



FACULTAD DE QUÍMICA Y DE FARMACIA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

**LABORATORIO DE QUÍMICA TEÓRICA COMPUTACIONAL (QTC)
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA
ESCUELA DE QUÍMICA**

MECANISMO DE HIDROXILACIÓN DE LA DOPAMINA β -
MONOOXIGENASA PARA LA FORMACIÓN DE NOREPINEFRINA

ANGIE CAROLAY FORERO GIRÓN

Tesis para optar al Grado
Académico de Doctor en
Química.

Director de Tesis : **Dr. Alejandro Toro-Labbé**

Santiago de Chile, Junio de 2022

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE QUÍMICA Y DE FARMACIA
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

**MECANISMO DE HIDROXILACIÓN DE LA DOPAMINA β -
MONOOXIGENASA PARA LA FORMACIÓN DE NOREPINEFRINA**

Tesis presentada por:

ANGIE CAROLAY FORERO GIRÓN

Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Química

APROBADA POR:

DR. PABLO JAQUE OLMEDO
Profesor examinador

DR. CLAUDIO OLEA AZAR
Profesor examinador

DR. GERALD ZAPATA TORRES
Profesor examinador

DR. DAVID PESSOA MAHANA
Profesor examinador

DR. ALEJANDRO TORO LABBÉ
Director de Tesis

Junio 2022

Al amor de una madre que todo lo puede, a su fortaleza que todo lo vuelve
ternura, a ti madre, gracias por tu amor y apoyo incondicional.

Para ti son todos mis triunfos.

AGRADECIMIENTOS

Realizar un doctorado es una experiencia que complace al niño científico y forma el guerrero investigador, gracias a todas las personas que me acompañaron en este proceso.

Agradezco a mi director de tesis, el Dr. Alejandro Toro-Labbé, por abrirme las puertas de su laboratorio para desarrollar mi tesis de investigación, por sus enseñanzas sobre la Química Teórica y especialmente por su calidez humana durante todos estos años, muchas gracias por escucharme y brindarme sus consejos en los momentos más difíciles. Agradezco a los compañeros actuales ó exmiembros del grupo de investigación de Química Teórica Computacional: Alessandra Misad, Francisca Benítez, Felipe Urcelay, Dr. Nery Villegas, Dra. Daniela Guzmán, Dra. Rocío Duran, Dr. Cesar Barrales, Dra. Barbara Herrera y Dra. Soledad Gutiérrez por su acompañamiento en el laboratorio, su apoyo en el manejo de programas, por las discusiones científicas y por las enseñanzas brindadas.

Agradezco al comité de esta tesis: Dr. Pablo Jaque, Dr. David Pessoa, Dr. Claudio Olea y Dr. Gerald Zapata por su disposición para resolver dudas, brindar aportes y sugerencias sustanciales para mejorar esta investigación.

Me reservo mis agradecimientos más profundos a mi madre Bellanir Becerra, quien con su ejemplo diario me demuestra la fortaleza que tenemos dentro, gracias mamá por ser mi ejemplo en la vida. Gracias a mi familia: a mi tías, especialmente a mi tía Mayer y a mi tía Nohora, a mi padre Jesús Forero, a mis hermanas y hermanos, y a mis abuelos en el cielo. Gracias por su guía, apoyo y amor durante todos estos años.

Un cálido agradecimiento a mis amigos de la carrera y de vida: Oriel Sánchez, Juan David Figueroa, Paula Rivero, Alexander Córdoba, Andrés Lancheros, Kelly Zuñiga, Yeniffer Usuriaga, Diana Agredo, Marcela Muñoz, Mauricio Varas y Eider Muñoz por su amor, apoyo incondicional y por ser mi familia en Colombia y en Chile.

Finalmente, agradezco a la Escuela de Graduados de la Pontificia Universidad Católica de Chile por la beca brindada para realizar mis estudios doctorales, al gobierno de Canadá por la beca ELAP para desarrollar la pasantía de investigación en The University of British Columbia, al proyecto FONDECYT 1181072 del Dr. Alejandro Toro-Labbé y a la Facultad de Química especialmente a la profesora Margarita Aliaga por la preocupación y el apoyo durante los tiempos de pandemia.

LISTA DE ABREVIACIONES

Algunas abreviaciones tienen sus siglas en inglés.

ξ	Coordenada intrínseca de reacción
ξ_R	Coordenada de la reacción en los reactantes
ξ_1	Coordenada de la reacción en el mínimo de la fuerza
ξ_2	Coordenada de la reacción en el máximo de la fuerza
ξ_R	Coordenada de la reacción en los productos
ϵ	Constante dieléctrica
BEP	Postulado de Brönsted- Evans-Polanyi
B3LYP	Funcional híbrida que incluye el intercambio y la correlación electrónica
$\text{Cu}^{\text{I}}_{\text{M}}$	Sitio de $\text{Cu}^{\text{I}}_{\text{M}}$ reducido
$\text{Cu}^{\text{II}}_{\text{M}}(\eta^1 - \text{OOH})$	Hidroperoxo de $\text{Cu}^{\text{II}}_{\text{M}}$
$\text{Cu}^{\text{II}}_{\text{M}}(\text{OH})(\text{OSutrato})$	Intermediario hidroxil: Radical formado por el reenlace del radical DP al complejo $\text{Cu}^{\text{II}}_{\text{M}}(\eta^1 - \text{OOH})$
$\text{Cu}^{\text{II}}_{\text{M}}(\eta^1 - \text{O}_2\cdot)$	Complejo superoxo $\text{Cu}^{\text{II}}_{\text{M}}$
Cu_{H}	Dominio de cobre que se une a 3 residuos de histidina.
Cu_{M}	Dominio de cobre que se une a 2 residuos de 2 histidina y 1 metionina
D β M	Dopamina β Monooxigenasa
DOMON	Dominio N-terminal de D β M
DP	Dopamina
$E(\xi)$	Energía Total
EM	Ecuación de Marcus
EPR	Resonancia Paramagnética Electrónica
$F(\xi)$	Fuerza de reacción
HAT	Hydrogen Atom Transfer (Abstracción de un átomo de hidrógeno)
HF	Metodología Hartree Fock
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital (Orbital molecular ocupado de más alta energía)
NCI	Índice de interacciones no covalentes
IRC	Método de la coordenada intrínseca de la reacción
$J(\xi)$	Flujo electrónico de reacción
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital (Orbital molecular desocupado de más baja energía)
MBC	Monooxigenasas binucleares de cobre no acopladas
MBO	Mayer Bond Order (Órdenes de enlaces de Mayer)
MOXD1	Monooxigenasa X
NP	Norepinefrina

P	Productos
PAL	Peptidil-alfahidroxi-glicina- α -amidante-liasa
PCET	Proton-coupled electron transfer (Transferencia electrónica acoplada a protón)
PCM	Modelo Continuo Polarizable
PDB – 4ZEL	Código del banco de información de proteínas para la estructura cristalográfica de la D β M humana.
PEP	Perfil de energía potencial
PFR	Perfil de la fuerza de la reacción
PH	Postulado de Hammond
PHM	Peptidilglicina α -hidroxilasa
PM	Potencial de Marcus
R	Reactantes
REF	Reaction Electronic Flux (Flujo electrónico de reacción)
RP	Región de los productos
RR	Región de reactantes
RTS	Región del estado de transición
SEP	Superficie de energía potencial
SNC	Sistema Nervioso Central
TE	Transfer Electron (Transferencia electrónica)
DFT(TFD)	Density Functional Theory (Teoría funcional de la densidad)
DM	Dinámica Molecular
TS	Transition State (Estado de transición)
T β M	Tiramina β -monooxigenasa
W	Trabajo de reacción

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIACIONES.....	IV
ÍNDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
RESUMEN	XII
ABSTRACT.....	XIV
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	16
1.1. DOPAMINA β -MONOOXIGENASA: DEFINICIÓN E IMPORTANCIA.....	16
1.2. MONOOXIGENASAS BINUCLEARES DE COBRE (MBC)	17
1.3. ESTRUCTURA CRISTALOGRAFICA DE LA D β M	23
1.4. HIPÓTESIS.....	26
1.5. OBJETIVOS	26
1.5.1. OBJETIVO GENERAL	26
1.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO Y METODOLOGÍA	27
2.1. CÁLCULOS TEÓRICOS DE LA ESTRUCTURA ELECTRÓNICA	27
2.2. SUPERFICIES DE ENERGÍA Y FUERZA DE REACCIÓN.....	28
2.3. DFT Y REACTIVIDAD QUÍMICA.....	31
2.3.1 Flujo Electrónico de Reacción.....	32
2.3.2 Índice de Interacciones no Covalentes	33
2.4. SELECCIÓN DEL SISTEMA A ESTUDIAR	34
2.5. OPTIMIZACIÓN	35
2.6. REACCIONES	36
2.7. SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR.....	39
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.1. MODELO SENCILLO DE LA ENZIMA DBM.	41
3.2. PRIMER PASO: ENLACE DE OXÍGENO AL COMPLEJO SUPEROXO DE COBRE	43
3.3. SEGUNDO PASO: ABSTRACCIÓN DEL ÁTOMO DE HIDRÓGENO (HAT).....	45
3.3.1. Conformaciones de la DP interactuando con el superoxo de Cu _M	45
3.3.2. Análisis del Perfil Energético de la Fuerza de Reacción.....	47
3.3.3. Análisis del reactivo activado	49
3.3.4. Interacciones no covalentes en el TS	50
3.3.5. Análisis del flujo electrónico de reacción (REF), Interacciones no covalentes y órdenes de enlaces de Mayer para la HAT.....	51
3.3.6. Descomposición física del REF	54
3.3.7. Descomposición química del REF	59

3.3.8. Eventos químicos que conducen el mecanismo de reacción en R2.....	61
3.3.9. Comparación de la barrera libre de Gibbs calculada computacionalmente y la extraída de los datos experimentales.....	62
3.4 PASOS SIGUIENTES EN EL MECANISMO PROPUESTO POR SOLOMON	64
3.4.1 Reenlace del radical dopamina al hidroperoxo de cobre (II)	64
3.4.2 Transferencia electrónica acoplada a un protón a la especie $\text{Cu}_M^{\text{II}}\text{OH} \cdot \text{OR}$	66
3.4.3. Transferencia protónica intramolecular (TPi) en $\text{Cu}_M^{\text{II}}\text{OH}_2\text{OR}$	67
3.4.4. Diagrama energético para la hidroxilación de la DP empleando el mecanismo de Solomon.	68
3.5. ABSTRACCIÓN DEL ÁTOMO DE HIDRÓGENO DESDE EL ASCORBATO	69
3.5.1. Perfiles de Energía y Fuerza de Reacción	72
3.6. SIMULACIÓN DE LA DOPAMINA BETA MONOOXIGENASA MEDIANTE SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR.	78
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFÍA	84
ANEXOS	97
ANEXO 1: OTRAS ACTIVIDADES.....	97
ANEXO 2: ALINEACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS EN MBC.	98
ANEXO 3: GRÁFICOS NCI PARA LOS TS DE LAS 4 REACCIONES DE HAT	99
ANEXO 4: ARTÍCULOS CIENTÍFICOS GENERADOS EN ESTA TESIS.....	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: ΔG para la reacción de intercambio de una molécula de agua por el oxígeno molecular en el complejo Cu_M	42
Tabla 2: Evaluación de diferentes parámetros en el complejo de Cu_M triplete utilizando diferentes niveles de teorías.	44
Tabla 3: Información energética para las reacciones de HAT desde dopamina en fase gaseosa y medio proteico. Trabajos de reacción en medio proteico son dados en paréntesis para R1 y R2. Todos los valores están en kcal/mol.....	47
Tabla 4: Energía libre de Gibbs para las cuatro reacciones de HAT estudiadas.....	62
Tabla 5: Energética y trabajos de reacción para la HAT desde ascorbato al superoxo de cobre. En paréntesis se detalla el porcentaje de la $\Delta E^\ddagger$ asociado a cada trabajo de reacción.	76
Tabla 6: Índices globales para la dopamina acoplada al complejo de Cu.....	79
Tabla 7: Cargas atómicas en la dopamina y en el complejo de cobre. q_{frag} = Carga atómica en el fragmento, q_{Supe} = Carga atómica en la supermolécula.	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Reacción de hidroxilación de la dopamina a norepinefrina catalizado por la DβM	16
Figura 2: Esquema representativo del sitio activo de la enzima DβM. Coordenadas extraídas de PDB-4ZEL [17] y graficadas en Pymol.	18
Figura 3: Transferencia de dos electrones desde el ascorbato a la enzima. Dos moléculas de ascorbato se oxidan en 2 moléculas de radical ascorbato liberando 2 electrones que son capturados por los dos Cu(I) de la enzima.	19
Figura 4: (a) Complejo precatalítico encontrado en la enzima PHM. Este complejo está formado por: el centro de Cu _M (His242, His244 y Met314), el oxígeno unido al cobre y el sustrato (péptido IYT) cercano al oxígeno. (b) Estructura del sitio del enlace de dioxígeno. La coordinación del oxígeno al Cu _M es monodentada. Figuras tomadas desde Sean T. Priggle et al. Science 2004; 304: 864-867.	19
Figura 5: Mecanismo de mínima energía propuesto por Solomon y colaboradores para los pasos de la hidroxilación del sustrato formilglicina en la PHM. Los valores de energía libre ΔG° y $\Delta G^\ddagger$ están en kcal/mol a 298 K. Figura tomada desde Ryan E. Cowley et al. PNAS 2016;113:43:12035-12040.	21
Figura 6: (a) Diagrama de orbitales moleculares para el complejo triplete Cu _M ^{II} $\eta^1 - O_2^-$. (b) Orbital molecular frontera LUMO para la PHM. Figuras tomadas desde Ryan E. Cowley et al. PNAS 2016; 113:43:12035-12040.	22
Figura 7: Estructura de la DβM humana. (a) Estructura tridimensional de la DβM y sus dominios. (b) Conformaciones de los dos sitios activos de la enzima. La conformación cerrada puede observarse en la cadena A y la conformación abierta puede detallarse en la cadena B. Figuras tomadas desde Vendelboe et al. Sci. Adv. 2016; 2: e1500980.	24
Figura 8: Mecanismo flip-flop propuesto para la DβM. La conformación abierta carga la dopamina y a medida que se van cerrando se va produciendo la reacción, la conformación cerrada facilita la TE. Figuras tomadas desde Vendelboe et al. Sci. Adv. 2016; 2: e1500980.	25
Figura 9: Superficie de energía potencial para un sistema molecular.	28
Figura 10: Perfiles genéricos de la energía (a) y la fuerza de reacción (b) para una reacción de un paso. Dos puntos críticos (ξ_1 y ξ_2) en RF delimitan las regiones de reacción.	30
Figura 11: Gráfica de s vs el signo $\lambda \cdot \rho$ para tres diméros: agua, biciclo 2,2,2 octano, y metano. Ejercicio Manual NCIPLOT [116].	34
Figura 12: Gráfica de interacciones no covalentes entre un sistema sustrato-proteína.	34
Figura 13: Estructuras químicas de la unión del oxígeno al sitio Cu _M (a) Coordinación bidentada y (b) Coordinación monodentada del oxígeno al Cu _M	36
Figura 14: Reacción de transferencia del átomo de hidrógeno desde dopamina (DP) al complejo superoxo de cobre (II) para formar el radical dopamina y el complejo hidroperoxo de cobre	

(II). Para claridad, los dos hidrógenos del carbono β de la dopamina son diferenciados con subíndices R o S.....	37
Figura 15: Estructura para las dos conformaciones de DP interactuando con el complejo superoxo. (a) Sin interacción (b) Con un enlace de hidrógeno.....	37
Figura 16: Estructura química del sitio Cu _M His412, His414, Met487 sin (a) y con (b) una molécula de agua coordinada al átomo de Cu. La estructura en (a) es etiquetada como A0 y la estructura en (b) es llamada A.....	41
Figura 17: Orbitales fronteras de las especies superoxo Cu _M (a) Orbitales moleculares HOMO y LUMO del superoxo Cu _M singlete (b) Orbitales moleculares betas (no ocupado) SOMO y SOMO-1 del superoxo Cu _M triplete.....	43
Figura 18: Interacción entre la dopamina y el sitio de Cu _M ^{II} $\eta^1 - O_2^-$. La dopamina se encuentra en la conformación 2, donde dos interacciones entre las especies pueden ser vistas: un enlace de hidrógeno entre la amina de la dopamina y el oxígeno proximal del superoxo y la interacción para la HAT.	46
Figura 19: Perfiles de energía y de fuerza de reacción de las cuatro reacciones de HAT en fase gas. Los recuadros muestran una vista amplia de las regiones del estado de transición que amplifican los intervalos $\xi_1 = -0,422$ a $\xi_2 = 0,195$ en R1; $\xi_1 = -0,285$ a $\xi_2 = 0,285$ en R2; $\xi_1 = -0,390$ a $\xi_2 = 0,195$ en R3 y $\xi_1 = -0,254$ a $\xi_2 = 0,318$ en R4.....	48
Figura 20: Interacciones no covalente de los estados de transición de las dos reacciones de HAT desde dopamina al complejo superoxo de cobre (II). Interacciones atractivas son representadas en superficies azules-verdes mientras que interacciones repulsivas son representadas por superficies rojas-amarillas.	51
Figura 21: Flujo electrónico de reacción y órdenes de enlace de Mayer para R1 y R1(p). Note que los órdenes de enlace de ambas reacciones están superpuestos el uno con el otro.	52
Figura 22: Flujo electrónico de reacción y órdenes de enlace de Mayer para R2 y R2(p). Note que los órdenes de enlace de ambas reacciones están superpuestos el uno con el otro.	53
Figura 23: Definición de los fragmentos empleados en el método counterpoise para las dos reacciones.....	54
Figura 24: Flujo de polarización para la supermolécula y los dos fragmentos en R1 y R2. En cada perfil, los gráficos NCI son mostrados para los máximos de cada $Jp(\xi)$	55
Figura 25: Interacciones no covalentes para las dos estructuras en los dos máximos de Jp para las reacciones R1 y R2. A la izquierda se visualiza la estructura en la coordenada de reacción para el primer máximo de Jp antes de la HAT y a la derecha se muestra la estructura de la supermolécula en la coordenada para el segundo máximo de Jp después de la HAT.	56
Figura 26: Flujo de transferencia para la supermolécula y los dos fragmentos en R1 y R2. ..	57
Figura 27: Flujo electrónico de reacción expresado en términos de polarización y transferencia para R1 y R2.	58
Figura 28: Flujo electrónico de reacción expresado en términos de electrofilia y transferencia (a,c) y en términos de dureza y polarización (b,d) para ambas reacciones (R1, R2).	60
Figura 29: Principales cambios estructurales en R2 a lo largo de la reacción	61

Figura 30: Reenlace del radical DP sobre el complejo hidroperoxo de cobre (II).....	64
Figura 31: Conversión desde el producto de la HAT in R2 hasta el complejo reactivo para el reenlace de la dopamina en el hidroperoxo de cobre (II).	64
Figura 32: Estructuras optimizadas para el reactante, ts y producto de la reacción de reenlace del radical DP al hidroperoxo de cobre (II).	65
Figura 33 Arriba: Transferencia electrónica acoplada a protón (PCET) a la especie $\text{Cu}_M^{\text{II}}(\text{OH})(\cdot \text{ODp})$ para formar la $\text{Cu}_M^{\text{II}}(\text{OH}_2)(\text{ODp})$. Abajo: Oxidación del centro de cobre Cu_H^{I} a Cu_H^{II}	66
Figura 34: Estructuras optimizadas para el reactante, ts y producto de la reacción de TPi en el $\text{Cu}_M^{\text{II}}\text{OH}_2\text{OR}$	67
Figura 35: Diagrama de energía libre de Gibbs para la hidroxilación de dopamina.....	68
Figura 36: Reacción de abstracción del átomo de hidrógeno desde el ascorbato por el superoxo de cobre (II).....	69
Figura 37: Estructuras optimizadas y gráficos NCI para reactantes, estado de transición y producto de la reacción de HAT desde el ascorbato.	70
Figura 38: Coordenada escaneada (distancia O47-H67) en la reacción de HAT desde el ascorbato al superoxo de cobre.	72
Figura 39: Perfil de energía potencial obtenido desde el scan de la distancia entre el O distal del superoxo y el hidrogeno abstraído del ascorbato, distancia O47-H67.	73
Figura 40: Intermediario generado en el pozo de energía potencial. Se observa un cambio en la esfera de coordinación del cobre.....	74
Figura 41: Perfiles de energía potencial obtenidos desde el scan de la distancia O47-H67. En la curva morada, se fijó el enlace Cu-S y en la curva verde se fija el diedro formado entre los átomos coordinados al cobre.....	74
Figura 42: Estructuras antes y después del salto de energía en el scan. La diferencia entre ambas estructuras es el rompimiento de un enlace oxígeno-HN(His) y la posterior formación de una interacción oxígeno-HC(His).	75
Figura 43: Perfiles de energía y fuerza de reacción de la HAT desde ascorbato al superoxo de cobre.....	76
Figura 44: Órdenes de enlace de Mayer para la reacción de HAT desde el ascorbato al superoxo de cobre. A la izquierda se encuentra la estructura con la numeración atómica para lograr una mejor comprensión de los enlaces que se describen.	77
Figura 45: DP y el ácido ascórbico acoplado en la D β M usando AutoDock Vina.	78
Figura 46: (a) Estructura optimizada de $\text{Cu}_M - \text{H}_2\text{O}$ con THR413 y dopamina acoplada. (b) Interacciones no covalentes del complejo $\text{Cu}_M - \text{H}_2\text{O}$, THR413 y dopamina (c) Potencial electrostático del $\text{Cu}_M - \text{H}_2\text{O}$, THR413 y dopamina.....	79
Figura 47: Análisis de las energías (a), temperatura (b), presiones instantáneas (c) y densidad (d) de los 1,6 ps de dinámica molecular.....	81

RESUMEN

La dopamina β monooxigenasa (D β M) es una enzima que cataliza la reacción de hidroxilación desde dopamina (DP) a norepinefrina (NP). Esta conversión tiene relevancia biológica debido a que la desregulación de estos neurotransmisores (DP y NP) ha sido asociada a diferentes enfermedades neurológicas o enfermedades relacionadas con la presión arterial, por ejemplo, altas concentraciones de DP han sido asociadas a hipotensión, y un aumento de la concentración de NP ha sido asociada a hipertensión. En este contexto, entender el mecanismo de las etapas que determinan la conversión DP $\rightarrow$ NP es muy relevante y puede conducir a avances sustantivos en el tratamiento de diversas enfermedades donde el equilibrio DP $\rightleftharpoons$ NP se ve alterado.

La D β M presenta un centro de cobre como sitio activo que captura oxígeno molecular y activa un enlace C-H de la DP, la activación de este enlace es un paso crucial para que ocurra la hidroxilación de DP hasta NP. En este trabajo se analizan a profundidad los dos primeros pasos elementales de este mecanismo: la oxigenación de la enzima D β M y la activación del enlace C-H necesaria para la transferencia del átomo de hidrógeno (Hydrogen atom transfer, HAT) desde el carbono β de la DP hasta el superoxo previamente formado en el sitio catalítico luego de la captura de una molécula de oxígeno. Entonces, el primer paso consiste en la interacción de oxígeno molecular con el complejo de cobre Cu^I_M en la enzima D β M para formar un superoxo de cobre Cu^{II}_M(O₂^{•-}). El segundo paso de la reacción es la HAT desde la DP al complejo superoxo en la enzima catalizadora D β M para formar un intermediario hidroperoxo y el radical dopamina.

En esta tesis, se realizó una caracterización teórica detallada de la HAT usando dos conformaciones de la DP que conducen a cuatro posibles reacciones de HAT, dos de las cuales condujeron al enantiómero producido por la enzima. En las dos reacciones que conducen al enantiómero correcto se estudió el efecto del solvente mediante un modelo continuo polarizable. Se encontró que un enlace de hidrógeno entre la DP y el complejo superoxo en la enzima catalizadora D β M, fortalece la interacción enzima-sustrato y facilita la HAT, la cual toma lugar selectivamente para dar la forma enantiomérica del producto deseado. Las cuatro reacciones que llevaron al intermediario hidroperoxo fueron analizadas usando herramientas teóricas y computacionales con el fin de identificar el mecanismo más probable. El análisis de la fuerza de reacción demostró que la naturaleza de la energía de activación es principalmente de tipo estructural y es debida al acercamiento de las especies para así facilitar la HAT. Por otra parte, el análisis del flujo electrónico de reacción reveló que la actividad electrónica que conduce la reacción es iniciada por efectos de polarización, seguida de efectos de transferencia y finalizada nuevamente con efectos de polarización. Además, en la reacción más probable, la HAT toma lugar

concertadamente y con actividad electrónica que ocurre de manera no-espontánea inducida por fuertes cambios estructurales.

También analizamos en este trabajo de tesis, un mecanismo alternativo propuesto recientemente, que plantea la posibilidad de que la HAT al superoxo se lleve a cabo desde el ascorbato, en lugar de la DP. Esta reacción presenta una menor barrera de energía libre de Gibbs, por lo que se espera que estudios experimentales puedan corroborar estos resultados.

ABSTRACT

Dopamine β monooxygenase (D β M) is an enzyme that catalyzes the hydroxylation reaction from dopamine (DP) to norepinephrine (NP). This conversion has biological relevance because deregulation of these neurotransmitters (DP and NP) has been associated with different neurological or blood pressure diseases, for example, high DP concentrations have been linked to hypotension, and an increase in NP concentration has been associated with hypertension. In this context, understanding the mechanism of the steps that determine the DP $\rightarrow$ NP conversion is relevant and can lead to substantive advances in treating various diseases where the DP $\rightleftharpoons$ NP balance is altered.

D β M has a copper center as an active site that captures molecular oxygen and activates a C-H bond of DP, the activation of this bond is a crucial step for the hydroxylation of DP to NP. In this work, the first two elementary steps of this mechanism are analyzed in-depth: the oxygenation of the enzyme D β M and the activation of the C-H bond necessary for the transfer of the hydrogen atom (Hydrogen atom transfer, HAT) from the carbon β of the DP to the previously formed superoxo at the catalytic site after the capture of an oxygen molecule. Therefore, the first step studies the interaction of molecular oxygen with the copper complex Cu^I_M in the enzyme D β M to form a copper superoxo Cu^{II}_M(O₂^{•-}). The second step in the reaction is HAT from DP to the superoxo complex on D β M to form a hydroperoxo intermediate and the dopamine radical.

In this thesis, a detailed theoretical characterization of HAT was performed using two DP conformations leading to four possible HAT reactions, two of which led to the enantiomer produced by the enzyme. In the two reactions that lead to the correct enantiomer, the effect of the solvent was studied using a polarizable continuum model. It was found that a hydrogen bond between DP and the superoxo complex in the enzyme catalyst D β M strengthens the enzyme-substrate interaction and facilitates HAT, which takes place selectively to give the enantiomeric form of the desired product. The four reactions that led to the hydroperoxo intermediate were analyzed using theoretical and computational tools to identify the most probable mechanism. The reaction force analysis showed that the nature of the activation energy is mainly structural because of the approach of the species to facilitate HAT. On the other hand, the reaction electron flux analysis revealed that the electronic activity driving the reaction is initiated by polarization effects, followed by transfer effects, and terminated again by polarization effects. Furthermore, in the most likely reaction, HAT takes place in concerted and with electronic activity occurring non-spontaneously induced by strong structural changes.

In this thesis work, we also analyze a recently proposed alternative mechanism, which raises the possibility that HAT to superoxo is carried out from ascorbate, instead of DP.

This reaction presents a lower Gibbs free energy barrier, so it is expected that experimental studies can corroborate these results.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. DOPAMINA β -MONOOXIGENASA: DEFINICIÓN E IMPORTANCIA

La dopamina β -monooxigenasa (D β M) o dopamina β -hidroxilasa (D β H) es una enzima vesicular que cataliza la reacción de hidroxilación desde dopamina (DP) a norepinefrina (NP) en la ruta biosintética de las catecolaminas.

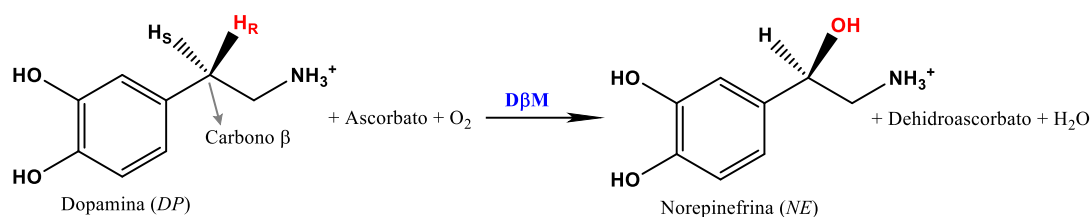


Figura 1: Reacción de hidroxilación de la dopamina a norepinefrina catalizado por la D β M

Esta ruta sintética es considerada fundamental en el organismo porque controla y regula la concentración de DP, NP y otros neurotransmisores derivados que son esenciales en diferentes procesos fisiológicos [1].

Se ha reportado que la liberación de NP es mínima en el descanso y se eleva durante el desvelo, pero su máximo se presenta durante situaciones de estrés o peligro [2,3]. Desregulación en estos compuestos, ha sido vinculada con diferentes enfermedades que incluyen la hipertensión arterial, depresión, ansiedad, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, drogadicción, entre otros [4].

Dentro de las principales causas de la desregulación de estos sistemas se encuentra el déficit de la funcionalidad de la D β M que es originada por la alteración en la actividad enzimática conllevando a un descontrol de la actividad catalítica. Altas concentraciones de DP han sido asociadas a hipotensión, y un aumento de la concentración de NP ha sido asociada a hipertensión. También, se ha encontrado que el aumento en la concentración de DP de las personas que sufren de déficit de D β M es igual a la reportada en pacientes con depresión, esquizofrenia y migrañas [5–7]. Incluso se ha reportado que la ausencia de la funcionalidad de D β M causadas por alteraciones en el gen de D β M, produce la muerte del feto en el útero de biomodelos [8].

Gracias a la relevancia biológica de esta enzima, existe un gran número de estudios sobre su funcionamiento, sin embargo, su mecanismo de hidroxilación ha sido difícil de elucidar y diferentes propuestas han sido debatidas durante años. La principal dificultad para entender el mecanismo de hidroxilación que realiza la D β M ha sido la

dificultad en la caracterización y la captura experimental de los intermediarios del mecanismo de reacción [9,10].

La D β M es una enzima que está clasificada dentro de las enzimas monooxigenasas binucleares de cobre (MBC) [11]. Para conocer más sobre el mecanismo de la enzima D β M, se presentará la información disponible en la literatura sobre el mecanismo de las MBC. En este proyecto de investigación, se examinará detalladamente el mecanismo de hidroxilación propuesto para las MBC y se aplicará en la conversión de DP a NP. La próxima sección describirá las MBC y su mecanismo de hidroxilación.

1.2. MONOOXIGENASAS BINUCLEARES DE COBRE (MBC)

Las monooxigenasas binucleares de cobre son una clase de enzimas activantes de oxígeno que contienen dos átomos de cobre, estas enzimas están involucradas en la hidroxilación regio y estereoespecífica de enlaces C – H en compuestos fisiológicamente importantes. Las MBCs son esenciales porque permiten controlar la síntesis de neurotransmisores y hormonas en el organismo [12–15]. Dentro de estas enzimas, se encuentran la dopamina β -monooxigenasa (D β M), la tiramina β -monooxigenasa (T β M) y la peptidilglicina α -hidroxilasa (PHM) que se caracterizan por presentar un núcleo catalítico con dos átomos de cobre no acoplados.

Las funciones fisiológicas de estas enzimas son diferentes, sin embargo, presentan alta similitud estructural entre ellas, lo que hace que la reacción de hidroxilación proceda por un mecanismo similar [10]. La T β M presenta un 39% de identidad y un 55% de similitud y la PHM muestra un 32% identidad y un 40% de similitud de secuencia con respecto a D β M [16]. De igual forma, fue reportado que el núcleo catalítico es similar entre estas tres enzimas (25-88%) (Anexo 1) [17].

El núcleo catalítico de las MBC está compuesto por dos dominios de cobre, cada dominio contiene un átomo de cobre, conocidos como Cu_H y Cu_M (alternativamente llamados Cu_A y Cu_B) [16]. La Figura 2 muestra el sitio activo de las MBC constituido por los dos átomos de cobre, cada uno con diferente entorno de coordinación. El Cu_M tiene una coordinación tetraédrica, está enlazado a una metionina, dos histidinas y una molécula de agua [20,21], y es el lugar donde se activa el oxígeno, funcionaliza el enlace C-H [22] e hidroxila el sustrato. En cambio, el Cu_H está rodeado de tres histidinas y es la zona donde ocurre la transferencia electrónica (TE) por lo que es considerado el regulador electrónico de la reacción [23]. Debido a que los dos átomos de cobre se encuentran separados por ~12 Å y no se ha encontrado evidencia de ligandos puente entre ellos, estos cobres no presentan acoplamiento magnético ni electrónico.

Las reacciones de hidroxilación de las MBC, se llevan a cabo en este único sitio activo [24–26] empleando oxígeno molecular y un donador de electrones (ascorbato) como cofactor.

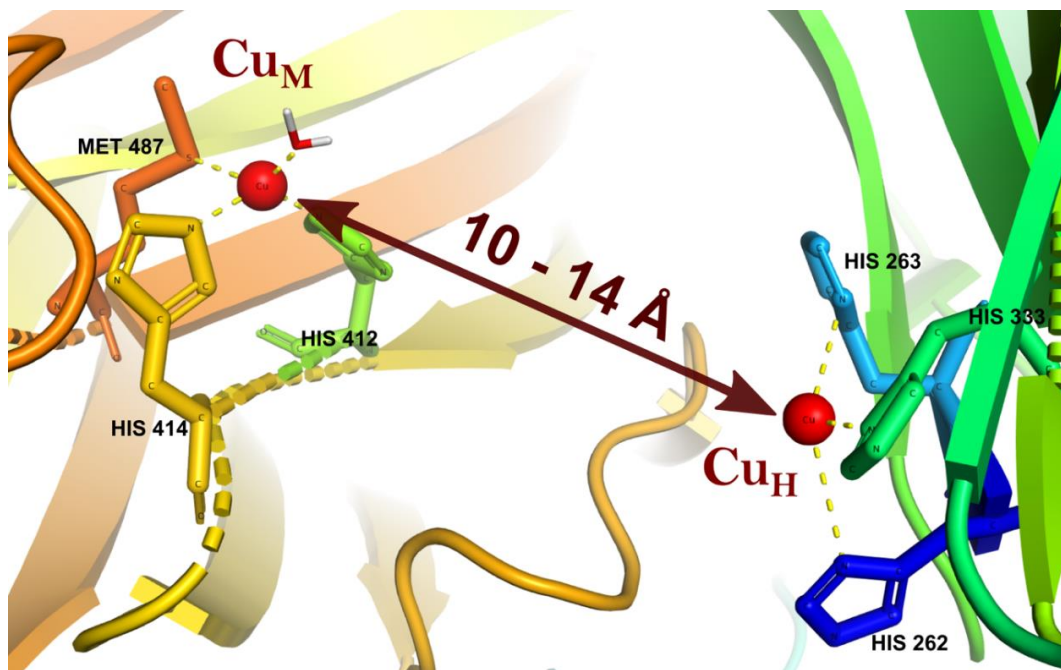


Figura 2: Esquema representativo del sitio activo de la enzima **DβM**. Coordenadas extraídas de PDB-4ZEL [17] y graficadas en Pymol.

El mecanismo de estas enzimas ha sido discutido por años debido a su importancia fisiológica, sin embargo, han existido dificultades que no han permitido elucidar el mecanismo exacto de hidroxilación. Estas dificultades son: la obtención de los cristales de las enzimas, la caracterización de los intermediarios de reacción y la dificultad de modelarlos teóricamente. En las últimas décadas, gracias a los avances experimentales y teóricos se ha logrado proponer modelos que permiten entender los pasos iniciales en el mecanismo de reacción [23–27].

Entre los resultados experimentales sobre el mecanismo de reacción, los estudios de rayos X, de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR, por sus siglas en inglés) en los átomos de cobre y los estudios de oxidación del ascorbato permitieron inferir información sobre la etapa inicial donde se activan las monooxigenasas, Figura 3. Inicialmente las monooxigenasas se encuentran con los átomos de Cu en estado de oxidación II, sin embargo al estar en contacto con el ascorbato del medio vesicular ocurre una transferencia de electrones desde el ascorbato a la enzima, reduciendo los dos centros de cobre desde Cu (II) a Cu (I) [28–31].



Figura 3: Transferencia de dos electrones desde el ascorbato a la enzima. Dos moléculas de ascorbato se oxidan en 2 moléculas de radical ascorbato liberando 2 electrones que son capturados por los dos Cu(I) de la enzima.

También, se destacan los estudios experimentales de Klinman y Miller sobre los efectos isotópicos cinéticos primarios que jugaron un papel importante en establecer que el sustrato (dopamina) y el oxígeno se unen a la enzima y posteriormente ocurre el rompimiento irreversible del enlace C-H desde la dopamina [14,32,33].

De los estudios experimentales, el hallazgo más relevante fue realizado por Amzel y colaboradores en el 2004. Estos investigadores encontraron una estructura ternaria en un cristal de una MBC (la enzima PHM), formada por una molécula de oxígeno molecular enlazada de forma monodentada al Cu_M y con el sustrato muy cerca de este sitio. La Figura 4 muestra esta estructura que ha sido llamada complejo precatalítico [29].

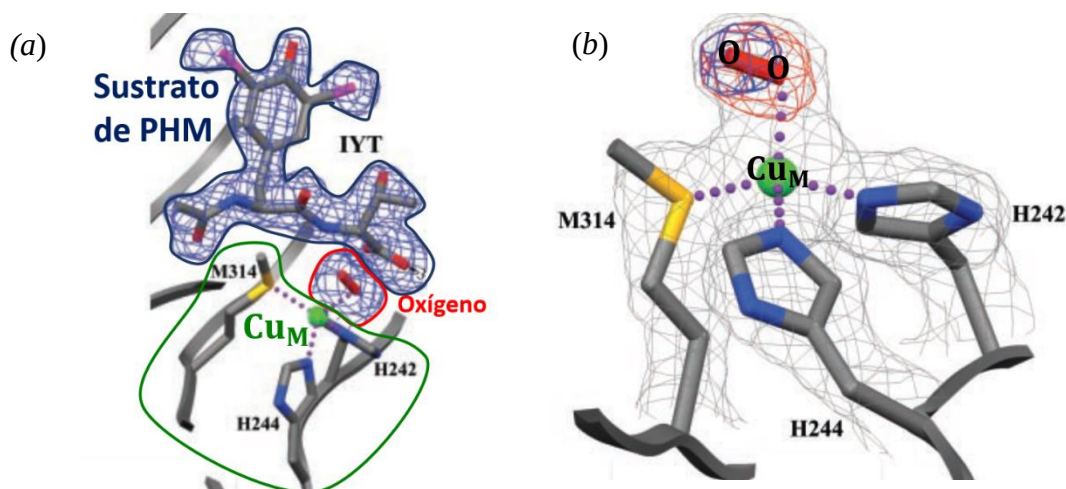


Figura 4: (a) Complejo precatalítico encontrado en la enzima PHM. Este complejo está formado por: el centro de Cu_M (**His242, His244 y Met314**), el oxígeno unido al cobre y el sustrato (péptido IYT) cercano al oxígeno. (b) Estructura del sitio del enlace de dioxígeno. La coordinación del oxígeno al Cu_M es monodentada. Figuras tomadas desde Sean T. Priggle et al. Science 2004; 304: 864-867.

La investigación de Amzel y colaboradores es significativa porque caracteriza el primer intermediario en el mecanismo de estas reacciones, indicando el sitio de unión del

oxígeno en la enzima y proponiendo la formación de un superóxido de cobre (II). Amzel y colaboradores, también comprueban que este intermediario no es formado cuando la enzima está oxidada (los dos átomos de cobre, Cu_M y Cu_H , se encuentran en estados de oxidación (II)) o cuando la enzima está reducida en ausencia de sustrato [29,31]. Por lo tanto, se plantea que la unión del sustrato a la enzima ocurra antes que la unión de oxígeno al cobre [16]. Estos requisitos revelan el control en la unión y la activación de oxígeno para catalizar solo las especies de interés y evitar la producción de especies dañinas de oxígeno.

Con estos resultados experimentales fue posible establecer la secuencia de los pasos iniciales en el mecanismo general para las MBC. En primer lugar se lleva a cabo la reducción anaeróbica de los dos átomos de cobre (II) a cobre (I) por dos moléculas de ascorbato (donor de electrones) [34], que conlleva a la enzima reducida, (los dos átomos de cobre Cu_M y Cu_H en estados de oxidación (I)) y dos moléculas de radical ascorbato [31]. Luego, la enzima reducida enlaza al oxígeno y el sustrato, formando un complejo ternario o complejo precatalítico que permite realizar la abstracción del átomo de hidrógeno desde el sustrato. Debido a la falta de evidencia experimental, se desconoce los siguientes intermediarios y pasos de reacción, sin embargo, es aceptado que el Cu_H se oxida para realizar finalmente la hidroxilación del sustrato y la regeneración de la enzima [16,35–40].

Con esta información, fue posible proponer que estas monooxigenasas operan por un mecanismo de dos electrones que eran transferidos controladamente en dos pasos diferentes de la reacción. En un primer paso, cuando el oxígeno se enlaza al Cu_M generando la reducción del oxígeno y la oxidación del Cu_M^I , y en un segundo paso, en la transferencia de 1 electrón desde el Cu_H^I al Cu_M [41].

A la luz de estos resultados experimentales, diferentes estudios teóricos fueron proponiendo el ciclo catalítico completo de estas enzimas. Uno de los más recientes, es el mecanismo de Solomon y colaboradores en 2016, que utilizan un modelo representativo de estas enzimas y estudian el mecanismo mediante cálculos basados en la teoría funcional de la densidad (DFT) [9,29]. La Figura 5 muestra un diagrama energético con los pasos de la reacción descrito por Solomon y colaboradores en donde se resaltan: la unión del oxígeno molecular, la abstracción de un átomo de hidrógeno, la transferencia electrónica acoplada a protón y la liberación del producto en una MBC.

El mecanismo inicia desde un centro reducido de Cu_M^I que sufre una oxidación mediante la coordinación monodentada del oxígeno para formar un radical superóxido $\text{Cu}_M^{II} (\eta^1 - \text{O}_2^{\cdot-})$. En este paso, el Cu_M^I se oxida a Cu_M^{II} cediendo 1 electrón al oxígeno el cual se reduce a superóxido. Esta especie ha sido propuesta como la responsable de la abstracción del átomo de hidrógeno desde el sustrato.

En la reducción del oxígeno molecular a superoxo, el oxígeno se puede coordinar al cobre de manera monodentada o bidentada. Para entender la coordinación del oxígeno, Solomon y Fujisawa [42] propusieron optimizar teóricamente dos complejos modelos de estas enzimas. En sus resultados encontraron que, en el superoxo con la coordinación bidentada, cada oxígeno presenta un carácter del 32% del orbital LUMO y en la coordinación monodentada el oxígeno distal presenta un carácter del 49% del orbital LUMO. Por lo tanto, el oxígeno unido de forma monodentada está más activado para la abstracción del átomo de hidrógeno [41].

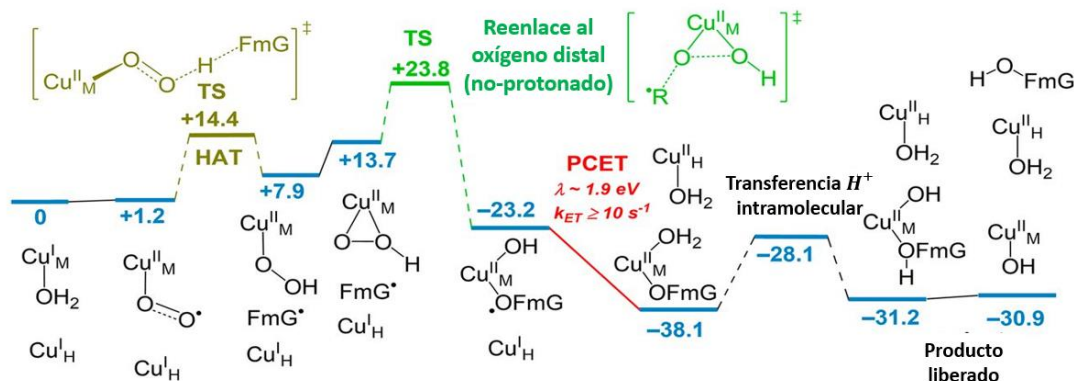


Figura 5: Mecanismo de mínima energía propuesto por Solomon y colaboradores para los pasos de la hidroxilación del sustrato formilglicina en la **PHM**. Los valores de energía libre ΔG° y $\Delta G^\ddagger$ están en kcal/mol a 298 K. Figura tomada desde Ryan E. Cowley et al. PNAS 2016;113:43:12035-12040.

Un mecanismo alternativo planteaba la reducción del oxígeno por dos electrones hasta hidroperoxo de cobre [9]. Sin embargo, los estudios teóricos y espectroscópicos de Solomon y Fujisawa, fueron relevantes para descartar la formación del hidroperoxo [10]. Se creía que la especie hidroperoxo realizaba la abstracción del átomo de hidrógeno desde sustrato. Sin embargo, los estudios de orbitales moleculares fronteras sobre un complejo modelo de cobre [42], describió un orbital LUMO con un carácter del 2% en el oxígeno distal y un 17% en el oxígeno proximal, lo que indicó que esta especie no estaba activada para la abstracción del átomo de hidrógeno. Estudios adicionales sobre la coordenada de reacción evaluaron la reducción de oxígeno por 1 ó 2 electrones. La reducción de oxígeno por dos electrones para generar el intermediario hidroperoxo $\text{Cu}_M(\text{II}) - \text{OOH}$ presentó una barrera de activación mayor a 40 kcal/mol [43]. En cambio, la reducción de oxígeno por un electrón para generar una especie superoxo presentó una barrera de activación de aproximadamente 20 kcal/mol, que es consistente con los resultados experimentales [16].

La formación de la especie superoxo de cobre (II) ha sido respaldada por el complejo precatalítico encontrado por Amzel y colaboradores [29], la consistencia con las señales EPR [44] y ha sido confirmada por varios compuestos sintéticos modelos de las MBC [27,45]. Además, su capacidad para abstraer un hidrógeno ha sido probada

mediante un estudio en el 2021, donde un nuevo modelo de superoxo para las MBCs fue reportado con reactividad para reacciones de HAT [23].

Se ha encontrado que una coordinación monodentada del oxígeno al cobre está correlacionada con una multiplicidad triplete. Como se observa en la Figura 6 a, el origen de esta multiplicidad triplete viene dada porque un orbital π_σ^* del superoxo se superpone con un orbital d_{z^2} del Cu (II) para generar un orbital σ de enlace ($d_{z^2} + \pi_\sigma^*$) y uno σ de antienlace ($d_{z^2} - \pi_\sigma^*$), dejando el segundo orbital π_v^* del superoxo no enlazado [27]. Cuando la diferencia energética entre el orbital π_v^* y el orbital σ de antienlace ($d_{z^2} - \pi_\sigma^*$) es pequeña, estos dos orbitales estarán semi ocupados para generar una multiplicidad triplete.

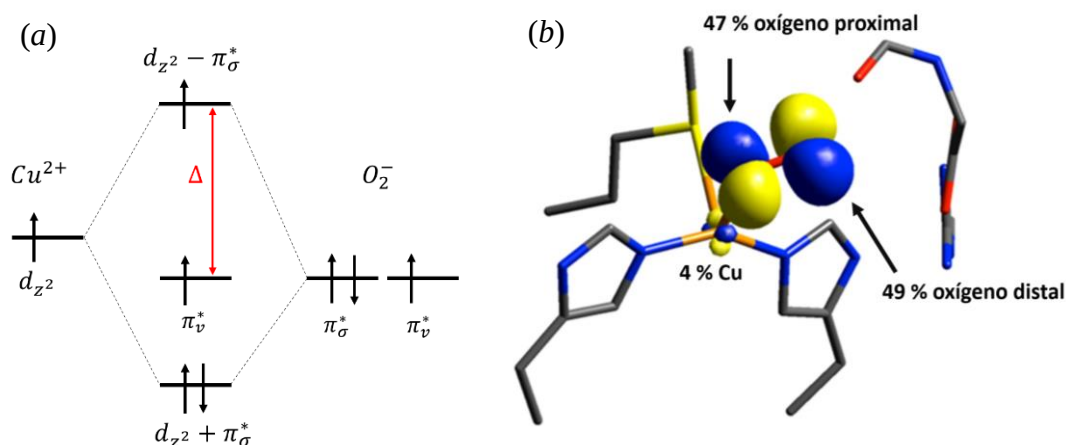


Figura 6: (a) Diagrama de orbitales moleculares para el complejo triplete $Cu^{II}_M(\eta^1 - O_2^{\cdot-})$. (b) Orbital molecular frontera LUMO para la PHM. Figuras tomadas desde Ryan E. Cowley et al. PNAS 2016; 113:43:12035-12040.

El enlace σ débil entre el oxígeno del superoxo y el cobre no supera la energía para un giro de espín. Entonces, un orbital semivacío π_v^* localizado principalmente en el oxígeno distal del superoxo, con una contribución del 49% al orbital LUMO, está activado para realizar la HAT sobre el sustrato (Figura 6 b) [46].

Esta información fue evidencia suficiente para aceptar que el oxígeno se coordinaba de forma monodentada al sitio de cobre, manteniéndose activado para realizar la transferencia de hidrógeno sobre el sustrato.

Siguiendo con el mecanismo de Solomon (Figura 5), una vez que se obtiene la especie superoxo de cobre (II), ocurre la abstracción de un átomo de hidrógeno del sustrato [29,38,47]. El electrón transferido en este proceso se aloja en el orbital molecular π_v^* generando así el hidroperoxo de cobre (II) y un radical del sustrato. La barrera calculada para la HAT desde el sustrato formilglicina fue de $\Delta G^\ddagger = 22,2$ kcal/mol. Este valor encontrado es similar al presentado por el complejo LPheCuO₂ que presenta una

barrera experimental para la HAT de 20,4 kcal/mol [48] y al modelar este complejo con la metodología B3LYP, la barrera es de 28,2 kcal/mol.

De acuerdo con el mecanismo de Solomon, el hidropéroxido formado en el proceso de HAT se reorganiza coordinándose de forma bidentada al cobre para favorecer la siguiente etapa de reacción que consiste en el reenlace del radical del sustrato (Sustrato $\cdot$) al oxígeno no protonado (oxígeno proximal) del complejo de cobre $\text{Cu}^{\text{II}}_{\text{M}}(\text{OOH})$ para formar el $\text{Cu}^{\text{II}}_{\text{M}}(\text{OH})(\text{OSustrato}\cdot)$. Éste es el paso determinante de la reacción y la barrera energética global obtenida desde estos cálculos teóricos es de $\Delta G = 31,7$ kcal/mol, valor que se debe comparar con la barrera obtenida desde la constante de velocidad de la reacción para PHM, que es de 17 kcal/mol [9,16].

Posteriormente, se propone que dos reacciones sean llevadas a cabo simultáneamente: i) la TE desde el $\text{Cu}^{\text{I}}_{\text{H}}$ hasta el $\text{Cu}^{\text{II}}_{\text{M}}$ [10] y ii) la PCET al $\text{Cu}^{\text{II}}_{\text{M}}(\text{OH})(\text{O}\cdot\text{Sustrato})$. En la primera semi reacción los átomos de cobre se encuentran separados y el acoplamiento entre ellos es muy bajo por lo tanto se considera que la segunda semi reacción es la fuerza impulsora para la primera semi reacción. Solomon y colaboradores estudiaron varias TE y PCET desde el $\text{Cu}^{\text{I}}_{\text{H}}$ a diferentes especies de $\text{Cu}^{\text{II}}_{\text{M}}/\text{O}_2^-$ [49,50] y encontraron que la vía más favorable es la PCET al $\text{Cu}^{\text{II}}_{\text{M}}(\text{OH})(\text{O}\cdot\text{Sustrato})$ con un $\Delta G^\circ = -14,9$ kcal/mol y una $k_{\text{ET}} = 10 \text{ s}^{-1}$ [9]. Esta PCET genera una especie $\text{Cu}^{\text{II}}_{\text{M}}(\text{OH}_2)(\text{OSustrato})$ que finalmente conduce a una transferencia intramolecular protónica $\text{Cu}^{\text{II}}_{\text{M}}(\text{OH})(\text{HOSustrato})$ seguida de la liberación del producto hidroxilado desde de la enzima [9].

De acuerdo con el mecanismo de Solomon, la separación de los dos átomos de cobre en las MBC y la diferencia en los dos entornos de coordinación genera una reacción de hidroxilación con un control estricto para evitar reacciones colaterales en el organismo.

Como ha sido mencionado, las MBC presentan estructuras similares que conlleva a cinéticas similares y por lo tanto a mecanismos similares. Sin embargo, con los recientes estudios cristalográficos se han encontrado algunas diferencias estructurales que permite analizar el mecanismo de reacción. Un estudio reciente sobre la estructura cristalográfica de D β M realizado por Vendelboe en 2016 [17] encontró dos sitios catalíticos en la enzima: una conformación abierta de los átomos de Cu a una distancia de ~ 14 Å característica de este tipo de enzima y una conformación cerrada con los átomos de Cu a 4-5 Å de distancia, conformación no observada en ninguna MBC. En la siguiente sección, se estudia y describe la estructura cristalográfica de la enzima D β M.

1.3. ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE LA D β M

En el año 2016, Vendelboe y colaboradores reportaron la primera estructura cristalográfica de la forma dimerica de la D β M humana [17]. En la Figura 7 se detalla la estructura tridimensional de la D β M y los dominios que la conforman. La forma

dimérica presenta dos cadenas: La cadena A y la cadena B [48]. Cada una presenta tres dominios: el dominio DOMON, el dominio Cu_H y el dominio Cu_M (ver Figura 7 a). Estas cadenas están conectadas mediante el dominio dimerización que es asimétrico y genera que la organización de los núcleos catalíticos (dominio Cu_M y dominio Cu_H) de cada cadena sea diferente. En la cadena A, se origina una conformación cerrada (ver Figura 7 b) en donde la distancia interatómica entre los dos cobres es aproximadamente entre 4 – 5 Å. En la cadena B, se origina una conformación abierta donde los átomos de Cu_M y Cu_H están a ~14 Å [17].

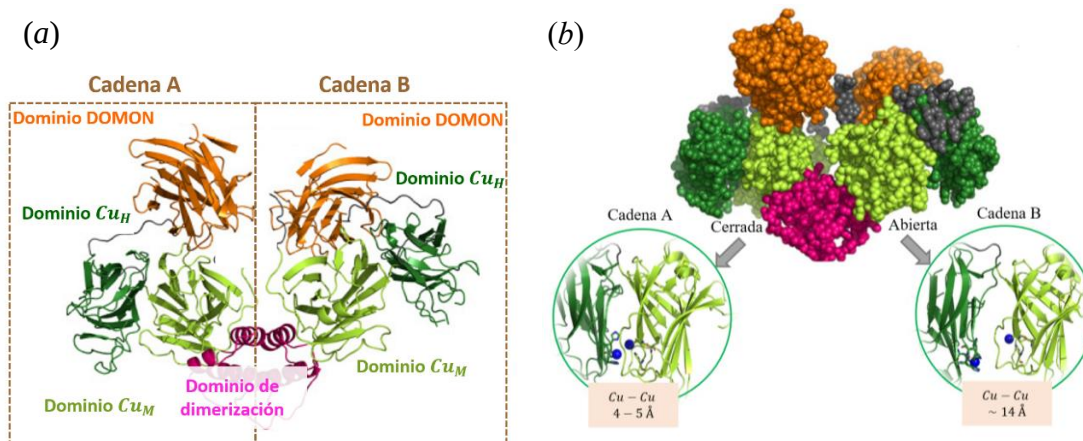


Figura 7: Estructura de la DβM humana. (a) Estructura tridimensional de la DβM y sus dominios. (b) Conformaciones de los dos sitios activos de la enzima. La conformación cerrada puede observarse en la cadena A y la conformación abierta puede detallarse en la cadena B. Figuras tomadas desde Vendelboe et al. Sci. Adv. 2016; 2: e1500980.

El hallazgo de una conformación cerrada en el núcleo catalítico de la DβM formula una pregunta importante: ¿Cuál es el rol de esta conformación en el mecanismo de la reacción?

Pese a que no se comprende la importancia funcional de este segundo sitio, se sugiere que la enzima podría modular el paso de acoplamiento mediante una flexibilidad conformacional para regular la sincronización de la segunda TE [41]. Algunos autores han planteado un posible mecanismo tipo flip-flop (ver Figura 8) en donde las dos subunidades se alternan entre una forma abierta y una forma cerrada. La forma abierta cargaría el sustrato y a medida que se van cerrando los dominios, la TE toma lugar para la liberación del producto y posterior regeneración de la enzima en una conformación cerrada [17]. Wang y colaboradores [15] en 2019 plantearon un mecanismo teórico que considera una transición entre las subunidades.

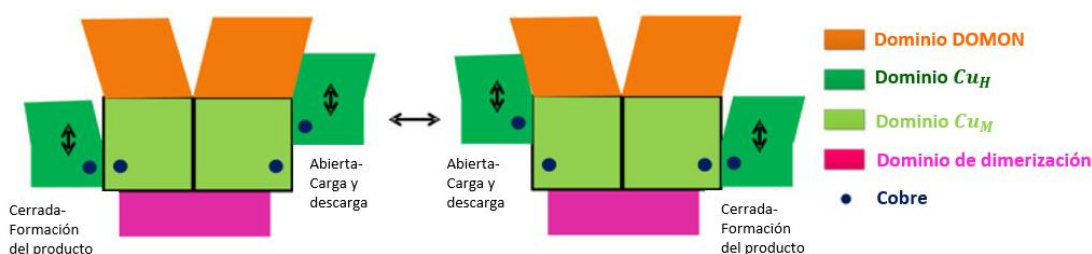


Figura 8: Mecanismo flip-flop propuesto para la **DβM**. La conformación abierta carga la dopamina y a medida que se van cerrando se va produciendo la reacción, la conformación cerrada facilita la **TE**. Figuras tomadas desde Vendelboe et al. Sci. Adv. 2016; 2: e1500980.

Una segunda teoría plantea que la conformación cerrada sea inactiva y la conformación abierta sea el sitio catalítico como ya se conoce. Esta teoría está apoyada sobre los estudios que demuestran que el núcleo catalítico de PHM es enzimáticamente activo en la fase cristalina, donde el movimiento entre dominios no es posible y por lo tanto, solo la conformación abierta es activa [30].

En este trabajo se plantea estudiar los dos primeros pasos del mecanismo de la hidroxilación de la DP a NP mediada por la DβM siguiendo el mecanismo general planteado por Solomon en 2016. Estos pasos son: *i)* la oxigenación de la enzima para formar la especie superoxo de cobre (II) y *ii)* La transferencia del átomo de hidrógeno desde la dopamina al complejo superoxo de cobre formado en el paso anterior. En esta investigación se estudian estos dos pasos en profundidad usando un modelo sencillo de la enzima DβM. Además, realizamos un estudio comparativo de la transferencia de hidrógeno cuando este se transfiere desde la dopamina o desde el ascorbato.

En las siguientes secciones se describirán: la hipótesis general de este trabajo y el marco teórico empleado para estudiar estas reacciones.

1.4. HIPÓTESIS

El mecanismo propuesto por Solomon y colaboradores [9] para la hidroxilación de un sustrato catalizado por las MBC, proporciona un modelo teórico realista que utilizaremos en este trabajo para investigar la reacción de DP a NP catalizada por la enzima D β M.

Los factores físicos que gobiernan cada etapa elemental del mecanismo pueden ser dilucidados mediante el uso de las herramientas teóricas interpretativas como la fuerza de la reacción y el flujo electrónico de reacción además de otros índices locales como interacciones no covalentes, órdenes de enlace y cargas atómicas.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de este proyecto es verificar el mecanismo planteado por Solomon y colaboradores en la reacción de hidroxilación de DP a NP catalizada por la enzima D β M y dilucidar los factores físicos que la controlan.

1.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar y caracterizar los sistemas de forma independiente: Sustrato, Productos y el modelo simple del sitio activo de la enzima D β M.
2. Optimizar y caracterizar las macromoléculas del mecanismo propuesto en este trabajo.
3. Encontrar el estado de transición para cada etapa de la reacción en estudio.
4. Estudiar el comportamiento de la enzima y del sustrato mediante el índice de interacciones no covalentes.
5. Caracterizar el perfil de energía potencial de las reacciones involucradas para obtener los datos cinéticos y termodinámicos de cada proceso.
6. Estudiar la fuerza de reacción y el flujo electrónico de las reacciones involucradas para obtener información estructural y electrónica relevante para entender el mecanismo de cada proceso.
7. Determinar los factores que gobiernan las primeras etapas del mecanismo de la reacción y compararlas con los datos experimentales disponibles.
8. Estudiar las conformaciones de la DP que interactúan con el sitio catalizador.
9. Realizar una descomposición física y química del flujo en las reacciones de interés.
10. Analizar la viabilidad de mecanismos de HAT alternativos al planteado por Solomon.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO Y METODOLOGÍA

Con el fin de estudiar el mecanismo de hidroxilación en la D β M, la primera sección está basada en un análisis a los cálculos de la estructura electrónica que puedan ser aplicados a sistemas grandes y que incluyan modelos simples y representativos de la reactividad y la química enzimática.

La segunda sección está enfocada en la superficie y el perfil de energía potencial que permite conectar reactantes, estados de transición y productos para describir la cinética y termodinámica de una reacción. Seguidamente, se definirá la fuerza de reacción que permite entender a detalle el mecanismo haciendo una partición racional de la energía y de la coordenada de reacción. Se continuará describiendo el flujo electrónico de reacción, que determina la actividad electrónica que tiene lugar durante la reacción, y finalmente se describirá la teoría detrás del índice de interacciones no covalentes. Adicionalmente, se utilizará el Potencial de Marcus [51] con el fin de evaluar su aplicabilidad en estas reacciones.

2.1. CÁLCULOS TEÓRICOS DE LA ESTRUCTURA ELECTRÓNICA

Empleando las metodologías teóricas y los recursos computacionales actuales es posible estudiar con mecánica cuántica sistemas medianamente grandes que incluyen metales de transición, la metodología teórico-computacional que se utilizó para estudiar el mecanismo de la reacción se entregan en esta sección.

Los métodos químico-cuánticos más comunes para determinar la energía y la estructura electrónica de sistemas moleculares son las metodologías post-Hartree-Fock [52] y las metodologías basadas en la teoría funcional de la densidad (TFD) [53]. Existe un amplio rango de métodos de cálculo, sin embargo, la elección depende del tamaño del sistema y los objetivos de cada estudio. Debido a que los sistemas bioquímicos son moléculas grandes, las metodologías basadas en la TFD son las más accesibles. El funcional híbrido B3LYP es uno de los más populares, de bajo costo computacional y que incluyen un 20% del intercambio exacto que proviene del método de Hartree-Fock (HF) [27,54].

Por otro lado, las funciones base son un conjunto de funciones matemáticas que se utilizan para describir la estructura electrónica de los átomos que conforman la molécula en estudio. El conjunto de funciones base es escogido de acuerdo con su precisión y costo computacional. Las funciones tipo Slater son las más exactas, sin embargo, es difícil resolver numéricamente las integrales bioelectrónicas para sistemas de tamaño grande, por tanto, funciones matemáticas similares, pero con mayor

facilidad de cálculo son usadas. Las funciones Gaussianas son ampliamente utilizadas debido a que representan adecuadamente bien a las funciones atómicas de Slater y su flexibilidad permite acelerar el cálculo en un factor cercano a 5 [55]. Adicionalmente, con el fin de incluir la polarización en los orbitales o una mayor extensión de los mismos es posible incluir funciones de polarización (denotadas con *) y funciones difusas (denotadas con +) [27,56]. En esta investigación el nivel de teoría empleado para todos los cálculos fue B3LYP/6-311G (d,p) [9,27].

2.2. SUPERFICIES DE ENERGÍA Y FUERZA DE REACCIÓN

La energía potencial (E) de un sistema de N átomos se obtiene considerando la aproximación de Born-Oppenheimer al resolver la ecuación de Schrödinger para $3N - 6$ coordenadas internas o variables de Jacobi ($3N - 5$ si es lineal) [57–59]. La variación de E es representada en una hipersuperficie que determina los posibles caminos de reacción [60,61].

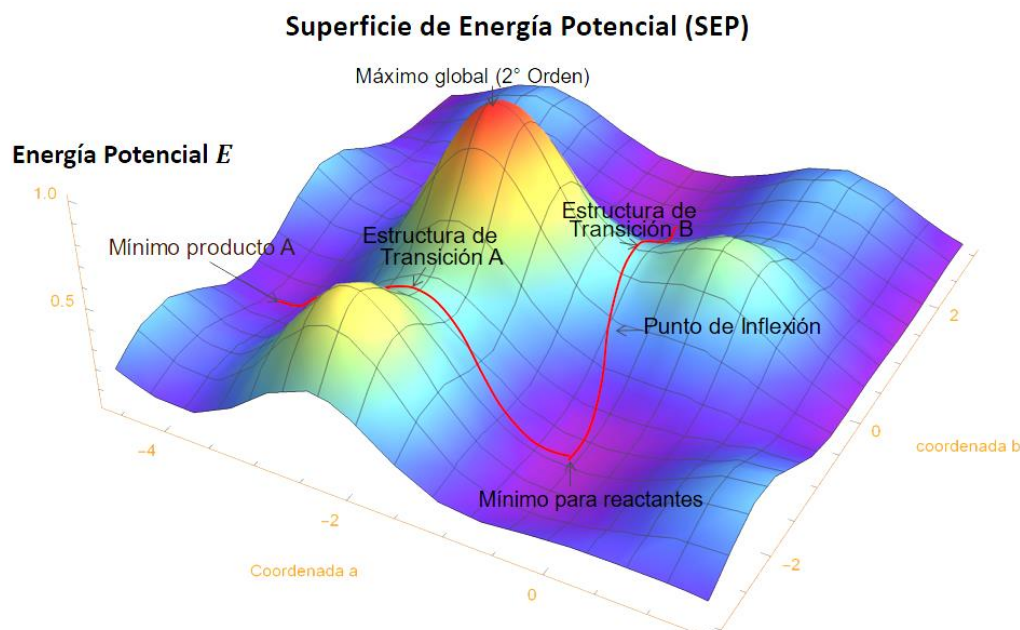


Figura 9: Superficie de energía potencial para un sistema molecular.

La superficie de energía potencial (SEP) representada en la Figura 9 muestra la variación de la energía de un sistema molecular al variar la distribución espacial de los átomos. En una reacción química, la SEP se analiza siguiendo el camino de mínima energía que conecta los reactantes (R) con los productos (P), y que pasa por un tercer punto llamado estado de transición (TS) (punto silla) obteniéndose un perfil de energía

potencial (PEP). El PEP, permite disminuir la complejidad y el costo computacional asociado al estudio de la hipersuperficie de energía que representa la reacción química. El método de la coordenada intrínseca de la reacción (IRC) grafica el PEP que describe el camino de mínima energía con la que se conecta R y P pasando por un estado de transición a lo largo de la coordenada intrínseca de la reacción (ξ) y da información termodinámica y cinética asociada a la energía de la reacción (ΔE°) y la barrera energética ($\Delta E^\ddagger$), respectivamente [56,62–64].

La SEP no brinda información sobre el mecanismo de reacción que está estrechamente ligado a los desplazamientos nucleares durante el transcurso de la reacción. Sin embargo, la fuerza de reacción $F(\xi)$, una propiedad global del sistema que indica la evolución de la fuerza global que conduce una reacción química, permite obtener información crucial sobre el mecanismo de reacción y las energías (ΔE° y $\Delta E^\ddagger$) en ella involucradas [65]:

$$F(\xi) = -\left(\frac{dE(\xi)}{d\xi}\right) \quad (1)$$

La $F(\xi)$ divide la coordenada de reacción ξ en diferentes regiones en las cuales pueden ocurrir diferentes mecanismos de reacción. Una reacción química se entiende entonces como una secuencia de eventos químicos que conducen cambios estructurales y electrónicos que ocurren a lo largo de la coordenada de reacción. Las regiones definidas a partir de la fuerza de reacción permiten establecer límites entre los cuales los diferentes eventos químicos operan. Los límites de las regiones (Figura 10 b) representan los puntos críticos en el perfil de la fuerza de la reacción (PFR). Para una reacción química con un paso elemental y un TS que transcurre según el PEP de la Figura 10 a, la fuerza de la reacción representado en la Figura 10 b presenta dos puntos críticos: un mínimo en ξ_1 antes del TS y un máximo en ξ_2 después del TS. Entonces, tres regiones son delimitadas: la región de los reactantes (RR), del estado de transición (RTS) y la región de los productos (RP) cada una en el intervalo: $\xi_R \leq \xi \leq \xi_1$; $\xi_1 < \xi < \xi_2$ y $\xi_2 \leq \xi \leq \xi_P$, respectivamente. Para reacciones más complejas que involucran varios pasos elementales, otras regiones deben ser definidas [66–74], una reacción que involucra n pasos elementales presentara $(2n + 1)$ regiones de reacción, con n estados de transición y $(n - 1)$ regiones de intermediarios además de las regiones de reactantes y de productos.

Se ha comprobado que la RR está principalmente asociada a reordenamientos estructurales como deformación estructural y cambios geométricos que progresivamente llevan a los reactantes activados [75]. La RTS es caracterizada por reordenamientos electrónicos debido a la ruptura de enlaces desde los R y formación de enlaces hacia los P. La RTS puede verse como un continuo de estructuras transientes, descripción que es congruente con un estado de transición definido

espectroscópicamente por Zewail y Polanyi, donde el TS se va formando mediante estructuras transitorias e inestables que incrementan la actividad electrónica [76,77]. Finalmente, la RP está asociada a relajaciones de tipo estructural que se reflejan en la disminución de la $F(\xi)$ hasta alcanzar un valor cero en P.

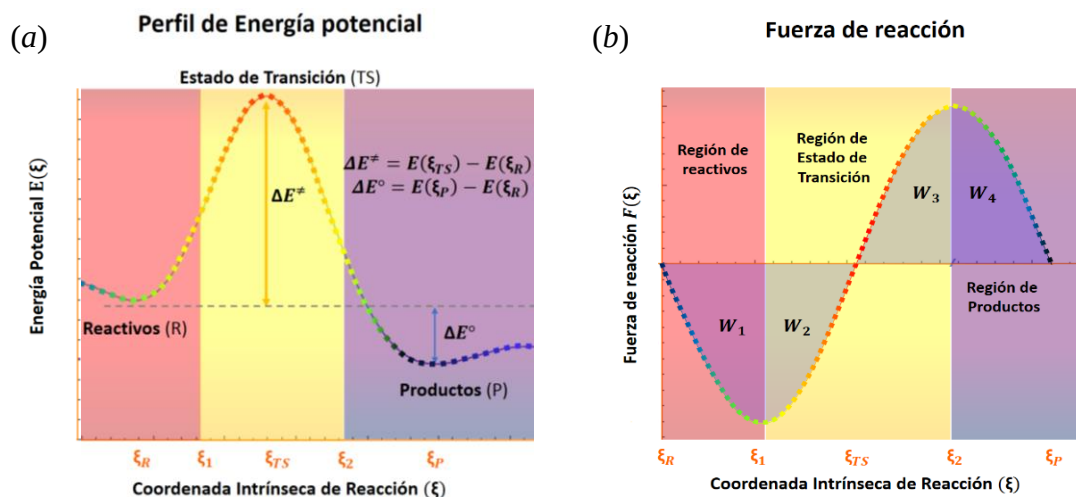


Figura 10: Perfiles genéricos de la energía (a) y la fuerza de reacción (b) para una reacción de un paso. Dos puntos críticos (ξ_1 y ξ_2) en RF delimitan las regiones de reacción.

El signo y la pendiente de la $F(\xi)$ definen el mecanismo involucrado en la racionalización de la energía dividiendo la energía total del sistema [78,79]. Obtenida la $F(\xi)$, es posible identificar el trabajo (W) requerido para cada proceso mediante la integral numérica que separa cada región [68,69,74,80–85].

$$W_1 = - \int_{\xi_R}^{\xi_1} F(\xi) d\xi > 0 \quad W_2 = - \int_{\xi_1}^{\xi_{TS}} F(\xi) d\xi > 0 \quad W_3 = - \int_{\xi_{TS}}^{\xi_2} F(\xi) d\xi < 0 \quad W_4 = - \int_{\xi_2}^{\xi_P} F(\xi) d\xi < 0 \quad (2)$$

A partir de la Ecuación (2) es posible observar que W_1 , W_2 , W_3 y W_4 representan los trabajos definidos en diferentes regiones y que permiten particionar las energías de activación y de reacción según:

$$\Delta E^\ddagger = E(\xi_{TS}) - E(\xi_R) = W_1 + W_2 \quad \text{y} \quad \Delta E^\circ = E(\xi_P) - E(\xi_R) = W_1 + W_2 + W_3 + W_4 \quad (3)$$

Los trabajos de reacción W_1 y W_4 se vinculan básicamente con arreglos estructurales mientras que W_2 y W_3 cuantifican la energía involucrada en reordenamientos electrónicos [67,72,75,80,84,86,87]. En este contexto es posible establecer la naturaleza física de $\Delta E^\ddagger$ y ΔE° en términos de sus componentes estructural y electrónica:

$$\Delta E^\ddagger = W_1 + W_2 = \Delta E_s^\ddagger + \Delta E_e^\ddagger \quad \text{y} \quad \Delta E^\circ = \{W_1 + W_4\} + \{W_2 + W_3\} = \Delta E_s^\circ + \Delta E_e^\circ \quad (4)$$

Solomon y colaboradores entregan valiosa información acerca del mecanismo enzimático de la hidroxilación en términos de $\Delta E^\ddagger$ y ΔE° para cada uno de los pasos involucrados en la reacción total de las MBC. Por nuestra parte, en este trabajo empleamos la PEP y la $F(\xi)$ para entender con mayor detalle los primeros pasos del mecanismo de hidroxilación de la DP a NP catalizada por D β M para lo cuál exploramos el camino de mínima energía que conduce a NP a partir de DP, se identificaron las etapas de la reacción y los resultados fueron racionalizados en términos de efectos estructurales y electrónicos en base a sus trabajos de reacción.

La siguiente sección está enfocada en herramientas que permiten describir la actividad electrónica y las interacciones electrostáticas como el flujo electrónico de reacción y el índice de interacciones no covalentes, respectivamente.

2.3. DFT Y REACTIVIDAD QUÍMICA

A partir de la DFT (por sus siglas en inglés Density Functional Theory), la energía de un sistema se puede expresar en función al número de electrones (N) y al potencial externo $v(\vec{r})$ debido a los núcleos, $E = E[N, v(\vec{r})]$ [54,88,89]. La reactividad y la selectividad de un sistema molecular es evaluada mediante descriptores globales y locales que resultan de las derivadas de la energía con respecto al N y a $v(\vec{r})$, respectivamente [90,91]. Entre las propiedades globales se encuentra el potencial químico (μ), la dureza global (η), la electrofilia global (ω), entre otras [54,55,92–98].

El potencial químico electrónico (μ) surge de la ecuación de Euler-Lagrange asociada a la minimización de la funcional de la energía condicionada a que la integración de la densidad electrónica sea igual al número de electrones N [54,65,91], formulas empíricas para μ y η incluyen el potencial de ionización (I_1) y la afinidad electrónica (A_1) que a partir del teorema de Koopmans [92] se puede expresar en términos de la energía del orbital molecular ocupado de más alta energía (HOMO) y el orbital molecular desocupado de más baja energía (LUMO) [53–56]. En este trabajo nos interesamos especialmente en el potencial químico electrónico, dejando a la dureza y otros descriptores de reactividad en un segundo plano. Entonces el potencial químico viene dado por:

$$\mu = \left[\frac{\partial E}{\partial N} \right]_{v(\vec{r})} \approx -\frac{(I_1 + A_1)}{2} \approx \frac{(E_H + E_L)}{2} \quad (9)$$

Al aplicar la aproximación de diferencias finitas [54] a la definición de potencial químico, se obtiene la expresión que involucra al potencial de ionización y a la electroafinidad. Si a esta última ecuación se aplica el teorema de Koopmans [92,93] se obtiene el potencial químico en términos de las energías de los orbitales moleculares de frontera. El potencial químico y el flujo electrónico de reacción serán utilizados para

entender la actividad electrónica de las reacciones y comprender la TE en el sitio catalítico.

2.3.1 Flujo Electrónico de Reacción

La derivada del potencial químico a lo largo de la ξ es definida como el flujo electrónico de reacción $J(\xi)$, que permite medir la actividad electrónica que ocurre durante una reacción química [83,99–102]. El flujo electrónico de reacción es observado como un gradiente electrónico de la reacción a lo largo de ξ :

$$J(\xi) = -\left(\frac{d\mu(\xi)}{d\xi}\right) \quad (10)$$

Similar a la energía libre en termodinámica clásica, es posible señalar que cuando $J(\xi) > 0$ los reordenamientos electrónicos ocurren de forma espontáneamente y son conducidos por procesos de fortalecimiento y formación de enlaces; en contraste, cuando tenemos $J(\xi) < 0$ hay cambios de la densidad electrónica que son no espontáneos manejados por debilitamiento y ruptura de enlaces [68,69,79,83,96,102]. De esta forma, el $J(\xi)$ es el índice que determinará la actividad electrónica durante la reacción global. Para caracterizar el o los átomos o grupo funcional responsable de la actividad electrónica observada, $J(\xi)$ se complementa con el estudio de propiedades globales y locales como cargas, órdenes de enlace [103], función de Fukui [104,105] y el descriptor dual $f^{(2)}(\vec{r})$, [104,106–108].

2.3.1.1 Partición del Flujo Electrónico de Reacción: Para profundizar en el entendimiento de la actividad electrónica es posible realizar una descomposición física [102] o química [109] del flujo electrónico de reacción. La descomposición física está expresada en términos de los efectos de polarización y de los procesos de transferencia de carga. Entonces, $J(\xi) = J_p(\xi) + J_t(\xi)$. Donde $J_p(\xi)$ se obtiene haciendo una fragmentación de la supermolécula y empleando el método de counterpoise [110–112] para obtener la polarización de cada fragmento. El flujo de polarización de cada fragmento i y el flujo de polarización total son calculados de esta forma [109]:

$$J_p^{(i)}(\xi) = -\left(\frac{N_i}{N}\right) \frac{d\mu_i}{d\xi} \text{ y } J_p(\xi) = \sum_{i=1}^n J_p^{(i)}(\xi) \quad (11)$$

Donde N_i, N, n, μ_i corresponden al número de electrones de cada fragmento i , el número total de electrones en la supermolécula, el número de fragmentos considerados para hacer el cálculo counterpoise y el potencial químico en cada fragmento, respectivamente [102]. Con el flujo de polarización encontrado anteriormente y el flujo electrónico de reacción, es posible calcular el flujo de transferencia realizando la diferencia entre estos: $J_t(\xi) = J(\xi) - J_p(\xi)$. Considerando que el potencial químico es una propiedad global en el sistema, es posible determinar el flujo de transferencia electrónica en cada fragmento:

$$J_t^{(i)}(\xi) = \sum_{i=1}^n \left(\frac{N_i}{N} \right) \frac{d}{d\xi} (\mu_i - \mu^\circ) = \sum_{i=1}^n J_t^{(i)}(\xi) \quad (12)$$

Donde μ_i y μ° representan el potencial químico en cada fragmento y el potencial químico de la supermolécula. De esta manera, la partición física del REF puede ser entendida en términos de la naturaleza electrónica a lo largo de ξ separando los efectos de polarización de los procesos de transferencia involucrados en el mecanismo de una reacción química.

Adicionalmente, es posible obtener la descomposición química de REF en términos de electrofilia y de dureza [109]. Empleando la definición de electrofilia $\omega = \frac{\mu^2}{2\eta}$ se tiene que:

$$J(\xi) = \frac{1}{2} \Delta N_{max}(\xi) \left(\frac{d\eta}{d\xi} \right) + \frac{1}{\Delta N_{max}(\xi)} \left(\frac{d\omega}{d\xi} \right) = J_\eta(\xi) + J_\omega(\xi) \quad (13)$$

Desde la ecuación 13 podemos observar que el flujo electrónico presenta un balance entre la dureza ó la resistencia del sistema a deformar su nube electrónica y la transferencia representada en la electrofilia del sistema [109]. Por lo tanto, la actividad electrónica en una reacción química puede entenderse como una secuencia de procesos de resistencia ó polarización y de cambios de electrofilia ó de transferencias electrónicas.

Ambas descomposiciones del REF son acompañados por propiedades globales y locales mencionadas anteriormente y por el índice de interacciones no covalentes que es descrito en la siguiente sección.

2.3.2 Índice de Interacciones no Covalentes

El índice de las interacciones no covalentes (NCI por sus siglas en inglés) es un índice de visualización de interacciones de tipo no covalente (favorables o desfavorables) que grafica la densidad (y sus derivadas) para un sistema molecular [113–115]. A partir de los picos que aparecen a baja densidad en la gráfica del gradiente de la densidad reducida (s) vs el segundo autovalor del hessiano de la densidad electrónica λ por la densidad electrónica, signo $(\lambda) \cdot \rho$, es posible determinar las interacciones atractivas fuertes (enlaces de hidrógeno), interacciones débiles (van der Waals) y las repulsiones estéricas fuertes [82]. En la Figura 11, se han superpuesto tres dímeros de agua, de dibiciclo 2,2,2 octano y de metano, se observa que los picos a baja densidad indican puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones repulsivas que siguen una convención de colores específica.

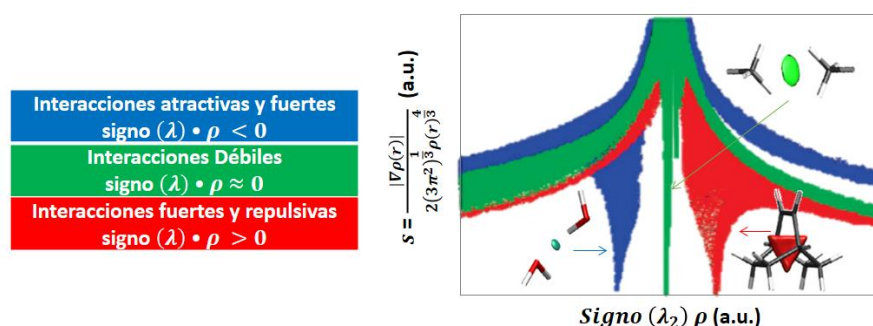


Figura 11: Gráfica de s vs el signo $(\lambda) \cdot \rho$ para tres diméros: agua, biciclo 2,2,2 octano, y metano. Ejercicio Manual NCIPLOT [115]

El NCI es utilizado en biomoléculas para describir la interacción entre los complejos enzimas-sustrato y analizar desde sus coordenadas atómicas las interacciones intramoleculares e intermoleculares [116]. En la Figura 12, se ejemplifica un sistema que consta de un sustrato dentro de la cavidad de un sitio activo y se observa interacciones fuertes atractivas como enlaces de hidrógeno representadas en color azul, interacciones débiles mostradas en color verde e interacciones fuertes repulsivas en color rojo.

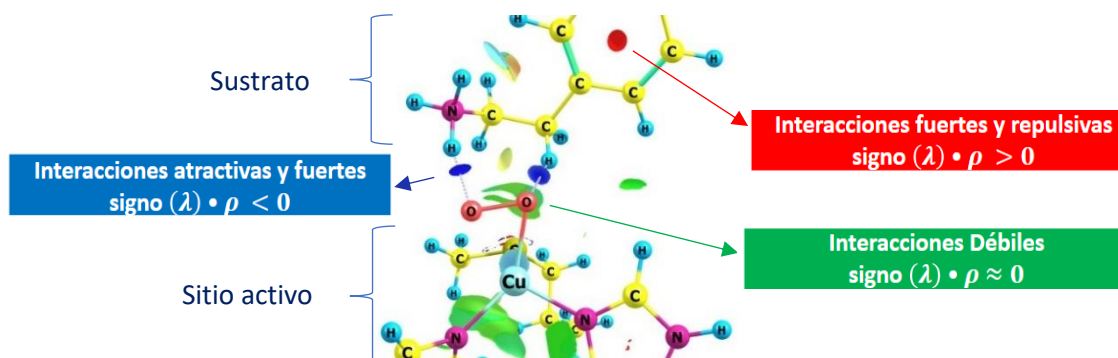


Figura 12: Gráfica de interacciones no covalentes entre un sistema sustrato-proteína

Gráficos NCI fueron usados para describir la variación en las interacciones entre el sitio activo y la dopamina a medida que transcurre la reacción.

2.4. SELECCIÓN DEL SISTEMA A ESTUDIAR

La DβM es una enzima con más de 9000 átomos distribuidos en 619 aminoácidos, estudiar computacionalmente el sistema completo es un desafío en la actualidad. Con el objetivo de estudiar los primeros pasos del mecanismo de hidroxilación del sustrato dopamina, se escogió un modelo simple pero representativo de la DβM.

El sitio activo de la D β M está conformado por dos centros de cobre (Cu_H y Cu_M) los cuales generalmente son modelados de forma independiente debido a que no presentan acople magnético ni electrónico entre ellos [9,15]. Como las primeras etapas de la reacción se llevan a cabo en el sitio de Cu_M, un modelo clúster de este complejo se modeló para representar el sitio activo de la D β M.

El modelo clúster consistió en una esfera primaria de coordinación para cada átomo de cobre. El sitio de Cu_M está enlazado a los aminoácidos His412, His414 y Met487 a través del átomo de nitrógeno del imidazol en las histidinas y del azufre de la metionina, respectivamente. Cada residuo es truncando de la proteína en el carbono α del aminoácido y este átomo de carbono es fijado en la optimización. De esta manera, se conservan las restricciones de la estructura secundaria y terciaria de la enzima. De igual forma, el sitio de Cu_H corresponde al átomo de cobre que se encuentra unido a los aminoácidos His262, His263 e His333 a través del átomo de nitrógeno del imidazol.

Las estructuras iniciales del sitio activo de la enzima fueron obtenidas desde las coordenadas cristalográficas de la D β M humana (E.C. 1.14.17.1) [Banco de Información de proteínas (PDB) código ID 4ZEL] [17].

2.5. OPTIMIZACIÓN

Los cálculos de los sistemas moleculares a estudiar se llevaron a cabo usando la Teoría de Funcionales de la Densidad con el fin de disminuir el costo computacional asociado a estos sistemas biológicos.

De acuerdo con la literatura [27] el funcional B3LYP es apropiado para los cálculos de superoxo en MBC, el enlace Cu-O de los superóxidos monodentados es poco covalente y necesita una pequeña cantidad de intercambio HF que es suministrada por el funcional B3LYP [27]. Adicionalmente, cálculos sobre el mecanismo de reacción realizados para superoxo de PHM reproducen energías de activación razonables [117]. Siguiendo el modelo planteado por Solomon y colaboradores en 2016 [9] y con el fin de comparar nuestros resultados con la literatura [46,117], el nivel de teoría que se empleó fue B3LYP, con el conjunto de funciones base 6-311G(d,p). La elección del nivel de teoría estuvo influenciada por el tamaño del sistema y los tiempos de los cálculos de IRC. Para realizar los cálculos computacionales se empleó el paquete de software Gaussian 16 [118] y Gauss View [119].

Para representar el efecto del ambiente de la proteína se empleó el modelo continuo polarizable PCM [120] ($\epsilon = 4.0$) que ha sido empleado previamente como medio de solvatación en estas enzimas [9,117] y en nuestro modelo presentó una buena eficiencia computacional. Una constante dieléctrica de 4,0 ha sido empleada para describir el medio alrededor de la proteína o medio proteico [121]. Solomon y Chen en

2004 emplearon valores de $\epsilon = 5, 10$ y 20 y no se encontraron cambios en la energética de las reacciones. Las energías libres de Gibbs y las energías de activación son reportadas en fase gas ó simulando el medio proteico.

Como fue mencionado en la sección 1.2, el primer cambio en la enzima para realizar la hidroxilación de cualquier sustrato es la reducción de los centros de cobre (II) a cobre (I) por medio del ascorbato. La forma de cobre (II) es inactiva en las reacciones catalizadas por monooxigenasas y por lo tanto es fisiológicamente no relevante. Los mecanismos teóricos que estudian este tipo de sistemas [9,15,117] inician los estudios desde los centros de cobre reducidos en estados de oxidación (I).

2.6. REACCIONES

Dos reacciones consecutivas del mecanismo general de hidroxilación de dopamina serán descritas a profundidad en este documento:

Reacción 1: La oxigenación de la BCM en el sitio de Cu_M produciendo un superoxo de cobre (II).

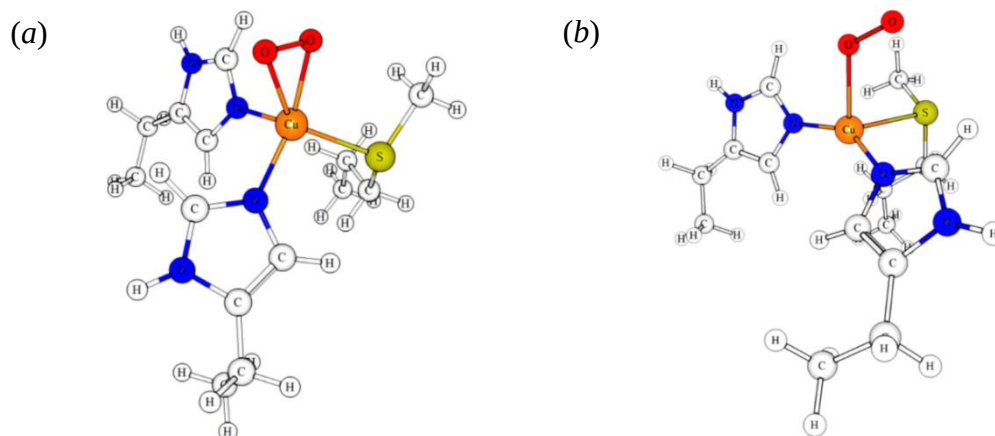


Figura 13: Estructuras químicas de la unión del oxígeno al sitio Cu_M (a) Coordinación bidentada y (b) Coordinación monodentada del oxígeno al Cu_M .

La interacción del oxígeno con la enzima fue estudiada calculando la energía libre de Gibbs para las dos conformaciones de oxígeno frente al cobre: coordinación monodentada ó bidentada del oxígeno al sitio de Cu_M (Figura 13).

Reacción 2: La HAT desde la dopamina por el complejo superoxo de Cu_M : Una vez el superoxo de cobre es formado en la reacción anterior, esta especie puede realizar una abstracción del átomo de hidrógeno sobre carbono β de la dopamina. La Figura 14 muestra un esquema general de la reacción de HAT desde dopamina hasta el complejo de superoxo de cobre (II).

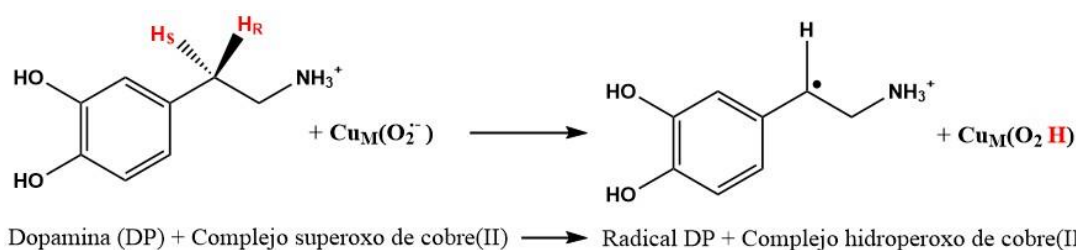


Figura 14: Reacción de transferencia del átomo de hidrógeno desde dopamina (DP) al complejo superoxo de cobre (II) para formar el radical dopamina y el complejo hidroperoxo de cobre (II). Para claridad, los dos hidrógenos del carbono β de la dopamina son diferenciados con subíndices R o S.

En esta investigación, dos conformaciones de dopamina interactuando con el complejo superoxo de Cu_M fueron estudiadas como se muestra en la Figura 15.

En la primera conformación, no hay interacción entre la dopamina y la especie superoxo (Figura 15 a); en la segunda conformación, un enlace de hidrógeno entre el grupo amino de la dopamina y el oxígeno del superoxo fue considerado (Figura 15 b).

Puede ser observado desde la Figura 14, que es posible realizar dos diferentes reacciones de HAT desde el carbono β de la dopamina, la abstracción del hidrógeno H_S ó H_R que conduce, después de subsecuentes pasos, a la formación del enantiómero R ó S de la norepinefrina. En cada conformación de la dopamina, las dos posibles HAT fueron estudiadas. Estas cuatro reacciones fueron llamadas **R1**, **R2**, **R3** y **R4**. En **R1**

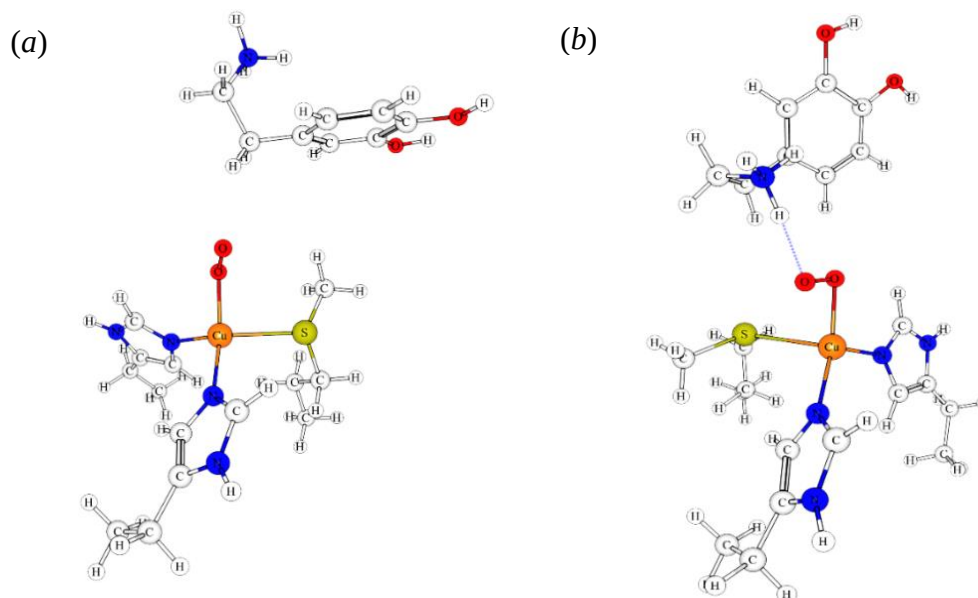


Figura 15: Estructura para las dos conformaciones de DP interactuando con el complejo superoxo. (a) Sin interacción (b) Con un enlace de hidrógeno.

(R3) y R2 (R4) el átomo de hidrógeno $H_R(H_S)$ es transferido desde la dopamina en la conformación *a* y *b*, respectivamente. Estas cuatro reacciones de HAT fueron estudiadas en fase gas y en un segundo paso, las dos reacciones que condujeron a la forma enantiomérica correcta del producto, fueron modeladas en medio proteico usando el modelo PCM con una constante dieléctrica $\epsilon = 4,0$ [9,38,117].

- ✚ Los perfiles de energía para las seis reacciones fueron obtenidos mediante el método basado en la coordenada intrínseca de reacción (IRC). Cada perfil de energía presentó alrededor de 1.000 a 2.000 puntos.
- ✚ Todos los estados de transición fueron caracterizados por presentar una sola frecuencia negativa y fueron optimizados siguiendo el algoritmo Berni Synchronous Transit-Guided Cuasi-Newton (STQN) como los reportados por Cowley en 2016 [9].
- ✚ El procedimiento IRC fue confirmado con optimizaciones independientes de los reactantes y los productos.
- ✚ El formalismo de la fuerza de reacción [65–67,73,81] fue empleado para particionar la energía de cada una de las reacciones y para entender los factores que gobiernan cada una de las etapas del mecanismo de la reacción en función a los trabajos de reacción.
- ✚ El potencial químico y el flujo electrónico de reacción [96,122] se emplearon para evaluar los eventos de transferencia electrónica en las distintas conformaciones.
- ✚ Las interacciones no covalentes [113,115] se utilizaron para la descripción del sistema enzima-sustrato en puntos específicos del transcurso de la reacción.
- ✚ Todos los gráficos moleculares se realizaron usando GaussView [119], Chemcraft [123] o PyMOL [124], las gráficas de PEP, $F(\xi)$, $J(\xi)$ se realizarán con Matemática 11 [125] y OriginPro9 [126]. El índice de interacciones no covalentes se estudiaron con el software NCIPLOT [113,115].

Los siguientes pasos del mecanismo planteado por Solomon fueron estudiados solo en función a la energía libre de Gibbs, tanto en fase gaseosa como simulando el medio proteico usando el modelo PCM. La energía libre de Gibbs fue calculada así:

$$G_{en_solvente} \approx G_{fase_gaseosa} + [E_{sp_solvente} - E_{fase_gaseosa}] \approx G_{fase_gaseosa} + E_{solvatación}$$

Reacción 2/Mecanismo alternativo: Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, un nuevo mecanismo fue publicado por Wang y colaboradores [15]. Este mecanismo propone que el paso de la HAT ocurre desde el radical ascorbato en lugar de la dopamina. Por lo tanto, empleando el modelo del superoxo de cobre (II) obtenido en la reacción 1, la energía libre de Gibbs fue calculada para la reacción de HAT desde radical ascorbato.

2.7. SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR

De modo complementario, en esta investigación se estudió el sitio de acople de la dopamina a la enzima D β M. Para seguir este estudio se realizó una simulación de dinámica molecular.

La primera etapa de la simulación de dinámica molecular fue preparar la enzima. Para ello, la estructura de D β M fue establecida a partir del archivo PDB código 4ZEL. Los residuos ausentes en las dos cadenas fueron colocados usando Gaussian View [119] y Pymol [127]. En total 58 residuos fueron colocados (En la cadena A los residuos 40-45, 109, 593-607, 612-617 y en la cadena B:40-45,104-109, 273-275, 288-291, 597-608, 615-617). Adicionalmente, residuos no relevantes fueron eliminados. La molécula de agua 805 fue conservada para considerar el ligando del sitio de Cu_M. Los átomos de cobre ausentes fueron manualmente adicionados y la His262 y His263 del sitio activo fueron levemente rotadas para mejorar la interacción con el cobre. La protonación de la enzima fue realizada usando el programa propKa a través el servidor web de PDB2PQR [127] con un campo de Fuerza Amber. Seguido de la protonación en el programa, se realizó una inspección visual cuidadosa de los hidrógenos colocados. Arg, His y Lys fueron protonadas y Asp y Glu fueron desprotonadas. El sustrato DP y el cofactor ascorbato fueron optimizados en Gaussian y luego acoplados en el sitio activo usando AutoDock Vina [128].

Parametrización: La parametrización el complejo metálico fue realizado usando la herramienta del programa Amber: MCPB.py. El campo de fuerza utilizado para la enzima fue ff14SB y para el complejo de cobre, dopamina y ascorbato fue GAFF. Las cargas atómicas fueron calculadas usando el método RESP con HF/6-311G. Usando la herramienta tleap fue posible adicionar 5 iones de cloro para neutralizar la carga total de la enzima. El sistema fue solvatado usando una caja rectangular de agua tipo TIP3P con una distancia de 18 Å desde la superficie de la proteína.

Simulaciones de DM: Para realizar la dinámica se usó el programa Amber 20. Con este objetivo, primero se llevó a cabo una minimización de toda la enzima previamente configurada, usando los métodos de gradiente conjugado y descenso pronunciado, límites periódicos y un corte de 10 Å para eliminar interacciones lejanas. La etapa de minimización se realizó en dos pasos, primero solo los iones y las moléculas de agua fueron minimizadas y posteriormente toda la enzima. Seguidamente, el sistema fue calentado usando el termostato de Langevin hasta 300 K y con una restricción en la enzima de 15 kcal/mol Å, los hidrógenos covalentes fueron fijados por medio del algoritmo de SHAKE y usando un paso de tiempo de 2 femtosegundos. El calentamiento se llevó a cabo en dos etapas: 20 ps desde 0 a 100 K y 80 ps de 100 K a 300 K. La etapa para equilibrar el sistema fue realizada bajo ensamble NPT con una presión de 1.0 atm y una temperatura de 300 K. Primero, se equilibró por 500 ps y

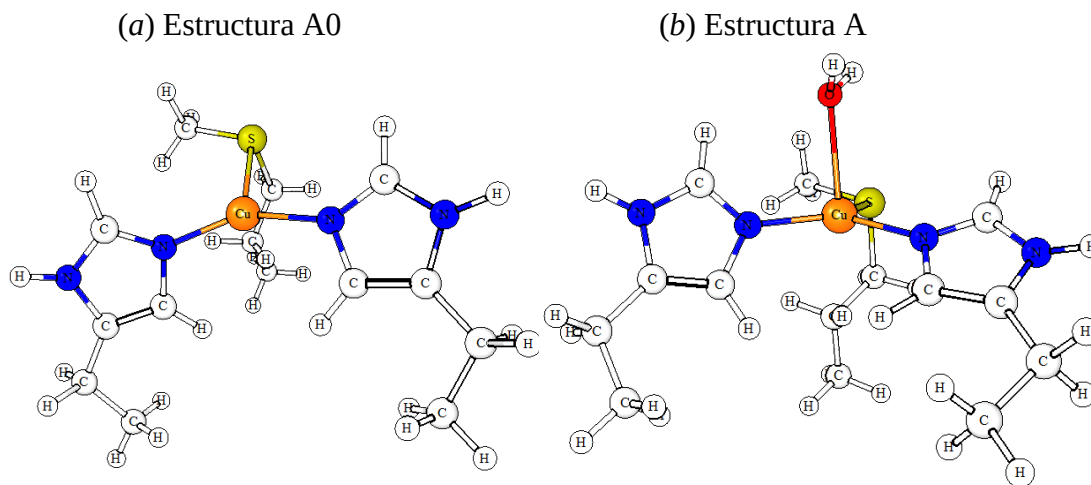
usando una restricción en la enzima de 10 kcal/mol Å, seguidamente 500 ps con una restricción de 10 kcal/mol solo en la cadena principal de la cadena y finalmente una restricción en la cadena principal de la enzima de 0,1 kcal/mol.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. MODELO SENCILLO DE LA ENZIMA D β M.

Las estructuras iniciales del sitio activo de la enzima D β M humana se obtuvieron a partir del archivo 4ZEL del banco de información de proteínas (E. C. 1.14.17.1) [17]. Los dos sitios con probable actividad catalítica fueron encontrados en esta enzima: La conformación A y la conformación B. La conformación A corresponde a una conformación cerrada y la conformación B corresponde a una conformación abierta. Tres de los cuatro átomos de cobre no fueron encontrados en la estructura cristalográfica y fueron agregados manualmente. En la conformación abierta los átomos de Cu se encuentran separados a una distancia de ~ 14 Å. En este escrito se reporta el sitio de cobre Cu_M en la conformación abierta que corresponde al lugar donde se lleva a cabo las primeras reacciones que se discutirán en este trabajo.

El sitio de Cu_M consistió en un complejo de cobre (I), enlazado a dos histidinas y una metionina (His412, His414 y Met487). Sin embargo, de acuerdo con los resultados por absorción de rayos X [29] y a los resultados teóricos de Solomon y colaboradores [7], la estructura con un cuarto ligando enlazado al Cu_M, una molécula de solvente fue considerada como estado inicial de la enzima. Las dos estructuras mostradas en la Figura 16, sin y con el cuarto ligando llamadas A0 y A, respectivamente, se optimizaron y se compararon.



$$\Delta G^\circ = -1.49 \text{ kcal/mol con respecto a A0}$$

Figura 16: Estructura química del sitio Cu_M (His412, His414, Met487) sin (a) y con (b) una molécula de agua coordinada al átomo de Cu. La estructura en (a) es etiquetada como A0 y la estructura en (b) es llamada A.

La estructura con la molécula de agua es favorable sobre la correspondiente sin la molécula de agua ($\Delta G^\circ = -1,49$ kcal/mol¹ y $\Delta G^\circ = -0,32$ kcal/mol²). Estos resultados son coherentes con los resultados obtenidos por Solomon y colaboradores para la remoción del agua desde la estructura A ($\Delta G^\circ = +1,4$ kcal/mol²). De acuerdo con los resultados, A es la estructura inicial del sitio de Cu_M, es consistente con otros centros de cobres tetraédricos para las MBC y con la información espectroscópica disponible [20,29].

Como se ha mencionado en diferentes estudios [15,117] la metionina 487 está enlazada débilmente al Cu_M ya que los ligandos tioéter son donantes deficientes de electrones, pero estabilizan el estado de oxidación Cu (I) como se ha visto en complejos modelos [30,129,130]. En la optimización de la estructura A usando el modelo PCM, fue necesario congelar el enlace Cu-S a 2,3 Å, esta distancia fue reportada en la DβM reducida (2,25 Å) [21], en los modelos estudiados por Solomon [9] y en compuestos similares reportados por Chen y Solomon, 2004 [117].

Por otra parte, teóricamente hemos podido observar que la distancia de enlace Cu-S aumenta a medida que ocurre la hidroxilación. Cuando el cobre se oxida por el oxígeno molecular del medio, ocurre una perturbación geométrica en la distancia Cu-S (Metionina) que ha sido estudiada a través de EXAFS en PHM y DβM [23,131].

En este trabajo se detallan los primeros dos pasos de la reacción que consisten en el enlace del oxígeno al sitio de Cu_M y una de las etapas centrales: la HAT desde la dopamina al complejo superoxo de Cu_M.

Antes de estudiar el modo de enlace del oxígeno al cobre. Se estudio el intercambio del ligando agua por el ligando oxígeno en el complejo de Cu_M. Se encontró que la reacción es endergónica presentando un $\Delta G^\circ = 6,5$ kcal/mol en fase gaseosa, $\Delta G^\circ = 3,2$ kcal/mol empleando la estructura optimizada en fase gaseosa considerando el medio proteico y $\Delta G^\circ = 3,5$ kcal/mol optimizando en medio proteico. Solomon y colaboradores encontraron que este intercambio presenta un $\Delta G^\circ = 1,2$ kcal/mol en el modelo propuesto para PHM.

Reacción	$\Delta G^\circ_{gaseosa}$	$\Delta G^\circ_{sp(gaseosa)+PCM}$	ΔG°_{PCM}
$Cu_M - H_2O + O_2 \rightarrow Cu_M - O_2 + H_2O$	6,5	3,2	3,5

Tabla 1: ΔG para la reacción de intercambio de una molécula de agua por el oxígeno molecular en el complejo Cu_M.

¹ Sin considerar el modelo de solvatación PCM

² Considerando el modelo de solvatación PCM

3.2. PRIMER PASO: Enlace de oxígeno al complejo superoxo de cobre

El primer paso que activa el mecanismo de la hidroxilación de la dopamina es la unión de oxígeno molecular al sitio Cu_M^I para producir una especie superoxo de cobre (II).

Un enlace σ entre el oxígeno molecular y el átomo de cobre (I) perteneciente a la $\text{D}\beta\text{M}$ puede ocurrir de dos maneras: coordinación frontal que consiste en un enlace bidentado del oxígeno sobre el Cu_M y la coordinación terminal del oxígeno que se enlaza de forma monodentada sobre el Cu_M . En ambos casos, la oxidación del cobre por el oxígeno conduce a la transferencia de un electrón desde el Cu^+ al oxígeno, formando el complejo superoxo de cobre (II).

La Figura 13 *a* y *b* muestra las dos estructuras optimizadas para los dos superóxidos de cobre unidos de forma monodentada y bidentada al oxígeno. Las estructuras presentan multiplicidades singlete y triplete, respectivamente, que están de acuerdo con los resultados de susceptibilidad magnética por SQUID para estos complejos [10,132].

En la conformación monodentada, el superoxo se enlaza al Cu^{2+} compartiendo un par de electrones, formando así un enlace covalente coordinado. En esta geometría el Cu^{2+} y el ligando superoxo quedan con un electrón desapareado evidenciando una multiplicidad triplete (Figura 17).

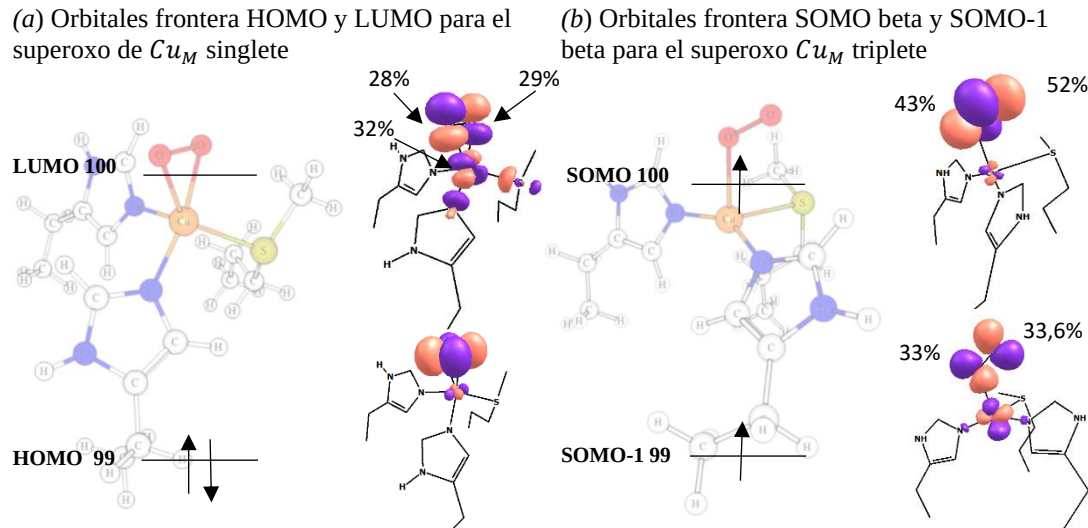


Figura 17: Orbitales fronteras de las especies superoxo Cu_M (a) Orbitales moleculares HOMO y LUMO del superoxo Cu_M singlete (b) Orbitales moleculares betas (no ocupado) SOMO y SOMO-1 del superoxo Cu_M triplete.

En la coordinación bidentada, el acercamiento de las dos especies disminuye la diferencia de energía entre los orbitales parcialmente ocupados conduciendo al

apareamiento de los electrones. La multiplicidad de esta estructura es singlete, como se muestra en la Figura 17.

Para predecir la especie con menor energía, estudiamos la variación en la energía libre de Gibbs entre los dos isómeros. Se encontró que el isómero coordinado de forma monodentada está favorecido sobre la forma bidentada por $\Delta G^\circ = 11,54$ kcal/mol y $\Delta G^\circ = 17,53$ kcal/mol en fase gaseosa y optimizando en medio proteico, respectivamente. De acuerdo con la regla de los 18 electrones, la especie bidentada es un complejo de 17 electrones, mientras que la monodentada presenta 16 electrones, por lo tanto, la especie monodentada sería más estable, como lo indican nuestros resultados, pero la especie bidentada sería la más reactiva, sin embargo, para la HAT, nuestros resultados indican que el HOMO de la especie monodentada estaría más favorecida para recibir un átomo de hidrógeno. Una mayor estabilidad del isómero coordinado de forma monodentada ha sido evidenciada en complejos de cobre tetraédricos [27]. También se ha determinado mediante cálculos teóricos que para un modelo de la enzima PHM la forma monodentada está favorecida en 6,3 kcal/mol con respecto a la forma bidentada [9]. En el complejo precatalítico encontrado por Amzel para la enzima PHM [29], el oxígeno molecular se encuentra enlazado al Cu_M con una geometría monodentada. La Tabla 2 muestra los parámetros obtenidos por cristalografía de rayos X [29].

La geometría optimizada del superoxo de $Cu_M - O_2$ coordinado de forma bidentada que hemos encontrado presenta: un ángulo Cu_M-O-O de 72° , una distancia de enlace $O-O$ de 1,33 Å, una distancia $Cu_M - O$ proximal de 1,84 Å y una distancia Cu_M-O distal de 1,91 Å. Por otro lado, en el superoxo $Cu_M - O_2$ coordinado de forma lateral, el ángulo Cu_M-O-O es de 118° , la distancia del enlace $O-O$ es de 1,24 Å, la distancia Cu_M-O proximal es de 2,1 Å y la distancia Cu_M-O distal es de 2,9 Å lo que sugiere que la estructura optimizada para el isómero coordinado de forma monodentada se encuentra muy cercana a la estructura experimental del sitio activo de estas enzimas.

Nivel de teoría	Cu_M-O-O	$O-O$	Cu_M-O proximal	Cu_M-O distal
Estructura experimental para la PHM	110°	1,23 Å	2,11 Å	2,78 Å
uB3LYP/6-311G(d,p)	118°	1,240 Å	2,101 Å	2,899 Å
uB3LYP/6-311++G(d,p)	$122,4^\circ$	1,207 Å	2,906 Å	3,696 Å
uB3LYP/def2TZVP Dispersion=GD3	$118,8^\circ$	1,208 Å	2,563 Å	3,319 Å

Tabla 2: Evaluación de diferentes parámetros en el complejo de Cu_M triplete utilizando diferentes niveles de teorías.

Otros niveles de teoría fueron empleados para optimizar la estructura de superoxo Cu_M triplete. Como puede evidenciarse en la Tabla 2, en general los tres niveles de teoría reproducen bien el ángulo Cu_M-O-O y la distancia $O-O$ del complejo. Sin embargo, las bases que incluyen funciones difusas aumentan la distancia entre el átomo de cobre y el oxígeno distal. Todos los cálculos incluyeron el modelo PCM.

Usando multiwfn [133] fue posible establecer la contribución de los átomos a los orbitales LUMO en cada isómero. La Figura 17 muestra que el orbital LUMO del superoxo de cobre (II) singlete tiene una contribución del ~28% en cada oxígeno y 32% en el átomo de cobre. Por otro lado, el orbital SOMO beta del superoxo de cobre triplete (II) tiene una contribución del 52,3% en el oxígeno distal, 43% en el oxígeno proximal y un 3% en el cobre. El orbital SOMO-1 beta tiene una contribución del ~33% en cada oxígeno y un 27% en el cobre. Estos resultados son coherentes con la literatura demostrando que el superoxo de cobre triplete estaría más activado para realizar una abstracción del átomo de hidrógeno desde la dopamina.

3.3. SEGUNDO PASO: Abstracción del átomo de hidrógeno (HAT)

Después de la adición del oxígeno molecular, el siguiente paso en el mecanismo de hidroxilación es la HAT desde la dopamina hasta el complejo superoxo de cobre (II) para generar el hidroperoxo de cobre (II) $Cu^{2+}_M(\eta^1-OOH)$ y el radical dopamina ($Dp^\bullet$). Este paso de la reacción es importante porque determina la posición final del grupo hidroxilo en producto final debido a la abstracción del átomo de hidrógeno en la posición “R” ó “S”. Por otra parte, la conformación de la dopamina interactuando con el catalizador, con ó sin enlace de hidrógeno, Figura 18, determinará la energética de la reacción.

Hemos encontrado que la existencia de un enlace de hidrógeno entre el grupo amina de la dopamina y el oxígeno proximal en el complejo superoxo de la enzima, Figura 18, tiene el efecto de facilitar la transferencia del átomo de hidrógeno disminuyendo la barrera energética de la reacción. Este hallazgo es evidencia directa que la conformación del grupo amino en la dopamina para formar un enlace de hidrógeno juega un rol importante en la energía de activación de las reacciones de HAT. Este resultado está de acuerdo con la observación de que la $D\beta M$ puede catalizar otras reacciones que involucren compuestos con esqueletos básicos de feniletilamina [134], como la dopamina, que facilite la formación de un enlace de hidrógeno con el grupo $Cu_M^2(O_2^{-1})$ en la enzima.

3.3.1. Conformaciones de la DP interactuando con el superoxo de Cu_M

El carbono β de la dopamina no es un carbono asimétrico, sin embargo, el producto hidroxilado: la norepinefrina, presenta una configuración **R**. En consecuencia, la

conformación de la dopamina y el hidrógeno que se abstrae del carbono β es esencial para entender el mecanismo.

En resumen, hemos evaluado cuatro reacciones de HAT considerando las dos conformaciones iniciales de dopamina interactuando con el $\text{Cu}_M^2(\text{O}_2^{\cdot-})$. La primera conformación corresponde a la dopamina que no presenta interacción (Figura 15 a) con el sitio de $\text{Cu}_M^2(\eta^1 - \text{O}_2^{\cdot-})$. La segunda conformación, corresponde a la estructura con un enlace de hidrógeno entre un hidrógeno de la amina de la dopamina y un oxígeno del superoxo. El enlace de hidrógeno de la conformación 2 se evidencia entre el hidrógeno de la amina y el oxígeno proximal del superoxo, Figura 15 b.

Para cada conformación de la dopamina, las dos HAT fueron reportadas involucrando la transferencia del hidrógeno “R” ó “S” desde el carbono β de la dopamina. Por lo tanto, para cada conformación se generó el par de radicales de dopamina que conducen a los enantiómeros *R* ó *S*.

Las reacciones estudiadas fueron **R1 (R3)** y **R2 (R4)** en donde el átomo de hidrógeno $H_R(H_S)$ es transferido desde la dopamina en la conformación a y b, respectivamente. Las reacciones **R1** y **R2** fueron estudiadas simulando el medio proteico y se denotaron como **R1(p)** y **R2(p)**.

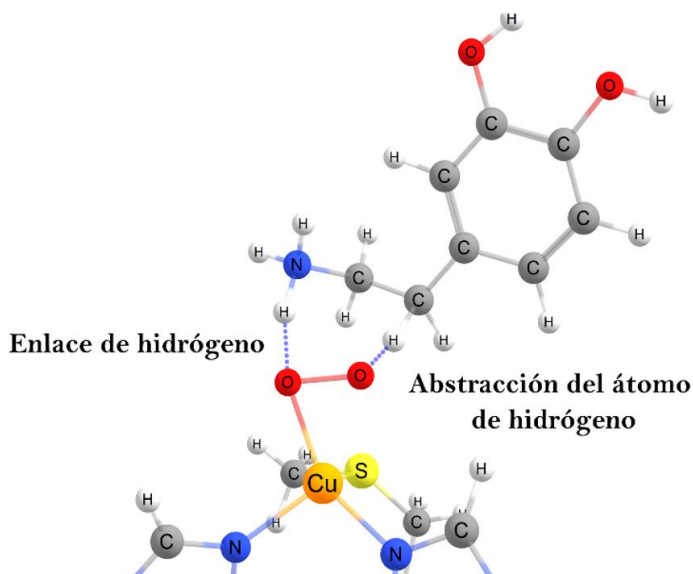


Figura 18: Interacción entre la dopamina y el sitio de $\text{Cu}_M^2(\eta^1 - \text{O}_2^{\cdot-})$. La dopamina se encuentra en la conformación 2, donde dos interacciones entre las especies pueden ser vistas: un enlace de hidrógeno entre la amina de la dopamina y el oxígeno proximal del superoxo y la interacción para la **HAT**.

Para ilustrar las interacciones específicas que conducen las reacciones de HAT, la Figura 18 muestra el estado de transición para la reacción **R2** donde el enlace de

hidrógeno entre las dos especies y el átomo transferido desde el carbono β de la dopamina son mostrados explícitamente. Puede ser notado que la HAT desde el $C\beta$ de la dopamina involucra rearrreglos estructurales que toman lugar concertadamente. Como se mostrará más adelante, el ángulo diedro N-C α -C β -C γ en la dopamina y la distancia C β -O (C β de la dopamina y el oxígeno del superoxo) son muy importantes porque producen un efecto cooperativo para la transferencia de hidrógeno.

3.3.2. Análisis del Perfil Energético de la Fuerza de Reacción

La Figura 19 muestra los perfiles de energía y de la fuerza de reacción para las cuatro reacciones bajo estudio. Cada reacción conduce al mismo radical dopamina, el cual a través de subsecuentes pasos conducirá al enantiómero R ó S de la norepinefrina.

Experimentalmente, el producto formado es el enantiómero R, y de las cuatro reacciones, solo **R1** y **R2** conducen al producto observado, no obstante, cada una de ellas lo realiza mediante dos mecanismos diferentes que serán analizados en los siguientes párrafos. En este punto y teniendo en cuenta las energías mostradas en la Tabla 3, **R2** parece ser el mecanismo de hidroxilación más probable debido a que presenta una barrera energética menor para HAT con respecto a **R1**. Adicionalmente, es posible deducir desde las reacciones que para producir el producto final con enantiomería R, la norepinefrina, es necesario que la abstracción sea realizada solo sobre el H_R.

	Método	Reacciones			
		R1	R2	R3	R4
$\Delta E^\ddagger$	Fase gas	31,61	26,44	32,35	29,16
	Medio proteico	30,29	28,46		
ΔE^o	Fase gas	17,47	13,18	19,13	14,11
	Medio proteico	15,91	14,51		
RFA		$W_1=24,56$ (23,45)	$W_1=24,66$ (26,59)	$W_1=26,66$	$W_1=27,49$
		$W_2=7,05$ (6,84)	$W_2=1,78$ (1,87)	$W_2=5,69$	$W_2=1,67$
		$W_3=-1,00$ (-1,49)	$W_3=-1,91$ (-2,13)	$W_3=-0,93$	$W_3=-3,05$
		$W_4=-13,14$ (-12,89)	$W_4=-11,35$ (-11,82)	$W_4=-12,29$	$W_4=-12,00$

Tabla 3: Información energética para las reacciones de HAT desde dopamina en fase gaseosa y medio proteico. Trabajos de reacción en medio proteico son dados en paréntesis para **R1** y **R2**. Todos los valores están en kcal/mol.

Las reacciones **R1** y **R2** discutidas anteriormente, fueron estudiadas en medio proteico, solo pequeños cambios en las energías de activación y de reacciones fueron encontradas. Debe ser notado que, en todos los casos, la energía de activación es principalmente debido a cambios estructurales, en todas las reacciones W_1 representan al menos cerca del 80% de la energía de activación, esta energía da cuenta de los procesos de translación y distorsión de la dopamina para interactuar con el complejo superoxo de cobre.

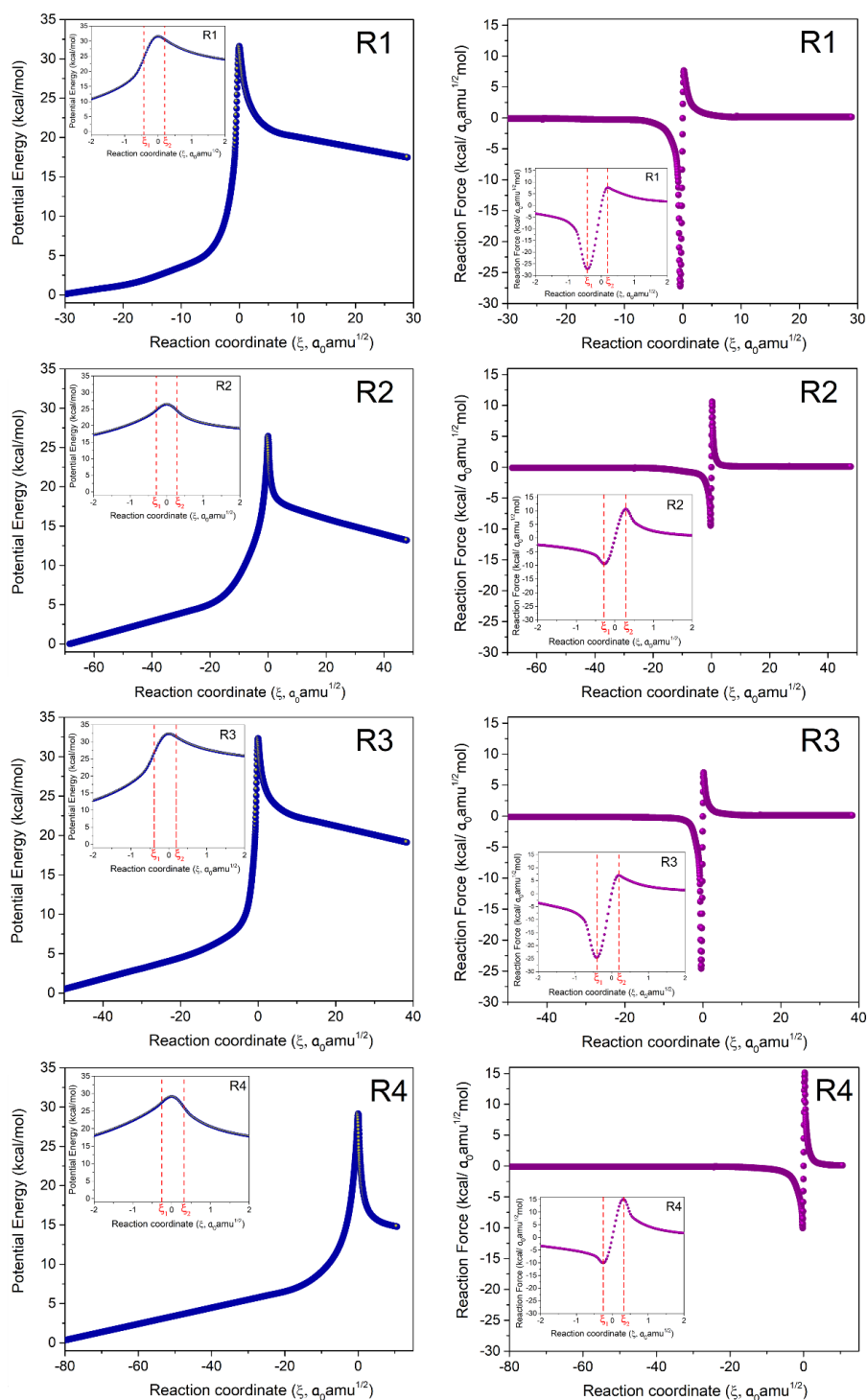


Figura 19: Perfiles de energía y de fuerza de reacción de las cuatro reacciones de HAT en fase gas. Los recuadros muestran una vista amplia de las regiones del estado de transición que amplifican los intervalos $\xi_1 = -0,422$ a $\xi_2 = 0,195$ en **R1**; $\xi_1 = -0,285$ a $\xi_2 = 0,285$ en **R2**; $\xi_1 = -0,390$ a $\xi_2 = 0,195$ en **R3** y $\xi_1 = -0,254$ a $\xi_2 = 0,318$ en **R4**.

Mecanísticamente, el par de reacciones {**R1**, **R3**} y {**R2**, **R4**} tienen un comportamiento similar. El porcentaje de energía estructural W_1 , en la energía de activación es cerca del 80% en el primer par de reacciones mientras que en el segundo par es mayor que el 92%. Adicionalmente, **R2** y **R4** presentan una disminución considerable en el trabajo electrónico, W_2 para alcanzar el TS comparadas con el par **R1** y **R3**. A la luz de estos resultados, es claro que el efecto catalítico del enlace de hidrógeno entre la dopamina y el superoxo actúa principalmente sobre el trabajo electrónico W_2 produciendo una reducción significativa de esta cantidad.

Es interesante notar que las cuatro reacciones presentan perfiles de reacción y de fuerza de reacción con la misma forma cualitativa, aunque los perfiles de las reacciones, **R1** y **R3**, así como, **R2** y **R4** son similares uno con otro; esto es consistente con el hecho de que cada par de reacciones proceden a través del mismo mecanismo de reacción. En **R1** y **R3**, las energías incrementan de forma monótona hasta alcanzar un punto en el cual la velocidad de cambio de la energía incrementa rápida e intensamente. En **R2** y **R4**, el cambio de la energía va subiendo moderadamente hasta alcanzar el estado de transición. En todas las cuatro reacciones, la región del estado de transición es muy estrecha, lo cual explica la naturaleza estructural de la energía de activación. La actividad electrónica en esta región es muy intensa identificando un gran número de conformaciones transitorias que cambian para alcanzar el estado de transición, como lo descrito por Polanyi y Zewail [76,77].

En resumen, todas las cuatro reacciones presentan un comportamiento cualitativo similar, aunque solo dos de ellas (**R1** y **R2**) conducen al enantiómero correcto, por lo tanto, en las siguientes secciones, solo serán discutidas estas dos reacciones.

3.3.3. Análisis del reactivo activado

Para entender la influencia de la conformación inicial de la dopamina en las regiones reactivas, es necesario analizar los cambios estructurales desde los reactivos hasta la estructura del reactante activado, a ξ_1 . En el primer punto crítico de la fuerza de reacción, es encontrado el reactante activado que ha sufrido una preparación estructural para iniciar actividad electrónica. En este contexto, W_1 puede ser definido como el trabajo necesario para alcanzar una estructura activada desde los reactantes.

Para comparar el reactante activado y el reactivo de cada reacción de HAT, fue extraída la matriz Z de cada estructura. Los cambios estructurales de los reactantes hasta el reactivo activado en **R1** y **R2** fueron principalmente tres: i) la translación de la DP para interactuar con el complejo superoxo; ii) la rotación interna del grupo etilenamina en dopamina, representado por el cambio del ángulo diedro $C\gamma-C\beta-C\alpha-N$ para exponer el átomo de hidrógeno cerca del superoxo y iii) la flexión de los ángulos $O-H-C\beta$ y $Cu-O-O$. Este reordenamiento estructural es responsable por W_1 . En **R2**, la conformación

de la DP genera un impedimento estérico con el superoxo de cobre que no permite la apertura normal del ángulo Cu-O-O. Adicionalmente, el reactivo activado es estabilizado por un anillo de siete miembros (Figura 18) entre la dopamina y el superoxo de cobre que se forma debido al enlace de hidrógeno presente entre las dos especies. Este anillo disminuye los grados de libertad y una condición de rigidez es mantenida en la dopamina formando un plano entre el C α -C β -C γ que promueve la HAT y facilita la formación del radical dopamina por el cambio de hibridación desde sp^3 a sp^2 .

En la región del TS, la HAT empieza a desplegarse involucrando la ruptura del enlace C-H en la dopamina y el fortalecimiento del enlace O-H en el complejo superoxo. El reordenamiento estructural distinto en **R2** con respecto a **R1** justifica la disminución en el trabajo electrónico W_2 . Un ángulo cercano a 180° (172°) fue encontrado en el TS entre el O – H(Dp) – β C(Dp), similar al reportado para PHM [9]. En la región de los productos, la relajación estructural permite la formación del radical dopamina y el hidroperoxo de cobre (II) ($\text{Cu}_M^{2+}\text{OOH}$).

3.3.4. Interacciones no covalentes en el TS

Las interacciones no covalentes fueron analizadas para entender mejor la interacción entre las dos especies en el estado de transición de cada reacción. La Figura 20 muestra los gráficos de isosuperficies atractivas y repulsivas representando este tipo de interacciones. Una fuerte interacción no covalente atractiva (en azul) indica el enlace de hidrógeno en **R2** junto con interacciones débiles repulsivas (en naranja) en el límite entre la dopamina y el complejo superoxo. Regiones azules verdosas aparecen en algunos sitios indicando interacciones atractivas principalmente asociadas a la interacción electrostática entre los residuos químicos. Interesantemente, en **R2** una región atractiva fina entre el cobre y el oxígeno proximal es evidenciada, ésta probablemente se deba a la menor apertura del enlace Cu-O-O. Esta interacción que no es vista en ninguna de las cuatro reacciones estudiadas puede estar facilitando el rearrreglo electrónico y puede ser responsable para el menor valor de W_2 para alcanzar el TS, lo cual explica la energía de activación más baja en **R2** comparada con otras reacciones.

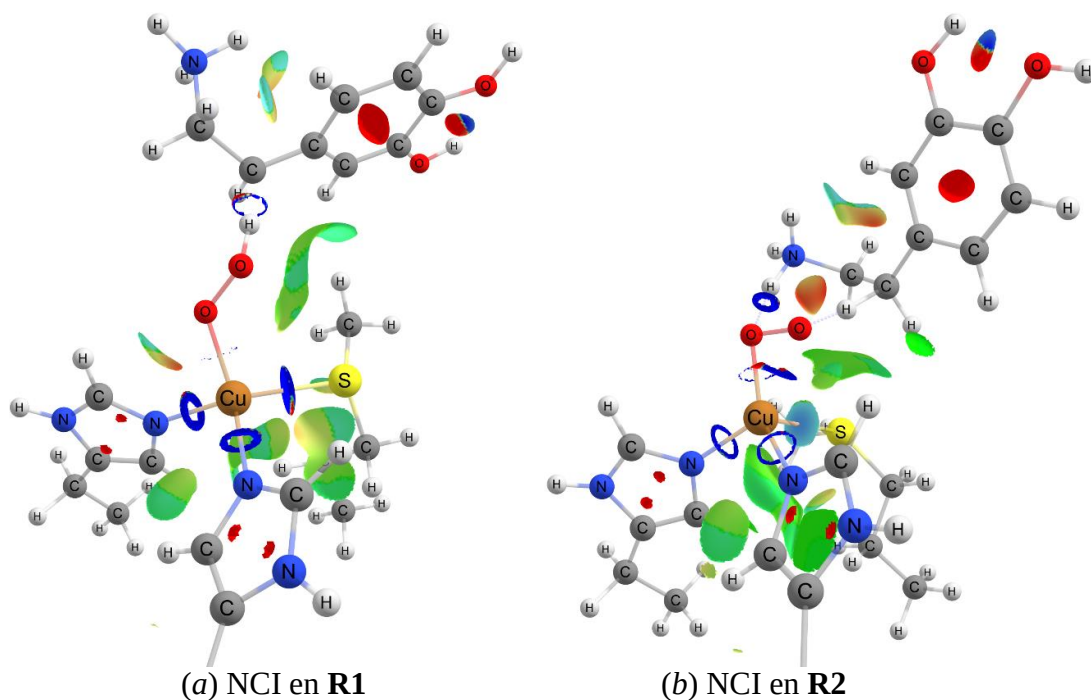


Figura 20: Interacciones no covalente de los estados de transición de las dos reacciones de HAT desde dopamina al complejo superoxo de cobre (II). Interacciones atractivas son representadas en superficies azules-verdes mientras que interacciones repulsivas son representadas por superficies rojas-amarillas.

Las interacciones covalentes de las otras reacciones (R3, R4) son mostradas en el Anexo 2.

3.3.5. Análisis del flujo electrónico de reacción (REF), Interacciones no covalentes y órdenes de enlaces de Mayer para la HAT

Para describir la actividad electrónica durante la HAT se analizó el flujo electrónico de reacción (REF del inglés Reaction Electronic Flux), complementado con el estudio de interacciones no covalentes y órdenes de enlace natural. Las gráficas del REF y de los órdenes de enlace de Mayer [103] que se discuten y muestran en esta sección, corresponden al intervalo de la coordenada de reacción donde estos parámetros cambian significativamente.

La Figura 21 *a* muestra el REF para la HAT en **R1** y **R1(p)**. Inicialmente, REF permanece constante a valores cercanos a cero. En **R1**, la actividad electrónica toma lugar antes que sea alcanzado el reactante preparado, y el punto donde el REF comienza a cambiar, se correlaciona bien con el punto de partida de la variación en los órdenes de enlace de Mayer como se muestra en la Figura 21 *b*. Antes de ingresar en la región del TS, el acercamiento de las dos especies las polariza dando lugar a un pico suave en REF. En esta zona, las interacciones no-covalentes mostraron una interacción electrostática fuerte y positiva entre el hidrógeno del C β de la dopamina con el átomo

de oxígeno del superoxo que podría ser el origen del efecto de la polarización reflejada sobre el perfil REF.

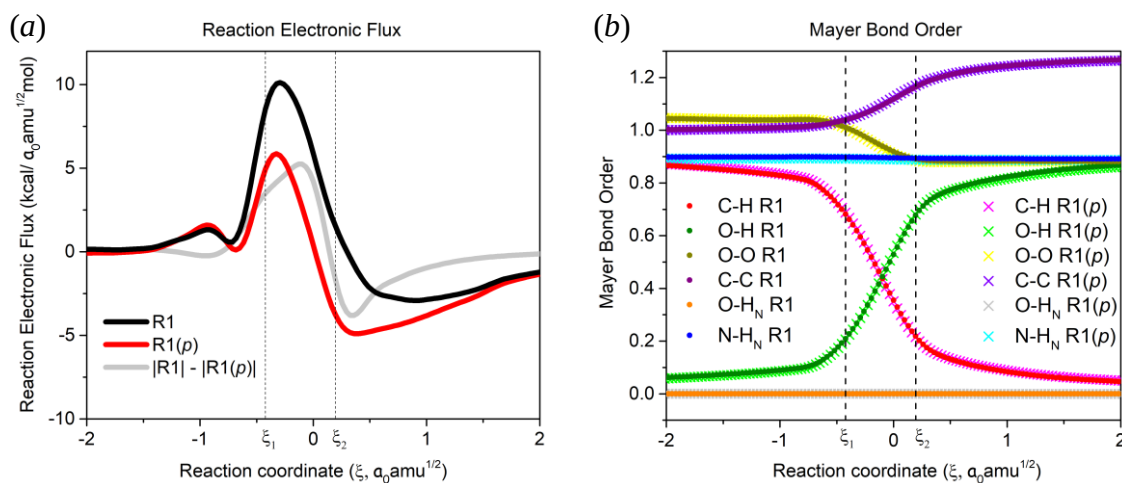


Figura 21: Flujo electrónico de reacción y órdenes de enlace de Mayer para **R1** y **R1(p)**. Note que los órdenes de enlace de ambas reacciones están superpuestos el uno con el otro.

Durante este pico, disminuye levemente la distancia O-H (átomos involucrados en la abstracción) y se incrementa levemente la distancia C-H en la dopamina. Esta primer cresta del flujo muestra la polarización de las especies previo a la HAT.

Después del este pico, desaparece la interacción electrostática positiva entre el hidrógeno del C β de la dopamina con el átomo de oxígeno del superoxo indicando que inicia a formarse el enlace O-H y simultáneamente se debilita el enlace C-H. La ruptura del enlace C-H para llevar a cabo la transferencia del átomo de hidrógeno y la formación del enlace O-H, son responsables del fuerte incremento en el REF conducido a la formación del enlace O-H. En la región del TS, el REF se incrementa hasta alcanzar un máximo donde el hidrógeno desde el C β está a mitad de camino entre la dopamina y el radical superoxo, el enlace C β -H se rompe mientras que simultáneamente se enlaza el O-H. Desde la Figura 21 b, es claro observar que dentro de la región del TS, los dos procesos, la transferencia del hidrógeno desde la dopamina y la formación del grupo hidroxilo en el sitio catalítico, toman lugar de forma sincrónica. También, es interesante observar el cambio simultáneo y opuesto en los órdenes de enlaces O-O y C β -C γ , esto significa que la hibridación del C β cambia desde sp^3 a sp^2 mientras que en el radical oxígeno va desde sp^2 a sp^3 , este cambio es completado dentro de la región de los productos.

La Figura 21 también reproduce el REF para la HAT en la reacción **R1** simulando el medio proteico con el PCM llamada **R1(p)**. Es importante notar que los perfiles en fase gaseosa y en medio proteico son muy similares. Las diferencias entre los perfiles son solo notables principalmente dentro de la región del TS donde la intensidad del pico

positivo principal en **R1(p)** es menor que en **R1**. Por otra parte, desde la Figura 21 *b*, se muestra que la actividad electrónica a nivel de enlace es la misma (las curvas para la fase gaseosa y el medio proteico están superpuestas) la diferencia en el REF debe estar asociada con la polarización electrónica debida al campo de reacción impuesto por el modelo PCM.

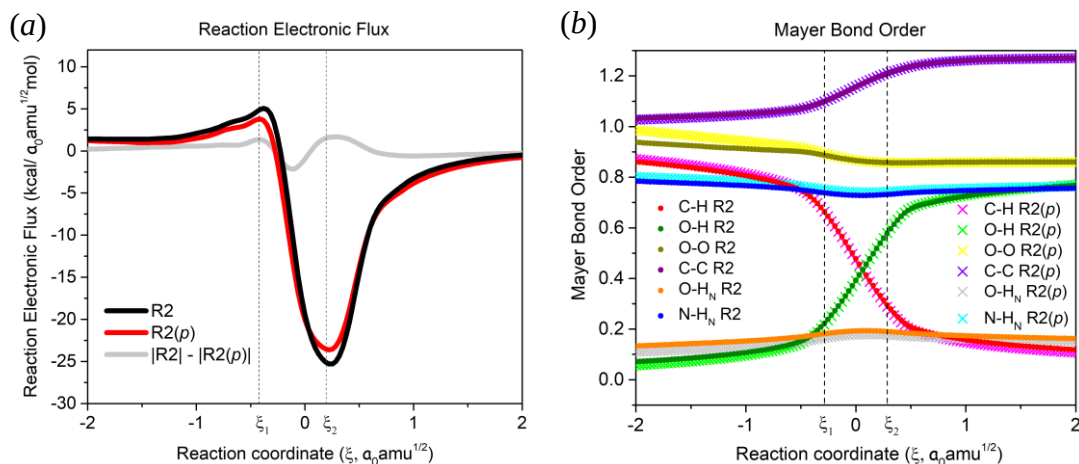


Figura 22: Flujo electrónico de reacción y órdenes de enlace de Mayer para **R2** y **R2(p)**. Note que los órdenes de enlace de ambas reacciones están superpuestos el uno con el otro.

La Figura 22 *a* muestra el REF para **R2** y **R2(p)**. El perfil de REF para **R2** muestra dos picos distintivos, inicialmente un pico amplio y con intensidad media se localiza mayormente en la región de reactantes y un segundo pico negativo amplio e intenso es observado en la región del estado de transición y productos. Curiosamente, el perfil presentado para la HAT en **R2**, es opuesto al observado en **R1**, confirmando que los mecanismos de ambas reacciones son diferentes. El cambio en la física del REF demuestra que el enlace de hidrógeno entre la dopamina y el complejo superoxo de alguna manera está condicionando la actividad electrónica y todo el mecanismo de la reacción. La conformación adoptada por los reactantes para permitir la formación de un anillo de siete miembros en el estado de transición produce una polarización espontánea inicial del REF dando lugar a un pico positivo cuando se sale de la región de reactantes. Las interacciones no covalentes muestran una interacción positiva y fuerte entre el hidrógeno y el oxígeno involucrados en la HAT que desaparecen antes de alcanzar el máximo de REF. También, es observado un rearrreglo del átomo de oxígeno del O_2 unido al cobre cuando la reacción avanza. Por lo tanto, el rearrreglo inicial en el ángulo Cu-O-O podría estar relacionado con el origen en el cambio temprano del orden del enlace O-O que puede estar contribuyendo a la polarización sobre el REF. En la Figura 20, las interacciones no covalentes fuertes y repulsivas en el TS son visualizadas entre el $\text{C}\beta$ de la dopamina y el oxígeno del superoxo, esto confirma que los efectos de polarización crecen inicialmente a medida que las especies se acercan.

En la región del estado de transición, el REF disminuye bruscamente reflejando la intensa actividad electrónica debido a la ruptura del enlace C-H y la abstracción de hidrógeno, así como la disminución del enlace O-O junto con el incremento de la distancia del enlace C β -C γ , los cuales ocurren de forma concertada y no espontánea en esta región. En la región de los productos, el REF aumenta hasta estabilizarse a valores cercanos a cero indicando que la actividad electrónica se desvanece para alcanzar el equilibrio. Es importante mencionar que interacciones no covalentes atractivas muestran que el enlace hidrógeno entre la amina y el superoxo son encontradas en toda la coordenada de la reacción, y es más atractiva en la región del estado de transición.

La Figura 22 *a*, también ilustra el flujo electrónico para la HAT en **R2** en medio proteico. El perfil de REF en **R2(p)** es muy similar al observado en **R2**. Similarmente a **R1**, no se presentan cambios en la estructura electrónica observada, todos los perfiles de órdenes de enlaces están superpuestos, aunque una pequeña diferencia es percibida dentro de la región de reactantes en los órdenes de enlaces O-O, ver Figura 22 *b*. De igual manera que el par anterior, la diferencia del REF entre **R2** y **R2(p)** está asociada con los efectos de polarización debido al campo de reacción involucrados en el modelo PCM.

Con los resultados de esta sección, se concluye que las dos reacciones **R1** y **R2** presentan mecanismos y orígenes físicos diferentes. La siguiente sección profundiza en el entendimiento de la actividad electrónica realizando la descomposición física del flujo electrónico de reacción, seguida de la descomposición química de REF.

3.3.6. Descomposición física del REF

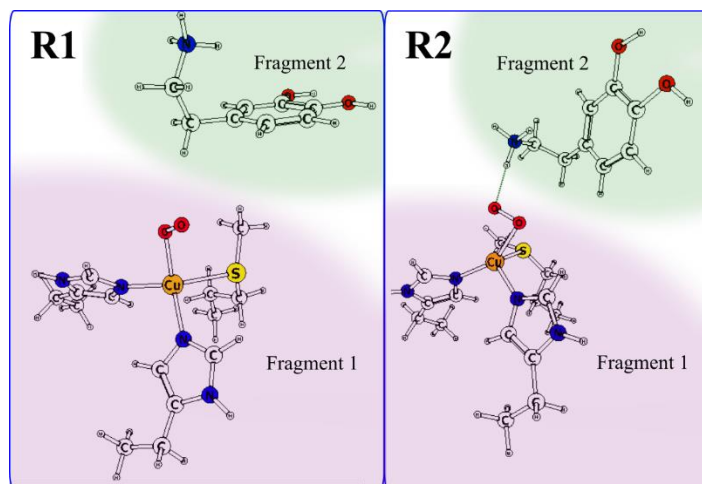


Figura 23: Definición de los fragmentos empleados en el método counterpoise para las dos reacciones.

En esta sección se describe la descomposición física del REF en términos de efectos de polarización y de transferencia. Los resultados a continuación son presentados de forma comparativa entre ambas reacciones con el fin de entender las diferencia en la actividad electrónica. Primero, se comparan los flujos de polarización, luego los flujos de transferencia y finalmente los flujos totales. Para calcular el flujo de polarización usando método CP (de sus siglas en inglés Counterpoise), dos fragmentos fueron considerados. El fragmento 1 corresponde al complejo superoxo de cobre y el fragmento 2 a la dopamina.

3.3.6.1. Flujo de polarización $J_p(\xi)$

La Figura 24 muestra el flujo de polarización a lo largo de la coordenada de reacción de la supermolécula y de los dos fragmentos para las reacciones, **R1** y **R2**. Ambas reacciones presentan perfiles similares del flujo de polarización de la supermolécula y de los fragmentos. El $J_p(\xi)$ para la supermolécula en la curva roja, muestra dos picos distintivos: Uno saliendo de la región de reactantes y el otro iniciando la región de los productos. Se puede observar que en ambas reacciones el primer pico de $J_p(\xi)$ está contribuido solo por el flujo de polarización del fragmento 1, complejo superoxo de cobre que se muestra en la curva morada. Por otro lado, el segundo pico es contribuido por ambos fragmentos, pero con una mayor contribución del flujo de polarización del fragmento 2, dopamina, representada en la curva verde. De acuerdo a estos resultados, el primer máximo de $J_p(\xi)$ evidencia la polarización del complejo superoxo de cobre antes de que el hidrógeno sea transferido desde la DP, y el segundo máximo de $J_p(\xi)$ da cuenta de la polarización principalmente de la DP cuando el hidrógeno ya ha sido transferido.

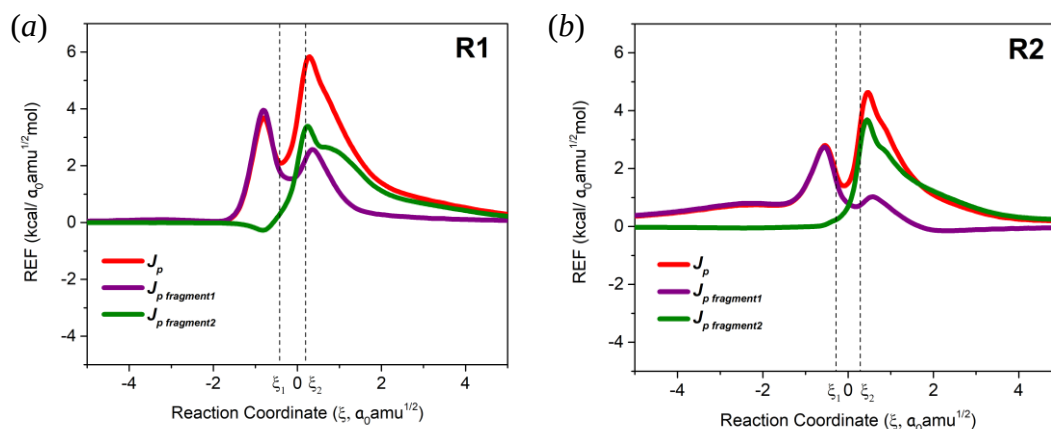


Figura 24: Flujo de polarización para la supermolécula y los dos fragmentos en **R1** y **R2**. En cada perfil, los gráficos NCI son mostrados para los máximos de cada $J_p(\xi)$.

La Figura 25 *a* y *c* muestra los gráficos NCI para las estructuras en la coordenada de reacción donde se encuentra el primer máximo de $J_p(\xi)$ para la reacción **R1** y **R2**, respectivamente. En ambas reacciones se puede evidenciar una fuerte interacción debido a un enlace de hidrógeno momentáneo entre el hidrógeno unido al C β de la dopamina y el oxígeno distal del complejo superoxo. Antes de la HAT, el superoxo incrementa el ángulo Cu-O-O para mejorar la interacción con la DP y lograr acercarse al hidrógeno, esta distorsión en la estructura del superoxo podría explicar la polarización del complejo superoxo.

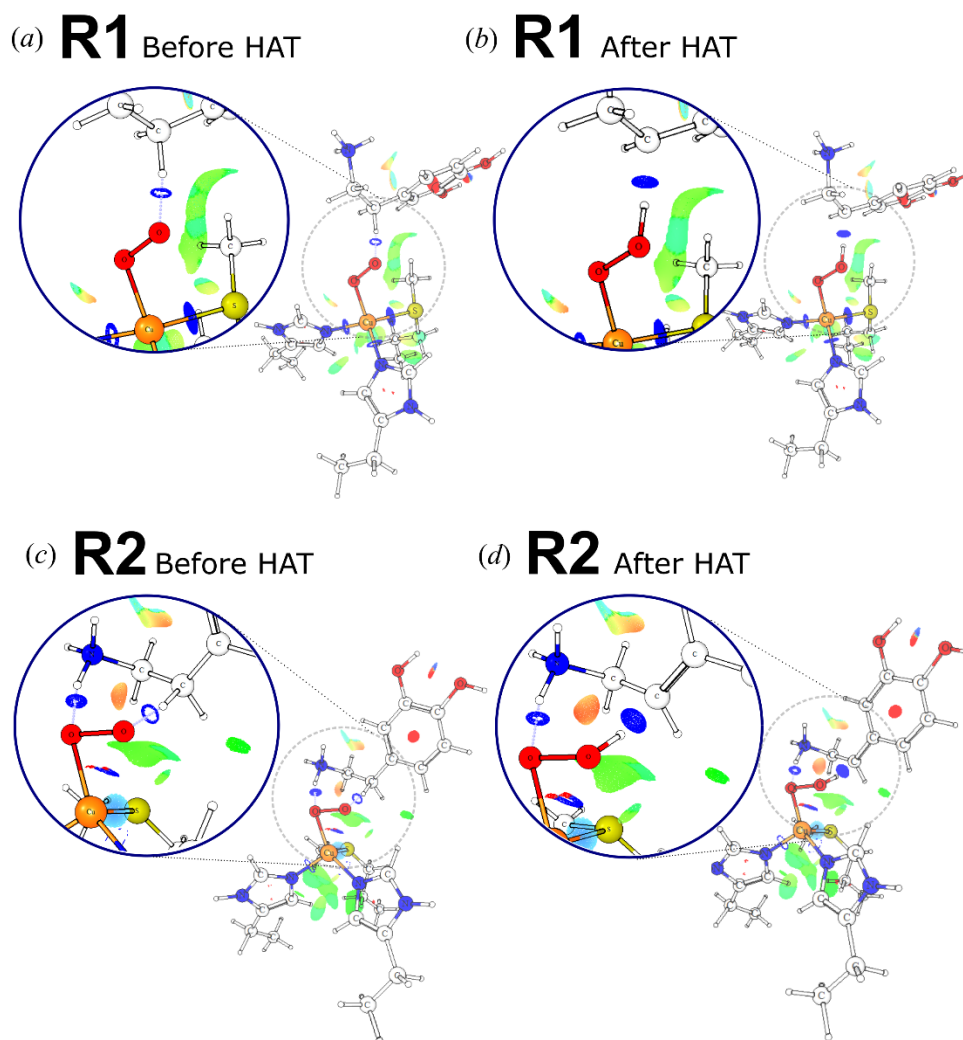


Figura 25: Interacciones no covalentes para las dos estructuras en los dos máximos de J_p para las reacciones **R1** y **R2**. A la izquierda se visualiza la estructura en la coordenada de reacción para el primer máximo de J_p antes de la HAT y a la derecha se muestra la estructura de la supermolécula en la coordenada para el segundo máximo de J_p después de la HAT.

En el segundo pico de $J_p(\xi)$, el hidrógeno del C β la DP ya ha sido transferido al superoxo de cobre (II) y por lo tanto hay una gran polarización en estas especies, especialmente en el C β la DP que se ha convertido en un radical. La Figura 25 b y d muestra los gráficos NCI para las estructuras en la coordenada de reacción donde se encuentra el segundo máximo de $J_p(\xi)$ para la reacción **R1** y **R2**, respectivamente. En estas estructuras es evidenciado un segundo enlace de hidrógeno momentaneo entre el hidrógeno del complejo hidroperoxo y el C β de la DP.

Puede ser notado desde la Figura 24, que el flujo de polarización en **R2** es menor que en **R1**. Esto puede ser explicado porque en **R2**, la DP y el superoxo están unidos por el enlace de hidrógeno conduciendo a una HAT con una menor distorsion en las estructuras y por lo tanto a una menor intensidad en el flujo polarización.

Es importante mencionar que aunque la HAT ocurre de forma sincrónica como fue mencionado anteriormente, el flujo de polarización puede separar e identificar con precisión los eventos en ambas reacciones: la polarización del superoxo antes de la HAT y la polarización en el C β de la DP despues de la HAT. Por otra parte, podemos concluir que aunque las reacciones se lleven a cabo mediante mecanismos diferentes, el flujo de polarización es similar en ellas.

3.3.6.2. Flujo de transferencia $J_t(\xi)$

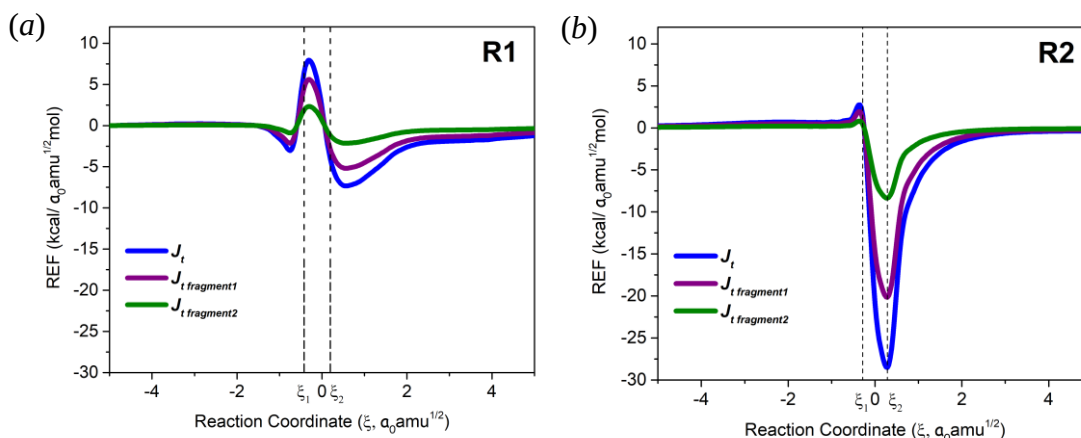


Figura 26: Flujo de transferencia para la supermolécula y los dos fragmentos en **R1** y **R2**.

La Figura 26 muestra el flujo de transferencia a lo largo de la coordenada de reacción para la supermolécula y los dos fragmentos en **R1** y **R2**. En **R1**, el flujo de transferencia para la supermolécula representado en la curva azul, muestra principalmente un pico característico en la región del TS y dos picos negativos menores, uno dejando la región

de los reactantes y otro iniciando la región de los productos. Se puede observar que todos los picos son contribuidos por ambos fragmentos, sin embargo, el fragmento 1 que corresponde al superoxo de cobre presenta la mayor contribución. Por otro lado, la Figura 26 *b* muestra el flujo de transferencia para la supermolécula y los dos fragmentos en **R2**. Si comparamos las dos gráficas *a* y *b*, podemos observar que el flujo de transferencia en **R2** es diferente a **R1**. En **R2**, la curva azul muestra el flujo de polarización de la supermolécula donde se pueden encontrar dos picos: Un pico positivo leve dejando la región de los reactantes y un pico negativo característico en la región de TS. Similar a **R1**, los dos fragmentos contribuyen a cada pico del flujo de transferencia.

Desde estos resultados podemos encontrar que la diferencia en el mecanismo de ambas reacciones se debe a la diferencia en los flujos de transferencia los cuales ocurren principalmente en la región del TS.

3.3.6.3. Flujo electrónico de reacción de la supermolécula

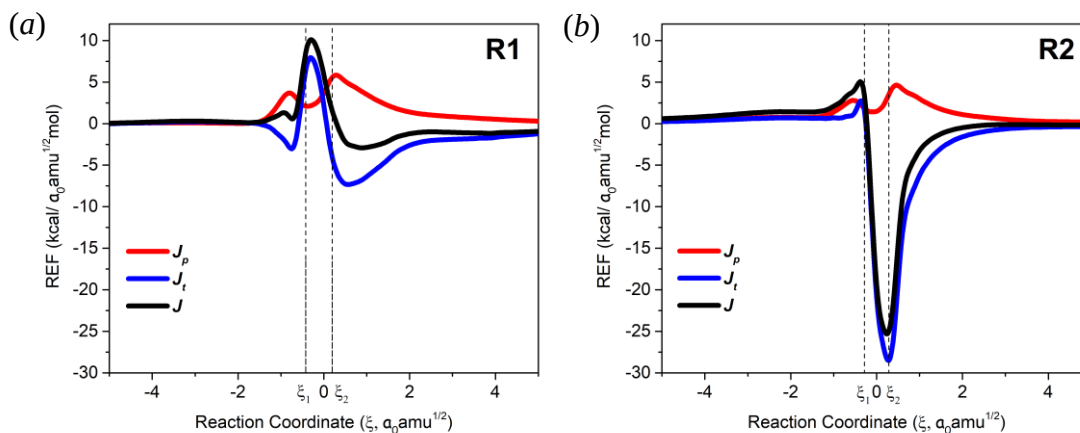


Figura 27: Flujo electrónico de reacción expresado en términos de polarización y transferencia para **R1** y **R2**.

La Figura 27 *a* y *b* muestra la representación física del REF en **R1** y **R2**, respectivamente. La curva en rojo muestra el flujo de polarización total, la curva en azul el flujo de transferencia total y la curva en negro el flujo electrónico de reacción de la supermolécula.

Como puede ser observado desde las gráficas en la Figura 27, el flujo electrónico de reacción en la curva negra presenta la misma tendencia que el flujo de transferencia en la curva azul en ambas reacciones, evidenciando que el flujo electrónico está principalmente asociado con efectos de transferencia electrónica, aunque los efectos de polarización también son importantes antes y después del TS.

En la Figura 27 *a*, es interesante notar la secuencia de los eventos. Primero se encuentra un pico de polarización en la región de los reactantes, posteriormente un pico de transferencia significativo en la región del estado de transición y finalmente un pico de polarización en la región de los productos. Esta reacción ejemplifica los eventos de polarización y transferencia de una reacción general.

Por otro lado, podemos evidenciar que en **R2**, Figura 27 *b*, el primer pico del flujo de polarización contribuye al flujo total indicando que los efectos iniciales de polarización y transferencia son procesos espontáneos antes del TS. No obstante, en la segunda parte podemos ver un efecto opuesto entre un pico positivo del flujo de polarización y un flujo negativo del flujo de transferencia, resultante en un pico negativo del flujo total debido a una mayor contribución del el flujo de transferencia. Este resultado indica que para la **R2** la formación de grupo OH del complejo superoxo de cobre es un proceso no espontáneo.

Con estos resultados podemos sustentar que la diferencia entre ambos mecanismos se deben a diferencias en los procesos de transferencia.

3.3.7. Descomposición química del REF

Los resultados sobre la descomposición química del REF en términos de electrofilia J_ω y dureza J_η para ambas reacciones son mostrados en la Figura 28. El perfil de J_ω es mostrado junto al perfil de J_t y el perfil de J_η junto al de J_p . La Figura 28 *a* y *b* muestra las gráficas para **R1** y la Figura 28 *c* y *d* muestra los resultados para la **R2**.

La Figura 28 *a* muestra una curva naranja que corresponde al REF en términos de electrofilia para **R1**. Dos picos positivos superpuestos son observados entrando en la región del TS, estos picos pueden estar asociados a la captura del átomo de hidrógeno por el superoxo de cobre que es un proceso con actividad electrónica espontánea, Figura 21. El máximo de J_ω se localiza en ξ_1 y se encuentra cerca del máximo de J_t , esto podría indicar que la transferencia del átomo de hidrógeno podría estar mediada por una buena capacidad del sistema a aceptar electrones en esta región. En la región del TS, J_ω disminuye rápidamente correlacionado con el hecho de que se está realizando la transferencia.

La Figura 28 *b* muestra una curva verde correspondiente al REF en términos de dureza. Dos picos son evidenciados en este perfil: Un pico negativo amplio saliendo de la región de reactantes y un pico positivo mediano saliendo de la región del TS. El primer pico negativo podría estar relacionado a la resistencia de la supermolécula a deformar o distorsionar su nube electrónica, posteriormente, después del TS aparece el segundo pico positivo indicando una mayor dureza alcanzada después de la HAT. Es importante mencionar que el máximo de $J_\omega(\xi)$ y el mínimo de $J_\eta(\xi)$ se alcanzan cerca de ξ_1 donde se encuentra el reactivo activado que inicia el proceso de la HAT. Aunque J_η ha sido

correlacionado con J_p en varias reacciones [109], en esta reacción no se observa una tendencia similar en los perfiles.

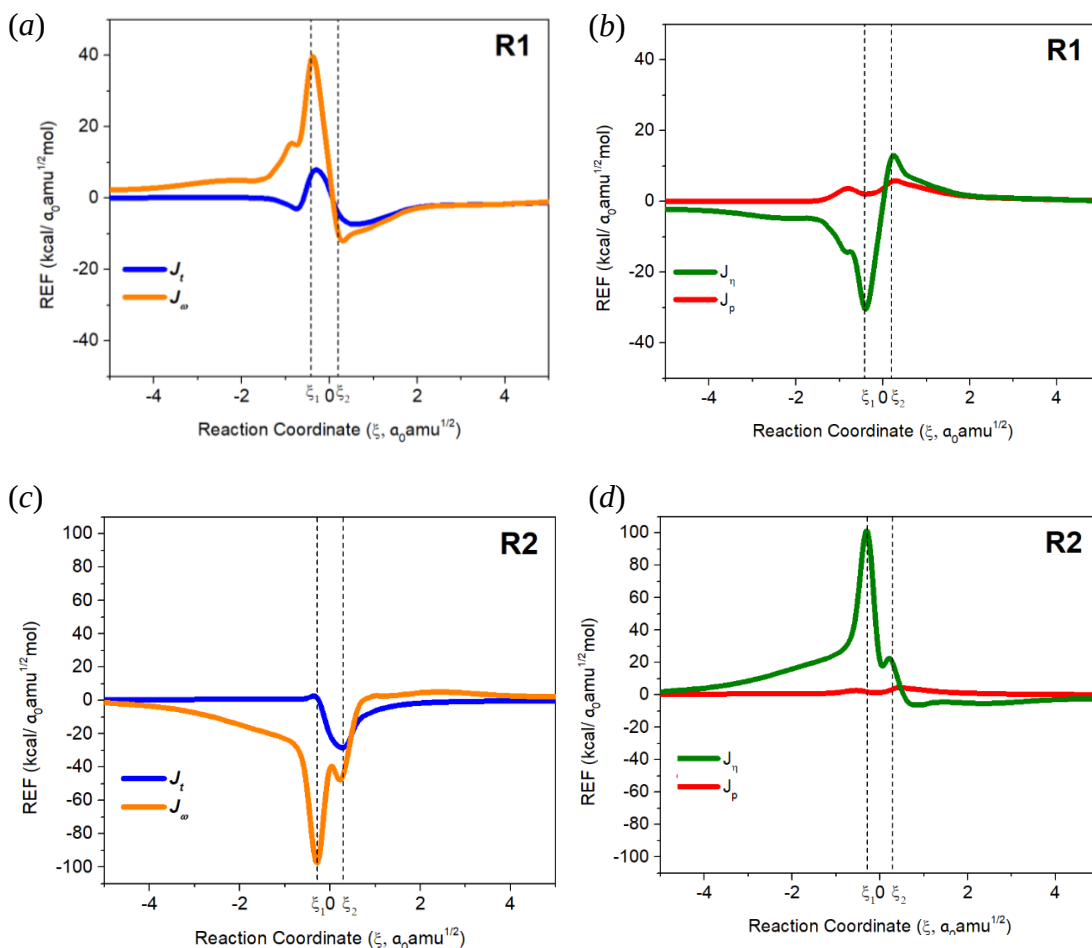


Figura 28: Flujo electrónico de reacción expresado en términos de electrofilia y transferencia (a,c) y en términos de dureza y polarización (b,d) para ambas reacciones (**R1**, **R2**).

La Figura 28 c muestra una curva naranja que corresponde a $J_w(\xi)$ para **R2**, dos picos negativos en la región del TS indican una actividad electrónica no espontánea en términos de electrofilia para la HAT. En las secciones anteriores, los resultados muestran que el acercamiento de las especies en **R2** es espontánea, lo que puede explicarse por una fortaleza del enlace de hidrógeno entre la amina y el superoxo, sin embargo, el mínimo en $J_w(\xi)$ podría indicar que la captura de electrones en **R2** sea un proceso no espontáneo debido a la repulsión del anillo formado.

Por otra parte, la Figura 28 d representa el $J_\eta(\xi)$ en la curva color verde, dos picos positivos son observados principalmente dentro de la región del estado de transición.

Estos picos podrían estar asociados a una mayor dureza cuando las especies se acercan y una disminución después del estado de transición, lo que soportaría los resultados encontrados en las secciones anteriores.

Desde las gráficas se puede evidenciar el comportamiento balanceado entre $J_\eta(\xi)$ y $J_\omega(\xi)$ en cada una de la reacciones a lo largo de ξ y también el comportamiento opuesto de $J_\eta(\xi)$ ó de $J_\omega(\xi)$ entre las dos reacciones. De la misma manera es posible evidenciar algunas tendencias entre los diferentes flujos. La Figura 28a y c muestra que J_ω presenta una tendencia similar a J_t , explicando que el cambio de electrofilia puede ser visto como un proceso de transferencia en estas reacciones. Sin embargo, desde la Figura 28 b y d se puede evidenciar que no hay una tendencia similar entre J_η y J_p en estas reacciones.

Para entender los eventos químicos que ocurren en **R2**, diferentes parámetros estructurales fueron analizados a detalle y su contribución a la energética de la reacción fue evaluada. La siguiente sección analiza y cuantifica los eventos en **R2**.

3.3.8. Eventos químicos que conducen el mecanismo de reacción en R2.

De acuerdo con los resultados encontrados, la reacción **R2** es el mecanismo más probable en la DP para producir la especie hidroperoxo activa que conducirá a la norepinefrina. Los principales eventos químicos que conducen **R2** serán descritos en esta sección, estos dan cuenta de los efectos estructurales y electrónicos observados. La Figura 29 muestra la variación a lo largo de ξ de los cambios estructurales más importantes: ángulo diedro N-C α -C β -C γ , el ángulo O-O-H y las distancias O-H, C β -H y C β -O.

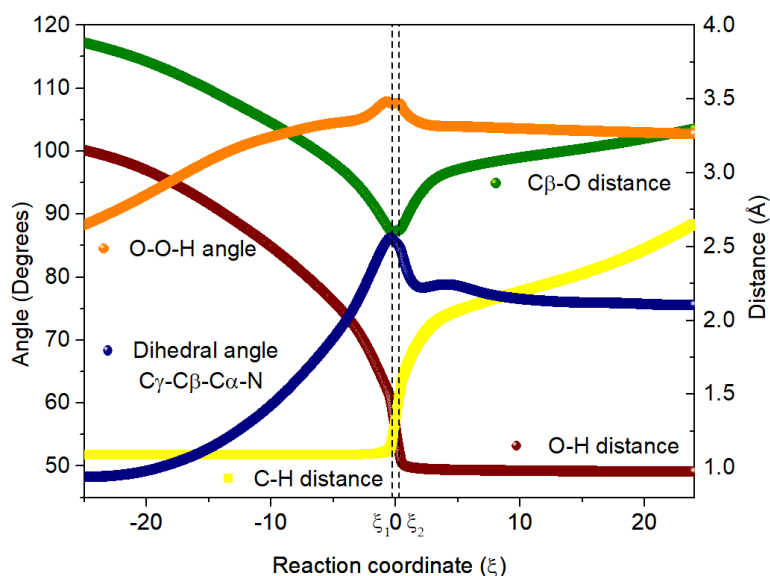


Figura 29: Principales cambios estructurales en **R2** a lo largo de la reacción.

La reacción inicia con un acercamiento de la DP al superoxo de cobre, este acercamiento involucra cambios notables en los ángulos de enlace y en las distancias mostradas en la Figura 29.

El cambio más interesante es observado en el ángulo diedro $C\gamma-C\beta-C\alpha-N$ de la DP representada en la curva azul, que sufre una fuerte variación dentro de la región de los reactantes, el ángulo diedro incrementa $\sim 28^\circ$ que consumen 14 kcal/mol de la energía de activación. Note que el hidrógeno en la distancia O-H, se acerca hacia el oxígeno desde comienzo de la reacción, pero la transferencia del hidrógeno desde el carbono es completada en la región del estado de transición. La energía total involucrada en estos rearrreglos estructurales es de 24,66 kcal/mol, correspondiente a W_1 .

En ξ_1 , el ángulo diedro $C\gamma-C\beta-C\alpha-N$ se encuentra en el máximo valor permitiendo que inicie el proceso de la HAT, un incremento $C\beta-H$ es observada en la región del TS. La distancia $C\beta-O$ ($C\beta$ de la dopamina y O desde el superoxo) a lo largo de ξ cae con una razón de cambio similar a la distancia O-H hasta alcanzar un valor mínimo en el TS, una vez la HAT se ha completado para alcanzar los productos. El comportamiento acoplado de estas distancias de enlace, confirman el efecto cooperativo que empuja el átomo de hidrógeno hacia el sitio catalítico.

En la región de los productos, el ángulo diedro $C\gamma-C\beta-C\alpha-N$ y el ángulo O-O-H sufren una leve disminución y posteriormente permanece constante debido a la formación del radical DP y el hidroperoxo de cobre, respectivamente.

3.3.9. Comparación de la barrera libre de Gibbs calculada computacionalmente y la extraída de los datos experimentales.

La Tabla 4 muestra la energía de reacción y la barrera libre de Gibbs para las cuatro reacciones de HAT desde la DP.

	R1	R2	R3	R4	R1(p)	R2(p)
$\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)	30,40	25,23	29,98	28,98	28,21	25,84
ΔG° (kcal/mol)	15,80	11,72	15,29	14,48	14,92	12,77

Tabla 4: Energía libre de Gibbs para las cuatro reacciones de HAT estudiadas.

Consistente con los datos anteriores, la reacción **R2** presenta la menor barrera libre de Gibbs de todas las reacciones, con un $\Delta G^\ddagger = 25,23$ kcal/mol en fase gaseosa y de $\Delta G^\ddagger = 25,84$ kcal/mol simulando el medio proteico.

La barrera encontrada es consistente con diferentes valores teóricos reportados para la HAT de sustratos de las MBC ó de compuestos sintéticos similares. Solomon y colaboradores en 2016 [9] obtuvieron una barrera de HAT para la formilglicina de $\Delta G^\ddagger = 22,2$ kcal/mol catalizada por un modelo de la enzima PHM. Kunishita y

colaboradores en 2012 [48] reportaron un $\Delta G^\ddagger = 21,8 - 29,9$ kcal/mol para la HAT intramolecular del compuesto 1-(2-fenetilo)-5-[2-piridil]-1,5-diazaciclooctano, que simula el sitio activo de las MBC. Finalmente, Wang en 2019 [15,135] reportó un $\Delta E^\ddagger = 26,1-37,5$ kcal/mol para la HAT desde el ácido hipúrico catalizado por la enzima PHM. Estos resultados indican que la HAT desde un enlace C-H catalizado por las MBC presenta una barrera superior a 20 kcal/mol.

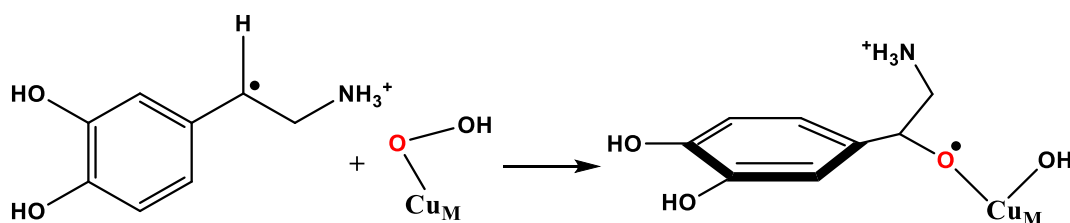
Experimentalmente, la barrera libre de Gibbs extraída desde la k_{C-H} para la HAT es de $\Delta G^\ddagger \sim 14$ kcal/mol [9,136]. La barrera calculada teóricamente y la experimental tienen una diferencia de 11,84 kcal/mol que puede ser atribuida a las aproximaciones realizadas experimentalmente para calcular la constante catalítica de un solo paso y a la energía de estabilización de la enzima completa que no es considerada en nuestro modelo.

3.4 PASOS SIGUIENTES EN EL MECANISMO PROPUESTO POR SOLOMON

Los siguientes pasos del mecanismo general para las MBC propuesto por Solomon y colaboradores, son resumidos en las siguientes subsecciones.

3.4.1 Reenlace del radical dopamina al hidroperoxo de cobre (II)

Siguiendo el mecanismo planteado por Solomon [9,117], el siguiente paso de la reacción es el enlace del carbono radical del sustrato ($C\beta$ de la DP) sobre el oxígeno no protonado del hidroperoxo de cobre (II) para formar el enlace C-O en el sustrato. La Figura 30 muestra el reenlace de la DP sobre el complejo hidroperoxo de cobre (II).



Radical dopamina + Complejo hidroperoxo de cobre

Figura 30: Reenlace del radical DP sobre el complejo hidroperoxo de cobre (II)

Iniciando desde el producto de la reacción anterior de HAT en **R2**, el hidroperoxo de cobre se encuentra interactuando con la DP, por medio de un enlace de hidrógeno. Una condición necesaria para que pueda ocurrir la reacción de reenlace es que la DP pierda el enlace de hidrógeno con el hidroperoxo de cobre (II) exponiendo el carbono β de la dopamina como se muestra en la Figura 31.

Producto reacción de HAT in **R2**

Complejo reactivo para el reenlace

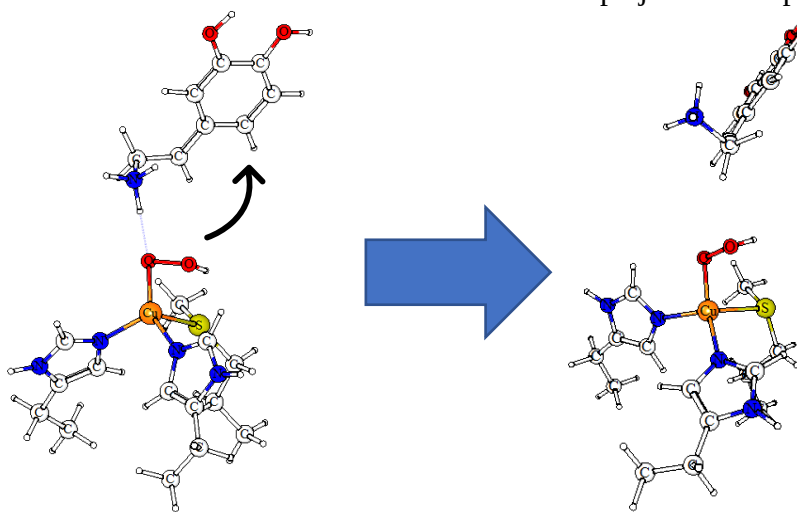


Figura 31: Conversión desde el producto de la HAT in **R2** hasta el complejo reactivo para el reenlace de la dopamina en el hidroperoxo de cobre (II).

Entre las dos estructuras, la conformación con el enlace de hidrógeno entre las especies es la de menor energía. La diferencia entre las dos conformaciones es de $\Delta G^\circ = 7,69$ kcal/mol en fase gaseosa y de $\Delta G^\circ = 6,18$ kcal/mol considerando el medio proteico. Una vez se rompe el enlace de hidrógeno se puede llevar a cabo el reenlace.

En la reacción de reenlace, el carbono β de la dopamina se enlaza al oxígeno no protonado del hidroperoxo, esta formación de enlace está compensada por el rompimiento homolítico del enlace oxígeno – oxígeno. Las estructuras optimizadas para los reactantes, estado de transición y productos son mostrados en la Figura 32. En el estado de transición es posible evidenciar que el enlace Cu-S se rompe debido a que el oxígeno protonado se acerca al cobre para enlazarse. La metionina es un ligando lábil que se ve desplazada por el oxígeno que es una base más dura. También, desde reactivos a productos, es posible evidenciar el cambio de geometría del complejo, iniciando con una geometría tetraédrica en el reactivo hasta una cuadrado planar distorsionado en el producto.

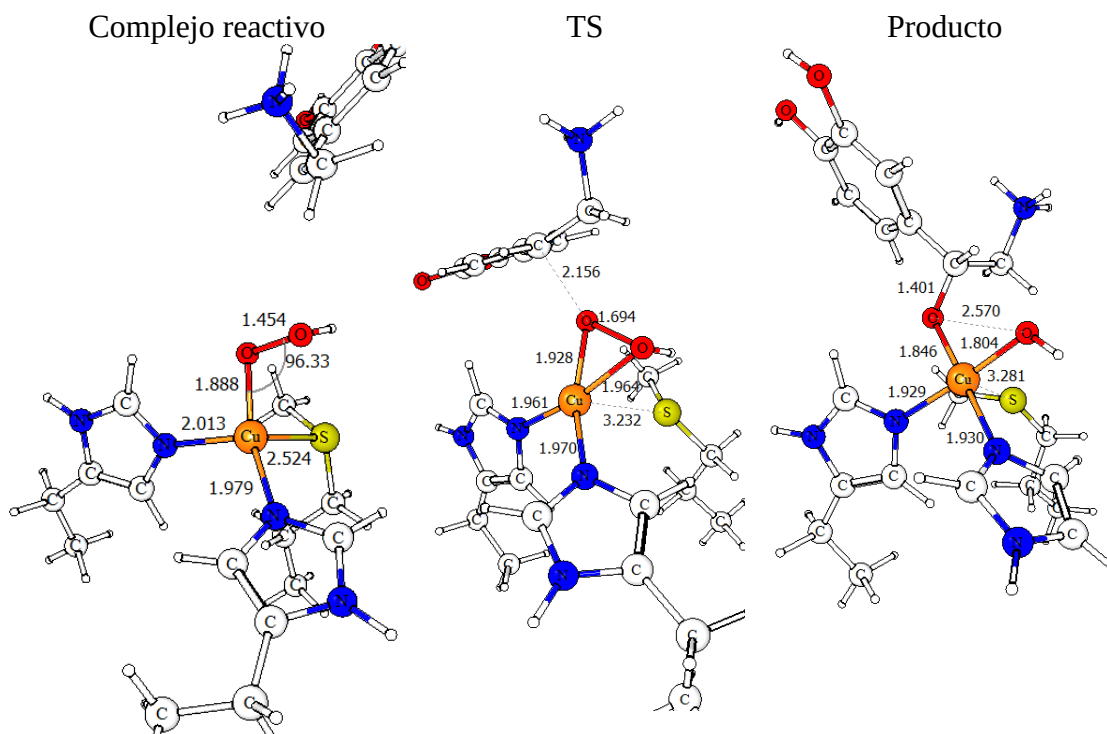


Figura 32: Estructuras optimizadas para el reactante, ts y producto de la reacción de reenlace del radical DP al hidroperoxo de cobre (II).

La barrera encontrada para el reenlace del radical dopamina es de $\Delta G^\ddagger = 17,01$ kcal/mol y la energía libre de reacción es de $\Delta G^\circ = -43,43$ kcal/mol en fase gaseosa. Empleando estas estructuras y considerando el modelo PCM se tiene una

barrera de $\Delta G^\ddagger = 13,64$ kcal/mol y un $\Delta G^\circ = -47,10$ kcal/mol. Solomon y colaboradores reportan el reenlace para el radical formilglicina con una $\Delta G^\ddagger = 10,1$ kcal/mol y una $\Delta G^\circ = -36,9$ kcal/mol.

3.4.2 Transferencia electrónica acoplada a un protón a la especie $\text{Cu}_M^{\text{II}}(\text{OH})(\bullet \text{OR})$

El siguiente paso dentro del mecanismo planteado por Solomon es la transferencia electrónica acoplada a protón (PCET, por sus siglas en inglés) hacia la especie $\text{Cu}_M^{\text{II}}(\text{OH})(\bullet \text{ODp})$. Estos autores plantean que simultáneamente ocurre una segunda semirreacción que es la transferencia de electrones entre los átomos de cobre. Las dos semirreacciones que se llevan a cabo son detalladas en la Figura 33.

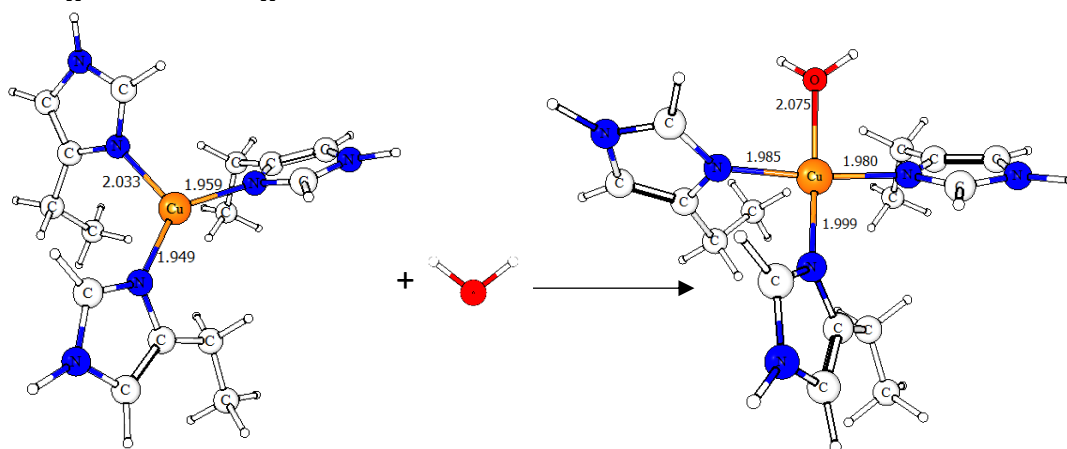
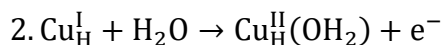
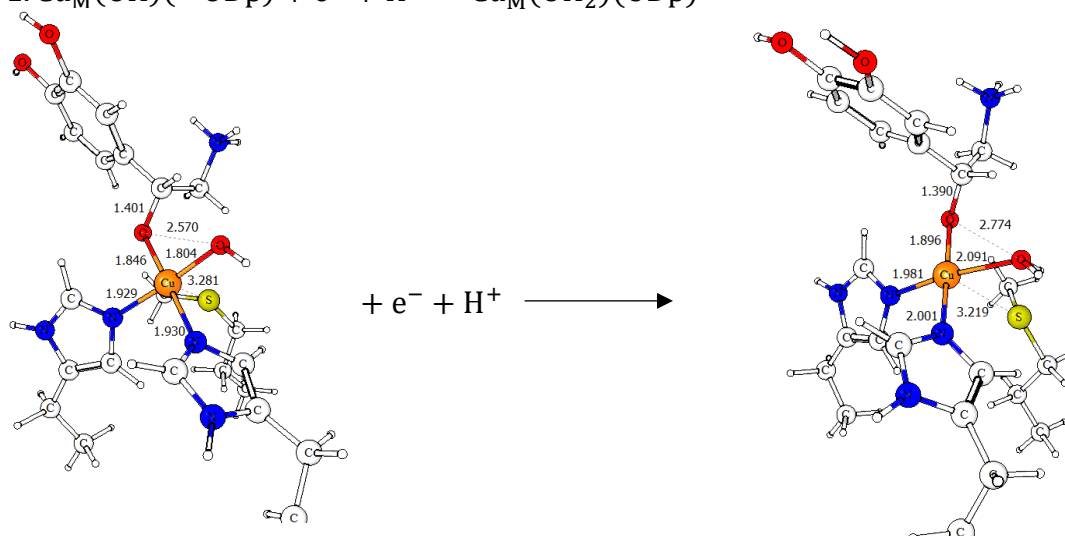
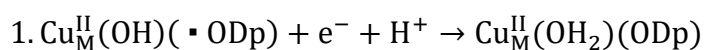


Figura 33 Arriba: Transferencia electrónica acoplada a protón (PCET) a la especie $\text{Cu}_M^{\text{II}}(\text{OH})(\bullet \text{ODp})$ para formar la $\text{Cu}_M^{\text{II}}(\text{OH}_2)(\text{ODp})$. Abajo: Oxidación del centro de cobre Cu_H^{I} a Cu_H^{II} .

Solomon y colaboradores, estudiaron diferentes procesos de TE y PCET a la especie $\text{Cu}_M^{\text{II}}(\text{OH})(\bullet\text{OR})$, encontrando que la PCET concertada para formar la especie $\text{Cu}_M^{\text{II}}(\text{OH}_2)(\text{OR})$ es la reacción más favorecida. En su estudio encontraron que la energía libre de Gibbs total de las dos semirreacciones es de $\Delta G^\circ = -14,9$ kcal/mol. En nuestro sistema empleando DP como sustrato la energía libre de Gibbs total de las dos semirreacciones es de $\Delta G^\circ = -30,92$ kcal/mol en fase gaseosa, donde las semirreacciones 1 y 2 presentan $\Delta G^\circ = -237,88$ kcal/mol y $\Delta G^\circ = 206,96$ kcal/mol, respectivamente. Y considerando el modelo PCM la energía libre de Gibbs total es de $\Delta G^\circ = -49,81$ kcal/mol, donde las semirreacciones 1 y 2 presentan $\Delta G^\circ = -181,75$ kcal/mol y $\Delta G^\circ = 131,93$ kcal/mol, respectivamente.

3.4.3. Transferencia protónica intramolecular (TPi) en $\text{Cu}_M^{\text{II}}(\text{OH}_2)(\text{OR})$

Desde el complejo $\text{Cu}_M^{\text{II}}(\text{OH}_2)(\text{OR})$, es fácil identificar que una TPi desde el ligando OH_2 a ODp- puede conducir al producto hidroxilado de DP. Esta transferencia protónica intramolecular ocurre con un $\Delta G^\circ = -13,54$ kcal/mol y con una barrera de $\Delta G^\ddagger = 6,64$ kcal/mol en fase gaseosa y con un $\Delta G^\circ = -10,73$ kcal/mol y con una barrera de $\Delta G^\ddagger = 5,23$ kcal/mol considerando el modelo PCM. Es interesante observar que la TPi debilita el enlace Cu-O(Dp) desde 1,896 Å en el reactante hasta 2,175 Å en el TS y a su vez disminuye el enlace Cu-S desde 3,219 Å en el reactante hasta 3,018 Å en el TS. En el producto, el diedro de la etilamina en la DP rota para interactuar con el complejo de cobre.

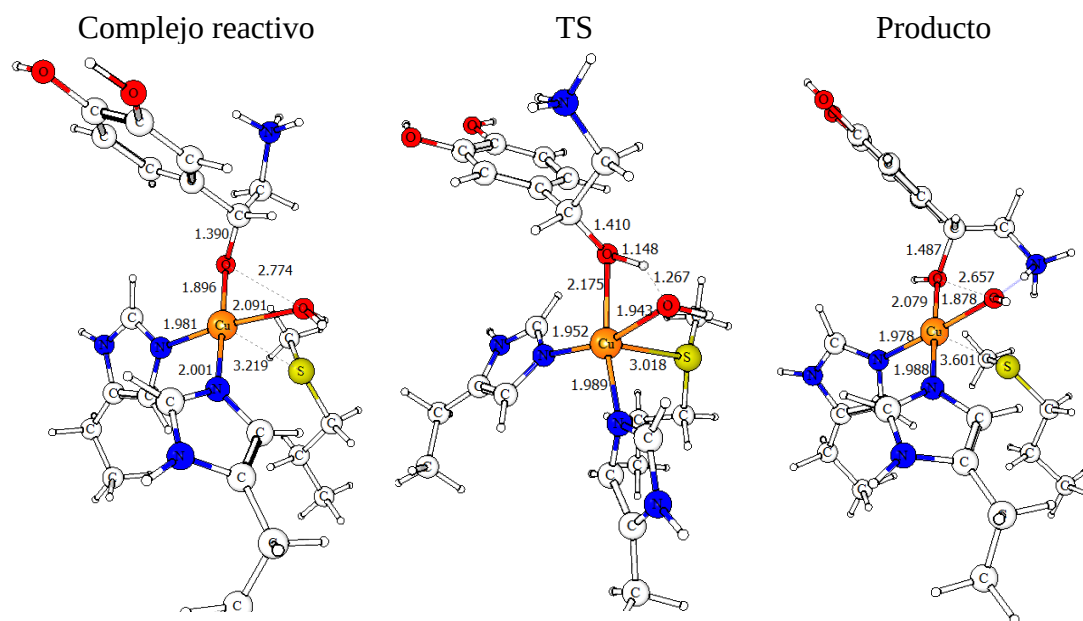


Figura 34: Estructuras optimizadas para el reactante, ts y producto de la reacción de TPi en el $\text{Cu}_M^{\text{II}}(\text{OH}_2)(\text{OR})$.

Finalmente, el rompimiento de la norepinefrina desde el sitio activo de Cu_M^{II} es un proceso exotérmico con un $\Delta G^\circ = -12,60$ kcal/mol en fase gaseosa.

3.4.4. Diagrama energético para la hidroxilación de la DP empleando el mecanismo de Solomon.

La Figura 35 resume el diagrama energético para la hidroxilación de la DP empleando el mecanismo de las MBC propuesto por Solomon y colaboradores. Las energías están calculadas en base a la enzima reducida representada por el complejo $\text{Cu}_M^{\text{I}}(\text{OH}_2)$. De acuerdo con los resultados, la barrera libre de Gibbs para la hidroxilación de DP catalizada por el modelo de las MBC es de $\Delta G^\ddagger = 42,92$ kcal/mol en fase gaseosa y de $\Delta G^\ddagger = 35,77$ kcal/mol considerando el modelo PCM. La energía libre de Gibbs de la reacción total es de $\Delta G^\circ = -74,57$ kcal/mol en fase gaseosa y de $\Delta G^\circ = -75,16$ kcal/mol considerando el modelo PCM. Estos resultados indican que la solvatación del medio proteico estabiliza el sistema, disminuyendo la barrera y la energía libre de Gibbs de la reacción.

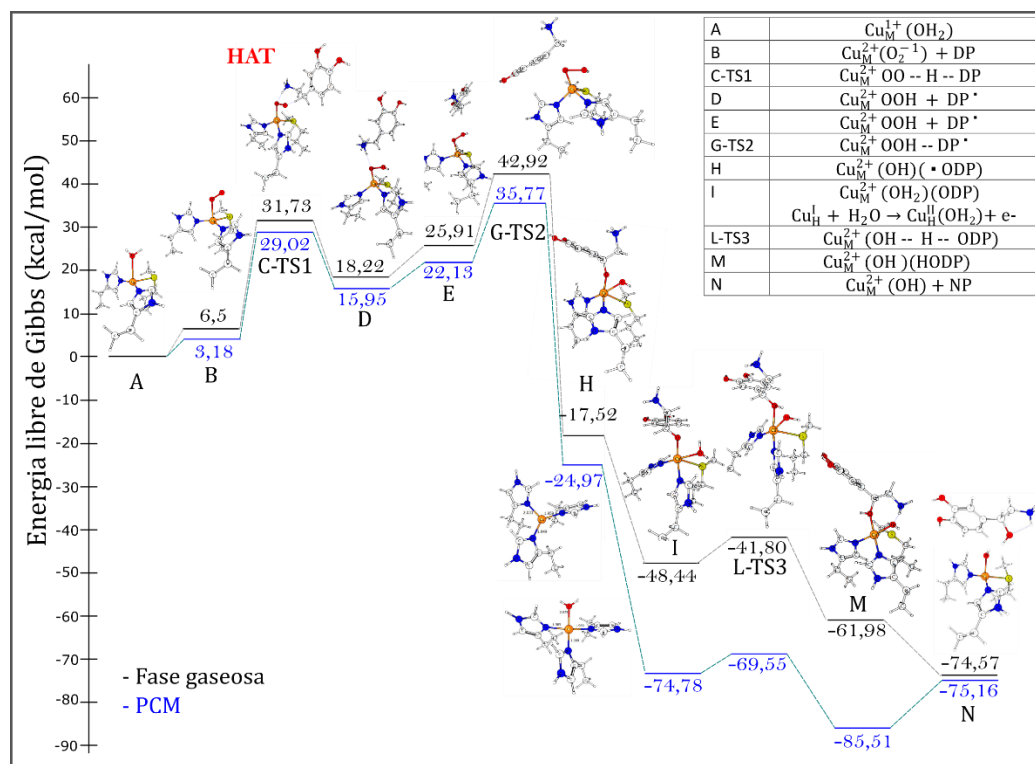


Figura 35: Diagrama de energía libre de Gibbs para la hidroxilación de dopamina.

El valor de la barrera de la reacción ($\Delta G^\ddagger = 35,77$ kcal/mol) es consistente con el valor encontrado por Solomon y colaboradores para la hidroxilación de la formilglucina ($\Delta G^\ddagger = 31,7$ kcal/mol). Por otra parte, como fue indicado anteriormente, también fue evaluado un mecanismo alternativo para el paso de la HAT desde el ascorbato.

3.5. ABSTRACCIÓN DEL ÁTOMO DE HIDRÓGENO DESDE EL ASCORBATO

Durante el desarrollo de esta tesis, un nuevo mecanismo para la hidroxilación del sustrato en las monooxigenasas binucleares de cobre (D β M y PHM) ha sido propuesto por Wang y colaboradores [15]. Estos investigadores realizaron simulaciones multiescala para demostrar un mecanismo acoplado de estas enzimas. Empleando cálculos QM/MM, los autores descartan que la especie superoxo de cobre (II), $Cu_M^2(O_2^{-1})$, pueda abstraer un átomo de hidrógeno desde el sustrato debido a que presenta una barrera de energía alta (>22,2 kcal/mol [9,27,117,135]) comparada con la encontrada experimentalmente de 14 kcal/mol [9]. En su lugar, ha sido propuesto que el superoxo de cobre realice la abstracción del átomo de hidrógeno desde el cofactor ascorbato. Estos autores simularon la reacción y encontraron una barrera de energía en el rango de 7,1-12 kcal/mol.

En nuestra investigación, la barrera libre de Gibbs para las 4 reacciones de abstracción del átomo de hidrógeno desde el sustrato dopamina está en el intervalo de 25,23-30,40 kcal/mol. Estos valores se encuentran dentro del intervalo reportado por Wang y colaboradores.

Con el fin de comparar nuestros resultados y analizar las dos reacciones, con ascorbato y dopamina, decidimos estudiar la abstracción del átomo de hidrógeno desde el monoanión ascorbato empleando nuestro modelo representativo del sitio activo de la enzima.

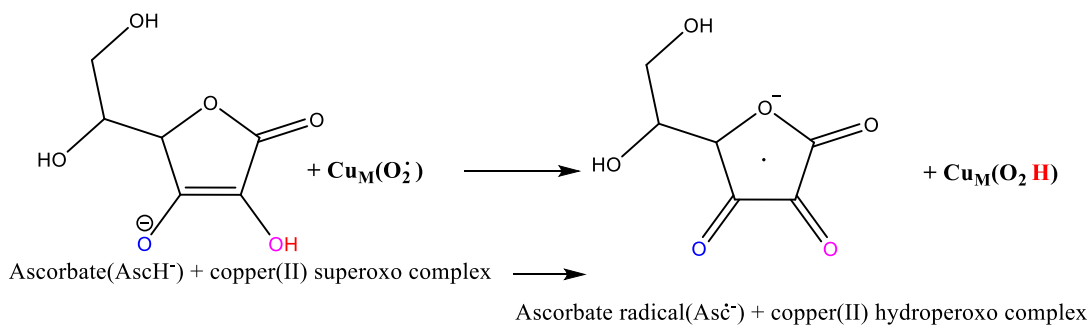
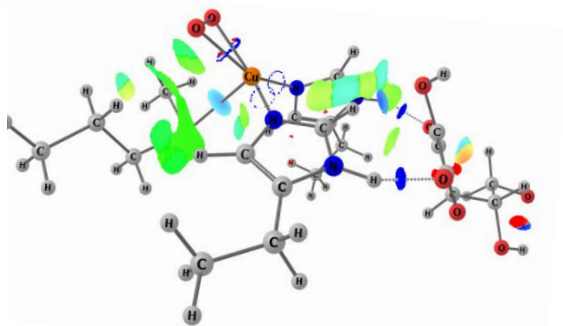
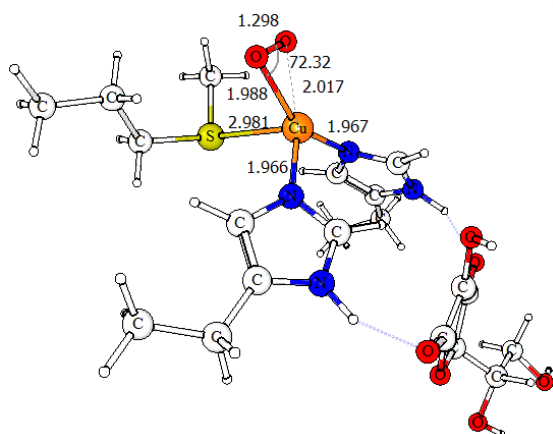


Figura 36: Reacción de abstracción del átomo de hidrógeno desde el ascorbato por el superoxo de cobre (II).

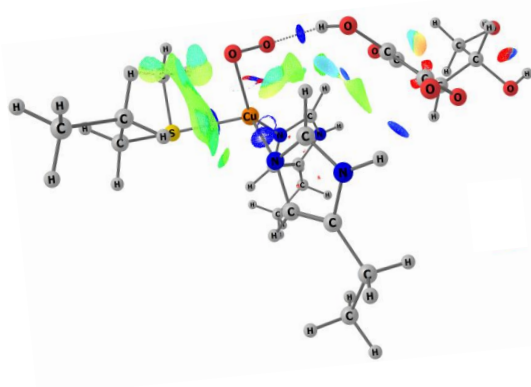
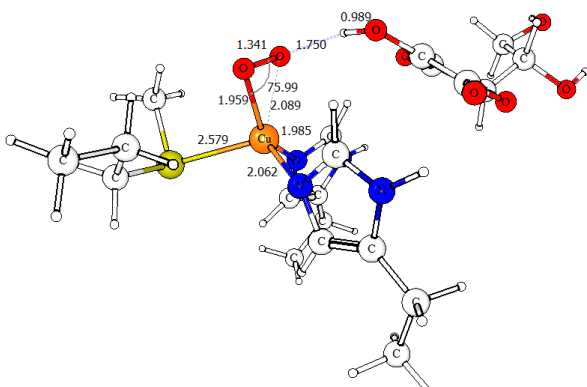
Para modelar esta reacción, se eliminó la restricción de borde de fijar los carbonos finales en los aminoácidos del superoxo de cobre (II). De esta forma, fue posible encontrar los mínimos locales y un estado de transición entre reactivos y productos. Las estructuras optimizadas y los gráficos NCI para el complejo reactivo, el estado de transición y los productos son ilustradas en la Figura 37.

Al remover la restricción de borde en las tres estructuras: reactantes, estado de transición y productos, se puede observar que la metionina se desplaza hacia fuera del complejo, es posible que exista un cambio conformacional en la enzima cuando el ascorbato se une al superoxo que provoque un movimiento de la cadena unida a la metionina 487.

(a) Reactante o complejo reactivo:



(b) Estado de transición:



(c) Producto:

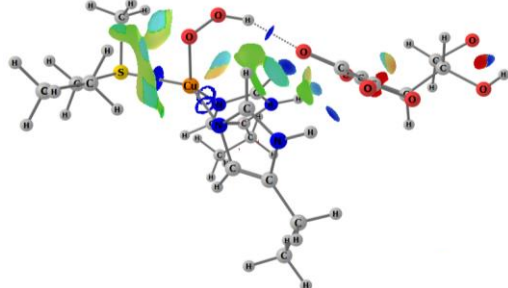
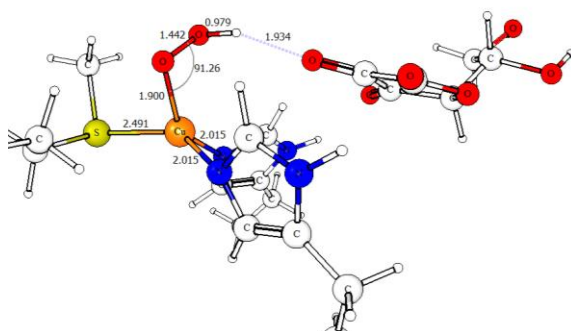


Figura 37: Estructuras optimizadas y gráficos NCI para reactantes, estado de transición y producto de la reacción de HAT desde el ascorbato.

En la estructura del reactante, se puede observar que la unión del monoanión ascorbato al superoxo de cobre (II) se da a través de dos puentes de hidrógeno: el primero formado entre un hidrógeno del imidazol y el oxígeno carbonílico del ascorbato y el segundo formado entre un hidrógeno del imidazol de la segunda histidina y el oxígeno cargado negativamente del ascorbato. En este complejo reactivo, el ascorbato retira ligeramente densidad electrónica del complejo, generando que el cobre se encuentre levemente más positivo. La diferencia de carga del cobre en el complejo-ascorbato versus la del complejo aislado es de 0,024.

La interacción entre el ascorbato y el superoxo produce una deformación en el superoxo. Desde la Figura 37 *a* es posible observar que la distancia entre el cobre y el oxígeno distal es de 2,017 Å y la del Cu-O proximal es de 1,988 Å, esto indica que hay una coordinación bidentada (η^2) del oxígeno al cobre. El ángulo Cu-O-O es de 72,32° y la multiplicidad encontrada para este sistema es triplete. La especie singlete fue encontrada con mayor energía que la especie triplete y en ambas estructuras la función de onda fue verificada con un cálculo de estabilidad. Aunque anteriormente, se encontró que la coordinación bidentada del oxígeno al cobre está vinculada a un estado fundamental singlete, es importante mencionar que, en este caso, el complejo reactivo formado con el anión ascorbato presenta una multiplicidad triplete.

Complejos modelos del superoxo cobre con una coordinación bidentada del oxígeno $\eta^2 - O_2$ al cobre y multiplicidad triplete, también han sido evaluados como intermediarios responsable de la abstracción del átomo de hidrógeno desde enlaces C-H [117,137]. En estos modelos se reporta que los enlaces Cu-O se encuentran opuestos a los enlaces Cu-N en una geometría casi cuadrado plana [117]. Como se puede evidenciar en la estructura optimizada en la Figura 37 *a* el complejo reactivo-ascorbato presenta una geometría muy distorsionada casi cuadrado planar.

La distorsión que presenta el complejo superoxo de cobre por el ascorbato, también se puede observar en un aumento en la distancia del enlace Cu-S (2,981 Å) comparada con la del superoxo de cobre (II) aislado (2,630 Å) o en presencia de dopamina (~2,429 Å). Debido a que el ascorbato retira densidad electrónica del cobre, este prefiere coordinar el oxígeno distal sobre el azufre probablemente a que el oxígeno es una base más dura sobre el azufre que es un donador débil de electrones.

La estructura optimizada del producto de la reacción es mostrada en la Figura 37 *c*. En esta estructura el cobre se coordina a los 4 ligandos (dos histidinas, 1 metionina y el hidroperoxo) formando una estructura tetraédrica distorsionada, los enlaces Cu-X (X=N, S, y O) y el ángulo Cu-O-O se encuentran dentro de los parámetros normales de un hidroperoxo de cobre aislado.

En esta estructura, el ascorbato se encuentra interactuando con el hidroperoxo de cobre por medio de un enlace de hidrógeno entre el oxígeno del ascorbato desde donde se transfiere el hidrógeno, y el hidrógeno que se ha transferido al hidroperoxo. En el

producto, el ascorbato se ha desplazado con respecto al reactivo y por lo tanto los enlaces de hidrógeno entre estas dos especies son más débiles.

La estructura optimizada del estado de transición factible para esta reacción es mostrada en la Figura 37 *b*. Puede evidenciarse que la estructura del producto y del estado de transición son muy similares, la geometría del complejo es tetraédrica y el ascorbato se encuentra interactuando con el superoxo a través de enlaces de hidrógeno débiles. El ángulo Cu-O-O es de $75,99^\circ$ y el enlace Cu-O distal es de $2,089 \text{ \AA}$, estos parámetros indican una coordinación bidentada del oxígeno sobre el cobre, y por lo tanto un estado de transición donde el cobre estaría coordinado a cinco ligandos. Esta estructura presentó una frecuencia imaginaria débil de $-147,5 \text{ cm}^{-1}$, dificultando estudiar la reacción mediante un cálculo IRC.

La barrera libre de Gibbs para la abstracción del átomo de hidrógeno desde el ascorbato por el superoxo de cobre (II) es de $\Delta G^\ddagger = 16,33 \text{ kcal/mol}$. De acuerdo con los resultados anteriores, la abstracción del átomo de hidrógeno desde el ascorbato es energéticamente más favorable que desde el sustrato dopamina. Aunque este mecanismo alternativo es viable teóricamente, experimentalmente no se ha encontrado que el ascorbato se encuentre cerca del Cu_M y por lo tanto, estudios experimentales adicionales son necesarios [14].

3.5.1. Perfiles de Energía y Fuerza de Reacción

Con el fin de obtener un perfil de energía aproximado de la reacción y racionalizar esta energía, se siguieron las siguiente etapas:

Etapas 1: Se escanea una coordenada de la reacción que permita observar el proceso de la HAT. Esta coordenada es la distancia entre el O distal del superoxo y el hidrogeno abstraído del ascorbato, distancia O47-H67 en la Figura 38.

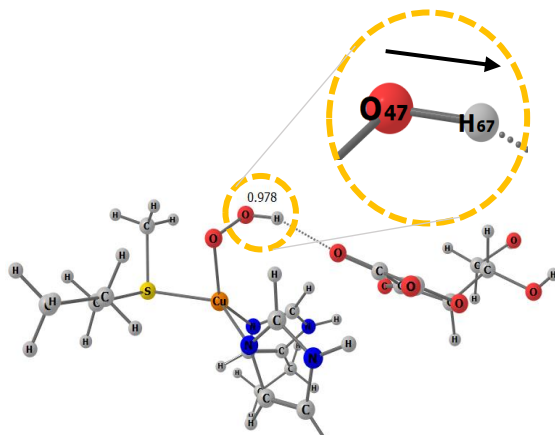


Figura 38: Coordenada escaneada (distancia O47-H67) en la reacción de HAT desde el ascorbato al superoxo de cobre.

Computacionalmente el scan inicia desde la estructura del producto hasta finalizar en el reactante. Las siguientes gráficas presentadas en este documento son ajustadas a comodidad para que la coordenada inicie desde el reactivo y finalice en el producto.

La Figura 39 muestra el scan obtenido para la reacción de HAT desde el ascorbato al superoxo de cobre. El scan muestra una buena representación del cambio de energía potencial desde el reactante, pasando por el punto más alto que corresponde al estado de transición y finalmente llegando al producto. Sin embargo, es posible evidenciar un pozo potencial pequeño antes de llegar al estado de transición. En esta región fue verificado el valor propio del spin $\langle \hat{S}^2 \rangle = 2.0$ correspondiente a la multiplicidad triplete en la que se lleva a cabo toda la reacción. Por lo tanto, la contaminación de spin por un cruce entre sistemas de diferentes multiplicidades es descartado.

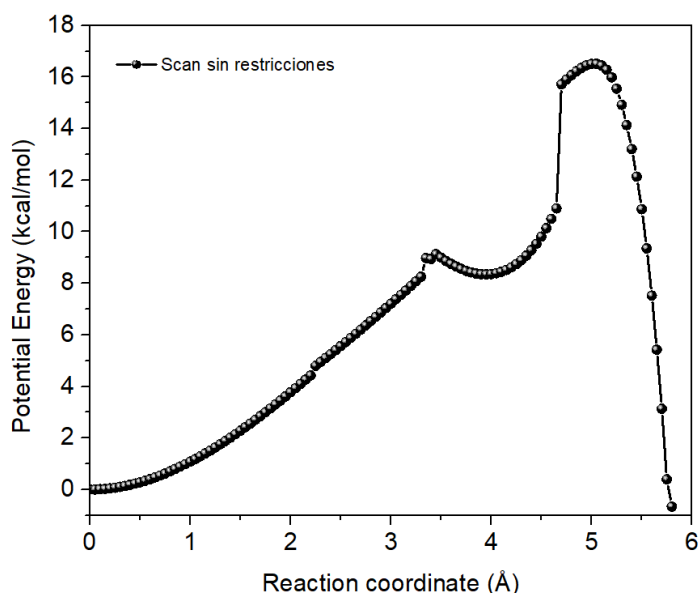


Figura 39: Perfil de energía potencial obtenido desde el scan de la distancia entre el O distal del superoxo y el hidrogeno abstraído del ascorbato, distancia O47-H67.

En el mínimo del pozo potencial se encontró un intermediario que se origina debido a una distorsión en el complejo de cobre. En este intermediario mostrado en la Figura 40, el enlace Cu-S se rompe, y se forma un enlace entre el Cu y el O del ascorbato.

Debido a que en la enzima hay restricciones de movimiento que conservan la esfera de coordinación del complejo de cobre es probable que no se forme este intermediario y sea necesario incluir algunas restricciones en la estructura del complejo. Para escanear la superficie sin la formación de este intermediario se realizaron dos pruebas.

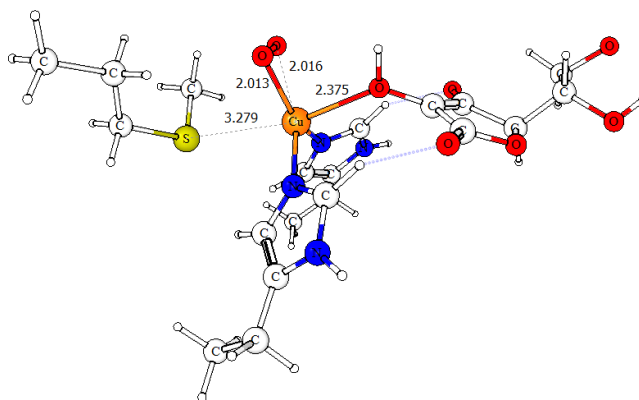


Figura 40: Intermediario generado en el pozo de energía potencial. Se observa un cambio en la esfera de coordinación del cobre.

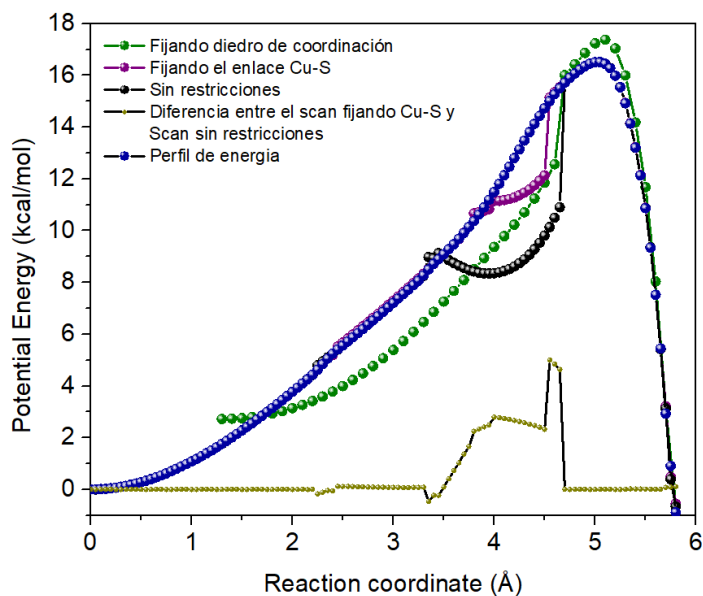


Figura 41: Perfiles de energía potencial obtenidos desde el scan de la distancia O47-H67. En la curva morada, se fijó el enlace Cu-S y en la curva verde se fija el diedro formado entre los átomos coordinados al cobre.

Etapa 2: Se realizan dos scan empleando la misma coordenada anterior, pero en el primer scan se fija la distancia Cu-S y en el segundo scan se fija el diedro formado entre los átomos unidos al cobre (O-S-N-N).

La Figura 41 muestra una curva morada para el scan fijando el enlace Cu-S y una curva verde para el scan fijando el diedro de átomos coordinados al cobre (O-S-N-N). En ambas curvas es posible evidenciar que la HAT desde el ascorbato al superoxo de cobre se lleva a cabo sin la formación del intermediario anterior indicando que la HAT es posible sin un cambio en la esfera de coordinación del cobre. El scan fijando el enlace

Cu-S logra mejorar el perfil de energía indicando que la deformación de este enlace es responsable de gran parte del pozo de energía potencial. La diferencia de energía entre el scan sin restricciones y el scan fijando el enlace Cu-S, representado en la curva color amarilla, aísla el efecto de este enlace en el pozo potencial. Las diferencias de energía más altas son encontradas en el mínimo del pozo potencial y en el salto brusco de energía finalizando el pozo potencial.

Desde las dos gráficas también es posible observar una discontinuidad antes de llegar al estado de transición donde la energía aumenta abruptamente y un salto de la energía es generado. Analizamos las estructuras en esta zona representadas en la Figura 42, en donde se evidencia un cambio en la interacción entre las dos especies. Un enlace de hidrógeno entre (Ascorbato)O-HN(His) se rompe y se forma un enlace (Ascorbato)O-HC(His). El cambio de una estructura a otra se da abruptamente en el scan lo que produce un salto en la energía potencial.

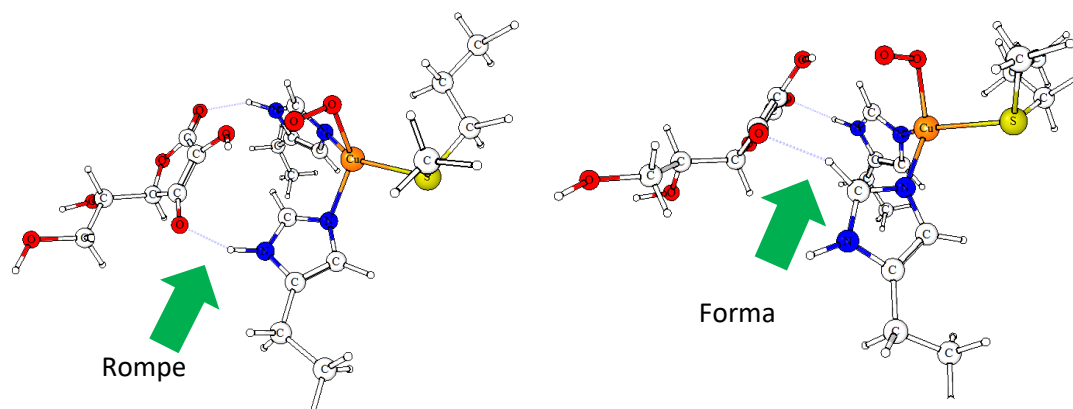


Figura 42: Estructuras antes y después del salto de energía en el scan. La diferencia entre ambas estructuras es el rompimiento de un enlace oxígeno-HN(His) y la posterior formación de una interacción oxígeno-HC(His).

La coordenada escogida para escanear la reacción puede identificar adecuadamente el cambio de energía entre las especies, logrando recuperar cerca del 80% de la coordenada real de reacción, sin embargo, no sustituye la coordenada de la reacción de un cálculo IRC en donde más de una coordenada de la reacción permite que se lleve a cabo una transición suave entre reactantes, estados de transición y productos. Con el fin racionalizar la energía, propusimos un perfil de energía potencial basado en los gráficas anteriores en donde se empleó una interpolación en el pozo de energía potencial.

Etapa 3: La Figura 43 muestra una curva azul que muestra el perfil sugerido para la HAT desde ascorbato al superoxo de cobre y una curva morada que presenta la fuerza de reacción. En este perfil es posible observar un aumento continuo de la energía desde el reactante hasta el estado de transición y posteriormente una caída pronunciada desde

el estado de transición hasta el producto. La forma del perfil produce una amplia región de los reactantes y una estrecha región de los productos.

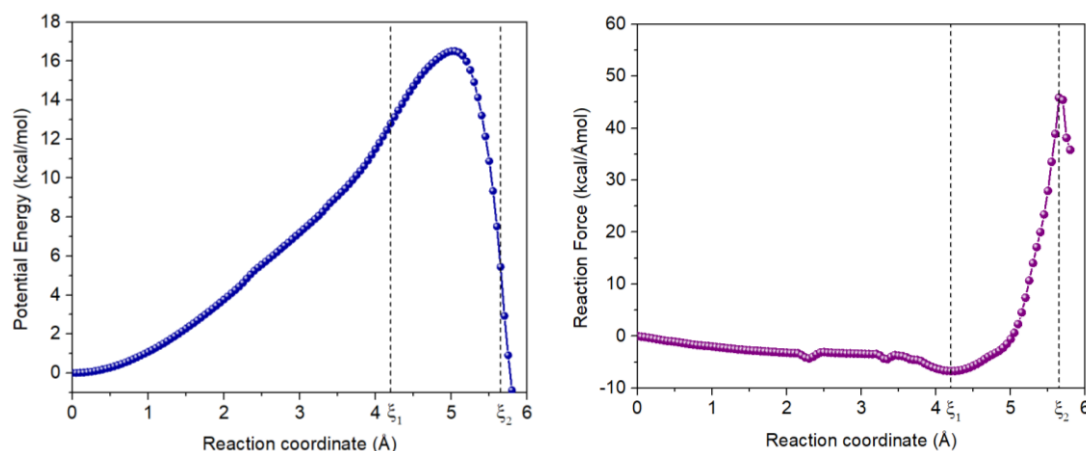


Figura 43: Perfiles de energía y fuerza de reacción de la HAT desde ascorbato al superoxo de cobre.

La Tabla 5 resume la energética de la reacción y los trabajos de reacción obtenidos para la HAT desde ascorbato al superoxo de cobre. La barrera de reacción para esta reacción es de $\Delta E^\ddagger = 16,51$ kcal/mol que es menor a las barreras encontradas en las reacciones anteriores **R1**, **R2**, **R3** y **R4** con barrera de 31,61 , 26,44 , 32,35 y 29,16 kcal/mol, respectivamente. El porcentaje de energía estructural W_1 en la energía de activación es del 77,59% similar al de dos reacciones {**R1**, **R3**} en la HAT desde la dopamina.

Parámetro	$\Delta E^\ddagger$	ΔE°	W_1	W_2	W_3	W_4
HAT desde ascorbato	16,51	-0,66	12,81(77,59%)	3,7(22,41%)	-11,07	-6,1

Tabla 5: Energética y trabajos de reacción para la HAT desde ascorbato al superoxo de cobre. En paréntesis se detalla el porcentaje de la $\Delta E^\ddagger$ asociado a cada trabajo de reacción. Los valores son reportados en kcal/mol

El trabajo estructural en esta reacción es debido al acercamiento del ascorbato al superoxo lo que produce cambios en la interacción entre las dos especies. En el reactante, Figura 37 a, las dos especies interactúan formado dos enlaces de hidrógeno, el primero entre el oxígeno carbonílico del ascorbato con el hidrógeno H-N(His) de una de las histidinas y el segundo entre el oxígeno aniónico del ascorbato con el hidrogeno H-N(His) de la otra histidina. En la región de reactantes el ascorbato se acerca al superoxo de cobre rompiendo la interacción de hidrógeno entre el oxígeno aniónico del ascorbato con el hidrogeno H-N(His) de la histidina y en su lugar el oxígeno aniónico interactúa con el hidrogeno H-C(His) de la histidina. Este acercamiento del ascorbato y el cambio de interacciones entre las dos especies consume 12,81 kcal/mol.

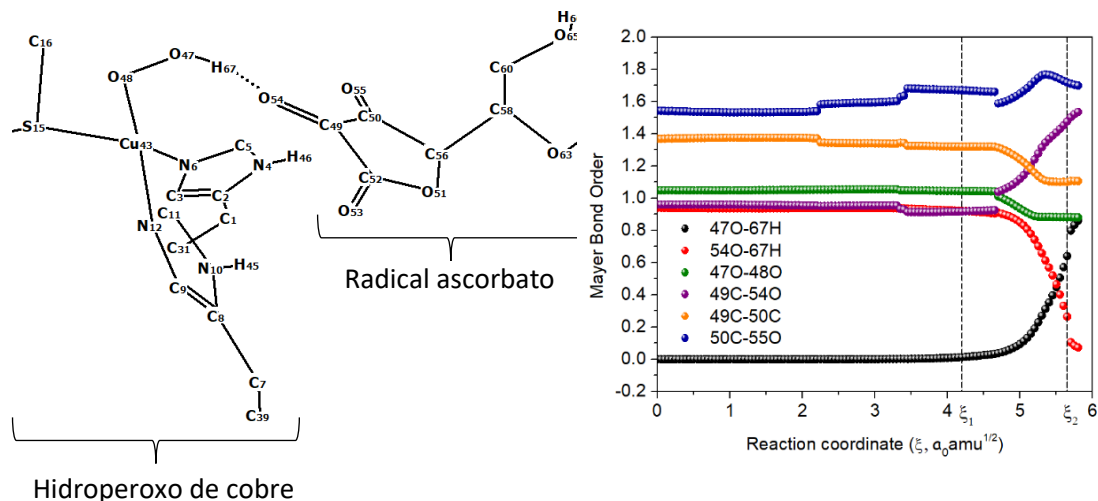


Figura 44: Órdenes de enlace de Mayer para la reacción de HAT desde el ascorbato al superóxido de cobre. A la izquierda se encuentra la estructura con la numeración atómica para lograr una mejor comprensión de los enlaces que se describen.

En la región del estado de transición se inicia la transferencia del hidrógeno desde el ascorbato al superóxido de cobre (II). La Figura 44 muestra la variación de los órdenes de enlace de Mayer a lo largo de la coordenada de la reacción. Los órdenes de enlace empiezan a variar dentro del estado de transición, es posible evidenciar el rompimiento del enlace O-H desde el ascorbato en la curva de color rojo que se da simultáneamente a la formación del enlace O-H en el superóxido representada en la curva color negra.

De igual forma, es posible observar el debilitamiento del enlace O-O del superóxido representada en la curva verde y un fortalecimiento del enlace C49-O54 del ascorbato desde un enlace sencillo a un enlace doble, curva morada. Al transferirse el hidrógeno desde el ascorbato al superóxido de cobre, el ascorbato queda de forma radicalaria, este radical se estabiliza dentro del ciclo de cinco miembros del ascorbato. Ocurre una reorganización electrónica en donde el C50-O55 forman un enlace doble, curva color azul; el enlace C49-C50 disminuye el orden de enlace, curva naranja y se fortalece el enlace C49-O54.

Como se evidenció a lo largo de esta sección, estudiar la HAT empleando este modelo permite conocer las interacciones puente de hidrógeno entre el ascorbato y el superóxido de cobre que no son detalladas o descritas en la reacción de HAT presentada por Wang, además permite conocer la naturaleza física de la energética de la reacción a través de los trabajos de reacción.

3.6. SIMULACIÓN DE LA DOPAMINA BETA MONOOXIGENASA MEDIANTE SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR.

De forma complementaria, en este trabajo se estudió la interacción inicial entre la DP y la enzima reducida debido a que las investigaciones [16,29] convergen a que la DP se acopla a la enzima antes de la unión del oxígeno molecular al Cu_M . Para ello, se preparó toda la enzima, se acopló la DP y finalmente se evaluó todo el sistema mediante dinámica molecular.

Al acoplar la DP en el sitio de $\text{Cu}_M - \text{H}_2\text{O}$, fue posible observar un enlace de hidrógeno entre la THR413 y la dopamina, esta estructura fue optimizada en Gaussian para entender mejor el rol de esta interacción.

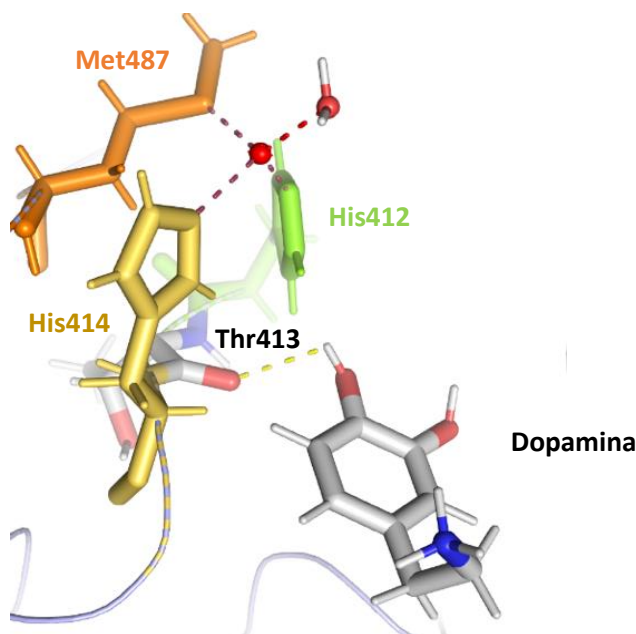


Figura 45: DP y el ácido ascórbico acoplado en la **DβM** usando AutoDock Vina.

La estructura optimizada a un nivel B3LYP/def2-TZVP con dispersión empírica GD3 es ilustrada en la Figura 46.

Mediante NCI se corroboró el enlace de hidrógeno entre las dos especies (Figura 46) y por medio del potencial electrostático es posible entender que la zona menos positiva en el sitio activo es el oxígeno de la THR413 y por lo tanto es la zona más probable que interactúe con la dopamina. Aunque la zona más positiva en la dopamina es la amina protonada, la dopamina interactúa mediante el hidrógeno del grupo hidroxilo en posición para, es probable que la amina interactúe con otro residuo de la enzima.

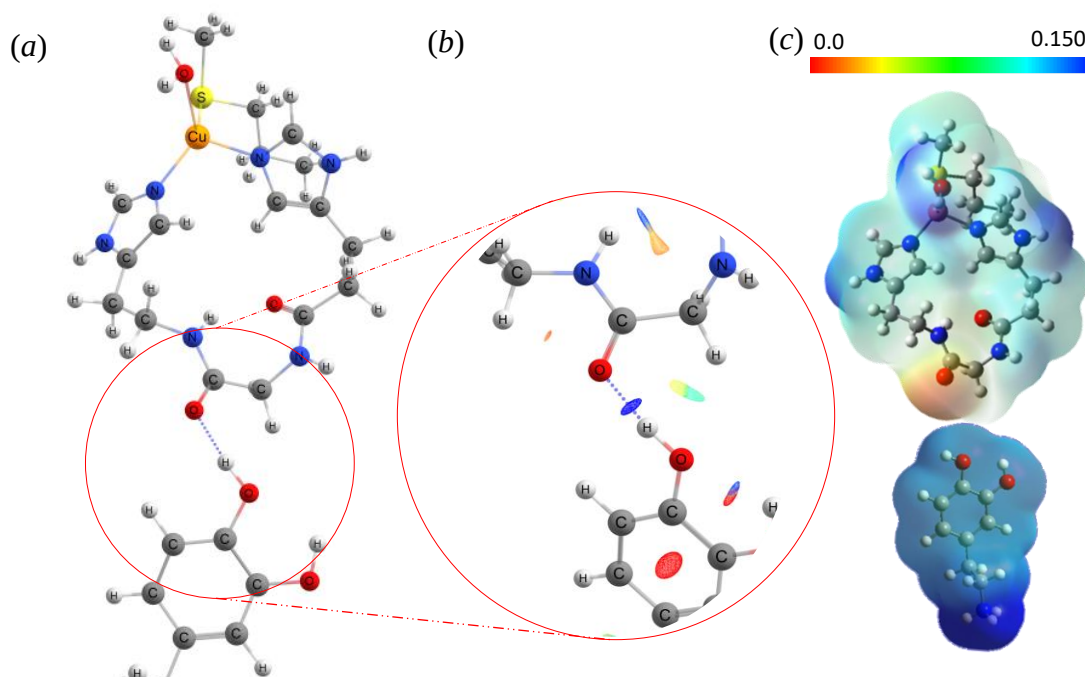


Figura 46: (a) Estructura optimizada de $\text{Cu}_M - \text{H}_2\text{O}$ con THR413 y dopamina acoplada. (b) Interacciones no covalentes del complejo $\text{Cu}_M - \text{H}_2\text{O}$, THR413 y dopamina (c) Potencial electrostático del $\text{Cu}_M - \text{H}_2\text{O}$, THR413 y dopamina.

Para entender la reactividad entre estas dos moléculas fue calculado el potencial químico, la dureza y la electrofilia global de los dos fragmentos. Los resultados son mostrados en la Tabla 6.

	μ	η	ω	$\Delta N_{m\acute{a}x}$
Dopamina	-0,2566	0,0697	0,4724	3,68
Complejo de cobre	-0,2086	0,0942	0,2310	2,21

Tabla 6: Índices globales para la dopamina acoplada al complejo de Cu.

De acuerdo con los resultados existe una transferencia de carga electrónica parcial desde el complejo de cobre a la DP ($\mu_{\text{complejo}} > \mu_{dp}$ y $\omega_{dp} > \omega_{\text{complejo}}$). Adicionalmente, según la dureza, el complejo de cobre no deformará su nube electrónica tan fácil como la DP.

Para corroborar la transferencia de carga parcial entre las dos moléculas, fueron calculadas las cargas de cada fragmento en la supermolécula. La carga de la dopamina fue de 0,94 y del complejo fue de 1,06. Estos resultados indican que hay una transferencia de carga total de 0,06 desde el complejo de cobre a la dopamina.

ÁTOMO	q_{frag}	q_{Supe}	$q_{Supe-frag}$
O19 (THR)	-0,592	-0,666	-0,074
O60 (DP)	-0,653	-0,702	-0,048
H73 = H_R (DP)	0,215	0,251	0,037
N22 (THR)	-0,612	-0,576	0,036
C56 (DP)	-0,061	-0,095	-0,034
C55 (DP)	-0,250	-0,216	-0,034
C18 (THR)	0,660	0,636	0,024

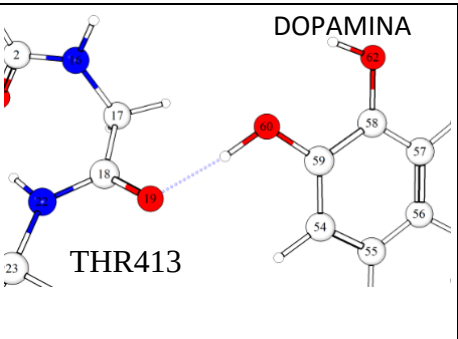


Tabla 7: Cargas atómicas en la dopamina y en el complejo de cobre.

q_{frag} = Carga atómica en el fragmento, q_{Supe} = Carga atómica en la supermolécula.

La Tabla 7 muestra los principales átomos involucrados en la transferencia de carga entre la dopamina y el complejo. Comparando la carga atómica en los fragmentos y la supermolécula (Tabla 7), es posible interpretar que el oxígeno 60, el carbono 55 y 56 de la dopamina han ganado carga parcial importante y el nitrógeno 22 del complejo ha perdido carga. Un dato interesante es que el hidrógeno R de la DP involucrado en la abstracción pierde carga volviéndose más positivo. Adicionalmente, es posible observar que el oxígeno 19 involucrado en el enlace de hidrógeno, ha ganado carga parcial (-0,074) y el hidrógeno de la dopamina ha perdido (0,0233). En esta interacción hay una transferencia local desde el hidrógeno de la dopamina al oxígeno del complejo.

De los resultados anteriores es posible inferir que la DP se encuentra unida al aminoácido THR413 del sitio activo mediante un enlace de hidrógeno y adicionalmente existe una transferencia parcial de carga total desde el complejo a la dopamina.

Una vez realizado el estudio de docking, se realizó la minimización y la dinámica molecular. En las siguientes gráficas se puede observar el avance de la energía del sistema, la presión, el volumen y la temperatura durante 1,6 ps. En todas las gráficas es posible resaltar que la estabilidad de estos parámetros se alcanza alrededor de los 250 ps.

Desde el archivo de salida fue posible observar que la DP efectivamente se encuentra acoplada al sitio de $\text{Cu}_M - \text{H}_2\text{O}$ mediante el aminoácido THR413, sin embargo, a medida que avanza el tiempo la dopamina se desacopla de este sitio, lo que probablemente sucede debido a que la transferencia de carga entre las dos especies es débil. Estos resultados sugieren que la interacción de la DP con la enzima es débil y probable que esta interacción se rompa para que la DP pueda acoplarse al $\text{Cu}_M - \text{O}_2^-$ en el segundo paso de la reacción general.

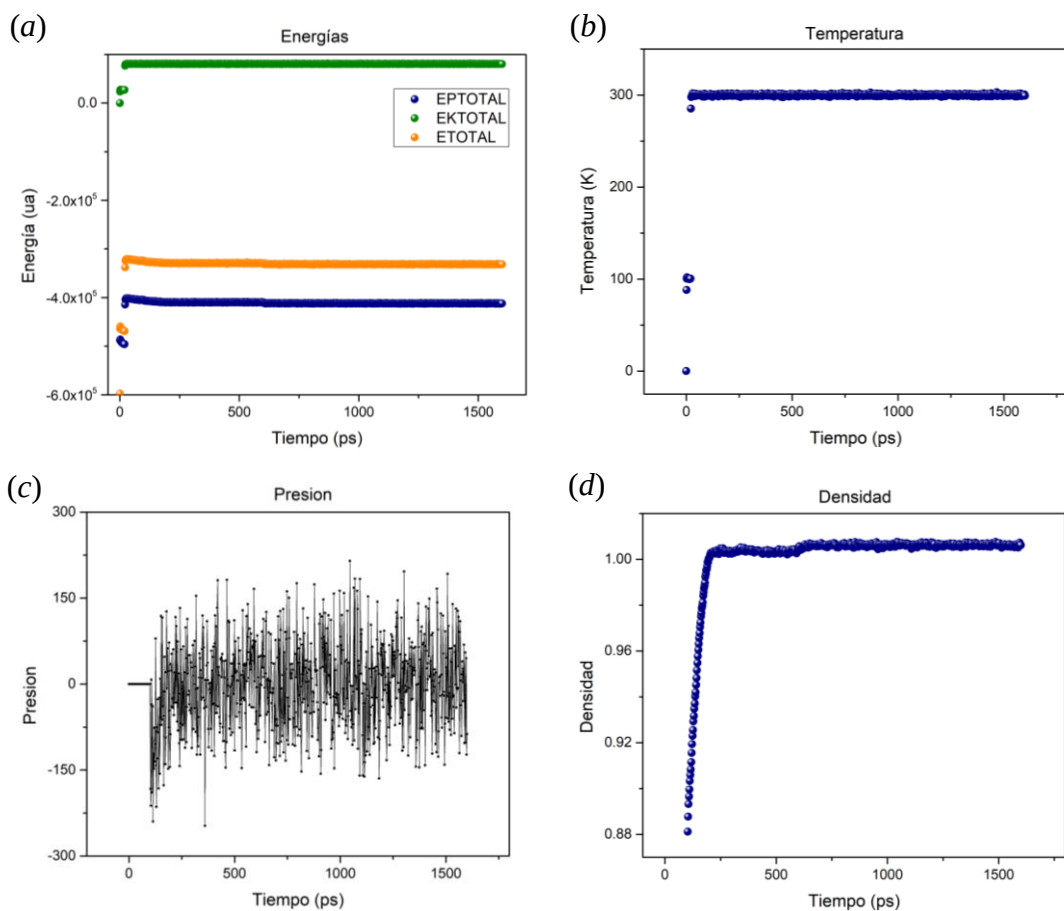


Figura 47: Análisis de las energías (a), temperatura (b), presiones instantáneas (c) y densidad (d) de los 1,6 ps de dinámica molecular.

Los resultados encontrados confirman que la dopamina se encuentra cerca del sitio activo de la enzima específicamente cerca del $\text{Cu}_M - \text{H}_2\text{O}$ y por lo tanto estaría disponible para continuar con un mecanismo planteado por Solomon ó por Wang.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación se realizó un estudio teórico y computacional del mecanismo de hidroxilación de la DP mediada por la $D\beta M$. Inicialmente se estudió la coordinación del oxígeno sobre el complejo de cobre (I) de la enzima y seguidamente se estudió la abstracción del átomo de hidrógeno desde el complejo superoxo de Cu_M al carbono β de la dopamina. Por primera vez, el mecanismo detallado del paso de HAT desde DP en el mecanismo de hidroxilación ha sido explicado usando diferentes herramientas computacionales.

En el primer paso de la reacción, se analizó el intercambio de ligandos entre la molécula de agua y el oxígeno, que fue estimado con un $\Delta G^\circ = 6,61$ kcal/mol. La coordinación del oxígeno al sitio de $Cu_M(I)$ fue estudiada de forma monodentada y bidentada concluyendo que el isómero coordinado de forma monodentada está favorecido en 17,53 kcal/mol respecto de la forma bidentada. El análisis sobre los orbitales moleculares frontera demostró que esta especie se encuentra activada para realizar una HAT debido a que la contribución de los oxígenos al orbital SOMO es mayor al 33 %.

En el segundo paso del mecanismo, la HAT fue examinada usando dos conformaciones de la dopamina que interactúan con el sitio de cobre $Cu^{2+}_M(\eta^1 - O_2^{\cdot-})$. Hemos encontrado que un enlace de hidrógeno entre el hidrógeno de la amina de la DP y el oxígeno proximal del superoxo es un paso clave para activar la reacción de transferencia del átomo de hidrógeno. Aunque la HAT desde DP a $Cu^{2+}_M(O_2^{\cdot-})$ fue analizada por diferentes conformaciones de la dopamina, ha sido demostrado que el enlace de hidrógeno facilita la reacción del HAT implicando específicamente el H_R de la DP.

Cuatro reacciones de HAT fueron estudiadas, **R1** y **R3** fueron energéticamente menos favorables que sus equivalentes respectivas, **R2** y **R4** que presentan el enlace de hidrógeno enzima-sustrato. Sin embargo, solo **R1** y **R2** conducen al producto deseado, las otras dos conducen a un enantiómero que no es producido por la enzima. En esta tesis se demostró que la reacción **R2** es la reacción más favorable cinética y termodinámicamente.

A través del análisis del reactante activado, se logró demostrar que el enlace de hidrógeno enzima-sustrato disminuye los grados de libertad del complejo y produce una rigidez estructural que facilita la HAT y promueve la formación del radical DP.

La actividad electrónica de las dos reacciones fue notablemente diferente. En **R1**, el REF indica espontaneidad en la actividad electrónica mientras que en **R2**, que conduce al producto correcto, la actividad electrónica es no espontánea y es inducida por fuertes cambios estructurales. Finalmente, los perfiles de REF de las reacciones en el medio

proteico son similares a aquellos en fase gaseosa indicando que la diferencia entre ellos debe ser atribuida a efectos de polarización impuesta por el modelo de solvatación.

La descomposición física del REF mostró que ambos mecanismos, **R1** y **R2**, presentan los mismos efectos de polarización con diferentes magnitudes. No obstante, presentan flujos de transferencia con comportamientos opuestos indicando que la diferencia entre estos mecanismos se debe a procesos de transferencia electrónica diferentes que ocurren dentro del estado de transición. Interesantemente, la formación del enlace O-H es un proceso no espontáneo en la reacción más probable **R2**.

Los principales eventos químicos en el paso de HAT de la conversión de DP a NP fueron descritos en detalle y la energética de cada uno fue cuantificada. Fue encontrado que el parámetro más influyente es la variación del ángulo diedro N-C α -C β -C γ de la DP y este es responsable por al menos 40% de la energía de activación.

Los pasos siguientes a la HAT fueron estudiados de acuerdo con el mecanismo de Solomon para encontrar la barrera y la energía libre de Gibbs total de la reacción. La barrera libre de Gibbs total para la hidroxilación de DP catalizada por el modelo representativo del sitio activo de la D β M es de $\Delta G^\ddagger = 42,92$ kcal/mol en fase gaseosa y de $\Delta G^\ddagger = 35,77$ kcal/mol considerando la solvatación del medio proteico; la energía libre de Gibbs de la reacción es de $\Delta G^\circ = -74,57$ kcal/mol en fase gaseosa y de $\Delta G^\circ = -75,16$ kcal/mol en el medio proteico, concluyéndose que la solvatación del medio de la proteína estabiliza notablemente el sistema, disminuyendo la barrera y la energía libre de Gibbs de la reacción.

Un mecanismo alternativo plantea que la HAT por el superoxo de cobre puede darse desde el ascorbato. Aunque hemos encontrado que este mecanismo puede ser viable debido a una menor energía de activación, es necesario esperar que estudios experimentales puedan comprobar este resultado.

Por otro lado, desde los estudios de la interacción entre la DP y el sitio de Cu_M – H₂O se puede concluir que la DP se une a la enzima mediante el aminoácido THR413, se encontró que hay una transferencia de carga débil desde el complejo de cobre hasta la DP. Los resultados de DM sugieren que esta interacción (THR-DP) puede romperse rápidamente.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] R.A. Rush, L.B. Geffen, Dopamine β hydroxylase in health and disease, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 12 (1980) 241–277. <https://doi.org/10.3109/10408368009108731>.
- [2] S. Sugama, Y. Kakinuma, Noradrenaline as a key neurotransmitter in modulating microglial activation in stress response, *Neurochem. Int.* 143 (2021) 104943. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104943>.
- [3] S.M. Southwick, J.D. Bremner, A. Rasmusson, C.A. Morgan, A. Arnsten, D.S. Charney, Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder, *Biol. Psychiatry.* 46 (1999) 1192–1204. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00219-X).
- [4] J.F. Cubells, C.P. Zabetian, Human genetics of plasma dopamine β -hydroxylase activity: Applications to research in psychiatry and neurology, *Psychopharmacology (Berl.)* 174 (2004) 463–476. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1840-8>.
- [5] L. Almeida, T. Nunes, R. Costa, J.F. Rocha, M. Vaz-da-Silva, P. Soares-da-Silva, Etamicastat, a Novel Dopamine β -Hydroxylase Inhibitor: Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics in Patients With Hypertension, *Clin. Ther.* 35 (2013) 1983–1996. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2013.10.012>.
- [6] J.A. Palma, L. Norcliffe-Kaufmann, C. Fuente-Mora, L. Percival, C.L. Spalink, H. Kaufmann, Disorders of the Autonomic Nervous System: Autonomic Dysfunction in Pediatric Practice, in: Swaiman's *Pediatr. Neurol. Princ. Pract.* Sixth Ed., Elsevier, 2017: pp. 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-37101-8.00154-5>.
- [7] K.J. Swoboda, M.A. Walker, Neurotransmitter-Related Disorders, in: Swaiman's *Pediatr. Neurol. Princ. Pract.* Sixth Ed., Elsevier, 2017: pp. 355–361. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-37101-8.00044-8>.
- [8] S.A. Thomas, A.M. Matsumoto, R.D. Palmiter, Noradrenaline is essential for mouse fetal development, *Nature.* 374 (1995) 643–646. <https://doi.org/10.1038/374643a0>.
- [9] R.E. Cowley, L. Tian, E.I. Solomon, Mechanism of O₂ activation and substrate hydroxylation in noncoupled binuclear copper monooxygenases, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (2016) 12035–12040. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614807113>.
- [10] E.I. Solomon, J.W. Ginsbach, D.E. Heppner, M.T. Kieber-Emmons, C.H. Kjaergaard, P.J. Smeets, L. Tian, J.S. Woertink, Copper Dioxygen (Bio)Inorganic Chemistry, *Faraday Discuss.* 148 (2011) 11–39.
- [11] H. Winkler, D.K. Apps, R. Fischer-Colbrie, The molecular function of adrenal

- chromaffin granules: Established facts and unresolved topics, *Neuroscience*. 18 (1986) 261–290. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90154-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90154-5).
- [12] D.A. Quist, D.E. Diaz, J.J. Liu, K.D. Karlin, Activation of dioxygen by copper metalloproteins and insights from model complexes, *J. Biol. Inorg. Chem.* 22 (2017) 253–288. <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1415-2>.
- [13] S. Chauhan, P. Hosseinzadeh, Y. Lu, N.J. Blackburn, Stopped-Flow Studies of the Reduction of the Copper Centers Suggest a Bifurcated Electron Transfer Pathway in Peptidylglycine Monooxygenase, *Biochemistry*. 55 (2016) 2008–2021. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00061>.
- [14] J.P. Klinman, Mechanisms Whereby Mononuclear Copper Proteins Functionalize Organic Substrates, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2541–2562. <https://doi.org/10.1021/cr950047g>.
- [15] P. Wu, F. Fan, J. Song, W. Peng, J. Liu, C. Li, Z. Cao, B. Wang, Theory Demonstrated a “Coupled” Mechanism for O₂ Activation and Substrate Hydroxylation by Binuclear Copper Monooxygenases, *J. Am. Chem. Soc.* 141 (2019) 19776–19789. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b09172>.
- [16] W.A. Francisco, D.J. Merkler, N.J. Blackburn, J.P. Klinman, Kinetic Mechanism and Intrinsic Isotope Effects for the Peptidylglycine α -Amidating Enzyme Reaction, *Biochemistry*. 37 (1998) 8244–8252. <https://doi.org/10.1021/bi973004y>.
- [17] T. V Vendelboe, P. Harris, Y. Zhao, T.S. Walter, K. Harlos, K. El Omari, H.E.M. Christensen, The crystal structure of human dopamine β -hydroxylase at 2.9 Å resolution, *Sci. Adv.* 2 (2016) e1500980. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500980>.
- [18] J.P. Klinman, M. Krueger, M. Brenner, D.E. Edmondson, Evidence for two copper atoms/subunit in dopamine beta-monooxygenase catalysis., *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 3399–402. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6706964>.
- [19] R. Bartlett, C.E. Dykstra, G. Frenking, K.S. Kim, G.E. Scuseria, Theory and Applications of Computational Chemistry: The First Forty Years, Dykstra, CE. (2005) 1191.
- [20] S.T. Prigge, A.S. Kolhekar, B.A. Eipper, R.E. Mains, L.M. Amzel, Amidation of bioactive peptides: The structure of peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase, *Science*. 278 (1997) 1300–1305. <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1300>.
- [21] B.A. Eipper, A.S.W. Quon, R.E. Mains, J.S. Boswell, N.J. Blackburn, The Catalytic Core of Peptidylglycine α -Hydroxylating Monooxygenase: Investigation by Site-Directed Mutagenesis, Cu X-ray Absorption Spectroscopy, and Electron Paramagnetic Resonance, *Biochemistry*. 34 (1995) 2857–2865. <https://doi.org/10.1021/bi00009a016>.

- [22] J.C. Lewis, P.S. Coelho, F.H. Arnold, Enzymatic Functionalization of Carbon-Hydrogen Bonds. <https://doi.org/10.1039/c0cs00067a>.
- [23] M. Bhadra, W.J. Transue, H. Lim, R.E. Cowley, J.Y.C. Lee, M.A. Siegler, P. Josephs, G. Henkel, M. Lerch, S. Schindler, A. Neuba, K.O. Hodgson, B. Hedman, E.I. Solomon, K.D. Karlin, A Thioether-Ligated Cupric Superoxide Model with Hydrogen Atom Abstraction Reactivity, *J. Am. Chem. Soc.* (2021). <https://doi.org/10.1021/jacs.1c00260>.
- [24] E.J. Diliberto, P.L. Allen, Mechanism of dopamine-beta-hydroxylation. Semidehydroascorbate as the enzyme oxidation product of ascorbate., *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 3385–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6451628>.
- [25] H. Zhu, M. Sommerhalter, A.K.L. Nguy, J.P. Klinman, Solvent and temperature probes of the long-range electron-transfer step in tyramine β -monooxygenase: Demonstration of a long-range proton-coupled electron-transfer mechanism, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 5720–5729. <https://doi.org/10.1021/ja512388n>.
- [26] S.T. Prigge, R.E. Mains, B.A. Eipper, L.M. Amzel, New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: Structure, mechanism and function, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1236–1259. <https://doi.org/10.1007/PL00000763>.
- [27] E.I. Solomon, D.E. Heppner, E.M. Johnston, J.W. Ginsbach, J. Cirera, M. Qayyum, M.T. Kieber-Emmons, C.H. Kjaergaard, R.G. Hadt, L. Tian, Copper Active Sites in Biology, *Chem. Rev.* 114 (2014) 3659–3853. <https://doi.org/10.1021/cr400327t>.
- [28] T. Ljones, T. Skotland, Evidence from the acceleration of cytochrome c reduction for the formation of ascorbate free radical by dopamine beta monooxygenase, *Febs Lett.* 108 (1979) 25–27.
- [29] S.T. Prigge, B.A. Eipper, R.E. Mains, L.M. Amzel, Dioxygen Binds End-On to Mononuclear Copper in a Precatalytic Enzyme Complex, *Science.* 304 (2004) 864–867. <https://doi.org/10.1126/science.1094583>.
- [30] S.T. Prigge, A.S. Kolhekar, B.A. Eipper, R.E. Mains, L. Mario Amzel, Substrate-mediated electron transfer in peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase, *Nat. Struct. Biol.* 6 (1999) 976–983. <https://doi.org/10.1038/13351>.
- [31] J.C. Freeman, J.J. Villafranca, D.J. Merkler, Redox Cycling of Enzyme-Bound Copper during Peptide Amidation, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 4923–4924. <https://doi.org/10.1021/ja00064a077>.
- [32] S.M. Miller, J.P. Klinman, Magnitude of Intrinsic Isotope Effects in the Dopamine β -Monooxygenase Reaction, *Biochemistry.* 22 (1983) 3091–3096. <https://doi.org/10.1021/bi00282a011>.
- [33] N. Ahn, J.P. Klinman, Mechanism of Modulation of Dopamine β -

- Monooxygenase by pH and Fumarate As Deduced from Initial Rate and Primary Deuterium Isotope Effect Studies, *Biochemistry*. 22 (1983) 3096–3106. <https://doi.org/10.1021/bi00282a012>.
- [34] O. Terland, T. Flatmark, Ascorbate as a natural constituent of chromaffin granules from the bovine adrenal medulla, *FEBS Lett.* 59 (1975) 52–56. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(75\)80339-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80339-5).
- [35] C.R. Hess, M.M. McGuirl, J.P. Klinman, Mechanism of the insect enzyme, tyramine β -monooxygenase, reveals differences from the mammalian enzyme, dopamine β -monooxygenase, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 3042–3049. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705911200>.
- [36] G. Tian, J.P. Klinman, J.A. Berry, Oxygen-18 Kinetic Isotope Effects in the Dopamine β -Monooxygenase Reaction: Evidence for a New Chemical Mechanism in Non-Heme Metallomonooxygenases, *Biochemistry*. 33 (1994) 226–234. <https://doi.org/10.1021/bi00167a030>.
- [37] M.C. Brenner, J.P. Klinman, Correlation of Copper Valency with Product Formation in Single Turnovers of Dopamine β -Monooxygenase, *Biochemistry*. 28 (1989) 4664–4670. <https://doi.org/10.1021/bi00437a023>.
- [38] P. Chen, J. Bell, B.A. Eipper, E.I. Solomon, Oxygen Activation by the Noncoupled Binuclear Copper Site in Peptidylglycine α -Hydroxylating Monooxygenase. Spectroscopic Definition of the Resting Sites and the Putative Cu(II)-OOH Intermediate, *Biochemistry*. 43 (2004) 5735–5747. <https://doi.org/10.1021/bi0362830>.
- [39] B.J. Reedy, N.J. Blackburn, Preparation and Characterization of Half-Apo Dopamine- β -hydroxylase by Selective Removal of Cu A .Identification of a Sulfur Ligand at the Dioxygen Binding Site by EXAFS and FTIR Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 1924–1931. <https://doi.org/10.1021/ja00084a037>.
- [40] A. Kohen, H.-H. Limbach, *Isotope Effects In Chemistry and Biology* - CRC Press Book, (2006) 1074. <https://www.crcpress.com/product/isbn/9780824724498>.
- [41] E.I. Solomon, Dioxygen Binding, Activation, and Reduction to H₂O by Cu Enzymes, *Inorg. Chem.* 55 (2016) 6364–6375. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b01034>.
- [42] P. Chen, K. Fujisawa, E.I. Solomon, Spectroscopic and theoretical studies of mononuclear copper(II) alkyl- and hydroperoxo complexes: Electronic structure contributions to reactivity, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 10177–10193. <https://doi.org/10.1021/ja0016755>.
- [43] P. Chen, E.I. Solomon, O₂ activation by binuclear Cu sites: Noncoupled versus exchange coupled reaction mechanisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101

- (2004) 13105–13110. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0402114101.
- [44] J.P. Klinman, The copper-enzyme family of dopamine β -monooxygenase and peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase: Resolving the chemical pathway for substrate hydroxylation, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 3013–3016. <https://doi.org/10.1074/jbc.R500011200>.
 - [45] R. Trammell, K. Rajabimoghadam, I. Garcia-Bosch, Copper-Promoted Functionalization of Organic Molecules: From Biologically Relevant Cu/O₂ Model Systems to Organometallic Transformations, *Chem. Rev.* 119 (2019) 2954–3031. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00368>.
 - [46] J.W. Ginsbach, R.L. Peterson, R.E. Cowley, K.D. Karlin, E.I. Solomon, Correlation of the electronic and geometric structures in mononuclear copper(II) superoxide complexes, *Inorg. Chem.* 52 (2013) 12872–12874. <https://doi.org/10.1021/ic402357u>.
 - [47] N. Kindermann, C.J. Günes, S. Dechert, F. Meyer, Hydrogen Atom Abstraction Thermodynamics of a μ -1,2-Superoxo Dicopper(II) Complex, *J. Am. Chem. Soc.* 139 (2017) 9831–9834. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b05722>.
 - [48] A. Kunishita, M.Z. Ertem, Y. Okubo, T. Tano, H. Sugimoto, K. Ohkubo, N. Fujieda, S. Fukuzumi, C.J. Cramer, S. Itoh, Active site models for the CuA site of peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase and dopamine β -monooxygenase, *Inorg. Chem.* 51 (2012) 9465–9480. <https://doi.org/10.1021/ic301272h>.
 - [49] R.A. Marcus, On the theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer. I, *J. Chem. Phys.* 24 (1956) 966–978. <https://doi.org/10.1063/1.1742723>.
 - [50] R.A. Marcus, Electron Transfer Reactions in Chemistry: Theory and Experiment (Nobel Lecture), *Angew. Chemie Int. Ed. English.* 32 (1993) 1111–1121. <https://doi.org/10.1002/anie.199311113>.
 - [51] S. Gutiérrez-Oliva, B. Herrera, A. Toro-Labbé, An extension of the Marcus equation: the Marcus potential energy function, *J. Mol. Model.* 24 (2018) 104. <https://doi.org/10.1007/s00894-018-3633-8>.
 - [52] V. Magnasco, Post-Hartree–Fock methods, in: *Elem. Mol. Quantum Mech.*, Elsevier, 2013: pp. 681–722. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-62647-9.00016-6>.
 - [53] N. Mardirossian, M. Head-Gordon, Thirty years of density functional theory in computational chemistry: An overview and extensive assessment of 200 density functionals, *Mol. Phys.* 115 (2017) 2315–2372. <https://doi.org/10.1080/00268976.2017.1333644>.
 - [54] R.G. Parr, W. Yang, Density functional approach to the frontier-electron theory

- of chemical reactivity, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 4049–4050. <https://doi.org/10.1021/ja00326a036>.
- [55] R.G. Parr, W. Yang, *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules* - Robert G. Parr, Yang Weitao, Oxford Science Publications, New York, 1994.
- [56] J.B. Foresman, *Exploring chemistry with electronic structure method (Gaussian)*, 2002. <http://gaussian.com/expchem3>.
- [57] R. Mcweeny, *Quantum Chemistry*, *Nature*. 238 (2005) 114–114. <https://doi.org/10.1038/238114b0>.
- [58] A. Szabo, N. Ostlund, *Modern quantum chemistry : introduction to advanced electronic structure theory*, Dover Publications, 1996.
- [59] M. Born, R. Oppenheimer, *Zur Quantentheorie der Molekeln*, *Ann. Phys.* 389 (1927) 457–484. <https://doi.org/10.1002/andp.19273892002>.
- [60] C. Gonzalez, H.B. Schlegel, *Reaction path following in mass-weighted internal coordinates*, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 5523–5527. <https://doi.org/10.1021/j100377a021>.
- [61] R. Bartlett, C.E. Dykstra, G. Frenking, K.S. Kim, G.E. Scuseria, *Theory and Applications of Computational Chemistry: The First Forty Years*, Dykstra, CE. (2005) 1191.
- [62] K. Fukui, *The Path of Chemical Reactions - The IRC Approach*, *Acc. Chem. Res.* 14 (1981) 363–368. <https://doi.org/10.1021/ar00072a001>.
- [63] H.P. Hratchian, H.B. Schlegel, *Accurate reaction paths using a Hessian based predictor-corrector integrator*, *J. Chem. Phys.* 120 (2004) 9918–9924. <https://doi.org/10.1063/1.1724823>.
- [64] H.P. Hratchian, H.B. Schlegel, *Using Hessian updating to increase the efficiency of a Hessian based predictor-corrector reaction path following method*, *J. Chem. Theory Comput.* 1 (2005) 61–69. <https://doi.org/10.1021/ct0499783>.
- [65] A. Toro-Labbé, *Characterization of chemical reactions from the profiles of energy, chemical potential, and hardness*, *J. Phys. Chem. A.* 103 (1999) 4398–4403. <https://doi.org/10.1021/jp984187g>.
- [66] J. Martínez, A. Toro-Labbé, *Energy and chemical force profiles from the Marcus equation*, *Chem. Phys. Lett.* 392 (2004) 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2004.05.034>.
- [67] S. Gutiérrez-Oliva, B. Herrera, A. Toro-Labbé, H. Chermette, *On the mechanism of Hydrogen transfer in the HSCH(O) to (S)CHOH and HSNO to SNOH reactions*, *J. Phys. Chem. A.* 109 (2005) 1748–1751. <https://doi.org/10.1021/jp0452756>.

- [68] B. Herrera, A. Toro-Labbé, The role of reaction force and chemical potential in characterizing the mechanism of double proton transfer in the adenine-uracil complex, in: *J. Phys. Chem. A*, American Chemical Society, 2007: pp. 5921–5926. <https://doi.org/10.1021/jp065951z>.
- [69] F. Duarte, A. Toro-Labbé, The mechanism of H₂ activation by (amino)carbenes, *J. Phys. Chem. A*. 115 (2011) 3050–3059. <https://doi.org/10.1021/jp1071154>.
- [70] J.I. Martínez-Araya, R. Quijada, A. Toro-Labbé, The mechanism of ethylene polymerization reaction catalyzed by group IVB metallocenes. A rational analysis through the use of reaction force, *J. Phys. Chem. C*. 116 (2012) 21318–21325. <https://doi.org/10.1021/jp302702h>.
- [71] D. Yepes, J.I. Martínez-Araya, P. Jaque, Solvent effect on the degree of (a)synchronicity in polar Diels-Alder reactions from the perspective of the reaction force constant analysis, *J. Mol. Model.* 24 (2018) 33. <https://doi.org/10.1007/s00894-017-3563-x>.
- [72] P. Politzer, A. Toro-Labbé, S. Gutiérrez-Oliva, B. Herrera, P. Jaque, M.C. Concha, J.S. Murray, The reaction force: Three key points along an intrinsic reaction coordinate, *J. Chem. Sci.* 117 (2005) 467–472. <https://doi.org/10.1007/BF02708350>.
- [73] J. Martínez, A. Toro-Labbé, The reaction force. A scalar property to characterize reaction mechanisms, *J. Math. Chem.* 45 (2009) 911–927. <https://doi.org/10.1007/s10910-008-9478-0>.
- [74] B. Herrera, A. Toro-Labbé, The role of the reaction force to characterize local specific interactions that activate the intramolecular proton transfers in DNA basis, *J. Chem. Phys.* 121 (2004) 7096–7102. <https://doi.org/10.1063/1.1792091>.
- [75] P. Politzer, A. Toro-Labbé, S. Gutiérrez-Oliva, J.S. Murray, Perspectives on the Reaction Force, in: *Adv. Quantum Chem.*, Academic Press, 2012: pp. 189–209. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396498-4.00006-5>.
- [76] J.C. Polanyi, A.H. Zewail, Direct Observation of the Transition State, *Acc. Chem. Res.* 28 (1995) 119–132. <https://doi.org/10.1021/ar00051a005>.
- [77] A.H. Zewail, Femtochemistry: Atomic-Scale Dynamics of the Chemical Bond, *J. Phys. Chem. A*. 104 (2000) 5660–5694. <https://doi.org/10.1021/jp001460h>.
- [78] N. Villegas-Escobar, M.H. Larsen (née Vilhelmsen), S. Gutiérrez-Oliva, A.S.K. Hashmi, A. Toro-Labbé, Double Gold Activation of 1-Ethynyl-2-(Phenylethynyl)Benzene Toward 5-exo-dig and 6-endo-dig Cyclization Reactions, *Chem. - A Eur. J.* 23 (2017) 13360–13368. <https://doi.org/10.1002/chem.201701595>.
- [79] N. Villegas-Escobar, S. Gutiérrez-Oliva, A. Toro-Labbé, Catalytic Mechanism

- of H₂ Activation by a Carbenoid Aluminum Complex, *J. Phys. Chem. C*. 119 (2015) 26598–26604. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b08957>.
- [80] P. Politzer, J.S. Murray, D. Yepes, P. Jaque, Driving and retarding forces in a chemical reaction, *J. Mol. Model.* 20 (2014) 2351. <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2351-0>.
- [81] D.E. Ortega, S. Gutiérrez-Oliva, D.J. Tantillo, A. Toro-Labbé, A detailed analysis of the mechanism of a carbocationic triple shift rearrangement, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 9771–9779. <https://doi.org/10.1039/c4cp03819c>.
- [82] C. Lefebvre, G. Rubez, H. Khartabil, J.C. Boisson, J. Contreras-García, E. Hénon, Accurately extracting the signature of intermolecular interactions present in the NCI plot of the reduced density gradient: Versus electron density, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19 (2017) 17928–17936. <https://doi.org/10.1039/c7cp02110k>.
- [83] M.L. Cerón, E. Echegaray, S. Gutiérrez-Oliva, B. Herrera, A. Toro-Labbé, The reaction electronic flux in chemical reactions, *Sci. China Chem.* 54 (2011) 1982–1988. <https://doi.org/10.1007/s11426-011-4447-z>.
- [84] E. Rincón, P. Jaque, A. Toro-Labbé, Reaction force analysis of the effect of Mg(II) on the 1,3 intramolecular hydrogen transfer in thymine, *J. Phys. Chem. A*. 110 (2006) 9478–9485. <https://doi.org/10.1021/jp062870u>.
- [85] J. V. Burda, A. Toro-Labbé, S. Gutiérrez-Oliva, J.S. Murray, P. Politzer, Reaction force decomposition of activation barriers to elucidate solvent effects, *J. Phys. Chem. A*. 111 (2007) 2455–2457. <https://doi.org/10.1021/jp0709353>.
- [86] A. Toro-Labbé, S. Gutiérrez-Oliva, J.S. Murray, P. Politzer, The reaction force and the transition region of a reaction, in: *J. Mol. Model.*, Springer-Verlag, 2009: pp. 707–710. <https://doi.org/10.1007/s00894-008-0431-8>.
- [87] D. Yepes, J.S. Murray, J.C. Santos, A. Toro-Labbé, P. Politzer, P. Jaque, Fine structure in the transition region: Reaction force analyses of water-assisted proton transfers, in: *J. Mol. Model.*, Springer-Verlag, 2013: pp. 2689–2697. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1475-3>.
- [88] W. Koch, M.C. Holthausen, *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*, Wiley-VCH, 2001. <https://doi.org/10.1002/3527600043>.
- [89] R.M. Dreizler, J. da Providencia, North Atlantic Treaty Organization. Scientific Affairs Division., *Density Functional Methods In Physics*, 1985. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0818-9>.
- [90] R.G. Pearson, Absolute Electronegativity and Absolute Hardness of Lewis Acids and Bases, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 6801–6806. <https://doi.org/10.1021/ja00310a009>.
- [91] P. Geerlings, F. De Proft, W. Langenaeker, *Conceptual Density Functional*

- Theory, Chem. Rev. 103 (2003) 1793–1874. <https://doi.org/10.1021/cr990029p>.
- [92] T. Koopmans, Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms, Physica. 1 (1934) 104–113. [https://doi.org/10.1016/s0031-8914\(34\)90011-2](https://doi.org/10.1016/s0031-8914(34)90011-2).
- [93] J.F. Janak, Proof that $\partial E / \partial n_i = \epsilon$ in density-functional theory, Phys. Rev. B. 18 (1978) 7165–7168. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.18.7165>.
- [94] R.G. Parr, P.K. Chattaraj, Principle of Maximum Hardness, J. Am. Chem. Soc. 113 (1991) 1854–1855. <https://doi.org/10.1021/ja00005a072>.
- [95] E. Chamorro, P.K. Chattaraj, P. Fuentealba, Variation of the Electrophilicity Index along the Reaction Path, J. Phys. Chem. A. 107 (2003) 7068–7072. <https://doi.org/10.1021/jp035435y>.
- [96] R.A. Matute, P. Pérez, E. Chamorro, N. Villegas-Escobar, D. Cortés-Arriagada, B. Herrera, S. Gutiérrez-Oliva, A. Toro-Labbé, Reaction Electronic Flux Perspective on the Mechanism of the Zimmerman Di- π -methane Rearrangement, J. Org. Chem. 83 (2018) 5969–5974. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b00499>.
- [97] P. Pérez, A. Aizman, R. Contreras, Comparison between experimental and theoretical scales of electrophilicity based on reactivity indexes, J. Phys. Chem. A. 106 (2002) 3964–3966. <https://doi.org/10.1021/jp014664m>.
- [98] O. V. Gritsenko, Koopmans' theorem and its density-functional-theory analog assessed in evaluation of the red shift of vertical ionization potential upon complexation, Chem. Phys. Lett. 691 (2018) 178–180. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.11.019>.
- [99] S. Vogt-Geisse, A. Toro-Labbé, Chemical potential and reaction electronic flux in symmetry controlled reactions, J. Comput. Chem. 37 (2016) 1794–1800. <https://doi.org/10.1002/jcc.24394>.
- [100] A.M. Lamsabhi, S. Gutiérrez-Oliva, O. Mó, A. Toro-Labbé, M. Yáñez, Effects of the ionization in the tautomerism of uracil: A reaction electronic flux perspective, J. Comput. Chem. 36 (2015) 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.24054>.
- [101] C. Morell, V. Tognetti, E. Bignon, E. Dumont, N. Hernandez-Haro, B. Herrera, A. Grand, S. Gutiérrez-Oliva, L. Joubert, A. Toro-Labbé, H. Chermette, Insights into the chemical meanings of the reaction electronic flux, Theor. Chem. Acc. 134 (2015) 133. <https://doi.org/10.1007/s00214-015-1730-7>.
- [102] E. Echegaray, A. Toro-Labbé, Reaction electronic flux: A new concept to get insights into reaction mechanisms. Study of model symmetric nucleophilic substitutions, J. Phys. Chem. A. 112 (2008) 11801–11807. <https://doi.org/10.1021/jp805225e>.

- [103] A.J. Bridgeman, G. Cavigliasso, L.R. Ireland, J. Rothery, The Mayer bond order as a tool in inorganic chemistry, *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* (2001) 2095–2108. <https://doi.org/10.1039/b102094n>.
- [104] W. Yang, R.G. Parr, R. Pucci, Electron density, Kohn-Sham frontier orbitals, and Fukui functions, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 2862–2863. <https://doi.org/10.1063/1.447964>.
- [105] V. Tognetti, C. Morell, L. Joubert, Quantifying electro/nucleophilicity by partitioning the dual descriptor, *J. Comput. Chem.* 36 (2015) 649–659. <https://doi.org/10.1002/jcc.23840>.
- [106] W. Yang, W.J. Mortier, The Use of Global and Local Molecular Parameters for the Analysis of the Gas-Phase Basicity of Amines, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 5708–5711. <https://doi.org/10.1021/ja00279a008>.
- [107] C. Morell, A. Grand, A. Toro-Labbé, Theoretical support for using the $\Delta f(r)$ descriptor, *Chem. Phys. Lett.* 425 (2006) 342–346. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2006.05.003>.
- [108] C. Morell, A. Grand, A. Toro-Labbé, New dual descriptor for chemical reactivity, *J. Phys. Chem. A* 109 (2005) 205–212. <https://doi.org/10.1021/jp046577a>.
- [109] S. Gutiérrez-Oliva, S. Díaz, A. Toro-Labbé, Unveiling the Mysterious Mechanisms of Chemical Reactions, in: P.K. Chattaraj, D. Chakraborty (Eds.), *Chem. React. Confin. Syst. Theory, Model. Appl.*, First Edit, John Wiley & Sons Ltd., 2021: pp. 1–448.
- [110] S. Simon, M. Duran, J.J. Dannenberg, How does basis set superposition error change the potential surfaces for hydrogen-bonded dimers?, *J. Chem. Phys.* 105 (1996) 11024–11031. <https://doi.org/10.1063/1.472902>.
- [111] P. Salvador, X. Fradera, M. Duran, Effect of basis set superposition error on the electron density of molecular complexes, *J. Chem. Phys.* 112 (2000) 10106–10115. <https://doi.org/10.1063/1.481703>.
- [112] S.F. Boys, F. Bernardi, The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors, *Mol. Phys.* 19 (1970) 553–566. <https://doi.org/10.1080/00268977000101561>.
- [113] J. Contreras-García, E.R. Johnson, S. Keinan, R. Chaudret, J.P. Piquemal, D.N. Beratan, W. Yang, NCIPLOT: A program for plotting noncovalent interaction regions, *J. Chem. Theory Comput.* 7 (2011) 625–632. <https://doi.org/10.1021/ct100641a>.
- [114] R. Chauvin, C. Lepetit, B. Silvi, E. Alikhani, *Applications of Topological Methods in Molecular Chemistry*, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-29022-5>.

- [115] J. Contreras-García, E.R. Johnson, S. Keinan, W. Yang, NCIPLOT Manual, (n.d.) 1–16. <http://www.lct.jussieu.fr/pagesperso/contrera/nciplot-manual.pdf>.
- [116] J. González, I. Baños, I. León, J. Contreras-García, E.J. Cocinero, A. Lesarri, J.A. Fernández, J. Millán, Unravelling Protein-DNA Interactions at Molecular Level: A DFT and NCI Study, *J. Chem. Theory Comput.* 12 (2016) 523–534. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00330>.
- [117] P. Chen, E.I. Solomon, Oxygen Activation by the Noncoupled Binuclear Copper Site in Peptidylglycine α -Hydroxylating Monooxygenase. Reaction Mechanism and Role of the Noncoupled Nature of the Active Site, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 4991–5000. <https://doi.org/10.1021/ja031564g>.
- [118] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M. a. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. a. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, a. V. Marenich, J. Bloino, B.G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H.P. Hratchian, J. V. Ortiz, a. F. Izmaylov, J.L. Sonnenberg, Williams, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V.G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. a. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M.J. Bearpark, J.J. Heyd, E.N. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, T. a. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, a. P. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J.M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J.B. Foresman, D.J. Fox, Gaussian 16 Revision C.01, (2016).
- [119] R. Dennington, T.A. Keith, J.M. Millam, GaussView, Version 6.1, (2016).
- [120] Jacopo Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, Quantum mechanical continuum solvation models, *Chem. Rev.* 105 (2005) 2999–3093. <https://doi.org/10.1021/cr9904009>.
- [121] S. Ahmadi, L. Barrios Herrera, M. Chehelamirani, J. Hostaš, S. Jalife, D.R. Salahub, Multiscale modeling of enzymes: QM-cluster, QM/MM, and QM/MM/MD: A tutorial review, *Int. J. Quantum Chem.* 118 (2018) e25558. <https://doi.org/10.1002/QUA.25558>.
- [122] D. Guzmán-Angel, S. Gutiérrez-Oliva, A. Toro-Labbé, Hydrogenation and hydration of carbon dioxide: a detailed characterization of the reaction mechanisms based on the reaction force and reaction electronic flux analyses, *J. Mol. Model.* 25 (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00894-018-3891-5>.
- [123] G.A. Zhurko, D.A. Zhurko, Chemcraft, version 1.6, (2009).
- [124] L. Schrodinger, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8, (2015).
- [125] I. Wolfram Research, Mathematica 11.0, (2016).

- [126] O. Corporation, Origin(Pro), Version 9.0, (2013).
- [127] T.J. Dolinsky, J.E. Nielsen, J.A. McCammon, N.A. Baker, PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) W665–W667. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh381>.
- [128] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.* 31 (2009) NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- [129] K.D. Karlin, Z. Tyeklár, *Bioinorganic Chemistry of Copper*, Springer Netherlands, New York and London, 1993. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-6875-5>.
- [130] L. Casella, M. Gullotti, M. Bartosek, G. Pallanza, E. Laurenti, Model monooxygenase reactivity by binuclear two-coordinate copper(I) complexes extends to new ligand systems containing nitrogen and sulphur donors, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1991) 1235–1237. <https://doi.org/10.1039/C39910001235>.
- [131] N.J. Blackburn, F.C. Rhames, M. Ralle, S. Jaron, Major changes in copper coordination accompany reduction of peptidylglycine monooxygenase: Implications for electron transfer and the catalytic mechanism, *J. Biol. Inorg. Chem.* 5 (2000) 341–353. <https://doi.org/10.1007/PL00010663>.
- [132] P. Chen, D.E. Root, C. Campochiaro, K. Fujisawa, E.I. Solomon, Spectroscopic and electronic structure studies of the diamagnetic side-on CuII-superoxo complex Cu(O₂)[HB(3-R-5-iPrpz)₃]: Antiferromagnetic coupling versus covalent delocalization, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 466–474. <https://doi.org/10.1021/ja020969i>.
- [133] T. Lu, F. Chen, Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer, *J. Comput. Chem.* 33 (2012) 580–592. <https://doi.org/10.1002/jcc.22885>.
- [134] A. Beliaev, H. Ferreira, D.A. Learmonth, P. Soares-da-Silva, Dopamine β -Monooxygenase: Mechanism, Substrates and Inhibitors, *Curr. Enzym. Inhib.* 5 (2009) 27–43. <https://doi.org/10.2174/157340809787314265>.
- [135] P. Wu, J. Zhang, Q. Chen, W. Peng, B. Wang, Theoretical perspective on mononuclear copper-oxygen mediated C–H and O–H activations: A comparison between biological and synthetic systems, *Chinese J. Catal.* 43 (2022) 913–927. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(21\)63974-8](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(21)63974-8).
- [136] S.M. Miller, J.P. Klinman, Secondary isotope effects and structure-reactivity correlations in the dopamine beta-monooxygenase reaction: evidence for a chemical mechanism, *Biochemistry.* 24 (1985) 2114–2127. <https://doi.org/10.1021/BI00330A004>.

- [137] B.N. Sánchez-Eguía, M. Flores-Alamo, M. Orio, I. Castillo, Side-on cupric-superoxo triplet complexes as competent agents for H-abstraction relevant to the active site of PHM, *Chem. Commun.* 51 (2015) 11134–11137. <https://doi.org/10.1039/C5CC02332G>.

ANEXOS

ANEXO 1: OTRAS ACTIVIDADES

1. CONGRESOS

XXXIII Jornadas Chilenas de Química 2020. Puerto Varas.

Premio: Reconocimiento por Presentación Modalidad Poster en Química Teórica.
Trabajo: Oxygen Activation and Hydrogen Atom Transfer in Dopamine- β -Monooxygenase.

LatinXChem 2021. Twitter. Video-Poster. #Comp005, Category: #LXChemComp.
Trabajo: HAT from dopamine by D β M.

2. PASANTIA DE INVESTIGACIÓN

Pasantía de Investigación realizada en The University of British Columbia. Vancouver, Canadá mediante la beca ELAP del Gobierno de Canadá.

3. PUBLICACIONES

Artículo en proceso de ser sometido a Journal of Computational Chemistry:

Forero-Girón, Angie Carolay, Toro-Labbé, Alejandro. How Does Dopamine Convert into Norepinephrine? Insights on the key step of the Reaction. 2022.

Artículo en proceso de revisión en Journal of Physical Chemistry A:

Forero-Girón, Angie Carolay, Toro-Labbé, Alejandro. How Does Electronic Activity Drive Chemical Reactions? Insights from the Reaction Electronic Flux for the Conversion of Dopamine into Norepinephrine. 2022.

Artículo review de un libro:

Gutiérrez-Oliva Soledad, Forero-Girón Angie Carolay, Villegas-Escobar Nery, Toro-Labbé Alejandro. On the Mechanism of Chemical Reactions. Shubin Liu (Ed). Conceptual Density Functional Theory: Towards a New Chemical Reactivity Theory. Wiley VCH. 2022. doi.org/10.1002/9783527829941.ch23

ANEXO 2: ALINEACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS EN MBC.

La alineación completa de los aminoácidos para las diferentes MBC realizada por Vendelboe, 2016 y colaboradores demuestra los diferentes multidominios de las enzimas. Se destaca que el núcleo catalítico es similar para todas las enzimas y está unido a dominios específicos de cada enzima. El porcentaje de residuos idénticos en el núcleo catalítico entre MBC varía desde el 25-88 % como puede detallarse en la Tabla 10.

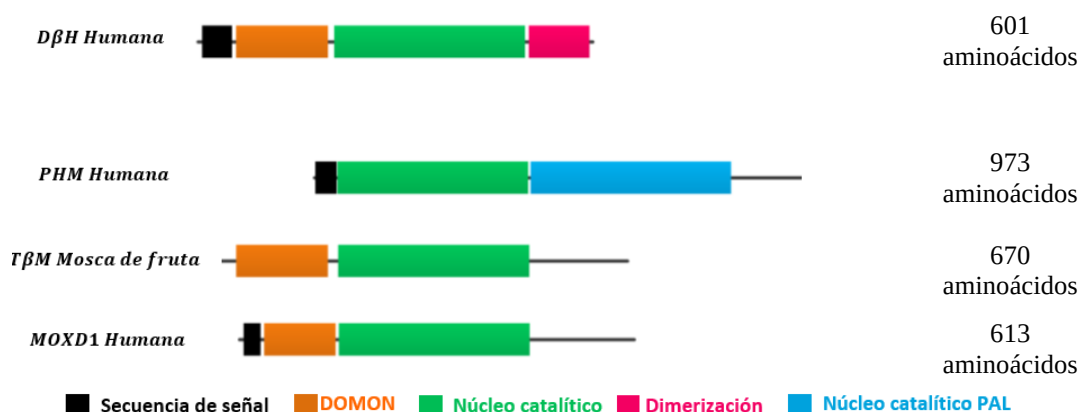


Figura A1: Alineamiento global de los dominios de las enzimas hidroxilasas que contienen cobre. *DβM*: Dopamina β - monooxigenasa, *PHM*: Peptidilglicina α -hidroxilasa; *TBM*: Tiramina β -monooxigenasa y *MOXD1*: Monooxigenasa X. *DOMON*: Dominio N-terminal de *DβM*. *PAL*: Peptidil α -hidroxiglicina α -amidaliasa. Imagen tomada desde [17]

	<i>DβM</i> Bovina	<i>PHM</i> Humana	<i>PHM</i> Rata	<i>TβM</i> Mosca de fruta	<i>MOXD1</i> Humana
<i>DβM</i> Humana	88	25	26	50	40
<i>DβM</i> Bovina	-	25	25	52	38
<i>PHM</i> Humana	-	-	94	22	24
<i>PHM</i> Rata	-	-	-	22	23
<i>TβM</i> Fruta humana	-	-	-	-	37

Tabla A1: Porcentaje de residuos idénticos en el núcleo catalítico de diferentes hidroxilasas. Tabla tomada desde [17].

ANEXO 3: GRÁFICOS NCI PARA LOS TS DE LAS 4 REACCIONES DE HAT

La Figura muestra las interacciones no covalentes para las cuatro reacciones estudiadas. En **R2** y **R4**, una región atractiva (región azul) indica el enlace de hidrógeno entre la dopamina y el sitio de cobre; así mismo, una región roja anaranjada muestra la repulsión en el anillo de 7 miembros formado entre las dos especies, una mayor repulsión es observada en **R4** comparada con **R2**. En las cuatro reacciones, regiones verdes indican regiones atractivas débiles entre las dos especies. En las reacciones **R1** y **R3** no se evidencia interacciones adicionales.

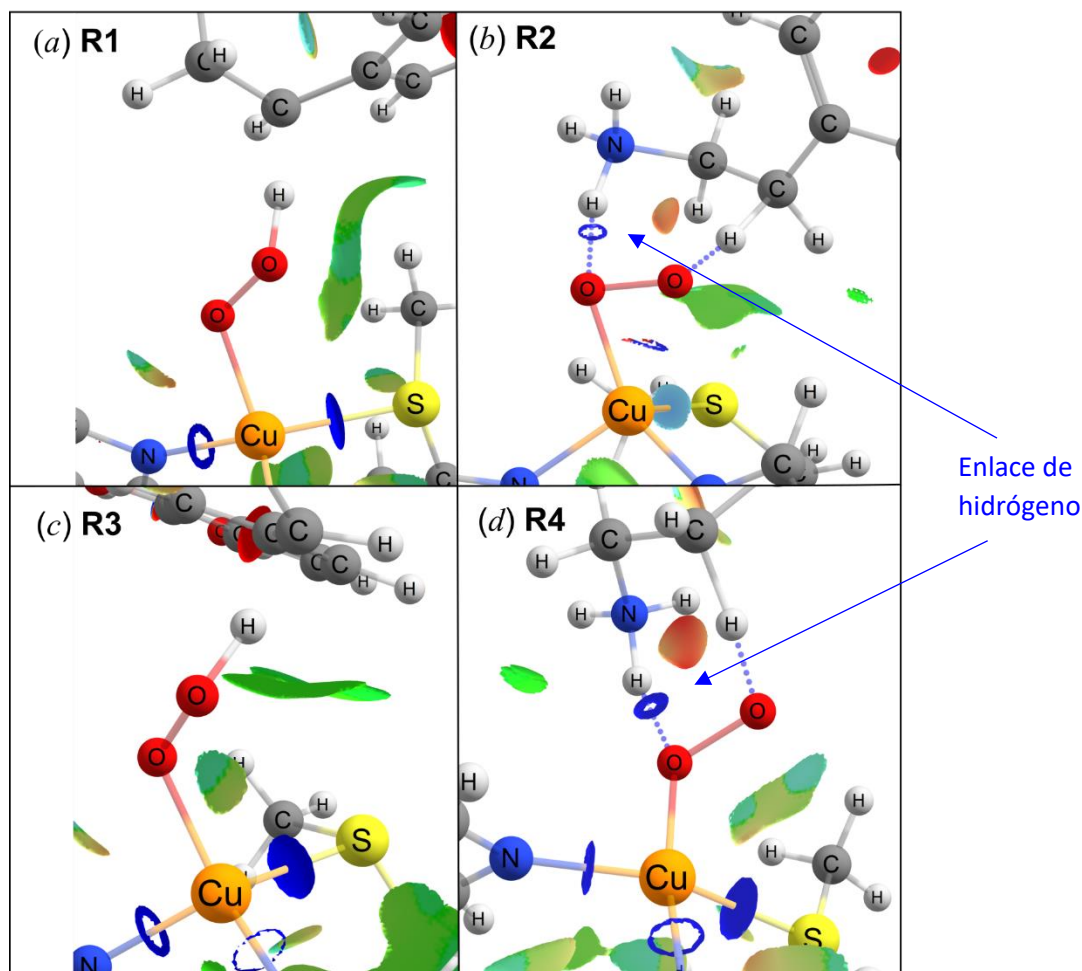


Figura A2: Gráfica de índice de interacciones no covalentes para los estados de transición de las reacciones de *HAT* en a) **R1** b) **R2** c) **R3** d) **R4**.

ANEXO 4: ARTÍCULOS CIENTÍFICOS GENERADOS EN ESTA TESIS DOCTORAL.

Artículo 1: Forero-Girón, Angie Carolay, Toro-Labbé, Alejandro. How Does Electronic Activity Drive Chemical Reactions? Insights from the Reaction Electronic Flux for the Conversion of Dopamine into Norepinephrine. *Journal of Physical Chemistry A*, sometido 2022.

Artículo 2: Forero-Girón, Angie Carolay, Toro-Labbé, Alejandro. How Does Dopamine Convert into Norepinephrine? Insights on the key step of the Reaction. *Journal of Computational Chemistry*, sometido 2022.

Artículo 3: Gutiérrez-Oliva Soledad, Forero-Girón Angie Carolay, Villegas-Escobar Nery, Toro-Labbé Alejandro. On the Mechanism of Chemical Reactions. Shubin Liu (Ed). *Conceptual Density Functional Theory: Towards a New Chemical Reactivity Theory*. Wiley VCH. 2022. doi.org/10.1002/9783527829941.ch23

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

**How Does Electronic Activity Drives Chemical Reactions?
Insights from the Reaction Electronic Flux for the
Conversion of Dopamine into Norepinephrine.**

Journal:	<i>The Journal of Physical Chemistry</i>
Manuscript ID	jp-2022-01469q.R1
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	12-May-2022
Complete List of Authors:	Forero Giron, Angie Carolay; Pontificia Universidad Católica de Chile, Química y Farmacia Toro-Labbé, Alejandro; Pontificia Universidad Católica de Chile, Laboratorio de Química Teórica Computacional (QTC), Departamento de Química Física.

SCHOLARONE™
Manuscripts

De: **The Journal of Physical Chemistry** <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Date: vie, 3 jun 2022 a las 13:16

Subject: Decision on Manuscript ID jp-2022-01469q.R1

To: <atola@uc.cl>, Cc: <crawford-office@jpc.acs.org>

03-Jun-2022

Journal: The Journal of Physical Chemistry

Part: Part A: Molecules, Clusters, and Aerosols

Section: A: Structure, Spectroscopy, and Reactivity of Molecules and Clusters

Please note that the final decision on journal Part and Section remains with the journal Editors.

Title: "How Does Electronic Activity Drives Chemical Reactions? Insights from the Reaction Electronic Flux for the Conversion of Dopamine into Norepinephrine."

Authors: Forero Giron, Angie Carolay; Toro-Labbé, Alejandro

Manuscript ID: jp-2022-01469q.R1

Manuscript Status: Accept

Dear Dr. Toro-Labbé:

We are pleased to inform you that your manuscript **has been accepted** for publication in The Journal of Physical Chemistry Part A: Molecules, Clusters, and Aerosols, A: Structure, Spectroscopy, and Reactivity of Molecules and Clusters.

You will soon receive an email invitation from the ACS Journal Publishing Staff that contains a link to the online Journal Publishing Agreement. Please sign and submit the journal publishing agreement within 48 hours.

Your manuscript has been forwarded to the ACS Publications office. You will be contacted in the near future by the ACS Journal Publishing Staff regarding the proofs for your manuscript.

Thank you again for choosing The Journal of Physical Chemistry for the publication of your work.

With best regards,

Prof. T. Daniel Crawford

Deputy Editor

The Journal of Physical Chemistry

Fax: 1-202-513-8605

Editor Email: crawford-office@jpc.acs.org

How Does Electronic Activity Drive Chemical Reactions? Insights from the Reaction Electronic Flux for the Conversion of Dopamine into Norepinephrine.

Angie Carolay Forero-Girón^a and Alejandro Toro-Labbé^{a*}

^a*Laboratorio de Química Teórica Computacional (QTC), Facultad de Química y de Farmacia, Pontificia Universidad Católica de Chile, Avenida Vicuña Mackenna 4860, Santiago de Chile, 7820436, Chile*

* E-mail: atola@uc.cl

Abstract

Hydrogen atom transfer (HAT) is a crucial step in the physiological conversion of dopamine into norepinephrine catalyzed by dopamine β -monooxygenase. The way the reaction takes place is unclear and a rational explanation on how the electronic activity drives the HAT seems to be necessary. In this work, we answer this question using the reaction electronic flux (REF), a DFT-based descriptor of electronic activity. Two reaction mechanisms will be analyzed using the REF's decomposition in polarization and electron transfer effects. Results show that both mechanisms goes as follows: 1) polarization effects initiate the reactions producing structural distortions; 2) electron transfer processes take over near the transition states triggering specific chemical events such as bond forming and breaking which are responsible to push the reactions towards the products; 3) after passing the transition state, polarization shows up again and

drives the relaxation process toward the product. Similar polarization effects were observed in both reactions, but they present an opposite behavior of the electronic transfer flux disclosing the fact that electron transfer phenomena govern the reaction mechanisms.

1. Introduction

A chemical reaction can be understood as a sequence of structural and electronic changes taking place along a reaction coordinate, identify and rationalize these combined structural and electronic changes is very important since it leads to key information to understand the reaction mechanism. The reaction electronic flux is a powerful tool that measures the electronic activity taking place along the reaction coordinate¹⁻¹² and it can be rationalized in terms of polarization and transfer effects.^{1,3-5} REF has been widely used to get insights into the mechanism of different reactions such as proton transfer,^{6,7} chemisorptions,⁸ nucleophilic substitutions^{1,3} hydrogen atom transfer,⁹ among other.¹⁰⁻¹² In this research, the reaction electronic flux will be employed to characterize a key HAT reaction carried out by the enzyme dopamine β -monooxygenase in the conversion of dopamine into norepinephrine.¹³ Important physiological compounds as hormones and neurotransmitters are hydroxylated in the organism through copper metalloenzymes. Specifically, the noncoupled binuclear copper monooxygenases (BCM) such as dopamine β -monooxygenase (D β M) have recently received attention due to new theoretical and experimental studies¹³⁻¹⁷ aimed at understanding their enzymatic hydroxylation mechanism. The BCMs are characterized by presenting a catalytic site with two non-coupled copper atoms^{18,19} separated by about 10-14 Å. Each copper atom has its own coordination sphere and plays a specific role: a so called Cu_M binds with two histidines, one methionine, and one solvent molecule, this is the site where the oxygen activation and substrate-binding occur²⁰ (See Fragment 1 in Figure 2). On the other hand, the second copper atom is coordinated to three histidines and acts as the electron relay in the enzyme.¹⁴ The catalytic activity of D β M has been studied^{13,15,21} and the proposed

mechanism indicates that the formation of a copper superoxide species on the Cu_M site precedes the hydrogen atom transfer that achieves this key step of the conversion. According to the Solomon mechanism,¹³ the $\text{D}\beta\text{M}$ capture an oxygen molecule to form an end-on copper superoxo complex capable of performing a selective HAT from the substrate,^{14,18} this step is crucial in enzymatic hydroxylation because it determines the chirality of the final product. This very specific and complex step of the whole reaction transforming dopamine into norepinephrine, involves many different kind of chemical events which corresponds to the combined changes of molecular structure and electronic density. Primary events such as bond breaking/formation as well as secondary ones as bond weakening/strengthening turns on and off along the reaction coordinate driving the chemical transformation. Since most of these events take place simultaneously, it is very difficult to catch them and describe them with precision. Nevertheless, the reaction electronic flux has proven to be a very accurate tool to describe the electronic activity that drives chemical reactions,¹⁻¹² this is the reason why it will be used as a main instrument of analysis in this research.

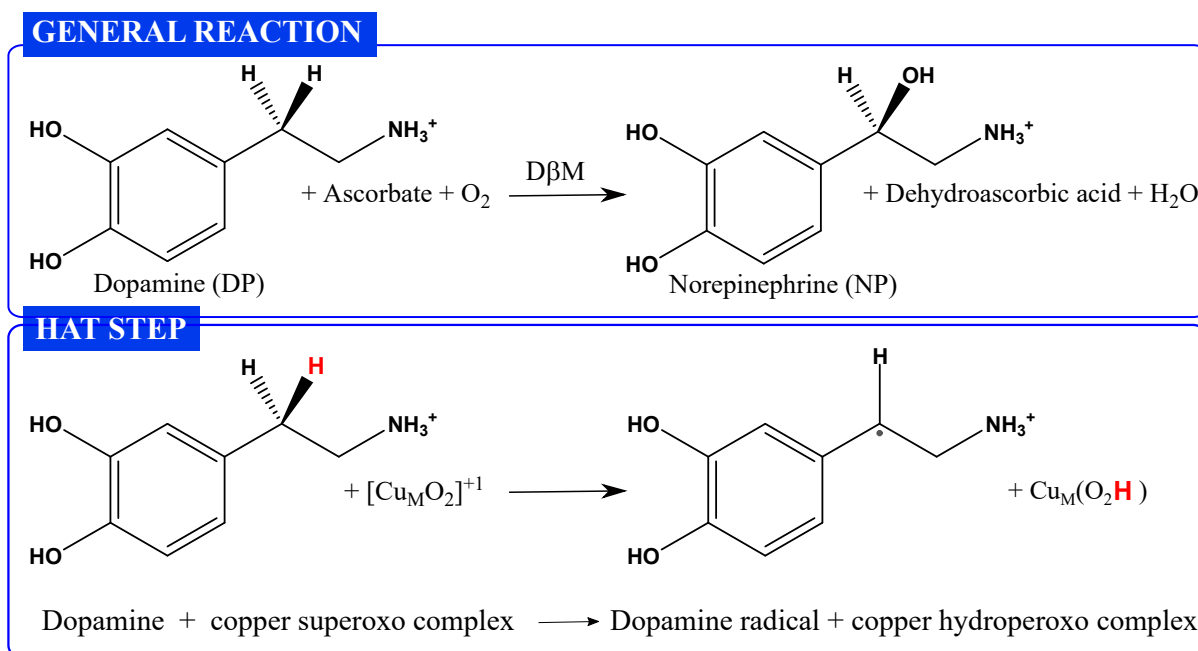


Figure 1: General hydroxylation reaction from dopamine to norepinephrine catalyzed by $\text{D}\beta\text{M}$, and HAT step from dopamine to copper superoxo complex on $\text{D}\beta\text{M}$ to produce dopamine radical and copper hydroperoxo complex

Figure 1 shows the HAT step from dopamine to the copper superoxo complex on the D β M, the latter abstracts the hydrogen atom (highlighted in red) from the β carbon (C β) of dopamine to form a copper hydroperoxo complex (Cu_MO₂H) and radical dopamine which later will capture a hydroxyl group to become norepinephrine. It seems that D β M may catalyze many other reactions that involve, like dopamine, a basic phenylethylamine skeleton that facilitates the formation of a hydrogen bond with the enzyme.²² In fact, we will see that a hydrogen bond between dopamine and the superoxide species reduces the energetic barrier for HAT.

In this work, we provide a detailed analysis of the electronic activity taking place in the HAT step of the conversion of dopamine into norepinephrine on a representative model of the D β M following the mechanism proposed by Solomon et al.¹³ To get more insights on how the electronic activity drives the main step of the reaction, physical decomposition of the REF^{1,5,6} in terms of polarization and transfer effects will be employed.

This article is organized as follows; in the theoretical background, section 2, the main definition of physical quantities employed in this study are reminded. Section 3 gives details on the computational methods used to characterize molecular structures along the reaction coordinate. In Section 4, two mechanisms of HAT are discussed and in Section 5, some conclusions are drawn.

2. Theoretical Background

2.1 Energy and Force Profiles: It is possible to obtain the minimum energy path, $E(\xi)$, connecting, along the intrinsic reaction coordinate (IRC= ξ), reactants, transition states and products.^{23–25} First insights on the reaction mechanism are provided by the reaction force,²⁶ $F(\xi) = -\frac{dE}{d\xi}$ since its critical points split the reaction coordinate into different reaction intervals. For one-step reactions with one transition state, the critical points of $F(\xi)$, ξ_1 and ξ_2 , corresponding to minimum and maximum values of $F(\xi)$, respectively, divide the reaction

coordinate into three regions: the reactants ($\xi_R \leq \xi \leq \xi_1$), transition state ($\xi_1 \leq \xi \leq \xi_2$) and products ($\xi_2 \leq \xi \leq \xi_P$) regions. Within each reaction region, different mechanisms might be operating.^{5,27–30} With the above partition, the energy associated in each region can be quantified through reaction works that can be conveniently defined at any interval along ξ :

$$W_i = - \int_{\xi_i}^{\xi_i + \delta\xi} F(\xi) d\xi, \quad (1)$$

in particular, expressions for the energy barrier, $\Delta E^\ddagger$, and the reaction energy ΔE° , in terms of reaction works associated to each reaction region are straightforwardly obtained.^{10,27,31–34}

2.2 Reaction Electronic Flux: The reaction electronic flux is a measure of the electronic activity taking place along ξ ,^{1–3} it is math defined as the variation of μ along ξ :

$$J(\xi) = - \frac{d\mu}{d\xi} \quad (2)$$

where μ is the electronic chemical potential,³⁵ a measure of the escaping tendency of the electronic density from equilibrium.^{35,36} Conceptually, in the frame of Density Functional Theory (DFT), the electronic chemical potential is the Lagrange multiplier used to minimize the energy functional with respect to the total number of electrons, N . Numerical values of μ can be obtained using the finite difference approximation³⁷ that express the energy change in terms of the first ionization potential IP and the electron affinity EA ; further approximation is the Koopmans theorem³⁸ that allows to write IP and EA in terms of the negative of the frontier molecular orbitals energies, highest occupied and lowest unoccupied molecular orbitals, HOMO (ε_H) and LUMO (ε_L) respectively.

$$\mu = \left(\frac{\partial E}{\partial N} \right)_{v(r)} \approx -\frac{1}{2}(IP + EA) \approx \frac{1}{2}(\varepsilon_H + \varepsilon_L) \quad (3)$$

According to the equation above, knowledge of the frontier molecular orbital energies along ξ , allow to characterize the profile $\mu(\xi)$, that give rise to $J(\xi)$ ^{1–12,31,39,40} through Equation

(2). It has been established that positive values of REF are associated with spontaneous electronic activity that is driving by bond strengthening and/or bond forming processes; negative values of $J(\xi)$ are due to non-spontaneous electronic activity which are driven by bond weakening and/or bond breaking processes.^{34,40}

The basics of any electronic phenomena at molecular level, indicates that it can be rationalized in terms of polarization and transfer so that it would be possible to propose a natural decomposition of the electronic activity in terms of these two components:^{3-5,41}

$$J(\xi) = J_p(\xi) + J_t(\xi), \quad (4)$$

we call this a physical decomposition of the REF. The above partition of $J(\xi)$ has been studied during the last decade in many different reactions,^{1,4-12,41,42} its fundamental interest lies in its ability to rationalize electronic activity as due to polarization and electronic transfer phenomena.

Structural distortions on the reacting species can be seen as a consequence of the electronic polarization taking place during the reaction. In this context, $J_p(\xi)$ can be obtained through fragmentation of the supermolecule identifying adequately the molecular species involved and then using the counterpoint method⁴³⁻⁴⁵ to characterize the electronic structure of each fragment along the actual reaction coordinate, thus obtaining their own chemical potential and reaction electronic flux profiles. In this model, the REF determined in this way is interpreted as a polarization flux on a given fragment due to the presence of other chemical fragments surrounding it. The chemical potential of each fragment, at each point along ξ , is determined using the geometry the fragment has within the supermolecule array. The polarization flux on a given fragment i is then defined as:^{1,5}

$$J_p^{(i)}(\xi) = - \left(\frac{N_i}{N} \right) \frac{d\mu_i}{d\xi} \quad \text{with} \quad J_p(\xi) = \sum_{i=1}^n J_p^{(i)}(\xi), \quad (5)$$

where N_i is the number of electrons on fragment i , N is the total number of electrons of the

supermolecule and n is the number of fragments in which the supermolecule has been divided. Then, the electron transfer flux $J_t(\xi)$ can be calculated through the difference between $J(\xi)$ calculated in the IRC procedure for the supermolecule and $J_p(\xi)$ given in Equation (5). Moreover, it is possible to determine the flux $J_t^{(i)}(\xi)$ associated to electronic transfer on each fragment.^{12,41}

$$J_t(\xi) = J(\xi) - J_p(\xi) \quad \text{and} \quad J_t(\xi) = \sum_{i=1}^n J_t^{(i)}(\xi), \quad J_t^{(i)}(\xi) = \left(\frac{N_i}{N} \right) \frac{d}{d\xi} (\mu_i - \mu_i^\circ) \quad (6)$$

where μ_i° is the chemical potential of fragment i in the supermolecule, however, since μ is a global property of the system, $\mu_i^\circ \equiv \mu^\circ$ for all i , with μ° the chemical potential of the supermolecule. Although other decomposition of the REF based on chemical considerations have been proposed,^{12,41} the above physical decomposition of the REF, in terms of polarization and electronic transfer contributions, is the most basic partition since it is not based on hypotheses or assumptions on the system under study. Polarization and transfer effects taking place during a chemical reaction and identified through the REF, produce a quite detailed picture on the electronic activity driving the reaction.

3. Computational Methods

To study the HAT step from dopamine to the copper superoxo complex on the D β M, a representative and reduced model of the active site of D β M was employed. This model has been used previously by Solomon and co-workers^{13,18,46,47} to examine the full mechanism of monooxygenases. The cluster model describes the superoxo copper complex on the D β M, built up including three amino acids (His412, His414, and Met487) linked to the Cu_M . Initial structures of amino acids were obtained from Protein Data Bank PDB-4ZEL,⁴⁸ and the whole system including the aminoacids, the copper atom, an oxygen molecule and dopamine was fully optimized at the B3LYP/6-311g(d,p) level theory using Gaussian 16 soft-

ware package.^{49–51} The B3LYP functional has been widely used to describe the mechanism of binuclear copper monooxygenases,^{13,15,21,52} copper metalloenzymes,⁴⁶ and synthetic copper complexes,^{14,47,53–55} generating reliable outcomes of geometry and energy computations that agree with experimental data.^{20,46,56} To evaluate the effect of dispersion we have performed calculations using D3 method⁵⁷ at the three key points along the reaction coordinate these are reactants, transition state and product, quite small changes in the activation and reaction energies were observed.

In this research, two possible mechanisms for the HAT reaction will be considered, in which the conformations of dopamine facing the superoxo complex are displayed in Figure 2. Although, both reactions lead to the same dopamine radical as an intermediate, which through subsequent steps will lead to the R norepinephrine enantiomer, in **R1**, dopamine and the superoxo copper complex are not bonded whereas in **R2** there is a hydrogen bond connecting them. To analyze the REF, the dopamine-superoxo complex was virtually divided into two fragments, as indicated in Figure 2. Counterpoise calculations,^{43–45} were then performed to determine the flux on each fragment along ξ keeping the geometry previously determined in the IRC calculation.^{23–25} As REF is a global property that rationalizes the whole electronic activity taking place along the reaction, at this point, it is not possible to identify places on the molecular topology in which the chemical events are actively driving the whole reaction. However the information provides by REF will be crucial to characterize the reaction mechanism. Also, over the geometry determined in the IRC calculation, the REF total profile was studied using the PCM model⁵⁸ ($\epsilon=4.0$)^{13,21} to mimic the protein medium but only minor changes were observed compared with the gas phase profile.

On the other hand, the stability of the wavefunction was checked at key points on the reaction coordinate to ensure that the wavefunction remains a triplet having an eigenvalue of $\langle S^2 \rangle = 2.0$.

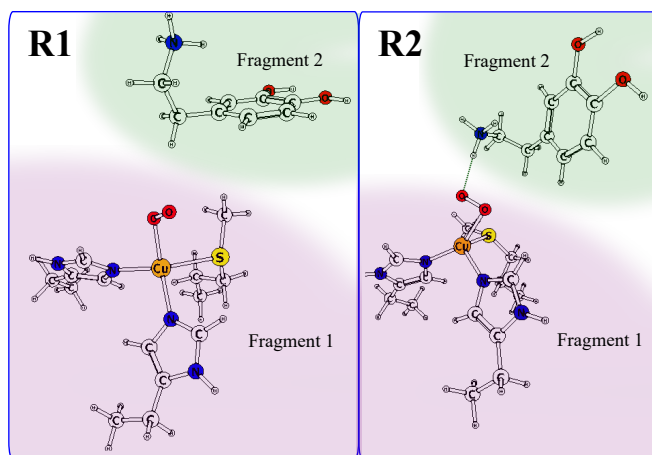


Figure 2: Two dopamine conformations interacting with copper superoxo complex on D β M, in **R1** there is no bonding interaction, in **R2** a hydrogen bond between the two species is formed

4. Results and Discussion

Energy profiles together with activation and reaction energies for **R1** and **R2** are displayed in Figure 3. Activation energy indicates that **R2** appears to be the most probable HAT mechanism. Alternatively, using empirical dispersion through D3 method,⁵⁷ the activation and reaction energy decrease only 2.07 and 1.12 kcal/mol in **R1** respectively, and increase 0.86 and 1.91 kcal/mol in **R2** respectively. These results show that dispersion effects are not playing a significant role in the HAT reaction. According to these results, the hydrogen bond dopamine-superoxo in **R2** should be responsible for the decrease of $\Delta E^\ddagger$ with respect to **R1**. It is interesting to note that activation and reaction energies are lowered by about the same amount due to the action of the hydrogen bond present in **R2**. Another interesting observation is the narrowness of the transition state region, this means that energy barriers are mainly determined by structural reordering that takes place before the electronic activity starts to emerge.^{5,59} Also, due to the shape of the energy profiles,⁶⁰ the possibility of HAT by tunneling was evaluated. The WKB approximation was used for a rough estimation of the probability of tunnelling using the formula:^{61,62} $P(E) = e^{-\pi^2 w \sqrt{2m(V_0 - E)}/h}$, where w is the barrier width, m the reduced mass on the vibration mode of the imaginary frequency of

the TS, V_0 is the potential barrier, E is the potential energy along the reaction path and h is the Planck's constant. To obtain the barrier width, the IRC was computed in non-mass-weight cartesian coordinates using units of length of Bohr. The probability of tunneling was estimated at ξ_1 for both reactions. In **R1**, the corresponding energy value at ξ_1 is 24.56 kcal/mol and the tunneling probability is 1.71×10^{-7} ; in **R2**, the tunneling probability at ξ_1 with energy 24.66 kcal/mol, is 2.09×10^{-2} . We observe a higher probability of tunneling for **R2** at ξ_1 , due to lesser width and a smaller ($V_0 - E$) difference at this point.

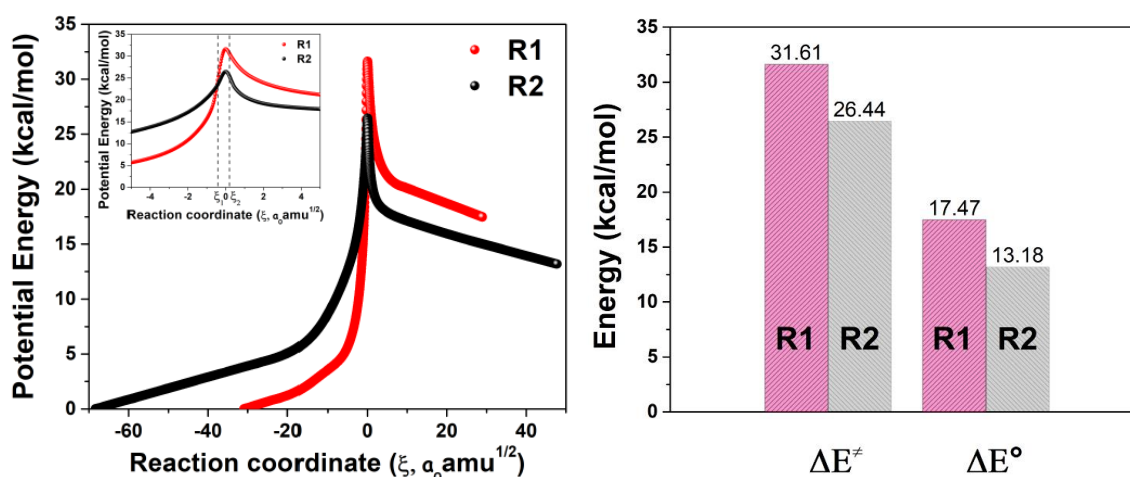


Figure 3: Potential energy profiles, activation and reaction energies for the two HAT reactions. Vertical dashed lines in the inset indicates the borders of the reaction regions defined from the reaction force analysis.

To understand differences in the electronic activity that conduct the mechanism of both reactions, the physical decomposition of REF was analyzed considering the fragmentation of the system given in Figure 2.

4.1 Polarization flux: Figure 4, top panels, show the profiles of polarization fluxes for the supermolecule and for the two fragments in reactions **R1** and **R2**, respectively. Total polarization flux J_p , in red curves, displays two distinctive positive peaks, the first one observed in the reactant region with lower intensity than the second peak that starts to develop in the TS region with a maximum entering the product region. This behavior is

observed in both reactions, the main difference between these polarization fluxes is observed in the intensity of the peaks, being larger in **R1** than in **R2**. A closer view to the fragment contributions to $J_p(\xi)$ shows that the first peak is clearly due to polarization of fragment 1 (superoxo complex) showed in purple curve, polarization of fragment 2 (dopamine) is practically zero in this region (green curve). The second peak is due to a combination of polarization of both fragments, with a larger contribution of fragment 2, especially in **R2**. In summary, the first peak evidences the polarization of the copper superoxo complex before the hydrogen atom is transferred from dopamine. Visualizing the chemical structure of the complexes at the first maximum of $J_p(\xi)$, it can be observed a transient hydrogen bond between the hydrogen of $C\beta$ of dopamine and the distal oxygen of superoxo copper, this could be at the origin of the polarization in the superoxo moiety, and it is illustrated through non-covalent interaction display in Figure 5. In this region, the copper superoxo increases the angle Cu-O-O to capture the hydrogen atom from dopamine, as a consequence of this structural distortion, the electronic distributions of copper complex and dopamine get distorted thus causing the polarization. Therefore, the source of polarization of the first peak of the REF is most probably due to the geometric distortion in the copper superoxo complex. The second peak of $J_p(\xi)$ reveals polarization on both fragments when the hydrogen atom has been transferred, at this point, polarization is larger in dopamine where $C\beta$ becomes a radical carbon. A second transient hydrogen bond after HAT (Figure 5) between the hydrogen of the newly formed copper hydroperoxo and the $C\beta$ might be producing significant polarization on dopamine.

In both reactions, polarization of copper superoxo complex takes place before the HAT while polarization in dopamine emerges after the HAT. It is important to mention that polarization flux can perfectly identify and separate two main events: 1) polarization of the superoxo complex which takes place before the hydrogen is transferred, it comes along with the activation of the reaction; 2) polarization of dopamine occurs when the hydrogen has already been transferred, and it takes place in the relaxation process.

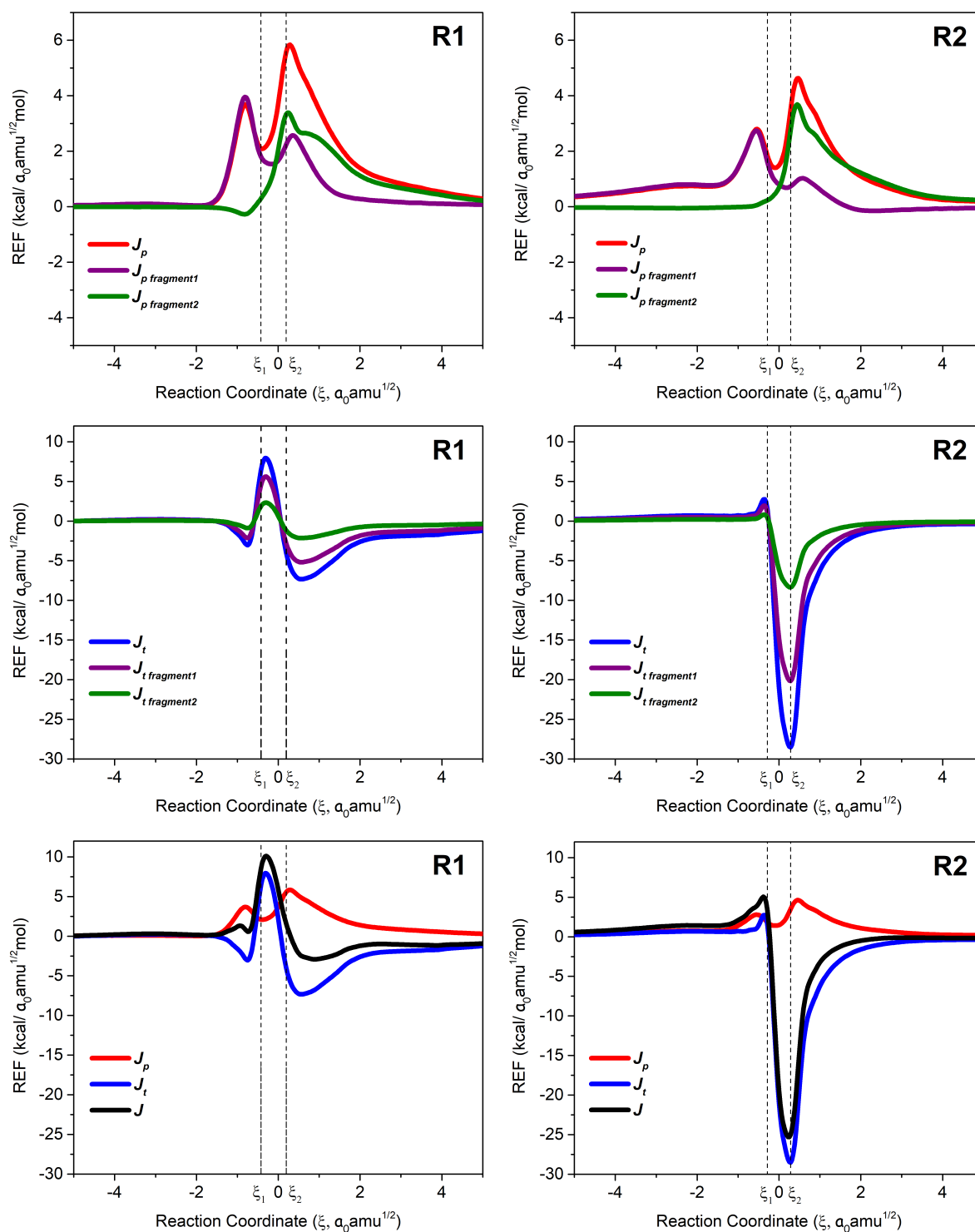
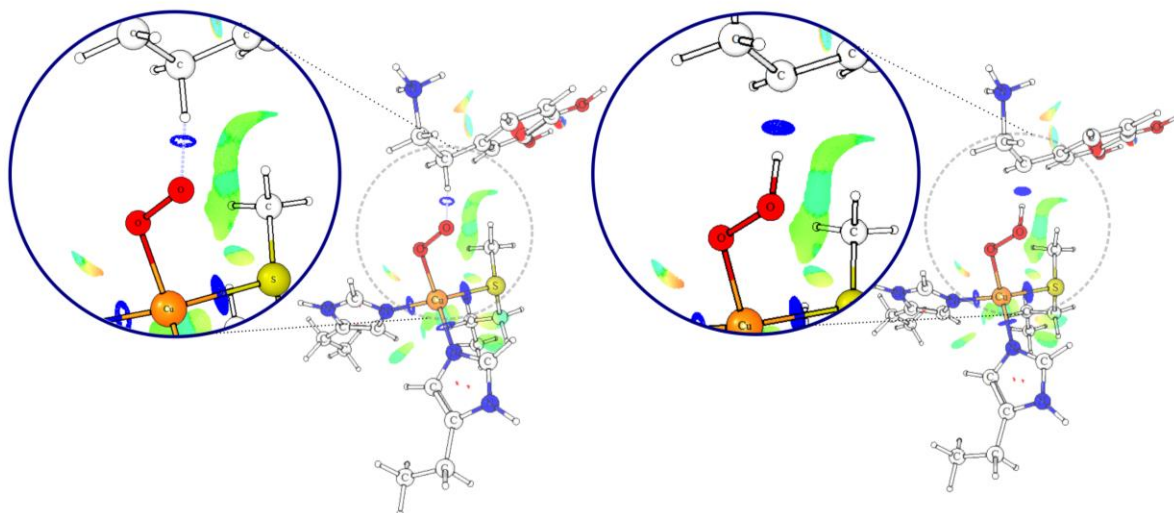


Figure 4: Polarization, transfer and total reaction electronic fluxes for the supermolecule and two fragments in **R1** and **R2**. Vertical dashed lines indicate the borders of the reaction regions obtained from the reaction for analysis.

R1

Before HAT

After HAT

**R2**

Before HAT

After HAT

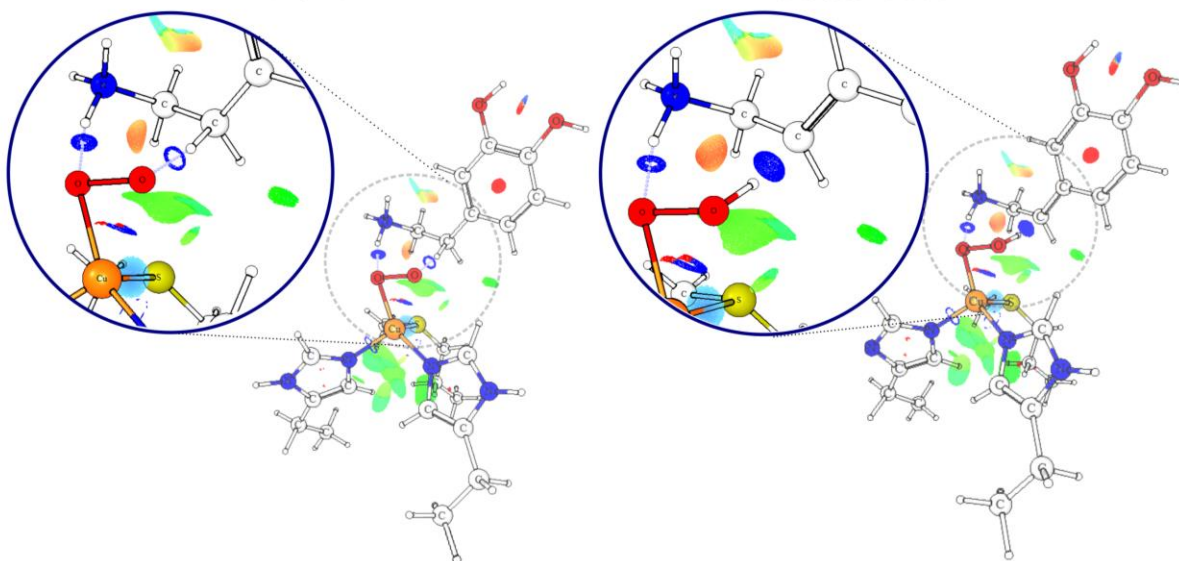


Figure 5: Non-covalent interactions at the reaction coordinate of the two maximums of J_p in R1 and R2. On the left, it is visualized the first maximum of J_p before HAT and the right side shows the second maximum of J_p after HAT.

4.2 Electron transfer flux: Figure 4, middle panels, display the transfer flux along ξ for the supermolecule and for the two fragments of **R1** and **R2** respectively. First, it should be noticed that the intensity of the peaks of $J_t(\xi)$ is larger than that associated to $J_p(\xi)$, suggesting that electron transfer is the main process that drives both reactions. However, electronic transfer activity occurs almost exactly in between the two polarization peaks already described. Transfer flux for the supermolecule in **R1**, blue curve, shows one main characteristic positive peak in the TS region, enfolded by two negative peaks located in the reactant and the product regions. All peaks bear the signature of the two fragments, with a larger contribution due to the copper superoxo complex, purple curve. It is interesting to note that the transfer flux of **R2** is opposite to that of **R1**. In **R2**, the transfer flux of the supermolecule presents two characteristic peaks, a low intensity positive peak leaving reactant region and a high intensity negative peak in the TS reaching its minimum at ξ_2 , the activated products. Both peaks are contributed by both fragments but mainly by copper superoxo complex, as in **R1**. Therefore, it can be safely concluded that the difference in the mechanism of both reactions is due to the transfer flux.

4.3 Total reaction electronic flux: Figure 4, bottom panels, display the total physical partition of the REF. Polarization flux in red curve, hits its maximum values at the reactant and product regions; in the first one it activates the reaction while in the second one it support the relaxation process. In both reactions, the total REF (black curves) is mainly determined by electronic transfer effects with a complementary opposite behavior of $J_p(\xi)$ and $J_t(\xi)$.

In summary, $J(\xi)$ is governed by the transfer flux, although polarization flux plays an important role in activation and relaxation processes. Polarization and transfer fluxes were identified and associated to specific moieties of the system, they may have an opposite behavior, making the total REF fluctuate from positive to negative values, thus indicating that

electronic activity might switch from spontaneous to non spontaneous chemical events all along the reaction coordinate.

5. Conclusions

The electronic activity of the key step of the reaction converting dopamine into norepinephrine catalyzed by a representative model of the D β M was studied using the reaction electronic flux. Polarization and transfer contributions were identified and associated to specific moieties of the system. It has been found that polarization effects takes place mostly at the reactant and products regions whereas electron transfer effects were found mainly localized at the TS regions. The polarization in the superoxo complex take place before the HAT, as part of the activation process, whereas polarization in dopamine appears after the hydrogen atom has been transferred, as part of the relaxation process. On the other hand, transfer fluxes showed opposite behavior, indicating that the difference in the two mechanisms analyzed is due to electron transfer effects that occur mainly within the transition state region. Summing up, it has been shown that the reaction electronic flux allows one to get a detailed view of the electronic activity that drives these very complicated reactions, it indicates that polarization effects prepare the reaction in the reactant region, then electronic transfer, the main effect driving both reactions, takes over to produce the new chemical species and finally, polarization pushes the relaxation process to the products of the reactions.

Acknowledgement

The authors thank the financial support from VRI-PUC, and ANID (Chile) through project FONDECYT N° 1181072.

References

- (1) Cerón, M. L.; Echegaray, E.; Gutiérrez-Oliva, S.; Herrera, B.; Toro-Labbé, A. The reaction electronic flux in chemical reactions. *Sci. China Chem.* **2011**, *54*, 1982–1988.
- (2) Vogt-Geisse, S.; Toro-Labbé, A. Chemical potential and reaction electronic flux in symmetry controlled reactions. *J. Comput. Chem.* **2016**, *37*, 1794–1800.
- (3) Echegaray, E.; Toro-Labbé, A. Reaction electronic flux: A new concept to get insights into reaction mechanisms. Study of model symmetric nucleophilic substitutions. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 11801–11807.
- (4) Vogt-Geisse, S.; Toro-Labbé, A. The mechanism of the interstellar isomerization reaction $\text{HOC}^+ \rightarrow \text{HCO}^+$ catalyzed by H_2 : New Insights from the reaction electronic flux. *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*, 244308.
- (5) Duarte, F.; Toro-Labbé, A. The mechanism of H_2 activation by (amino)carbenes. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 3050–3059.
- (6) Inostroza-Rivera, R.; Herrera, B.; Toro-Labbé, A. Using the reaction force and the reaction electronic flux on the proton transfer of formamide derived systems. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 14489–14495.
- (7) Durán, R.; Vöhringer-Martinez, E.; Toro-Labbé, A.; Herrera, B. Reaction electronic flux and its role in DNA intramolecular proton transfers. *J. Mol. Model.* **2016**, *22*, 1–10.
- (8) Cortés-Arriagada, D.; Gutiérrez-Oliva, S.; Herrera, B.; Soto, K.; Toro-Labbé, A. The mechanism of chemisorption of hydrogen atom on graphene: Insights from the reaction force and reaction electronic flux. *J. Chem. Phys.* **2014**, *141*, 134701.
- (9) Ortega-Moo, C.; Durán, R.; Herrera, B.; Gutiérrez-Oliva, S.; Toro-Labbé, A.; Var-

- gas, R. Study of antiradical mechanisms with dihydroxybenzenes using reaction force and reaction electronic flux. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 14512–14519.
- (10) Hernández Mancera, J. P.; Núñez-Zarur, F.; Gutiérrez-Oliva, S.; Toro-Labbé, A.; Vivas-Reyes, R. Diels-Alder reaction mechanisms of substituted chiral anthracene: A theoretical study based on the reaction force and reaction electronic flux. *J. Comput. Chem.* **2020**, *41*, 2022–2032.
- (11) Villegas-Escobar, N.; Poater, A.; Solà, M.; Schaefer, H. F.; Toro-Labbé, A. Decomposition of the electronic activity in competing [5,6] and [6,6] cycloaddition reactions between C60 and cyclopentadiene. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 5039–5048.
- (12) Gutiérrez-Oliva, S.; Díaz, S.; Toro-Labbé, A. In *Chemical Reactivity in Confined Systems: Theory, Modelling and Applications*, first edit ed.; Chattaraj, P. K., Chakraborty, D., Eds.; John Wiley & Sons Ltd., 2021; pp 1–448.
- (13) Cowley, R. E.; Tian, L.; Solomon, E. I. Mechanism of O₂ activation and substrate hydroxylation in noncoupled binuclear copper monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2016**, *113*, 12035–12040.
- (14) Bhadra, M.; Transue, W. J.; Lim, H.; Cowley, R. E.; Lee, J. Y. C.; Siegler, M. A.; Josephs, P.; Henkel, G.; Lerch, M.; Schindler, S.; Neuba, A.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Solomon, E. I.; Karlin, K. D. A thioether-ligated cupric superoxide model with hydrogen atom abstraction reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 3707–3713.
- (15) Wu, P.; Fan, F.; Song, J.; Peng, W.; Liu, J.; Li, C.; Cao, Z.; Wang, B. Theory demonstrated a “coupled” mechanism for O₂ activation and substrate hydroxylation by binuclear copper monooxygenases. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 19776–19789.
- (16) Vendelboe, T. V.; Harris, P.; Zhao, Y.; Walter, T. S.; Harlos, K.; El Omari, K.; Christensen, H. E. M. The crystal structure of human dopamine β -hydroxylase at 2.9 Å resolution. *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1500980.

- (17) Solomon, E. I. Dioxygen binding, activation, and reduction to H₂O by Cu enzymes. *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 6364–6375.
- (18) Solomon, E. I.; Ginsbach, J. W.; Heppner, D. E.; Kieber-Emmons, M. T.; Kjaergaard, C. H.; Smeets, P. J.; Tian, L.; Woertink, J. S. Copper dioxygen (bio)inorganic chemistry. *Faraday Discuss.* **2011**, *148*, 11–39.
- (19) Klinman, J. P. The copper-enzyme family of dopamine β -monooxygenase and peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase: Resolving the chemical pathway for substrate hydroxylation. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 3013–3016.
- (20) Prigge, S. T.; Eipper, B. A.; Mains, R. E.; Amzel, L. M. Dioxygen binds end-on to mononuclear copper in a precatalytic enzyme complex. *Science* **2004**, *304*, 864–867.
- (21) Chen, P.; Bell, J.; Eipper, B. A.; Solomon, E. I. Oxygen activation by the noncoupled binuclear copper site in peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase. Spectroscopic definition of the resting sites and the putative Cu^{II}_M-OOH intermediate. *Biochemistry* **2004**, *43*, 5735–5747.
- (22) Beliaev, A.; Ferreira, H.; Learmonth, D. A.; Soares-da Silva, P. Dopamine β -Monooxygenase: Mechanism, substrates and inhibitors. *Curr. Enzyme Inhib.* **2009**, *5*, 27–43.
- (23) Fukui, K. The path of chemical reactions - The IRC approach. *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14*, 363–368.
- (24) Hratchian, H. P.; Schlegel, H. B. Accurate reaction paths using a Hessian based predictor-corrector integrator. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 9918–9924.
- (25) Hratchian, H. P.; Schlegel, H. B. Using Hessian updating to increase the efficiency of a Hessian based predictor-corrector reaction path following method. *J. Chem. Theory Comput.* **2005**, *1*, 61–69.

- (26) Toro-Labbé, A. Characterization of chemical reactions from the profiles of energy, chemical potential, and hardness. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 4398–4403.
- (27) Durán, R.; Herrera, B. Theoretical study of the mechanism of catalytic enantioselective N-H and O-H insertion reactions. *J. Phys. Chem. A* **2020**, *124*, 2–11.
- (28) Martínez-Araya, J. I.; Quijada, R.; Toro-Labbé, A. The mechanism of ethylene polymerization reaction catalyzed by group IVB metallocenes. A rational analysis through the use of reaction force. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 21318–21325.
- (29) Martínez, J.; Toro-Labbé, A. The reaction force. A scalar property to characterize reaction mechanisms. *J. Math. Chem.* **2009**, *45*, 911–927.
- (30) Politzer, P.; Toro-Labbé, A.; Gutiérrez-Oliva, S.; Murray, J. S. *Advances in Quantum Chemistry*; Academic Press, 2012; Vol. 64; pp 189–209.
- (31) Herrera, B.; Toro-Labbé, A. The role of reaction force and chemical potential in characterizing the mechanism of double proton transfer in the adenine-uracil complex. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 5921–5926.
- (32) Villegas-Escobar, N.; Schaefer, H. F.; Toro-Labbé, A. Formation of formic acid derivatives through activation and hydroboration of CO₂ by low-valent group 14 (Si, Ge, Sn, Pb) catalysts. *J. Phys. Chem. A* **2020**, *124*, 1121–1133.
- (33) Rincón, E.; Jaque, P.; Toro-Labbé, A. Reaction force analysis of the effect of Mg(II) on the 1,3 intramolecular hydrogen transfer in thymine. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 9478–9485.
- (34) Guzmán-Angel, D.; Gutiérrez-Oliva, S.; Toro-Labbé, A. Hydrogenation and hydration of carbon dioxide: a detailed characterization of the reaction mechanisms based on the reaction force and reaction electronic flux analyses. *J. Mol. Model.* **2019**, *25*, 1–10.

- (35) Geerlings, P.; De Proft, F.; Langenaeker, W. Conceptual Density Functional Theory. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1793–1874.
- (36) Parr, R. G.; Donnelly, R. A.; Levy, M.; Palke, W. E. Electronegativity: The density functional viewpoint. *J. Chem. Phys.* **2003**, *68*, 3801–3807.
- (37) Parr, R. G.; Yang, W. *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*; Oxford University Press, USA, 1994.
- (38) Koopmans, T. Über die zuordnung von wellenfunktionen und eigenwerten zu den einzelnen elektronen eines atoms. *Physica* **1934**, *1*, 104–113.
- (39) Villegas-Escobar, N.; Larsen (née Vilhelmsen), M. H.; Gutiérrez-Oliva, S.; Hashmi, A. S. K.; Toro-Labbé, A. Double gold activation of 1-ethynyl-2-(phenylethynyl)benzene toward 5-exo-dig and 6-endo-dig cyclization reactions. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 13360–13368.
- (40) Matute, R. A.; Pérez, P.; Chamorro, E.; Villegas-Escobar, N.; Cortés-Arriagada, D.; Herrera, B.; Gutiérrez-Oliva, S.; Toro-Labbé, A. Reaction electronic flux perspective on the mechanism of the zimmerman Di- π -methane rearrangement. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 5969–5974.
- (41) Gutiérrez-Oliva, S.; Forero-Girón, A. C.; Villegas-Escobar, N.; Toro-Labbé, A. *Conceptual Density Functional Theory*; Editor Shubin Liu. John Wiley & Sons, Ltd, 2022; Chapter 23, pp 463–479.
- (42) Giri, S.; Echegaray, E.; Ayers, P. W.; Nuñez, A. S.; Lund, F.; Toro-Labbé, A. Insights into the mechanism of an SN2 reaction from the reaction force and the reaction electronic flux. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 10015–10026.
- (43) Boys, S. F.; Bernardi, F. The calculation of small molecular interactions by the dif-

- ferences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. *Mol. Phys.* **1970**, *19*, 553–566.
- (44) Simon, S.; Duran, M.; Dannenberg, J. J. How does basis set superposition error change the potential surfaces for hydrogen-bonded dimers? *J. Chem. Phys.* **1996**, *105*, 11024–11031.
- (45) Foresman, J. B.; Frisch, A. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*, 3rd ed.; Gaussian Inc. Wallingford CT, 2015.
- (46) Solomon, E. I.; Heppner, D. E.; Johnston, E. M.; Ginsbach, J. W.; Cirera, J.; Qayyum, M.; Kieber-Emmons, M. T.; Kjaergaard, C. H.; Hadt, R. G.; Tian, L. Copper active sites in biology. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 3659–3853.
- (47) Chen, P.; Solomon, E. I. Oxygen activation by the noncoupled binuclear copper site in Peptidylglycine α -Hydroxylating Monooxygenase. Reaction mechanism and role of the noncoupled nature of the active site. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4991–5000.
- (48) Vendelboe, T. V.; Harris, P.; Christensen, H. E. M.; Harlos, K.; Walter, T. S.; Zhao, Y.; El Omari, K. RCSB The Protein Data Bank PDB - 4ZEL: Human dopamine beta-hydroxylase. 2016; 10.2210/pdb4ZEL/pdb.
- (49) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. a.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. a.; Nakatsuji, H.; et al., Gaussian 16, Revision C.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT. 2016.
- (50) Dennington, R.; Keith, T. A.; Millam, J. M. GaussView, Version 6.1; Semichem Inc.: Shawnee Mission, KS. 2016.
- (51) Glendening, E. D.; Reed, A. E.; Carpenter, J. E.; Weinhold, F. NBO Version 3.1.

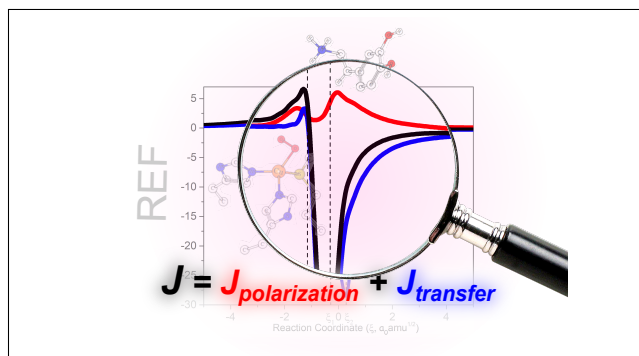
- (52) Wu, P.; Zhang, J.; Chen, Q.; Peng, W.; Wang, B. Theoretical perspective on mononuclear copper-oxygen mediated C–H and O–H activations: A comparison between biological and synthetic systems. *Chin. J. Catal.* **2022**, *43*, 913–927.
- (53) Cowley, R. E.; Cirera, J.; Qayyum, M. F.; Rokhsana, D.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Dooley, D. M.; Solomon, E. I. Structure of the reduced copper active site in preprocessed Galactose Oxidase: Ligand tuning for one-electron O₂ Activation in Cofactor Biogenesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 13219–13229.
- (54) Dereli, B.; Momeni, M. R.; Cramer, C. J. Density functional modeling of ligand effects on electronic structure and C–H Bond activation activity of copper(III) hydroxide compounds. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 9807–9813.
- (55) Tabuchi, K.; Ertem, M. Z.; Sugimoto, H.; Kunishita, A.; Tano, T.; Fujieda, N.; Cramer, C. J.; Itoh, S. Reactions of copper(II)-phenol systems with O₂: Models for TPQ biosynthesis in copper amine oxidases. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 1633–1647.
- (56) Reedy, B. J.; Blackburn, N. J. Preparation and characterization of half-apo Dopamine-β-hydroxylase by selective removal of CuA. Identification of a sulfur ligand at the dioxygen binding site by EXAFS and FTIR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1924–1931.
- (57) Grimme, S.; Antony, J.; Ehrlich, S.; Krieg, H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H–Pu. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 154104.
- (58) Jacopo Tomasi,; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999–3093.
- (59) Ortega, D. E.; Gutiérrez-Oliva, S.; Tantillo, D. J.; Toro-Labbé, A. A detailed analysis of the mechanism of a carbocationic triple shift rearrangement. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 9771–9779.

(60) Meisner, J.; Kästner, J. Atom tunneling in chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5400–5413.

(61) Zhu, Y.; Yang, X.; Yu, F.; Wang, R.; Chen, Q.; Zhang, Z.; Wang, Z. Quantum tunneling of hydrogen atom transfer affects mandrel degradation in inertial confinement fusion target fabrication. *iScience* **2022**, *25*, 103674.

(62) Nunes, C. M.; Reva, I.; Fausto, R. *Tunnelling in Molecules: Nuclear Quantum Effects from Bio to Physical Chemistry*; The Royal Society of Chemistry, 2021; pp 1–60.

Graphical TOC Entry



How Dopamine Converts into Norepinephrine? Insights on the key step of the Reaction

Angie Carolay Forero-Girón and Alejandro Toro-Labbé *

Laboratorio de Química Teórica Computacional (QTC), Facultad de Química y de Farmacia,
Pontificia Universidad Católica de Chile, Avenida Vicuña Mackenna 4860, Santiago de Chile

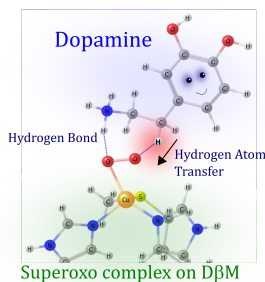
*E-mail for A.T.L.: atola@uc.cl

Abstract

Dopamine β -monooxygenase ($D\beta M$) is an essential enzyme in the organism that regioselectively converts dopamine into norepinephrine, the key step of the reaction, studied in this paper, is an hydrogen atom transfer (HAT) from dopamine to a superoxo complex on $D\beta M$, forming a hydroperoxo intermediate and dopamine radical. It was found that the formation of a hydrogen bond between dopamine and the $D\beta M$ catalyst strengthens the substrate-enzyme interaction and facilitates the HAT which takes place selectively to give the desired enantiomeric form of the product. Four reactions leading to the hydroperoxo intermediate were analyzed using theoretical and computational tools in order to identify the most probable reaction mechanism. The reaction force analysis has been used to demonstrate that the nature of the activation energy is mostly structural and largely due to the initial approach of species in order to get closer to each other to facilitate the hydrogen abstraction. On the other hand, the reaction electronic flux revealed that electronic activity that drives the reactions is triggered by polarization effects and, in the most probable reaction among the four studied, it takes place in a concerted and non-spontaneous way. Chemical events driving the reaction have been identified and the energy they take or deliver was quantified in detail.

Graphical Table of Contents

The preferred conformation of dopamine to interact with the copper superoxo complex on $D\beta M$ is studied in order to research the variation of the energy on the hydrogen atom transfer step in the relevant conversion of dopamine into norepinephrine.



1 Introduction

Binuclear copper monooxygenases (BCM) are a class of copper-containing oxygen-activating enzymes involved in the stereospecific hydroxylation of physiologically important compounds^[1]. Among the BCMs, peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase (PHM), dopamine β -monooxygenase (D β M) and tyramine β -monooxygenase (T β M) present two non-coupled copper atoms in their catalytic core^[1,2]. Dopamine β -monooxygenase or dopamine β -hydroxylase is a crucial BCM enzyme that catalyzes the conversion of dopamine into norepinephrine, which is a physiological hydroxylation reaction (see Figure [1](#)). Norepinephrine, or noradrenaline, is a derivative of dopamine that functions as a hormone or a neurotransmitter. Natural release of norepinephrine is minimum at rest and it rises during wakefulness, but its maximum is attained during stress or danger^[3,4]. Since irregularities in the levels of dopamine and norepinephrine are associated with neurological diseases^[5-7], it is important to know how the hydroxylation of dopamine takes place identifying specific interactions that drive the process. Controlling such important physiological reaction to maintain the right level of norepinephrine would represent a milestone in the way to defeat depression, anxiety and stress disorders.

Enzyme D β M is characterized by an active site that consists of two copper domains^[8] known as Cu_H and Cu_M (see Figure [2](#)). It is believed that the Cu_M site binds the molecular oxygen and dopamine, and Cu_H site acts as the electron relay. The long distance between the copper atoms of each domain results in the absence of electronic and magnetic coupling among them^[9], although recent studies

have shown that D β M could form a coupled structure where the two copper atom would be closer to each other^{[10][11]}. Vendelboe reported the crystal structure of human D β M^[11] putting in evidence two conformations of the catalytic core: the first one consisting of two copper domains separated by about 12 Å (open conformation) and a second conformation in which the distance between the copper atoms is about 5 Å (closed conformation), the author suggested that copper domains switch from one conformation to the other following a kind of flip-flop conversion^[11].

Different mechanisms based on experimental and/or computational information, concerning the catalytic cycle of the hydroxylation of dopamine by D β M have been proposed. At the beginning, there were a general agreement that two ascorbate molecules reduce anaerobically the two sites of copper from Cu^{II} to Cu^I^{[12][14]}. Then, both molecular oxygen and substrate enter in the active site to form a Cu-O₂ species. Amzel and co-workers^[15] trapped a precatalytic complex for PHM, where the x-ray crystal structure reveals the dioxygen binds to Cu_M adopting an end-on geometry, and with the substrate near to the Cu_M. Later, Solomon and co-workers demonstrate that a copper end-on superoxo species, EPR silent^[2], would be activated to capture a hydrogen atom from substrate^{[16][17]}, although spectroscopy and computational studies in models complexes suggest that other activated dioxygen species such as hydroperoxo, oxyl and peroxo could also be able to capture hydrogen^[18]. Despite of the vast kinetic, spectroscopy and structure data on BCMs, there are few evidence of the subsequent intermediaries species in the reaction mechanism, most probably due to experimental difficulties in their characterization^[19] and the lack of reliable crystallographic structures^{[20][21]}. This makes difficult to know with accuracy what chemical substances are associated to each step of the reaction. In this context, theoretical studies^{[10][17]} have proposed mechanisms, that are consistent with the experimental data available so far.

The latest two theoretical mechanisms were proposed by Solomon in 2016,^[22] for a non-coupled mechanism, and by Wang in 2019^[10], for a coupled mechanism. Both models agree in the initial formation of a triplet Cu-superoxo species^{[15][23][24]} on the enzyme. In the non-coupled mechanism,

Solomon and co-workers carry out Density Functional Theory (DFT) calculations using a model of PHM to demonstrate that hydrogen atom abstraction by copper-superoxo complex occurs from substrate making its C β prone to receive a hydroxyl group to achieve its conversion. On the other hand, Wang and co-workers^[10] propose an alternative mechanism, in which copper-superoxo abstracts an hydrogen atom from ascorbate, thus discarding the HAT from the substrate. This conclusion, is based on DFT calculations, the energy barrier for HAT from ascorbate (10.2 kcal/mol) is lower than that from substrate (26.1-37.5 kcal/mol) and therefore it is more consistent with the available experimental data (~ 14 kcal/mol). In line with the crystallographic results of D β M^[11], Wang and co-workers through QM/MM simulations, demonstrate the conversion from an open conformation of Cu_M^{II}-OOH intermediate into a close conformation of (μ -OOH)Cu(I)Cu(II) species. From this conformation, subsequent binuclear intermediates are responsible by O-O cleavage, HAT from the substrate and final hydroxylation.

Although a coupled mechanism is nowadays the most accepted theory for BCM, it does not support the experimental evidence of Amzel and co-workers^[25], in that the PHM catalytic core is enzymatically active in crystal phase where interdomain motion is not possible. Additionally, there is no experimental evidence of the closeness of ascorbate to the Cu_M site to make the HAT possible. It is worth to mention that the HAT by copper-superoxo complex from substrate is a key step in the conversion mechanism because it determines the chirality of the final product. The question that arises is what would be the preferred conformation of the substrate to interact with the copper-superoxo complex to lead to the product with the right chirality?. In this paper, we intend to find the answer to this question through unveiling the role of the orientation of dopamine with superoxo complex thus elucidating the mechanism of this specific step of HAT in the general reaction converting dopamine into norepinephrine.

To achieve this goal, relatively new theoretical and computational approaches will be used, the reaction force analysis (RFA), providing a framework to characterize the mechanism of chemical

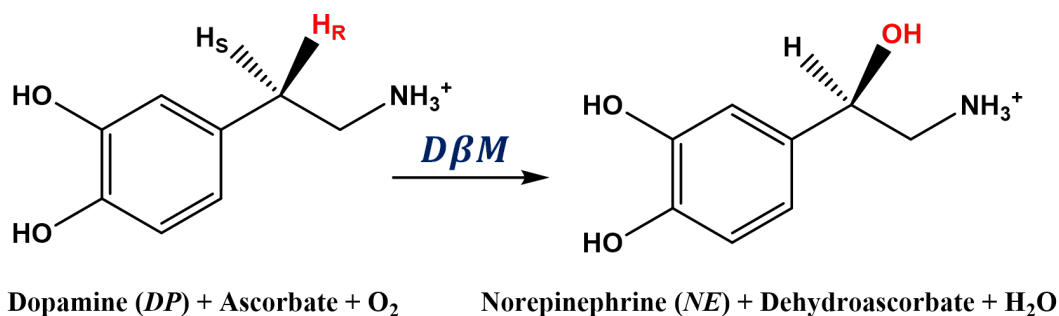


Figure 1: Conversion from dopamine to norepinephrine catalyzed by Dopamine β -monooxygenase. The two hydrogens of $\text{C}\beta$ of dopamine are differentiated with R or S subscripts to show the chirality of the carbon center when a hydrogen is removed.

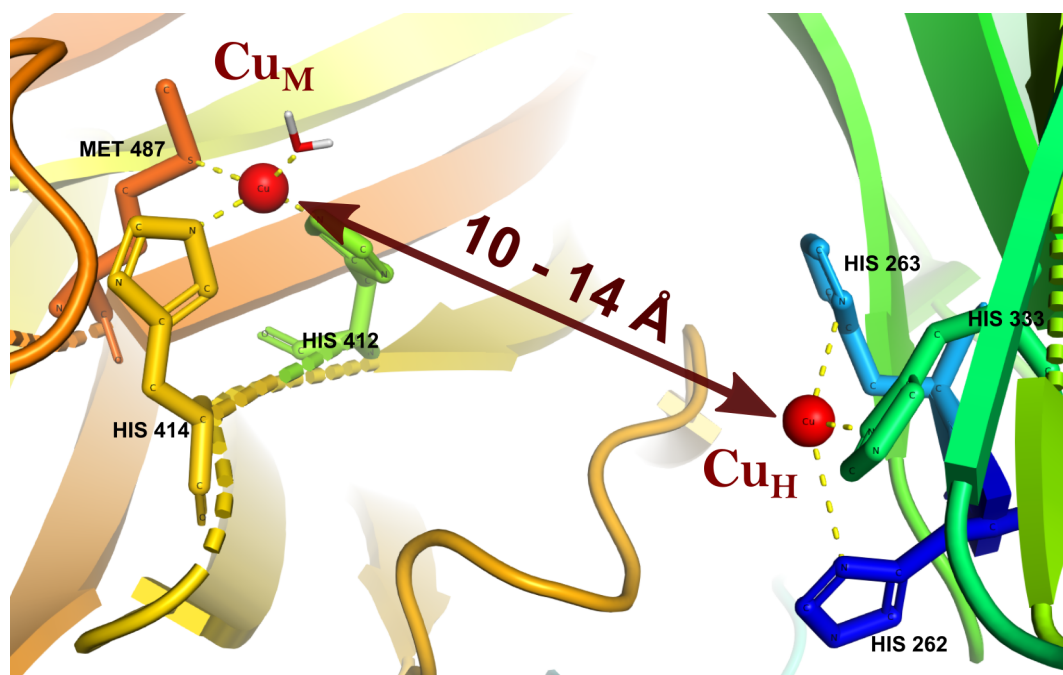


Figure 2: Active site of the noncoupled binuclear copper monooxygenases generated from crystallographic coordinates of D β M (PDB-ID code 4ZEL). The distance between the copper of each domain is ~ 14 Å.

reactions and the physical nature of the activation energy^[26]. On the other hand, the reaction electronic flux (REF)^[27] will be used to characterize the electronic activity taking place during the reaction. These global properties will be complemented with the use of local indicators of electronic activity and interactions such as bond orders and non-covalent interactions descriptors^{[28][29]}.

This work is organized as follows, next Section includes a brief overview of the theoretical procedures used to characterize the reaction under study while Section 3 shows the computational details. Results are given and discussed in Section 4 and in Section 5 our concluding remarks are drawn.

2 Theoretical Background

2.1 Energy and The Reaction Force Analysis

The intrinsic reaction coordinate (IRC) method defines the minimum energy path in going from reactants to products,³⁰⁻³² an energy profile that gives valuable information about thermodynamic and kinetic outcomes of the reaction. The reaction force, defined as the negative of the potential energy variation with respect to the reaction coordinate ξ , complement this information by providing useful insights about the mechanisms of chemical reactions³³⁻⁴².

$$F(\xi) = -\frac{dE(\xi)}{d\xi} \quad (1)$$

Figure 3 shows generic energy and reaction force profiles for a one-step reaction featuring one transition state along ξ . The most striking result that emerges from the RFA is the rational partition of the reaction coordinate into three significant regions whose boundaries are defined by the critical points of $F(\xi)$. These regions are: the reactant region (RR), $\xi_R \leq \xi < \xi_1$; transition state region (TSR), $\xi_1 \leq \xi \leq \xi_2$; and product regions (PR), $\xi_2 < \xi \leq \xi_P$. For multi-step reactions more reaction regions will emerge, for example, a n -step reaction will have $(2n+1)$ reaction regions with n transition state, $(n-1)$ intermediate regions, plus the reactant and product regions²⁶⁻³⁴⁻³⁸⁻⁴³.

It has been observed in many reactions that in most cases the reactant region hosts most structural arrangements necessary to activate the reaction³⁸⁻⁴⁰; in contrast to this, TSR is predominantly governed by electronic reordering, most bond breaking and formations necessary to launch the chemical conversion are mostly concentrated within the TSR⁴¹⁻⁴². Moreover, it is conceptually appealing to consider the TSR region as a sequence of transient unstable states, in agreement with Polanyi and Zewail ideas⁴⁴⁻⁴⁵. In fact the transition state region hosts activated reactants and products, which are unstable species that appear and disappear promoting the reaction in one sense or

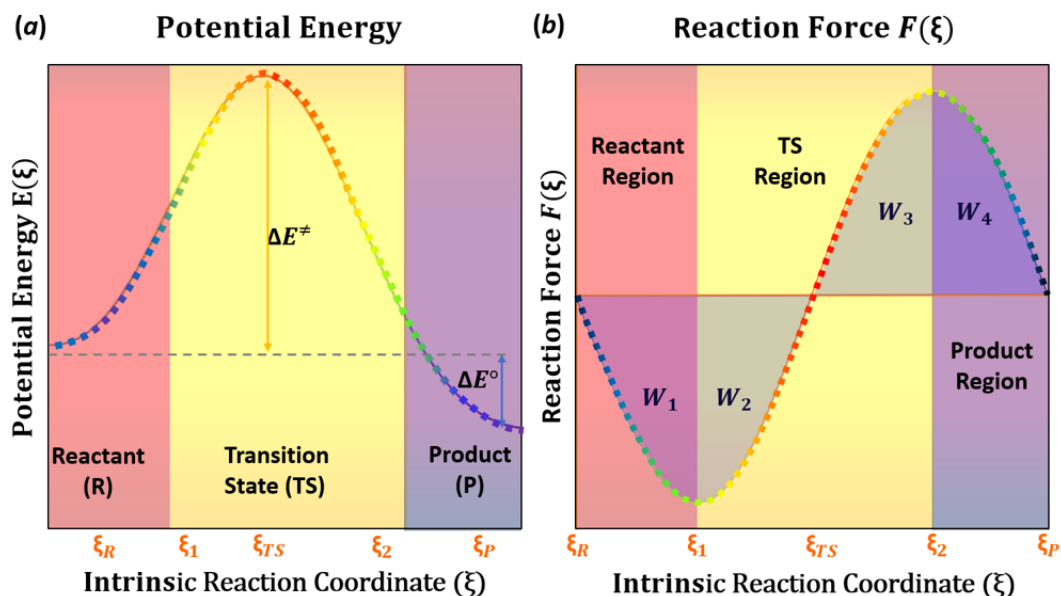


Figure 3: Generic profiles of energy (a) and reaction force (b) for an arbitrary one-step reaction. Two critical points (ξ_1 and ξ_2) in RF delimit the reaction regions

another. On the other hand, the product region is highly controlled by structural relaxations to reach the product of the reaction^{46,47}. A chemical reaction can be understood in terms of chemical events that drive the whole chemical process within each reaction region all along the reaction coordinate. Primary chemical events are bond forming/breaking processes and they take place mainly within the TS region; secondary chemical events are bond strengthening/weakening processes whereas tertiary events are non-covalent interactions that are present in any chemical reaction. Secondary and tertiary events may take place all along ξ .

Significantly, the numerical value of the definite integral of RF in any interval along ξ will provide information about the energy associated to specific chemical events that might be driving the reaction within those intervals, the reaction works are defined as⁴⁸:

$$W_i = - \int_{\xi_i}^{\xi_i + \delta\xi} F(\xi) d\xi, \quad (2)$$

Therefore, it is possible to quantify the energetic expenditure of specific chemical events taking place anywhere along the reaction coordinate. In particular, and with the aim of providing a natural partition of activation and reaction energies, reaction works W_1, W_2, W_3 and W_4 , consistent with the

already defined reaction region, are defined:

$$W_1 = - \int_{\xi_R}^{\xi_1} F(\xi) d\xi > 0; \quad W_2 = - \int_{\xi_1}^{\xi_0} F(\xi) d\xi > 0; \quad (3)$$

$$W_3 = - \int_{\xi_0}^{\xi_2} F(\xi) d\xi < 0; \quad W_4 = - \int_{\xi_2}^{\xi_P} F(\xi) d\xi < 0 \quad (4)$$

Note that the TSR has been subdivided at the transition state (ξ_0) giving rise to W_2 and W_3 , to be consistent with the definition of activation energy. Since W_1 y W_4 are defined within the reactant and product regions, respectively, they mostly account for structural rearrangements; similarly, W_2 and W_3 , defined within the transition state region, essentially are quantifying the energy mostly due to electronic activity^[33, 42, 49, 51]. In this context, the activation and reaction energies are expressed in terms of structural $\{W_1, W_4\}$ and electronic $\{W_2, W_3\}$ reactions works:

$$\begin{aligned} \Delta E^\ddagger &= \int_{\xi_R}^{\xi_0} F(\xi) d\xi = W_1 + W_2 \quad \text{and} \\ \Delta E^\circ &= \int_{\xi_R}^{\xi_P} F(\xi) d\xi = W_1 + W_2 + W_3 + W_4 \end{aligned} \quad (5)$$

Activation and reaction energies can therefore be expressed as a sum of non equilibrium reaction works and Equations (5) could be used to open ways to new characterizations of rate and equilibrium constants. Other choices of reaction works could be determined by the type of the reaction and by specific chemical events taking place at precise intervals along ξ . In summary, RFA provides a useful theoretical framework to characterize the mechanism and energies involved in a chemical reaction and to produce a virtual fragmentation of the reaction coordinate to define regions in which different mechanism might be operating^[33, 42, 47, 50, 52].

2.2 Reaction Electronic Flux (REF)

The reaction electronic flux measures the electronic activity taking place along the reaction coordinate, it is defined as^{27,52,53}:

$$J(\xi) = -\frac{d\mu}{d\xi} \quad (6)$$

where μ is the electronic chemical potential, representing the escaping tendency of electrons from equilibrium^{54,55}. From Conceptual DFT^{54,56}, the electronic chemical potential is defined as:

$$\mu = \left(\frac{dE}{dN} \right)_{v(r)} \approx -\frac{1}{2}(IP + EA) \approx \frac{1}{2}(\epsilon_H + \epsilon_L) \quad (7)$$

where IP, EA, ϵ_H and ϵ_L are ionization potential, electron affinity, energy of the highest occupied molecular orbital (HOMO) and energy of the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) respectively. To obtain the working formulae given in Equation (7) from the differential definition of μ , it is necessary to invoke the finite difference approximation⁵⁶ and the Koopmans theorem⁵⁷.

In this context, the simple knowledge of frontier molecular orbital energies along ξ is enough to get a profile of the chemical potential, $\mu(\xi)$, which produces crucial information about the electronic activity that drives a chemical reaction^{26,46,58}. It has been established that positive values of $J(\xi)$ are associated with spontaneous electronic activity driven by bond strengthening/forming processes whereas, negative values are associated with non-spontaneous electronic activity which is conducted by bond weakening/cleavage processes^{42,58}. In this context chemical events are associated to spontaneous or non-spontaneous processes, therefore, it becomes possible to characterize the nature of the electronic activity that drives the reaction along ξ . To complement the REF results, bond orders are used to identify specific bond processes (forming/cleavage) that might be responsible for the electronic activity evidenced by the REF.

3 Computational Methods

The BCM-oxygen interaction and six HAT reactions were studied using B3LYP level of theory with 6-311g(d,p) basis set. This level of theory has been used to correctly calculate the geometry, energy, and total spin of copper superoxo intermediates in BCM, moreover, it has been reported that the weak covalence of the Cu-O bond is well described with a mix of 20% of HF exchange^[17,19]. Computations were performed using the Gaussian 16 software package^[59,60]. Initial structures of Cu_M, the catalytic site of the enzyme, was built based on crystallographic coordinates of Protein Data Bank PDB-ID code 4ZEL^[61]. The copper atom was manually added using Gauss View^[62]. The cluster approach for modeling the D β M active site includes a first-shell of amino acids linked to the copper in the Cu_M domain (His412, His414, and Met487)^[63,64] and dopamine as substrate. Figures were drawn using Pymol^[65] and Chemcraft programs^[66]. To keep the overall shape of the Cu_M site and to avoid steric hindrance effects of the protein matrix, the position of the α -carbon of each amino acid residue was fixed. On the other hand, to mimic the electrostatic polarization effects of the surrounding protein media, the polarizable continuum model (PCM)^[67] was used in the two reactions that lead to the right enantiomeric form of the product. The interaction of O₂ with BCM to form the superoxo complex was studied calculating the Gibbs free energy for the two conformation of O₂ in front of copper, *end-on* and *side-on* coordinations, as shown in Figure 4. The HAT from dopamine to superoxo complex (Cu_M²⁺ O₂^{•-}) was then studied using two dopamine conformations as displayed in Figure 5, thus leading to a total of four reactions. In the first conformation, there is no bonding interaction between dopamine and the superoxo species (Figure 5a); in the second conformation there is a hydrogen bond between the amine group of dopamine and the terminal oxygen of superoxo (Figure 5b).

Figure 6 shows a scheme of the general reaction of hydrogen atom transfer from dopamine to copper (II) superoxo complex. It can be observed from the reactant of Figure 6 that it is possible to perform two different HAT reactions from C β of dopamine, the abstraction of hydrogens H_S or H_R

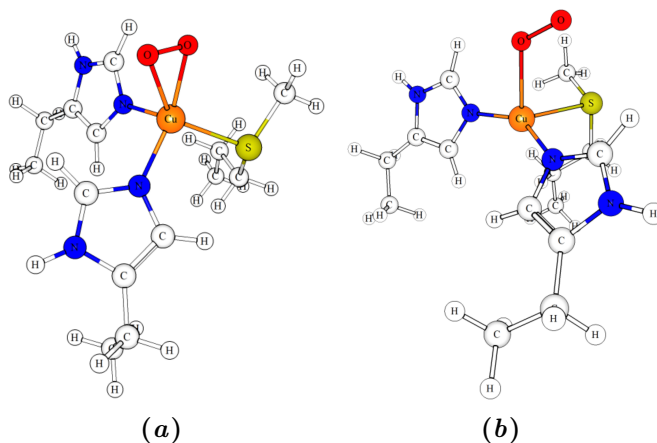


Figure 4: Chemical structures for the *side-on* (a) and *end-on* (b) incorporation of O₂ to the copper site on DβM.

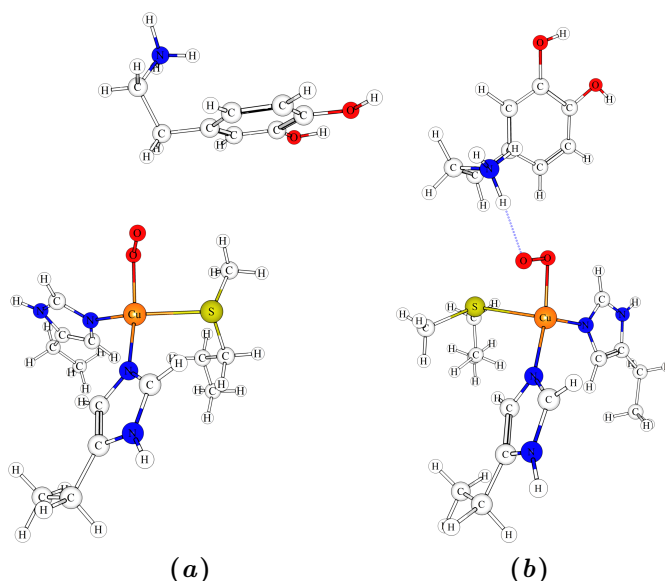


Figure 5: Chemical structures for two dopamine conformations interacting with superoxo complex (a) no bonded interactions (b) with a hydrogen bond between both species.

will lead, after subsequent steps, to the formation of the S or R enantiomer of norepinephrine. In each conformation of dopamine, the two possible HAT (see Figure 6) were studied, this leads to four reactions, named **R1**, **R2**, **R3** and **R4**. In **R1** (**R3**) and **R2** (**R4**) the H_R (H_S) hydrogen atom is transferred from dopamine in the (a) and (b) conformation, respectively. These four HAT reactions were studied in gas phase and in a second step, the two reactions leading to the right enantiomeric form of the product were modeled in a protein medium using PCM, with dielectric constant $\epsilon = 4.0$ ^{17,68}.

Energy profiles for the six reactions were obtained through the IRC methodology, all transition

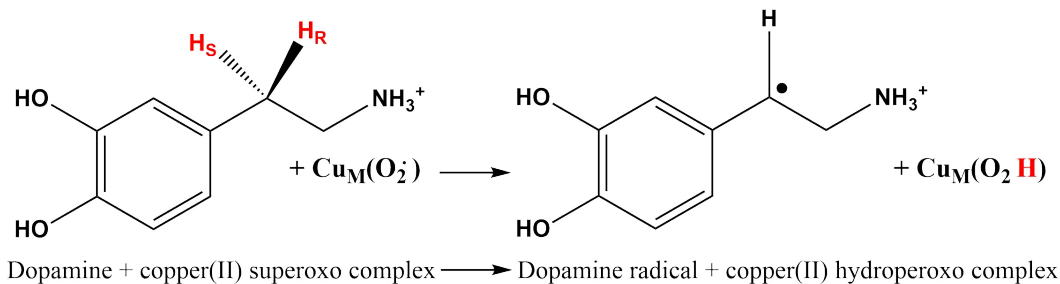


Figure 6: Reaction of hydrogen atom transfer from dopamine to copper (II) superoxo complex to form dopamine radical and copper (II) hydroperoxo complex. For the sake of clarity, the two hydrogens on $C\beta$ of dopamine are differentiated with the R or S subscripts.

states were characterized to have a unique negative frequency and IRC procedure was confirmed with independent optimizations of reactant and products. Non-covalent interactions (NCI) were performed using the NCI-plot software to understand the kind of interactions between substrate and Cu_M site²⁹.

4 Results and Discussion

The initial structure of the Cu_M site is a tetrahedral complex consisting of two histidines, one methionine and one water molecule (see Figure 2). Our optimized geometry is in complete agreement with the X-ray emission and absorption spectroscopy data of BCM^{64,69}. The Cu-X distances (X = S or N from ligands) are consistent with extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) reported for $D\beta M$ ⁶³ and a weak and flexible Cu-S bond is observed along the reactions as was previously reported^{70,71}. In this section, we will analyze the oxygen bonding on Cu_M and four possible HAT reactions from dopamine to the catalytic site. First of all, the BCM- O_2 interaction will be briefly discussed in terms of the Gibbs free energy for both, *end-on* and *side-on*, coordinations.

4.1 The Oxygenation of BCM

The first step of the hydroxylation mechanism of dopamine is the BCM oxygenation producing a superoxo species and giving the catalytic site a nucleophilic character. Bonding between O_2 and the copper atom Cu_M^{1+} belonging to the $D\beta M$ catalyst can be achieved in either an *end-on* or a

side-on coordinations^[15], the oxygen-binding induces electronic transfer from Cu(I) to O₂ forming a σ bond between copper and oxygen giving rise to Cu(II)-superoxo complex (Cu_M²⁺ O₂^{•-}). It has been found that the *end-on* isomer was favored by $\Delta G^\circ = 11.54$ kcal/mol and $\Delta G^\circ = 17.53$ kcal/mol over the *side-on* coordination in both, gas phase and protein media, respectively, these results are in good agreement with other active site model for BCM^[17]. On the other hand, the multiplicity of the resulting *end-on* complex is consistent with other enzymes of this family^{[10][17]}, with a triplet ground state (Cu_M²⁺ O₂^{•-}). The Cu-O-O angle in the (Cu_M²⁺ O₂^{•-}) complex was 119° and the O-O bond distance 1.24 Å, this result is perfectly consistent with the available superoxide experimental data on these enzymes^{[15][72]}.

4.2 Hydrogen Atom Transfer

After the O₂ addition, the resulting superoxide species activates the HAT from dopamine generating the copper(II)-hydroperoxo (Cu_M²⁺ OOH) and dopamine radical (Dp[•]) as intermediates of reaction, this step in the conversion of dopamine is the one that determines the position of the hydroxyl group on the product because of the *R* or *S* hydrogen abstraction. On the other hand, the initial dopamine conformation, with or without H-bond to catalyst, Figure 7, will determine the energetic of the reaction, we have found that a hydrogen bond between the hydrogen of amine group in dopamine and the proximal oxygen in superoxide species reduces the HAT energetic barrier, making clear that conformation of the amino group on dopamine to allow the formation of the H-bond, plays an important role in the lowering of activation energies of HAT reactions. This is in agreement with the observation that DβM may catalyze other reactions involving compounds which have, as dopamine, a basic phenylethylamine skeleton that facilitates the formation of a hydrogen bond with the (Cu_M²⁺ O₂^{•-}) moiety of the enzyme^[73]. Also, a H-bond between dopamine radical and the copper(II)-hydroperoxo will facilitate the next step, a rebound of the Cβ of dopamine in the hydroperoxo moiety.

In summary, we have evaluated four HAT reactions considering two initial conformations of dopamine interacting with the $(\text{Cu}_M^{2+} \text{O}_2^{\bullet-})$, with or without H-bonding interaction between dopamine and superoxo. To each conformation, two HAT reactions are reported involving the transfer of H_S or H_R . To illustrate the specific interactions that are driving the HAT reactions, Figure 7 displays the transition state of **R2** where the hydrogen bond between the two species and the hydrogen atom transferred from β -carbon of dopamine are explicitly shown. It can be noted that the abstraction of the hydrogen atom from $\text{C}\beta$ in dopamine involves a number of structural arrangements that take place concertedly. As shown in Section 4.2.5, changes in the $\text{N-C}\alpha\text{-C}\beta\text{-C}\gamma$ dihedral angle and in Cu-O-O bending angle are quite important and produce a cooperative effect for the hydrogen transfer.

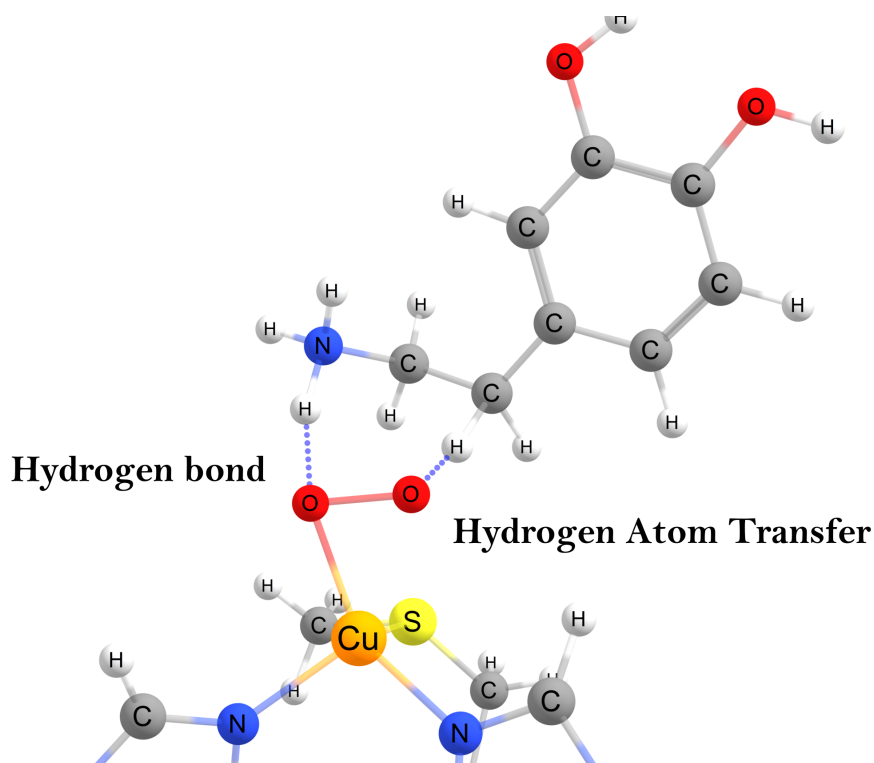


Figure 7: Transition state of **R2** where there are two bonding interactions between dopamine and the $(\text{Cu}_M^{2+} \text{O}_2^{\bullet-})$ complex: hydrogen bond between the proximal oxygen of superoxo and a hydrogen of the amine of dopamine, and a hydrogen atom transfer of β -carbon of dopamine

4.2.1 Potential Energy and Reaction Force Profiles: Figure 8 displays energy and reaction force profiles for the four reactions under study. Each reaction leads to an intermediate dopamine radical which through subsequent steps will lead to R or S norepinephrine enantiomer. **R1** and **R2** may lead to R-norepinephrine while **R3** and **R4** produce the S-enantiomer. Experimentally⁷⁴⁻⁷⁸, the

Table 1: Energetic data for the hydrogen atom transfer reactions from dopamine in gas phase and protein medium. Reaction works in protein medium are given in parenthesis for **R1** and **R2**. All values are in kcal/ ξ mol

Method		Reactions			
		R1	R2	R3	R4
$\Delta E^\ddagger$	Gas phase	31.61	26.44	32.35	29.16
	Protein media	30.29	28.46		
$\Delta G^\ddagger$	Gas phase	30.40	25.23	29.98	28.98
	Protein media	28.21	25.84		
ΔE°	Gas phase	17.47	13.18	19.13	14.11
	Protein media	15.91	14.51		
ΔG°	Gas phase	15.80	11.72	15.29	14.48
	Protein media	14.92	12.77		
RFA		$W_1=24.56$ (23.45)	$W_1=24.66$ (26.59)	$W_1=26.66$	$W_1=27.49$
		$W_2=7.05$ (6.84)	$W_2=1.78$ (1.87)	$W_2=5.69$	$W_2=1.67$
		$W_3=-1.00$ (-1.49)	$W_3=-1.91$ (-2.13)	$W_3=-0.93$	$W_3=-3.05$
		$W_4=-13.14$ (-12.89)	$W_4=-11.35$ (-11.82)	$W_4=-12.29$	$W_4=-12.00$

only known product formed is R-norepinephrine, so only **R1** and **R2** lead to the observed product, although they do it through two different mechanisms that will be analyzed in the next paragraphs. At this point, and looking at the energy data displayed in Table 1, **R2** appear to be the most probable mechanism of hydroxylation because of its lower energy barrier for HAT with respect to **R1**. The calculated energetic barrier in **R2**, 26.44 kcal/mol is in line with previous theoretical estimations (22 – 38 kcal/mol)^{10,17}.

Table 1 summarizes energetic data for the four reactions in gas phase, and for the two reactions leading to the R product, in protein medium. The highest energy barriers were found in reaction **R1** and **R3**, the ones in which the reactants are not H-bonded and the lowest energy barriers were for **R2** and **R4** that form a hydrogen bond between the oxygen of the catalytic site and the amine group of dopamine. In all reactions, a ternary complex is formed between the enzyme, oxygen and dopamine, indicating a ternary binding mechanism of these two substrates, in agreement with the result of ^{18}O kinetic isotope effects (KIEs) for D β M^{79,80} and with previous DFT calculations^{116,22}. The values of $\Delta G^\ddagger$ and ΔG° present the same trends observed in $\Delta E^\ddagger$ and ΔE° indicating that entropic effects are very small.

The above discussed calculations for **R1** and **R2** were replicated in protein medium, only small changes in activation and reaction energies were observed. It should be noted that in all cases

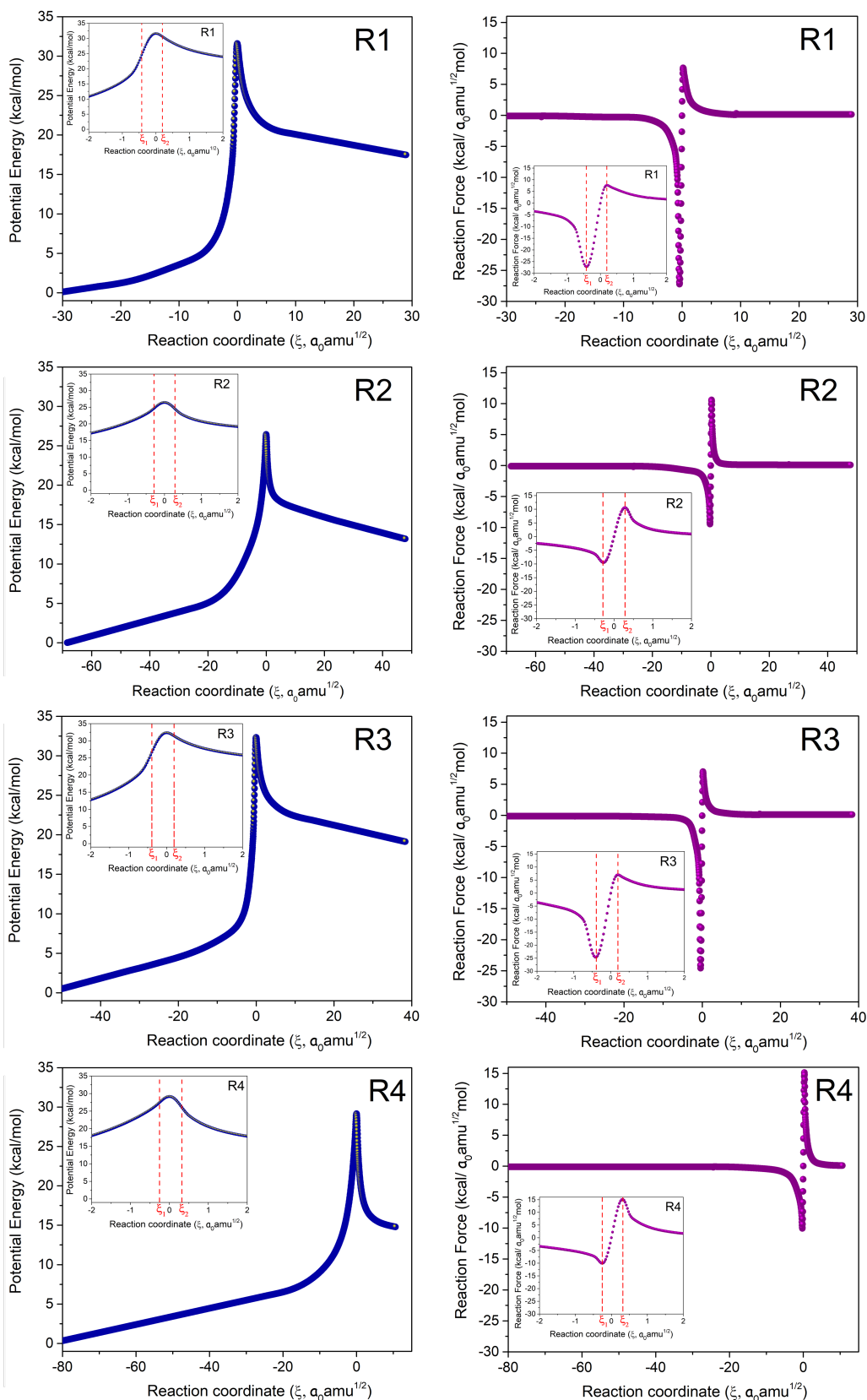


Figure 8: Potential energy and reaction force profiles of four HAT reactions in gas phase. The insets display an amplified view of the transition state regions that spans the interval $\xi_1 = -0.422$ to $\xi_2 = 0.195$ in **R1**; $\xi_1 = -0.285$ to $\xi_2 = 0.285$ in **R2**; $\xi_1 = -0.390$ to $\xi_2 = 0.195$ in **R3** and $\xi_1 = -0.254$ to $\xi_2 = 0.318$ in **R4**.

activation energy is mainly due to structural rearrangements, in all reactions; W_1 represents at least near 80% of the activation energy, and accounts for translation and structural distortion of dopamine and superoxo complex to facilitate the interaction.

Mechanistically the reactions pairs $\{\mathbf{R1}, \mathbf{R3}\}$ and $\{\mathbf{R2}, \mathbf{R4}\}$ have a similar behavior. Structural energy in the first pair is about 80% while in the second one is more than 92% of the activation energy; the value of structural work W_1 in all reactions is quite similar ($\sim 24\text{-}27$ kcal/mol). However, $\mathbf{R2}$ and $\mathbf{R4}$ present considerable lower electronic work W_2 to reach the TS than $\mathbf{R1}$ and $\mathbf{R3}$. On the light of these results, it is clear that the catalytic effect of the hydrogen bond dopamine-superoxo mainly acts on the electronic energy W_2 producing a significant reduction of this quantity. On the other hand, it is interesting to note that similar energetic results for the two HAT reactions in each pair $\{\mathbf{R1}, \mathbf{R3}\}$ and $\{\mathbf{R2}, \mathbf{R4}\}$ reveals the reaction equivalence of the R or S transferred hydrogens.

It should be pointed out that steep profiles in all reactions indicate a coupled process of proton and electron transfer, instead of a separated process, the four reactions present the same qualitative shape of energy and reaction force profiles, although in $\mathbf{R1}$ and $\mathbf{R3}$, as well as in $\mathbf{R2}$ and $\mathbf{R4}$, the profiles are more similar one to each other in consistency with the fact that they proceed through the same reaction mechanism. In $\mathbf{R1}$ and $\mathbf{R3}$ energy increases monotonically until reaching a point in which the rate of energy change increases rapidly and sharply. In $\mathbf{R2}$ and $\mathbf{R4}$ the energy change goes smoothly until reaching the transition state. In all four cases the transition state region is very narrow (see Figure 8) thus explaining the structural nature of the activation energy, the electronic activity within this region is very intense with bond forming and breaking processes and identifying a large number of transient conformation pushing to reach the transition state, in agreement with the view of Polanyi and Zewail on chemical reactions^{44,45}.

In summary, although all four reactions present a similar qualitative behavior, only two of them ($\mathbf{R1}$ and $\mathbf{R2}$) lead to the right product according with Solomon mechanism¹⁷, so from here on we will discuss results for these two reactions.

4.2.2 Structural Deformation of the Reactants: To understand the influence of the initial conformation of dopamine in the outcome of the reaction, it is necessary to analyze structural changes when going from reactants to the activated reactant, at ξ_1 . At this point of the reaction, the activated reactant has undergone structural reorganization from the reactant itself and it is ready for electronic activity; the energy spent in this process is the reaction work W_1 .

Structural changes of activated reactants from reactants for **R1** and **R2** are mainly three: *i*) translation of dopamine to get close to the superoxo complex; *ii*) the internal rotation of the ethyleneamine group in dopamine, represented by the change of the $C\gamma-C\beta-C\alpha-N$ dihedral angle, to expose one hydrogen atom to be near the superoxo complex and *iii*) the bending of $O-H-C\beta$, and $Cu-O-O$ angles. This structural reordering is mainly responsible for W_1 . In **R2**, initially the oxygen atom of superoxide involved in the hydrogen bond is not coordinated with the copper, when the dopamine gets closer to the superoxo complex, a rearrangement of the oxygen atom coordinated to copper occurs. The oxygen atom, involved in the hydrogen bond, coordinates to the copper atom while the second oxygen atom gets away from the copper atom and starts to participate in the HAT. Then, dopamine creates a steric hindrance in superoxo complex that restricts the normal opening of the $Cu-O-O$ angle, additionally the activated reactant is structurally stabilized by a seven member ring between dopamine and superoxo complex (see Figure 7), this is due to the hydrogen bond in the dopamine initial conformation. This ring decreases the degrees of freedom and a stiffness condition is maintained by dopamine forming a plane between $C\alpha-C\beta-C\gamma$ that promotes the HAT, facilitates the formation of the dopamine radical and triggers the hybridization change on $C\beta$ from sp^3 to sp^2 . In the TS region the HAT starts to develop, involving the rupture of C-H bond in dopamine and the strengthening and formation of the O-H bond in the superoxo complex. The different structural reordering for **R2** with respect to **R1** make easier the rupture of C-H bond thus decreasing the electronic work W_2 . In the product regions structural relaxation allows formation of dopamine radical and copper(II)- hydroperoxo ($Cu_M^{2+} OOH$).

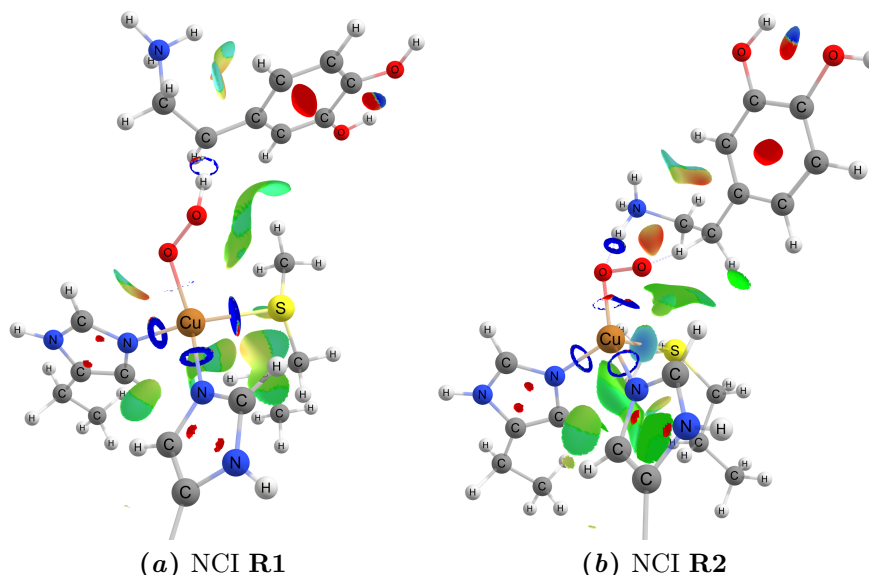


Figure 9: Non-covalent interaction of transition states of the two HAT reactions from dopamine to the superoxo complex. Attractive interactions are represented by blue-green surfaces whereas repulsive ones are represented by red-yellow surfaces.

4.2.3 Non-Covalent Interactions in TS: To better understand the interaction between the two species in the transition state of each reaction, tertiary chemical events have been studied through the analysis of non covalent interactions using the NCIPLOT package by Yang et al.²⁹; Figure 9 displays attractive and repulsive surfaces representing this kind of interactions. Strong non-covalent attractive interaction (in blue) indicating hydrogen bonds is observed in **R2** together with weak repulsive interactions (in orange) in the boundary between dopamine and the $(\text{Cu}_M^{2+} \text{O}_2^{\bullet-})$ complex. Greenish blue regions appearing here and there indicate attractive interactions mostly due to electrostatic interplay among chemical residues. Interestingly, in **R2** a tiny attractive region between Cu and proximal oxygen shows up, this is most probably due to the opening of the Cu-O-O angle. This interaction, which is not seen in any other reaction, may be facilitating the electronic arrangements and could be responsible for the low value of reaction work W_2 to reach the TS, explaining the lower activation energy in **R2** compared to the other reactions.

4.2.4 Reaction Electronic Flux and Bond Orders: To describe the electronic activity during the HAT reactions, the reaction electronic flux was analyzed and complemented with the study of non-covalent interactions and natural bond orders, the latter studies were performed to identify the

chemical events that drive the reactions at different stages of the chemical transformation. Figure 10(a) shows the reaction electronic flux of **R1** and **R1(p)** which corresponds to **R1** taking place in protein media. Electronic activity shows up only within the interval $-2 \leq \xi \leq 2$, besides this interval, no electronic activity has been observed. Initially, REF remains constant and close to zero, the REF value at equilibrium. In **R1** the electronic activity initiates before the activated reactant is reached at ξ_1 and the point where the REF starts to change correlates well with the starting point of variation in the Mayer Bond Order displayed in Figure 10(b). In the reactant region, the approach of the two species polarizes them giving rise to a slight positive peak. Although not shown here, non-covalent interactions present a strong and attractive electrostatic interaction between hydrogen from dopamine with the oxygen atom of superoxo, this is a tertiary event that might be at the origin of the polarization effect accounting for the electronic activity observed in the REF profile roughly within the interval $-1.5 \leq \xi \leq 0.5$. It is interesting to note that at the beginning of the reaction the effect of protein media is negligible, it starts to be important when entering the TS region, although the electronic activity within this region is lower than the one observed in gas media.

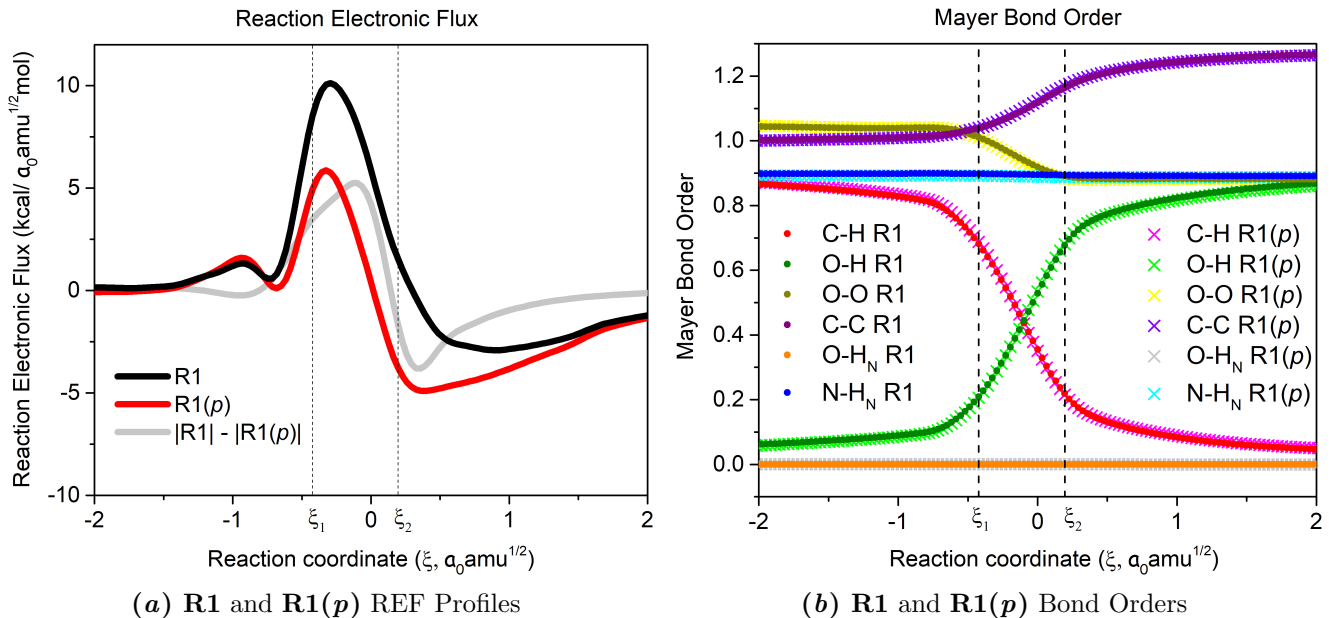


Figure 10: Reaction electronic flux and Mayer Bond Orders profiles for **R1** and **R1(p)**. Note that bond orders for both reactions are superimposed to each other.

After the first peak of the REF, the O-H bond starts to form and simultaneously the C-H bond

weakens. Then two events, the C-H rupture and transfer of the hydrogen atom together with the formation of the O-H bond, could be responsible for the sharp increase of the REF observed in the TS region, where it reaches a maximum. Positive REF indicate that bond formation and/or strengthening processes, primary and secondary chemical events, might be conducting this stage of the whole reaction.

Figure 10(b) shows that the hydrogen from the C β is at midway between dopamine and the superoxo radical, the C β -H bond cleaves while OH bonding develops simultaneously. It is clear that within the TS region the two processes, H abstraction from dopamine and formation of the hydroxyl group in the catalytic site, take place synchronically. Also, it is interesting to observe the simultaneous and opposite change of the O-O and C β -C γ bond orders, this means that hybridization of C β change from sp^3 to sp^2 whereas that on radical oxygen goes from sp^2 to sp^3 , this change is achieved within the product region. The REF drops slightly until reaches a minimum near to ξ_2 and then in the product region, the REF is stabilized at values close to zero.

It is important to stress the fact that the electronic activity of **R1** in gas phase and protein medium is very similar, the difference of the REF profiles became more noticeable within the TS region revealing a different intensity of the main positive peak. It seems that the medium quenches electronic activity although it remains active. On the other hand, since Figure 10(b) shows that the electronic activity at bonds level is the same (the curves for gas phase and protein media are superimposed) the difference in REF must be associated to electronic polarization due to the reaction field imposed by the PCM model.

Figure 11(a) shows the reaction electronic flux for **R2** and **R2(p)**. The REF profile for **R2** displays two distinctive peaks, one positive when starting the TS region and a negative one, when abandoning the TS region. Interestingly, the main peak of REF in **R2** is opposite and notably more intense than the one in **R1**. This confirms that the mechanisms of both reactions are influenced by the conformation of dopamine interacting with the copper superoxo complex, the difference in the REFs

shows that the hydrogen bond between dopamine and superoxo complex is conditioning the electronic activity. The conformation adopted by the reactants to allow the formation of the seven member ring at the transition state produces a spontaneous polarization REF giving rise to a positive peak when leaving the reactant region. Also, the initial opening of the Cu-O-O angle may be at the origin of the observed early change of the O-O bond order that may be contributing to the polarization effect on the REF. Strong repulsive non-covalent interactions between the C α of dopamine and oxygen of superoxo are visualized in Figure 9(b) confirming polarization effects growing as the two species approach to each other.

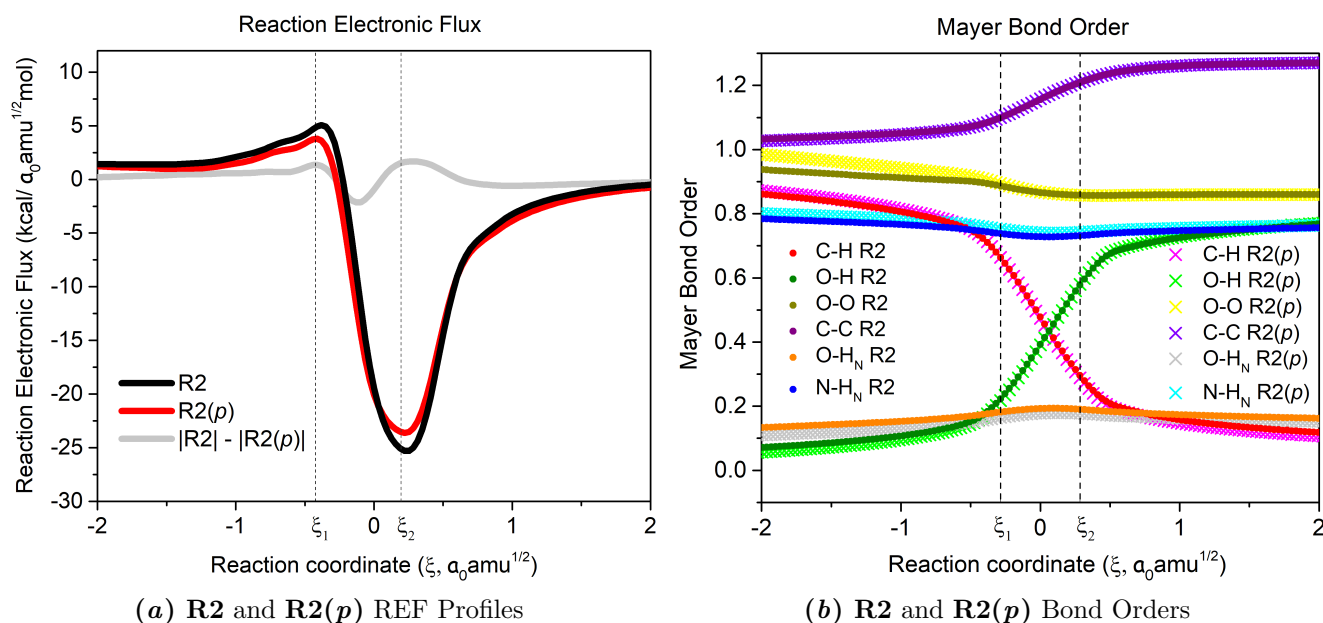


Figure 11: Reaction electronic flux and Mayer Bond Orders profiles for **R2** and **R2(p)**. Bond orders for both reactions appear to be superimposed to each other.

In the TS region, the REF decreases sharply reflecting intense electronic activity, the rupture of the C-H bond and hydrogen abstraction as well as, the decrease in the O-O together with the increase of the C β -C γ bond distances are concertedly acting in this region. In **R2**, O-H_N bond order increases while the N-H_N bond order decreases simultaneously, indicating that the hydrogen bond between the protonated amine and superoxo stabilizes the transition state. Since in **R1** there is no hydrogen bond formation, then, there is no variation of O-H_N and N-H_N bonds. In the products region, the REF increases until it reaches stabilization with near-zero values indicating that electronic activity

fades out to reach the equilibrium state at the products.

Figure 11a also illustrates the REF for the HAT in protein medium. The REF profile in $\mathbf{R2}(p)$ is very similar to that observed in gas phase, differences are only noted due to the magnitude of the peaks. Similarly to $\mathbf{R1}$, no change in the electronic structure is observed, all bond orders profiles are superimposed although a small difference between the O-O bond order within the reactant region can be perceived, see Figure 11(b). Again, the REF difference between both reactions is associated with polarization effects due to the reaction field involves in the PCM model. Comparison of the REFs profiles of $\mathbf{R1}$ and $\mathbf{R2}$ confirms the different mechanism that are operating to produce the chemical change. While $\mathbf{R1}$ is characterized by positive REF based on spontaneous events such as bond formation/strengthening, $\mathbf{R2}$ appears to be conducted by non-spontaneous bond weakening/breaking processes.

4.2.5 More on Chemical Events Driving the Reaction Mechanism of $\mathbf{R2}$: Our results indicate that reaction $\mathbf{R2}$ is the most probable mechanism to produce the active hydroperoxo species that will lead to norepinephrine. The main chemical events that drive $\mathbf{R2}$ involve structural and electronic reordering, the most important structural changes observed are displayed in Figure 12, they include the N-C α -C β -C γ dihedral and the O-O-H angles, as well as, C β -O and O-H distances. It is interesting to notice that structural changes take place at a different scale along ξ , noticeable changes are observed within the interval $-20 \leq \xi \leq 20$, indicating that electronic and structural conversion take place in a uncoupled way.

The first event corresponds to the dopamine getting close to superoxide, this involved noticeable changes in bond angles and distances displayed in Figure 12. The total energy involved in the structural arrangements when going from ξ_R to ξ_1 is W_1 (24.66 kcal/mol). Note that the transferred hydrogen atom starts its way to the oxygen at the very beginning of the reaction, the transfer is completed within the transition state region. Similarly, the C β -O distance (C β from dopamine and oxygen from superoxo) along ξ drops at a similar rate than OH distance until reaching a minimum

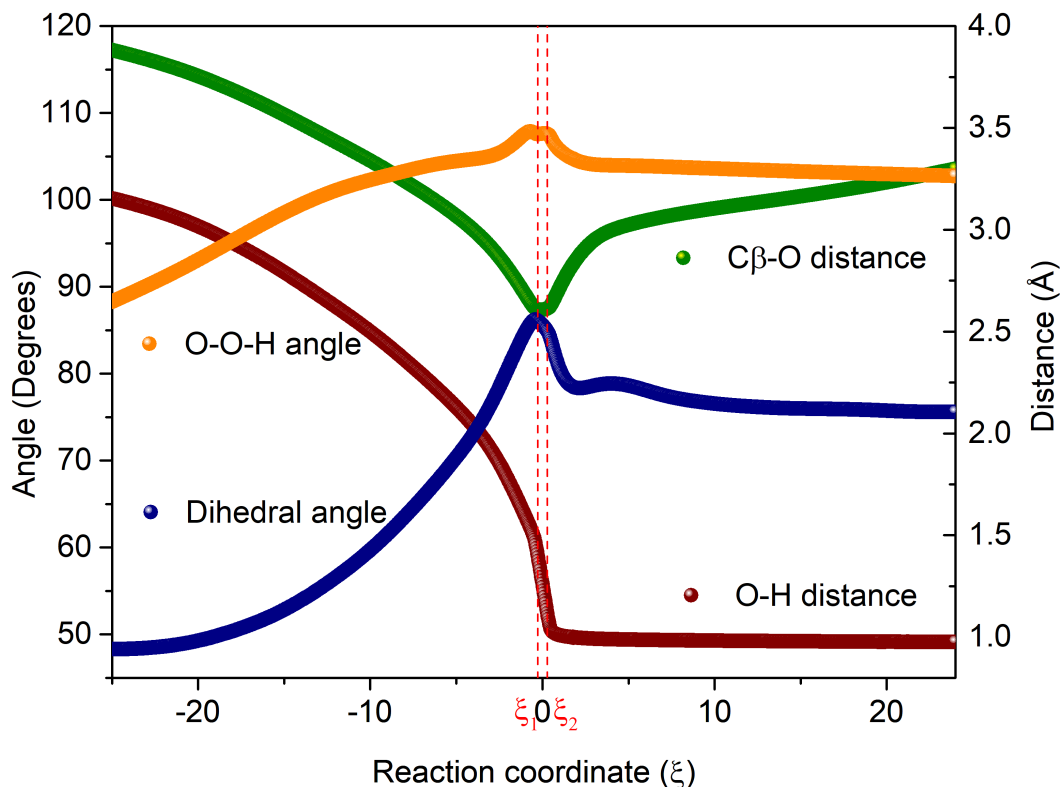


Figure 12: Main structural changes in **R2** along the reaction coordinate.

value at the transition state, once the HAT is achieved it increases to reach the products. The coupled behaviour of these bond distances confirms the cooperative effect that push the hydrogen atom toward the catalytic site.

At the same time dihedral and bond angles also accommodate themselves to facilitate the HAT. The most noticeable change is observed in the dihedral angle that after strong variation within the reactant region and a sharp decrease at the transition state region, it remain quite constant all along the product region. The torsion of this dihedral angle takes ~ 10 kcal/mol of the activation energy.

5 Conclusions

A detailed mechanism of the HAT stage in the hydroxylation mechanism of dopamine has been explained using different theoretical tools. We have found that formation of a hydrogen bond between dopamine and the superoxo complex of D β M enzyme is a key step to activate the hydrogen atom transfer reaction. It has been found that the hydrogen bond facilitates the HAT reaction implying

specifically the H_R hydrogen of dopamine, our mechanism of HAT is in agreement with the general mechanism in BCMs and with the experimental information available^{15,17,73}.

Among the four reactions studied, **R1** and **R3** were energetically more expensive than their equivalent reactions with hydrogen bonded reactants, only **R1** and **R2** lead to the desired product, the other two lead to the wrong enantiomer, which is not produced by the enzyme, moreover the most favorable reaction kinetically and thermodynamically was **R2**. This reaction takes place in a concerted process, where the hydrogen bond between protonated dopamine and superoxo complex stabilizes the TS decreasing the energetic barrier.

It was possible to find that the initial hydrogen bond decreases the degrees of freedom of the complex dopamine-superoxo and a stiffness condition emerges facilitating the HAT and promoting the formation of dopamine radical. The energy profiles of the two couples of reactions present a similar trend but with a notable difference in the values of activation and reaction energies.

In **R1** the electronic activity shows up at about $\xi \sim -1.5$, when the reaction is well advanced and the energy already engaged in the activation process is about 13 kcal/mol. The events that lead the electronic activity depicted in two positive peaks of the REF profile, are spontaneous bond formation/strengthening process.

In **R2** the reaction electronic flux shows that electronic activity starts to be noticeable at about $\xi \sim -1$ where about 20 kcal/mol have been already engaged in the activation process. A maximum associated to spontaneous polarization processes due to the approach of two species shows up, it is consistent with a decrease in hydrogen bond distance that facilitates a secondary interaction to activate the HAT within the TS region where high electronic activity is observed led by non-spontaneous bond weakening/breaking processes.

Finally, REF profiles of both reactions in protein media were similar to those in gas phase indicating that the difference between them must be attributed to polarization effects imposed by the solvation

model.

The main chemical events in the HAT step of the conversion of dopamine in norepinephrine were described in detail and energetically quantified, it has been found that variation of the N-C α -C β -C γ dihedral angle drives the reaction and is responsible for almost 40% of the activation energy.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgments

The authors wish to thank the financial support from Vicerrectoria de Investigación - Pontificia Universidad Católica de Chile VRI-PUC and Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo ANID (Chile) through project FONDECYT N° 1181072.

References

- [1] Solomon, E. I.; Ginsbach, J. W.; Heppner, D. E.; Kieber-Emmons, M. T.; Kjaergaard, C. H.; Smeets, P. J.; Tian, L.; Woertink, J. S. Copper Dioxygen (Bio)Inorganic Chemistry. *Faraday Discuss.* **2011**, *148*, 11–39.
- [2] Klinman, J. P. The Copper-Enzyme Family of Dopamine β -Monooxygenase and Peptidylglycine α -Hydroxylating Monooxygenase: Resolving the Chemical Pathway for Substrate Hydroxylation. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 3013–3016.
- [3] Sugama, S.; Kakinuma, Y. Noradrenaline as a key neurotransmitter in modulating microglial activation in stress response. *Neurochem. Int.* **2021**, *143*, 104943.
- [4] Southwick, S. M.; Bremner, J. D.; Rasmusson, A.; Morgan, C. A.; Arnsten, A.; Charney, D. S. Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry* **1999**, *46*, 1192–1204.
- [5] Punchaichira, T. J.; Dey, S. K.; Mukhopadhyay, A.; Kundu, S.; Thelma, B. K. Characterization of SNPs in the dopamine- β -hydroxylase gene providing new insights into its structure-function relationship. *Neurogenetics* **2017**, *18*, 155–168.
- [6] González-Lopez, E.; Kawasaki-Imamura, Y.; Zhang, L.; Huang, X.; Koltun, W. A.; Coates, M. D.; Vrana, K. E. A single nucleotide polymorphism in dopamine beta hydroxylase

- (rs6271(C>T)) is over-represented in inflammatory bowel disease patients and reduces circulating enzyme. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0210175.
- [7] Tang, S.; Yao, B.; Li, N.; Lin, S.; Huang, Z. Association of dopamine beta-hydroxylase polymorphisms with Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease and schizophrenia: Evidence based on currently available loci. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *51*, 411–428.
 - [8] Klinman, J. P.; Krueger, M.; Brenner, M.; Edmonds, D. E. Evidence for two copper atoms/subunit in dopamine β -monooxygenase catalysis. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 3399–402.
 - [9] Klinman, J. P. Mechanisms Whereby Mononuclear Copper Proteins Functionalize Organic Substrates. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2541–2562.
 - [10] Wu, P.; Fan, F.; Song, J.; Peng, W.; Liu, J.; Li, C.; Cao, Z.; Wang, B. Theory Demonstrated a “Coupled” Mechanism for O₂ Activation and Substrate Hydroxylation by Binuclear Copper Monooxygenases. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 19776–19789.
 - [11] Vendelboe, T. V.; Harris, P.; Zhao, Y.; Walter, T. S.; Harlos, K.; El Omari, K.; Christensen, H. E. M. The crystal structure of human dopamine β -hydroxylase at 2.9 Å resolution. *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1500980.
 - [12] Terland, O.; Flatmark, T. Ascorbate as a natural constituent of chromaffin granules from the bovine adrenal medulla. *FEBS Lett.* **1975**, *59*, 52–56.
 - [13] Ljones, T.; Skotland, T. Evidence from the acceleration of cytochrome c reduction for the formation of ascorbate free radical by dopamine beta monooxygenase. *FEBS Lett.* **1979**, *108*, 25–27.
 - [14] Freeman, J. C.; Villafranca, J. J.; Merkler, D. J. Redox Cycling of Enzyme-Bound Copper during Peptide Amidation. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4923–4924.
 - [15] Prigge, S. T.; Eipper, B. A.; Mains, R. E.; Amzel, L. M. Dioxygen Binds End-On to Mononuclear Copper in a Precatalytic Enzyme Complex. *Science* **2004**, *304*, 864–867.
 - [16] Chen, P.; Solomon, E. I. Oxygen Activation by the Noncoupled Binuclear Copper Site in Peptidylglycine α -Hydroxylating Monooxygenase. Reaction Mechanism and Role of the Noncoupled Nature of the Active Site. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4991–5000.
 - [17] Cowley, R. E.; Tian, L.; Solomon, E. I. Mechanism of O₂ activation and substrate hydroxylation in noncoupled binuclear copper monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 12035–12040.
 - [18] Chen, P.; Fujisawa, K.; Solomon, E. I. Spectroscopic and theoretical studies of mononuclear copper(II) alkyl- and hydroperoxo complexes: Electronic structure contributions to reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10177–10193.
 - [19] Solomon, E. I.; Heppner, D. E.; Johnston, E. M.; Ginsbach, J. W.; Cirera, J.; Qayyum, M.; Kieber-Emmons, M. T.; Kjaergaard, C. H.; Hadt, R. G.; Tian, L. Copper Active Sites in Biology. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 3659–3853.
 - [20] Quist, D. A.; Diaz, D. E.; Liu, J. J.; Karlin, K. D. Activation of dioxygen by copper metalloproteins and insights from model complexes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2017**, *22*, 253–288.
 - [21] Maheshwari, S.; Shimokawa, C.; Rudzka, K.; Kline, C. D.; Eipper, B. A.; Mains, R. E.; Gabelli, S. B.; Blackburn, N.; Amzel, L. M. Effects of copper occupancy on the conformational landscape of peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase. *Commun. Biol.* **2018**, *1*, 74.

- [22] Solomon, E. I. Dioxygen Binding, Activation, and Reduction to H₂O by Cu Enzymes. *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 6364–6375.
- [23] Elwell, C. E.; Gagnon, N. L.; Neisen, B. D.; Dhar, D.; Spaeth, A. D.; Yee, G. M.; Tolman, W. B. Copper–Oxygen Complexes Revisited: Structures, Spectroscopy, and Reactivity. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 2059–2107.
- [24] Osborne, R. L.; Klinman, J. P. *Copper-Oxygen Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2011; pp 1–22.
- [25] Prigge, S. T.; Kolhekar, A. S.; Eipper, B. A.; Mains, R. E.; Mario Amzel, L. Substrate-mediated electron transfer in peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 976–983.
- [26] Herrera, B.; Toro-Labbé, A. The Role of Reaction Force and Chemical Potential in Characterizing the Mechanism of Double Proton Transfer in the Adenine-Uracil Complex. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 5921–5926.
- [27] Echegaray, E.; Toro-Labbé, A. Reaction electronic flux: A new concept to get insights into reaction mechanisms. Study of model symmetric nucleophilic substitutions. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 11801–11807.
- [28] Bridgeman, A. J.; Cavigliasso, G.; Ireland, L. R.; Rothery, J. The Mayer bond order as a tool in inorganic chemistry. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, 2095–2108.
- [29] Contreras-García, J.; Johnson, E. R.; Keinan, S.; Chaudret, R.; Piquemal, J. P.; Beratan, D. N.; Yang, W. NCIPLOT: A program for plotting noncovalent interaction regions. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 625–632.
- [30] Fukui, K. The Path of Chemical Reactions - The IRC Approach. *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14*, 363–368.
- [31] Hratchian, H. P.; Schlegel, H. B. Accurate reaction paths using a Hessian based predictor-corrector integrator. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 9918–9924.
- [32] Hratchian, H. P.; Schlegel, H. B. Using Hessian updating to increase the efficiency of a Hessian based predictor-corrector reaction path following method. *J. Chem. Theory Comput.* **2005**, *1*, 61–69.
- [33] Toro-Labbé, A. Characterization of chemical reactions from the profiles of energy, chemical potential, and hardness. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 4398–4403.
- [34] Martínez-Araya, J. I.; Quijada, R.; Toro-Labbé, A. The mechanism of ethylene polymerization reaction catalyzed by group IVB metallocenes. A rational analysis through the use of reaction force. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 21318–21325.
- [35] Politzer, P.; Toro-Labbé, A.; Gutiérrez-Oliva, S.; Herrera, B.; Jaque, P.; Concha, M. C.; Murray, J. S. The reaction force: Three key points along an intrinsic reaction coordinate. *J. Chem. Sci.* **2005**, *117*, 467–472.
- [36] Martínez, J.; Toro-Labbé, A. The reaction force. A scalar property to characterize reaction mechanisms. *J. Math. Chem.* **2009**, *45*, 911–927.
- [37] Politzer, P.; Toro-Labbé, A.; Gutiérrez-Oliva, S.; Murray, J. S. *Adv. Quantum Chem.*; Academic Press, 2012; Vol. 64; pp 189–209.
- [38] Durán, R.; Herrera, B. Theoretical Study of the Mechanism of Catalytic Enantioselective N-H and O-H Insertion Reactions. *J. Phys. Chem. A* **2020**, *124*, 2–11.

- [39] Villegas-Escobar, N.; Schaefer, H. F.; Toro-Labbé, A. Formation of Formic Acid Derivatives through Activation and Hydroboration of CO₂ by Low-Valent Group 14 (Si, Ge, Sn, Pb) Catalysts. *J. Phys. Chem. A* **2020**, *124*, 1121–1133.
- [40] Hernández Mancera, J. P.; Núñez-Zarur, F.; Gutiérrez-Oliva, S.; Toro-Labbé, A.; Vivas-Reyes, R. Diels-Alder reaction mechanisms of substituted chiral anthracene: A theoretical study based on the reaction force and reaction electronic flux. *J. Comput. Chem.* **2020**, *41*, 2022–2032.
- [41] Rincón, E.; Jaque, P.; Toro-Labbé, A. Reaction force analysis of the effect of Mg(II) on the 1,3 intramolecular hydrogen transfer in thymine. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 9478–9485.
- [42] Guzmán-Angel, D.; Gutiérrez-Oliva, S.; Toro-Labbé, A. Hydrogenation and hydration of carbon dioxide: a detailed characterization of the reaction mechanisms based on the reaction force and reaction electronic flux analyses. *J. Mol. Model.* **2019**, *25*, 16.
- [43] Duarte, F.; Toro-Labbé, A. The mechanism of H₂ activation by (amino)carbenes. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 3050–3059.
- [44] Polanyi, J. C.; Zewail, A. H. Direct Observation of the Transition State. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 119–132.
- [45] Zewail, A. H. Femtochemistry: Atomic-Scale Dynamics of the Chemical Bond †. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 5660–5694.
- [46] Villegas-Escobar, N.; Larsen (née Vilhelmsen), M. H.; Gutiérrez-Oliva, S.; Hashmi, A. S. K.; Toro-Labbé, A. Double Gold Activation of 1-Ethynyl-2-(Phenylethynyl)Benzene Toward 5-exo-dig and 6-endo-dig Cyclization Reactions. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 13360–13368.
- [47] Villegas-Escobar, N.; Gutiérrez-Oliva, S.; Toro-Labbé, A. Catalytic Mechanism of H₂ Activation by a Carbenoid Aluminum Complex. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 26598–26604.
- [48] Herrera, B.; Toro-Labbé, A. The role of the reaction force to characterize local specific interactions that activate the intramolecular proton transfers in DNA basis. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 7096–7102.
- [49] Politzer, P.; Murray, J. S.; Yepes, D.; Jaque, P. Driving and retarding forces in a chemical reaction. *J. Mol. Model.* **2014**, *20*, 2351.
- [50] Toro-Labbé, A.; Gutiérrez-Oliva, S.; Murray, J. S.; Politzer, P. The reaction force and the transition region of a reaction. *J. Mol. Model.* **2009**, *15*, 707–710.
- [51] Yepes, D.; Murray, J. S.; Santos, J. C.; Toro-Labbé, A.; Politzer, P.; Jaque, P. Fine structure in the transition region: Reaction force analyses of water-assisted proton transfers. *J. Mol. Model.* **2013**, *19*, 2689–2697.
- [52] Cerón, M. L.; Echegaray, E.; Gutiérrez-Oliva, S.; Herrera, B.; Toro-Labbé, A. The reaction electronic flux in chemical reactions. *Sci. China Chem.* **2011**, *54*, 1982–1988.
- [53] Vogt-Geisse, S.; Toro-Labbé, A. Chemical potential and reaction electronic flux in symmetry controlled reactions. *J. Comput. Chem.* **2016**, *37*, 1794–1800.
- [54] Geerlings, P.; De Proft, F.; Langenaeker, W. Conceptual Density Functional Theory. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1793–1874.
- [55] Parr, R. G.; Donnelly, R. A.; Levy, M.; Palke, W. E. Electronegativity: The density functional viewpoint. *J. Chem. Phys.* **2003**, *68*, 3801–3807.
- [56] Parr, R. G.; Yang, W. *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*; Oxford University Press, USA, 1994.

- [57] Koopmans, T. Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms. *Physica* **1934**, *1*, 104–113.
- [58] Matute, R. A.; Pérez, P.; Chamorro, E.; Villegas-Escobar, N.; Cortés-Arriagada, D.; Herrera, B.; Gutiérrez-Oliva, S.; Toro-Labbé, A. Reaction Electronic Flux Perspective on the Mechanism of the Zimmerman Di- π -methane Rearrangement. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 5969–5974.
- [59] Frisch, M. J. et al. Gaussian 16 Revision C.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT. 2016.
- [60] Glendening, E. D.; Reed, A. E.; Carpenter, J. E.; Weinhold, F. NBO Version 3.1.
- [61] Vendelboe, T. V.; Harris, P.; Christensen, H. E. M.; Harlos, K.; Walter, T. S.; Zhao, Y.; El Omari, K. RCSB The Protein Data Bank PDB - 4ZEL: Human dopamine beta-hydroxylase. 2016; [10.2210/pdb4ZEL/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb4ZEL/pdb).
- [62] Dennington, R.; Keith, T. A.; Millam, J. M. GaussView, Version 6.1; Semichem Inc.: Shawnee Mission, KS. 2016.
- [63] Reedy, B. J.; Blackburn, N. J. Preparation and Characterization of Half-Apo Dopamine- β -hydroxylase by Selective Removal of Cu A .Identification of a Sulfur Ligand at the Dioxygen Binding Site by EXAFS and FTIR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1924–1931.
- [64] Scott, R. A.; Sullivan, R. J.; Dewolf, W. E.; Dolle, R. E.; Kruse, L. I. The Copper Sites of Dopamine β -hydroxylase: An X-ray Absorption Spectroscopic Study. *Biochemistry* **1988**, *27*, 5411–5417.
- [65] Schrodinger, L. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. 2015.
- [66] Zhurko, G.; Zhurko, D. Chemcraft, version 1.6. 2009.
- [67] Jacopo Tomasi.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999–3093.
- [68] Chen, P.; Bell, J.; Eipper, B. A.; Solomon, E. I. Oxygen Activation by the Noncoupled Binuclear Copper Site in Peptidylglycine α -Hydroxylating Monooxygenase. Spectroscopic Definition of the Resting Sites and the Putative CuIIM-OOH Intermediate. *Biochemistry* **2004**, *43*, 5735–5747.
- [69] Co, M. S.; Hodgson, K. O. *Copper Proteins and Copper Enzymes*; CRC Press, 2018; Vol. 1; pp 93–113.
- [70] Blackburn, N. J.; Rhames, F. C.; Ralle, M.; Jaron, S. Major changes in copper coordination accompany reduction of peptidylglycine monooxygenase: Implications for electron transfer and the catalytic mechanism. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 341–353.
- [71] Bhadra, M.; Transue, W. J.; Lim, H.; Cowley, R. E.; Lee, J. Y. C.; Siegler, M. A.; Josephs, P.; Henkel, G.; Lerch, M.; Schindler, S.; Neuba, A.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Solomon, E. I.; Karlin, K. D. A Thioether-Ligated Cupric Superoxide Model with Hydrogen Atom Abstraction Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 3707–3713.
- [72] Alwan, K. B.; Welch, E. F.; Arias, R. J.; Gambill, B. F.; Blackburn, N. J. Rational Design of a Histidine–Methionine Site Modeling the M-Center of Copper Monooxygenases in a Small Metallochaperone Scaffold. *Biochemistry* **2019**, *58*, 3097–3108.
- [73] Beliaev, A.; Ferreira, H.; Learmonth, D. A.; Soares-da Silva, P. Dopamine β -Monooxygenase: Mechanism, Substrates and Inhibitors. *Curr. Enzyme Inhib.* **2009**, *5*, 27–43.
- [74] Kaufman, S.; Bridgers, W. F.; Eisenberg, F.; Friedman, S. The source of oxygen in the

- phenylalanine hydroxylase and the dopamine- β -hydroxylase catalyzed reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1962**, *9*, 497–502.
- [75] Goldstein, M.; Lauber, E.; McKereghan, M. Studies on the Purification and Characterization of 3,4-Dihydroxyphenylethylamine β -Hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 2066–2072.
- [76] Taylor, K. B. Dopamine β hydroxylase. Stereochemical course of the reaction. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 454–458.
- [77] Klinman, J. P.; Krueger, M. Dopamine β -Hydroxylase: Activity and Inhibition in the Presence of β -Substituted Phenethylaminest. *Biochemistry* **1982**, *21*, 67–75.
- [78] Levin, E. Y.; Levenberg, B.; Kaufman, S. The enzymatic conversion of 3,4-dihydroxyphenylethylamine to norepinephrine. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 2080–2086.
- [79] Tian, G.; Klinman, J. P.; Berry, J. A. Oxygen-18 Kinetic Isotope Effects in the Dopamine β -Monooxygenase Reaction: Evidence for a New Chemical Mechanism in Non-Heme Metallomonooxygenases. *Biochemistry* **1994**, *33*, 226–234.
- [80] Francisco, W. A.; Merkler, D. J.; Blackburn, N. J.; Klinman, J. P. Kinetic Mechanism and Intrinsic Isotope Effects for the Peptidylglycine α -Amidating Enzyme Reaction. *Biochemistry* **1998**, *37*, 8244–8252.

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	☐
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

23

On the Mechanisms of Chemical Reactions

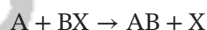
Soledad Gutiérrez-Oliva¹, Angie Carolay Forero-Girón¹, Nery Villegas-Escobar², and Alejandro Toro-Labbé¹

¹Universidad Católica de Chile, Facultad de Química y de Farmacia, Laboratorio de Química Teórica Computacional (QTC), Santiago, Chile

²Universidad Bernardo O'Higgins, Centro Integrativo de Biología y Química Aplicada (CIBQA), Santiago, Chile

23.1 Introduction

One can picture a chemical reaction as a sequence of chemical events that are structural and electronic changes taking place along a reaction coordinate to produce a chemical transformation. These chemical events are basically bond-forming and bond-breaking processes that are main actions, although not the only ones, necessary to produce the structural and electronic changes that achieve a chemical reaction. For example, a simple substitution reaction as



involves a weak initial attractive interaction that allows the approach of the reactants A and BX to initiate the reaction. This is followed by the breaking of the B–X bond and the formation of the A–B bond; depending on the reaction, these two events may, or may not, take place simultaneously. The reaction is achieved when the products AB and X are formed and interacting through non-covalent interactions. It is possible to define a hierarchy of chemical events that can be distinguished empirically, but also in terms of the amount of energy they involve and, in most cases, for the position along the reaction coordinate in which they take place. Bond-breaking and bond-forming processes are primary events, bond weakening and strengthening are secondary events, and non-covalent interactions can be considered as tertiary events. These chemical events shows up at different degrees of progress of the reaction, as shown in Figure 23.1. Discovering how and where, along the reaction coordinate, chemical events shows up unveils the very whole reaction mechanism, the processes by which chemical substances are transformed into other substances are then at hand.

The first key quantity involved in a chemical process is the reaction energy (ΔE°), which is the net energy change between reactants and products; it defines the chemical equilibrium and characterizes the thermodynamics of the reaction.

Conceptual Density Functional Theory: Towards a New Chemical Reactivity Theory, First Edition.

Edited by Shubin Liu.

© 2022 WILEY-VCH GmbH. Published 2022 by WILEY-VCH GmbH.

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	☐
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

Color Fig: 23.1

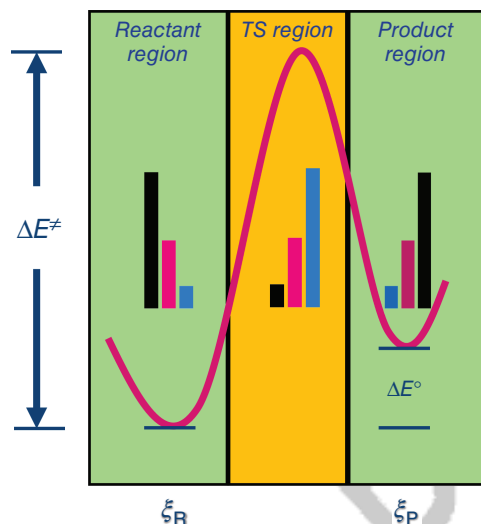


Figure 23.1 The partition of the reaction coordinate provided by the reaction force analysis and projected on a schematic energy profile of an elementary step along the reaction coordinate ξ . The pair $\{\Delta E^\circ, \Delta E^\ddagger\}$ are the reaction and activation energies. The bars on each reaction region indicate qualitatively the expected intensity of primary (blue), secondary (pink), and tertiary (black) chemical events along the reaction coordinate.

Frequently, there are many ways a chemical reaction may take place. Among all possible mechanisms, the most probable is the one that follows the minimum energy path (MEP) connecting the reactants with the products and passing by a transition state [1–3]. The MEP corresponds to the path with the lower activation energy, which is the energy necessary to reach the transition state, and to do so, chemical events have to be put at play. An energy profile represented in Figure 23.1 has three key points, two minima at the reactants (ξ_R) and products (ξ_P) and one maximum at the transition state. The activation energy ($\Delta E^\ddagger$) reveals, through the transition state theory (TST)[4–6], the kinetic aspects of an elementary step or how much time it takes for the whole process. Reaction thermodynamics, kinetics, and mechanism are the three most relevant dimensions of a chemical reaction, and they are intimately related. Therefore, a complete characterization of a chemical reaction necessarily requires the knowledge of these three aspects.

Reaction rate and the activation energy are connected through the Arrhenius equation

$$k = Ae^{-\Delta E^\ddagger/RT} \quad (23.1)$$

where k is the rate constant, A is the pre-exponential coefficient often referred to as the frequency factor, R is the universal gas constant, and T is the temperature. More sophisticated theories have been developed later being the most important one the Eyring, Polanyi, and Evans TST [4, 5] based on the assumption that activated complexes are in quasi-equilibrium with the reactants. This leads to the Eyring equation[6, 7]

$$k = \left(\frac{k_B T}{h\nu} \right) e^{-\Delta G^\ddagger/RT} \quad (23.2)$$

where k_B is the Boltzmann constant, h is the Planck constant, ν is the frequency of an specific vibrational mode (chemical event) responsible for converting the

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	☐
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

activated complex to the product, and $\Delta G^\ddagger$ is the activation Gibbs free energy. Therefore, the knowledge of the activation energy of a chemical reaction produces fundamental kinetic information such as the time needed to produce the chemical transformation.

Often, due to the impossibility to get reliable estimation of activation energies, empirical relationships between kinetic and thermodynamic data have been suggested. A linear relationship between the activation energy and the reaction energy of an elementary reaction is known as Brönsted–Evans–Polanyi (BEP) principle [8, 9]:

$$\Delta E^\ddagger = E_0 + \beta \Delta E^\circ \quad (23.3)$$

where E_0 is a reference energy and β is the Brönsted coefficient that measures the resemblance between the transition state and the product. Following the Leffler postulate [10], β is formally defined as

$$\beta = \left(\frac{d\Delta E^\ddagger}{d\Delta E^\circ} \right) \quad (23.4)$$

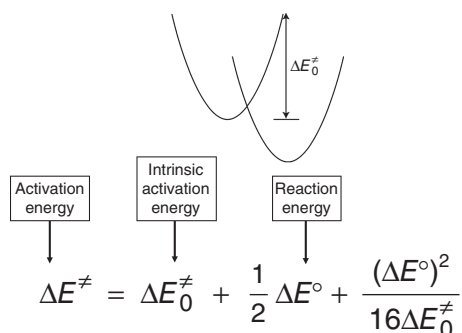
This simple equation may provide interesting insights on kinetic and thermodynamic patterns of similar reactions. The Marcus equation (ME) for predicting activation energies results from the interpolation of two local potentials, $E_R(\xi)$ and $E_P(\xi)$, describing the reactants and the products. These potentials are linked through a reaction coordinate ξ and intersect in the transition state. Marcus equation is conceived at the intersection of the two wells, which correspond to the actual transition state (TS) of the reaction; see Figure 23.2 [11, 12]:

$$\Delta E^\ddagger = \Delta E_0^\ddagger + \frac{1}{2} \Delta E^\circ + \frac{(\Delta E^\circ)^2}{16\Delta E_0^\ddagger} \quad (23.5)$$

It is interesting to note that in the ME, the linear relationship between activation and reaction energies already found in the BEP model is recovered, although the constant slope of $\beta = 0.5$ is slightly different from the β coefficient obtained in the BEP model. In the Marcus equation, a corrected Brönsted coefficient emerges:

$$\beta = \left(\frac{d\Delta E^\ddagger}{d\Delta E^\circ} \right) = \frac{1}{2} + \frac{\Delta E^\circ}{8\Delta E_0^\ddagger} \quad (23.6)$$

Figure 23.2 The Marcus equation is obtained from interpolation of two potentials localized at the reactants and products. The intercepting point defines the location of the transition state with the associated activation energy $\Delta E^\ddagger$. The intrinsic activation energy is the energy involved in distorting the reactants to reach the position of the products.



Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	☐
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

4 | 23 On the Mechanisms of Chemical Reactions

As observed, the correction to the one half factor of Eq. (23.6) is due to a balance between reaction and intrinsic activation energies, and it is normally small since in most cases $\Delta E_0^\ddagger \gg \Delta E^\circ$. The Brönsted coefficient, as defined in Eq. (23.6), measures the compliance of the Hammond postulate [13] stating that for exergonic reactions ($\Delta E^\circ < 0$) the transition state is located closer to the reactants ($\beta < 0.5$), whereas for endergonic reactions ($\Delta E^\circ > 0$) the TS is located closer to the products ($\beta > 0.5$). This is the basis of the Marcus theory of electron transfer reactions that was originally formulated to link the rate of the reactions with the thermodynamics of the process [7, 11, 12]. As indicated in Figure 23.2, a key quantity in the Marcus theory is the reorganization energy or Marcus' intrinsic activation energy, $\Delta E_0^\ddagger$, which corresponds to the energy associated to the reorganization of the reactant at the equilibrium configuration of the product.

Although not intended to describe chemical reactions, the Marcus equation became a keystone in the characterization of the kinetics and thermodynamics of any kind chemical process [14, 15]. The three stationary points on the energy profile along a reaction coordinate were enough to get this information, and the profiles of energy became crucial to get kinetic and thermodynamic data of a chemical process although it never gave a clue on the reaction mechanisms. An important leap further on the direction of elucidating reaction mechanisms was the introduction of the reaction force since it provided a rational partition of the reaction coordinate into the so-called reaction regions in which specific mechanisms might be operating [16–22].

In this chapter, we are going to review all three aspects of a chemical reaction on the basis of the Marcus' equation that relates activation and reaction energies. Reaction mechanisms will be rationalized within the frame of the reaction force analysis (RFA) that allows a partition of the reaction coordinate in *reaction regions* in which different mechanisms might be operating. On the other hand, chemical events explaining the reaction mechanism will be characterized through the reaction electronic flux (REF) that is a density functional theory (DFT)-based descriptor of the electronic activity taking place during a chemical reaction.

23.2 Theory of the Mechanism of Chemical Reactions

23.2.1 The Reaction Force Analysis

As already mentioned, a major leap on the characterization of reaction mechanism was the introduction of the reaction force, defined as [16]

$$F(\xi) = - \left(\frac{dE(\xi)}{d\xi} \right) \quad (23.7)$$

So, to any energy profile it corresponds a reaction force profile that is obtained through numerical or analytic differentiation of $E(\xi)$, as illustrated in Figure 23.3. The five key points on the reaction force profile are the same as for the energy profile, reactant, transition state, and product to which the reaction force minimum

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	
☐	
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

23.2 Theory of the Mechanism of Chemical Reactions | 5

Color Fig: 23.3

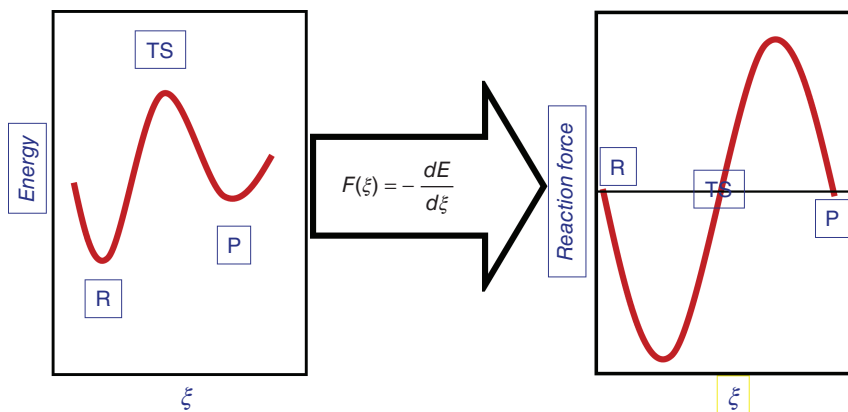
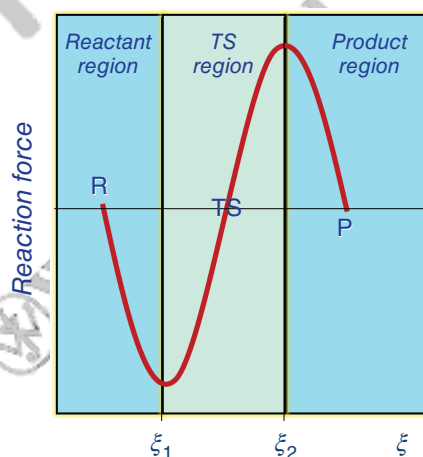


Figure 23.3 Correspondence between energy and reaction force profiles. The energy profile has three key points, whereas the reaction force profile exhibits five points of interest.

Color Fig: 23.4

Figure 23.4 Reaction regions defined for an elementary step. The force minimum and the force maximum define the borders for the regions.



and maximum have to be added. These five points are used to define reaction regions along ξ in which different mechanisms might be operating, as indicated in Figure 23.4.

The reactant and product regions are structurally intensive. In the reactant region, structural rearrangements prepare the reaction, whereas in the product region the structural relaxation leads to the products [23–27]. These two regions are characterized mainly by secondary and tertiary chemical events. In contrast to this, the transition state region is mostly electronically intensive. Here, most electronic activity takes place through primary chemical events; see Figure 23.1 [20, 28]. In fact the transition state region hosts activated reactants and products, which are unstable species that appear and disappear, promoting the reaction in one sense or the other. Significantly, the numerical value of the definite integral of reaction force

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	☐
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

6 | 23 On the Mechanisms of Chemical Reactions

(RF) in given intervals along ξ gives information about the energy associated with specific chemical events that might be driving the reaction within those intervals, defining reaction works as [17]

$$W_i = - \int_{\xi_i}^{\xi_i + \delta\xi} F(\xi) d\xi \quad (23.8)$$

In this way, it is possible to quantify the energetic expenditure of specific chemical events taking place anywhere along the reaction coordinate. In particular, and with the aim of providing a natural partition of activation and reaction energies, reaction works W_1 , W_2 , W_3 , and W_4 , consistent with the already defined reaction region, are given by

$$W_1 = - \int_{\xi_R}^{\xi_1} F(\xi) d\xi > 0; \quad W_2 = - \int_{\xi_1}^{\xi_0} F(\xi) d\xi > 0 \quad (23.9)$$

$$W_3 = - \int_{\xi_0}^{\xi_2} F(\xi) d\xi < 0; \quad W_4 = - \int_{\xi_2}^{\xi_P} F(\xi) d\xi < 0 \quad (23.10)$$

where ξ_0 is the position of the transition state. The above-defined reaction works introduce a new perspective into activation and reaction energies, which can be expressed as

$$\Delta E^\circ = (W_1 + W_2 + W_3 + W_4) \quad (23.11)$$

and

$$\Delta E^\ddagger = (W_1 + W_2) \quad (23.12)$$

Note that since the reaction works are defined within regions in which structural or electronic effects prevails over the other, the physical nature of these key energies is then revealed in terms of the relative weight of structural and electronic effects. In this context a new perspective on activation processes is obtained, illustrated in Figure 23.5.

In summary, the RFA provides a reliable framework to analyze the different reaction mechanisms that might be operating within the different reaction regions. It

Color Fig: 23.5

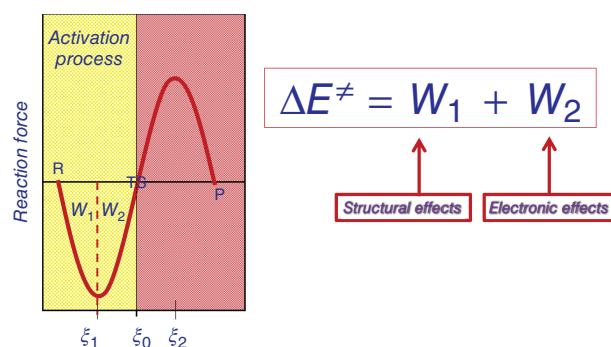


Figure 23.5 The activation process from the perspective of the reaction force.

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	☐
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

is important to note that for multistep reactions, more reaction regions have to be defined and a n -step reaction will have $(2n + 1)$ reaction regions with n transition state and $(n - 1)$ intermediate regions, besides the reactant and product regions [19, 23, 29–33]. The energy involved in activation and relaxation can be easily quantified through the reaction works evaluated within the different regions, thus allowing to identify their physical nature.

23.2.2 The Marcus Potential Function

Recently a potential function consistent with the Marcus equation has been proposed [34], which is given by

$$E^{(m)}(\xi) = -\frac{1}{4}\Delta E_o^\ddagger \xi^4 + \Delta E_o^\ddagger \xi^2 + \frac{1}{4}\Delta E^\circ \xi^2 \quad (23.13)$$

As it can be seen, the Marcus potential ($E^{(m)}(\xi)$) is a two-parameter polynomial function. Both parameters have known physical meaning, the intrinsic activation energy $\Delta E_o^\ddagger$ accounting for structural distortion and the reaction energy (ΔE°) accounting for the thermodynamic driving force of the chemical process. Therefore, the Marcus potential can be defined by having the energy of the reactants, products, and the TS. This potential naturally spans in an interval $\{0, 2\}$ yielding an energy profile over ξ that recovers the activation energy and the reaction energy. The position of the transition state for $E^{(m)}(\xi)$ is given by

$$\left(\frac{dE^{(m)}(\xi)}{d\xi} \right)_{\xi_0} = 0 \rightarrow \xi_0 = \left[2 + \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta E^\circ}{\Delta E_o^\ddagger} \right) \right] \quad (23.14)$$

When Eq. (23.13) is evaluated at ξ_0 , the Marcus equation is recovered. Therefore, the classical ME is a particular case of the Marcus potential.

23.2.3 The Reaction Force Analysis of $E^{(m)}(\xi)$

It is possible to perform the RFA using the analytic Marcus' potential function given in Eq. (23.11). The reaction force in the context of the Marcus potential is given by [34]

$$F^{(m)}(\xi) = - \left(\frac{dE^{(m)}}{d\xi} \right) = \Delta E_o^\ddagger \xi^3 - 2\Delta E_o^\ddagger \xi - \frac{1}{2}\Delta E^\circ \xi \quad (23.15)$$

The reaction force $F^{(m)}(\xi)$ vanishes zero at the reactant and transition state. After the TS, it continues to increase so that it can only be used for activation processes although relaxation can be treated as a reverse activation. Another important result is that the minimum of the Marcus' reaction force (ξ_1) can be derived analytically:

$$\xi_1^2 = \frac{1}{3}\xi_0^2 = \frac{1}{3} \left[2 + \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta E^\circ}{\Delta E_o^\ddagger} \right) \right] \quad (23.16)$$

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	☐
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

and therefore, integrating $F^{(m)}(\xi)$ within the right intervals will lead to analytic forms for reaction works $W_1^{(m)}$ and $W_2^{(m)}$:

$$\begin{aligned}
 W_1^{(m)} &= \int_{\xi_R}^{\xi_1} F^{(m)}(\xi) d\xi \\
 &= -\frac{1}{4} \Delta E_o^\ddagger \left(\frac{1}{9} \xi_0^4 \right) + \Delta E_o^\ddagger \left(\frac{1}{3} \xi_0^2 \right) + \frac{1}{4} \Delta E^\circ \left(\frac{1}{3} \xi_0^2 \right) \\
 &= \frac{5}{9} \Delta E_o^\ddagger + \frac{5}{18} \Delta E^\circ + \frac{5}{144} \left[\frac{(\Delta E^\circ)^2}{\Delta E_o^\ddagger} \right]
 \end{aligned} \quad (23.17)$$

and

$$\begin{aligned}
 W_2^{(m)} &= \int_{\xi_1}^{\xi_0} F^{(m)}(\xi) d\xi \\
 &= -\frac{1}{4} \Delta E_o^\ddagger \left(\frac{8}{9} \xi_0^4 \right) + \Delta E_o^\ddagger \left(\frac{2}{3} \xi_0^2 \right) + \frac{1}{4} \Delta E^\circ \left(\frac{2}{3} \xi_0^2 \right) \\
 &= \frac{4}{9} \Delta E_o^\ddagger + \frac{4}{18} \Delta E^\circ + \frac{4}{144} \left[\frac{(\Delta E^\circ)^2}{\Delta E_o^\ddagger} \right]
 \end{aligned} \quad (23.18)$$

with

$$W_1^{(m)} + W_2^{(m)} = \Delta E_m^\ddagger \quad (23.19)$$

where $\Delta E_m^\ddagger$ is the same expression for the activation energy given in Eq. (23.4), and a subindex (m) has been added to $\Delta E^\ddagger$ to stress its analytic origin. A relevant result is that within the framework of the Marcus' potential function, the reaction work $W_1^{(m)}$ represents 56% of the activation energy, confirming the preponderance of structural reorganizations over electronic reordering, a fact that has been empirically observed in many reactions.

23.3 The Reaction Electronic Flux

The REF measures the electronic activity taking place along the reaction coordinate, which is defined as [35–37]

$$J(\xi) = -\frac{d\mu}{d\xi} \quad (23.20)$$

where μ is the electronic chemical potential accounting for the escaping tendency of electrons from equilibrium [38–40], defined as

$$\mu = \left(\frac{dE}{dN} \right)_{v(\vec{r})} \approx -\frac{1}{2} (\text{IP} + \text{EA}) \approx \frac{1}{2} (\epsilon_H + \epsilon_L) \quad (23.21)$$

where N is the total number of electron of the system, $v(\vec{r})$ is the external potential, and the pairs {IP, EA} and $\{\epsilon_H, \epsilon_L\}$ are the ionization potential and electron affinity; and the frontier molecular orbital energies, highest occupied molecular orbital (HOMO) and lowest unoccupied molecular orbital (LUMO), respectively. To obtain the working formulae given in the above equation from the differential

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	☐
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

definition of μ , it is necessary to invoke the finite difference approximation [41] and the Koopmans theorem [42]. In this context, the simple knowledge of frontier molecular orbital energies along ξ is enough to get a profile for the chemical potential, $\mu(\xi)$, which produces crucial information about the electronic activity that drives a chemical reaction [25, 29, 43]. It has been established that positive values of $J(\xi)$ are associated with spontaneous electronic activity driven by bond strengthening/forming processes, whereas negative values are associated with non-spontaneous electronic activity that is conducted by bond weakening/cleavage processes [28, 43].

23.3.1 Physical Partition of the REF

To better rationalize results from REF, a physical partition of $J(\xi)$ was proposed [30, 37, 44] in terms of electronic polarization and transfer effects (Figure 23.6):

$$J(\xi) = (J_p(\xi) + J_t(\xi)) \quad (23.22)$$

where $J_p(\xi)$ and $J_t(\xi)$ are polarization and transfer fluxes, respectively. In this way, it is possible to characterize the nature of the electronic activity that drives the reaction along ξ .

23.3.2 Chemical Partition of the REF

A chemical partition of the REF is also available [45], which is derived from the electrophilicity index ω :

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (23.23)$$

where η is the hardness expressed in the frame of conceptual DFT as the derivative of μ with respect to the total number of electrons. Therefore,

$$J(\xi) = \frac{1}{2} \Delta N_{\max}(\xi) \left(\frac{d\eta}{d\xi} \right) + \frac{1}{\Delta N_{\max}(\xi)} \left(\frac{d\omega}{d\xi} \right) \quad (23.24)$$

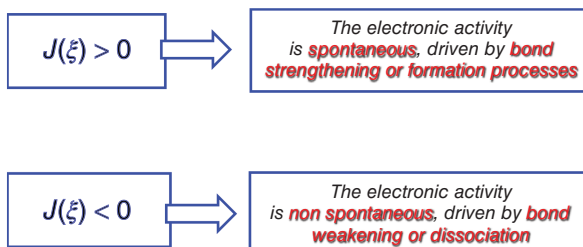
$$= (J_\eta(\xi) + J_\omega(\xi)) \quad (23.25)$$

with $\Delta N_{\max} = -\mu/\eta$ being the maximum number of electrons the system can accept. Therefore, the following component of the reaction flux emerges

$$J_\eta(\xi) = \frac{1}{2} \Delta N_{\max}(\xi) \left(\frac{d\eta}{d\xi} \right) \quad (23.26)$$

Figure 23.6 Conceptual interpretation of the reaction electronic flux.

Color Fig: 23.6



Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	☐
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

and

$$J_{\omega}(\xi) = \frac{1}{\Delta N_{\max}(\xi)} \left(\frac{d\omega}{d\xi} \right) \quad (23.27)$$

The pair $\{J_{\eta}, J_{\omega}\}$ can be used to rationalize results of REF in terms of well-known reactivity descriptors such as hardness and electrophilicity index.

23.3.3 REF, Electronic Populations, and Bond Orders

To complement the REF results, it is possible to link the REF with local electronic properties such as bond orders, atomic charges, and electronic populations. The link comes from the very definition of the chemical potential in DFT [38, 39]:

$$\mu = \int f(\vec{r}) \delta v(\vec{r}) d\vec{r} \rightarrow \mu \approx \sum_k v_k f_k \quad (23.28)$$

and therefore, the REF can be written in terms of condensed to atoms quantities:

$$J(\xi) \approx -\frac{1}{N} \sum_k \left(\frac{dv_k}{d\xi} \right) \cdot \rho_k - \frac{1}{N} \sum_k \left(\frac{d\rho_k}{d\xi} \right) \cdot v_k \quad (23.29)$$

where, since the condensed external potential v_k remains constant all along the reaction coordinate, the first term of the right-hand side can be overlooked. In this context the REF becomes proportional to the derivative of electronic population on atom k weighted by the constant external potential. Following the above equation, it is possible to use bond orders to identify specific bond processes (forming/cleavage) that might be prime responsible for the electronic activity evidenced by the REF.

23.4 Selected Applications

23.4.1 Reaction Force Analysis and REF

Carbocation rearrangements are involved in many enzyme-catalyzed biochemical reactions; in particular, the carbocation triple shift (CCTS) reaction is one of the most unusual types of rearrangements discovered. The CCTS consists in concerted processes that are characterized by three main events, which are [1] 1,2-methyl shift, [2] 1,3-hydride shift, and [3] 1,2-alkyl shift [46]. In this study, the reactant, product, and transition state geometries were optimized at the B3LYP/6-31+G(d,p) level using the Gaussian 09 package, which has proven to be a good methodology for the description of this mechanism. Results are summarized in Figure 23.7. It can be observed that the reaction force profile suggests the existence of intermediates, thus leading to four reaction regions, as indicated by the different colors on the figures. The table indicate that all chemical events that drive a portion of the progress of the reaction have associated a value of energy adsorbed or released indicating that the RFA provides a very detailed scrutiny of the energy involved in the chemical transformation. On the other hand, it can be observed on the right-bottom panel that the REF is basically constructed from the contributions, at different stages of

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	☐
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

Color Fig: 23.7

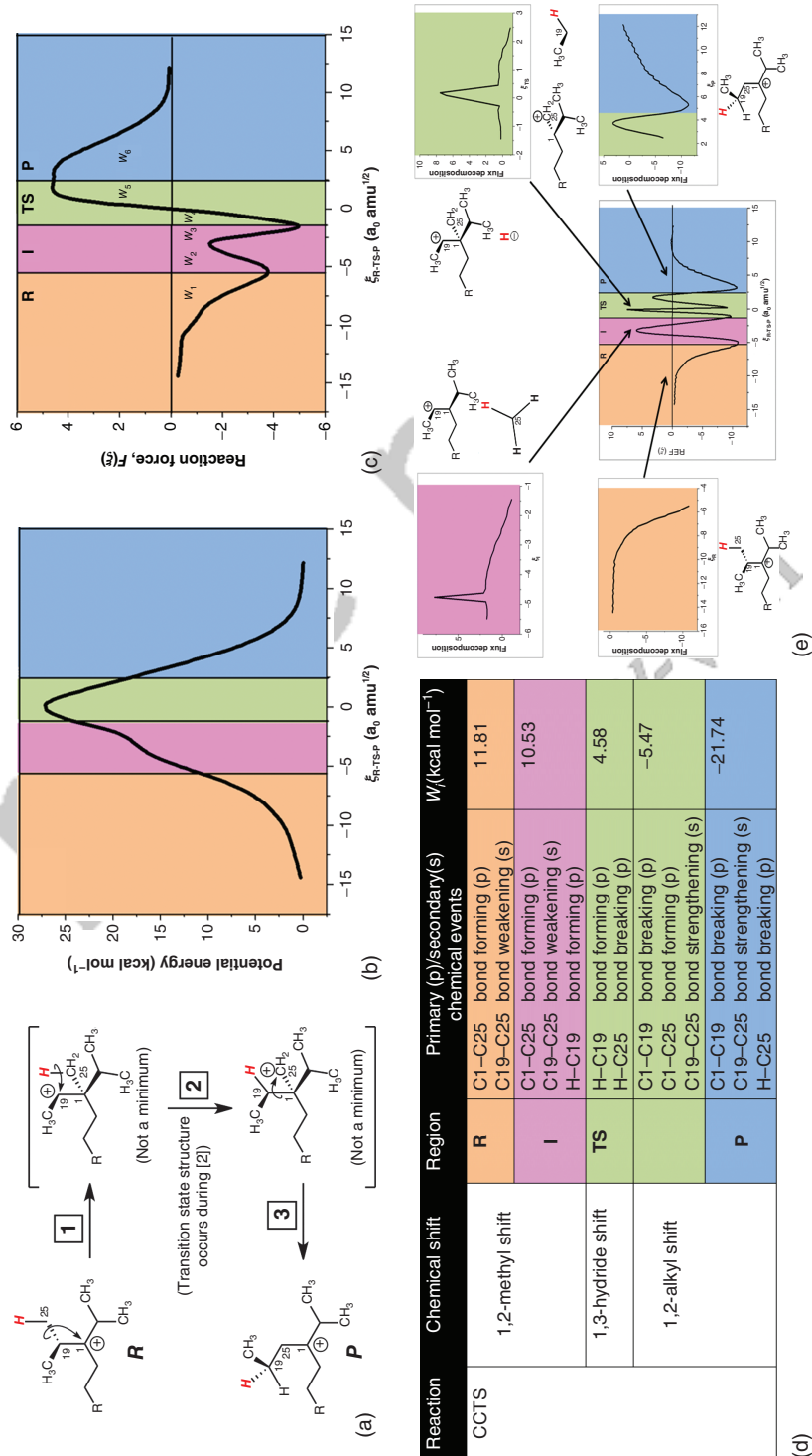


Figure 23.7 Composition of results concerning the triple shift rearrangement. (a) The scheme of the triple shift rearrangement, the (b) energy and (c) reaction force profiles, (d) the energy associated to each chemical event that drives a portion of the progress of the reaction along ξ , and (e) REF that is clearly built up from local fragments REFs. Source: Ortega et al. [46].

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	☐
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

12 | 23 On the Mechanisms of Chemical Reactions

the reaction, of the specific chemical event, the REFs to which are determined by fragmentation of the supermolecule into relevant topologic fragment containing the chemical event under study.

23.4.2 Physical and Chemical Partition of REF

To illustrate the chemical and physical partition of the REF, we will analyze the two-step mechanism of the formation of aminoacetonitrile ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CN}$) from methanimine (NHCH_2) and hydrogen isocyanide (CNH). The interest of this reaction comes from the fact that aminoacetonitrile is a direct precursor of glycine and the reaction may take place in the interstellar medium, where both reactants have been observed [45]. The reaction takes place following two steps as indicated in Figure 23.8. It can be observed in the Figure 23.8 that in step 1 physical and chemical components of the partition match each other very closely and in step 2 the situation consistency is more qualitative.

The physical and chemical representations of the REF for R1 and R2 are given in left and right bottom panels, where each one includes four plots. (a) Red and blue curves correspond to $J_p(\xi)$ and $J_t(\xi)$, respectively; black curve is the total REF: $J(\xi) = J_p(\xi) + J_t(\xi)$. (b) Red and blue curves correspond to $J_\eta(\xi)$ and $J_\omega(\xi)$, respectively; black curve is the total REF: $J(\xi) = J_\eta(\xi) + J_\omega(\xi)$. The inset on the Figure 23.8 shows the variation of $\Delta N_{\max}(\xi)$. (c) Comparison between $J_t(\xi)$ and $J_\eta(\xi)$. (d) Comparison between $J_p(\xi)$ and $J_\omega(\xi)$. Consistency between the two approaches was reached for the case of the formation reaction of aminoacetonitrile. A very good correspondence between the pairs $\{J_p, J_\omega\}$ and $\{J_t, J_\eta\}$ was obtained, thus giving new conceptual insights on the physical interpretation of the REF and its components.

23.5 Conclusions

In this chapter, we have given an overview of a protocol based on the RFA to characterize the most frequently elusive mechanism of chemical reactions. The bunch of tools we reviewed starts with the characterization of transition states and the activation energy. This can be achieved using simple empirical models such as the BEP or the Marcus' equation. The usefulness of energy profiles to track specific events that drive the reaction has been put in value; numerical and analytic profiles can be used to rationalize them. In this context, an analytic potential was formulated to extend the validity of the ME and to characterize energies associated to specific stages as the reaction progress, energies that are crucial in the unfolding of the mechanism. It has been proven that the RFA is a very powerful tool to define a framework based on the reaction coordinate to zoom-in into the specific effects that drive a chemical reaction.

REF emerged as a very useful tool to characterize the electronic activity that takes place at every step of the reaction; the coupling between conceptual DFT and the classical physical chemistry of reactions is then achieved. Physical and chemical partitions of the REF provide different ways to rationalize the electronic

Color Fig: 23.8

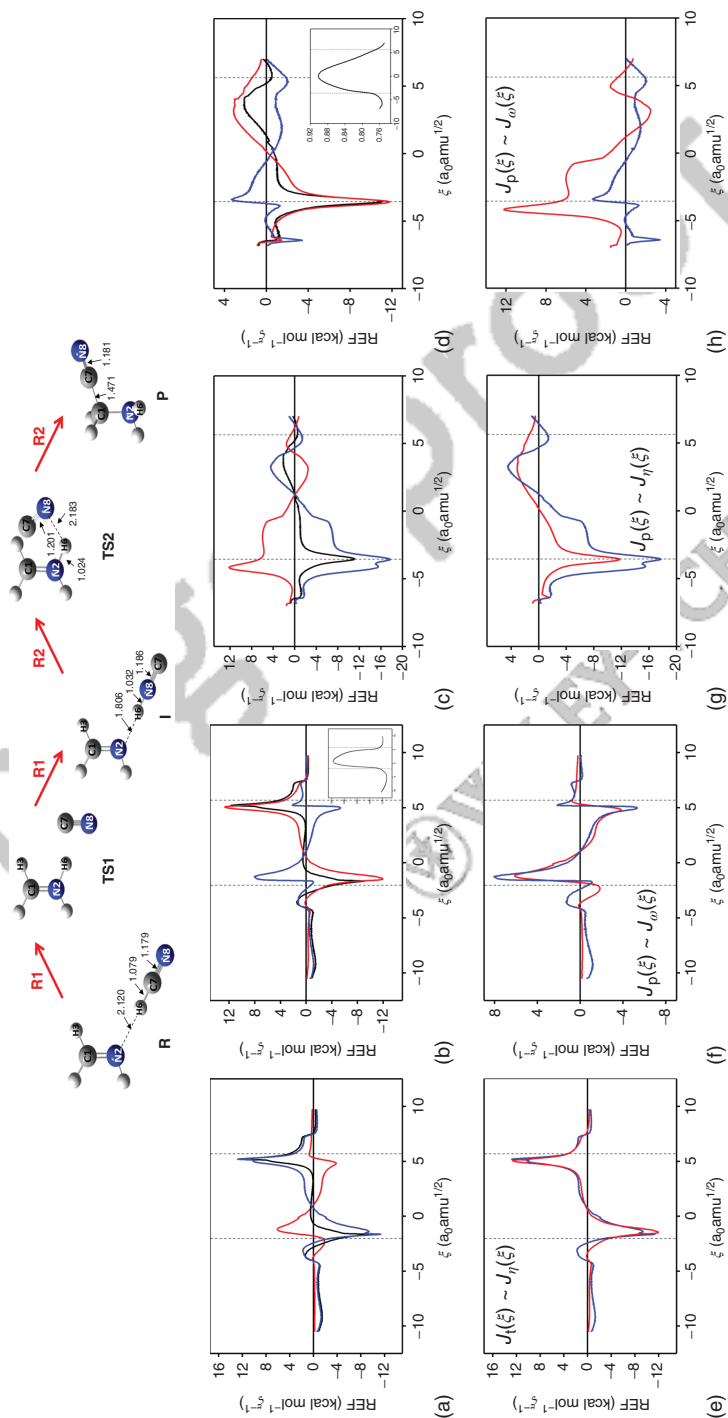


Figure 23.8 Composition of results concerning the comparison of physical and chemical partition of REF. Source: Gutiérrez-Oliva et al. [45].

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	☐
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

activity: the first one uses polarization and transfer effects, and the second one involves well-known DFT descriptors of chemical reactivity. In this context, the link between both approaches provides new interpretative resources to analyze any chemical process.

Integration of different tools, global and local properties of a chemical reaction, produces a very powerful protocol to analyze chemical events and to assign them the relevance they have in a given step of the reaction. Like a musical piece made of musical notes that are going on and off along the whole artwork, a chemical reaction is made of chemical events that show up and disappear sequentially or synchronously as part of a vast ensemble of events that remain active until completion of the desired chemical change, where equilibrium is reached.

Acknowledgments

The authors are indebted to Professor Shubin Liu for his kind invitation to participate in this book. Financial support from FONDECYT (ANID-Chile) through Projects Nos. 1181072 and 1201617 are gratefully acknowledged.

References

- 1 Fukui, K. (1981). The path of chemical reactions. The IRC approach. *Acc. Chem. Res.* 14 (12): 363–368.
- 2 Hratchian, H.P. and Schlegel, H.B. (2004). Accurate reaction paths using a Hessian based predictor-corrector integrator. *J. Chem. Phys.* 120: 9918–9924.
- 3 Hratchian, H.P. and Schlegel, H.B. (2005). Using Hessian updating to increase the efficiency of a Hessian based predictor-corrector reaction path following method. *J. Chem. Theory Comput.* 1: 61–69.
- 4 Eyring, H. (1935). The activated complex in chemical reactions. *J. Chem. Phys.* 3: 107–115.
- 5 Evans, M.G. and Polanyi, M. (1935). Some applications of the transition state method to the calculation of reaction velocities, especially in solution. *Trans. Faraday Soc.* 31: 875–894.
- 6 Laidler, K.J. and King, M.C. (1983). The development of transition-state theory. *J. Phys. Chem.* 87: 2657–2664.
- 7 Pross, A. (1945). *Theoretical and Physical Principles of Organic Reactivity*. Wiley.
- 8 Brønsted, J.N. (1928). Acid and basic catalysis. *Chem. Rev.* 5 (3): 231–338.
- 9 Evans, M.G. and Polanyi, M. (1938). Inertia and driving force of chemical reactions. *Trans. Faraday Soc.* 34: 11–24.
- 10 Leffler, J.E. (1953). Parameters for the description of transition states. *Science* 117: 340–341.
- 11 Marcus, R.A. (1964). Chemical and electrochemical electron-transfer theory. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 15 (1): 155–196.

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	☐
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

- 12 Marcus, R.A. (1993). Electron transfer reactions in chemistry. Theory and experiment. *Rev. Mod. Phys.* 65: 599–610.
- 13 Hammond, G.S. (1955). A correlation of reaction rates. *J. Am. Chem. Soc.* 77 (2): 334–338.
- 14 Cárdenas-Jirón, G.I., Toro-Labbé, A., Bock, C.W., and Maruani, J. (1995). *Characterization of Rotational Isomerization Processes in Monorotor Molecules*, 97–120. Dordrecht: Springer Netherlands.
- 15 Martínez, J. and Toro-Labbé, A. (2004). Energy and chemical force profiles from the Marcus equation. *Chem. Phys. Lett.* 392 (1–3): 132–139.
- 16 Toro-Labbé, A. (1999). Characterization of chemical reactions from the profiles of energy, chemical potential, and hardness. *J. Phys. Chem. A* 103 (22): 4398–4403.
- 17 Herrera, B. and Toro-Labbé, A. (2004). The role of the reaction force to characterize local specific interactions that activate the intramolecular proton transfers in DNA basis. *J. Chem. Phys.* 121 (15): 7096–7102.
- 18 Gutiérrez-Oliva, S., Herrera, B., Toro-Labbé, A., and Chermette, H. (2005). On the mechanism of hydrogen transfer in the $\text{HSCH(O)} \rightleftharpoons \text{(S)CHOH}$ and $\text{HSNO} \rightleftharpoons \text{SNOH}$ reactions. *J. Phys. Chem. A* 109 (8): 1748–1751.
- 19 Politzer, P., Toro-Labbé, A., Gutiérrez-Oliva, S. et al. (2005). The reaction force: three key points along an intrinsic reaction coordinate. *J. Chem. Sci.* 117 (5): 467–472.
- 20 Rincón, E., Jaque, P., and Toro-Labbé, A. (2006). Reaction force analysis of the effect of Mg(II) on the 1,3 intramolecular hydrogen transfer in thymine. *J. Phys. Chem. A* 110 (30): 9478–9485.
- 21 Toro-Labbé, A., Gutiérrez-Oliva, S., Murray, J.S., and Politzer, P. (2009). The reaction force and the transition region of a reaction. *J. Mol. Model.* 15: 707–710.
- 22 Politzer, P., Murray, J.S., Yepes, D., and Jaque, P. (2014). Driving and retarding forces in a chemical reaction. *J. Mol. Model.* 20 (8): 2351.
- 23 Durán, R. and Herrera, B. (2020). Theoretical study of the mechanism of catalytic enantioselective N-H and O-H insertion reactions. *J. Phys. Chem. A* 124 (1): 2–11.
- 24 Villegas-Escobar, N., Gutiérrez-Oliva, S., and Toro-Labbé, A. (2015). Catalytic mechanism of H_2 activation by a carbenoid aluminum complex. *J. Phys. Chem. C* 119 (47): 26598–26604.
- 25 Villegas-Escobar, N., Larsen (Née Vilhelmsen), M.H., Gutiérrez-Oliva, S. et al. (2017). Double gold activation of 1-ethynyl-2-(phenylethynyl)benzene toward 5-exo-dig and 6-endo-dig cyclization reactions. *Chem. Eur. J.* 23 (54): 13360–13368.
- 26 Villegas-Escobar, N., Schaefer, H.F., and Toro-Labbé, A. (2020). Formation of formic acid derivatives through activation and hydroboration of CO_2 by low-valent group 14 (Si, Ge, Sn, Pb) catalysts. *J. Phys. Chem. A* 124 (6): 1121–1133.
- 27 Hernández Mancera, J.P., Núñez-Zarur, F., Gutiérrez-Oliva, S. et al. (2020). Diels–Alder reaction mechanisms of substituted chiral anthracene: a theoretical study based on the reaction force and reaction electronic flux. *J. Comput. Chem.* 41 (23): 2022–2032.

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	☐
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

- 28 Guzmán-Angel, D., Gutiérrez-Oliva, S., and Toro-Labbé, A. (2019). Hydrogenation and hydration of carbon dioxide: a detailed characterization of the reaction mechanisms based on the reaction force and reaction electronic flux analyses. *J. Mol. Model.* 25 (1): 16.
- 29 Herrera, B. and Toro-Labbé, A. (2007). The role of reaction force and chemical potential in characterizing the mechanism of double proton transfer in the adenine-uracil complex. *J. Phys. Chem. A* 111 (26): 5921–5926.
- 30 Duarte, F. and Toro-Labbé, A. (2011). The mechanism of H_2 activation by (amino)carbenes. *J. Phys. Chem. A* 115 (14): 3050–3059.
- 31 Martínez-Araya, J.I., Quijada, R., and Toro-Labbé, A. (2012). The mechanism of ethylene polymerization reaction catalyzed by group IVB metallocenes. A rational analysis through the use of reaction force. *J. Phys. Chem. C* 116 (40): 21318–21325.
- 32 Martínez, J. and Toro-Labbé, A. (2009). The reaction force. A scalar property to characterize reaction mechanisms. *J. Math. Chem.* 45 (4): 911–927.
- 33 Politzer, P., Toro-Labbé, A., Gutiérrez-Oliva, S., and Murray, J.S. (2012). Perspectives on the reaction force. In: *Advances in Quantum Chemistry*, (ed. E.J. Brändas) vol. 64, 189–209. Academic Press.
- 34 Gutiérrez-Oliva, S., Herrera, B., and Toro-Labbé, A. (2018). An extension of the Marcus equation: the Marcus potential energy function. *J. Mol. Model.* 24: 104.
- 35 Cerón, M.L., Echegaray, E., Gutiérrez-Oliva, S. et al. (2011). The reaction electronic flux in chemical reactions. *Sci. China Chem.* 54 (12): 1982–1988.
- 36 Vogt-Geisse, S. and Toro-Labbé, A. (2016). Chemical potential and reaction electronic flux in symmetry controlled reactions. *J. Comput. Chem.* 37 (19): 1794–1800.
- 37 Echegaray, E. and Toro-Labbé, A. (2008). Reaction electronic flux: a new concept to get insights into reaction mechanisms. Study of model symmetric nucleophilic substitutions. *J. Phys. Chem. A* 112 (46): 11801–11807.
- 38 Parr, R.G. and Yang, W. (1989). *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*. New York: Oxford University Press.
- 39 Geerlings, P., De Proft, F., and Langenaeker, W. (2003). Conceptual density functional theory. *Chem. Rev.* 103 (5): 1793–1874.
- 40 Parr, R.G., Donnelly, R.A., Levy, M., and Palke, W.E. (2003). Electronegativity: the density functional viewpoint. *J. Chem. Phys.* 68 (8): 3801–3807.
- 41 Janak, J.F. (1978). Proof that $\frac{\partial \epsilon}{\partial n_i} = \epsilon$ in density-functional theory. *Phys. Rev. B* 18: 7165–7168.
- 42 Koopmans, T. (1934). Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms. *Physica* 1 (1–6): 104–113.
- 43 Matute, R.A., Pérez, P., Chamorro, E. et al. (2018). Reaction electronic flux perspective on the mechanism of the Zimmerman Di- π -methane rearrangement. *J. Org. Chem.* 83 (11): 5969–5974.
- 44 Vogt-Geisse, S. and Toro-Labbé, A. (2009). The mechanism of the interstellar isomerization reaction $HOC^+ \rightarrow HCO^+$ catalyzed by H_2 : new insights from the reaction electronic flux. *J. Chem. Phys.* 130 (24): 244308. Gutiérrez-Oliva, Díaz and Toro-Labbé in., (Editors)

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	
☐	
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

- 45 Gutiérrez-Oliva, S., Díaz, S., and Toro-Labbé, A. (2021). Chemical reactivity in confined systems: theory, modelling and applications. In: *Unveiling the Mysterious Mechanisms of Chemical Reactions*, Chapter 5 (ed. P.K. Chattaraj and D. Chakraborty). Wiley. 81–98.
- 46 Ortega, D.E., Gutiérrez-Oliva, S., Tantillo, D.J., and Toro-Labbé, A. (2015). A detailed analysis of the mechanism of a carbocationic triple shift rearrangement. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17: 9771–9779.

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	
☐	
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

page proof

WILEY-VCH

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	☐
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	☐
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	

“keywords/abstract

Dear Author,

Keywords and abstracts will normally not be included in the print version of your chapter but only in the online version (if not decided differently by Wiley-VCH).

Thank you!”

Abstract

The study of the detailed processes that leads to the transformation of matter is very important for many reasons, including the understanding and controlling reactions that produce the fine chemicals present in all areas of human development such as pharmacy, medicine, food, materials, and agriculture. Thermodynamic, kinetic, and mechanism are the three key dimensions of chemical reactions that condition the feasibility of a chemical transformation: the first two deal with the energy and time involved in the reaction, and the third dimension is the reaction mechanism, the way in which the atoms belonging to a reacting molecule reorder to form a new molecule. In this chapter, we will concentrate on reaction mechanisms, probably the most important dimension for rationalizing chemical reactions; we will define descriptors for the evolution of the electronic activity involved in a chemical reaction and provide a protocol to analyze the whole transformation step by step. The theory of reaction mechanisms developed here will be complemented with some considerations on transition states and activation energies. In the search for more refined chemical analysis based on energetics and mechanism, mathematical expressions that are useful in describing and characterizing chemical reactions are provided. We think these equations may be used to feed machine learning infrastructures to access to much more complex reactions.

Keywords

reaction mechanisms; reaction electronic Flux; partition of REF