



50001469844

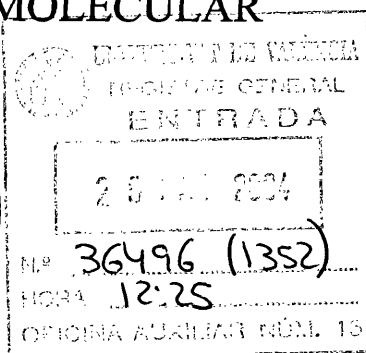
Biblioteca de Ciències



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

E

INSTITUTO DE CIENCIA MOLECULAR



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

CINC  
SEGLES 1999

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
BIBLIOTECA CIÈNCIES  
Nº Registre 22436  
DATA 24-06-04  
SIGNATURA  
TD-Q 00583  
Nº LIBIS: 1469844

TESIS DOCTORAL

24 cm,



**APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS  
QM/MM AL ESTUDIO DE  
REACCIONES EN MEDIOS  
CONDENSADOS**

ALEJANDRO JOSÉ SORIANO MARTÍNEZ  
Valencia, Marzo 2004

UMI Number: U607193

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607193

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346





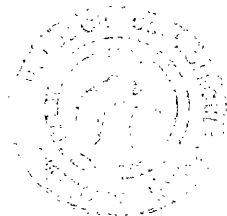


**Ignacio Nilo Tuñón García de Vicuña**, profesor titular de Química Física del departamento de Química Física de la Universitat de València,

**CERTIFICA:**

Que el trabajo con título **Aplicación de los métodos QM/MM al estudio de reacciones en medios condensados** ha sido realizado por **Alejandro José Soriano Martínez**, Licenciado en Ciencias Químicas por la Universitat de València, bajo mi dirección para optar al grado de Doctor en Química.

Así, **AUTORIZO** la presentación de este trabajo a efectos de seguir los trámites correspondientes en la Universitat de València.



Valencia, 24 de marzo de 2004.









A Mabel, a mi familia y a mis amigos.



# Índice

<b>Agradecimientos</b>	<b>III</b>
<b>Prefacio</b>	<b>VII</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Fundamentos Teóricos</b>	<b>5</b>
2.1. Las Herramientas Teóricas . . . . .	5
2.1.1. Los Métodos Híbridos QM/MM . . . . .	5
2.1.2. Explorando la Superficie de Energía Potencial . . . . .	15
2.1.3. Simulaciones Moleculares . . . . .	19
2.1.3.1. Dinámicas Moleculares . . . . .	19
2.1.3.2. Calculando Energías Libres . . . . .	23
2.2. Los Problemas Químicos . . . . .	28
2.2.1. La Transferencia Electrónica Disociativa . . . . .	29
2.2.1.1. La Teoría de Marcus . . . . .	30
2.2.2. La Catálisis Enzimática . . . . .	33
2.2.3. Interacciones moleculares del ADN . . . . .	41
<b>3. Objetivos</b>	<b>45</b>
<b>4. Resultados y Conclusiones</b>	<b>47</b>
4.1. La Transferencia Electrónica Disociativa . . . . .	47
4.1.1. Reducción Disociativa del Cloruro de Metilo . . . . .	47
4.1.2. Metodología . . . . .	48

---

4.1.3. Resultados . . . . .	49
4.1.4. Conclusiones . . . . .	64
4.2. Las Enzimas como Catalizadores . . . . .	66
4.2.1. 1,2-dicloroetano y Haloalcano deshalogenasa de <i>Xanto-</i> <i>bacter autotrophicus</i> . . . . .	66
4.2.2. Equilibrio Conformacional . . . . .	70
4.2.2.1. Metodología . . . . .	71
4.2.2.2. Resultados . . . . .	73
4.2.2.3. Conclusiones . . . . .	80
4.2.3. Deshalogenación Catalítica . . . . .	81
4.2.3.1. Metodología . . . . .	83
4.2.3.2. Resultados . . . . .	86
4.2.3.3. Conclusiones . . . . .	97
4.2.4. Trayectorias de Reacción . . . . .	98
4.2.4.1. Methodology . . . . .	101
4.2.4.2. Results . . . . .	104
4.2.4.3. Conclusions . . . . .	119
4.3. Interacciones Moleculares con el ADN . . . . .	122
4.3.1. ADN e Histamina . . . . .	122
4.3.2. Metodología . . . . .	125
4.3.3. Resultados . . . . .	130
4.3.4. Conclusiones . . . . .	137
4.4. Conclusiones Generales . . . . .	139
<b>5. Perspectivas y Continuidad</b>	<b>143</b>
<b>6. Programas empleados</b>	<b>149</b>
6.1. Programas de Cálculo . . . . .	149
6.2. Otros . . . . .	152
<b>Bibliografía</b>	<b>159</b>







# Agradecimientos

“No conozco a la mitad de ustedes, ni la mitad de lo que querría, y lo que yo querría es menos de la mitad de lo que la mitad de ustedes merece.”

*El señor de los anillos*

*La comunidad del anillo. J.R.R. Tolkien (1966)*

**H**ay mucha gente a la que quisiera agradecer su ayuda y apoyo durante estos últimos cuatro años (¡o más!). Me gustaría recordarles a todos que *el orden de los factores no altera el producto* y que listar por orden alfabético resulta un tanto aburrido.

- A Mabel Garrido y a mi familia, José Soriano, Bienvenida Martínez y Jéssica Soriano, por dejarme hacer siempre lo que he querido y aguantarme durante todos estos años de inactividad económica. Por darme la vida (algunos de ellos) y pasarla conmigo (todos ellos). Por soportar mi, a menudo, extraño carácter.
- A Estanislao Silla, Iñaki Tuñón y Juan Luis Pascual por darme la oportunidad de empezar a trabajar con ellos desde tercero de carrera. Por ser unos amigos además de unos jefes y por su inconmensurable paciencia con mi forma de trabajar. Quiero mencionar aquí a Jesús Pitarch, tesinero fallido que tanto me enseñara cuando todavía era yo un becario de colaboración. Jesús, ahora te toca a ti.
- A Sergio Martí (Xexo) por crear esas librerías que sólo él entiende de verdad y estar ahí para todos nosotros, solucionándonos la vida cada día con infinita paciencia y extraordinario humor.

- A Vicente Pérez por compartir conmigo infinitas horas frente a la máquina de café, frente a diversos programas de entorno gráfico avanzado y, en general, por ser alguien con quien se puede contar.
- A mis compañeros de despacho, Rafael Tortonda, Silvia Ferrer y Javier Ruiz, por hacer tan fácil la convivencia y ser tan pacientes con mi (repi-to de nuevo) extraña forma de ser. Por hacer que ir todos los días a trabajar sea un verdadero placer.
- A todos mis compañeros del departamento de Química Física, especialmente al grupo de becarios, por hacer tan agradables todos estos años pasados en el mismo. Ellos son: Julio Peiró, Jose Miguel Junquera, Víctor Ramírez, Pau Arroyo, Ximo Sanchís, Óscar Rubio y Rafael Soriano y ellas: Begoña Milián, Montserrat Ochando y Boutaina El Hadri.
- A Alejandro Gaita, por insistirme tanto para que hiciera esta tesis en L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X 2<sub>ε</sub> y por esas horas de discusiones científicas rayantes y linuxeras. Por ser un magnífico *padawan* y un mejor maestro.
- A Manolo Ruiz, por su amistad y por cuidarme mientras era un *forastero en tierra extraña*. Gracias por haberme acogido dos veces en su unidad de investigación en Nancy (Francia).
- A Francisco Javier Ramírez y Antonio Joaquín Ruiz, por acogerme tan bien en el departamento de Química Física en la Universidad de Málaga y por toda su ayuda en el trabajo del ADN.
- A Pablo Montañés, Alejandro Vázquez y Antonio Gris, por todas esas horas invertidas en el “piso” y esas conversaciones intrascendentes y rayantes mantenidas durante las horas de baja moral ante la proximidad de los exámenes.
- A mis compañeros del instituto en Xirivella: Antonio Lladró y Javier Pelleric, por todo esos “inolvidables” momentos que hemos tenido a bien el disfrutar juntos y de los cuales contaremos batallitas el resto de nuestros días.

- A todos mis amigos, que hacen que la vida fuera de la universidad sea algo más que tele-basura y libros de ciencia ficción: Jose Ramón Barreiro, Ana Solbes, Ana de Paco, Eva Gómez, Guillem Brocal, Silvia Rubio, Cristina Toledo, Nieves Toledo, Jose Urizar, Yolanda Falcó, Lorena Rosaleny, Felicidad Martínez, Jorge “feo”, Cuca Brocal, Víctor Rams y Salva Mateu.
- A toda la gente de la UJI, por su acogida durante tantos y tantos viajes de exploración a su sala de pantallas y visitas a la cantina: Juan Andrés, Vicente Moliner, Raquel Castillo, Maite Roca y Lourdes Gracia.
- A todos los demás que me dejo por poner, pero que ellos saben quienes son y a toda mi familia al completo.



# Prefacio

“La frase más excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es “¡Eureka!” (¡Lo encontré!) sino “Es extraño...””

*Isaac Asimov (1920-1972)*

“La suerte favorece a las mentes preparadas”

*Louis Pasteur (1822-1895)*

A lo largo de la historia, la ciencia ha avanzado gracias al esfuerzo de muchos científicos, movidos por la fuerza de su curiosidad. Muchos de ellos fueron calificados como locos por la gente de la sociedad que les tocó vivir. Las primeras teorías nacieron de la simple observación de los fenómenos naturales y, a menudo, se recurría a interpretaciones más bien esotéricas o sobrenaturales que científicas. Dicen que la genialidad no reside en una magnífica memoria o en una gran capacidad para realizar complicados cálculos mentales, sino en la facultad de establecer relaciones entre hechos en apariencia independientes. A lo largo de la historia de la ciencia, algunos de los descubrimientos más famosos se han realizado a partir de afortunadas observaciones de hechos casuales.

Una de las anécdotas científicas más divertidas que conozco es la que le ocurrió a Arquímedes (287-212 a.C.), y demuestra cómo la observación de un hecho cotidiano puede llevar a la mente del científico hacia su meta. El rey de Siracusa, Hierón II, había mandado a un orfebre que realizara una corona de oro. Le entregó el oro necesario para su realización y el orfebre hizo una magnífica corona, cuyo peso era el correcto. No obstante, el rey de Siracusa sospechaba que el orfebre había añadido plata u otro material menos noble a la corona, quedándose él el oro sobrante. Hierón le pidió a Arquímedes que averiguase si eso era cierto, pero con la condición de no dañar la corona. Estando un día en los baños públicos,

Arquímedes observó que su cuerpo era afectado por una fuerza ascendente la cual aumentaba hasta un máximo que se producía cuando se encontraba completamente sumergido. Reconociendo de inmediato el valor de esta observación y movido por la alegría del descubrimiento salió, desnudo como estaba, corriendo en dirección a su casa mientras gritaba: ¡Eureka! ¡Eureka! (que significa ¡Lo encontré!). Resta tan sólo decir que logró establecer el fraude del orfebre (aunque en la historia no queda dicho cómo).

Éste no es un hecho aislado en ciencia. En 1928 un médico y bacteriólogo escocés volvió de sus vacaciones de nuevo a su despacho. Antes de su marcha, había estado trabajando con cultivos de *Staphylococcus Aureus* en placas Petri y las había dejado olvidadas, apiladas en su despacho. Cuando estaba tirándolas a la basura observó que una de las placas se había contaminado y en ella estaba creciendo un hongo. Le llamó fuertemente la atención que alrededor de ese hongo había una zona en la que no crecían los estafilococos. Lo que vio le hizo sospechar lo que ahora parece obvio, que el hongo estaba produciendo alguna sustancia que inhibía el crecimiento bacteriano. El médico se llamaba Alexander Fleming (1881-1955) y acababa de descubrir la *penicilina*. Esta observación casual ha salvado la vida a millones de personas en todo el mundo.

Dejando de lado lo gracioso del primer ejemplo, estos dos hechos tienen algo en común: las personas que los vivieron fueron capaces de establecer las relaciones oportunas, bien por genialidad, bien por su preparación, y extrajeron las conclusiones menos obvias, pero más acertadas. Casos de este tipo los hay a decenas en la historia de la ciencia. No hay que restarles mérito por eso, al igual que en la famosa historia del “huevo de Colón”, hacerlo por primera vez siempre es más difícil. La ciencia ha avanzado mucho gracias a este tipo de personas y son sus nombres los que han quedado escritos en la historia humana.

Hoy en día, el modelo científico es muy distinto al que existía en tiempos de Arquímedes. Los científicos no trabajan solos, sino en grupos de investigación, y comunican sus resultados al resto de la comunidad científica por medio de publicaciones especializadas. El desarrollo de la ciencia básica ha sucumbido un poco a una visión más práctica de la misma (o más comercial, según se mire), quedando la primera relegada a un segundo plano. Afortunadamente, las Universidades y diversas instituciones públicas siguen desarrollando ciencia básica. En este tipo de trabajo científico, la probabilidad de realizar una observación casual sobre

un efecto y que eso de lugar a un descubrimiento de gran magnitud es hoy en día menor. El trabajo que se realiza en las universidades por separado quizá no sea tremendamente importante, pero es un bloque más para la construcción de un conjunto con el que, con el tiempo, se podrán explicar los aspectos de la naturaleza que hoy en día nos intrigan.

El trabajo realizado en esta tesis no es revolucionario. No he realizado ninguna observación feliz que me lleve a ganar un premio Nóbel. No he descubierto el factor clave de una aplicación tecnológica de millonarias aplicaciones. Pero pienso que he añadido mi bloque al conjunto... y me siento muy orgulloso de ello.





# Capítulo 1

## Introducción

**PA:** Hoy uno de los hermanos me preguntó : ¿Es una prisión tan terrible no poder moverte del lugar donde estás?

**RC:** Y respondiste...

**PA:** Le dije que soy más libre que él. La incapacidad de moverme me libra de la obligación de actuar.

**RC:** Los que habláis lenguajes sois unos mentirosos.

*Diálogo entre un Padre Árbol y la Reina Colmena  
Ender el xenocida. Orson Scott Card (1991)*

**D**urante años, los químicos teóricos han estudiado procesos químicos (equilibrios conformacionales, geometrías de equilibrio, transiciones electrónicas, reacciones, etc.) en el vacío. Sin embargo, es bien sabido que lo que rodea a nuestro sistema de estudio, lo que llamamos el *medio*, puede afectar sustancialmente al proceso químico que tiene lugar en su seno. Los efectos del medio pueden influir de tal forma en un proceso químico que determinan factores como la velocidad, la energía de reacción y las poblaciones relativas de isómeros estructurales y ópticos.

Existen reacciones que no se producen en fase gas en cantidad apreciable y que, sin embargo, son incluso exotérmicas cuando la reacción se lleva a cabo en disolución como, por ejemplo, la reacción de Menshutkin. La transferencia de carga que se produce durante la reacción hace que los productos estén eléctricamente cargados, mientras que los reactivos son neutros. Si la reacción tiene lugar en fase gas, donde la separación de cargas es un proceso desfavorable, el proceso es tan endotérmico que la reacción no tiene lugar. Sin embargo, en disolución acuosa,

las cargas formadas durante la reacción son fácilmente estabilizadas por el medio polar, de forma que la reacción puede llegar a ser exotérmica. *Un cambio de medio puede alterar el perfil energético de un proceso químico.*

Los efectos del medio también son esenciales para la vida. Toda la información necesaria para el correcto funcionamiento de un ser vivo se encuentra en la molécula de *ácido desoxirribonucleico (ADN)*. El ADN contiene, codificadas en su secuencia, las instrucciones para crear todas las proteínas de un organismo, las cuales controlan las reacciones químicas necesarias para el correcto funcionamiento de todos los procesos bioquímicos del mismo. De todas las funciones que llevan a cabo las proteínas, una de las más importantes está íntimamente relacionada con los efectos del medio. Existen unas proteínas especiales que poseen capacidad catalítica (esto es, pueden controlar la velocidad de una reacción química) que reciben el nombre de *enzimas*. Las enzimas pueden llegar a acelerar una reacción miles e incluso millones de veces. Además de la velocidad, las enzimas son capaces de producir reacciones en las que se controlan la estereoselectividad y la enantioselectividad, produciendo productos puros en lugar de mezclas racémicas. Este increíble control de las reacciones pasa por proporcionar un medio alternativo y totalmente específico de reacción. Este cambio de medio suele provocar una reducción de la energía de activación. Para ello es necesaria la formación de un complejo en el que el sustrato se aloja en una cavidad de la enzima especialmente diseñada para ello: el *centro activo*. Todos los residuos de aminoácidos que forman esa cavidad están dispuestos de tal forma que interaccionan con el sustrato enzimático en la manera exacta en la que la reacción global resulta catalizada. *Un medio adecuado puede controlar un proceso químico*

Millones de años de evolución han jugado un papel decisivo en la capacidad catalítica de las enzimas. Ningún catalizador creado por el hombre puede compararse en factores tales como la eficiencia, la especificidad o la tasa de recambio. También son envidiables las condiciones suaves en las cuales realizan su función; normalmente a presión atmosférica y temperatura corporal o ambiente. Un ejemplo ilustrativo: el problema de la fijación del nitrógeno atmosférico. El nitrógeno es necesario para la biosíntesis de ácidos nucleicos y aminoácidos y existe abundantemente en nuestra atmósfera en forma de molécula diatómica. Su reducción a estados más útiles biológicamente es un proceso necesario para renovar el nitrógeno perdido por medio de otros mecanismos, pero su triple enlace la convierte en

una molécula muy estable. A nivel industrial se utiliza el método de Haber-Bosch (1909) para producir amoníaco a partir de nitrógeno ( $N_2$ ) e hidrógeno ( $H_2$ ) gaseosos. En este método se hace uso de un catalizador metálico finamente dividido e inmovilizado sobre un soporte (generalmente hierro, cobalto o níquel sobre alúmina). Para obtener un rendimiento del 17 % es necesario que la temperatura sea de entre 400 - 700 grados celsius y la presión de entre 200 - 400 atmósferas. Sin embargo, en la naturaleza existen bacterias que realizan el mismo proceso a temperatura y presión ambientales: se las conoce como *bacterias nitrificantes*. Estas bacterias poseen un complejo enzimático denominado *nitrogenasa* que se encarga de reducir el nitrógeno gaseoso a amoníaco. El complejo nitrogenasa está formado por dos metaloproteínas que acoplan la reducción del nitrógeno con la hidrólisis de moléculas energéticas (ATP<sup>1</sup>). El rendimiento de esta enzima ronda el 75 %, pues invierte algunos electrones en una reducción de protones durante el mecanismo de reacción. Con estos datos delante, resulta evidente que la nitrogenasa es un catalizador muchísimo más efectivo que el catalizador industrial del método de Haber-Bosch. Es por tanto muy deseable poder llegar a diseñar catalizadores sintéticos con un poder catalítico comparable al enzimático. Este objetivo pasa por llegar a comprender los mecanismos de la catálisis enzimática. Si supiéramos con precisión la forma en la que las enzimas catalizan las reacciones químicas, podríamos soñar con diseñar nuestros propios catalizadores. Estos catalizadores de diseño podrían solucionar muchos problemas de la síntesis de compuestos a nivel industrial, otorgándonos un control mucho mayor que el que se tiene en la actualidad. Podrían sintetizarse, por ejemplo, compuestos con actividad farmacológica con unos costes mucho más reducidos, lo que repercutiría en el precio del producto final. O sintetizar productos orgánicos complejos por rutas sintéticas hasta hoy inabordables debido a la dureza de las condiciones en las que son llevadas a cabo.

El estudio de los efectos del medio es una tarea compleja, aún con la capacidad de cálculo actual. El gran número de partículas que intervienen hacen muy difícil su tratamiento riguroso, por lo que se han de hacer uso de modelos simplificados para llevarlo a cabo. En esta tesis se ha abordado el estudio de estos efectos, mediante el uso y desarrollo de los métodos más apropiados en cada caso.

---

<sup>1</sup>Adenosín trifosfato



# Capítulo 2

## Fundamentos Teóricos

### 2.1. Las Herramientas Teóricas

“Divide et vinces”

*Locución latina*

*Divide y vencerás*

#### 2.1.1. Los Métodos Híbridos QM/MM

La mecánica cuántica nos proporciona unas excelentes herramientas para el estudio del mundo microscópico. La aplicación de los principios de la mecánica cuántica al estudio de los procesos químicos recibe el nombre de *química cuántica* y es una disciplina que ha experimentado un notable desarrollo en el pasado siglo, propiciado sobre todo por el vertiginoso avance de la informática, a la que está íntimamente ligada. La química cuántica ha sido usada como herramienta de estudio de átomos, moléculas y de las reacciones que se producen entre ellas, proporcionando resultados de gran calidad (en comparación con los datos experimentales). Sin embargo, aunque sería la solución ideal, la aplicación de esta metodología al estudio de reacciones en medios condensados está todavía lejos de ser factible. La resolución de las ecuaciones mecano-cuánticas requiere de una capacidad computacional elevada que crece rápidamente con el número de átomos. De esta forma, mientras calcular la energía interna de una molécula de agua en el vacío es un cálculo que puede durar desde unos pocos segundos a unas cuantas horas (en función del método de cálculo y el ordenador elegido), realizar

el mismo cálculo para  $10^3$  moléculas de agua resulta en un problema prácticamente inabordable, incluso empleando los métodos de menor demanda computacional (los *métodos semiempíricos*<sup>1</sup>).

Otra posibilidad es enfocar el estudio de procesos en fases condensadas desde un punto de vista clásico. Los métodos de Mecánica Molecular, basados en campos de fuerzas, nos permiten el estudio de sistemas con un número elevado de átomos, con un consumo aceptable de tiempo de cálculo (lo que llamamos tiempo de CPU<sup>2</sup>). En este tipo de metodología, se emplean funciones analíticas de energía potencial para describir las interacciones entre los diferentes tipos de átomos. El principal problema de esta metodología reside en que no se trata de forma explícita la estructura electrónica, es decir, no podemos describir procesos tales como la formación y/o rotura de enlaces.

Si analizamos nuestro problema de estudio, reacciones en medios condensados, observamos que siempre podemos dividir nuestro sistema en dos partes que se influyen mutuamente. Por un lado tenemos la parte en la que se da el proceso químico propiamente dicho, en el que se produce rotura y/o formación de enlaces. Por otro lado, tenemos un medio que no participa directamente en la reacción pero que influye de forma decisiva en la misma. Expuesto de esta forma, resulta claro que, si combinamos el uso de la mecánica cuántica (QM) con el uso de la mecánica molecular (MM), podremos abordar el estudio de procesos químicos que tienen lugar en medios condensados de una manera más sencilla. Esta nueva metodología, nacida de la combinación de las otras dos, recibe el poco original pero preciso nombre de *metodología híbrida QM/MM*.

En la figura 2.1 se observa el fundamento de trabajo para este tipo de metodología. El sistema de estudio se divide en dos subsistemas que llamamos subsistema QM y subsistema MM. El subsistema QM será tratado haciendo uso de la mecánica cuántica, mientras que el MM será tratado con los métodos de mecánica molecular. Lo que se ha llamado contorno en el dibujo resume una serie de restricciones aplicadas al modelo debido a la imposibilidad de simular un sistema infinito. No existe una regla formal para separar ambos subsistemas, pero si

---

<sup>1</sup>En los métodos semiempíricos no se resuelven analíticamente todas las integrales, sino que algunas se substituyen por parámetros. Estos parámetros provienen normalmente de ajustes con datos experimentales, de ahí su nombre.

<sup>2</sup>Siglas inglesas de Unidad Central de Proceso

podemos dar una serie de recomendaciones [1]:

- Cualquier enlace que vaya a ser formado o roto debe permanecer entero en la región QM.
- Cualquier sección que cambie su hibridación debe permanecer entera en la región QM.
- Deben mantenerse las secciones aromáticas o conjugadas del sistema completamente en una región
- Cuando se espera que los efectos de segundos o terceros átomos sean importantes, esos átomos deben estar en la misma región del cálculo.
- En los métodos QM/MM no se permite la transferencia de carga entre las diferentes regiones del sistema. De esta forma, la partición no debe dividir secciones entre las que se espere una separación de cargas.

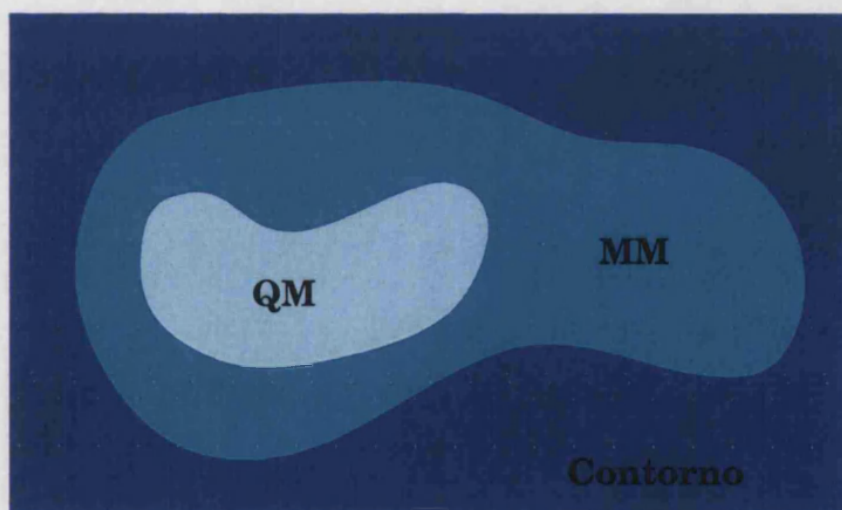


Figura 2.1: Partición del sistema químico en distintas regiones.

El subsistema QM contiene núcleos y electrones. La función de onda de los electrones del subsistema QM depende de las coordenadas de los electrones ( $\vec{r}_i$ ) y, paraméricamente, de las posiciones de los núcleos cuánticos ( $\vec{R}_\alpha$ ) y clásicos ( $\vec{R}_\omega$ ):

$$\Phi(\vec{r}_i; \vec{R}_\alpha, \vec{R}_\omega) \quad (2.1)$$



Partiendo de la aproximación de Born-Oppenheimer y asumiendo que no existe transferencia de carga entre ambos subsistemas, el hamiltoniano efectivo del conjunto puede ser separado en tres términos:

$$\hat{H}_{eff} = \hat{H}_{QM} + \hat{H}_{QM/MM} + \hat{H}_{MM} \quad (2.2)$$

donde  $\hat{H}_{QM}$  es el hamiltoniano del subsistema cuántico,  $\hat{H}_{MM}$  da cuenta de las interacciones entre los átomos del subsistema clásico y  $\hat{H}_{QM/MM}$  es el encargado de acoplar los dos subsistemas, dando cuenta de las interacciones entre ambos. Los términos correspondientes a las condiciones de contorno deberían estar incluidos en la ecuación 2.2, pero forman parte del proceso de cálculo, así que hablaremos de ellos más adelante.

El **primer término** de la ecuación 2.2 es el hamiltoniano del subsistema QM en vacío, esto es, es la suma de la energía cinética de los electrones ( $\hat{\mathcal{K}}_i$ ) y las energías potenciales de interacción electrón-electrón ( $\hat{\mathcal{U}}_{ii}$ ), electrón-núcleo ( $\hat{\mathcal{U}}_{i\alpha}$ ) y núcleo-núcleo ( $\mathcal{U}_{\alpha\alpha}$ ):

$$\hat{H}_{QM} = \hat{\mathcal{K}}_i + \hat{\mathcal{U}}_{ii} + \hat{\mathcal{U}}_{i\alpha} + \mathcal{U}_{\alpha\alpha} \quad (2.3)$$

El **segundo término** recoge, en la expresión del hamiltoniano  $\hat{H}_{QM/MM}$ , el acoplamiento entre ambos subsistemas. Podemos expresar este hamiltoniano como la suma de tres términos: la contribución electrostática, la de van der Waals y la de polarización.

$$\hat{H}_{QM/MM} = \hat{H}_{QM/MM}^{Elec} + \hat{H}_{QM/MM}^{vdW} + \hat{H}_{QM/MM}^{Pol} \quad (2.4)$$

El término de polarización,  $\hat{H}_{QM/MM}^{Pol}$ , representa la polarización instantánea de las moléculas del subsistema clásico debido a un cambio en la función de onda del subsistema cuántico. Puesto que cambiar las cargas clásicas alteraría la función de onda cuántica, este término habría que resolverlo de forma autoconsistente. En general, se suele obviar este término, que resulta particularmente importante a la hora de realizar estudios sobre los efectos del medio en los espectros electrónicos. No obstante, existen programas [2, 3] en los que la polarización sí está implementada.

Teniendo en cuenta esto, podemos desarrollar el hamiltoniano de la ecuación 2.4 hasta su forma habitual (en unidades atómicas):

$$\hat{H}_{QM/MM} = \sum_i \sum_{\omega} \frac{q_{\omega}}{r_{i\omega}} + \sum_{\alpha} \sum_{\omega} \frac{Z_{\alpha} q_{\omega}}{R_{\alpha\omega}} + \left[ \frac{A_{\alpha\omega}}{R_{\alpha\omega}^{12}} - \frac{B_{\alpha\omega}}{R_{\alpha\omega}^6} \right] \quad (2.5)$$

donde  $q_\omega$  es la carga de los átomos clásicos y  $Z_\alpha$  es la carga nuclear de los átomos cuánticos.  $A_{\alpha\omega}$  y  $B_{\alpha\omega}$  son los parámetros de un potencial 6-12 de Lennard-Jones que modela las interacciones de van der Waals. Estos parámetros dependen sólo del tipo de hibridación del átomo cuántico, por lo que son completamente transferibles de un sistema a otro. Por otro lado, el primer término de la ecuación 2.5 hace uso de las coordenadas electrónicas, por lo que aparecerá en forma de integral electrónica entre dos centros en el ciclo SCF (será resuelto junto al hamiltoniano cuántico). La forma final de esta ecuación está sometida también a la elección del método de cálculo del subsistema cuántico, sobre todo cuando se emplean métodos semiempíricos [4], ya que usan formas modificadas para representar las interacciones electrostáticas.

El **tercer término** de la ecuación 2.2 da cuenta de la energía de interacción entre los átomos clásicos. En Mecánica Molecular, se substituyen los átomos por cargas puntuales, dotadas de parámetros de van der Waals, que sirven para evaluar las interacciones entre átomos que no están unidos por un enlace. Para representar los enlaces, ángulos y dihedros se utilizan funciones de energía potencial, que dependen de constantes de fuerza y valores de equilibrio. Al conjunto de estas funciones y de los parámetros se le denomina *campo de fuerza*. De forma general<sup>3</sup> podemos escribir:

$$\begin{aligned}\hat{H}_{MM} &= \mathcal{U}_{MM} = \mathcal{U}_{ENLACE} + \mathcal{U}_{NO\ ENLACE} \\ \mathcal{U}_{ENLACE} &= \mathcal{U}_{Enlaces} + \mathcal{U}_{\text{Ángulos}} + \mathcal{U}_{\text{Dihedros}} \\ \mathcal{U}_{NO\ ENLACE} &= \mathcal{U}_{\text{Electrostático}} + \mathcal{U}_{\text{van der Waals}}\end{aligned}\quad (2.6)$$

La forma genérica de los términos  $\mathcal{U}_{ENLACE}$  suele ser de tipo cuadrático (correspondiente a un potencial armónico), mientras que para los términos de  $\mathcal{U}_{\text{Electrostático}}$  y  $\mathcal{U}_{\text{van der Waals}}$  se suelen emplear las expresiones de Coulomb y de Lennard-Jones, respectivamente. Los términos de  $\mathcal{U}_{NO\ ENLACE}$  no se calculan para todos los pares de átomos, sino sólo para aquellos pertenecientes a distintas moléculas o separadas por al menos 3 enlaces. Así, se eliminan del cálculo de no enlace las contribuciones de átomos directamente enlazados (interacciones 1-2, ver figura 2.2) y las de aquellos separados por dos enlaces (interacciones 1-3). Las interacciones 1-4, las de aquellos átomos separados por tres enlaces, se calculan o no

<sup>3</sup>La forma específica depende del campo de fuerzas que estemos empleando

en función del campo de fuerzas empleado, pero se suele escalar la interacción multiplicándola por un factor. La razón de este especial tratamiento de las interacciones 1-4 es debido a que la combinación de términos de enlace de ángulo dihedro y términos de interacción electrostáticos y Lennard-Jones es lo que determina la barrera de rotación alrededor de un enlace.

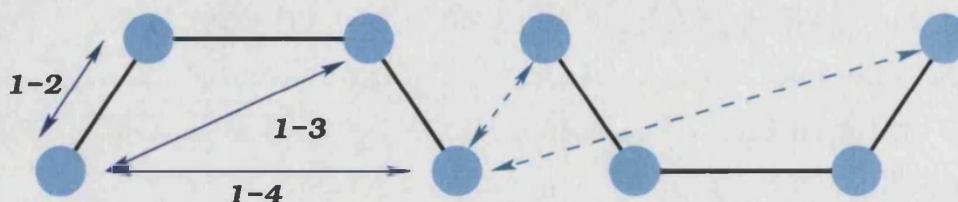


Figura 2.2: Ejemplos de interacciones 1-2, 1-3 y 1-4 en una molécula modelo. Con línea discontinua las interacciones intermoleculares.

El origen de los parámetros de estos campos de fuerzas puede ser muy variado. En función del origen se pueden agrupar en dos tipos básicos: campos de fuerza experimentales y *ab initio*. Los campos de fuerza experimentales están caracterizados porque los parámetros que utilizan provienen de ajustes con datos experimentales (constantes de fuerza provenientes de espectros de vibración, valores de equilibrio de datos cristalográficos, etc.). Por otro lado, en los campos de fuerza *ab initio* estos parámetros se obtienen por medio de cálculos mecano-cuánticos sobre sistemas modelo.

Falta por discutir un término que no aparece de forma explícita en la ecuación 2.2 pero del que ya hemos mencionado algo, el **contorno** (ver figura 2.1). Tal y como hemos dicho antes, la región denominada contorno aparece en la figura debido a la imposibilidad de simular una disolución infinita. De forma explícita sólo es posible representar una pequeña porción del disolvente, por lo que las interacciones de larga distancia, como las de tipo electrostático, que decrecen lentamente con la distancia ( $\propto r^{-2}$ ) no estarían adecuadamente representadas. Este problema puede resolverse utilizando diferentes técnicas:

- Condiciones de contorno **deformables** [5]. En esta técnica se aplica un potencial de tipo radial a determinados átomos de las moléculas del disolvente (por ejemplo, el oxígeno en el caso del agua). La forma de este potencial hace que la fuerza que aplica sobre los átomos sea mayor conforme aumente la distancia al origen del potencial, llegando incluso a congelar las posiciones

de los átomos más alejados, pero de modo que continúa siendo posible su reorientación. Con esto se intenta evitar la aparición de algunos efectos no deseados, como la evaporación de moléculas de solvente (las moléculas externas se alejan del soluto) o todo lo contrario, que se produzca un aumento de la tensión superficial (las moléculas de solvente colapsan sobre las capas de moléculas internas, disminuyendo el volumen final del sistema). Estos efectos modifican la densidad del medio y, por tanto, la representatividad del modelo.

- Condiciones de contorno **periódicas** [6]. En este caso la celda unidad (formada por el soluto más las moléculas de solvente) es repetida periódicamente en el espacio por translación en las tres dimensiones (figura 2.3). Las moléculas de la celda unidad interactúan con las imágenes, simulando de esta forma la presencia de una disolución a través de interacciones de larga distancia. La celda unidad más sencilla y usada es un cubo, debido a su simplicidad geométrica, pero se han usado también otro tipo de polihedros (dodecahedro [7] y octaedro truncado [8])

Otro factor que afecta a la energía pero que está más relacionado con estrategias de tipo computacional es el empleo de distancias de corte (en inglés *cutoff*). Estos cortes afectan sobre todo a los términos de  $U_{NOENLACE}$ , debido al coste computacional que implica calcular todos los pares interaccionantes en sistemas formados por miles de átomos. Si una molécula interaccionase con todas sus imágenes el sumatorio tendría infinitos términos, lo cual es imposible de calcular en la práctica. Una posible solución sería usar sólo aquellas celdas replicadas más cercanas, lo que se llama el “convenio de la imagen mínima” (usado por primera vez por Metropolis *et al* [9]), pero aún así, sigue siendo un cálculo muy pesado. Una forma de mejorar esta situación es utilizar un *cutoff* esférico, ya que las contribuciones más importantes a las fuerzas y energía potencial vienen de las moléculas que rodean al soluto. Algunas de las posibles opciones, representadas en la figura 2.4, para la forma de este *cutoff* son:

- **Truncado**, en la que se obvia toda interacción a partir de un determinado valor de la distancia. Aunque se trata del método más sencillo, no es el más adecuado, dado que introduce discontinuidades en la función de energía y en

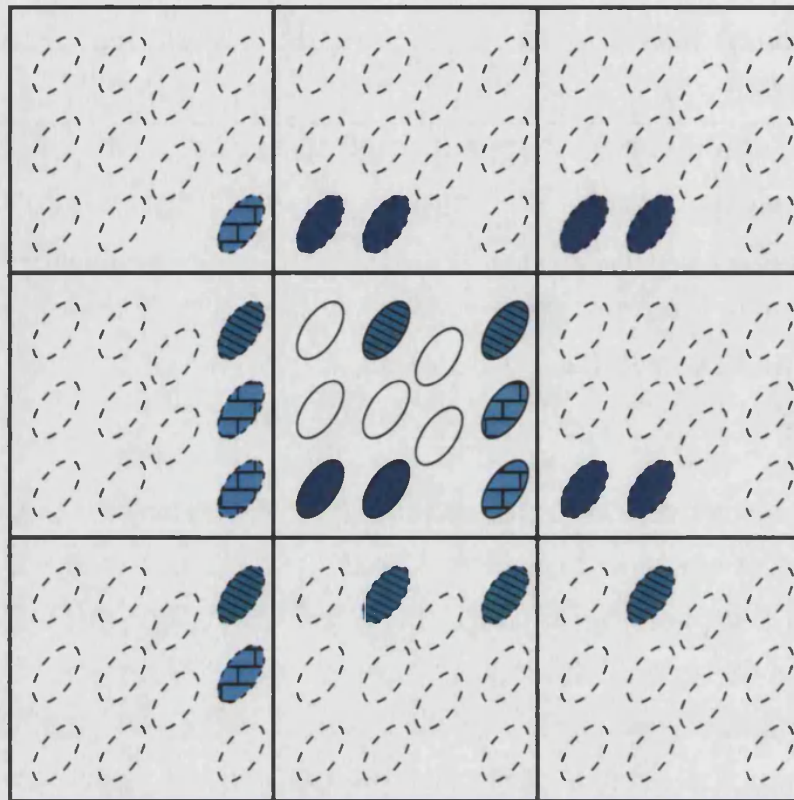


Figura 2.3: Representación esquemática en dos dimensiones de las interacciones entre la celda unidad (en el centro) y las distintas imágenes replicadas.

sus derivadas (pequeños desplazamientos de los núcleos variarán el número de interacciones total). Dichas discontinuidades afectan a los procesos de búsqueda y localización de puntos estacionarios, así como a las dinámicas moleculares.

- Suavizado.** La alternativa al truncado es el empleo de funciones (a modo de factores multiplicativos) que, a partir de un determinado valor de la distancia, produzcan una caída suave del valor de la energía de interacción. Entre las distintas opciones, dos de las más adoptadas son la función de conmutación (o *switch function*), y la de desplazamiento (o *shift function*). La primera emplea en su definición dos radios de corte,  $r_{in}$  y  $r_{out}$ , entre los que se produce el decaimiento de la función. Toda aquella distancia mayor

que  $r_{out}$ , se elimina del conjunto de interacciones a calcular:

$$f_{switch}(r, r_{in}, r_{out}) = \begin{cases} 1 & r \leq r_{in} \\ \frac{(r_{out}^2 - r^2)^2 (r_{out}^2 + 2r^2 - 3r_{in}^2)}{(r_{out}^2 - r_{in}^2)^3} & r_{in} < r \leq r_{out} \\ 0 & r > r_{out} \end{cases} \quad (2.7)$$

En el caso de la función de desplazamiento, se recurre únicamente a un radio de corte  $r_c$ , por lo que el suavizado se aplica a todo el rango de distancias válidas (menores que  $r_c$ ), hasta que finalmente cae a cero:

$$f_{shift}(r, r_c) = \begin{cases} \left[ 1 - \left( \frac{r}{r_c} \right)^2 \right]^2 & r \leq r_c \\ 0 & r > r_c \end{cases} \quad (2.8)$$

Ambas opciones proporcionan una variación continua de la energía, así como de su primera derivada.

Se trata, pues, de realizar una elección adecuada de modo que contemple un compromiso entre precisión y duración del cálculo.

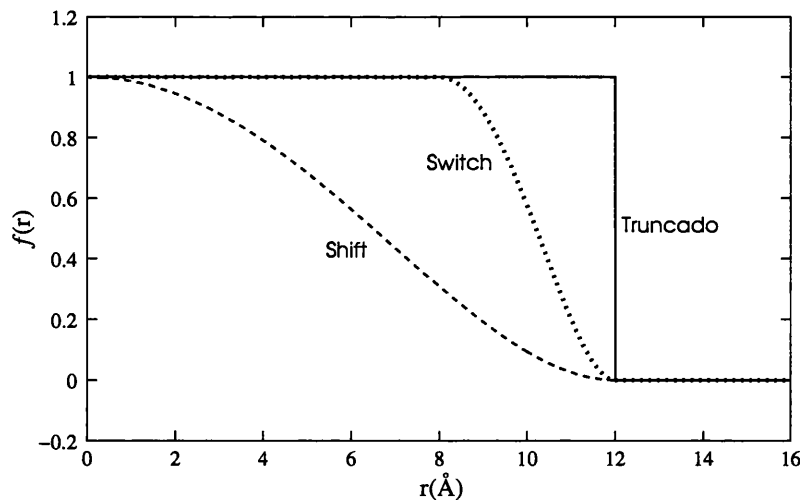


Figura 2.4: Representación gráfica de las distintas alternativas al problema del cutoff: truncado ( $r_c = 12\text{Å}$ ), switch function ( $r_{in} = 8\text{Å}$ ,  $r_{out} = 12\text{Å}$ ) y shift function ( $r_c = 12\text{Å}$ ).

Resta tan sólo mencionar una peculiaridad de estos métodos que se produce a la hora de definir los subsistemas. En ocasiones, nos interesa incluir parte del

entorno en el subsistema cuántico, bien porque participa en la reacción de forma directa o bien porque nos interesa estudiar el efecto polarizante de una molécula del entorno en el sistema reactivo. Esto resulta trivial cuando estudiamos reacciones en disolución, ya que introducir una molécula de disolvente en la parte cuántica sólo tiene el inconveniente de aumentar el tiempo de cálculo. Sin embargo, deja de ser evidente cuando estamos trabajando en sistemas enzimáticos. Muchas veces necesitaremos introducir un residuo en el subsistema cuántico, lo que implica romper el enlace que lo une al resto de la proteína. Si hacemos esto, tendremos que satisfacer de alguna forma la valencia del átomo cuántico cuyo enlace hemos roto (lo que se denomina enlace frontera). En la actualidad existen básicamente dos métodos para realizar dicha partición:

- Métodos basados en el formalismo del campo local auto-consistente (*LSCF*) [10, 11], excluyen del cálculo SCF el orbital del átomo cuántico que forma parte del enlace frontera, permaneciendo congelado durante todo el proceso de optimización. Tanto los coeficientes que definen el orbital congelado como su población electrónica, han de ser determinados previamente empleando cálculos cuánticos de modelos reducidos.
- Métodos que emplean átomos adicionales de unión (*Link Atoms*). En éstos, las valencias de los átomos cuánticos afectados por el corte se saturan empleando átomos de unión (que serán a su vez incluidos en el subsistema cuántico), de modo que sustituyan a la región MM del enlace frontera (figura 2.5). Las características que han de presentar los átomos de unión no están completamente establecidas, variando tanto su naturaleza como el tipo de interacciones que le son permitidas con el entorno clásico. En lo que respecta al tipo de átomo, éste debería ser capaz de reproducir en cierta medida las propiedades (tanto eléctricas como estéricas) del grupo al que sustituye. A pesar de ello, de entre las distintas opciones, la más común es el empleo de átomos de hidrógeno. En cuanto al tipo de interacción, el planteamiento original excluye toda interacción del átomo de unión con el subsistema clásico [12, 13], aunque estudios recientes han demostrado que se obtienen mejores resultados si se le permite interactuar electrostáticamente, participando en el término  $\hat{H}_{QM/MM}^{Elec}$  [11]. Dicha mejora es debida a que este átomo link induce falsos efectos de polarización en el átomo QM del enlace

frontera.

En cualquier caso, es importante mencionar que los enlaces frontera deben estar lo más lejos posible de la zona reactiva, para evitar que el empleo de alguna de las dos aproximaciones anteriores ejerza algún tipo de influencia.

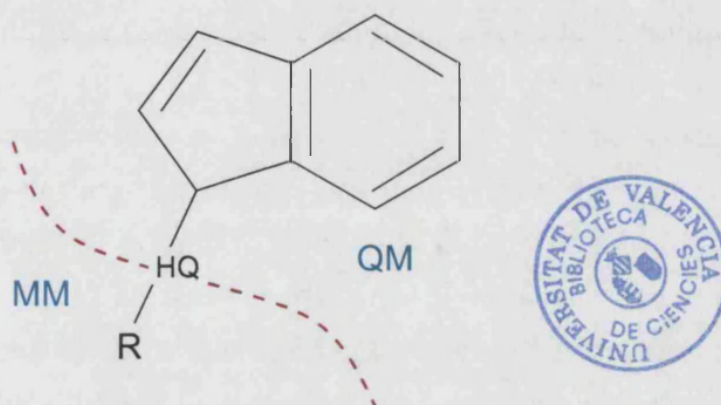


Figura 2.5: Empleo de *Link Atoms* en el tratamiento de los enlaces frontera entre las regiones QM y MM.

### 2.1.2. Explorando la Superficie de Energía Potencial

Una de las aproximaciones más importantes en la química cuántica es la de Born-Oppenheimer [14]. Esta aproximación permite la separación del movimiento nuclear del electrónico, lo que facilita la resolución de la correspondiente ecuación de Schrödinger. La justificación para lo que *a priori* parece una aproximación tan drástica es sencilla: existe una gran diferencia de masa entre núcleos y electrones (el núcleo más ligero, constituido por un único protón, pesa 1836 veces más que un electrón), con lo que el movimiento de unos y otros puede ser considerado de modo independiente.

Si usamos dicha aproximación en la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo (aplicable a sistemas no relativistas en estado estacionario) podemos expresar la función de onda y la energía del sistema electrónico como una función paramétrica de las posiciones de los núcleos. Es decir, para cada configuración nuclear se obtiene una solución para el sistema electrónico, que depende de las coordenadas de los núcleos ( $\vec{R}_\alpha$  y  $\vec{R}_\omega$ ). Al ir variando dichas coordenadas surge la Superficie de Energía Potencial (SEP), como suma de la energía electrónica y la repulsión nuclear.



Definida de esta forma, la SEP para una molécula diatómica tiene una forma geométrica simple, ya que queda definida por un sólo parámetro (la distancia entre los dos núcleos). Explorar esta superficie completamente requiere de unos pocos cálculos a diferentes valores de la distancia interatómica (empezando por ejemplo a un valor pequeño para luego ir aumentándolo). Sin embargo, al calcular la SEP de un sistema químico complejo, nos encontramos con que la superficie que genera el sistema es igualmente compleja. Para tres átomos formando un sistema reactivo lineal, es decir, eliminando un grado de libertad, la superficie que se obtiene tiene 2 grados de libertad y puede ser representada en tres dimensiones. Para más de dos átomos la dimensionalidad de la superficie es tan elevada que no permite ni su representación gráfica. A estas últimas se las denomina *hipersuperficies* de energía potencial. Explorar una superficie multidimensional requiere de un número de cálculos muy elevado. Por ejemplo, en un sistema no lineal de tres átomos, necesitaríamos al menos  $10^3$  cálculos de energía para caracterizar la superficie de un modo razonable. Utilizar la misma estrategia cuando se está trabajando con un sistema de cinco mil átomos es totalmente inabordable.

Afortunadamente, no todas las configuraciones posibles son químicamente probables. En muchos casos, la energía de una configuración dada es tan elevada que el sistema no puede existir prácticamente en dicha configuración. Por ello, normalmente centraremos nuestra atención en los *puntos estacionarios* de la superficie, generalmente en los mínimos, aquellas zonas de la superficie de energía potencial que representan a una configuración estable del sistema. Tanto para analizar, como para localizar dichos puntos estacionarios sobre la superficie de energía potencial, es necesario conocer el vector gradiente ( $\vec{G}$ ) y la matriz hessiana ( $H$ ) de la energía. Siendo  $\mathcal{U}(R_{\alpha,\omega})$  la expresión para la energía total del sistema en función de las coordenadas de los átomos cuánticos y clásicos podemos escribir:

$$\mathcal{U}(R_{\alpha,\omega}) = \mathcal{K}_{El}(r_i) + \mathcal{U}_{El}(r_i, R_{\alpha}, r_{\omega}) + \mathcal{U}_{Nuc}(R_{\alpha}, R_{\omega})$$

$$\vec{G} = \begin{pmatrix} \frac{\partial \mathcal{U}(R_{\alpha,\omega})}{\partial R_{\alpha x}} \\ \dots \\ \frac{\partial \mathcal{U}(R_{\alpha,\omega})}{\partial R_{\omega z}} \end{pmatrix} \quad H = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 \mathcal{U}(R_{\alpha,\omega})}{\partial R_{\alpha x}^2} & \dots & \frac{\partial^2 \mathcal{U}(R_{\alpha,\omega})}{\partial R_{\omega z} \partial R_{\alpha x}} \\ \dots & \dots & \dots \\ \frac{\partial^2 \mathcal{U}(R_{\alpha,\omega})}{\partial R_{\alpha x} \partial R_{\omega z}} & \dots & \frac{\partial^2 \mathcal{U}(R_{\alpha,\omega})}{\partial R_{\omega z}^2} \\ \dots & \dots & \dots \\ \frac{\partial^2 \mathcal{U}(R_{\alpha,\omega})}{\partial R_{\alpha x} \partial R_{\omega z}} & \dots & \frac{\partial^2 \mathcal{U}(R_{\alpha,\omega})}{\partial R_{\omega z}^2} \end{pmatrix} \quad (2.9)$$

Todo punto estacionario posee un vector gradiente nulo ( $\vec{G} = \vec{0}$ ), y toda la información sobre la naturaleza del punto estacionario está almacenada en la matriz hessiana. En su forma diagonal:

$$|\mathbf{H} - \lambda \mathbf{I}|_{Det} = 0 \quad \{\lambda_k, \vec{e}_k\}_{3(\alpha+\omega)} \quad (2.10)$$

En función de los valores propios de la matriz hessiana ( $\lambda_k$ ), los puntos estacionarios de la SEP, más importantes desde un punto de vista químico, pueden clasificarse como:

- *Mínimos* (o de orden cero), si poseen únicamente valores propios positivos. Dicho comportamiento se debe a que cualquier desplazamiento que se realice sobre el punto conduce a una situación de mayor energía. A esta categoría pertenecen estructuras estables como reactivos, productos e intermedios de reacción.
- *Puntos de silla* (o de primer orden), a los que corresponden estructuras de transición. Se caracterizan por presentar un único valor propio negativo, de modo que todas las posibles modificaciones de la geometría nuclear dan lugar a un incremento de la energía, excepto en una dirección que conecta el punto con los mínimos asociados.

Tanto el vector gradiente como la matriz hessiana, además de servir como prueba para caracterizar las estructuras obtenidas, se pueden emplear también en los métodos de localización de dichas estructuras<sup>4</sup>. Un ejemplo es el algoritmo de Baker, que hace uso de un polinomio de Taylor para generar geometrías nuevas a partir de las existentes, empleando para ello un desplazamiento ( $\vec{d}_k$ ) lo suficientemente corto como para hacer válida la aproximación:

$$\vec{r}_k = \vec{r}_k^0 + \vec{d}_k$$

$$\mathcal{U}(R_{\alpha,\omega}) = \mathcal{U}(R_{\alpha,\omega}^0) + \vec{G}^T \vec{d}_{\alpha,\omega} + \frac{1}{2} \vec{d}_{\alpha,\omega}^T \mathbf{H} \vec{d}_{\alpha,\omega} \quad (2.11)$$

<sup>4</sup>Hay métodos que únicamente hacen uso del vector gradiente en el proceso de localización [15], aunque estos algoritmos suelen estar restringidos a la búsqueda de mínimos, no siendo fiables para la localización de estructuras de transición.

Diferenciando la ecuación anterior respecto al desplazamiento e igualando a cero:

$$\frac{\partial \mathcal{U}(R_{\alpha,\omega})}{\partial \vec{d}_{\alpha,\omega}} = 0 \quad \begin{cases} \vec{d}_{\alpha,\omega} = -\mathbf{H}^{-1} \vec{G} \\ \vec{d}_{\alpha,\omega} = -\sum_{3N} \frac{1}{\lambda_k} \vec{e}_k^T \vec{G} \vec{e}_k \end{cases} \quad (2.12)$$

Dicho algoritmo pertenece, junto con muchos otros [15, 16], a los basados en el método de Newton-Raphson.

En cualquier caso, se emplee un método u otro para realizar la exploración de la superficie de energía potencial, hay que tener en cuenta que, si se trabaja en coordenadas cartesianas, hay que eliminar los grados de libertad correspondientes a la traslación y la rotación del vector gradiente y de la matriz hessiana<sup>5</sup>. Esto es debido a que únicamente los modos normales de vibración son responsables de cambios en las geometrías nucleares. De entre los distintos métodos disponibles para eliminar modos de traslación y rotación, las condiciones de Eckart [17, 18] son las más utilizadas debido a que pueden linealizarse fácilmente.

La superficie de energía potencial está íntimamente relacionada con el concepto de mecanismo de reacción a través del cual tiene lugar el proceso químico. Dado que en toda reacción o proceso químico existe una coordenada interna, o combinación de éstas, que rige el tránsito entre las distintas especies, es posible representar la energía potencial únicamente en función de dicha coordenada, denominada *coordenada de reacción*. De esta forma se dispone de la mayor cantidad de información posible: la posición relativa de las distintas estructuras localizadas –tanto en energía como en términos geométricos– y el camino –variación de coordenada de reacción– que las une, denominado *camino de reacción*. Además, las estructuras que definen el camino de reacción deben poseer un vector gradiente cuyas componentes han de ser nulas excepto las asociadas a la propia coordenada de reacción (es decir, las geometrías dadas están en situación de mínimo para todas las variables que no formen parte de la coordenada de reacción).

<sup>5</sup>A diferencia del sistema de coordenadas cartesiano, que necesita  $3N$  variables para describir un sistema dado, el empleo de coordenadas internas simplifica el problema dado que elimina de modo implícito tanto rotación como traslación (parámetros internos como distancias, ángulos y dihedros no se ven afectados por traslaciones o rotaciones de todo el sistema), siendo necesarias únicamente  $3N - 6$  coordenadas. A pesar de ello, hay que tener presente que el acoplamiento entre rotación y vibración no se elimina únicamente al realizar el cambio de coordenadas (si bien esta cantidad suele ser despreciable en la mayoría de los casos).

La elección de la coordenada de reacción suele ser un proceso delicado dado que, en muchos de los casos, intervienen multitud de componentes. En general se suele optar por la combinación de coordenadas internas que presentan un mayor peso en su definición, denominándose entonces *coordenada distinguida*. La contribución (o peso) de las distintas coordenadas internas a la coordenada de reacción se obtiene de los valores propios de la matriz hessiana.

### 2.1.3. Simulaciones Moleculares

En *biología* se clasifican los experimentos en dos tipos bien diferenciados. Por un lado tenemos los denominados experimentos *in vitro*. Estos experimentos se realizan en matraces o tubos de ensayo y en ellos se hace uso de material de origen biológico como, por ejemplo, reacciones entre un medicamento y moléculas de un extracto celular. Sin embargo, si lo que queremos es observar cómo se comporta un medicamento en el interior de un organismo vivo, lo que haremos será inocularlo a, por ejemplo, una rata. Este último tipo de experimentos se denominan *in vivo*.

Los métodos de simulación han avanzado mucho en la segunda mitad del siglo pasado gracias al avance de la informática. En la actualidad, si queremos saber cómo se comportará un medicamento en la molécula objetivo, podemos recurrir a realizar una simulación del proceso. Las simulaciones moleculares son cada día más precisas y más realistas: conforme crece la capacidad de proceso y almacenamiento de datos, crece nuestra capacidad de simulación. Si hace unos años se podía trabajar a duras penas con cinco mil átomos, ahora se trabaja con facilidad con veinte mil en un ordenador de sobremesa. Las simulaciones moleculares en la actualidad pueden llegar a ser tan realistas que ya se les denomina experimentos *in silico*<sup>6</sup>.

#### 2.1.3.1. Dinámicas Moleculares

La exploración de la Superficie de Energía Potencial utilizando los métodos descritos en el apartado 2.1.2 tiene sus limitaciones. Cuando estudiamos procesos químicos que tienen lugar en medios condensados, la influencia del medio se tra-

<sup>6</sup>Referencia al material en el que están contruidos los microprocesadores, el silicio.

duce en un aumento de la “rugosidad” de la superficie de energía potencial, debido a la presencia de conformaciones (o estados) accesibles de bajo coste energético. La figura 2.6 ilustra el efecto que tiene el medio sobre la forma de una superficie modelo. Esto provoca que los puntos estacionarios del sistema no queden completamente descritos por una única conformación del sistema, sino por toda una familia de conformaciones que se diferencian principalmente en pequeños cambios geométricos (y por lo tanto energéticos) inducidos por la fase condensada, pero que contienen en esencia idéntica información química. Por otra parte, para calcular propiedades termodinámicas, es necesaria abundante información sobre los distintos estados accesibles al sistema. En consecuencia, toda magnitud calculada únicamente será comparable con el valor experimental, en aquellos casos en los que se hayan explorado la mayor cantidad de los estados posibles.

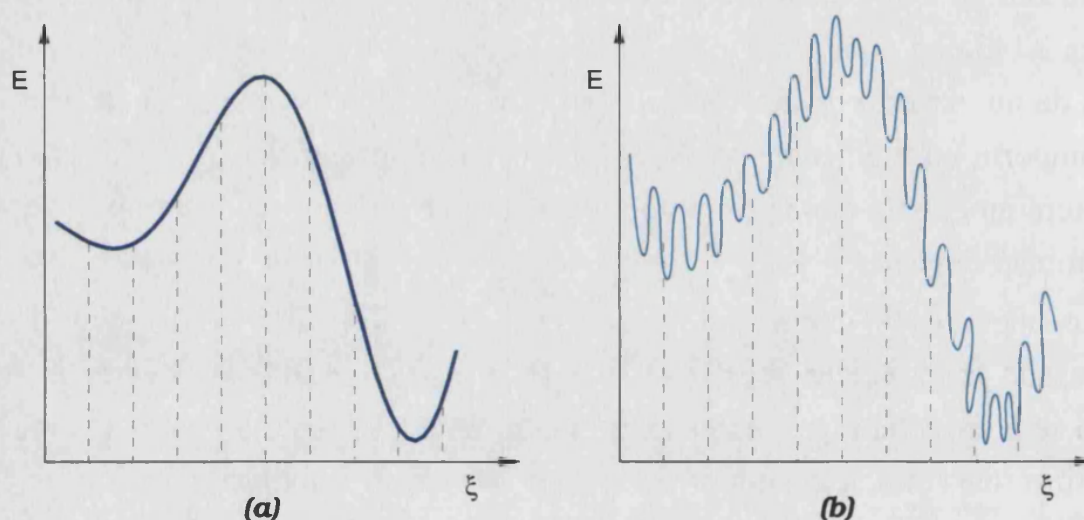


Figura 2.6: Superficies de Energía Potencial proyectadas sobre la coordenada de reacción para un sistema modelo. (a) En el vacío. (b) Inmerso en un medio condensado.

Uno de los métodos empleados para evaluar las distintas conformaciones del sistema se basa en el estudio de la dinámica de los núcleos atómicos que lo forman. En este método, conocido como *Dinámica Molecular* ó MD, se recurre a las ecuaciones del movimiento para nuestro sistema. Suponiendo que el movimiento nuclear pueda seguirse con las ecuaciones de Newton:

$$\vec{F}_k(t) = m_k \vec{a}_k = m_k \frac{\partial^2 \vec{r}_k}{\partial t^2} = - \frac{\partial \mathcal{U}(r_k)}{\partial r_k} \frac{\vec{r}_k}{r_k} = -\vec{G}_k \quad (2.13)$$

La forma de la función de potencial ( $\mathcal{U}(r_k)$ ) dependerá del tipo de átomo que estemos considerando, es decir, si pertenece a una región clásica o cuántica. Una

vez conocida la fuerza que actúa sobre un determinado núcleo, es posible calcular la nueva posición que tendrá transcurrido un incremento finito de tiempo ( $\Delta t$ ), conociendo la posición ( $\vec{r}_k(t)$ ) y su velocidad ( $\vec{v}_k(t)$ ) en el instante anterior ( $t$ ). Para hacer esto tendremos que integrar la ecuación 2.13. De entre los diversos métodos, los más sencillos (en cuanto a implementación) son los que se basan en el algoritmo de Verlet [19], el cual hace uso de la solución directa de la ecuación diferencial anterior:

$$\begin{aligned}\vec{r}_k(t + \Delta t) &= \vec{r}_k(t) + \Delta t \vec{v}_k(t) + \frac{\Delta t^2}{2m_k} \vec{F}_k(t) \\ \vec{v}_k(t + \Delta t) &= \frac{1}{2\Delta t} (\vec{r}_k(t + \Delta t) - \vec{r}_k(t - \Delta t))\end{aligned}\quad (2.14)$$

Aunque presenta numerosas ventajas, el algoritmo de Verlet también tiene algunos inconvenientes. El tratamiento que hace de las velocidades provoca que se introduzca necesariamente un error numérico. Con el fin de solventar esta deficiencia, existen numerosas modificaciones del algoritmo de Verlet. Un modo sencillo de mejorar la eficiencia del algoritmo es empleando las velocidades del instante de tiempo anterior, en lugar de recalcularlas por completo en cada nueva situación. Dicho algoritmo se denomina *Velocity-Verlet* [20]:

$$\vec{v}_k(t + \Delta t) = \vec{v}_k(t) + \frac{\Delta t}{2m_k} (\vec{F}_k(t) + \vec{F}_k(t + \Delta t)) \quad (2.15)$$

Sea cual sea el algoritmo o método empleado para llevar a cabo la dinámica, se ha de garantizar que el sistema evoluciona de modo que tanto el momento lineal total ( $\vec{M}$ ) como el angular ( $\vec{L}$ ) permanecen constantes:

$$\vec{M} = \sum_{\alpha, \omega} \vec{p}_k = cte \quad \vec{L} = \sum_{\alpha, \omega} \vec{r}_k \wedge \vec{p}_k = cte \quad (2.16)$$

Una vez se dispone de las expresiones necesarias para tratar el movimiento de los núcleos, hay que escoger las condiciones en las que tendrá lugar la simulación; ya que, en función de cuales sean las variables que permanezcan constantes durante la simulación, se obtendrá un observable u otro. Esta elección puede, en ocasiones, venir impuesta por la naturaleza del sistema que se esté estudiando. En general, en la mayoría de los procesos químicos existe conservación en el número total de partículas ( $N$ ) que definen el sistema. Otro factor decisivo sobre las condiciones de trabajo será la disponibilidad de datos experimentales con los que

realizar contrastes. De entre las distintas opciones disponibles, una comúnmente adoptada es la que permite evolucionar al sistema manteniendo el número de partículas, el volumen ( $V$ ) y la temperatura ( $T$ ) constantes. La razón se encuentra en que la mayoría de los procesos químicos en fases condensadas tienen lugar bajo estas circunstancias. Así, el volumen del sistema puede mantenerse constante empleando, por ejemplo, condiciones periódicas que garanticen la conservación de la densidad del medio durante todo el proceso de simulación.

En el caso de la temperatura existen diversas aproximaciones, aunque todas hacen uso de un baño termostático externo en contacto con el sistema. El modo en que se realiza el tratamiento de la interacción del sistema con el baño es, al final, el factor decisivo que diferencia los distintos planteamientos. Por ejemplo, en el caso del termostato de Nosé-Hoover [21–23], las ecuaciones de movimiento se obtienen introduciendo, en la lagrangiana del sistema, un término adicional que actúa controlando la energía cinética y que es dependiente del termostato. El cálculo de la energía del sistema se realiza empleando el hamiltoniano resultante, de modo que se obtiene una dinámica isoterma del sistema de interés. Se continúa haciendo uso de los algoritmos derivados a partir de las ecuaciones de Newton, pero modificando las velocidades de los núcleos de modo que se cumpla que la temperatura del baño termostático ( $T_{\text{Baño}}$ ), sea igual al promedio estadístico proporcionado por la teoría cinética de gases para un instante dado (a tiempo  $t$ ):

$$T_t = \frac{2}{N_{df} k_B} \langle \mathcal{K}(p_{\alpha, \omega}) \rangle = T_{\text{Baño}} \quad (2.17)$$

donde  $N_{df}$  corresponde al número de grados de libertad del sistema. En el planteamiento original de Andersen [24], las velocidades de un colectivo de núcleos elegidos aleatoriamente se reasignan (para cada incremento de tiempo  $\Delta t$ ), haciendo uso de una distribución de Maxwell-Boltzmann, como consecuencia de una supuesta colisión elástica con las paredes del baño. La simulación dinámica así obtenida no es plenamente útil dado que dichos cambios aleatorios en las velocidades de los núcleos, provocan que la evolución de la posición de los mismos en el tiempo (o *trayectorias*) sea discontinua. Un modo de evitar dichas discontinuidades fue propuesto por Berendsen *et al.* [25,26]. En dicho tratamiento, se incluye un término adicional en el cálculo de las velocidades instantáneas (es decir, las correspondientes a un tiempo  $t$ ), asociado a una fuerza de fricción dependiente de la

temperatura del baño y la que proporciona la ecuación 2.17:

$$\vec{a}_k(t) = m_k \vec{F}_k(t) + \vec{v}_k(t) \frac{1}{2\tau_k} \left( \frac{T_{\text{Baño}}}{T_t} - 1 \right) \quad (2.18)$$

De esta manera el control se ejerce automáticamente sobre todos los núcleos del sistema, obteniendo así trayectorias continuas en el tiempo. El parámetro  $\tau_k$  (cuyas unidades son de tiempo), puede suponerse dependiente del tipo de átomo y rige la intensidad con la que éste interacciona con el termostato.

### 2.1.3.2. Calculando Energías Libres

Las condiciones termodinámicas de trabajo, número de partículas, temperatura y volumen constantes, hacen que sea el *colectivo canónico*, cuyo observable para la energía libre del sistema es el potencial de Helmholtz ( $A$ ), el adecuado para describir el sistema:

$$A = -\frac{1}{\beta} \ln Z_{NVT} \quad (2.19)$$

donde  $\beta$  se define como la inversa del producto de la constante de Boltzmann por la temperatura,  $\beta = (k_B T)^{-1}$ , y  $Z_{NVT}$  corresponde a la función de partición (para las condiciones de trabajo seleccionadas) que proporciona o establece la probabilidad de encontrar al sistema en un determinado estado:

$$Z_{NVT} = \frac{1}{N! h^{3N}} \int e^{-\beta \mathcal{K}(p_{\alpha,\omega})} dp \int e^{-\beta \mathcal{U}(R_{\alpha,\omega})} dR \quad (2.20)$$

Aunque no es evidente, se puede calcular la energía libre de un sistema a partir de una simulación. Podemos reescribir la ecuación 2.20 de tal forma que la función de partición puede ser calculada a partir de un promedio:

$$Z_{NVT} \propto \frac{1}{\langle e^{\mathcal{U}/k_B T} \rangle} \quad (2.21)$$

es decir, si realizamos una simulación de dinámica molecular y evaluamos el promedio  $\langle e^{\mathcal{U}/k_B T} \rangle$  a lo largo de la trayectoria, podríamos calcular la función de partición y, por consiguiente, la energía libre.

A pesar de ser atractiva la idea de obtener la energía del sistema a partir del cálculo de la función de partición promedio, esta aproximación es inviable. La razón se encuentra en la imposibilidad de explorar todas las configuraciones dejando



evolucionar al sistema libremente. Es decir, partiendo inicialmente de una configuración determinada (representada por **(a)** en la figura 2.7), el sistema evolucionará siempre hacia estados de menor energía potencial (**(b)**), por lo que la simulación explorará preferiblemente estos estados, que contribuirán de forma significativa al promedio.

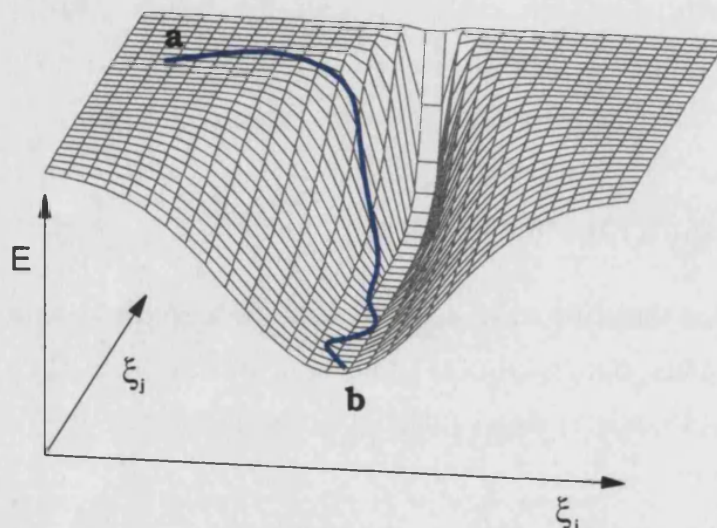


Figura 2.7: Evolución del sistema sobre la superficie de energía potencial

Los métodos que vamos a describir a continuación tienen en común que trabajan restringiendo la región del espacio de fases que es necesario explorar durante una simulación.

### Perturbación Termodinámica

Este método, y el que se describe en el apartado siguiente, son utilizados principalmente para calcular las diferencias entre las energías libres de dos sistemas muy similares [27–30].

La diferencia entre las energías libres de dos estados,  $I$  y  $J$ , de un sistema con funciones de partición  $Z_I$  y  $Z_J$ , respectivamente, es:

$$\begin{aligned}\Delta A_{I \rightarrow J} &= A_J - A_I \\ &= -k_B T \ln \frac{Z_J}{Z_I}\end{aligned}\quad (2.22)$$

Suponiendo que la energía cinética de los Hamiltonianos es la misma (esto es, el número y la masa de las partículas es idéntica) y que sólo los términos de energía potencial,  $\mathcal{U}_I$  y  $\mathcal{U}_J$ , son diferentes, se puede reescribir esta ecuación como:

$$\Delta A_{I \rightarrow J} = -k_B T \ln \langle \exp[-(\mathcal{U}_J(R) - \mathcal{U}_I(R))/k_B T] \rangle_I \quad (2.23)$$

Esta ecuación (2.23) establece que la diferencia de energía libre entre dos estados,  $I$  y  $J$ , puede ser calculada generando una trayectoria para el estado  $I$  y calculando el promedio de la exponencial de la diferencia entre las energías potenciales de los estados  $I$  y  $J$  para cada configuración dividido por  $k_B T$ . Sin embargo, esta ecuación no converge a menos que la diferencia de energía entre los dos estados sea pequeña. Puesto que ésto no suele ser cierto en las aplicaciones actuales, se recurre a dividir el problema en trozos más pequeños. Para ello se introduce un nuevo hamiltoniano que es función de un *parámetro perturbacional*,  $\lambda$ .

$$\hat{H}(p, R, \lambda) \begin{cases} = \hat{H}_I(p, R) & \lambda = 0 \\ = \hat{H}_J(p, R) & \lambda = 1 \\ = (1 - \lambda)\hat{H}_I(p, R) + \lambda\hat{H}_J(p, R) & \lambda \neq 0, 1 \end{cases} \quad (2.24)$$

Utilizando este hamiltoniano y asumiendo, igual que antes, que la energía cinética permanece constante, podemos escribir:

$$\Delta A_{I \rightarrow J} = -k_B T \ln \langle \exp[-(\mathcal{U}(R, \lambda_J) - \mathcal{U}(R, \lambda_I))/k_B T] \rangle_{\lambda_I} \quad (2.25)$$

La diferencia de energía libre se puede calcular entonces descomponiendo la transformación total  $\lambda = 0 \rightarrow \lambda = 1$  en una suma de pequeñas transformaciones  $\lambda_i \rightarrow \lambda_{i+1}$ :

$$\Delta A_{I \rightarrow J} = \sum_{i=0}^{N_W} \Delta A_{i \rightarrow (i+1)} \quad (2.26)$$

donde  $N_W$  es el número total de estados intermedios o ventanas y los estados  $i = 0$  e  $i = N_W + 1$  se refieren a los estados  $I$  y  $J$ , respectivamente.

### Integración Termodinámica

En esta metodología, al igual que en la del apartado anterior, se emplea también un parámetro de perturbación. Sin embargo, en lugar de la ecuación 2.22 se usa la siguiente identidad:

$$\Delta A_{I \rightarrow J} = \int_0^1 d\lambda \frac{\partial A}{\partial \lambda} \quad (2.27)$$

Haciendo uso de las ecuaciones 2.19 y 2.20 y teniendo en cuenta que el hamiltoniano depende del parámetro  $\lambda$ :

$$\Delta A_{I \rightarrow J} = \int_0^1 d\lambda \langle \frac{\partial \hat{H}}{\partial \lambda} \rangle_{\lambda} \quad (2.28)$$

La derivada del hamiltoniano con respecto al parámetro de perturbación es fácilmente evaluada una vez conocido el hamiltoniano. La integral es calculada realizando simulaciones para obtener el promedio del integrando a varios valores de  $\lambda$  y después aplicando una técnica estándar de integración numérica a los resultados obtenidos.

### Umbrella Sampling y WHAM

Debido a la versatilidad del tipo de información que ofrece la superficie de energía potencial, sería de mayor utilidad disponer de un observable asociado con la energía libre, que dependa a su vez de la coordenada de reacción. El *Potencial de Fuerza Media* (ó PMF) se ajusta a esta definición:

$$PMF(\xi_o) \propto -\frac{1}{\beta} \ln \langle \rho(\xi_o) \rangle \quad (2.29)$$

donde  $\langle \rho(\xi_o) \rangle$  corresponde al promedio de la función de distribución de probabilidad para dicha coordenada de reacción:

$$\langle \rho(\xi_o) \rangle = \frac{\int \delta[\xi_o - \xi(R)] e^{-\beta u(R)} dR}{\int e^{-\beta u(R)} dR} \quad (2.30)$$

La delta de Dirac de la ecuación anterior asegura que únicamente se tiene en cuenta la coordenada de reacción elegida,  $\xi_o$ .

Un método, elegante a la vez que potente, para calcular PMF fue descrito por Kumar *et al.* [31]: *Weighted Histogram Analysis Method* (ó WHAM). En éste, la función de distribución de probabilidad se expresa como una combinación lineal de un número  $\mathcal{W}$  de funciones de distribución para distintos valores de la coordenada de reacción ( $\xi_{o,i=1,\mathcal{W}}$ ):

$$\langle \rho(\xi_o) \rangle = \sum_i^{\mathcal{W}} c_i \langle \rho(\xi_{o,i}) \rangle \quad \begin{cases} \sum_i^{\mathcal{W}} c_i = 1 \\ \langle \rho(\xi_o)^2 \rangle - \langle \rho(\xi_o) \rangle^2 \text{ Mínimo} \end{cases} \quad (2.31)$$

donde los coeficientes  $c_i$  se escogen de modo que se minimize el error aleatorio. Se trata, pués, de realizar dinámicas moleculares a distintos valores de  $\xi_{o,i}$  (denominadas *ventanas*), de las que se obtendrán las correspondientes funciones de distribución  $\langle \rho(\xi_{o,i}) \rangle$  (o histogramas de frecuencia), tal y como se muestra en la siguiente figura:

Llegados a este punto, el principal problema continúa siendo poder ejercer un control sobre el proceso de exploración con dinámicas; ya que toda ventana que

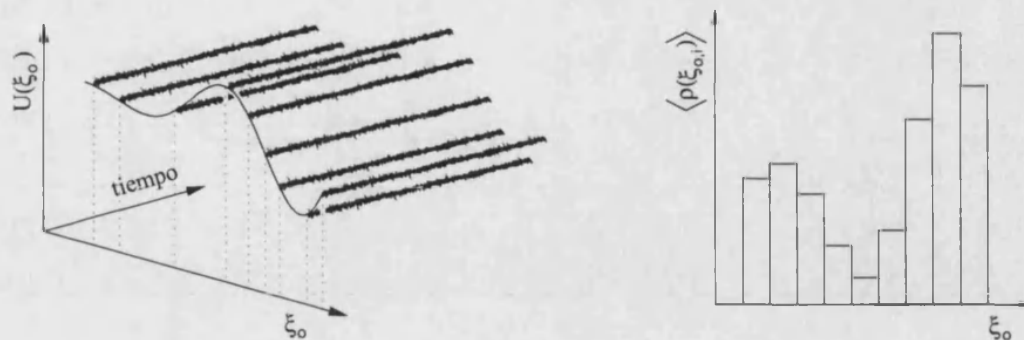


Figura 2.8: Representación de las distintas ventanas trazadas, y de los histogramas de frecuencia asociados a la coordenada de reacción escogida.

tenga su origen en una región que no corresponda a un mínimo, evolucionará hacia estados de menor energía. De entre los distintos métodos existentes, uno de los más empleados es el denominado *Umbrella Sampling*. Dicha técnica, introducida por Valleau *et al.* [32,33], permite recuperar el valor real de una variable a la que se ha aplicado una restricción durante el proceso de medida. Por ejemplo, supóngase que se pretende calcular el valor promedio de un observable,  $\mathcal{X}$ , que está definido por una función de potencial determinada,  $\mathcal{U}(r)$ . Es posible demostrar que existe una relación entre el valor promedio, y el que se obtiene –denominado *biased*– aplicando una función  $\mathcal{V}_{Umb}(R)$ , que restrinja algún aspecto del sistema:

$$\begin{aligned} \langle \mathcal{X} \rangle &= \frac{\int \mathcal{X}(R) e^{-\beta \mathcal{U}(R)} dR}{\int e^{-\beta \mathcal{U}(R)} dR} \\ &= \frac{\int \frac{\mathcal{X}(R)}{\mathcal{V}_{Umb}(R)} \mathcal{V}_{Umb}(R) e^{-\beta \mathcal{U}(R)} dR}{\int \mathcal{V}_{Umb}(R) e^{-\beta \mathcal{U}(R)} dR} \frac{\int \mathcal{V}_{Umb}(R) e^{-\beta \mathcal{U}(R)} dR}{\int \frac{1}{\mathcal{V}_{Umb}(R)} \mathcal{V}_{Umb}(R) e^{-\beta \mathcal{U}(R)} dR} \quad (2.32) \\ \langle \mathcal{X} \rangle &= \frac{\langle \frac{\mathcal{X}(r)}{\mathcal{V}_{Umb}(R)} \rangle_{biased}}{\langle \frac{1}{\mathcal{V}_{Umb}(R)} \rangle_{biased}} \end{aligned}$$

De este modo, sobre cada uno de estos intervalos (o ventanas) se aplica una función potencial de “umbrella”, cuya única finalidad es evitar que se produzcan desviaciones importantes en el valor de la coordenada interna:

$$\mathcal{V}_{Umb,i}(\xi_{0,i}) = e^{\beta \frac{1}{2} K_{Umb,i} (\xi_{0,i} - \xi_{0,i}^{ref})^2} \quad (2.33)$$

En este caso se ha optado por un potencial de tipo armónico, caracterizado por una constante de fuerza  $K_{Umb,i}$ , y un valor de referencia para la coordenada de

reacción en dicha ventana  $\xi_{o,i}^{ref}$ . El hecho de que se pueda definir una constante de fuerza distinta para cada ventana, hace que se pueda intensificar el efecto de la función en aquellas zonas más conflictivas (la región que envuelve al estado de transición, por ejemplo).

El siguiente paso es la reconstrucción de la función de distribución de probabilidad para cada una de las ventanas, a partir de los datos obtenidos durante la simulación:

$$\langle \rho(\xi_{o,i}) \rangle = \frac{e^{-\frac{1}{2}\beta K_{Umb,i} (\xi_{o,i} - \xi_{o,i}^{ref})^2} \langle \rho(\xi_{o,i}) \rangle}{\langle e^{-\frac{1}{2}\beta K_{Umb} (\xi_{o,i} - \xi_{o,i}^{ref})^2} \rangle} \quad (2.34)$$

Finalmente, al generar por combinación lineal la función total de distribución, los coeficientes  $c_i$  resultan dependientes del valor PMF en las distintas ventanas ( $PMF(\xi_{o,i})$ ).

$$\begin{cases} \langle \rho(\xi_o) \rangle = \frac{\sum_i^{\mathcal{W}} n_i \langle \rho(\xi_{o,i}) \rangle_{biased}}{\sum_j^{\mathcal{W}} n_j e^{-\beta(\mathcal{V}_{Umb,j} - PMF(\xi_{o,j}))}} \\ e^{-\beta PMF(\xi_{o,i})} = \int_{\text{Camino de Reacción}} \langle \rho(\xi_o) \rangle \mathcal{V}_{Umb,i}(\xi_o) d\xi_o \end{cases} \quad (2.35)$$

donde  $n_{i/j}$  representa el número de datos empleados para calcular la función de distribución de probabilidad de dicha ventana. Este acoplamiento entre las distintas ventanas se resuelve iterando de modo autoconsistente: inicialmente se asigna un valor a todas las energías libres  $PMF(\xi_{o,j})$  (usualmente cero), y se resuelve la ecuación anterior, obteniendo así un conjunto de energías mejorado. El proceso se repite entonces con este nuevo grupo de valores y se va iterando hasta que ya no se producen cambios tanto en las energías libres como en la función de densidad total [34, 35].

## 2.2. Los Problemas Químicos



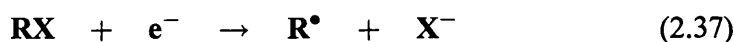
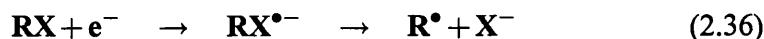
n esta tesis se han aplicado los métodos ya descritos a tres grandes temas. Los tres tienen en común que tratan procesos dinámicos en entornos complejos, pero representan diferentes problemas químicos en diferentes tipos de medios condensados: la transferencia electrónica disociativa en medio acuoso, la influencia de una enzima en la reacción que cataliza y la

dinámica vibracional de una pequeña molécula interactuando con el ADN. A continuación, vamos a plantear los diferentes problemas en los que se ha trabajado en la presente tesis.

### 2.2.1. La Transferencia Electrónica Disociativa



La transferencia de electrones a moléculas está a menudo acompañada por la rotura de un enlace existente o la formación de uno nuevo. En el primer caso este proceso recibe el nombre de *reducción disociativa* o *transferencia electrónica disociativa*. Cuando la transferencia se produce a moléculas neutras, éstas se pueden dividir en dos fragmentos, uno aniónico y otro radicalario. De todas las moléculas que sufren este tipo de reacción, unas de las más estudiadas son las de los haluros de alquilo y arilo (donde  $X$  = flúor, cloro, bromo y yodo en las ecuaciones 2.36 y 2.37). Estas reacciones son usadas frecuentemente en química orgánica para producir los correspondientes radicales alquilo y arilo [36]. Una cuestión importante es si la transferencia electrónica (ET) y la rotura del enlace ocurre de forma consecutiva o concertada [37], tal y como puede verse en las siguientes ecuaciones:



donde la ecuación 2.36 representa el mecanismo consecutivo y la ecuación 2.37 da cuenta del mecanismo concertado. El mecanismo consecutivo puede ser considerado como una secuencia de dos transferencias electrónicas: i) formación del anión radical donde el electrón queda localizado en un orbital  $\pi^*$ , seguido por ii) transferencia electrónica intramolecular,  $\pi^* \rightarrow \sigma^*$ , que provoca la rotura del enlace  $\text{RX}$ . Que una molécula evolucione usando uno de estos dos mecanismos viene determinado por la vida media de las especies intermedias, en este caso el anión radical [38–40]. Se entiende que si la vida media del anión radical es superior que el tiempo en que se produce una vibración de enlace ( $\simeq 10^{-13} \text{ s} = 100 \text{ fs}$ ), la reacción seguirá un mecanismo consecutivo. Si el anión radical no existe según el criterio anterior (tiene un vida media  $< 100 \text{ fs}$ ), la reacción evolucionará mediante un mecanismo concertado. Este criterio proporciona una distinción clara entre ambos mecanismos y permite clasificar las reacciones estudiando la vida media de las especies intermedias.

Las constantes de velocidad para la pérdida de  $X$  han sido medidas en numeros medios y para varias especies  $RX$  mediante técnicas de rotura por radiación [41–43] o métodos electroquímicos [44,45]. El efecto que el medio tiene sobre este tipo de reacciones es muy importante, siendo, en general, la velocidad de disociación mayor en medios polares apróticos que en agua. En algunos casos un cambio de disolvente puede provocar, incluso, la transición de un mecanismo consecutivo a uno concertado [46].

#### 2.2.1.1. La Teoría de Marcus

Los químicos orgánicos han explicado los mecanismos de las reacciones químicas que observaban utilizando movimientos de pares de electrones. Un ejemplo claro es la reacción de  $S_N2$ , donde el par de electrones del nucleófilo ataca al centro electrófilo con la consiguiente expulsión de un grupo saliente. Actualmente se reconoce que los electrones no siempre van emparejados [47]. La reacción clásica de  $S_N2$  puede entenderse a fin de cuentas como la transferencia de un electrón desde el nucleófilo hacia el grupo saliente.

Podemos distinguir dos tipos de transferencia electrónica (ET) de un sólo electrón. Cuando el dador y el aceptor de electrones interactúan fuertemente, en el sentido de que puede existir entre ellos un enlace parcial, se denomina *transferencia electrónica de esfera interna*. Si por el contrario, la interacción entre dador y aceptor es débil, pasa a ser denominada *transferencia electrónica de esfera externa*. La diferencia fundamental entre ambos mecanismos radica en la velocidad relativa de los mismos. Puesto que en un mecanismo de esfera interna la interacción entre dador y aceptor es mayor, esto provoca una estabilización del estado de transición mayor respecto al mismo estado de transición correspondiente al caso de la ET de esfera externa. Es decir, la energía libre de activación es menor para la ET de esfera interna, por lo que la velocidad de reacción es mayor. Esto nos indica que cuando sea posible cualquier ET tendrá lugar por un mecanismo de esfera externa, a menos que la interacción disminuya, por ejemplo, debido a factores estéricos. Así pues, se pueden clasificar los dadores y los aceptores como propensos a dar ET's de esfera externa (dadores muy voluminosos) o ET's de esfera interna.

Para la ET de esfera externa, Rudolph Marcus [48–52] propuso una ecuación que describe la relación entre la energía libre de activación para el proceso de ET

en disolución y la energía libre de la reacción (lo que se denomina fuerza conductora de la reacción). Tomemos una reacción de ET modelo como la expresada en la ecuación 2.38 y cuyo diagrama de energía se muestra en la figura 2.9:

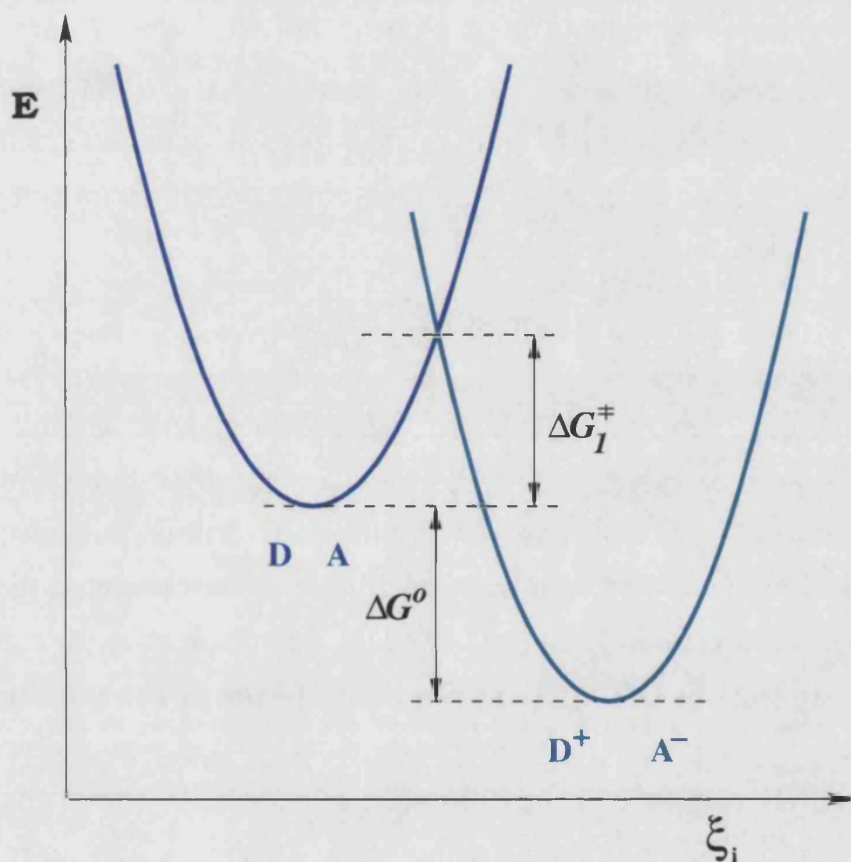


Figura 2.9: Diagrama de energía libre para la transferencia electrónica de esfera externa entre un dador (D) y un aceptor (A) de electrones.

Podemos plantear las siguientes hipótesis de partida:

- Tanto el estado  $D + A$  como el  $D^+ + A^-$  pueden ser descritos con funciones parabólicas y el estado de transición como el cruce evitado entre ambos, tal y como se puede apreciar en la figura 2.9.
- Ambos miembros de la pareja rédox deben ser químicamente estables. En la escala de tiempo del experimento, no se debe producir la rotura o formación de enlaces.
- La reacción de ET debe de esfera externa.



Si se cumplen las condiciones anteriores, se cumple la relación cuadrática de Marcus:

$$\Delta G_1^\ddagger = \Delta G_0^\ddagger \left(1 + \frac{\Delta G^0}{4\Delta G_0^\ddagger}\right)^2 \quad (2.39)$$

donde  $\Delta G_1^\ddagger$  es la energía libre de activación para el proceso directo.  $\Delta G^0$  es la energía libre de reacción y puede ser expresada como la diferencia entre los potenciales rédox de las especies dadora y aceptora ( $\Delta G^0 = -nF(E_{prod}^0 - E_{reac}^0)$ ). El término  $\Delta G_0^\ddagger$  se denomina energía estandar de activación y representa la energía libre de activación a valor cero de energía libre de reacción (esto es, cuando  $\Delta G^0 = 0$ ). Este término es la suma de dos factores relacionados con la reorganización de los núcleos que acompaña a la ET:

$$\Delta G_0^\ddagger = \Delta G_{externa}^\ddagger + \Delta G_{interna}^\ddagger \quad (2.40)$$

para transferencias electrónicas tanto homogéneas como heterogéneas. El término  $\Delta G_{externa}^\ddagger$  se denomina factor de reorganización externa y está relacionado con la reorganización de las moléculas del disolvente. Este término puede ser expresado como una función de los radios de los reactivos y de la constante dieléctrica del disolvente en el marco de trabajo del modelo de solvatación de esferas rígidas de Born. El otro factor,  $\Delta G_{interna}^\ddagger$ , se denomina factor de reorganización interno y da cuenta de los cambios en distancias de enlace y ángulos que acompañan al proceso de transferencia electrónica. Puede ser expresado como una función de la variación neta de las longitudes de enlace y ángulos y sus correspondientes constantes de fuerza en reactivos y productos.

Esta relación cuadrática (ecuación 2.39) ha sido aplicada con mucho éxito en el campo de las transferencias electrónicas. Sin embargo, estrictamente hablando no puede ser aplicada al caso de la reducción disociativa (que es tema que nos ocupa en la presente tesis). Los motivos son varios. En primer lugar, la vida media del intermedio  $RX^{\bullet-}$  es tan corta, que no se dispone de datos sobre la energía potencial del mismo o su potencial rédox, por lo que no se cumple la premisa *a*). En segundo lugar, se produce la rotura de un enlace en el tiempo de escala del experimento, por lo que no se cumple la premisa *b*). En este sentido se han llevado a cabo algunos intentos de extender la teoría de Marcus al ámbito de la transferencia electrónica disociativa. Savéant [53] extendió la validez de la relación de Marcus, utilizando una descripción de tipo curva de Morse para la energía potencial de

reactivos y productos, obteniendo una buena relación entre datos experimentales y teóricos. Sin embargo, Pérez *et al* [54] utilizando simulaciones Monte Carlo limitaron la aplicabilidad de esta relación a aquellos casos en los que además de ser posible la descripción de la energía potencial en términos de funciones de Morse, la parte repulsiva del sistema en el que se producía la rotura del enlace no era muy grande.

En este trabajo se va a explorar el efecto del disolvente sobre la reacción de reducción disociativa del cloruro de metilo y comprobaremos la validez de la teoría de Marcus.

### 2.2.2. La Catálisis Enzimática

En la introducción del presente trabajo ya hemos podido comprobar la increíble capacidad que tienen las enzimas para catalizar reacciones químicas. Las enzimas son una clase especial de proteínas, que los seres vivos sintetizan para controlar sus procesos metabólicos. Hasta tal punto resulta fundamental su actividad que podemos decir sin equivocarnos que la vida no sería posible sin estas macromoléculas.

Una proteína es un biopolímero, cuya unidad monomérica se denomina *aminoácido*. Los organismos vivos (al menos los de este planeta) usan veinte aminoácidos distintos para construir todas sus proteínas, posean carácter enzimático o no. El orden concreto en que los diferentes aminoácidos se encuentran en la secuencia primaria<sup>7</sup> de una proteína es absolutamente determinante para su actividad biológica. Esta información se encuentra codificada en la molécula de ácido desoxirribonucleico (ver siguiente apartado (2.2.3)). De esta estructura primaria depende en gran medida el plegamiento espacial que adoptará la proteína y que le otorgará algún tipo de función biológica. Hasta tal punto el plegamiento de una proteína es indispensable para realizar su función biológica que, si calentamos una proteína por encima de su temperatura de trabajo (en organismos superiores, la temperatura corporal), la estructura espacial se pierde y cesa la actividad de la misma. Este proceso se denomina *desnaturalización*. Si alteramos la secuencia primaria en tan sólo un aminoácido, también modificamos su actividad (este

<sup>7</sup>La estructura primaria de una proteína consiste en la secuencia concreta de aminoácidos que la conforman, empezando por el aminoácido con su grupo amino libre

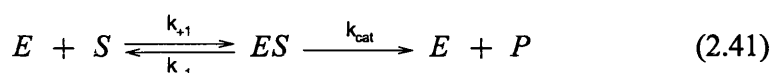
hecho es aprovechado en estudios de mutagénesis dirigida para elucidar mecanismos de reacción enzimática). Las funciones que desempeñan las proteínas son, básicamente [55]:

- *Estructural*: constituyen estructuras por sí mismas o unidas a otras moléculas. Por ejemplo el colágeno en el tejido conjuntivo de los huesos o la queratina del cabello.
- *Transportadora*: de sustancias químicas por todo el organismo, como el oxígeno por la hemoglobina o el hierro por la ferritina.
- *Nutritiva*: fuente de aminoácidos para organismos que no pueden sintetizarlos.
- *Inmunológica y defensiva*: frente a sustancias ajenas y/o nocivas para el organismo.
- *Hormonal*: algunas hormonas como la tiroidea o la insulina son proteínas.
- *Catalítica*: marcan el rumbo y ritmo de todas las reacciones del organismo. Estas proteínas se denominan enzimas y son el objeto de estudio del presente trabajo.

Vamos a centrar nuestra atención en las proteínas con misión catalítica o enzimas. Las enzimas se definen como biocatalizadores autógenos de acción concreta, esto es, cada organismo sintetiza los suyos según sus propias necesidades para actuar específicamente en un tipo de reacción o reacciones similares. Las características más destacadas de una enzima residen en su gran especificidad (sólo actúan sobre una determinada molécula objetivo denominada *sustrato*), estereoselectividad (producen únicamente un estereoisómero) y alto rendimiento. Numerosas enzimas necesitan de la colaboración de otras sustancias de naturaleza no proteica para realizar su labor: las coenzimas o cofactores. La parte proteica recibe entonces el nombre de apoenzima, mientras que el conjunto se denomina holoenzima. Ejemplos típicos de coenzimas son las vitaminas, de aquí la importancia de estos compuestos, y los iones metálicos.

En 1913, L. Michaelis y M. Menten [56] desarrollaron una teoría general sobre la acción y cinética de las enzimas (ampliada posteriormente [57]). En ésta, la

enzima (E) se combina inicialmente con el sustrato (S) dando lugar a un complejo enzima-sustrato (ES), el cual reacciona para formar producto (P) y enzima libre:



siendo  $k_{\pm i}$  las constantes de velocidad para los procesos directos e inversos, y en donde se ha supuesto que la etapa de formación de productos es irreversible. Si se aplica la aproximación del estado estacionario a la especie ES:

$$\frac{\partial[ES]}{\partial t} = 0 = k_{+1}[E][S] - k_{-1}[ES] - k_{cat}[ES] \quad (2.42)$$

dado que la concentración total de enzima es igual a la de enzima libre, más la del complejo enzima-sustrato:

$$[E]_o = [E] + [ES] \quad k_{+1}([E]_o - [ES])[S] - (k_{-1} + k_{cat})[ES] = 0 \quad (2.43)$$

Finalmente, sustituyendo la ecuación anterior en la velocidad del proceso:

$$\begin{aligned} v &= k_{cat}[ES] \\ &= \frac{k_{+1}k_{cat}[E]_o[S]}{k_{-1} + k_{cat} + k_{+1}[S]} \\ &= \frac{k_{cat}[E]_o[S]}{K_M + [S]} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_{+1}} \end{aligned} \quad (2.44)$$

donde  $K_M$  se conoce como *constante de Michaelis*, y en función de su valor – comparado con el de la concentración de sustrato– se pueden describir las distantes regiones de la curva obtenida al representar la ecuación 2.44. Así por ejemplo, en el caso en el que la concentración de sustrato sea mayor que la constante de Michaelis ( $[S] \gg K_M$ ), tendrá lugar el efecto de saturación:

$$v_{max} = k_{cat}[E]_o \quad (2.45)$$

mientras que si  $[S] \ll K_M$ , entonces la ecuación se linealiza (pasa a ser una cinética de primer orden) y la velocidad se denomina ahora velocidad inicial:

$$v_{inicial} = \frac{k_{cat}}{K_M}[E]_o[S] \quad (2.46)$$

A pesar de existir un amplio abanico de reacciones enzimáticas a las que es posible aplicar la ecuación de Michaelis-Menten, no existe un mecanismo molecular inequívoco capaz de explicar la catálisis enzimática, siendo muy probable que corresponda a la combinación de diversos factores. Es decir, aunque a nivel macroscópico es posible describir el mecanismo de la acción enzimática, a nivel microscópico todavía hoy no está claro el origen del mismo. En concreto, debemos buscar la respuesta a la siguiente pregunta: ¿Por qué la energía libre de activación de una reacción catalizada por un enzima es menor que la energía de activación observada para la misma reacción en disolución acuosa?

Para encontrar la respuesta, analicemos el esquema termodinámico de la figura 2.10, que compara la reacción enzimática con la reacción en disolución.

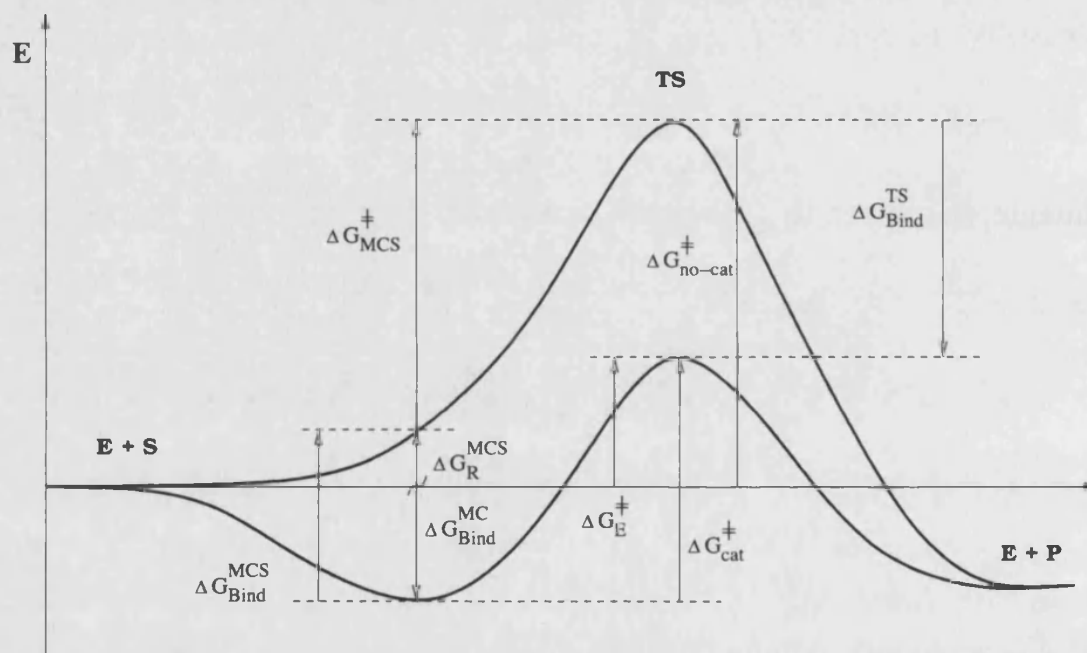


Figura 2.10: Esquema termodinámico para la catálisis enzimática, en comparación con la reacción en disolución.

De acuerdo con este esquema, la reducción de la energía libre de activación puede ser expresada en términos de la energía de unión a la enzima o *binding* tanto de reactivos como del estado de transición [58]:

$$\Delta G_{no-cat}^{\ddagger} - \Delta G_{cat}^{\ddagger} = \Delta G_{Bind}^{MC} - \Delta G_{Bind}^{TS} \quad (2.47)$$

donde  $\Delta G_{no-cat}^{\ddagger}$  y  $\Delta G_{cat}^{\ddagger}$  representan la energía libre de activación para la reacción no catalizada y catalizada respectivamente y  $\Delta G_{Bind}^{MC}$  y  $\Delta G_{Bind}^{TS}$  representan la

energía de binding para el complejo de Michaelis (MC) y del estado de Transición (TS). Si asumimos que la reacción catalizada tiene menor energía de activación, eso implica que el término de la izquierda de la ecuación 2.47 es positivo, por lo que  $\Delta G_{Bind}^{TS}$  debe ser mayor, en valor absoluto (la energía de *binding* es negativa), que  $\Delta G_{Bind}^{MC}$ . Es decir, la enzima presenta una mayor afinidad para el estado de transición que para los reactivos. Esta idea fue formulada por primera vez por Pauling [59], proponiendo una complementariedad entre el centro activo de las enzimas y la estructura de transición (modelo de la “llave y la cerradura”) y ha sido explorada más a fondo por otros autores, dando lugar a una serie de hipótesis que se detallan a continuación:

- *Efectos Electroestáticos* [60–62]: En este caso, el efecto catalítico se atribuye a la estabilización electrostática de la estructura de transición que generan los residuos del centro activo de la enzima. Si bien a priori dicho efecto no tiene por qué ser mayor que el ejercido por el disolvente, se postula que la energía necesaria para reorganizar el entorno (y ofrecer así una solvatación eficaz), en la enzima resulta mínima; es decir, la enzima actúa a modo de “super disolvente” dado que el centro activo presenta (a coste energético de reorganización prácticamente nulo), un microentorno con las características electrostáticas óptimas para albergar al estado de transición. Así pues, se apuesta por una energía de reorganización, que resulta ser mucho menor para la enzima que para el disolvente.
- *Enlaces de Hidrógeno de Barrera Baja (LBHB)* [63, 64]: Un enlace de hidrógeno de barrera baja, corresponde a una situación en la que la distancia entre los heteroátomos que forman dicho enlace ( $X-H \cdots Y$ ) es menor que la habitual ( $\sim 2.5\text{\AA}$  vs  $\sim 2.8\text{\AA}$ ) y por tanto el átomo de hidrógeno puede moverse libremente entre ambos, a través de enlaces de carácter covalente. La formación de este tipo de enlaces posee una mayor estabilización energética que su contrapartida habitual ( $\sim 20\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  vs  $\sim 5\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Además, un factor importante es el hecho de que éste tipo de enlaces no tiene lugar en disolución. La combinación por un lado de la estabilización energética debida a este tipo de enlace de hidrógeno (que disminuiría la energía del estado de transición), junto con el efecto de *strain* asociado a la mayor fuerza de dichos enlaces (desestabilización del reactivo), sería la

responsable de la catálisis.

Otros autores, sin embargo, han centrado su atención en el complejo de Michaelis. Esto se debe al hecho de que la energía de *binding* puede incluir contribuciones no despreciables debidas a cambios geométricos del sustrato durante el proceso de unión. En el caso del estado de transición, es de esperar que los parámetros geométricos más importantes permanezcan constantes, o bien varíen muy poco, cuando pasamos de una disolución acuosa al interior de la enzima [58]. De esta forma  $\Delta G_{Bind}^{TS}$  en la ecuación contiene básicamente información sobre la variación en la energía de interacción al pasar del disolvente al centro activo. Sin embargo, en el término de  $\Delta G_{Bind}^{MC}$  se incluye además el cambio geométrico de pasar de unos reactivos separados y completamente solvatados a estar juntos y orientados de forma adecuada para reaccionar. Para ayudarnos a ver esto podemos considerar la existencia de un intermedio imaginario en disolución que tiene una estructura geométrica igual a la del complejo de Michaelis (MC), aunque este intermedio no sea un mínimo real de energía libre. Esta estructura en disolución (MCS) tendría la misma coordenada de reacción que el MC. Utilizando este intermedio, podemos descomponer  $\Delta G_{Bind}^{MC}$  en la suma de dos términos, la energía requerida para llevar los reactivos separados y solvatados hasta el MCS ( $\Delta G_R^{MCS}$ ) y la energía de *binding* de esta estructura ( $\Delta G_{Bind}^{MCS}$ ).

$$\Delta G_{Bind}^{MC} = \Delta G_R^{MCS} + \Delta G_{Bind}^{MCS} \quad (2.48)$$

Ahora podemos comparar las energías de *binding* del TS y del MCS de forma directa, por lo que si sustituimos la ecuación 2.48 en la ecuación 2.47 obtenemos (ver figura 2.10 para una mayor claridad):

$$\Delta G_{no-cat}^{\ddagger} - \Delta G_{cat}^{\ddagger} = \Delta G_R^{MCS} + \Delta G_{Bind}^{MCS} - \Delta G_{Bind}^{TS} \quad (2.49)$$

Como  $\Delta G_R^{MCS}$  es un valor positivo, ahora se puede obtener una reducción de la energía libre de activación incluso si la enzima presenta una mejor afinidad por el complejo de Michaelis ( $\Delta G_{Bind}^{MCS}$ ) que por el estado de transición ( $\Delta G_{Bind}^{TS}$ ), mostrando así que la contribución debida a cambios geométricos no ha sido tenida en cuenta en la medida necesaria.

La discusión sobre el origen de la catálisis enzimática puede ser centrada ahora en la preorganización del sustrato, que tiene lugar de forma energéticamente

favorable en la enzima, pero que conlleva un coste energético en disolución. En la bibliografía podemos encontrarnos con las siguientes hipótesis que abordan este aspecto:

- *Desolvatación* [65–68]: Relacionada con la etapa de formación del complejo de Michaelis (ES), y según la cual el modo de funcionamiento de las enzimas estaría basado en la aportación de una cavidad o entorno no polar, encargado de desestabilizar a aquellos reactivos que posean una elevada carga. Dicho efecto debe además tener en cuenta el proceso inicial de desolvatación de los reactivos, y del centro activo de la enzima.
- *Direccionamiento de Orbitales (Orbital Steering)* [69, 70]: Basado en la correlación existente entre la barrera de activación y el grado de solapamiento de los orbitales involucrados en el proceso, patente en determinadas reacciones, establece que el centro activo de la enzima estaría convenientemente diseñado para maximizar dicho solapamiento disminuyendo así la energía de activación de la correspondiente estructura de transición (ES)<sup>‡</sup>.
- *Efectos de Tensión (Strain)* [59, 65]: Implica una desestabilización del sustrato en el complejo ES, debido a fuerzas de carácter estérico, con la consecuente reducción de la energía de activación del proceso de reacción. Uno de los principales argumentos que emplean los detractores de dicho factor es el hecho de que las enzimas poseen cierto grado de flexibilidad, lo que les permitiría acomodar cambios estructurales en el sustrato [62]. Hoy en día, dicha teoría ha evolucionado hacia lo que se conoce como *stress* enzimático, según la cual el centro activo de la enzima sufre menor grado de deformación cuando alberga a la estructura de transición.
- *Near Attack Conformations (NAC)* [71]: Este efecto fue propuesto por Bruice *et al.* Para cualquier reacción, existe un conjunto de geometrías del complejo ES (o de los reactivos en reacciones no enzimáticas) en las que la evolución hacia el estado de transición (y, por tanto, la consecución de la reacción) resulta energéticamente más favorable, debido al parecido geométrico de dicho complejo con el TS. Por esta razón reciben el nombre de conformaciones cercanas de ataque o NACs. Según esta hipótesis, la en-



zima incrementaría la posibilidad de encontrar NACs en el centro activo, reduciendo así la energía de activación de la reacción.

- *Factores Entrópicos* [65]: Asociados en gran medida con la etapa de *binding*, repercutirían a posteriori en la disminución de la barrera de activación  $\Delta G_{cat}^\ddagger$ , a través de la componente entrópica ( $\Delta S_{cat}^\ddagger$ ). La enzima favorecería de este modo el proceso de reacción al reducir grados de libertad al sustrato, fijándolo en su centro activo mediante interacciones específicas (como por ejemplo enlaces de hidrógeno, etc.). Otros autores, [72–74], definen este factor (acuñado  $\Delta G_{crática} = \Delta G_R^{MCS}$ ), como la suma entre la energía libre necesaria para acercar los fragmentos o moléculas que van a reaccionar y la correspondiente empleada en orientarlos de modo adecuado para que tenga lugar el proceso químico.

Finalmente, existen otros ejemplos que son difíciles de encuadrar en las clasificaciones anteriores, ya que son de carácter más generalista.

- *Efecto Túnel* [75–77]: El hecho de que la longitud de onda de *de Broglie* para el átomo de hidrógeno sea cercana a la distancia de los enlaces que forma ( $\lambda \sim 0.63\text{Å}$ ), hace que sea posible su participación en procesos de efecto túnel (*tunneling*). Si el medio enzimático fuera capaz de propiciar dicho efecto, se producirían reducciones drásticas en las barreras de activación de aquellos procesos químicos basados en la transferencia de hidrógeno. Las barreras de activación y efectos cinéticos isotópicos anómalos observados en algunos de estos sistemas, hacen pensar que la presencia de un entorno altamente preordenado (al contrario que en el caso del disolvente), junto con el efecto de *strain* que induce el centro activo puedan ser los responsables (generalmente suelen ir asociados a efectos de tipo dinámico) del efecto catalítico.
- *Efectos Dinámicos* [75, 76, 78, 79]: En los que se postula la existencia de fluctuaciones especiales inducidas por la enzima, que no obedecen la teoría general de Eyring de las velocidades ([80]).

Resumiendo, existen multitud de factores que podrían dar lugar a la catálisis enzimática y que podemos clasificar en dos apartados principalmente: los efectos

sobre el TS y los efectos sobre el MC. Es seguro que ninguno de ellos por sí sólo puede explicar un fenómeno tan complejo en su totalidad, y sólo el estudio de sistemas enzimáticos a nivel teórico puede proporcionar los resultados necesarios como para poder llegar a dar solución al problema planteado.

En esta tesis se va estudiar la reacción catalizada por la enzima Haloalcano Deshalogenasa de *Xanthobacter Autotrophicus* GJ10 y se van a analizar diversos factores, para tratar de elucidar cuales son, al menos en este caso, los factores determinantes de la catálisis enzimática.



### 2.2.3. Interacciones moleculares del ADN

Los organismos vivos contienen un conjunto de instrucciones que dirige la síntesis de ácido ribonucleico (ARN) y proteínas [55]. Esta información reside en el material genético, o *genoma*, que está compuesto por una o más largas moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN). Esta molécula es copiada enzimáticamente durante la síntesis de ARN (en un proceso conocido como transcripción) y posteriormente este ARN es traducido por la maquinaria de fabricación proteica, dando lugar a cadenas polipeptídicas, que posteriormente se plegarán y se unirán para dar lugar a las proteínas. Esta molécula es la encargada de guardar y transmitir *toda* la información necesaria para la construcción de un organismo dado y, sin ella, no sería posible la transmisión de información de un organismo a sus descendientes (herencia genética).

Químicamente, el ADN es un polímero ácido formado por cuatro diferentes monómeros, llamados *nucleótidos*. Un nucleótido está constituido por la unión de una molécula de fosfato a un azúcar de desoxirribosa y una base nitrogenada, que es la que varía de un nucleótido a otro. En función de la base que los conforma, los nucleótidos reciben el nombre de *púricos*: Citosina (C) y Timina (T); y *pirimidínicos*<sup>8</sup>: Guanina (G) y Adenina (A) (ver figura 2.11).

Los nucleótidos se unen entre sí por esterificación del hidroxilo libre del grupo fosfato de un nucleótido con el hidroxilo libre del anillo de ribosa del nucleótido siguiente. De esta forma, los oxígenos restantes del grupo fosfato (dos, uno unido

<sup>8</sup>La base nitrogenada tiene la forma básica de una molécula de purina y pirimidina, respectivamente.

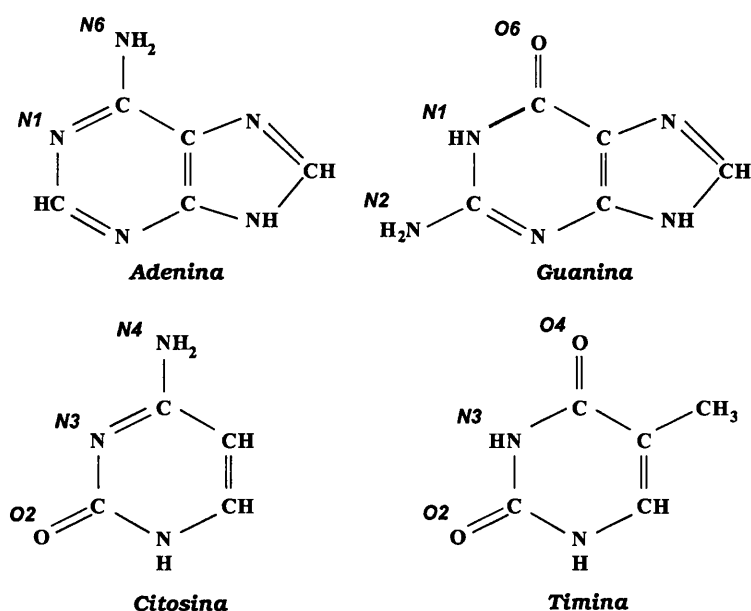


Figura 2.11: Bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos presentes en el ADN. En cursiva, la nomenclatura de los átomos más reactivos.

mediante doble enlace, el otro cargado negativamente) quedan dispuestos hacia el lado contrario de la base nitrogenada.

La mayoría de los genomas están constituidos por una doble cadena de ADN, cada una de las cuales es un polinucleótido. Las dos cadenas se disponen de forma antiparalela, con las bases nitrogenadas enfrentadas entre sí y unidas mediante puentes de hidrógeno. La unión entre las distintas bases es específica: sólo puede unirse una base púrica con una pirimidínica y, más concretamente, la adenina se empareja con la timina y la guanina con la citosina. Cualquier otro tipo de unión resulta desestabilizante para el polinucleótido, ya que ni el número de puentes de hidrógeno formados ni el tamaño final son los adecuados. La doble cadena así formada se enrolla sobre sí misma, dando lugar a una doble hélice. Esta disposición de la molécula de ADN en una doble hélice fue propuesta por J. Watson y F. Crick en 1953 [81], lo que les hizo merecedores, junto a Maurice Wilkins, del premio Nóbel de medicina en 1962 (adelantándose en la propuesta a Linus Pauling).

Dependiendo de la secuencia nucleotídica y de las condiciones de hidratación y polaridad del medio, la molécula de ADN puede adoptar diferentes conformaciones. Las principales conformaciones adoptadas se denominan : *A*, *B* y *Z*, aun-

que la que más predomina en los seres vivos es la *B*. En esta estructura, las bases se disponen de forma coplanar y perpendiculares al eje de la doble hélice, lo que permite tres enlaces de hidrógeno entre la citosina y la guanina y dos enlaces entre la adenina y la timina. El resultado es una doble hélice de giro dextrógiro, caracterizada por tener dos surcos de distinta profundidad, denominados mayor y menor (ver figura 2.12).

La doble hélice es una estructura muy estable (de ahí su utilidad como medio de almacenamiento de información) pero esto no impide que interaccione con otro tipo de moléculas, lo cual tiene gran importancia desde el punto de vista biológico [82]. El ADN puede unirse a otros biopolímeros como RNA, proteínas o hidratos de carbono, o bien a pequeñas moléculas. Como consecuencia de estas interacciones la estructura polinucleotídica experimenta transformaciones esenciales para los distintos procesos biológicos que desarrolla (por ejemplo, el ADN se desenrolla y se separan sus ebras durante el proceso de transcripción).

En esta tesis vamos a estudiar la dinámica vibracional de una pequeña molécula, la histamina, interaccionando con el ADN, con el fin de proponer modelos teóricos consistentes con los datos observados de forma experimental.

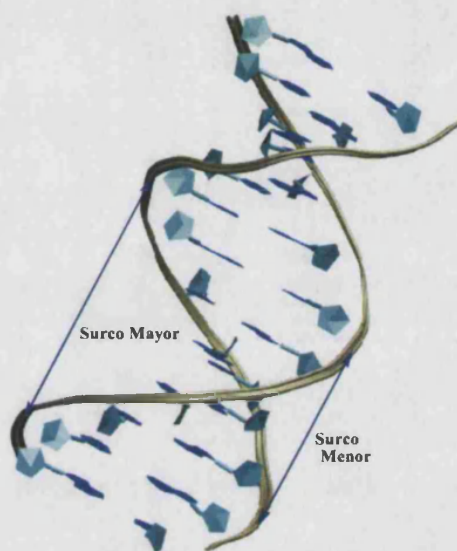


Figura 2.12: Estructura básica de la forma *B* del ADN. En azul oscuro las bases nitrogenadas, en azul claro los azúcares.



## Capítulo 3

### Objetivos

“Examinen ustedes algunos fragmentos de pseudociencia y encontrarán un manto de protección, un pulgar que chupar, unas faldas a las que agarrarse. ¿Y que ofrecemos nosotros a cambio? ¡Incertidumbre! ¡Inseguridad!”

*Isaac Asimov (1920-1992)*

**L**os objetivos del presente trabajo son varios, todos con unos denominadores comunes: los métodos híbridos QM/MM y los efectos del medio.

- *En general:* estudio de la aplicabilidad de los métodos híbridos QM/MM al análisis de los efectos del medio sobre los procesos químicos.
- *En particular:* estudio de los siguientes problemas químicos utilizando los métodos QM/MM:
  - Aplicación del método híbrido QM/MM al estudio de la transferencia electrónica disociativa en medio acuoso. Estudio de la dinámica de la reacción, así como de la dinámica del medio. Determinación de la aplicabilidad de la teoría de Marcus para la transferencia electrónica en este tipo de reacciones.
  - Aplicación del método híbrido QM/MM al estudio de la reacción enzimática de deshalogenación del 1,2-dicloroetano llevada a cabo por

la enzima *Haloalkane dehalogenase* de la bacteria *Xanthobacter Autotrophicus* GJ10. Estudio del complejo de Michaelis en comparación con el medio acuoso. Estudio de la primera etapa de la reacción y de como la enzima influye en ella. Estudio de la dinámica del sistema.

- Aplicación del método híbrido QM/MM al estudio de las interacciones de la molécula de histamina con la de ácido desoxirribonucleico (ADN). Comparación de resultados con los datos experimentales de espectroscopía vibracional.

## Capítulo 4

# Resultados y Conclusiones

“En las profundidades de nuestro inconsciente hay una obsesiva necesidad de un universo lógico y coherente. Pero el universo real se halla siempre un paso más allá de la lógica.”

*Dune*

*Frank Herbert (1965)*

### 4.1. La Transferencia Electrónica Disociativa

En esta sección centraremos nuestra atención en el trabajo realizado sobre la transferencia electrónica disociativa en disolución acuosa, en particular, sobre la reducción disociativa del cloruro de metilo, como ejemplo de proceso químico rápido en medio condensado.

#### 4.1.1. Reducción Disociativa del Cloruro de Metilo

El cloruro de metilo, como otros muchos compuestos halogenados, sufre una rotura del enlace carbono-halógeno cuando acepta un electrón:  $CH_3Cl + 1e^- \rightarrow CH_3 + Cl^-$ . Esta reducción ocurre de forma muy rápida, tanto en fase gas como en disolución. La energía de activación, calculada para este proceso en fase gas, varía considerablemente en función del método de cálculo elegido, desde 19 a 31 kcal/mol [37]. Los efectos del disolvente se han tenido en cuenta en otros estudios, pero generalmente por medio de modelos de continuo [36, 83, 84] que, si bien son adecuados para representar al disolvente como colectivo (las interacciones elec-



trostáticas de larga distancia están muy bien calculadas), carece de la capacidad de representar interacciones específicas (por ejemplo, puentes de hidrógeno). En disolución, el radical anión formado tras la transferencia electrónica está claramente mejor solvatado por la disolución acuosa, lo que favorece el proceso de disociación. Por lo que parece evidente que el disolvente puede llegar a influir de forma notable en esta reacción.

El camino por el cual se produce la disociación no está, todavía, claramente establecido. Generalmente se asume que, tanto la molécula neutra como el anión radical, se disocian por un camino de simetría  $C_{3v}$  [54, 85, 86]. En el caso del cloruro de metilo, se encuentra un pequeño mínimo a lo largo de este camino para el anión radical a una distancia carbono-cloro aproximada de 4.0 Å, correspondiente a un complejo débil entre el anión cloruro y el radical metilo. Sin embargo, Tada y colaboradores mostraron que el mínimo absoluto estaba situado en la curva de disociación de geometría  $C_{2v}$ , estando el punto de corte entre las curvas  $C_{3v}$  y  $C_{2v}$  a una distancia carbono-cloro aproximada de 3.2 Å [83].

Sin embargo, en ningún caso anterior se ha abordado la dinámica del proceso de disociación, ni tampoco el acoplamiento que existe entre la dinámica del soluto y la del disolvente.

#### 4.1.2. Metodología

Para simular la transferencia electrónica disociativa sobre el cloruro de metilo hemos utilizado la metodología híbrida QM/MM. Hemos dividido el sistema de estudio en dos partes: el subsistema cuántico (QM), formado por la molécula de cloruro de metilo se ha tratado utilizando la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) [87]. Aunque los métodos QM/MM se desarrollaron inicialmente para usar hamiltonianos semiempíricos (AM1, PM3, etc) a fin de minimizar el tiempo de cálculo necesario, esta peculiaridad limita su aplicabilidad, dada la falta de fiabilidad que implica, ya que existen procesos que no están bien representados por los métodos semiempíricos. En nuestro caso, para estudiar la formación de un anión radical, es necesario el uso de un hamiltoniano de un nivel computacional elevado. Afortunadamente, existen implementaciones tanto de hamiltonianos *ab initio* [88, 89] como de funcionales de la densidad [90, 91]. En estas implementaciones, el subsistema QM es tratado a un nivel de cálculo superior al de un método

semiempírico, lo que se traduce en mejores funciones de onda y energías, que resulta en mejores geometrías y cargas. Naturalmente, el precio a pagar por el uso de un hamiltoniano de estas características es un mayor tiempo de cálculo, lo que conlleva un intento de recortar tiempo de otros aspectos (por ejemplo, en nuestro caso se usan moléculas de disolvente no flexibles). Para simular el disolvente, utilizaremos una caja de simulación de 300 moléculas de agua representadas por un potencial clásico no flexible de tipo TIP3P [92], que conformarán el subsistema clásico (MM).

Para el cálculo de la función de onda de la parte QM se han resuelto las ecuaciones de Khon-Sham [93], utilizando unas funciones doble zeta con polarización, en concreto: Cl [4s 3p 1d], C [3s 2p 1d] y H [2s]. El conjunto de base auxiliar para el ajuste de la densidad electrónica y el intercambio-correlación fue: Cl (5,4;5,4), C (4,3;4,3) y H(4;4). Véase la documentación del programa DEMON [94, 95] para más detalles. Para el cálculo de la parte de correlación e intercambio se utilizó un funcional Becke-Perdew de tipo no local [96, 97] y equivalente al implementado en el programa GAUSSIAN 98 [98] bajo el nombre de BP86. GAUSSIAN 98 fue empleado para realizar los cálculos en vacío (usando el funcional mencionado anteriormente). Los parámetros de Lennard-Jones utilizados para los átomos cuánticos en el cálculo de la interacción de dispersión-repulsión entre los subsistemas QM y MM fueron tomados de la referencia [99].

Sobre el sistema así constituido se han realizado simulaciones de Dinámica Molecular (DM) en el conjunto NVE, en una caja cuadrada de 20.84 Å, a 25 grados celsius. Las ecuaciones de movimiento se integraron usando un algoritmo de tipo "leap frog" basado en el empleo de cuaterniones [100, 101]. Se usaron condiciones de contorno periódicas y una distancia de cutoff de 10.0 Å junto con un tiempo de integración de 0.5 fs. A los hidrógenos cuánticos se les ha asignado la masa del deuterio, mientras que al resto se les deja el valor normal. De esta forma se asegura una mejor convergencia del algoritmo de dinámica empleado.

### 4.1.3. Resultados

Con el fin de exponer los resultados de forma ordenada, vamos a separarlos en tres grandes apartados.

#### Curvas de energía libre de disociación

Se han calculado las curvas de energía de disociación, tanto para la molécula neutra como para el anión radical, en fase gas y en disolución. Analizamos primero las de vacío para comparar los resultados que hemos obtenido con valores experimentales y trabajos anteriores, validando de esta forma nuestro método de trabajo.

La figura 4.1 muestra las curvas de disociación obtenidas para el cloruro de metilo en fase gas. Con rombos, se muestra la curva de disociación para la molécula neutra, siguiendo un camino de disociación  $C_{3v}$ . La curva con cuadrados representa la disociación del anión radical para el camino  $C_{3v}$  y la de triángulos para el mismo anión radical, pero siguiendo esta vez un camino de disociación  $C_{2v}$ . La curva de la especie neutra presenta un mínimo con una distancia C-Cl de 1.802 Å, cercano al valor experimental de 1.78 Å. Esta especie disocia a un átomo de cloro neutro y un radical metilo con una energía de 87.1 kcal/mol, que es comparable al valor experimental de 83.4 kcal/mol.

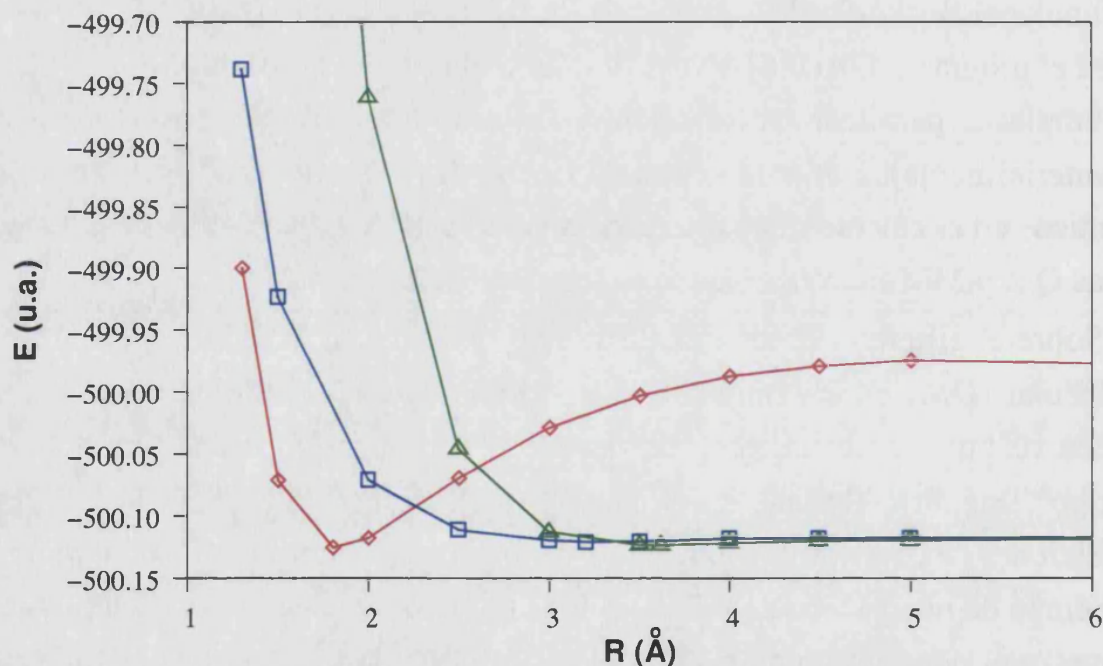


Figura 4.1: Energía de disociación en vacío versus la distancia de separación C-Cl. Con rombos la especie neutra. Con cuadrados y triángulos la disociación de la especie radical anión por el camino  $C_{3v}$  y  $C_{2v}$ , respectivamente.

En cuanto a las curvas de disociación del anión radical, el camino  $C_{3v}$  es el de mínima energía para distancias C-Cl inferiores 3.24 Å. Para distancias mayores, el camino  $C_{2v}$  resulta el de menor energía. Ambas curvas presentan un pequeño

mínimo de energía. En la curva  $C_{3v}$  este mínimo aparece a una distancia C-Cl de 3.203 Å y disocia al anión cloruro y radical metilo con una energía de 3.57 kcal/mol (2.54 kcal/mol si añadimos la corrección counterpoise [102] debido al error de superposición de bases o BSSE). El mínimo de la curva  $C_{2v}$  aparece a una distancia C-Cl de 3.618 Å con una energía de disociación de 5.09 kcal/mol (4.05 kcal/mol cuando usamos la corrección counterpoise). Este mínimo de energía ya fue señalado por Tada y colaboradores [83] en un trabajo previo a una distancia C-Cl de 3.75 Å realizando cálculos UMP2/6-31+G\*. En este trabajo también confirmamos la presencia de los mínimos  $C_{3v}$  y  $C_{2v}$  usando un nivel de cálculo superior: UMP2/6-311++G(3d, 2f, 2p). A este nivel de cálculo hemos encontrado los mínimos de las curvas de disociación del anión radical  $C_{2v}$  y  $C_{3v}$  a distancias C-Cl de 3.641 y 3.398 Å, respectivamente. Las energías de disociación a este nivel de cálculo fueron 4.21 y 1.23 kcal/mol (3.68 y 0.80 kcal/mol si corregimos el BSSE). Esto significa que la estructura  $C_{2v}$  es 3.01 kcal/mol más estable que la  $C_{3v}$  (ó 2.88 kcal/mol cuando corregimos el BSSE), lo cual está en concordancia con los resultados que hemos obtenido para nuestro modelo DFT. Otro tipo de valores calculados, como la afinidad electrónica del átomo de cloro o la afinidad electrónica vertical del cloruro de metilo que aparecen en la Tabla 4.1 también se comparan adecuadamente con datos experimentales [36, 83, 84], lo que confirma la bondad del nivel computacional elegido para representar a nuestro sistema cuántico.

Tabla 4.1: Valores calculados en esta tesis y experimentales de algunas propiedades de la molécula neutra de cloruro de metilo en fase gas.  $d_{C-Cl}$  es la distancia carbono-cloro (en Å),  $D_e$  es la energía de disociación del enlace (en kcal/mol), VEA la afinidad electrónica vertical (en kcal/mol), EA(Cl) la afinidad electrónica del átomo de cloro y  $\mu$  el momento dipolar (en Debyes).

	Experimental	Calculado en esta tesis
$d_{C-Cl}$	1.78 [103]	1.802
$D_e$	83.5 [104]	87.1
VEA	79.5 [105]	65.4
EA(Cl)	83.2 [106]	80.7
$\mu$	1.94 [107]	2.18

En disolución hemos calculado el potencial de fuerza media (PMF) como una función de la distancia C-Cl, tanto para la molécula neutra como para el anión radical. Para hacer esto, hemos utilizado una combinación de las técnicas de dinámica molecular QM/MM y de la integración termodinámica. En cada paso de este procedimiento, se fija la distancia C-Cl a un valor dado y se calcula la fuerza promedio asociada a esta coordenada interna, mediante una simulación de dinámica molecular. La fuerza promedio se integra después para obtener el PMF. La curva correspondiente a la molécula de cloruro de metilo neutra fue obtenida mediante incrementos de 0.2 Å, empezando a la distancia de equilibrio carbono-cloro, 1.827 Å, que es la distancia promedio en una simulación de dinámica molecular de 60 ps sin restricciones. La curva para el anión radical fue calculada utilizando incrementos de 0.1/0.2 Å a partir de la misma distancia de equilibrio. Todos los intentos de simular el radical anión a distancias carbono-cloro inferiores a la misma resultaron en la rotura espontánea de un enlace C-H. Cada punto del PMF fue equilibrado durante 40 ps y promediado durante otros 40 ps, usando en ambos casos un paso de integración de 1 fs. Para construir las curvas, se utilizaron un total de 11 puntos para la especie neutra y 16 para la especie aniónica. La figura 4.2 muestra ambos PMF.

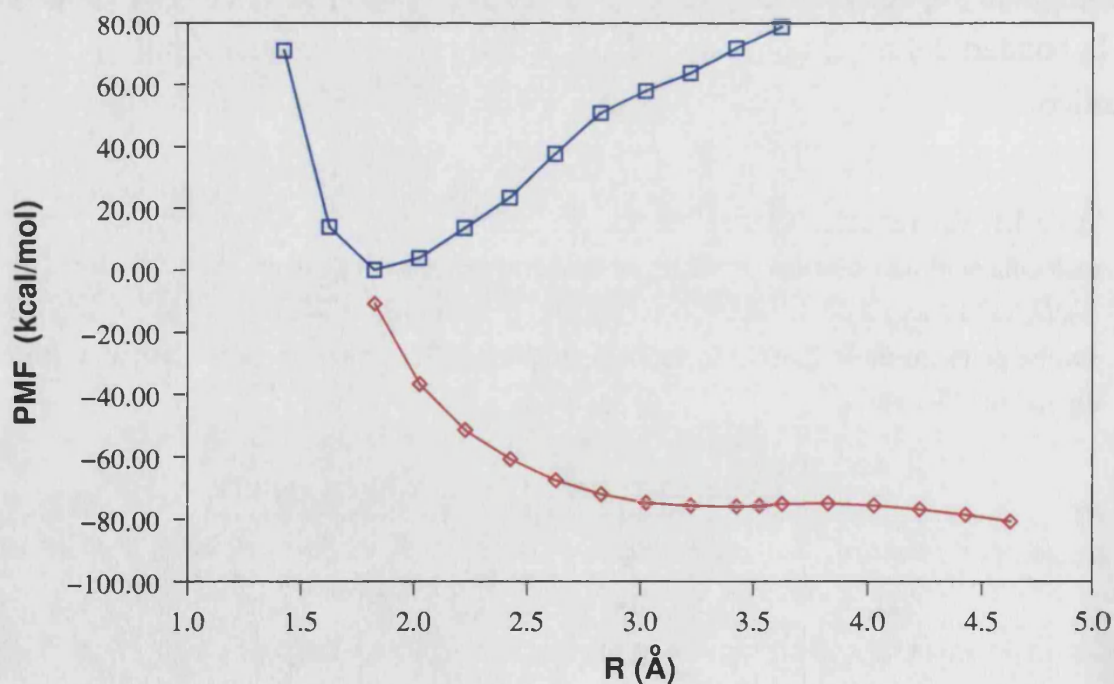


Figura 4.2: Potenciales de fuerza media en disolución versus la distancia de separación C-Cl. Con cuadrados la especie neutra, con rombos el radical anión.

Para poder situar uno de ellos en relación con el otro asumimos un valor inicial cero para la energía del electrón que debe ser añadido y calculamos la energía libre para la transformación del cloruro de metilo neutro al cloruro de metilo radical anión en disolución a una distancia fija C-Cl (1.827 Å en este caso). Dicha energía libre fue estimada como la suma de dos contribuciones:

$$\Delta G \simeq \Delta G_{sol} + \Delta E_{ele} \quad (4.1)$$

donde el primer término representa la diferencia en la energía libre de solvatación entre ambas especies y el segundo la diferencia en energía electrónica y nuclear. El segundo término fue obtenido como la diferencia entre las energías promedio electrónica y nuclear de la molécula neutra y del anión radical en disolución. El primer término fue calculado usando la metodología de perturbación termodinámica: las cargas puntuales de la molécula clásica (el cloruro de metilo en este caso) son cambiadas suavemente desde los valores promedio correspondientes a la molécula neutra a aquellos del radical anión (ver apartado 2.1.3.2). La energía de solvatación es obtenida en función del parámetro de perturbación  $\lambda$ , el cual muta las cargas de Mulliken de la molécula de los valores promedio para la especie neutra a aquellos del anión radical con la distancia C-Cl fijada al mismo. En este estudio cambiamos  $\lambda$  de 0 a 1 en 30 pasos y para cada paso se realizó una simulación Monte Carlo. Previamente se había realizado una equilibración de  $10^6$  movimientos y después una simulación de  $3 \cdot 10^6$  movimientos. Estos cálculos fueron llevados a cabo con la librería DYNAMO [34]. La energía libre obtenida para la transformación de la molécula neutra a la aniónica fue de  $-8.6$  kcal/mol ( $\Delta E_{elec} = 66.4$  kcal/mol,  $\Delta G_{sol} = -75.0$  kcal/mol. Este último valor incluye también la contribución del continuo para tener en cuenta interacciones electrostáticas de larga distancia más allá del cutoff) y es la que se ha usado a la hora de dibujar la figura 4.2.

El PMF obtenido para el anión radical es claramente disociativo y no existen mínimos energéticos a distancias de enlace. La curva presenta una región muy plana entre 3.4 y 4.0 Å, con un pequeño mínimo de energía situado a una distancia C-Cl aproximada de 3.6 Å. Desde esta estructura, la barrera de disociación es de sólo 0.8 kcal/mol. Esto, sumado a los errores asociados a la metodología (como, por ejemplo, el uso de cutoffs y de un bajo número de puntos para realizar la integración termodinámica), hacen que esta estructura no deba ser considerada un

verdadero mínimo de energía, sino una estructura representativa de esta región plana.

A nivel geométrico, la solvatación aumenta la distancia carbono-cloro para la molécula neutra (de 1.802 a 1.827 Å) y aumenta la carga negativa sobre el cloro (de  $-0.11$  a  $-0.16$  u.a.), dando lugar a un aumento del momento dipolar molecular (de 2.18 D a 2.68 D) y, por lo tanto, aumentando la interacción soluto-disolvente. Para el anión radical, lo primero que llama la atención es la simetría del mismo. Mientras que en fase gas el mínimo absoluto de energía tiene una simetría  $C_{2v}$ , en disolución esto no sucede. Una simulación de dinámica molecular del anión radical con la distancia carbono-cloro fija a 3.6 Å muestra que la simetría de este complejo no está claramente definida. El ángulo entre el vector director del plano formado por los hidrógenos del metilo y el vector CCl (que toma los valores de  $180/0^\circ$  y  $90^\circ$  para las simetrías puras  $C_{3v}$  y  $C_{2v}$ , respectivamente) presenta un valor promedio próximo al correspondiente al de una estructura  $C_{2v}$ , pero su evolución temporal muestra oscilaciones de una gran amplitud, aproximadamente de  $\pm 40^\circ$ , lo que indica que la orientación relativa de ambos fragmentos es muy variable. La carga de Mulliken del átomo de cloro en el anión radical en fase gas es de  $-0.92$  a.u. y de  $-0.98$  a.u. en disolución, estando estos valores en concordancia con el grado de transferencia de carga observado para estos complejos en matrices de argón [37].

La figura 4.3 muestra las funciones de distribución radial (RDF) de los hidrógenos de las moléculas del disolvente alrededor del átomo de cloro cuántico. En el caso de la molécula neutra, la interacción soluto-disolvente no es lo suficientemente fuerte como para definir de forma clara una capa de solvatación alrededor del cloro. De acuerdo con la carga negativa localizada en el átomo de cloro, la RDF para el anión radical muestra dos capas de solvatación bien definidas. El número de coordinación obtenido por integración del primer pico de la RDF es de 6.6, cercano al valor obtenido de una simulación de un anión cloruro en disolución acuosa (7.4) [108]. Por razones de comparación, la figura 4.3 muestra también la RDF para el anión radical cuando la distancia carbono-cloro está restringida al valor promediado para la molécula neutra. En este caso, se observan también dos capas de solvatación bien definidas, siendo el número de coordinación del átomo de cloro 5.4. Así pues, la solvatación del anión aparece como una de las fuerzas conductoras de la reacción, contribuyendo a la disociación una vez

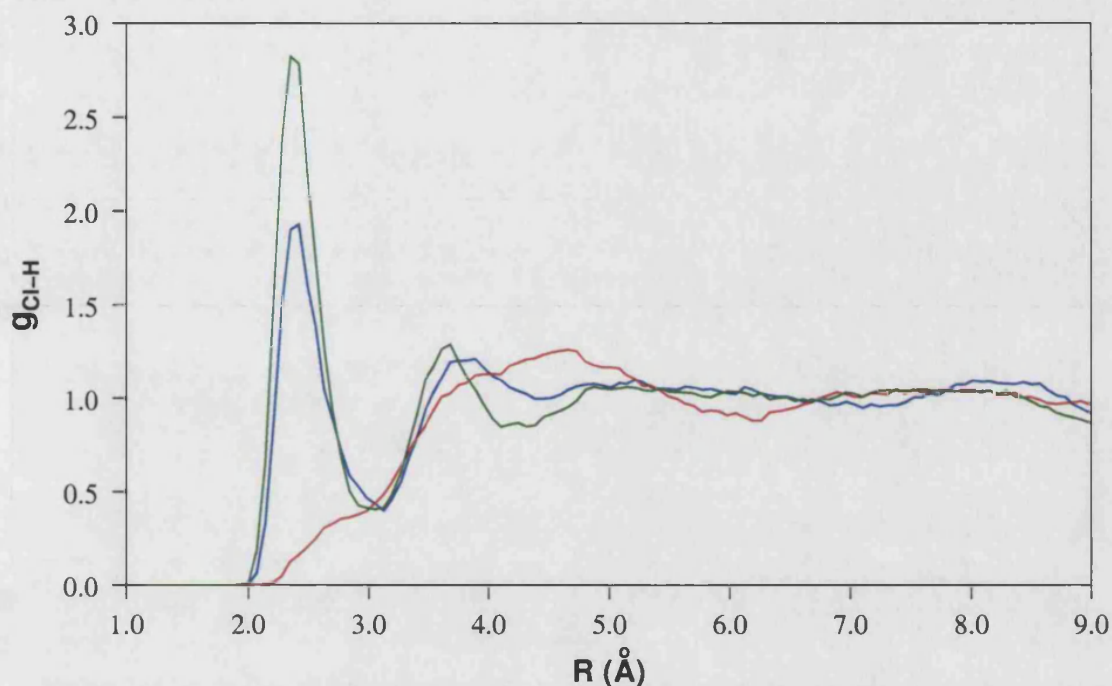


Figura 4.3: Funciones de distribución radial de los hidrógenos del disolvente alrededor del átomo de cloro, para la molécula neutra (en rojo), para el anión radical con la distancia C-Cl restringida al valor promedio de la molécula neutra (en azul) y para el anión radical relajado (en verde).

se ha producido la transferencia electrónica. De donde parece deducirse que el acoplamiento entre la dinámica del soluto y del disolvente puede ser uno de los factores importantes que determinen el mecanismo de reacción.

### La teoría de Marcus

De la figura 4.2, que muestra la energía libre de disociación en disolución para la molécula neutra y el anión radical, podemos obtener también información acerca de las energías libres de activación para el proceso de la transferencia electrónica. Una vez ambos PMF han sido situados uno en relación del otro, su posición final todavía depende de la energía inicial del electrón añadido. Por ello, asumiendo diferentes valores para la energía electrónica, la curva de disociación de la molécula neutra puede ser desplazada con respecto a la aniónica. Repitiendo este procedimiento, podemos obtener parejas de valores para la energía libre de activación (calculada como la diferencia en energía libre entre el punto de cruce de las curvas y la de los reactivos) y la energía libre de reacción (obtenida como diferencia entre la energía libre de productos y reactivos).

En la figura 4.4 se muestran estos valores, los cuales pueden ajustarse a una



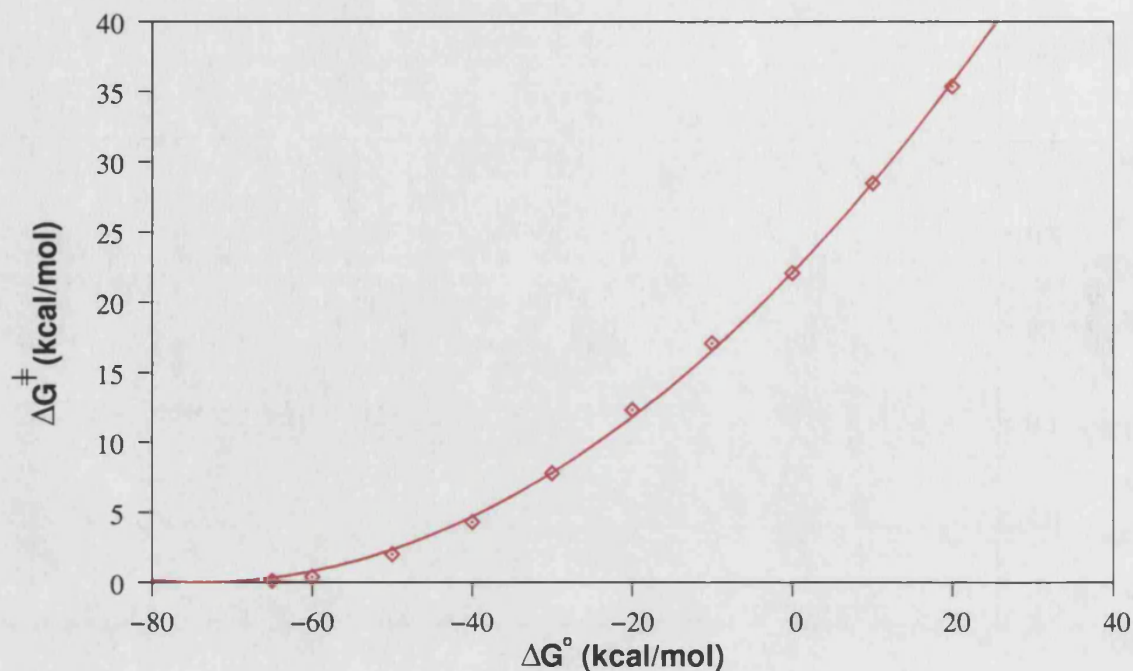


Figura 4.4: Energía libre de activación versus energía libre de reacción. La línea representa el ajuste de los datos a una relación de tipo cuadrática.

ecuación de tipo Marcus con dos parámetros  $a$  y  $b$ :

$$\Delta G^\ddagger = a \left( 1 + \frac{(\Delta G^0 + b)}{4a} \right)^2 \quad (4.2)$$

$a$  es la energía libre de activación a valor cero de energía libre de reacción ( $\Delta G^0 = 0$ ) y  $b$  corrige los valores de  $\Delta G^0$  del hecho de que nuestros PMF no se extienden hasta distancias muy largas y de otros errores metodológicos. Un ajuste por mínimos cuadrados de los datos obtenidos anteriormente da  $a = 15.5$  kcal/mol y  $b = 12.1$  kcal/mol. El valor obtenido para el coeficiente de correlación (0.9996) refleja el excelente ajuste entre las predicciones de Marcus y los valores que hemos obtenido.

En un trabajo anterior de Pérez y colaboradores [54], en el que se limitaba la aplicación de la teoría de Marcus al proceso de transferencia electrónica disociativa, estos autores obtenían un error muy grande al utilizar la relación de Marcus para predecir la energía libre de activación. Nuestros resultados parecen indicar que la relación de Marcus funciona para este sistema, al menos para el rango de energías libres de reacción entre -60 a +20 kcal/mol. Para valores más altos y positivos los errores obtenidos son mayores (4% y 14% para las energías libres de reacción de 40 y 50 kcal/mol respectivamente). Es interesante mencionar que las

energías libres obtenidas en fase gas también cumplen la relación de Marcus (con  $a = 15.2$  kcal/mol,  $b = 0$  y  $R = 0.9990$ ), aunque la curva de disociación no está representada por una curva de Morse, tal y como requiere el trabajo original desarrollado por Savéant [53]. Esto demuestra que las relaciones de tipo cuadrático entre la energía libre de reacción y la energía libre de activación pueden ser de una aplicabilidad mucho más general de la esperada.

### Dinámica de la disociación

Después de una equilibración lo suficientemente larga del sistema formado por una molécula de cloruro de metilo en su forma neutra y 300 moléculas de agua, realizamos una simulación de 60 *ps*, con un tiempo de integración de 1 *fs*. A lo largo de esta simulación, la geometría de la parte cuántica fue dejada completamente libre y guardamos una configuración completa soluto-disolvente cada *ps* de simulación. De esta forma generamos 60 configuraciones desde las cuales iniciamos trayectorias independientes añadiendo un nuevo electrón al subsistema cuántico, simulando así transferencias electrónicas no activadas, esto es, aquellas transferencias en las que la energía inicial del electrón añadido está alrededor de  $-8.6$  kcal/mol (es decir, obligamos a la superficie de energía potencial de la forma radical anión a cruzarse con la de la molécula neutra). El tiempo total de simulación en cada una de estas trayectorias fue de 500 *fs* y utilizamos un paso de integración de 0.1 *fs*, con el fin de estudiar adecuadamente los cambios rápidos que tienen lugar en el sistema. No se realizó un escalado de las temperaturas para poder conservar la energía total del sistema y poder estudiar de esta forma el flujo de energía entre el subsistema cuántico y el clásico.

El análisis de las trayectorias muestra, en general, cambios muy rápidos en la estructura del subsistema cuántico. Podemos clasificar las trayectorias en dos tipos basándonos en la evolución frente al tiempo de la distancia carbono-cloro. Las que hemos denominado trayectorias de tipo I corresponden a aquellas en las que la distancia carbono-cloro aumenta continuamente hasta la disociación completa. En las de tipo II, sin embargo, se observa un complejo temporal entre el anión cloruro y el radical metilo. Del total de las 60 simulaciones realizadas, podemos clasificar 11 como pertenecientes al tipo II, mientras que el resto (49) lo hacen al tipo I. En la figura 4.5 se han representado los valores promedio de la distancia carbono-cloro, para ambos tipos de trayectorias. Después de 30 *fs*, la representación promedio de ambos tipos de trayectorias diverge de forma clara y

para aquellas trayectorias de tipo **II** la distancia permanece básicamente constante, alrededor de 3.8 – 4.0 Å, durante al menos 400 *fs*. Es interesante destacar que continuamos con la simulación de estas 11 trayectorias de tipo **II** durante 500 *fs* adicionales y se observó una disociación completa en 6 de ellas, mientras que en 5 trayectorias el complejo temporal se mantuvo durante el *ps* completo.

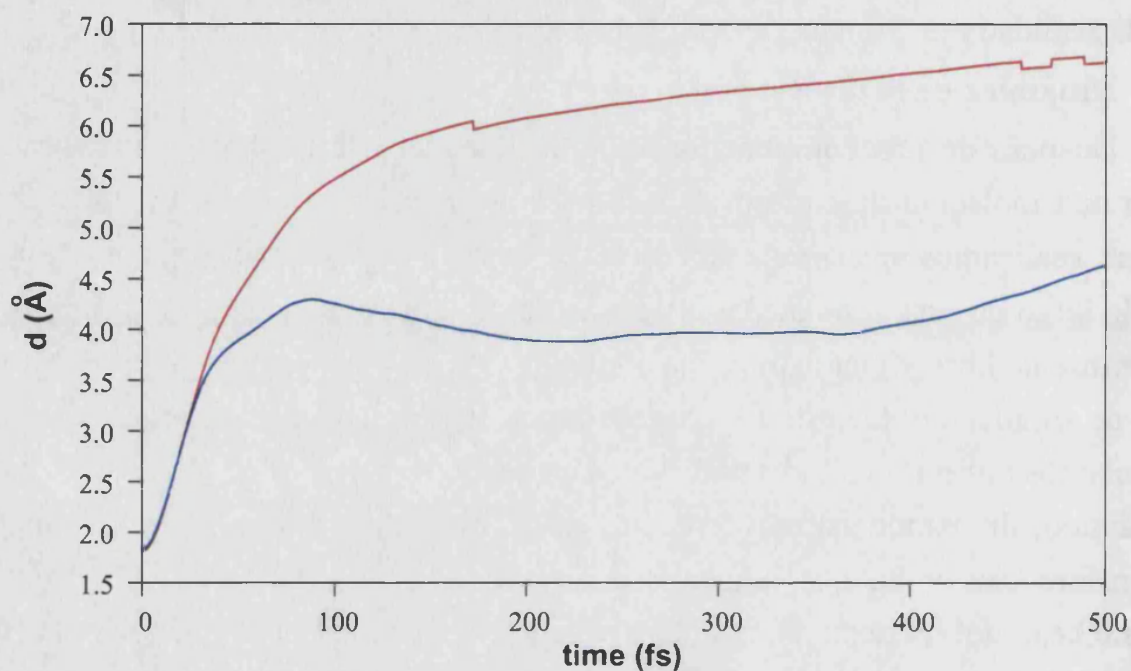


Figura 4.5: Distancia promedio carbono-cloro versus el tiempo para los dos tipos de trayectorias. En rojo las trayectorias de tipo **I**, en azul las de tipo **II**.

Las figuras 4.6, 4.7 y 4.8 muestran el cambio en la energía potencial del subsistema cuántico ( $E_{QM}$ ) frente al tiempo, la energía de interacción entre ambos subsistemas ( $E_{QM/MM}$ ) y la energía cinética de la parte cuántica ( $T_{QM}$ ) para ambos tipos de trayectorias, respectivamente.

La disociación del cloruro de metilo radical anión está dirigida tanto por fuerzas intramoleculares como por intermoleculares. Durante el proceso de disociación, la energía potencial del subsistema cuántico decae alrededor de 50 kcal/mol. La mayor parte de esta variación tiene lugar durante los primeros 20 *fs* de la trayectoria. Transcurrido este período, la energía potencial del subsistema cuántico presenta un mínimo, como consecuencia de la polarización electrónica debida al campo eléctrico del disolvente, y, después, llega a un llano donde, en promedio, la energía potencial de las trayectorias de tipo **II** es ligeramente inferior a la de las trayectorias de tipo **I**, reflejando la existencia de un complejo entre el anión

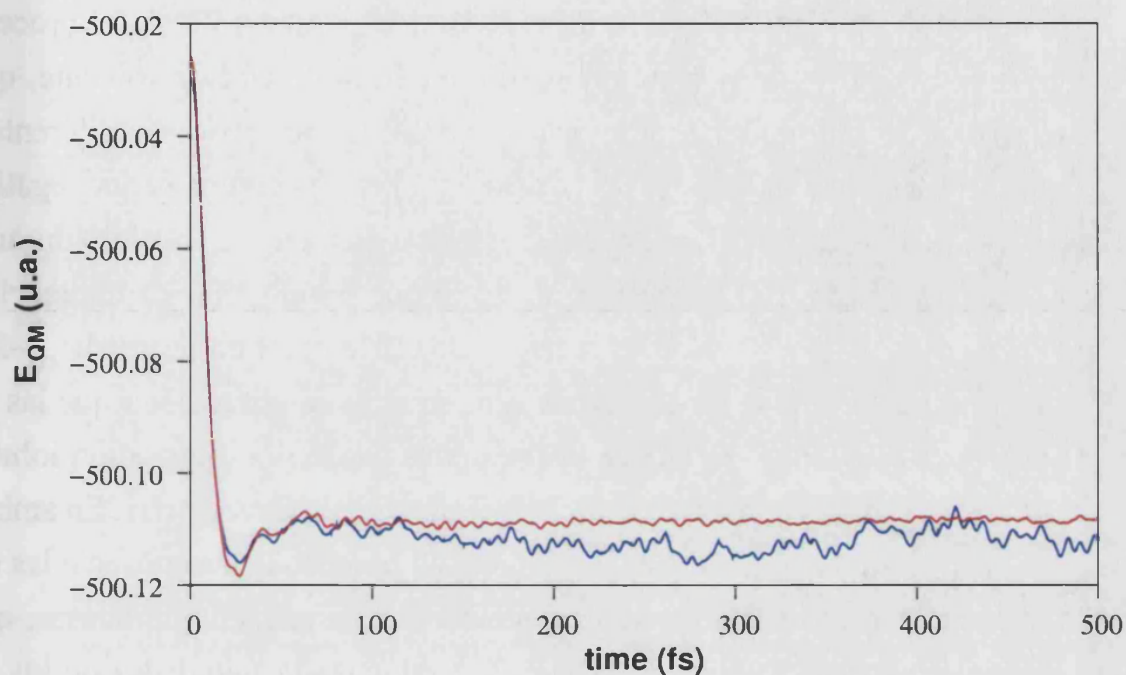


Figura 4.6: Valor promedio para la energía potencial del subsistema cuántico para los dos tipos de trayectorias. En rojo las de tipo I, en azul las de tipo II.

cloruro y el radical metilo.

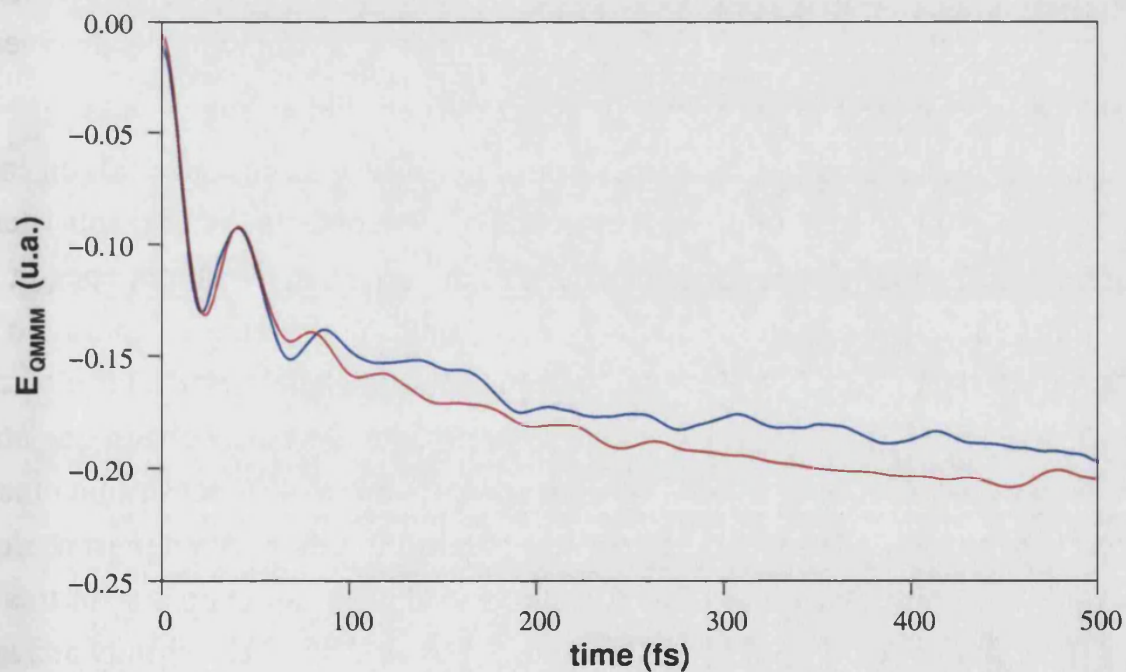


Figura 4.7: Valor promedio para la energía potencial de interacción entre el subsistema cuántico y el clásico para los dos tipos de trayectorias. En rojo las de tipo I, en azul las de tipo II.

En la figura 4.7 podemos ver que después de los primeros 20 *fs*, el proceso de disociación está dirigido por la energía de interacción soluto-disolvente, que pierde alrededor de 120 kcal/mol. Este valor es debido a dos procesos diferentes: la relajación del disolvente después de la adición repentina de una carga negativa y la localización de la carga del anión radical cloruro de metilo en el cloro durante el proceso de disociación. Es interesante destacar que las energías de interacción inicial ( $t = 0$ ) para ambos tipos de trayectorias son diferentes en promedio,  $-3.8$  y  $-7.4$  kcal/mol para el tipo I y II, respectivamente. Esto quiere decir que las de tipo II son 3.6 kcal/mol más negativas, lo que indica una mejor interacción soluto-disolvente para las configuraciones iniciales de este tipo de trayectorias. En ambos casos, la curva de interacción QM/MM presenta un hombro que representa las diferencias en los tiempos de relajación características de estos dos procesos, que tienen lugar de forma simultánea. Este hombro está situado alrededor de los 40 *fs*, que es aproximadamente el tiempo necesario para romper el enlace carbono-cloro y por lo tanto para localizar el electrón en el átomo de cloro (en 40 *fs*, la distancia carbono-cloro es de 3.8 Å para ambos tipos de trayectorias y el promedio de las cargas de Mulliken sobre el átomo de cloro cambia de  $-0.53$  u.a. a cerca de  $-1$  u.a.). Una vez el enlace carbono-cloro se ha roto completamente y el exceso de carga ha sido localizado en el átomo de cloro, la energía de interacción soluto-disolvente aumenta en valor absoluto, debido a la relajación del disolvente alrededor de la carga negativa del átomo de cloro.

Durante todo el proceso, la energía potencial del sistema es convertida en energía cinética. En la figura 4.8 se ha representado la energía cinética del subsistema cuántico en función del tiempo. En esta gráfica podemos ver que la energía cinética del subsistema cuántico aumenta muy rápido al principio, alcanzando un máximo alrededor de 20 *fs*. Este aumento es debido esencialmente a la velocidad relativa de ambos fragmentos de disociación, pero hemos comprobado que otros movimientos moleculares están muy activados. La figura 4.9 muestra una medida del movimiento de *umbrella* del radical metilo. En ella, se ha representado la distancia del átomo de carbono del radical metilo al plano formado por sus tres hidrógenos. Como puede apreciarse, el movimiento de *umbrella* está muy activado al inicio del proceso de disociación, donde aún no se ha podido disipar el exceso de energía potencial. Conforme avanza la reacción, se observa una amortiguación del movimiento en las trayectorias de ambos tipos, a medida que la energía poten-

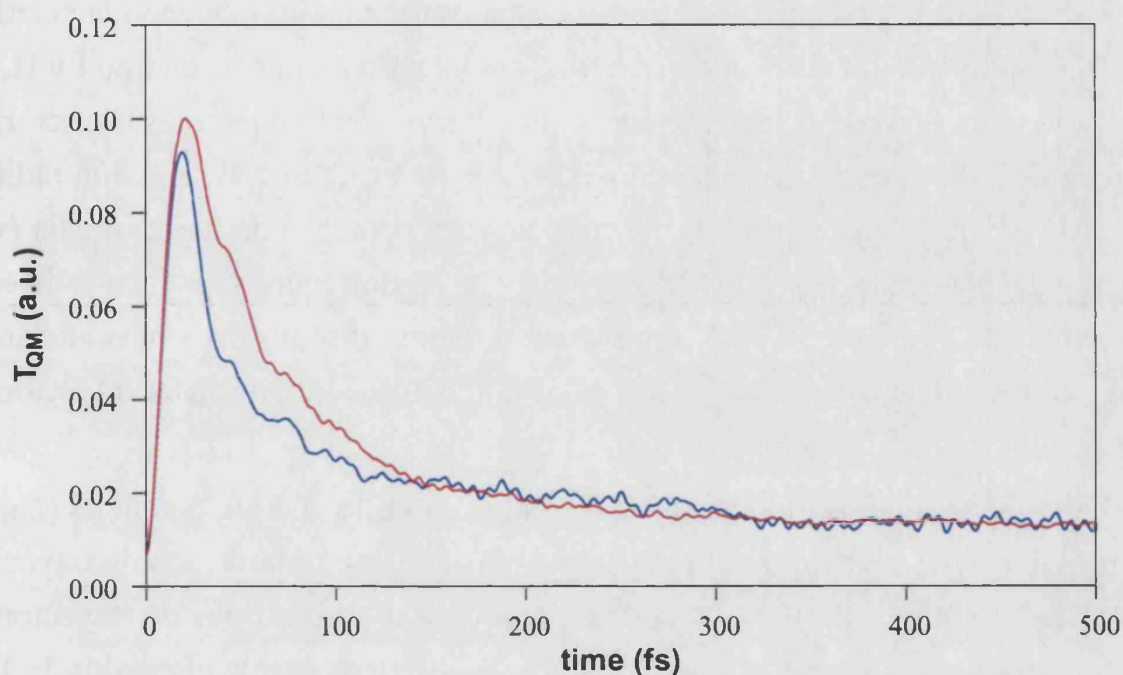


Figura 4.8: Valor promedio para la energía cinética del subsistema cuántico para los dos tipos de trayectorias. En rojo las de tipo I, en azul las de tipo II.

cial se disipa.

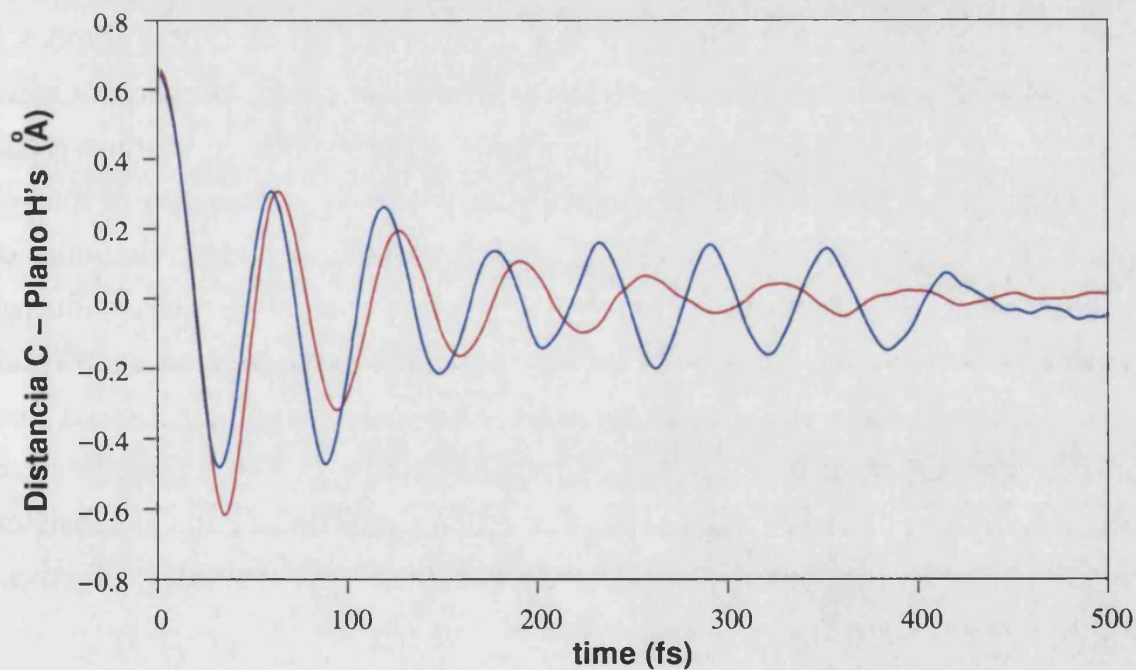


Figura 4.9: Representación del movimiento de *umbrella* del radical metilo, medido como la distancia del átomo de carbono al plano formado por los hidrógenos para ambos tipos de trayectorias. En rojo las de tipo I, en azul las de tipo II.

Volviendo a la gráfica 4.8, después de alcanzar el máximo, la energía cinética se disipa siguiendo un perfil exponencial. Comparando las curvas de tipo I y II, se observa que el proceso de disipación es mucho más efectivo para las trayectorias de tipo II. Esto quiere decir que, para las trayectorias de tipo II, el anión radical cloruro de metilo llega a esta región tan plana del potencial de fuerza media (ver figura 4.2) localizada alrededor de 3.4 y 4 Å con menos energía cinética y, de esta forma, queda atrapado en esta configuración. Como discutiremos más adelante, esto está relacionado con la mejor interacción inicial encontrada en las trayectorias de tipo II.

Las figuras 4.10 y 4.11 muestran los cambios en la energía potencial ( $E_{MM}$ ) y cinética ( $T_{MM}$ ) promedio del subsistema clásico para ambos tipos de trayectorias. Desde el punto de vista de la energía potencial ambos tipos de trayectorias son muy similares: la energía potencial del disolvente aumenta alrededor de 130 kcal/mol como consecuencia de la suma del proceso de carga más la disociación. Cuando pasamos de un soluto poco polar, como el cloruro de metilo, a una especie cargada, la estructura del disolvente se rompe, porque las moléculas de disolvente están ahora fuertemente orientadas por el campo eléctrico del soluto. El valor promedio para las trayectorias de tipo II es ligeramente inferior que para las de tipo I, indicando que, posiblemente, la estructura del disolvente esté menos rota en el primer caso. Para la energía cinética se observan, no obstante, grandes diferencias entre ambos tipos de trayectorias. En los dos casos, la energía cinética del disolvente aumenta durante los primeros 100 fs después de la transferencia electrónica, pero en el caso de las trayectorias de tipo II el aumento es más elevado. La evolución de la energía cinética del disolvente se puede relacionar con la energía cinética del soluto (ver figura 4.8) y con la energía de interacción entre ambos subsistemas (ver figura 4.7). Como comentábamos antes, en las trayectorias de tipo II, el soluto es capaz de disipar su exceso de energía cinética de forma más eficiente que en el caso de las trayectorias de tipo I. Ahora podemos comprobar que la energía cinética del subsistema cuántico es transferida al subsistema clásico (a las moléculas del disolvente) de forma mucho más rápida y efectiva en las trayectorias de tipo II.

Así pues, según nuestros resultados, la disociación del anión radical cloruro de metilo puede tener lugar mediante la formación de un complejo temporal entre el anión cloruro y el radical metilo o no. El PMF muestra la existencia de una re-

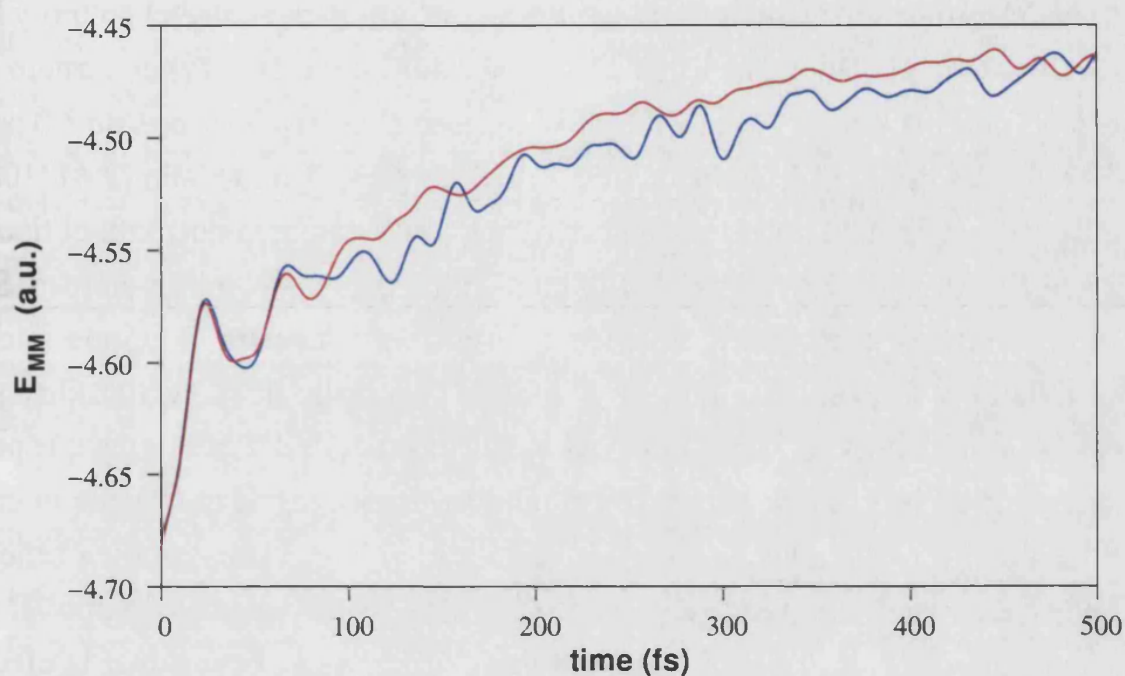


Figura 4.10: Valor promedio para la energía potencia del subsistema clásico para los dos tipos de trayectorias. En rojo las de tipo I, en azul las del tipo II.

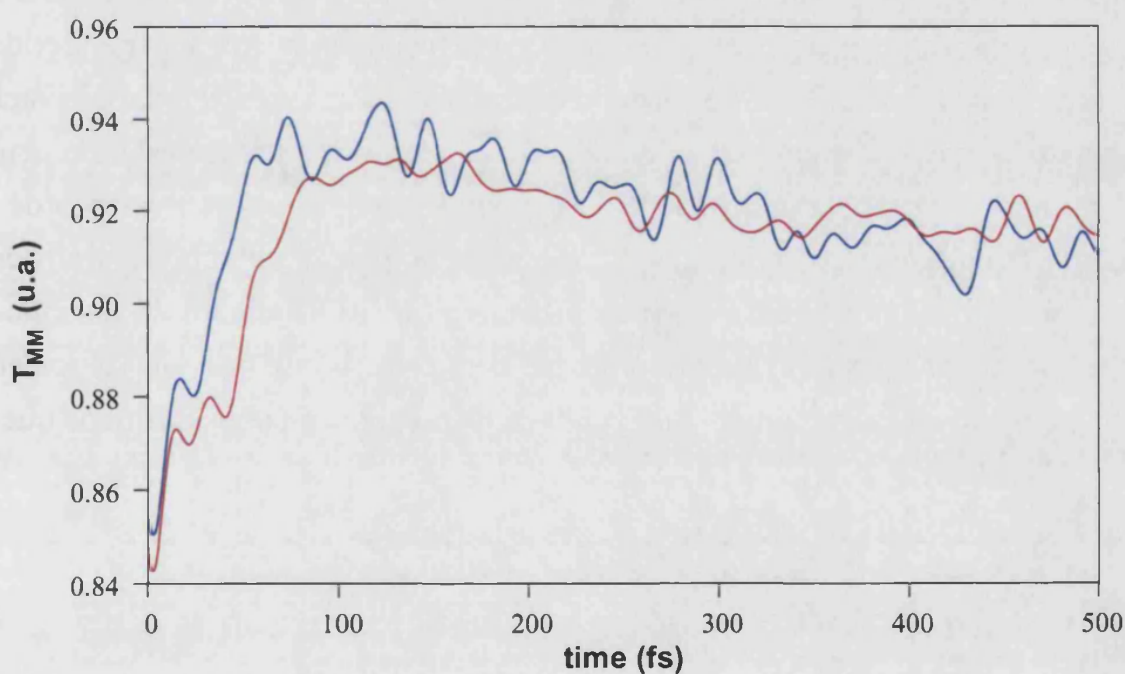


Figura 4.11: Valor promedio para la energía cinética del subsistema clásico para los dos tipos de trayectorias. En rojo las de tipo I, en azul las de tipo II.

gión muy plana en la cual el sistema puede quedar atrapado durante algún tiempo si éste pierde su energía cinética rápidamente, transfiriéndola al disolvente. Hay varios factores que afectan a la eficiencia de esta transferencia. Uno de los más



importantes puede ser la formación de puentes de hidrógeno entre el soluto y las moléculas del disolvente. Después de la disociación (a  $t = 500$  fs) el número de moléculas de agua unidas por puentes de hidrógeno al anión cloruro es de 7.0 para las trayectorias de tipo I, cercano al valor obtenido para el anión solo (7.4) [108]. Para las trayectorias de tipo II es 6.5, un número más pequeño que para el tipo I, debido a la presencia del radical metilo en los alrededores del anión cloruro. Sin embargo, son más interesantes las diferencias encontradas para el tiempo inicial ( $t = 0$ ). Para las trayectorias de tipo I el número promedio de moléculas de agua enlazadas por puentes de hidrógeno al átomo de cloro es de 1.5, mientras que para las de tipo II es de 2.0. Este cambio en el número de enlaces de hidrógeno inicial, establecido entre las moléculas de disolvente y el soluto, viene también reflejado en una energía de interacción más negativa para las trayectorias de tipo II. La existencia de más enlaces de hidrógeno o más fuertes puede determinar la efectividad de la transferencia de energía cinética del soluto al disolvente. Si el electrón se añade al soluto en una configuración en la que existe un mejor contacto entre el átomo de cloro y las moléculas de disolvente, el exceso de energía potencial del soluto al disociarse es convertido a energía potencial, así puede ser transferido a las moléculas del disolvente de forma rápida y, de esta manera, quedar el sistema atrapado en esa región tan plana del PMF. Esta conclusión parece estar de acuerdo con la observación experimental de que, en algunos casos, un cambio de un medio prótico (por ejemplo el agua) a uno aprótico parece inducir una transición de un mecanismo concertado a uno consecutivo [46]. Este efecto de los enlaces de hidrógeno pueden también relacionarse con el hecho de que las velocidades de disociación son generalmente mayores en disolventes polares apróticos que en agua [37, 109].

#### 4.1.4. Conclusiones

En esta parte de la tesis hemos realizado el estudio de una reacción de transferencia electrónica disociativa en disolución. Para ello hemos realizado simulaciones, usando la metodología híbrida QM/MM, del proceso químico que tiene lugar tras la adición de un electrón a la molécula de cloruro de metilo. En primer lugar hemos obtenido las curvas de energía libre para la disociación de la molécula de cloruro de metilo, tanto en su estado neutro, como para el anión radical en disolu-

ción. Usando simulaciones moleculares y la técnica de integración termodinámica, calculamos el PMF de la reacción en función de la distancia carbono-cloro. El PMF para el anión radical muestra una región muy plana, alrededor de 3.4 – 4.0 Å, correspondiente a un complejo débil de simetría  $C_{2v}$ .

Situando adecuadamente los PMF's anteriores mediante la metodología de perturbación termodinámica, se ha comprobado la existencia de una relación de tipo cuadrática entre la energía libre de activación y la energía libre de reacción. Estos resultados confirman la aplicabilidad de la teoría desarrollada por Marcus.

Hemos analizado también los aspectos dinámicos de la transferencia electrónica disociativa. Para un conjunto de 60 trayectorias de reacción, cuyos puntos de partida fueron tomados de una simulación de equilibrio del cloruro de metilo en disolución acuosa, se observan dos tipos de trayectorias diferentes (que hemos denominado I y II). Para las trayectorias de tipo I, el sistema evoluciona directamente desde los reactivos hacia los productos separados, el anión cloruro y el radical metilo. Para las trayectorias de tipo II, se observa un complejo débil entre el radical metilo y el anión cloruro a una distancia carbono-cloro cercana a 3.8 Å. Del análisis de factores intra e intermoleculares, la idea que parece adaptarse bien a los resultados es que el cloruro de metilo puede disociarse sin y con formación de un complejo temporal. Tal y como mostramos anteriormente, el PMF muestra una región muy plana a esa misma distancia, con lo que la molécula podría quedar atrapada en esta región al disociarse. Para ello sería necesario que el cloruro de metilo pudiese eliminar el exceso de energía cinética que tiene a causa de la disociación, transfiriéndola a las moléculas de disolvente. Uno de los factores más importantes que determinan la efectividad de esta transferencia es la existencia de enlaces de hidrógeno entre el soluto y el solvente. Así, hemos comprobado que las trayectorias de tipo II poseen inicialmente, en promedio, un mayor número de puentes de hidrógeno con las moléculas del disolvente. Esta interacción permitiría transferir el exceso de energía cinética al disolvente, de una forma más efectiva que en las trayectorias de tipo I. Este hecho parece estar en concordancia con algunos hallazgos experimentales sobre los efectos que el disolvente produce en las reacciones de transferencia electrónica.



## 4.2. Las Enzimas como Catalizadores

En esta parte expondremos el trabajo realizado sobre la reacción enzimática que ha sido objeto de estudio en la presente tesis y los resultados obtenidos para la misma.

### 4.2.1. 1,2-dicloroetano y Haloalcano deshalogenasa de *Xantobacter autotrophicus*

Los compuestos orgánicos halogenados constituyen una clase importante de productos químicos que son ampliamente utilizados en la industria y en la vida diaria [110]. Abarcan toda una serie de sustancias aromáticas, ácidas y alifáticas que tienen una gran cantidad de aplicaciones [111]. Son usados en grandes cantidades como, por ejemplo, pesticidas, aditivos de gasolina, desinfectantes, plásticos, disolventes en los procesos de limpieza en seco, disolventes de pinturas, agentes de extracción, etc. y como precursores para la producción de medicamentos, siliconas y polímeros como PVC y Teflón, entre otros.

Sin embargo, se ha demostrado que muchos de estos compuestos químicos tiene serios efectos secundarios. En 1987, el Departamento de Salud y Seguridad del Reino Unido informó de la elevada frecuencia de abortos espontáneos entre las empleadas de la industria de la limpieza en seco, donde se usan disolventes halogenados [112]. Esto es sólo un ejemplo. Hoy en día se reconoce un gran número de compuestos halogenados como potencialmente mutagénicos, carcinogénicos y/o tóxicos [113–117]. Además, muchos de los compuestos halogenados son *xenobióticos*, esto es, su origen es sintético, por lo que son desconocidos en la naturaleza. Esto hace a este tipo de compuestos muy a menudo resistentes a una degradación biológica. El hecho de que hayan entrado en nuestro entorno (aire, agua y suelo) en enormes cantidades debido a su uso (y, en gran medida, abuso), hace que estos contaminantes sean potencialmente peligrosos para los ecosistemas y la salud humana.

Un ejemplo ilustrativo lo tenemos en los compuestos clorofluorocarbonados (CFC's). Desde los años 50, este tipo de compuestos han sido usados como refrigerantes y como gases propulsores en aerosoles. A consecuencia de esto, grandes cantidades de estos compuestos han quedado almacenados en la atmósfera. De-

safortunadamente, años después se descubrió que estaban implicados en la destrucción de la capa de ozono estratosférico que protege a la Tierra de la radiación ultravioleta [117]. La desaparición de esta capa protectora pone en serio peligro la vida sobre la Tierra y ha provocado, entre otros muchos efectos, un aumento de la cantidad de casos de cáncer de piel. Aunque el uso de estos compuestos ha sido prohibido desde la década de los 90, debido a la gran estabilidad que presentan no se espera una reducción de la cantidad de los mismos en la estratosfera hasta pasados al menos 10 años desde la reducción efectiva de su uso (que no ha tenido lugar con su prohibición).

Debido a los efectos tóxicos que tienen este tipo de compuestos químicos y a su persistencia en el medioambiente, los científicos han centrado su atención en el desarrollo de métodos que permitan limpiar zonas contaminadas por compuestos halogenados. Una de las vías de estudio seguidas es la del empleo de microorganismos como agentes descontaminantes, puesto que no todos los compuestos halogenados son necesariamente xenobióticos. Hoy en día, se conocen alrededor de 3000 compuestos halogenados con un origen biológico [118]. Microorganismos, insectos, plantas y animales superiores pueden sintetizar compuestos halogenados complejos, aunque la mayoría son producidos por organismos marinos. Por ejemplo, el 1,2-dibromoetano y el tricloroetano pueden ser producidos por microalgas marinas [119]. Después de todo, si algunos organismos son capaces de sintetizar este tipo de compuestos, deben existir otros capaces de degradarlos, de modo que la solución ideal sería encontrar un organismo que utilizase estos contaminantes como fuente de carbono y energía.

En la actualidad, el compuesto xenobiótico 1,2-dicloroetano (DCE) es, de lejos, el compuesto hidrocarbonado clorado más sintetizado, con un volumen de producción industrial anual de más de  $25 \cdot 10^6$  toneladas en todo el mundo [120]. Se utiliza como disolvente y como la sustancia de partida para la producción de cloruro de vinilo y PVC. Sin embargo, el DCE es carcinogénico para los humanos y ha sido añadido a la "lista negra" de agentes contaminantes de algunos países, entre ellos Canadá y Estados Unidos [121]. Janssen y colaboradores [122] descubrieron que la bacteria *Xanthobacter autotrophicus* puede vivir en un medio que contiene 1,2-dicloroetano. Esta bacteria ya ha sido usada con éxito en el tratamiento de aguas subterráneas en Lübeck, Alemania. La zona industrial de esta localidad estaba fuertemente contaminada con DCE, debido a los residuos de lo

que había sido una industria farmacéutica. Para proteger la zona residencial y un río cercano, se contruyó un planta depuradora para el tratamiento de las aguas subterráneas. La depuradora utilizaba la bacteria *Xanthobacter autotrophicus* para degradar el DCE presente en el agua, a un ritmo de entre 5 y 20 m<sup>3</sup> por hora. En 5 años se eliminaron 2 toneladas de DCE [123] de las aguas subterráneas.

*Xanthobacter autotrophicus* produce una enzima que es capaz de hidrolizar los enlaces carbono-cloro de una amplio rango de compuestos halogenados, la Haloalcano deshalogenasa (DhlA). Muchos de estos compuestos son claramente contaminantes, como el 1,2-dicloroetano (DCE), el 1,2-dibromoetano (DBE) y el 1,3-dicloropropano [124]. DhlA convierte sus sustratos en los correspondientes alcoholes sin la ayuda de cofactores ni oxígeno molecular (que es un oxidante muy agresivo), y muestra un máximo de actividad catalítica a pH 8.2 y 37 grados Celsius. Sin embargo, la afinidad que muestra hacia su mejor sustrato, el DBE, y el número de recambio<sup>1</sup> es bastante bajo ( $K_m = 0.01mM$ ,  $k_{cat} = 3.0s^{-1}$ ). Esta enzima presenta muy poca afinidad hacia sustratos de cadena larga (más de 4 átomos de carbono), alcanos altamente clorados y compuestos polares como alcoholes o epóxidos; y ninguna frente a compuestos como el 1,2-dicloropropano, pese a su similitud estructural con el DCE (que, curiosamente, es un compuesto xenobiótico).

La estructura tridimensional de la DhlA ha sido resuelta hasta con una resolución de 1.15 Å mediante cristalografía de rayos-X [125–127]. Es una enzima soluble y monomérica de 35kDa y 310 aminoácidos. Su estructura tridimensional puede apreciarse en la figura 4.12. El centro activo esta localizado en una cavidad de 37 Å, que es lo suficientemente grande como para acomodar al DCE o al DBE, pero demasiado pequeña para moléculas mayores. En el centro activo hay dos residuos cargados, Asp124 e His289, que junto con un tercero, Asp260, forman un conjunto de residuos catalíticos presentes en todas las enzimas hidrolíticas de este tipo denominado *tríada catalítica*. El resto de los residuos que conforman la cavidad son esencialmente hidrofóbicos: Glu56, Trp125, Phe128, Leu262, Leu263, Phe164, Phe172, Trp175, Phe222, Pro223 y Val226 [128]. Los datos cristalográficos sugieren además que esta cavidad está unida al disolvente mediante un túnel [125].

<sup>1</sup>El número de recambio se define como la cantidad de sustrato transformado por unidad de tiempo por una cantidad dada de enzima

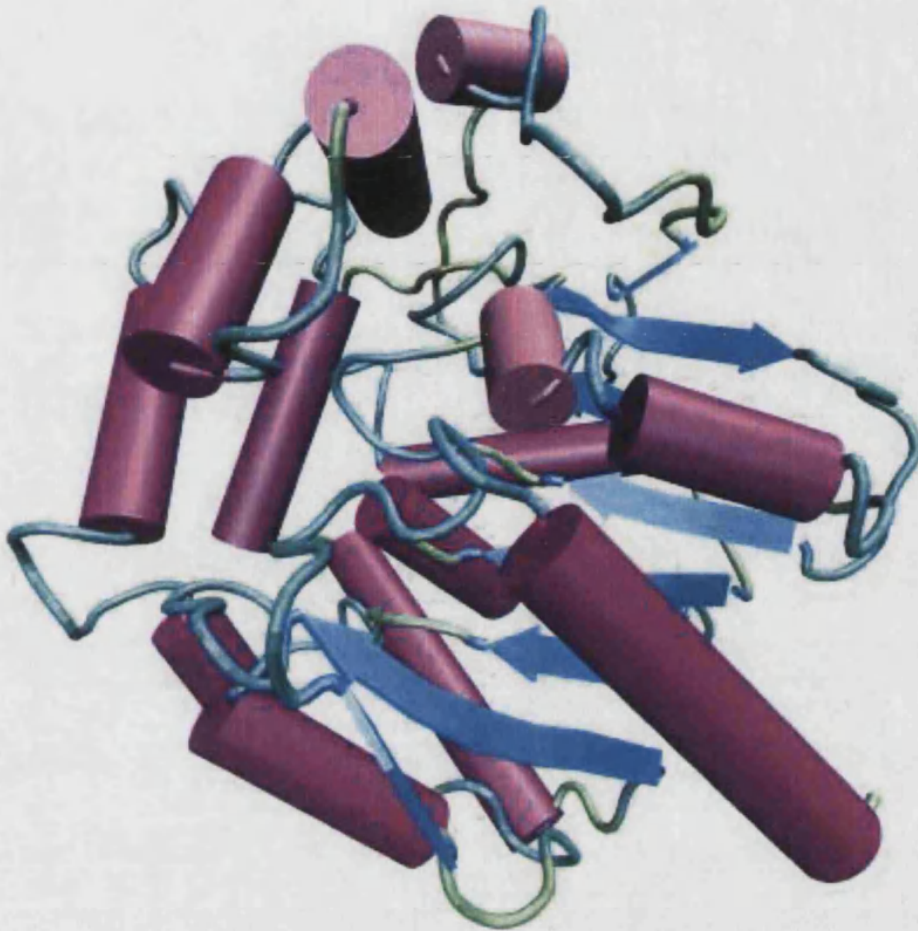


Figura 4.12: Representación tridimensional de la enzima DhIA.

La reacción de deshalogenación catalizada por la DhIA procede a través de tres intermedios que han sido “capturados” en cristales de DhIA: el Complejo de Michaelis (MC) o enzima-sustrato, un intermediario covalente y un complejo enzima-ión haluro. Los datos de rayos-X indican que, una vez el sustrato ha entrado en el centro activo, el grupo carboxilato del Asp124 (uno de los residuos de la tríada catalítica) lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el átomo de carbono terminal del sustrato que lleva unido el halógeno, para producir un intermedio alquil-enzima y un ión haluro (ver figura 4.13, (a)). El ión haluro permanece enlazado mediante puentes de hidrógeno a los grupos NH de los indoles de los aminoácidos Trp125 y Trp175. En el siguiente paso (ver figura 4.13, (b)), el intermedio covalente es atacado por una molécula de agua, activada a su vez por la acción combinada de los residuos restantes de la tríada: His289 y Asp260 (no mostrado en la figura por motivos de claridad). Esta hidrólisis produce un alcohol

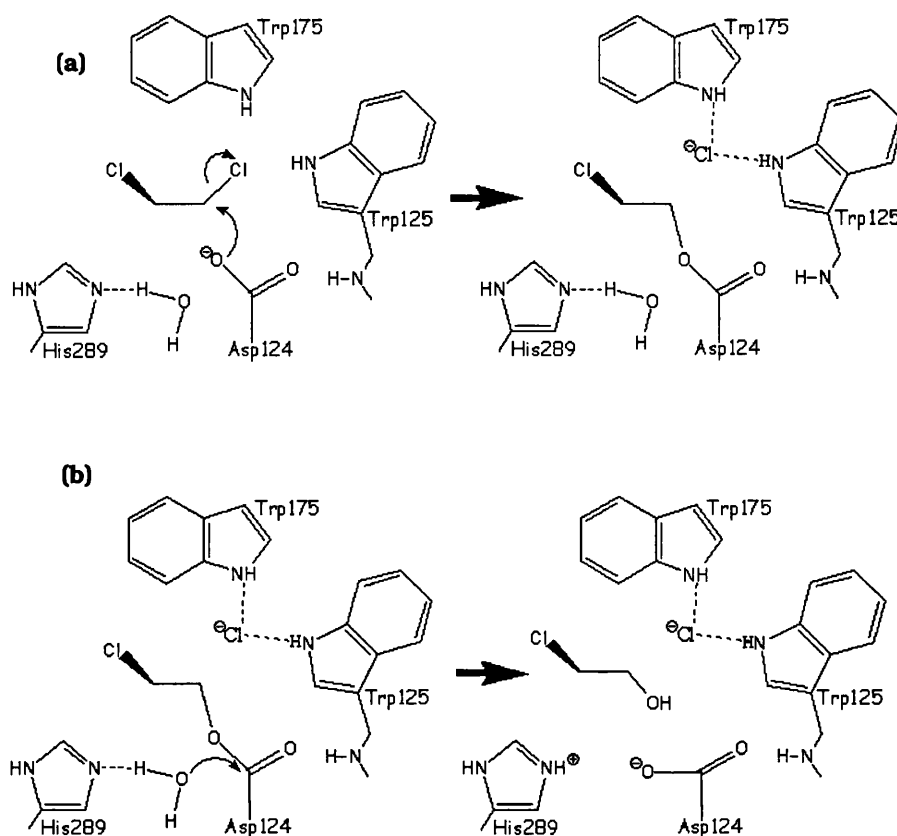


Figura 4.13: Mecanismo catalítico de la DhlA. (a) Primer paso, deshalogenación. (b) Segundo paso, hidrólisis.

que probablemente deje la cavidad catalítica de forma inmediata, ya que nunca ha sido cristalizado en el interior de la misma. El ciclo reactivo se completa con la liberación del ión haluro y de un protón.

#### 4.2.2. Equilibrio Conformacional

En esta primera parte de las tres que conforman el estudio sobre la enzima Haloalcano deshalogenasa se ha estudiado la estructura del Complejo de Michaelis (MC): el sustrato 1,2-dicloroetano (DCE) en el centro activo de la misma. Un conocimiento adecuado del origen y magnitud de las interacciones enzima-sustrato es necesario si lo que pretendemos es diseñar nuevos catalizadores. La naturaleza de estas interacciones, tanto en el MC como en el TS puede ser muy variada (ver

la cita [129] para una revisión reciente), aunque muchos autores parecen apuntar hacia la importancia de las interacciones de tipo electrostático [130]. En este trabajo, vamos a intentar evaluar las interacciones electrostáticas en el sitio activo de la Dh1A en comparación con su valor en disolución acuosa.

El DCE es un magnífico candidato como prueba para estudiar los efectos electrostáticos, ya que su equilibrio conformacional puede ser determinado mediante interacciones de tipo electrostático con el medio. En fase gas, la forma *trans* del DCE ( que posee un ángulo dihedro Cl-C-C-Cl de  $180^\circ$  predomina sobre los dos conformeros equivalentes denominados *gauche* ( $+60^\circ$  y  $-60^\circ$  grados). Que el conformero *trans* posea mayor población es debido a la minimización de las repulsiones Cl-Cl que existen en dicha conformación. Cuando el DCE es solvatado, la población de las conformaciones *gauche* aumenta, porque el momento dipolar del DCE aumenta continuamente cuando el ángulo dihedro disminuye. Esto quiere decir que la población relativa de ambos conformeros puede ser controlada cambiando la polaridad del disolvente. Puesto que existen datos experimentales en diferentes disolventes [131], este sistema ha sido empleado como prueba para diferentes modelos de solvatación y, en general, las tendencias experimentales son correctamente reproducidas [132–134].

En la estructura cristalina del complejo de Michaelis [126], obtenida a  $4^\circ$  Celsius y pH 5, el DCE muestra una conformación en *trans*, pero la densidad observada para el átomo de cloro no reactivo es muy débil. Bruice y colaboradores [135–137] han mostrado recientemente que, en simulaciones realizadas en condiciones equivalentes a pH 7, esta estructura se mantiene durante las minimizaciones de energía, pero que el DCE rota hacia una conformación *gauche* cuando se somete el sistema a una dinámica molecular a 300 K, permaneciendo en ella durante gran parte de la simulación. Un cambio hacia esta conformación en *gauche* es muy importante para el mecanismo de reacción ya que, en *trans*, el átomo de cloro no reactivo impide el acercamiento del carboxilato del Asp124, dificultando la evolución del MC hacia el TS.

#### 4.2.2.1. Metodología

Para estudiar la influencia del medio en el equilibrio conformacional del DCE, hemos obtenido el potencial de fuerza media (PMF) del sistema en función del



ángulo dihedro Cl-C-C-Cl en fase gas, en disolución y en el centro activo de la Dh1A. Todos los cálculos se han realizado usando la librería DYNAMO [138]. Se ha empleado la metodología QM/MM para representar nuestro sistema, usando el hamiltoniano semiempírico AM1 para el subsistema cuántico, mientras que el subsistema clásico ha sido representado por un campo de fuerzas OPLS-AA [139, 140]. Para realizar el estudio en fase gas, se utilizó la molécula de DCE (8 átomos QM). Para los de disolución, el DCE fue situado en el interior de una caja de agua de 31.4 Å, con las moléculas representadas por un potencial de tipo TIP3P [92]. Fueron eliminadas todas aquellas moléculas que solapasen con nuestro soluto, dando lugar a un sistema con 1030 moléculas de agua que conformaron la parte MM. Para los cálculos en la enzima se utilizó la estructura cristalina de la Dh1A con 1,2-dicloroetano, cuya entrada en el Protein Data Bank (PDB) es 2DHC. El DCE, y parte del residuo de aminoácido Asp124, fueron tomados como la parte QM (un total de 15 átomos cuánticos). El enlace entre los carbonos CA y CB de la cadena lateral del Asp124 fue roto, para separar ambos subsistemas, y se añadió un átomo link para completar la valencia del subsistema cuántico (ver figura 4.14). La parte MM queda entonces formada por el resto de la enzima (4851 átomos más 121 moléculas de agua de cristalización) introducido en una caja, de 55.9 Å de lado, de moléculas de agua TIP3P, dando lugar a un sistema de 17109 átomos.

Para realizar las dinámicas moleculares (MD) se emplearon condiciones de contorno periódicas y una distancia de corte de 12 Å de radio. En todos los casos, la geometría de partida fue una conformación *gauche* del DCE, que es la más estable en el interior de la enzima. Se usó la aproximación de *umbrella sampling* [32] para mantener el sistema en un valor determinado de la coordenada de reacción (el ángulo dihedro Cl-C-C-Cl) por medio de la adición de un potencial de tipo parabólico. El valor de la constante de fuerza usada para el muestreo ( $0.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{deg}^{-2}$ ) fue determinada de manera que permita un completo solapamiento entre las diferentes ventanas que conforman el PMF. La longitud de cada ventana (10 ps) y el número total de ventanas (60 en disolución y fase gas y 120 en la enzima) fueron elegidas para permitir un muestreo completo del ángulo dihedro, a la temperatura de trabajo de 300 K. Las variaciones del ángulo dihedro son almacenadas durante las dinámicas moleculares y, luego, son usadas todas juntas para producir el PMF, utilizando el conjunto termodinámico canónico (NVT) usado en todos los cálculos.

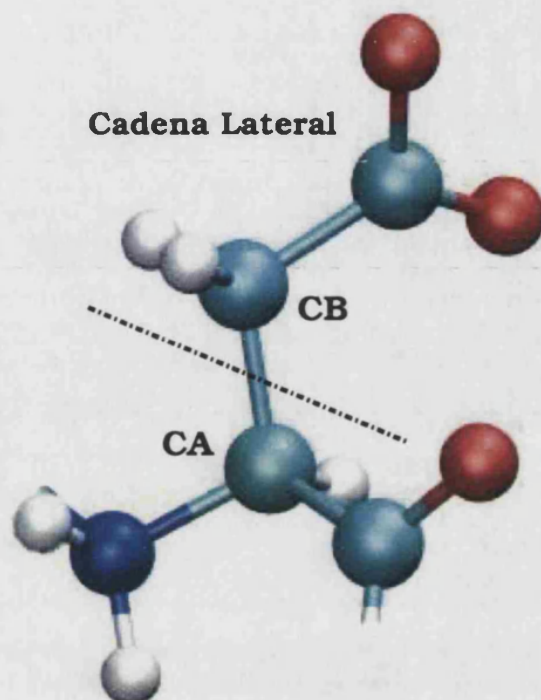


Figura 4.14: Aminoácido aspartato (Asp) en su forma ácida. La línea indica el enlace que se ha roto para separar el subsistema cuántico del subsistema clásico.

Para cada ventana, se almacena también un fichero de trayectoria, para poder analizar la misma, calculando promedios con el tiempo. Para comparar la magnitud de las interacciones electrostáticas en diferentes medios, realizamos los promedios utilizando la misma distancia de corte de 12 Å utilizado durante las simulaciones. Los promedios fueron calculados a determinados ángulos dihedros, puntos característicos del PMF.

#### 4.2.2.2. Resultados

En la figura 4.15 se muestran los PMFs obtenidos en fase gas, en disolución acuosa y en el centro activo de la enzima, en función del ángulo dihedro Cl-C-C-Cl. En fase gas el PMF contiene tres mínimos diferentes, que se corresponden con los conformeros *trans* y *gauche* (con ángulos dihedros de  $180^\circ$  y  $\pm 72^\circ$ , respectivamente). La diferencia de energía libre entre el *trans* y los dos *gauche* (equivalentes) es de 0.80 kcal/mol a favor del conformero *trans*. Este resultado es comparable con el valor experimental de 1.20 kcal/mol [131]. En disolución acuosa, la

diferencia de energía libre entre el conformero *trans* y ambos conformeros equivalentes *gauche* (con un ángulo dihedro de  $\pm 63^\circ$ ) es de  $-0.38$  kcal/mol, siendo ahora la forma *gauche* la más estable. Las diferencias de energía libre entre ambos conformeros han sido medidas en diferentes disolventes. Ordenados por constante dieléctrica creciente:  $0.11$  en tetrahidrofurano ( $\epsilon = 7.58$ ),  $-0.14$  en acetona ( $\epsilon = 20.7$ ) y  $-0.22$  en acetonitrilo ( $\epsilon = 36.0$ ). Un reciente trabajo teórico es disolución de Jorgensen y colaboradores, realizado con simulaciones de Monte Carlo, sitúa la diferencia de energía en  $-0.62$  kcal/mol [133]. Estos datos bibliográficos se comparan bien con nuestros resultados obtenidos para fase gas y disolución, lo que refleja la bondad de nuestro método.

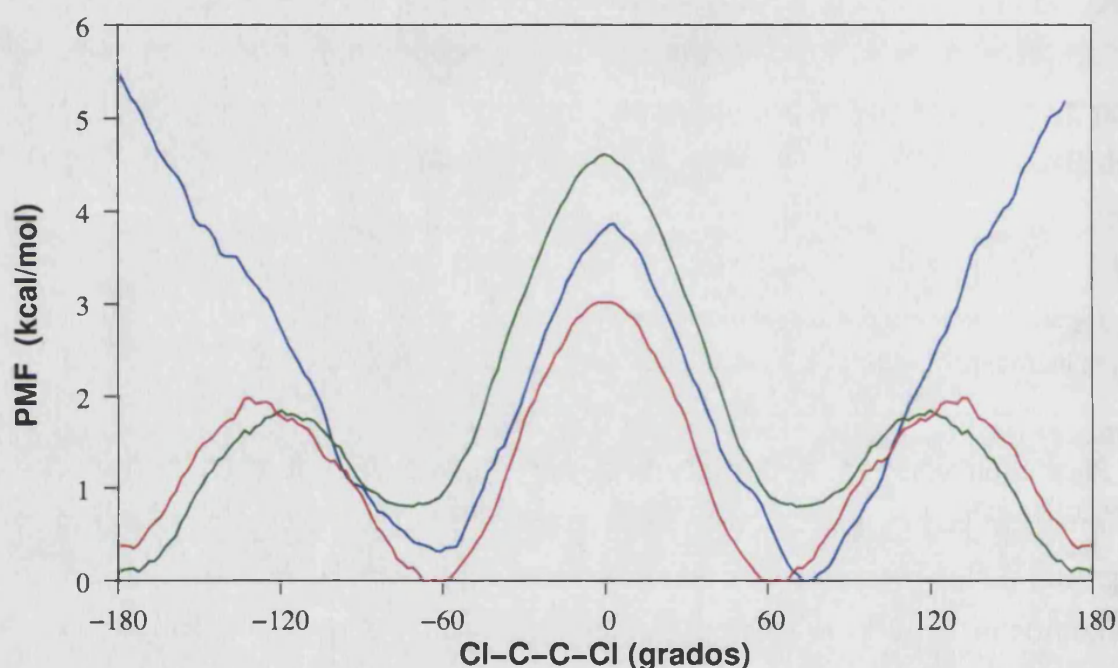


Figura 4.15: Potenciales de Fuerza Media (kcal/mol) obtenidos para la rotación a lo largo del enlace C-C del DCE. En color verde para los resultados en vacío, en rojo para la disolución acuosa y en azul para la enzima.

En la enzima, el PMF obtenido es completamente diferente al de fase gas o disolución. Sólo aparecen dos mínimos de energía, correspondientes a los dos conformeros *gauche*, mientras que el conformero *trans* es ahora el máximo absoluto de energía, de acuerdo con las observaciones de simulaciones publicadas con anterioridad [135, 136]. Más aún, puesto que el medio proteico es anisótropo, los dos conformeros *gauche* ya no son equivalentes. El conformero *gauche* que presenta un ángulo dihedro de  $75^\circ$  (que denominaremos *gauche 1*) es el mínimo

absoluto de energía, mientras que el de  $-61^\circ$  (*gauche 2*) tiene una energía libre de 0.32 kcal/mol en relación con el primero. Es interesante destacar que en una exploración limitada de la superficie de energía potencial, se ha demostrado que el conformero *gauche 1* posee una mayor reactividad que el *gauche 2* [137]. El conformero *trans* está 5.5 kcal/mol por encima de *gauche 1*. La diferencia entre estos datos y los publicados de rayos-X, que muestran al sustrato unido en la conformación *trans*, se debe probablemente al hecho de que, a bajo pH, Dh1A no es activa, ya que el residuo His289 está presente como ión imidazol. De esta forma, esta estructura de rayos-X no sería una representación adecuada del verdadero complejo de Michaelis [141]. Las figuras 4.16 (a) y (b) muestra dos instantáneas correspondientes a la dinámica de los dos conformeros *gauche*. Se puede observar que, cuando el ángulo dihedro cambia del correspondiente a *gauche 1* hasta el de *gauche 2*, la posición del átomo de cloro C11, el que sufre el ataque nucleófilo, permanece básicamente sin cambios, debido probablemente a la interacción favorable del mismo con los átomos de hidrógeno del grupo HN de los residuos Trp125 y Trp175 y a la repulsión con el grupo carboxilato del Asp124, que es el que produce el ataque nucleófilo. La posición del segundo átomo de cloro (C12) es más flexible, tal y como puede apreciarse en las figuras, de acuerdo con el análisis de los datos cristalográficos [128].

Para analizar el origen de las diferencias de los PMFs obtenidos en disolución acuosa y en la enzima hemos investigado los efectos electrostáticos en ambos medios. En concreto, hemos calculado el momento dipolar del DCE y el campo eléctrico creado por los alrededores en el centro de masas del DCE. El producto escalar de estas dos cantidades vectoriales nos da una idea de la magnitud de la interacción electrostática en disolución acuosa y en la enzima. La figura 4.17 muestra el momento dipolar del DCE como una función del ángulo dihedro Cl-C-C-Cl en fase gas, en disolución acuosa y en el sitio activo de la enzima. El momento dipolar en fase gas aumenta de, 0 a 0.98 u.a., cuando el ángulo dihedro cambia de  $180^\circ$  a  $0^\circ$ . En disolución acuosa, el momento dipolar es mayor porque el soluto polariza al disolvente, lo cual crea un campo eléctrico reactivo, que polariza a su vez al soluto. Es interesante destacar que, incluso a  $180^\circ$ , el momento dipolar del DCE no es cero, porque el soluto puede polarizar al disolvente mediante momentos eléctricos de mayor orden, apareciendo entonces un campo eléctrico de reacción. De esta forma, el momento dipolar promedio del DCE en disolución

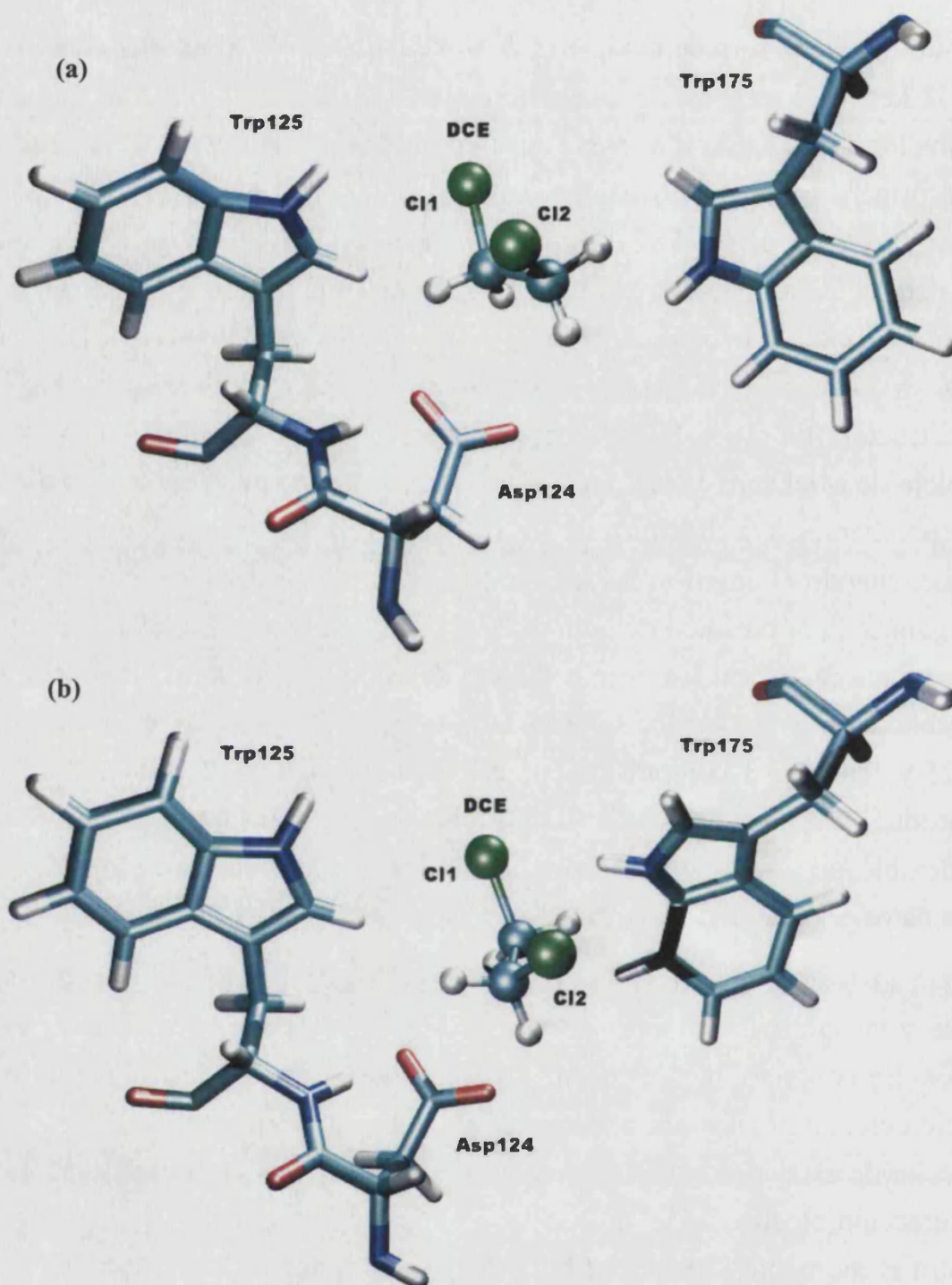


Figura 4.16: Instantáneas de los dos mínimos encontrados para el DCE en el centro activo: (a) gauche1 (ángulo dihedro Cl-C-C-Cl de 75°) y (b) gauche2 (ángulo dihedro de -61°). Por razones de simplicidad sólo se muestran algunos residuos importantes.

aumenta de 0.13 a 1.26 u.a. conforme el ángulo dihedro va desde 180° a 0°. El aumento del momento dipolar es todavía mayor en el centro activo de la enzima. El momento dipolar es 0.43 u.a. para el conformero *trans* y 1.63 u.a. para el *cis*. Es-

tos valores ya proporcionan una idea de la importancia y magnitud de los efectos electrostáticos en el centro activo de la enzima. El momento dipolar encontrado para el conformero *trans* en la enzima, que puede ser atribuido a la polarización del sustrato por el medio, es equivalente al momento dipolar obtenido después de rotar unos  $60^\circ$  en fase gas.

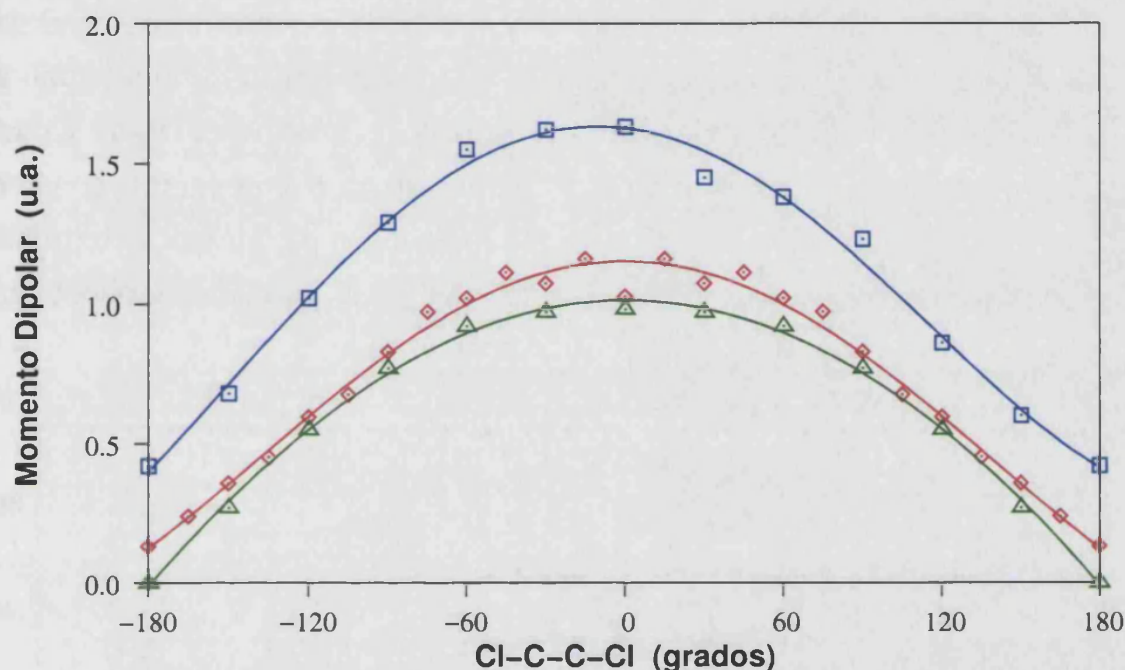


Figura 4.17: Momento dipolar (u.a.) del DCE en función del ángulo dihedro Cl-C-C-Cl en fase gas (en color verde), en disolución acuosa (en color rojo) y en la enzima (en color azul). Las líneas muestran el mejor ajuste a un polinomio de cuarto orden.

Los módulos de los campos eléctricos promedios creados por el medio (moléculas de agua o residuos proteicos) en el centro de masas del DCE se muestran en la figura 4.18. Lo primero que es importante destacar es la diferencia entre ellos, al menos en un factor de diez. En la enzima, el campo eléctrico varía entre  $1.5 \cdot 10^{-2}$  y  $2.0 \cdot 10^{-2}$  u.a.. En disolución acuosa, el campo reactivo del disolvente aumenta desde  $4.0 \cdot 10^{-3}$  u.a. para el conformero *trans* a  $6.5 \cdot 10^{-3}$  u.a. para el *cis*. Mas aún, en disolución acuosa el campo eléctrico muestra una gran correlación con el ángulo dihedro, aumentado en magnitud conforme el ángulo dihedro pasa de  $\pm 180^\circ$  a  $0^\circ$ . Un ajuste lineal entre el campo eléctrico y el momento dipolar del DCE en disolución da un coeficiente de correlación de 0.81. El mismo ajuste lineal en la enzima da un valor de correlación inversa muy bajo ( $R = -0.35$ ). Esto significa que mientras que en disolución acuosa el campo eléctrico es un campo

de reacción producido por la polaridad del soluto, en la enzima encontramos un campo permanente, cuyas variaciones no son esencialmente debidas a la polaridad del soluto. Este carácter permanente del campo eléctrico enzimático se observa no sólo en el modulo, sino también en la orientación. Las desviaciones angulares del campo eléctrico promedio encontradas en la enzima para diferentes conformaciones del DCE no son mayores en ningún caso a  $20^\circ$ . Esto se traduce en que el campo eléctrico creado por la enzima en el centro activo permanece esencialmente sin cambios en su orientación y magnitud, sea cual sea la configuración del DCE. Obviamente, el centro activo de la enzima no es totalmente rígido y puede adaptarse a diferentes sustratos, pero esta flexibilidad no es comparable con la del agua, donde la respuesta electrostática del medio esta completamente determinada por el soluto. El cambio de un campo de reacción a uno permanente puede tener importantes consecuencias para la catálisis enzimática.

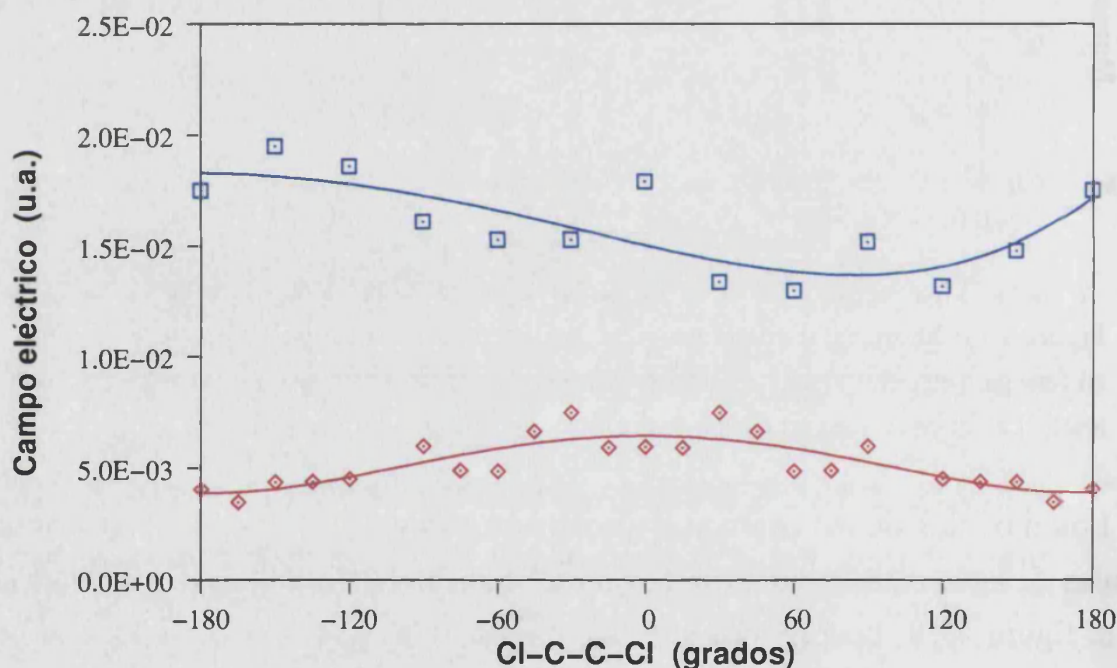


Figura 4.18: Campo eléctrico (u.a.) creado por el medio en el centro de masas del DCE en función del ángulo diédrico Cl-C-C-Cl para la disolución acuosa (rojo) y para la enzima (azul).

Finalmente, hemos calculado la energía de interacción entre el campo eléctrico ( $F$ ) creado por los alrededores en el centro de masas del sustrato o soluto y su momento dipolar ( $\mu$ ) como el producto escalar entre estas dos cantidades vectoriales:

$$E_{int} = -\vec{\mu} \cdot \vec{F} = -(\mu_x F_x + \mu_y F_y + \mu_z F_z) \quad (4.3)$$

La energía de interacción así calculada se muestra en la figura 4.19 como una función del ángulo dihedro Cl-C-C-Cl. En disolución acuosa, esta energía de interacción varía desde  $-0.3$  a  $-2.5$  kcal/mol y aumenta, en valor absoluto, cuando el ángulo dihedro varía desde  $\pm 180^\circ$  a  $0^\circ$ . En la enzima obtenemos prácticamente la misma forma general, pero las diferencias de energía son mucho más importantes. La energía de interacción es alrededor de  $-2.6$  kcal/mol para el conformero *trans* y cerca de  $-18.0$  kcal/mol para el *cis*. Esto significa que la contribución de la interacción electrostática a la diferencia de energía entre *gauche* y *trans* es mayor de 15 kcal/mol en la enzima, mientras que en disolución es de sólo 2.2 kcal/mol. Es más, debe tenerse en cuenta que, en el balance energético global en un medio polarizable, como puede ser una disolución acuosa, cerca de la mitad de la energía de interacción se emplea en la polarización del disolvente. Así pues, las diferencias de energía debidas a los efectos electrostáticos son mucho más pronunciadas en la enzima que en disolución acuosa y son decisivas para determinar el mínimo absoluto de energía libre del DCE en el centro activo de DhIA.

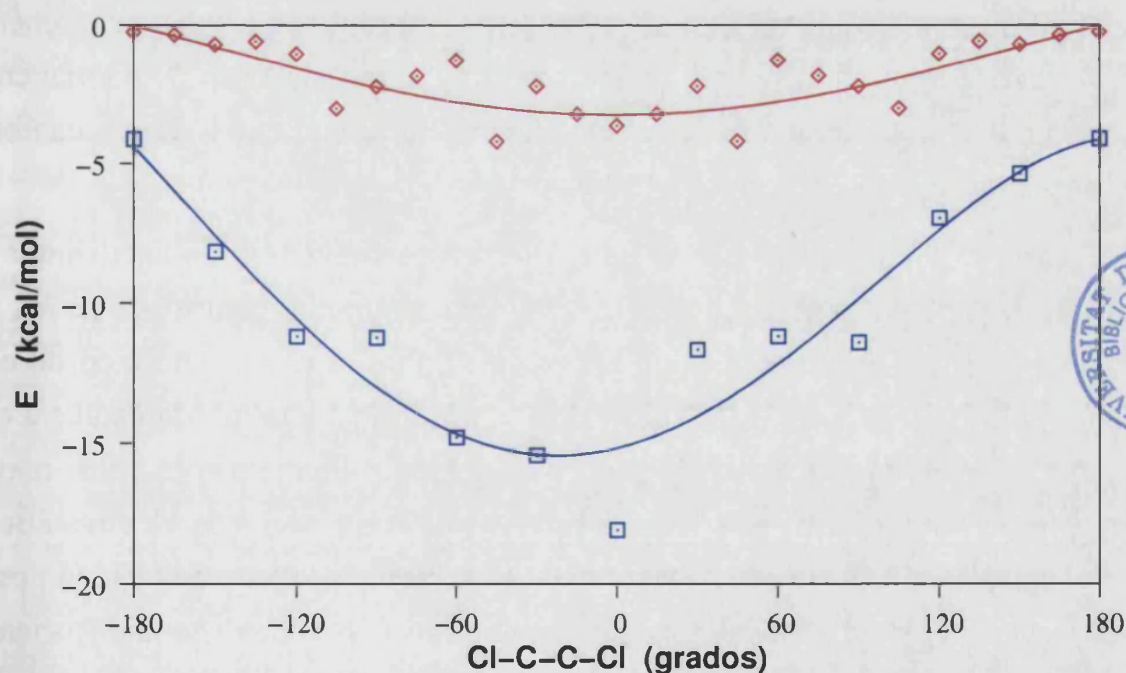


Figura 4.19: Interacción electrostática (kcal/mol) entre el momento dipolar del DCE y el campo eléctrico del medio como una función del ángulo dihedro Cl-C-C-Cl para la disolución acuosa (en rojo) y para la enzima (en azul).



#### 4.2.2.3. Conclusiones

En este apartado hemos estudiado los perfiles de energía libre asociados al equilibrio conformacional del DCE en fase gas, en disolución acuosa y en el sitio activo de las Dh1A. Los PMF's muestran tres mínimos diferentes en fase gas y en disolución acuosa, correspondientes a la conformación *trans* y a dos conformaciones *gauche*. Mientras que en fase gas la conformación *trans* es el mínimo absoluto de energía, en disolución acuosa los conformeros *gauche* son más estables. En el centro activo de la enzima la situación es completamente diferente. Sólo los conformeros *gauche* son mínimos de energía libre y además estas dos estructuras ya no son equivalentes, debido a la anisotropía del medio. En análisis del momento dipolar del soluto/sustrato y del campo eléctrico debido al medio muestra que los efectos electrostáticos son decisivos para comprender los cambios que surgen en el PMF cuando pasamos de la disolución acuosa al medio enzimático. En disolución tenemos un campo de reacción cuya magnitud y orientación depende de la polaridad del soluto. Como el momento dipolar del DCE disminuye con el ángulo dihedro Cl-C-C-Cl, los efectos del disolvente favorecen las formas *gauche* frente a la *trans*. En el centro activo enzimático el campo eléctrico es de mayor magnitud que en disolución acuosa, tal y como se refleja en un mayor momento dipolar inducido en el DCE. Sin embargo, este campo eléctrico es permanente, y su magnitud y orientación son esencialmente independientes de los cambios conformacionales que tienen lugar en el sustrato.

El campo eléctrico enzimático puede ser visto también como catalizador de la reacción. En este sentido, es interesante realizar un comentario sobre los resultados recientes de Warshel y colaboradores sobre el poder catalítico de esta enzima [142]. Estos autores han mostrado para esta enzima que la catálisis que presenta en relación con el medio acuoso es debido principalmente a una mayor estabilización del TS causada principalmente por contribuciones electrostáticas. Como consecuencia, este efecto electrostático también produce una tensión estérica sobre los reactivos, manteniendo el residuo Asp124 a una distancia y orientación adecuada para que se produzca el ataque nucleofílico. Nuestra contribución en este trabajo sería complementario, mostrando el papel de los efectos electrostáticos sobre la rotación a lo largo del enlace C-C del DCE. Además, a partir de nuestro análisis puede vislumbrarse la diferente naturaleza de los efectos elec-

trostáticos en agua y en el centro activo de la enzima. Efectivamente, en la enzima hemos encontrado un campo eléctrico permanente que está correctamente orientado para favorecer la transferencia de una carga negativa desde el átomo de oxígeno nucleofílico del Asp124 hacia el grupo saliente (el átomo de cloro). El ángulo promedio entre el campo eléctrico y la línea que une el átomo atacante y el saliente en la estructura *gauche1* es de sólo 30°. Así, la misma propiedad enzimática, el campo eléctrico en este caso, el cual está preparado para favorecer el progreso del proceso de transferencia de carga, también jugaría un papel adicional en la preorganización del sustrato. Un papel dual similar ha sido también encontrado en otros procesos enzimáticos [58, 143, 144].

### 4.2.3. Deshalogenación Catalítica

La primera etapa de la reacción que cataliza la Dh1A es una *deshalogenación*. En el interior del centro activo que, recordemos, es hidrofóbico, se produce el ataque nucleofílico del oxígeno del carboxilato del residuo de aminoácido Asp124 al sustrato DCE. Este ataque provoca la formación de un éster unido covalentemente a la enzima y la liberación de un ión cloruro, el cual queda atrapado formando enlaces de hidrógeno con los residuos Trp125 y Trp175.

Se han realizado multitud de estudios computacionales sobre el primer paso de esta reacción [71, 135–137, 145–151], lo que ha dado lugar a diferentes explicaciones acerca del origen del poder catalítico de la Dh1A. En agua, la reacción equivalente entre el DCE y el acetato tiene lugar con una barrera de energía libre estimada en el rango de 26 – 29.9 kcal/mol (Estos dos valores están basados en extrapolaciones desde otras temperaturas [152] o en el uso de parámetros nucleofílicos [142, 153]), mientras que en la enzima ésta se reduce hasta 15.3 kcal/mol (esta valor ha sido obtenido de la referencia [154], aplicando la teoría del estado de transición a  $k_{cat}$ ). Esto significa que el efecto catalítico se puede estimar entre 10.7 y 14.6 kcal/mol. Siguiendo las ideas de Bruice y colaboradores [71] esta enzima puede “comprimir” los fragmentos reactivos (el DCE y el grupo carboxilato del Asp124) en una disposición reactiva cerca a la estructura del estado de transición (TS). Esta explicación se conoce normalmente como hipótesis NAC e implica que la enzima reduce la barrera de activación empujando a los reactivos a lo largo del camino de reacción. Sin embargo, Warshel y colaboradores [142] han

cuantificado este efecto y han encontrado que su contribución al efecto catalítico total es pequeña (unas 2.2 kcal/mol). De acuerdo con estos autores, la catálisis enzimática es el resultado de la estabilización del TS relativa a disolución, causada principalmente por factores electrostáticos. En un trabajo más reciente, Gao y colaboradores [153] llegan a la conclusión de que el efecto catalítico es el resultado de dos factores: la desolvatación de los reactivos (cuya contribución es estimada en 8 kcal/mol) y la estabilización electrostática del TS (ver capítulo de Fundamentos Teóricos).

Desde un punto de vista más general, todas estas diferentes propuestas son un ejemplo del debate sobre el origen de la catálisis enzimática, un campo en el que todavía no se ha alcanzado un consenso. Si el mecanismo de reacción es el mismo para la reacción catalizada y no catalizada, entonces podemos relacionar fácilmente las diferencias en sus respectivas energías libres de activación con la energía de *binding* del TS y de los reactivos (ver esquema 2.10 del apartado 2.2.2 del capítulo de Fundamentos):

$$\Delta G_{no-cat}^{\ddagger} - \Delta G_{cat}^{\ddagger} = \Delta G_R^{MCS} + \Delta G_{Bind}^{MCS} - \Delta G_{Bind}^{TS} \quad (4.4)$$

donde MCS son las siglas de *Michaelis Complex in Solution*, es decir un intermedio imaginario en disolución que tiene la misma geometría que los reactivos en el centro activo de la enzima y el término  $\Delta G_R^{MCS}$  es la energía libre requerida para ir de los reactivos separados en disolución hasta formar el complejo MCS. Como ya discutimos en el apartado 2.2.2, la catálisis puede ser obtenida ahora de dos formas diferentes: por medio de la estabilización del TS (por factores electrostáticos por ejemplo) o por la desestabilización de los reactivos (por el NAC o la desolvatación).

En este trabajo vamos a realizar un estudio de la reacción de  $S_N2$  entre el grupo carboxilato del Asp124 y el átomo de cloro del DCE por medio de un hamiltoniano híbrido QM/MM en el centro activo de Dh1A y en disolución acuosa. Los resultados obtenidos son comparados con trabajos previos y relacionados con otros procesos enzimáticos, intentado así no sólo profundizar en este proceso enzimático en particular, sino también en el problema general de la catálisis enzimática.

#### 4.2.3.1. Metodología

Debido al tamaño de nuestro sistema, hemos usado la metodología híbrida QM/MM, donde el DCE y parte de la cadena lateral del Asp124 son descritos usando la mecánica cuántica, mediante el método semiempírico PM3 [155]. Este hamiltoniano ha sido previamente probado para esta misma reacción y produce resultados razonables, aunque se obtiene una sobreestimación sistemática de la energía [136, 153]. El subsistema clásico es descrito por medio del potencial OPLS-AA [140] para la enzima y un potencial flexible TIP3P para las moléculas de agua [92]. Los parámetros de Lennard-Jones para la interacción entre ambos subsistemas han sido tomados también del potencial OPLS, excepto para los átomos de cloro, para los cuales usamos los de la referencia [99]. Aunque estos parámetros fueron originalmente desarrollados para cálculos AM1/MM, los hemos probado con el hamiltoniano PM3, por medio de unas optimizaciones de clusters de ión cloruro y agua, obteniendo resultados más concordantes con los resultados *ab initio* que con los parámetros estandar del OPLS. La interfaz entre ambos subsistemas se trata mediante la metodología del átomo link [11–13]. El átomo link fue situado entre los átomos CA y CB del Asp124 (ver la figura 4.14). Se empleó un radio de cutoff de 12 Å para todos los tipos de interacciones.

Una vez definida la superficie de energía potencial (PES) necesitamos explorarla para obtener estructuras representativas de los puntos estacionarios del proceso químico. En el caso de la enzima, tomamos la estructura cristalina de rayos-X del complejo enzima sustrato (cuyo código PDB es 2DHC [128]) y lo situamos en el interior de una caja de moléculas de agua TIP3P de 55.8 Å, de la que eliminamos las moléculas de agua solapadas. Como el sistema resultante era demasiado grande (17154 átomos en total) mantuvimos congelados todos los átomos situados a más de 20 Å del DCE (un total de 12317). Estos átomos están lo suficientemente lejos como para considerar despreciables sus contribuciones al proceso reactivo. Tal y como encontramos en el trabajo anterior (ver apartado 4.2.2) hay dos mínimos de energía libre en el centro activo de la enzima, correspondientes a los dos conformeros gauche. Desde estos dos mínimos, usando el algoritmo GRACE [156, 157], encontramos dos estructuras de transición diferentes, mostradas en la figura 4.21. Estas dos estructuras han sido caracterizadas como verdaderos puntos estacionarios, ya que poseen una única frecuencia imaginaria en el espacio

de coordenadas de la parte QM. Para estudiar la reacción equivalente en agua situamos una molécula de DCE y un ión acetato en una caja de moléculas de agua TIP3P de 31.4 Å de lado, dando lugar a un sistema de 3081 átomos (1022 moléculas de agua). Como en la enzima, utilizamos el GRACE para localizar una estructura de transición.

Para obtener los potenciales de fuerza media (PMF) de la reacción de sustitución nucleofílica tanto en la enzima como en disolución acuosa utilizamos la metodología de *umbrella sampling* [32]. La coordenada de reacción elegida para seguir la evolución de la reacción fue la diferencia entre la distancia de los enlaces que se rompen y forman, esto es, la distancia carbono-cloro (C-Cl) menos la distancia carbono-oxígeno (C-O). Para poder superar la barrera de energía, añadimos un potencial de tipo cuadrático a esta coordenada de reacción. El valor de la constante de fuerza usada para el *umbrella sampling* ( $3000 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$ ) fue determinado para permitir un completo solapamiento entre las diferentes ventanas trazadas para la evaluación del PMF. Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron a 300 K usando el conjunto termodinámico NVT con un tiempo de integración de 1 fs. El tiempo de integración usado es adecuado para simular este sistema, debido a que la reacción no se rompe o forma ningún enlace en el que intervenga un átomo de hidrógeno. Las distribuciones de probabilidad, obtenidas para cada ventana individual, son unidas por medio de la metodología WHAM [32]. La longitud de cada ventana (10 ps) y el número total de ventanas (80) son lo suficientemente grandes como para explorar un amplio rango de estructuras a la temperatura de referencia. Para estos valores, la separación entre las diferentes ventanas fue de, aproximadamente, 0.0375 Å.

Para obtener el PMF de la reacción equivalente en agua mantuvimos fija la orientación relativa de ambos fragmentos (acetato y DCE), impidiendo de esta forma la exploración de estructuras irrelevantes para el proceso en estudio. En concreto, además de la restricción correspondiente a la coordenada de reacción empleada para el *umbrella sampling*, se utilizaron tres restricciones más: dos ángulos dihedros y un ángulo de enlace. Este ángulo es el que define el ataque nucleofílico, el formado por los átomos de oxígeno nucleofílico del acetato, el átomo de carbono del DCE que sufre el ataque y el átomo de cloro saliente. El valor elegido para este ángulo fue el correspondiente al ángulo promedio calculado en la ventana del TS en la enzima, esto es, 165.14°. Los dos ángulos dihedros restantes,

impiden que el acetato pierda la orientación que posee en la enzima y se una al DCE por otros lugares, más favorables en disolución pero que carecen de importancia para nuestro estudio. La figura 4.20 sitúa claramente estos dihedros. Los valores elegidos para ambos ángulos fueron  $180^\circ$ , para asegurar un acercamiento entre ambos fragmentos en concordancia con el camino seguido en la enzima. Uno de ellos impide que el grupo metilo del acetato se mueva de la línea de ataque al DCE. Entre los dos, impiden una posible rotación del oxígeno no nucleofílico para interactuar con los hidrógenos del DCE. Estas restricciones no fueron necesarias cuando obtuvimos el PMF en la enzima, ya que el medio impone una orientación adecuada a los fragmentos reactivos. Para obtener el PMF completo en disolución tenemos que estimar la energía libre generada al eliminar las restricciones impuestas sobre nuestro sistema, siguiendo el método descrito en la referencia [73]. Para varios puntos del PMF, se calculó la variación de la energía libre con la restricción correspondiente a diferentes valores de la constante de fuerza ( $k$ ) asociada, desde el valor inicial ( $k_i = 2.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{grado}^{-2}$ ) hasta el valor final ( $k_f = 0$ ), mediante simulaciones de dinámica molecular. Todas las restricciones fueron liberadas simultáneamente en 32 ventanas equidistantes. La experiencia demostró que la dependencia de la energía con respecto al valor de  $k$  para la última ventana era muy elevada, lo cual falseaba el resultado, provocando un problema de histéresis. Para evitarlo, se dividió la última ventana en 20 subventanas equidistantes. Calculadas estas variaciones y usando la ecuación 4.5 fuimos capaces de evaluar la contribución debida a la liberación de las restricciones aplicadas, a los diferentes valores de la coordenada de reacción usados.

$$\Delta G_{unfreeze} = \int_{k_i}^{k_f} \left( \frac{\partial \Delta E}{\partial k} \right) dk \quad (4.5)$$

Una vez calculado lo que cuesta liberar las restricciones en varios puntos del PMF, se interpoló el valor de  $\Delta G_{unfreeze}$  para todos los puntos del PMF. Después de interpolar, esta contribución es añadida al PMF restringido, obteniendo así el PMF completo y corregido para la reacción de  $S_{N2}$  en agua.

Las propiedades de los estados de transición y reactivos han sido obtenidas de simulaciones más largas, realizadas sobre las ventanas situadas en los máximos y mínimos de los PMF's, respectivamente.

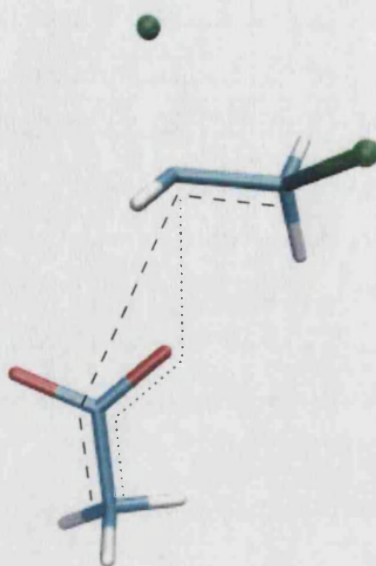


Figura 4.20: Dihedros fijados en el sistema ión acetato más DCE, utilizado en la simulación de la reacción en agua. Ambos dihedros tienen un valor de  $180^\circ$ .

#### 4.2.3.2. Resultados

##### Potenciales de Fuerza Media

Tal y como mostramos en el trabajo anterior (apartado 4.2.2), cuando el sustrato se une a la enzima Dh1A, se encuentran dos diferentes mínimos de energía libre, correspondientes a las dos conformaciones *gauche* del DCE. La conformación de equilibrio del DCE está determinada por interacciones electrostáticas y la diferencia en energía libre entre estos dos mínimos es bastante reducida (0.3 kcal/mol). Por esta razón investigamos los dos posibles canales de reacción. Empezando por los dos conformeros *gauche* hemos obtenido dos diferentes estructuras para el estado de transición (ver figura 4.21) desde los cuales se trazaron los correspondientes PMF's (denominados aquí como **I** y **II**). Estos PMF's se muestran en la figura 4.22, junto con el PMF obtenido para la reacción en disolución. La energía libre de activación obtenida para el camino **II** es un poco más baja que la encontrada para el camino **I** (28.4 frente a 31.5 kcal/mol).

La tabla 4.2 muestra los parámetros geométricos promedio correspondientes a los estados de transición de los dos caminos. La diferencia entre las energías de activación de los dos caminos enzimáticos (3.1 kcal/mol) está de acuerdo con la

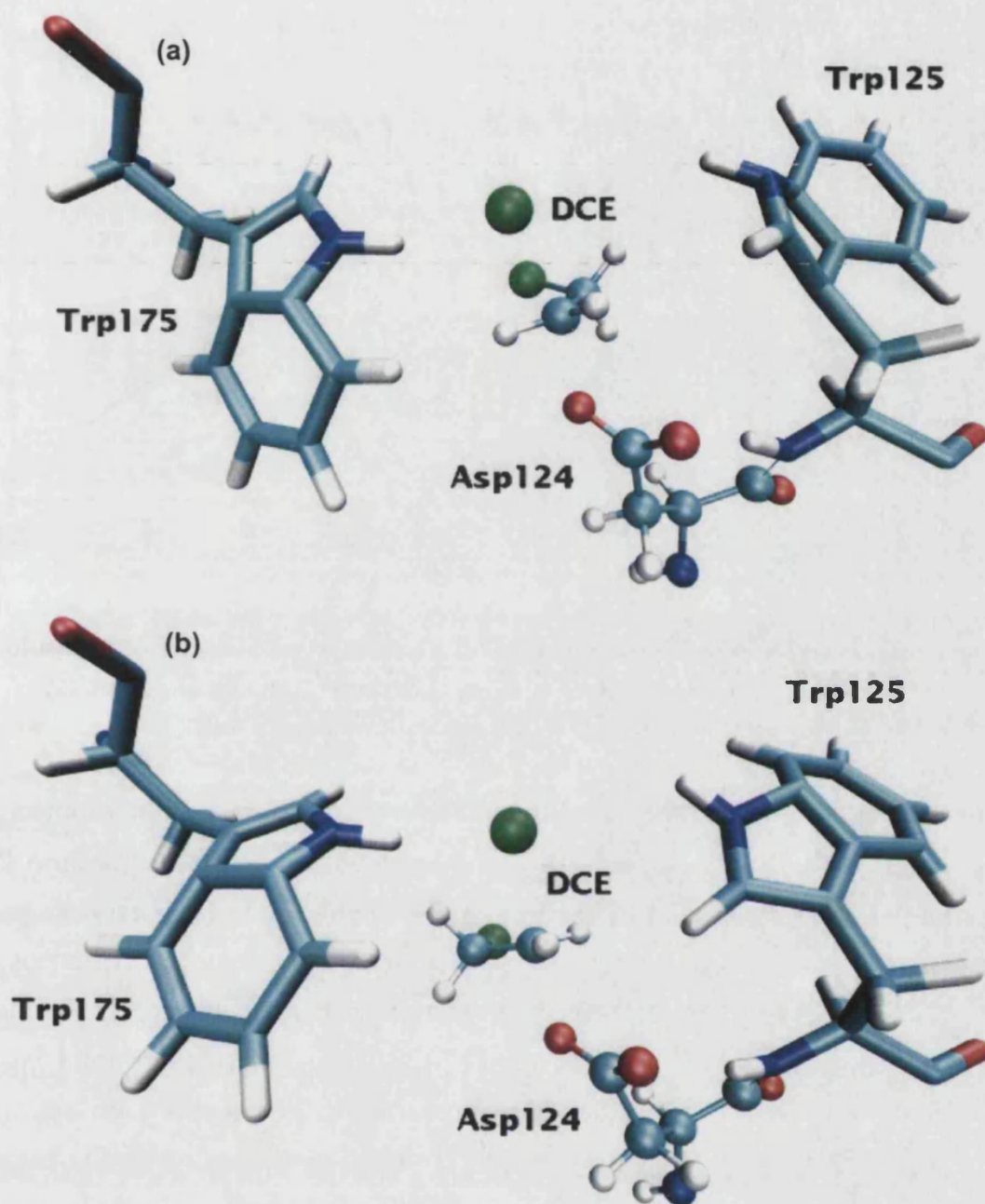


Figura 4.21: Instantáneas de los estados de transición correspondientes a los caminos enzimáticos I (a) y II (b). La variación del ángulo dihedro Cl-C-C-Cl es fácilmente apreciable.

estimación realizada por Bruice y colaboradores [71], basada en la exploración de la PES.

Las energías libres de activación están resumidas en la tabla 4.3 y comparadas con los valores experimentales. Como era de esperar, los cálculos PM3/MM sobreestiman las energías libres de activación, pero el efecto catalítico, que es la



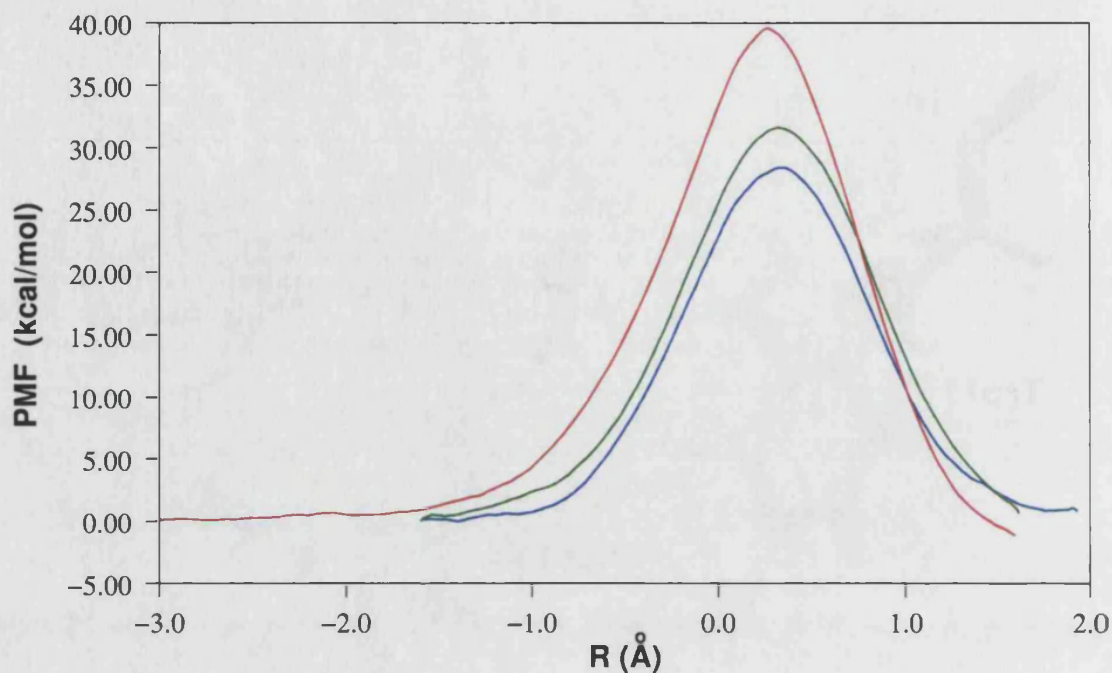


Figura 4.22: Potenciales de Fuerza Media (PMF's) obtenidos para la reacción en disolución acuosa (en rojo) y para la enzima (en verde el camino I y en azul el camino II).

diferencia entre las energías libres de activación en la enzima y en disolución, está bien reproducida en nuestros cálculos. El error esperado del hamiltoniano PM3, comparado con cálculos G2 para la reacción del acetato más DCE en fase gas, ha sido estimado en 9 kcal/mol [153]. Para intentar eliminar este error hemos evaluado un término de corrección igual a la diferencia entre las barreras de energía calculadas a nivel MP2/6-31+G\* y a nivel PM3, pero usando las geometrías promedio de los reactivos y del estado de transición en la enzima y en agua. Los valores corregidos,  $\Delta G_{corr}^\ddagger$ , están también listados en la tabla 4.3. De esta forma, nuestra mejor estimación para las energías libres de activación de la reacción catalizada y la no catalizada sería 16.6 y 30.0 kcal/mol, respectivamente, lo que está de acuerdo con los datos experimentales. Es interesante comparar nuestros resultados con los recientes cálculos de Gao y colaboradores [153]. Quienes, en ese trabajo, obtenían una barrera de energía libre PM3/MM de 23.0 kcal/mol, la cual está 5.4 kcal/mol por debajo de nuestra estimación PM3. La diferencia se debe, muy probablemente, al hecho de que en nuestros reactivos el átomo de cloro interacciona mejor con el H<sup>e1</sup> del Trp125 y Trp175 y, de esta forma, está más estabilizado. Los valores promedio aportados en la referencia [153] para estos dos enlaces de hidrógeno son 4.3 y 3.7 Å en los reactivos, que deben ser compara-

Tabla 4.2: Parámetros geométricos promedio seleccionados (distancias en Å y ángulos en grados) para reactivos (RS) y estructuras de transición (TS) de la reacción enzimática.

	Camino I		Camino II	
	RS	TS	RS	TS
<b>Asp124 O<sup>δ2</sup>-C</b>	3.22	1.94	3.20	1.94
<b>C-Cl</b>	1.82	2.26	1.81	2.27
<b>R.C.</b>	-1.40	0.32	-1.39	0.33
<b>Asp124 O<sup>δ2</sup>-C-Cl</b>	158	171	146	168
<b>Cl-C-C-Cl</b>	-82	-92	84	86
<b>Trp125 H<sup>e1</sup>-Cl</b>	3.37	3.12	3.61	3.37
<b>Trp175 H<sup>e1</sup>-Cl</b>	4.58	2.51	3.06	2.53

dos con 3.4 y 2.5 Å en nuestro caso (ver RS del Camino II en la tabla 4.2). Las distancias promedios en el estado de transición son similares (3.3 y 2.6 Å en la referencia [153], comparados con 3.4 y 2.5 Å en este trabajo). El uso de parámetros de Lennard-Jones diferentes para el átomo de cloro puede explicar esta discrepancia. Con respecto a la energía libre de reacción, nuestro PMF enzimático muestra un proceso prácticamente termoneutro. Para esta cantidad, el error asociado al uso del hamiltoniano semiempírico PM3 se espera que sea pequeño (alrededor de 0.6 kcal/mol en fase gas cuando comparamos con cálculos G2 [153]). En contraste, los resultados de Gao y colaboradores muestran un proceso exergónico, siendo los productos 16 kcal/mol más estables que los reactivos [153]. Un reciente análisis cinético-isotópico [149] indica que el paso del ataque nucleofílico de la reacción global es, muy probablemente, reversible, por lo que nuestros cálculos estarían reproduciendo mejor este hallazgo experimental.

La mutación de uno de los dos triptófanos a glutamina muestra una disminución de la eficiencia catalítica y constante de enlace [125, 158]. Interesantemente, la mutación del Trp175 tiene un mayor efecto en estas dos magnitudes. Esto está de acuerdo con las distancias de enlace de hidrógeno más cortas que hemos observado entre el átomo de cloro y el H<sup>e1</sup> del Trp175 en los reactivos y el estado de transición para el Camino II, el que presenta una menor energía de activación en la enzima.

Tabla 4.3: Energías libres de activación calculadas y experimentales (en kcal/mol).

		$\Delta G^\ddagger(\text{PM3/MM})$	$\Delta G_{\text{corr}}^\ddagger$	Expt.
<b>Enzima</b>	Camino I	31.5		
	Camino II	28.4	16.6	15.3
<b>Disolución</b>		39.6	30.0	26; 29.9 [142]
$\Delta\Delta G^\ddagger$		11.2	13.4	10.7 – 14.6

### Origen de la catálisis: análisis de los efectos electrostáticos

Para obtener una visión más profunda sobre el origen de la eficiencia de las enzimas para catalizar reacciones químicas, debemos comparar con el adecuado proceso equivalente en disolución acuosa. En este caso, hemos modelizado la reacción no catalizada en disolución como el ataque nucleofílico del ión acetato sobre el DCE. El PMF correspondiente se presenta, junto a los enzimáticos, en la figura 4.22. Al comparar con los PMF's enzimáticos podemos destacar dos diferencias significativas: la primera es que la reacción no catalizada, como era de esperar, presenta una mayor energía libre de activación (39.6 kcal/mol a nivel PM3 y 30.0 kcal/mol cuando corregimos) que cualquier camino enzimático. En segundo lugar, tal y como se señaló en la introducción de este trabajo, mientras que el estado de transición aparece a un valor de la coordenada de reacción muy parecido al de los caminos enzimáticos (0.29 versus 0.33 Å), los reactivos corresponden ahora a los fragmentos totalmente separados y solvatados (con una coordenada de reacción de menos infinito).

Como ya hemos discutido anteriormente, nuestros PMF's, dentro de las limitaciones del modelo, nos dan una imagen razonable del proceso en estudio, de acuerdo con los datos experimentales existentes, especialmente la disminución de la barrera de energía libre causada por la enzima. Siguiendo el análisis presentado en la introducción, la comparación directa de las energías libres de activación para la reacción catalizada y no catalizada puede ser relacionada con la diferencia en las energías libres de *binding* del estado de transición y de los reactivos. Usando los valores PM3/MM.:

$$\Delta G_{\text{uncat}}^\ddagger - \Delta G_{\text{cat}}^\ddagger = \Delta G_{\text{Bind}}^{\text{MC}} - \Delta G_{\text{Bind}}^{\text{TS}} = 11.2 \text{ kcal/mol} \quad (4.6)$$

Sin embargo, como discutimos antes, esta diferencia no puede ser directamente interpretada como una interacción preferente de la enzima con la distribución de cargas del estado de transición. Además, las energías de *binding* del estado de transición y de los reactivos pueden contener diferentes contribuciones. En nuestro caso, el estado de transición en disolución acuosa aparece a un valor de la coordenada de reacción (0.29 Å) muy parecido al encontrado para la reacción enzimática (0.33 Å). Sin embargo, mientras que los reactivos en la enzima (el complejo de Michaelis) aparece a  $-1.39$  Å el mínimo de energía libre encontrado en disolución se encuentra cuando la distancia entre el ión acetato y el DCE es infinita. Desde nuestro PMF en disolución podemos estimar fácilmente la energía libre necesaria para hacer que los fragmentos reactivos alcancen el valor de la coordenada de reacción correspondiente al MC, esto es,  $\Delta G_R^{MCS}$ . El valor obtenido es 1.7 kcal/mol, de acuerdo con la estimación de Warshel y colaboradores de 2.2 kcal/mol [142]. Debe destacarse que esta cantidad ha sido obtenida en disolución. Los cálculos en fase gas de la energía necesaria para reordenar los fragmentos reactivos en una estructura similar a la del MC no son relevantes en nuestro esquema termodinámico y puede llevar a interpretaciones erróneas [159]. Se puede argumentar que la formación del MC también incluye cambios en otras coordenadas importantes, siendo nuestro cálculo sólo un límite inferior. Sin embargo, la comparación de la dinámica del MC y del MCS no revela diferencias importantes. En cualquier caso, se espera que las contribuciones de otros grados de libertad a la energía libre de *binding* sean pequeñas [142] y que se cancelen, al menos parcialmente, desde el momento en que pueden ser similares en el TS y en el MCS. Una vez  $\Delta G_R^{MCS}$  ha sido obtenido, podemos comparar las energías de *binding* del TS y del MCS. Estas energías de *binding* se espera que contengan contribuciones similares, porque la energía necesaria para reordenar los reactivos a lo largo de la coordenada de reacción ha sido eliminada:

$$\Delta G_{MCS}^{\ddagger} - \Delta G_{cat}^{\ddagger} = \Delta G_{Bind}^{MCS} - \Delta G_{Bind}^{TS} = 9.5 \text{ kcal/mol} \quad (4.7)$$

Así pues, la enzima presenta claramente una afinidad mayor por el TS con respecto a nuestro estado de referencia (RS o MCS). La verdadera cuestión sobre la catálisis enzimática es cómo la enzima es capaz de lograr esta diferencia en la energía de binding, en relación al estado de referencia en disolución acuosa. Por esta razón, decidimos investigar los diferentes patrones electrostáticos crea-

dos por los medios MM enzimático y acuoso. La figura 4.23 (a) muestra el módulo del campo eléctrico creado por el medio acuoso en el oxígeno nucleofílico del ión acetato y sobre el carbono del DCE que sufre el ataque, durante una simulación del MCS. En disolución acuosa, el campo eléctrico creado por las moléculas del disolvente es un campo reactivo, dominado por la carga negativa del sistema acetato más DCE. Lo que hemos encontrado es un fuerte campo eléctrico, con un valor muy parecido sobre ambos átomos (el módulo promedio es 0.0121 y 0.0126 u.a. sobre el átomo de carbono y el de oxígeno). En la figura 4.23 (b) se muestra el mismo campo eléctrico calculado durante una simulación del camino II sobre el MC en el centro activo de la enzima. Ahora, el campo eléctrico sobre el átomo de oxígeno es muy parecido al que hemos obtenido en disolución, con un módulo promedio de 0.0142 u.a. Esto es, desde un punto de vista electrostático no hemos encontrado una significativa desolvatación de el oxígeno nucleofílico del Asp124 en el centro activo de la enzima. Aunque no se muestra aquí, lo mismo es aplicable para el átomo de cloro saliente, siendo los campos eléctricos promedio sobre este átomo 0.0071 y 0.0074 u.a. en disolución acuosa y en la enzima, respectivamente. Lo que es realmente diferente en ambos medios es el campo eléctrico creado sobre el átomo de carbono. En la enzima, este campo eléctrico es mucho menor que en agua, con un valor promedio de sólo 0.0038 u.a.. Más aún, este campo eléctrico no sólo es diferente en magnitud, sino también en orientación. En agua, el campo eléctrico sobre el átomo de carbono está, esencialmente, orientado a lo largo de la línea que une el oxígeno nucleofílico con el átomo de cloro saliente, esto es, en la dirección del ataque nucleofílico. El componente promedio a lo largo de esta línea es 0.0102 u.a.. Este componente del campo actúa como una fuerza que empuja la conversión de los reactivos hacia una configuración similar a la del TS  $[O^{\delta-} - C^{\delta+} - Cl^{\delta-}]$ , como se ha encontrado en otras reacciones  $S_N2$  similares en disolución [160]. En la enzima la proyección del campo eléctrico sobre esta línea promedia a cero y por lo tanto esta fuerza desaparece.

De los resultados anteriormente mostrados, podemos concluir que los efectos electrostáticos en la enzima puede ser tan importantes como en disolución, pero existen algunas diferencias significativas. La primera, el campo eléctrico en la enzima presenta grandes cambios en magnitud cuando, en los reactivos, nos movemos desde el átomo de oxígeno nucleofílico hacia el átomo de carbono. Esto está claramente relacionado con la composición heterogénea del centro activo de

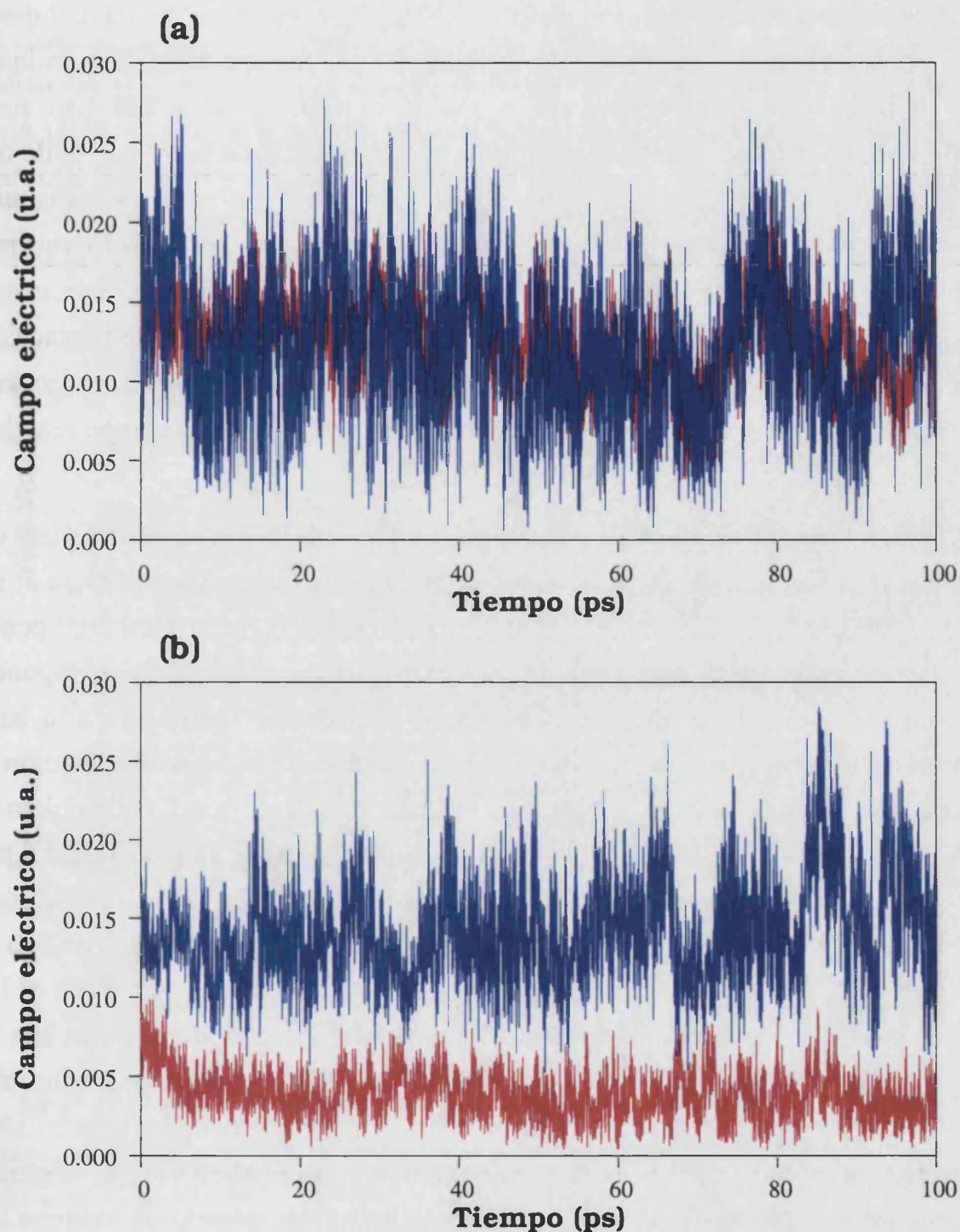


Figura 4.23: Módulo del campo eléctrico promedio creado por el medio MM sobre el oxígeno nucleofílico (en azul) y sobre el átomo de carbono que sufre el ataque (en rojo) para el MCS en disolución (a) y para el MC del camino II en la enzima (b).

la enzima con respecto al hueco del disolvente en el que introducimos el MCS. La existencia de residuos hidrofóbicos (no polares) en el centro activo de la enzima está claramente relacionado con esta característica y puede ser indispensable

para modular el campo eléctrico. En segundo lugar, el campo eléctrico del disolvente es un campo de reacción cuya magnitud y orientación queda determinada por la respuesta del disolvente a las propiedades eléctricas del soluto. Esto tiene importantes consecuencias para el perfil energético de la reacción. El TS de una sustitución nucleofílica que evoluciona desde unos reactivos cargados hacia unos productos igualmente cargados, es menos polar que ambos y, por lo tanto, está menos estabilizado por el campo eléctrico reactivo del disolvente. La consecuencia es que el efecto del disolvente es incrementar la barrera energética de la reacción, como puede ser deducido de las reglas de Hughes-Ingold [161]. Sin embargo, esto no es necesariamente así si el campo eléctrico del medio no es un campo reactivo, como ocurre en el caso de la enzima.

Desde un punto de vista electrostático, la reacción de  $S_N2$  puede ser vista como una transferencia de carga desde el oxígeno nucleofílico (dador) hacia el ión cloruro saliente (aceptor). La cuestión es cómo el medio, dentro del cual ocurre la reacción, afecta a la energética de esta transferencia de carga. Para responder a esta cuestión, hemos evaluado el potencial electrostático promedio a lo largo del vector que conecta el átomo dador con el aceptor, debido a la distribución de cargas del subsistema MM, en las trayectorias correspondientes al complejo de Michaelis y el estado de transición, tanto en agua como en el camino II. La figura 4.24 es un dibujo de la variación del potencial electrostático creado por el agua o por la enzima en varios puntos a lo largo de la línea del ataque nucleofílico (el vector O-Cl). El valor  $d = 0$  indica la posición del átomo de oxígeno y el  $d = 1$  el del átomo de cloro. Un valor negativo del potencial electrostático indica una interacción repulsiva entre la carga negativa y el medio MM, mientras que un valor positivo indica una interacción de tipo atractiva. La curva correspondiente al MCS muestra un potencial decreciente desde el oxígeno hacia el cloro. Esto significa que el potencial es sustancialmente más positivo sobre el átomo de oxígeno que sobre el cloro o, lo que es lo mismo, que el medio MM formado por las moléculas de agua está bien situado para estabilizar la distribución de carga de los reactivos, pero mal situada para la de productos. De acuerdo con esto, debemos realizar un trabajo extra para transferir la carga negativa contra el potencial electrostático del disolvente, que puede ser evaluado como  $W = \delta q \cdot \Delta V$ . En el TS, la carga está ya parcialmente transferida desde el oxígeno hacia el cloro y de esta forma la curva correspondiente al TS en disolución es la correspondiente a una distribución

del disolvente complementaria a esta nueva situación. Obviamente, el cambio en la distribución de cargas del soluto implica una redistribución significativa de las moléculas del disolvente, que aquí queda reflejado por los diferentes potenciales electrostáticos encontrados en cada caso.

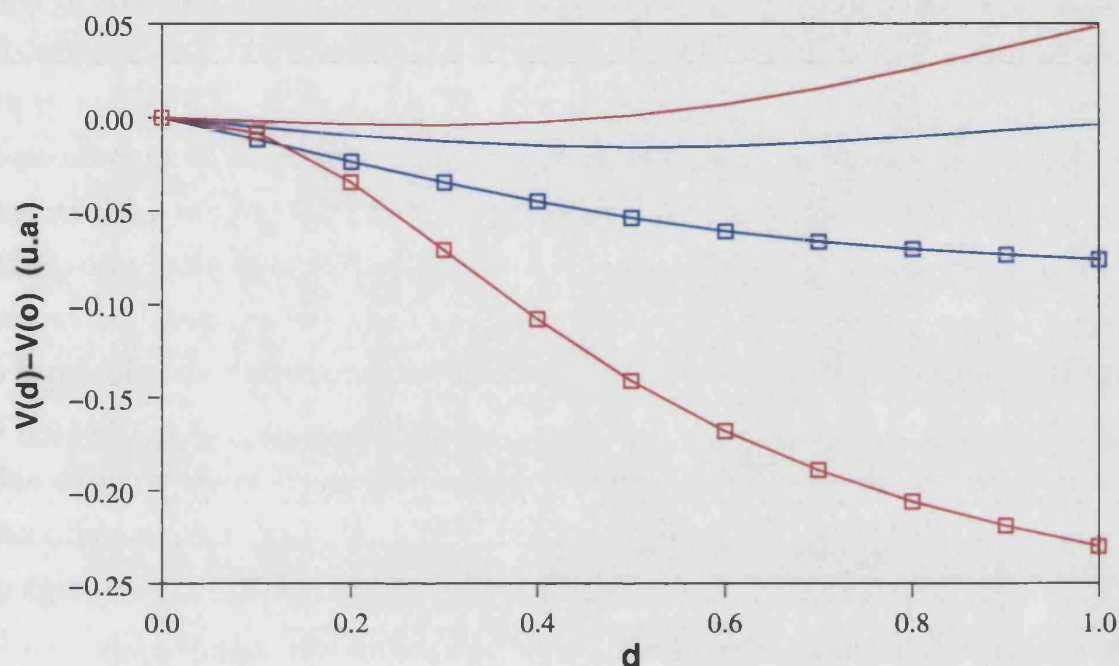


Figura 4.24: Variación del potencial electrostático promedio, creado por el medio MM, a lo largo del vector que une el oxígeno nucleofílico y el átomo de cloro saliente para el MCS (en rojo y cuadrados) y el TS (en rojo) en disolución acuosa y para el MC (en azul y cuadrados) y el TS (en azul) del camino II en la enzima. Nótese que la distancia O-Cl ha sido normalizada para poder promediar entre las diferentes estructuras que aparecen durante la simulación.

La curva para el complejo de Michaelis en la enzima muestra, otra vez, un potencial más positivo sobre el átomo de oxígeno que sobre el átomo de cloro, indicando que, cuando el medio está en equilibrio con el MC desde el punto de vista electrostático, debe realizarse un trabajo extra para completar la reacción. Sin embargo, la variación de este potencial es ahora mucho más pequeña que en disolución, 0.14 versus 0.23 a.u.. De esta forma, el trabajo necesario para completar la transferencia de carga en este medio es menor que en disolución. Más aún, las curvas correspondientes al MC y al TS en la enzima son muy similares. La diferencia entre el potencial electrostático en el complejo de Michaelis y en el TS es mucho más pequeña en el centro activo enzimático en el disolvente. El campo creado por la enzima es debido, principalmente, a una distribución de carga per-



manente y, por lo tanto, se mantiene esencialmente inalterado y en una orientación favorable, en relación con el agua, para el progreso de la reacción. En contraste, el campo eléctrico en agua refleja la polarización del disolvente, inducida por la polaridad del soluto.

El potencial electrostático es también una herramienta útil para analizar el papel jugado por diferentes residuos o grupos de residuos sobre la reacción. Por ejemplo, se espera que los dos triptófanos, Trp125 y Trp175, favorezcan el progreso de la reacción estabilizando el átomo de cloro por medio de puentes de hidrógeno entre el átomo de cloro y los átomos polares  $H^{\delta 1}$ . La figura 4.25 muestra la contribución de los dos triptófanos al potencial electrostático promedio durante las simulaciones correspondientes a los reactivos en la enzima para los caminos **I** y **II**. En ambos casos estos residuos crean un potencial positivo a lo largo del vector que une los átomos dador y aceptor. Sin embargo, sólo en el caso del camino **II** el potencial electrostático debido a estos residuos es más positivo sobre el átomo de cloro que sobre el oxígeno, siendo en este último caso cuando están mejor orientados, en el MC, para la estabilización de la transferencia de carga que tendrá lugar durante el proceso reactivo.

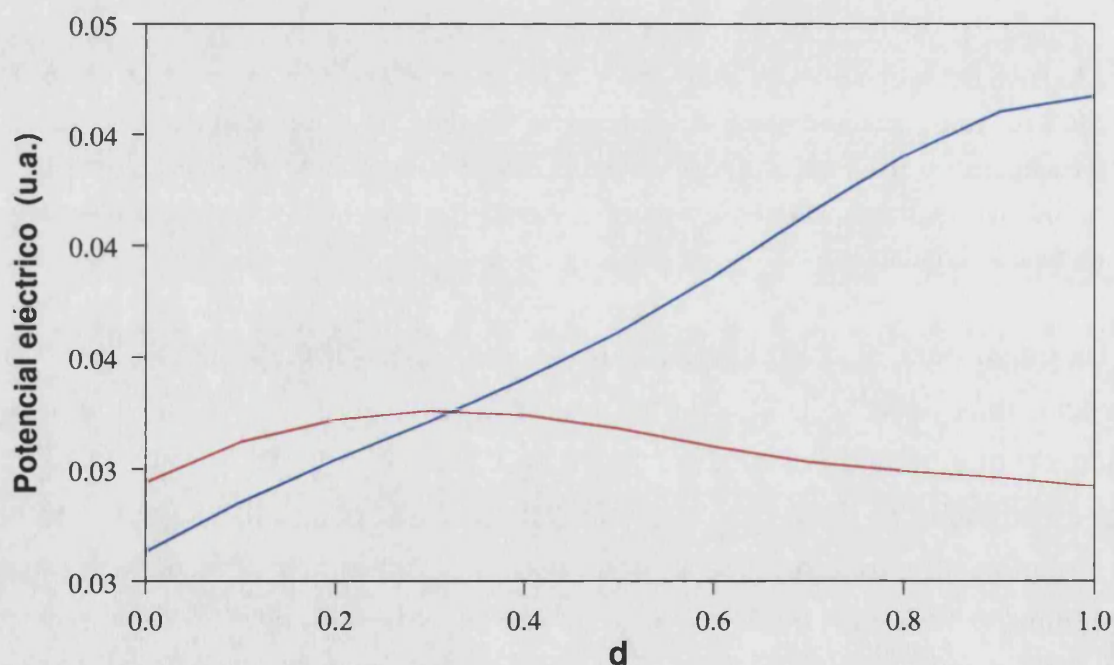


Figura 4.25: Contribución promedio de los residuos Trp125 y Trp175 al potencial electrostático calculado a lo largo del vector que une el oxígeno nucleofílico y el átomo de cloro saliente para el MC en el camino **I** (en rojo) y para el camino **II** (en azul).

### 4.2.3.3. Conclusiones

En este apartado hemos presentado un estudio de dinámica molecular QM/MM del primer paso de la conversión enzimática del 1,2-dicloroetano (DCE) a 2-cloroetanol e ión cloruro. Los resultados están razonablemente en concordancia con los datos experimentales, considerando las limitaciones del hamiltoniano semiempírico empleado en nuestro tratamiento. Para poder profundizar en el origen de la habilidad de la enzima para acelerar este proceso químico, hemos comparado los resultados obtenidos con los correspondientes al ataque nucleofílico del ión acetato sobre el DCE en agua. La diferencia entre la energía de activación de la reacción catalizada y la no catalizada puede relacionarse con la diferencia entre las energías de *binding* de los reactivos (MC) y del estado de transición (TS). El problema es que, en este caso, la comparación directa puede no ser concluyente sobre la magnitud de la interacción enzima-sustrato en cada estado, ya que los reactivos son muy diferentes en la enzima y en disolución. En un caso como este, las energías de *binding* pueden contener contribuciones sustanciales, debido a la reorganización de los reactivos. Por esta razón hemos introducido el concepto de un complejo similar al MC en disolución (MCS), definido como la estructura de los reactivos que aparece a lo largo del PMF, con el mismo valor de la coordenada de reacción que el MC. Desde nuestros PMF's puede fácilmente deducirse que, independientemente del estado de referencia escogido para el proceso en disolución (reactivos separados en el infinito o el MCS), la enzima muestra una afinidad mayor por el TS:

$$\Delta G_{Bind}^{MC} - \Delta G_{Bind}^{TS} \geq \Delta G_{Bind}^{MCS} - \Delta G_{Bind}^{TS} > 0 \quad (4.8)$$

Esta relación puede indicar que el papel principal jugado por la enzima es el de estabilizar el estado de transición más que los reactivos, en comparación con el proceso en disolución. A continuación hemos buscado el origen de esta estabilización relativa estudiando los diferentes efectos electrostáticos causados por ambos medios: el disolvente y la enzima. En disolución tenemos un campo de reacción dominado por la carga negativa del soluto. Cuando la reacción tiene lugar, desde los reactivos hacia el TS, la polaridad del soluto disminuye, lo que a su vez provoca una disminución del campo de reacción del disolvente. Como consecuencia, el TS es menos estabilizado por interacciones electrostáticas que los reactivos y el efecto final es un incremento neto de la energía de activación. En la enzima

tenemos un campo eléctrico que presenta diferencias significativas respecto al hallado en el disolvente. En este caso, el medio se opone menos a los cambios que tienen lugar en la distribución de cargas del soluto a lo largo de la reacción. El campo eléctrico en la enzima no es reactivo y, por lo tanto, no necesariamente disminuye cuando lo hace la polaridad del sustrato. El campo reactivo en disolución está en equilibrio con la distribución de cargas del soluto, mientras que en la enzima tiene una parte permanente. Podemos concluir que, en comparación con el proceso en disolución, la estructura de la enzima está diseñada para favorecer electrostáticamente al TS frente a los reactivos.

#### 4.2.4. Trayectorias de Reacción

Hasta ahora hemos estudiado el equilibrio conformacional del sustrato en el interior de la enzima Dh1A y el perfil energético y los factores electrostáticos en el estado de transición y los reactivos de la primera etapa de la reacción. Para finalizar el trabajo sobre esta primera etapa, a continuación realizaremos un estudio dinámico de la misma.

Puesto que esta tesis va a ser presentada como “Doctorado Europeo”, este subapartado está escrito en inglés, de acuerdo con el requisito número 3 de las condiciones aprobadas por la Junta de Gobierno de la *Universitat de València*, en la sesión del 8 de noviembre de 1994.

As we have previously show, enzymes are biological catalysts able to speed up chemical reactions by several orders of magnitude, making these processes compatible with life. For example, the hydrolysis linkages in glycosidic bonds of cellulose would require several million years to reach its half-time in the absence of the appropriate catalyst while it is easily done by some living organisms [58]. In fact, enzymes may increase the rate constants of chemical reactions in an order of magnitude of  $10^6$  to  $10^{23}$ , which represent an amazing enhancement of chemical kinetics with respect to the counterpart reaction in solution. A convenient way to study the different factors contributing to the increase of the rate constant is provided by transition state theory and its variational extension [80, 162, 163]. According to this, the rate constant of a reaction  $k$ , is related to the activation free energy  $\Delta G^\ddagger$  obtained from the free energy difference between the reactant state and a constrained transition state defined as the maximum along a reaction

coordinate:

$$k = \kappa \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad (4.9)$$

where  $T$  is the temperature,  $h$  is Planck's constant,  $k_B$  Boltzmann's constant and  $\kappa$  is the transmission coefficient. This last factor accounts for trajectories recrossing the transition state dividing surface. In the variational version of the transition state theory this transmission coefficient is substituted by a generalized transmission coefficient accounting not only for recrossings, but also for tunnelling and nonequilibrium effects [164].

At room temperature, an increase of  $10^6$  in the rate constant can be attained with an activation free energy reduction of about 8 kcal/mol. In principle, this activation free energy reduction can be obtained either from transition state stabilization or from reactant state destabilization and up to now a consensus has not been reached about the origin of the enzymatic reduction of the activation free energy [58, 72, 74, 130, 151, 164]. The reduction of the activation free energy is the more important factor responsible for the rate acceleration of chemical reactions in enzymes and hence most computational studies of enzymatic processes have been devoted to obtain and analyze the potential of mean force associated to the corresponding reaction coordinate.

Enzymatic effects on the rate constant through the transmission coefficient are much more moderate [165]. Departures from transition state theory due to recrossings can be interpreted on the basis of the generalized Langevin equation [166–170]. According to this, the movement of the system along the reaction coordinate is governed by the potential of mean force and a frictional random force due to the environment and the nonreactive coordinates of the reactant system [171]. The first term represents the equilibrium situation between the reactant system and the environment and the second represents the effect that enters when the environment does not have enough time to follow the reactant system during the barrier passage. This time-dependent friction can be obtained from the autocorrelation of the forces acting on the transition state. The net effect of this friction is to reduce the frequency of passage across the barrier region and thus the rate constant. The transmission coefficient is then determined by the ratio between the effective frequency ( $\omega_{ef}$ ) and the equilibrium value ( $\omega_{eq}$ ) determined from the potential of mean force and it is obviously less than unity. In the nonadiabatic limit,

the environment can be considered as frozen so that the friction is completely determined by the value at the top of the barrier ( $\omega_{\xi}^2 = \zeta$  (at  $t = 0$ )). Transmission coefficients have been evaluated for several enzyme reactions showing only modest differences with respect to the corresponding solution process [165, 172, 173]. Probably for this reason, the study of reaction trajectories in enzymes is much less popular than the computation of the potential of mean force. However, this kind of studies provides valuable information not only about the dynamic effects but also about the key factors governing the change of interaction patterns along the reaction progress. Therefore, these studies can be useful to clarify the origin of the activation free energy reduction for catalyzed processes.

The nucleophilic substitution reaction between dichloroethane (DCE) and the carboxylate group of Asp124 in a haloalkane dehalogenase offers an excellent example to analyze dynamical effects. As previously seen (see section 4.2.1), Haloalkane dehalogenases are a class of enzymes that catalyses the cleavage of carbon-halogen bonds yielding the corresponding halide anion and an alcohol [122, 174]. These enzymes thus provide a practical way to efficiently remove contaminants from the environment. In particular, haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter Autotrophicus* GJ10 (DhlA) catalyses the conversion of 1,2-dichloroethane to 2-chloroethanol and chloride [154]. The complete reaction takes place in two steps [126, 175, 176]. In the first one, 1,2-dichloroethane undergoes a  $S_N2$  displacement of a chloride anion by means of the carboxylate group of Asp124, resulting in an ester covalently bound to the enzyme (see figure 4.13, (a)). In a second process, a crystal water molecule hydrolyses the ester (see figure 4.13, (b)).

We have already seen that several computational studies have been devoted to the study of the first reaction step [135–137, 145–150, 153] and different explanations about the origin of the catalytic power of DhlA have been given. In water, the counterpart reaction between DCE and acetate takes place with a free energy barrier estimated to range between 26 – 29.9 kcal/mol<sup>2</sup>, while in the enzyme this is reduced up to 15.3 kcal/mol. This means a catalytic effect between 10.7 and 14.6 kcal/mol. As we have discussed in the previous section, several hypothesis have been proposed to explain their effect. Following Bruice [71], the enzyme reduces

---

<sup>2</sup>see section 4.2.3.

the activation barrier pushing up the reactants along the reaction path. However, Warshel *et al* [142] have quantified this effect and found that its contribution to the total catalytic effect is small. According to these authors and our own conclusions presented in section 4.2.3.3, enzyme catalysis is the result of TS stabilization relative to water solution caused mainly by electrostatic contributions. Other authors have attributed catalysis to reactant desolvation effects [153]. Recently, Gao *et al* [173] have presented a dynamical study by means of short ( $\pm 100$  fs) downhill trajectories starting at the transition state, concluding that the transmission coefficient in the enzyme was about twice the value in solution. In this work the importance of the coupling of intramolecular vibrations with the reaction coordinate in the enzyme is stressed very clearly while no strong electrostatic coupling in the enzyme was found. In addition, dynamical effects on  $S_N2$  reactions in aqueous solutions have been thoroughly studied using different strategies [171, 177–179] and then provide a good comparative framework for the enzymatic reaction.

In this work, we have made a further analysis of protein dynamic effects on the enzymatic reaction in Haloalkane Dehalogenase. We focus on the role played by the interactions of the chemical system with its environment and we make a detailed comparison for the reaction in solution and in the enzyme. Within this aim, a number of relatively long trajectories (12 ps) have been computed. In agreement with Gao and coworkers study, we predict a significant effect on the transmission coefficient. However, in contrast to this previous paper, the importance of electrostatic effects arising from different hydrogen bond patterns is clearly stressed in our work.

#### 4.2.4.1. Methodology

##### Constructing the Systems

To perform the dynamical study of the reaction that takes place in the active site of Dh1A, we need to use a realistic potential energy surface of the studied system. We have used the same QM/MM partition scheme that in the obtention of the PMF. The 1,2-dichloroethane (DCE) and part of the residue Asp124 were chosen to be the QM subsystem, while the rest of the enzyme and the crystallization water molecules are in the MM subsystem. A link atom [11–13] was added

to the QM subsystem in order to complete its valence. This link atom was placed between CA and CB atoms of Asp124 (see figure 4.14). As we did in the previous study, we have used the semiempirical Hamiltonian PM3 to represent the QM subsystem [155]. We have just seen that this Hamiltonian gives reasonably results, though systematic overestimation of the activation energy is obtained when compared to higher level estimations [180]. The MM subsystem was described using the OPLS-AA [140] potential for the enzyme, and the flexible TIP3P potential for the water molecules [92]. The Lennard-Jones parameters for the QM/MM interaction are the same that in the PMF study. A switched cut-off radius of 12 Å was used for all kind of interactions.

### Downhill Trajectories

In order to obtain transition state configurations corresponding to an equilibrium distribution, we ran a 750 ps long NVT MD simulation with the reaction coordinate restrained at the top of the PMFs presented before, both for the system in solution and in the enzyme. As showed in the previous work, the  $S_N2$  attack of Asp124 on dichloroethane can take place through two possible reaction paths, depending on the value of the ClCCC1 dihedral angle. In this work we have centred our attention in the path with a lower activation free energy barrier. Here, we just remember that the PMFs were obtained using as reaction coordinate (RC) the length difference between the broken and the formed bonds, that is, the C-Cl distance minus the C-O<sup>δ2</sup> distance (O<sup>δ2</sup> is the attacking oxygen atom of the carboxylate group while the other one is labelled as O<sup>δ1</sup>):  $q = d_{C-Cl} - d_{C-O^{\delta 2}}$ . The Potentials of Mean Force (PMFs) calculated for these systems showed activation free energy barriers of 28.4 and 39.6 kcal/mol in the enzyme and in aqueous solution respectively. These values reproduce quite well the catalytic effect (a free energy barrier diminution of about 11.2 kcal/mol compared to the experimental estimation of about 10.7 – 14.6 kcal/mol) although they are clearly overestimated. Corrections by means of MP2 punctual calculations led to a close agreement to experiment. Periodic boundary conditions and a temperature of 300 K were using all around the simulations. One complete configuration of the system (atomic coordinates and velocities) was recorded each 5 ps. In this way, we obtained a set of 150 independent transition state (TS) configurations that were used as the starting point for downhill trajectories. In figure 4.26 is showed one of this

TS structures, and the nomenclature of the atoms we are going to use during the discussion.

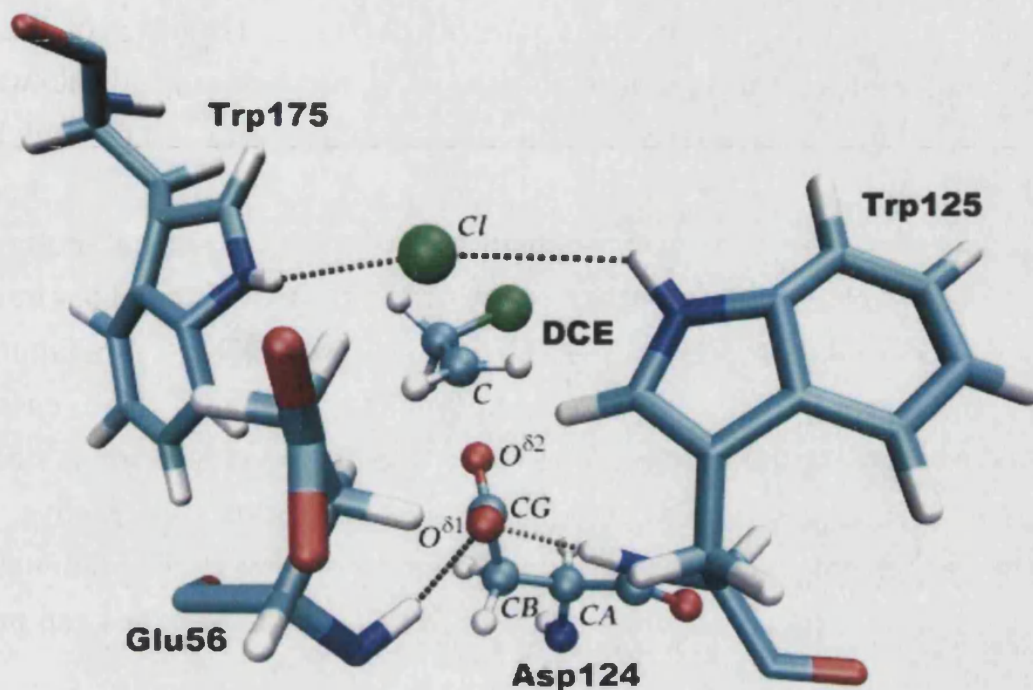


Figura 4.26: Snapshot of one of the transition state structures used as starting point in a downhill trajectory. The nomenclature of the atoms and residues is also showed.

As the reaction coordinate was restrained during the preparatory NVT MD simulation, the velocity associated to this coordinate is not correctly thermalized in the selected configurations. In principle, several strategies are possible to take an appropriate set of velocities for the initial configuration [181]. It is possible, for example, to assign random velocities from a Maxwell-Boltzmann distribution for all the degrees of freedom [177]. However, this approach seems to fail when applied to high-frequency vibration modes. One could in principle randomize the rotational and translational degrees of freedom only, but unfortunately the vibrational modes and the rotational motion cannot be rigorously separated. The approximation of velocity randomization that we have adopted here is based on the fact that the TS may be schematically represented by a structure A-B-C (i.e., A = the leaving chlorine atom, B = the CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl moiety and C = the rest of the system). The translation velocities of the centres of mass of A, B and C are assigned to a random value from the Maxwell-Boltzmann distribution corresponding to 300 K, preserving thus the velocities of the other degrees of freedom. In



their recent contribution Gao *et al* adopted the strategy of randomizing only the reaction coordinate velocity [173].

For each one of the selected transition state configurations (with randomized velocities) we ran downhill trajectories releasing the restraint imposed on the reaction coordinate. The equations of motion were integrated forward and backward in time until the system reaches the reactants or the product states. In general, backward integration can be simply achieved using a negative time step. In practice, this was done using the same integration algorithm in both cases, but multiplying the velocities by minus one, that has the same effect [6]. We extended our trajectories from  $-6$  ps to  $+6$  ps. A time step of  $0.5$  fs was used in these simulations because large changes take place in the chemical subsystem and the NVE ensemble was employed for these trajectories. A trajectory file of each simulation is stored to perform further analysis. The trajectories can then be classified as reactive, when reactants are connected to products, or non-reactive otherwise. The latter supposes always a barrier recrossing although also the reactive trajectories can present recrossings.

#### 4.2.4.2. Results

##### Calculation and Analysis of the Transmission Coefficient

Trajectories have initially positive velocities in the reaction coordinate which sends them towards products at positive times ( $t > 0$ ) and towards reactants at negative times ( $t < 0$ ). For the total number of trajectories ran in the enzyme and in aqueous solution a significant fraction presented recrossings of the transition state dividing surface. The three different types of trajectories observed were: i) a direct reactant-product (RP) transition with no recrossing; ii) a single recrossing trajectory leading from reactants to reactants (RR) and iii) a single recrossing trajectory leading from products to products (PP). In the enzyme 59 % of the total number of trajectories were of the RP type, 24 % of RR type and 17 % of PP type. In solution the percentages were 40 % RP, 19 % RR and 41 % PP.

Because of the existence of these recrossings, the transition state theory rate constant needs to be corrected by a transmission coefficient  $\kappa$ , which will necessarily be less than unity. We have computed the transmission coefficient using the

“positive flux” [177] formulation that assumes that the trajectories are initiated at the barrier top with forward momentum along the reaction coordinate. Then, for a given reaction time  $t$ , the time-dependent transmission coefficient is defined as:

$$\kappa(t) = \frac{\langle j_+ \theta[q(+t)] \rangle_R - \langle j_+ \theta[q(-t)] \rangle_R}{\langle j_+ \rangle_R} \quad (4.10)$$

where  $q$  is the reaction coordinate (the carbon-chlorine distance minus the carbon-oxygen distance)  $j_+$  represents the initially positive flux at  $t = 0$ , given by  $\dot{q}(t = 0)$ , and  $\theta(q)$  is a step function equal to one on the product side of the reaction coordinate and zero on the reactant side. The averages are taken over all the trajectories. The results obtained for the transmission coefficient in the enzyme and in aqueous solution are presented in figure 4.27. The shape of  $\kappa(t)$  shows a fast decay in both media. The fate of the reaction is completely defined after the first 20 fs in solution and after 30 fs in the enzyme, in good agreement with other  $S_N2$  reactions [171, 177]. After this period of time, the transmission coefficient reaches a plateau from which the values of the transmission coefficients in solution and in the enzyme can be obtained. The computed values of  $\kappa$  are 0.57 and 0.77 respectively. Thus, the enzyme speeds up the chemical process not only by lowering the activation free energy, but also by increasing the transmission coefficient. In fact, the effect on the free energy barrier lowering (around 11 – 15 kcal/mol) is much larger as this implies a rate constant increase by a factor of  $3 \times 10^9$  to be compared to the 1.4 factor arising from the transmission coefficients. For the same system Gao, and coworkers [173] obtained a value for  $\kappa$  of 0.53 for the enzymatic process and 0.26 for the uncatalyzed one. Although the tendencies are the same, the absolute values differ notably. Part of the discrepancy with our results might be due to the different potential energy function used. In their work, Gao and coworkers, used a specifically reparametrized AM1 hamiltonian and obtained significantly smaller free energy barriers (31.4 and 20.5 kcal/mol in aqueous solution and in the enzyme, to be compared, respectively, with 39.6 and 28.4 kcal/mol in our previous work). Though it is difficult to conclude on the accuracy of transmission coefficients calculations, the value of 0.26 reported in reference [173] seems too small when compared to other  $S_N2$  processes displaying similar free energy barriers in aqueous solution [171].

The existence of barrier recrossings in  $S_N2$  reactions in aqueous solutions has been explained on the basis of the coupling between the solute and the solvent.

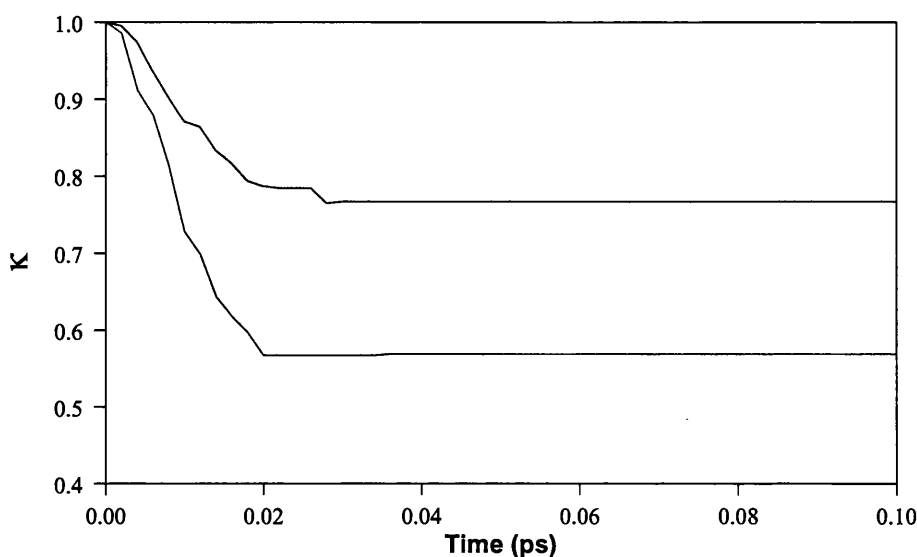


Figura 4.27: Time dependent transmission coefficient versus time calculated in aqueous solution (red line) and in enzyme (blue line).

In particular, for the symmetric  $[\text{Cl-CH}_3\text{-Cl}]^-$  reaction it has been found that the reaction outcome is largely determined by which of the two chlorine atoms is better solvated in the particular transition state configuration [177]. The question now is to understand which is the difference between the enzyme and the solvent and why there is a significant smaller number of recrossings in the former. The magnitude of the solute-environment coupling can be determined from the time dependent friction coefficient, related to the random force exerted on the reaction coordinate [182]:

$$\zeta = \frac{\langle FF(t) \rangle}{kT\mu} \quad (4.11)$$

where  $\mu$  is the effective mass associated to the reaction coordinate and  $\langle FF(t) \rangle$  is the autocorrelation function of the force acting on the reaction coordinate. We have obtained the initial value of the friction from a 100 ps simulation of the transition state with a fixed value of the reaction coordinate. This value can be conveniently expressed as a frequency or a wave number just considering  $\zeta(t=0) = \omega_\zeta^2$ . The values obtained for  $\omega_\zeta$  were 600 and 935  $\text{cm}^{-1}$  for the enzymatic and the uncatalyzed processes, respectively. These numbers indicates a strong coupling of the reactant system with both media, but this coupling is clearly stronger in solution. One may compare these values with that obtained for the symmetric  $[\text{Cl-}$

$\text{CH}_3\text{-Cl}]^-$  reaction for which a friction of  $890 \text{ cm}^{-1}$  in aqueous solution was predicted [177]. The recent results of Gao *et al* [173] also show a stronger coupling in water than in the enzyme. Indeed, the ratio between the friction coefficients in water and in the enzyme reported by these authors display a similar tendency than in our results although absolute values are quite different (results provided in that reference, of about  $2600 \text{ cm}^{-1}$ , seem to be out of the typical range for  $S_{N2}$  reactions in solution, most probably due to a problem in the units).

To understand the different coupling between the reactant system and the environment in aqueous solution and in the enzyme and thus the origin of the differences in the transmission coefficient we have turned our attention to the electrostatic effects. It has been shown that for  $S_{N2}$  processes in aqueous solution the coupling arises by electrical forces associated with the charge switching between the attacking and leaving groups (the oxygen and the chlorine atoms in our case) and increases with the charge switching rate [177, 178]. In figure 4.28, we show the variation of the averaged Mulliken charges on the attacking oxygen atom, the leaving chlorine atom and the  $\text{CH}_2$  moiety with the reaction coordinate. The vertical line displays the approximate position of the transition state. It can be seen that in both media the charges vary in the same way, the rate of charge transfer being quite similar in both cases. In the transition state the averaged charge on the attacking oxygen ( $\text{O}^{\delta 2}$ ) and the leaving chlorine atoms are about  $-0.6$  and  $-0.8$  a.u. respectively, while for the  $\text{CH}_2$  group is about  $+0.6$  a.u.. Then, the different coupling arising in both media is not due to differences in the chemical system but to the different response of the environment. We have evaluated this by means of the electric field created by water molecules or enzyme residues on the attacking oxygen, carbon and chlorine atoms. The electric field is directly related to the forces. In addition, it depends on the local environment configuration around the reactive atoms, which has been shown to determine the reaction outcome in the symmetric  $S_{N2}$  reaction in water [177]. In our work, we have chosen the component of the electric field projected along the vector defined by the leaving and attacking atoms ( $E_{OCl}$ ), which is the component acting on the reaction process. Figure 4.29 displays a gaussian fit to the distribution of  $E_{OCl}$  values obtained during a molecular dynamics simulation of the transition state in water and in the enzymatic active site. In particular, we have computed the values of this component of the electric field acting on the oxygen, chlorine and carbon atoms. The pattern obtained in

aqueous solution corresponds to a reaction field. The solvent electric field is essentially a response to the negative charge appearing on the chlorine atom and its mean values diminish in the order  $\text{Cl} > \text{C} > \text{O}$ . The results are clearly different in the case of the enzyme where the electric field is essentially the same on chlorine and carbon atoms. This is due to the disposition of Trp125 and Trp175 residues: the hydrogen bonds established between the  $\text{H}_\epsilon$  of these residues and the leaving chloride anion are nearly perpendicular to the  $\vec{OCl}$  vector (see figure 4.26). One may notice two other important differences between the electric field appearing in solution and in the enzyme (related to the different number of recrossing found in both media). First, in aqueous solution the difference between the mean values of the electric field on the attacking and the leaving atoms is larger than in the enzyme. Second, the distribution of electric field values is wider in solution. This means that it is more probable to find configurations with large differences in the interaction of the leaving and attacking atoms with their surroundings in water than in the enzyme. For example, it will be more probable to find configurations where the interaction of the chlorine atom with the surrounding water molecules is much stronger than for the oxygen atom, and then the trajectory starting at this configuration will lead to products irrespectively of the initial velocity along the reaction coordinate. Water solution is more flexible than the enzyme and it adapts to the charge distribution of the solute creating a solvent reaction field. Equilibrium fluctuations of this electric field can lead to important departures of transition state theory predictions by means of trajectory recrossings provoked by differential stabilization of the attacking and leaving groups. Fluctuations in the enzyme are significantly smaller and thus it is also smaller the probability of environment-induced recrossings. This finding is obviously related to the reorganization concept [61, 129]. According to this the energy spent in reorganizing the environment to the changes in the charge distribution during the reaction progress is larger in solution than in the enzyme and this makes an important contribution to catalysis.

Analysis of environment-induced recrossings shows an interesting difference between solvent and enzyme reactions. We have compared the time evolution of  $E_{OCl}$  on both the leaving and the attacking atoms averaging over reactive (RP) and non-reactive (RR and PP) trajectories. Results are presented in figure 4.30. The transition state defines the initial configuration ( $t = 0$ ), while negative and

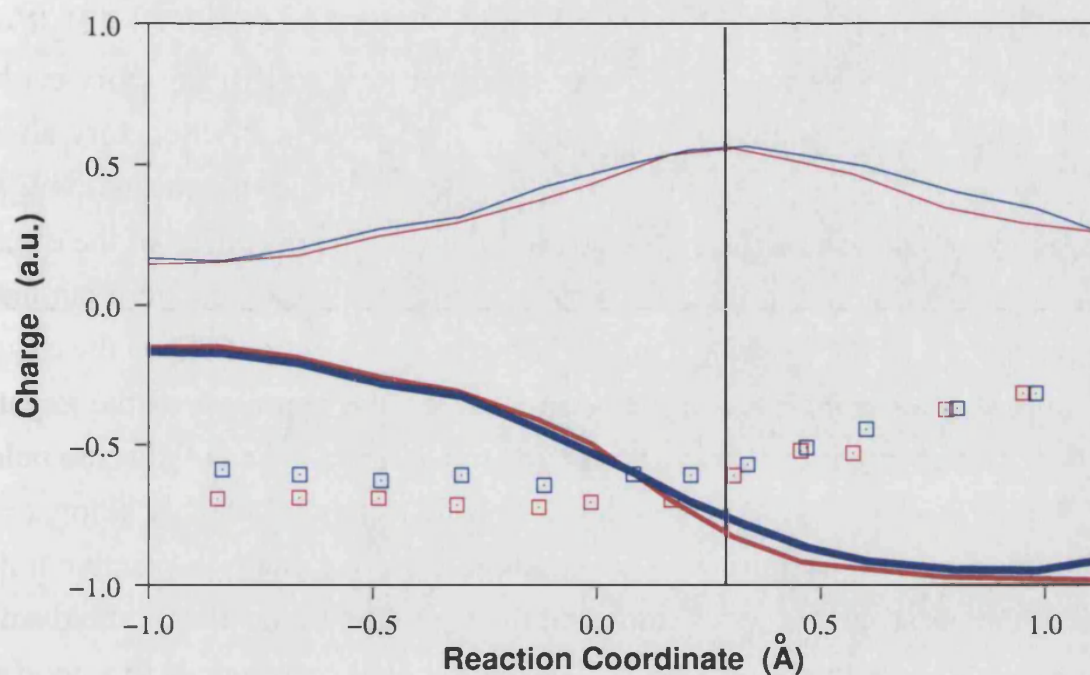


Figura 4.28: Variación de las cargas Mulliken promedio con la coordenada de reacción en solución acuosa (rojo) y en la enzima (azul). Con los puntos las cargas en el átomo de oxígeno atacante, con línea gruesa para el átomo de cloro y con línea fina para el grupo CH<sub>2</sub>. Línea vertical representa la posición aproximada del TS.

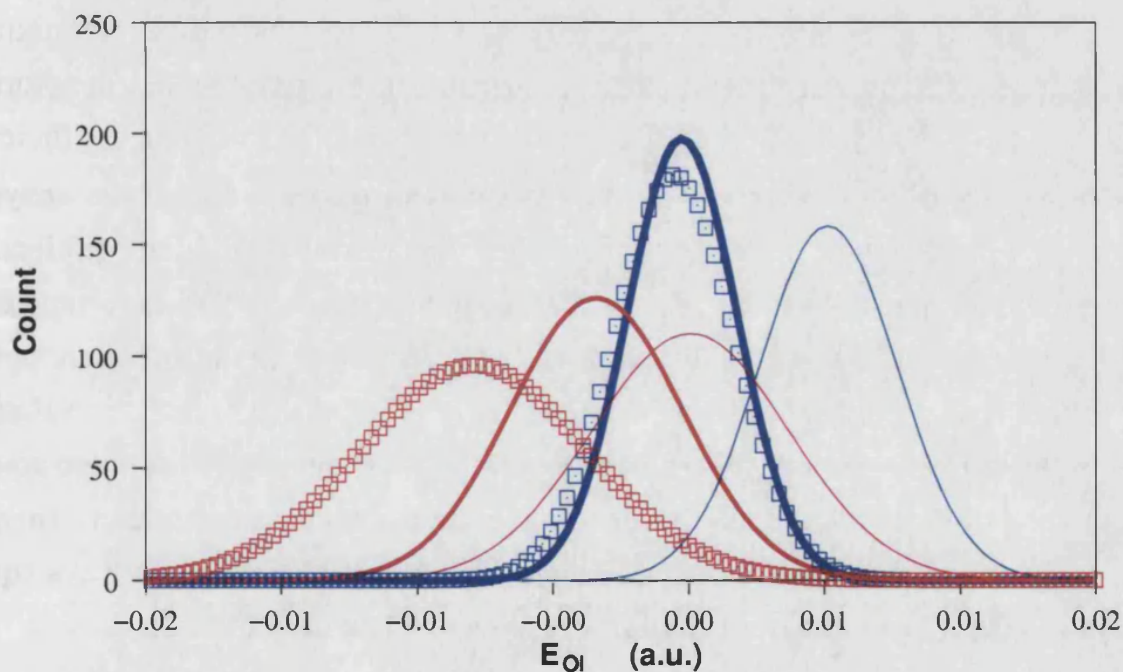


Figura 4.29: Ajuste gaussiano a la distribución de los valores de  $E_{OCl}$  en los átomos de la solución acuosa (rojo) y la enzima (azul). Con los cuadrados el ajuste gaussiano para el campo en el átomo de cloro, con línea gruesa para el átomo de carbono y con línea fina para el átomo de oxígeno.

positive times corresponds to the evolution towards reactants ( $R-O^- + CH_2R'-Cl$ ) and products ( $R-O-CH_2R' + Cl^-$ ) in a reactive trajectory (a RR trajectory evolves towards reactants irrespectively of the sign of time while a PP trajectory always evolves towards products). It is interesting to note that in the enzyme, reactive and non-reactive trajectories differ in the initial value and the evolution of the electric field (the component along the  $\vec{OCI}$  vector) acting on the oxygen atom but not in the electric field on the chlorine atom. A large positive electric field on the oxygen atom indicates environmental force acting against the approach of the negative charge to dichloroethane, defining then a RR trajectory. As we will discuss below, in a RP trajectory this component of the electric field changes notably before  $t = 0$ . In solution we have just the opposite situation. Reactive and non-reactive trajectories clearly differ in the initial value and the evolution of the electric field acting on chlorine atom. In this case the negative electric field corresponds to a good solvation of the leaving chloride anion and thus to an environmental force against the approach of the anion to the ether formed. Thus, recrossings in the enzyme seem to be essentially due to fluctuations in the interactions of the environment with the attacking oxygen atom while in solution these seem to be mainly due to changes in the solvation of the leaving group. This result indicates then a different mixture of reacting system and environmental coordinates in the enzyme and in solution and then it can contribute to the differences found in the transmission coefficient.

Interesting differences between the dynamics in solution and in the enzyme are also evidenced when comparing the magnitude of friction and the equilibrium forces in both media. At  $t = 0$ , the friction in solution is about  $935 \text{ cm}^{-1}$  and  $600 \text{ cm}^{-1}$  in the enzyme. The equilibrium frequency, derived from the curvature of the potential of mean force at the top of the barrier is  $1150$  and  $1050 \text{ cm}^{-1}$  in solution and in the enzyme, respectively. From these values we can obtain the force acting on the reaction coordinate assuming that the environment is completely frozen, this is, in the nonadiabatic regime [171]. In this case the friction is always equal to the  $t = 0$  value and then the net force, expressed as a frequency is:

$$\omega_{na}^2 = \omega_{eq}^2 - \omega_{\xi}^2 \quad (4.12)$$

From this nonadiabatic frequency of passage over the barrier top, we can estimate the nonadiabatic limit to the transmission coefficient [171]. Results are summarized in table 4.4. As it can be seen, the transmission coefficient obtained from mo-

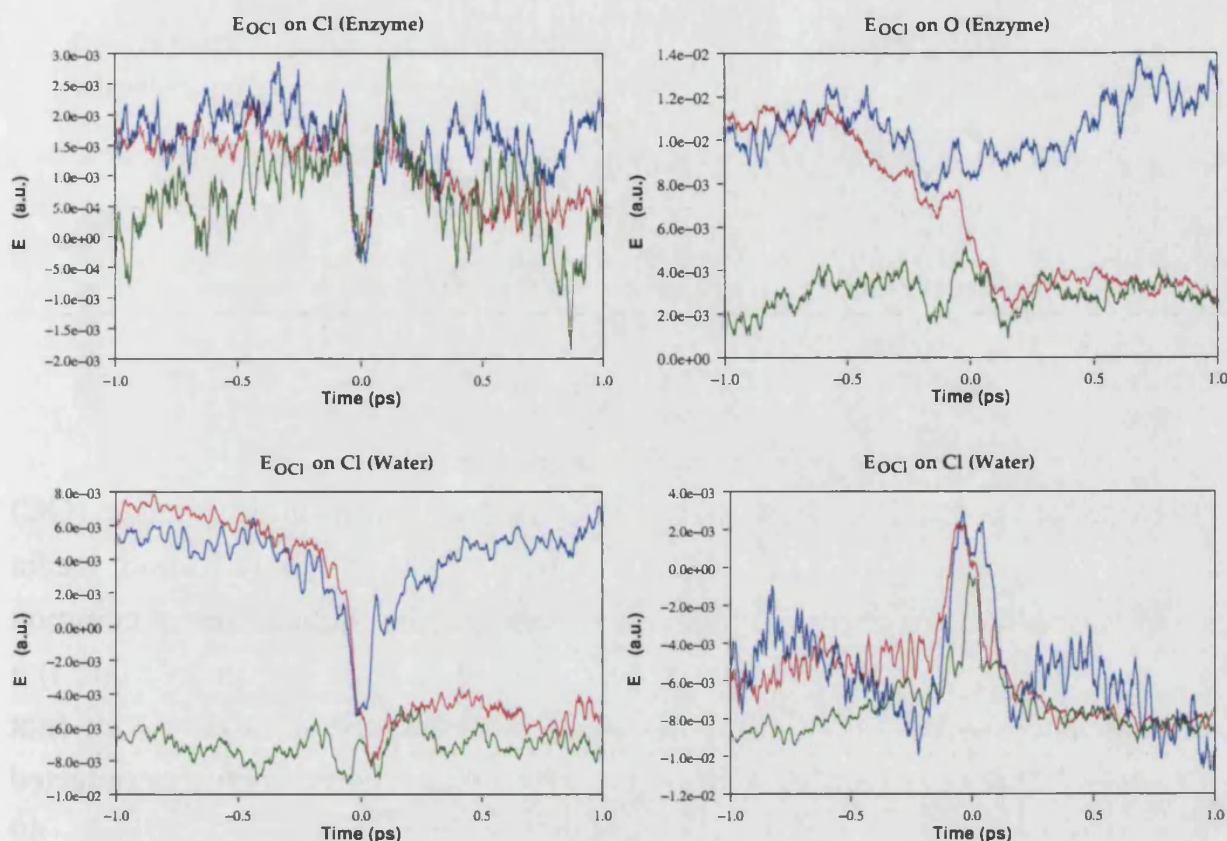


Figura 4.30: Representation of the time evolution of the averaged  $E_{OCI}$  on both the leaving and attacking atoms for the reactive (RP, red line) and non-reactive (RR, blue line; PP, green line) trajectories, in aqueous solution and in the enzyme.

lecular dynamics rare event simulations is slightly lower than the value obtained in the nonadiabatic limit. This could be due to dynamical effects in the rearrangement of the environment around the other oxygen atom of the carboxylate group as the reaction advances. As we shall discuss below, environment interactions with this atom play also a fundamental role in the reaction progress but these effects are not included in our estimation of the friction as far as the coordinates of this atom are not included in the definition of the reaction coordinate.

### Analysis of Reactive Trajectories

In this section we analyze the differences between reactive trajectories in aqueous solution and in the enzyme in order to understand the molecular mechanism of catalysis. For this purpose, we have averaged over the reactive trajectories in both media.

Figure 4.31 shows the evolution of the most important atomic distances during



Tabla 4.4: Frequencies associated to the reaction dynamics (equilibrium, friction at  $t = 0$  and nonadiabatic limit) in  $\text{cm}^{-1}$  and transmission coefficients calculates from molecular dynamics or in the nonadiabatic limit.

	$\omega_{eq}$	$\omega_{\zeta}$	$\omega_{na}$	$\kappa_{MD}$	$\kappa_{na}$
<b>Solution</b>	1150	935	670	0.56	0.58
<b>Enzyme</b>	1050	600	860	0.77	0.82

the reaction: the bond breaking distance (CCl), the bond forming distance (OC) and the distance between the attacking and leaving groups (OCl). In both media the description of the reaction dynamics is quite similar. Four different common steps can be found in the chemical reaction in the enzyme and in solution: i) a vibrational activation of the chlorine-carbon bond starting at about  $-4$  ps (not presented in the figure) [179] ii) the approach of the reactant fragments reflected in the diminution of the OCl distance, which takes place between  $-130$  and  $-40$  fs, when the OCl distance diminishes from 5 to 4.2 Å. iii) the transfer of the methyl group from the leaving chlorine atom to the attacking oxygen one, which requires about 80 fs (from the last CCl vibration at about  $-40$  fs to the first CO vibration at  $+40$  fs) and can be seen as a positive charge moving from one negatively charged center to the other  $[\text{O}^- - \text{C}^+ - \text{Cl}^-]$  and iv) the departure of the leaving group, once the new carbon-oxygen bond has been formed, taking place roughly from  $+40$  to  $+140$  fs, when the OCl distance has been lengthened up to 5 Å. The similar dynamical behaviour of the geometrical parameters in solution and in the enzyme is the result of two opposite contributions. On one hand, the potential of mean force in solution presents larger energy barrier and frequency, so that forces acting on the reaction coordinate due to the equilibrium situation are larger in solution. On the other hand, as discussed above, friction is also larger, resulting in a net force that seems to be very similar in solution and in the enzyme.

Obviously, we have observed differences between both media for reaction times longer than  $\pm 100$  fs due to the diffusion of the reactants or products in water. As a consequence of this diffusional movement, the carbon-oxygen distance in water does not present a vibrational structure in the reactant state ( $t < 0$ ), which is clearly apparent in the enzyme. This vibration of the carbon-oxygen distance have

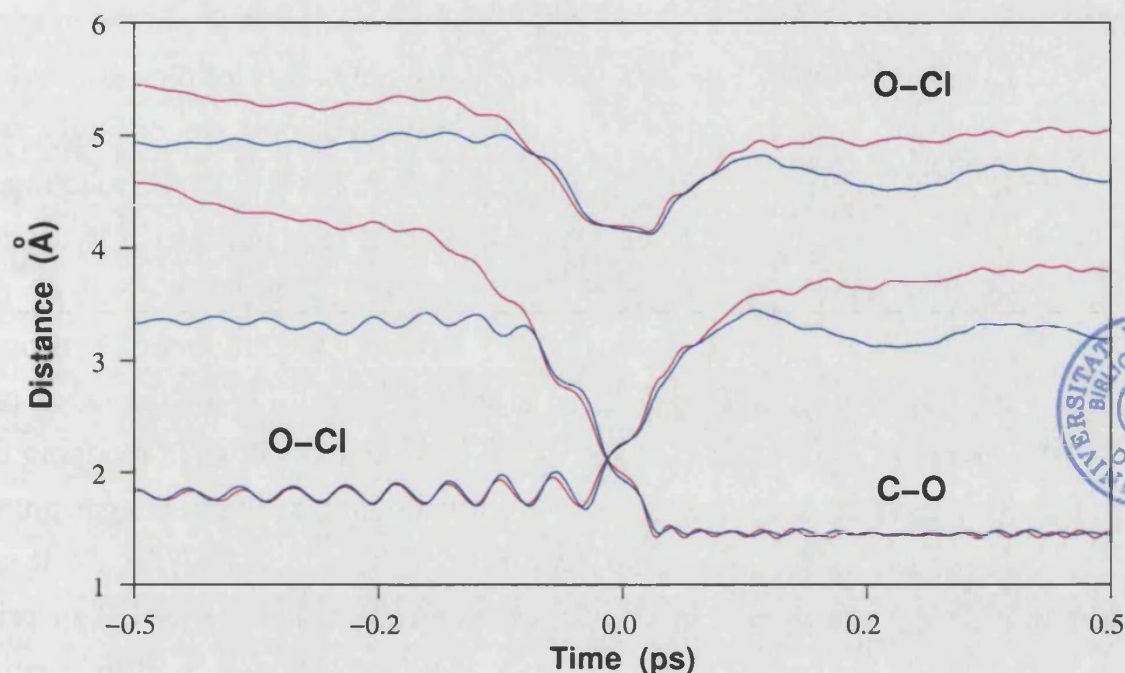


Figura 4.31: Time evolution of the averaged most important atomic distances in aqueous solution (red line) and in the enzyme (blue line) for the reactive trajectories. The distances are named on the graphic.

been invoked to explain differences in the time dependent friction in the enzyme with respect to aqueous solution suggesting that intramolecular vibrations provide a main channel for coupling the enzyme to the reaction coordinate [173].

We have also found important differences in the dynamical behaviour of the environment. As far as the electrostatic interaction is determinant in the evolution of the reaction, we have focused our attention on the hydrogen bonds established between the reactant system and the environment. In aqueous solution we have computed the number of hydrogen bonds established between the different atoms of the reactants and water molecules. In particular, we were looked at the hydrogen bonds involving the attacking oxygen atom ( $O^{\delta 2}$ ), the leaving chlorine atom (Cl) and the other oxygen atom of the carboxylate group ( $O^{\delta 1}$ ). The hydrogen bonds have been defined using a simple criterion based on the distance between the solute atom and the hydrogen atom of water molecules as far as our interest is in the variation of the magnitude with reaction progress and not in the absolute value. Figure 4.32 displays the averaged number of hydrogen bonds as a function of time for the reactive trajectories. In the reactants state ( $t < 0$ ), we find approximately 3.6 hydrogen bonds between water molecules and each one of the

carboxylate oxygens ( $O^{\delta 2}$  and  $O^{\delta 1}$ ) and 1.9 with the chlorine atom. In the product side ( $t > 0$ ), the predicted averaged number of hydrogen bonds for the carboxylate oxygens ( $O^{\delta 2}$  and  $O^{\delta 1}$ ) and Cl are 0.3, 1.6 and 6.5 respectively. Accordingly, solvation of the chlorine atom appears to be a major driving force for the reaction in solution. For the transition state to be reached, the averaged number of hydrogen bonds of this atom has to increase up to 4.5. In contrast, in order to climb up the barrier, both oxygen atoms must be desolvated, reducing the number of hydrogen bonds up to 1.2 for the attacking oxygen atom ( $O^{\delta 2}$ ) and 3.0 for the other one ( $O^{\delta 1}$ ). In average the system has lost about half hydrogen bond when reaching the transition state and the energy barrier is consequently larger than in the gas phase. Figure 4.32 also shows the dynamical evolution of these hydrogen bonds. It can be seen that changes in the solvation of these atoms start as soon as 1-2 ps prior to the passage over the barrier top. This suggests an important solvent fluctuation preceding the chemical changes and it is consistent with the existence of water reorientation motions in a similar time scale [183].

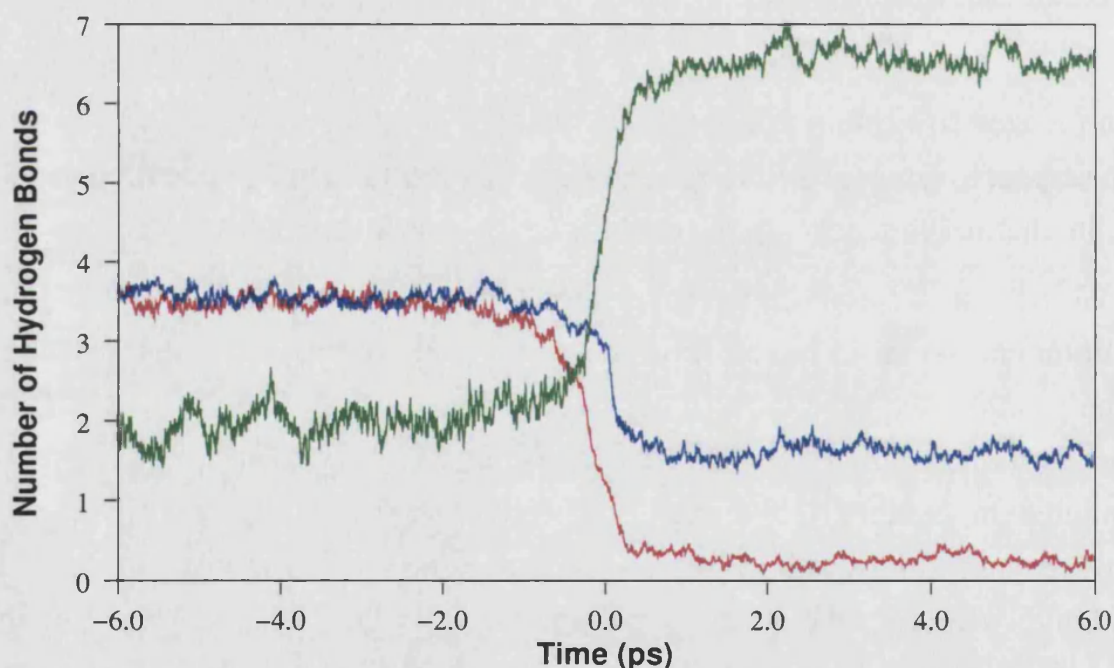


Figura 4.32: Representation of the time evolution of the averaged number of hydrogen bonds for the reactive trajectories in aqueous solution: for the attacking oxygen atom ( $O^{\delta 2}$ , red line), the non-attacking oxygen atom ( $O^{\delta 1}$ , blue line) and the chlorine atom (Cl, green line).

In the enzyme the two carboxylate oxygen atoms can establish hydrogen bonds

with the HN atoms of Glu56 and Trp125, while the leaving chlorine atom can form hydrogen bonds with the H<sup>ε</sup> atoms of Trp125 and Trp175 (see figure 4.26). Figure 4.33 shows the averaged evolution of these hydrogen bond distances for O<sup>δ2</sup> (a), O<sup>δ1</sup> (b) and Cl (c). A comparative analysis of the evolution of hydrogen bonds in the enzyme and in water solution can be very useful to understand one of the most important contributions to catalysis. For O<sup>δ2</sup> and Cl, the change in the hydrogen bond pattern during the enzymatic reaction is similar to what we find in solution. The leaving chlorine atom forms stronger hydrogen bonds in the product state than in the reactant state. However, the diminution of these hydrogen bond distances becomes evident only after  $t = -600$  fs. The attacking oxygen atom (O<sup>δ2</sup>) loses its hydrogen bonds as this atom approaches to dichloroethane. The main difference with respect to the reaction in solution concerns the other oxygen atom (O<sup>δ1</sup>) from which the hydrogen bonds strength increases in the enzyme as the reaction advances. Thus, hydrogen bond interactions of the O<sup>δ1</sup> atom are in fact one of the driving forces of the reaction in the enzyme and make a decisive contribution to catalysis when compared to the reaction in solution. To understand this, we have analyzed the evolution of the hydrogen bonds established by O<sup>δ2</sup> and O<sup>δ1</sup> in the individual trajectories. The change in the averaged hydrogen bond distances is the result of different type of trajectories. At  $t = -6$  ps 32 % of the reactive trajectories presented a hydrogen bond between O<sup>δ2</sup> and the amide group of Trp125 and 22 % with the amide group of Glu56. At  $t = 0$ , when the transition state is reached, only 10 % of the structures showed a hydrogen bond between O<sup>δ2</sup> and the amide group of Trp125 and none with Glu56. This desolvation of the attacking oxygen is assisted by the solvation of the O<sup>δ1</sup> atom. At  $t = -6$  ps 75 % of the reactive trajectories presented a hydrogen bond between O<sup>δ1</sup> and the amide group of Glu56 and 63 % with the amide group of Trp125 (obviously, in some cases the O<sup>δ1</sup> atoms displays short distances with both amide groups). At  $t = 0$ , when the transition state is reached, the percentage are increased up to 69 and 97 %, respectively. The reason of this compensation between the hydrogen bonds of O<sup>δ2</sup> and O<sup>δ1</sup> is that the positioning of the attacking oxygen with respect to the dichloroethane is essentially accomplished by means of a rotation of the carboxylate group around the CG-CB bond (see figure 4.26). When this bond is rotated to desolvate the O<sup>δ2</sup> atom then the O<sup>δ1</sup> atom is better exposed to the polar hydrogen atoms of Glu56 and Trp125 amide groups. The evolution of the dihedral

angle that defines the rotation around this bond ( $O^{\delta 1}$ -CG-CB-CA) is shown in figure 4.34 for all the reactive trajectories. When the transition state is reached, all the trajectories present a dihedral angle close to 250 degrees, which is also kept for positive reaction times. However, in the reactant state ( $t < 0$ ), we can observe different behaviours. Most of the cases have a dihedral angle close to 270 degrees but the carboxylate group can rotate around the CG-CB bond and other conformations (0, 90 and 180 degrees) present a significant population. Thus, the  $O^{\delta 1}$  atom plays a completely different role in solution and in the enzyme. In solution, this atom presents also an important desolvation at the top of the barrier and thus this means an energy penalty to reach the transition state. In the enzyme, when the attacking  $O^{\delta 2}$  atom approaches the substrate the carboxyl group rotates and then the  $O^{\delta 1}$  atom can form stronger hydrogen bonds. Thus, these hydrogen bonds help the reactant system to climb up the energy barrier during the positioning of the nucleophilic oxygen. This is an important electrostatic contribution to lower the free energy barrier of the catalytic process. The importance of these hydrogen bonds on the catalytic process have also been previously suggested from the analysis of the X-ray crystallographic data [126, 128].

Also during the positive methyl group transfer (step iii) we have found an important contribution to catalysis. As discussed above, from  $-40$  to  $+40$  fs the distance between the attacking and the leaving groups remains essentially constant (at a mean value of 4.2 Å) and, in this period, the reaction can be seen as the movement of a positively charged particle from one negative centre (the chlorine atom) to another (the  $O^{\delta 2}$  atom). According to the charges showed in figure 4.28 the chemical system can be described at this step approximately as  $[O^- - C^+ - Cl^-]$ . In solution, the electrostatic reaction field of the solvent hinders this transfer. When the methyl group is still bonded to the chlorine atom it experiences a solvent-induced force against the transfer to the oxygen atom. Once the barrier top has been passed over, the force acts in the opposite sense, this is against the transfer towards the chlorine atom. Then, we have an electrostatic contribution that destabilizes the transition structure. This solvent electrostatic effect can be seen in figure 4.35 where the component of the solvent electric field along the  $\vec{OCl}$  vector acting on the carbon atom is presented. This component of the field is positive on the reactant side ( $t < 0$ ) and negative on the product side ( $t > 0$ ). In the same figure 4.35 we also present the component of the electric field acting on

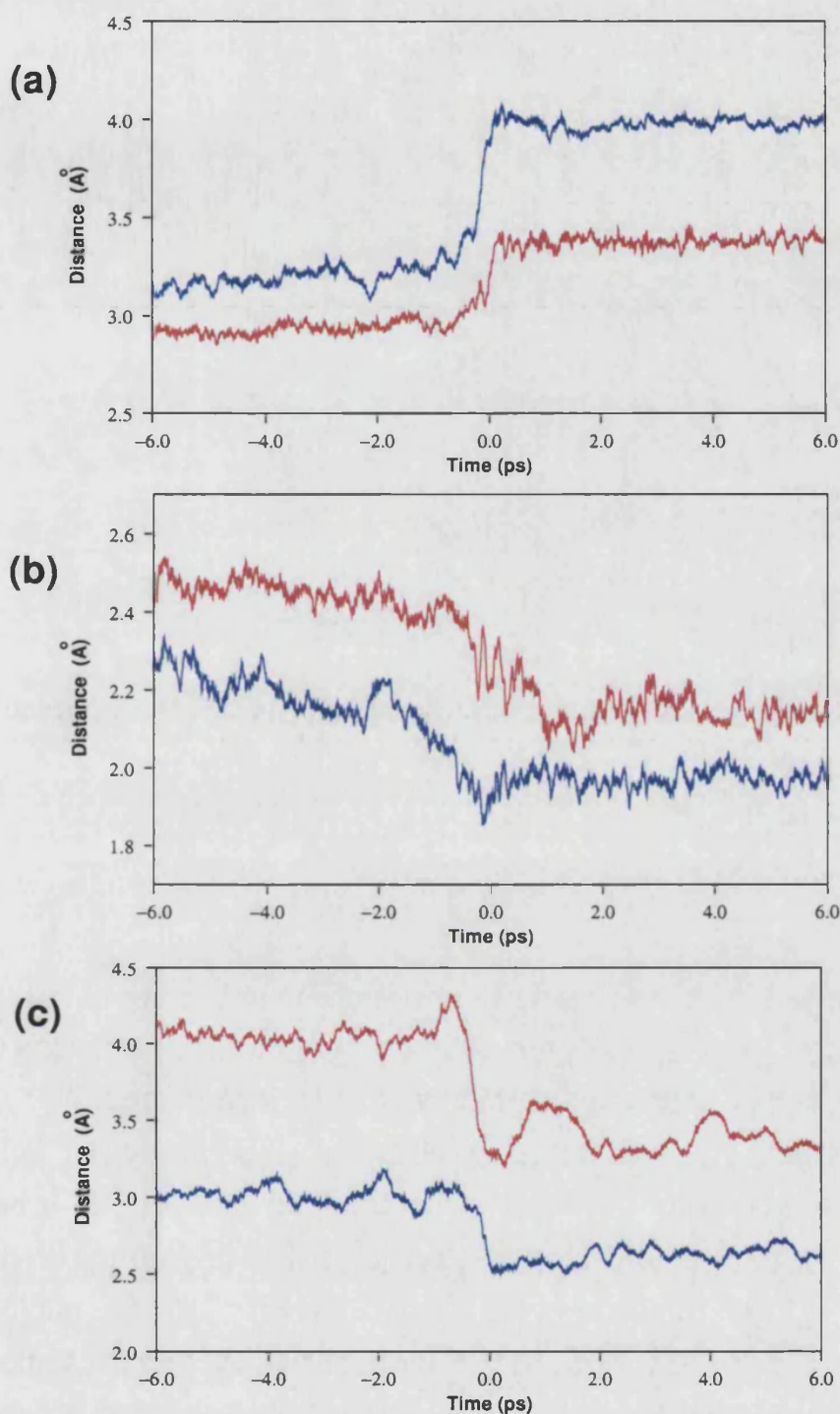


Figura 4.33: Representación de la evolución temporal de las distancias promedio de los enlaces de hidrógeno (Å) para las trayectorias reactivas en la enzima. (a) Para el  $O^{\delta 2}$  átomo con el átomo HN de Glu56 (línea azul) y Trp125 (línea roja). (b) Para el  $O^{\delta 1}$  átomo con el átomo HN de Glu56 (línea azul) y Trp125 (línea roja). (c) Para el Cl átomo con el  $H^{\epsilon}$  de Trp175 (línea azul) y Trp125 (línea roja).

the carbon atom in the enzyme. Here we can observe a very different behaviour of

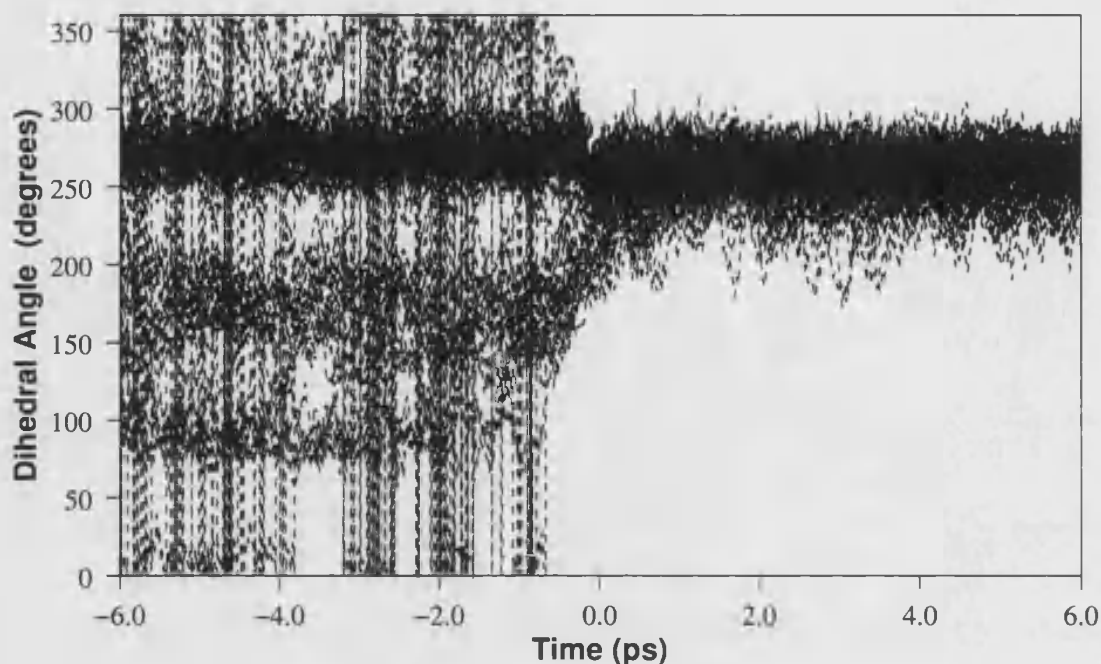


Figura 4.34: Representation of the evolution of the  $O^{\delta 1}$ -CG-CB-CA dihedral angle (in degrees) versus time for all the reactive trajectories.

the electric field. At long times this component of the electric field is close to zero both on the reactant side and the product side. However, about 200 *fs* before the passage over the barrier top, there is a subtle change in the electric field created by the environment. At  $t = -200$  *fs* the electric field changes and it becomes slightly negative. This component of the electric field acts as a force on the positively charged methyl group favouring the displacement towards the nucleophilic oxygen. If we look at the behaviour on the opposite side we find the same features. At about  $t < 200$  *fs* the electric field is slightly positive and then it favours the movement of the positive charge towards the chlorine atoms. Thus, in the proximity of the passage over the barrier top, the enzyme creates a small electrostatic force that effectively stabilizes this transition state. In terms of dynamical contributions, this electric field will reduce the friction of the environment as compared to water solution where the electric field always acts against the passage of the system over the barrier top and then it could be one of the important terms contributing to the differences found in the friction between the solvent and the enzyme.

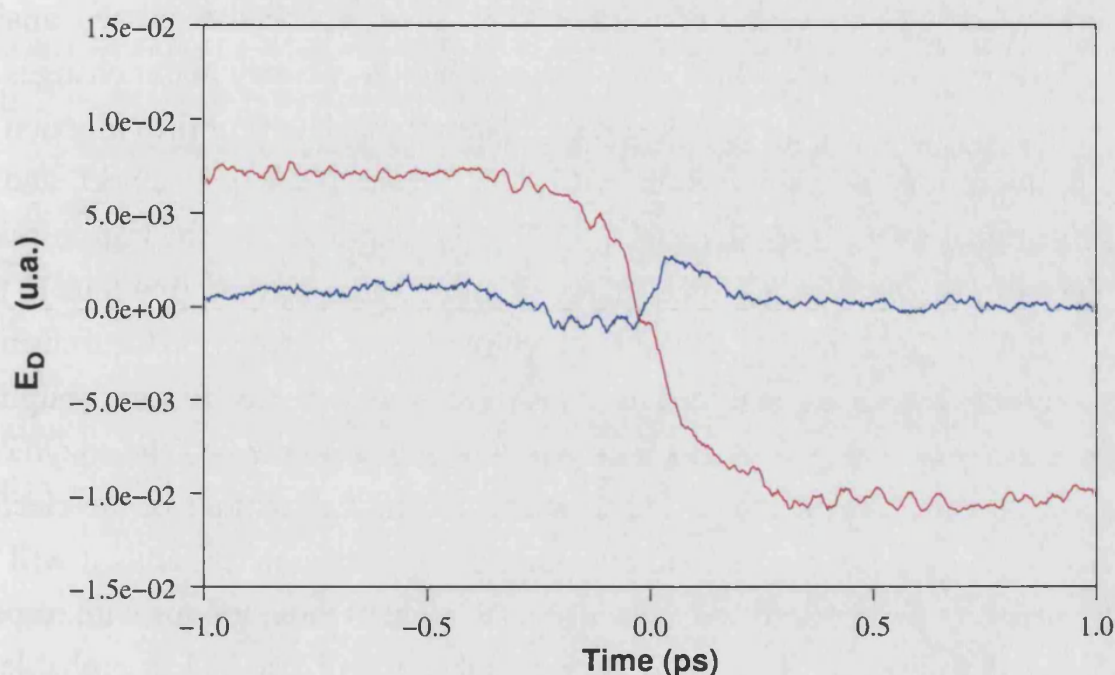


Figura 4.35: Representation of the time evolution of the averaged electric field along the  $\overline{OCl}$  vector acting on the carbon atom in aqueous solution (red line) and in the enzyme (blue line).

#### 4.2.4.3. Conclusions

The amazing ability of enzymes to catalyze chemical reactions is attained by a substantial reduction of the activation free energy. This effect is clearly stressed when the potential of mean force of the catalyzed reaction is compared to the counterpart process in solution. In the case of the nucleophilic displacement of a chloride anion in 1,2-dichloroethane catalyzed by Dh1A, our previous calculations, presented in section 4.2.3, predicted a reduction of the activation free energy of about 11 – 13 kcal/mol which means an increase of the rate constant in a factor of 108-109 relative to the uncatalyzed reaction. Obviously, the effect of the enzyme on the rate constant through changes in the transmission coefficient are expected to be much more modest and this can be one of the reasons to explain why PMF's calculations are much more popular than the study of reactive trajectories.

We have presented in this section an analysis of rare event trajectories for the nucleophilic displacement of a chloride anion of 1,2-dichloroethane by a carboxylate group in Dh1A and in aqueous solution. These trajectories are started at a transition state configuration obtained from an equilibrium distribution with the



system placed at the top of the respective PMFs. As it has been discussed, analysis of these trajectories provides valuable information not only about changes in the transmission coefficient but also on the microscopic details of the reduction of the activation free energy in the enzyme. With respect to the first subject, and in agreement with a recent similar study [173], we have found that the transmission coefficient in the enzyme is slightly larger than in water, contributing thus to the acceleration of the chemical process. The origin of the differences in the transmission coefficient has been analyzed in terms of the different electrostatic coupling between the chemical system and the environment in both media. The enzyme is less flexible than water solution and then equilibrium fluctuations of the electric field acting on the leaving and the attacking groups are smaller. Thus it will be less probable to find large differences in the solvation of these groups with respect to the equilibrium situation in the enzyme and then it will also be less probable to find recrossing trajectories.

From the detailed analysis of the reactive trajectories we have also found interesting differences that can explain the way in which the enzyme attains a so large diminution in the activation free energy. In aqueous solution the reaction requires the desolvation of the two oxygen atoms of the carboxylate group as the system advances towards the transition state while this climbing is assisted by the formation of an increasing number of hydrogen bonds with the leaving group (the chlorine atom). In the enzymatic process the changes taking place in the interactions established between the substrate and the environment during the reaction progress are quite different. While the chlorine atom forms also stronger hydrogen bonds as the reaction goes from the reactant state to the product state, a striking difference is found in the desolvation of the attacking group. Effectively, in the enzyme the correct alignment of the nucleophilic oxygen is attained by means of a rotation around the CG-CB bond. This rotation implies the desolvation of the attacking oxygen, just as in water solution. However, this desolvation is now assisted by the formation of stronger hydrogen bonds with the other oxygen atom of the carboxylate group. Then we have an additional driving force for the reaction in enzyme that can explain the lower activation free energy. An additional difference has been found for the movement of the positively charged methyl group between the chlorine and the oxygen atoms just during the pass over the top of the barrier. In this case, the enzymatic electric field seems to be designed to stabilize the tran-

sition state configuration  $[O^- - C^+ - Cl^-]$ , while the solvent reaction field obviously acts favouring a charge separation configuration ( $[OC - Cl^-]$  or  $[O^- - CCl]$ ).

As a general conclusion, the analysis of detailed trajectories for a particular enzymatic process does not provide only information about dynamical effects (transmission coefficients) but it is a complementary tool to the study of the PMF. The detailed description of the evolution of the chemical system and of the environment is essential to fully understand the origins of enzymatic catalysis as it allows to follow the changes that take place in the chemical system and in its surroundings.

### 4.3. Interacciones Moleculares con el ADN

En esta tercera y última sección estudiaremos la simulación de la interacción de moléculas de pequeño tamaño, en concreto la molécula de histamina, con el ADN y como la presencia del ADN modifica las propiedades de la molécula que interacciona con él.

#### 4.3.1. ADN e Histamina

La histamina (2-aminoetil-imidazol) es una amina biógena que se encuentra en gran cantidad de seres vivos, variando su concentración según órganos y especies [184]. Esta amina procede de la descarboxilación del aminoácido histidina, catalizada por la enzima histidina descarboxilasa (HDC), presente en numerosos tejidos. En la figura 4.36 se ha dibujado la molécula de histamina (en su forma de monocatión), con la nomenclatura utilizada en este trabajo.

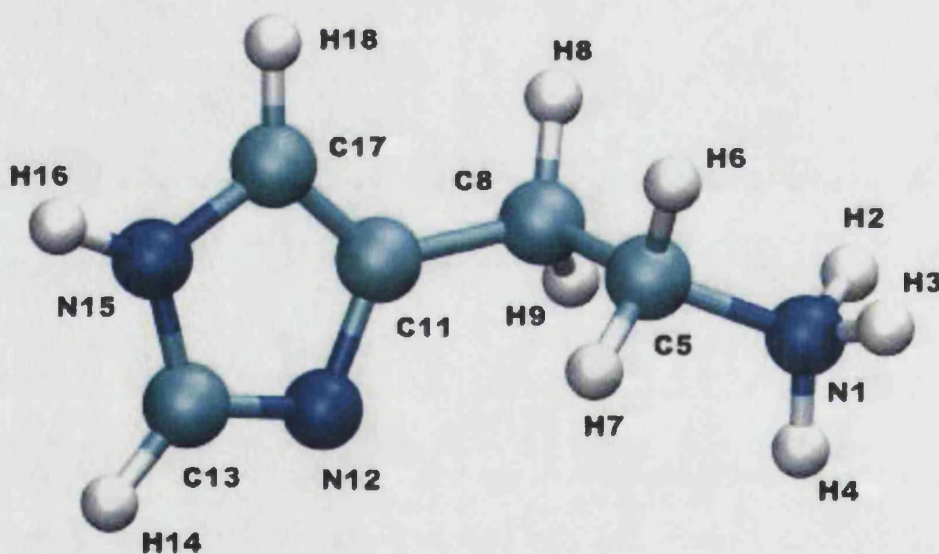


Figura 4.36: Representación de la molécula de histamina monocatión (la especie utilizada en este trabajo). Se ha añadido la nomenclatura usada en esta tesis.

En 1911, Dale y Laidlaw [185] indentificaron y describieron muchas de las propiedades de la histamina. Estos autores sugirieron que la histamina era el mediador relacionado con las manifestaciones alérgicas. Actualmente, se sabe que la histamina está implicada en importantes procesos biológicos relacionados con la secreción gástrica, comunicación celular, defensa de organismos frente a agentes

externos, proliferación celular, etc [186, 187]. La histamina es un neurotransmisor y, como tal, se almacena en vesículas y se libera por exocitosis. Los efectos biológicos de la histamina se ejercen a través de receptores frente a los que se han desarrollado fármacos que antagonizan de forma muy selectiva sus acciones [188]. Desde el punto de vista de defensa contra agentes externos, la relación directa entre procesos alérgicos e histamina ha sido claramente establecida, ya que la histamina se libera cuando el organismo es invadido por un agente externo (drogas, proteínas, etc..) [189–193]. Por el contrario, existe aún cierta controversia sobre la implicación directa de la histamina en procesos de crecimiento celular [194]. En la actualidad, los científicos están reuniendo una gran cantidad de información que relaciona la inhibición de los receptores de histamina y la inhibición de la HDC (la enzima que sintetiza histamina a partir del aminoácido histidina) con la proliferación celular y la expresión específica de oncogenes [193].

Aunque la mayoría de los efectos inducidos por la histamina pueden explicarse a partir de las interacciones específicas de la misma con receptores de membrana celular, se han descrito también receptores de histamina intracelulares o, al menos, macromoléculas con capacidad de unir y mediar señales inducidas por histamina, algunos de los cuales se han localizado en el núcleo y en otros compartimientos celulares [195]. Por esta razón, se ha estudiado la posible interacción entre el ADN y la molécula de histamina a nivel experimental, con el fin de determinar su existencia y caracterizarla si existiera.

Desde hace años, nuestra unidad mantiene una colaboración con el grupo de espectroscopía dirigido por el profesor Francisco Javier Ramírez, lo que se ha traducido en diversas publicaciones en las que teoría y experimentos han sido usados de forma conjunta para una mejor comprensión de los fenómenos químicos [196–199]. Entre estos, cabe destacar varios estudios sobre las propiedades estructurales y vibracionales de la histamina. Con la experiencia adquirida sobre el sistema modelo histamina en vacío e histamina en agua, se ha realizado el mismo estudio sobre la interacción de la histamina con el ADN, lo que ha conformado una parte de la tesis doctoral publicada por Antonio Joaquín Ruiz Chica [82].

Experimentalmente, se ha realizado un estudio de la interacción de la histamina con el ADN mediante espectroscopía vibracional (Raman e Infrarroja) y espectroscopía de dicroísmo circular electrónico. Para ello, se ha usado un medio acuoso (natural o deuterado, según metodología) a  $pH = 7.5$ , al cual, teniendo

en cuenta los valores de  $pK$  de la molécula de histamina [200], ésta se encuentra como monocatión en un porcentaje del 96% [201]. Los complejos de ADN e histamina fueron preparados por adición de ADN a disoluciones de distintas concentraciones de histamina. Estas mezclas se dejaron en agitación suave durante 48 horas a 4° centígrados, para asegurar la formación de disoluciones homogéneas.

Los resultados obtenidos por espectroscopía Raman e Infrarroja, tanto en medio acuoso natural como deuterado, indican en primer lugar que la interacción de histamina con ADN afecta directamente a los grupos C2=O de timina (marcado en la figura 2.11 del apartado 2.2.3 como O2). Esta deducción se basa en los desplazamientos observados para varias bandas en ambos espectros. Puesto que este grupo C2=O de timina está situado en el surco menor de la doble hélice, esto nos lleva a pensar que la interacción entre ADN e histamina debe establecerse por este surco (que posee una mayor densidad de carga negativa). También se observan cambios en la banda asignada al átomo N3 de las bases púricas (ver figura 2.11 para la adenina y la guanina). Este átomo pertenece a uno de los grupos con mayor reactividad del surco menor, lo que apoya la idea anterior.

El análisis de las bandas de Raman intensas de la histamina observadas en las disoluciones de mayor concentración, revelan cambios, tanto en las vibraciones de la cadena lateral, como en las del anillo de imidazol. Los desplazamientos más importantes se dieron en los modos de tensión del anillo aromático.

En el espectro de Dicroísmo Circular se aprecian bandas en la región correspondiente al anillo de imidazol. El hecho de que aparezcan estas bandas está relacionado con cambios estructurales del anillo, lo que da lugar a lo que se denomina *dicroísmo circular inducido* [202]. A diferencia de las bases, ni las vibraciones del grupo fosfodioxo, ni las del grupo fosfodiéster se ven afectadas de forma significativa por la presencia de histamina cuando los espectros se realizan en agua natural. Igualmente, las vibraciones asignadas a desoxirribosa experimentan desplazamientos poco significativos o nulos. Estos datos indican que la estructura del ADN no sufre distorsiones al interactuar con la histamina. Al igual que con las técnicas anteriores, tampoco se observan desplazamientos en las bandas asignadas a grupos funcionales localizados en el surco mayor, como el N7 de adenina y guanina o el grupo CH<sub>3</sub> de timina.

### 4.3.2. Metodología

Para poder simular la interacción de la histamina con una doble hélice de ADN, se procedió a la construcción de diferentes modelos computacionales de partida, de acuerdo siempre con los datos experimentales. Todos los modelos están constituidos por un oligonucleótido de 12 pares de bases dispuestas en forma de doble hélice, la molécula de histamina interaccionando con ella en una posición determinada y todo ello a su vez situado en el interior de una caja de moléculas de agua y contraiones sodio. El dodecámero utilizado en todos los casos ha sido el siguiente: 3'-A-T-C-T-C-G-T-A-G-A-C-G-5'. Se trata de una secuencia nucleotídica que se encuentra en el genoma de ternero, que ha sido el ADN utilizado en los estudios espectroscópicos experimentales, registrada en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) en las referencias Z11996 y X14710 (entre otras). La secuencia central (CGTAG), que es con la que interacciona específicamente la molécula de histamina en los modelos propuestos, se encuentra mucho más extendida tanto en el genoma de ternero como en el humano. Los extremos 3' y 5' fueron bloqueados con grupos OH, resultando en una doble hélice con 24 cargas negativas en total. Sobre esta cadena de ADN se añadió, en tres diferentes disposiciones iniciales, la molécula de histamina, cuya estructura fue tomada de la referencia [198]. Una vez determinada la forma de interacción inicial, se introduce el sistema contruido en un paralelepípedo de moléculas de agua de 30 x 30 x 60 Å de lado, del cual fueron eliminadas las moléculas de agua que solapaban con la doble hélice o la molécula de histamina. La caja contenía inicialmente un número elevado de contraiones sodio, que fueron eliminados selectivamente para dejar los 23 átomos más cercanos a los grupos fosfato de la doble hélice. Estas 23 cargas positivas más la carga positiva de la molécula de histamina compensan las 24 cargas negativas de la doble hélice, por lo que el sistema resultante es eléctricamente neutro. El número total de moléculas de agua del sistema así construido varía en función del caso, pero se mantuvo siempre próximo a 2426 unidades.

Los modelos de interacción puestos a prueba fueron tres, que denominaremos a partir de ahora intercalado, N2N3 y N2O2. Las dos últimas responden a interacciones con las bases por el surco menor, de acuerdo con la interpretación de los espectros experimentales. A continuación, vamos a ver con detalle las características de estos modelos:



- **Modelo Intercalado**

El primer modelo que probamos está basado en los desplazamientos observados en las bandas del espectro correspondientes a la vibración del anillo de imidazol. En él, la molécula de histamina fue colocada con su anillo de imidazol intercalado entre dos bases consecutivas, con el amino terminal orientado hacia el surco menor. Esta disposición está basada en la interacción, que presentan algunas moléculas con anillos aromáticos cuando interactúan con el ADN [203–205]. En la figura 4.37 (a) puede apreciarse el anillo de imidazol, intercalado entre dos pares de bases.

- **Modelo N2N3**

El siguiente modelo que hemos probado lo hemos denominado N2N3 por los lugares de interacción de la molécula de histamina con el ADN. La molécula se sitúa a lo largo del surco menor, con el anillo de imidazol y el amino terminal interactuando con dos bases diferentes, pero pertenecientes a la misma cadena de ADN. El anillo de imidazol interactúa por uno de sus nitrógenos desprotonado con el grupo exocíclico  $\text{NH}_2$  de un residuo de guanina, mientras que el grupo amino lo hace con el N3 de un residuo de purina. En la figura 4.37 (b) se muestra esta disposición.

- **Modelo N2O2**

Este último modelo que hemos probado también corresponde a una interacción por el surco menor. En este caso, el anillo también se dispone longitudinalmente a lo largo del surco menor, pero ahora los puntos de anclaje inicial son diferentes. El átomo de nitrógeno protonado del anillo de imidazol se ha hecho interactuar en este modelo con el átomo N3 de una purina, mientras que el grupo amino terminal interactúa con el grupo  $\text{C}2=\text{O}$  de una timina. La figura 4.37 (c) muestra la disposición de la molécula de histamina en este modelo.

Para realizar el estudio del sistema se ha utilizado un hamiltoniano híbrido QM/MM. La división entre ambos subsistemas resulta fácil en este caso, ya que no existen uniones covalentes entre la molécula de histamina y el ADN. La histamina será tratada mediante un hamiltoniano semiempírico AM1, mientras que

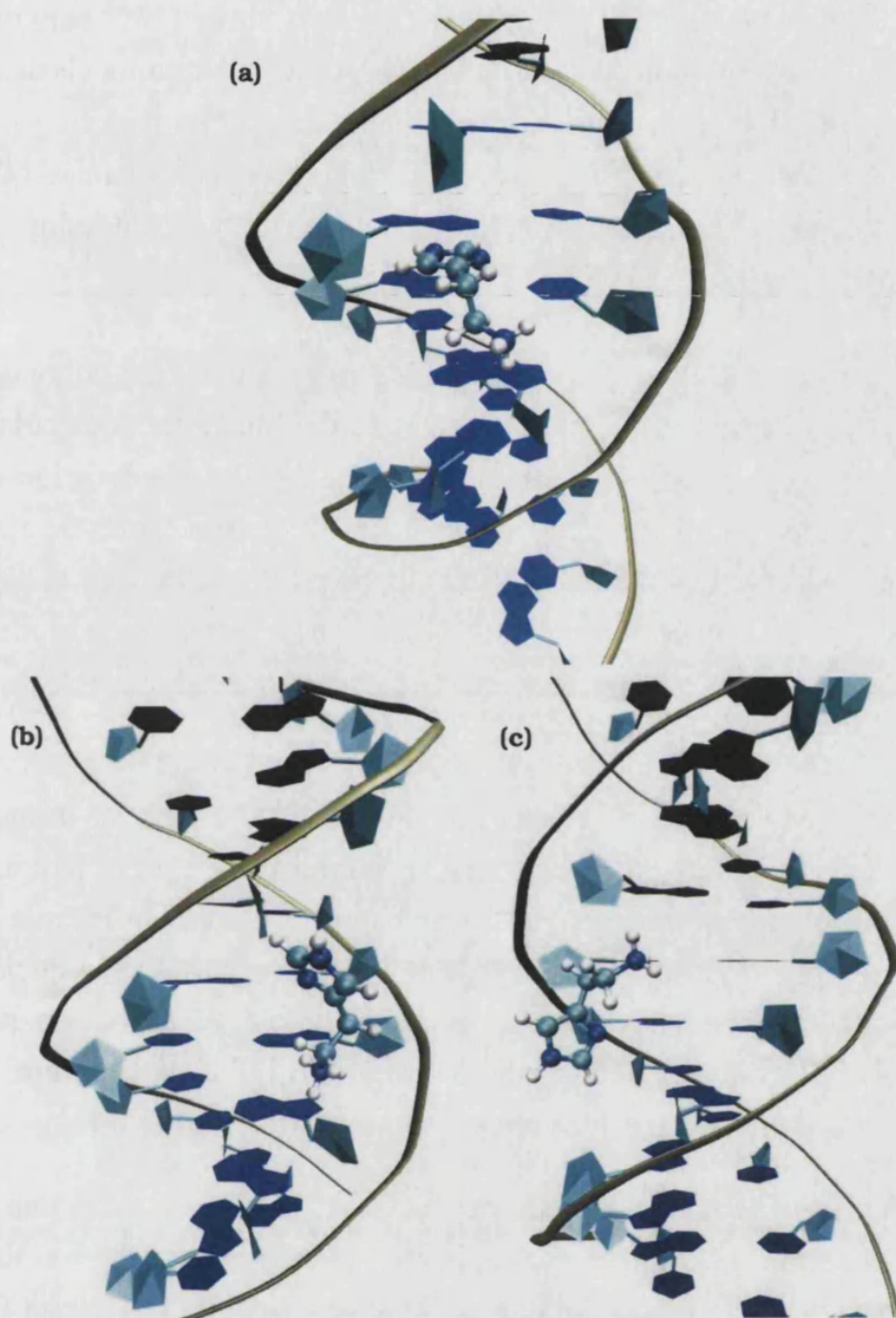


Figura 4.37: Representación esquemática de la interacción de la molécula de histamina con el ADN. (a) Modelo Intercalado, (b) modelo N2N3 y (c) modelo N2O2.

la doble hélice de ADN y las moléculas de agua y sus contraiones conforman el subsistema clásico, que estará representado por el campo de fuerzas Charmm, en su versión 27 [206, 207]. Para las moléculas de agua se utilizó el potencial flexible TIP3P [92]. Estos modelos fueron sometidos a diferentes procesos de relajación y equilibración utilizando el program Charmm en su versión 25b2 [208].



Durante las simulaciones se ha utilizado el algoritmo Shake [209] para mantener fijas todas las distancias con átomos de hidrógeno del subsistema clásico. Todas las dinámicas moleculares se realizaron usando el algoritmo leap-frog [20] para integrar las ecuaciones de movimiento, en el conjunto termodinámico NVT, a la temperatura adecuada en cada momento. El protocolo seguido en todos los casos fue el siguiente:

- **Equilibrado de la caja.** Manteniendo fijas las posiciones del oligonucleótido y de la molécula de histamina, se realizó una dinámica molecular de las moléculas de agua y los contraiones de sodio de 20 *ps* de duración a 300 K. Con el fin de equilibrar sólo las posiciones de las moléculas de agua y los contraiones, mantuvimos fijas las coordenadas del ADN y de la histamina, añadiendo un potencial armónico sobre las coordenadas cartesianas de los mismos, caracterizado por una constante de fuerza que depende de la masa del átomo sobre el cual se aplica.
- **Eliminación de las restricciones.** Para evitar que el sistema se desmonte debido a las tensiones que puedan quedar acumuladas en la estructura, cuando eliminamos las restricciones lo hacemos en 11 etapas, en las que la constante de fuerza armónica aplicada en el punto anterior es reducida hasta cero. Para cada etapa, el sistema es minimizado 1000 pasos con el algoritmo ABNR (Adopted Basis Newton-Raphson) [208] de Charmm. De este modo obtenemos un sistema relajado y sin restricciones a 0 K.
- **Dinámica de termalización.** Sobre el sistema a 0 K se realiza una dinámica molecular en la que vamos subiendo la temperatura de 0 a 300 K, en incrementos de 10 grados durante 10 picosegundos (*ps*). De esta forma ya tenemos el sistema listo para dejarlo evolucionar libremente.
- **Dinámicas libres.** El sistema obtenido en el punto anterior es sometido a varias dinámicas de 100 *ps*, en función de la respuesta del sistema. El tiempo mínimo de simulación fue de 500 *ps* y el máximo de 1 *ns*.
- **Minimización.** Por último, la estructura final así obtenida es minimizada de nuevo usando el algoritmo ABNR, con el fin de localizar una estructura representativa de la interacción.

Una vez que la estructura propuesta ha pasado por todas estas etapas de relajación y minimización, procedemos a calcular sus frecuencias de vibración, con el fin de obtener unos datos que podamos comparar con los datos experimentales. Para poder calcularlas necesitamos las constantes de fuerza cartesianas de la histamina, es decir, su Hessiana. Utilizando el programa GRACE [156, 157] se calcula la Hessiana de la molécula de histamina interaccionando con el ADN. Para ello se divide en dos el conjunto de las coordenadas: uno sobre el cual se va a calcular la Hessiana y otro que define el entorno, que está en equilibrio con el primero. En este caso, esta división se corresponde con la separación entre subsistema cuántico y clásico. Las constantes de fuerza cartesianas así calculadas, son transformadas a un conjunto de coordenadas internas no redundantes localmente simetrizadas, definidas de acuerdo con la metodología de Pulay [210]. Esto permite una descripción más útil de la función de energía vibracional, ya que elimina las contribuciones debidas a las translaciones y rotaciones, y hace que el resto de cálculos resulten más sencillos. A continuación, calculamos las frecuencias y las coordenadas normales utilizando el método de la matriz FG de Wilson [211].

Las frecuencias así obtenidas no son directamente comparables con los datos experimentales, lo que obliga a un tratamiento de las mismas. Para establecer una base de comparación entre teoría y experimentación, se ha procedido a realizar una identificación de las frecuencias calculadas para la histamina sola en disolución. Por ello, se ha calculado la Hessiana de la histamina en disolución acuosa, obtenida esta última de una simulación de dinámica molecular de la histamina en una caja de agua cuadrada de 30 Å de lado. Puesto que se disponen de las frecuencias experimentales ordenadas y asignadas, se reordenan las frecuencias teóricas con respecto a las mismas. A continuación, se escala el campo de fuerzas calculado para la histamina para que reproduzca los datos experimentales en la medida de lo posible, lo que se consigue utilizando dos factores de escala genéricos (0.94 para las frecuencias de vibración del imidazol, el esqueleto carbonado, el bending del amonio, el rocking del metileno y el wagging del metileno; 1.06 para las frecuencias de bending carbono-hidrógeno, el rocking del amonio y el resto de los modos de bending del metileno [212]). Este método de escalado de bajo nivel preserva la esencia del método de cálculo y hace posible la comparación directa entre teoría y experimento, eliminando las desviaciones sistemáticas que presenta. Estos mismos factores se utilizan a continuación para escalar el campo de fuerzas

obtenido para los modelos de la histamina interaccionando con el ADN.

### 4.3.3. Resultados

#### Modelo Intercalado

Todos los intentos de simular este modelo resultaron en la rotura espontánea de la molécula de histamina cuando se intentan liberar las restricciones que la mantienen congelada. Las causas de esta rotura pueden deberse a que, aunque previamente la estructura del ADN y de las moléculas de agua habían sido exhaustivamente relajadas, las fuerzas sobre la histamina continúan siendo elevadas, lo que provoca la rotura de la misma. Con el fin de intentar corregir esto, se realizaron simulaciones de dinámica molecular a 300 K manteniendo únicamente congeladas las coordenadas internas de la molécula de histamina. Con esta simulación se pretendía relajar la estructura del ADN alrededor de la histamina. Esta estrategia tampoco dio resultado, observándose el desplazamiento de la molécula de histamina hacia el exterior de la doble hélice, por lo que el modelo intercalado parece no representar una posible interacción de la molécula de histamina con el ADN. Al mirar la bibliografía [205] y algunas estructuras cristalinas asociadas del Protein Data Bank (PDB) (códigos 108D [213], 1AL9 [214], 1FN1 [215], 1KCI [216]) pudimos constatar que las moléculas que interaccionan de esta manera con el ADN presentan varios anillos conjugados que hacen que la interacción se dé con cuatro bases nitrogenadas, en lugar de con dos, que es como lo hace la histamina.

#### Modelo N2O2

El modelo N2O2 superó también todo el proceso de relajado y simulación. Sin embargo, la situación final a la que se llegó resultó ser sustancialmente distinta de la situación inicial. En este modelo, el anillo de imidazol no establece ningún contacto con sitios reactivos del ADN, disponiéndose perpendicularmente al eje de la doble hélice y apuntando hacia el disolvente, de una forma tal que llega a interaccionar de forma intramolecular con el grupo amonio de su cola. La figura 4.38 muestra la disposición de la molécula de histamina en la estructura minimizada final. En esta figura puede apreciarse cómo el anillo de imidazol no interacciona de modo directo con el ADN. La interacción entre la molécula de

histamina y el ADN está basada en la interacción por el grupo amonio, el cual forma puentes por dos de sus tres hidrógenos. Una de estas uniones por puente de hidrógeno se produce con una citosina ( $2.87 \text{ \AA}$ ), pero con un nitrógeno responsable de formar un puente de hidrógeno con su base complementaria. Esto produce la rotura de este emparejamiento específico C-G y un gran daño a la estructura de la doble hélice. Este dato no refleja la observación experimental de que la estructura del ADN permanece básicamente inalterada. Así mismo, tampoco se refleja la observación experimental del espectro de dicroísmo circular que indica que el anillo aromático sufre algún tipo de interacción que es capaz de deformarlo. La otra interacción se produce con un átomo de oxígeno de una ribosa ( $1.88 \text{ \AA}$ ). El análisis de la dinámica molecular muestra una clara evolución del sistema, por lo que la estructura obtenida tras la minimización es probablemente representativa de un estado intermedio y no de un mínimo global del sistema.

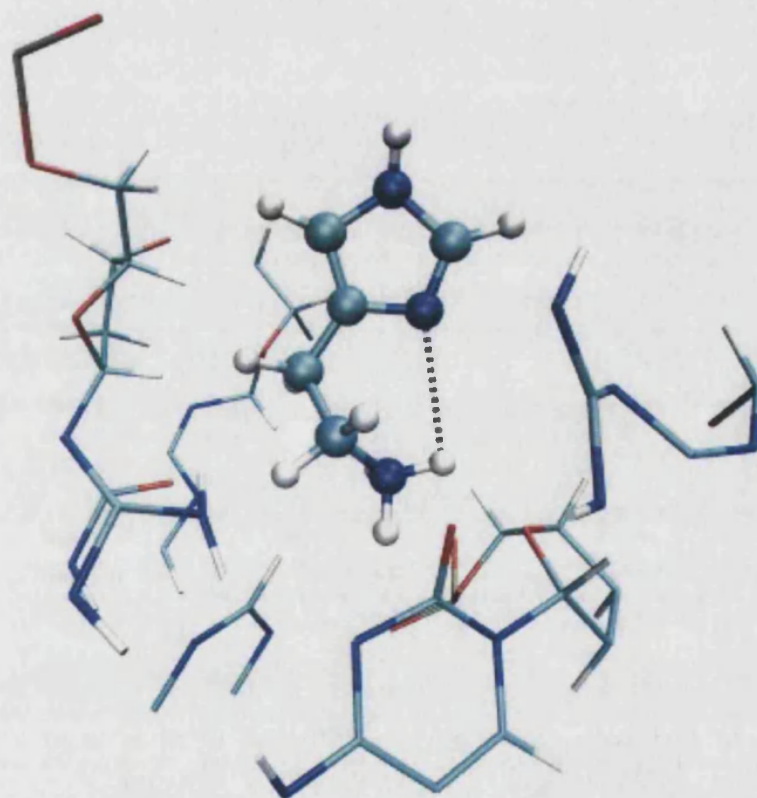


Figura 4.38: Representación esquemática de la estructura final alcanzada en el caso del modelo N2O2. Con línea punteada, la interacción intramolecular observada. Para simplificar la figura, se ha representado sólo la zona inmediatamente adyacente a la molécula de histamina.

El resultado del análisis de las frecuencias de vibración calculadas para este modelo está mostrado en las tablas 4.5 y 4.6 (ver apartado siguiente). Estas tablas resumen las frecuencias de vibración más relevantes observadas en los espectros para la histamina en agua natural y deuterada, respectivamente, y las mismas frecuencias observadas para las disoluciones de histamina y ADN. A continuación, se han calculado las mismas frecuencias de vibración en los modelos teóricos, tanto en agua como en los modelos de interacción con el ADN. Como puede observarse, al pasar de la disolución acuosa a mezclas con ADN, algunas bandas sufren desplazamientos, debido precisamente a la interacción entre la histamina y el ADN. Si observamos los desplazamientos calculados para el modelo N2O2, vemos que muestra fuertes desviaciones con respecto a los desplazamientos observados experimentalmente. La tendencia de los desplazamientos no es predicha en la mayoría de casos, así como tampoco lo son los valores absolutos. Estos datos confirman la conclusión que puede extraerse del análisis estructural: este modelo parece no ser representativo de la interacción entre el ADN y la molécula de histamina.

Tabla 4.5: Correlación entre los números de ondas experimentales y calculados (en  $\text{cm}^{-1}$ ) de las bandas de histamina observadas en el espectro Raman de disoluciones de histamina y ADN-histamina en agua natural.

Datos Experimentales		Datos Calculados		
Histamina	ADN-Histamina	Histamina	Modelo N2N3	Modelo N2O2
1574	1575	1598	1621	1630
1469	1462	1465	1428	1422
1358	1363	1419	1466	1422
1326	1332	1299	1314	1285
1158	1153	1155	1138	1165
646	648	673	675	664

### Modelo N2N3

En este modelo y después de todo el proceso de simulación, la histamina mantiene aproximadamente la misma posición que al inicio. Se mantiene a lo largo del

Tabla 4.6: Correlación entre los números de ondas experimentales y calculados (en  $\text{cm}^{-1}$ ) de las bandas de histamina observadas en el espectro Raman de disoluciones de histamina y ADN-histamina en agua deuterada.

Datos Experimentales		Datos Calculados		
Histamina	ADN-Histamina	Histamina	Modelo N2N3	Modelo N2O2
1568	1570	1586	1616	1624
1471	1465	1444	1439	1407
1374	1375	1320	1331	1324
1238	1242	1244	1258	1201
1099	1095	1144	1156	1134
836	834	923	915	914
648	649	668	669	659

surco menor, interaccionando por el grupo amino y por el anillo de imidazol. En la figura 4.39 se muestra la estructura final alcanzada. La distancia entre el átomo de nitrógeno desprotonado del anillo de imidazol y el  $\text{NH}_2$  (marcado como N2 en la figura) de la guanina es de 3.16 Å. El grupo amonio de la cola interacciona a través de dos átomos de hidrógeno con las posiciones N3 de los residuos cercanos de guanina y adenina (2.19 y 2.49 Å, respectivamente).

El anillo de imidazol también sufre una alteración de sus parámetros geométricos. La tabla 4.7 resume los cambios geométricos más relevantes de la molécula de histamina, con especial interés en el anillo de imidazol (la numeración utilizada es la misma de la figura 4.36). Como puede apreciarse en esta tabla, las distancias correspondientes a los enlaces carbono-carbono y carbono-nitrógeno del anillo de imidazol son las que muestran mayores desviaciones con respecto a las mismas distancias calculadas para la histamina en disolución acuosa. El análisis de los ángulos dihedros muestra que el plano del anillo de imidazol está ligeramente deformado. El hecho de que el anillo sufra algún tipo de deformación coincide con las observaciones experimentales realizadas sobre los espectros de dicroísmo circular, lo que nos indica que este modelo cumple otra de las condiciones observadas en los espectros para representar la interacción entre el ADN y la histamina.

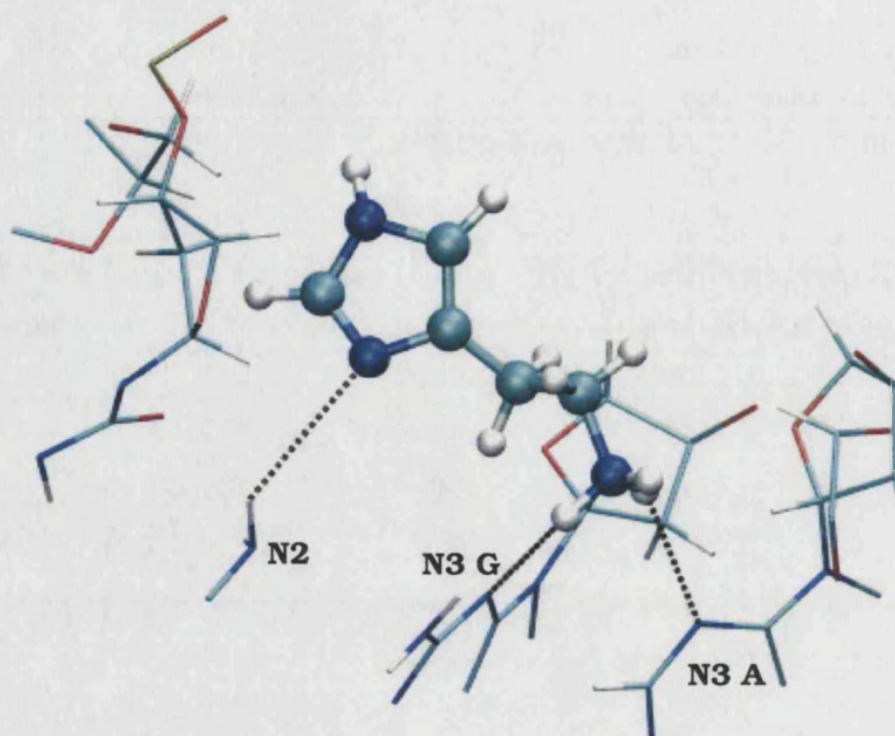


Figura 4.39: Representación esquemática de la estructura final alcanzada en el caso del modelo N2N3. Con línea punteada se han marcado las interacciones con el N2 y con los N3 (el de guanina marcado con “G” y el de adenina con “A”). Para simplificar la figura, se ha representado sólo la zona inmediatamente adyacente a la molécula de histamina.

Además de la estructura final minimizada, hemos estudiado también estas interacciones durante el nanosegundo previo de dinámica molecular (ver metodología), con lo que podremos observar las variaciones de las distancias más significativas con el tiempo. La figura 4.40 (a) muestra la distancia de los tres hidrógenos del grupo amino de la histamina con el nitrógeno N3 de guanina (el más cercano). Como puede apreciarse en la figura, a tiempos pequeños el sistema evoluciona ligeramente hasta alcanzar la situación (alrededor de 400 ps) en la que ya permanece estable durante el resto de la simulación. Esto es común en este tipo de cálculos y corresponde a la fase de equilibración. Entrando en el análisis de las distancias, llama la atención que todos los hidrógenos interaccionan en algún momento directamente con el N3. Esto implica que el grupo amino está rotando sobre el eje del enlace carbono-nitrógeno durante toda la simulación, de forma un tanto caótica al principio, pero totalmente regular en la segunda mitad del nanosegundo de simulación, con un periodo aproximado de 100 ps. Una gráfica similar

Tabla 4.7: Parámetros geométricos seleccionados (distancias de enlace en Å, ángulos y dihedros en grados) calculados para la histamina en disolución acuosa e interaccionando con el ADN en el modelo N2N3.

<b>Dist. de enlace</b>	<b>Histamina</b>	<b>N2N3</b>
<i>C11 – C17</i>	1.41	1.40
<i>C17 – N15</i>	1.39	1.44
<i>N15 – C13</i>	1.40	1.43
<i>C13 – N12</i>	1.35	1.33
<i>N12 – C11</i>	1.40	1.41
<i>N1 – C5</i>	1.47	1.49
<i>N1 – H2</i>	1.04	1.05
<i>N1 – N3</i>	1.03	1.02
<i>N1 – N4</i>	1.03	1.03
<b>Ángulo</b>	<b>Histamina</b>	<b>N2N3</b>
<i>C11 – C17 – N15 – C13</i>	–0.9	–0.8
<i>C17 – N15 – C13 – N12</i>	1.1	8.4
<i>N15 – C13 – N12 – C11</i>	–0.8	–12.4
<i>C13 – N12 – C11 – C17</i>	0.3	11.7
<i>C13 – N12 – C11 – C8</i>	0.4	23.4

se encuentra para las distancias con el otro grupo N3 de adenina, aunque a distancias más largas.

En la figura 4.40 (b) se muestra la distancia entre el nitrógeno desprotonado del anillo de imidazol y uno de los nitrógenos del grupo NH<sub>2</sub>. Al igual que sucede en el caso anterior, al principio de la simulación la distancia es muy corta y aumenta ligeramente, hasta que se alcanza un valor sobre el que oscila durante el resto de la simulación. El valor promedio de la distancia N-H calculado para esta parte final de la simulación es de 3.17 Å, prácticamente el mismo valor que el medido en la estructura minimizada, aunque en algunas estructuras la distancia llega a aumentar hasta alrededor de los 3.6 Å y disminuir hasta 2.6 Å.

Las tablas 4.5 y 4.6 muestran las frecuencias de vibración más relevantes calculadas para la histamina en agua natural y deuterada, respectivamente, y la corre-



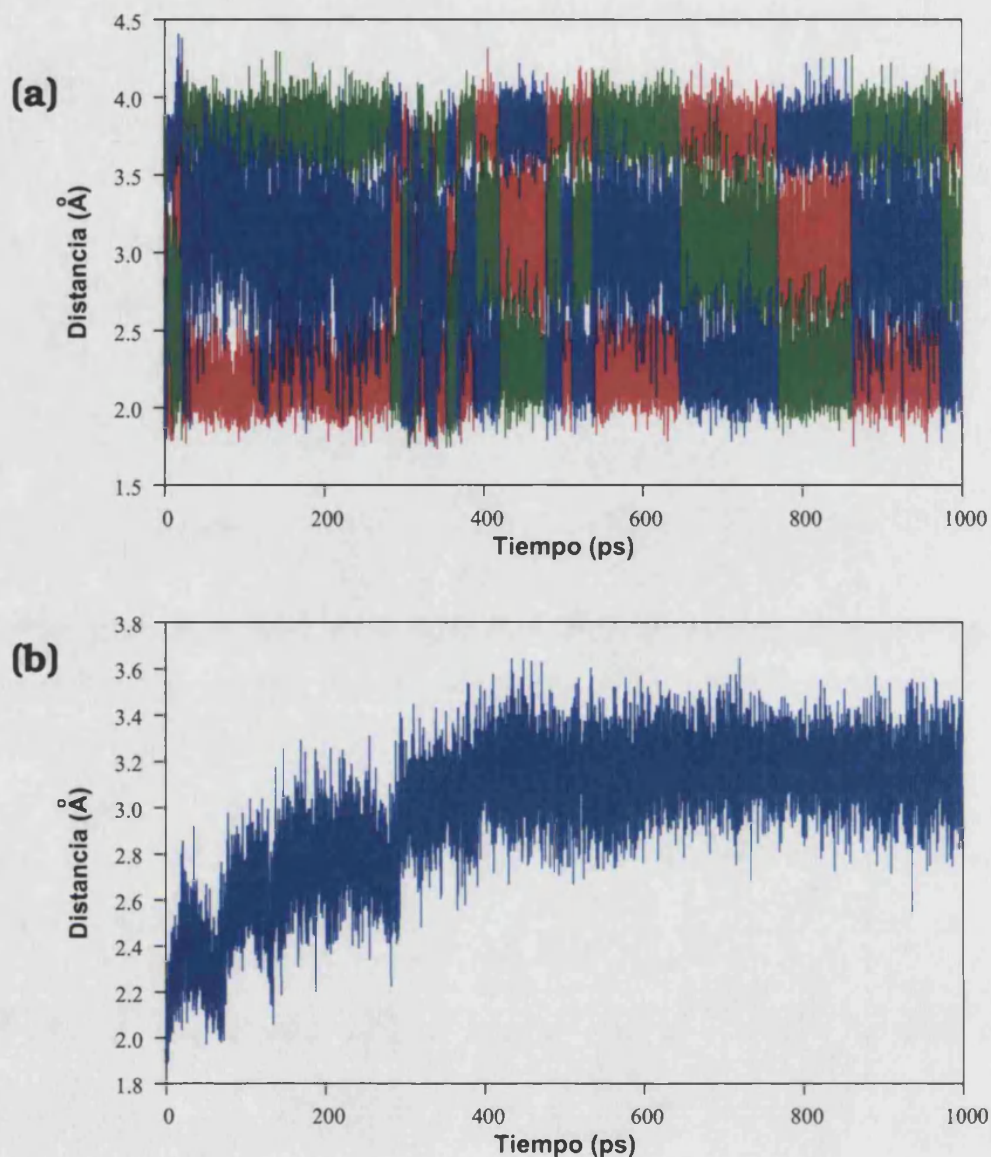


Figura 4.40: Distancias obtenidas durante una simulación de un nanosegundo de duración. **(a)** Distancia (en Å) de los tres hidrógenos del grupo amino de la histamina al nitrógeno N3 de guanina en función del tiempo. **(b)** Distancia (en Å) del nitrógeno desprotonado del anillo de imidazol de la histamina al grupo  $\text{NH}_2$  de guanina en función del tiempo.

lación existente con los datos experimentales. En un primer análisis, los resultados vibracionales obtenidos para el modelo N2N3 indican que se predice correctamente el signo de los desplazamientos de muchas de las frecuencias medidas para las bandas de histamina. La única excepción es la banda de  $1099\text{ cm}^{-1}$  del derivado deuterado, que experimentalmente disminuye con la adición de ADN, mientras que el dato calculado aumenta. Si tenemos en cuenta que esta frecuencia está asociada al grupo amonio, este resultado sugiere que la interacción del grupo amonio

de la histamina con el ADN debería ser más intensa de lo que predice el modelo N2N3. Esta tendencia aparece correctamente representada sin embargo por el modelo N2O2, donde el grupo amino forma una interacción intramolecular con el anillo. Este resultado parece pues indicar la necesidad de tratar también a nivel mecano-cuántico el átomo aceptor para reproducir correctamente esta característica del espectro experimental.

A un nivel de discusión más detallado, podemos analizar los valores absolutos de los desplazamientos de las frecuencias. En el modelo N2N3, los valores calculados son, normalmente, mayores que los observados experimentalmente. Este hecho indica que la verdadera interacción es menos intensa que la predicha de forma teórica, ya que la estructura de la que disponemos está a 0 Kelvin, donde las interacciones están optimizadas. Es interesante discutir otra fuente de desplazamiento de las bandas calculadas que no puede ser directamente asignables a la interacción ADN-histamina. Cuando aplicamos los factores de escala para la histamina en disolución, también observamos importantes desviaciones entre los valores calculados y los experimentales [212], lo que puede estar influyendo en los desplazamientos observados. Otro posible factor de discrepancia radica en que toda medida experimental representa un promedio de microestados, mientras que de forma teórica sólo hemos estudiado uno de ellos. No obstante las diferencias, este modelo cumple con prácticamente todas las observaciones experimentales, por lo que posiblemente representa adecuadamente una forma de interacción de esta molécula con el ADN.

#### 4.3.4. Conclusiones

Basándonos en el análisis de los espectros experimentales obtenidos de mezclas de ADN e histamina, se han propuesto tres modelos para la interacción de estas dos moléculas. Un modelo denominado intercalado, en el que el anillo de imidazol se sitúa entre dos pares de bases, y otros dos modelos correspondientes a interacciones a lo largo de surco menor con grupos reactivos de bases nitrogenadas específicas, los cuales hemos denominado N2N3 y N2O2.

Después de someter a estos modelos a un proceso de relajación/simulación, sólo los dos últimos han dado lugar a estructuras estables. Esto nos lleva a pensar que la interacción de la histamina con el ADN no puede ser adecuadamente repre-

sentada mediante la intercalación del anillo de imidazol entre dos bases consecutivas. Las estructuras estables se corresponden a interacciones por el surco menor, lo que está de acuerdo con las observaciones experimentales de desplazamientos en las bandas asociadas a grupos reactivos presentes en dicho surco. De ambas estructuras, la N2N3 parece representar mejor las observaciones experimentales, ya que presenta interacciones con el ADN tanto por el anillo de imidazol como por el grupo amino. El hecho de que estas interacciones se mantengan estables durante la simulación no hace sino reforzar la hipótesis de que esta estructura parece representar adecuadamente la interacción ADN-histamina. La estructura N2O2 sólo interacciona por el grupo amino, deformando la estructura de doble hélice del ADN, lo que contradice las observaciones experimentales en las que la estructura del ADN permanece básicamente inalterada y el anillo de imidazol interacciona también con el ADN.

Mediante una simulación de la molécula de histamina en agua, hemos podido realizar un análisis comparativo de las vibraciones en ambos entornos. Para ello se han calculado de forma teórica las constantes de fuerza de los modelos teóricos. A partir de estas constantes de fuerza, se ha realizado un cálculo de las frecuencias de vibración. Con el fin de unificar los resultados teóricos con los experimentales se ha procedido a escalar las frecuencias de vibración del modelo acuoso utilizando como referencia las experimentales. En prácticamente todas las bandas del modelo N2N3, se predice de forma teórica el signo del desplazamiento de las mismas al pasar de disolución acuosa a disoluciones que contienen ADN. La única excepción está relacionada con una banda asociada al grupo amino aunque la descripción QM/MM que hemos realizado del sistema podría estar relacionada con este hecho. En el caso del modelo N2O2 estas predicciones no son tan acertadas, lo que confirma las conclusiones obtenidas del análisis geométrico. El valor absoluto del desplazamiento de las bandas no se reproduce cuantitativamente para ningún modelo, pero existen varios factores que afectan al mismo, factores que no son asignables directamente a la interacción del ADN con la histamina. Los datos experimentales son el resultado de realizar una observación sobre un conjunto de microestados, mientras que de forma teórica sólo tenemos acceso a uno de ellos que es, además, un mínimo de energía (es decir, una estructura que presenta interacciones muy fuertes).

## 4.4. Conclusiones Generales

Como hemos podido comprobar en tres diferentes problemas, el medio en el que un proceso químico tiene lugar influye de modo sustancial en el mismo. La forma que tiene de hacerlo varía en función del proceso que se desarrolle en su seno y de las propiedades del medio.

La metodología híbrida QM/MM, basada en la división del sistema total en dos partes que interaccionan entre sí, ha demostrado ser una herramienta muy eficaz a la hora de estudiar los procesos químicos que tienen lugar en medios condensados. Una de sus principales ventajas es la posibilidad de estudiar de forma muy precisa procesos químicos que tienen lugar en sistemas con un elevado número de átomos. Esta peculiaridad, que es justamente la que poseen los medios condensados, hace que, en la práctica, sea imposible abordar el estudio de estos sistemas desde un punto de vista mecano-cuántico. Esto es debido a que para realizar dicho estudio, sería necesario disponer de una capacidad de cálculo que no existe actualmente. Aunque la informática avanza con pasos de gigante, aún está muy lejos el día en que este estudio sea factible. Hasta ese día, la metodología híbrida QM/MM es una de las opciones más prácticas y realistas que existen. El efecto del medio queda introducido en el cálculo de la función de onda a través de un conjunto de cargas y parámetros clásicos. De esta forma, se tiene en cuenta el efecto polarizante del medio sobre la densidad de carga del subsistema cuántico. Esta densidad de carga es usada a su vez para provocar una respuesta en el medio. Esta metodología ha sido implementada en numerosos programas, lo que hace que actualmente exista la posibilidad de realizar toda clase de simulaciones, utilizando la superficie de energía potencial que describe: Dinámicas Moleculares, Monte Carlo, localización de puntos singulares, etc. Aunque en su implementación original esta metodología utilizaba hamiltonianos semiempíricos (AM1, PM3, etc.), el aumento de la capacidad de cálculo actual hace accesibles actualmente hamiltonianos de mayor calidad, como puedan ser los *ab initio* o DFT. La inclusión de estos hamiltonianos permite obtener energías y geometrías mejores, lo que redundará en una mejor descripción del proceso de estudio. Pero las mejoras no sólo han sido realizadas en el subsistema cuántico. Los campos de fuerza usados en mecánica clásica han sido depurados para representar mejor todo tipo de interacciones.

La influencia del medio la hemos podido comprobar en dos aspectos esen-

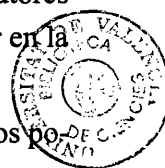
ciales del proceso químico: su energía y su dinámica. Con respecto a la primera, hemos podido establecer cómo el medio determina el potencial de fuerza media que actúa sobre el sistema estudiado. En el caso del cloruro de metilo y para la curva de disociación de la molécula neutra, se observan cambios cuyo responsable es la presencia del disolvente. La distancia de enlace de equilibrio para la molécula neutra aumenta, así como la carga negativa sobre el cloro y, por tanto, el momento dipolar. Estos efectos pueden explicarse si tenemos en cuenta que el momento dipolar de la molécula de cloruro de metilo interacciona con el campo eléctrico creado por el disolvente como respuesta al mismo. Para la disociación del anión radical también se observan cambios al pasar de fase gas a disolución. Si en fase gas el mínimo absoluto de energía (el complejo entre el anión cloruro y el radical metilo) tiene una simetría  $C_{2v}$ , al pasar a un medio acuoso esto ya no sucede así. Una simulación de dinámica molecular muestra que la estructura de este complejo no está bien definida, presentando fluctuaciones significativas respecto a la simetría  $C_{2v}$ . El grado de transferencia de carga observado al pasar de vacío a disolución acuosa en este complejo también aumenta, lo que es indicativo de una fuerte interacción con el disolvente.

En el trabajo realizado sobre el equilibrio conformacional del 1,2-dicloroetano (DCE) se aprecia muy bien la influencia del medio. Si comparamos los potenciales de fuerza media, calculados para la rotación a lo largo del enlace C-C del DCE, en vacío, en disolución acuosa y en la enzima, podemos observar qué efecto tiene cada uno de estos medios sobre el equilibrio conformacional. En vacío, existen dos conformeros *gauche* distintos y uno *trans* que son mínimos energéticos. El conformero más estable es el *trans*, puesto que es el que minimiza la interacción estérica entre los átomos de cloro. Al pasar a disolución acuosa, se observan cambios importantes. Ahora los conformeros *gauche* y *trans* son prácticamente isoenergéticos, siendo este cambio inducido por el medio: los medios polares interaccionan favorablemente con cargas y dipolos, por lo que los conformeros *gauche* que tienen un momento dipolar distinto de cero interaccionan con el disolvente mejor que el conformero *trans*. Pero es al estudiar el equilibrio conformacional en el centro activo de la enzima Haloalcano deshalogenasa de *Xanthobacter Autotrophicus* (DhlA) cuando se observan los cambios más importantes. Los conformeros *gauche* son ahora mínimos absolutos de energía libre, ya que el conformero *trans* es un máximo de energía libre, es decir, se encuentra desestabilizado. La compa-

ración de los potenciales de fuerza media obtenidos en otros medios nos indica que es la enzima la que está desestabilizando este confórmero del DCE, que sí existe en vacío y en disolución, y está favoreciendo los confórmeros *gauche*. Es más, ahora estos confórmeros no son equivalentes, ya que uno de ellos presenta menor energía que el otro. Esto se debe a que el centro activo de la enzima es un medio no homogéneo y es capaz de favorecer un confórmero frente al otro. Lo que estamos viendo en este comportamiento es que las enzimas seleccionan de forma adecuada la conformación del sustrato para que la reacción tenga lugar.

Por último, hemos analizado una influencia similar al estudiar la reacción de deshalogenación catalítica que tiene lugar en el interior de la Dh1A. Tal y como hemos mostrado, el perfil energético de la reacción se modifica al pasar de disolución acuosa al interior de la enzima. La energía libre de activación es más pequeña en el caso de la enzima, lo cual es un reflejo de su poder catalítico. Utilizando campos eléctricos orientados de forma adecuada, la enzima favorece el proceso de  $S_N2$ , estabilizando preferentemente el estado de transición frente a los reactivos. En este sentido, estamos de acuerdo con la propuesta de algunos autores de que uno de los factores principales de la catálisis enzimática debe residir en la estabilización electrostática del estado de transición.

Con respecto al segundo aspecto, la dinámica del sistema, también hemos podido comprobar de qué forma el medio influye en la misma. En el cloruro de metilo, los efectos dinámicos juegan un papel fundamental a la hora de determinar qué mecanismo de reacción seguirá nuestro sistema al disociarse. Los estudios energéticos muestran que existe un pequeño mínimo de energía en el potencial de fuerza media de disociación del cloruro de metilo, un mínimo que justifica la existencia de un complejo débil entre el anión cloruro y el radical metilo. Sin embargo, hemos podido comprobar cómo es el medio el que realmente determina la formación o no de este complejo: si al recibir un electrón el cloruro de metilo es capaz de transferir al disolvente su exceso de energía potencial de forma efectiva, el sistema queda temporalmente atrapado en ese mínimo que mencionábamos antes. Para que esta transferencia tenga lugar de forma efectiva, hemos podido comprobar que es necesario la existencia de puentes de hidrógeno entre el disolvente y el átomo de cloro. Este efecto no aparece diferenciado en los estudios de energía libre que contempla el resultado promedio, pero determina el mecanismo de reacción, por lo que su estudio no debe ser despreciado.



También hemos realizado un estudio de la dinámica de la reacción  $S_N2$  en la enzima Dh1A. Para ello, hemos trazado trayectorias de reacción desde el estado de transición, para poder observar los cambios que ocurren en el sistema. El primer dato relevante es el resultado obtenido para el coeficiente de transmisión. El valor del coeficiente de transmisión en la enzima es mayor que el obtenido para la misma reacción en disolución, lo que indica que la enzima favorece el proceso reactivo también mediante efectos dinámicos. Si estudiamos como cambian algunos parámetros geométricos de la enzima en función del tiempo, vemos que alrededor de 2 ps antes de que se produzca la reacción ya se están produciendo cambios que son totalmente determinantes para que ésta tenga lugar. Uno de los efectos más destacables lo constituyen los puentes de hidrógeno que forma el oxígeno que no realiza el ataque nucleofílico del Asp124 con el aminoácido Glu56 y el grupo NH de su enlace peptídico con el aminoácido siguiente. En disolución acuosa, ambos oxígenos del ión acetato pierden puentes de hidrógeno para poder realizar el ataque nucleofílico sobre el 1,2-dicloroetano. Sin embargo, hemos comprobado que cuando la reacción se produce en la enzima, el oxígeno que no realiza el ataque presenta dos puentes de hidrógeno. Esto provoca que este oxígeno tenga su posición fijada, ayudando al correcto posicionamiento del oxígeno nucleofílico, que tiene lugar por giro alrededor del enlace CB-CG. El oxígeno que realiza el ataque nucleofílico se encuentra en ese momento muy desolvatado, lo que le facilita el ataque.

El estudio de la dinámica vibracional de la histamina nos ha permitido poner a punto una metodología muy prometedora para predecir modelos de interacción desde el uso conjunto de datos experimentales y simulaciones computacionales. De forma experimental, se han realizado los espectros de vibración de la histamina, tanto en disolución acuosa (natural o deuterada) como en mezclas con ADN. La comparación de estos espectros da lugar a una serie de desplazamientos en las bandas, que se asocian a las interacciones del ADN con la histamina. Realizando el mismo análisis vibracional para los modelos teóricos propuestos, se ha observado que el modelo denominado N2N3 es capaz de predecir el desplazamiento de prácticamente todas las bandas significativas del espectro. Esto nos lleva a pensar que esta estructura representa un posible modelo de la interacción real que tiene la histamina con la molécula de ADN.

## Capítulo 5

# Perspectivas y Continuidad

En el año 2024 Jonh Vines, un neurocirujano de Boston, ejecutó una Copia<sup>a</sup> completamente consciente de él mismo en una tosca Realidad Virtual. Después de menos de tres hora de tiempo real [...] las primeras palabras de la primera Copia fueron: “Esto es como estar enterrado vivo. He cambiado de opinión. Sácame de aquí”.

*Ciudad Permutación*  
*Greg Egan (1994)*

---

<sup>a</sup>En el contexto del libro puede cambiarse la palabra Copia por Simulación

**T**odo el trabajo realizado en esta tesis no hace sino abrir nuevos caminos para realizar futuros trabajos, tanto a nivel metodológico como a nivel de resultados. A continuación, vamos a fijarnos en detalle sobre todos aquellos aspectos del presente trabajo que pueden ser mejorados y/o completados.

### Metodología

La metodología QM/MM ha sido y es ampliamente aplicada a multitud de sistemas. La principal ventaja de esta metodología es que hace accesible el estudio de sistemas con un número elevado de átomos, como es el caso de disoluciones acuosas y medios enzimáticos, gracias a la división que hace del sistema total. Los resultados obtenidos al usar esta metodología son muy satisfactorios, pero su aplicación tiene limitaciones. Una de las limitaciones más importantes es el método de cálculo usado para representar al subsistema QM. Es bien sabido que los hamiltonianos semiempíricos (AM1, PM3, etc) no reproducen adecuadamente



la superficie de energía potencial de todos los sistemas e incluso están bien documentados sus fallos [217–219]. Esto obliga a la reparametrización en muchos casos, un procedimiento tedioso que no siempre produce los resultados esperados. Por lo tanto, esta metodología es susceptible de mejoras, algunas de las cuales están siendo llevadas a cabo en nuestro grupo de investigación.

Como ya hemos mencionado antes, una de las primeras necesidades de mejora radica en la calidad de la función de onda del subsistema cuántico. Esto puede conseguirse mediante la implementación de hamiltonianos *ab initio* o DFT. Originalmente, la metodología QM/MM fue desarrollada para hamiltonianos semiempíricos por las limitaciones de cálculo. Hoy en día, la potencia de cálculo es más elevada, por lo que es interesante invertir un poco más de tiempo para conseguir mejores resultados. En esta tesis ya se ha usado una implementación DFT/MM, en el trabajo realizado sobre el cloruro de metilo. Cuando se desarrolló esta aplicación, el tiempo de cálculo de la función de onda era muy elevado, por que lo que sólo se implementó la posibilidad de realizar cálculos en disolución. En la actualidad, en nuestro grupo de investigación se están implementando hamiltonianos *ab initio* y DFT junto a motores de dinámica molecular de la calidad de DYNAMO o CHARMM. La inclusión de estos hamiltonianos, permitirá estudiar procesos hasta ahora no accesibles a los métodos semiempíricos, como por ejemplo el estudio de sistemas con iones metálicos en los centros activos enzimáticos.

Otra posible vía de mejora que se está estudiando en nuestro grupo es la de usar correcciones a los valores de energía semiempíricos [220]. Hasta ahora, siempre se habían realizado correcciones de los valores de energía obtenidos mediante la realización de cálculos puntuales a niveles de cálculo elevado sobre sistemas modelo reducidos. Aunque la energía obtenida es adecuada, no ocurre lo mismo con la geometría, al depender esta última de una energía que no está corregida. Para solucionar este problema se ha implementado un método de corrección de la energía basado en el uso de “splines”. Este método corrige la energía *durante* la realización del cálculo cuántico. Puesto que los splines son funciones derivables, podemos también corregir las fuerzas, lo que redundará en una mejor geometría. De esta forma podemos obtener energías y geometrías corregidas con elevados niveles de cálculo, sin un aumento aparente del tiempo de cálculo (pero con una inversión inicial para preparar los splines).

Hasta ahora hemos hablado de la parte cuántica, pero también se puede me-

jorar la respuesta del subsistema clásico. Mientras que la densidad de carga de la parte cuántica se polariza debido a la presencia del medio, no ocurre habitualmente lo mismo en la parte clásica. En este sentido, se han realizado algunas propuestas, basadas en el empleo de cargas polarizables que responden a la densidad de carga del subsistema QM [221–223].

Por último, es interesante mencionar que en la actualidad existen ya lo que se denomina *Ab Initio Molecular Dynamics* [224]. En esta metodología, que también se conoce como dinámicas de Carr-Parinello, *todos* los átomos del sistema son simulados a nivel de mecánica cuántica. Aunque es sin duda la opción a priori más correcta, también es la más costosa computacionalmente, y no por poco. Con la potencia de cálculo actual sólo es posible simular unos pocos picosegundos de sistemas formados por unos pocos centenares de átomos. Es indudable que es una cuestión de tiempo: conforme aumente la potencia de cálculo, hará más accesible el uso de esta metodología. Sin embargo, la demanda computacional es tan elevada que esto no ocurrirá a corto plazo, por lo que sigue siendo fundamental mejorar los actuales métodos QM/MM.

### Sistemas Estudiados

El trabajo que realizamos sobre el cloruro de metilo está finalizado, pero no así el estudio de la transferencia electrónica sobre otros sistemas. En nuestro grupo, como se ha mencionado antes, se está trabajando en implementar la metodología de *umbrella sampling* y WHAM junto con hamiltonianos de un nivel computacional más elevado que los semiempíricos, en concreto a nivel HF y DFT. Esto nos permitirá estudiar el proceso de reducción disociativa de una forma mucho más precisa. Podremos utilizar moléculas de agua flexibles, cajas de simulación más grandes, los últimos funcionales para representar la parte cuántica y un mayor abanico de condiciones de simulación. Las primeras pruebas se han llevado a cabo con la molécula de nitroclorometano ( $\text{ONCH}_2\text{Cl}^-$ ), un sistema interesante porque es el ión radical nitroderivado conjugado más simple, lo que nos va a permitir usarlo como sistema modelo en el estudio de la reducción disociativa de nitroderivados aromáticos. Utilizando esta metodología, ya hemos producido las primeras cajas de simulación equilibradas.

Queda muchísimo trabajo que hacer sobre el problema de la catálisis enzimática. El problema del origen de la catálisis enzimática no está resuelto. Aunque

parece evidente que los factores electrostáticos son fundamentales en algunos casos, todavía queda averiguar si esta conclusión es generalizable. Es necesario, por tanto, estudiar más sistemas enzimáticos. En nuestro grupo ya se están realizando estudios sobre numerosas enzimas, cada una con su problemática característica: tamaño de la enzima, implicación de iones metálicos en el mecanismo de reacción, efecto túnel en las transferencias de protones, etc.

Sobre la enzima Dh1A, que ha sido el objeto de estudio en la presente tesis también queda trabajo por hacer. En esta tesis se ha estudiado de forma bastante exhaustiva la primera etapa de la reacción que tiene lugar en su interior. Queda pendiente, por tanto, realizar el estudio sobre la segunda etapa de la misma, la hidrólisis del éster. Nosotros ya hemos realizado las primeras exploraciones de la superficie de energía potencial utilizando la combinación de programas GRACE/CHARMM. Los resultados obtenidos hasta el momento para esta hidrólisis parecen indicar la existencia de un mecanismo en dos etapas. Sin embargo, la exploración realizada aún no está completada. Al igual que hemos hecho en la primera etapa, habrá que trazar los potenciales de fuerza media para la hidrólisis del éster. También hay que realizar un estudio dinámico de la misma, utilizando procedimientos similares a los empleados en la presente tesis, con la consideración de que en esta reacción sí que se produce la rotura y formación de enlaces con átomos de hidrógeno, por lo que hay que tener en cuenta el efecto túnel.

El trabajo realizado sobre las interacciones del ADN nos muestra un abanico de vías de trabajo para el futuro. En primer lugar, sería muy interesante considerar varias estructuras a la vez y promediar las frecuencias. Puesto que las medidas experimentales son el reflejo de un conjunto de microestados, de esta forma conseguiríamos producir unos resultados más comparables con los datos experimentales. La inclusión de hamiltonianos *ab initio* en el programa CHARMM, un procedimiento que se está llevando a cabo en nuestro grupo, nos permitirá mejorar los resultados obtenidos, proporcionándonos mejores constantes de fuerza para la molécula de histamina, lo que se traducirá en frecuencias de vibración mejores. Otra vía de trabajo que se abre es la del estudio de sistemas de interacción conocida con el ADN. Los resultados de un estudio como este nos permitirían refinar nuestra metodología de cálculo, para producir simulaciones lo más realistas posibles. Por último, tenemos como objetivo el poder calcular la energía libre de unión (ó *binding*),  $\Delta G_{bind}$ , de la molécula objeto de estudio con el ADN. La obtención

de este valor nos permitiría discernir estructuras entre sí, independientemente de las frecuencias de vibración que posean, ya que dispondríamos de una medida de la interacción entre la molécula objetivo y el ADN.

### **Vías Futuras**

A nivel personal y pensando en un futuro lejano (o no tan lejano, ya que el avance científico es exponencial) el objetivo final para mí sería el poder simular de forma adecuada cualquier tipo de sistema químico. La cita de este capítulo ha sido elegida de un libro en el que las simulaciones se realizan de personas completas, con sus órganos vitales representados por parámetros semiempíricos y la interconexión entre las neuronas simuladas a partir de un escáner cerebral, por lo que las simulaciones tienen conciencia de sí mismas. Aunque todavía está lejos el día en el podamos simular todos los órganos de una ser humano, incluido su cerebro, el aumento de la potencia de cálculo y de la capacidad de almacenamiento de datos hace que cada día podamos simular sistemas más grandes y con mayor precisión. Pero sin perder la perspectiva: la simulación como tal no es el objetivo principal, sino que es la herramienta para entender y racionalizar el proceso químico estudiado. Estamos en el principio del camino, pero aún queda mucho de él por recorrer.



# Capítulo 6

## Programas empleados

“Dave –dijo HAL–. No comprendo por qué me está haciendo esto... Tengo un gran entusiasmo por la misión... Está usted destruyendo mi mente.”

*2001: una odisea espacial*  
*Arthur C. Clarke (1968)*

### 6.1. Programas de Cálculo

#### Gaussian 98 (rev A.7)



**Categoría:** Comercial

**Autor/es:** M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, Jr., R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E. S. Replogle and J. A. Pople.

**Descripción:** Gaussian es un programa de cálculo mecánico cuántico que implementa los principales métodos de cálculo que existen hoy en día, tan semiempíricos (AM1, PM3, MNDO, DFT) como *ab-initio* (HF, MP2, CC, etc.). Implementa además unos buenos algoritmos de localización de puntos singulares, así como procedimientos para el análisis de los datos obtenidos.

**URL:** <http://www.gaussian.com>

## Dynamo

**Categoría:** Freeware

**Autor/es:** Copyright © 2000 CEA/CNRS. Martin J. Field y colaboradores.

**Descripción:** DYNAMO es una librería de FORTRAN 90 que implementa los algoritmos más usados en el campo de las simulaciones moleculares. Permite, entre otras cosas, la realización de dinámicas moleculares clásicas (usando el campo de fuerzas OPLS-AA) e híbridas (usando métodos semiempíricos para la parte QM). Implementa también el *Umbrella Sampling* y el *WHAM*, lo que lo convierte en una poderosa herramienta para el cálculo de Potenciales de Fuerza Media (PMF).

**URL:** [http://www.ibs.fr/ext/labos/LDM/projet6/welcome\\_fr.htm](http://www.ibs.fr/ext/labos/LDM/projet6/welcome_fr.htm)

## Charmm v26b2

**Categoría:** Comercial

**Autor/es:** Grupo de investigación del profesor Martin Karplus, Harvard University

**Descripción:** CHARMM [208] (Chemistry at HARvard Molecular Mechanics) es un programa para simulaciones macromoleculares en diferentes colectivos (NVE, NVT, NPT), que incluyen minimizaciones de energía, dinámicas moleculares y simulaciones de Monte Carlo. Implementa también hamiltonianos híbridos QM/MM con AM1 y MNDO como método semiempírico (en la última versión incluye también PM3). Las funciones de energía potencial del campo

de fuerzas del Charmm han sido parametrizadas para optimizar el trabajo sobre proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. También dispone de diferentes herramientas implementadas que facilitan la realización de simulaciones como varios tipos de restricciones (incluyendo la fijación de átomos), restricciones en coordenadas internas, SHAKE, optimizaciones en cristales, etc.

**URL:** <http://mir.harvard.edu>

### **DFMM**

**Categoría:** Freeware

**Autor/es:** Iñaki Tuñón, Marilia Martins-Costa, Claude Millot y Manolo Ruiz-López

**Descripción:** Programa de cálculo, capaz de realizar cálculos híbridos QM/MM. Una parte del mismo se encarga de optimizar la función de onda a nivel de la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) incluyendo el efecto polarizante de las cargas clásicas. La otra parte proporciona el motor de dinámica molecular y monte carlo. Este programa en su actual implementación sólo permite trabajar con moléculas en disolución y el disolvente está respresentado por moléculas rígidas. En este programa se implementó el método de integración termodinámica para realizar los cálculos del cloruro de metilo.

**URL:** <http://->

### **Grace v2.2**

**Categoría:** Freeware

**Autor/es:** A. J. Turner

**Descripción:** Conjunto de subrutinas y programas de cálculo [156, 157] implementados en FORTRAN77 y *Tool Command Language*<sup>1</sup>, que permiten extender el programa Charmm en el proceso de exploración de la superficie de energía potencial, así como de la caracterización de los puntos estacionarios localizados. De modo independiente a la partición del sistema en regiones QM y MM, se define

<sup>1</sup><http://tcl.sourceforge.net/>



un subconjunto de átomos, al que se denomina *core*, sobre el que Grace aplicará el algoritmo *Eigenvector Following* (método de optimización basado en el de Newton-Raphson). El cálculo de la hessiana del *core* se realiza numericamente a partir de los datos de posición, energía y gradiente que proporciona Charmm. El resto de coordenadas que no pertenece al *core* se minimiza en cada una de las etapas del cálculo, de modo que el resultado final corresponda a un punto estacionario

**URL:** <http://www.bath.ac.uk/chsihw/grace/grace.html>

## 6.2. Otros

### L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X 2<sub>ε</sub>

**Categoría:** Licencia GPL

**Autor/es:** Múltiples autores

**Descripción:** L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X es un paquete de macros que le permite al autor de un texto componer e imprimir su documento con la mayor calidad tipográfica, empleando para ello patrones previamente definidos. Originalmente, L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X fue escrito por Leslie Lamport. Utiliza el cajista T<sub>E</sub>X como su elemento de composición. Desde diciembre de 1994, el paquete L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X está siendo actualizado por el equipo L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X3, que dirige Frank Mittelbach, para incluir algunas de las mejoras que se habían solicitado desde hace tiempo, y para reunificar todas las versiones retocadas que han surgido desde que apareciera L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X2.09 hace ya algunos años. Para distinguir la nueva versión de la vieja se le llama L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X 2<sub>ε</sub>.

T<sub>E</sub>X es un programa de ordenador de Donald E. Knuth. Está orientado a la composición e impresión de textos y fórmulas matemáticas.

**URL:** <http://www.ctan.org>

### TeXShop

**Categoría:** Licencia GPL

**Autor/es:** Múltiples autores

**Descripción:** TeXShop es una aplicación para Mac OS X destinada a escribir y componer archivos  $\text{T}_{\text{E}}\text{X}$  y  $\text{L}_{\text{A}}\text{T}_{\text{E}}\text{X}$ , mostrando el resultado previsto en la pantalla. Generalmente, TeXShop compone usando pdftex o pdflatex en lugar de tex o latex. Estos programas generan archivos pdf en lugar de archivos dvi. Puesto que pdf es el formato gráfico nativo para Mac OS X, es fácil mostrar la salida en la pantalla. Pdftex y pdflatex han sido escritos por Han The Thanh, Petr Sojka y Jiri Zlatuska. Los archivos pdf creados por TeXShop son archivos pdf estándar que pueden distribuirse a otras personas y verse en una gran variedad de sistemas informáticos. Por ejemplo, pueden verse con Adobe Acrobat en Mac OS 9.

**URL:** <http://darkwing.uoregon.edu/koch/texshop/texshop.html>

### **ChemDraw Ultra v7.0.1**

**Categoría:** Comercial

**Autor/es:** Copyright © 1985-2001 CambridgeSoft Corporation

**Descripción:** ChemDraw forma parte del paquete de programas ChemOffice de CambridgeSoft. El ChemDraw permite dibujar estructuras químicas de forma sencilla. Contiene multitud de estructuras predibujadas (anillos aromáticos, azúcares, aminocidos) así como flechas, cuadros y diferentes símbolos químicos. Con ChemDraw se pueden dibujar esquemas de reacción, añadirles texto, colores y luego exportarlo a diferentes formatos, lo que lo convierte en un excelente intermediario a la hora de realizar gráficos.

**URL:** <http://www.cambridgesoft.com>

### **RasMol v2.6**

**Categoría:** Freeware

**Autor/es:** Copyright © Roger Sayle 1992-1999

**Descripción:** RasMol es un programa de visualización de estructuras, usado principalmente para visualizar proteínas y ácidos nucleicos. Este programa Permite seleccionar diferentes regiones en la molécula de interés por medio de un

conjunto de diferentes parámetros o grupos predefinidos, los cuales permiten hacer referencia a propiedades o regiones típicas en proteínas y ácidos nucleicos.

En el caso de proteínas, RasMol permite seleccionar residuos de acuerdo con sus propiedades de carga, tamaño, cadenas laterales, comportamiento químico y ubicación dentro de la proteína. De igual forma, es posible seleccionar secciones de la cadena peptídica de acuerdo con la estructura secundaria en  $\alpha$ -hélices, hojas plegadas- $\beta$  y sus segmentos de unión. Para ácidos nucleicos, los grupos predefinidos permiten discriminar pares de bases AT, CG, púricas y pirimidínicas; y así mismo seleccionar heteroátomos, ligandos y moléculas de agua asociadas a la molécula de estudio.

**URL:** <http://www.openrasmol.org>

### **Molden v3.7**

**Categoría:** Freeware

**Autor/es:** Gijs Schaftenaar

**Descripción:** Es un paquete para la visualización de Densidad Molecular procedente de paquetes Ab Initio como GAMESS-UK, GAMESS-US y GAUSSIAN y los paquetes Semi-Empíricos Mopac/Ampac, aunque también soporta otros programas. Molden toma toda la información necesaria de las salidas de los programas anteriormente nombrados. Tiene un editor de Matriz-Z que resulta muy útil a la hora de preparar los ficheros de entrada de estos programas, ya que es capaz de escribir en numerosos formatos (xyz, matriz-z, pdb, etc.). Permite asimismo el análisis del output, midiendo distancias, ángulos y dihedros de forma gráfica e intuitiva.

**URL:** <http://www.cmbi.kun.nl/schaft/molden/molden.html>

### **VMD**

**Categoría:** Freeware

**Autor/es:** Copyright ©1994-2003 por la Universidad de Illinois y otros.

**Descripción:** VMD es un programa de representación gráfica. Es capaz de leer multitud de formatos de coordenadas e incluso ficheros de trayectorias de los programas Charmm y Dynamo. Al igual que RasMol, permite seleccionar diferentes partes de la misma estructura para aplicarles un tipo de representación diferente, como líneas, CPK, esferas y cilindros, puntos, VDW, etc. VMD utiliza OpenGL para proporcionar unos gráficos en 3D de alta calidad, que pueden ser exportados a lenguajes escénicos como el de PovRay. Totalmente controlado por línea de comandos, permite automatizar las tareas mas comunes mediante la creación de scripts.

**URL:** <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd>

### GNUplot v3.8

**Categoría:** Freeware

**Autor/es:** Copyright ©1986 - 1993, 1999 - 2002. Thomas Williams, Colin Kelley y otros

**Descripción:** GNUplot es un programa de dibujo de gráficas por línea de comandos. Produce gráficas de alta calidad exportables a numerosos formatos: L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X, png, pdf, eps, ps, xfig, etc. Es capaz de dibujar datos y funciones de dos dimensiones, así como gráficos en 3D y superficies. Al ser controlado por línea de comandos, permite su integración en procedimientos automáticos de análisis de datos.

**URL:** <http://www.gnuplot.info>

### PovRay v3.1

**Categoría:** Freeware

**Autor/es:** POV-Ray está basado en DKBTrace 2.12 de David K. Buck & Aaron A. Collins.

**Descripción:** Povray (Persistence of Vision Raytracer) es básicamente un trazador de rayos. El trazado de rayos es una técnica para representar escenas imaginarias definidas en el ordenador mediante el uso de unos modelos, en los que

se establecen los objetos y sus formas, así como puntos de luz y una cámara. La calidad del trazador de rayos Povray es excelente y no tiene nada que envidiar a la de muchos productos comerciales. Utilizado en combinación con el VMD, produce unas representaciones tridimensionales de moléculas de gran calidad, con sensación de profundidad debido al empleo de las luces y sombras.

**URL:** <http://www.povray.org>

### Gimp v1.2.1

**Categoría:** Licencia GPL

**Autor/es:** Spencer Kimball & Peter Mattis

**Descripción:** El GIMP es una abreviatura para Programa General de la Manipulación de Imagen (General Image Manipulation Program por sus siglas en inglés) (o el GNU Programa de Manipulación de Imagen). El GIMP es un programa gratuito, robusto y poderoso para pintar, para el procesamiento de imágenes y para manipular gráficos. El GIMP es un proyecto de Spencer Kimball y Peter Mattis de la Universidad de California, Berkeley. Empezó como un compilador de un proyecto de clase en LISP. La frustración con el programa, más las caídas del sistema, empujaron el proyecto en una nueva dirección. En vez de LISP, los estudiantes decidieron escribir un proyecto de manipulación de imagen en C. El resultado ha crecido rápidamente y se ha convertido en un programa de edición de imágenes de gran calidad, que compite con productos comerciales como el Photoshop©.

**URL:** <http://www.gimp.org>

### XFig v3.2 pl4

**Categoría:** Licencia GPL

**Autor/es:** Copyright ©1985-1988 Supoj Sutanthavubul

**Descripción:** Xfig es una herramienta interactiva de dibujo que funciona bajo X Windows System. En Xfig, las figuras deben ser dibujadas usando objetos tales como círculos, cuadros, líneas, texto, etc. Es posible importar imágenes como

---

GIF, JPEG, EPS, etc. Todos estos objetos pueden ser borrados, movidos, rotados, escalados o modificados. El color, la fuente y el tamaño del texto también es modificable. Las figuras generadas pueden ser guardadas en el formato nativo de Xfig (fig) o exportadas a una gran cantidad de formatos: ps, eps, pdf, GIF, JPEG, HP-GL y contiene una interfaz para impresoras PostScript. Existen muchos programas que pueden generar sus ficheros de salida en formato Xfig, lo que facilita un posterior retocado, como el GNUplot o el Xgraph.

**URL:**            <http://www.xfig.org>



## Bibliografía

- [1] D. Young. *Computational Chemistry: A practical guide for applying techniques to real world problems*. John Wiley & Sons, Inc., 605, Third Avenue, New York, 2001.
- [2] P. J. Winn, G. G. Ferenczy, and C. A. Reynolds. *Journal of Computational Chemistry*, 20:704–712, 1999.
- [3] S. R. Gooding, P. J. Winn, R. I. Maurer, G. G. Ferenczy, J. R. Miller, J. E. Harris, D. V. Griffiths, and C. A. Reynolds. *Journal of Computational Chemistry*, 21:478–482, 2000.
- [4] F. Luque, N. Reuter, A. Cartier, and M. Ruiz-López. *Journal of Physical Chemistry A*, 104:10923–10931, 2000.
- [5] C. Brooks and M. Karplus. *Journal of Chemical Physics*, 79:6312, 1983.
- [6] M. Allen and D. Tildesley. *Computer simulation of liquids*. Oxford University Press, 1987.
- [7] S. S. Wang and J. A. Krumhansl. *Journal of Chemical Physics*, 56:4287–4290, 1972.
- [8] D. J. Adams. *Chemical Physics Letters*, 62:329–332, 1979.
- [9] N. Metropolis, A. W. Rosenbluth, A. H. Teller, and E. Teller. *Journal of Chemical Physics*, 21:1087–1092, 1953.
- [10] V. Thery, D. Rinaldi, J. Rivail, B. Maigret, and G. Ferenczy. *Journal of Computational Chemistry*, 15:269–282, 1994.



- [11] N. Reuter, A. Dejaegere, B. Maigret, and M. Karplus. *Journal of Physical Chemistry A*, 104:1720–1735, 2000.
- [12] H. Singh and P. Kollman. *Journal of Computational Chemistry*, 7:718, 1986.
- [13] M. Field, P. A. Bash, and M. Karplus. *Journal of Computational Chemistry*, 11:700–733, 1990.
- [14] M. Born and R. Oppenheimer. *Annual Physics (Leipzig)*, 84:457–484, 1927.
- [15] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, and B. P. Flannery. *Numerical recipes in C: the art of scientific computing*. Cambridge University Press, 1992.
- [16] S. Bell and J. S. Crighton. *Journal of Chemical Physics*, 80:2464–2475, 1984.
- [17] C. Eckart. *Physical Reviews*, 47:552, 1935.
- [18] W. H. Miller, N. C. Handy, and J. E. Adams. *Journal of Chemical Physics*, 72:99–111, 1980.
- [19] L. Verlet. *Physical Reviews*, 159:98–103, 1967.
- [20] W. C. Swope, H. Andersen, P. Berens, and K. Wilson. *Journal of Chemical Physics*, 76:637–649, 1982.
- [21] M. Klein and S. Nosé. *Molecular Physics*, 50:1055–1076, 1983.
- [22] S. Nosé. *Journal of Chemical Physics*, 81:511–519, 1984.
- [23] W. G. Hoover. *Physical Reviews A*, 31:1695–1697, 1985.
- [24] H. C. Andersen. *Journal of Chemical Physics*, 72:2384–2393, 1980.
- [25] H. Berendsen, J. Postma, W. van Gusteren, A. DiNola, and J. Haak. *Journal of Chemical Physics*, 81:3684–3690, 1984.

- [26] S. E. Feller, Y. Zhang, R. W. Pastor, and B. R. Brooks. *Journal of Chemical Physics*, 103:4613–4621, 1995.
- [27] W. Jorgensen. *Accounts on Chemical Research*, 22:184–189, 1989.
- [28] D. Beveridge and F. Di Capua. *Annual Reviews on Biophysics and Biophysical Chemistry*, 18:431–492, 1989.
- [29] T. Straatsma and J. McCammon. *Annual Reviews on Physical Chemistry*, 43:407–35, 1992.
- [30] P. Kollman. *Chemistry Reviews*, 93:2395–2417, 1993.
- [31] S. Kumar, D. Bouzida, R. H. Swendsen, P. A. Kollman, and J. M. Rosenberg. *Journal of Computational Chemistry*, pages 1011–1021, 1992.
- [32] G. Torrie and J. Valleau. *Journal of Chemical Physics*, 23:187–199, 1977.
- [33] J. Valleau and G. Torrie. A guide to monte carlo for statistical mechanics. 2. Byways. En B. Berne, editor, *Statistical mechanics A. Modern theoretical chemistry*, volume 5, pages 169–194. Plenum Press, 1977.
- [34] M. Field. *A practical introduction to the simulation of molecular systems*. Cambridge University Press, 1999.
- [35] D. Frenkel and S. Berend. *Understanding molecular simulation: from algorithms to applications*. Academic Press, 1996.
- [36] M. Hotokka, B. Roos, and L. Ebersson. *Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 2*, page 1986, 1979.
- [37] L. Ebersson. *Acta Chemica Scandinavica*, 53:751–764, 1999.
- [38] S. Eldin and W. Jencks. *Journal of American Chemical Society*, 117:9415, 1995.
- [39] J. Richard and W. Jencks. *Journal of American Chemical Society*, 106:1383, 1984.
- [40] W. Jencks. *Chemical Society Reviews*, 10:345, 1981.

- [41] J. Bays, S. Blumer, S. Baral-Tosh, D. Behar, and P. Neta. *Journal of American Chemical Society*, 105:320, 1983.
- [42] P. Neta and D. Behar. *Journal of American Chemical Society*, 103:103, 1981.
- [43] D. Behar and P. Neta. *Journal of American Chemical Society*, 103:2280, 1981.
- [44] J. Lawless, D. Bartak, and M. Hawley. *Journal of American Chemical Society*, 91:2280, 1969.
- [45] C. Andrieux, J. Savéant, and D. Zann. *Nouve Journal Chimie*, 8:107, 1984.
- [46] C. Andrieux, A. Le Corande, and J. Savéant. *Journal of American Chemical Society*, 114:6892, 1992.
- [47] L. Ebersson. *Electron Transfer in Organic Chemistry*. Springer-Verlag: Heidelberg, 1987.
- [48] R. Marcus. *Annual Review of Physical Chemistry*, 15:155, 1964.
- [49] R. Marcus. *Journal of Chemical Physics*, 43:679, 1965.
- [50] E. Waisman, G. Worry, and R. Marcus. *Electroanalytical Chemistry*, 82:9, 1977.
- [51] R. Marcus. *Faraday Discussion Chemical Society*, 74:7, 1982.
- [52] R. Marcus and N. Sutin. *Biochemistry and Biophysics Acta*, 811:265, 1985.
- [53] J. Savéant. *Journal of the American Chemical Society*, 109:6788–6795, 1987.
- [54] V. Pérez, J. Lluch, and J. Bertrán. *Journal of the American Chemical Society*, 116:10117, 1994.
- [55] L. Moran et al. *Biochemistry*. Neil Patterson Publishers/Prentice-Hall, Inc, Englewood Cliffs, NJ 07632, segunda edición, 1994.
- [56] L. Michaelis and M. Menten. *Biochemistry*, 49:333, 1913.

- [57] G. Briggs and J. Haldane. *Biochemistry*, 19:338, 1925.
- [58] S. Martí, M. Roca, J. Andrés, V. Moliner, E. Silla, I. Tuñón, and J. Bertrán. *Chemical Society Reviews*, 33:98–107, 2004.
- [59] L. Pauling. *Chemical & Engineering News*, 24:1375–1377, 1946.
- [60] A. Warshel and M. Levitt. *Journal of Molecular Biology*, 103:227–249, 1976.
- [61] A. Warshel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75:5250–5254, 1978.
- [62] A. Warshel. *Computer Modeling of Chemical Reactions in Enzymes and Solutions*. John Wiley & Sons, 1991.
- [63] W. Cleland and M. M. Kreevoy. *Science*, 264:1887–1890, 1994.
- [64] P. A. Frey, S. A. Whitt, and J. B. Tobin. *Science*, 264:1927–1930, 1994.
- [65] W. Jencks. *Catalysis in chemistry and enzymology*. Dover Publication: New York, 1986.
- [66] J. Crosby, R. Stone, and G. Lienhard. *Journal of the American Chemical Society*, 92:2891, 1970.
- [67] M. J. Dewar and D. M. Storch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82:2225–2229, 1985.
- [68] J. K. Lee and K. Houk. *Science*, 276:942–945, 1997.
- [69] D. Koshland. *Journal of the American Chemical Society*, 94:5805, 1972.
- [70] A. D. Mesecar, B. L. Stoddard, and D. E. Koshland Jr. *Science*, 277:202–206, 1997.
- [71] T. C. Bruice. *Accounts of Chemical Research*, 35:139–148, 2002.
- [72] P. A. Kollman, B. Khun, O. Donini, M. Peräkylä, R. Stanton, and D. Bakowies. *Accounts of Chemical Research*, 34:72–79, 2001.

- [73] J. Hermans and L. Wang. *Journal of the American Chemical Society*, 119:2707–2714, 1997.
- [74] R. V. Stanton, M. Peräkylä, D. Bakowies, and P. A. Kollman. *Journal of the American Chemical Society*, 120:3448, 1998.
- [75] A. Kohen, R. Cannio, S. Bartolucci, and J. P. Klinman. *Nature*, 393:496–499, 1999.
- [76] J. Basran, M. Sutcliffe, and N. Scrutton. *Biochemistry*, 38:3218–3222, 1999.
- [77] Y. Cha, C. Murray, and J. Klinman. *Science*, 243:1325–1330, 1989.
- [78] G. Carey, P. Fasella, and E. Gratton. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 8:69–97, 1979.
- [79] J. McCammon, P. Wolynes, and M. Karplus. *Biochemistry*, 18:927–942, 1979.
- [80] S. Glasstone, K. J. Laidler, and H. Eyring. *The Theory of Rate Processes*. McGraw-Hill: New York, 1941.
- [81] J. D. Watson and F. H. C. Crick. *Nature*, 171:737–738, 1953.
- [82] A. J. Ruiz Chica. *Caracterización espectroscópica de la interacción entre ADN y aminos biógenas y sintéticas*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga, 2003.
- [83] R. Tada and R. Yoshimura. *Journal of the American Chemical Society*, 114:1593, 1992.
- [84] J. Bertrán, I. Gallardo, M. Moreno, and J. Savéant. *Journal of the American Chemical Society*, 114:9576, 1992.
- [85] P. Piecuch. *Journal of Molecular Structure*, 436:503, 1997.
- [86] T. Clark. *Faraday Discussion Chemical Society*, 78:203, 1984.
- [87] R. Parr and W. Yang. *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*. Oxford University Press, New York, 1995.

- [88] R. Stanton, L. Little, and K. Merz Jr. *Journal of Physical Chemistry*, 99:17344, 1995.
- [89] M. Freindorf and J. Gao. *Journal of Computational Chemistry*, 17:386, 1996.
- [90] R. Stanton, D. Hartsough, and K. Merz Jr. *Journal of Physical Chemistry*, 97:11868, 1993.
- [91] I. Tuñón, M. Martins-Costa, C. Millot, M. Ruiz-López, and J. Rivail. *Journal of Computational Chemistry*, 17:19, 1996.
- [92] W. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. Madura, R. Impey, and M. Klein. *Journal of Chemical Physics*, 79:926–935, 1983.
- [93] W. Kohn and L. Sham. *Physical Reviews A*, 140:1133, 1965.
- [94] A. St-Amant and D. Salahub. *Chemical Physics Letters*, 169:387, 1990.
- [95] D. Salahub, R. Fournier, P. Mlynarski, I. Papai, A. St-Amant, and J. Ushio. *Theory and Applications of Density Functional Approaches to Chemistry*. Springer-Verlag, Berlin, 1991.
- [96] A. Becke. *Physical Reviews A*, 38:3098, 1988.
- [97] J. Perdew. *Physical Reviews B*, 33:8822, 1986.
- [98] M. Frisch, G. Trucks, H. Schlegel, G. Scuseria, M. Robb, J. Cheeseman, V. Zakrzewski, J. Montgomery Jr., R. Stratmann, J. Burant, S. Dapprich, J. Millam, A. Daniels, K. Kudin, M. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. Petersson, P. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. Malick, A. Rabuck, K. Raghavachari, J. Foresman, J. Cioslowski, J. Ortiz, A. Baboul, B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. Martin, D. Fox, T. Keith, M. Al-Laham, C. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. Wong, J. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E. Replogle, and J. Pople. *Gaussian 98 (Revision A.7)*. Gaussian Inc., Pittsburgh PA, 1998.

- [99] J. Gao and X. Xia. *Journal of the American Chemical Society*, 115:9667, 1993.
- [100] D. Fincham. *CCP5 Quarterly*, 2:6, 1981.
- [101] D. Fincham and D. Heyes. *Advanced Chemical Physics*, 68:493, 1985.
- [102] S. Boys and F. Bernardi. *Molecular Physics*, 19:553, 1970.
- [103] J. Duncan. *Journal of Molecular Structure*, 6:447, 1970.
- [104] M. Weissman and S. Benson. *Journal of Physical Chemistry*, 87:243, 1983.
- [105] A. Modeli, F. Scagnolari, G. Distefano, D. Jones, and M. Guerra. *Journal of Chemical Physics*, 96:1061, 1992.
- [106] R. Berry, S. Rice, and J. Roos. *Journal of Physical Chemistry*, 1980.
- [107] A. McClelland. *Tables of Experimental Dipole Moments*. W. H. Freeman & Co., 1963.
- [108] I. Tuñón, M. Martins-Costa, C. Millot, and M. Ruiz-López. *Chemical Physical Letters*, 241:450, 1995.
- [109] H. Jensen and K. Daasbjerg. *Acta Chemical Scandinavica*, 52:1151, 1998.
- [110] G. H. Krooshof. *Structure-Function Relationships in Haloalkane Dehalogenase*. Tesis Doctoral, Rijksuniversiteit Groningen, 2000.
- [111] S. Fetzner. *Applications on Microbiology and Biotechnology*, 50:633–657, 1998.
- [112] H. Illing, S. Mariscotti, and A. Smith. *HSE Toxicity Review*, 17, 1987.
- [113] R. Crebelli, C. Andreoli, A. Carere, G. Conti, L. Conti, M. Cotta Ramusino, and R. Benigni. *Mutant Research*, 266:117–134, 1992.
- [114] A. Doherty, S. Ellard, E. Parry, and J. Parry. *Mutagenesis*, 11:247–274, 1996.
- [115] A. Richard and E. Hunter. *Teratology*, 53:352–360, 1996.

- [116] P. Brown-Woodman, H. L. C., F. Huq, C. Herlihy, K. Picker, and W. Webster. *Teratology*, 57:321–333, 1998.
- [117] M. Molina and F. Rowland. *Nature*, 249:810–814, 1974.
- [118] J. Field, F. Verhagen, and E. De Jong. *Tibtech*, 13:451–456, 1995.
- [119] F. Laturus, C. Wiencke, and H. Klöser. *Maritim Environment Research*, 41:169–181, 1996.
- [120] Anonymous. *Chemical Engineer News*, 74:38–79, 1996.
- [121] K. Hughes, M. Meek, and I. Cadwell. *Environment Carcinogenesis Reviews*, C12:293–303, 1994.
- [122] D. Janssen, A. Scheper, L. Dijkhuizen, and B. Witholt. *Applications on Environment Microbiology*, 49:673–677, 1985.
- [123] G. Stucki and M. Thüer. *Environment Science and Technology*, 29:2339–2345, 1995.
- [124] S. Keuning, D. Janssen, and B. Witholt. *Journal of Bacteriology*, 163:635–639, 1985.
- [125] S. Franken, H. Rozeboom, K. Halk, and B. Dijkstra. *EMBO Journal*, 10:1297–1302, 1991.
- [126] K. Verschueren, S. Franken, H. Rozeboom, K. Kalk, and B. Dijkstra. *Journal of Molecular Biology*, 232:856–872, 1993.
- [127] I. Ridder, H. Rozeboom, and B. Dijkstra. *Acta Crystallographic, Section D: Biological Crystallographic*, 55:1273–1290, 1999.
- [128] K. Verschueren, F. Seljée, H. Rozeboom, K. Kalk, and B. Dijkstra. *Nature*, 363:693–698, 1993.
- [129] A. Warshel. *Journal of Biological Chemistry*, 273:27035–27038, 1998.
- [130] A. Warshel. *Accounts on Chemical Research*, 35:385–395, 2002.



- [131] K. Wiber, T. Keith, M. Frish, and M. Murcko. *Journal of Physical Chemistry*, 99:9072–9079, 1995.
- [132] M. Wong, M. Frisch, and K. Wiberg. *Journal of American Chemical Society*, 113:4776–4782, 1991.
- [133] W. Jorgensen, N. McDonald, M. Selmi, and P. Rablen. *Journal of the American Chemical Society*, 117:11809–11818, 1995.
- [134] G. Kaminski and W. Jorgensen. *Journal of Physical Chemistry B*, 102:1787–1796, 1998.
- [135] F. C. Lightstone, Y.-J. Zheng, and T. C. Bruice. *Journal of the American Chemical Society*, 120:5611–5621, 1998.
- [136] A. Maulitz, F. Lightstone, Y. Zheng, and T. Bruice. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 94:6591–6595, 1997.
- [137] E. Lau, K. Kahn, Bash, and T. Bruice. *Proceeding of the National Academy of Science U.S.A.*, 97:9937–9942, 2000.
- [138] M. J. Field, M. Albe, C. Bret, F. Proust-de Martin, and A. Thomas. *Journal of Computational Chemistry*, 21:1088–110, 2000.
- [139] W. Jorgensen and J. Tirado-Rives. *Journal of the American Chemical Society*, 110:1657, 1988.
- [140] W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, and J. Tirado-Rives. *Journal of the American Chemical Society*, 118:11225–11236, 1996.
- [141] J. Schindler, P. Naranjo, D. Honaberger, C. Chang, J. Brainard, L. Vanderberg, and C. Unkefer. *Biochemistry*, 38:5772–5778, 1999.
- [142] A. Shurki, M. Štrajbl, J. Villà, and A. Warshel. *Journal of the American Chemical Society*, 4107:4097, 2002.
- [143] S. Martí, J. Andrés, V. Moliner, E. Silla, I. Tuñón, J. Bertrán, and M. J. Field. *Journal of the American Chemical Society*, 123:1709–1712, 2001.

- [144] S. Martí, J. Andrés, V. Moliner, E. Silla, I. Tuñón, and J. Bertrán. *Theoretical Chemistry Accounts*, 105:207–212, 2001.
- [145] J. Damborky, M. Kutý, M. Nemeč, and J. Koca. *Journal of Chemical Inf. Computer Science*, 37:562, 1997.
- [146] J. Damborsky, M. Bohac, M. Prokop, M. Kutý, and J. Koca. *Protein Engineering*, 11:901, 1998.
- [147] J. Damborsky and J. Koca. *Protein Engineering*, 12:989, 1999.
- [148] M. Kutý, J. Damborsky, M. Prokop, and J. Koca. *Journal of Chemical Inf. Computer Science*, 38:736, 1998.
- [149] A. Lewandowicz, J. Rudziński, L. Tronstad, M. Widersten, P. Ryberg, O. Matsson, and P. Paneth. *Journal of the American Chemical Society*, 123:4550–4555, 2001.
- [150] F. Lightstone, Y. Zheng, and T. Bruice. *Biology and Organic Chemistry*, 26:169, 1998.
- [151] T. C. Bruice and F. C. Lightstone. *Accounts of Chemical Research*, 32:127–136, 1999.
- [152] K. Okamoto, T. Kita, K. Araki, and H. Shingu. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 40:1912, 1967.
- [153] L. Devi-Kesavan and J. Gao. *Journal of the American Chemical Society*, 125:1532, 2003.
- [154] J. Schanstra, J. Kingma, and D. Janssen. *Journal of Biological Chemistry*, 271:14747, 1996.
- [155] J. Stewart. *Journal of Computational Chemistry*, 10:209, 1989.
- [156] V. Moliner, A. Turner, and I. Williams. *Chemical Communications*, pages 1271–1272, 1997.
- [157] A. J. Turner, V. Moliner, and I. H. Williams. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 1:1323–1331, 1999.

- [158] G. Krooshof, I. Ridder, A. Tepper, G. Vos, H. Rozeboom, K. Kalk, B. Dijkstra, and D. Janssen. *Biochemistry*, 37:15013, 1998.
- [159] M. Štrajbl, A. Shurki, M. Kato, and A. Warshel. *Journal of the American Chemical Society*, 125:10228, 2003.
- [160] B. Gertner, R. Whitnell, K. Wilson, and J. Hynes. *Journal of the American Chemical Society*, 113:74, 1991.
- [161] E. Hughes and C. Ingolg. *Journal of Chemical Society*, 244:252, 1935.
- [162] J. Keck. *Advances on Chemical Physics*, 13:85–121, 1967.
- [163] D. Truhlar, B. Garret, and S. Klippensteins. *Journal of Physical Chemistry*, 100:12771–12800, 1996.
- [164] M. García-Viloca, J. Gao, M. Karplus, and D. Truhlar. *Science*, 303:186–195, 2004.
- [165] J. Villà and A. Warshel. *Journal of Physical Chemistry B*, 105:7887–7907, 2001.
- [166] G. Zwan and J. Hynes. *Journal of Chemical Physics*, 76:2993, 1982.
- [167] G. Zwan and J. Hynes. *Journal of Chemical Physics*, 78:4174, 1983.
- [168] E. Pollak. *Journal of Chemical Physics*, 85:865, 1986.
- [169] R. Zwanzing. *Journal of Statistical Physics*, 9:215, 1973.
- [170] S. Adelman. *Journal of Chemiscal Physics*, 73:3145, 1980.
- [171] B. Gertner, K. Wilson, and J. Hynes. *Journal of Chemical Physics*, 90:3537–3558, 1989.
- [172] E. Neria and M. Karplus. *Chemical Physics Letters*, 267:23–30, 1997.
- [173] K. Nam, X. Prat-Resina, M. García-Viloca, L. Devi-Kesavan, and J. Gao. *Journal of the American Chemical society*, 126:1369–1376, 2004.
- [174] C. Wischnak and R. Muller. *Biotechnology*, 11b:241, 2000.

- [175] C. Kennes, F. Pries, G. Krooshof, E. Bokma, J. Kingma, and D. Janssen. *European Journal of Biochemistry*, 228:403, 1995.
- [176] F. Pries, J. Kingma, G. Krooshof, C. Jeronimus-Stratingh, A. Bruins, and D. Janssen. *Journal of Molecular Biology*, 18:10405, 1995.
- [177] J. Bergsma, K. Gertner, K. Wilson, and J. Hynes. *Journal of Chemical Physics*, 86:1356, 1987.
- [178] M. Ruiz-López, D. Rinaldi, and J. Bertrán. *Journal of Chemical Physics*, 103:9249–9260, 1995.
- [179] B. Gertner, R. Whitnell, K. Wilson, and J. Hynes. *Journal of the American Chemical Society*, 113:74–78, 1991.
- [180] A. Soriano, E. Silla, I. Tuñón, S. Martí, V. Moliner, and J. Bertrán. *Theoretical Chemistry Accounts*, 2004, aceptado.
- [181] M. Strnad, M. Martins-Costa, C. Millot, I. Tuñón, M. Ruiz-López, and J. Rivail. *Journal of Chemical Physics*, 106:3643–3657, 1997.
- [182] S. Adelman. *Advances on Chemical Physics*, 53:61, 1983.
- [183] A. Mosyak, O. Prezhdo, and P. Rossky. *Journal of Chemical Physics*, 109:6390–6369, 1998.
- [184] K. Babe and W. Serafin. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw Hill, New York, 9 edición, 1996.
- [185] H. Dale and P. Laidlaw. *Journal of Physiology*, 41:318–344, 1911.
- [186] D. Cooper, R. Young, G. Durant, and C. Ganellini. *Comprehensive Medical Chemistry*, 3:323–421, 1990.
- [187] F. Sánchez-Jiménez, J. Matés, J. Urdiales, M. Medina, E. Viguera, M. García-Caballero, and I. Núñez de Castro. *Advanced Biosciencie*, 89:43–69, 1993.
- [188] E. Weihe and L. Eiden. *FASEB Journal*, 151:354–362, 2000.

- [189] M. Jutel, T. Watanabe, S. Klunker, M. Akdis, J. Thomet, O. A. Malolepszy, T. Zak-Nejmark, R. Koga, T. Kobayashi, K. Blaser, and C. Akdis. *Nature*, 413:420–425, 2001.
- [190] J. Green. *Handbook of Neurochemistry*, 4:221, 1970.
- [191] H. Hess. *Annual Reports on Medicinal Chemistry*, page 56, 1986.
- [192] D. Cooper, R. Young, G. Durant, and C. Ganellin. *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Pergamon Press, 1990; Vol 3.
- [193] G. Khalson and E. Rosengren. *Annual Reviews of Physiology*, 48:155, 1965.
- [194] E. Riviera, G. Gricco, N. Engel, C. Fitzsimons, G. Martin, and R. Bergoc. *Seminar Cancer Biology*, 10:15–23, 2000.
- [195] F. LaBella and L. Brandes. *Seminars in Cancer Biology*, 10:47–53, 2000.
- [196] F. Ramírez, I. Tuñón, and E. Silla. *Journal of Physical Chemistry B*, 102:6290–6298, 1998.
- [197] F. Tortonda, J. Pacual-Ahuir, e. Silla, I. Tuñón, and F. Ramírez. *Journal of Chemical Physics*, 109:592–602, 1998.
- [198] J. Collado, I. Tuñón, E. Silla, and F. Ramírez. *Journal of Physical Chemistry A*, 104:2120–2131, 2000.
- [199] F. Ramírez, I. Tuñón, J. Collado, and E. Silla. *Journal of American Chemical Society*, 125:2328–2340, 2003.
- [200] T. Paiva, M. Tominaga, and A. Paiva. *Journal of Medical Chemistry*, 1:689, 1970.
- [201] C. Ganellin and E. Pepper. *Journal of Medical Chemistry*, 16:610–616, 1973.
- [202] M. Ardhammar, B. Nordén, and T. Kurucsev. *Circular Dichroism: Principles and Applications*, chapter DNA-Drug Interacctions, pages 741–768. Wiley-VCH, 2000.

- [203] W. Denny. *Anti-Cancer Drug Design*, 4:241, 1989.
- [204] B. Baguley. *Anti-Cancer Drug Design*, 6:1, 1991.
- [205] A. Elcock, A. Rodger, and W. Richards. *Biopolymers*, 39:309–326, 1996.
- [206] N. Foloppe and A. MacKerell Jr. *Journal of Computational Chemistry*, 21:86–104, 2000.
- [207] A. MacKerell Jr. and N. Banavali. *Journal of Computational Chemistry*, 21:105–120, 2000.
- [208] B. Brooks, R. Bruccoleri, B. Olafson, D. States, S. Swaminathan, and M. Karplus. *Journal of Computational Chemistry*, 4:187–217, 1983.
- [209] J. Ryckaert, G. Ciccotti, and H. Berendsen. *Journal of Computational Physics*, 23:327, 1977.
- [210] P. Pulay, G. Fogarasi, F. Pang, and J. Boggs. *Journal of the American Chemical Society*, 101:2550, 1979.
- [211] E. Wilson. *Journal of Chemical Physics*, 7:1047, 1939.
- [212] A. Ruiz-Chica, A. Soriano, I. Tuñón, E. Silla, and F. Ramírez. *Manuscrito en preparación.*, 2004.
- [213] H. Spielmann, D. Wemmer, and J. Jacobsen. *Biochemistry*, 34:8542, 1995.
- [214] H. Robinson, W. Priebe, J. Chaires, and A. Wang. *Biochemistry*, 36:8663–8670, 1997.
- [215] A. Adams, J. Guss, C. Collyer, W. Denny, and L. Wakelin. *Nucleic Acid Research*, 28:4244, 2000.
- [216] A. Adams, J. Guss, W. Denny, and L. Wakelin. *Nucleic Acid Research*, 30:719, 2002.
- [217] E. Coitiño, K. Irving, J. Rama, A. Iglesias, M. Paulino, and O. Ventura. *Journal of Molecular Structure (Theochem.)*, 210:405, 1990.

- [218] E. Coitiño, O. Ventura, and R. Sosa. *Journal of Molecular Structure (Theochem.)*, 254:315, 1992.
- [219] S. Morpurgo, M. Bossa, and G. Morpurgo. *Journal of Molecular Structure (Theochem.)*, 429:71, 1998.
- [220] J. Ruiz-Pernía, I. Tuñón, E. Silla, S. Martí, and V. Moliner. *Journal of Physical Chemistry B*, 2004, Aceptado.
- [221] K. Miller. *Journal of the American Chemical Society*, 112:8533, 1990.
- [222] J. Stout and C. Dykstra. *Journal of Chemical Physics*, 102:1576, 1998.
- [223] P. Ren and J. Ponder. *Journal of Computational Chemistry*, 23:1497–1506, 2002.
- [224] R. Carr and M. Parrinello. *Physical Review Letters*, 55:2471, 1985.

**VNIVERSITAT ID VALÈNCIA**  
**FACULTAT DE QUÍMICA**

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de  
la fecha, acordó otorgar a esta Tesis doctoral de  
**ALEJANDRO JOSE SORIANO MARTINEZ**  
la calificación de **EXCELENT CUM LAUDE**  
Valencia, a **18** de **JUNIO** de 2.0**04**  
El Secretario,



N.º 647 del registro de Tesis de la Facultad

