

Trabajo Especial I
Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de la República Oriental del Uruguay

Modelado Teórico Computacional de Procesos Reactivos de Interés Bioquímico

Pablo Daniel Dans Puiggrós
Febrero 2000

Tutora:
Dra. Elena Laura Coitiño
Laboratorio de Química Teórica y Computacional
Instituto de Química Biológica

A mis queridos padres.

Agradecimientos

En orden alfabético: Astrid Agorio, Valerie Cayssials, Laura Coitiño, Silvana Masciadri y Sylvia Vazquez; a todas ellas, un agradecimiento muy especial por su incondicional apoyo y su inconmensurable paciencia sin lo cuál hubiera sido imposible la realización del presente trabajo.

A todas aquellas personas que me acompañaron en mi prolongada estadía por IMPASA, logrando mantener en alto mi ánimo y brindándome las fuerzas necesarias para continuar adelante; que la divina providencia los tenga en consideración.

Prefacio	7
Introducción.....	12
Conceptos fundamentales para el estudio de la reactividad utilizando la química computacional.....	16
1.1. Hipersfície de energía potencial (HEP).	16
1.2. Mecánica Clásica sobre una HEP.	17
1.3. Mecánica Cuántica sobre una HEP: aproximación de Born-Oppenheimer.....	18
1.4. Evaluación y análisis de la HEP.	20
1.5. Puntos de interés químico sobre la HEP.	21
1.6. Métodos para la localización de puntos estacionarios sobre la HEP.	25
1.6.1. Localización de mínimos.....	25
1.6.2. Localización de puntos de ensilladura.....	27
Métodos clásicos y métodos cuánticos.....	30
2.1. Métodos clásicos.	30
2.2. Métodos cuánticos.....	43
2.2.1. Métodos Hartree-Fock o del Campo Auto Consistente.	44
2.2.2. Métodos <i>ab initio</i> y la elección del conjunto de base.....	47
2.2.3. Métodos semiempíricos.	51
2.2.4. Correlación electrónica:	55
a) métodos Post-HF.	57
b) Funcionales de la densidad electrónica (DFT).	61
2.2.5. Divide y reinarás.	64
Métodos mixtos.....	66
3.1. Metodología.	68
3.1.1. Principios generales.....	68
3.1.2. La unión entre las regiones QM/MM: establecimiento de la frontera.....	70
3.2. Aplicaciones.....	73
Tres niveles de enfoque para el estudio de la reactividad.....	76
4.1. Propiedades moleculares utilizadas para analizar la reactividad en problemas de interés bioquímico.	77
4.1.1. Propiedades que se obtienen a partir de la HEP.....	77
4.1.2. Propiedades de primer orden.	78
4.1.3. Propiedades de segundo orden.....	81
4.1.4. Propiedades que involucran más de un estado electrónico.	81
4.2. Evaluación de las propiedades termodinámicas.	81
4.2.1. Funciones de partición.....	82
4.2.2. El cálculo de las propiedades termodinámicas a partir de las funciones de partición.....	84
4.3. La aproximación estática y el estudio de la cinética de reacción.	84
4.3.1. La teoría del estado de transición.....	85
4.3.2. La teoría variacional del estado de transición.....	85

Referencias	89
Anexos	97
Indice de Abreviaturas.....	97
Indice de Figuras.....	99
Indice de Tablas.....	101

Prefacio

Antes de la revolución química que muchos autores atribuyen a las leyes de Lavoisier sobre la conservación de la masa y de los elementos y la primera implementación de una nomenclatura química racional, era sabido que las reacciones no solo dependían de la naturaleza de las especies químicas reactivas, sino también de condiciones exteriores tales como la temperatura, la presión, la dilución, etc. Ya a principios del siglo XIX, el químico francés Claude Berthollet había postulado ciertas reglas con intenciones de predecir las reacciones: dos especies químicas en solución reaccionaban entre ellas si uno de los productos posibles de la reacción era susceptible de escapar de la solución, ya sea por ser insoluble o por estar en estado gaseoso.¹

Desventuradamente para el orgullo francés, las grandes enciclopedias universales están de acuerdo en marcar el nacimiento de la química-física como ciencia en 1885, a partir de la publicación del volumen "*Lehrbuch der allgemeinen Chemie*"² por el químico alemán Wilhelm Ostwald, quien sería galardonado luego con el premio Nobel de química en el año 1909. Durante este último siglo, una de las áreas más prósperas de esta rama de la química ha sido la de intentar comprender por qué, cómo y en que condiciones dos o más sustancias sufren transformaciones gobernadas por leyes y procesos físicos, dando origen a una o varias sustancias o especies químicas diferentes de las iniciales. Esta es en esencia la problemática de la reactividad química que ha pasado en los últimos doscientos años por tres sucesivos niveles de comprensión.

En primer lugar la descripción macroscópica cualitativa bien ilustrada por los postulados de Berthollet, que intentan responder a interrogantes tales como: ¿qué productos se obtienen?, ¿a partir de qué reactivos? y ¿bajo qué condiciones?.

A este nivel se obtiene abundante información con muy bajo poder predictivo. El segundo nivel está dirigido a la determinación de los pasos elementales de una reacción y la determinación cuantitativa de los factores de velocidad en base a la ecuación de Arrhenius. Las variables involucradas en esta última ecuación son todavía poco incisivas como para permitir la comprensión profunda de la transformación química. Para poder alcanzar el tercer nivel de comprensión fue necesario el trabajo desarrollado por Henry Eyring y Michael Polanyi³, donde se introduce el concepto del estado de transición sobre una hiperficie de energía potencial, y que de algún modo marca la entrada al mundo de la química molecular. Esto nos lleva al estudio de la dinámica de colisiones reactivas entre átomos y moléculas. Una serie de colisiones reactivas se traduce entonces en un conjunto de reacciones químicas elementales que constituyen el proceso de transformación global macroscópico que observamos.⁴

Señalamos anteriormente que las transformaciones que se dan en las reacciones químicas son inducidas por procesos físicos que están a su vez gobernados por las leyes físicas. Históricamente la física puede dividirse entre la física de antes del siglo XX y la física del siglo XX, hasta tienen un nombre diferente. La física del siglo veinte se identifica bajo el nombre de física moderna, marcada esencialmente por el desarrollo de la mecánica cuántica y de la relatividad general. Previamente los esfuerzos estuvieron centrados en elaborar la teoría del electromagnetismo clásico y las ecuaciones de movimiento de Newton. Este siglo tiene asociado una profunda revolución de conceptos donde la formulación de la mecánica cuántica (debida a los aportes realizados hace ya más de 70 años por Planck, Einstein, Heisenberg, Schrödinger y Dirac) sentó las bases para la fundación teórica de la química moderna. Desde entonces es posible en principio entender como interaccionan los núcleos y los electrones para formar enlaces químicos que los unen formando moléculas. Por otra parte como afirmó Paul Dirac en 1929:

“The underlying laws necessary for the mathematical theory of large parts of physics and the whole of chemistry are thus completely known, and the difficulty is only that the exact application of these laws leads to equations much too complicated to be soluble.”⁵

Esta aseveración era ciertamente correcta en 1929 cuando la aplicación de la mecánica cuántica a la química, era en esos tempranos días, de naturaleza principalmente cualitativa. Recién en los años '50 varios científicos comenzaron seriamente a desafiar la visión un tanto pesimista de Dirac hallando posibles formas de resolver las ecuaciones de la mecánica cuántica para moléculas. Hace no más de 40 años los esfuerzos de la química cuántica eran ridiculizados por varios, cuando no la mayoría de los químicos, como una promesa fútil con magras implicancias y efectos en la química.

Hoy en día la realidad es otra. Durante estas décadas, el importante desarrollo de la teoría, acompañado por el de las técnicas computacionales y de la tecnología informática para caracterizar las reacciones químicas han permitido hacer un salto en nuestra comprensión de los factores que controlan el cambio químico. Actualmente asistimos a un reconocimiento indiscutible por parte de la comunidad científica sobre la utilidad y las grandes potencialidades de la química teórica computacional. Para ilustrar este reconocimiento cabe destacar, que en el año 1998, la Real Academia de Ciencias Sueca, otorgó el premio Nobel de química a dos químicos teóricos John Pople y Walter Kohn por el desarrollo de métodos computacionales en química cuántica y la teoría de los funcionales de la densidad (DFT), respectivamente.⁶

Es de nuestro especial interés, dada la naturaleza de ésta monografía, dejar ahora una imagen general sobre los logros de la química teórica computacional en

el estudio de procesos reactivos de interés bioquímico, que iremos analizando detalladamente en el transcurso del trabajo. Dado que el estudio de la reactividad en bioquímica requiere generalmente de la descripción de la interacción de macromoléculas en solución (es decir sistemas de dimensión considerable y con un amplio número de grados de libertad) para poder simular las condiciones biológicas reales, no ha sido hasta las dos últimas décadas, en gran parte debido a los crecientes recursos computacionales disponibles, que se han logrado resultados de un buen nivel de exactitud y en correspondencia con la información experimental disponible. Cabe resaltar que se ha tomado como estrategia general en esta clase de problemas la de estudiar modelos de mínima, que irán paso a paso relativamente creciendo en complejidad, para luego extrapolar los resultados al macrosistema.

Los logros son notables en cuanto al entendimiento adquirido sobre los factores que gobiernan la estructura de las proteínas y los procesos dinámicos de *folding* y *unfolding* de las mismas^{7,8,9}. Varios sitios activos de enzimas han sido estudiados y se conocen más o menos en detalle a nivel molecular las interacciones con sus respectivos substratos así como la termodinámica y la cinética de reacción^{10,11}. Análogos avances se han alcanzado en relación con el estudio de las interacciones entre proteínas y ADN, esenciales para la comprensión de los procesos que dan lugar a la vida^{12,13}. La química de los fotosistemas de los cloroplastos, que involucran el conocimiento de la interacción entre la materia y la luz en pro de la generación biológica de energía, ha sido también considerablemente estudiada¹⁴, si bien en ninguna de estas áreas la última palabra está pronunciada. Al contrario, estos primeros resultados deben ser considerados como un especial estímulo para la comunidad científica dedicada a la búsqueda de nuevos modelos y métodos cada vez más eficientes y que se ajusten con mayor exactitud a las observaciones de la realidad especialmente en

el área de desarrollo de nuevas técnicas y metodologías para introducir el efecto del solvente^{15,16,17} en la descripción de estos macrosistemas.

Introducción

El importante desarrollo logrado en química cuántica durante la década de los 70, llevó a muchos científicos a pensar que estos métodos no sólo podrían complementar el trabajo de los experimentalistas, sino que incluso podrían sustituirlo¹⁸. Por otro lado se comenzó a especular que el modelado computacional podría hacer posible el tratamiento de problemas inalcanzables desde un punto de vista experimental. Un buen ejemplo de éste tipo de situación es la determinación de mecanismos de reacción de procesos atmosféricos a bajas temperaturas, principalmente por lo difícil que resulta la caracterización de las reacciones involucradas en el laboratorio.¹⁹

Actualmente, asistimos a un gran esfuerzo cooperativo entre teóricos y experimentalistas con la intención de describir mejor las transformaciones químicas, de manera de lograr entenderlas y predecir nuevas transformaciones aún no exploradas empíricamente. La complementaridad entre teoría y experimentación son (afortunadamente para el progreso del conocimiento) hoy en día un hecho. Por otra parte los desarrollos y avances logrados en cada sector, marcan la necesidad de mejorar las técnicas y los modelos usados.

Al usar la química computacional en el estudio de la reactividad química, dos puntos de vista pueden ser adoptados. Por un lado, podemos encarar el estudio de sistemas extremadamente simples, donde la gran exactitud con la cuál se pretende elucidar los aspectos cuantitativos de estas reacciones sencillas, requerirá del uso de modelos fisico-matemáticos *derivados a primeros principios* (*ab initio*), insumiendo considerables recursos computacionales. Este es el caso, por ejemplo, en estudios sobre la transferencia protónica entre dos especies químicas sencillas, donde lo que se pretende es determinar con gran exactitud

datos estructurales, energéticos, constantes de velocidad y otras muchas variables.

El segundo punto de vista es justamente el opuesto, y está dirigido al estudio de sistemas que son químicamente más complejos. La complejidad del sistema puede deberse a que intervienen una multitud de especies químicas relativamente sencillas que interaccionan mutuamente en distintas fases, como en el caso de los estudios aplicados a la electroquímica y a la química de ciertos procesos atmosféricos. Por otro lado, la complejidad puede surgir del estudio de sistemas donde interaccionan sustancias con estructura química complicada generalmente en fase líquida. Buenos ejemplos de este último caso lo constituyen los estudios aplicados a la farmacología cuántica o a la bioquímica, en los cuales se pretende determinar de forma semicuantitativa las etapas elementales que dan lugar a los mecanismos de reacción globales.²⁰

Entre estas dos visiones extremas caben infinidad de casos intermedios. Así, para el estudio de la reactividad en sistemas biomoleculares se pueden adoptar tres niveles de enfoque básicos: El primero se limita a analizar la reactividad por extrapolación de ciertas propiedades de los reactivos involucrados y los productos generados. En esta primera aproximación es posible utilizar una serie de índices de reactividad. En problemas de interés bioquímico como los revisados en esta monografía, los índices más usuales son las cargas sobre los átomos derivados del análisis de Mulliken²¹ y las densidades electrónicas de frontera obtenidas a partir de los orbitales moleculares HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) y LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*)^{10,22}.

Un segundo nivel de enfoque es el estático, en el que se estudian algunos puntos específicos de interés químico sobre una hiperficie de energía potencial. En esta aproximación la reacción química se ve reducida al estudio de estructuras

estables o a lo sumo metaestables que pueden ser calculadas por ejemplo resolviendo la ecuación de Schrödinger no relativista y no dependiente del tiempo, dentro de la aproximación de Born-Oppenheimer²³. Usando la metodología adecuada, debe quedar claro que este nivel de enfoque es suficiente para brindar datos cuantitativos relevantes de las reacciones químicas, tales como mecanismo y termoquímica del proceso.

El tercer nivel de enfoque es aquél que permite obtener información cuantitativa sobre la cinética de la reacción. Una opción posible, que no incluye al tiempo como variable, consiste en determinar caminos de reacción sobre la hipersuperficie de energía potencial y usar la teoría variacional del estado de transición²⁴ (VTST) desarrollada por Truhlar *et al.*, para calcular constantes de velocidad de reacción. Una segunda opción, conocida como aproximación dinámica, consiste en incluir de manera más o menos explícita el tiempo como nueva variable en los cálculos llevados a cabo. Los estudios dinámicos *derivados a primeros principios*, que implican la resolución de la ecuación de Schrödinger no relativista dependiente del tiempo para la determinación del camino de reacción, son hoy en día impracticables para estudiar sistemas de interés bioquímico por la falta de implementación de los algoritmos necesarios y por el enorme costo computacional que insumirían. En cambio, ésta última década, estrategias basadas en la resolución de las ecuaciones de movimiento de Newton o en las ecuaciones clásicas de movimiento de Langevin, han sido ampliamente usadas, principalmente en el estudio de la dinámica y flexibilidad de las proteínas^{7,8,25,26} y de distintas hebras de ADN^{27,28}.

En esta monografía los tres niveles de enfoque recién señalados son abordados y discutidos en función del análisis de una selección de trabajos publicados en revistas arbitradas, que se extienden sobre los últimos 10 años, en los cuales se estudian diversos aspectos de la reactividad en sistemas de interés bioquímico.

Con la intención de facilitar la lectura, este trabajo se organiza en 4 partes: En la primera presentaremos algunos conceptos básicos necesarios para la comprensión del estudio de la reactividad utilizando la química computacional.

La segunda parte estará dedicada a la presentación (siempre en base a la discusión de problemas concretos aplicados), de las diferentes metodologías tanto clásicas como cuánticas necesarias para la caracterización de la estructura y energética de las especies participantes en una reacción. Examinaremos las ventajas, desventajas y rango de aplicabilidad de cada familia de métodos.

En la tercera parte del trabajo presentaremos nuevos desarrollos metodológicos basados en estrategias mixtas clásico-cuánticas, discutiendo la gran potencialidad de su uso.

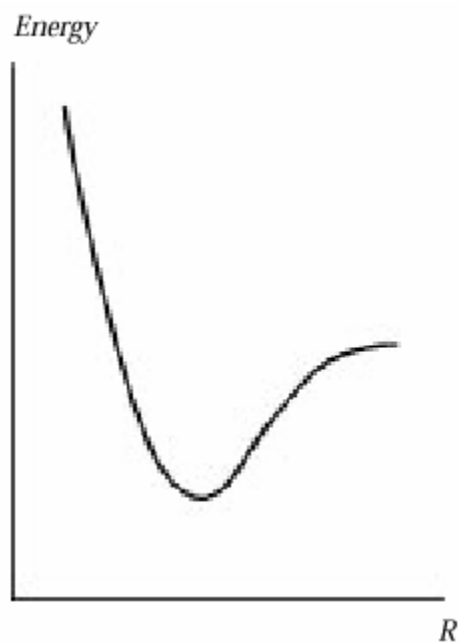
La cuarta parte del trabajo esta abocada a la predicción de las propiedades relacionadas con la reactividad según los tres niveles de enfoque que mencionábamos anteriormente. Introducimos las propiedades moleculares usualmente usadas como herramientas interpretativas: carga sobre los átomos, densidad de carga, potenciales electrostáticos, orbitales moleculares HOMO-LUMO, etc. Luego veremos de que manera es posible evaluar las propiedades termodinámicas de un sistema a partir de la termodinámica estadística y cómo determinar la cinética de reacción basados en la teoría clásica del estado de transición²⁹ (TST) o en la VTST.

PARTE 1:

Conceptos fundamentales para el estudio de la reactividad utilizando la química computacional.

1.1. Hiperficie de energía potencial (HEP).

Una hiperficie de energía potencial consiste en la descripción de la energía potencial V , como función de la estructura molecular. Todos los trabajos revisados en esta monografía descansan sobre la validez de este concepto. En la figura 1 se aprecia por ejemplo una curva de energía potencial (corte en una dimensión de la hiperficie) de una molécula diatómica.



Como podemos observar esta curva muestra la variación de la energía potencial de la molécula en función de la distancia internuclear R . En realidad, tratándose de una molécula diatómica, la energía potencial debería depender de 6 grados de libertad. Nótese sin embargo que 3 de esos 6 grados de libertad corresponden a movimientos traslacionales y otros 2 a movimientos rotacionales de la molécula rígida y no afectan la energía interna del sistema. Esto deja únicamente a la distancia internuclear como parámetro del cual depende la energía potencial.³⁰

Figura 1. (ver índice de figuras en anexos)

En la figura 1 vemos que cuando R tiende a infinito, la energía potencial se vuelve constante, en una situación en la que los 2 átomos están separados al infinito (disociación del enlace). En la región intermedia se observa un mínimo y a distancias internucleares cortas la energía potencial aumenta rápidamente debido al predominio de las fuerzas de repulsión electrostáticas entre los dos núcleos.

1.2. Mecánica Clásica sobre una HEP.

Una aproximación muy comúnmente usada consiste en considerar a los átomos lo suficientemente pesados como para ser tratados según las leyes de la mecánica clásica. Se puede entonces estudiar la hipersuperficie de energía potencial de una manera puramente clásica usando las posiciones (R_i) y las velocidades ($v_i=dR_i/dt$) de los átomos constituyentes, a través de una ecuación que nos da la energía clásica total:

$$E(R) = \sum_i \frac{1}{2} m_i (dR_i / dt)^2 + V(R) \quad (1)$$

En este contexto, el movimiento de los átomos y moléculas sobre la hipersuperficie de energía potencial da lugar al concepto clásico de trayectoria empleado para los estudios de dinámica molecular.^{25,28}

Como veremos en la siguiente parte, los campos de fuerza de los métodos clásicos tienen como componente fundamental la descripción analítica de cada una de las distintas contribuciones a la energía potencial total del sistema.

1.3. Mecánica Cuántica sobre una HEP: aproximación de Born-Oppenheimer.

Para interpretar correctamente a la mecánica cuántica es necesario introducir el concepto de dualidad onda-partícula. En los orígenes de la teoría, De Broglie propuso, en base a consideraciones relativistas, que cualquier cuerpo en movimiento tiene asociada una onda, de modo que el momento del cuerpo está inversamente relacionado con la longitud de la onda a través de la constante de Planck³¹. La trascendencia de esta relación reside en que expresa la fusión de dos opuestos: el momento que es una característica propia de las partículas y la longitud de onda propia de las ondas.

Varios resultados experimentales confirman la conjetura de De Broglie, siendo quizás el trabajo más ilustrativo el realizado por Davisson y Germer³¹ en 1925, quienes hicieron incidir un haz de electrones sobre un cristal de níquel y observaron que el patrón de difracción mostraba longitudes de ondas en acuerdo con la relación de De Broglie.

Todos los avances en mecánica cuántica realizados en el primer cuarto del presente siglo, fueron coronados en 1926 con las formulaciones de Erwin Schrödinger³² y Werner Heisenberg³¹.

Una de las ecuaciones fundamentales de la mecánica cuántica es la ecuación de Schrödinger (ES) no relativista e independiente del tiempo que permite determinar la energía y la función de onda asociada a cualquier partícula en un estado dado. En particular se puede resolver la ES

$$\hat{H}_T \Psi(r, R) = E\Psi(r, R) \quad (2)$$

para un conjunto de electrones (descritos por el conjunto de coordenadas r) y núcleos (descritos por el conjunto de coordenadas R), siendo E la energía total del sistema y \hat{H} el operador hamiltoniano asociado a la energía.³²

La HEP que constituye el potencial en el cual se mueven los núcleos del sistema surge en este contexto de resolver la ES independiente del tiempo dentro de la aproximación fundamental de Born-Oppenheimer (BO): Dado que los electrones son mucho más livianos que los núcleos, la función de onda electrónica se ajusta instantáneamente luego de cada movimiento nuclear²³. Esto permite la separación de los movimientos de forma tal que:

$$\hat{H}_T \Psi(r, R) = E \sum_{n,m} \Psi_n(r, R) X_{n,m}(R) \quad (3)$$

donde Ψ_n es la función de onda electrónica que describe a los n electrones del sistema y $X_{n,m}$ es la función de onda que representa los núcleos.

Dentro de la aproximación de BO, la HEP se obtiene calculando la energía y la función de onda electrónica para una posición fija de los núcleos. Para obtener la función de onda electrónica y la energía E_n de todos los electrones del sistema, basta resolver la ES electrónica.

$$\hat{H}_e(r, R) \Psi_n(r, R) = E_n(R) \Psi_n(r, R) \quad (4)$$

La energía electrónica $E_n(R)$ sumada a la repulsión electrostática entre los núcleos (segundo término de la derecha en la ecuación 5):

$$V(R) = E_n(R) + \sum \sum_{N \geq N'} Z_N Z_{N'} / R_{NN'} \quad (5)$$

definen la hiperficie de energía potencial $V(R)$ sobre la cuál se mueven los núcleos. Resolviendo la ES para la parte nuclear:

$$\left[\hat{T}_N + \hat{V}(R)\right]\Psi_{Ni}(R) = E_i \Psi_{Ni}(R) \quad (6)$$

se puede determinar los niveles energéticos vibracionales y rotacionales del sistema¹⁹. Resulta entonces (dentro de la aproximación de BO), que los electrones siguen adiabáticamente el movimiento de los núcleos, los que a su vez se mueven sobre la hiperficie multidimensional $V(R)$.

Esta aproximación es muy buena para tratar con especies químicas cuyas estructuras están cerca del equilibrio y para la mayoría de los estados de transición, pero tiene fallas cuando intervienen más de una HEP que se tocan en un punto o que se cortan³³. Una variedad de procesos tales como las reacciones fotoquímicas y las reacciones de transferencias de electrones comprometen más de una hiperficie de energía potencial, pudiendo ser necesario el uso de métodos teóricos que no recurran a la aproximación de BO.³³

1.4. Evaluación y análisis de la HEP.

La evaluación completa de una HEP supone un gran esfuerzo computacional. El número de grados de libertad internos del sistema crece linealmente con el tamaño del mismo. Dado un sistema con N átomos, la HEP correspondiente tendrá $3N-6$ (o $3N-5$ grados de libertad, si el sistema es lineal) dimensiones. Al mismo tiempo, si no se dispone de una expresión analítica para la función energía potencial (como ocurre en los casos de sistemas complejos), los cálculos deben hacerse punto a punto, construyendo una grilla a partir de la cuál es posible

extrapolar las características de la HEP completa³⁴. Por todo esto, para el caso de los sistemas biomoleculares, resulta inviable la construcción de la HEP completa debiéndose adoptar un nivel de enfoque menos ambicioso del problema.

El enfoque de mínima en el estudio de reacciones químicas se reduce a localizar únicamente los puntos de interés químico sobre la HEP, es decir, aquellos que corresponden a reactivos, productos, intermediarios y estados de transición. La transformación química se define entonces como un movimiento entre el valle de los reactivos y el valle de los productos. El estado de transición, cuya energía determina la velocidad de la reacción, es el punto más alto a lo largo del camino de reacción de mínima energía que une los reactivos y productos. En tanto las especies estables corresponden a mínimos en la superficie, el estado de transición corresponde a un punto de ensilladura de primer orden sobre la HEP.

Un enfoque más completo del problema de la reactividad química (a temperaturas finitas) debería incluir el cálculo las contribuciones térmicas, para lo cual se debe conocer la forma de la HEP en el mínimo, lo que implica al menos el cálculo de las frecuencias de los modos vibracionales en ese mínimo. Incluso si el objetivo es determinar constantes de velocidad de reacción usando las teorías TST o VTST, se requerirá de información sobre la forma de la HEP en el punto de ensilladura de primer orden, en segmentos cortos a lo largo del camino de reacción o incluso del cálculo de ciertos puntos sobre la HEP, a los lados del estado de transición.³⁵

1.5. Puntos de interés químico sobre la HEP.

La primera derivada de la hiperficie de energía potencial corresponde matemáticamente a la definición de gradiente. Las fuerzas sobre los átomos o

núcleos de una molécula son de igual valor y signo opuesto al gradiente. En un mínimo y en un estado de transición, las fuerzas o el gradiente valen cero, por lo cual dichos puntos son llamados frecuentemente puntos estacionarios. Usando únicamente la información que nos brinda la primera derivada de la energía no se puede distinguir *a priori* entre un mínimo y un estado de transición, para ello se debe examinar también la derivada segunda de la HEP. La matriz de derivadas segundas de la energía es llamada matriz Hessiana o matriz de constantes de fuerza. Si la matriz Hessiana es transformada en coordenadas pesadas por la masa y a su vez diagonalizada, los vectores propios del Hessiano permiten calcular las frecuencias de los modos normales de vibración y los valores propios son proporcionales al cuadrado de las frecuencias vibracionales de cada uno de los modos normales³⁶. Cabe destacar que la naturaleza de un punto estacionario no varía con las transformaciones de coordenadas.

Para encontrar un mínimo, en una coordenada particular de la HEP, la derivada segunda con respecto a la energía para esa coordenada debe tomar un valor positivo; análogamente para ser un máximo el valor de la segunda derivada debe ser negativo. Una manera equivalente de caracterizar un mínimo, que requiere diagonalizar la matriz Hessiana, es constatar que todas las frecuencias de vibración de los modos normales deben ser números reales positivos.

Como ya se mencionara, una estructura de transición es el punto más alto a lo largo del camino de reacción de mínima energía que conecta a los reactivos y a los productos. Por lo tanto, debe ser un máximo en una dirección (la que corresponde con la coordenada de reacción) y un mínimo en todas las direcciones restantes, ya que cualquier desplazamiento perpendicular al camino de reacción debe acarrear un aumento de la energía potencial, o lo que es lo mismo un punto de ensilladura de primer orden. Análogamente que para los mínimos, para caracterizar un punto de ensilladura de primer orden, es necesario calcular la

matriz de derivadas segundas y diagonalizarla. Si el Hessiano diagonalizado tiene solamente un valor propio negativo y los restantes positivos se encontró un punto de ensilladura de primer orden. El vector propio del Hessiano que corresponde al valor propio negativo es usualmente llamado vector de transición y apunta a lo largo del camino de reacción.

El camino de reacción puede definirse como una curva en la HEP multidimensional que conecta los mínimos pasando a través del punto de ensilladura de primer orden y que es, en cualesquiera de sus puntos, perpendicular a las curvas isoenergéticas, es decir, que es el camino de descenso más empinado (*steepest descent path*) que conecta al punto de ensilladura con los mínimos³⁷. Si $\vec{x}(s)$ representa el camino y s el arco a lo largo del mismo, entonces \vec{v}^0 , la tangente al camino de reacción, está dada por:

$$\vec{v}^0 = \frac{\partial \vec{x}(s)}{\partial s} = -\frac{\vec{g}(s)}{|\vec{g}(s)|} \quad (7)$$

donde $\vec{g}(s)$ es el gradiente en $\vec{x}(s)$. El camino de reacción puede seguirse integrando esta última ecuación utilizando una gran variedad de métodos numéricos. El camino de reacción solo puede ser definido “colina abajo” con respecto al estado de transición; no se puede seguir un camino de reacción “colina arriba” sin ambigüedades ya que todas las direcciones saliendo de un mínimo son desde el punto de vista energético “colina arriba”, siendo limitadas las direcciones que llevan al punto de ensilladura de primer orden.^{33,35}

Esta definición de camino de reacción es válida sólo para reacciones que ocurren sobre una única HEP (ya sea en el estado fundamental o en uno excitado), y depende de la selección de coordenadas.

La más popular de las definiciones de camino de reacción corresponde al camino de máxima pendiente expresado en coordenadas cartesianas ponderadas por la masa –frecuentemente llamado camino de mínima energía (MEP) o coordenada de reacción intrínseca (IRC)- originalmente propuesto por Fukui^{38,39,40}. El mismo representa la única línea imaginaria (no es una trayectoria real) sobre la HEP para un movimiento infinitamente lento, sin vibraciones y con disipación continua de energía. El IRC es muy ventajoso desde un punto de vista dinámico, ya que permite una observación gráfica del desplazamiento conjunto de los núcleos con el transcurso del tiempo y sirve para delimitar un canal sobre la HEP por el cual transcurre la reacción para bajas energías traslacionales y rotovibratoriales.

Algunos métodos para calcular el camino de reacción, como los métodos basados en la teoría variacional del estado de transición requieren del conocimiento de la curvatura del camino de reacción además de la determinación del camino propiamente dicho. La curvatura, \vec{v}^1 viene dada por:

$$\vec{v}^1 = \frac{\partial^2 x(s)}{\partial s^2} = -\frac{(Hv^0 - (v^{0t} H v^0)v^0)}{|g(s)|} \quad (8)$$

donde H es el Hessiano y \vec{v}^{0t} es el traspuesto del vector tangente. Movimientos a lo largo del camino de reacción y vibraciones perpendiculares al camino pueden ser calculadas sencillamente usando los vectores tangente y de curvatura, \vec{v}^0 y \vec{v}^1 respectivamente.³³

1.6. Métodos para la localización de puntos estacionarios sobre la HEP.

1.6.1. Localización de mínimos.

La optimización de geometría es un paso clave en todos los estudios teóricos que encaran la problemática de la reactividad. Para la localización de mínimos sobre la HEP hay que recurrir a métodos de minimización de la función energía potencial respecto a todos los grados de libertad nucleares del sistema.

Estos métodos de minimización pretenden localizar mínimos relativos; el resultado de una optimización no es necesariamente el mínimo global (el conformero más estable del isómero estructural más estable para la colección de átomos de entrada). La mayoría de los métodos de optimización son iterativos y pueden ser clasificados en tres categorías: i) métodos de búsqueda directa que sólo usan la función energía potencial; ii) los métodos que requieren de la función energía potencial y de su derivada primera; y iii) los métodos que requieren la evaluación de la función energía potencial y las derivadas primera y segunda.

Los métodos de búsqueda directa tienen la ventaja de ser más independientes de la elección del punto inicial en el proceso de optimización y son por lo tanto de aplicabilidad más amplia. Sin embargo, el número de veces que es necesario calcular la energía para lograr la convergencia en un sistema n -dimensional es proporcional a n^2 , lo que se traduce en una convergencia lenta. Para realizar optimizaciones en más de tres dimensiones, cuando no se dispone de una función analítica para el gradiente, es preferible calcular el gradiente numéricamente y usar un algoritmo de la segunda categoría.

Si se dispone del gradiente, la velocidad de convergencia en un proceso de optimización de geometría aumenta considerablemente. Cada paso de

optimización brinda $n+1$ elementos de información adicional sobre la HEP (i.e. la energía propiamente dicha y los n componentes del gradiente en el punto considerado). El método *steepest descent*³⁷ es la aproximación más sencilla, de la segunda categoría de métodos, donde en cada paso se encuentra un mínimo “colina abajo” buscando a lo largo de la dirección negativa del vector gradiente. Este método es muy efectivo al principio de la optimización cuando se trata de bajar rápidamente el valor de la energía, pero una vez cerca del mínimo se hace muy lenta la convergencia.

Los métodos de gradiente conjugado⁴¹ y los quasi-newtonianos⁴² son mucho más eficientes a la hora de hallar un mínimo. Estos métodos están basados en una expresión cuadrática para la función a optimizar y por esta razón son buenos para minimizar la energía en la cercanías del mínimo. Es sencillo comprobar que estos últimos métodos convergen en a lo sumo $n+1$ etapas para una función cuadrática n -dimensional. Los cálculos comienzan con la elección de un sistema de coordenadas y la estimación de la geometría y del Hessiano. Cada ciclo de optimización consiste en el cálculo de la energía, del gradiente, minimizar a lo largo de la dirección de búsqueda, estimar nuevamente el Hessiano, determinar una nueva dirección de búsqueda y verificar la convergencia. Por supuesto que este esquema es general y cada algoritmo tendrá una implementación particular para cada uno de los pasos.

Los métodos basados en el cálculo explícito de la matriz Hessiana o de su inversa, si bien más costosos, son muy útiles cuando se encuentran dificultades en la convergencia al utilizar los otros métodos ya mencionados³³. Cuando no se dispone del Hessiano analítico, el mismo puede obtenerse por diferenciación numérica del gradiente. La determinación de la dirección de búsqueda y el control del tamaño de cada paso en la optimización se logra de la misma forma que en los métodos basados únicamente en el gradiente, de modo tal que estos

métodos pueden ser vistos como un caso especial de los algoritmos quasi-newtonianos, pero con un cálculo explícito de la matriz de derivadas segundas. Con la finalidad de aliviar los cálculos y de aumentar la velocidad de convergencia, es preferible recalcular el Hessiano cada x pasos en lugar de hacerlo en cada paso, o incluso limitar su cálculo únicamente al principio del proceso de optimización.

1.6.2. Localización de puntos de ensilladura.

Encontrar estados de transición para reacciones químicas es al menos un orden de magnitud más difícil que encontrar geometrías de equilibrio. Los métodos quasi-newtonianos son muy robustos y eficientes para minimizaciones, pero cuando son modificados para localizar puntos de ensilladura de primer orden, se reduce considerablemente el radio de convergencia³³. Para los mínimos, la intuición química y una serie de reglas empíricas pueden ser usadas para obtener buenas geometrías de partida que aseguren una rápida convergencia. Sin embargo, para los estados de transición existe únicamente la vaga idea de que se encuentran en algún lugar entre los reactivos y los productos. Hammond ha postulado en 1953 que la estructura del estado de transición de una reacción se asemejaría más a la de los productos para procesos endotérmicos, en tanto que está más próxima a la de los reactivos para procesos exotérmicos.⁴³

Una aproximación que se ha utilizado en la optimización de los estados de transición es la de transformar la búsqueda del punto de ensilladura en una minimización, optimizando la norma del gradiente. Esto último sirve para unos pocos estados de transición siendo el radio de convergencia aún menor que el logrado con los métodos quasi-newtonianos modificados.³³

Conociendo la estructura de los reactivos y de los productos, se puede aproximar el camino de reacción por interpolación lineal entre dichas estructuras. El máximo a lo largo de este camino de reacción es entonces una cruda aproximación a la estructura del estado de transición, y el camino de reacción interpolado lleva el nombre de camino de tránsito sincrónico lineal (LST)⁴⁴. Cabe destacar que por lo general la estructura determinada de esta forma no suele ser un punto de ensilladura de primer orden, pero se acerca lo suficientemente al verdadero estado de transición como para lograr a continuación la optimización con un método quasi-newtoniano.

Un ejemplo reciente de aplicación de estos métodos a problemas de interés bioquímico puede verse en la determinación del camino de reacción para la reacción de fragmentación del dímero de la timina catión radical, realizado por Misako⁴⁵ *et al.* En el mismo, se utiliza la aproximación LST para extrapolar el camino de reacción, el cual posteriormente es refinado para representar correctamente estructuras claves en el mecanismo de fragmentación. Los dímeros de pirimidinas se forman por irradiación del ADN, en el núcleo celular, en la región UV-lejana (200-300 nm) con resultados tóxicos y mutagénicos para las células⁴⁶. La oxidación fotoinducida del ADN es una de las formas de llevar a cabo la fragmentación de los dímeros de pirimidinas, reacción que procede a través del dímero catión radical. Recientemente se descubrió que complejos de Rodio(III) fotooxidantes, que se intercalan al ADN catalizan su reparación a la luz solar, abriendo nuevos horizontes para una futura quimioterapia⁴⁷. Poco se conoce del proceso de reparación del ADN por los enzimas fotoliasas, si bien se acepta generalmente que la fragmentación es debida a la simple transferencia de un electrón desde el coenzima FAD (en el centro catalítico de las fotoliasas) hacia el dímero, reacción que procedería entonces a través de un dímero anión radical⁴⁸.

Una opción aún más certera para localizar el estado de transición, consiste en realizar una interpolación parabólica del camino de reacción entre los reactivos y los productos. El camino de reacción así determinado lleva el nombre de camino de tránsito sincrónico cuadrático (QST)⁴⁴ y el máximo sobre el mismo resulta en una mejor estimación de la estructura del estado de transición.

Se han implementado una gran variedad de algoritmos, que no mencionaremos en este trabajo, basados en el cálculo del gradiente, que alternan entre la maximización a lo largo de un camino de reacción aproximado y la minimización perpendicular a dicho camino.

PARTE 2: Métodos clásicos y métodos cuánticos.

Los trabajos revisados en esta monografía utilizan en forma complementaria o alternativa métodos que recurren a distintas aproximaciones para caracterizar los puntos de interés químico sobre una hiperficie de energía potencial. Parte de estos métodos (los más simples) están basados en modelos de la física clásica y se los conoce como métodos clásicos o de mecánica molecular, que han sido los más utilizados en los primeros estudios sobre sistemas biológicos. Por otra parte, las últimas décadas han sido testigo del gran desarrollo de los métodos basados en la resolución de las ecuaciones de la física moderna o cuántica conocidos globalmente como métodos cuánticos. Finalmente la década del '90 ha sido marcada por la utilización de ambos tipos de métodos en forma mixta.

2.1. Métodos clásicos.

Los métodos de mecánica molecular usan una función analítica, diferenciable y relativamente sencilla de la energía potencial, para describir la interacción entre un conjunto de átomos en función de sus posiciones relativas.

A diferencia de los cálculos que hacen uso de los primeros principios de la mecánica cuántica, los métodos de mecánica molecular deben ser vistos como un simple procedimiento de ajuste, usado con la intención de lograr lo más exactamente posible una representación de la función energía potencial, sin preocuparse demasiado por los fundamentos teóricos. De todos modos, se encuentra que los mejores procedimientos de ajuste con utilidad genérica, llevan a términos en la función potencial que pueden ser atribuidos a interacciones químicas fundamentales. Los términos analíticos, propios de cada campo de

fuerza, que componen el funcional energía potencial, describen tanto las interacciones enlazantes como las no enlazantes. Usualmente las energías de las interacciones enlazantes son arbitrariamente cero para una configuración de los átomos ideal y describen el aumento de la energía conforme se va deformando dicha configuración. Por ejemplo, en un potencial de mecánica molecular típico, encontramos generalmente términos analíticos sencillos que permiten obtener la contribución a la energía de las distancias, ángulos y diedros de enlace estándar, junto a términos que describen interacciones no enlazantes tales como las de van der Waals, y las electrostáticas (que surgen de la interacción entre las cargas, dipolos, cuadrupolos, multipolos de orden superior). Algunas veces se le suma al potencial un término que tiene en cuenta explícitamente la formación de puentes de hidrógeno, si bien puede en principio asumirse que estas interacciones están consideradas en los términos electrostáticos.³⁰

Para ser de utilidad, los potenciales obtenidos a partir de los métodos de mecánica molecular, deben lograr un equilibrio entre la simplicidad de los términos analíticos que forman parte de la función energía potencial y la exactitud con la cuál se describen importantes características de la función energía potencial exacta $V(R)$. La simplicidad de dichos términos analíticos permiten que la energía y sus derivadas sean rápidamente evaluadas, incluso para sistemas de gran tamaño, de aquí su importancia en el estudio de sistemas de interés bioquímico. El desarrollo de estos campos de fuerza de mecánica molecular es, desde hace ya varios años, un área con importante actividad de investigación con el resultado de que hoy en día se dispone de numerosas metodologías estándar para el estudio conformacional de proteínas, ácidos nucleicos, que pueden incluir los efectos del solvente, etc.

Los campos de fuerza son usualmente desarrollados para un tipo específico de moléculas y su uso puede dar pobres resultados cuando son usados fuera del

rango de moléculas para el cuál fueron desarrollados, o incluso fallar (ya sea por la falta de parámetros o la por falta de expresiones analíticas adecuadas). Esto lleva a que en casos de problemas específicos sea necesario desarrollar campos de fuerza “a medida”, como el desarrollado para el estudio de la interacción entre nucleótidos de guanina y complejos con Platino.⁴⁹

Además de los términos funcionales analíticos ya discutidos, otros dos elementos importantes que definen un campo de fuerza son el tipo de átomo y el conjunto de parámetros o constantes de fuerza.

El tipo de átomo depende del entorno químico de un átomo determinado en una molécula, aspecto que es probablemente único a esa molécula y por lo tanto podría parecer que las combinaciones de tipos de átomos son *a priori* infinitas. Para fijar ideas, veamos el ejemplo concreto del campo de fuerza AMBER desarrollado por el grupo de Kollman's⁵⁰, el cual define cinco tipos de átomos para el oxígeno:

Tipo de átomo	Situación química que representa
O	oxígeno en grupos carbonilos.
OH	oxígeno en grupos hidroxilos (alcoholes).
O ₂	oxígeno en grupos carboxilos o junto a fosfatos.
OS	oxígeno en grupos ester o eter.
OW	oxígeno en una molécula de agua.

Tabla 1. (ver índice de Tablas en anexos)

En mecánica molecular las interacciones son calculadas a partir de los tipos de átomos, no de los elementos. Existen dos aproximaciones básicas: los campos de fuerza que usan como estrategia la definición del tipo de átomo de forma individual (*all atom type*) o aquéllos que lo hacen en forma agrupada (*united atom type*). El campo de fuerza AMBER define los tipos de átomos individualmente. Por ejemplo, para un grupo metilo cada átomo de Hidrógeno y el de Carbono reciben

un tratamiento individual. En cambio, los campos de fuerza basados en una estrategia unificadora representan al grupo metilo con un solo tipo de átomo, ubicado en la posición del carbono central pero con características propias de un grupo metilo, reduciendo así el número de términos reales presentes en el cálculo de la energía potencial total de la molécula. Esto es importante a la hora de reducir los requerimientos de cálculo en el estudio de sistemas de grandes dimensiones, donde las interacciones no enlazantes crecen rápidamente.

El campo de fuerza AMBER ya mencionado ha sido desarrollado en forma genérica para el estudio de proteínas y ácidos nucleicos, y permite trabajar con interacciones entre átomos individuales, o incluso definiendo los tipos de átomo de forma agrupada. Existen diversos campos de fuerza, cada uno de los cuales tienen generalmente varias implementaciones diferentes. Mencionaremos brevemente algunos, que son los que están disponibles en los programas de uso más común, y de los que discutiremos a continuación algunos ejemplos concretos de aplicación.

MM+: ha sido desarrollado para el estudio de moléculas orgánicas (con especial énfasis en algunos grupos específicos de ellas). Es un campo de fuerza de generalidad limitada, en el que cada átomo es representado en forma individual.^{51,52}

OPLS: ha sido desarrollado por Jorgensen y colaboradores, para trabajar con proteínas y ácidos nucleicos⁵³. Es similar al AMBER, pero trata las interacciones de tipo no enlazante en forma más exacta, lo cual lo vuelve particularmente adecuado para el estudio de problemas en donde las moléculas de solvente son incluidas en el estudio explícitamente. Utiliza únicamente tipos de átomo individuales para evaluar las interacciones.

CHARMM: desarrollado por el grupo de Karplus en Harvard, trabaja con macromoléculas biológicas, y tiene la posibilidad de considerar interacciones entre átomos individuales o agrupados. Cabe destacar que la disponibilidad de parámetros se limita a un conjunto específico de aminoácidos, y no incluye términos para describir el enlace de hidrógeno.⁵⁴

Un buen ejemplo de la aplicación de los campos de fuerza mencionados al estudio de sistemas de interés bioquímico, es el trabajo realizado en 1996 por Orozco y colaboradores quienes estudiaron teóricamente las interacciones de apilamiento (*stacking*) para las formas A y B del ADN.⁵⁵

Las interacciones de apilamiento entre sistemas aromáticos resultan ser un fenómeno esencial en numerosos procesos químicos y bioquímicos. Estas interacciones influyen significativamente sobre la estructura y estabilidad de las biomoléculas, por tanto su conocimiento detallado puede ser de gran ayuda en el diseño de drogas intercalantes, y para la comprensión de los polimorfismos secuencia dependientes del ADN.

Orozco y colaboradores se centran en estudiar la energía de apilamiento utilizando entre otros los métodos clásicos, específicamente los campos de fuerza AMBER y OPLS, y comparando los resultados obtenidos. Estos autores definen la energía de apilamiento entre dímeros de pares de bases, como el resultado de la suma de las distintas contribuciones intra-hebra ($5' \leftrightarrow 3'$) e inter-hebra ($5' \leftrightarrow 5'$) y ($3' \leftrightarrow 3'$) de ADN. La energía relativa de apilamiento entre los pares de bases es determinada como la diferencia entre la energía del complejo y la energía de las bases aisladas.

Todas las energías de las interacciones de apilamiento 1-2 entre dímeros fueron determinadas con métodos cuánticos que veremos en detalle en la próxima parte,

para lo cuál fue necesaria la optimización de la energía de cada base nucleotídica y luego de los 10 posibles dímeros, procesos que abarcaron, cada uno, varios meses de tiempo de cálculo.

Para estudiar la energética de las interacciones de apilamiento 1-3, fue necesario recurrir a otro tipo de metodología, ya que el número de átomos comprometidos en los cálculos vuelve prohibitivo el uso de métodos cuánticos *ab initio*. De aquí surge el interés en poder utilizar metodología clásica, donde la resolución de las sencillas ecuaciones analíticas y diferenciables de los campos de fuerza, reducen significativamente los tiempos y costos computacionales. En este sentido en este trabajo, se reoptimizaron nuevamente todas las estructuras y se midieron las energías relativas de interacción de apilamiento 1-2 entre dímeros, con los campos de fuerza AMBER y OPLS. Los valores de energía así obtenidos fueron comparados con sus análogos resultantes de los cálculos *ab initio*, siendo utilizado para el estudio de las interacciones 1-3, el campo de fuerza que mejor reproducía los datos cuánticos. Este tipo de procedimiento se conoce con el nombre de validación del método.

El estudio de Orozco⁵⁵ *et al* puso en evidencia que las energías de interacción de apilamiento 1-2 entre dímeros calculadas con AMBER-94 y OPLS se correlacionan bien con los resultados cuánticos. Se aprecia cualitativamente, que ambos campos de fuerza reproducen razonablemente los valores de energía para las interacciones de apilamiento, si bien el campo de fuerza AMBER falla en la descripción cuantitativa de la energía, dando valores muy por encima de los obtenidos con los cálculos más exactos y los provenientes de la información experimental disponible.

Secuencia (5'-X ₁ -Y ₁ -3') (3'-Y ₂ -X ₂ -5')	ADN forma B			ADN forma A		
	5'-5'	3'-3'	Total	5'-5'	3'-3'	Total
A-A	-0.42	-1.19	-1.61	-0.46	-2.10	-2.56
T-T	-0.91	-2.05	-2.96	-0.48	-3.43	-3.91
A-G	0.27	0.11	0.38	0.31	1.24	1.55
T-C	-0.36	-1.88	-2.24	0.01	-1.39	-1.38
G-A	0.09	0.68	0.77	0.53	0.32	0.85
C-T	0.91	-0.03	0.88	0.41	-0.94	-0.53
G-G	-3.16	-2.21	-5.37	-2.45	-2.41	-4.86
C-C	-3.63	-3.55	-7.18	-2.63	-4.32	-6.95
A-T	-0.09	0.42	0.33	-0.39	0.39	0.00
T-A	-1.39	0.04	-1.35	-0.92	-0.59	-1.48
G-T	-2.23	-0.30	-2.53	-2.17	-1.78	-3.95
C-A	-2.54	-0.16	-2.70	-1.90	-1.76	-3.66
G-C	1.60	2.56	4.16	2.70	1.36	4.06
C-G	0.73	3.44	4.17	2.51	2.22	4.73
T-A	0.29	-0.79	-0.50	0.35	2.20	2.55
A-T	0.21	-2.87	-2.66	0.36	-1.33	-0.97
T-G	-0.34	-2.82	-3.16	-0.34	-1.64	-1.98
A-C	-0.50	-5.97	-6.47	-0.29	-3.75	-4.04
C-G	0.99	-2.35	-1.36	-0.84	0.29	-0.55
G-C	1.17	-4.97	-3.80	1.10	-0.48	0.62

Tabla 2.

Los resultados calculados con el campo de fuerza OPLS reproducen adecuadamente los valores derivados de los métodos cuánticos, aunque la correlación entre dichos cálculos es mejor para el caso de las interacciones inter-hebra que para las interacciones intra-hebra. En este sentido los autores sugieren que la próxima generación de campos de fuerza a desarrollar debería lograr un mejor equilibrio en la forma de modelar las interacciones de apilamiento intra e inter hebra.

La reparametrización⁵⁶, el agregado de tipos de átomos no definidos⁴⁹ y la corrección de los términos analíticos de la función energía potencial⁵⁷, son procesos recurrentes cuando se trabaja con campos de fuerza de mecánica molecular, con la finalidad de representar mejor ciertas propiedades o extender el método a una familia más amplia de moléculas.

El conocimiento de los factores que modulan las interacciones de apilamiento entre pares de bases nucleotídicas son difíciles de determinar tanto teóricamente como experimentalmente. Con las técnicas experimentales disponibles es prácticamente imposible discernir entre las contribuciones de apilamiento puras y las contribuciones de las interacciones provenientes del grado de hidratación del sistema, la formación de puentes de hidrógeno, los cambios conformacionales locales y otros efectos. En este mismo sentido, los pequeños dinucleótidos utilizados usualmente como modelos para el estudio experimental de las interacciones de apilamiento tienen patrones de apilamiento muy diferentes que los del ADN polimérico. Por otro lado, un estudio teórico riguroso requiere el uso de metodología cuántica de alto nivel, aplicado a un sistema de grandes dimensiones, siendo esto impracticable hoy en día por los elevados costos computacionales que insumirían los cálculos. El apropiado modelado teórico del entorno fisiológico del ADN es una tarea difícil de abordar, obligando generalmente a extrapolar los datos obtenidos en fase gaseosa a las condiciones reales fisiológicas.

Por estos motivos, hallar o implementar un campo de fuerza que reproduzca correctamente las propiedades de interés, resulta ser un preciado legado a la hora de encarar problemas que comprometen interacciones entre moléculas estables para sistemas con un gran número de átomos. De todos modos, como lo ilustra el trabajo de Orozco *et al*, es siempre necesaria una etapa de validación del campo de fuerza con cálculos derivados a primeros principios y/o con la información experimental disponible, para lo cuál generalmente se hace uso de modelos de mínima como estrategia.

Si bien el estudio de Orozco⁵⁵ y colaboradores no aborda la reactividad propiamente dicha, el mismo puede verse como un paso previo imprescindible

para futuros estudios de reactividad donde la energía de apilamiento entre bases del ADN juegue un rol preponderante.

Dado que los campos de fuerza de mecánica molecular no tratan explícitamente a los electrones, resulta imposible describir procesos de ruptura y formación de enlaces, de ahí la dificultad de estudiar reactividad con métodos clásicos, que se aplican generalmente mejor a moléculas estables cerca del equilibrio. No obstante, se encuentra en la literatura varios ejemplos de estudios teóricos donde se determinan estados de transición y caminos de reacción de enzimas, con campos de fuerza de mecánica molecular.^{58,59,60}

Un caso concreto lo representa el estudio realizado por Lazaridis y Paulaitis, quienes determinaron con el campo de fuerza CHARMM las transiciones conformacionales del sitio activo de la α -quimiotripsina¹¹. Este enzima es una serina proteasa que cataliza la hidrólisis de enlaces amida y éster, especialmente cuando los mismos se encuentran cerca de un grupo aromático.

Una importante gama de estudios de RMN en solución que intentan determinar la dinámica del sitio activo de la α -quimiotripsina, han mostrado que el grupo aromático tosilo unido a la serina 195 rota rápidamente en solución⁶¹. Estos resultados no concuerdan con las observaciones provenientes del estudio de la estructura cristalina del enzima, donde se observa que el grupo tosilo aparece fuertemente unido en un bolsillo hidrofóbico cerca del sitio activo⁶². A partir de medidas del corrimiento químico, también se determinó que el entorno químico alrededor del anillo tosilo era predominantemente polar⁶¹. Estas observaciones experimentales pueden recibir dos explicaciones posibles: Por un lado resulta posible que el bolsillo hidrofóbico en el sitio activo del enzima sufra un relajamiento en solución tal que la entrada de moléculas de agua permita la rápida rotación del

anillo aromático. Por otro lado resulta verosímil que el anillo tosilo no se encuentre todo el tiempo en el bolsillo hidrofóbico, dando lugar a un equilibrio entre varias conformaciones fuera y dentro del mismo. El trabajo teórico de Lazaridis y Paulaitis intenta constatar cuan flexible es el sitio activo del enzima y de que manera dicha flexibilidad puede afectar la actividad catalítica.

Se ha determinado con numerosos estudios cuánticos el camino de reacción catalítico de varias enzimas de la familia de las serina proteasas.^{63,64} Por otro lado, las energías de enlace substrato-enzima han sido determinadas con métodos de mecánica molecular⁶⁵ y se han realizado simulaciones de dinámica molecular usando campos de fuerza empíricos sobre diversas serina proteasas.^{66,67} Sin embargo, ninguno de los trabajos se centró en aspectos dinámicos de la catálisis de las serina proteasas tales como la unión en el bolsillo hidrofóbico y la movilidad de los grupos catalíticos.

Con las técnicas y la potencia computacional disponible actualmente, las simulaciones de dinámica molecular convencionales pueden analizar la dinámica de proteínas durante escalas de tiempo de simulación relativamente cortas, del orden de los nanosegundos. Sin embargo, es sabido que la mayoría de los movimientos de las proteínas con algún significado funcional bioquímico ocurren en escalas de tiempo mucho más largas. Por lo tanto la determinación de la cinética de dichos procesos no se puede realizar con las metodologías convencionales.

Una opción alternativa reside en usar la teoría del estado de transición. Esta aproximación ha sido usada por primera vez, en la determinación de la cinética de reacción de la rotación del anillo aromático de una tirosina del sitio activo del enzima inhibidor de la tripsina pancreática bovina (BPTI), brindando información

detallada de la dinámica de la reacción, sin tomar en cuenta las contribuciones de la entropía a la energía libre de activación.⁶⁸

En el trabajo de Lazaridis y Paulaitis, el código del programa CHARMM⁶⁹ fue modificado para incorporar la búsqueda del estado de transición y la determinación del camino de reacción realizándolos sobre una superficie de energía potencial adiabática reducida. Únicamente cuatro grados de libertad torsionales fueron considerados, reduciendo así enormemente las dimensiones de la HEP. Los autores consideraron los cuatro diedros que se encuentran entre el residuo de serina 195 y el anillo aromático:

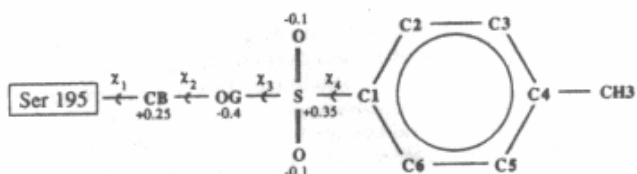


Figura 2.

Para la determinación de los estados de transición se usaron dos estrategias. Se usó el algoritmo de Cerjan-Miller⁷⁰ para explorar la superficie de energía potencial adiabática reducida. Este algoritmo requiere de la información de las derivadas segundas que se obtienen numéricamente y resultó para este estudio muy costoso computacionalmente aún empleando métodos clásicos. El uso de las derivadas segundas de la energía implica además que los autores deben agregar una aproximación al modelo, ya que la siguiente relación:

$$\frac{\partial^2 E_{adiab}}{\partial \chi_i^2} = \frac{\partial^2 E}{\partial \chi_i^2} \quad (9)$$

sólo es válida cuando prácticamente no existe acoplamiento entre los grados de libertad internos del sistema. Sin embargo, la relación de igualdad entre el gradiente adiabático reducido y el gradiente correspondiente a la HEP total siempre es válida, por lo cual los autores resuelven usar alternativamente un método de determinación del estado de transición que requiere únicamente de la información de las derivadas primeras de la energía potencial. El método utilizado, como segunda estrategia, es similar al desarrollado por Elber y colaboradores⁷¹, que se basa en la proyección del gradiente y en el control de las etapas para ir explorando el camino de reacción, en particular en las inmediaciones de un estado de transición.

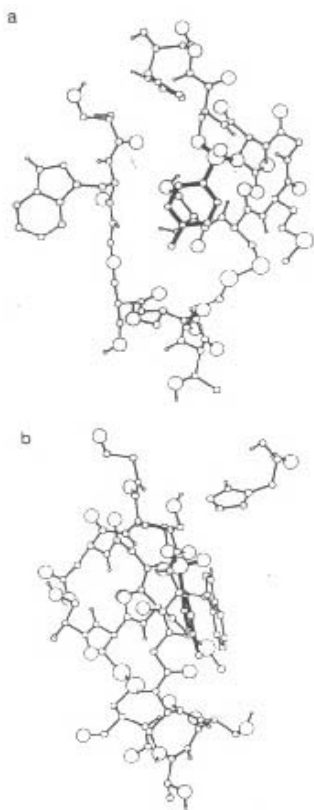


Figura 3.

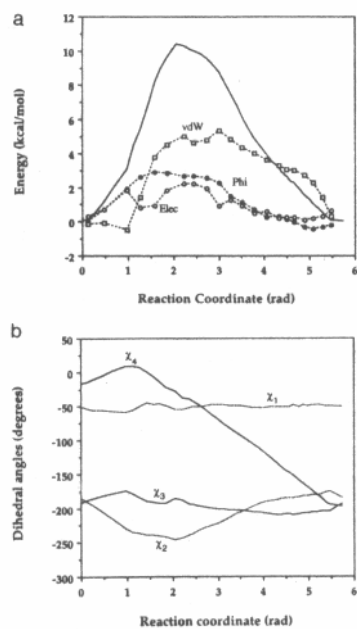


Figura 4.

En la figura 3 mostramos uno de los estados de transición obtenidos, y en la figura 4 la coordenada de reacción determinada para la rotación del anillo en el sitio activo del enzima.

Desde un punto de vista metodológico, los resultados obtenidos por Lazaridis y Paulaitis muestran que es posible determinar el camino de reacción multidimensional correspondiente a los rearrreglos conformacionales en el sitio activo de un enzima sobre una superficie de energía potencial adiabática reducida, la cual da buenos resultados incluso para moléculas del tamaño de una proteína. Las posibles fallas de esta aproximación son en general obvias al usuario y pueden ser corregidas aumentando el número de grados de libertad explícitos considerados.

Desde un punto de vista bioquímico, los autores sugieren que el anillo aromático alterna entre conformaciones dentro y fuera del bolsillo hidrofóbico en el sitio activo de la α -quimiotripsina y postulan que el grupo tosilo es capaz de rotar tanto dentro del bolsillo como fuera del mismo en solución, ya que las escalas de tiempo para el movimiento dentro y fuera del bolsillo son muchas más largas que las correspondientes a la rotación. En el trabajo los autores incorporaron a través de una simulación de dinámica molecular el efecto del solvente, necesario para lograr una descripción completa del sistema. Las metodologías usadas en la bibliografía reciente con la finalidad de incorporar el efecto del solvente son sumamente amplias y variadas, pudiendo ser tema de otro trabajo monográfico similar al presente, por lo cual no serán tratadas aquí. La incorporación del efecto del solvente es sin embargo fundamental para lograr una visión global de la dinámica del sitio activo de la α -quimiotripsina, más aún sabiendo que cuando el grupo tosilo se encuentra fuera del bolsillo hidrofóbico, éste se llena de moléculas de agua, relajando toda la estructura. Cuando el anillo aromático regresa al interior

del bolsillo para fijar el sustrato, todas las moléculas de agua son desplazadas excepto dos de ellas, las cuales se considera que juegan un rol biológico importante en la unión del sustrato al sitio activo.

Supongamos ahora que se quisiera realizar un estudio de la reactividad del sitio activo de un enzima, en términos de ruptura y formación de enlaces. Para ello, es necesario recurrir a metodologías que traten explícitamente a los electrones como las basadas en la física cuántica y que pasaremos a describir.

2.2. Métodos cuánticos.

Uno de los objetivos primarios de la mecánica cuántica molecular es la resolución de la ES no relativista e independiente del tiempo, y en particular el cálculo de la estructura electrónica de las moléculas. En esta parte revisaremos algunas de las técnicas utilizadas para resolver la ES electrónica molecular y sus aplicaciones. Cabe destacar que todas las técnicas aquí presentadas están basadas en la aproximación de BO y se centran en la resolución de la ES únicamente para la parte electrónica del sistema considerado. (ver ecuación 4, p. 19)

Nótese que para una determinada posición fija de los núcleos, el Hamiltoniano electrónico viene dado por la siguiente expresión:

$$H_e = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_i^n \nabla_i^2 - \sum_i^n \sum_l^N \frac{Z_l e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{li}} + \frac{1}{2} \sum_{ij}^n \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (10)$$

donde \hbar^2 es una modificación de la constante de Planck y vale $h/2\pi$, r_{ii} las distancias entre los electrones y los núcleos, y r_{ij} las distancias entre los electrones.

Por lo general, como convención, no se agrega en el cálculo de la estructura molecular el término de energía que corresponde a la repulsión nuclear, sino que en cambio, se lo suele sumar como un término clásico al final del cálculo de ES electrónica.

Esta parte de la monografía se concentra en el cálculo de la función de onda electrónica y de la energía electrónica $E_n(R)$. Sin embargo, una vez que conocemos estas dos últimas magnitudes es posible determinar una amplia gama de importantes propiedades tanto físicas como químicas como lo veremos más adelante en la cuarta parte de este trabajo.

2.2.1. Métodos Hartree-Fock o del Campo Auto Consistente.

La complicación crucial en el cálculo de cualquier estructura electrónica nace de la presencia de los términos de repulsión interelectrónica, que dependen de la separación entre los electrones r_{ij} como puede verse en el tercer término de la ecuación 10. La ES se vuelve tan compleja de resolver analíticamente para sistemas polielectrónicos, que hay que recurrir a aproximaciones tanto físicas como numéricas.

La aproximación física del método de Hartree-Fock (HF) consiste en considerar a cada uno los electrones moviéndose en el campo creado por los núcleos y un campo promedio generado por los restantes $n-1$ electrones, lo cual genera un

error intrínseco conocido como error de correlación que será tratado en una sección posterior. De esta manera, es posible expresar el Hamiltoniano electrónico como la suma de Hamiltonianos efectivos (F_i) que dependen de las coordenadas de un solo electrón:

$$H_e \approx H_e^{HF} = \sum_i^N F_i \quad (11)$$

siendo

$$F_i = -\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{i,A}} + V_i^{HF} = h_i + V_i^{HF} \quad (12)$$

$$V_i^{HF} = \sum_{j \neq i} \int |\Phi_j(\tau_j)|^2 \frac{1}{r_{ij}} d\tau_j \quad (13)$$

donde Φ_j es el orbital molecular (MO) del electrón j .

Obsérvese que el cálculo de estos potenciales efectivos V_i^{HF} requiere el conocimiento de la posición promedio de los restantes electrones para cada posición del i -ésimo electrón. Esto implica conocer previamente la solución que se busca, por lo tanto se requiere el empleo de un procedimiento iterativo. Esta es la base del método del campo auto-consistente (SCF), que reduce el problema de la resolución de la ES polielectrónica a la resolución de N ecuaciones monoeléctricas. Cuando las soluciones del procedimiento numérico iterativo son auto-consistentes con el criterio de convergencia establecido, el proceso culmina y las funciones de onda resultantes, optimizadas variacionalmente, deben ser consideradas como soluciones aceptables.

Cuando se calcula la estructura electrónica, dentro de la aproximación de HF, para sistemas de capa-cerrada (en los cuales el número de electrones es siempre

un número par), se suele considerar que la parte espacial de los spin-orbitales – productos de la función de onda orbital y de una función de spin- para dos electrones apareados es la misma. Esta consideración reduce el tiempo de cálculo y lleva el nombre de *Restricted Hartree-Fock* (RHF). En cambio para sistemas de capa-abierta no es posible hacer la misma consideración sin introducir errores graves en el cálculo, por lo cuál la parte espacial de los spin-orbitales de cada electrón es tomada por separado dando lugar a cálculos de tipo *Unrestricted Hartree-Fock* (UHF).

Las funciones de onda resultantes de un cálculo HF (Ψ_k^{HF}), se expresan matemáticamente como determinantes de Slater para cumplir con la condición de antisimetría, impuesta por los principios de mecánica cuántica, inherente al hecho de estar trabajando con partículas que son fermiones.³¹ Adicionalmente estos determinantes de Slater se construyen usando orbitales moleculares que son combinaciones lineales de orbitales atómicos (MO-LCAO).

Una vez planteado lo anterior existen dos alternativas metodológicas: a) calcular todas las integrales necesarias para resolver la ecuación 4 (p. 19). Este tipo de cálculo se conoce con el nombre de SCF *ab initio*; b) reducir el costo del cálculo introduciendo parámetros y despreciando integrales. Este último tipo de cálculo se conoce con el nombre de semiempírico.

Todos los trabajos revisados en esta monografía, que hacen uso de metodología *ab initio*, parten de la optimización de geometría a nivel HF de las especies químicas involucradas. Por lo general los resultados HF obtenidos son corregidos con cálculos de mayor nivel (con correlación), o comparados a cálculos de menor nivel con la finalidad de validar estos últimos. De hecho, en el trabajo de Orozco⁵⁵ *et al* presentado en la parte previa de métodos clásicos, las estructuras y

energética resultantes de la optimización de geometría con el campo de fuerza AMBER y OPLS fueron comparados con los correspondientes valores obtenidos a partir de la optimización de geometría a nivel HF para validarlos.

2.2.2. Métodos *ab initio* y la elección del conjunto de base.

Como se introdujo previamente, en el caso de los métodos *ab initio*, el determinante de Slater se construye a partir de MO que son combinaciones lineales de orbitales atómicos (AO). Resta entonces elegir la forma funcional para representar tales AO. Esta selección considera el tipo de función de base y su tamaño, y al conjunto de funciones elegidas se lo llama conjunto de base. Una primera alternativa viene dada por los orbitales tipo Slater (STO)⁷². Los mismos tienen un comportamiento físico adecuado (cumplen con condiciones de contorno de los AO exactos, tales como la cúspide de Kato⁷³), pero su uso práctico se reduce al caso de átomos y moléculas lineales. Esto se debe a que la evaluación de las integrales bielectrónicas tri y tetracéntricas no puede ser realizada en forma eficiente usando bases de STO. El segundo tipo de función, son los orbitales tipo gaussiana (GTO), introducidos por Boys⁷⁴ en la década del '50 y actualmente los más utilizados. Si bien no cumplen con las condiciones de contorno de los AO en valores muy pequeños y grandes de r_{ii} , la evaluación de las integrales se vuelve sumamente eficiente permitiendo su aplicación a sistemas complejos. Para superar las debilidades de los GTO, se consideran combinaciones lineales de los mismos, llamadas gaussianas contraídas (CGTO).⁷⁵

En principio el conjunto de base debería ser infinito de manera de representar correctamente los spin-orbitales moleculares. La energía que se obtendría en esas condiciones se conoce con el nombre de límite de HF, el cual difiere con la energía exacta de la molécula en el error de correlación. En la práctica, la

necesidad de utilizar un conjunto de base finito introduce un segundo tipo de error, asociado justamente a la truncación de la base. Para el estudio de una propiedad dada, en general se busca lograr un compromiso entre la extensión de la base (o lo que es lo mismo en el tiempo requerido para el cálculo) y la exactitud del resultado.

En función de lo anterior, existen distintos grupos de conjuntos de base que son usados en los estudios aquí revisados: a) Bases mínimas: utilizan una sola función por AO. Dentro de este grupo están las bases de Pople del tipo STO-NG⁷⁶; b) Bases extendidas: utilizan más de una función por AO. Por ejemplo las bases doble ξ (DZ) utilizan dos funciones STO (aproximadas por CGTO) para cada AO, o las bases triple ξ (TZ) que usan tres funciones por cada AO; c) Bases Split Valence: combinan los tipos anteriores, usando una descripción de base mínima para los AO internos (*core*) y una extendida para los AO de valencia. A este grupo pertenecen las bases más usadas en el estado de arte actual para problemas de reactividad (6-31G, 6-311G, etc.)³⁶; d) Funciones de polarización: usualmente se adicionan a la base utilizada para obtener una mejor descripción de la deformación que sufren los AO al integrar el sistema molecular. Poseen momento angular mayor que el correspondiente al AO que complementan; e) Funciones difusas: Son gaussianas con contribuciones en las zonas más alejadas del núcleo que se utilizan en casos donde el sistema en estudio posee esa región poblada de electrones (estados excitados de Rydberg y aniones).

Otra consecuencia de la truncación del conjunto de base aparece cuando se estudian interacciones moleculares. En estos casos la energía de interacción suele ser sobreestimada, efecto que se debe al hecho que la base usada para estudiar el complejo resultante es más completa que la empleada para describir cada fragmento, y que se conoce como error de superposición de base (BSSE)⁷⁷.

Existen varias formas de corregir este error, siendo quizás lo más popular el método de Counterpoise (CP)⁷⁸, utilizado por ejemplo en el trabajo de Orozco⁵⁵ *et al* ya mencionado previamente, para corregir el BSSE en el cálculo de las energías de apilamiento entre bases de ADN al nivel 6-31G(d).

La elección cuidadosa del conjunto de base adecuado para el estudio de un sistema y/o propiedad particular, frecuentemente requiere del análisis de la sensibilidad de dicha propiedad a la variación del conjunto de base. Un buen ejemplo de aplicación de este proceso lo representa el trabajo de Nagy⁷⁹ *et al*, en el que se determina la energética de varios tautómeros neutros y protonados de la histamina y la (α R, β S)- α,β -dimetilhistamina.

El interés bioquímico de la histamina, reside en el estímulo directo que provoca, via receptores H₁, en la contracción de varios músculos lisos como es el caso de los músculos bronquiales, intestinales y uterinos. La histamina también cumple un importante rol fisiológico en la regulación de los ácidos estomacales, actuando sobre otro receptor caracterizado y definido como receptor H₂. Varios estudios teóricos fueron realizados sobre la histamina y sus derivados dimetilados, pero hasta la fecha del trabajo de Nagy y colaboradores, ninguno de ellos había prestado la debida atención al efecto del conjunto de base y la correlación electrónica.

En la tabla 3 se resume el efecto de la base sobre la diferencia de energías existentes entre los tautómeros t3H⁺ y g3H⁺ (donde t3H⁺ corresponde a la conformación trans que tiene un hidrógeno en N3 y está protonado en N8; g3H⁺ corresponde al conformero *gauche*. Los átomos están numerados según la convención introducida por IUPAC IUB para la histamina).⁸⁰ Ambos tautómeros de la histamina fueron optimizados a nivel HF/6-31G(d), realizándose luego cálculos

single-point (a geometría fija) con bases mayores y con la inclusión de la energía de correlación al nivel MP2, aspecto que se discute más adelante en esta sección.

	E(t3H ⁺) – E(g3H ⁺)	
	HF	MP2
6-31G(d)	12.49	15.31
6-31G(d,p)	12.74	15.48
6-31+G(d,p)	11.85	14.13
6-31++G(d,p)	11.82	14.14
6-311G++(d,p)	11.75	14.20

Tabla 3.

Como se puede apreciar de estos datos, la mayor diferencia se da entre la base 6-31G(d,p) y 6-31+G(d,p), es decir luego de la inclusión de una primera función difusa. La adición de una segunda función difusa, o incluso el uso de un conjunto de base *split valence* triple, no introduce cambios sustanciales en los valores relativos de energía.

Otro resultado del estudio de Nagy *et al*, interesante para ilustrar el efecto de la base sobre la energética de isómeros neutros y protonados se resume en la tabla 4:

	g1H	g3H	t3H	t1H	g3H ⁺	T3H ⁺	g1H ⁺	t1H ⁺
HF/3-21G//HF/3-21G	0.00	3.51	5.03	5.62	0.00	18.84	26.84	31.68
HF/6-31G(d)	0.00	2.32	3.05	3.38	0.00	12.49	19.66	23.97
HF/6-311++G(d,p)	0.00	2.02	2.12	2.66	0.00	11.75	19.37	23.43
MP2/6-31G(d)	0.00	2.58	4.35	5.28	0.00	15.31	21.47	27.32
MP4SDQ/6-31G(d)	0.00	2.44	4.02	4.84	0.00	14.69	21.06	26.54
QCISD/6-31G(d)	0.00	2.42	3.99	4.80	0.00	14.66	21.04	26.45
MP2/6-311++G(d,p)	0.00	2.53	3.40	4.28	0.00	14.20	20.41	26.14

Tabla 4.

Lo anterior muestra que es necesario optimizar al nivel HF/6-31G(d), y que conforme aumenta la base, la energía relativa de los tautómeros disminuye. Cabe

resaltar que el orden relativo de estabilidad no cambia con los conjuntos de base utilizados. En cambio, estudios anteriores realizados por Topiol⁸¹ *et al* sobre este mismo sistema pero con una base mínima STO-3G, mostraban un orden de estabilidad entre el tautómero t3H y t1H invertido, resultado cualitativamente erróneo.

2.2.3. Métodos semiempíricos.

Los métodos semiempíricos han sido desarrollados para hacer posible en la práctica (entre otras cosas) el estudio de la reactividad de sistemas más grandes que requieren la localización de varios puntos sobre la HEP, mediante la optimización de geometría en los que cada paso del proceso representa un cálculo SCF de la energía.

La evaluación de las integrales involucradas es un proceso que consume mucho tiempo de cálculo, y para una base de N funciones se debe almacenar un número elevado de integrales (del orden de N^2 monoeléctricas y N^4 bielectricas). Por ello es necesario reducir estos requerimientos en tiempo de cálculo y capacidad de almacenamiento de la información en disco.

Estos métodos logran esa reducción por dos vías: eliminando aquellas integrales cuyo valor es muy pequeño, por aplicación en mayor o menor extensión de la aproximación ZDO⁸² (*Zero Differential Overlap*), y sustituyendo otras por parámetros ajustables, de manera de reproducir resultados *ab initio* (métodos CNDO⁸³ –*Complete Neglect of Differential Overlap*- e INDO⁸⁴ –*Intermediate Neglect of Differential Overlap*-), o experimentales (métodos MINDO⁸⁵ –*Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap*- y MNDO⁸⁶ –*Modified Neglect of Differential Overlap*-) para distintas propiedades. Obviamente, las aproximaciones inherentes al hecho de despreciar la superposición diferencial causan la pérdida

de exactitud, pero ésta puede ser compensada por la información introducida a través de la parametrización utilizada.³⁰

Desde un punto de vista histórico, el desarrollo de los métodos semiempíricos se ha dado en dos corrientes diferentes. La primera liderada por J. Pople, productora de los métodos CNDO⁸³ e INDO⁸⁴ en sus distintas parametrizaciones y reformulaciones, que actualmente han caído prácticamente en desuso. La segunda, encabezada por M.J.S. Dewar, que dió origen a los métodos MINDO⁸⁵ y MNDO⁸⁶ que continúan siendo utilizados a pesar de no describir adecuadamente la estructura y la energética de los complejos de enlace de hidrógeno. En este sentido se han realizado diversas modificaciones del método MNDO dirigidas a mejorar la descripción del enlace de hidrógeno que proporciona. Las interacciones resultantes de la formación de puentes de hidrógeno, son fundamentales en el estudio de sistemas bioquímicos, por lo cuál, el uso de métodos derivados *a posteriori* del MNDO, a saber, AM1⁸⁷, MNDO/H⁸⁸, MNDO/M⁸⁹ y PM3⁹⁰, son sin lugar a dudas una mejor elección, como se muestra en la discusión de aplicaciones aquí revisadas.

En un estudio publicado en 1993, Alagona y Ghio, determinaron el primer paso del mecanismo de acción reversible de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa, una aldolasa de clase I de la glicólisis, que cataliza la conversión de Fructosa-1,6-bisfosfato a Gliceraldehido-3-fosfato y Dihidroxiacetonafofosfato (DHAP).⁹¹ En este estudio se determinó la HEP a nivel HF/4-31G y con el método semiempírico MNDO, para la reacción entre la Dihidroxiacetona (DHA) y la Metilamina (MA) para formar Dihidroxicarbinolamina. La DHA sirvió de modelo para la DHAP, ya que previamente se había determinado que el grupo fosfato no juega un rol preponderante en el mecanismo de reacción. A su vez, la MA sirvió de modelo del residuo de lisina 229 que se encuentra en el sitio activo del enzima.

Como la construcción de una HEP punto a punto es computacionalmente muy costosa, además de usar modelos de mínima, los autores fijaron algunas distancias de enlace, con el fin de reducir los grados de libertad del sistema.

Uno de los objetivos del trabajo, fue la validación del método semiempírico MNDO con los cálculos HF/4-31G, con la finalidad de poder usar de aquí en más el método semiempírico (menos costoso) para la determinación de todas las etapas del camino de reacción completo, o para ser aplicado en otros casos similares.

En las figuras 5 y 6 mostramos comparativamente los mapas de energía potencial obtenidos a nivel HF/4-31G y MNDO respectivamente.

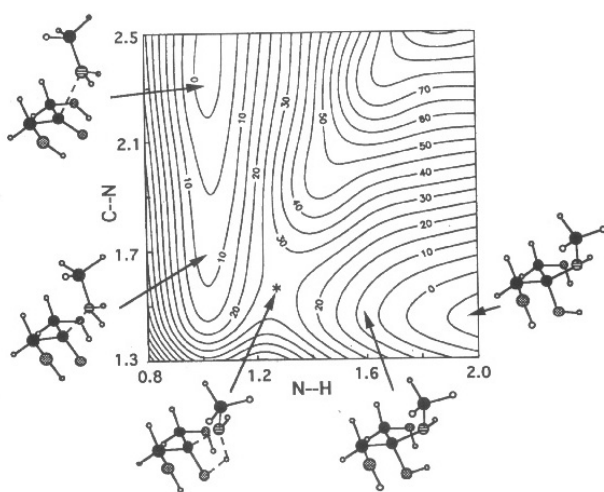


Figura 5.

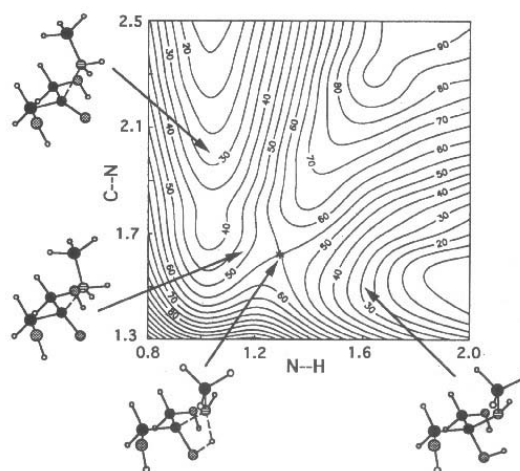


Figura 6.

Si comparamos la forma de los mapas, es evidente que las características generales se conservan, y por lo tanto, el método MNDO da una descripción cualitativamente bastante correcta del mecanismo de acción. Sin embargo, las energías están sobre evaluadas en promedio 15 kcal/mol para todas las

estructuras calculadas. La barrera de reacción, respecto del complejo DHA+MA y el estado de transición, medida con MNDO dió 55,5 kcal/mol contra 35.8 Kcal/mol a nivel HF/4-31G.

En el modelo de mínima utilizado, hay 4 dadores potenciales de puentes de hidrógeno y 7 aceptores. Los autores concluyen que la primera etapa del mecanismo de reacción de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa es conducida, al menos en fase gaseosa, por la interacción competitiva de puentes de hidrógeno intramoleculares entre las especies participantes. Dado que el MNDO⁸⁶ no reproduce correctamente las interacciones resultantes de la formación de puentes de hidrógeno, probablemente se habría obtenido con MNDO/H una mejor descripción cualitativa de la HEP y una mejora cuantitativa de los valores de energía, a un costo computacional similar.

En un trabajo publicado el mismo año por Goldblum⁹² *et al*, se estudió el primer paso del mecanismo de acción de las proteasas de ácido aspártico optimizando las estructuras involucradas con el método semiempírico MNDO/H⁸⁸. Como en todas las interacciones enzima-sustrato o enzima-inhibidor, las interacciones de puente de hidrógeno cumplen un rol fundamental en el posicionamiento correcto del sustrato en el sitio activo y como conductores del mecanismo de reacción de los reactivos involucrados hacia la formación de los productos.

Los métodos semiempíricos no siempre reproducen correctamente las propiedades de interés en reactividad. Este es el caso del mecanismo de reacción en procesos redox biológicos que involucran al NAD⁺ como cofactor. Norris y Gready realizaron un estudio cuántico de los posibles sustratos de la lactato deshidrogenasa, enzima que cataliza la conversión de L-lactato a Piruvato usando NAD⁺ como cofactor.⁹³ Estas moléculas presentan varios grados de libertad rotacional y la habilidad de formar puentes de hidrógeno intramoleculares

interacciones estas que sumadas a las repulsiones estéricas son determinantes de la estabilidad relativa de los posibles conformeros del sustrato aislado y en el sitio activo del enzima. Los autores optimizaron las estructuras de reactivos, productos y algunos de sus tautómeros a nivel HF/3-21G y con el método semiempírico AM1⁸⁷ (*Austin Model 1*). Donde la comparación fue posible, los resultados *ab initio* mostraron buen acuerdo con los datos experimentales disponibles^{94,95} y con otros estudios teóricos^{96,97} realizados, indicando el rol protagónico de los enlaces de hidrógeno frente a las interacciones estéricas. Por su parte, el método semiempírico AM1 difiere de los resultados HF/6-31G cualitativamente exagerando la importancia de las interacciones estéricas, motivo por el que se concluyó que el método AM1 no es fiable para el estudio conformacional de este tipo de moléculas.

Para corregir este tipo de situación es posible la reparametrización de un método semiempírico para problemas específicos. Por ejemplo, el método ZINDO⁹⁸ (*Zerner Intermediate Neglect of Differential Overlap*) ha sido parametrizado para describir problemas con metales de transición y fue aplicado en el estudio de metales ambivalentes que dirigen el plegamiento de la estructura secundaria en el diseño de nuevas proteínas⁹⁹. Otro ejemplo es la estrategia NDDO-SRP desarrollado por Truhlar¹⁰⁰ *et al*, en la que un método semiempírico es ajustado para reproducir las características principales conocidas de una reacción química, aspecto aplicado con éxito a varios procesos simples¹⁰⁰.

2.2.4. Correlación electrónica:

No importa lo buena que resulte la función de onda obtenida con los métodos HF, dicha función nunca será la función de onda exacta. El método de HF, no es capaz de manejar las interacciones dinámicas que provienen de la correlación

espacial instantánea existente entre electrones de diferente spin. Se dice que los métodos HF no incluyen la energía de correlación electrónica o que sus resultados están afectados por el error de correlación. No obstante, en el modelo de HF se tiene en cuenta la denominada correlación de Fermi³¹ para electrones del mismo spin: de acuerdo con el principio de exclusión de Pauli, la probabilidad de que dos electrones ocupen el mismo lugar del espacio es nula.

La energía de correlación puede ser dividida en dos tipos: a) la energía de correlación dinámica, que surge al considerar las interacciones instantáneas entre electrones en el estado basal; b) la correlación estática, que proviene de la interacción entre distintos estados electrónicos. Para el estudio de un problema que sólo comprometa moléculas estables en su estado fundamental, la energía de correlación dinámica será significativamente relevante, en cambio la energía de correlación estática será despreciable bastando con incluir la correlación dinámica. Por el contrario, en el caso de querer estudiar por ejemplo transiciones electrónicas o reacciones fotoquímicas¹⁴ (por ejemplo reacciones relacionadas con la fotosíntesis), la energía de correlación estática se torna significativa y deberá ser incluida en los cálculos para lograr mayor exactitud.

Para obtener una representación cuantitativamente más exacta y dinámicamente correcta de la estructura molecular, es preciso recurrir a métodos que incluyan la energía de correlación. Existen varios tipos de métodos dirigidos a lograr este objetivo, cada uno de los cuales presenta distintas ventajas e inconvenientes. A continuación damos los fundamentos de aquéllos métodos que han sido aplicados a problemas bioquímicos. Podemos distinguir dos tipos de estrategias para resolver la ES incluyendo la correlación: a) métodos que parten de un cálculo HF y lo mejoran (métodos Post-HF); b) métodos basados en la teoría de funcionales de la densidad (DFT).

a) métodos Post-HF.

Todos estos métodos tienen en común el hecho de desarrollar la función de onda exacta no relativista (Ψ_{exacta}^{NR}) como combinación lineal de determinantes de Slater (Ψ_k^{HF}):

$$\Psi_{exacta}^{NR} = \sum_k C_k \Psi_k^{HF} \quad (14)$$

y difieren primariamente en la forma en que se determinan los coeficientes C_k de la expansión y en la forma de extraer la energía correspondiente.³¹ En función de ello, podemos hablar principalmente de métodos variacionales (Interacción de configuraciones¹⁰¹ (CI), SCF multiconfiguracionales¹⁰² (MCSCF) y *Complete Active Space SCF*⁴⁵ (CASSCF)) o de métodos perturbacionales basados en la *Many Body Perturbation Theory* (MBPT)¹⁰³.

En los métodos de CI, las funciones de onda del estado basal y los estados excitados exactos, pueden expresarse como combinación lineal de los posibles determinantes de Slater n-electrónicos provenientes de un conjunto de spin-orbitales dado. En esa combinación lineal cada término de la expansión está pesado por un coeficiente que se obtiene variacionalmente. Los coeficientes de la expansión LCAO-MO se determinan en primera instancia mediante un cálculo SCF monoconfiguracional, de forma de obtener las funciones (Ψ_k). Con la configuración de referencia y las contribuciones de configuraciones excitadas de la misma –excitaciones simples (S), dobles (D), triples (T), etc.- se construye la función de onda multiconfiguracional como lo ilustra la ecuación número 14. En teoría, usando todas las configuraciones posibles y un conjunto de funciones de base completo, es posible obtener el valor exacto de la energía no relativista. En

la práctica, con un número reducido de electrones y funciones de base - respectivamente 10 electrones y 20 funciones de base- el número total de determinantes a considerar es del orden de $8,4 \times 10^8$, volviéndose necesario el uso de desarrollos truncados.³¹ De acuerdo al principio variacional, se obtienen entonces cotas superiores del valor de la energía exacta no relativista del sistema, en el estado fundamental. Existen distintos esquemas de truncación que consideran diferentes niveles de excitación. La versión más simple incluye sólo excitaciones simples y dobles respecto a la configuración de referencia y se conoce por el nombre de SDCI. Sin embargo, al usar desarrollos truncados, estos métodos presentan el defecto de no ser consistentes en tamaño (*size-consistent*)¹⁰⁴, lo que implica que las energías calculadas pueden dejar de variar linealmente con el número de partículas del sistema al aumentar el tamaño del mismo. Estos métodos deberían ser capaces de dar la energía de un dímero cuyos fragmentos estén separados de forma tal que no interactúen, como el doble del valor de la energía correspondiente al monómero. Para ello es necesario recurrir a cálculos *full CI* o bien QCI (*Quadratic CI*), que si son consistentes en tamaño¹⁰⁴. Ahora bien, si en lugar de una sólo configuración de referencia, se consideran varias, el método recibe el nombre de interacción de configuraciones multi-referencial¹⁰¹ (MRCI). Este método es más exacto que el CI, especialmente en los casos que se desea estudiar disociaciones moleculares. La función de onda del método SCF multiconfiguracional (MCSCF) es también una forma de expansión CI truncada, donde se optimizan al mismo tiempo los coeficientes C_k y las funciones de onda Ψ_k^{HF} , es decir, los coeficientes de la expansión LCAO-MO que determinan estas funciones. El desarrollo de métodos MCSCF eficientes es un área de desarrollo de particular importancia en el estudio de moléculas con electrones en estados excitados. En ese sentido fue desarrollado el método CASSCF. En esta aproximación los spinorbitales se dividen en tres clases: i) un grupo de orbitales inactivos que corresponden a los spinorbitales de menor

energía que se encuentran doblemente ocupados; ii) un grupo de orbitales virtuales de alta energía que se encuentran desocupados; y iii) un grupo de orbitales activos, energéticamente intermedios entre los inactivos y los virtuales. Los electrones activos son aquellos que no se encuentran en los orbitales inactivos doblemente ocupados. Las configuraciones calculadas con CASSCF provienen de todas las posibles maneras que hay de distribuir los electrones activos en los orbitales activos disponibles. Este tipo de metodología ha sido ampliamente usada con buenos resultados en estudios teóricos donde las especies participantes son aniones y/o cationes radicales.⁴⁵ Todos los métodos basados en interacción de configuraciones recuperan toda la energía de correlación estática y parte de la energía de correlación dinámica.

Un procedimiento para evaluar la energía de correlación, que no es variacional, pero si consistente en tamaño a cualquier nivel de truncación descansa en la teoría de perturbaciones¹⁰³. El interés de estos métodos es obtener una expansión perturbacional de la energía de correlación, para lo cual, se elige el Hamiltoniano de HF como Hamiltoniano no perturbado de orden cero (H_0). La teoría de perturbaciones desarrollada por Rayleigh y Schrödinger¹⁰⁵, fue aplicada a sistemas con N electrones por Møller y Plesset¹⁰⁶ y por este motivo es conocida por el nombre de teoría de perturbaciones de Møller-Plesset (MP). En esta aproximación, el Hamiltoniano total del sistema H_λ , se particiona en dos tipos de términos: un Hamiltoniano no perturbado de orden cero cuyos valores y funciones propias son conocidas, y una perturbación V:

$$H_\lambda = H_0 + \lambda V = \sum_{i=1}^N F_i + \lambda V \quad (15)$$

siendo λ el parámetro perturbacional. La energía exacta es entonces expresada como suma finita de contribuciones de complejidad creciente:

$$E_{\lambda} = E^{(0)} + \lambda E^{(1)} + \lambda^2 E^{(2)} + \dots \quad (16)$$

De este modo, las energías de correlación a distintos niveles se obtienen truncando esta serie y haciendo $\lambda = 1$. Así, por ejemplo, la energía de correlación de Møller-Plesset hasta segundo orden (MP2) será:

$$E_{(MP2)} = E^{(0)} + E^{(1)} + E^{(2)} \quad (17)$$

Este método perturbacional recupera toda la energía de correlación dinámica de un sistema dado pero no recupera en absoluto la energía de correlación estática.

Retomemos el ejemplo de aplicación que presentamos cuando analizamos los efectos del cambio del conjunto base. Habíamos señalado que además de considerar el efecto del cambio de base, Nagy *et al* estudiaron el efecto de incluir la correlación electrónica realizando cálculos *single-point* sobre las estructuras optimizadas HF/6-31G(d). (ver tabla 4 p. 50)

Como se puede apreciar, la inclusión de la energía de correlación a distintos niveles aumenta considerablemente la energía relativa de los distintos tautómeros de la histamina. En el caso del tautómero t3H, la inclusión de la energía de correlación multiplica por un factor de dos la energía calculada a nivel HF con la base 6-311++G(d,p). Por otro lado, incluir la energía de correlación no afecta el orden de estabilidad de los diferentes tautómeros neutros o protonados de la histamina. En consecuencia, un cálculo HF con una base mínima sobreestima en varias Kcal el valor de la energía en relación a los cálculos que incluyen correlación electrónica (esto último es más notorio en las especies protonadas), mientras que un cálculo HF con una buena base subestima los valores de dicha

energía, siendo en cualquier caso necesario incluir la correlación para lograr resultados cuantitativamente correctos.

La inclusión de la energía de correlación con los métodos vistos hasta el momento, consume enormes recursos computacionales y es impracticable en macromoléculas del tamaño de una proteína. Calcular estos resulta incluso prohibitivos para el sitio activo de una proteína o para un segmento corto de hebra simple de ADN. Por lo general se opta por estudiar el efecto de la correlación electrónica sobre un modelo de mínima con pocos átomos, para luego extrapolar los resultados al resto del sistema real.

b) Funcionales de la densidad electrónica (DFT).

Los métodos revisados hasta ahora están basados en la resolución de la ES no relativista e independiente del tiempo, dentro de la aproximación de HF. Sin embargo, todos tienen el inconveniente de ser computacionalmente complicados cuando se requieren cálculos exactos, con conjuntos de base grandes, para moléculas con muchos átomos. Existen en cambio, métodos basados en otras aproximaciones que también recuperan la energía de correlación y que por sus implementaciones pueden aplicarse a sistemas más grandes (del orden de 150 átomos). Los métodos basados en la Teoría de Funcionales de la Densidad¹⁰⁷ (DFT), parten del concepto de densidad de probabilidad electrónica, y su creciente popularidad se debe a que recuperan la energía de correlación de forma similar que los métodos perturbacionales, con un cálculo menos exigente y costoso que el correspondiente realizado con la aproximación HF. Además, estos métodos dan excelentes resultados en sistemas que involucran metales de transición, como es el caso del centro catalítico de varias enzimas¹⁰⁸. La idea básica detrás de un cálculo DFT es que la energía de una estructura electrónica dada es descrita en términos de la densidad de probabilidad electrónica ρ . Se dice que la energía

electrónica es un funcional de la densidad electrónica $E[\rho]$, en el sentido de que para una función dada $\rho(r)$, existe una única energía correspondiente.

Históricamente los métodos DFT fueron desarrollados principalmente por W. Kohn y L.J. Sham a mediados de los años 60, pero su aplicación a moléculas es cada vez más notoria en los últimos años, especialmente en el caso del funcional B3LYP.¹⁰⁹

En 1996, Radkiewicz *et al*, aplicaron la metodología DFT para estudiar el mecanismo de reacción de la racemización de los residuos de ácido aspártico y asparragina.¹¹⁰ Estos dos residuos sufren una rápida racemización en proteínas y péptidos, a través de una ciclación espontánea, dando lugar a intermediarios succinimida. Todos los aminoácidos son incorporados en las proteínas y péptidos, via síntesis ribosomal, solamente bajo la configuración levógira (L). Sin embargo, durante el tiempo de vida de una proteína, ocurren racemizaciones espontáneas de ciertos residuos hacia la forma D. La acumulación de dichos residuos dextrógiros en los tejidos es causa de pérdida de funcionalidad biológica. Los residuos de ácido aspártico y de asparragina son los que más rápido sufren la racemización espontánea a la configuración dextrógira, lo que ha sido atribuído a la acidez incrementada de los carbonos α de los intermediarios succinimida derivados de la ciclación. Para comprender la base de este efecto, se estudió la acidez de dichos compuestos usando métodos HF y DFT con la base 6-31+G(d).

A continuación mostramos la comparación de los datos estructurales resultantes de la optimización de la succinimida, del 2-pirrolidinona, y de los correspondientes aniones enolato en fase gaseosa, con HF/6-31+G(d) y B3LYP/6-31+G(d).

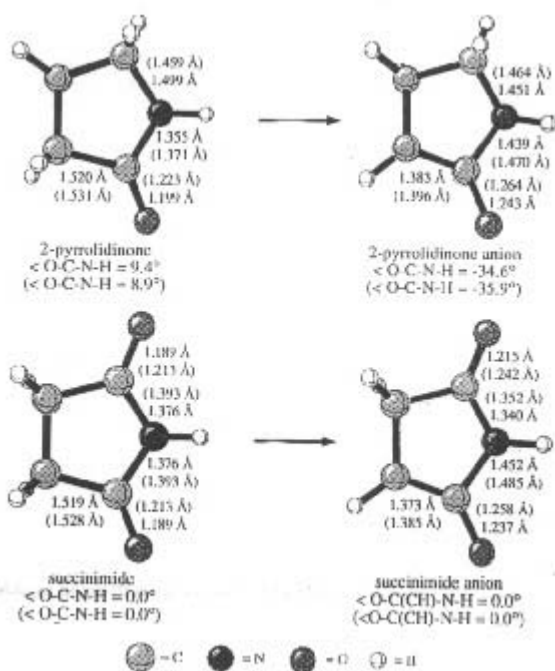


Figura 7.

Como podemos apreciar los datos estructurales se correlacionan cuantitativamente bien entre las dos metodologías usadas. También se compararon los resultados de energías relativas y de afinidad protónica en los métodos HF y DFT:

	HF		DFT	
	afinidad pro.	energía rel.	afinidad pro.	energía rel.
2-pirrolidinona	394.4	18.0	384.6	18.3
Succinimida	376.4	00.0	366.3	00.0

Tabla 5.

Los cálculos HF tienden a subestimar la deslocalización electrónica o resonancia en este tipo de compuestos. Este problema puede ser resuelto

incorporando en el cálculo el efecto de la correlación electrónica. Aunque los métodos DFT, tienden en cambio, a sobreestimar el efecto de resonancia¹¹⁰, dan una manera bastante exacta y relativamente menos costosa que los métodos Post-HF para incluir la correlación electrónica. Los cálculos DFT indican que la estabilización de los aniones por resonancia tiene un efecto mayor sobre la acidez que los predichos por los resultados HF. Los autores consideran que los valores de acidez reales deberían encontrarse entre los valores que resultan de los cálculos HF y DFT respectivamente. De esta forma se estableció la importancia de los efectos de resonancia en la incrementada acidez de los carbonos α de los intermediarios succinimida, aunque los efectos electrostáticos e inductivos tienen también una marcada influencia sobre la acidez.

2.2.5. Divide y reinarás.

Estos últimos años, se han desarrollado técnicas que expanden las posibilidades de los métodos cuánticos, en el sentido de que es ahora posible aplicar dichos métodos a sistemas del tamaño de una proteína. Una de esas novedosas técnicas esta basada en la filosofía de *Divide and Conquer (D&C)*. El método D&C fue propuesto y aplicado inicialmente a los Hamiltonianos derivados de los cálculos DFT por Yang y Lee¹¹¹, y posteriormente se extendió el uso de esta técnica a los Hamiltonianos semiempíricos, debido principalmente a los aportes de Dixon y Merz¹¹², y Yang¹¹³ *et al.* El método D&C es un algoritmo de escalamiento lineal para resolver la ES para moléculas con muchos átomos. La idea de base del método es dividir toda la molécula o el sistema en consideración en subsistemas y resolver *a posteriori* las ecuaciones de HF para cada subsistema por separado. Las soluciones de los subsistemas son luego escaladas linealmente para representar el sistema en su conjunto.

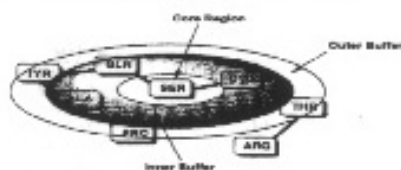


Figura 8.

Este último año, el algoritmo D&C ha sido combinado exitosamente con la distribución de Boltzmann-Poisson¹¹⁴ (BP) y los modelos de carga CM (*Charge Model*) desarrollados por Cramer y Truhlar¹⁶, para poder introducir el efecto del solvente de forma cuántica en sistemas de dimensiones considerables, tales como la crambina (proteína de 642 átomos), la subtilisina E (3854 átomos) y un dodecámero del ADN (24 nucleótidos).¹¹⁵

Comparando la presente aproximación a las existentes hasta el momento, Gogonea y Merz concluyen que es posible reducir hasta 25 veces el costo computacional para los sistemas más grandes estudiados.¹¹⁵ Esta metodología debería, por lo tanto, ser en el futuro una importante herramienta para investigar la termodinámica y los aspectos mecánicos de varios fenómenos bioquímicos como el plegamiento de proteínas y las reacciones enzimáticas en fase condensada, ya que nos permite determinar propiedades derivadas de la mecánica cuántica como los efectos de polarización y de transferencia de cargas.

PARTE 3:

Métodos mixtos.

En los últimos años se ha intentado conjugar el nivel de detalle que permiten los métodos cuánticos, con la aplicabilidad a sistemas de gran dimensión de los campos de fuerza de Mecánica Molecular, en la estrategia que se conoce con el nombre de métodos mixtos o híbridos. El desarrollo de este tipo de estrategias podrá ser aplicada en forma más generalizada a los sistemas de interés bioquímico, permitiendo lograr resultados confiables incluso capaces de considerar el efecto del medio circundante.

En 1976, Warshel y Levitt¹¹⁶ introducen por primera vez la idea de utilizar un método híbrido o mixto QM/MM (mecánica cuántica/mecánica molecular), en el cual una pequeña parte del sistema es representada cuánticamente mientras que el resto del sistema, que no requiere de un tratamiento tan detallado, es representado por un campo de fuerza empírico. El potencial obtenido de esta forma fue utilizado por Warshel y colaboradores para estudiar el mecanismo de reacción catalítico de la lisosima¹¹⁷. Desde entonces, Warshel ha aplicado este tipo de potencial mixto a una variedad de reacciones enzimáticas, desarrollando la aproximación *Empirical Valence Bond* (EVB)¹¹⁷. La desventaja principal del método reside en que la función energía potencial debe ser reparametrizada para cada sistema en particular, pecando de falta de generalidad.

Los siguientes investigadores que emplearon metodología mixta fueron Singh y Kollman¹¹⁸, quienes en 1986 desarrollaron un potencial mixto QM/MM, combinando la descripción *ab initio* con el campo de fuerza AMBER. Más recientemente, Karplus¹¹⁹ *et al* desarrollaron sobre las mismas bases, un potencial mixto usando la familia de métodos semiempíricos AM1/MNDO y el campo de fuerza CHARMM. Desde entonces se han desarrollado una gran variedad de

modelos que combinan métodos semiempíricos¹²⁰, HF¹²¹ y DFT¹²², con campos de fuerza de mecánica molecular.

La mayoría de los últimos trabajos realizados en el área, se centran en el estudio de pequeñas moléculas en fase condensada, que pueden ser considerados como los ejemplos de aplicación más sencillos de la metodología mixta. En estos casos, el soluto es tratado a nivel cuántico y las moléculas de solvente, que pueden ser incluidas o no explícitamente en el sistema, contribuyen al Hamiltoniano total con términos típicos de los campos de fuerza de mecánica molecular.¹²³ En este tipo de esquema no existen interacciones enlazantes entre la parte descrita cuánticamente y la descrita clásicamente, lo que evita el problema de tener que elegir una frontera cuántico/clásica y (lo que es aún más complicado) una expresión analítica para la energía de interacción entre las partes¹²⁶. Por lo general, cuando entre la parte cuántica y clásica sólo existen interacciones no enlazantes (principalmente de Van der Waals), éstas son consideradas en un término clásico del tipo Lennard-Jones³⁰:

$$E_{vdW} = \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} \quad (18)$$

donde A y B son parámetros dependientes del campo de fuerza usado.

Si bien estos ejemplos son muy interesantes, el análisis más profundo de la metodología disponible para estudios en solución va más allá de los alcances de este trabajo. En la literatura se encuentran también varios ejemplos de métodos QM/MM aplicados al estudio de la reactividad química, de procesos que involucran enzimas y sus centros catalíticos.^{124,125}

3.1. Metodología.

3.1.1. Principios generales.

La idea fundamental que subyace el desarrollo de potenciales mixtos, es que se puede dividir el sistema en consideración en varias regiones cada una de las cuales pueden ser modelada con diferentes niveles de aproximación. Así los átomos o residuos que participan directamente de la reacción, y/o los átomos ricos en electrones como los metales de transición, son tratados cuánticamente. El resto del sistema es descrito por campos de fuerza de mecánica molecular. Finalmente, en algunos casos, se determina una región de contorno que tiene en cuenta el tamaño finito del sistema.

El punto crucial cuando se hace uso de un potencial mixto, es el análisis de la sensibilidad de los resultados a los diferentes esquemas de partición del sistema posibles. El espíritu de esta metodología es tener el mínimo posible de átomos en la región descrita a un alto nivel de teoría, pero en cantidad suficiente como para que los resultados obtenidos para el sistema en su totalidad sean de la misma calidad que los obtenidos con cálculos de mayor nivel.¹²³

Una manera conveniente de describir las características de un sistema con un potencial mixto, requiere del uso de un Hamiltoniano efectivo. De esta forma la energía de un sistema para una determinada configuración de los átomos se obtiene resolviendo la ES no relativista e independiente del tiempo:

$$\hat{H}_{eff} \Psi(r_i, R_\alpha, R_M) = E(R_\alpha, R_M) \Psi(r_i, R_\alpha, R_M) \quad (19)$$

donde r_i y R_α son las coordenadas de los electrones y los núcleos de la región descrita cuánticamente, y R_M las coordenadas de los átomos en la región clásica.

Para el caso más simple, donde el sistema en consideración es dividido en tres regiones, el Hamiltoniano efectivo estará compuesto por cuatro términos:

$$\hat{H}_{eff} = \hat{H}_{QM} + \hat{H}_{MM} + \hat{H}_{QM/MM} + \hat{H}_{contorno} \quad (20)$$

El Hamiltoniano electrónico \hat{H}_{QM} , tendrá la expresión correspondiente al método cuántico utilizado para la parte reactiva, y el Hamiltoniano MM, tendrá los términos típicos presentes en los campos de fuerza. La forma del Hamiltoniano para la región QM/MM no es tan evidente. Si entre ambas regiones sólo existen interacciones no enlazantes del tipo electrostáticas o de Van der Waals, $\hat{H}_{QM/MM}$ podría expresarse como:

$$\hat{H}_{QM/MM} = -\sum_{iM} \frac{q_M}{r_{iM}} + \sum_{\alpha M} \frac{Z_\alpha q_M}{r_{\alpha M}} + \sum_{\alpha M} \left\{ \frac{A_{\alpha M}}{R_{\alpha M}^{12}} - \frac{B_{\alpha M}}{R_{\alpha M}^6} \right\} \quad (21)$$

donde los dos primeros términos corresponden a las interacciones electrostáticas Coulomb y el tercero representa las interacciones de Van der Waals bajo la forma de un potencial de Lennard-Jones³⁰.

Para determinar $\hat{H}_{contorno}$ (que representa el efecto del medio), es posible utilizar todas las aproximaciones más comunmente usadas en simulaciones de mecánica molecular, como por ejemplo las condiciones periódicas de contorno en las cuales el sistema es reproducido una multitud de veces en todas las direcciones del espacio.¹²³

Para obtener la energía del sistema, se calcula el valor esperado y la función de onda usando el Hamiltoniano efectivo de la ecuación 20. Una vez que la energía es determinada, las fuerzas sobre los átomos son sencillamente derivadas con respecto a las coordenadas atómicas. La energía resultante y las fuerzas asociadas pueden ser usadas entonces para realizar optimizaciones de geometría o dinámicas moleculares sobre la superficie de energía potencial mixta, como si se tratase de cálculos puramente cuánticos o clásicos.

3.1.2. La unión entre las regiones QM/MM: establecimiento de la frontera.

Para reacciones que comprometen moléculas relativamente pequeñas en solución, la división de los átomos del sistema en regiones es sencilla. Sin embargo, la situación es bastante más complicada cuando la región de interés es parte de una macromolécula, como puede ser el caso del sitio activo de un enzima. En este tipo de esquema, partes de la misma molécula estarán en regiones diferentes, y habrá por lo tanto enlaces covalentes entre los átomos descritos cuánticamente y aquellos descritos clásicamente.¹²⁶ Es claro que no es posible simplemente truncar dichos enlaces, ya que este procedimiento dejaría unos cuantos orbitales a medio llenar, dando pobres resultados en la descripción electrónica de la región QM.¹²³

En el trabajo original de Warshel y Levitt¹¹⁶, este problema fue parcialmente solucionado usando un orbital molecular híbrido del tipo sp^2 ocupado por un único electrón para cada átomo de carbono o nitrógeno en la frontera QM/MM. Las interacciones restantes para esos átomos de frontera eran representadas usando términos clásicos del campo de fuerza elegido. Una aproximación más simple, (pero menos rigurosa) introducida por Singh y Kollman¹¹⁸, y por Karplus¹¹⁹ *et al* consiste en incluir átomos enlace (*link atoms*) también llamados articulaciones

ficticias (*dummy junction*) para llenar la valencia de los átomos de la región QM. Usualmente se usan átomos de Hidrógeno, aunque también se recurre a pseudoátomos de halógenos que son parametrizados para imitar las características del átomo de la región MM que están substituyendo. Los átomos de enlace no son incluidos en la expresión final de la energía y su uso es cuestionable en la medida que pueden polarizar indebidamente la región cuántica.

Un esquema alternativo recientemente propuesto por Morokuma y Maseras¹²⁶, elimina la necesidad de usar átomos de enlace o incluso orbitales individuales, cuando la frontera se ubica sobre enlaces covalentes de la misma molécula. El método desarrollado consiste en dividir el sistema en subsistemas superpuestos, cada uno de los cuales es tratado con diferentes niveles de cálculo. En un sistema con dos regiones, hay una pequeña parte central calculada cuánticamente y una región MM que abarca todos los átomos del sistema incluyendo los de la región QM. Para evitar sumar dos veces el efecto de los átomos de la intersección entre las regiones QM/MM, la energía final del sistema debe ser refinada, en el sentido que es necesario restarle la contribución energética de la región cuántica calculada a nivel clásico. Este método lleva el nombre de IMOMM (*Integrated Molecular Orbital Molecular Mechanics*), y tiene como ventajas adicionales su generalidad y la facilidad de implementación en un programa. La parte MO del método puede ser un cálculo HF que incluya por ejemplo correlación electrónica, y la parte MM un campo de fuerza típico. Una desventaja del método IMOMM para el tratamiento de ciertos problemas particulares, es la dificultad de incluir los efectos electrónicos de la región MM en la región QM, como por ejemplo los efectos inductivos.¹²⁶

Esta última limitación puede ser sobrellevada si se usan dos métodos cuánticos para describir las diferentes regiones. Este tipo de método es llamado IMOMO¹²¹ (*Integrated Molecular Orbital Molecular Orbital*), y consiste en describir el

subsistema y el sistema en su totalidad con métodos cuánticos, siendo el subsistema tratado con un nivel de cálculo superior.

Un caso especial de los métodos IMOMO incluye la correlación electrónica en la región pequeña, desestimando sus efectos en el sistema completo.¹²⁸ Se puede de este modo llevar a cabo cálculos del tipo I:QCI:HF (*Integrated:Quadratic Configuration Interaction:Hartree-Fock*), o incluso se pueden usar otros esquemas para tomar en consideración el efecto de la correlación electrónica. De este modo también se da lugar a métodos mixtos del tipo I:MPBT:HF basados en la teoría perturbacional. A esta familia de métodos en los cuales una pequeña región es afectada por la correlación electrónica, mientras que el resto de la molécula es calcula cuánticamente pero sin correlación electrónica, se la denomina CCSS (*Correlated Capped Small System*)¹²⁸. Este tipo de métodos tiene varias ventajas sobre los anteriores al considerar la energía de correlación localmente. Una de las ventajas es que el método CCSS se ve sistemáticamente mejorado conforme se aumenta el tamaño del sistema y el nivel de cálculo usado, algo que no comparten todos los métodos que incluyen correlación electrónica como es el caso de los basados en la teoría de funcionales de la densidad (DFT).

Una generalización de los métodos IMOMM e IMOMO consiste en no restringir los niveles de cálculo en únicamente dos regiones MO y MM, sino que de lo contrario permite el uso de varios niveles de cálculo. Se puede entonces en principio integrar, metafóricamente como si fueran capas de una cebolla, las diferentes aproximaciones basadas en orbitales moleculares y mecánica molecular.

Este método lleva el nombre de ONIOM¹²⁷ (*Our own N-layered Integrated molecular Orbital and molecular Mechanics*). Si consideramos el ejemplo más simple que consiste de tres capas o regiones, la región más pequeña será tratada

con el cálculo de mayor nivel, una región intermedia que engloba la más pequeña será tratada con un nivel de cálculo intermedio y finalmente el sistema en su conjunto será calculado con el menor nivel de cálculo elegido. De este modo, un esquema de división en tres regiones requerirá del cálculo de cinco energías y gradientes independientes que serán sumados o restados, según el caso, para obtener la energía total del sistema.

3.2. Aplicaciones.

Es probablemente cierto decir que el motor que impulsó a varios investigadores a desarrollar potenciales mixtos, fue el deseo de poder estudiar reacciones enzimáticas. Estos estudios son sin embargo más costosos que los equivalentes que comprometen pequeñas moléculas en solución. Desde el trabajo pionero de Warshel y Levitt¹¹⁶ sobre el mecanismo de acción de la lisosima, ha habido un número considerable de estudios, de otros autores, que usaron métodos QM(semiempírico)/MM y QM(*ab initio*)/MM para estudiar reacciones enzimáticas.^{120,121} En todos estos estudios la aproximación del átomo de enlace (*atom link*) ha sido utilizada. No obstante, debe quedar claro que es preferible evitar el uso de átomos de enlace ya que frecuentemente no representan correctamente las características de la región cuántica.

Los métodos IMOMM, IMOMO y su generalización ONIOM son una alternativa prometedora, si bien hasta el momento han sido únicamente probados en sistemas de dimensiones reducidas.¹²⁹ En particular los métodos de la familia CCSS, deberían ser una importante herramienta para el cálculo de propiedades de sistemas en los cuales la inclusión de la energía de correlación cumple un rol preponderante.¹²⁸ Este tipo de método ha sido utilizado con éxito para calcular el

efecto de diferentes substituyentes sobre las energías de enlace. Este es el caso de un estudio realizado por Coitiño y Truhlar¹²⁹ sobre la molécula de etano, en la que la región descrita con mayor detalle fue calculada a nivel QCISD(T)/6-311G(d,p) (Interacción de configuraciones cuadrática con excitaciones simples, dobles e inclusión perturbativa de excitaciones triples). Dependiendo del tamaño del sistema se pueden adoptar variadas combinaciones duales. Los autores recomiendan para sistemas de medianas dimensiones el uso de metodología DFT con la base 3-21G para el nivel bajo de cálculo, el uso de metodología HF con la misma base para sistemas de dimensiones mayores y el uso de métodos semiempíricos como MNDO o AM1 cuando uno debe encarar problemas que ponen en juego macromoléculas biológicas. Estos métodos también fueron utilizados con éxito para determinar energías de disociación con un error del orden de 1 kcal/mol comparado con los resultados experimentales. El cálculo experimental de energías de disociación es una ardua tarea, particularmente para sistemas de grandes dimensiones, disponiéndose hoy en día de pocos valores experimentales para cotejar con los resultados de aplicar la teoría. En este sentido, el desarrollo de una metodología tan exacta como la presente puede ser de tremenda utilidad para sistemas moleculares de dimensiones biológicas.

Los potenciales mixtos vieron su nacimiento a mediados del presente decenio, y su desarrollo ha sido muy importante en los últimos 5 años, de modo que hay varias áreas que son objeto de intensas investigaciones como es el caso de la búsqueda de una mejor representación de la interacción entre la parte cuántica y la parte clásica. Otra área obvia de investigación es aquella que intenta mejorar las inexactitudes introducidas con los átomos de enlace, o como representar correctamente las interacciones covalentes entre los átomos QM y MM respectivamente. Además de la mejora que requieren los potenciales en si mismo, es claro que el desarrollo de componentes de *hardware* cada vez más rápidos y eficientes, así como de técnicas de procesamiento en paralelo, harán

posible la aplicación de los métodos mixtos más exactos, a nuevos y excitantes problemas de reactividad química en sistemas de interés bioquímicos.

PARTE 4:

Tres niveles de enfoque para el estudio de la reactividad.

Aunque los químicos teóricos hayan inicialmente volcado la mayor parte de sus esfuerzos en la construcción de funciones de onda y la determinación de energías, estos dos aspectos raramente son el objetivo final de los cálculos, sino en cambio la determinación de ciertas propiedades físicas, o expresado más físicamente, la respuesta de un sistema dado a una perturbación externa.¹³⁰

En el estudio de la reactividad de sistemas biomoleculares se pueden adoptar, como se mencionaba en la Introducción, tres niveles de enfoque básicos: En el primero se reduce el estudio de la reactividad a la extrapolación de ciertas propiedades de los reactivos y productos. En el segundo nivel de enfoque, es posible calcular y determinar (con los métodos mencionados en la parte 2 y 3) la estructura del estado de transición e incluso el IRC, brindando datos relevantes tales como mecanismo y termodinámica del proceso.

El conocimiento y la justificación de los factores que determinan la velocidad de una reacción -uno de los problemas más importantes en química-, está estrechamente relacionado con el mecanismo de reacciones y la reactividad de moléculas. El tercer nivel de enfoque es precisamente aquél que permite, mediante la información obtenida en el segundo nivel y el cálculo de una región más amplia de la HEP, obtener datos cuantitativos detallados sobre la cinética de reacción.

Antes de concluir con una breve descripción del tercer y más completo nivel de enfoque, nos detendremos en describir sumariamente el cálculo de las propiedades moleculares que se utilizan como herramientas interpretativas para analizar la reactividad.

4.1. Propiedades moleculares utilizadas para analizar la reactividad en problemas de interés bioquímico.

En 1989, Kutzelnigg¹³⁰ propuso una clasificación operacional de las propiedades moleculares en base a la manera en que las mismas son calculadas y que utilizaremos para desarrollar esta sección.

4.1.1. Propiedades que se obtienen a partir de la HEP.

Las propiedades que se pueden obtener a partir de la HEP incluyen datos estructurales y energéticos de geometrías de equilibrio, posibles isómeros y estados de transición. Además, con las frecuencias de los modos vibracionales es posible modelar espectros infrarrojos y Raman. Por ejemplo, en el estudio de Nagy⁷⁹ *et al* presentado al introducir los métodos *ab initio*, se comparan las frecuencias vibracionales de los distintos tautómeros neutros y protonados de la histamina y la (α R, β S)- α,β -dimetilhistamina contra los obtenidos para el imidazol, con la finalidad de analizar el efecto de los sustituyentes en α y β .

A esta categoría de propiedades pertenece también la determinación de barreras de reacción (rotación, inversión, isomerización y disociación de enlaces). Parte de estas barreras pueden ser calculadas usando tanto métodos clásicos como cuánticos (por ejemplo, para procesos de rotación o inversión). En cambio, la barreras de reacción para procesos que involucran disociación de enlaces y la energía electrónica en función de las coordenadas nucleares, solo pueden ser calculadas resolviendo la ES.

4.1.2. Propiedades de primer orden.

Las propiedades de primer orden son denominadas así por que pueden ser calculadas a partir de la función de onda o de la matriz densidad, ya que se obtienen de los valores esperados de operadores simples.¹³⁰ La mayoría de las propiedades utilizadas en los trabajos revisados para esta monografía pertenecen a esta categoría. El momento dipolar y la densidad de spin (a partir de la cuál es posible calcular constantes de acoplamiento hiperfino en espectros de EPR) son buenos ejemplos de este grupo. En un estudio realizado por Walden y Wheeler¹³¹ se calculan las constantes de acoplamiento del radical Indol (Ind[•]) y del correspondiente catión radical (IndH^{•+}) para modelar respectivamente el radical Triptófano (Trp[•]) y catión radical (TrpH^{•+}) con el objetivo de proponer un diseño experimental basado en EPR que permita distinguirlos. A continuación se muestra una tabla con las constantes de acoplamiento hiperfinas para los átomos de H, ¹⁴N, ¹⁵N, y ¹³C, calculadas con DFT usando los funcionales B3LYP y SVWN.¹³¹

Atom	B3LYP		SVWN	
	Ind [•]	IndH ^{•+}	Ind [•]	IndH ^{•+}
14N1	3.6	1.8	2.1	0.95
15N1	5.1	2.5	3.0	1.3
C2	-6.1	2.6	-4.7	0.12
C3	20.9	11.5	11.2	6.0
C4	7.8	10.2	4.0	5.2
C5	-3.2	-4.4	-2.4	-3.1
C6	5.4	6.4	2.6	3.0
C7	0.44	3.4	-0.12	1.5
C8	0.54	0.66	-0.90	-1.4
C9	-7.0	-5.0	-5.4	-4.1
H1	n/a	-3.7	n/a	-3.0
H2	0.0	-4.2	-0.86	-3.4
H3	-11.9	-7.7	-8.9	-6.1
H4	-4.7	-6.2	-3.6	-4.7
H5	0.31	0.80	-0.25	-0.03

Tabla 6.

De los resultados obtenidos, los autores concluyen que debido a la alta densidad de spin localizada en el N1 la simple observación de las interacciones hiperfinas para los átomos de ^{14}N y ^{15}N no bastan por si solas para permitir diferenciar entre Trp^\bullet y $\text{TrpH}^{\bullet+}$. En cambio, la diferencia de polarización de spin en el C2 del Ind^\bullet y del $\text{IndH}^{\bullet+}$ deberían servir de base para un diseño experimental que permita distinguir entre ambos radicales del triptófano.

El rol de la interacción entre los orbitales es usualmente considerado en el estudio de la reactividad en bioquímica. Por ejemplo, la determinación de los orbitales de frontera HOMO-LUMO y su interacción han sido analizados para explicar pasos claves en el mecanismo de transaminación del enzima GABA²² y en la extracción de un grupo acilo de la cisteína proteasa Papaína.¹⁰ En ambos estudios la energética de los orbitales HOMO y LUMO fue determinada mediante el uso de métodos semiempíricos AM1 y MNDO.

Las cargas sobre los átomos son también propiedades de primer orden. Existen distintos esquemas para calcularlas que han sido clasificados por Truhlar y Cramer¹⁶ de la siguiente forma: a) Cargas de clase I: se obtienen sin la necesidad de usar la mecánica cuántica, por ejemplo dividiendo el momento dipolar de una molécula diatómica por la distancia de enlace; b) Cargas de clase II: se obtienen a partir de una razonable división entre poblaciones atómicas de la densidad electrónica calculada con algún método cuántico. Dentro de este tipo de esquema se encuentra las de Mulliken,²¹ que son sin duda las más usadas en el estudio de la reactividad de problemas de interés bioquímico,^{26,132} c) Cargas de clase III: se determinan de forma tal que los cálculos llevados a cabo reproduzcan verdaderos observables como los momentos dipolares y los potenciales electrostáticos, un buen ejemplo es el método SKBM¹³³; d) Cargas de clase IV: recientemente implementadas para estudiar biomoléculas¹³⁴, muestran respecto a las clases

anteriores una gran eficiencia de cálculo (reduciendo los tiempos y los costos) y una mayor exactitud a la hora de reproducir resultados experimentales.¹⁶

Los mapas de potencial electrostático molecular resultan ser una propiedad de primer orden muy popular en el estudio de la reactividad en sistemas bioquímicos. El análisis de los mismos a lo largo del mecanismo de reacción, permite describir las distintas regiones electrófilas y neutrófilas así como los cambios que ellas experimentan. De esta manera se puede por ejemplo determinar la orientación con la cuál un sustrato se aproxima al sitio activo de un enzima, y la reorganización de cargas que sufre el enzima cuando se produce la unión. Este es el caso de un estudio realizado por Tempczyk¹³⁵ *et al* donde se determina el mecanismo catalítico de la fosfatasa Calcineurina usando metodología mixta QM/MM. Otro ejemplo de aplicación de estos mapas lo representa el trabajo de, Orozco y colaboradores quienes han utilizado mapas de potenciales electrostáticos bidimensionales de varios tautómeros de sustratos del enzima xantina oxidasa,^{136,137} en un esfuerzo por crear un modelo del reconocimiento del sitio activo del enzima por sus sustratos. A modo de ejemplo gráfico, mostramos a continuación un mapa bidimensional de potencial electrostático comparativo para los sustratos xantina y 2-azahypoxantina:

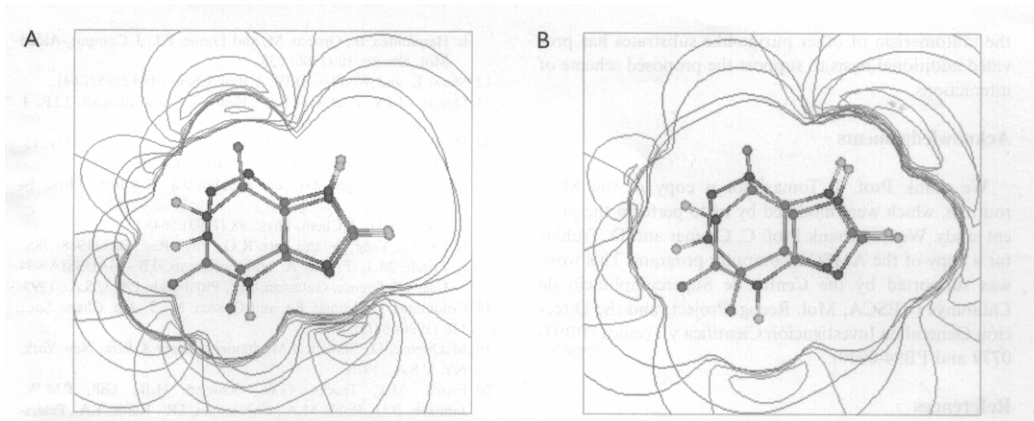


Figura 9.

4.1.3. Propiedades de segundo orden.

Estas propiedades se obtienen aplicando alguna teoría perturbacional a un cálculo cuántico convencional. Las propiedades de segundo orden más importantes son la polarizabilidad, el acoplamiento spin-spin indirecto, y el corrimiento químico en espectros de RMN.¹³⁰ Recientemente el modelado de espectros de RMN ha sido utilizado con éxito, en apoyo con la información experimental disponible, para caracterizar los aminoácidos responsables de la flexibilidad de la proteína Calbindina D9K.¹³⁸

4.1.4. Propiedades que involucran más de un estado electrónico.

Las propiedades más relevantes de esta categoría son los potenciales de ionización y las relacionadas con el dicroísmo circular, que requieren de un cálculo *ab initio* que incluya la energía de correlación estática.¹³⁰

4.2. Evaluación de las propiedades termodinámicas.

La química teórica maneja las moléculas y sus interacciones, pero las observaciones experimentales que se realizan en la mayor parte de los casos involucran a la materia en su conjunto. Los cálculos clásicos y cuánticos presentados en la segunda y tercera parte de esta monografía proporcionan de este modo información sobre la energía interna de los sistemas químicos a nivel molecular. A los efectos de poder comparar la información proveniente de ambos tipos de observación, es necesario lograr una conexión entre las propiedades termodinámicas de la materia y las propiedades de las moléculas que la constituyen. Este enlace se logra a través de la Termodinámica Estadística¹³⁹ (TE), haciendo posible el cálculo de propiedades tales como la energía libre, la

entalpía o la entropía a partir de las propiedades moleculares de un sistema, mediante el uso de métodos estadísticos. Las magnitudes termodinámicas recién mencionadas se calculan a partir de las llamadas funciones de partición que vienen definidas de acuerdo a:

$$Q = \sum_{n=0}^{\infty} g_i e^{(-E_i/kT)} \quad (22)$$

siendo E_i la i -ésima energía total posible para el sistema, g_i la degeneración del i -ésimo nivel de energía, k la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta.

4.2.1. Funciones de partición.

En varios tipos de sistemas, cabe como simplificación, expresar la energía total como la suma de contribuciones independientes de los distintos modos de movimiento, siempre y cuando no haya acoplamiento entre dichos modos. En este caso aproximado, la función de partición total puede ser expresada de la forma:

$$Q_{Tot} = Q_{Trasl} Q_{Int} \quad (23)$$

donde Q_{Trasl} corresponde a la función de partición para el movimiento de traslación de las moléculas como un todo y Q_{Int} la función de partición interna del sistema considerado. En general, no se toma en consideración la contribución de la energía nuclear, ya que la separación entre niveles energéticos nucleares es muy grande y puede considerarse que todos los núcleos se hallan en el estado fundamental, transformándose la función de partición nuclear en una constante.

La energía interna viene dada por la suma de tres contribuciones: electrónica, rotacional y vibracional. Para la contribución de la energía electrónica a la energía total se hace la misma misma consideración que para la energía nuclear. Así, excepto en el caso de temperaturas elevadas, para la mayoría de las moléculas la energía electrónica es también una constante que corresponde a la energía del estado electrónico fundamental.¹³⁹

Despreciando el acoplamiento entre los movimientos rotacionales y vibracionales, la función de partición interna puede ser expresada como:

$$Q_{Int} = Q_{Rot} Q_{Vib} Q_{Elec} \quad (24)$$

Para obtener las expresiones de las funciones de partición traslacional, rotacional y vibracional, se utilizan distintas aproximaciones como el modelo del rotor rígido para aproximar el movimiento de rotación, el modelo del oscilador armónico para representar las vibraciones moleculares y el modelo de una partícula en una caja tridimensional para la traslación. La función de partición vibracional contiene a la energía de punto cero (ZPE) para cada modo normal de vibración y para calcularla es necesario conocer las frecuencias normales de vibración.

Lo hasta ahora mencionado es una extrema simplificación del caso de estudio más sencillo, pero cabe mencionar que la TE puede ser aplicada a problemas de interés bioquímico. Tal es el caso del modelo tetrahédrico para representar la unión del oxígeno a la hemoglobina¹³⁹ y el modelo de regulación alostérica para enzimas con dos sitios activos,¹³⁹ donde las funciones de partición son expresiones matemáticas ciertamente más complejas que las aquí presentadas y por tanto están fuera del alcance de este trabajo.

4.2.2. El cálculo de las propiedades termodinámicas a partir de las funciones de partición.

Una vez conocidas las funciones de partición, relacionando la termodinámica clásica y estadística se puede obtener respectivamente (entre otras propiedades termodinámicas), la energía libre, la entropía y la entalpía del sistema considerado:

$$G = RT - RT \ln Q \quad \text{para un mol de gas ideal} \quad (25)$$

$$S = R \ln Q + RT \left[\frac{\partial \ln q}{\partial T} \right]_v \quad (26)$$

$$H = RT + RT^2 \left[\frac{\partial \ln Q}{\partial T} \right]_v \quad (27)$$

4.3. La aproximación estática y el estudio de la cinética de reacción.

Como se mencionó en la Introducción de esta monografía, para abordar el tercer nivel de enfoque es posible utilizar los métodos estáticos para el cálculo de la constante de velocidad. Estos métodos involucran la caracterización de ciertas estructuras sobre la HEP tales como reactivos, productos y estados de transición y la descripción termodinámica estadística introducida en la sección anterior.

Una aproximación usada en el cálculo de constantes de velocidad, se basa en la teoría del estado de transición desarrollada por Eyring²⁹ en la década de los 40. Posteriormente Truhlar²⁴ *et al* desarrollaron la teoría generalizada del estado de transición o VTST con el objetivo de mejorar los resultados logrados con una TST convencional. A continuación mostramos un ejemplo de aplicación de ambas teorías al estudio de la reactividad en sistemas de interés bioquímicos.

4.3.1. La teoría del estado de transición.

La TST permite, sobre la base del conocimiento de las propiedades que se obtienen con el segundo nivel de enfoque, obtener fácilmente las constantes de equilibrio y de velocidad correspondientes a un proceso químico. En esta aproximación se supone que los reactivos en su camino hacia los productos, se hallan en equilibrio termodinámico con una especie inestable de alta energía: el estado de transición.

Utilizando los métodos de la termodinámica estadística, desarrollados para sistemas en equilibrio, se obtiene una expresión para la constante de velocidad, postulando que el único movimiento importante que ocurre cuando el sistema se encuentra en el estado de transición, está restringido a una única dirección que es la de máxima pendiente. En la TST el punto de ensilladura es un momento de decisión terminante para el sistema reaccionante, que ya no vuelve a pasar por aquél. Si ninguna de las trayectorias del sistema vuelve a cruzar este estado de transición la TST es exacta, en caso contrario, el valor obtenido será una cota superior de la constante de velocidad. Cuando la energía de los reactivos es del orden de la energía correspondiente a la barrera para ese camino de reacción, se obtiene una buena aproximación. Los trabajos de Northrup⁶⁸ *et al* y Lazaridis y Paulaitis¹¹ presentados en la parte de métodos clásicos son dos buenos ejemplos de la aplicación de la TST a sistemas de interés bioquímico, donde se determinan aspectos cinéticos de reacciones que involucran enzimas.

4.3.2. La teoría variacional del estado de transición.

Sin embargo, a temperaturas bajas, cuando la masa de las especies involucradas directamente en la reacción es pequeña como por ejemplo en una

transferencia protónica, empiezan a aparecer efectos cuánticos que no son considerados en la TST convencional (i.e. reflexión no clásica y efecto túnel). En la mecánica clásica, una partícula puede oscilar estrictamente a la largo de la curva de potencial, pero en una descripción cuántica la partícula puede encontrarse en regiones prohibidas debido al principio de incertidumbre de Heisenberg.¹⁴⁰ En el caso de una transferencia protónica, el protón puede pasar del valle de los reactivos al valle de los productos sin tener necesariamente la energía suficiente para remontar el estado activado, fenómeno conocido como efecto túnel. En estos casos, la VTST representa una mejora a la TST¹⁴⁰ al incorporar en forma sistemática un factor de transmisión que evalúa globalmente estos efectos. Un segundo elemento fundamental diferencial entre ambas aproximaciones al problema, lo constituye la búsqueda del cuello de botella dinámico considerando la altura de la barrera como función de la posición a lo largo del camino de reacción. Así, en tanto la TST convencional requiere sólo del cálculo de la altura de la barrera y las funciones de partición correspondientes al punto de ensilladura y los reactivos, la VTST requiere que se evalúen constantes de velocidad para un rango de valores sobre la coordenada de camino de reacción,²⁴ tomando finalmente el valor correspondiente a la máxima barrera en términos de energía libre para el proceso modelado.

La VTST supone un conocimiento más completo de la HEP haciendo que el cálculo sea más costoso e incluso prohibitivo, para el estudio de sistemas de interés bioquímico, si los puntos sobre la misma y sus propiedades se determinan uno a uno con los métodos mencionados en la parte 2 y 3. Una opción alternativa consiste en desarrollar superficies analíticas de potencial como en el trabajo desarrollado por Kim, Truhlar y Kreevoy¹⁴¹ donde se estudia la transferencia de hidruros entre análogos del NAD⁺. En ese estudio, la VTST es utilizada en conjunto con la teoría de Marcus¹⁴² para determinar constantes de velocidad,

efectos isotópicos cinéticos y coeficientes de transmisión. Como podemos apreciar la superficie de energía potencial tiene una gran curvatura:

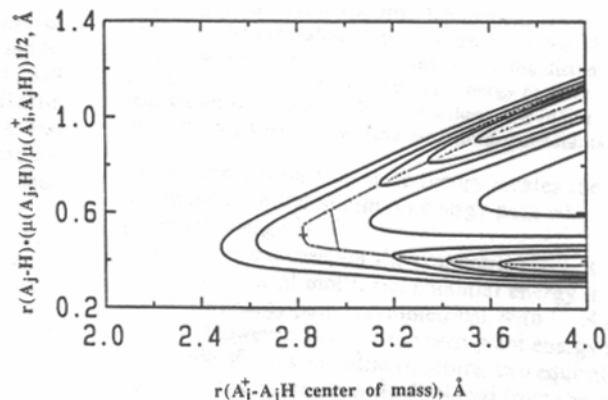


Figura 10.

por lo cuál el efecto túnel tendrá un rol importante en la cinética del proceso, reforzando la necesidad de usar la VTST con correcciones cuánticas.

La discrepancia media entre las constantes de velocidad calculadas y las observadas experimentalmente son de un factor de 1.6. Todas las características cualitativas fueron reproducidas, y los resultados se corresponden cuantitativamente bien con los resultados experimentales.

El trabajo de Kim, Truhlar y Kreevoy muestra la gran potencialidad de este método para el estudio de la cinética de reacciones de interés bioquímico, siempre y cuando sea posible encontrar una expresión analítica razonable para la función potencial.

Referencias

1. Enciclopedia Universal Larousse, **5**, (1973) p. 2730.
2. Wilson, E. B., *Am. Sci.* **74**, (1986) p. 70.
3. Eyring, H., Polanyi, M., *Phys. Chem.*, **B12**, (1931) p. 279.
4. Ventura, O., *Química Teórica volumen III: Estructura, interacciones y reactividad*, Fraga (Ed.), CSIC, Madrid (1991).
5. Dirac, P. A. M., *Proc. Roy. Soc., London*, **123**, (1929) p. 714.
6. Additional background material on the Nobel Prize in chemistry 1998, *Royal Swedish Academy of Sciences* (1998).
7. Hartsough, D. S., Merz, K. M. Jr., *JACS*, **114**, (1992) p.10113.
8. Hartsough, D. S., Merz, K. M. Jr., *JACS*, **115**, (1993) p. 6525.
9. Head-Gordon, T., Sorenson, J. M., *J. Phys. Chem B*, **103 (26)**, (1999).
10. Duncan, G., Huber, C., Welsh, W., *JACS*, **114**, (1992) p. 5784.
11. Lazaradis, T., Paulaitis, M. E., *JACS*, **116**, (1994) p. 1546.
12. Brutlag, D. L., Galper, A. R., Milis, D. H., *Comp. Applic. Biosciences (CABI)*, **7**, (1991) p. 9.
13. Eriksson, M.A.L., Härd, T. & Nilsson, L., *Biophys. J.*, **68**, (1995) p. 402.
14. Nakatsuji, H., Hasegawa, J., *J. Phys. Chem. B*, **102**, (1998).
15. Pettitt, B. M., Smith, P. E., *J. Phys. Chem*, **98**, (1994).
16. Truhlar, D. G., Cramer, L. J., *Solute/solvent interactions (Theor. and comp. chem.)*, **1**, (1994) p. 9.
17. Luque, F. J., Orozco, M., *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, (1996).
18. Jug, K., *Theoret. Chim. Acta*, **54**, (1980) p. 263.
19. Dunning, *Phys. Chem.*, **90**, (1986) p. 344.
20. Ventura, O., *Chemical Reactivity*, S. Fraga (Ed.), Elsevier, Amsterdam, (1991).
21. Mulliken, R. S., *J. Chem. Phys.*, **23**, (1955) p. 1833.
22. Nero, T. L., Iskander, M. N., *J. Chem. Soc. Perkins trans.*, **2**, (1993) p. 431.
23. Born, M., Oppenheimer, J. R., *Ann. Phys.*, **84**, (1927) p. 457.

24. Truhlar, D. G., Hase, W. L., *J. Phys. Chem.*, **87**, (1983) p. 2664.
25. Orozco, M., Tirado-Rives, J., Jorgensen, W. L., *Biochemistry*, **32**, (1995) p. 12864.
26. Fuxreiter, M., Warshel, A., *JACS*, **120**, (1998) p. 183.
27. Gabb, H. A., Prévost, C., *J. Comp. Chem.*, **18**, (1997) p. 2001.
28. Shields, G. C., Laughton, C. A., *JACS*, **119**, (1997).
29. Eyring, H., *Chem. Revs.*, **17**, (1935) p. 65.
30. Hyperchem Computacional Chemistry, Hypercube Inc., (1996).
31. Atkins, P. W., Friedman, R. S., *Molecular quantum mechanics*, 3ed., (1997).
32. Schrödinger, E., *Ann. Phys.*, **76**, (1926) p. 361.
33. Schlegel, H. B., *Modern electronic structure theory*, part 1, D. Yarkony (Ed.), (1995) p. 460
34. Coitiño, E. L., *Estudio teórico del efecto del agua sobre las reacciones de condensación aldólica del acetaldehído*. Universidad de la República-PEDECIBA, Montevideo, (1991).
35. Havlas, Z.; Zahradník, R., *Int. J. Quantum chem.*, **26**, (1984) p. 607.
36. Gaussian 98 user's reference, (1998).
37. Müller, K., *Angew. Chem.*, **19**, (1980) p. 1.
38. K. Fukui, *J. Phys. Chem.*, **74**, (1970) p. 4161.
39. Ishida, K.; Morokuma, K., y Kormornicki, A., *J. Chem. Phys.*, **66**, (1977) p. 2153.
40. K. Fukui, *Acc. Chem. Res.*, **14**, (1981) p. 363.
41. Fletcher, R., Reeves, C. M., *Computer J.*, **7**, (1964) p. 149.
42. Davidon, M. C., *USA EC Doc. Anl.-5990 (rev)*, (1959).
43. Hammond, G. S., *JACS.*, **77**, (1955) p. 334.
44. Halgren, T. A., Lipscomb, W. N., *Chem. Phys. Lett.*, **46**, (1977) p. 255.
45. Misako, A., Inoue, F., Motohisa, K., Dupuis, M., *JACS*, **119**, (1997) p. 12274.
46. Sancar, G. B., *Mutat. Res.*, **236**, (1990) p. 147.

47. Scannell, M. P., Fenick, D. J., Yeh, S. R., Falvey, D. E., *JACS*, **119**, (1997) p. 1971.
48. Dandliker, P. J., Holmlin, R. E., Barton, J. K., *Science*, **275**, (1997) p. 1465.
49. Yao, S., Plastaras, J. P., Marzilli, L. G., *Inorg. Chem*, **33**, (1994) p. 6061.
50. Weiner, S. J., Kollman, P. A., *JACS*, **106**, (1984) p. 765.
51. Allinger, N. L., *JACS*, **99**, (1977) p. 8127.
52. Allinger, N. L., Yuh, Y. H., *JACS*, **111**, (1989) p. 8551.
53. Jorgensen, W. L., Tirado-Rives, J., *JACS*, **110**, (1988) p. 1657.
54. Smith, J. C., Karplus, M., *JACS*, **114**, (1992) p. 805.
55. Alhambra, C, Luque, F. J., Orozco, M., *J. Phys. Chem. B*, **101**, (1997) p. 3846.
56. <http://www.amber.ucsf.edu/amber/newparams.html>.
57. Cornell, W. D., Cieplak, P., *JACS*, **117**, (1995).
58. Elber, R., Karplus, M., *Chem. Phys. Lett.*, **139**, (1987) p. 375.
59. Nowak, W., Czerminski, R., Elber, R., *JACS*, **113**, (1991) p. 5627.
60. Lazaridis, T., Tobias, D. J., Brooks, C. L. III, Paulaitis, M. E., *J. Chem. Phys.*, **95**, (1991) p. 7612.
61. Ando, M. E., Gerig, J. T., Weigand, E. F., *JACS*, **104**, (1982) p. 3172.
62. Birktoft, J. J., Blow, D. M., *J. Mol. Biol.*, **68**, (1972) p. 187.
63. Daggett, V., Schröder, S., Kollman, P., *JACS*, **113**, (1991) p. 8926.
64. Stamato, F. L. M. G., Tapia, O., *Int. J. Quantum Chem.*, **33**, (1988) p. 187.
65. DeTar, D. F., *JACS*, **103**, (1981) p. 107.
66. Wong, C. F., McCammon, J. A., *JACS*, **108**, (1986) p. 3830.
67. Brünger, A. T., Huber, R., Karplus, M., *Biochemistry*, **26**, (1987) p. 5153.
68. Northup, S. H., Pear, M. R., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**, (1982) p. 4035.
69. Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., Karplus, M., *J. Comput. Chem.*, **4**, (1983) p. 187.
70. Cerjan, C. J., Miller, W. H., *J. Chem. Phys.*, **75**, (1981) p. 2800.
71. Ulitsky, A., Elber, R., *J. Chem. Phys.*, **92**, (1990) p. 1510.
72. Slater, J. C., *Phys. Rev.*, **36**, (1930) p. 57

73. Kato, T., *Comm. Pure Appl. Math.*, **10**, (1957) p. 151.
74. Boys, S. F., *Proc. Roy. Soc., London*, **A 200**, (1950) p. 543.
75. Clementi, E., Davis, D. R., *J. Chem. Phys.*, **45**, (1966) p. 2593.
76. Hehre, W. J., Stewart, R. F., Pople, J. A., *J. Chem. Phys.*, **51**, (1969) p. 2657.
77. Kestner, N. R., *J. Chem. Phys.*, **28**, (1968) p. 252.
78. Boys, S. F., Bernardi, F., *Mol. Phys.*, **19**, (1970) p. 535.
79. Nagy, P. I., Durant, G. J., Hoss, W. P., Smith, D. A., *JACS*, **116**, (1994) p. 4898.
80. Black, J. W., Ganellin, C. R., *Experientia*, **30**, (1974) p. 111.
81. Topiol, S., Weinstein, H., Osman, R. J., *Med. Chem.*, **27**, (1984) p. 1531.
82. Parr, R. G., *J. Chem. Phys.*, **20**, (1952) p. 239.
83. Pople, J. A., Santry, D. P., Segal, G. A., *J. Chem. Phys.*, **43**, (1965) p. 5129.
84. Pople, J. A., Beveridge, D. L., Dobosch, P. A., *J. Chem. Phys.*, **47**, (1967) p. 2026.
85. Baird, N. C., Dewar, M. J. S., *J. Chem. Phys.*, **50**, (1969) p. 1262.
86. Dewar, M. J. S., Thiel, W., *JACS*, **99**, (1977) p. 4899.
87. Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F., Stewart, J. J. P., *JACS*, **107**, (1985) p. 3902.
88. Burstein, K. Y., Isaev, A. N., *Theoret. Chim. Acta*, **64**, (1984) p. 3987.
89. Voityuk, A. A., Bliznyuk, A. A., *Theoret. Chim. Acta*, **71**, (1987) p. 327.
90. Stewart, J. J. P., *J. Comput. Chem.*, **10**, (1989) p. 209.
91. Alagona, G., Ghio, C., *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, **287**, (1993) p. 253.
92. Goldblum, A., Glick, M., Rayan, A., *Theor. Chim. Acta*, **85**, (1993) p. 231.
93. Norris, K. E., Gready, J. E., *Journal of Mol. Struct. (THEOCHEM)*, **258**, (1992) p. 109.
94. Rach, W., Kiel, G., Gattow, G., *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **563**, (1988) p. 87.
95. Kratochvíl, B., Ondráček, J., Krechl, J., Hasek, J., *Acta Crystallogr.*, **C 43**, (1987) p. 2182.
96. Van Alsonoy, C., Schäfer, L., Siam, K., Ewbank, J. D., *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **187**, (1989) p. 271.

97. Murto, J., Raaska, T., Kunttu, H., Räsänen, M., *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **200**, (1989) p. 93.
98. Zerner, M. C., ZINDO, *Quantum Theory Project*, Uni. of Florida, Gainesville, USA.
99. Nicolau, D. V., Yamamoto, H., Yoshikawa, S., *MSI's solutions magazine*, july (1997).
100. Liu, Y., Lu, D., Lafont, A., Truhlar, D. G., Garrett, B. C., *JACS*, **115**, (1993) p. 7806.
101. Boys, S. F., *Proc. Roy. Soc., London*, **A201**, (1950) p. 125.
102. Das, G., Wahl, A. C., *Methods of Electronic Structure Theory*, H. F. Schaeffer (Ed), Plenum, New York, (1977) p. 51.
103. Moller, C., Plesset, M. S., *Phys. Rev.*, **46**, (1934) p. 618.
104. Pople, J. A., *Energy, Structure and Reactivity*, D. W. Smith, W. B. McRae (Eds.), Wiley, New York, (1973) p. 51.
105. Lowdin, P. O., *Int. J. Quantum Chem.*, **2**, (1968) p. 867.
106. Brueckner, K. A., *Phys. Rev.*, **97**, (1953) p. 1353.
107. Kohn, W., Sham, L. J., *Phys. Rev. A*, **140**, (1965) p. 1133.
108. Andres, J., Moliner, V., Picher, M. T., *Journal of organic chemistry*, **61**, (1996) p. 7777.
109. Parr, R. G., Yang, W., *Density-Funtional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford Science, Oxford (1989).
110. Radkiewicz, J. L., Zipse, H., Clarke, S., Houk, K. N., *JACS*, **118**, (1996) p. 9148.
111. Yang, W., Lee, T.S., *J. Chem. Phys.*, **103**, (1995) p. 5674.
112. Dixon, S. L., Merz, Jr. K. M., *J. Chem. Phys*, **107**, (1997) p. 879.
113. Lee, T.S., York, D. M., Yang, W., *J. Chem. Phys*, **105**, (1996) p. 2744.
114. Warwicker, J., Watson, H. C., *J. Mol. Biol.*, **157**, (1982) p. 671.
115. Gogonea, V., Merz Jr. K. M., *J. Phys. Chem. A.*, **103**, (1999) p. 5171.
116. Warshel, A., Levitt, M., *J. Mol. Biol.*, **103**, (1976) pp 227.

117. Warshel, A., *Computer modeling of chemical reactions in enzymes and solutions*, Wiley, New York (1992).
118. Singh, U. C., Kollman, P. A., *J. Comput. Chem.*, **7**, (1986) p. 718.
119. Field, M. J., Bash, P. A., Karplus, M., *J. Comput. Chem.*, **11**, (1990) p. 700
120. Gao, J., *J. Phys. Chem.*, **96**, (1992) p. 6432.
121. Stanton, R. V., Little, L. R., Merz, K. M., *J. Phys. Chem.*, **99**, (1995) p. 17344.
122. Estrin, D. A., Kohanoff, J., Laria, D. H., Weht, R. O., *Chem. Phys. Lett.*, **280**, (1997) p. 280.
123. Field, J. M., Amara, P., *Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Potentials*, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, (1997).
124. Bash, P. A., Field, M. J., Davenport, R. C., Petsko, G. A., Ringe, D., Karplus, M., *Biochemistry*, **30**, (1991) p. 5826.
125. Lyne, P. D., Mulholland, A. J., Richards, W. G., *JACS*, **117**, (1995) p. 11345.
126. Maseras, F., Morokuma, K., *J. Comp. Chem.*, **16**, (1995) p. 1170.
127. Humbel, S., Sieber, S., Morokuma, K., *J. Chem. Phys.*, **105**, (1996) p. 1959.
128. Coitiño, L. E., Truhlar, D. G., Morokuma, K., *Chem. Phys. Lett*, **259**, (1996) p. 159.
129. Noland, M., Coitiño, E. L., Truhlar, D. G., *J. Phys. Chem. A.*, **101**, (1997) p. 1193.
130. Kutzelnigg, W., *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, **202**, (1989) p. 11.
131. Walden, S. E., Wheeler, R. A., *J. Phys. Chem.*, **100**, (1996) p. 1530.
132. Cárdenas, R., Andrés, J., Krechl, J., Campillo, M., Tapia, O., *Int. J. Quantum Chem.*, **57**, (1996) p. 245.
133. Besler, B. H., Merz, K., Kollman, P. A., *J. Comp. Chem.*, **11**, (1990) p. 431.
134. Storer, J. W., Giesen, D. J., Cramer, C. J., Truhlar, D. G., *J. Computer-Aided Mol. Des.*, **9**, (1995) p. 87.
135. Tempczyk, A., Chuck, K., Villafranca, E., *MSI's solutions magazine*, (1997).

136. Hernández, B., Orozco, M., Luque, F. J., *J. Computer-Aided Mol. Des.*, **11**, (1996) p. 153.
137. Hernández, B., Orozco, M., Luque, F. J., *J. Computer-Aided Mol. Des.*, **10**, (1996) p. 535.
138. Akke, M., Skelton, N. J., Kordel, J., Palmer III, A. G., Chazin, W. J., *Biochemistry*, **32**, (1993) p. 9832.
139. Ben-Naim, A., *Statistical Thermodynamics for chemists and biochemists*, PLENUM, New York, (1992).
140. Houben, J. L., *The enzyme catalysis process*, PLENUM, New York, (1989) p. 275.
141. Kim, Y., Truhlar, D. G., Kreevoy, M. M., *JACS*, **113**, (1991) p. 7837.
142. Marcus, R. A., *J. Phys. Chem.*, **72**, (1968) p. 891.

Anexos

Índice de Abreviaturas

Orden alfabético

AM1	<i>Austin Model 1</i>	p. 52
AO	<i>Atomic Orbital</i>	p. 47
BO	Born-Oppenheimer.....	p. 19
BP	Boltzmann-Poisson.....	p. 65
BSSE	<i>Basis Set Superposition Error</i>	p. 48
CASSCF	<i>Complete Active Space Self Consistent Field</i>	p. 57
CCSS	<i>Correlated Capped Small System</i>	p. 73
CGTO	<i>Contracted Gaussian Type Orbital</i>	p. 47
CI	<i>Configuration Interaction</i>	p. 57
CM	<i>Charge Model</i>	p. 65
CNDO	<i>Complete Neglect of Differential Overlap</i>	p. 51
D&C	<i>Divide and Conquer</i>	p. 64
DFT	<i>Density Functional Theory</i>	p. 9
DZ	Doble Z.....	p. 48
ES	Ecuación de Schrödinger.....	p. 18
EVB	<i>Empirical Valence Bond</i>	p. 67
GTO	<i>Gaussian Type Orbital</i>	p. 47
HEP	Hiperficie de Energía Potencial.....	p. 16
HF	Hartree-Fock.....	p. 44
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>	p. 13
IMOMM	<i>Integrated Molecular Orbital Molecular Mechanics</i>	p. 72
IMOMO	<i>Integrated Molecular Orbital Molecular Orbital</i>	p. 72
INDO	<i>Intermediate Neglect of Differential Overlap</i>	p. 51
IRC	<i>Intrinsic Reaction Coordinate</i>	p. 24

LST	<i>Linear Sincronic Transit.</i>	p. 28
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>	p. 13
MBPT	<i>Many Body Perturbation Theory</i>	p. 57
MCSCF	<i>Multi-Configuration Self Consistent Field</i>	p. 57
MEP	<i>Minimun Energy Path</i>	p. 24
MINDO	<i>Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap</i>	p. 51
MNDO	<i>Modified Neglect of Differential Overlap</i>	p. 51
MO	<i>Molecular Orbital</i>	p. 45
MO-LCAO	<i>Molecular Orbital – Linear Combination of Atomic Orbital</i> ...	p. 46
MP	Møller-Plesset.....	p. 59
MRCI	<i>Multi-Reference Self Consistent Field</i>	p. 58
NDDO-SRP	<i>Neglect of Diatomic Differential Overlap – Specific Reaction Parameters</i>	p. 55
ONIOM	<i>Our own N-layered Integrated Molecular Orbital Molecular Mechanics</i>	p. 74
QCI	<i>Quadratic Configuration Interaction</i>	p. 58
QM/MM	<i>Quantum Mechanics/Molecular Mechanics</i>	p. 67
QST	<i>Quadratic Sincronic Transit.</i>	p. 29
RHF	<i>Restricted Hartree-Fock</i>	p. 45
SCF	<i>Self Consistent Field</i>	p. 45
STO	<i>Slater Type Orbital</i>	p. 47
TE	Termodinámica Estadística.....	p. 80
TST	<i>Transition State Theory</i>	p. 15
TZ	Triple Z.....	p. 48
UHF	<i>Unrestricted Hartree-Fock</i>	p. 46
VTST	<i>Variational Transition State Theory</i>	p. 14
ZDO	<i>Zero Differential Overlap</i>	p. 51
ZPE	<i>Zero Point Energy</i>	p. 81

Índice de Figuras

Orden de aparición

- F1:** Curva de energía potencial para una molécula diatómica. Tomado de *Hyperchem Computacional Chemistry*, Hypercube Inc (1996)..... (p. 16)
- F2:** Esquema del anillo tosilo unido a la serina 195 en el sitio activo de la α -quimiotripsina. Se muestra explícitamente los cuatro diedros considerados en los cálculos. Tomado de Lazaridis, T., Paulaitis, M. E., *JACS*, **116**, (1994)..... (p. 40)
- F3:** Estado de transición para la rotación del anillo tosilo en el bolsillo hidrofóbico de la α -quimiotripsina. El anillo tosilo se muestra en negrita visto de frente (a) y visto del costado de los residuos de serina 214 y 217 (b). Tomado de Lazaridis, T., Paulaitis, M. E., *JACS*, **116**, (1994)..... (p. 41)
- F4:** Coordenada de reacción para la rotación del anillo tosilo en el bolsillo hidrofóbico de la α -quimiotripsina. (a) Perfil energético: la línea entera representa la energía total y vdW, Phi y Elec las energías correspondientes a las fuerzas de van der Waals, la energía torsional y la energía electrostática respectivamente. (b) Seguimiento de los diedros a lo largo de la coordenada de reacción. Tomado de Lazaridis, T., Paulaitis, M. E., *JACS*, **116**, (1994)..... (p. 41)
- F5:** Mapa de energía potencial para la reacción DHA+MA obtenido a nivel HF/4-31G. Tomado Alagona, G., Ghio, C., *Journal of Mol. Struct. (THEOCHEM)*, **287**, (1993)..... (p. 53)

- F6:** Mapa de energía potencial para la reacción DHA+MA obtenido a nivel MNDO. Tomado Alagona, G., Ghio, C., *Journal of Mol. Struct. (THEOCHEM)*, **287**, (1993)..... (p. 53)
- F7:** Estructuras optimizadas de la succinimida y el 2-pirrolidinona y sus correspondientes aniones enolato. Los números entre paréntesis corresponden a los valores estructurales optimizados con DFT/6-31+G(d). Tomado de Radkiewicz, J. L., Zipse, H., Clarke, S., Houk, K. N., *JACS*, **118**, (1996)..... (p. 63)
- F8:** División de una proteína en subsistemas en el método D&C. Tomado de Gogonea, V., Merz Jr. K. M., *J. Phys. Chem. A.*, **103** (1999)..... (p. 65)
- F9:** Potencial electrostático de interacción para los sustratos xantina y 2-azahypoxantina a nivel HF/6-31G(d). A) Interacción con un hidrógeno; B) Interacción con un oxígeno. Tomado de Hernández, B., Orozco, M., Luque, F. J., *J. Computer-Aided Mol. Des.*, **11**, (1997)..... (p. 80)
- F10:** Superficie de energía potencial de la transferencia de hidruro en coordenadas pesadas por la masa. En línea punteada se muestra la MEP y el camino más probable para el efecto túnel a 300K . Tomado de Kim, Y., Truhlar, D. G., Kreevoy, M. M., *JACS*, **113**, (1991)..... (p. 86)

Índice de Tablas

Orden de aparición

- T1:** Tipo de átomo y situación química que representa, para el caso del tipo de átomo oxígeno implementado en el campo de fuerza AMBER desarrollado por Kollman *et al.*..... (p. 32)
- T2:** Energías de interacción de apilamiento inter-hebra en kcal/mol. Para cada dímero, las energías de la fila de arriba son las calculadas con MP2/6-31G(d)//HF/6-31G(d) y las de abajo con OPLS. Tomado de Alhambra, C., Luque, F. J., Orozco, M., *J. Phys. Chem. B*, **101** (1997) (p. 36)
- T3:** Efecto de la base sobre la energía relativa de los tautómeros t3H⁺-g3H⁺. Energía relativa en Kcal/mol. Geometría optimizada a nivel HF/6-31G(d). Tomado de Nagy, P. I., Durant, G. J., Hoss, W. P., Smith, D. A., *JACS*, **116** (1994).... (p. 50)
- T4:** Energía relativa al tautómero más estable en Kcal/mol. Los cálculos *single-point* fueron realizados sobre la estructura optimizada a nivel HF/6-31G(d), excepto el primer caso. Tomado de Nagy, P. I., Durant, G. J., Hoss, W. P., Smith, D. A., *JACS*, **116** (1994)..... (p. 50)
- T5:** La afinidad protónica y las energías relativas están en Kcal/mol para la 2-pirrolidinona y la Succinimida. Tomado de Radkiewicz, J. L., Zipse, H., Clarke, S., Houk, K. N., *JACS*, **118** (1996)..... (p. 63)
- T6:** Constantes de acoplamiento hiperfinas para los átomos de H, ¹⁴N, ¹⁵N, y ¹³C, de Indol radical y catión radical, calculadas con DFT usando los funcionales B3LYP y SVWN. Tomado de Walden, S. E., Wheeler, R. A., *J. Phys. Chem.*, **100** (1996)..... (p. 78)