

Tesis Doctoral

*“Estudios Computacionales de Sistemas
Orgánicos y Bioorgánicos”*

José Luis Borioni

2016

Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba

Departamento de Química Orgánica

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

2016

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Directora

Dra. Adriana B. Pierini

Comisión de Tesis

**Dr. Marcelo
Puiatti**

**Dra. Gabriela L.
Borosky**

**Dr. Mario A.
Quevedo**

Evaluador Externo

Dr. Ricardo D. Enriz

A Sol

A mi familia

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

En algún lugar creo haber leído que somos una mezcla de todo lo que conocemos. Seres complejos, compuestos por muchas personas y situaciones que nos han tocado en la vida.

Para mi fortuna puedo decir que me han abrazado PERSONAS increíbles durante este período -5 años-, las cuales me ofrecieron, y aún lo hacen, una gran cantidad de situaciones maravillosas que resultan en recuerdos. A estos los considero tesoros y los guardo como tal en la memoria de mi corazón... es mi forma de mantener a estas PERSONAS cerca.

Mi agradecimiento es enorme.

“Solo se puede decir que estamos vivos en esos momentos cuando nuestros corazones están conscientes de nuestros tesoros”.

-Thornton Wilder (1897 – 1975)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

LISTA DE ACRÓNIMOS	i
OBJETIVOS GENERALES	v
RESUMEN	vii

CAPÍTULO 1

MODELOS Y MÉTODOS	1
1.1 Mecánica cuántica	3
1.1.1 Aproximación de Born-Oppenheimer.....	5
1.1.2 Teoría de Hartree-Fock.....	7
1.1.2.1 Conjunto de bases	8
1.1.2.1.1 Bases de Pople	10
1.1.2.2 Principio variacional.....	11
1.1.2.3 Ecuaciones de Roothaan-Hall	12
1.1.2.4 Métodos de capa abierta	13
1.1.2.5 Correlación electrónica: limitaciones del método de HF.....	14
1.1.3 Teoría del funcional de la densidad	15
1.1.3.1 Funcionales de intercambio y correlación	17
1.1.3.1.1 Corrección de la Dispersión	19
1.1.3.1.2 Correcciones del intercambio a largo alcance.....	20
1.1.4 Solvente implícito	22
1.1.5 Orbitales naturales de enlace (NBO)	24
1.2 Mecánica molecular	24
1.2.1 <i>Docking</i> molecular	26
1.2.1.1 Funciones de evaluación (<i>Scoring Functions</i>)	26
1.2.1.2 Algoritmos de búsqueda conformacional.....	27
1.2.1.3 Mapas de Grilla	28
1.2.2 Dinámica molecular	28
1.2.2.1 Condiciones periódicas de contorno.....	29
1.2.2.2 Criterios de corte para las interacciones (<i>cut-off</i>).....	31
1.2.2.3 Integración.....	32
1.2.2.3.1 Algoritmos de integración	33
1.2.2.4 Dinámica molecular con restricciones.....	35
1.2.2.5 Ensamblés	36

1.2.2.6 Control de presión y temperatura	37
1.2.2.7 Análisis de una dinámica molecular	38
1.2.2.7.1 Energía libre de unión.....	39
1.3 Bibliografía	41

PARTE I

APLICACIONES DEL MODELADO A SISTEMAS BIOORGÁNICOS: ACETILCOLINESTERASA

CAPÍTULO 2

INTRODUCCIÓN GENERAL: PARTE I	49
2.1 Enfermedad de Alzheimer. Patogenia	52
2.1.1 Hipótesis colinérgica	52
2.1.2 Hipótesis tau	53
2.1.3 Hipótesis amiloidea.....	55
2.2 Enzima acetilcolinesterasa (AChE). Estructura y función	57
2.2.1 Estructura tridimensional.....	57
2.2.2 Función fisiológica.....	60
2.3 Inhibidores reversibles de la acetilcolinesterasa	63
2.3.1 Inhibidores del sitio activo.....	64
2.3.2 Inhibidores duales	67
2.4 Bibliografía	72

CAPÍTULO 3

ESTUDIOS DE INTERACCIONES ENTRE ACETILCOLINESTERASA Y ALCALOIDES DEL *LYCOPodium* EXTRAÍDOS DE LA HUPERZIA SAURURUS ..

3.1 Introducción	81
3.2 Objetivos específicos	83
3.3 Métodos.....	84
3.3.1 <i>Docking</i> molecular	84
3.3.2 Parametrización de residuos no estándares.....	85
3.3.3 Simulaciones de DM	85
3.3.4 Evaluación de la actividad inhibitoria sobre AChE	86

3.4 Resultados y discusión.....	87
3.4.1 Estudios de <i>docking</i> molecular.....	87
3.4.2 Estudios de dinámica molecular.....	91
3.4.2.1 Análisis de interacciones	93
3.5 Conclusiones	97
3.6 Bibliografía.....	98

CAPÍTULO 4

DERIVADOS DE SOLANOCAPSINA COMO POTENCIALES INHIBIDORES DE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA: *DOCKING* Y DINÁMICA MOLECULAR 103

4.1 Introducción	105
4.2 Objetivos específicos	107
4.3 Métodos.....	109
4.3.1 Información experimental.....	109
4.3.2 <i>Docking</i> molecular	109
4.3.3 Simulaciones de DM.....	110
4.4 Resultados y discusión.....	111
4.4.1 Estudios de <i>docking</i> molecular.....	111
4.4.2 Estudios de dinámica molecular.....	115
4.5 Conclusiones	120
4.6 Bibliografía.....	121

CAPÍTULO 5

MODELO LINEAL DE PREDICCIÓN DE INHIBIDORES DUALES DE AChE 123

5.1 Introducción	125
5.2 Objetivos específicos	128
5.3 Métodos.....	129
5.4 Resultados y discusión.....	129
5.4.1 Construcción del conjunto de entrenamiento.....	129
5.4.2 Alcaloides esteroidales.....	131
5.4.3 Inhibidores híbridos.....	134
5.5 Conclusiones	141

5.6 Bibliografía	143
-------------------------------	------------

PARTE II

CÁLCULO CON MODELOS DE ESTRUCTURA ELECTRÓNICA EN SISTEMAS ORGÁNICOS

CAPÍTULO 6

INTRODUCCIÓN GENERAL: PARTE II.....	149
--	------------

6.1 Afinidad electrónica	152
---------------------------------------	------------

6.1.1 Aniones inestables.....	154
-------------------------------	-----

6.1.1.1 Métodos para tratar radicales aniones del tipo N.....	155
---	-----

6.2 Potenciales de reducción	158
---	------------

6.2.1 Definición de potencial de reducción estándar	159
---	-----

6.2.2 Protocolos basados en solvente implícito	161
--	-----

6.3 Bibliografía	164
-------------------------------	------------

CAPÍTULO 7

ESTUDIO DEL DESEMPEÑO DE FUNCIONALES DE DFT PARA EL MODELADO DE ANIONES	169
--	------------

7.1 Objetivos específicos	171
--	------------

7.2 Metodología	171
------------------------------	------------

7.2.1 Cálculo directo de la <i>AE</i>	172
---	-----

7.2.2 <i>AE</i> obtenidas por extrapolación.....	173
--	-----

7.2.3 Cálculo de los potenciales de reducción.....	173
--	-----

7.3 Resultados y discusión.....	173
--	------------

7.3.1 Cálculo de <i>AEs</i>	174
-----------------------------------	-----

7.3.2 Calculo de potenciales de reducción.....	181
--	-----

7.4 Conclusiones	186
-------------------------------	------------

7.5 Bibliografía	188
-------------------------------	------------

CONCLUSIONES GENERALES.....	191
------------------------------------	------------

ANEXOS	195
---------------------	------------

Anexo A	197
Anexo B	199
Bibliografía.....	216

LISTA DE ACRÓNIMOS

A3	<i>Autodock3</i>
A4.2	<i>Autodock4.2</i>
ACE	Electrodo de Cloruro de Plata
ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima Acetilcolinesterasa
AChEI	Inhibidor de Acetilcolinesterasa
AChE-M	Monómero de Acetilcolinesterasa
AChE-T	Tetrámero de Acetilcolinesterasa
AE	Afinidad Electrónica
AEA	Afinidad Electrónica Adiabática
AEV	Afinidad Electrónica Vertical
APP	Proteína Precursora de β -amiloide
AV	<i>Autodock Vina</i>
BO	Aproximación de Born-Oppenheimer
ChAT	Enzima Colinacetiltransferasa
DAG	Diacilglicerol
DC	Dominio Citoplasmático
DEC	Dominio Extracelular
DFT	Teoría del Funcional de la Densidad (<i>Density Functional Theory</i>)
DM	Dinámica Molecular Clásica
DTM	Dominio Transmembrana
EA	Enfermedad de Alzheimer
<i>EeAChE</i>	Acetilcolinesterasa de <i>Electrophorus Electricus</i>
ETE	Espectroscopia de Transmisión Electrónica
FCT α	Fragmento C-terminal de 83 Aminoácidos
FCT β	Fragmento C-terminal de 99 Aminoácidos

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAFF	<i>General AMBER Force Field</i>
GA-LS	Algoritmo Genético – Búsqueda Local (<i>Genetic algorithm- Local Search</i>)
GGA	Aproximación de Gradiente Generalizado (<i>Generalized Gradient Approximation</i>)
GTO	Funciones tipo <i>Gaussianas</i>
H	Hamiltoniano
H₀	Hamiltoniano en Fase Gaseosa
<i>hAChE</i>	Acetilcolinesterasa de humano
H_{elec}	Hamiltoniano Electrónico
HF	Hartree-Fock
H_N	Hamiltoniano Nuclear
HOMO	Orbital Molecular Ocupado de Mayor Energía (<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>)
IE	Índices de Eficiencia
LDA	Aproximación de la Densidad Local (<i>Local Density Approximation</i>)
LUMO	Orbital Molecular Desocupado de Menor Energía (<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>)
MM	Mecánica Molecular
MM-GBSA	<i>Molecular Mechanic-Generalized Born Surface Area</i>
MM-PBSA	<i>Molecular Mechanic-Poisson-Boltzmann surface area</i>
N	Anión de No Valencia
NHA	Numero de Átomos Distintos a Hidrogeno
NHE	Electrodo Normal de Hidrogeno (<i>Normal Hydrogen Electrode</i>)
NOC	Número de Átomos de Carbono
PCM	<i>Método del Continuo Polarizado(Polarized Continuum Model)</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
QM/MM	Simulación Híbrida de Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
RA	Radical Anión
R _c	Radio de Corte

<i>RESP</i>	<i>Restrained Electrostatic Potential</i>
RF	Campo de Reacción
RHF	<i>Restricted</i> Hartree-Fock
RMSD	Desviación Cuadrática Media de las Posiciones
S	Matriz de Solapamiento
SA	Sitio Activo
SAP	Sitio Aniónico Periférico
SAR	<i>Struture-Activity Relationship</i>
SCE	Electrodo de Calomel Saturado (<i>Saturated Calomel Electrode</i>)
SCF	Método de Campo Autoconsistente (<i>Self Consistent Field</i>)
SCRF	Campo de Reacción Auto-Consistente (<i>Self Consistent Reaction Field</i>)
SEP	Superficie de Energía Potencial
STO	funciones tipo <i>Slater</i>
<i>TcAChE</i>	Acetilcolinesterasa de <i>Torpedo Californica</i>
TD-DFT	Teoría del funcional de la Densidad Dependiente del Tiempo (<i>Time Dependent DFT</i>)
TE	Transferencia de Electrones
UHF	<i>Unrestricted</i> Hartree-Fock
V	Anión de Valencia
vAChT	Vesícula de Transporte
ρ	Densidad Electrónica
Φ	Función de Onda Prueba Antisimétrica Normalizada
Ψ	Función de Onda
Ψ_{elec}	Función de Onda Electrónica
βA	Péptido β -amiloide
ε	constante dieléctrica
χ_{μ}	Orbital Atómico
\mathbf{H}_{tot}	Hamiltoniano Total del Sistema
E_{Abs}°	Potencial Absoluto Estándar
E^{XC}	Término de Intercambio-Correlación
ε^{XC}	Densidad de Energía

ϕ_i

Orbitales Molecular

ϕ_{nml}^{GTO}

Orbitales Gaussianos

OBJETIVOS GENERALES

El objetivo central que motivó esta tesis es el estudio de sistemas enzimáticos y orgánicos empleando modelos y métodos de la química computacional.

En una primera parte se plantea estudiar las interacciones de compuestos orgánicos con la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Esta enzima se encuentra en el sistema nervioso central y periférico, y su función fisiológica es la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. Mediante la hidrólisis de este neurotransmisor se finaliza la comunicación entre células colinérgicas, y debido a su función, la AChE es un blanco terapéutico en la enfermedad de Alzheimer (EA). Esta enfermedad es la más común de las demencias y afecta a una porción importante de la población mayor a 65 años deteriorando seriamente sus habilidades cognitivas.

En este escenario, planteamos estudiar y caracterizar, mediante técnicas de mecánica molecular clásica, los complejos formados entre compuestos orgánicos de actividad conocida y la enzima AChE. Por un lado, se propone explorar los modos de unión de alcaloides del *Lycopodium* extraídos de la *Huperzia Saururus*. Así como también, del alcaloide esteroide solanocapsina extraído de *Solanum pseudocapsicum L* y sus derivados semisintéticos. Mediante el cálculo de la energía de unión y la descomposición de la misma se pretende identificar los aminoácidos con los cuales debe interaccionar un compuesto orgánico para presentar una buena actividad inhibitoria. Por otro lado, se plantea el diseño de un modelo lineal de predicción de actividad experimental de inhibidores duales de la enzima en cuestión. La información obtenida a partir de estos estudios será de utilidad para el diseño de potenciales inhibidores de la enzima que puedan ser aplicados en terapias contra la EA.

En una segunda parte de la tesis se proyecta modelar aniones orgánicos inestables mediante modelos y métodos de la química cuántica. Los aniones y radicales aniones son intermediarios frecuentes en importantes mecanismos

orgánicos en los cuales intervienen eventos de transferencia electrónica como el daño reductivo del DNA y la cadena respiratoria, entre otras. El modelado de estas especies iónicas inestables ha sido un desafío para la química computacional y el desarrollo de metodologías para el cálculo de algunas de sus propiedades está en continuo desarrollo.

RESUMEN

El trabajo expuesto en la presente tesis doctoral se llevó a cabo aplicando métodos y modelos de la química computacional. Específicamente, los sistemas abordados se modelaron y simularon utilizando métodos de la mecánica molecular clásica como *docking* molecular y dinámica molecular (DM), y métodos cuánticos como la teoría del funcional de la densidad (DFT). Estos métodos se presentan en forma general en el Capítulo 1 de esta tesis.

El trabajo de tesis gira en torno de dos ejes principales. El primero está vinculado al estudio de complejos formados entre la enzima acetilcolinesterasa (AChE) e inhibidores de la misma. Además, en esta parte se expone el desarrollo de un modelo lineal de predicción de actividad de inhibidores duales de dicha enzima. Por otra parte, el segundo eje está relacionado al estudio del desempeño de distintos funcionales y modelos de DFT en el modelado de aniones orgánicos inestables.

Particularmente, el primer eje temático se encuentra dividido en tres temas fundamentales. En el primero: "*Estudio de interacciones entre AChE y alcaloides del Lycopodium extraídos de la Huperzia Saururus*" (Capítulo 3) se describen y comparan los modos de unión de inhibidores alcaloides de *Lycopodium* y huperzina A con AChE. Para cada complejo obtenido se determinó la energía de unión con los métodos MM-PBSA y MM-GBSA. Se encontró que la unión en el sitio activo se ve favorecida en todos los compuestos activos. Además, el método MM-GBSA predijo los valores de energía de unión en concordancia con los valores de actividad experimental.

En la segunda parte, titulada "*Derivados de Solanocapsina como Potenciales Inhibidores de la Enzima AChE*" (Capítulo 4) se estudian las interacciones globales de inhibidores duales con la enzima. Para el conjunto de ligandos estudiados, se encontraron dos modos de unión principales, y mediante DM y una descomposición de la energía de unión se pudo demostrar que los residuos

Trp84, Phe330, Trp279, Phe331, Asp72, Tyr334 y Ser286 son fundamentales para la actividad de los mismos.

Por último, en el tercer tema: “*Modelo Lineal de Predicción de Inhibidores duales de la enzima AChE*” (Capítulo 5) se busca un modelo de predicción de inhibidores duales empleando un conjunto de entrenamiento de inhibidores informados en bibliografía. El modelo fue construido correlacionando de manera lineal los valores de energía de unión e índices de eficiencia con la actividad biológica.

Por otro lado, en el segundo eje, titulado “*Estudio del Desempeño de Funcionales de DFT para el Modelado de Aniones*” (Capítulo 7) se evaluó la capacidad de 23 funcionales de DFT y el método *ab initio* MP2 para modelar correctamente aniones inestables. Para encontrar los mejores funcionales y evaluar sus ventajas y limitaciones se emplearon como indicadores las propiedades de afinidad electrónica (*AE*) y potenciales de reducción de moléculas orgánicas de tamaño medio. En términos generales, se encontró que los funcionales híbridos son los mejores para el cálculo de *AEs*. En cambio, en el cómputo de potenciales de reducción los funcionales GGA funcionaron realmente bien.

Como se puede notar, durante la tesis se estudiaron sistemas de tamaño pequeño (menor a 50 átomos), los cuales fueron modelados con métodos de la química cuántica explorando distintas metodologías modernas para el cómputo de propiedades como la *AE* y los potenciales de reducción. Además, se abordaron sistemas de tamaño más grande (16000 átomos aproximadamente) con métodos de mecánica molecular aplicados al entendimiento de la unión de inhibidores de distinta naturaleza de la AChE y la propuesta de un modelo lineal de inhibidores duales.

CAPITULO 1

MODELOS Y MÉTODOS

MODELOS Y MÉTODOS	1
1.1 Mecánica cuántica	3
1.1.1 Aproximación de Born-Oppenheimer.....	5
1.1.2 Teoría de Hartree-Fock.....	7
1.1.2.1 Conjunto de bases	8
1.1.2.1.1 Bases de Pople	10
1.1.2.2 Principio variacional.....	11
1.1.2.3 Ecuaciones de Roothaan-Hall	12
1.1.2.4 Métodos de capa abierta	13
1.1.2.5 Correlación electrónica: limitaciones del método de HF.....	14
1.1.3 Teoría del funcional de la densidad	15
1.1.3.1 Funcionales de intercambio y correlación	17
1.1.3.1.1 Corrección de la Dispersión	19
1.1.3.1.2 Correcciones del intercambio a largo alcance.....	20
1.1.4 Solvente implícito	22
1.1.5 Orbitales naturales de enlace (NBO)	24
1.2 Mecánica molecular	24
1.2.1 <i>Docking</i> molecular	26
1.2.1.1 Funciones de evaluación (<i>Scoring Functions</i>)	26
1.2.1.2 Algoritmos de búsqueda conformacional.....	27
1.2.1.3 Mapas de Grilla	28
1.2.2 Dinámica molecular	28
1.2.2.1 Condiciones periódicas de contorno.....	29
1.2.2.2 Criterios de corte para las interacciones (<i>cut-off</i>).....	31
1.2.2.3 Integración.....	32
1.2.2.3.1 Algoritmos de integración	33
1.2.2.4 Dinámica molecular con restricciones.....	35
1.2.2.5 Ensamblados	36
1.2.2.6 Control de presión y temperatura.....	37
1.2.2.7 Análisis de una dinámica molecular.....	38

1.2.2.7.1 Energía libre de unión.....	39
1.3 Bibliografía	41

En el presente capítulo se realizará una revisión de algunos modelos y métodos computacionales empleados en la presente tesis. Específicamente, se desarrollarán conceptos vinculados con modelos de Mecánica Cuántica y Mecánica Molecular Clásica que se fundamentan en la aproximación de Born-Oppenheimer.

1.1 Mecánica cuántica

El postulado fundamental de la mecánica cuántica indica que dado un sistema químico, éste queda descrito por una *función de onda* ($\Psi(\mathbf{q}, \mathbf{t})$), donde \mathbf{q} indica la posición de las partículas y \mathbf{t} el tiempo. Además, distintos operadores pueden actuar sobre Ψ devolviendo propiedades observables del sistema. En particular, la energía del sistema puede ser obtenida mediante la acción del operador Hamiltoniano (\mathbf{H}) sobre $\Psi(\mathbf{q})$:

$$\mathbf{H}\Psi(\mathbf{q}) = E\Psi(\mathbf{q}) \quad (1.1)$$

Ésta es una función de estado en la cual el escalar E es el autovalor de la energía del sistema en estado estacionario, es decir, un sistema donde el potencial externo no cambia con el tiempo.^[1]

La ecuación de Shrödinger, para sistemas estacionarios, describe la variación de la función de onda con las coordenadas espaciales:

$$\mathbf{H}_{tot}(\mathbf{Q}, \mathbf{q})\Psi(\mathbf{Q}, \mathbf{q}) = E_{tot}\Psi(\mathbf{Q}, \mathbf{q}) \quad (1.2)$$

donde \mathbf{Q} representa el conjunto de las coordenadas espaciales de los núcleos y \mathbf{q} las coordenadas espaciales y de espín de los electrones. En el caso de moléculas, \mathbf{H}_{tot} representa el operador Hamiltoniano para un sistema de M núcleos y N electrones. En situaciones especiales, como la presencia de un campo eléctrico o magnético externo, entre otros, la ecuación involucra otros términos.^[1]

En términos generales, la ecuación 1.2 tiene numerosas autofunciones Ψ aceptables para una dada molécula, resultando en diferentes autovalores E . Entonces, existe un conjunto completo (posiblemente infinito) de autofunciones Ψ_i con autovalores E_i asociados.

Por su parte, el Hamiltoniano se encuentra compuesto por los siguientes terminos:

$$\mathbf{H}_{tot}(\mathbf{Q}, \mathbf{q}) = \mathbf{T}_n(\mathbf{Q}) + \mathbf{T}_e(\mathbf{q}) + \mathbf{V}_{nn}(\mathbf{Q}) + \mathbf{V}_{ne}(\mathbf{Q}, \mathbf{q}) + \mathbf{V}_{ee}(\mathbf{q}) \quad (1.3)$$

La parte derecha de la ecuación 1.3 contiene, los operadores de energía cinética nuclear y electrónica (\mathbf{T}_n y \mathbf{T}_e), y los correspondientes a los potenciales núcleo-núcleo, núcleo-electrón y repulsión interelectrónica (\mathbf{V}_{nn} , \mathbf{V}_{ne} y \mathbf{V}_{ee}), respectivamente.^[2]

Extendiendo cada operador y empleando unidades atómicas se obtiene la siguiente expresión:

$$\mathbf{H}_{tot} = -\frac{1}{2} \sum_{A=1}^M \frac{1}{M_A} \nabla_A^2 - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (1.4)$$

El Hamiltoniano de la ecuación 1.4 posee términos de atracción y repulsión de a pares, implicando que ninguna partícula se mueve independiente de las demás, y a esto se lo define como “correlación”. Este término es ampliamente utilizado en bibliografía y lo será en adelante en este capítulo. El empleo de este Hamiltoniano que involucra el movimiento correlacionado de las partículas hace que resulte imposible encontrar las funciones de onda exactas, ya que la ecuación 1.4 no resulta separable.^[3]

1.1.1 Aproximación de Born-Oppenheimer

Para simplificar el problema electrónico molecular de algún modo, se utiliza la aproximación de Born-Oppenheimer (BO). Ésta se basa en la consideración práctica de que el electrón posee una masa más pequeña que los núcleos y, por ende, el relajamiento electrónico respecto al movimiento nuclear es instantáneo. En virtud de esto, es conveniente desacoplar los movimientos electrónicos y nucleares, y computar la energía electrónica para posiciones nucleares fijas.

Con esta consideración, la aproximación de BO, simplifica el \mathbf{H}_{tot} , debido a que, como no hay movimiento nuclear, la energía cinética nuclear (\mathbf{T}_n) es cero y la energía potencial de la repulsión entre los núcleos (\mathbf{V}_{nn}) es una constante (ver ec. 1.3). Entonces, el Hamiltoniano se reduce a lo que se conoce como el *Hamiltoniano electrónico*:

$$\mathbf{H}_{tot} = \mathbf{T}_n + \mathbf{H}_{elec} \Rightarrow \mathbf{H}_{tot} = \mathbf{H}_{elec} \quad (1.5)$$

siendo \mathbf{H}_{elec}

$$\begin{aligned} &= -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N v(\mathbf{r}) - \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (1.6) \\ &= \mathbf{T}_e(\mathbf{q}) + \mathbf{V}_{ne}(\mathbf{Q}, \mathbf{q}) + \mathbf{V}_{ee}(\mathbf{q}) + \mathbf{V}_{nn}(\mathbf{Q}) \end{aligned}$$

Se define el término $v(\mathbf{r})$ como “potencial externo”, el cual actúa sobre los electrones debido a la carga de los núcleos.

$$v(\mathbf{r}_i) = \sum_A^M \frac{Z_A}{|\mathbf{r}_{iA}|} \quad (1.7)$$

Como consecuencia, la ecuación de Schrödinger para el movimiento electrónico está dada por:

$$\mathbf{H}_{elec}(\mathbf{Q}, \mathbf{q})\Psi_{elec}(\mathbf{Q}, \mathbf{q}) = E_{elec}\Psi_{elec}(\mathbf{Q}, \mathbf{q}) \quad (1.8)$$

Tanto la función de onda electrónica Ψ_{elec} como la E_{elec} dependen de las coordenadas nucleares, ya que según la aproximación de BO depende de las posiciones de los núcleos y no de sus momentos.

Debido a que, por cada configuración de las coordenadas nucleares hay una Ψ_{elec} y una E_{elec} correspondiente al estado fundamental, se puede construir una superficie de energía potencial (SEP) del sistema.

Por lo tanto, si los núcleos cambian sus coordenadas en $\Delta\mathbf{Q}$, entonces la función de onda electrónica cambia instantáneamente de $\Psi_{elec}(\mathbf{Q}, \mathbf{q})$ a $\Psi_{elec}(\mathbf{Q} + \Delta\mathbf{Q}, \mathbf{q})$ y la energía electrónica cambia de $E_{elec}(\mathbf{Q}, \mathbf{q})$ a $E_{elec}(\mathbf{Q} + \Delta\mathbf{Q}, \mathbf{q})$. De este modo, a medida que los núcleos se mueven, la energía electrónica varía suavemente como una función de las coordenadas nucleares y, por ende, la $E_{elec}(\mathbf{Q})$ se convierte efectivamente en la energía potencial para el movimiento nuclear. Por consiguiente, la ecuación de Schrödinger para el movimiento nuclear es:

$$\mathbf{H}_N\Psi_N = E\Psi_N \quad (1.9)$$

Las variables en la ecuación de Schrödinger nuclear son las coordenadas nucleares. La energía E (ecuación 1.9) es la energía total de la molécula, ya que el Hamiltoniano nuclear incluye el operador para la energía cinética nuclear y el termino correspondiente a la energía electrónica, E_{elec} .

1.1.2 Teoría de Hartree-Fock

Para sistemas multielectrónicos, una solución exacta de la ecuación de Schrödinger no es posible. Sin embargo, algunas aproximaciones y procedimientos pueden arrojar una solución para átomos y moléculas con más de un electrón. En este sentido, la aproximación de Hartree-Fock (HF) emplea el principio variacional, considerando además, a la función de onda como una función antisimetrizada de N funciones de onda monoeléctricas.

La forma simple de construir Ψ es mediante una combinación de los orbitales moleculares a través del producto de Hartree:

$$\Psi(\mathbf{r}) = \phi_1(\mathbf{r}_1) \phi_2(\mathbf{r}_2) \dots \phi_N(\mathbf{r}_N) \quad (1.10)$$

donde \mathbf{r}_i representa las coordenadas de cada electrón.

Ahora bien, como los electrones poseen espín = $\pm 1/2$, la función de onda electrónica debe ser antisimétrica respecto al intercambio de las coordenadas espaciales y de espín de los electrones. El principio de antisimetría representa la generalización del Principio de Exclusión de Pauli.^[1, 3] En virtud de esto, una función de onda debe cambiar su signo si las coordenadas de un par de electrones se intercambian, aunque su densidad no se vea modificada.^[4]

Se puede construir una función de onda para un sistema de capa cerrada (numero par de electrones) definiendo $N/2$ orbitales moleculares para un sistema con N electrones, y asignar electrones en los orbitales de a pares y con el espín opuesto. Esto se puede expresar como un determinante al que se lo conoce como el *determinante de Slater*, que se muestra a continuación:

$$\Psi(\mathbf{r}) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \phi_1(\mathbf{r}_1)\alpha(1) & \phi_1(\mathbf{r}_1)\beta(1) & \phi_2(\mathbf{r}_1)\alpha(1) & \phi_2(\mathbf{r}_1)\beta(1) & \dots & \dots & \phi_{N/2}(\mathbf{r}_1)\alpha(1) & \phi_{N/2}(\mathbf{r}_1)\beta(1) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \phi_1(\mathbf{r}_i)\alpha(i) & \phi_1(\mathbf{r}_i)\beta(i) & \phi_2(\mathbf{r}_i)\alpha(i) & \phi_2(\mathbf{r}_i)\beta(i) & \dots & \dots & \phi_{N/2}(\mathbf{r}_i)\alpha(i) & \phi_{N/2}(\mathbf{r}_i)\beta(i) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \phi_1(\mathbf{r}_N)\alpha(N) & \phi_1(\mathbf{r}_N)\beta(N) & \phi_2(\mathbf{r}_N)\alpha(N) & \phi_2(\mathbf{r}_N)\beta(N) & \dots & \dots & \phi_{N/2}(\mathbf{r}_N)\alpha(N) & \phi_{N/2}(\mathbf{r}_N)\beta(N) \end{vmatrix} \quad (1.11)$$

Cada fila corresponde a todas las posibles asignaciones del electrón i para

todas las combinaciones de espín orbital. Intercambiar dos electrones es igual que intercambiar dos filas o dos columnas del determinante, que se va a reflejar en un cambio de signo. El factor inicial $(\frac{1}{\sqrt{N!}})$ es necesario para normalizar la función de onda.

Esta formulación no es sólo un artilugio matemático para obtener una función de onda antisimétrica. La mecánica cuántica especifica que no es posible determinar exactamente la ubicación de un electrón, sino más bien es posible obtener una densidad de probabilidad. Este determinante combina todos los posibles orbitales de espín que pueden ocupar todos los electrones en el sistema molecular, y de esta manera, construir la función de onda.

1.1.2.1 Conjunto de bases

Un orbital molecular individual es definido como una combinación lineal de orbitales atómicos (LCAO, de sus siglas en inglés):

$$\phi_i = \sum_{\mu=1} c_{\mu i} \chi_{\mu} \quad (1.12)$$

donde χ_{μ} representa a un orbital atómico, $c_{\mu i}$ es conocido como el coeficiente de expansión del orbital molecular y la sumatoria es sobre un conjunto definido de bases.

La aproximación siguiente se encuentra en la expresión de cada orbital molecular como una combinación lineal de un conjunto predefinido de funciones de un electrón conocidas como "*funciones bases*". Estas funciones bases están usualmente centradas en el núcleo y presentan algunas semejanzas con los orbitales atómicos.

Las funciones bases más conocidas y utilizadas en los cálculos computacionales son las funciones tipo *Slater* (STO), y las funciones tipo *Gaussianas* (GTO).^[5-7]

En funciones bases tipo Slater los orbitales están definidos por la siguiente ecuación:

$$\phi_{nml}^{STO} = N_{\zeta} r^{n-1} e^{-\zeta r} Y_l^m \quad (1.13)$$

donde ζ es el parámetro que se puede determinar variacionalmente, N_{ζ} la constante de normalización, Y_l^m corresponde al armónico esférico empleado, l y m son los números cuánticos del momento angular.

Los orbitales de Slater no son funciones ortogonales y las integrales bielectrónicas son muy difíciles de resolver. Por esta razón, su uso ha sido limitado.

Por otra parte, los orbitales gaussianos están definidos por:

$$\phi_{nml}^{GTO} = N_{\alpha} r^{n-1} e^{-\alpha r^2} Y_l^m \quad (1.14)$$

donde ahora α es el parámetro variacional y N_{α} la constante de normalización. Aunque los orbitales gaussianos siguen siendo funciones no ortogonales su resolución es más sencilla. Muchos programas empleados para modelar sistemas químicos, tales como *Gaussian*, emplean funciones bases del tipo gaussianas.^[8]

Una sola gaussiana da una representación muy pobre de un orbital atómico, y por ende, la construcción de las funciones bases se lleva a cabo mediante la combinación lineal de gaussianas primitivas de distintos exponentes (g_p):

$$\chi_{\mu} = \sum_p d_{\mu p} g_p \quad (1.15)$$

donde $d_{\mu p}$ es una constante fija dentro del conjunto de bases, y para un orbital molecular tenemos:

$$\phi_i = \sum_{\mu=1} c_{\mu i} \chi_{\mu} = \sum_{\mu=1} c_{\mu i} \left(\sum_p d_{\mu p} g_p \right) \quad (1.16)$$

1.1.2.1.1 Bases de Pople

Pople y colaboradores han diseñado un conjunto de bases que son muy utilizadas en el modelado de sistemas orgánicos.^[9] Las bases se especifican según la notación *k-nlmG*, donde *k* representa el número de gaussianas primitivas empleadas para describir las capas internas, y los valores *nlm* indican en cuantas funciones se dividen los orbitales de valencia y cuantas primitivas son empleadas para su representación. En este tipo de bases la representación de los orbitales de valencia se encuentra dividida, y por esto se las denominan *split valence*. Veamos unos ejemplos para comprender la notación y como están compuestas las mismas:

- i) 6-31G: esta es una base *split valence*, donde los orbitales internos están representados por una contracción de seis primitivas, la parte interna de los orbitales de valencia está constituida por la contracción de tres funciones primitivas y la parte externa de valencia por solo una primitiva.
- ii) 6-311G: esta es una base *triple split valence*, las capa interna está constituida por seis funciones primitivas y cada orbital atómico de valencia está dividido en tres funciones, representadas por tres, una y una función primitiva, respectivamente.

A cada conjunto de base se le puede adicionar funciones difusas y de polarización. Las funciones difusas son normalmente funciones *s* y *p*, y se mencionan antes de la letra G. Estas se denotan por un signo + o ++; un signo + indica un conjunto de difusas *s* y *p* para los átomos pesados, y el segundo + indica que una difusa *s* es adicionada a los átomos de hidrógeno.

Por su parte, las funciones de polarización son explicitadas después de la

letra G. Por ejemplo, la base 6-31G(d) (o 6-31G*), es una base con funciones de polarización tipo d para los átomos pesados. En cambio, la base 6-311G(2df,2pd) posee dos conjuntos de funciones de polarización d y una f sobre los átomos pesados, y dos conjuntos de funciones de polarización p y una d sobre los átomos de hidrógeno.

Además de las bases de Pople, existen otras bases muy empleadas como las de Dunning-Huzinaga, MINI, MIDI, MAXI y las bases consistentes de correlación (cc), estas no son desarrolladas en este capítulo debido a que no han sido empleadas en los cálculos de modelado en la presente tesis.^[2]

1.1.2.2 Principio variacional

A continuación se describe una manera de obtener los coeficientes de la expansión, $c_{\mu i}$ (ver ec. 1.12). Para esto, la teoría de HF toma las ventajas del principio variacional, que dice que para una función de onda prueba antisimétrica normalizada (Φ) el valor de energía computada siempre será mayor o igual a la energía real del sistema en su estado basal, E_0 .

$$\frac{\int \Phi^* \mathbf{H} \Phi d\mathbf{r}}{\int |\Phi|^2 d\mathbf{r}} = E[\Phi] \geq E_0 \quad (1.17)$$

Mediante la aplicación de este principio se puede obtener un valor aceptable de energía, para ello es necesario encontrar un conjunto de coeficientes que la minimicen.

$$E_0 = \min_{\Phi} E[\Phi] \quad (1.18)$$

1.1.2.3 Ecuaciones de Roothaan-Hall

El principio variacional conduce a las siguientes ecuaciones derivadas por Roothaan y Hall:

$$\sum_{v=1} (F_{\mu v} - \varepsilon_i S_{\mu v}) c_{vi} = 0 \quad \mu = 1, 2, \dots, v \quad (1.19)$$

La ecuación 1.19 puede ser expresada en forma matricial:

$$FC = SC\varepsilon \quad (1.20)$$

donde ε es la matriz diagonal de las energías orbitales, cada uno de sus elementos ε_i representa la energía orbital de un electrón del orbital molecular χ_i . F es llamada *matriz de Fock*, y representa el efecto promedio del campo de todos los electrones sobre cada orbital, y para un sistema de capa cerrada, sus elementos son:

$$F_{\mu\nu} = H_{\mu\nu}^{core} + \sum_{\lambda=1} \sum_{\sigma=1} P_{\lambda\sigma} \left[\mu\nu | \lambda\sigma - \frac{1}{2} (\mu\nu | \lambda\sigma) \right] \quad (1.21)$$

donde $H_{\mu\nu}^{core}$ es una matriz que representa la energía de un solo electrón en el campo del núcleo desnudo, y $P_{\lambda\sigma}$ es la *matriz densidad*, definida como:

$$P_{\lambda\sigma} = 2 \sum_{i=1}^{ocupados} c_{\lambda i}^* c_{\sigma i} \quad (1.22)$$

Los coeficientes son sumados sobre los orbitales ocupados, y el factor dos deriva del hecho de que cada orbital contiene dos electrones.

Finalmente, la matriz S es la matriz de solapamiento (ec. 1.20), que representa el solapamiento entre orbitales.

Tanto la matriz de Fock como los orbitales dependen de los coeficientes de expansión. Por ende, la ec. 1.20 debe ser resuelta de manera iterativa.

Para esto se emplea el método de campo autoconsistente (SCF, de sus siglas en inglés). Cuando el método alcanza la convergencia la energía se encuentra en un mínimo. Además, la solución produce un conjunto de orbitales, *ocupados* ($\phi_{i,j} \dots$) y *virtuales* desocupados. El número total de orbitales es igual al número de funciones base empleadas.

El término $(\mu\nu|\lambda\sigma)$ en la ecuación 1.21 representa la integral de repulsión entre dos electrones. Bajo el tratamiento de HF, cada electrón ve a todos los otros electrones como una distribución promedio y las interacciones instantáneas electrón-electrón no son consideradas.

1.1.2.4 Métodos de capa abierta

Hasta aquí, solo se ha considerado la aplicación del método de HF a sistemas de capa cerrada (*Restricted* HF, RHF). En estos sistemas todos los orbitales se encuentran doblemente ocupados y los electrones están apareados. Para aquellos sistemas de capa abierta existe un método que considera a los electrones alfa y beta en orbitales diferentes (*Unrestricted* HF, UHF), resultando dos conjuntos de coeficientes de la expansión de orbitales moleculares.

$$\begin{aligned}\phi_i^\alpha &= \sum_{\mu} c_{\mu i}^\alpha \chi_{\mu} \\ \phi_i^\beta &= \sum_{\mu} c_{\mu i}^\beta \chi_{\mu}\end{aligned}\quad (1.23)$$

De los dos conjuntos de coeficientes resultan dos conjuntos de matrices de

Fock (y sus matrices densidad asociadas), y la solución genera dos conjuntos de orbitales. Sin embargo, las autofunciones no son autofunciones del operador de espín y por ende pueden poseer una contaminación de espín debido a estados superiores de espín.

1.1.2.5 Correlación electrónica: limitaciones del método de HF

La teoría de HF no trata de manera correcta la correlación en el movimiento de los electrones, especialmente para aquellos con espín opuesto.

Anteriormente, hemos visto que las ecuaciones de HF derivan del empleo de un determinante de Slater. Estas ecuaciones, consideran que cada electrón está sujeto a un potencial efectivo, estimando las interacciones con los otros electrones como un promedio. Desde un punto de vista físico, un producto de funciones monoeléctricas implica que los electrones no interactúan entre sí instantáneamente. Sin embargo, en un sistema real el movimiento de los electrones está correlacionado, y éstos tienden a evitarse unos a los otros disminuyendo la energía del sistema. En resumen, estas interacciones particulares e instantáneas entre los pares de electrones no son descritas en el método de HF, el cual predice un valor de energía (E_{HF}) superior a la exacta (E_0). La diferencia entre estas dos energías es denominada energía de correlación electrónica (E_{corr}):

$$E_{corr} = E_0 - E_{HF} \quad (1.24)$$

El valor de la E_{corr} es negativo debido a que según el principio variacional la E_{HF} arroja un valor superior o igual a la energía real del sistema. Aunque la energía de correlación sea frecuentemente pequeña en comparación a la energía total del sistema, es esencial para la descripción de procesos electrónicos, y su exclusión deriva en resultados erróneos.^[10, 11]

1.1.3 Teoría del funcional de la densidad

La teoría del funcional de la densidad (DFT, de sus siglas en inglés) es un método de estructura electrónica, que en las últimas décadas, se ha convertido en la metodología más empleada en el modelado químico cuántico. A diferencia de la formulación de HF, esta teoría contempla inherente y explícitamente la correlación electrónica. Muchos problemas que antes eran tratados con HF, o con métodos post-HF (no desarrollados en este capítulo, pero el lector interesado puede consultar las referencias [1, 2, 5]), son actualmente tratados empleando DFT. Además, posee un fuerte atractivo, debido a que puede ser aplicado al estudio de sistemas de tamaño medio o grande, obteniendo resultados con una exactitud aceptable. En términos generales, el costo computacional es semejante al de HF (debido a que su implementación es similar) y, por lo general, es una fracción del requerido por los métodos de correlación electrónica (post-HF) tales como la Teoría de Perturbación (método basado en Møller-Plesset) y *Coupled Cluster*.^[12]

Además, algunos factores como el desarrollo de funcionales de intercambio-correlación, de algoritmos más eficientes y la implementación de éstos en varios programas comerciales contribuyeron en forma significativa a la popularidad de los métodos de DFT.

La base de DFT es el primer teorema de Hohenberg-Kohn (HK),^[13] reportado en 1964, el cual afirma que la energía del estado electrónico fundamental de un sistema puede determinarse si se conoce su densidad electrónica. Es decir, la energía es un funcional de la densidad.

El segundo teorema de HK provee un método variacional en términos del funcional de la densidad electrónica. Además, la densidad electrónica se encuentra relacionada con un funcional universal que tiene en cuenta el término de energía cinética y de interacción entre las partículas. Sin embargo, lo desarrollado por HK no detalla cuál es la forma exacta del funcional o cómo construirlo.

Posteriormente, Kohn y Sham dan un gran paso que permitió aplicar este formalismo a la química cuántica, encontrando una expresión para el funcional

dividiendo la energía electrónica en varios términos:

$$E = E^T + E^V + E^J + E^{XC} \quad (1.25)$$

donde E^T es el término de energía cinética derivada del movimiento electrónico, E^V incluye los términos relacionados a la energía potencial de interacción núcleo-electrón y de la repulsión núcleo-núcleo, E^J es el término de repulsión electrón-electrón, y E^{XC} es el término de intercambio-correlación que representa la parte restante de la interacción electrón-electrón.^[14]

Todos los términos, a excepción del de repulsión núcleo-núcleo, son funciones de la densidad electrónica (ρ). Por su parte, E^J está definido como se muestra a continuación:

$$E^J = \frac{1}{2} \iint \rho(\mathbf{r}_1) (\Delta \mathbf{r}_{12})^{-1} \rho(\mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \quad (1.26)$$

Los términos E^T , E^V y E^J corresponden a la energía clásica de la distribución de carga de ρ . El término E^{XC} representa la energía de intercambio que proviene de la forma antisimétrica de la función de onda cuántica, y la energía de correlación que deriva de la dinámica del movimiento de los electrones.

Hohenberg y Kohn demostraron que E^{XC} está definido enteramente por la densidad electrónica. En la práctica, este término es usualmente aproximado como una integral que incluye la densidad de espín y, en ocasiones, su gradiente:

$$E^{XC}(\rho) = \int f(\rho_\alpha(\mathbf{r}), \rho_\beta(\mathbf{r}), \nabla \rho_\alpha(\mathbf{r}), \nabla \rho_\beta(\mathbf{r})) d\mathbf{r} \quad (1.27)$$

donde ρ_α hace referencia a la densidad de espín α y ρ_β a la β , y ρ a la densidad electrónica total ($\rho_\alpha + \rho_\beta$). Además, este término es dividido en una parte de

intercambio y en una parte de correlación, también dependientes de la densidad.

$$E^{XC}(\rho) = E^X(\rho) + E^C(\rho) \quad (1.28)$$

1.1.3.1 Funcionales de intercambio y correlación

La piedra angular de DFT es la descripción exacta del funcional de intercambio-correlación, E^{XC} , que involucra los términos no clásicos como la correlación, el intercambio, y la diferencia en la energía cinética entre el sistema real y el de referencia. En la actualidad, se está muy lejos de uno que sea universal y existe un esfuerzo muy importante dirigido al desarrollo de nuevos y mejores funcionales. Sin embargo, esto trae acarreado el inconveniente de que los usuarios se enfrentan a una gran cantidad de métodos.

En estos funcionales de DFT, la dependencia de E^{XC} con $\rho(\mathbf{r})$ se expresa como interacción entre la densidad electrónica y una “densidad de energía” ε^{XC} , la cual a su vez depende de $\rho(\mathbf{r})$:

$$E^{XC}[\rho(\mathbf{r})] = \int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon^{XC}[\rho(\mathbf{r})] d\mathbf{r} \quad (1.29)$$

La densidad de energía se trata siempre como una suma individual de contribuciones de intercambio y de correlación, es decir, $\varepsilon^{XC} = \varepsilon^X + \varepsilon^C$.

De acuerdo a la aproximaciones que implementan, los funcionales E^{XC} se pueden dividir en cinco familias:^[15]

Aproximación de la Densidad Local (LDA, de las siglas *Local Density Approximation*). Estos funcionales se basan en la teoría del gas de electrones homogéneo para derivar las funciones de intercambio-correlación. El empleo del gas de electrones homogéneo para este propósito no es equivalente a asumir que la densidad es constante en todo el espacio, sino que en un sistema no homogéneo

con densidad electrónica, $\rho(\mathbf{r})$, como lo es una molécula o un átomo, se aproxima el funcional $E^{XC}[\rho]$ por un valor correspondiente al gas de electrones homogéneo en un entorno $\rho(\mathbf{r} + \delta\mathbf{r})$ (localmente homogéneo). La aproximación de LDA tuvo gran éxito en predicción de estructuras, en especial de metales de transición y de sistemas en el estado sólido. A pesar de su éxito en la descripción de algunos sistemas, en otros la densidad electrónica está lejos de ser espacialmente uniforme, y por esto la LDA tiene sus limitaciones.

Aproximación de Gradiente Generalizado (GGA, *Generalized Gradient Approximation*). En esta aproximación, se incluye el gradiente de la densidad ($\nabla\rho(\mathbf{r})$) para representar el cambio local de la misma. De este modo, obtiene una mejor descripción de la densidad electrónica. El funcional de intercambio GGA más popular al día de hoy es el desarrollado por Becke en 1988. Este funcional se abrevia como “B” (en algunas ocasiones B88) e incorpora un parámetro experimental.^[16] En relación a los funcionales de correlación GGA los más importantes son los propuestos por Lee, Yang y Parr (LYP) y por Perdew y Wang (PW).^[17, 18] Por otro lado, existen otros funcionales de correlación e intercambio que no poseen, en su forma funcional, parámetros empíricos. Entre los más conocidos se encuentra el de Perdew, Burke y Ernzerhof (PBE).^[19] En la literatura se encuentra comúnmente que los funcionales de intercambio y correlación se especifican por dos acrónimos en ese orden, respectivamente. Por ejemplo, El cálculo con BLYP, combina el funcional de intercambio de Becke (“B”) con el de correlación de GGA de Lee, Yang y Parr (LYP). En la práctica, es posible combinar funcionales de correlación e intercambio.

Funcionales meta-GGA. En estos funcionales se extiende la expansión de GGA usando el gradiente de segundo orden, y así considerar la densidad de la energía cinética del sistema de electrones que no interaccionan. Como ejemplo de estos funcionales se pueden mencionar M06-L y TPSS.

Funcionales híbridos. Incorporan en el funcional de intercambio parte o toda la energía de intercambio obtenida mediante el método de HF. Esto se debe a que este método calcula de forma exacta la energía de intercambio. En algunos funcionales como B3LYP se incorporan parámetros empíricos que son coeficientes para pesar las contribuciones locales y no locales de la densidad ε^{XC}

y la parte de DFT y HF para el intercambio de ϵ^X .^[20, 21] Los funcionales híbridos se basan en el Método de Conexión Adiabática que aproxima el cálculo de la energía de intercambio-correlación mediante la conversión paulatina de un sistema no interactuante de referencia a uno real, interactuante, a través del empleo del teorema de Hellmann-Feynmann.

Doble Híbridos. Estos funcionales incorporan orbitales de Kohn-Sham para describir la correlación electrónica no local.^[22] Existen varias posibilidades para incluir estos orbitales como la teoría de perturbación de Görling-Lewy,^[23] los métodos de potencial efectivo optimizado,^[24] y los métodos post-HF. Estos funcionales, han ganado popularidad a partir del reporte del primer funcional de esta naturaleza en 2006; B2PLYP.^[25] En éste se reemplaza la parte de correlación de DFT por la contribución no local basada en un tratamiento perturbativo de segundo orden del tipo Møller–Plesset.

1.1.3.1.1 Corrección de la Dispersión

Uno de los defectos que presentan los funcionales de DFT es que no describen correctamente la correlaciones de electrones a largo alcance, que son las responsable de las interacciones de van der Waals. El problema que posee DFT con respecto a estas interacciones se ha convertido en un campo de investigación muy amplio y las primeras respuestas fueron brindadas por Grimme en 2004 a través del método de DFT-D.^[26]

El método de DFT-D es uno de los más empleados y presenta buena exactitud en muchas aplicaciones.^[27, 28] En éste la energía total está representada como:

$$E_{DFT-D} = E_{KS-DFT} + E_{disp} \quad (1.30)$$

donde E_{KS-DFT} es la energía de Kohn-Sham obtenida mediante el método SCF, mientras que E_{disp} es el término de corrección de la dispersión. Este último término está definido como:

$$E_{disp} = -s_6 \sum_{i=1}^{Nat-1} \sum_{j=i+1}^{Nat} \frac{C_6^{ij}}{R_{ij}^6} f_{damp}(R_{ij}) \quad (1.31)$$

donde Nat es el número de átomos en el sistema, el término C_6^{ij} es el coeficiente de dispersión para el par de átomos ij , s_6 es el factor que depende del tipo funcional utilizado, y R_{ij} es la distancia interatómica. Finalmente, la función de amortiguación f_{damp} (la cual evita singularidades para valores pequeños de R), está definida como:

$$f_{damp}(R) = \frac{1}{1 + e^{-\alpha(R/R_0-1)}} \quad (1.32)$$

donde R_0 es la suma de los radios atómicos de van der Waals.

Posteriormente, Grimme y colaboradores han continuado trabajando en la problemática y desarrollaron otros métodos de dispersión como el GD2 y GD3.^[29, 30]

Todos los métodos mencionados anteriormente se encuentran disponibles en el programa *Gaussian 09*.^[8]

1.1.3.1.2 Correcciones del intercambio a largo alcance

La introducción de parte del intercambio HF en los funcionales híbridos no solo mejora los resultados frente a los valores LDA y GGA sino, que corrige en parte el mal comportamiento asintótico del potencial de intercambio de estos funcionales.^[31] Sin embargo, la mejora producida en funcionales híbridos no es completamente satisfactoria y, por ejemplo, el funcional B3LYP tiene un comportamiento del tipo $-0,2r^{-1}$,^[32] lo que explica su fracaso en los casos que involucran una densidad electrónica más dispersa, como la que puede aparecer en el estudio de la polarizabilidad de grandes cadenas o en la evaluación de algunos niveles excitados como los estados de transferencia de carga.^[33]

Para corregir esta deficiencia, Tsuneda y colaboradores han propuesto dividir el término de repulsión interelectrónica del potencial de intercambio en dos regiones, una de corto y otra de largo alcance, siguiendo el esquema de partición de Ewald:^[34]

$$\frac{1}{r_{12}} = \frac{1 - \text{erf}(\mu r_{12})}{r_{12}} + \frac{\text{erf}(\mu r_{12})}{r_{12}} \quad (1.33)$$

donde erf es la función de error de Gauss y μ es un parámetro que controla la forma de esta función. El primer término describe el decaimiento de corto alcance (*Short Range*, SR) y el segundo de largo alcance (*Long Range*, LR).

De acuerdo con la expresión anterior, el intercambio en $r_{12} = 0$ no incluye nada de intercambio HF, mientras que a distancias infinitas, $r_{12} \rightarrow \infty$, todo el intercambio es el exacto (HF).

Posteriormente, Yanai y colaboradores introdujeron más flexibilidad en el esquema de división del término de repulsión interelectrónica,^[32] añadiendo dos parámetros a la expresión (ec. 1.33) que permiten que la contribución HF sea variable en $r_{12} = 0$ y en $r_{12} \rightarrow \infty$. Esta extensión se denomina método de atenuación de Coulomb (*Coulomb Attenuating Method*, CAM), y se expresa de la forma:

$$\frac{1}{r_{12}} = \frac{1 - [\alpha + \beta \text{erf}(\mu r_{12})]}{r_{12}} + \frac{\alpha + \beta \text{erf}(\mu r_{12})}{r_{12}} \quad (1.34)$$

donde los parámetros α y β controlan la contribución de intercambio exacto en función de r_{12} .

El funcional CAM-B3LYP ofrece resultados similares a B3LYP en muchos casos, pero mejorando, por ejemplo, la descripción de los estados de transferencia de carga.

1.1.4 Solvente implícito

La mayoría de los procesos químicos ocurren en solvente, y éste puede participar directamente del proceso químico, como por ejemplo, una reacción de hidrólisis de éster o una solvólisis. En otros casos, el solvente no interviene directamente, pero ofrece un ambiente que afecta la estabilidad de las distintas especies presentes en la reacción (reactivos, estados de transición, intermediarios o productos). Debido a las implicancias del solvente, una variedad de modelos de solvente implícito han sido propuestos, tanto para Mecánica Cuántica como Mecánica Molecular.

En estos modelos, la energía libre de solvatación (ΔG_{solv}) se puede descomponer en tres contribuciones:

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{elec} + \Delta G_{cav} + \Delta G_{vdw} \quad (1.35)$$

El primer componente es el electrostático, el segundo es el costo de cavitación,ⁱ y el último refiere a las interacciones de van der Waals entre el solvente y el soluto, el cual puede ser dividido en un término repulsivo (ΔG_{rep}) y otro atractivo de dispersión (ΔG_{disp}). El término más crítico es el primero, relacionado con la contribución electrostática a la solvatación.

Para la contribución electrostática se aplica el modelo que se conoce como *Campo de Reacción* (RF, por *Reaction Field*). En el cual, el soluto que se encuentra en una cavidad dentro del solvente, polariza al solvente, y éste a su vez induce un campo eléctrico sobre el soluto.^[35] El RF dentro de la Mecánica Cuántica, se conoce como *campo de reacción auto-consistentemente* (SCRF) considerando el Hamiltoniano del sistema (\mathbf{H}_{tot}) como el Hamiltoniano en fase gaseosa (\mathbf{H}_0) más una perturbación (\mathbf{H}_p) impuesta por la presencia del solvente.

ⁱCosto de cavitación se refiere al trabajo necesario para generar una cavidad para el soluto en contra de la presión del solvente y de la penalidad entrópica asociada con la reorganización de las moléculas de solvente.

$$\mathbf{H}_{tot} = \mathbf{H}_0 + \mathbf{H}_p \quad (1.36)$$

Hay distintos modelos de SCRF que varían fundamentalmente en cómo se define la cavidad y la distribución de cargas del soluto. Uno de los modelos de SCRF más empleado es el *Método del Continuo Polarizado* (PCM, de sus siglas en inglés), y en algunas ocasiones su variante en formalismo de ecuaciones integrales (IEF-PCM).^[36] En el PCM, la cavidad está definida por la conjunción de esferas con radios atómicos de van der Waals aumentados un 20% aproximadamente. La distribución de carga del soluto, $q(\mathbf{r})$, es la suma de la distribución de carga nuclear discreta, $q_{nuc}(\mathbf{r})$, y la función de densidad electrónica, $\rho(\mathbf{r})$.

En este modelo, la cavidad es dividida en pequeños elementos de superficie, y la polarización del solvente es representada a través de cargas puntuales sobre dichos elementos. La magnitud de cada carga superficial es proporcional al flujo del campo eléctrico en ese punto.^[37, 38] Entonces, la distribución de cargas del soluto genera cargas superficiales derivadas de la polarización del solvente, y éstas, a su vez, polarizan al soluto modificando su distribución de cargas, y con ellas a la densidad electrónica.ⁱⁱ

El segundo y el tercer término son los términos más sencillos de calcular, y corresponden a la pérdida de entropía para generar una cavidad en el solvente donde se aloja el soluto y la estabilización debida a interacciones de van der Waals (balance entre repulsión y dispersión), respectivamente. La mayoría de los modelos continuos utilizan parámetros similares a los empleados en Mecánica Molecular Clásica y parten de modelos sencillos parametrizados para adecuarse al comportamiento de gases nobles en estado líquido. Existen parámetros adecuados para la mayoría de los átomos de la tabla periódica y dependen de su polarizabilidad y tamaño atómico.^[39]

ⁱⁱ Este proceso de polarización recíproca entre el soluto y solvente se realiza de manera iterativa hasta alcanzar un estado de auto-consistencia, en el cual ambos se encuentran polarizados y ninguno induce cambios en la polarización del otro.

1.1.5 Orbitales naturales de enlace (NBO)

El método de orbitales naturales de enlace (NBO, por sus siglas en inglés) es un conjunto de algoritmos matemáticos para el análisis de las funciones de onda electrónicas bajo una interpretación en términos localizados de la estructura de Lewis.^[40] Los NBOs son orbitales localizados en uno o dos centros atómicos que difieren bastante de los correspondientes orbitales moleculares canónicos, los cuales se encuentran deslocalizados en gran parte de la molécula. El rasgo distintivo clave de los orbitales NBO es su formulación en términos de *orbitales atómicos naturales* (NAO, de sus siglas en inglés).

Al igual que los orbitales moleculares deslocalizados, los NAOs y NBOs forman un set completo de orbitales ortogonales y poseen propiedades convergentes óptimas para describir regiones localizadas en una molécula. Además, los NAOs se dividen en dos conjuntos, uno altamente ocupado (*bases naturales mínimas*), y otro residual de baja ocupación (*bases mínimas de Rydberg*). Por ende, mediante un análisis de NBO es posible clasificar a los orbitales como internos, enlazantes, antienlazantes o de Rydberg. Los orbitales de Rydberg son muy difusos en el espacio y tienen un número cuántico principal superior al que poseen los orbitales de valencia. Por esta razón, éstos presentan un reducido carácter enlazante o antienlazante, y generalmente su ocupación es despreciable en la mayoría de los sistemas químicos.^[41]

Es algunas ocasiones es conveniente emplear la metodología NBO para abordar problemas mediante una descripción simple, cualitativa y localizada de las propiedades electrónicas, la cual conlleva a conclusiones preliminares útiles.

1.2 Mecánica molecular

Muchos de los problemas que son de interés en modelado molecular, involucran sistemas cuyos tamaños son demasiado grandes para ser tratados con métodos de Mecánica Cuántica, debido a que la resolución de la ecuación de Schrödinger es muy costosa computacionalmente. En este escenario, la mecánica

molecular (MM) surge como una herramienta valiosa para calcular propiedades de sistemas con un gran número de átomos.

Los métodos de MM emplean las leyes de la física clásica para predecir propiedades de un sistema molecular. Existen muchos métodos y cada uno está caracterizado por su *campo de fuerza*, que posee las siguientes componentes:

- i) Una expresión matemática que define la *energía potencial* del sistema y que varía con las posiciones de los átomos. Esta expresión se construye como la sumatoria de las energías de interacción entre pares de átomos enlazados y no enlazados. Los términos enlazantes incluyen contribuciones debidas a los enlaces covalentes, ángulos de enlace y ángulos de torsión. Los términos no-enlazantes se definen por un término de atracción-repulsión del tipo Lennard-Jones para las fuerzas de van der Waals y un término Coulómbico para las interacciones electrostáticas.
- ii) Una serie de *tipos de átomos* que definen diferentes características y desempeño de un elemento dependiendo de su entorno químico. Por ejemplo, un átomo de carbono en un grupo carbonilo es tratado de manera diferente a uno enlazado a tres átomos de hidrógeno. Los tipos de átomos dependen de la hibridación, carga y a que átomos se encuentran unidos.
- iii) Conjunto de parámetros que ajustan las ecuaciones y tipos de átomos a la información experimental. El conjunto de parámetros se encuentra definido por las constantes de fuerza, parámetros de van der Waals y cargas atómicas. Estos parámetros son empleados en las ecuaciones para relacionar características atómicas y estructurales con las componentes de la energía potencial.

Cabe mencionar, que los cálculos de MM no tratan de manera explícita a los electrones del sistema. En lugar de ello, realizan cálculos basados en las interacciones entre los núcleos. Por esta razón, con estos métodos no pueden evaluarse propiedades que dependan de la densidad electrónica ni describir formación y/o ruptura de enlaces.

1.2.1 *Docking* molecular

Las aplicaciones del modelado molecular en la predicción de fármacos (ligando) han tenido un comienzo dificultoso debido a las limitaciones computacionales y a la relativamente baja resolución de las estructuras 3D disponibles para receptores. En 1985 el programa GRID, desarrollado por GoodFord, fue un importante paso hacia el avance del entendimiento y predicción (diseño) de las interacciones de un principio activo con su “*target*”.^[42] Este método empleaba una sonda química para evaluar energéticamente un sitio de unión proteico y generar un campo molecular de interacción, y de esta manera identificaba regiones donde la presencia de un grupo funcional sería favorable. Posteriormente, en 1988 DesJarlais y colaboradores reportaron el primer programa de *docking* rígido, poniendo en consideración la complementariedad geométrica entre el ligando y el receptor.^[43] El *docking* molecular es una técnica computacional dirigida a la predicción de la configuración espacial fármaco-receptor, y la correspondiente energía de unión. En una primera etapa, los algoritmos de búsqueda conformacional exploran las posibles conformaciones del fármaco (poses) dentro o fuera del sitio de unión de la proteína, tomada generalmente como una estructura rígida. Posteriormente, una función de evaluación de energía es aplicada para seleccionar poses favorables.^[44]

Los algoritmos de *docking* molecular han mejorado considerablemente y, al momento, existen más de 40 programas diseñados para aplicar esta técnica.^[45]
46]

1.2.1.1 Funciones de evaluación (*Scoring Functions*)

La evaluación precisa, con un costo computacional razonable, de la afinidad de interacción entre los ligandos y sus receptores es de enorme beneficio para el diseño racional. Este hecho, posibilita la predicción de la afinidad de un gran número de compuestos antes de ser sintetizados, agilizando el proceso del desarrollo farmacológico como un todo.

Sin embargo, obtener una estimación adecuada de la energía libre de unión de un complejo ligando-proteína es una tarea bastante costosa computacionalmente. Como ejemplo, podemos mencionar los métodos perturbativos como FEP (*free energy perturbation*), y otros más eficientes como LIE (*linear interaction energy*).^[47-49] La necesidad de funciones de evaluación más rápidas, que puedan ser utilizadas por los programas de *docking*, ha llevado al desarrollo de un gran número de funciones que hacen uso de aproximaciones para la valoración del complejo ligando-proteína. Dentro de ese gran número, se pueden encontrar principalmente tres clases:^[50] 1) funciones basadas en campos de fuerzas, 2) funciones empíricas y 3) funciones basadas en conocimiento (*knowledge-based*).

1.2.1.2 Algoritmos de búsqueda conformacional

El *docking* molecular necesita computar varios grados de libertad del ligando para encontrar la conformación más adecuada. En los algoritmos de *docking* rígido se consideran seis grados de libertad de la molécula correspondiente a la traslación y rotación, tratando a la proteína y al ligando como cuerpos rígidos. En cambio, el *docking* semi-rígido considera la flexibilidad del ligando y a la proteína la mantiene fija, incrementando los grados de libertad de la búsqueda conformacional.

Una búsqueda sistemática de todos los enlaces rotables no es eficiente debido a que el número de posibles combinaciones de rotámeros incrementa exponencialmente con el número de enlaces rotables. Los algoritmos de búsqueda están pensados para solucionar este inconveniente, explorando el espacio conformacional del ligando de una manera eficiente y rápida. La búsqueda a través de estos métodos arrojan resultados reproducibles y lo más importante es que el espacio conformacional se explora más eficientemente.^[44]

Algunos de los algoritmos empleados en los programas de *docking* son: algoritmo genético, templado simulado y método de Monte Carlo.^[44]

En esta tesis se empleó el programa *Fred* para llevar a cabo *docking* rígido

y *Autodock3* y *Autodock4.2* para la aplicación de *docking* semi-rígido.

1.2.1.3 Mapas de Grilla

Para resolver de forma rápida las interacciones entre cada conformero y el receptor, el *docking* molecular utiliza una grilla que rodea al sitio de unión (de interés) de la enzima o incluso a toda la enzima. Se construye esta grilla calculando en cada punto la energía de interacción coulombica y de van der Waals entre un átomo prueba del ligando y la proteína. Estos datos, calculados para todos los átomos del ligando, son almacenados y, luego al computar la energía de interacción entre la proteína y el ligando en una conformación particular, se asigna a cada átomo el valor de energía del punto de la grilla más cercano. La disminución del espaciamiento entre los puntos de la grilla aumenta la precisión en el cálculo de la energía, como también su costo.

La grilla tiene en cuenta sólo las interacción del ligando con la proteína (puente de hidrógeno, coulombica y de van der Waals). Los términos de torsión y de las interacciones internas de ligando (energía interna), dependen de la conformación que adopte el ligando, por lo tanto no pueden ser precalculados. El costo computacional para estas interacciones es mínimo comparado con las interacciones intermoleculares.

1.2.2 Dinámica molecular

La aplicación de DM permite generar configuraciones sucesivas del sistema integrando las leyes del movimiento de Newton. El resultado es una trayectoria que especifica cómo las posiciones y las velocidades de las partículas varían con el tiempo. Se trata de un método determinista, es decir, las posiciones de los átomos se suceden en la escala temporal y las interacciones entre las partículas son descritas generalmente por un campo de fuerza.

El número de partículas que componen el sistema a ser simulado depende de la naturaleza del propio sistema, de las propiedades que se desea estudiar y la

capacidad computacional disponible, pero sobre todo, debe ser representativo del sistema macroscópico real.

Las propiedades de equilibrio del sistema de estudio son determinadas a partir de los promedios temporales sobre un intervalo de tiempo suficientemente grande en la escala atómica. El tiempo total de simulación depende de los procesos dinámicos que se investiguen y de la convergencia estadística de las propiedades de interés. Por ejemplo, la energía de interacción y la función de distribución radial convergen rápidamente, mientras que otras, como la presión, la tensión superficial y los coeficientes de transporte requieren trayectorias más extensas para llegar a la convergencia.

Existen distintos campos de fuerzas aplicados a la DM, entre los más importantes podemos encontrar AMBER, GROMOS y CHARMM, los cuales presentan distintas versiones de acuerdo a las modificaciones que se le fueron realizando a lo largo del tiempo. Estos campos de fuerza, han sido diseñados especialmente para el estudio de sistemas bioorgánicos. Cada campo de fuerza, por lo general, se combina junto a un paquete de programas que incluyen un integrador de las ecuaciones de movimiento, y herramientas de análisis.

1.2.2.1 Condiciones periódicas de contorno

La simulación de un sistema, sea éste una molécula individual o un conjunto de átomos o moléculas, requiere establecer las condiciones de contorno para el mismo. La condición más simple es que dicho sistema esté aislado. Esta condición, si bien en general inapropiada, puede ser parcialmente aceptable para moléculas en fase gaseosa pero no resulta apropiada en absoluto para simular líquidos, soluciones o sólidos.

La simulación del sistema inmerso en el vacío produce efectos generalmente indeseados debido a que los átomos en contacto con el vacío estarán afectados por fuerzas diferentes a las que existen en un sistema con las condiciones reales, produciendo una distorsión de la superficie de energía potencial. Por esta razón, podemos tratar de evitar, al menos en parte, estos

efectos indeseados introduciendo *condiciones periódicas de contorno*.

El establecer condiciones periódicas de contorno significa que el sistema está determinado por una celda unidad que se replica periódicamente en el espacio. Tanto la celda unidad como sus imágenes son consideradas para el cálculo. En la Figura 1. 1 es posible observar el caso bidimensional (por simplicidad en el dibujo) dado por un rectángulo y sus imágenes. En esta figura se muestra que cada partícula está rodeada por otras, es decir, que no hay partículas en los límites -no hay límites-. Cada partícula está sometida a interacción de todas las partículas de su alrededor, ya sea por las propias partículas de la caja o sus imágenes.

Es evidente que si la interacción se extiende sin límite es posible que una partícula sea afectada dos veces por otra, la "real" y su imagen (en la Figura 1. 1 la 1 con la 2 y 2', por ejemplo). Para evitar esta situación artificial se establece un radio de corte (R_c) para el potencial, que limite el alcance de la interacción. En la Figura 1. 1 vemos que la partícula 1 interactúa con las 2, 3'' y 4', las cuales están dentro de R_c . En resumen, cada partícula interactúa con otras o sus imágenes según cuál de ellas se encuentre más próxima, a esto se lo denomina *convención de imagen mínima*. El R_c no puede ser muy pequeño, puesto que produciría una situación irreal, ni debe superar la mitad de la caja ($R_c \leq L/2$, donde L es la longitud de la arista menor) puesto que no se lograría el efecto buscado. Si alguna partícula, en su trayectoria, abandona la caja, una de sus imágenes ingresa por el lado opuesto. De esta manera se mantiene constante el número de partículas en la simulación.^[35, 44]

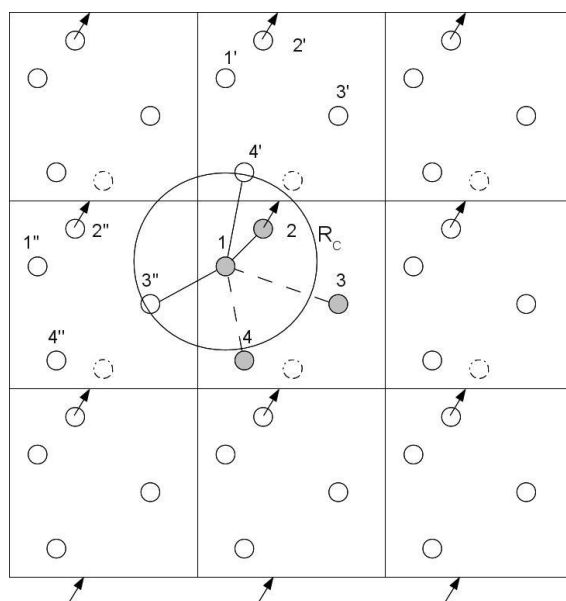


Figura 1. 1. Condiciones periódicas de contorno para un sistema bidimensional. n' indica la imagen de una partícula.

1.2.2.2 Criterios de corte para las interacciones (*cut-off*)

La cantidad de términos covalentes (enlaces, ángulos y diedros) al ser evaluados aumentan con orden uno respecto a la cantidad de átomos del sistema, mientras que los términos no covalentes (interacciones de van der Waals y electrostáticas) lo hacen con el cuadrado del número de átomos. Por lo tanto, estos últimos son los de mayor consumo de tiempo de cálculo. En DM, este tipo de interacciones debe calcularse entre todos los pares de átomos del sistema, pero para un sistema de muchas interacciones esto no resulta práctico.

Como se explicó en el punto anterior, el problema se puede solucionar aplicando la convención de imagen mínima y una distancia de truncamiento de interacciones (*cut-off*) o radio de corte (R_c). Cuando se define un valor de R_c las interacciones tipo van der Waals de a pares que están a una distancia mayor a éste son consideradas nulas, solo se consideran aquellas con las imágenes más cercanas.

Sin embargo, para las interacciones electrostáticas, no es el caso, porque son interacciones de muy largo alcance, incluso involucrando interacciones con átomos de la celda y sus imágenes. Por lo tanto, para este tipo de interacción se requieren metodologías eficientes para su cálculo, por ejemplo el método de

sumatoria de Ewald o campo de reacción, y valores (o funciones) de corte elegidos cuidadosamente.^[35]

1.2.2.3 Integración

Las ecuaciones de Newton del movimiento para un sistema de N partículas interactuando a través de un potencial $U(\mathbf{r}_i)$, $i = 1, \dots, N$ pueden ser formuladas como se muestra a continuación en las ecuaciones diferenciales de segundo orden:

$$\mathbf{F}_i = m_i \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2} \quad (1.37)$$

o se puede expresar como dos ecuaciones de primer orden:

$$\begin{cases} \frac{\partial \mathbf{r}_i}{\partial t} = \frac{\mathbf{p}_i}{m_i} \\ \frac{\partial \mathbf{p}_i}{\partial t} = \mathbf{F}_i \end{cases} \quad (1.38)$$

donde \mathbf{r}_i y \mathbf{p}_i representan las coordenadas y el momento lineal de la partícula, y \mathbf{F}_i la fuerza. Por su parte, \mathbf{F}_i viene dada por:

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial U(\mathbf{r}_i)}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (1.39)$$

Estas ecuaciones deben ser integradas usando algún método de diferenciación finita a partir de potenciales continuos, que sólo involucran interacción de a pares. La integración de las ecuaciones de diferenciación finita se realiza en diferenciales de tiempo, δt . Éstos, se denominan “pasos de integración”, y presentan un valor fijo a lo largo de todo el tiempo de simulación.

La fuerza total sobre un átomo en un tiempo t es calculada como la sumatoria de todas las fuerzas que actúan sobre éste, ecuación 1.37. A partir de la fuerza, se puede conocer la aceleración de las partículas, la cual es combinada con las posiciones y velocidades en el tiempo t para calcular las posiciones y velocidades en el tiempo $t + \delta t$. Es importante tener en cuenta que la fuerza se asume como constante durante el paso de integración. Las fuerzas sobre las partículas en sus nuevas posiciones son nuevamente determinadas comenzando con el ciclo nuevamente.

Existen varios algoritmos para integrar las ecuaciones de movimiento usando métodos de diferenciación finita, muchos de cuales son comúnmente usados en DM. Todos los algoritmos asumen que las posiciones, velocidades y aceleraciones pueden ser aproximadas mediante expansiones en series de Taylor:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \frac{d\mathbf{r}(t)}{dt} \delta t + \frac{1}{2!} \frac{d^2\mathbf{r}(t)}{dt^2} (\delta t)^2 + \frac{1}{3!} \frac{d^3\mathbf{r}(t)}{dt^3} (\delta t)^3 + \vartheta(\delta t)^4 \quad (1.40)$$

1.2.2.3.1 Algoritmos de integración

El algoritmo de Verlet es posiblemente el más usado de los métodos para integrar las ecuaciones de movimiento en una DM.^[51] Este algoritmo emplea las posiciones y aceleración a tiempo t , y las posiciones de la etapa previa, $(\mathbf{r}(t - \delta t))$ para calcular las nuevas posiciones a $t + \delta t$. Se puede escribir la relación entre estos parámetros y la velocidad a tiempo t como:

$$\begin{aligned} \mathbf{r}(t + \delta t) &= \mathbf{r}(t) + \frac{d\mathbf{r}(t)}{dt} \delta t + \frac{1}{2!} \frac{d^2\mathbf{r}(t)}{dt^2} (\delta t)^2 + \frac{1}{3!} \frac{d^3\mathbf{r}(t)}{dt^3} (\delta t)^3 + \vartheta(\delta t)^4 \\ \mathbf{r}(t - \delta t) &= \mathbf{r}(t) - \frac{d\mathbf{r}(t)}{dt} \delta t + \frac{1}{2!} \frac{d^2\mathbf{r}(t)}{dt^2} (\delta t)^2 - \frac{1}{3!} \frac{d^3\mathbf{r}(t)}{dt^3} (\delta t)^3 + \vartheta(\delta t)^4 \end{aligned} \quad (1.41)$$

Si sumamos las dos ecuaciones tenemos:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = 2 \mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \delta t) + \frac{d^2 \mathbf{r}(t)}{dt^2} (\delta t)^2 \quad (1.42)$$

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = 2 \mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \delta t) + \mathbf{a}(t) \quad (1.43)$$

Se puede notar que la velocidad no aparece de manera explícita en este algoritmo de integración. Las velocidades se pueden calcular de diferentes maneras; una forma es dividir la diferencia entre la posiciones a $t + \delta t$ y $t - \delta t$ por $2\delta t$:

$$\mathbf{v}(t) = \frac{[\mathbf{r}(t + \delta t) - \mathbf{r}(t - \delta t)]}{2\delta t} \quad (1.44)$$

Un inconveniente importante del algoritmo de Verlet es la posible pérdida en la precisión debido a que para obtener las posiciones a $t + \delta t$ se añade un término de magnitud pequeña ($\mathbf{a}(t)$) a la diferencia de dos términos de magnitud mucho más grande, $2 \mathbf{r}(t)$ y $-\mathbf{r}(t - \delta t)$. Otra desventaja es la falta de una forma explícita para la expresión de la velocidad. Las velocidades no son calculadas hasta que se obtienen las posiciones en el próximo paso de integración. Sumado a estos inconvenientes, quizás el más importante, sea que al realizar el primer paso de integración ($t = 0$) no se conocen las posiciones del paso de integración previo ($t - \delta t$).

Con la finalidad de mejorar la precisión, se han desarrollado variaciones del algoritmo de Verlet. Uno de ellos es el *leap-frog*, en el cual las velocidades son calculadas explícitamente, usando las siguientes ecuaciones:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \delta t \mathbf{v} \left(t + \frac{1}{2} \delta t \right) \quad (1.45)$$

$$\mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) = \mathbf{v}\left(t - \frac{1}{2}\delta t\right) + \delta t\mathbf{a}(t) \quad (1.46)$$

En la implementación de este algoritmo primero se calculan las velocidades $\mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right)$, a partir de las velocidades a un tiempo $t - \frac{1}{2}\delta t$ y la aceleración a tiempo t . Las posiciones $\mathbf{r}(t + \delta t)$ son deducidas de las velocidades determinadas previamente.

Este método permite que se emplee menos memoria de almacenamiento debido a que sólo un conjunto de posiciones, velocidades y fuerzas son calculadas en cada paso de integración. Sin embargo, éste presenta la desventaja de que las posiciones y las velocidades no están sincronizadas. Esto significa que la energía cinética se calcula a destiempo respecto de las posiciones y, por ende, de la energía potencial.

Otra alternativa, es el método *velocity Verlet* que da las posiciones, velocidades y aceleración al mismo tiempo sin perder precisión:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)\delta t^2 \quad (1.47)$$

$$\mathbf{v}(t + \delta t) = \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2}\delta t[\mathbf{a}(t) + \mathbf{a}(t + \delta t)] \quad (1.48)$$

1.2.2.4 Dinámica molecular con restricciones

En una simulación a medida que se aumenta el paso de integración se pueden obtener trayectorias más prolongadas con menor cantidad de pasos de integración. Sin embargo, pasos de integración muy grandes pueden generar inestabilidades debido a que los átomos pueden acercarse demasiado generando potenciales muy grandes. Por este motivo, el valor máximo del paso de integración se encuentra limitado a un décimo (o menos en lo posible) del periodo más pequeño de vibración de enlace. En el caso de moléculas

bioorgánicas, este periodo corresponde al enlace “átomo pesado-hidrógeno” que es de 10^{-14} s. Entonces el paso de integración máximo permitido sería de 1 fs.

Una solución a esta limitación es congelar las vibraciones de estos enlaces de corto periodo, restringiéndolos a su valor de equilibrio mientras que el resto de los grados de libertad del sistema varían de acuerdo a su propia dinámica. El algoritmo más utilizado para este fin es SHAKE, que permite incrementar el paso de integración hasta 2 fs.^[52]

1.2.2.5 Ensamblés

Un ensamble es una idealización, que consiste en considerar un conjunto con un gran número de configuraciones de sistema, en el mismo estado termodinámico, pero con diferentes estados dinámicos de las partículas que lo constituyen. Esta colección de configuraciones representa una muestra apropiada de todos los estados microscópicos y, por lo tanto, sus propiedades promedio son las del sistema promedio ideal.

Distintas restricciones macroscópicas derivan en diferentes tipos de ensambles, con características particulares. En general, se definen cuatro ensambles termodinámicos importantes:

ensamble microcanónico (N, V, E): el sistema no intercambia energía ni materia con el ambiente. Su energía, número de partículas y volumen permanecen constantes.

ensamble canónico (N, V, T): el sistema intercambia energía térmica con los alrededores, pero no materia. El número de partículas, volumen y temperatura son constantes.

ensamble gran canónico (μ , V, T): el sistema intercambia materia y energía con el ambiente. Su temperatura, volumen y potencial químico son constantes en el tiempo.

ensamble isotérmico-isobárico (N, T, P): el sistema intercambia energía térmica con los alrededores, pero no materia. Su número de partículas, presión y

temperatura son constantes.

En las simulaciones de DM llevadas a cabo en la presente tesis se emplearon los ensambles canónico (N, V, T) e isotérmico-isobárico (N, T, P).

1.2.2.6 Control de presión y temperatura

A medida que la simulación avanza, el sistema se encuentra en situaciones de no equilibrio, en especial cuando comienza, debido a que no siempre se parte de configuraciones iniciales lo suficientemente relajadas. La energía potencial de las configuraciones fuera del equilibrio se convierte consecuentemente en energía cinética, aumentando la temperatura del sistema. Existen varios métodos para enfriar el sistema, los cuales acoplan un baño térmico. Entre estos métodos, se encuentra el termostato de Berendsen, que regula la entrada y salida de calor utilizando un factor λ dependiente del tiempo que aumenta o disminuye proporcionalmente la velocidad de cada partícula cada n cantidad de pasos de integración.^[53] Este método utiliza un tiempo de decaimiento τ en el cual el sistema se relaja. Cuanto más grande es el valor de τ , más lento es el tiempo de relajación efectiva.

Otros métodos, más complejos, permiten intercambios estocásticos de calor entre los grados de libertad del sistema y del baño térmico. Entre éstos, los referentes son el termostato de Nosé-Hoover y de Langevin.^[54]

Particularmente, las simulaciones en un ensamble NTP mantienen constante la presión mediante la variación del volumen. Muchos de los métodos para controlar la presión son análogos a los usados en el control de temperatura. Entonces, el sistema puede ser acoplado a un “baño de presión” que modifica las dimensiones de la caja cada una determinada cantidad de pasos. Al igual que en el baño térmico, existe una constante de acoplamiento τ_p , y además otra que tiene en cuenta la compresibilidad del sistema, κ (en sistemas bioorgánicos es usualmente la compresibilidad del agua). Este método de regulación de la presión se conoce como baróstato de Berendsen.^[53] En una caja de simulación, la presión puede ser isotrópica, anisotrópica o semi-anisotrópica. En la primera, todos los

lados de la caja de simulación están acoplados, en la segunda todos los lados están desacoplados y en la tercera, sólo dos lados están acoplados. En este sentido, se puede aplicar dos presiones diferentes, una transversal y otra lateral, en forma de tensión superficial. Ésta última se utiliza comúnmente para estudiar la dinámica de membranas lipídicas, donde la presión lateral se asume distinta de la transversal.^[44]

1.2.2.7 Análisis de una dinámica molecular

Por lo general, una simulación está conformada por una etapa de preparación, que involucra, entre otras cosas, un relajamiento del sistema a partir de optimizaciones. A esta etapa le sigue la de equilibración del sistema, para después pasar a la etapa de producción, donde el sistema permanece en el equilibrio. A partir de las configuraciones temporales obtenidas en esta última etapa se calculan y se analizan las propiedades que sirven para el estudio del sistema. A fin de saber cuando un sistema llegó al equilibrio, se monitorea la convergencia de alguna de sus propiedades estructurales o energéticas.

En el caso de macromoléculas, como las proteínas, se puede observar la variación de la desviación cuadrática media de las posiciones (RMSD).

$$\text{RMSD}(t) = \sqrt{\sum_{i=1}^N [\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_0]^2 / N} \quad (1.49)$$

donde \mathbf{r}_i es la coordenada del átomo i en el tiempo t , \mathbf{r}_0 es la coordenada de referencia para el mismo átomo y N es la cantidad de átomos. El RMSD computa la variación estructural de una molécula respecto a una referencia, la cual puede ser, por ejemplo, la estructura inicial de una dinámica o una estructura cristalográfica. La equilibración se alcanza cuando el RMSD en función del tiempo para una

selección de coordenadas de átomos (por ejemplo, el *backbone*ⁱⁱⁱ de la proteína) llega a valores constantes o a un *plateau*. Además, el RMSD sirve para determinar, en el tiempo, cambios conformacionales de la macromolécula, dentro de la etapa de producción.

1.2.2.7.1 Energía libre de unión

En el estudio de unión de ligandos a proteínas, el *docking* es muy útil para predecir la estructura de algún complejo de unión, pero las funciones de evaluación no determinan energías de unión con buena exactitud.

Por otro lado, existen métodos más rigurosos para determinar energías libres de unión como los que combinan mecánica molecular y modelos de solvente implícito. Entre estos métodos, podemos mencionar a MM-PBSA (*molecular mechanics/Poisson Boltzmann surface area*), y MM-GBSA (*molecular mechanics/generalized Born surface area*) como dos ampliamente usados.^[55-58]

En éstos, la energía libre de unión es estimada como se muestra a continuación:

$$\begin{aligned}\Delta G_{\text{unión}} &= G_{\text{complejo}} - G_{\text{receptor}} - G_{\text{ligando}} & (1.50) \\ &= \Delta E_{MM} + \Delta G_{PB(GB)} + \Delta G_{\text{no polar}} - T\Delta S\end{aligned}$$

donde ΔE_{MM} es la energía de interacción entre el ligando y el receptor en fase gaseosa, incluyendo energías de van der Waals y electrostáticas; $\Delta G_{\text{no polar}}$ y $\Delta G_{PB(GB)}$ son las componentes no polares y polares de la energía libre de solvatación, respectivamente. Las contribuciones no polares de la solvatación ($\Delta G_{\text{no polar}}$) son determinadas mediante el método de área superficial accesible al solvente (SASA, de sus siglas en inglés) con el método LCPO.^[59] Por otra parte, la componente electrostática ($\Delta G_{PB(GB)}$) es determinada por cada modelo de solvatación. En la ecuación 1.50 el término $T\Delta S$ es el más costoso desde el punto

ⁱⁱⁱ *Backbone* se refiere a los átomos que involucran a la cadena peptídica sin tener en cuenta a los átomos de las cadenas laterales.

de vista computacional y representa el cambio en la entropía conformacional. Este término puede ser despreciado en aquellos casos donde los ligandos evaluados presentan similitud estructural.

En una simulación de DM se puede estudiar la evolución, a lo largo del tiempo de esta energía de interacción analizando imágenes representativas de la simulación de manera individual. De estos valores individuales, se puede obtener un valor de energía de unión promedio.

1.3 Bibliografía

1. Cramer, C.J. *Essentials of Computational Chemistry. Theories and Models*. Second Edition. John Wiley & Sons Ltd. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England. **2004**.
2. Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry*. Second Edition. John Wiley & Sons Ltd. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England. **2007**.
3. Wolfram Koch y Holthausen, M.C. *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*. Second Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH. D-69469 Weinheim (Federal Republic of Germany). **2001**.
4. Foresman, J.B. y Frisch, A. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods* Second Edition. Gaussian, Inc. Pittsburgh, PA. U.S.A. **1996**.
5. Bertran Rusca, J.; Branchadell Gallo, V.; Moreno Ferrer, M. y Sodupe Roure, M. *Química Cuántica*. Editorial Síntesis S.A., Vallehermoso, 34 28015, Madrid, España. **2002**.
6. Slater, J.C. Atomic Shielding Constants. *Physical Review*, 1930, **36** (1), p. 57.
7. Boys, S.F. Construction of Some Molecular Orbitals to Be Approximately Invariant for Changes from One Molecule to Another. *Reviews of Modern Physics*, 1960, **32** (2), p. 296.
8. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H.P.; Izmaylov, A.F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J.L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery Jr., J.A.; Peralta, J.E.; Ogliaro, F.o.; Bearpark, M.J.; Heyd, J.; Brothers, E.N.; Kudin, K.N.; Staroverov, V.N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.P.; Burant, J.C.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N.J.; Klene, M.; Knox, J.E.; Cross, J.B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.E.; Yazyev, O.; Austin, A.J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.W.; Martin, R.L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V.G.; Voth, G.A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Dapprich, S.; Daniels, A.D.; Farkas, Á.d.n.; Foresman, J.B.; Ortiz, J.V.; Cioslowski, J. y Fox, D.J., *Gaussian 09*, 2009, Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA.
9. Wiberg, K.B. Ab Initio Molecular Orbital Theory by W. J. Hehre, L. Radom, P. v. R. Schleyer, and J. A. Pople. *Journal of Computational Chemistry*, 1986, **7** (3), p. 379.

10. Szabo, A. y Ostlund, N.S. *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. First Edition. Mineola, New York, U.S.A. **1996**.
11. Cook, M. y Karplus, M. Electron correlation and density-functional methods. *The Journal of Physical Chemistry*, 1987, **91** (1), p. 31.
12. Oliphant, N. y Bartlett, R.J. A systematic comparison of molecular properties obtained using Hartree–Fock, a hybrid Hartree–Fock density-functional-theory, and coupled-cluster methods. *The Journal of Chemical Physics*, 1994, **100** (9), p. 6550.
13. Hohenberg, P. y Kohn, W. Inhomogeneous electron gas. *Physical Review*, 1964, **136** (3B), p. B864.
14. Kohn, W. y Sham, L.J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review*, 1965, **140** (4A), p. A1133.
15. Peverati, R. y Truhlar, D.G. Quest for a universal density functional: the accuracy of density functionals across a broad spectrum of databases in chemistry and physics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2014, **372** (2011).
16. Miehlich, B.; Savin, A.; Stoll, H. y Preuss, H. Results obtained with the correlation energy density functionals of Becke and Lee, Yang and Parr. *Chemical Physics Letters*, 1989, **157** (3), p. 200.
17. Lee, C.; Yang, W. y Parr, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B*, 1988, **37** (2), p. 785.
18. Perdew, J.P.; Chevary, J.A.; Vosko, S.H.; Jackson, K.A.; Pederson, M.R.; Singh, D.J. y Fiolhais, C. Atoms, molecules, solids, and surfaces: Applications of the generalized gradient approximation for exchange and correlation. *Physical Review B*, 1992, **46** (11), p. 6671.
19. Perdew, J.P.; Burke, K. y Ernzerhof, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Physical Review Letters*, 1996, **77** (18), p. 3865.
20. Becke, A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics*, 1993, **98** (7), p. 5648.
21. Stephens, P.J.; Devlin, F.J.; Chabalowski, C.F. y Frisch, M.J. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional

- Force Fields. *The Journal of Physical Chemistry*, 1994, **98** (45), p. 11623.
22. Goerigk, L. y Grimme, S. Double-hybrid density functionals. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 2014, **4** (6), p. 576.
 23. Görling, A. y Levy, M. Correlation-energy functional and its high-density limit obtained from a coupling-constant perturbation expansion. *Physical Review B*, 1993, **47** (20), p. 13105.
 24. Mori-Sánchez, P.; Wu, Q. y Yang, W. Orbital-dependent correlation energy in density-functional theory based on a second-order perturbation approach: Success and failure. *The Journal of Chemical Physics*, 2005, **123** (6), p. 062204.
 25. Grimme, S. Semiempirical hybrid density functional with perturbative second-order correlation. *The Journal of Chemical Physics*, 2006, **124** (3), p. 034108.
 26. Grimme, S. Accurate description of van der Waals complexes by density functional theory including empirical corrections. *Journal of Computational Chemistry*, 2004, **25** (12), p. 1463.
 27. Piacenza, M. y Grimme, S. Van der Waals Interactions in Aromatic Systems: Structure and Energetics of Dimers and Trimers of Pyridine. *ChemPhysChem*, 2005, **6** (8), p. 1554.
 28. Piacenza, M. y Grimme, S. Van der Waals Complexes of Polar Aromatic Molecules: Unexpected Structures for Dimers of Azulene. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127** (42), p. 14841.
 29. Grimme, S. Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. *Journal of Computational Chemistry*, 2006, **27** (15), p. 1787.
 30. Grimme, S.; Antony, J.; Ehrlich, S. y Krieg, H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *The Journal of Chemical Physics*, 2010, **132** (15), p. 154104.
 31. Levy, M.; Perdew, J.P. y Sahni, V. Exact differential equation for the density and ionization energy of a many-particle system. *Physical Review A*, 1984, **30** (5), p. 2745.
 32. Yanai, T.; Tew, D.P. y Handy, N.C. A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chemical Physics Letters*, 2004, **393** (1–3), p. 51.

33. Dreuw, A. y Head-Gordon, M. Single-Reference ab Initio Methods for the Calculation of Excited States of Large Molecules. *Chemical Reviews*, 2005, **105** (11), p. 4009.
34. Tawada, Y.; Tsuneda, T.; Yanagisawa, S.; Yanai, T. y Hirao, K. A long-range-corrected time-dependent density functional theory. *The Journal of Chemical Physics*, 2004, **120** (18), p. 8425.
35. Leach, A.R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Second Edition Wesley Longman Limited. Edinburgh, Harlow, England. **1997**.
36. Miertuš, S.; Scrocco, E. y Tomasi, J. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilizaion of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Chemical Physics*, 1981, **55** (1), p. 117.
37. Tomasi, J. y Persico, M. Molecular Interactions in Solution: An Overview of Methods Based on Continuous Distributions of the Solvent. *Chemical Reviews*, 1994, **94** (7), p. 2027.
38. Tomasi, J.; Mennucci, B. y Cammi, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chemical Reviews*, 2005, **105** (8), p. 2999.
39. Langlet, J.; Claverie, P.; Caillet, J. y Pullman, A. Improvements of the continuum model. 1. Application to the calculation of the vaporization thermodynamic quantities of nonassociated liquids. *The Journal of Physical Chemistry*, 1988, **92** (6), p. 1617.
40. Glendenning, E.D.; Landis, C.R. y Weinhold, F. Natural bond orbital methods. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 2012, **2** (1), p. 1.
41. Weinhold, F. y Landis, C.R. *Valency and Bonding: A Natural Bond Orbital Donor-Acceptor Perspective*. firts Edition. Cambridge University Press. The Edimburgh Building, Cambridge **2005**.
42. Goodford, P.J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1985, **28** (7), p. 849.
43. DesJarlais, R.L.; Sheridan, R.P.; Seibel, G.L.; Dixon, J.S.; Kuntz, I.D. y Venkataraghavan, R. Using shape complementarity as an initial screen in designing ligands for a receptor binding site of known three-dimensional structure. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1988, **31** (4), p. 722.

44. Monticelli, L. y Salonen, E. *Biomolecular Simulations: Methods and Protocols*. Springer. Heidelberg Dordrecht London. **2013**.
45. Yuriev, E. y Ramsland, P.A. Latest developments in molecular docking: 2010–2011 in review. *Journal of Molecular Recognition*, 2013, **26** (5), p. 215.
46. Yuriev, E.; Holien, J. y Ramsland, P.A. Improvements, trends, and new ideas in molecular docking: 2012–2013 in review. *Journal of Molecular Recognition*, 2015, **28** (10), p. 581.
47. Van Gunsteren, W.F.; King, P.M. y Mark, A.E. Fundamentals of drug design from a biophysical viewpoint. *Quarterly Reviews of Biophysics* 1994, **27** (4).
48. Hansson, T.; Marelius, J. y Åqvist, J. Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. *Journal of Computer Aided Molecular Design*, 1998, **12** (1), p. 27.
49. Rathore, R.S.; Sumakanth, M.; Reddy, M.S.; Reddanna, P.; Allam Appa, R.; Mark, D.E. y Reddy, M.R. Advances in Binding Free Energies Calculations: QM/MM-Based Free Energy Perturbation Method for Drug Design. *Current Pharmaceutical Design*, 2013, **19** (26), p. 4674.
50. Kitchen, D.B.; Decornez, H.; Furr, J.R. y Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004, **3** (11), p. 935.
51. Verlet, L. Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review*, 1967, **159** (1), p. 98.
52. Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G. y Berendsen, H.J.C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, 1977, **23** (3), p. 327.
53. Berendsen, H.J.C.; Postma, J.P.M.; van Gunsteren, W.F.; DiNola, A. y Haak, J.R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 1984, **81** (8), p. 3684.
54. Izaguirre, J.A.; Catarello, D.P.; Wozniak, J.M. y Skeel, R.D. Langevin stabilization of molecular dynamics. *The Journal of Chemical Physics*, 2001, **114** (5), p. 2090.
55. Srinivasan, J.; Cheatham, T.E.; Cieplak, P.; Kollman, P.A. y Case, D.A. Continuum Solvent Studies of the Stability of DNA, RNA, and Phosphoramidate–DNA Helices.

Journal of the American Chemical Society, 1998, **120** (37), p. 9401.

56. Kollman, P.A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W.; Donini, O.; Cieplak, P.; Srinivasan, J.; Case, D.A. y Cheatham, T.E. Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. *Accounts of Chemical Research*, 2000, **33** (12), p. 889.
57. Homeyer, N. y Gohlke, H. Free Energy Calculations by the Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area Method. *Molecular Informatics*, 2012, **31** (2), p. 114.
58. Kuhn, B.; Gerber, P.; Schulz-Gasch, T. y Stahl, M. Validation and Use of the MM-PBSA Approach for Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, **48** (12), p. 4040.
59. Weiser, J.; Shenkin, P.S. y Still, W.C. Approximate atomic surfaces from linear combinations of pairwise overlaps (LCPO). *Journal of Computational Chemistry*, 1999, **20** (2), p. 217.

Parte I

Aplicaciones del Modelado a Sistemas Bioorgánicos: Acetilcolinesterasa

CAPÍTULO 2

INTRODUCCIÓN GENERAL: PARTE I

INTRODUCCIÓN GENERAL: PARTE I	49
2.1 Enfermedad de Alzheimer. Patogenia	52
2.1.1 Hipótesis colinérgica.....	52
2.1.2 Hipótesis tau.....	53
2.1.3 Hipótesis amiloidea.....	55
2.2 Enzima acetilcolinesterasa (AChE). Estructura y función	57
2.2.1 Estructura tridimensional.....	57
2.2.2 Función fisiológica.....	60
2.3 Inhibidores reversibles de la acetilcolinesterasa	63
2.3.1 Inhibidores del sitio activo.....	64
2.3.2 Inhibidores duales	67
2.4 Bibliografía.....	72

Los métodos *in silico* expuestos en el capítulo anterior representan una herramienta muy valiosa para el entendimiento de sistemas orgánicos y bioorgánicos. En particular, estos métodos se aplican exitosamente en el diseño racional de fármacos, optimizando tiempo y recursos en los procesos de desarrollo farmacológico. Estas herramientas posibilitaron la obtención numerosos medicamentos para muchas afecciones como la enfermedad de Alzheimer (EA).^[1] Respecto a esta enfermedad, los métodos computacionales han podido predecir modos de unión de fármacos conocidos, identificar nuevos principios activos y predecir la afinidad de ligandos con diferentes blancos biológicos involucrados en procesos cruciales.^[2, 3]

Es de gran relevancia desarrollar nuevos tratamientos para la EA ya que es una de las demencias más comunes y afecta a una fracción importante de la población mundial mayor de 65 años. En esta enfermedad, se ven afectadas progresivamente la memoria, pensamientos, comportamientos y la capacidad de realizar actividades diarias, manifestándose principalmente en personas de edad avanzada.

En 1906, el médico alemán, Alois Alzheimer fue el primero en describir, en una autopsia, una serie de condiciones patológicas en el cerebro de una mujer, llamada Auguste, que se vio afectada durante años por problemas de memoria, confusión y disfunción del lenguaje.^[4] En el cerebro de la paciente se observó reducción de la corteza y la presencia de fibras intraneuronales, que eran depósitos de “sustancias metabólicas patológicas”. Estas fibras eran evidencia suficiente para justificar un diagnóstico de una demencia senil, que se conoció posteriormente como la EA, siendo esta la más común de las demencias, representando al 75% del total de los casos.^[5]

A más de 100 años del primer reporte de la EA, el diagnóstico de la enfermedad se puede realizar con certeza pero las opciones terapéuticas actuales se limitan al tratamiento sintomático que sólo proporciona efectos paliativos, otorgando una retención temporaria de las funciones cognitivas pero sin alterar la progresión de la enfermedad.^[6, 7]

2.1 Enfermedad de Alzheimer. Patogenia

Debido a que la EA presenta una etiología multifactorial, se pueden mencionar varias hipótesis cuando se discute acerca de su patogenia:^[8-10] Entre ellas pueden mencionarse las hipótesis colinérgica, amiloidea, de la proteína tau, glutamatérgica, del estrés oxidativo e inflamatoria, siendo las primeras tres las mas citadas.

2.1.1 Hipótesis colinérgica

En 1936 Herry Dale y Otto Loewi compartieron el premio Nobel por sus investigaciones relacionadas a la neurotransmisión química y en particular por el descubrimiento y la caracterización del primer neurotransmisor reportado; acetilcolina (ACh) (Figura 2. 1).^[11, 12]

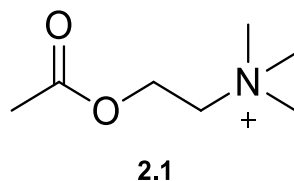


Figura 2. 1. Neurotransmisor catiónico acetilcolina.

Desde entonces, el descubrimiento de la ACh ha sido unos de los grandes avances en la neurociencia que permitió el entendimiento de muchas funciones del sistema nervioso, como así también de neuropatologías perjudiciales. Muchos autores han empleado los conocimientos de la transmisión colinérgica para elaborar la llamada hipótesis colinérgica que permitió entender varias funciones y disfunciones cerebrales tales como desorden afectivo, depresión, esquizofrenia y regulación del sueño. Sin embargo, no hay duda que la aplicación más concreta de dicha hipótesis está vinculada a la comprensión de las funciones cognitivas y demencias.^[13]

La idea terapéutica subyacente, a fines de los '70 y principios de los '80, era que este conocimiento podría ayudar a desarrollar enfoques terapéuticos

dirigidos a enfermedades relacionadas con alteraciones neuroquímicas encontradas en pacientes. Manteniendo esta idea, se examinaron cerebros de pacientes con Alzheimer, encontrando déficit de células colinérgicas en zonas específicas.^[14, 15] Además, la actividad de la enzima colinacetiltransferasa (marcador de los procesos sinápticos) responsable de la síntesis de la ACh, disminuyó considerablemente en este tipo de neuronas.^[15, 16] Otros dos marcadores específicos de la sinapsis colinérgica, que se vieron también reducidos en los mismos tejidos, son la liberación de ACh inducida por la despolarización y la captación de colina en la terminal nerviosa, para reponer la vía sintética del neurotransmisor.^[17]

Estas y otras observaciones constituyen las bases de la hipótesis colinérgica expuesta en el artículo seminal publicado por Bartus y colaboradores que puede ser considerado la primera apreciación comprensiva de la relación entre esta hipótesis y las disfunciones cognitivas.^[18]

Ésta fue la primera hipótesis relacionada a la EA y sirvió para desarrollar drogas para tratar la sintomatología de esta enfermedad. Para ello, se busca mantener los niveles de ACh funcional en el medio sináptico empleando inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), responsable de la hidrólisis de dicho neurotransmisor.

A pesar de que si bien actualmente la hipótesis colinérgica se encuentra cuestionada debido a los nuevos avances en neurociencia,^[13] es indiscutible que ha sido la base de inspiración para la búsqueda de un nuevo entendimiento en enfermedades neurodegenerativas como la EA.

2.1.2 Hipótesis tau

La hipótesis tau surge a través de la observación experimental de ovillos neurofibrilares en cortes histológicos de pacientes que sufrieron EA. Los ovillos están formados por agregados de una proteína, anormalmente fosforilada, llamada tau.

Esta proteína se une a los microtúbulos axonales regulando la estabilidad de los mismos. Tau es una proteína muy hidrofílica, que mayormente se encuentra desplegada y contiene en su región C-terminal tres o cuatro dominios iguales con una longitud de 31 aminoácidos. A lo largo de su secuencia, antes y después de estas regiones repetidas, posee 25 sitios potenciales de fosforilación y algunos de estos sitios específicos han sido correlacionados con daños severos en la EA.^[19] La proteína correctamente fosforilada estabiliza los microtúbulos, manteniendo un equilibrio dinámico entre su estado de unión con los mismos y su estado libre; de este modo se mantiene la morfología de la neurona y se asegura el transporte axonal. En la EA se establece un desbalance en las actividades de las proteínas kinasas y fosfatasas encargadas de la fosforilación y desfosforilación, respectivamente.

La hiperfosforilación que se observa en cerebros dañados por Alzheimer genera una desestabilización y despolimerización de los microtúbulos, deterioro del transporte axonal y disminución de la neurotransmisión. Estos eventos tienen un impacto directo en las funciones cognitivas del paciente.^[20] Además, el incremento de la fosforilación estimula el autoensamblado de tau. En este proceso, primeramente se liberan proteínas tau de los microtúbulos y se ensamblan formando preovillos. Estas proteínas posteriormente sufren un cambio conformacional para adoptar la forma de lámina- β formando fibras helicoidales (Figura 2. 2). Por último, estas fibras helicoidales se unen para formar ovillos neurofibrilares de mayor tamaño, en los cuales las proteínas han sufrido algunas modificaciones como clivajes, glicosidaciones o entrecruzamientos que les confieren una toxicidad adicional.

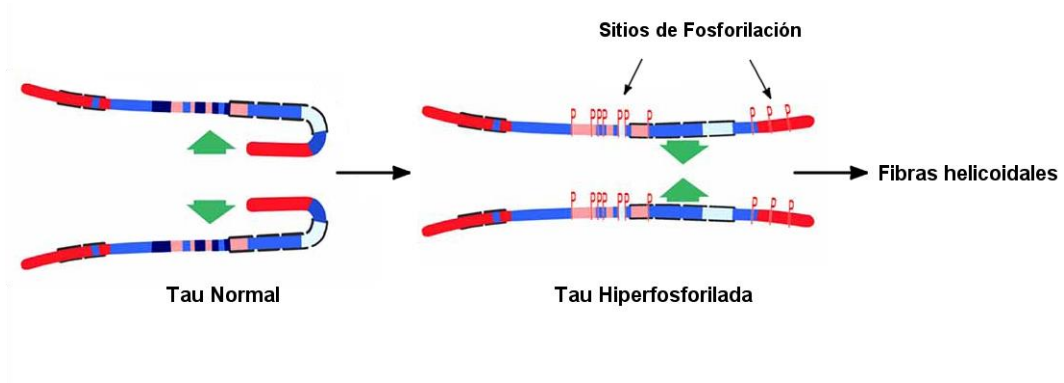


Figura 2. 2. Modelo de autoensamblado de la proteína tau. Figura adaptada de la referencia [19].

2.1.3 Hipótesis amiloidea

Desde sus orígenes, a principios de los '90, la hipótesis amiloidea ha dado forma en gran medida a la comprensión actual de la EA. En líneas generales, establece que la acumulación de péptidos β -amiloides (β A) es la causa primaria que inicia una cascada de eventos patogénicos que eventualmente resultan en las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Figura 2. 3).^[21, 22]



Figura 2. 3. Cascada neurodegenerativa ocasionada por la acumulación de β A.

La raíz de la amiloidosis es la proteína precursora de los péptidos β A, APP de las siglas en inglés *Amiloid Precursor Protein*.^[23] La APP es una proteína transmembrana que se expresa en tejidos de los sistemas nerviosos central (mayormente) y periférico. En la actualidad no se conoce con claridad cuál es el

verdadero rol fisiológico de esta proteína, aunque se cree que está vinculada al tráfico axonal vesicular.^[24] La mayor parte de la proteína forma un dominio extracelular (DEC), seguido por un dominio transmembrana (DTM) y un dominio citoplasmático (DC) de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud (Figura 2. 4).

La APP puede ser procesada por tres proteasas llamadas α -, β - y γ -secretasa.^[25] Particularmente, la escisión por las α - y β -secretasas ocurre en el medio extracelular cerca del DTM, derivando en la liberación del DEC. Ambas secretasas generan un fragmento C-terminal de 83 (FCT α) o 99 (FCT β) aminoácidos de longitud que permanecen anclados a la membrana. Estos FCTs pueden ser procesados por la γ -secretasa y su proteólisis resulta, en el caso del FCT β , en la formación de los péptidos β A. Por otro lado, la degradación de FCT α genera un péptido de corta longitud llamado p3, que es posteriormente digerido y no posee un rol patológico.

La γ -secretasa puede cortar al sustrato FCT β en varias posiciones vecinas dando péptidos β A de diferentes longitudes. La especie dominante es el β A40, que normalmente constituye entre el 80 y 90% del total de los β A formados. La segunda especie más abundante es el β A42 (representa entre 5 y 10%) y el resto corresponde a especies de menor longitud como β A37 y β A38. El β A42 puede agregarse y formar puntos de nucleación para la generación de grandes oligómeros y fibras que finalmente se convertirán en placas amiloides microscópicas.^[26-28] La formación de los agregados es acompañada por un cambio estructural del β A, que modifica su estructura secundaria pasando de α -hélice a lámina- β . Los péptidos β A40 pueden agregarse cuando la concentración de los agregados amiloides alcanza un valor límite. Por su parte, las especies de corta longitud no son propensas a agregarse, sino que pueden interferir en el proceso. Se ha informado que la enzima AChE posee un papel activo en el proceso de agregación, ya que en su estado soluble puede unirse al β A formando un complejo que promueve la formación de placas seniles.^[29, 30]

Los monómeros de β A no son tóxicos en concentraciones fisiológicas pero los eventos nocivos neuronales son desatados con la aparición de los

agregados. Los mismos pueden formar poros en la membrana celular interfiriendo en la homeostasis iónica. La toxicidad es finalmente una consecuencia de las diversas maneras en las que los agregados interactúan con las células.

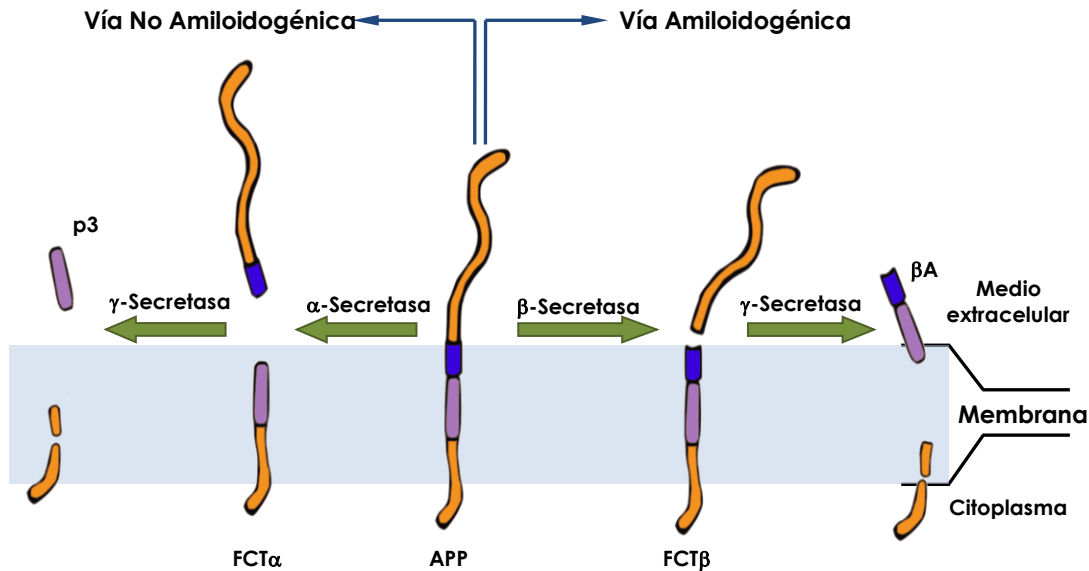


Figura 2. 4. Proteólisis de la proteína precursora del β A.

2.2 Enzima acetilcolinesterasa (AChE). Estructura y función

Como se ha mencionado anteriormente, el rol clásico de la enzima AChE en la finalización de la neurotransmisión mediada por ACh fue un foco de gran interés en las últimas décadas. Actualmente se ha puesto atención en entender cuáles y cómo son los roles “no clásicos” de la enzima, que la involucra en una variedad de procesos neurológicos.^[31]

2.2.1 Estructura tridimensional

Para comprender la eficiencia catalítica de la AChE o llevar a cabo un diseño racional de drogas es esencial el entendimiento de su estructura

tridimensional. La cristalografía de rayos X es una técnica experimental que permite visualizar y comprender algunos aspectos estructurales importantes de la enzima. Es por ello que se invierte un gran esfuerzo en obtener cristales de la enzima purificada de distintas especies y tejidos. Los primeros cristales obtenidos fueron de un tetrámero de AChE extraídos de tejidos de *Electrophorus electricus* (*EeAChE*).^[32] A pesar de que se informó su caracterización preliminar, no se obtuvo información estructural. La primera estructura cristalográfica obtenida fue la de AChE de *Torpedo californica*, enzima de raya eléctrica del pacífico (*TcAChE*), en el año 1991.^[33] Esta permitió por primera vez visualizar con resolución atómica las distintas zonas que conforman el bolsillo de unión. Posteriormente, se cristalizaron AChE de ratón,^[34] *Drosophila*^[35] y humano.^[36] En los últimos años, los reportes de AChE humana (*hAChE*) recombinante han revelado que posee características estructurales muy similares a la *TcAChE*.^[36, 37]

Una de las características remarcables de la estructura de la enzima es la presencia de una “cavidad catalítica” de aproximadamente 20 Å de profundidad que se extiende hacia el centro proteína. Recibe este nombre debido a que en el fondo de la misma se encuentra el sitio activo (SA) donde se lleva a cabo la hidrólisis del neurotransmisor. En el SA se encuentra ubicada la “tríada catalítica”, conformada por los residuos responsables de la actividad catalítica (serina, histidina y glutamato). En la Figura 2. 5 se muestra el mecanismo de catálisis de la enzima.

En el SA también hay otros tres subsitios; subsitio aniónico, oxoanión y de unión acilo. Los subsitios se han nombrado en base a la forma en la que interacciona cada uno de ellos con el sustrato natural ACh, (Figura 2. 6).

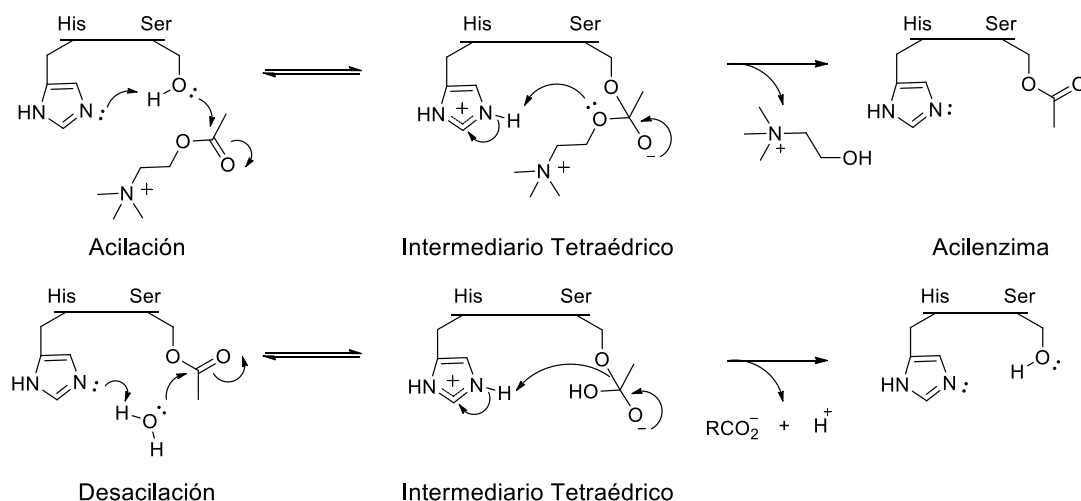


Figura 2. 5. Mecanismo de hidrólisis de la ACh.

En la boca de la cavidad, sobre la superficie de la enzima, se encuentra una zona denominada sitio aniónico periférico (SAP). En esta región se pueden unir inhibidores con nitrógenos cuaternarios y toxinas naturales de gran tamaño como la fasciculina-2.^[38] Entre el SA y SAP se encuentra una región denominada “cuello de botella” conformada por un residuo de fenilalanina y una tirosina. El cuello de botella se abre y cierra permitiendo el ingreso del sustrato natural, moléculas de agua e inhibidores. La numeración de los residuos que conforman cada una de las regiones y subsitios varía dependiendo de la especie, en la Tabla 2. 1 se muestra un detalle de las diferentes regiones para las enzimas *hAChE* y *TcAChE*.

Tabla 2. 1. Residuos que conforman cada una de las regiones y subsitios de la cavidad de *hAChE* y *TcAChE*.

Proteína	Región					
	Sitio Activo				Cuello de Botella	Sitio Aniónico Periférico
	Triada catalítica	Subsitio Aniónico	Subsitio Oxianion	Subsitio de unión acilo		
<i>hAChE</i>	Ser203, His447 y Glu303	Trp86, Tyr133 y Glu202	Gly121, Gly122 y Ala204	Trp236, Phe295 y Phe297	Phe338 y Tyr124	Asp74, Ser125, Trp286, Tyr337 y Tyr341
<i>TcAChE</i>	Ser200, His440 y Glu327	Trp84, Tyr130 y Glu199	Gly118, Gly119 y Ala201	Trp233, Phe290 y Phe288	Phe330 y Tyr121	Asp72, Ser122, Trp279 y Tyr334

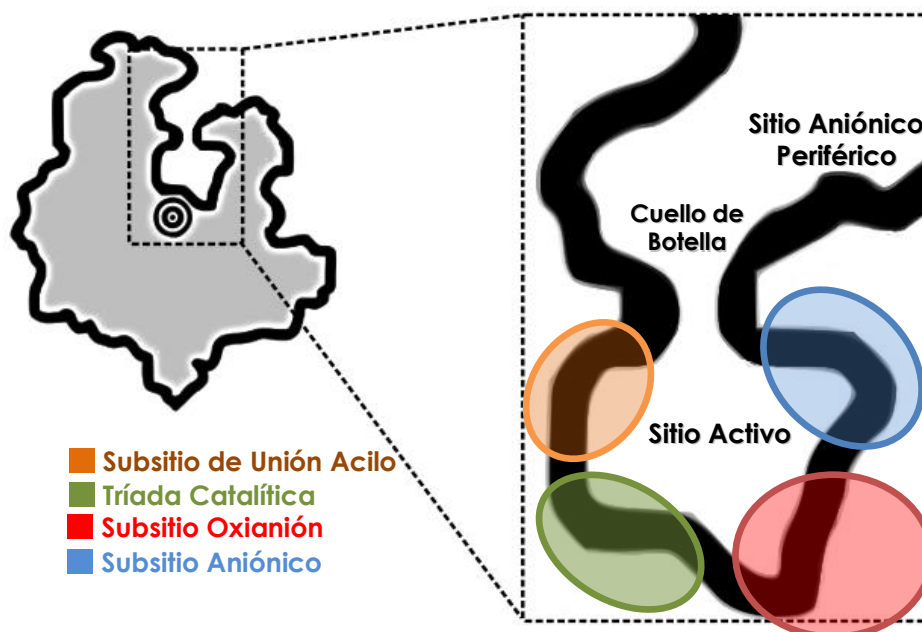


Figura 2. 6. Estructura de la AChE.

Como se mencionó anteriormente, la AChE cumple una importante función biológica y es necesario conocer acabadamente su estructura tridimensional y la diferencia que presenta en distintas especies para poder entender algunas claves de la catálisis y desarrollar compuestos que puedan inhibirla exitosamente. Esto puede conducir a nuevas terapias para el tratamiento de algunas enfermedades como Alzheimer.

2.2.2 Función fisiológica

La enzima AChE cumple su función en el sistema nervioso central y periférico siendo su tarea específica la hidrólisis del neurotransmisor catiónico ACh en la sinapsis colinérgica.

En la sinapsis colinérgica, la enzima colinacetiltransferasa (ChAT), presente en la neurona presináptica, cataliza la síntesis de ACh a partir de colina y acetil-coenzima A, siendo ACh empaquetada en vesículas de transporte (vAChT) (Figura 2. 7). Los potenciales de acción disparan la liberación de ACh al

espacio sináptico, donde se puede unir a receptores muscarínicos localizados en las membranas pre- y postsinápticas. El receptor muscarínico M2, ubicado en la membrana presináptica regula la liberación de neurotransmisor mediante una recaptación negativa. En la membrana postsináptica, M1 traduce la señal a través de un camino que involucra a diacilglicerol (DAG), inositol-1,4,5-trifosfato (ins-(1,4,5)P₃) y una kinasa dependiente de Ca²⁺. La ACh es hidrolizada en el espacio sináptico por un tetrámero de AChE (AChE-T), que se encuentra unido a la membrana mediante una cola similar a colágeno. Por su parte, la forma monomérica de AChE (AChE-M) también puede ser encontrada en estado soluble en el espacio sináptico. Por último, un eficiente mecanismo de recaptación de colina la ingresa a la célula presináptica y es tomada por la ChAT para sintetizar nuevamente ACh.

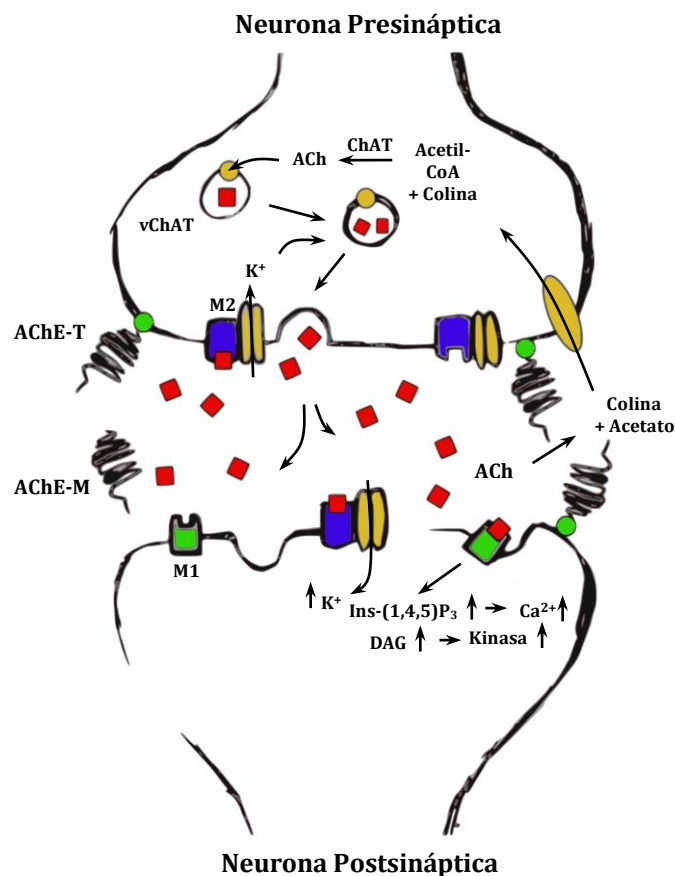


Figura 2. 7. Representación esquemática de la sinapsis colinérgica.

Debido al rol esencial que juega la enzima en el sistema nervioso, ha sido un blanco atractivo para el diseño racional de inhibidores de la AChE (AChEIs).^[39] Un ejemplo de esto, son los agentes nerviosos *sarín* y *somán* (**2.2** y **2.3**, respectivamente, Figura 2. 8) utilizados como armas químicas en la segunda guerra mundial. Estos compuestos son inhibidores irreversibles de la AChE y pueden unirse covalentemente al sitio activo de la AChE inhabilitándola permanentemente para su función de hidrólisis.^[40] Una representación 3D de los complejos formados entre la AChE y estos agentes nerviosos se muestran en la Figura 2.9. Estos AChEIs se encuentran entre las sustancias más tóxicas que ha sintetizado el hombre pudiendo inducir deficiencias circulatorias y respiratorias por anulación de la enzima AChE en el sistema nervioso periférico. En contraste, los carbamatos fisostigmina (**2.4**) y neostigmina (**2.5**) son empleados como agentes terapéuticos en el tratamiento de glaucoma y miastenia gravis. El mecanismo por el cual estos compuestos manifiestan su eficiencia biológica involucra una carbamilación del sitio activo de la AChE. Otro ejemplo de inhibidores irreversibles es el *malatión* (**2.6**) que fue empleado en los '80 para combatir la plaga de moscas de la fruta.^[39]

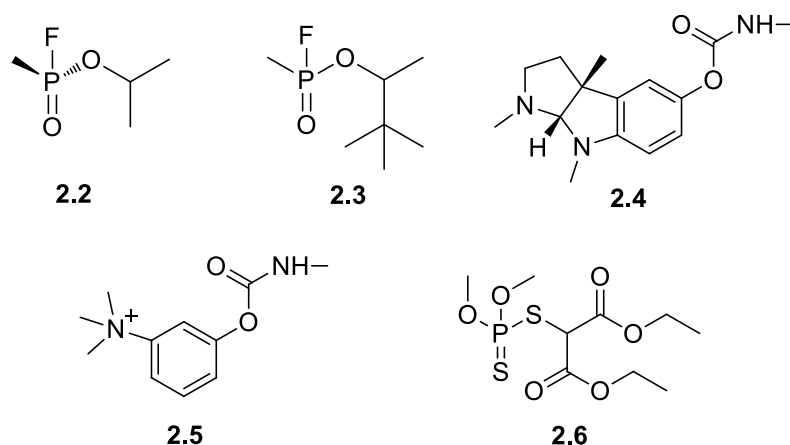


Figura 2. 8. Inhibidores irreversibles de la AChE.

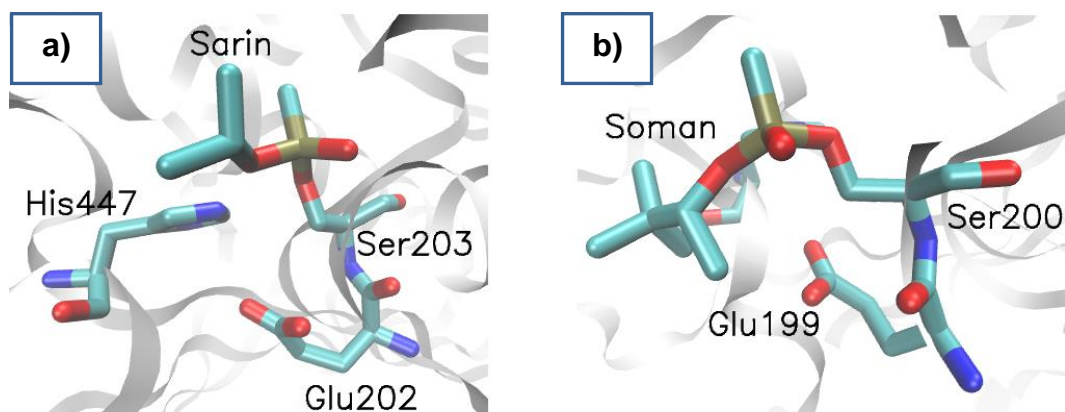


Figura 2.9. Representación 3D de los complejos formados con inhibidores irreversibles. a) *Mus Musculus* AChE-2.2. b) *TcAChE*-2.3.

Por otra parte, algunos artículos sugieren que la AChE posee otros roles además de su función específica en la terminación del impulso nervioso en la sinapsis colinérgica.^[41] Se ha informado que la enzima promueve el crecimiento axonal,^[42] activa células dopaminérgicas,^[43, 44] y participa en los procesos de ensamblado del péptido β A que deriva en la formación de depósitos neurofibrilares.^[29, 45] Se ha demostrado que el complejo AChE- β A posee características tóxicas al igual que las fibras amiloides. El descubrimiento de esta función ha incentivado la búsqueda de terapias alternativas para tratar la EA.^[46]

2.3 Inhibidores reversibles de la acetilcolinesterasa

En las terapias actuales, el empleo de inhibidores de origen natural o sintético, ha mostrado una pequeña, pero significativa, mejora en la calidad de vida de pacientes portadores de la EA. Esto se debe a que no presentan la posibilidad de revertir la enfermedad sino que solamente pueden ofrecer un efecto paliativo a los síntomas característicos de las disfunciones cognitivas.

Como se ha mencionado en el apartado 2.1.3, la hipótesis amiloidea es una de las más importantes y abarcativas en lo que a la patogénesis refiere. En esta se menciona que la agregación del β A dispara una cadena de eventos neurotóxicos que conducen a la degeneración neuronal, que se ve manifestada

en la sintomatología de la demencia. Debido a esto, interrumpir la formación de agregados de β A ha emergido como una de las estrategias predominantes en el desarrollo actual de terapias que pueden modificar el curso de la enfermedad.^[46] A pesar de que las pruebas iniciales con algunos candidatos como la vacuna β A AN1792, *tramiprosato*^[47] y *dimebon*^[48] han derivado en resultados negativos, los compuestos *nilvadipina*^[49] y SK-PB-B70M^[50] se encuentran en el proceso de evaluación de fase III.

Mientras las drogas dirigidas a impedir la formación de depósitos amiloides se encuentran en etapas de desarrollo, las terapias actuales todavía siguen dominadas por un grupo de drogas que fueron conceptualmente diseñadas para tratar síntomas de la demencia. Actualmente, se comercializan cuatro de estos inhibidores. Estos fármacos aumentan la concentración del neurotransmisor ACh en el espacio sináptico compensando el déficit colinérgico característico de la enfermedad.^[51-55]

2.3.1 Inhibidores del sitio activo.

Los compuestos que se discutirán a continuación poseen la particularidad de ser AChEIs reversibles. Esto significa que establecen interacciones no covalentes con la enzima como puente hidrógeno, van de Waals y enlaces iónicos. La suma de estas interacciones deriva en una unión específica entre el inhibidor y el receptor.

En 1986, Summer y colaboradores publicaron el compuesto tacrina (**2.7**, Figura 2. 10) como inhibidor reversible de la AChE.^[56] Posteriormente, en 1996, tacrina fue aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*), pero su uso fue discontinuado debido a su baja tolerancia en pacientes. En la cristalografía de rayos X del complejo tacrina-*TcAChE* (PDB:1ACJ) puede entenderse su modo de unión en el SA, siendo importantes las interacciones π -*stacking* entre el anillo acridina y los residuos Trp84 y Phe330 pertenecientes al subsitio aniónico y a la región del cuello de botella, respectivamente.^[55] Además, el nitrógeno del anillo, protonado a pH fisiológico, establece un puente hidrógeno con la His440 de la

tríada catalítica (Figura 2. 11a).

Otro inhibidor conocido, de origen natural, es la (-)-huperzina A (**2.8**).^[57, 58] Experimentalmente se ha encontrado que cuando se acompleja con la enzima forma una interacción catión- π entre su grupo amino y los anillos aromáticos de Trp84 y Phe330 (PDB: 1VOT) (Figura 2. 11b).^[54] Si se compara con tacrina, la posición del Trp84 no se afecta demasiado, aunque la posición de la cadena lateral de Phe330 se ve modificada. También, se observa una interacción de puente hidrógeno entre el grupo carbonilo del inhibidor y la Tyr130 ubicada en el sitio aniónico (Figura 2. 11c).

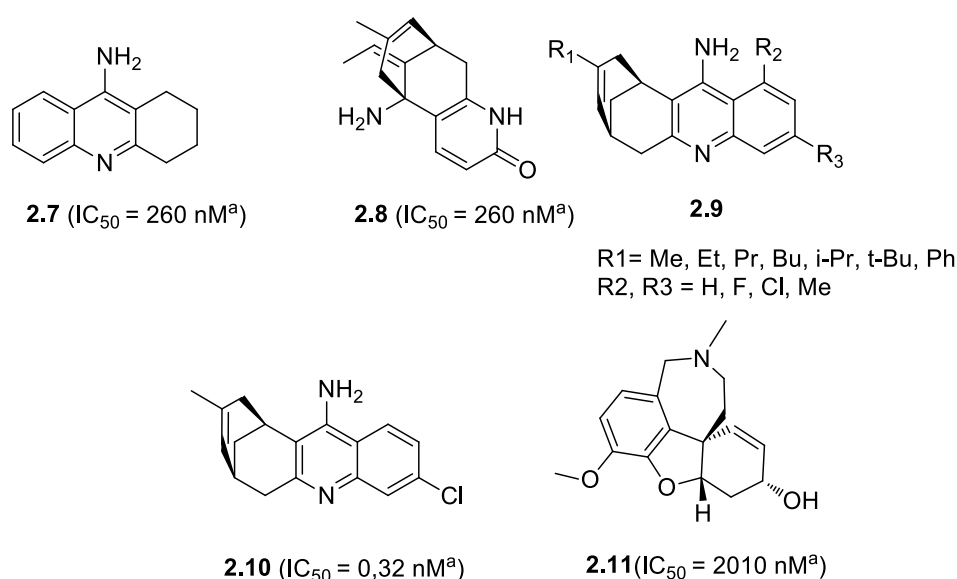


Figura 2. 10. Inhibidores reversibles que interaccionan con el SA de la AChE.
^ahAChE.

Por otra parte, existe un conjunto de compuestos híbridos, llamados huprinas (**2.9**) que fueron creados a partir de la fusión entre los núcleos de tacrina y (-)-huperzina A.^[59] Estudios de modelado molecular sugirieron un modo de unión que posteriormente fue confirmado mediante cristalografía del complejo entre AChE y huprina X (**2.10**) (PDB: 1E66).^[60, 61] El modo de unión confirma la naturaleza híbrida de las huprinas, ya que mantienen las principales interacciones que se dan lugar en los complejos de los inhibidores precursores.

Otro compuesto aprobado por la FDA es la galantamina (**2.11**).^[62, 63] Al igual que con la huprinas, la orientación de la galantamina en el sitio activo fue

primeramente estudiada mediante modelado molecular, y el modo predicho concuerda con el encontrado en la estructura de rayos X del complejo (-)-galantamina-*TcAChE* (PDB: 1QTI y 1DX6).^[55, 64, 65] El inhibidor se posiciona en la base del sitio activo e interacciona con los residuos Phe330, Gly118 y Glu199 (Figura 2. 11d).

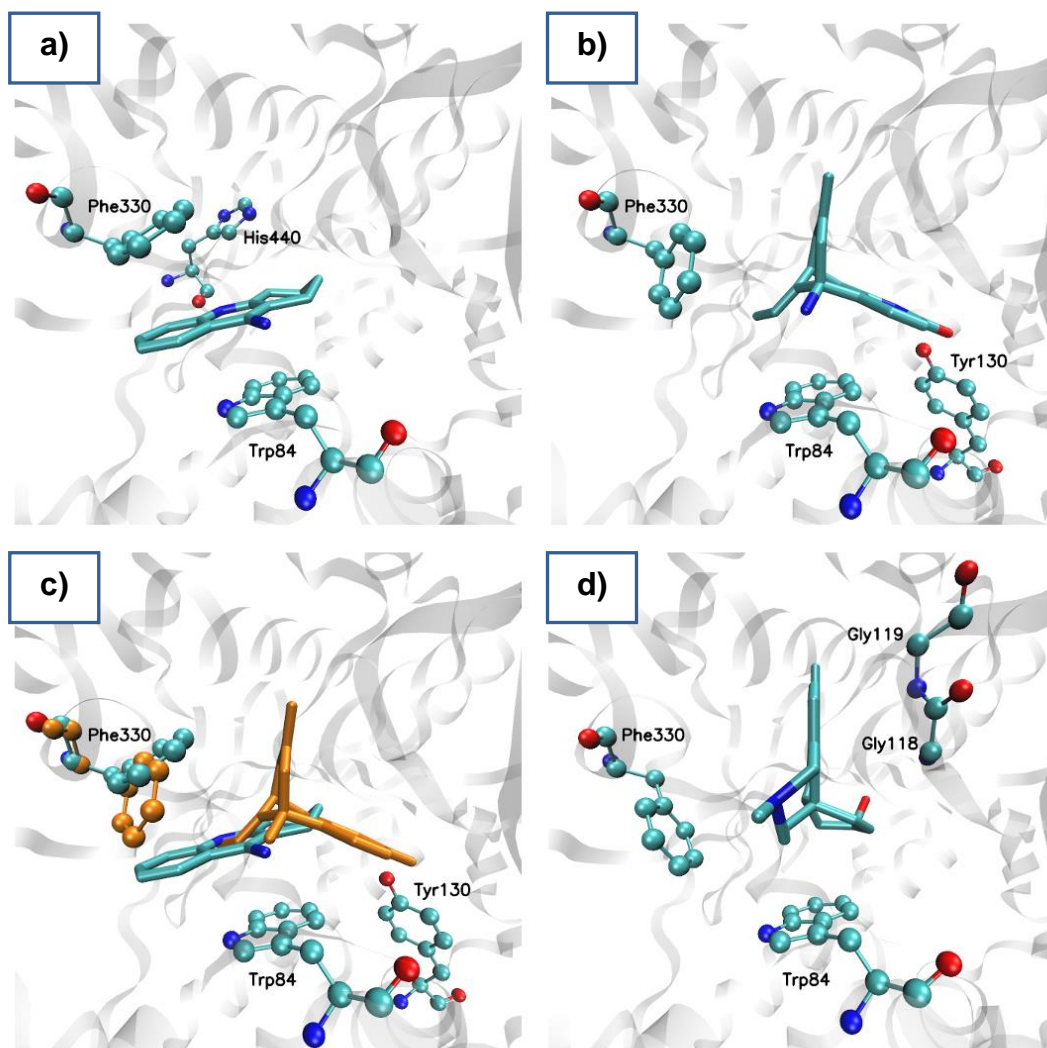


Figura 2. 11. Representación 3D de inhibidores de AChE en el sitio activo. a) AChE-2.7, b) AChE-2.8, c) Comparación de los complejos AChE-2.7 y AChE-2.8 (bastones naranja) d) AChE-2.11.

Los modos de unión de los inhibidores discutidos anteriormente, ilustran la diversidad molecular que puede ser explorada para alcanzar una buena unión en el SA de la enzima. Analizando estructuras de rayos X de los complejos

mencionados se puede notar que la versatilidad química está relacionada, en gran medida, a la plasticidad de la cadena lateral del residuo Phe330, cuya flexibilidad conformacional facilita el reconocimiento de diferentes inhibidores.

En los últimos años, estudios preclínicos, clínicos y radiológicos han evidenciado efectos neuroprotectores de algunos inhibidores, que van más allá de mejorar la sinapsis entre neuronas colinérgicas. Francis y colaboradores han encontrado, en estudios preclínicos, que estos compuestos pueden bloquear la apoptosis celular ayudando a mantener el número de neuronas colinérgicas en zonas afectadas por la enfermedad.^[66] Otro mecanismo por el cual pueden mejorar los síntomas se basa en la estimulación de la degradación de la proteína APP por vías no amiloidogénicas (Figura 2. 4), a través de la enzima α -secretasa.^[67] Esto conduciría a una génesis más lenta de las fibras amiloides.

Por todas estas razones, es importante entender cuál es el mecanismo de acción de estos inhibidores de gran interés, especialmente para el diseño de nuevas drogas de mayor potencia.

2.3.2 Inhibidores duales

La neuroprotección asociada a los compuestos mencionados anteriormente depende principalmente de su acción sobre el blanco biológico AChE. La situación es completamente diferente cuando se considera un mecanismo adicional de neuroprotección, como la interferencia en la agregación del péptido β A. Al momento, se ha podido avanzar en ciertas consideraciones de este mecanismo teniendo en cuenta algunas conclusiones alcanzadas por Inestrosa y Rees.^[29, 30] Estos resultados dan origen a la idea de posibles inhibidores capaces de impedir la formación del complejo AChE- β A.

Se ha encontrado que el β A se deposita en el SAP de la AChE para formar un complejo que promueve la agregación y también cumple un rol patógeno.^[68] De hecho, el propidio (**2.12**, Figura 2. 12), un inhibidor que bloquea el SAP, inhibe la agregación del péptido facilitada por AChE en un 75% a una concentración de 50 μ M.^[29] Por otra parte, de manera independiente, Andrisano

y colaboradores encontraron que el mismo compuesto podía inhibir la agregación en un 85% a una concentración 100 μ M.^[69]

En 1996 la FDA aprobó el empleo de donepezil (**2.13**), en ese momento se pensaba que era un inhibidor que podía bloquear la capacidad catalítica de la AChE. Pero en 1999 la estructura de rayos X de complejo con TcAChE (PDB:1EVE) mostró que podía interactuar simultáneamente con los residuos Trp84 y Trp279 pertenecientes al SA y SAP, respectivamente.^[70] Por esta característica, el donepezil pasó a formar parte del conjunto de “*inhibidores duales*”. En la cristalografía puede observarse que el grupo bencilo interactúa mediante π -stacking con el Trp84 del subsitio aniónico (Figura 2. 13a). Además, el anillo piperidina interactúa con residuos de la zona media de la cavidad y, por último, el fragmento de indano interactúa con el Trp279 mediante π -stacking.

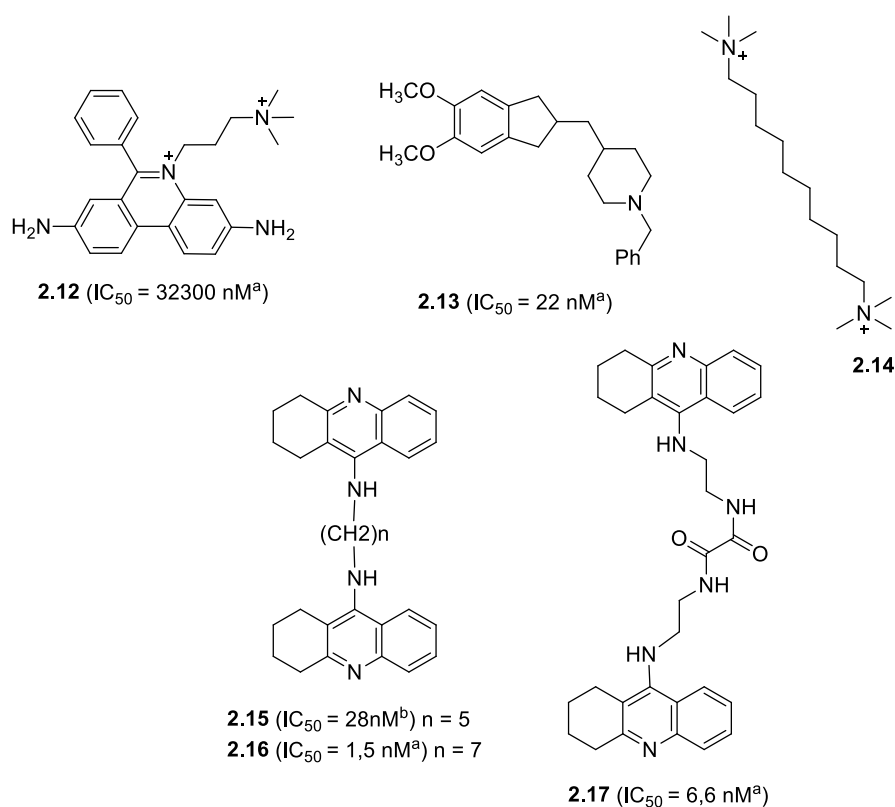


Figura 2. 12. Inhibidores duales. ^ahAChE, ^bAChE ratón.

Otro inhibidor dual que puede citarse es el decametonio (**2.14**). Este compuesto posee dos cargas positivas que son de suma importancia para su unión. Analizando los resultados experimentales (PDB: 1ACL), puede

encontrarse que el grupo trimetilamonio establece una interacción catión- π con Trp84. Además, la misma interacción puede verse entre el trimetilamonio y el indol del Trp279 del SAP (Figura 2. 13b).^[55]

Los complejos formados por la enzima y los inhibidores bis(5)-tacrina (**2.15**) y bis(7)-tacrina (**2.16**) son ejemplos paradigmáticos de inhibidores duales, cuya diferencia es sólo dos grupos metileno en el espaciador (PDB: 2CMF y 2CKM, respectivamente).^[71] En ambos inhibidores el fragmento de tacrina en el SA imita interacciones que se han encontrado en el modo de unión de tacrina (ver sección 2.3.1), particularmente las interacciones con los residuos Trp84 y Phe330. En el SAP el segundo fragmento de tacrina en la bis(5)-tacrina forma π -stacking con el Trp279, estando el residuo en una conformación similar a la encontrada en el complejo con donepezil. En contraste, los metilenos adicionales del bis(7)-tacrina permiten que la tacrina forme un “sándwich” con los residuos Tyr70 y Trp279, interaccionando mediante π -stacking, lo que requiere un cambio conformacional en el Trp279 (Figura 2. 13 c y d).

Por otra parte, existen inhibidores de carácter dual los cuales poseen propiedades antioxidantes. Éstos son compuestos híbridos constituidos por un fragmento que se une reversiblemente al sitio activo y otro que posee propiedades antioxidantes. Mediante las características antioxidantes estos inhibidores pueden contrarrestar efectos vinculados al estrés oxidativo e inflamatorio de la EA. En la presente tesis no se realiza un desarrollo sobre este tipo de principios activos, pero si el lector se encuentra interesado en obtener mayor información puede dirigirse a las referencias [72], [73] y [74].

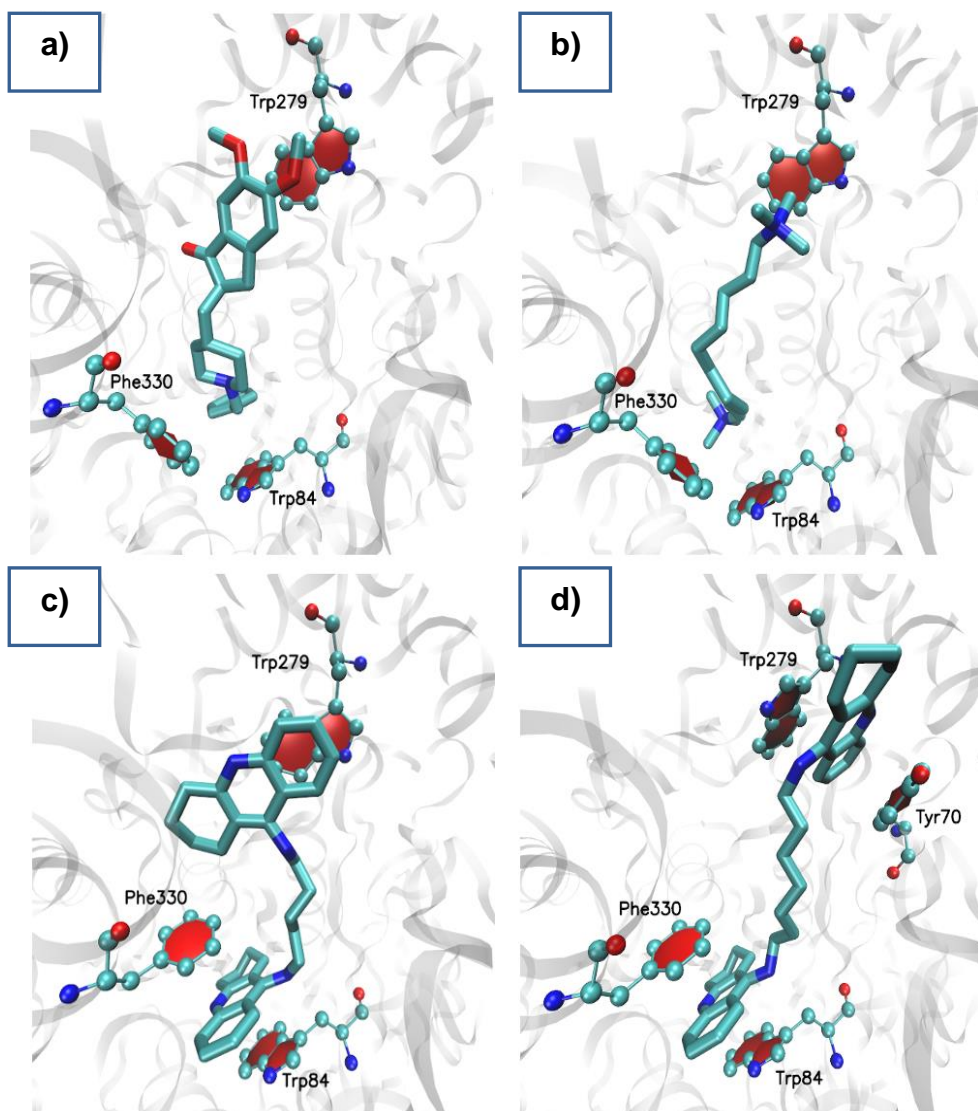


Figura 2. 13. Representación 3D de inhibidores duales de la AChE. a) AChE-2.13, b) AChE-2.14, c) AChE-2.15 d) AChE-2.16.

La incorporación de grupos capaces de interactuar simultáneamente con el SAP y el SA, a través de la manipulación de la naturaleza del espaciador ha sido ampliamente estudiada. Como ejemplo puede citarse al trabajo llevado a cabo por Bolognesi y colaboradores, donde han cambiado la cadena de siete metilenos del bis(7)-tacrina por una cadena donde se incorpora la función oxalamida o polietilenglicol (compuesto **2.17**). Con estas modificaciones se obtienen nuevas interacciones con residuos de la región media de la cavidad.^[69]

La discusión precedente pone énfasis en la plasticidad de la AChE y la

versatilidad de entidades químicas que pueden ser empleadas para la construcción de inhibidores duales. Claramente, las estructuras cristalográficas proveen información invaluable para el entendimiento de cuáles son los residuos responsables de la unión en el SA, la región media de la cavidad y el SAP, así como las alteraciones que estos pueden sufrir. Por ende, es necesario tener en cuenta las conformaciones que pueden adoptar las cadenas laterales de algunos residuos como Phe330 o Trp279 para el diseño de nuevos inhibidores duales, y explorar técnicas de simulaciones computacionales para validar la integridad del modo de unión predicho y de esta manera asistir al diseño de drogas.

2.4 Bibliografía

1. Bermudez-Lugo, J.A.; Rosales-Hernandez, M.C.; Deeb, O.; Trujillo-Ferrara, J. y Correa-Basurto, J. In Silico methods to assist drug developers in acetylcholinesterase inhibitor design. *Current Medicinal Chemistry*, 2011, **18** (8), p. 1122.
2. Khan, M.T.H. Molecular interactions of cholinesterases inhibitors using in silico methods: current status and future prospects. *New Biotechnology*, 2009, **25** (5), p. 331.
3. Munoz-Muriedas, J.; Lopez, J.M.; Modesto, O. y Luque, F.J. Molecular modelling approaches to the design of acetylcholinesterase inhibitors: New challenges for the treatment of alzheimers disease. *Current Pharmaceutical Design*, 2004, **10** (25), p. 3131.
4. Graeber, M.B.; Kösel, S.; Egensperger, R.; Banati, R.B.; Müller, U.; Bise, K.; Hoff, P.; Möller, H.J.; Fujisawa, K. y Mehraein, P. Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics*, 1997, **1** (1), p. 73.
5. Prince, M.; Albanese, E.; Guerchet, M. y Prina, M. World Alzheimer Report 2014. Dementia and Risk Reduction. AN ANALYSIS OF PROTECTIVE AND MODIFIABLE FACTORS. *Alzheimer's Disease International*, 2014.
6. Haas, C. Strategies, development, and pitfalls of therapeutic options for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, **28** (2), p. 241.
7. Mount, C. y Downton, C. Alzheimer disease: progress or profit? *Nature Medicine*, 2006, **12** (7), p. 780.
8. Karim, A. y Jason, E. The complex and multifactorial nature of alzheimers disease *Current Neuropharmacology*, 2011, **9** (4), p. 586.
9. Dana, M.N.; Peter, T.N. y Murphy, M.P. consAlzheimers disease: Pathological mechanisms and recent Insights. *Current Neuropharmacology*, 2011, **9** (4), p. 674.
10. Carreiras, M.C.; Eduarda, M.; Perry, M.J.; Ana Paula, F. y Marco-Contelles, J. The multifactorial nature of alzheimer disease for developing potential therapeutics. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2013, **13** (15), p. 1745.
11. Dale, H.H. The Action of Certain Esters and Ethers of Choline, and Their Relation to Muscarine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1914, **6** (2), p. 147.
12. Loewi, O. Über humorale übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Archiv*, 1921, **189** (1), p. 239.
13. Contestabile, A. The history of the cholinergic hypothesis. *Behavioural Brain Research*, 2011, **221** (2), p. 334.

14. Whitehouse, P.J.; Price, D.L.; Struble, R.G.; Clark, A.W.; Coyle, J.T. y Delon, M.R. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, 1982, **215** (4537), p. 1237.
15. Davies, P. y Maloney, A.J.F. Selective loss of central cholinergic neurons in alzheimer's disease. *The Lancet*, 1976, **308** (8000), p. 1403.
16. Bowen, D.M.; Smith, C.B.; White, P. y Davison, A.N. An neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain*, 1976, **99** (3), p. 459.
17. Perry, E.K.; Gibson, P.H.; Blessed, G.; Perry, R.H. y Tomlinson, B.E. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. *Journal of the Neurological Sciences*, 1977, **34** (2), p. 247.
18. Bartus, R.T.; Dean Iii, R.L.; Beer, B. y Lippa, A.S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 1986, **217**, p. 408.
19. Alejandra del, C.A.; Ben, L.; Inge, G.-I. y Khalid, I. Mechanism of Tau-Induced Neurodegeneration in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. *Current Alzheimer Research*, 2008, **5** (4), p. 375.
20. Mesulam, M.M. Neuroplasticity Failure in Alzheimer's Disease. *Neuron*, 1999, **24** (3), p. 521.
21. Selkoe, D.J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 1991, **6** (4), p. 487.
22. Jakob-Roetne, R. y Jacobsen, H. Alzheimer's Disease: From Pathology to Therapeutic Approaches. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, **48** (17), p. 3030.
23. Selkoe, D.J. Normal and Abnormal Biology of the beta-Amyloid Precursor Protein. *Annual Review of Neuroscience*, 1994, **17** (1), p. 489.
24. Annaert, W. y De Strooper, B. Cell biological perspective on alzheimer's disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2002, **18** (1), p. 25.
25. Dillen, K. y Annaert, W. *A Two Decade Contribution of Molecular Cell Biology to the Centennial of Alzheimer's Disease: Are We Progressing Toward Therapy?* Academic Press. International Review of Cytology. 215. Volume 254. **2006**.
26. Bitan, G.; Kirkitadze, M.D.; Lomakin, A.; Vollers, S.S.; Benedek, G.B. y Teplow, D.B. Amyloid β -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, **100** (1), p. 330.
27. Bitan, G.; Vollers, S.S. y Teplow, D.B. Elucidation of Primary Structure Elements Controlling Early Amyloid β -Protein Oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278** (37), p. 34882.
28. Lu, J.X.; Qiang W Fau - Yau, W.-M.; Yau Wm Fau - Schwieters, C.D.; Schwieters Cd Fau - Meredith, S.C.; Meredith Sc Fau - Tycko, R. y Tycko, R. Molecular structure of beta-amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. *Cell*, 2013, **154**, p. 1257.

29. Inestrosa, N.C.; Alvarez, A.; Pérez, C.A.; Moreno, R.D.; Vicente, M.; Linker, C.; Casanueva, O.I.; Soto, C. y Garrido, J. Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid- β -Peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme. *Neuron*, 1996, **16** (4), p. 881.
30. Rees, T.; Hammond Pi Fau - Soreq, H.; Soreq H Fau - Younkin, S.; Fau, Y.S. y Brimijoin, S. Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiology of Aging*, 2003, **24** (6), p. 777.
31. Soreq, H. y Seidman, S. Acetylcholinesterase [mdash] new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2001, **2** (4), p. 294.
32. Leuzinger, W. y Bake, A.L. Acetylcholinesterase, i. large-scale purification, homogeneity, and amino acid analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1967, **57** (2), p. 446.
33. Sussman, J.L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L. y Silman, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 1991, **253** (5022), p. 872.
34. Bourne, Y.; Taylor, P.; Radić, Z. y Marchot, P. Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. *The EMBO Journal*, 2003, **22** (1), p. 1.
35. Harel, M.; Kryger, G.; Rosenberry, T.L.; Mallender, W.D.; Lewis, T.; Fletcher, R.J.; Guss, J.M.; Silman, I. y Sussman, J.L. Three-dimensional structures of Drosophila melanogaster acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Science*, 2000, **9** (6), p. 1063.
36. Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T.L. y Sussman, J.L. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, **187** (1-3), p. 10.
37. Cheung, J.; Rudolph, M.J.; Burshteyn, F.; Cassidy, M.S.; Gary, E.N.; Love, J.; Franklin, M.C. y Height, J.J. Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, **55** (22), p. 10282.
38. Harel, M.; Kleywegt Gj Fau - Ravelli, R.B.; Ravelli Rb Fau - Silman, I.; Silman I Fau - Sussman, J.L. y Sussman, J.L. Crystal structure of an acetylcholinesterase-fasciculin complex: interaction of a three-fingered toxin from snake venom with its target. *Structure*, 1995, **3**, p. 1355.
39. Quinn, D.M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 1987, **87** (5), p. 955.
40. Sanson, B.; Nachon, F.; Colletier, J.-P.; Froment, M.-T.; Toker, L.; Greenblatt, H.M.; Sussman, J.L.; Ashani, Y.; Masson, P.; Silman, I. y Weik, M. Crystallographic snapshots of nonaged and aged conjugates of soman with acetylcholinesterase, and of a ternary complex of the aged conjugate with pralidoxime. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, **52** (23), p. 7593.

41. Silman, I. y Sussman, J.L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 2005, **5** (3), p. 293.
42. Layer, P.; Weikert, T. y Alber, R. Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism. *Cell Tissue Res*, 1993, **273** (2), p. 219.
43. Llinás, R.R. y Greenfield, S.A. On-line visualization of dendritic release of acetylcholinesterase from mammalian substantia nigra neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987, **84** (9), p. 3047.
44. Holmes, C.; Jones, S.A.; Budd, T.C. y Greenfield, S.A. Non-cholinergic, trophic action of recombinant acetylcholinesterase on mid-brain dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 1997, **49** (2), p. 207.
45. Alvarez, A.; Alarcón, R.; Opazo, C.; Campos, E.O.; Muñoz, F.J.; Calderón, F.H.; Dajas, F.; Gentry, M.K.; Doctor, B.P.; De Mello, F.G. y Inestrosa, N.C. Stable Complexes Involving Acetylcholinesterase and Amyloid- β Peptide Change the Biochemical Properties of the Enzyme and Increase the Neurotoxicity of Alzheimer's Fibrils. *The Journal of Neuroscience*, 1998, **18** (9), p. 3213.
46. Dunkel, P.; Chai, C.L.L.; Sperlágh, B.; Huleatt, P.B. y Mátyus, P. Clinical utility of neuroprotective agents in neurodegenerative diseases: current status of drug development for Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases, and amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2012, **21** (9), p. 1267.
47. Wright, T.M. Tramiprosate. *Drugs Today (Barc)*, 2006, **42** (5), p. 291.
48. Bezprozvanny, I. The rise and fall of Dimebon. *Drug News Perspectives*, 2010, **8**, p. 518.
49. Kennelly, S.; Abdullah, L.; Kenny, R.A.; Mathura, V.; Luis, C.A.; Mouzon, B.; Crawford, F.; Mullan, M. y Lawlor, B. Apolipoprotein E genotype-specific short-term cognitive benefits of treatment with the antihypertensive nilvadipine in Alzheimer's patients—an open-label trial. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 2012, **27** (4), p. 415.
50. Seo, J.-S.; Baek, I.-S.; Leem, Y.-H.; Kim, T.-K.; Cho, Y.; Lee, S.M.; Park, Y.H. y Han, P.-L. SK-PC-B70M alleviates neurologic symptoms in G93A-SOD1 amyotrophic lateral sclerosis mice. *Brain Research*, 2011, **1368**, p. 299.
51. Dvir, H.; Jiang, H.L.; Wong, D.M.; Harel, M.; Chetrit, M.; He, X.C.; Jin, G.Y.; Yu, G.L.; Tang, X.C.; Silman, I.; Bai, D.L. y Sussman, J.L. X-ray Structures of Torpedo californica Acetylcholinesterase Complexed with (+)-Huperzine A and (-)-Huperzine B: Structural Evidence for an Active Site Rearrangement. *Biochemistry*, 2002, **41** (35), p. 10810.
52. Bar-On, P.; Millard, C.B.; Harel, M.; Dvir, H.; Enz, A.; Sussman, J.L. y Silman, I. Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine. *Biochemistry*, 2002, **41** (11), p. 3555.

53. Bartolucci, C.; Perola, E.; Pilger, C.; Fels, G. y Lamba, D. Three-dimensional structure of a complex of galanthamine (Nivalin®) with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2001, **42** (2), p. 182.
54. Raves, M.L.; Harel, M.; Pang, Y.-P.; Silman, I.; Kozikowski, A.P. y Sussman, J.L. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. *Nature Structural & Molecular Biology* 1997, **4** (1), p. 57.
55. Harel, M.; Schalk, I.; Ehret-Sabatier, L.; Bouet, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Axelsen, P.H.; Silman, I. y Sussman, J.L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, **90** (19), p. 9031.
56. Chrispin, P. Tacrine. *The Lancet*, 1995, **345** (8959), p. 1248.
57. Liu, J.-S.; Zhu, Y.-L.; Yu, C.-M.; Zhou, Y.-Z.; Han, Y.-Y.; Wu, F.-W. y Qi, B.-F. The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. *Canadian Journal of Chemistry*, 1986, **64** (4), p. 837.
58. Ha, G.T.; Wong, R.K. y Zhang, Y. Huperzine A as Potential Treatment of Alzheimer's Disease: An Assessment on Chemistry, Pharmacology, and Clinical Studies. *Chemistry & Biodiversity*, 2011, **8** (7), p. 1189.
59. Camps, P.; El Achab, R.; Görbig, D.M.; Morral, J.; Muñoz-Torrero, D.; Badia, A.; Baños, J.E.; Vivas, N.M.; Barril, X.; Orozco, M. y Luque, F.J. Synthesis, in Vitro Pharmacology, and Molecular Modeling of Very Potent Tacrine–Huperzine A Hybrids as Acetylcholinesterase Inhibitors of Potential Interest for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1999, **42** (17), p. 3227.
60. Dvir, H.; Wong, D.M.; Harel, M.; Barril, X.; Orozco, M.; Luque, F.J.; Muñoz-Torrero, D.; Camps, P.; Rosenberry, T.L.; Silman, I. y Sussman, J.L. 3D Structure of *Torpedo californica* Acetylcholinesterase Complexed with Huprine X at 2.1 Å Resolution: Kinetic and Molecular Dynamic Correlates. *Biochemistry*, 2002, **41** (9), p. 2970.
61. Barril, X.; Orozco, M. y Luque, F.J. Predicting Relative Binding Free Energies of Tacrine–Huperzine A Hybrids as Inhibitors of Acetylcholinesterase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1999, **42** (25), p. 5110.
62. Wilcock, G.K.; Lilienfeld, S. y Gaens, E. Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. *BMJ : British Medical Journal*, 2000, **321** (7274), p. 1445.
63. Boit, H.-G. Über die Alkaloide der Zwiebeln von *Galanthus nivalis* (III. Mitteil. über Amaryllidaceen-Alkaloide). *Chemische Berichte*, 1954, **87** (5), p. 724.
64. Greenblatt, H.M.; Kryger G Fau - Lewis, T.; Lewis T Fau - Silman, I.; Silman I Fau - Sussman, J.L. y Sussman, J.L. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution. *FEBS LETTERS* 1999, **463**, p. 321.
65. Pilger, C.; Bartolucci, C.; Lamba, D.; Tropsha, A. y Fels, G. Accurate prediction of the bound conformation of galanthamine in the active site of *torpedo californica* acetylcholinesterase using molecular docking1. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2001, **19** (3–4), p. 288.

66. Francis, P.T.; Nordberg, A. y Arnold, S.E. A preclinical view of cholinesterase inhibitors in neuroprotection: do they provide more than symptomatic benefits in Alzheimer's disease? *Trends in Pharmacological Sciences*, 2005, **26** (2), p. 104.
67. Nitsch, R.M.; Slack, B.E.; Wurtman, R.J. y Growdon, J.H. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science*, 1992, **258** (5080), p. 304.
68. De Ferrari, G.V.; Canales, M.A.; Shin, I.; Weiner, L.M.; Silman, I. y Inestrosa, N.C. A Structural Motif of Acetylcholinesterase That Promotes Amyloid β -Peptide Fibril Formation. *Biochemistry*, 2001, **40** (35), p. 10447.
69. Bolognesi, M.L.; Cavalli, A.; Valgimigli, L.; Bartolini, M.; Rosini, M.; Andrisano, V.; Recanatini, M. y Melchiorre, C. Multi-Target-Directed Drug Design Strategy: From a Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitor to a Trifunctional Compound against Alzheimer's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2007, **50** (26), p. 6446.
70. Kryger, G.; Silman, I. y Sussman, J.L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept®): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*, 1999, **7** (3), p. 297.
71. Rydberg, E.H.; Brumshtein, B.; Greenblatt, H.M.; Wong, D.M.; Shaya, D.; Williams, L.D.; Carlier, P.R.; Pang, Y.-P.; Silman, I. y Sussman, J.L. Complexes of Alkylene-Linked Tacrine Dimers with *Torpedo californica* Acetylcholinesterase: Binding of Bis(5)-tacrine Produces a Dramatic Rearrangement in the Active-Site Gorge. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, **49** (18), p. 5491.
72. Munoz-Torrero, D. Acetylcholinesterase Inhibitors as Disease-Modifying Therapies for Alzheimers Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 2008, **15** (24), p. 2433.
73. Rosini, M.; Simoni, E.; Milelli, A.; Minarini, A. y Melchiorre, C. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Are We Connecting the Dots? *Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, **57** (7), p. 2821.
74. Ji, H.-F. y Shen, L. Berberine: A Potential Multipotent Natural Product to Combat Alzheimer's Disease. *Molecules*, 2011, **16** (8), p. 6732.

CAPÍTULO 3

ESTUDIOS DE INTERACCIONES ENTRE ACETILCOLINESTERASA Y ALCALOIDES DEL *LYCOPODIUM* EXTRAÍDOS DE LA HUPERZIA SAURURUS

ESTUDIOS DE INTERACCIONES ENTRE ACETILCOLINESTERASA Y ALCALOIDES DEL <i>LYCOPODIUM</i> EXTRAÍDOS DE LA HUPERZIA SAURURUS ..	79
3.1 Introducción	81
3.2 Objetivos específicos	83
3.3 Métodos.....	84
3.3.1 <i>Docking</i> molecular	84
3.3.2 Parametrización de residuos no estándares.....	85
3.3.3 Simulaciones de DM.....	85
3.3.4 Evaluación de la actividad inhibitoria sobre AChE.....	86
3.4 Resultados y discusión.....	87
3.4.1 Estudios de <i>docking</i> molecular.....	87
3.4.2 Estudios de dinámica molecular.....	91
3.4.2.1 Análisis de interacciones	93
3.5 Conclusiones	97
3.6 Bibliografía.....	98

3.1 Introducción

Entre los compuestos naturales se encuentran una gran variedad de AChEIs muy potentes.^[1, 2] De hecho, dos de los compuestos comercializados actualmente para aliviar los síntomas de la EA son de origen natural (galantamina y rivastigmina). En consecuencia, una amplia investigación se ha dirigido hacia la identificación de otros inhibidores de la AChE; la mayoría de éstos surge del reino vegetal. A pesar de la gran diversidad estructural, la mayoría de éstos son alcaloides.^[3] En términos generales, se ha encontrado que el grupo amina de los alcaloides, protonado a pH fisiológico, puede dar lugar a interacciones estabilizantes en la unión con el SA de la AChE.^[4] Esta característica representa una ventaja para los alcaloides respecto de otros inhibidores naturales como terpenos, xantonas y cumarinas.^[5]

Dentro de los productos naturales, un grupo ampliamente estudiado es el constituido por los alcaloides del *Lycopodium*, los que reciben esta denominación por haber sido originalmente identificados en plantas del género *Lycopodium*. Se han informado más de 200 alcaloides identificados en 54 especies,^[6] encontrándose que algunos poseían propiedades inhibitorias frente a la enzima AChE.^[3, 7, 8] Éstos usualmente poseen un esqueleto de aproximadamente 16 átomos de carbono y son del tipo quinolizina, piridina y α -piridona. Ayer ha dividido a estos alcaloides en cuatro clases: grupo lycodano, lycopodano, fawcetimano y misceláneo.^[9] Compuestos representativos de estos grupos son lycopodina, lycodina, fawcetina y flegmarina, respectivamente, los esqueletos de estos compuestos se muestran en la Figura 3. 1.

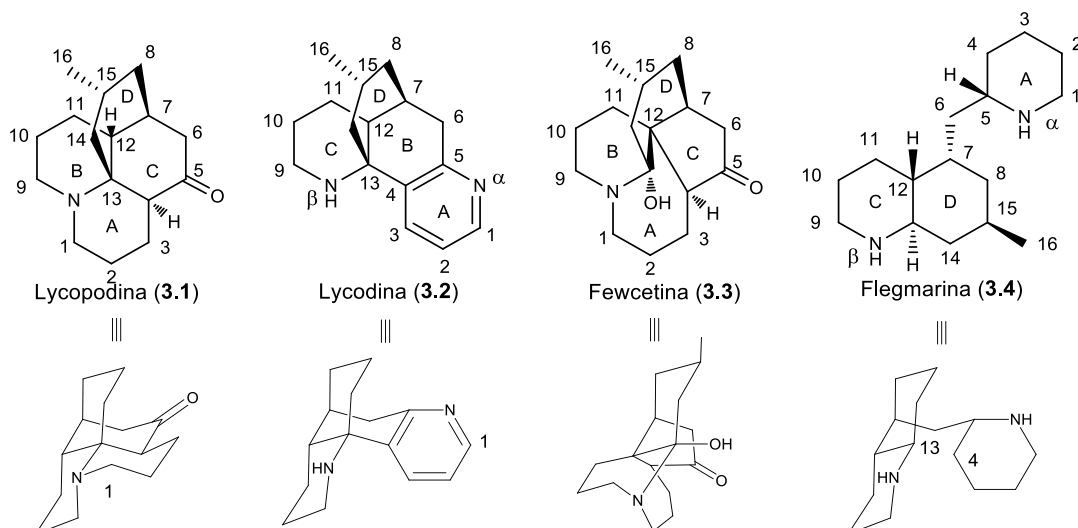


Figura 3. 1. Compuestos representativos de las cuatro clases representativas de alcaloides de *Lycopodium*, cuyos núcleos se ilustran en la parte inferior.

Con el afán de identificar nuevos AChEIs, se ha estudiado un gran número de plantas provenientes de la medicina tradicional. Un ejemplo es la *Qian Ceng Ta* (*Huperzia serrata*), empleada en la medicina tradicional china por siglos para el tratamiento de contusiones, distenciones, hinchazones y esquizofrenia.^[10] De esta especie fueron aislados huperzina A y B pertenecientes a la clase lycodano. Estos alcaloides han mostrado ser inhibidores potentes y selectivos de la actividad de la AChE. En particular, huperzina A ha sido comercializada en china como droga para combatir la EA.^[11, 12]

En nuestro país, se han llevado a cabo trabajos con el objetivo de explorar las propiedades de estos alcaloides aislados de *Huperzia saururus* (Lam.) Trevis. (Lycopodeaceae). Esta planta es un helecho que en Sudamérica crece en la región que se extiende desde el norte de Perú hasta Argentina. En Argentina, su hábitat se encuentra en las alturas de la región noroeste (Jujuy, Salta y Catamarca) y en la región centro (San Luis, Córdoba y Buenos Aires). Esta especie es comúnmente conocida como “cola de quirquincho”, “piyiyay” o “piyijay” y en la medicina tradicional se consumen infusiones de sus partes aéreas como afrodisíaco o mejorador de la memoria.^[13-15]

Los primeros estudios fitoquímicos de la *H. saururus* fueron realizados con material colectado en Argentina. En tales estudios se encontraron algunos

alcaloides, pero sus estructuras no fueron elucidadas.^[16] Posteriormente, a mediados de los '60, la planta fue examinada nuevamente y la estructura del alcaloide sauroxina (**3.7**) fue informada (Figura 3. 2).^[17]

Trabajos sobre la *H. saururus*, recolectada en la pampa de Achala (Córdoba), mostraron que el extracto acuoso posee actividad inhibitoria sobre la AChE.^[18] Además, en el extracto purificado se detectó la presencia de ocho alcaloides diferentes con sauroina (**3.5**) como el predominante. Algunos alcaloides purificados mostraron ser activos como AChEI (Figura 3. 2).^[19]

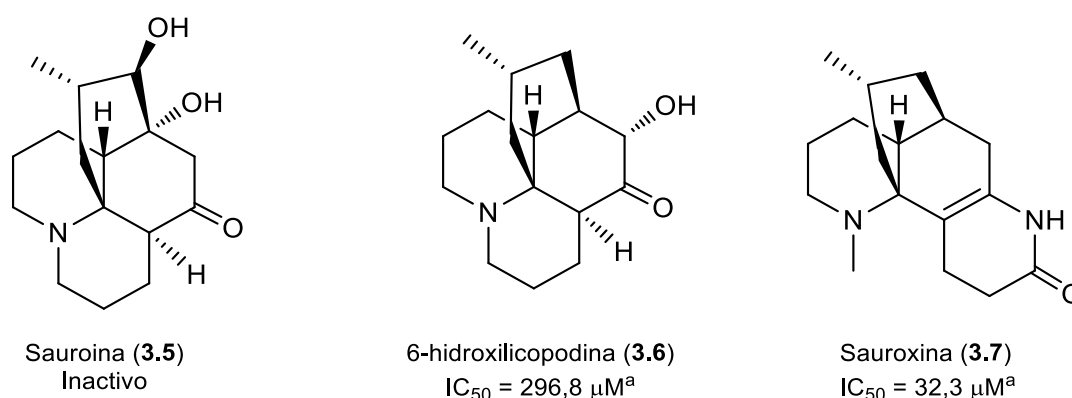


Figura 3. 2. Alcaloides extraídos de la *Huperzia saururus*. ^ahAChE

Los valores de IC_{50} determinados para los alcaloides de la clase lycopodano fueron similares a aquellos alcaloides de la misma clase informados en literatura.^[20] Además, concuerda con la información experimental disponible, que indica que comúnmente los del tipo lycopodano suelen ser menos activos que los del tipo lycodano.^[6]

3.2 Objetivos específicos

Como objetivo se propone racionalizar las diferencias en los valores de inhibición encontrados experimentalmente (Figura 3. 2), frente a la enzima hAChE, para los compuestos que se muestran en la figura. Para esto, se pretende identificar las características principales que dominan la unión enzima-inhibidor mediante el empleo de técnicas de modelado computacional.

Específicamente, se propone realizar estudios de *docking* molecular de los inhibidores anteriormente mencionados, además del inhibidor conocido, del grupo lycodano, huperzina A (**2.8**). Este último, se emplea con fines comparativos. Mediante esta técnica se plantea identificar los modos de unión posibles de los inhibidores con la enzima explorando exhaustivamente la cavidad catalítica de misma.

Utilizando los complejos obtenidos por el *docking* se propone realizar dinámica molecular y calcular de la energía de unión. Con estos resultados se espera elucidar cuáles son las interacciones relevantes de cada complejo y analizar la estabilidad de los mismos. Estos estudios nos brindarán las herramientas necesarias para poder racionalizar los valores de inhibición experimental.

3.3 Métodos

3.3.1 *Docking* molecular

Los programas *Autodock3* (A3)^[21], *Autodock4.2* (A4.2)^[22] y *Autodock Vina* (AV)^[23] fueron empleados para las simulaciones de *docking* molecular, asignándole a los residuos de la proteína las cargas pertenecientes al campo de fuerza ff99^[24]. Las coordenadas iniciales de la proteína de humano fueron tomadas de la estructura de rayos X (PDB: 3LII),^[25] removiendo todas las moléculas de agua. Además, para los residuos no determinados en la cristalografía (Pro259, Gly260, Gly261, Thr262 y Gly263) las coordenadas fueron adicionadas con la herramienta de predicción del programa *Maestro*.^[26] Los estados de protonación de la mayoría de los aminoácidos de la proteína fueron determinados con la ayuda del servidor *H++*.^[27, 28] Algunos residuos particulares, pertenecientes a la cavidad catalítica (His447, Glu334, Glu202 y Asp74), fueron protonados modificando manualmente el PDB del receptor asignando el estado

de protonación según el trabajo previo de McCammon y colaboradores.^[29] Para *A3* y *A4.2*, el método de búsqueda conformacional que otorgó mejores resultados fue el algoritmo genético combinado con búsqueda localizada (GA-LS).

La grilla empleada en las simulaciones fue construida empleado *AutoGrid*. Ésta fue centrada en la cavidad catalítica entre los residuos Trp86 y Tyr337, con un tamaño de 82 x 88 x 80 puntos con un espaciado entre ellos de 0,375 Å. Se ingresaron los mismos parámetros de búsqueda para *A3* y *A4.2*; un tamaño de paso de 2,0 Å para la traslación y 50° para la rotación. El número máximo de evaluaciones de energía fue de 1×10^7 y el número máximo de generaciones de 5×10^5 sobre una población de 50 individuos. Para cada compuesto, 500 geometrías fueron generadas y se las agrupó con un valor umbral de RMSD de 0,5 Å. En el caso de *AV*, un rango de energía de 5 kcal/mol fue empleado, con un máximo número de geometrías de 100 y una exhaustividad igual a 100.

3.3.2 Parametrización de residuos no estándares

La construcción de cada unidad de sustrato usada en las simulaciones de DM y *docking* molecular se realizó con el modulo del programa *antechamber*, usando el campo de fuerza GAFF (*General AMBER Force Field*),^[24, 30, 31] y las cargas del tipo RESP (*Restrained Electrostatic Potential*) obtenidas a partir de un cálculo de *single point* con HF/6-31G* sobre la geometría previamente optimizada (a nivel B3LYP/6-31G*) empleando el programa *Gaussian03*.^[32-34]

3.3.3 Simulaciones de DM

Para correr las simulaciones se utilizó el campo de fuerza ff99 y los archivos de entrada fueron construidos con *xleap* incluidos en el paquete *Ambertools*. Todo el sistema fue neutralizado y solvatado con el modelo de agua TIP3P,^[35] formando una caja rectangular de 56000 átomos en total.

Las simulaciones fueron corridas con el programa *NAMD* (versión 2.8)^[36] a 300 K, empleando condiciones periódicas de contorno. Las interacciones no

enlazantes fueron computadas utilizando una lista de vecinos de 13.0 Å actualizada cada 10 pasos de dinámica. Las interacciones de van der Waals fueron truncadas a los 11 Å aplicando una función de cambio suave a partir de los 8 Å. Todas las interacciones electrostáticas más allá de los 11 Å fueron calculadas empleando la aproximación de *particle-mesh* Ewald^[37] y todos los enlaces covalentes en los cuales se involucran átomos de hidrógeno fueron fijados con el algoritmo de SHAKE.^[38] Todas las trayectorias obtenidas con *NAMD* se analizaron con *VMD*^[39] y *ptraj* perteneciente a paquete de *Ambertools*.^[40]

Antes de empezar la etapa de producción de la simulación, tres etapas previas fueron llevadas a cabo. Primeramente, dos etapas de 5000 pasos de minimización; la primera restringiendo el movimiento de los átomos pesados del sistema enzima-ligando y la segunda con todo el sistema libre. Posteriormente, se realizaron simulaciones de 75 ps en el ensamble NVT a 300 K, con la movilidad de los átomos del sistema restringida. Posterior a estas dos etapas de preparación, se corrieron 20 ns de simulación en el ensamble NPT para el receptor sólo, simulación empleada como “blanco” y 15 ns para cada complejo enzima-ligando estudiado.

Una implementación del *amber11* en código *python* fue empleada para determinar la energías de unión con los modelos *molecular mechanic-Poisson-Boltzmann surface area* (MM-PBSA) y *molecular mechanic-Generalized Born surface area* (MM-GBSA).^[41, 42] Para esta determinación se promedió la energía de unión de las geometrías de los últimos 5 ns de las simulaciones.

3.3.4 Evaluación de la actividad inhibitoria sobre AChE

Los valores experimentales de IC₅₀ para los alcaloides **3.5**, **3.6** y **3.7** fueron determinados empleando el método de Ellman modificado^[43] siguiendo el procedimiento detallado en trabajo previo publicado por Puiatti y colaboradores.^[44] Los resultados se muestran en la Tabla 3. 1.

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Estudios de *docking* molecular

Antes de comenzar con las simulaciones de *docking* molecular, se debe seleccionar el estado de protonación correcto de los alcaloides a $\text{pH} \approx 7,4$. A partir de datos bibliográficos se espera que las aminas estén protonadas a este pH .^[45, 46] De todas maneras, se determinaron los valores de pK_b de los compuestos **2.8**, **3.5-7** siguiendo la metodología informada por Sastre y colaboradores.^[47] Para ello, se llevó a cabo una optimización de geometría y caracterización de los mínimos, por constantes de fuerza, empleando métodos de DFT (B3LYP/6-311++G(d,p), usando el modelo solvente SMD).^[48, 49] Estos valores se determinan mediante una reacción isodésmica en la cual se emplea una molécula de referencia cuyo pK_b se encuentra determinado experimentalmente. Esta referencia debe poseer una similitud estructural con el compuesto de interés. En nuestro caso, para el cómputo del pK_b de los compuestos **3.5-7** se empleó a quinuclidina ($\text{pK}_b = 3$) como referencia y para **2.8** etilamina ($\text{pK}_b = 3,4$). Para todos los alcaloides estudiados se obtuvieron valores de pK_b menores a 3,4. Por lo tanto, en condiciones fisiológicas ($\text{pH} = 7,4$), la forma protonada sería la predominante.

Debido a que la estereoquímica del nitrógeno β del alcaloide **3.7** no fue determinada experimentalmente, se evaluaron las estabildades (empleando cálculos de DFT) de los estereoisómeros neutros y protonados, con el enlace $\beta\text{-N-CH}_3$ en posición axial o ecuatorial. Se encontró que tanto para la forma neutra como la protonada, el isómero más estable ubica el enlace N-CH_3 en posición axial (Figura 3. 3).

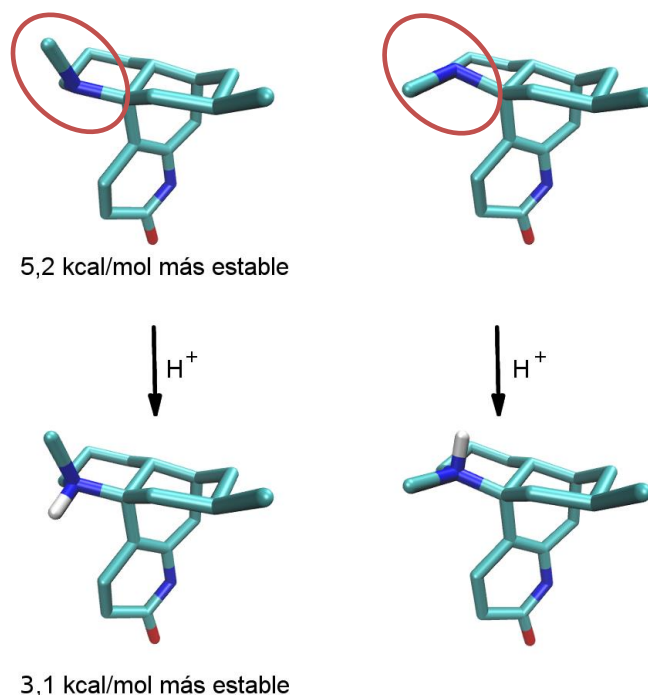


Figura 3. 3. Diferentes conformeros de **3.7** dependiendo de la posición del grupo β -N-CH₃.

Como control se llevó a cabo simulaciones de *docking* molecular del complejo entre *TcAChE* y huprina X y se comparó con la estructura determinada experimentalmente (PDB: 1E66).^[50] Para esto se emplearon los tres programas mencionados previamente en la sección de 3.3.1. Se exploraron diferentes algoritmos y los parámetros de búsqueda fueron refinados para reproducir los resultados experimentales. Los mejores resultados se obtuvieron con el algoritmo GA-LS, encontrándose que la geometría obtenida fue cercana a la experimental con un valor de RMSD de 0,55 Å. Las geometrías obtenidas con cada programa se muestran en la Figura 3. 4. De esta manera, se validó el procedimiento de *docking* empleado en la búsqueda de los modos de unión de los complejos.

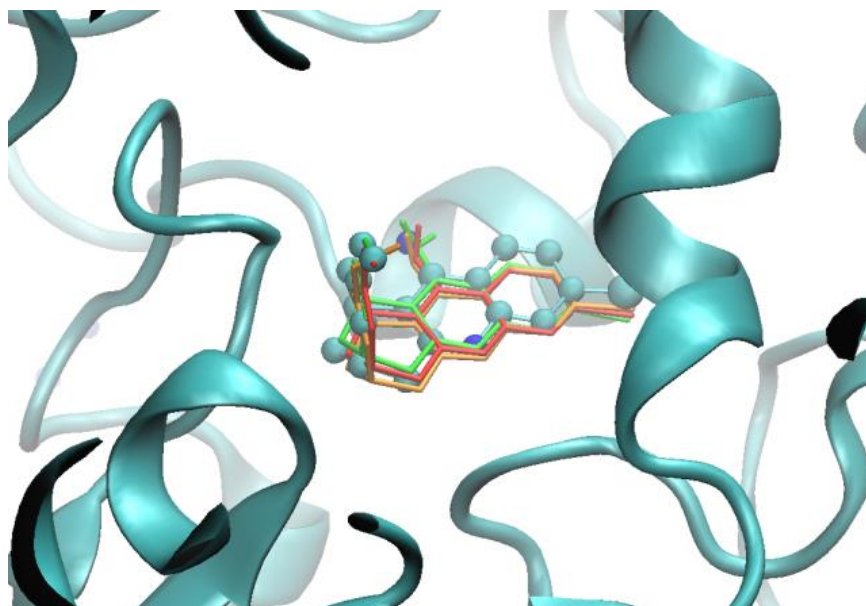


Figura 3. 4. Comparación entre la geometría de rayos X del complejo huprina X-TcAChE y las obtenidas con docking molecular. La geometría de rayos X se representa en bastones y esferas, la obtenida por el *Autodock3* en bastones naranja, en rojo la del *Autodock4.2* y en verde la del *AutodockVina*.

A continuación, los diferentes programas de *docking* molecular se emplearon para determinar cuál es el sitio de unión preferido por los alcaloides estudiados en la enzima *hAChE*. En la primera etapa, se partió de una estructura minimizada del receptor (PDB: 3LII)^[25]; una primera búsqueda se llevó a cabo con una grilla cuyas dimensiones incluían a toda la proteína. Los modos de unión más estables fueron obtenidas en dos regiones: SA y SAP. Posteriormente, con el objetivo de obtener geometrías refinadas se empleó una grilla más pequeña, en la que sólo se incluía la cavidad catalítica. Se utilizó la misma grilla para los tres programas empleados, entre éstos difieren los métodos de búsqueda y las funciones de evaluación. Para simplificar el análisis, las diferencias en la energía de unión entre SA y SAP son representadas en la Figura 3. 5. Las barras vacías ($\Delta\Delta G$ de unión < 0), ilustran una preferencia por el SA y las barras llenas ($\Delta\Delta G$ de unión > 0) por el SAP.

A pesar de las diferencias en las energías de unión absolutas, es importante indicar que las poses de menor energía para cada sitio son similares para los tres programas empleados. Los resultados fueron normalizados por un recálculo de la energía de unión de las estructuras finales empleando métodos

más sofisticados. Para llevar a cabo esto, todos los complejos obtenidos fueron neutralizados con el respectivo contraion, solvatados y minimizados usando los campos de fuerza de amber ff99 y GAFF. Posteriormente, las energías de unión fueron determinadas usando los métodos de MM-GBSA y MM-PBSA, como fue propuesto por Kunh y colaboradores.^[51] Se puede notar que para los inhibidores **2.8**, **3.6** y **3.7** se encontró la unión más estable en el SA. En cambio, para el compuesto **3.5**, las energías son comparables para ambos sitios.

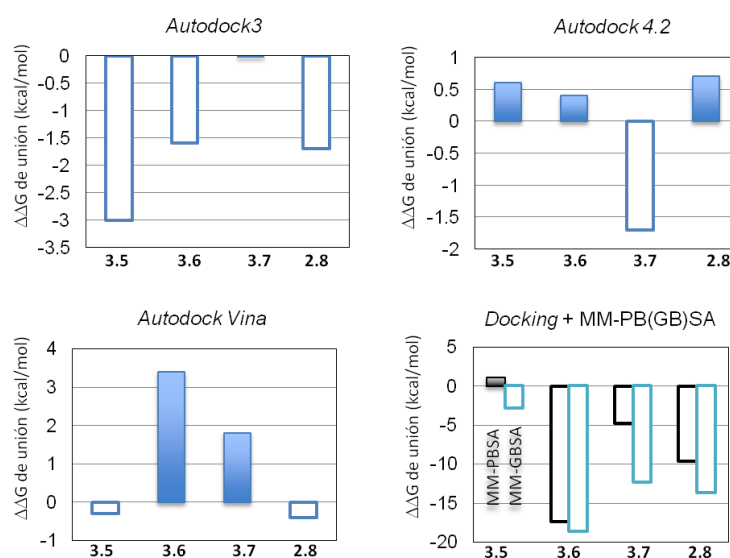


Figura 3. 5. Diferencia en la energía de unión entre SA y SAP para los procedimientos de *docking* empleados. ($\Delta\Delta G$ unión = ΔG de unión SA - ΔG de unión SAP). Barras vacías representa una preferencia por SA y barras llenas preferencia por SAP.

Cuando se comparan las poses encontradas en el SA, puede verse que los alcaloides **3.5** y **3.6** fueron ubicados de manera similar a pesar de que las posiciones de los sustituyentes son distintas. Por otro lado, aunque **3.7** y **2.8** poseen similitudes en la estructura molecular y tamaño, adoptan diferentes geometrías. Mientras que el compuesto **3.7** tiene los anillos C y D sobre el Trp86 con el grupo carbonilo apuntando hacia la entrada de la cavidad, el compuesto **2.8** posee el anillo A y B sobre este aminoácido. Esta última geometría fue similar a la encontrada en la estructura de rayos X del complejo *TcAChE-2.8*.^[52] Un interesante interrogante surgió inspeccionando los diferentes arreglos adoptados por **2.8** y **3.7** en el SA. Cuando **3.7** es ubicado en una conformación similar a la de

2.8, una alta repulsión estérica se hace presente debido a proximidad con los anillos de indol y fenol de los residuos Trp86 y Tyr337, respectivamente. A esta nueva geometría se la puede definir como **3.7b** (geometría de **3.7** alineada con **2.8**), y es mostrada en la Figura A. 1 del Anexo A. Sin embargo, cuando el complejo fue minimizado y determinada la energía de unión, se obtiene un valor de -39,5 kcal/mol (similar a las -38,1 kcal/mol estimadas por el mismo método para la configuración obtenida por *docking*). Basados en estos resultados, la nueva conformación de **3.7** fue también explorada mediante DM y comparada con la obtenida mediante la técnica de *docking* molecular (**3.7a**). Por otro lado, cuando **2.8** fue forzada a adoptar la conformación de **3.7a**, un impedimento estérico entre el metilo alílico del C10 de **2.8** y el grupo hidroxilo del residuo Tyr133 fue observado. Este nuevo complejo posee una energía de unión superior a la obtenida por el complejo alcanzado con *docking* molecular, por lo que fue descartada (-33,4 vs -40,4 kcal/mol respectivamente, después del refinamiento con MM-GBSA). Las dos geometrías son representadas en la Figura A. 2 del Anexo A.

Las energías de unión obtenidas por los distintos métodos no correlacionan con los valores de IC₅₀ (ver Tabla A. 1 del Anexo A). A pesar de que los métodos de MM-GBSA y MM-PBSA mejoraron los resultados, algunas discrepancias se encontraron. Con el afán de alcanzar una mejor correlación, se empleó DM para los complejos entre hAChE y los compuestos **2.8**, **3.5-3.7** en el SA y SAP.

3.4.2 Estudios de dinámica molecular

Con el objetivo de entender detalladamente las interacciones que ocurren en el modo de unión de cada AChI, tanto en el SA como en el SAP, se acudió a la técnica de simulación de DM. Mediante esta técnica se puede obtener una evolución temporal de los complejos pudiendo así comprender la relevancia de las interacciones enzima-inhibidor. Además, se obtuvieron mejores valores de energía de unión fueron obtenidos debido a la posibilidad de colectar una mayor cantidad de configuraciones de cada sistema.

Se llevaron a cabo simulaciones de cada complejo y del receptor sin la presencia de ligando. Los perfiles de RMSD de las simulaciones muestran, como era de esperar, que la presencia de los inhibidores en el SA y en el SAP no genera cambios globales importantes (Figura 3. 6).

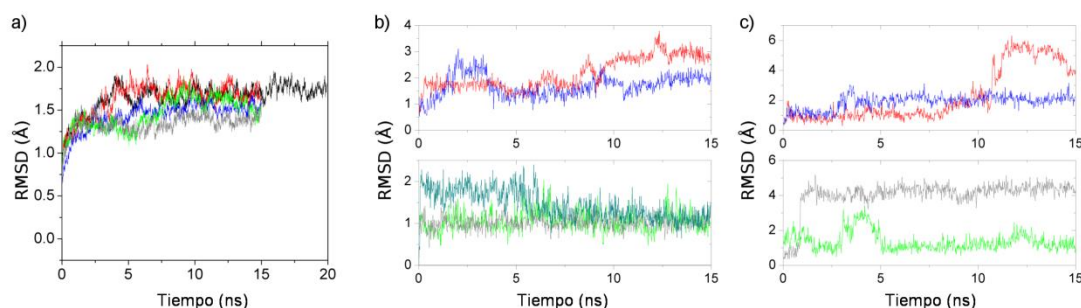


Figura 3. 6. a) Evolución del RMSD del *backbone* de la proteína sólo y con los compuestos 3.5-3.7 y 2.8 en el SA. b) RMSD de los inhibidores dentro del SA, sin considerar los átomos de hidrógeno. c) Evolución de los inhibidores en el SAP, sin considerar los átomos de hidrógenos. *hAChE* (■), *hAChE-3.5* (■), *hAChE-3.6* (■), *hAChE-3.7a* (■), *hAChE-3.7b* (■), *hAChE-2.8* (■).

Como se había reportado previamente, el RMSD global y del *backbone* del receptor se encuentra alrededor de 1,6 y 2 Å, respectivamente.^[53] Los RMSD de los ligandos aumentan cuando éstos se posan en el SAP, esto puede ser una consecuencia de la amplitud de este sitio que permite una mayor movilidad de los inhibidores.

Adicionalmente, se computó la energía de unión para cada complejo en ambos sitios. Ésta fue obtenida empleando los métodos de MM-GBSA y MM-PBSA. Reportes previos muestran que el desempeño de estos métodos puede variar según el sistema.^[54] El modelo de Poisson-Boltzman (PB) es teóricamente más riguroso que el de Born Generalizado (GB), y por ende el primero es considerado superior para el cálculo de energías. Sin embargo, en nuestro sistema los valores obtenidos con el método MM-GBSA se ajustan mejor a los resultados experimentales. Con la intención de simplificar, sólo los datos con este método se muestran en la Tabla 3. 1. Los valores obtenidos con el método MM-PBSA se muestran en la Tabla A. 2 del Anexo A.

Tabla 3. 1. Energías de unión de los complejos obtenidas con el método de MM-GBSA. Dinámica molecular.

Inhibidor	ΔH de Unión (kcal/mol)		ΔG de Unión (kcal/mol)		IC ₅₀ (μ M) ^a
	SA	SAP	SA	SAP	
3.5	-27,3 \pm 3,3	-27,8 \pm 3,2	11,3 \pm 3,3	10,2 \pm 3,2	Inactivo
3.6	-34,2 \pm 2,8	-25,8 \pm 2,4	2,6 \pm 2,8	12,1 \pm 2,4	296,8
3.7	(a) -38,2 \pm 2,5	-25,5 \pm 2,0	3,3 \pm 2,5	16,3 \pm 2,0	32,3
	(b) -41,4 \pm 2,7		0,5 \pm 2,7		
2.8	-47,7 \pm 2,8	-30,2 \pm 2,3	-8,1 \pm 2,8	10,8 \pm 2,3	0,082 ^[55]

^aLos valores fueron determinados con el método de Ellman Modificado

Con MM-GBSA se pudo distinguir exitosamente al mejor inhibidor (**2.8**) del compuesto inactivo (**3.5**). Algo para destacar es que solo se observó que las energías de unión para el SA y SAP eran similares solo para el compuesto **3.5**. Es posible que una de las causas por las cuales este compuesto es inactivo sea la falta de preferencia de unión por el SA. Para el resto de los casos la unión en el SA fue más favorable respecto del SAP. En el caso del compuesto **3.7**, de las dos geometrías exploradas en el SA, **3.7b** (Tabla 3. 1) fue la más favorable para la unión. Se puede notar en la tabla que la mayoría de los valores de ΔG de unión fueron positivos cuando se adicionó el término entrópico, probablemente debido a una sobreestimación de este último. Para esta evaluación se empleó la aproximación entrópica quasi-armónica en vez de la evaluación de los modos normales debido a que éste demanda un mayor costo computacional. Sin embargo, el orden de las energías de unión fue el esperado sobre la base de los resultados experimentales.

3.4.2.1 Análisis de interacciones

Con el objetivo de identificar cuáles son los residuos responsables de la unión de los inhibidores en el SA de la enzima, se llevó a cabo una descomposición de la energía de unión por residuo.^[56] Una descripción detallada de la descomposición se expone en la Figura 3. 7, y las principales interacciones con los residuos del SA se muestran en la Figura 3. 8. El análisis revela que en el SA las interacciones de van der Waals con el indol del Trp86 son las más importantes en

la mayoría de los casos evaluados.

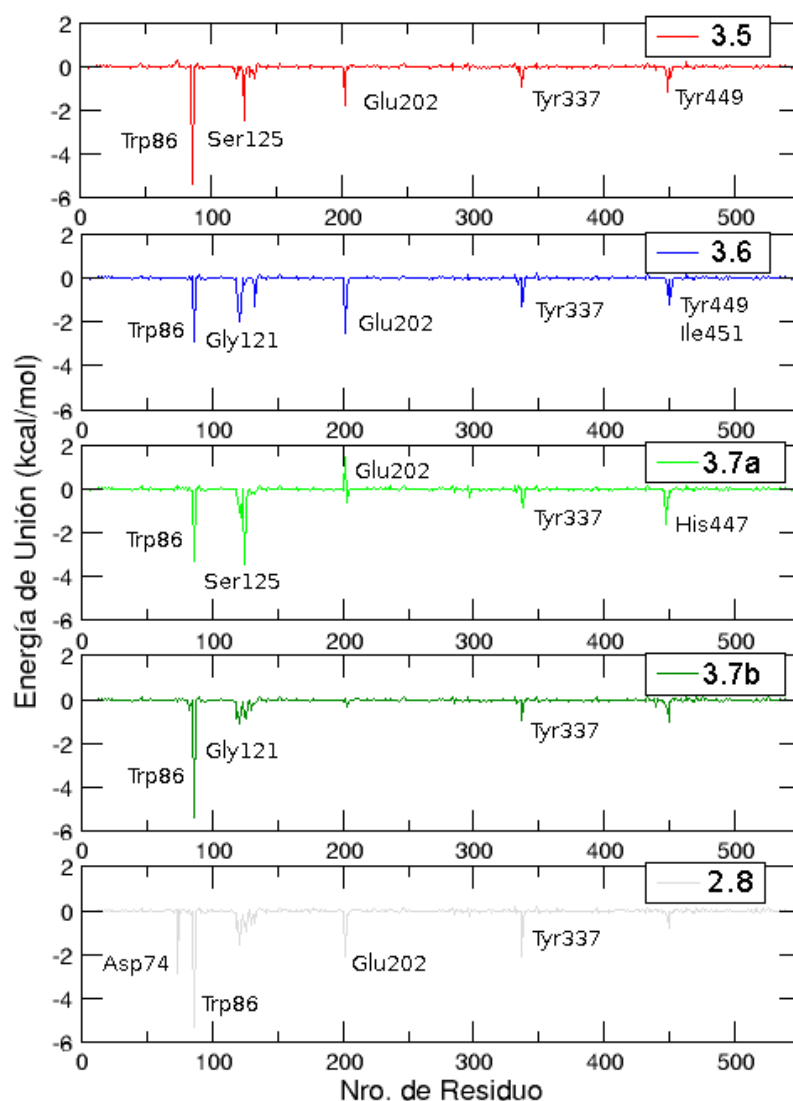


Figura 3. 7. Contribución por residuo a la energía de unión calculada con MM-GBSA a partir de las DMs de los ligandos en el SA.

Para comenzar con un análisis a nivel atómico detallado, podemos notar que el compuesto **3.5** (Figura 3. 1) ubica a los anillos B y D, y al nitrógeno protonado (R_3NH^+) de manera coplanar con el Trp86, estableciendo una interacción del tipo catión- π (Figura 3. 8a). Además, el grupo hidroxilo unido al C7 formó un puente hidrógeno con el grupo carboxilato del Glu202, que persistió durante el 75% de la simulación. A estas interacciones se le sumaron otras estabilizantes del tipo van der Waals con los residuos aromáticos Tyr337 y

Tyr449, sumada a la que se estableció entre la Ser125 y el CH₂ unido a los anillos A y B.

Como se observó para el grupo hidroxilo del C7 en el compuesto **3.5**, el OH en el C6 del compuesto **3.6** también formó puente hidrógeno con el carboxilato del Glu202 a lo largo de la DM (Figura 3. 8b). Este enlace posee una distancia promedio de 1,6 Å, por ende puede considerarse que tendrá un efecto estabilizador más importante que el formado por el compuesto **3.5**. Además, el oxígeno de ese mismo grupo actuó como aceptor de hidrógeno del grupo amina de residuo Gly121. Por otra parte, las interacciones de van der Waals con los residuos Trp86 y Ser125 han mostrado ser importantes. Finalmente, un perfil similar a **3.5** fue observado para las interacciones con Tyr337 y Tyr449.

Varias diferencias pueden ser mencionadas cuando se comparan las geometrías **3.7a** y **b** (Figura 3. 8c, e y f). Para la conformación **3.7a** se observó un puente hidrógeno entre β-NH⁺ y Ser125. Además, el α-NH también formó puente hidrógeno con el grupo hidroxilo de la Ser203. Sin embargo, la interacción con β-NH⁺ fue la más estabilizante debido al carácter positivo de este grupo. Por su lado, **3.7b** no formó puente hidrógeno a través de su grupo β-NH⁺, y la interacción catión-π con el Trp86 se convierte en la más destacada. Otra diferencia importante es la contribución de Glu202; para **3.7a**, no se observó puente hidrógeno con este residuo sino que la interacción aporta una contribución desfavorable a la unión debido a la presencia de un grupo apolar cerca del carboxilato de este residuo. Por el contrario, **3.7b** interacciona mediante un puente hidrógeno con este residuo estabilizando al complejo, aunque la interacción no se presente a lo largo de toda la simulación.

Finalmente, el compuesto **2.8** presentó interacciones de van der Waals con Tyr337 y Trp86. Además, se estableció un puente hidrógeno entre α-NH y el carboxilato del Glu202. A esto se le suma una componente importante debido a un puente salino entre β-NH₃⁺ y el carboxilato del Asp74 (Figura 3. 8d).

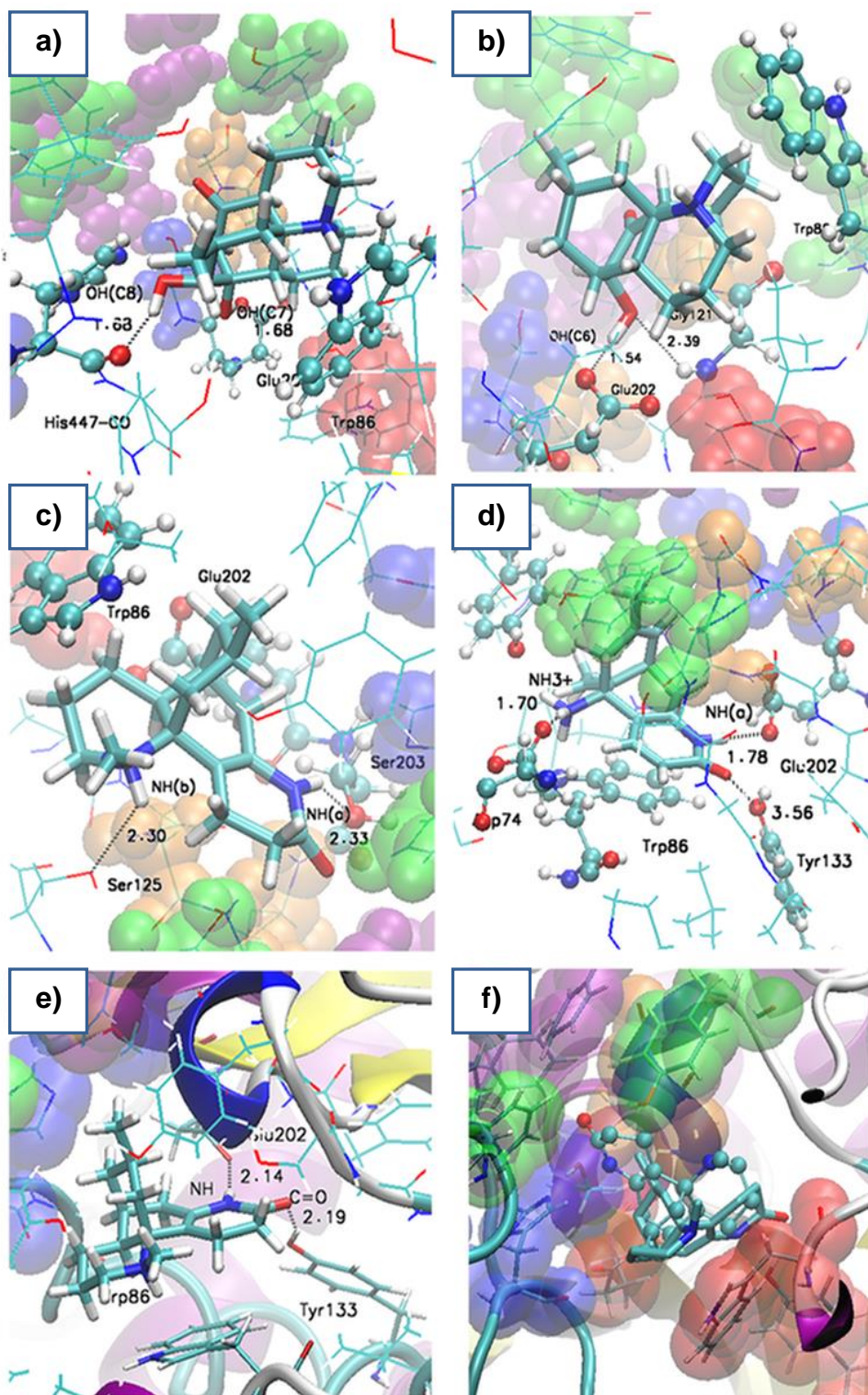


Figura 3. 8. Representación 3D de las geometrías finales obtenidas después de 15 ns de simulación. a) AChE-3.5, b) AChE-3.6, c) AChE-3.7a, d) AChE-2.8, e) AChE-3.7b. f) Comparación de las geometrías 3.7a (bastones y esferas) y 3.7b (bastones).

Este hecho puede ser explicado considerando la topología del SAP y su exposición al solvente. Para todos los inhibidores la interacción más importante en el SAP se da con el Trp286. Se ha encontrado que algunos inhibidores duales y donepezil

interaccionan también con este residuo.^[57]

3.5 Conclusiones

En literatura se ha informado que los alcaloides del *Lycopodium* **3.6** y **3.7** han mostrado ser inhibidores de la enzima AChE mientras que el compuesto **3.5** no presenta actividad. El modo de unión de estos compuestos fue explorado, en primera instancia, mediante *docking* molecular encontrando geometrías de unión similares para cada programa empleado, pero con discrepancias en la energía de unión. Mejores valores de energía fueron alcanzados cuando se lleva a cabo un refinado con los métodos MM-GBSA y MM-PBSA. Este refinamiento permitió discriminar de mejor manera entre los compuestos activos de aquel inactivo; con preferencia de unión por dos sitios bien definidos y característicos de la enzima: SA y SAP.

Posteriormente, simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo para cada complejo derivado de la unión de los compuestos en el SA y SAP. Mediante el método de MM-GBSA se ordenó exitosamente las energías de unión respecto a su actividad experimental. La inactividad que presenta **3.5** podría ser atribuida a que no presenta una preferencia por algunos de los dos sitios explorados en las simulaciones, a diferencia del resto de los compuestos que mostraron una marcada preferencia por el SA de la cavidad catalítica.

Es importante remarcar que sólo se centró en indagar la unión de los inhibidores y que los procesos cinéticos de entrada y salida de la cavidad catalítica pueden jugar un papel importante en la inhibición global. Aunque esto esté más allá del alcance de esta tesis, podría tenerse en cuenta para trabajos futuros.

3.6 Bibliografía

1. Williams, P.; Sorribas, A. y Howes, M.-J.R. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. *Natural Prod Reports*, 2011, **28** (1), p. 48.
2. Houghton, P.J.; Ren, Y. y Howes, M.-J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural product reports*, 2006, **23** (2), p. 181.
3. Konrath, E.L.; Passos, C.d.S.; Klein-Júnior, L.C. y Henriques, A.T. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2013, **65** (12), p. 1701.
4. Hostettmann, K.; Borloz, A.; Urbain, A. y Marston, A. Natural Product Inhibitors of Acetylcholinesterase. *Current Organic Chemistry*, 2006, **10** (8), p. 825.
5. Brühlmann, C.; Marston, A.; Hostettmann, K.; Carrupt, P.-A. y Testa, B. Screening of Non-Alkaloidal Natural Compounds as Acetylcholinesterase Inhibitors. *Chemistry & Biodiversity*, 2004, **1** (6), p. 819.
6. Ma, X. y Gang, D.R. The Lycopodium alkaloids. *Natural Prod Reports*, 2004, **21** (6), p. 752.
7. Tang, X.C.; Han, Y.F.; Chen, X.P. y Zhu, X.D. Effects of huperzine A on learning and the retrieval process of discrimination performance in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 1986, **7**, p. 507.
8. Tang, X.C.; De Sarno, P.; Sugaya, K. y Giacobini, E. Effect of huperzine A, a new cholinesterase inhibitor, on the central cholinergic system of the rat. *Journal of Neuroscience Research*, 1989, **24** (2), p. 276.
9. Ayer, W.A. y Trifonov, L.S. *Lycopodium Alkaloids*. Academic Press. San Diego. **1994**.
10. Skolnick, A.A. Old chinese herbal medicine used for fever yields possible new alzheimer disease therapy. *JAMA*, 1997, **277** (10), p. 776.
11. Liu, J.-S.; Zhu, Y.-L.; Yu, C.-M.; Zhou, Y.-Z.; Han, Y.-Y.; Wu, F.-W. y Qi, B.-F. The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. *Canadian Journal of Chemistry*, 1986, **64** (4), p. 837.
12. Zhang, R.W.; Tang, X.C.; Han, Y.Y.; Sang, G.W.; Zhang, Y.D.; Ma, Y.X.; Zhang, C.L. y Yang, R.M. Drug evaluation of huperzine A in the treatment of senile memory disorders. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 1991, **12** (3), p. 250.
13. Ortega, M.G.; Vallejo, M.G.; Cabrera, J.L.; Pérez, M.F.; Almirón, R.S.; Ramírez, O.A. y Agnese, A.M. Huperzia saururus, activity on synaptic transmission in the hippocampus. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, **104** (3), p. 374.
14. Vallejo, M.G.; Ortega, M.G.; Cabrera, J.L.; Carlini, V.P.; Barioglio, S.R.d. y Agnese, A.M. Huperzia saururus increases memory retention in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, **111** (3), p. 685.

15. Konrath, E.L.; Neves, B.M.; Lunardi, P.S.; Passos, C.d.S.; Simões-Pires, A.; Ortega, M.G.; Gonçalves, C.A.; Cabrera, J.L.; Moreira, J.C.F. y Henriques, A.T. Investigation of the in vitro and ex vivo acetylcholinesterase and antioxidant activities of traditionally used *Lycopodium* species from South America on alkaloid extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, **139** (1), p. 58.
16. Deulofeu, V. y Langhe, J.D. Studies on Argentine Plants. III. Alkaloids from *Lycopodium Saururus*1. *Journal of the American Chemical Society*, 1942, **64** (4), p. 968.
17. Ayer, W.A.; Habgood, T.E.; Deulofeu, V. y Juliani, H.R. *Lycopodium* alkaloids. *Tetrahedron*, 1965, **21** (8), p. 2169.
18. Ortega, M.G.; Agnese, A.M. y Cabrera, J.L. Anticholinesterase activity in an alkaloid extract of *Huperzia saururus*. *Phytomedicine*, 2004, **11** (6), p. 539.
19. Ortega, M.a.G.; Agnese, A.M. y Cabrera, J.L. Sauroine—a novel *Lycopodium* alkaloid from *Huperzia saururus*. *Tetrahedron Letters*, 2004, **45** (38), p. 7003.
20. Halldorsdottir, E.S.; Jaroszewski, J.W. y Olafsdottir, E.S. Acetylcholinesterase inhibitory activity of lycopodane-type alkaloids from the Icelandic *Lycopodium annotinum* ssp. *alpestre*. *Phytochemistry*, 2010, **71** (2–3), p. 149.
21. Morris, G.M.; Goodsell, D.S.; Halliday, R.S.; Huey, R.; Hart, W.E.; Belew, R.K. y Olson, A.J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 1998, **19** (14), p. 1639.
22. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S. y Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 2009, **30** (16), p. 2785.
23. Trott, O. y Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 2010, **31** (2), p. 455.
24. Wang, J.; Cieplak, P. y Kollman, P.A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *Journal of Computational Chemistry*, 2000, **21** (12), p. 1049.
25. Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T.L. y Sussman, J.L. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, **187** (1–3), p. 10.
26. Jacobson, M.P.; Pincus, D.L.; Rapp, C.S.; Day, T.J.F.; Honig, B.; Shaw, D.E. y Friesner, R.A. A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2004, **55** (2), p. 351.
27. Myers, J.; Grothaus, G.; Narayanan, S. y Onufriev, A. A simple clustering algorithm can be accurate enough for use in calculations of pKs in macromolecules. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006, **63** (4), p. 928.

28. Gordon, J.C.; Myers, J.B.; Folta, T.; Shoja, V.; Heath, L.S. y Onufriev, A. H⁺⁺: a server for estimating pK_as and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Research*, 2005, **33** (2), p. 368.
29. Wlodek, S.T.; Clark, T.W.; Scott, L.R. y McCammon, J.A. Molecular Dynamics of Acetylcholinesterase Dimer Complexed with Tacrine. *Journal of the American Chemical Society*, 1997, **119** (40), p. 9513.
30. Wang, J.; Wolf, R.M.; Caldwell, J.W.; Kollman, P.A. y Case, D.A. Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry*, 2004, **25** (9), p. 1157.
31. Cornell, W.D.; Cieplak, P.; Bayly, C.I.; Gould, I.R.; Merz, K.M.; Ferguson, D.M.; Spellmeyer, D.C.; Fox, T.; Caldwell, J.W. y Kollman, P.A. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 1995, **117** (19), p. 5179.
32. Bayly, C.I.; Cieplak, P.; Cornell, W. y Kollman, P.A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *The Journal of Physical Chemistry*, 1993, **97** (40), p. 10269.
33. Cornell, W.D.; Cieplak, P.; Bayly, C.I. y Kollmann, P.A. Application of RESP charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies, and free energies of solvation. *Journal of the American Chemical Society*, 1993, **115** (21), p. 9620.
34. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Montgomery, J.A.; Vreven, T.; Kudin, K.N.; Burant, J.C.; Millam, J.M.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J.E.; Hratchian, H.P.; Cross, J.B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.E.; Yazyev, O.; Austin, A.J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.W.; Ayala, P.Y.; Morokuma, K.; Voth, G.A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Zakrzewski, V.G.; Dapprich, S.; Daniels, A.D.; Strain, M.C.; Farkas, O.; Malick, D.K.; Rabuck, A.D.; Raghavachari, K.; Foresman, J.B.; Ortiz, J.V.; Cui, Q.; Baboul, A.G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B.B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Keith, T.; Laham, A.; Peng, C.Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P.M.W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M.W.; Gonzalez, C. y Pople, J.A. Gaussian 03, Revision C.02.
35. Jorgensen, W.L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J.D.; Impey, R.W. y Klein, M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 1983, **79** (2), p. 926.
36. Phillips, J.C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R.D.; Kalé, L. y Schulten, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 2005, **26** (16), p. 1781.
37. Golosov, A.A. y Karplus, M. Probing Polar Solvation Dynamics in Proteins: A Molecular Dynamics Simulation Analysis. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007, **111** (6), p. 1482.

38. Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G. y Berendsen, H.J.C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, 1977, **23** (3), p. 327.
39. Humphrey, W.; Dalke, A. y Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 1996, **14** (1), p. 33.
40. Roe, D.R. y Cheatham, T.E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2013, **9** (7), p. 3084.
41. Kollman, P.A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W.; Donini, O.; Cieplak, P.; Srinivasan, J.; Case, D.A. y Cheatham, T.E. Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. *Accounts of Chemical Research*, 2000, **33** (12), p. 889.
42. Srinivasan, J.; Cheatham, T.E.; Cieplak, P.; Kollman, P.A. y Case, D.A. Continuum Solvent Studies of the Stability of DNA, RNA, and Phosphoramidate–DNA Helices. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, **120** (37), p. 9401.
43. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres jr, V. y Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 1961, **7** (2), p. 88.
44. Puiatti, M.; Borioni, J.L.; Vallejo, M.G.; Cabrera, J.L.; Agnese, A.M.; Ortega, M.G. y Pierini, A.B. Study of the interaction of Huperzia saururus Lycopodium alkaloids with the acetylcholinesterase enzyme. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2013, **44**, p. 136.
45. Hall, H.K. Correlation of the base strengths of amines¹. *Journal of the American Chemical Society*, 1957, **79** (20), p. 5441.
46. Hext, N.M.; Hansen, J.; Blake, A.J.; Hibbs, D.E.; Hursthouse, M.B.; Shishkin, O.V. y Mascal, M. Azatriquinanes: Synthesis, structure, and reactivity. *The Journal of Organic Chemistry*, 1998, **63** (17), p. 6016.
47. Sastre, S.; Casasnovas, R.; Muñoz, F. y Frau, J. Isodesmic reaction for pK a calculations of common organic molecules. *Theoretical Chemistry Accounts*, 2012, **132** (2), p. 1.
48. Marenich, A.V.; Cramer, C.J. y Truhlar, D.G. Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2009, **113** (18), p. 6378.
49. Hohenberg, P. y Kohn, W. Inhomogeneous electron gas. *Physical Review*, 1964, **136** (3B), p. B864.
50. Dvir, H.; Wong, D.M.; Harel, M.; Barril, X.; Orozco, M.; Luque, F.J.; Muñoz-Torrero, D.; Camps, P.; Rosenberry, T.L.; Silman, I. y Sussman, J.L. 3D Structure of Torpedo californica Acetylcholinesterase Complexed with Huprine X at 2.1 Å Resolution: Kinetic and Molecular Dynamic Correlates. *Biochemistry*, 2002, **41** (9), p. 2970.

51. Kuhn, B.; Gerber, P.; Schulz-Gasch, T. y Stahl, M. Validation and Use of the MM-PBSA Approach for Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, **48** (12), p. 4040.
52. Dvir, H.; Jiang, H.L.; Wong, D.M.; Harel, M.; Chetrit, M.; He, X.C.; Jin, G.Y.; Yu, G.L.; Tang, X.C.; Silman, I.; Bai, D.L. y Sussman, J.L. X-ray Structures of Torpedo californica Acetylcholinesterase Complexed with (+)-Huperzine A and (-)-Huperzine B: Structural Evidence for an Active Site Rearrangement. *Biochemistry*, 2002, **41** (35), p. 10810.
53. Xu, Y.; Colletier, J.-P.; Weik, M.; Jiang, H.; Moulton, J.; Silman, I. y Sussman, J.L. Flexibility of Aromatic Residues in the Active-Site Gorge of Acetylcholinesterase: X-ray versus Molecular Dynamics. *Biophysical Journal*, 2008, **95** (5), p. 2500.
54. Hou, T.; Wang, J.; Li, Y. y Wang, W. Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2011, **51** (1), p. 69.
55. Bai, D.L.; Tang, X.C. y He, X.C. Huperzine A, A Potential Therapeutic Agent for Treatment of Alzheimers Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 2000, **7** (3), p. 355.
56. Gohlke, H.; Kiel, C. y Case, D.A. Insights into Protein–Protein Binding by Binding Free Energy Calculation and Free Energy Decomposition for the Ras–Raf and Ras–RalGDS Complexes. *Journal of Molecular Biology*, 2003, **330** (4), p. 891.
57. Kryger, G.; Silman, I. y Sussman, J.L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept®): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*, 1999, **7** (3), p. 297.

CAPÍTULO 4

DERIVADOS DE SOLANOCAPSINA COMO POTENCIALES INHIBIDORES DE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA: *DOCKING* Y DINÁMICA MOLECULAR

DERIVADOS DE SOLANOCAPSINA COMO POTENCIALES INHIBIDORES DE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA: <i>DOCKING</i> Y DINÁMICA MOLECULAR	103
4.1 Introducción	105
4.2 Objetivos específicos	107
4.3 Métodos.....	109
4.3.1 Información experimental.....	109
4.3.2 <i>Docking</i> molecular	109
4.3.3 Simulaciones de DM.....	110
4.4 Resultados y discusión.....	111
4.4.1 Estudios de <i>docking</i> molecular.....	111
4.4.2 Estudios de dinámica molecular.....	115
4.5 Conclusiones	120
4.6 Bibliografía.....	121

4.1 Introducción

Entre los productos naturales que pueden inhibir a la AChE pueden destacarse los alcaloides.^[1] El hecho de tener nitrógeno en sus estructuras les otorga propiedades ácido-base que pueden ser determinantes en su rol como AChEI.ⁱ En el capítulo anterior, hemos discutido acerca de la capacidad inhibitoria de los alcaloides y, en especial, de aquellos pertenecientes al grupo del *Lycopodium*. Además de éstos, existen reportes de ensayos que demuestran que alcaloides esteroidales y triterpenos también pueden inhibir exitosamente a la enzima AChE.^[2-4]

Alcaloides esteroidales pueden ser encontrados en especies de *Sarcococca*, *Veratrum*, *Fritillaria*, *Buxaceae* y en la familia *Solanum*. En particular, la familia de la *Sarcococca* es conocida como una fuente de esta clase de productos naturales del tipo pregnano. Estos metabolitos poseen sustituciones mono- o dimetilamino en la posiciones C3 y/o C20 del esqueleto esteroidal. Asimismo, se han reportado varios alcaloides de *Sarcococca* con actividad anticolinesterasa, con un rango de IC₅₀ de 0,5-249 µM. En la Figura 4. 1 se muestran algunos de estos compuestos.^[5-7]

ⁱ Se conoce que el sitio activo de la AChE es electronegativo y en general hay una alta preferencia por recibir a compuestos con carga positiva.

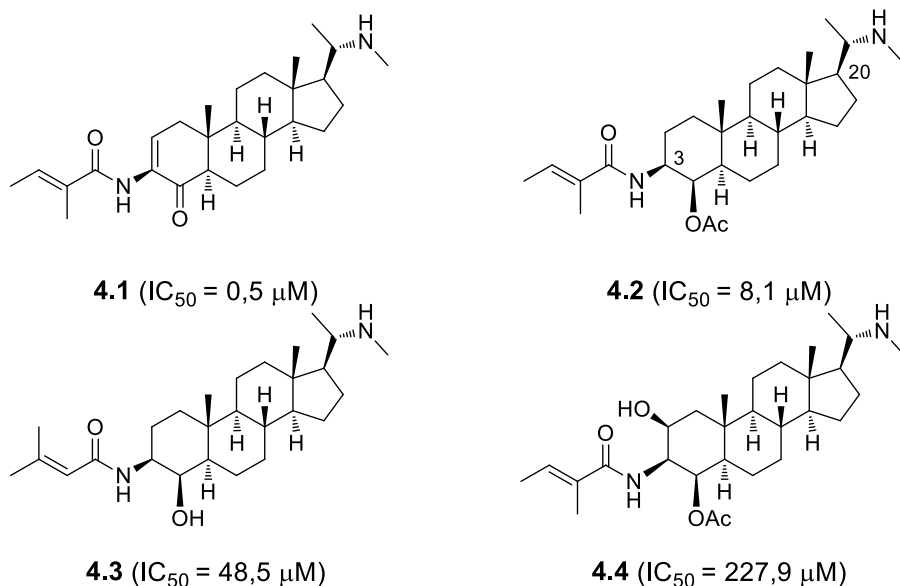


Figura 4. 1. Alcaloides de *Sarcococca*. Valores frente a la enzima *EeAChE*.

En cuanto a la familia de las *Solanum*, se reportó que el extracto etanólico de hoja de algunas especies como *Solanum asperum* y *Solanum nigrum* puede inhibir a la AChE.^[8-10] Recientemente, García y colaboradores han aislado de la especie *Solanum pseudocapsicum* L. el alcaloide esteroidal solanocapsina (**4.5**, Figura 4. 3) e informado una actividad inhibitoria IC_{50} , frente a AChE, de $3,22 \mu M$.^[11] Además, con el objetivo de mejorar la actividad, se han informado derivados de este compuesto obtenidos mediante la modificación de los grupos reactivos (hemiacetal y aminas), y la introducción de nuevos sustituyentes.

Tanto solanocapsina como la mayoría de sus derivados mostraron ser activos, siendo el compuesto híbrido **4.14** el más activo de la serie (Figura 4. 3). Mediante este compuesto se mejoró la actividad dos órdenes de magnitud ($IC_{50} = 90 \text{ nM}$), siendo éste un híbrido entre **4.5** y el conocido inhibidor de AChE tacrina. Además, se informaron estudios cinéticos de inhibición para los compuestos **4.5** y **4.14**, encontrándose que el mecanismo de inhibición que opera es mixto para ambos casos, como se puede ver en los gráficos de Lineweaver–Burk que se muestran en la Figura 4. 2. Esto significa, que cuando se acomplejan con la enzima, se unen simultáneamente al SA y al SAP. En otras palabras, estos pueden ser considerados inhibidores duales de la AChE.

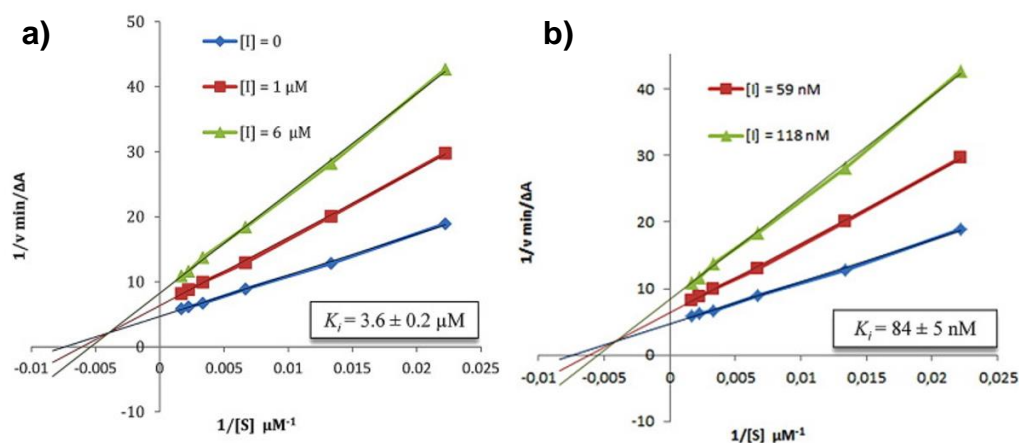


Figura 4. 2. Gráficos de Lineweaver–Burk de la inhibición de *EeAChE* por: a) solanocapsina (4.5) y b) compuesto 4.14.

4.2 Objetivos específicos

Se plantea estudiar, mediante técnicas de simulaciones clásicas (*docking* molecular y dinámica molecular clásica), los complejos formados entre solanocapsina (4.5) y algunos de sus derivados con la enzima AChE, los compuestos seleccionados para el estudio se muestran en la Figura 4. 3.

Concretamente, se propone emplear la técnica *docking* molecular rígido para evaluar cuáles son los posibles modos de unión de cada inhibidor. Para esto, se explorará exhaustivamente la región de la cavidad catalítica. Los resultados colectados en esta etapa nos posibilitarán identificar características generales de cada complejo, buscando corroborar la naturaleza dual de los inhibidores.

Por último, se propone caracterizar dinámicamente a los complejos, obtenidos con *docking*, empleando simulaciones de dinámica molecular clásica. Estas simulaciones servirán a fin de determinar la energía de unión y llevar a cabo una descomposición de la misma por residuo de la proteína. Con los resultados obtenidos se podrá elucidar cuales son los residuos importantes para la unión de cada inhibidor.

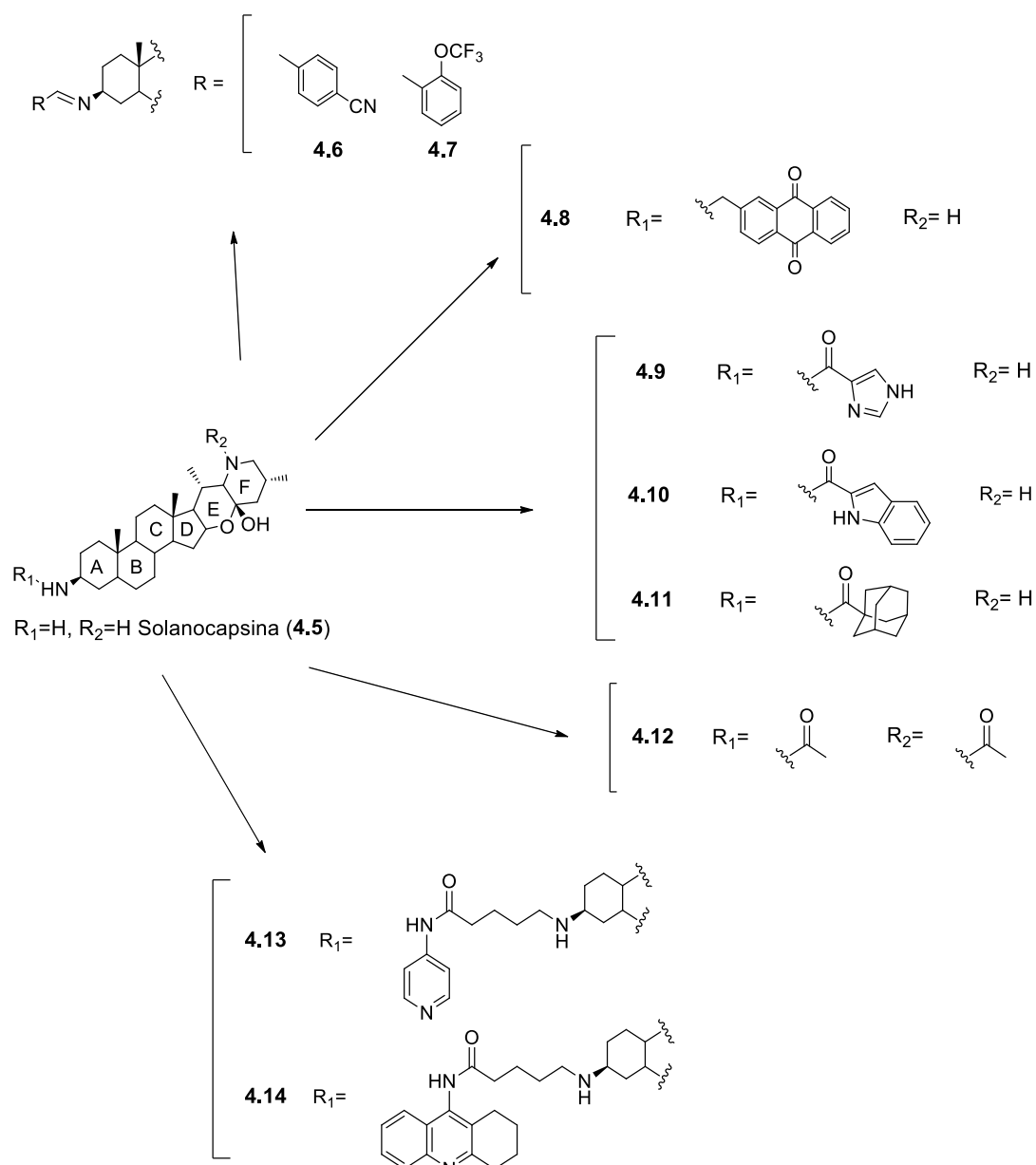


Figura 4. 3. Inhibidores de AChE estudiados.

4.3 Métodos

4.3.1 Información experimental

En el trabajo realizado por García y colaboradores se ha informado la obtención de los alcaloides esteroidales solanocapsina y sus derivados, que se tomaron para llevar a cabo las simulaciones.^[11] La actividad inhibitoria de los compuestos se ha obtenido mediante el método colorimétrico de Ellman con pequeñas modificaciones.^[12] Para estos ensayos se empleó la enzima AChE de *Electrophorus electricus* (EeAChE).

4.3.2 Docking molecular

Los complejos entre los ligandos y la enzima AChE se obtienen mediante *docking* molecular empleando las coordenadas de la enzima TcAChE. Cabe aclarar que los ensayos experimentales se realizaron empleando el receptor EeAChE, pero las estructuras cristalográficas para éste poseen una baja resolución (4.2-4,5 Å).^[13] Debido a la baja resolución del receptor de EeAChE, se empleó el receptor de TcAChE, cuya estructura es muy similar. Como receptor, se emplearon las coordenadas de los complejos TcAChE-donepezil (PDB: 1EVE),^[14] y de dos complejos entre la enzima y dímeros de tacrina (PDB: 2CMF y 2CKM),^[15] removiendo las moléculas de agua.

Antes de empezar la simulaciones de *docking*, se calcularon los valores de pK_a de los compuestos empleando el programa *MarvinSketch* v.5.12.4, y se seleccionaron las especies más abundantes a un pH de 7,4.^[16] Además, se prepararon los receptores usando *Make Receptor*, incluido en el paquete de programas *OpenEye*, en combinación con un algoritmo de detección de cavidades. Para cada receptor se construyó una grilla que incluía a toda la cavidad catalítica

de 43281 Å³, 39813 Å³ y 49527 Å³, para 1EVE, 2CMF y 2CKM, respectivamente. Para el estudio de este sistema se empleó la técnica de *docking* rígido. En el primer paso se realizó una búsqueda conformacional para cada ligando empleando el programa *Omega2 v.5.12.4* con un umbral de energía de 10 kcal/mol.^[17] Posteriormente, los cálculos de *docking* se realizaron con el programa *Fred v.3.0.1*, empleando la función de evaluación *ChemmgauSS4*.^[18, 19] La visualización de los resultados se llevó a cabo empleando los programas *Vida v.4.2.1* y *vmd v.1.9*.^[20]

Para cada complejo se recalculó la energía de unión empleando geometrías minimizadas, según el procedimiento que se describe a continuación. La construcción de cada unidad de ligando fue realizada con el módulo de *antechamber*, usando el campo de fuerza GAFF y cargas del tipo AM1-BCC. Por su parte, a los átomos del receptor se le asignaron las cargas del campo de fuerza ff99SB.^[21] Los archivos de entrada fueron construidos con el programa *xleap* incluido en el paquete *Ambertools*. Posteriormente, se minimizó, en solvente implícito, cada complejo en dos etapas de 5000 pasos empleando el programa *Sander*. La primera restringiendo el movimiento de los átomos pesados del sistema enzima-ligando y la segunda con todo el sistema libre. Después de la etapas de minimización, se computaron las energías de unión empleando los modelos de *molecular mechanic-Poisson-Boltzmann surface area* (MM-PBSA) y el *molecular mechanic-Generalized Born surface area* (MM-GBSA).^[22, 23]

4.3.3 Simulaciones de DM

El procedimiento que se empleó para llevar a cabo las simulaciones de DM es el mismo al descrito en la sección 3.3.3 del capítulo anterior. La única diferencia es que se empleó una versión más reciente del programa para correr la simulaciones (*NAMD v.29*).^[24]

Para este sistema, los tiempos de simulación van desde 20 a 30 ns dependiendo del complejo.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Estudios de *docking* molecular

En primera instancia se realizaron simulaciones de *docking* molecular para obtener los complejos enzima-inhibidor y de esta manera comenzar a explorar cuales son los posibles modos de unión de los compuestos mencionados anteriormente. Se determinaron los valores de pK_b con el programa *MarvinSketch* de los compuestos evaluados como se muestran en la Figura 4. 4. A partir de los valores determinados se seleccionaron los estados de protonación de los distintos compuestos estudiados.

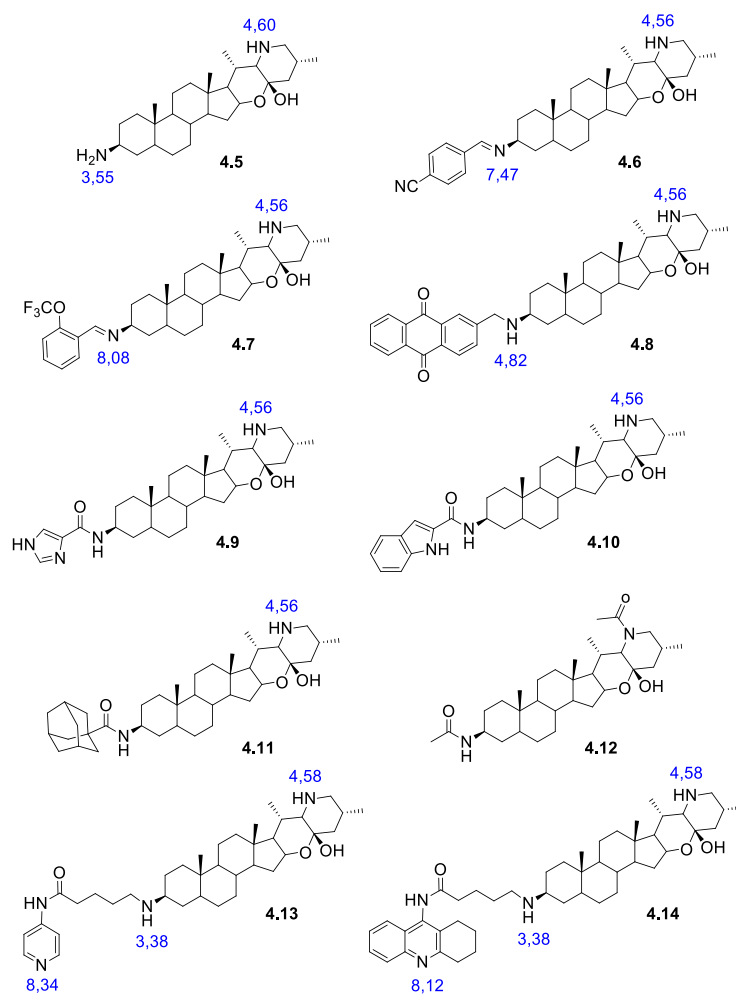


Figura 4. 4. Valores de pK_b para los inhibidores estudiados.

Por otro lado, con el propósito de validar el protocolo de *docking* molecular se simularon los complejos de *TcAChE* con donepezil y dos derivados de tacrina. Cada uno de los complejos obtenidos fue comparado con su análogo experimental (PDB: 1EVE, 1UT6 y 2CMF).^[14, 15] En estas simulaciones, se obtuvieron buenas geometrías para el donepezil (Figura 4. 5a) y para los fragmentos de tacrina en cada uno de sus derivados (Figura 4. 5b y c). Las geometrías obtenidas fueron cercanas a las experimentales con valores bajos de RMSD, indicando que el protocolo empleado es correcto.

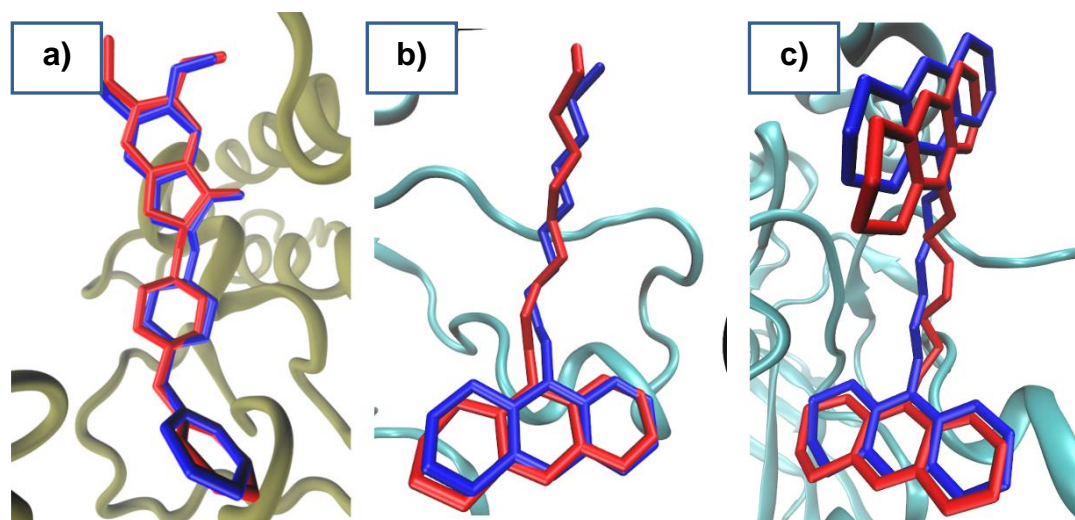


Figura 4. 5. Comparación entre la estructura experimental (rojo) y la encontrada por *docking* (azul). (a) complejo *TcAChE*-donepezil (1EVE). (b) complejo *TcAChE*-tacrina-1,8-diamina-octano (1UT6). (c) complejo *TcAChE*-dímero-bistracrina (2CMF).

Para la obtención de los complejos formados por los alcaloides esteroidales, se emplearon tres geometrías del receptor de *Torpedo californica* (PDB: 1EVE, 2CMF y 2CKM). Cuando se comparan las cristalografías de rayos X se puede notar que los residuos Phe330 y Trp279 adoptan diferentes conformaciones dentro de la cavidad catalítica (Figura 4. 6). Se puede ver que la cadena lateral de Phe330 actúa como una “puerta” que modula el ingreso al SA de la enzima. En el caso particular del complejo *TcAChE*-donepezil (PDB: 1EVE) la “puerta” se encuentra abierta. En cambio, para complejos con derivados de bis-tacrina (PDB: 2CMF y 2CKM) la puerta se encuentra cerrada dejando un espacio más pequeño para que se acomode la cadena carbonada que cumple el rol de espaciador que une a los

fragmentos de tacrina. Por otro lado, con respecto a la posición de la cadena lateral del Trp279, se pueden encontrar dos conformaciones diferentes. En los complejos formados con donepezil y con el derivado de bis-tacrina que posee el espaciador con 5 grupos metilenos, este aminoácido adopta la misma conformación. Pero cuando el espaciador posee 7 grupos metilenos el aminoácido adopta una conformación diferente a la mostrada en los complejos mencionados (Figura 4. 6).

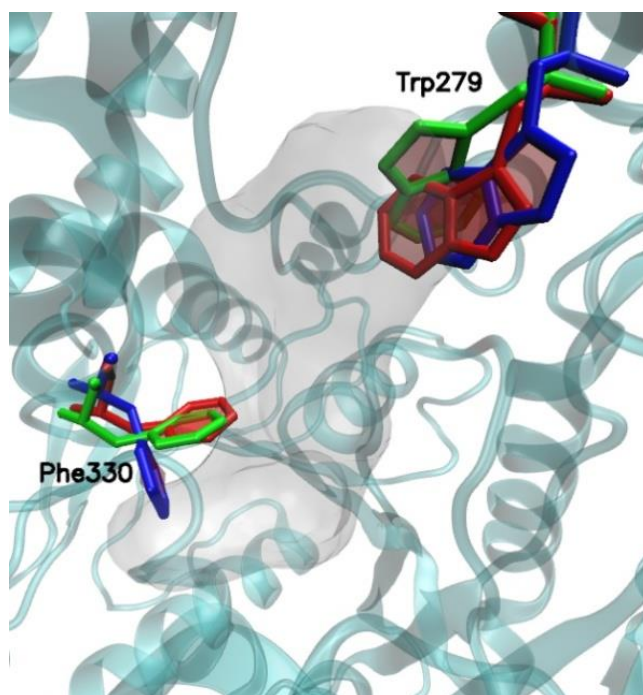


Figura 4. 6. Diferencia en las conformaciones de la cadena lateral de Phe330 y Trp279 de los receptores empleados. En azul 1EVE, rojo 2CMF y verde 2CKM.

Luego, se realizó un refinado de la energía de unión para los 10 complejos más favorables, obtenidos en el *docking* molecular, de cada inhibidor estudiado. Para esto, se minimizó cada complejo y se determinó la energía de unión empleando el método MM-GBSA. Para cada inhibidor se seleccionó el complejo más estable (del refinado) para analizar el modo de unión con la enzima. Los valores de energía se presentan en la Tabla 4. 1. Se puede notar que para los compuestos 4.5-4.12 los complejos más estables se obtienen con el receptor 1EVE, mientras que para 4.13 y 4.14 aquellos más estables se obtienen con el receptor 2CMF.

Tabla 4. 1. Energía de unión (kcal/mol) para cada complejo determinada con el método MM-GBSA a partir de simulaciones de *docking*.

Inhibidor	Energía de unión 1EVE	Energía de unión 2CMF	Energía de unión 2CKM	IC ₅₀ (μ M)
4.5	-47,34	-42,73	-39,54	3,22
4.6	-52,67	-50,12	-43,86	7,15
4.7	-51,15	-45,43	-44,16	8,10
4.8	-55,70	-51,73	-52,68	7,70
4.9	-45,06	-36,33	-35,96	16,18
4.10	-50,09	-43,59	-43,41	33,89
4.11	-55,45	-52,27	-51,64	58,90
4.12	-44,74	-42,33	-43,12	>100
4.13	-52,61	-53,58	-51,64	7,47
4.14	-57,37	-60,15	-58,48	0,09

Cuando se analizan los modos de unión para cada compuesto, se puede notar que existen dos modos principales (**A** y **B**), una descripción gráfica se muestra en la Figura 4. 7. Cuando un inhibidor ingresa a la cavidad de acuerdo al **Modo A**, el sustituyente unido al anillo A es posicionado en el SA. Mientras que si lo hace a través del **Modo B**, el anillo F es posicionado en el SA. Para los compuestos **4.5**, **4.13** y **4.14** se encontró que el modo más estable es el **A** y para los compuestos **4.6-4.12** el **Modo B**. En todos los casos el inhibidor ocupa el SA y el SAP simultáneamente, esto se encuentra en acuerdo con lo observado en los estudios cinéticos que determinaron que el mecanismo de inhibición es mixto. Existen antecedentes de otros compuestos estrooidales que presentan un mecanismo de inhibición no competitivo, uniéndose al SAP.^[25]

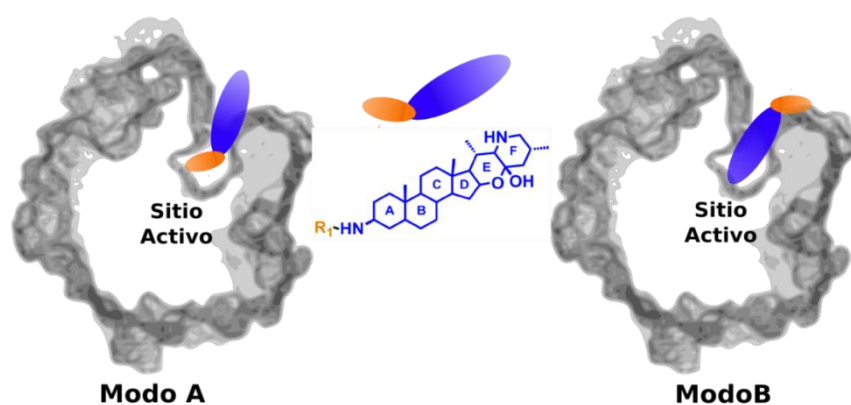


Figura 4. 7. Modos de unión encontrados.

Para obtener información acerca de la dinámica de las interacciones establecidas entre la enzima y cada uno de los inhibidores se llevaron a cabo simulaciones de DM.

4.4.2 Estudios de dinámica molecular

Para cada complejo se seleccionó la geometría de menor energía. En los casos en que la diferencia de energía fue menor a 2 kcal/mol se evaluaron las dos conformaciones más estables. El análisis se realizó sobre la simulación que presentó menor energía de unión después de la DM.

Se analizó el RMSD de la proteína para cada complejo, y en todos los casos se alcanzó un plató en la última etapa de la simulación (últimos 5 ns aproximadamente).

Con el objetivo de identificar qué residuo contribuye a la estabilidad de cada complejo, se llevó a cabo una descomposición de la energía de unión por residuo. La descomposición es ilustrada en la Figura 4. 8 para cada complejo. Un detalle de las interacciones de las geometrías representativas se muestra en la Figura 4. 9.

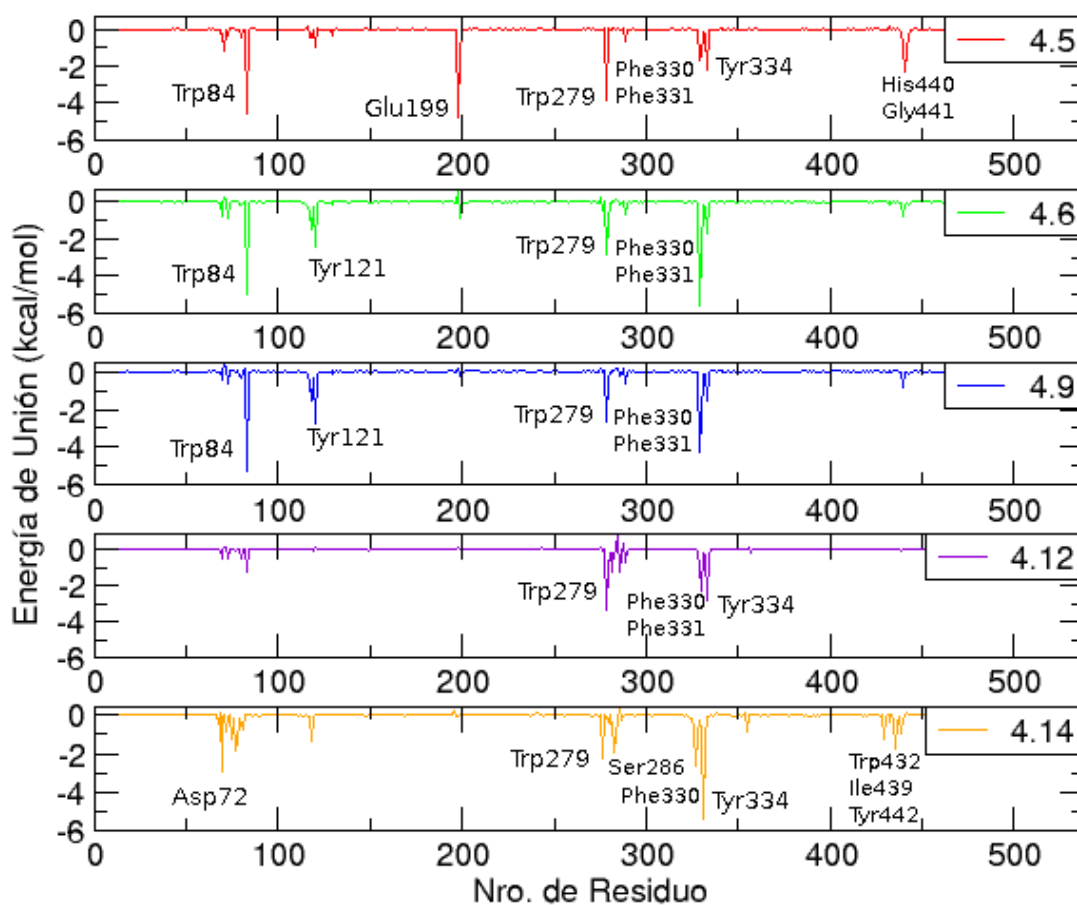


Figura 4. 8. Contribución por residuo a la energía de unión para las DMs.

Si analizamos la DM del núcleo solanocapsina (4.5) podemos notar que este se adaptó bien a la cavidad catalítica, entrando a la misma a través del **Modo A** (Figura 4. 9a). La simulación reveló que en el SA, la amina primaria protonada ($R-NH_3^+$) formó un puente salino con el carboxilato del residuo Glu199 durante el 85 % de la dinámica con una distancia promedio de 2.80 Å y, además, se suma una interacción catión- π con el Trp84. También, el grupo ($R-NH_3^+$) interactuó por medio de un puente hidrógeno con el oxígeno de los grupos C=O del *backbone* de Gly441 y His440. Además, el inhibidor mostró interacciones favorables del tipo van der Waals con los residuos aromáticos Phe330, Phe331 ubicados en la zona intermedia entre el SA y SAP, y con Tyr334 perteneciente al SAP. Por otra parte, una importante interacción de la misma naturaleza se observó entre el anillo F y el Trp279 perteneciente al SAP. Este análisis mostró que el inhibidor 4.5 puede interactuar con residuos

distribuidos a lo largo de toda la cavidad catalítica.

En el caso del compuesto **4.6**, a diferencia de **4.5**, se acomodó en la cavidad catalítica de acuerdo al **Modo B** (Figura 4. 9b), posicionando en el SA la carga positiva del grupo amino secundario perteneciente al anillo F. Si se analizan las interacciones en profundidad, es posible observar que las más importantes son del tipo catión- π entre la amina secundaria protonada del anillo F y los residuos Trp84 y Phe330. También, las interacciones de van der Waals con Tyr121 y Phe331 de la zona del cuello de botella fueron remarcables. Además, se encontró una interacción de la misma naturaleza con el Trp279 perteneciente al SAP. Por otro lado, se observó que los perfiles de interacciones encontrados para los compuestos **4.7** y **4.8** son similares al descrito para **4.6**.

Para el compuesto **4.9**, se observó un perfil de interacciones similar al descrito para el compuesto **4.6** (Figura 4. 8 y Figura 4. 9c). En comparación, el compuesto **4.10**, con una menor actividad inhibitoria, mostró una considerable disminución en las interacciones relacionadas con Trp121, Phe330 y Trp279. Por otra parte, para el compuesto **4.11**, aún menos activo que los dos anteriores, pudo verse una marcada disminución en las interacciones con los residuos Trp84 y Phe330. Tal vez, en ambos casos, la disminución en las interacciones con los residuos mencionados, respecto a **4.9**, se vea reflejada en una disminución de actividad experimental. Es conveniente recordar que estos tres compuestos se acomodaron en la cavidad de acuerdo al modo de unión **B**.

El compuesto **4.12** es inactivo y se acomodó a la cavidad de acuerdo al **Modo B** (Figura 4. 9d). Este compuesto presentó interacciones de van der Waals con Phe330, Phe331, Tyr334 y Trp279. Adicionalmente, pudo verse una interacción débil de la misma naturaleza con el Trp84, la interacción con este residuo mostró ser muy importante para la inhibición de los compuestos anteriores, por ende, la falta de esta, sumada a una disminución en las interacciones en términos generales, puede ser la razón por la cual este compuesto sea inactivo.

Los compuestos **4.13** y **4.14** se posicionan en la cavidad de acuerdo al **Modo A**. En el caso del inhibidor **4.14**, el compuesto más activo de la serie, el fragmento de tacrina se desplazó de la posición inicial en los primeros tiempos de la

dinámica. Inicialmente, este fragmento estaba intercalado entre los residuos de Trp84 y Phe330 y a lo largo de la dinámica se alejó del Trp84 para interactuar con Trp432, Ile439 y Tyr442 (Figura 4. 9e). Además, el grupo amino secundario unido al anillo A formó un puente hidrógeno con el oxígeno del grupo hidroxilo del residuo Tyr334. Este grupo amino también interactuó mediante puente salino con el carboxilato del Asp72. Por otra parte, los anillos A y B del núcleo de solanocapsina presentaron interacciones de van der Waals con los residuos Phe330 y Trp279. Por último, el grupo -OH, unido los anillos F y E, formó un puente hidrógeno con el oxígeno del grupo hidroxilo de la Ser286. Por su parte, **4.13**, en comparación a **4.14**, mostró la ausencia de las interacciones no polares con Trp432, Ile439 y Tyr442 y el puente hidrógeno con Ser286. Posiblemente, estas sean las razones por la cual este compuesto sea menos activo.

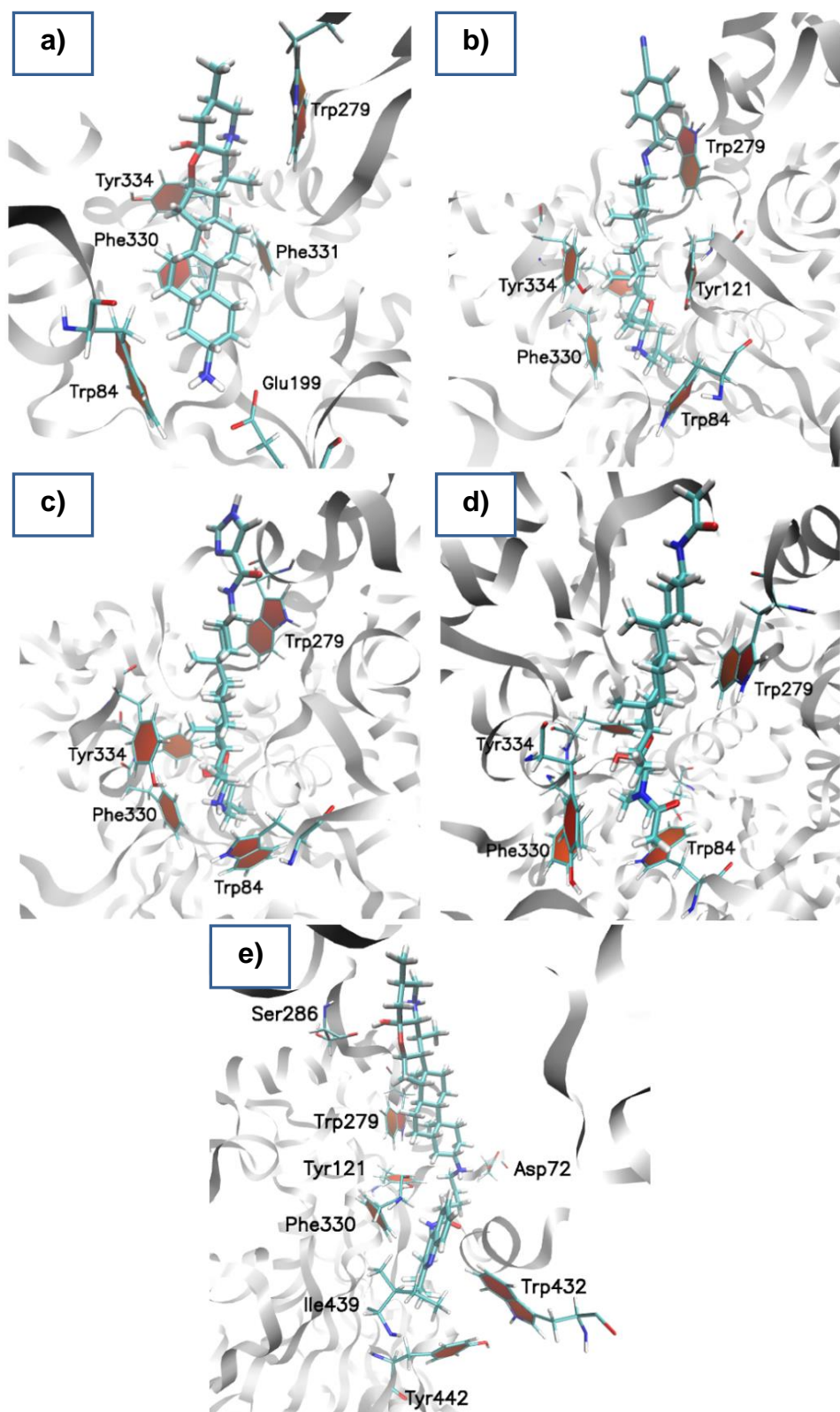


Figura 4. 9. Representación en 3D de las geometrías finales de las simulaciones. Para los complejos (a) AChE-4.5, (b) AChE-4.6, (c) AChE-4.9, (d) AChE-4.12, (e) AChE-4.14.

En resumen, se pudo observar que todos los compuestos estudiados se pueden unir simultáneamente en el SA y SAP, esto corrobora que los inhibidores pueden presentar naturaleza dual. Además, como se mencionó anteriormente, las interacciones de catión- π y van der Waals con residuos distribuidos en la cavidad catalítica son importantes en la estabilización de la mayoría de los compuestos estudiados. En términos generales, como residuos destacados para la unión de solanocapsina y sus derivados (4.5-4.12) podemos mencionar a Trp84 perteneciente al SA, Phe330 de la zona del cuello de botella y el Trp279 del SAP. Una disminución en las interacciones con alguno de estos residuos se refleja en una baja en la potencia inhibitoria, como sucede en los compuestos 4.10-4.12. Por otra parte, para los compuestos 4.13 y 4.14 las interacciones más importantes se observaron con los residuos Ser286, y Asp72 y Tyr334 pertenecientes al SAP.

4.5 Conclusiones

En resumen, se estudiaron las interacciones globales de solanocapsina y sus derivados con la enzima. Mediante la técnica de *docking* molecular, con posterior refinamiento de energía de unión se determinó cual es el modo de unión para cada inhibidor, encontrándose principalmente dos (**Modo A y B**). Como tendencia general, para ambos modos, podemos notar que los inhibidores se acomodan de tal manera de ubicar la carga positiva en la cavidad catalítica de la enzima.

La evolución de los diferentes complejos fue analizada empleando DM, pudiendo identificar las interacciones más importantes entre los inhibidores y AChE. Estas observaciones contribuyeron al entendimiento de la unión de cada inhibidor. Se pueden destacar que para solanocapsina y sus derivados (4.5-4.12) las interacciones del tipo catión- π con los residuos Trp84 y Phe330, y las de van der Waals con Phe331 y Trp279 mostraron ser importantes para la actividad. Por otra parte, los compuestos híbridos (4.13-4.14) mostraron otro perfil de interacciones. En estos casos, las interacciones destacadas son las de puente salino con Asp72 y puente hidrógeno con Tyr334 y Ser286.

4.6 Bibliografía

1. Konrath, E.L.; Passos, C.d.S.; Klein-Júnior, L.C. y Henriques, A.T. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2013, **65** (12), p. 1701.
2. Mukherjee, P.K.; Kumar, V.; Mal, M. y Houghton, P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 2007, **14** (4), p. 289.
3. Rouleau, J.; Iorga, B.I. y Guillou, C. New potent human acetylcholinesterase inhibitors in the tetracyclic triterpene series with inhibitory potency on amyloid β aggregation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, **46** (6), p. 2193.
4. Richmond, V.; Murray, A.P. y Maier, M.S. Synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity of polyhydroxylated sulfated steroids: Structure/activity studies. *Steroids*, 2013, **78** (11), p. 1141.
5. Choudhary, M.I.; Devkota, K.P.; Nawaz, S.A.; Shaheen, F. y Atta ur, R. Cholinesterase-Inhibiting New Steroidal Alkaloids from *Sarcococca hookeriana* of Nepalese Origin. *Helvetica Chimica Acta*, 2004, **87** (5), p. 1099.
6. Devkota, K.P.; Lenta, B.N.; Wansi, J.D.; Choudhary, M.I.; Kisangau, D.P.; Naz, Q.; Samreen y Sewald, N. Bioactive 5α -Pregnane-Type Steroidal Alkaloids from *Sarcococca hookeriana*. *Journal of Natural Products*, 2008, **71** (8), p. 1481.
7. Zaheer ul, h.; Wellenzohn, B.; Liedl, K.R. y Rode, B.M. Molecular Docking Studies of Natural Cholinesterase-Inhibiting Steroidal Alkaloids from *Sarcococca saligna*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2003, **46** (23), p. 5087.
8. Gupta, A. y Gupta, R. A survey of plants for presence of cholinesterase activity. *Phytochemistry*, 1997, **46** (5), p. 827.
9. Trevisan, M.T.S.; Macedo, F.V.V.; Meent, M.v.d.; Rhee, I.K. y Verpoorte, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Química Nova*, 2003, **26**, p. 301.
10. Khorshid, M.A.; Hassan, A.M.F.; El-Gawad, A.M.M.A. y Enab, A.K. Effect of some Plants and Pesticides on Acetylcholinesterase. *American Journal of Food Technology*, 2015, **10**, p. 93.
11. García, M.E.; Borioni, J.L.; Cavallaro, V.; Puiatti, M.; Pierini, A.B.; Murray, A.P. y Peñéñory, A.B. Solanocapsine derivatives as potential inhibitors of acetylcholinesterase: Synthesis, molecular docking and biological studies. *Steroids*, 2015, **104**, p. 95.
12. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres jr, V. y Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 1961, **7** (2), p. 88.

13. Bourne, Y.; Grassi, J.; Bougis, P.E. y Marchot, P. Conformational Flexibility of the Acetylcholinesterase Tetramer Suggested by X-ray Crystallography. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274** (43), p. 30370.
14. Kryger, G.; Silman, I. y Sussman, J.L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept®): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*, 1999, **7** (3), p. 297.
15. Rydberg, E.H.; Brumshtein, B.; Greenblatt, H.M.; Wong, D.M.; Shaya, D.; Williams, L.D.; Carlier, P.R.; Pang, Y.-P.; Silman, I. y Sussman, J.L. Complexes of Alkylene-Linked Tacrine Dimers with *Torpedo californica* Acetylcholinesterase: Binding of Bis(5)-tacrine Produces a Dramatic Rearrangement in the Active-Site Gorge. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, **49** (18), p. 5491.
16. Szegezdi, J. y Csizmadia, F. *American Chemical Society Spring Meeting*, 2007.
17. Boström, J.; Greenwood, J.R. y Gottfries, J. Assessing the performance of OMEGA with respect to retrieving bioactive conformations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2003, **21** (5), p. 449.
18. McGann, M.R.; Almond, H.R.; Nicholls, A.; Grant, J.A. y Brown, F.K. Gaussian docking functions. *Biopolymers*, 2003, **68** (1), p. 76.
19. McGaughey, G.B.; Sheridan, R.P.; Bayly, C.I.; Culberson, J.C.; Kretsoulas, C.; Lindsley, S.; Maiorov, V.; Truchon, J.-F. y Cornell, W.D. Comparison of Topological, Shape, and Docking Methods in Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2007, **47** (4), p. 1504.
20. Humphrey, W.; Dalke, A. y Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 1996, **14** (1), p. 33.
21. Hornak, V.; Abel, R.; Okur, A.; Strockbine, B.; Roitberg, A. y Simmerling, C. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006, **65** (3), p. 712.
22. Kollman, P.A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W.; Donini, O.; Cieplak, P.; Srinivasan, J.; Case, D.A. y Cheatham, T.E. Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. *Accounts of Chemical Research*, 2000, **33** (12), p. 889.
23. Srinivasan, J.; Cheatham, T.E.; Cieplak, P.; Kollman, P.A. y Case, D.A. Continuum Solvent Studies of the Stability of DNA, RNA, and Phosphoramidate–DNA Helices. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, **120** (37), p. 9401.
24. Phillips, J.C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R.D.; Kalé, L. y Schulten, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 2005, **26** (16), p. 1781.
25. Richmond, V.; Santos, G.A.G.; Murray, A.P. y Maier, M.S. Synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity of 2 β ,3 α -disulfoxy-5 α -cholestan-6-one. *Steroids*, 2011, **76** (10–11), p. 1160.

CAPÍTULO 5

MODELO LINEAL DE PREDICCIÓN DE INHIBIDORES DUALES DE AChE

MODELO LINEAL DE PREDICCIÓN DE INHIBIDORES DUALES DE AChE	123
5.1 Introducción	125
5.2 Objetivos específicos	128
5.3 Métodos.....	129
5.4 Resultados y discusión.....	129
5.4.1 Construcción del conjunto de entrenamiento.....	129
5.4.2 Alcaloides esteroidales.....	131
5.4.3 Inhibidores híbridos.....	134
5.5 Conclusiones	141
5.6 Bibliografía.....	143

5.1 Introducción

Los descubrimientos accidentales o inesperados han tenido siempre un importante rol en la ciencia y en especial en el desarrollo de fármacos. En un principio, las sustancias con propiedades farmacológicas, principalmente de origen vegetal, fueron descubiertas como resultado de la casualidad o de manera accidental. Estas propiedades conducían a observaciones y acciones de seguimiento para producir la aceptación de estas sustancias como medicamentos.

En muchos casos, un principio activo puede surgir del uso de un potencial fármaco, esperando un efecto determinado y encontrando otro completamente diferente. También, puede encontrarse como efecto secundario de un medicamento especificado para un tratamiento. Un ejemplo, relacionado a la EA, es el alcaloide natural fisostigmina. Este carbamato fue empleado en los años '70 para tratar el glaucoma y se encontró que podía inhibir a la AChE.^[1, 2] Otro caso que puede mencionarse es el bexaroteno (Targretin®) que fue aprobado por la FDA en 1999 para tratar el cáncer de piel; años después se encontró que puede reducir los agregados β -amiloides en pruebas con cerebros de ratones.^[3]

La contracara del descubrimiento accidental de fármacos es el diseño racional. Este concepto, en las últimas décadas, se ha instalado en la discusión de los químicos farmacéuticos. En el diseño racional se emplean conocimientos de modelado molecular, estadística, biología molecular, biofísica, química medicinal, farmacocinética y farmacodinamia para gestionar descubrimientos empíricos. De esta manera, la síntesis de nuevas drogas y los desarrollos terapéuticos han pasado del plano de lo casual o accidental a lo racional.

En relación al diseño de principios activos para tratar la EA, el conocimiento de la estructura tridimensional del receptor AChE ha proporcionado información muy importante. Como se ha mencionado anteriormente en esta tesis (capítulo 2, sección 2.2.1), el conocimiento de la estructura de rayos X proporcionó información necesaria para discriminar regiones importantes de la cavidad catalítica y entender la eficiencia de la enzima. Además, la cristalografía de los complejos entre la enzima e inhibidores de distinta naturaleza brindaron información acerca de la manera en la que se

adapta la cavidad.^[4-7] Esta información fue y es fundamental para llevar a cabo estudios de relación estructura-actividad (SAR, de las siglas en inglés *Structure-Activity Relationship*) de inhibidores, y de esta manera proponer nuevos candidatos para desarrollar terapias más eficientes.

En el diseño racional, el uso de métodos *in silico* se ha traducido en grandes avances en el descubrimiento de nuevos fármacos. Uno de los métodos más utilizados es el de *docking* molecular. Esta técnica tiene como objetivo predecir la estructura de un compuesto dentro de los límites de un sitio de unión perteneciente al receptor. Además, mediante el empleo de funciones matemáticas puede estimar la energía de unión.^[8, 9] Particularmente, se han informado muchos trabajos de *docking* sobre la enzima AChE.^[10, 11]

En 1993, Sussman y colaboradores han informado el modo de unión del sustrato natural de la enzima (ACh), encontrando que el nitrógeno cuaternario establece una interacción catión- π con el Trp84 del subsitio aniónico.^[12] Posterior a este trabajo, se han informado estudios de *docking* molecular donde se caracterizan complejos formados entre AChE y una gran variedad de inhibidores.^[13] En muchos de estos trabajos se tiene en cuenta la conformación que puede adoptar la cadena lateral del residuo Phe330 que pertenece a la región del cuello de botella. Esto se puede lograr empleando como receptor distintas estructuras de rayos X que posean distintos arreglos para la cadena lateral de Phe330.^[14]

También, la técnica de *docking* molecular es muy empleada en la estrategia de búsqueda virtual (VS, *Virtual Screening*), para identificar potenciales fármacos de una base de datos.^[15, 16] Mediante la aplicación de la VS, en una amplia base de datos de molécula orgánicas, se puede reducir la magnitud y complejidad de un problema seleccionado. El objetivo es reducir el número de moléculas que pueden tener implicancias farmacológicas. Madura y colaboradores han informado un efectivo protocolo de *docking* molecular para aplicar VS sobre AChE. Para ello, evaluaron diferentes programas de *docking* y funciones de cálculo de energía de unión determinando la habilidad para reproducir complejos experimentales de la enzima.^[10]

Otro método empleado para asistir al diseño de drogas es el de DM.

Mediante esta técnica se puede coleccionar información acerca del movimiento de los átomos de un receptor o un complejo. Respecto al receptor AChE, se han podido elucidar cambios conformacionales que no se habían notado en las estructuras cristalográficas de rayos X.^[17] Posteriormente, se empleó DM para caracterizar a un gran número de complejos con inhibidores conocidos, identificando cuales son los residuos importantes en la unión (*hot spots*) y, en base a esto, diseñar inhibidores que maximicen estas interacciones.^[13] La ventaja que posee la DM, respecto al *docking*, es que cuando un inhibidor se encuentra en el sitio de unión la DM muestra la evolución temporal de las interacciones obteniéndose una mejor representación del complejo. Además, mediante las trayectorias coleccionadas en una simulación de DM se puede determinar la energía de unión y analizar la estabilidad de los complejos.

Por otra parte, los métodos *in silico* han sido empleados para construir modelos estadísticos de predicción de fármacos. Un ejemplo es el modelo de QSAR (de sus siglas en inglés *Quantitative Structure-Activity Relationship*), el cual se construye empleando varios descriptores moleculares de un conjunto de inhibidores conocidos.^[18] Por lo general, una relación lineal múltiple vincula a los descriptores y las actividades experimentales. Hay un gran número de trabajos donde se informan modelos de QSAR para predecir inhibidores de la AChE.^[19, 20] Es posible mencionar el trabajo de Flores-Sandoval y colaboradores donde han construido un modelo con una serie de 84 AChIs empleando *docking* molecular y mecánica cuántica para obtener algunos de los descriptores necesarios.^[21]

Por otro lado, modelos lineales han sido diseñados correlacionando actividad experimental con índices de eficiencia (IE).^[22] Los índices de eficiencia pueden calcularse como la relación entre la energía de unión, experimental o calculada, y algún parámetro perteneciente a la molécula (ec. 5.1).^[23] Estos parámetros pueden ser los relacionados al tamaño molecular como el peso molecular, el número de átomos de carbono (NAC), número de átomos distintos a hidrógeno (NHA), el área molecular y área polar, y también vincular la polaridad o permeabilidad como el logaritmo de la constante de partición octanol-agua (logP).^[24]

$$IE = \frac{\text{E de Unión}}{\text{Parametro}} \quad (5.1)$$

Los índices de eficiencia se han propuesto para normalizar observaciones experimentales como, así también, las energías obtenidas mediante métodos computacionales. De esta manera, se pueden obtener mejores correlaciones. Ya que, a pesar de que el *docking* puede predecir bien modos de unión, la energía calculada por las funciones de evaluación suele no dar buenas correlaciones con los resultados experimentales.

5.2 Objetivos específicos

Como objetivo principal de este capítulo se propone construir un modelo lineal para predecir la actividad de inhibidores duales de la enzima AChE.

El modelo se construirá empleando un conjunto de entrenamiento de inhibidores informados en bibliografía. Entre los compuestos seleccionados se encuentran alcaloides esteroidales, compuestos policíclicos e inhibidores híbridos.

En una primera instancia, se propone emplear *docking* molecular para determinar el modo de unión de cada compuesto seleccionado. Luego, se plantea realizar dinámica molecular y determinar la energía de unión empleando el método MM-GBSA y MM-PBSA.

El modelo se construirá correlacionando de manera lineal los valores de energía de unión con el logaritmo la actividad experimental IC_{50} . Del mismo modo, se utilizarán índices de eficiencia en las correlaciones, y se comparará con los resultados anteriores.

Por último, se empleará el modelo que presente los mejores parámetros estadísticos para predecir la actividad de inhibidores derivados del núcleo solanocapsina y de compuestos híbridos que tengan a este compuesto y tacrina como parte de su estructura.

5.3 Métodos

Para llevar a cabo el trabajo desarrollado en este capítulo se empleó la metodología y las técnicas computacionales detalladas en la sección 4.3 del capítulo anterior.

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Construcción del conjunto de entrenamiento

El conjunto de entrenamiento fue construido abarcando un rango de actividad experimental de IC_{50} lo más amplio posible, que va desde 4,55 nM a 278 μ M. Para la formación de este conjunto se seleccionaron alcaloides esteroidales derivados del núcleo pregnano, solanocapsina y triperpenos.^[25-29] Los 21 inhibidores mencionados son mostrados en las Figura 5. 1- 5. 3. Estos compuestos poseen al menos un grupo amino que se encuentra protonado a pH fisiológico. En el capítulo anterior se discutió que la presencia de una carga positiva es importante para la actividad, debido a que maximiza interacciones en la cavidad catalítica de la enzima. Por otra parte, con el objetivo de incorporar variabilidad estructural al modelo se incorporaron inhibidores que contengan a tacrina como parte de su estructura.^[30, 31]

Estos compuestos fueron elegidos debido a que se intenta construir un modelo de predicción de compuestos híbridos entre esteroides y tacrina.

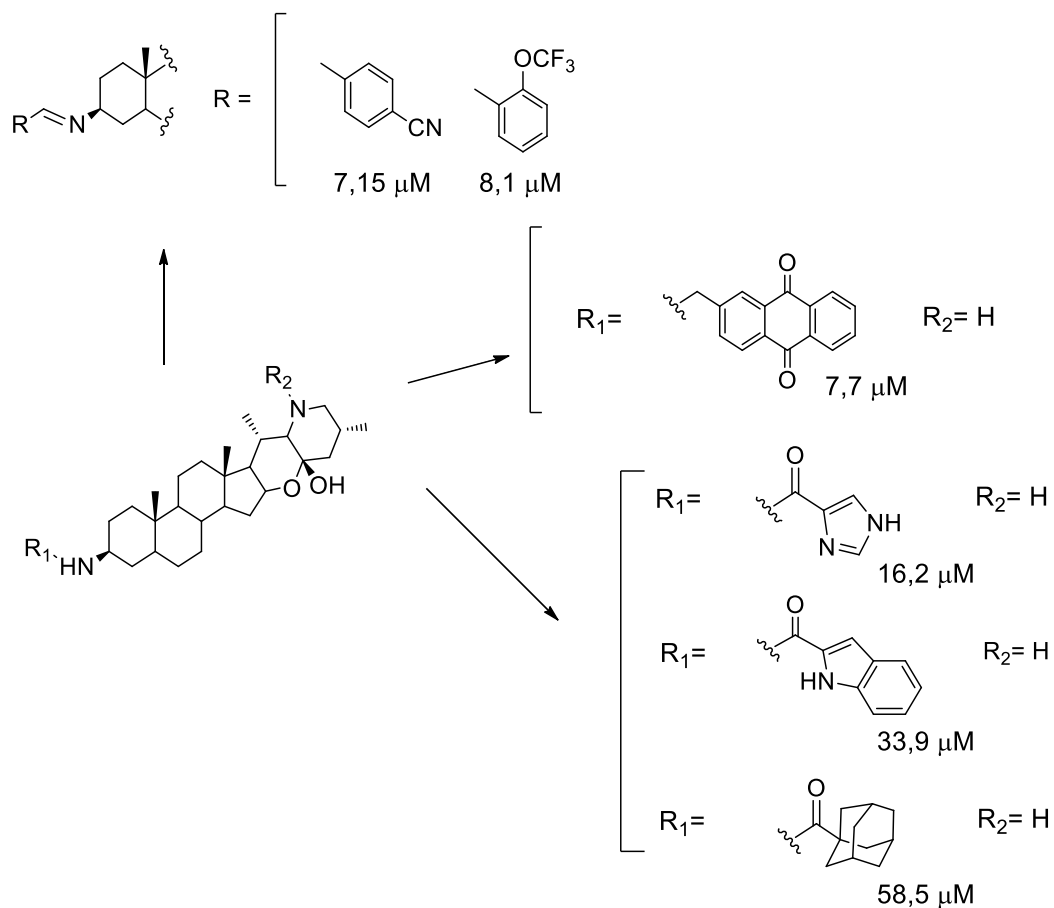


Figura 5. 1. Inhibidores derivados del núcleo solanocapsina (4.5).

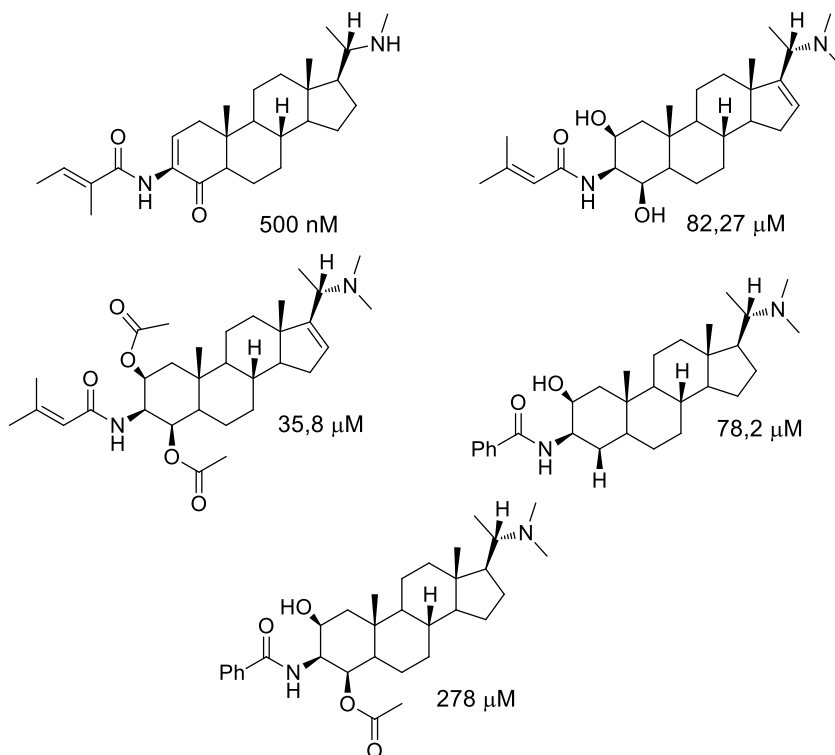


Figura 5. 2. Inhibidores derivados del núcleo pregnano.

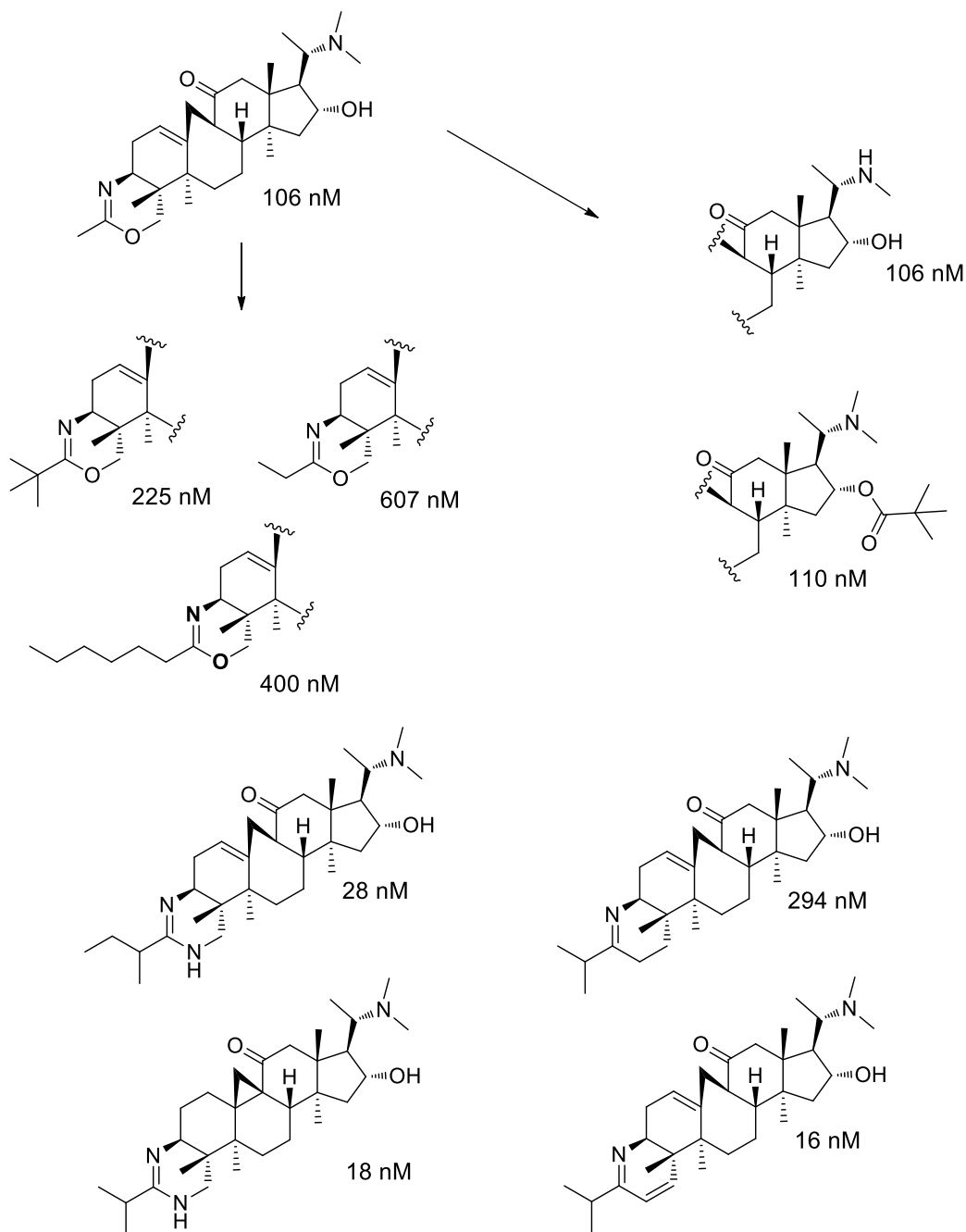


Figura 5. 3. Inhibidores derivados de triterpeno.

5.4.2 Alcaloides esteroidales

Mediante *docking* molecular se obtuvieron 10 geometrías de cada complejo formado entre la enzima y cada uno de los inhibidores del conjunto de evaluación. A cada uno de estos 10 complejos se los minimizó y se determinó la energía de unión con los métodos MM-GBSA y MM-PBSA. Posteriormente, se realizaron simulaciones de DM con el complejo más estable de cada método. Por

último, se calculó la energía de unión, empleando los métodos mencionados anteriormente a partir de los últimos 5 ns de la trayectoria.

En primera instancia, se consideró un modelo en el cual se empleó el conjunto formado solamente por los alcaloides esteroidales y sus derivados. Un buen ajuste fue alcanzado entre los valores de ΔH de unión promedio obtenidos con el método MM-PBSA a partir de la DM y los valores experimentales con un número de casos igual a 21 y un R^2 ajustado de 0,88. En el Gráfico 5. 1 se muestra el ajuste en cuestión.

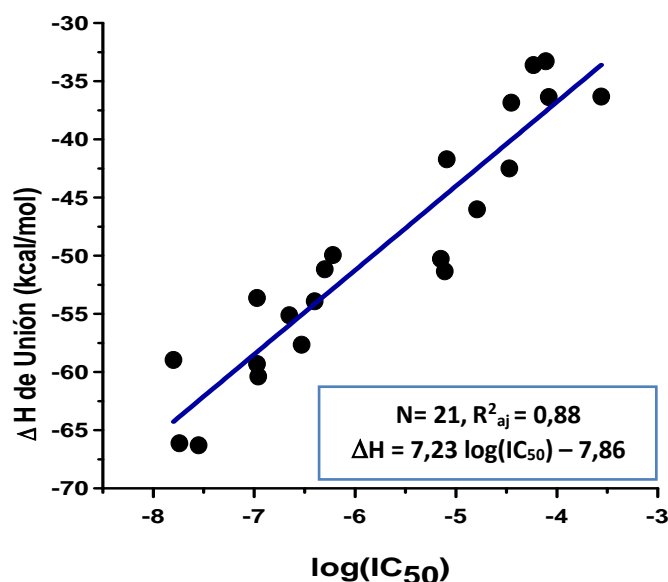


Gráfico 5. 1. Correlación entre ΔH de unión (MM-PBSA) y actividad experimental para alcaloides esteroidales.

Cabe mencionar que con los valores de energía de unión provenientes del método MM-GBSA no se obtuvo un buen ajuste con un valor de R^2 ajustado de 0,58.

A continuación, con el objetivo de identificar cuáles son los *hot spots* en la unión de este tipo de inhibidores se realizó una descomposición de la energía de unión por residuo para cada complejo simulado. Para llevar a cabo el análisis de interacciones, se dividió el conjunto de esteroides en dos grupos dependiendo de la actividad experimental. El grupo 1 está conformado por los inhibidores más

activos, cuyo rango de actividad va desde 16 nM a 607 nM. Por otro lado, se agrupó a los compuestos de menor actividad en el grupo 2, con un rango que va desde 7,15 μ M a 278 μ M. En la Tabla 5. 1 se muestra el porcentaje de incidencia de cada *hot spot* para cada grupo. También se informan los valores de energía, promediados sobre el número de moléculas de cada grupo.

Tabla 5. 1. Descomposición de la energía de unión por residuo para todo el conjunto de esteroides.

	Residuo	% Incidencia	ΔH de unión promedio
Grupo 1	Phe330	100	-1,53
	Trp84	100	-2,17
	Glu199	90,91	-6,91
	Tyr334	63,64	-1,41
Grupo 2	Tyr334	80	-1,41
	Trp279	70	-1,71
	Trp84	70	-3,36
	Phe330	60	-3,18

En la tabla se puede notar que aquellos inhibidores que se encuentran en un rango nanomolar de IC_{50} (grupo-1) interactúan con los residuos no polares Phe330, perteneciente a la región del cuello de botella, y con el Trp84 del subsitio aniónico (Figura 5. 4a). Por otro lado, la mayoría estos compuestos establecen interacciones puente salino con el residuo Glu199 perteneciente al subsitio aniónico. Esta interacción es la más importante con un valor de energía promedio igual a -6,91 kcal/mol. Los compuestos que se encuentran en el rango micromolar (grupo-2) no presentan esta interacción, evidenciando la importancia de la misma para la actividad de este tipo de compuestos. Por su parte, en el grupo-2 surgen como importantes las interacciones de van der Waals con los residuos Tyr334 y Trp279 del SAP (Figura 5. 4b). Además, se suma la interacción del mismo tipo con Trp84, perteneciente al SA, y Phe330 de la zona del cuello de botella.

En resumen, para el conjunto de alcaloides esteroidales se pudo ver que la interacción con Glu199 es fundamental para que un inhibidor de esta naturaleza posea una buena actividad inhibitoria. Además, se pueden mencionar como relevantes las interacciones con Trp84 del SA y Phe330.

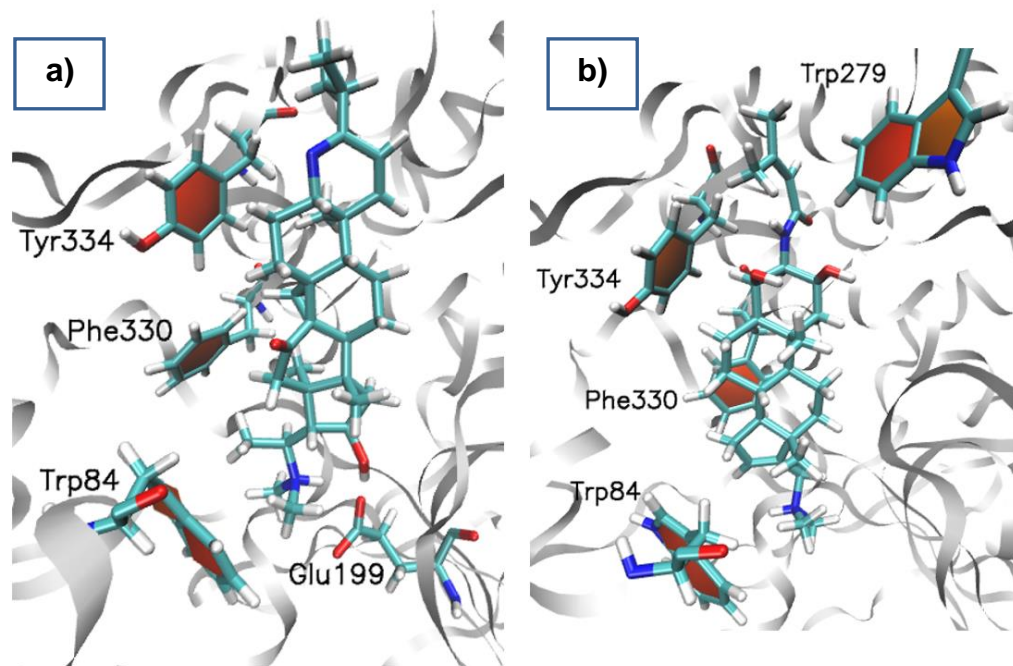


Figura 5. 4. Representación en 3D de las geometrías finales de las simulaciones. (a) Inhibidor esteroidal como potencia inhibitoria nanomolar y (b) inhibidor con potencial inhibitoria micromolar.

5.4.3 Inhibidores híbridos

Como se mencionó anteriormente, uno de los objetivos es predecir valores de inhibición de compuestos derivados del núcleo solanocapsina y también compuestos híbridos entre este alcaloide esteroidal y tacrina, modificando principalmente la naturaleza del espaciador. Para esto, fue necesario ampliar la variabilidad estructural en las moléculas empleadas.

Ahora bien, cuando al modelo discutido en la sección anterior se le adicionaron inhibidores derivados de tacrina y compuestos de naturaleza híbrida, el ajuste desmejoró considerablemente. Estos nuevos compuestos se muestran en la Figura 5. 5.

En el nuevo modelo hay 28 inhibidores, con un valor de R^2 ajustado de 0,67. La regresión se muestra en el Gráfico 5. 2.

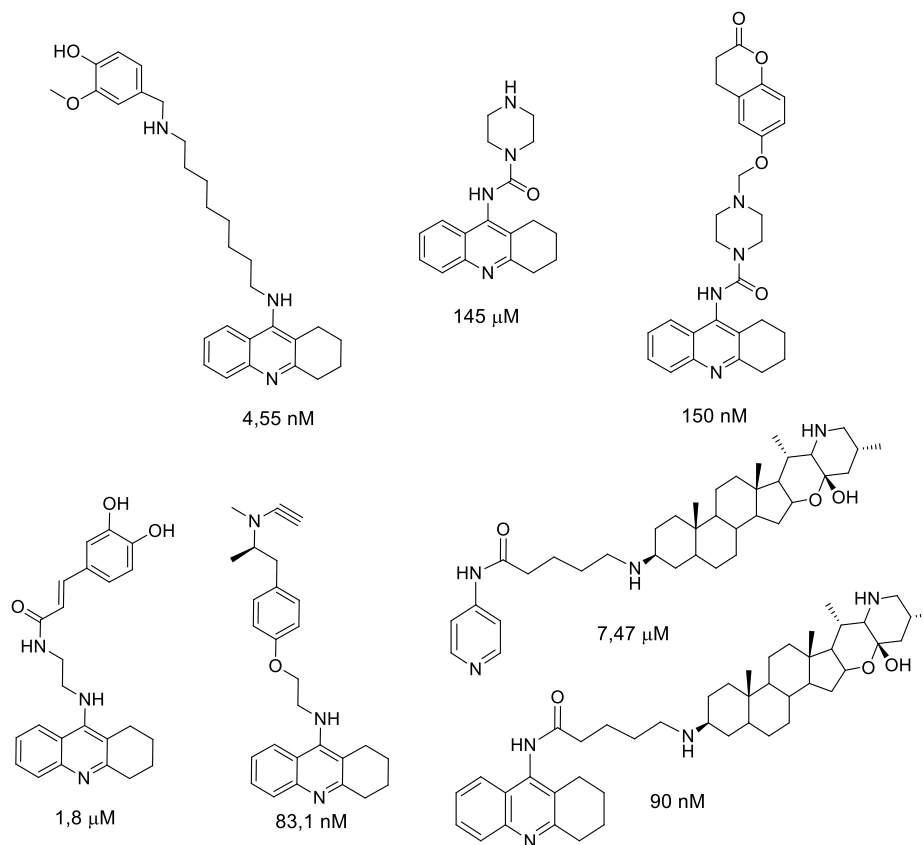


Figura 5. 5. Inhibidores híbridos..

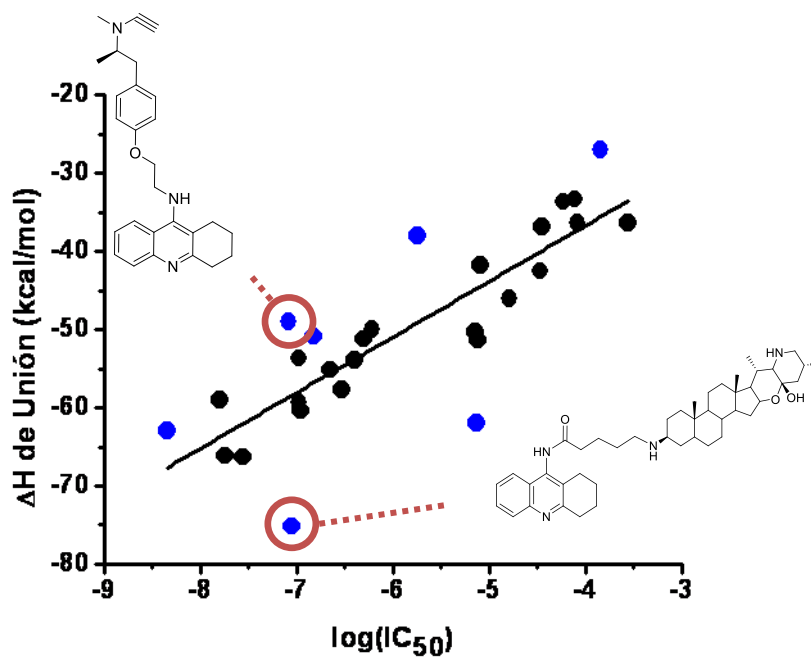


Gráfico 5. 2. Correlación entre ΔH de unión (MM-PBSA) y actividad experimental de alcaloides esteroidales e inhibidores híbridos. Los puntos azules corresponden a los compuestos híbridos.

En el gráfico se puede notar que los dos inhibidores híbridos marcados poseen una potencia inhibitoria similar pero valores de energía de unión muy disímiles. Estas observaciones pusieron en evidencia el hecho de que los valores de energía de unión ya no son útiles para la construcción del nuevo modelo con variabilidad estructural. En nuestro caso se observó, que mientras más grande sea un ligando más contactos puede establecer con la proteína, y entonces, más favorable será su energía de unión. Esto es debido a que el cálculo de la energía es aditivo por naturaleza, por ende la energía de ligado contiene interacciones relevantes y no relevantes para la inhibición. Por esta razón se tiende a sobreestimar la actividad inhibitoria de un ligando.

Con el afán de mejorar la regresión, se descartaron aquellos puntos que se alejaron demasiado de la recta de ajuste aplicando un criterio arbitrario de selección. Para ello, se determinaron los residuales studentizados para cada punto del ajuste y se definió un intervalo que va desde 1,75 a -1,75 (Figura 5. 6b). Si el punto se encuentra dentro del intervalo, es incluido en el ajuste. En cambio, si el punto se encuentra fuera de este intervalo, se descarta del ajuste considerando que está muy alejado de la recta de regresión. Teniendo en cuenta esto se pudo mejorar el ajuste quedando un modelo de regresión con 26 compuestos y un R^2 ajustado igual a 0,80. A continuación se muestra la regresión para el modelo mencionado.

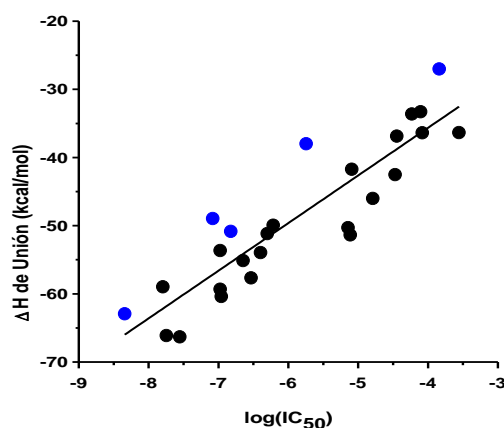


Gráfico 5. 3. Correlación entre ΔH de unión (MM-PBSA) y actividad experimental de alcaloides esteroidales e inhibidores híbridos. Los puntos azules corresponden a los compuestos híbridos.

Intentando mejorar aun más el modelo, se emplearon índices de eficiencia con la intención de normalizar los valores de energía de unión empleando factores estructurales. Los índices empleados fueron ΔH /masa molecular, ΔH /NAC y ΔH /NHA. Se determinaron los índices de eficiencia para cada compuesto y se los correlacionó con los valores experimentales. El resultado de los ajustes está resumido en la Tabla 5. 2.

Tabla 5. 2. Resultados de las regresiones llevadas a cabo con los índices de eficiencia.

Índices de Eficiencia	Numero de compuestos	R ² ajustado
ΔH /masa molecular	27	0,82
ΔH /NAC	26	0,82
ΔH /NHA	27	0,81

Los ajustes indican que se pudo mejorar el modelo cuando se emplearon los índices de eficiencia. El mejor ajuste fue obtenido cuando se utilizó el índice de eficiencia ΔH /masa molecular (N= 27 y R² aj = 0,82). Este modelo fue construido con 27 inhibidores entre los cuales se encuentran 20 inhibidores esteroidales y 7 híbridos.

El compuesto que fue excluido, indicado en el Figura 5. 6, es el derivado de solanocapsina **4.11**, discutido en el capítulo anterior. Este compuesto posee un

adamantano como sustituyente, unido al nitrógeno primario de la solanocapsina, que queda expuesto al solvente en las simulaciones. Además, se observó que este sustituyente no establece interacciones específicas con la enzima. Por ende, en el cálculo del índice de eficiencia se consideran los átomos del sustituyente en la masa molecular pero estos no contribuyen a la energía de unión. Por esta razón, se encontró un valor de IE más pequeño, en valor absoluto, que el esperado. Además, se observó que si se determina el IE con la masa molecular obtenida suplantando el adamantano por un átomo de hidrógeno el punto rojo, en la Figura 5. 6a, se acerca a la línea de regresión.

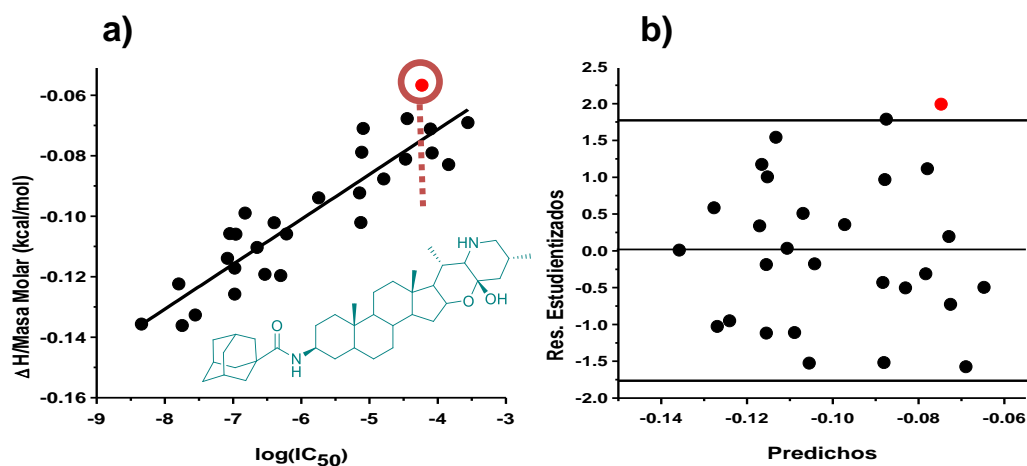


Figura 5. 6. a) Correlación entre ΔH de unión y actividad experimental para alcaloides esteroidales. b) Residuales studentizados vs. valores predichos del $\Delta H/\text{Masa molecular}$. En color rojo se marca el compuesto descartado.

Con la ecuación obtenida con el modelo alcanzado a partir de correlacionar el índice $\Delta H/\text{masa molecular}$ y la actividad experimental se intenta predecir la potencial actividad de derivados del núcleo solanocapsina y de compuestos híbridos.

En esta etapa, el número de compuestos planteados podría ser infinito, la etapa determinante sería la síntesis. Por ello, se diseñaron compuestos que podrían ser sintetizados con los reactivos y compuestos disponibles.^[25] Los compuestos a los cuales se le desea estimar la actividad experimental se muestran

en la Figura 5. 7.

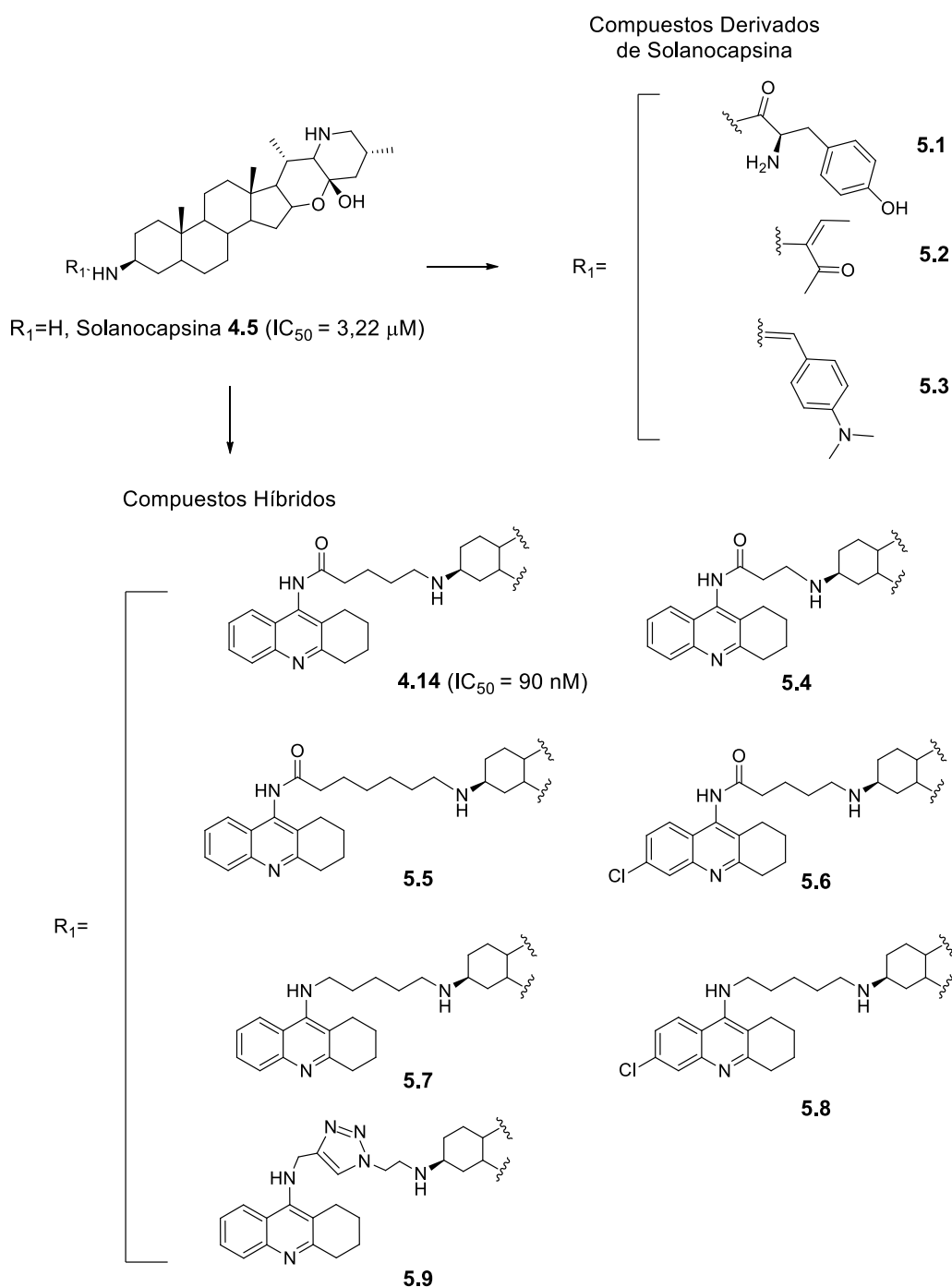


Figura 5. 7. Compuestos elegidos para predecir potencia inhibitoria.

En el conjunto de compuestos seleccionados para estimar la actividad se tienen tres compuestos derivados de solanocapsina (5.1-3) y seis compuestos híbridos. La propuesta de los compuestos híbridos tiene como objetivo mejorar la actividad de 4.14 (Figura 5. 7) modificando la naturaleza del puente que une a los fragmentos de tacrina y solanocapsina y, también, introduciendo un átomo de

cloro en el fragmento de tacrina. En la Tabla 5. 3 se muestran valores aproximados de actividad predichos por el modelo para los compuestos mencionados anteriormente.

Tabla 5. 3. Valores de actividad IC₅₀ predichos para los compuestos **5.1-9**.

Compuesto	Valores predicho de IC ₅₀ (μ M)
5.1	16
5.2	1,8
5.3	2,6
5.4	74
5.5	> 278
5.6	64
5.7	0,043
5.8	0,41
5.9	1,0

En cuanto a los derivados **5.1-3**, la incorporación de nuevos sustituyentes no derivaría en una mejora sustancial en la actividad. Es decir, ninguna de estas modificaciones planteadas mejorarían el valor actividad IC₅₀, de 3,22 μ M, del núcleo base solanocapsina (ver Figura 5. 7).

Por otro lado, para comenzar a analizar a los compuestos híbridos (**5.4-9**) es conveniente, en un principio, tomar como referencia al inhibidor **4.14** que posee un IC₅₀ de 90 nM (Figura 5. 7). Se observó que las modificaciones planteadas en la longitud del espaciador carbonado se traducirían en una pérdida de la potencia inhibitoria. Cuando se analizó la descomposición de la energía de unión para el compuesto **5.4** se pudo notar la aparición de interacciones estabilizantes del tipo van der Waals con Trp84 y Tyr334. A estas, se les adicionaron interacciones desestabilizantes con los residuos Asp72, Tyr121 y His440. Por otro lado, el compuesto **5.5** mostró la aparición de una interacción marcadamente desestabilizante con el Glu199 y un debilitamiento de la interacción puente salino con Asp72. En resumen, la aparición de interacciones desestabilizantes podría ser la causa de la baja actividad cuando la longitud del espaciador fue modificada.

También, la incorporación de un átomo de cloro en el fragmento de tacrina (**5.6**) no sería conveniente ya que no se traduce en una mejora en la inhibición. La

dinámica de este compuesto mostró que ambos fragmentos principales se encuentran desplazados respecto al **4.14**. Además, la descomposición reveló la aparición de una interacción marcadamente desestabilizante con el Glu199 del subsitio aniónico.

Para el caso del compuesto **5.7** se planteó una reducción del carbonilo del enlace amida. En este caso a lo largo de la simulación el fragmento de tacrina se intercaló entre los residuo Trp84 y Phe330. Este modo de unión del fragmento de tacrina no fue observado para **4.14**. Además, al reducir este carbonilo el fragmento de tacrina se encuentra protonado, a pH fisiológico, sumando así una interacción del tipo puente hidrógeno con His440. Estas interacciones estabilizantes se traducirían en un aumento en la potencia inhibitoria.

Continuando con la discusión, el compuesto **5.8** puede ser comparado con **5.7**. Éste posee un átomo de cloro en el núcleo de tacrina que derivaría en una baja en la potencia inhibitoria. Cuando se analizaron las interacciones de este compuesto se notó que, a pesar de la aparición de interacciones estabilizante del tipo catión- π con Phe281 perteneciente al SAP, no mejoraría la actividad. Esto puede deberse al debilitamiento en las interacciones claves con Phe330 y Tyr334, y una ausencia de interacción con el Trp279.

Por último, la adición de un triazol (**5.9**) en el espaciador tampoco mejoraría la actividad. En el análisis de la descomposición de la energía se pudo notar la presencia de una interacción marcadamente desestabilizante entre el espaciador y Tyr118; quizás esta sea la razón por la cual la actividad se vería disminuida.

5.5 Conclusiones

En este capítulo se han mostrado los esfuerzos llevados a cabo para alcanzar el objetivo primario de obtener un modelo lineal de predicción de inhibidores duales de la enzima AChE.

En primera instancia, se pudo obtener un modelo lineal, correlacionando energías de unión obtenidas de una DM y valores de IC₅₀, empleando un conjunto

de entrenamiento conformado por 21 alcaloides esteroidales. Además, a través la descomposición de la energía de unión se pudo distinguir que los residuos Glu199, Trp84 y Phe330 son muy importantes en aquellos compuestos con buena actividad inhibitoria.

Por otro lado, se amplió el modelo con la incorporación de inhibidores híbridos con tacrina como parte de su estructura. En este caso las energías de unión no resultaron adecuadas para llevar a cabo las correlaciones. Por esta razón, se emplearon índices de eficiencia para construir el modelo. El índice ΔH /masa molecular presentó mejores parámetros estadísticos en los ajustes.

Por último, con la ecuación de ajuste se estimaron los valores de actividad de algunos compuestos propuestos. De éstos, las modificaciones propuestas sobre el núcleo de solanocapsina no derivarían en sustanciales mejoras en la actividad. Por otro lado, planteamos que solo la reducción del carbonilo del espaciador del compuesto **5.7** podría derivar en un compuesto más activo (**4.14**).

5.6 Bibliografía

1. Davis, K.L. y Mohs, R.S. Enhancement of memory processes in Alzheimer's disease with multiple- dose intravenous physostigmine. *American Journal of Psychiatry*, 1982, **139** (11), p. 1421.
2. Thal, L.J.; Fuld, P.A.; Masur, D.M. y Sharpless, N.S. Oral physostigmine and lecithin improve memory in Alzheimer disease. *Annals of Neurology*, 1983, **13** (5), p. 491.
3. Cramer, P.E.; Cirrito, J.R.; Wesson, D.W.; Daniel Lee, C.Y.; Karlo, J.C.; Zinn, A.E.; Casali, B.T.; Restivo, J.L.; Goebel, W.D.; James, M.J.; Brunden, K.R.; Wilson, D.A. y Landreth, G.E. ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β -Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models. *Science (New York, N.Y.)*, 2012, **335** (6075), p. 1503.
4. Raves, M.L.; Harel, M.; Pang, Y.-P.; Silman, I.; Kozikowski, A.P. y Sussman, J.L. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. *Nature Structural & Molecular Biology* 1997, **4** (1), p. 57.
5. Dvir, H.; Wong, D.M.; Harel, M.; Barril, X.; Orozco, M.; Luque, F.J.; Muñoz-Torrero, D.; Camps, P.; Rosenberry, T.L.; Silman, I. y Sussman, J.L. 3D Structure of Torpedo californica Acetylcholinesterase Complexed with Huprine X at 2.1 Å Resolution: Kinetic and Molecular Dynamic Correlates. *Biochemistry*, 2002, **41** (9), p. 2970.
6. Greenblatt, H.M.; Kryger G Fau - Lewis, T.; Lewis T Fau - Silman, I.; Silman I Fau - Sussman, J.L. y Sussman, J.L. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution. *FEBS LETTERS* 1999, **463**, p. 321.
7. Kryger, G.; Silman, I. y Sussman, J.L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept®): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*, 1999, **7** (3), p. 297.
8. Yuriev, E. y Ramsland, P.A. Latest developments in molecular docking: 2010–2011 in review. *Journal of Molecular Recognition*, 2013, **26** (5), p. 215.
9. Guedes, I.; de Magalhães, C. y Dardenne, L. Receptor–ligand molecular docking. *Biophys Rev*, 2014, **6** (1), p. 75.
10. Zaheer ul, H.; Halim, S.A.; Uddin, R. y Madura, J.D. Benchmarking docking and scoring protocol for the identification of potential acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2010, **28** (8), p. 870.
11. Khan, M.T.H. Molecular interactions of cholinesterases inhibitors using in silico methods: current status and future prospects. *New Biotechnology*, 2009, **25** (5), p. 331.
12. Sussman, J.L.; Harel, M. y Silman, I. Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase drugs. *Chemico-Biological Interactions*, 1993, **87** (1–3), p. 187.
13. Bermudez-Lugo, J.A.; Rosales-Hernandez, M.C.; Deeb, O.; Trujillo-Ferrara, J. y Correa-Basurto, J. In Silico methods to assist drug developers in acetylcholinesterase inhibitor design. *Current Medicinal Chemistry*, 2011, **18** (8), p. 1122.

14. Camps, P.; Formosa, X.; Galdeano, C.; Muñoz-Torrero, D.; Ramírez, L.; Gómez, E.; Isambert, N.; Lavilla, R.; Badia, A.; Clos, M.V.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Andrisano, V.; Arce, M.P.; Rodríguez-Franco, M.I.; Huertas, Ó.; Dafni, T. y Luque, F.J. Pyrano[3,2-c]quinoline-6-Chlorotacrine Hybrids as a Novel Family of Acetylcholinesterase- and β -Amyloid-Directed Anti-Alzheimer Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, **52** (17), p. 5365.
15. Markus, H.J.S. y Martin, L. Essential Factors for Successful Virtual Screening. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2008, **8** (1), p. 63.
16. D'Oca, G. Message from the Editor. *Future Medicinal Chemistry*, 2013, **6** (1), p. 1.
17. Axelsen, P.H.; Harel, M.; Silman, I. y Sussman, J.L. Structure and dynamics of the active site gorge of acetylcholinesterase: synergistic use of molecular dynamics simulation and X-ray crystallography. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 1994, **3** (2), p. 188.
18. Santiago, V.; Giorgio, C. y Stefano, M. Medicinal Chemistry and the Molecular Operating Environment (MOE): Application of QSAR and Molecular Docking to Drug Discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2008, **8** (18), p. 1555.
19. Recanatini, M.; Cavalli, A. y Hansch, C. A comparative QSAR analysis of acetylcholinesterase inhibitors currently studied for the treatment of Alzheimer's disease. *Chemico-Biological Interactions*, 1997, **105** (3), p. 199.
20. Shen, L.-l.; Liu, G.-x. y Tang, Y. Molecular docking and 3D-QSAR studies of 2-substituted 1-indanone derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2007, **28** (12), p. 2053.
21. Correa-Basurto, J.; Bello, M.; Rosales-Hernández, M.C.; Hernández-Rodríguez, M.; Nicolás-Vázquez, I.; Rojo-Domínguez, A.; Trujillo-Ferrara, J.G.; Miranda, R. y Flores-Sandoval, C.A. QSAR, docking, dynamic simulation and quantum mechanics studies to explore the recognition properties of cholinesterase binding sites. *Chemico-Biological Interactions*, 2014, **209**, p. 1.
22. García-Sosa, A.T.; Hetényi, C. y Maran, U. Drug efficiency indices for improvement of molecular docking scoring functions. *Journal of Computational Chemistry*, 2010, **31** (1), p. 174.
23. Abad-Zapatero, C. y Metz, J.T. Ligand efficiency indices as guideposts for drug discovery. *Drug Discovery Today*, 2005, **10** (7), p. 464.
24. Hetényi, C.; Maran, U.; García-Sosa, A.T. y Karelson, M. Structure-based calculation of drug efficiency indices. *Bioinformatics*, 2007, **23** (20), p. 2678.
25. García, M.E.; Borioni, J.L.; Cavallaro, V.; Puiatti, M.; Pierini, A.B.; Murray, A.P. y Peñeñory, A.B. Solanocapsine derivatives as potential inhibitors of acetylcholinesterase: Synthesis, molecular docking and biological studies. *Steroids*, 2015, **104**, p. 95.
26. Choudhary, M.I.; Devkota, K.P.; Nawaz, S.A.; Shaheen, F. y Atta ur, R. Cholinesterase-Inhibiting New Steroidal Alkaloids from *Sarcococca hookeriana* of Nepalese Origin. *Helvetica Chimica Acta*, 2004, **87** (5), p. 1099.

27. Atta ur, R.; Zaheer ul, H.; Khalid, A.; Anjum, S.; Khan, M.R. y Choudhary, M.I. Pregnane-Type Steroidal Alkaloids of *Sarcococca saligna*: a New Class of Cholinesterase Inhibitors. *Helvetica Chimica Acta*, 2002, **85** (2), p. 678.
28. Sauvaître, T.; Barlier, M.; Herlem, D.; Gresh, N.; Chiaroni, A.; Guenard, D. y Guillou, C. New Potent Acetylcholinesterase Inhibitors in the Tetracyclic Triterpene Series. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2007, **50** (22), p. 5311.
29. Rouleau, J.; Iorga, B.I. y Guillou, C. New potent human acetylcholinesterase inhibitors in the tetracyclic triterpene series with inhibitory potency on amyloid β aggregation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, **46** (6), p. 2193.
30. Xie, S.-S.; Wang, X.-B.; Li, J.-Y.; Yang, L. y Kong, L.-Y. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine-coumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, **64**, p. 540.
31. Chao, X.; He, X.; Yang, Y.; Zhou, X.; Jin, M.; Liu, S.; Cheng, Z.; Liu, P.; Wang, Y.; Yu, J.; Tan, Y.; Huang, Y.; Qin, J.; Rapposelli, S. y Pi, R. Design, synthesis and pharmacological evaluation of novel tacrine-caffeic acid hybrids as multi-targeted compounds against Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, **22** (20), p. 6498.

Parte II

Cálculo con Modelos de Estructura Electrónica en Sistemas Orgánicos

CAPITULO 6

INTRODUCCIÓN GENERAL: PARTE II

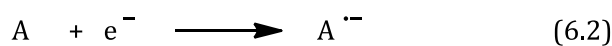
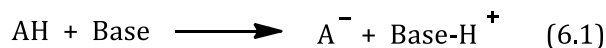
INTRODUCCIÓN GENERAL: PARTE II.....	149
6.1 Afinidad electrónica	152
6.1.1 Aniones inestables.....	154
6.1.1.1 Métodos para tratar radicales aniones del tipo N.....	155
6.2 Potenciales de reducción	158
6.2.1 Definición de potencial de reducción estándar	159
6.2.2 Protocolos basados en solvente implícito.....	161
6.3 Bibliografía.....	164

Durante las últimas décadas, la teoría DFT se ha convertido en una de las herramientas más usadas en muchas ramas de la química y en la ciencia de materiales. Esto es debido a su buen desempeño y bajo costo computacional que permite abordar sistemas de mayor tamaño.^[1] De hecho, muchos trabajos de investigación en química orgánica e inorgánica emplean estos métodos de manera rutinaria, utilizando códigos comerciales, bases y funcionales estándares.^[2] A pesar de su amplia difusión, se conoce que DFT posee aproximaciones que hacen que funcione adecuadamente para algunos sistemas pero no tan bien para otros. Por esta razón, es conveniente una buena búsqueda del funcional y la base para abordar eficientemente un problema particular.

En química orgánica, en muchas ocasiones es necesario modelar a especies aniónicas presentes en distintos mecanismos polares y radicalarios. Un ejemplo son los radicales aniones (RA). Estas especies reactivas son importantes intermediarios en reacciones que involucran etapas de transferencia de electrones (TE), como es el caso del mecanismo radicalario en cadena $S_{RN}1$.^[3, 4] Además, participan en procesos biológicos como el deterioro y reparación del ADN.^[5, 6] En algunas ocasiones no es posible modelar correctamente a estas especies aniónicas con los métodos estándares. La capacidad de una base o funcional de DFT, para modelar este tipo de especies, puede ser evaluada empleando los sets Gn ($G1$,^[7] $G2/97$,^[8] $G3/99$ ^[9] y $G3/05$ ^[10]). Sin embargo, estos conjuntos de datos contienen 63 afinidades electrónicas, y 10 afinidades de protones de especies monoatómicas, diatómicas y moléculas pequeñas con menos de 3 átomos pesados. Mediante el uso de estos conjuntos de validación se pueden desarrollar métodos con buen desempeño para átomos y moléculas pequeñas, pero muchas veces éstos no presentan el mismo comportamiento para moléculas de tamaño medio, lo cual implica un problema para muchas aplicaciones químicas.^[11]

Una especie aniónica (anión o RA) puede ser obtenida por deprotonación de una molécula neutra (6.1, Esquema 6. 1) o por una transferencia de electrón a un molécula neutra (6.2) o un radical (6.3). El primer proceso es una reacción ácido-base y está directamente asociada con la constante de disociación ácida (K_a) o el pK_a . Los dos procesos restantes pueden ser vinculados con la afinidad electrónica (AE , si el proceso ocurre en fase gaseosa) o con el potencial de reducción (en fase

condensada o solución) de una especie neutra. Por consiguiente, un buen funcional de DFT empleado para el estudio de especies orgánicas aniónicas debe predecir con exactitud al menos una de estas propiedades físicas.



Esquema 6. 1. Diferentes maneras de obtener una especie aniónica.

Varios autores han evaluado las capacidades de DFT para predecir o estimar los valores de pK_a , y una revisión de esto fue publicada por Ho y colaboradores.^[12] Para la predicción de esta propiedad, diferentes estrategias han sido aplicadas, tales como el uso de modelos continuos de solvatación,^[13, 14] inclusión de moléculas discretas de solvente,^[15, 16] o el uso de simulaciones QM/MM con solvatación explícita,^[17] entre otros. Cabe señalar que la exactitud en estos cálculos es difícil de alcanzar, debido a que un error de 1,36 kcal/mol en el cambio de energía libre para la desprotonación en solvente deriva en un error de una unidad de pK_a .^[18]

6.1 Afinidad electrónica

La diferencia de energía, en fase gaseosa, entre una especie neutra y un RA es definida como la AE . La relevancia y la utilidad de esta propiedad no sólo es importante por sí misma, sino que también es útil para definir otros conceptos químicos o parámetros de reactividad, como potencial químico, dureza y electrofilicidad.^[19]

Desde el modelado computacional, para el cálculo de la AE , se supone que es necesario conocer la superficie de energía potencial de la molécula neutra y de la especie aniónica. Sin embargo, solo dos diferencias entre estas superficies son útiles para estimar esta propiedad. Por una lado, se puede estimar la afinidad electrónica vertical (AEV) como la diferencia de energía electrónica entre la molécula neutra y el anión, pero para este último no se lleva a cabo optimización de la geometría (ec.

6.4).^[4, 20, 21] Por otra parte, se puede determinar la afinidad electrónica adiabática (AEA), en este caso se calcula la diferencia de energía entre las especies calculadas con completa optimización de geometría, incluyendo las correcciones de punto cero (CPC)(ec. 6.5).^[22] En otras palabras, se determina la diferencia entre el estado fundamental de la molécula neutra y estado fundamental del anión.

$$AEV = E_{(neutra\ optimizada)} - E_{(anión\ sobre\ la\ geometría\ de\ la\ neutra)} \quad (6.4)$$

$$AEA = E_{(neutra\ optimizada)} - E_{(anión\ optimizado)} + \Delta CPC_{(neutra-anión)} \quad (6.5)$$

Ahora bien, en el campo computacional hay dos escenarios posibles. Para aquellos compuestos donde el anión es más estable que la molécula neutra ($AE > 0$, Figura 6. 1a) los métodos de DFT funcionan correctamente.^[21] Por otro lado, muchas moléculas neutras tienen AE experimental negativa, lo que significa que la energía del anión está por encima de la energía de la molécula neutra (Figura 6. 1b). En estos casos el estado aniónico posee un tiempo de vida muy corto ($10^{-11} - 10^{-15}$ s), ya que puede sufrir un decaimiento espontáneo al estado neutro fundamental por desprendimiento del electrón adicional.^[23] Desde el punto de vista experimental, estos aniones, también llamados aniones temporales o *unbound*, pueden ser estudiados por medio de métodos de espectroscopia de transmisión electrónica (ETE).^[23] Por su naturaleza inestable, la caracterización de estos aniones temporales representa un desafío para los métodos experimentales y teóricos.^[24] Desde un punto de vista teórico, existen controversias sobre cuál es la mejor forma de modelar estas especies inestables en fase gaseosa.^[25]

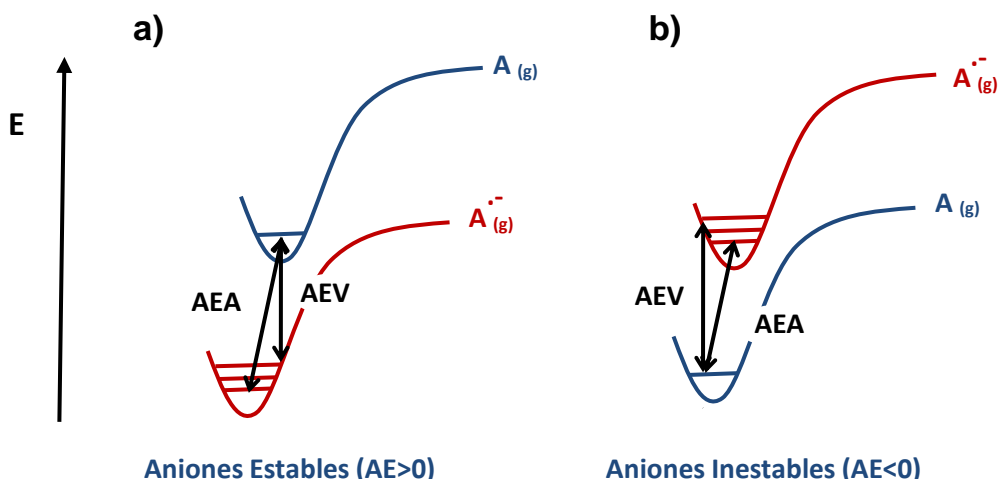


Figura 6. 1. Diagrama de las superficies de energía potencial del anión y molécula neutra. a) aniones estables. b) aniones inestables.

6.1.1 Aniones inestables

Cuando se modelan aniones inestables ($AE < 0$), se pueden distinguir dos situaciones. Por un lado, se tiene a los aniones de valencia (V), en estos aniones el electrón adicional se encuentra en un orbital molecular bien definido. Para estos casos, la AE puede ser calculada con buena exactitud y, en particular, el funcional B3LYP (uno de los más populares) con una base relativamente pequeña puede reproducir valores experimentales con una exactitud del orden de meV.^[26, 27] Por otro lado, se tienen los aniones de no valencia (N). Estos aniones poseen un electrón adicional desapareado en un orbital molecular difuso alrededor de la molécula. Para estos casos, los métodos teóricos estándares fallan en el cómputo de la AE y no es comparable con el valor obtenido con metodologías experimentales, en las cuales se obtienen los estados tipo V.^[25] Lo más importante es que RAs tipo N no se encuentran presentes en reacciones orgánicas o biológicas en solución, por lo cual se infiere que estos derivan de un artificio de los métodos de cálculo. En la Figura 6. 2 se muestran los estados tipo N para los RAs de acetona y el 1,3 ciclopentadieno, respectivamente.

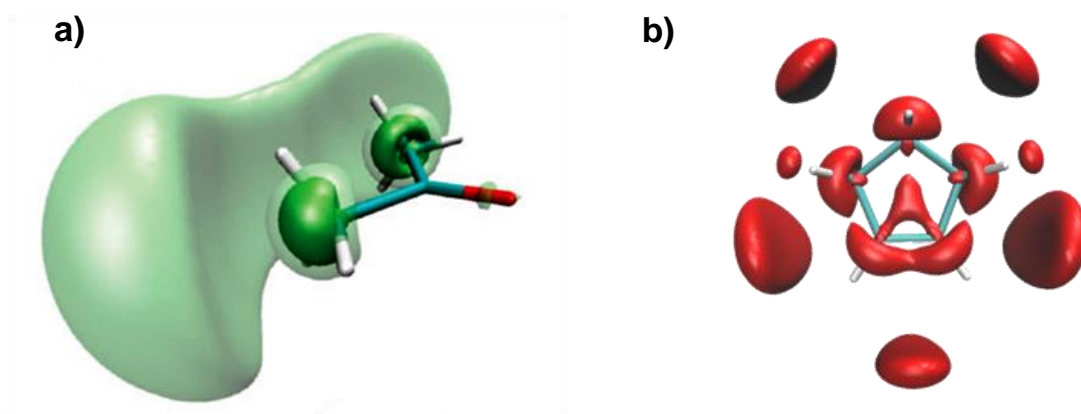


Figura 6. 2. Aniones del tipo N. a) RA tipo N para la acetona. b) RA tipo N para el 1,3 ciclopentadieno.

Existen cuatro factores que incrementan la probabilidad de encontrar aniones del tipo N: (i) *AEs* menores a -1,5 eV; (ii) alto momento dipolar y/o fuertes dipolos locales de enlace; (iii) el empleo de un conjunto de bases aumentadas como las bases Dunning (AUG-cc-pVDZ y AUG-cc-pVTZ) o las de Pople 6-311++G(2d,p), con mayor componente de difusas; y (iv) funcionales sin una componente de Hartree-Fock de intercambio.^[28]

A continuación la pregunta que parece surgir como obvia es: ¿cómo se debe tratar un RA cuando el estado tipo N es computacionalmente el más estable? En la sección siguiente se discuten algunas metodologías de modelado de aniones que surgen como respuesta a la pregunta anterior.

6.1.1.1 Métodos para tratar radicales aniones del tipo N

Como se ha mencionado anteriormente, el tratamiento de RAs no es trivial cuando el estado de menor energía, en fase gaseosa, es del tipo N. En consecuencia, se han informado algunas metodologías para modelar este tipo de especies y computar valores de *AEs* negativas.^[29-31]

Vera y colaboradores han desarrollado una metodología, para superar la imposibilidad de calcular *AE* mediante las ec. 6.4 y 6.5, basado en la obtención del estado tipo V en distintos solventes y una posterior extrapolación al vacío.^[32] Esto se

debe a que solventes polares estabilizan el estado de valencia de un RA lo suficiente como para que se convierta en el estado fundamental (Figura 6. 3).

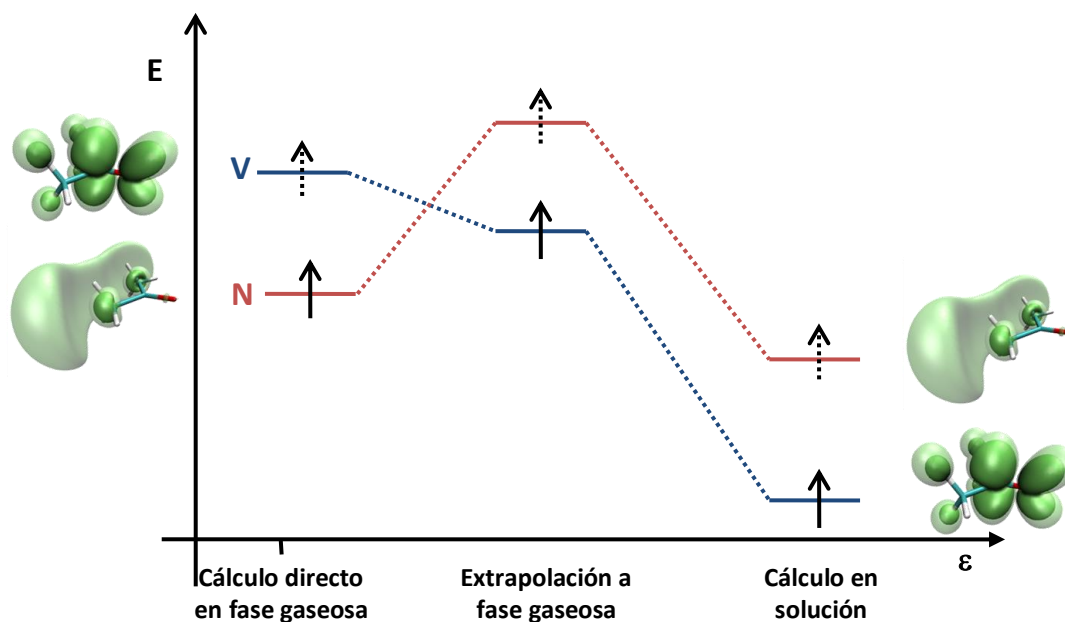
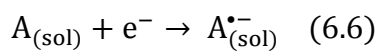
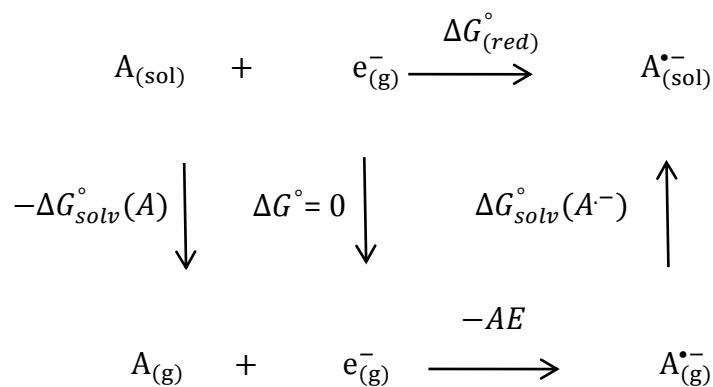


Figura 6. 3. Representación esquemática de la estabilización del estado tipo V en solventes polares.

El cambio de energía del proceso mostrado en la ec. 6.6 puede ser relacionado con la AE mediante las ec. 6.7, 6.8 y el ciclo termodinámico mostrado en el Esquema 6. 2. En éste son presentadas las reacciones de reducción en fase gaseosa y en solución, con el correspondiente cambio en la energía libre de Gibbs.





Esquema 6. 2. Ciclo termodinámico de Born-Haber.

Las componentes de la diferencia de energía del proceso ($\Delta G_{(red)}^\circ$) se muestran en las ec. 6.7 y 6.8.

$$\Delta E = \Delta G_{(red)}^\circ = -AE + \Delta G_{solv}^\circ(A^-) - \Delta G_{solv}^\circ(A) \quad (6.7)$$

$$\Delta E = \Delta G_{(red)}^\circ = -AE + \Delta \Delta G_{solv}^\circ \quad (6.8)$$

A partir de la ec. 6.8, se puede notar que ΔE se encuentra vinculada con la energía de solvatación y, por lo tanto, varía con el solvente y podría ser entendida como una función de la polaridad del mismo o su constante dieléctrica (ϵ). Teniendo en cuenta que la AE es una propiedad en fase gaseosa, cuando ϵ tiende a 1 (vacío o fase gaseosa), ΔE debe tender al valor real de la AE , ya que la diferencia entre las energías de solvatación de las especies cargadas y neutras tenderán a cero:

$$AE = \lim_{\epsilon \rightarrow 1} \Delta E_{(\epsilon)} \quad (6.9)$$

Por lo tanto, en esta metodología para una determinada molécula se determina el valor de ΔE en solventes con distinta polaridad, se construye una gráfica de ΔE vs. $1/\epsilon$ y se obtiene el valor de AE extrapolando ϵ a un valor igual a 1 (ec. 6.10).

$$AE = \lim_{\xi \rightarrow 1} \Delta E_{(1/\xi)} \quad (6.10)$$

De esta manera los autores han podido computar la AE , para molecular orgánicas de tamaño medio, hasta valores de AEs cercanos a -1,9 eV. Además, los valores estimados por esta metodología fueron comparables a los obtenidos experimentalmente, difiriendo en pocos meV. El modelado fue realizado empleando el funcional híbrido B3LYP con la base de Pople 6-311+G(2df,p) y el modelo de solvente IEF-PCM incluido en el programa *Gaussian 03*.

Otra alternativa, informada por los mismos autores, considera el empleo de la aproximación TD-DFT para la corrección de la energía del RA.^[31] Esta metodología ha dado buenos resultados incluso para especies de AEs inferiores a -2,5 eV hasta un valor límite de -3,5 eV. En estos estudios, se evaluaron sólo los funcionales B3LYP, PBE0 y PW91 siendo B3LYP el que presentó el mejor desempeño.

6.2 Potenciales de reducción

Muchas reacciones en fase condensada involucran etapas de TE de un reactivo a otro. La tendencia de una especie química a perder o ganar un electrón es descrita por una propiedad termodinámica llamada potencial de reducción, que puede ser medido experimentalmente a través de la técnica de voltamperometría cíclica. Sin embargo, en muchos casos, la alta reactividad de algunas moléculas o la irreversibilidad de una semireacción pueden hacer que la medida directa del potencial de reducción sea difícil o inviable. En estos casos la química computacional representa una invaluable alternativa frente a estas dificultades experimentales.

Anteriormente en este capítulo, se ha discutido acerca de avances recientes en el modelado computacional de especies químicas en fase gaseosa. Del mismo modo, los métodos teóricos en fase condensada han mostrado un gran desarrollo, esto es principalmente un resultado de mejoras en los modelos de solvente continuo y la combinación de mecánica cuántica y métodos de cálculo de energía libre con

mecánica molecular.^[33] Por lo tanto, varios métodos pueden ser empleados para realizar predicciones cuantitativas de propiedades electroquímicas como el potencial de reducción.

6.2.1 Definición de potencial de reducción estándar

Para desarrollar los fundamentos básicos, podemos comenzar considerando la semireacción mostrada en la ec. 6.6, donde A es el reactivo que se reduce. La energía libre de la reacción $\Delta G_{(red)}(A|A^-)$, a una temperatura T puede ser expresada como:^[33]

$$\Delta G_{(red)}(A|A^-) = \Delta G_{(red)}^\circ(A|A^-) + R_g T \ln \frac{\alpha_{A^-}}{\alpha_A} \quad (6.11)$$

donde R_g es la constante de los gases ideales, $\Delta G_{(red)}^\circ$ es la energía estándar de Gibbs de la reacción y α_x es la concentración efectiva de X (siendo X A o A^-).

El potencial de reducción absoluto E_{Abs} está definido por la ecuación de Nernst.^[34]

$$E_{Abs}(A|A^-) = -\frac{\Delta G_{(red)}(A|A^-)}{neF} = E_{Abs}^\circ(A|A^-) - \frac{R_g T}{neF} \ln \frac{\alpha_{A^-}}{\alpha_A} \quad (6.12)$$

donde F es la constante de Faraday y E_{Abs}° es el potencial de reducción estándar, relacionado con la $\Delta G_{(red)}^\circ$ de la reacción por la siguiente ecuación

$$\Delta G_{(red)}^\circ(A|A^-) = -neFE_{Abs}^\circ(A|A^-) \quad (6.13)$$

Note que E_{Abs}° es el potencial absoluto estándar de una semireacción redox (ec. 6.6), en la cual las especies presentan concentraciones estándar de 1 mol L⁻¹. Sin embargo, el potencial de reducción experimental de una semireacción nunca es

medido de manera aislada, sino que es relativo a otro potencial de referencia. Estos potenciales de referencia están asociados a los potenciales de los electrodos empleados en los experimentos de voltamperometría. Entre los electrodos de referencia más comunes podemos mencionar al electrodo normal de hidrógeno (NHE, de sus siglas en inglés), electrodo de calomel saturado (SCE, de sus siglas en inglés), y el electrodo de cloruro de plata (ACE, de sus siglas en inglés).^[35] La escala de potenciales moderna está basada en el NHE, el cual es un electrodo hipotético inmerso en una solución acuosa de H^+ de concentración 1M.^[36]

Las constantes de conversión entre diferentes electrodos de referencia en fase acuosa y en solventes orgánicos han sido medidas, y pueden ser empleadas para definir el potencial relativo de un electrodo de referencia distinto al NHE.

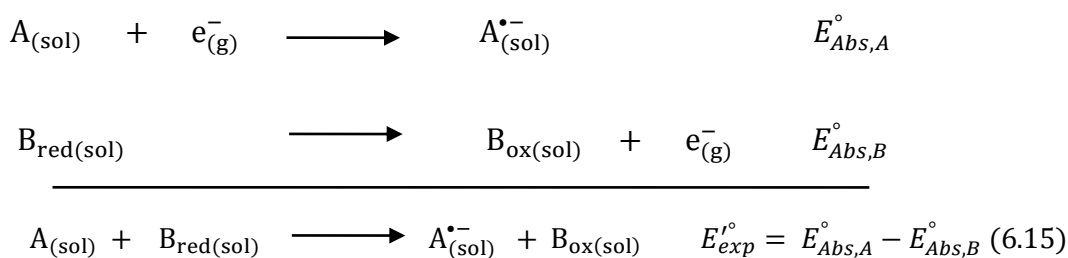
El potencial de reducción experimental de la semireacción $A|A^-$ puede ser definido en relación a un electrodo de referencia:

$$E'_{exp}(A|A^-) = E^{\circ}_{Abs}(A|A^-) - E^{\circ}_{Abs}(REF) \quad (6.14)$$

donde E°_{Abs} es calculado usando energía libre estándar de la correspondiente semireacción según la ec. 6.13.

Como se mencionó anteriormente, el potencial de reducción puede ser calculado a partir del cambio de energía libre estándar para una semireacción. La energía libre de la reacción es computada como la diferencia en la energía libre de productos y reactivos, y está compuesta por la suma de $-AE$ y el cambio en las energías libres de solvatación como se muestra en la ec. 6.8 que derivan del ciclo termodinámico mostrado en el Esquema 6. 2.

Una alternativa para calcular el $E'_{exp}(A|A^-)$ es computar la semireacción complementaria de oxidación de una especie B y calcular el potencial de reducción empleando el Esquema 6. 3.



Esquema 6. 3. Empleo de una reacción de oxidación como referencia interna.

De esta manera, empleando una reacción de referencia interna se puede computar potenciales de reducción con una buena exactitud.

Anteriormente, se ha mencionado qué procedimientos pueden emplearse para determinar la AE cuando el anión formado, A^- , es menos estable que la molécula neutra precursora A . En la próxima sección se discutirá cómo son aplicados algunos modelos en los que al solvente se lo considera como un dieléctrico continuo (solvente implícito) para determinar la energía de solvatación ($\Delta\Delta G_{solv}^\circ$) y por consiguiente, el potencial de reducción.

6.2.2 Protocolos basados en solvente implícito

En esta sección se discutirán algunos aspectos relacionados a la aplicación de métodos cuánticos, con modelos de solvente implícito, para el cálculo de potenciales de reducción de moléculas orgánicas e inorgánicas.

Como primer ejemplo, podemos mencionar lo realizado por Baik y Friesner en el año 2002.^[37] En el trabajo informado, se han calculado potenciales de reducción de moléculas orgánicas, metalocenos y complejos de metales de transición con bipyridina como ligando. Los cálculos se han llevado a cabo empleando un modelo de solvente implícito para agua, acetonitrilo, dimetilformamida y diclorometano empleando el funcional B3LYP con las bases triple- ζ de Dunning (cc-pVTZ(-f)++). Para los valores calculados, se obtuvieron

desviaciones media de 0,15 V respecto a los valores experimentales.ⁱ Similarmente, Fu y colaboradores han empleado también el funcional B3LYP con el modelo de solvente de Tomasi (D-PCM)^[38] para estimar el potencial de reducción de 270 moléculas orgánicas con una desviación estándar de 0,17 V.^[39] En el año 2011, Sviatenko y colaboradores han determinado potenciales de reducción estándar empleando un conjunto de moléculas orgánicas que incluyen quinonas, nitro compuestos y azaciclos.^[40] Para esto, los autores han evaluado el desempeño de varios funcionales, bases y modelos de solvente, encontrando que los mejores resultados fueron alcanzados con el funcional M05-2X, bases triple- ζ y el modelo de solvente continuo SMD.^[41]

Recientemente, Marenich y colaboradores han informado un estudio en fase acuosa en el cual evaluaron el procedimiento compuesto G3(MP2,CC)(+) y los modelos de solvente C-PCM(UAHF/UAKS), SMD y COSMO-RS.^[33] Para este análisis, seleccionaron 53 moléculas orgánicas con distintas funcionalidades como nitroxido, fenoles, hidroquinonas, aminas alifáticas, anilinas y compuestos organosulfurados. Los autores encontraron que el desempeño de los distintos modelos de solvente depende de los tipos de compuestos estudiados. Todos los modelos de solvente presentaron un buen desempeño para aminas y nitróxidos, donde la desviación media va desde 0,05 a 0,200 V. En cambio, para alcoholes los modelos presentaron desviaciones mayores que van desde 0,200 a 0,350 V. En términos generales, las desviaciones para todo el conjunto de moléculas fueron de 0,190, 0,230, 0,210 y 0,190 V para los modelos C-PCM(UAHF), C-PCM(UAKS), SMD y COSMO-RS, respectivamente.

Konezny y colaboradores han discutido acerca de las formas de reducir errores sistemáticos de los métodos de DFT usando el ciclo de Born-Haber (Esquema 6. 2) para determinar potenciales de reducción de complejos de metales de transición.^[42] Ellos han concluido que se pueden predecir valores de potenciales de reducción con un modesto nivel de DFT, en particular B3LYP/6-311G(d) combinado con el modelo de solvente incorporado en el programa *Jaguar*. Para esto, es necesario calcular, con el mismo nivel de teoría, el potencial de reducción de una semireacción redox de referencia como ferrocenio/ferroceno (ver Esquema 6. 3).

ⁱ Si se intercambia un electrón en la reacción redox se tiene:
 $1\text{V} = 1\text{eV} = 23,06037\text{ kcal/mol}$

Analizando los ejemplos citados en esta sección, se puede notar que hay algunos parámetros que pueden impactar sustancialmente sobre la exactitud de un protocolo de predicción de potenciales de reducción. Particularmente los protocolos son sensibles al nivel de teoría empleado, modelo de solvente implícito y los valores referencia para $E_{Abs}^{\circ}(REF)$.

Por otro lado, en bibliografía hay numerosos estudios en los cuales informan métodos con una alta exactitud en el cálculo de potenciales de reducción restringidos a una clase específica de compuestos pero estos protocolos aun requieren mayor desarrollo para poder llevar a cabo predicciones generales.^[33]

6.3 Bibliografía

1. Sherrill, C.D. Frontiers in electronic structure theory. *The Journal of Chemical Physics*, 2010, **132** (11), p. 110902.
2. Burke, K. Perspective on density functional theory. *The Journal of Chemical Physics*, 2012, **138** (15), p. 150901.
3. Rossi, R.A.; Pierini, A.B. y Peñéñory, A.B. Nucleophilic Substitution Reactions by Electron Transfer. *Chemical Reviews*, 2003, **103** (1), p. 71.
4. Pierini, A.B. y Vera, D.M.A. Ab Initio Evaluation of Intramolecular Electron Transfer Reactions in Halobenzenes and Stabilized Derivatives. *The Journal of Organic Chemistry*, 2003, **68** (24), p. 9191.
5. Borosky, G.L.; Nishimoto, S.-i. y Pierini, A.B. Radical anions from 5-fluorouracil derivatives. A theoretical study of their cleavage and orbital isomerism. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 2000, **499** (1-3), p. 151.
6. Sommerfeld, T. Electron-induced Chemistry of 5-Chlorouracil. *ChemPhysChem*, 2001, **2** (11), p. 677.
7. Pople, J.A.; Head-Gordon, M.; Fox, D.J.; Raghavachari, K. y Curtiss, L.A. Gaussian-1 theory: A general procedure for prediction of molecular energies. *The Journal of Chemical Physics*, 1989, **90** (10), p. 5622.
8. Curtiss, L.A.; Redfern, P.C.; Raghavachari, K. y Pople, J.A. Assessment of Gaussian-2 and density functional theories for the computation of ionization potentials and electron affinities. *The Journal of Chemical Physics*, 1998, **109** (1), p. 42.
9. Curtiss, L.A.; Raghavachari, K.; Redfern, P.C. y Pople, J.A. Assessment of Gaussian-3 and density functional theories for a larger experimental test set. *The Journal of Chemical Physics*, 2000, **112** (17), p. 7374.
10. Curtiss, L.A.; Redfern, P.C. y Raghavachari, K. Assessment of Gaussian-3 and density-functional theories on the G3/05 test set of experimental energies. *The Journal of Chemical Physics*, 2005, **123** (12), p. 124107.
11. Korth, M. y Grimme, S. "Mindless" DFT Benchmarking. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2009, **5** (4), p. 993.
12. Ho, J. y Coote, M.L. A universal approach for continuum solvent pKa calculations: are

we there yet? *Theoretical Chemistry Accounts*, 2009, **125** (1-2), p. 3.

13. Ho, J. Are thermodynamic cycles necessary for continuum solvent calculation of pK_as and reduction potentials? *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2015, **17** (4), p. 2859.
14. Alongi, K.S. y Shields, G.C., *Chapter 8 - Theoretical Calculations of Acid Dissociation Constants: A Review Article*, in *Annual Reports in Computational Chemistry*, A.W. Ralph, Editor 2010, Elsevier. p. 113.
15. Kelly, C.P.; Cramer, C.J. y Truhlar, D.G. Adding explicit solvent molecules to continuum solvent calculations for the calculation of aqueous acid dissociation constants. *The Journal of Physical Chemistry. A*, 2006, **110** (7), p. 2493.
16. Pliego, J.R. y Riveros, J.M. Theoretical Calculation of pK_a Using the Cluster-Continuum Model. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2002, **106** (32), p. 7434.
17. Uddin, N.; Choi, T.H. y Choi, C.H. Direct absolute pK_a predictions and proton transfer mechanisms of small molecules in aqueous solution by QM/MM-MD. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 2013, **117** (20), p. 6269.
18. Liptak, M.D.; Gross, K.C.; Seybold, P.G.; Feldgus, S. y Shields, G.C. Absolute pK_a Determinations for Substituted Phenols. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, **124** (22), p. 6421.
19. Parr, R.G.; Szentpály, L.v. y Liu, S. Electrophilicity Index. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, **121** (9), p. 1922.
20. Rienstra-Kiracofe, J.C.; Barden, C.J.; Brown, S.T. y Schaefer, H.F. Electron Affinities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2001, **105** (3), p. 524.
21. Rienstra-Kiracofe, J.C.; Tschumper, G.S.; Schaefer, H.F.; Nandi, S. y Ellison, G.B. Atomic and Molecular Electron Affinities: Photoelectron Experiments and Theoretical Computations. *Chemical Reviews*, 2002, **102** (1), p. 231.
22. Gonzales, J.M.; Barden, C.J.; Brown, S.T.; Schleyer, P.v.R.; Schaefer, H.F. y Li, Q.-S. Cyclopentadiene Annulated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Investigations of Electron Affinities. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, **125** (4), p. 1064.
23. Jordan, K.D. y Burrow, P.D. Temporary anion states of polyatomic hydrocarbons. *Chemical Reviews*, 1987, **87** (3), p. 557.

24. Simons, J. Molecular Anions. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2008, **112** (29), p. 6401.
25. Vera, D.M.A. y Pierini, A.B. Species with negative electron affinity and standard DFT methods. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2004, **6** (11), p. 2899.
26. Baboul, A.G.; Curtiss, L.A.; Redfern, P.C. y Raghavachari, K. Gaussian-3 theory using density functional geometries and zero-point energies. *The Journal of Chemical Physics*, 1999, **110** (16), p. 7650.
27. De Proft, F. y Geerlings, P. Calculation of ionization energies, electron affinities, electronegativities, and hardnesses using density functional methods. *The Journal of Chemical Physics*, 1997, **106** (8), p. 3270.
28. Jensen, F. Describing Anions by Density Functional Theory: Fractional Electron Affinity. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2010, **6** (9), p. 2726.
29. Tozer, D.J. y De Proft, F. Computation of the Hardness and the Problem of Negative Electron Affinities in Density Functional Theory. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2005, **109** (39), p. 8923.
30. De Proft, F.; Sablon, N.; Tozer, D.J. y Geerlings, P. Calculation of negative electron affinity and aqueous anion hardness using Kohn-Sham HOMO and LUMO energies. *Faraday Discussions*, 2007, **135** (0), p. 151.
31. Puiatti, M.; Vera, D.M.A. y Pierini, A.B. In search for an optimal methodology to calculate the valence electron affinities of temporary anions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2009, **11** (40), p. 9013.
32. Puiatti, M.; Vera, D.M.A. y Pierini, A.B. Species with negative electron affinity and standard DFT methods. Finding the valence anions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2008, **10** (10), p. 1394.
33. Marenich, A.V.; Ho, J.; Coote, M.L.; Cramer, C.J. y Truhlar, D.G. Computational electrochemistry: prediction of liquid-phase reduction potentials. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2014, **16** (29), p. 15068.
34. Ciobanu, M.; Wilburn, J.P.; Krim, M.L. y Cliffel, D.E., *1 - Fundamentals*, in *Handbook of Electrochemistry*, C.G. Zoski, Editor 2007, Elsevier: Amsterdam. p. 3.
35. Biegler, T. y Woods, R. The standard hydrogen electrode. A misrepresented concept. *Journal of Chemical Education*, 1973, **50** (9), p. 604.
36. Trasatti, S. The absolute electrode potential: an explanatory note *Pure and Applied*

Chemistry, 1986, **58**, p. 955.

37. Baik, M.-H. y Friesner, R.A. Computing Redox Potentials in Solution: Density Functional Theory as A Tool for Rational Design of Redox Agents. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2002, **106** (32), p. 7407.
38. Barone, V.; Cossi, M. y Tomasi, J. A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model. *The Journal of Chemical Physics*, 1997, **107** (8), p. 3210.
39. Fu, Y.; Liu, L.; Yu, H.-Z.; Wang, Y.-M. y Guo, Q.-X. Quantum-Chemical Predictions of Absolute Standard Redox Potentials of Diverse Organic Molecules and Free Radicals in Acetonitrile. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127** (19), p. 7227.
40. Sviatenko, L.; Isayev, O.; Gorb, L.; Hill, F. y Leszczynski, J. Toward robust computational electrochemical predicting the environmental fate of organic pollutants. *Journal of Computational Chemistry*, 2011, **32** (10), p. 2195.
41. Marenich, A.V.; Cramer, C.J. y Truhlar, D.G. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2009, **113** (18), p. 6378.
42. Konezny, S.J.; Doherty, M.D.; Luca, O.R.; Crabtree, R.H.; Soloveichik, G.L. y Batista, V.S. Reduction of Systematic Uncertainty in DFT Redox Potentials of Transition-Metal Complexes. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2012, **116** (10), p. 6349.

CAPITULO 7

ESTUDIO DEL DESEMPEÑO DE FUNCIONALES DE DFT PARA EL MODELADO DE ANIONES

ESTUDIO DEL DESEMPEÑO DE FUNCIONALES DE DFT PARA EL MODELADO DE ANIONES.....	169
7.1 Objetivos específicos	171
7.2 Metodología	171
7.2.1 Cálculo directo de la <i>AE</i>	172
7.2.2 <i>AE</i> obtenidas por extrapolación.....	173
7.2.3 Cálculo de los potenciales de reducción	173
7.3 Resultados y discusión.....	173
7.3.1 Cálculo de <i>AEs</i>	174
7.3.2 Calculo de potenciales de reducción.....	181
7.4 Conclusiones	186
7.5 Bibliografía.....	188

7.1 Objetivos específicos

Como objetivo de este capítulo se plantea estudiar el desempeño de 23 funcionales de DFT y el método *ab initio* MP2, en el modelado de aniones inestables. Para encontrar los mejores funcionales y evaluar sus ventajas y limitaciones, se propone emplear como indicador el cálculo de *AEs* y potenciales de reducción de moléculas (especies) orgánicas de tamaño medio.

Respecto a los cálculos de las *AEs* se propone evaluar el rendimiento de los funcionales empleando un conjunto de 60 moléculas con valores negativos de afinidad. Además, para aquellos aniones en los cuales el estado tipo N sea el más estable se propone emplear la metodología de desolvatación por extrapolación para obtener los valores de *AE* informados experimentalmente que corresponden a aniones tipo V.

Por otra parte, respecto al cálculo de potenciales de reducción, se seleccionaron 57 moléculas orgánicas con distintos grupos funcionales con un rango de potenciales que va desde -2,71 V a 0,06 V (vs. NHE).

7.2 Metodología

Entre los funcionales DFT, los de la familia GGA incluidos en el análisis fueron BLYP, BPW91, PW91 y B97D. Los meta GGA seleccionados fueron TPSS y M06-L. De la familia de los funcionales híbridos, además del popular B3LYP, se evaluaron B3PW91, BHHLYP y PBE0, entre otros. También, se incluyeron los funcionales doble híbridos B2PLYP y mPW2PLYP.

El modelado de las especies involucradas en las determinaciones de *AEs* y potenciales de reducción fue llevado a cabo empleando los funcionales, bases y modelos de solvatación implementados en el programa *Gaussian 09* versión B.01.^[1]

7.2.1 Cálculo directo de la AE

El procedimiento que fue seguido para el cómputo de las AEs ha sido ya previamente empleado en bibliografía.^[2-4] Esta propiedad fue calculada como la diferencia de energía entre la molécula neutra y el anión o RA, según corresponda, como se mostró en las ecuaciones 6.4 y 6.5 del capítulo anterior. Para comodidad del lector a continuación se muestran nuevamente estas ecuaciones.

$$AEV = E_{(neutra\ optimizada)} - E_{(anión\ sobre\ la\ geometría\ de\ la\ neutra)} \quad (6.4)$$

$$AEA = E_{(neutra\ optimizada)} - E_{(anión\ optimizado)} + \Delta CPC_{(neutra-anión)} \quad (6.5)$$

Para el cálculo de la AEs verticales (AEV), la molécula neutra se optimizó y se caracterizó el mínimo de energía mediante el cálculo de frecuencia empleando el funcional correspondiente y la base de Pople 6-31+G*. Posteriormente, se llevó a cabo un cálculo *single point* (sin optimización de geometría) de energía con la base 6-311+G(2df,p). En el modelado del anión se tomó la geometría optimizada de la molécula neutra y se realizó un cálculo *single point* con el método UHF. A la función de onda obtenida en este cálculo se la tomó como *guess* inicial, y se realizó un primer cálculo *single point* con el funcional correspondiente y la base 6-31+G*. Posteriormente, se llevó a cabo nuevamente un cálculo de la energía (sin optimización), pero en este caso empleando la base extendida 6-311+G(2df,p). Empleando la función de onda del cálculo UHF se disminuyó el número de aniones tipo N para los funcionales elegidos.

En cambio, para las AEs adiabáticas (AEA) las especies aniónicas y neutras fueron optimizadas y se obtuvieron las frecuencias empleando el funcional deseado y la base 6-31+G*. Luego, se realiza un cálculo *single point* de la energía con la base 6-311+G(2df,p). En este caso, para el cálculo de las AEA se incluyeron las correcciones de punto cero (CPC) para la especie aniónica y la molécula neutra.

7.2.2 AE obtenidas por extrapolación

Para aquellos compuestos con AE muy negativas, propensos a dar aniones del tipo N para la mayoría de los funcionales, se llevó a cabo la determinación de esta propiedad empleando la metodología de desolvatación por extrapolación desarrollada en la sección 6.1.1.1. Todas las especies involucradas fueron optimizadas y se determinaron las frecuencias empleando el funcional adecuado, la base 6-31+G* y el modelo de solvente IEF-PCM. Posteriormente, se efectuó un cálculo *single point*, también en solvente, con la base extendida 6-311+G(2df,p). Para la determinación del $\Delta G_{(red)}^\circ$ (ver ecuaciones 6.7 y 6.8 de la sección 6.1.1.1) se incluyeron las CPC para las especies aniónica y neutra. Los solventes empleados fueron: agua ($\epsilon = 78,4$), dimetilsulfoxido ($\epsilon = 46,7$), acetona ($\epsilon = 20,7$), 1,2 dicloroetano ($\epsilon = 10,4$), tetrahidrofurano ($\epsilon = 7,6$), ácido acético ($\epsilon = 6,25$), cloroformo ($\epsilon = 4,9$), dietil éter ($\epsilon = 4,24$), dietilamina ($\epsilon = 3,58$) y benceno ($\epsilon = 2,25$).

7.2.3 Cálculo de los potenciales de reducción

La determinación de E_{Abs}° para cada molécula orgánica del conjunto seleccionado fue llevada a cabo como se describe en la sección anterior. En este caso el solvente empleado es acetonitrilo, debido a que los valores experimentales, tomados de bibliografía, fueron medidos en este medio.

7.3 Resultados y discusión

Para simplificar el análisis de los resultados, esta sección se encuentra dividida en dos partes. La primera está vinculada al desempeño de funcionales en el cálculo de AEs , y la segunda a la evaluación de éstos en el cómputo de potenciales de reducción.

7.3.1 Cálculo de AEs

Para evaluar el desempeño de los funcionales en el cálculo de AEs hemos empleado un conjunto de moléculas orgánicas de tamaño medio que han sido utilizadas anteriormente por nuestro grupo de trabajo.^[2-4] En esta oportunidad, se escogieron 60 moléculas con AE experimental negativa (-0,06 a -3,4 eV), generalmente determinadas por la técnica de ETE.^[5] Este conjunto fue construido tratando de incluir diferentes heteroátomos en sistemas π , elementos del tercer periodo, especies de capa cerrada y abierta, así como también, algunos valores de AEA (las estructuras químicas de todos los compuestos, los valores de AEs experimentales y las referencias correspondientes se muestran en las Figuras B. 1 y B. 2, y en la Tabla B. 1 y B. 2 del Anexo B. Además, subdividimos el conjunto en dos grupos; el grupo 1 está constituido por 37 moléculas con el estado tipo V como más estable para sus aniones, cuando el funcional B3LYP se empleó en el modelado. Por otra parte, el grupo 2 se encuentra conformado por 23 moléculas que mostraron tener al estado tipo N como más estable con el empleo del mismo funcional. En primera instancia, al primer grupo se le determinó la AEs empleando las ecuaciones 6.4 y 6.5. Las AEs del segundo grupo se obtuvieron mediante la metodología de extrapolación por desolvatación desarrollada por Vera y colaboradores.^[2]

Para comenzar con el análisis, se llevo a cabo un primer control de los resultados centrando la atención en la desviación de las AEs calculadas respecto a los valores experimentales. Para esto, se graficó para cada compuesto la diferencia entre los valores calculados y experimentales con todos los funcionales evaluados, un ejemplo es mostrado en la Figura 7. 1. Los gráficos para todas las moléculas estudiadas se muestran en las Figuras B. 3–11 del Anexo B.

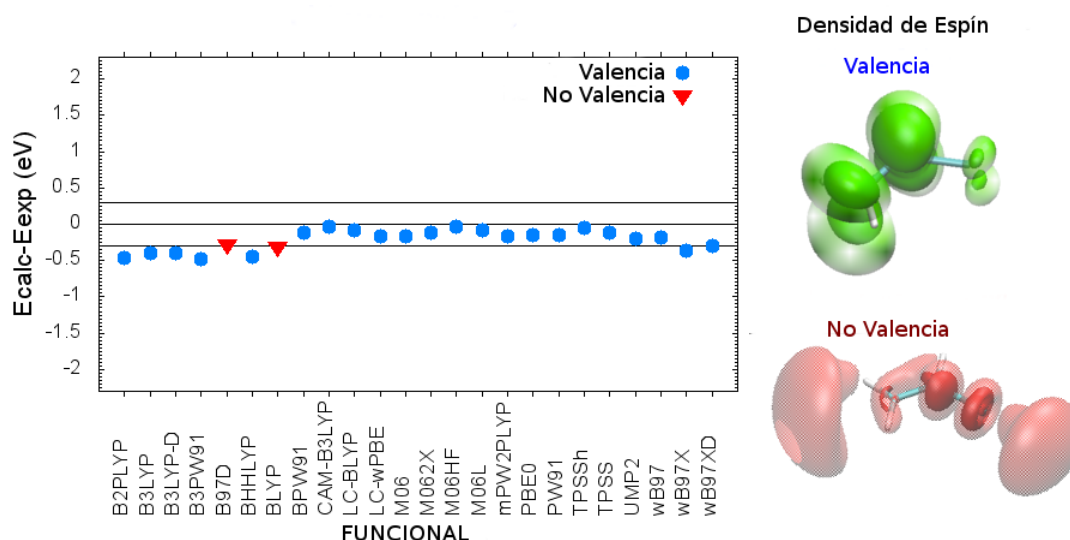


Figura 7. 1. Ejemplo de análisis de las desviaciones entre los valores calculados y experimentales para cloroetileno. Los aniones tipo V son representados mediante círculos celestes y los tipo N con triángulos rojos. Para mostrar las diferencias entre estos aniones se graficó la densidad de espín.

Una desviación sistemática puede indicar dos circunstancias: (i) en el cálculo se obtuvo un estado aniónico diferente al experimental, usualmente cuando el anión obtenido en el cálculo es de tipo N (cabe aclarar que experimentalmente el anión encontrado es del tipo V); (ii) una calidad cuestionable del valor experimental.

Para clasificar a los aniones nos valimos de dos criterios. El primero, consiste en aplicar un análisis de NBO (*natural bond orbital*) para evaluar la contribución de las bases naturales de Rydberg (ver sección 1.1.5 del capítulo 1).^[6] Para los casos límites, con *AEs* muy negativas, se encontró un valor umbral de 0,5. Es decir, aniones con una contribución menor a 0,5 se consideraron de V. Mientras que aquellos con los valores más altos de 0,5 fueron tratados como aniones tipo N. Finalmente, se inspeccionó visualmente la densidad de espín del electrón desapareado para corroborar la naturaleza del estado más estable del anión.

Como primer criterio de evaluación de calidad de los funcionales se utilizó la capacidad de encontrar el estado aniónico tipo V. Para ello, se utilizó la relación de valencia calculada como el número de aniones de V encontrados sobre el total de compuestos evaluados para cada funcional. Como observación general, se

encontró que el empleo de la función de onda HF como *guess* inicial en los cálculos con funcionales DFT mejoró la relación de V en el total de los funcionales. En términos generales, se encontró que cuando la *AE* es menor a -2 eV existen altas posibilidades de encontrar aniones con el estado N como el más estable sin importar el funcional usado.

Para un mejor análisis de los resultados se optó por determinar la desviación media absoluta (DMA), rango de desviaciones y la correlación entre los valores calculados y los valores experimentales (ver Tabla 7. 1). Respecto de la correlación se prestó especial atención a la pendiente, ordena al origen y el coeficiente de correlación (R^2). Los parámetros listados anteriormente se resumen en la Tabla 7. 1. De los 24 métodos evaluados BPW91, B3PW91, B3LYP y B3LYP-D presentan una DMA menor o igual a 0,1 eV (valor habitual para el error experimental). Los funcionales BLYP, PW91, B97D, TPSS, CAM-B3LYP, PBE0, TPSSh y M06 deben ser considerados en un segundo grupo con DMA entre 0,1 y 0,15 eV. Por su parte, MP2 arrojó valores de DMA que demuestran que no es un buen método para el cálculo de *AEs*, resultados similares han sido informados por Vera y colaboradores.^[4] Esta no es una observación menor ya que MP2 es empleado en métodos compuestos como G1-3 y por lo tanto se debería tener cuidado al emplear estos métodos para el modelado de especies aniónicas.^[7-9] Por último, los funcionales doble híbridos (mPW2PLYP y B2PLYP) también pueden ser incluidos en el grupo de los funcionales no recomendados, junto con MP2, ya que arrojaron valores de DMA superiores a 0,35 eV.

El rango de desviaciones puede ser empleado para evaluar la dispersión de los valores de *AEs* calculados. Una baja dispersión de 0,32 a ~0,40 eV fue encontrada para los funcionales GGA híbridos (CAM-B3LYP, ω -B97XD, BHHLYP, B3PW91 y PBE0), los meta GGA híbridos (M06, M06-2X y TPSSh) y el funcional meta GGA M06-L. Mientras que una alta dispersión fue observada para los funcionales doble híbridos (~0,45 eV) y los GGA puros (~0,45 a 0,60 eV).

Para una interpretación completa de los resultados es conveniente observar, como indicadores de un buen desempeño, a la pendiente, la ordenada al origen y el R^2 de las regresiones entre los valores calculados y experimentales. El método ideal debería dar una pendiente igual a 1 y una ordenada igual a 0. En

aquellos casos con valores de DMAs aceptables (entre 0,1 y 0,2 eV), un rango de desviación menor a 0,40 eV y valores para la pendiente que van desde 0,95 hasta 1,07 se registraron valores altos en la ordenada al origen poniendo en evidencia una desviación de los valores calculados. Para verificar este tipo de errores se analizó el gráfico de la regresión entre los valores calculados y experimentales incluyendo el ajuste ideal y el histograma de los residuales para cada funcional. Como ejemplo, podemos ver los resultados para el funcional B3PW91 que se presentan en la Figura 7. 2.

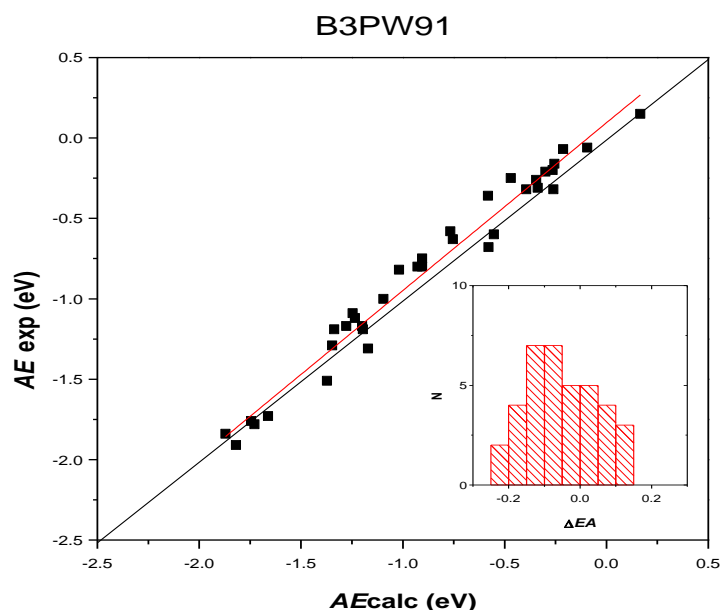


Figura 7. 2. Correlación entre los valores de *AE* experimentales y predichos por el funcional B3PW91. La lineal negra representa la correlación ideal y la roja la regresión de los valores calculados.

Como puede verse en la Figura 7. 1, existen desviaciones entre los valores experimentales y los calculados. Ahora bien, el análisis de los residuales para cada compuesto, y el histograma de distribución de los residuales para cada método no mostró una desviación sistemática significativa para la mayoría de los funcionales, excepto para las variantes de ω -B97, los funcionales M06, LC-BLYP y BHHLYP, así como los doble híbridos y MP2. Para estos métodos se observó una tendencia a dar valores de *AEs* más negativas que las experimentales.

Tabla 7. 1. Resultados de los cálculos de las AEs de los compuestos del grupo-1 ($AE > -1.5$ eV) para cada funcional.

Familia	Funcional	DMA (eV) ^a	Rango (eV) ^b	Relación de V ^c	Pendiente	Ordenada al origen	R ²
GGA puros	BLYP	0,11	0,60	0,45	0,960	0,020	0,90
	BPW91	0,09	0,49	0,65	1,006	0,005	0,95
	PW91	0,12	0,49	0,48	0,971	-0,105	0,94
	B97D	0,12	0,53	0,56	0,962	0,029	0,97
Meta GGA	M06-L	0,27	0,40	0,87	0,963	0,235	0,97
	TPSS	0,11	0,47	0,52	0,980	0,063	0,95
GGA híbridos	LC-BLYP	0,20	0,54	0,85	1,000	0,199	0,97
	B3PW91	0,10	0,36	0,90	1,043	0,094	0,97
	B3LYP	0,10	0,52	0,95	1,073	0,078	0,96
	B3LYP-D	0,09	0,43	0,90	1,046	0,047	0,97
	CAM-B3LYP	0,12	0,32	0,90	1,050	0,164	0,98
	BHLYP	0,31	0,34	0,87	1,029	0,341	0,98
	ω -B97	0,27	0,57	0,92	0,922	0,181	0,97
	ω -B97X	0,29	0,41	0,95	1,003	0,290	0,92
	ω -B97XD	0,20	0,32	0,95	0,980	0,180	0,98
	PBE0	0,12	0,38	0,95	1,056	0,153	0,98
LC- ω PBE	0,17	0,50	0,87	0,963	0,119	0,98	
Meta GGA híbridos	TPSSh	0,15	0,39	0,87	0,963	0,235	0,97
	M06	0,11	0,32	0,80	0,967	0,066	0,97
	M06-2X	0,18	0,37	0,90	0,981	0,160	0,98
	M06-HF	0,16	0,47	0,82	0,922	0,048	0,97
Doble híbridos	B2PLYP	0,38	0,47	0,95	1,063	0,482	0,97
	mPW2PLYP	0,38	0,44	0,95	1,073	0,482	0,97
<i>Ab initio</i>	MP2	0,89	1,02	0,87	0,957	0,810	0,86

^aDMA entre valores cauculados y experimentales de AEs para aniones tipo V. ^bAniones tipo V sobre el total de compuestos. ^cDispersión de los valores calculados determinada como la diferencia entre la desviación más grande y más pequeña.

Analizando los resultados de la tabla anterior es posible en principio identificar cual es el mejor funcional para tratar el problema en cuestión. Se puede pensar que el funcional más preciso es aquel con una menor DMA y rango de desviaciones. Mientras que el funcional con una pendiente y ordena al origen cercana a la ideal (1,00 y 0,00, respectivamente) puede considerarse más exacto. De acuerdo con esta idea, los funcionales GGA puros son buenos en términos de exactitud pero no en cuanto a la precisión como se refleja en sus valores de dispersión (además de bajos valores de relación de V). Entre los funcionales GGA

híbridos, ω -B97XD, CAM-B3LYP, B3PW91, BHHLYP y PBE0 fueron los mejores en términos de precisión, pero B3PW91 es el que combina buena exactitud y precisión. Finalmente, se pueden seleccionar a TPSS y M06 como los mejores meta GGA y meta GGA híbrido, respectivamente. De los datos recolectados, pueden ser considerados otros aspectos y examinar cómo impacta la naturaleza del funcional en su desempeño. Se analizó cómo afectan al modelado de estos aniones inestables la incorporación de efectos de largo alcance (LC, de sus sigla en inglés), correcciones de van der Waals “D” y la incorporación de términos de HF de distinto peso en la componente de intercambio. En aquellos funcionales donde se incorporan correcciones de largo alcance (LC-BLYP vs. BLYP y CAM-B3LYP vs. B3LYP) se obtuvieron valores de DMAs más altos y una subestimación de las AEs que se vió reflejado en un incremento de la ordenada al origen. Por otra parte, cuando adicionan correcciones de dispersión (B3LYP vs. B3LYP-D o ω -B97 vs. ω -B97XD) hubo una mejora en los parámetros de evaluación para estos funcionales. Finalmente, como ya ha sido informado por Jensen,^[10] el incremento de la contribución de HF en el término de intercambio mejora la relación de V (BLYP, B3LYP y BHHLYP o PW91, BPW91 y B3PW91). Sin embargo, esto no es completamente cierto para la familia M06 con diferentes contribuciones de HF en la componente de intercambio (0 %, 27 %, 54 % y 100 % para M06-L, M06, M06-2X y M06-HF, respectivamente). De esta familia, los funcionales con mejor desempeño fueron M06 y M06-HF.

Para las moléculas del grupo-2 no se pudieron encontrar los estados aniónicos tipo V (figura B. 2 y la Tabla B. 2 del Anexo B). Para estos compuestos conflictivos, con AEs menores a -1,5 eV, se empleó la metodología de extrapolación estabilizando el estado tipo V de los aniones mediante la utilización de un modelo de solvente continuo polarizable. Como puede verse en la Tabla 7. 2 los funcionales doble híbridos y el método *ab initio* MP2 no se incluyeron en esta ocasión debido a que no presentaron un buen desempeño en fase gaseosa para los casos más simples.

La capacidad de estabilizar los aniones V para la obtención de las AEs también se evaluó para cada funcional, una vez más a través de la relación de V. Para algunos casos límite como 2-butino (-3,43 eV), tetrafluoretileno (-3,00 eV),

acetonitrilo (-2,82 eV), etilisocianato (-2,63 eV) y dimetiformamida (-2,40 eV) fue imposible obtener aniones tipo V en los solventes estudiados para la mayoría de los funcionales, por esta razón se observaron bajos valores en la relación de V. Dado que las AEs de estos compuestos son más difíciles de calcular, se esperan valores de DMAs más grandes y un empobrecimiento en las correlaciones entre los valores calculados y experimentales, en comparación al grupo anteriormente analizado ($AE > -1,5$ eV).

Tabla 7. 2. Resultados de los cálculos de las AEs de los compuestos del grupo-2 ($AE < -1.5$ eV) para cada funcional.

Familia	Funcional	DMA (eV) ^a	Relación de V ^b	ΔE vs. $1/\epsilon$ Ajuste	Valor Limite (eV)
GGA Puro	BLYP	0,16	0,43	lineal	-2,1
	BPW91	0,14	0,61	cuadrático	-3,0
	PW91	0,17	0,61	lineal	-2,3
	B97D	0,15	0,35	cuadrático	-2,1
Meta GGA	TPSS	0,14	0,61	lineal	-2,4
	M06-L	0,15	0,61	cuadrático	-2,3
GGA híbridos	LC-BLYP	0,09	0,65	cuadrático	-2,3
	B3PW91	0,23	0,70	lineal	-3,4
	B3LYP	0,15	0,70	cuadrático	-2,2
	B3LYP-D	0,14	0,61	cuadrático	-2,3
	CAM-B3LYP	0,11	0,57	cuadrático	-2,4
	BHLYP	0,14	0,65	cuadrático	-2,4
	ω -B97	0,19	0,43	cuadrático	-2,3
	ω -B97X	0,13	0,56	cuadrático	-2,3
	ω -B97XD	0,11	0,56	cuadrático	-2,3
	PBE0	0,09	0,61	cuadrático	-3,0
	LC- ω PBE	0,10	0,65	cuadrático	-2,8
Meta GGA híbridos	TPSSh	0,09	0,57	cuadrático	-2,3
	M06	0,13	0,57	cuadrático	-2,2
	M06-2X	0,12	0,65	cuadrático	-2,3
	M06-HF	0,12	0,74	cuadrático	-2,8

^aDMA entre valores cauculados y experimentales de AEs. ^bAniones tipo V sobre el total de compuestos.

La extrapolación puede ser lineal o cuadrática como se detalla en la Tabla 7. 2. En términos generales se obtienen mejores resultados con la extrapolación cuadrática en la mayoría de los funcionales.

En la Tabla 7. 2 se informan valores límites de AEs para cada funcional, este es un valor umbral por debajo del cual se obtuvieron solo aniones tipo N.

Para la mayoría de los funcionales, el valor límite alcanzado fue de -2,4 eV, aunque para algunos funcionales (BPW91, B3PW91, PBE0, LC- ω PBE y M06-HF) se pudieron registrar valores más negativos a expensas de altos valores de desviaciones de los valores calculados que van desde $\sim 0,2$ a $0,3$ eV. Estas desviaciones se vieron reflejadas en valores muy negativos en la ordenada al origen (-0.15 a -0.4 eV) y un bajo coeficiente de correlación en comparación con los resultados de la Tabla 7. 1.

En resumen, para estos casos límites con *AEs* menores a -1,5 eV el funcional GGA puro recomendado es BPW91, y TPSS como el mejor meta GGA. En cuanto a los funcionales GGA híbridos LC-BLYP y LC- ω PBE mostraron un mejor desempeño. Por su parte, M06-HF fue el mejor entre el grupo de los meta GGA híbridos. En este caso, se pudo ver que la inclusión de correcciones de largo alcance (LC y CAM) y de van der Waals mejoraron los valores de DMA. Además, se pudo notar que la contribución de HF, en el funcional de intercambio, mejoran la relación de *V* (BLYP vs. B3LYP y BHLYP, o M06-L vs. M06-2X y M06-HF, o PW91, BPW91 vs. B3PW91).

7.3.2 Calculo de potenciales de reducción

Para el trabajo expuesto en esta sección se tuvo especial cuidado en la elección de los datos experimentales. Esto se debe a que en estas determinaciones existen algunas variables como el solvente, electrodo de referencia, fuerza iónica, electrolito soporte, entre otras, que pueden contribuir a desviaciones entre lo calculado y lo experimental.

Para llevar a cabo el análisis de desempeño de los funcionales, se seleccionaron potenciales de reducción que hayan sido determinados en acetonitrilo con el electrodo de referencia SCE o NHE. Se eligieron datos que hayan sido medidos en este medio ya que acetonitrilo es uno de los solventes orgánicos más empleados en los experimentos electroquímicos. El conjunto de datos está conformado por 57 moléculas (neutras y radicales) con diferentes grupos funcionales que cubren un amplio rango de valores experimentales

(desde 0,06 V a -2,71 V). Todas las moléculas del conjunto son incluidas en las Figuras B. 12 y 13 y en las Tablas B. 3 y 4 del Anexo B con las correspondientes referencias y valores experimentales.

El desempeño de todos los funcionales se muestran en la Tabla 7. 3. En este caso el método *ab initio* MP2 y los funcionales dobles híbridos B2PLYP y mPW2PLYP no se incluyeron en el estudio debido a su mal desempeño en el cómputo de las AEs, uno de los términos de la $\Delta G_{(red)}^{\circ}$ (ver ec. 6.7 y 6.8 del capítulo 6). Para evaluar los métodos se llevó a cabo la correlación entre los valores de E_{abs}^0 y E_{exp}^0 vs. los datos experimentales colectados. Los valores se calcularon empleando las ecuaciones 6.13 y 6.15 expuestas en la sección 6.2.1 del capítulo anterior.

Tabla 7. 3. Resultados del cálculo de los potenciales de reducción para todos los funcionales.

Familia	Funcional	DMA (V) ^a	Rango (V) ^b	Pendiente	E_{abs}^0 Ordenada al Origen	R ²	E_{exp}^0 Ordenada al origen
GGA puro	BLYP	0.13	0.59	1.010	-4.21	0.956	0.108
	BPW91	0.15	0.55	1.019	-4.39	0.967	0.174
	PW91	0.15	0.56	1.017	-4.44	0.966	0.162
	B97D	0.14	0.57	1.027	-4.34	0.964	0.170
Meta GGA	TPSS	0.14	0.62	1.008	-4.29	0.959	0.123
	M06-L	0.14	0.62	1.012	-4.26	0.968	0.149
GGA híbridos	LC-BLYP	0.17	0.97	0.902	-4.00	0.897	-0.133
	B3PW91	0.14	0.57	0.980	-4.29	0.954	0.070
	B3LYP	0.13	0.69	0.963	-4.20	0.942	0.005
	B3LYP-D	0.13	0.69	0.967	-4.21	0.942	0.009
	CAM-B3LYP	0.15	0.80	0.935	-4.09	0.924	-0.062
	BHHLYP	0.18	1.01	0.900	-3.82	0.884	-0.116
	ω -B97	0.14	0.76	0.961	-4.12	0.928	-0.006
	ω -B97X	0.14	0.74	0.951	-4.11	0.929	-0.034
	ω -B97XD	0.13	0.69	0.955	-4.13	0.941	-0.020
	PBE0	0.14	0.54	0.978	-4.24	0.952	0.069
	LC- ω PBE	0.17	0.77	0.958	-4.22	0.919	0.033
	TPSSh	0.14	0.58	0.985	-4.21	0.950	0.074
Meta GGA híbridos	M06	0.13	0.63	0.996	-4.32	0.956	0.093
	M06-2X	0.12	0.74	0.940	-4.16	0.949	-0.050
	M06-HF	0.17	0.78	0.873	-4.08	0.914	-0.197

^aDMA entre valores caculados y experimentales E_{exp}^0 (empleando la ec. 6.15). ^bDispersión de los valores calculados de E_{exp}^0 determinada como la diferencia entre la desviación más grande y más pequeña.

La correlaciones entre E_{abs}^0 y E_{exp}^0 y los valores experimentales fueron empleadas para evaluar los funcionales. Los parámetros empleados para el análisis fueron la pendiente, ordenada al origen y el R^2 . El método ideal debería presentar una pendiente igual a 1 y una ordenada al origen igual al potencial de oxidación absoluto del electrodo de referencia NHE en acetonitrilo, -4,60 V.^[11] Del análisis de la Tabla 7. 3 se pudo ver que para la mayoría de los funcionales los valores de pendiente se encontraron por encima de 0,93, indicando una buena correlación con los valores experimentales. Particularmente, para los casos M06-HF, BHHLYP, LC-BLYP y LC- ω PBE se encontraron importantes desviaciones que se vieron plasmadas en bajos valores de pendiente, R^2 y en el rango de dispersión. El mejor desempeño lo mostraron los funcionales PW91, BPW91 y M06-L con una pendiente cercana a la ideal (1,017; 1,019 y 1,012), un R^2 cercano a 1 (0,966; 0,967 y 0,968) y un rango bajo (0,56; 0,55 y 0,62). Como se mencionó previamente, la ordenada al origen posee una implicancia experimental ya que representa el potencial de oxidación del electrodo de referencia (NHE). Si se observan los valores de ordenada al origen para cada funcional podemos notar que se encuentran en un rango bastante amplio que va desde -3,82 a -4,44 V.ⁱ En definitiva, esto indica que las correlaciones entre los valores experimentales y calculados son lo suficientemente buenas para la mayoría de los funcionales.

Con el objetivo de encontrar una explicación a la diferencia observada entre los valores de ordenada al origen de los distintos funcionales, se evaluaron las variaciones de E_{Abs}° en función de las variaciones de $\Delta\Delta G_{solv}^{\circ}$ y AE (Gráfico 7. 1). En la sección 6.1.1.1 se ha mencionado que estas cantidades se encuentran relacionadas a través de las ecuaciones 6.8 y 6.13. Para un mejor entendimiento a continuación se expone nuevamente estas ecuaciones.

$$\Delta E = \Delta G_{(red)}^{\circ} = -AE + \Delta\Delta G_{solv}^{\circ} \quad (6.8)$$

$$\Delta G_{(red)}^{\circ}(A|A^{-}) = -neFE_{Abs}^{\circ}(A|A^{-}) \quad (6.13)$$

ⁱ Si se intercambia un electrón en la reacción redox se tiene:
1V = 1eV = 23,06037 kcal/mol

Se pudo notar que, en la mayoría de los casos, las desviaciones de los E_{Abs}° presentan la misma tendencia que las del término $-AE$. Se pudo ver que la energía de solvatación tiende a compensar estas desviaciones haciendo que las diferencias entre los valores de E_{Abs}° obtenidos con los diferentes funcionales DFT sean pequeñas.

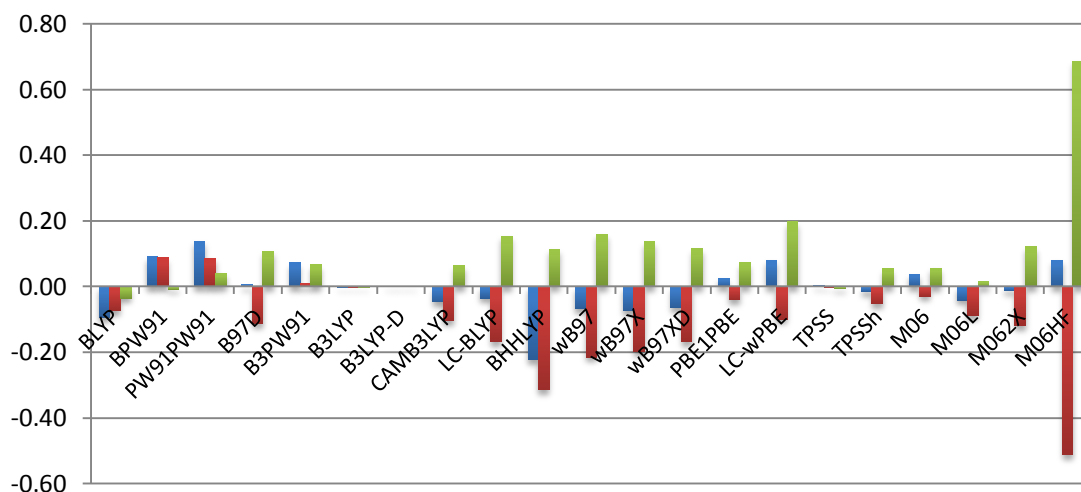


Gráfico 7. 1. Cambios en el E_{Abs}° , (y sus componentes AE s y $\Delta \Delta G_{solv}^{\circ}$) para los compuestos **40-50** (Figura B.13 del Anexo B) con los diferentes funcionales empleando a B3LYP-D como referencia. Las barras azules representan ΔE_{Abs}° , las rojas $-\Delta AE$ y las verdes $\Delta \Delta G_{solv}^{\circ}$.

El problema de la energía de solvatación ha sido previamente estudiado empleando diferentes modelos de solvente.^[12, 13] Se ha observado para los modelos implícitos un error sistemático para los potenciales de reducción que puede ser cancelado calculando el potencial de reducción de una reacción complementaria de oxidación y emplearlo como referencia interna.^[14, 15] Este procedimiento ha sido aplicado exitosamente para el cálculo de complejos organo-metálicos empleando complejos de Fe, Ru e Ir como referencias internas. En nuestro caso, empleamos la oxidación del RA naftilo a naftaleno ($E^0_{Ox} = 2,42$ V vs. NHE, en acetonitrilo).^[16]

Siguiendo el Esquema 6.3 y empleando la ecuación 6.15, se computaron los potenciales de reducción y se compararon con los valores experimentales. Una correlación ideal debería da una pendiente igual a 1 y una ordenada al origen

igual a cero. En este caso, los funcionales GGA puros dan buenos resultados, siendo BLYP el mejor. Por otra parte, para el grupo de los funcionales GGA híbridos los funcionales B3LYP y B3LYP-D mostraron ser los más exactos, sin embargo, estos poseen altos rangos de dispersión. Por su parte, B3PW91 y PBE0 pueden ser considerados los más balanceados de este grupo mostrando buena exactitud y precisión. Por último, a pesar de que la ordena al origen obtenida con M06-2X está cerca del ideal, TPSSh y M06 son los mejores del grupo de funcionales meta GGA híbridos.

Para el cómputo de esta propiedad la inclusión de LC y el incremento de HF en la componente de intercambio no derivaron en una mejoría en la predicción.

En resumen, se pudo ver que la inclusión de una reacción como referencia interna arrojó buenos resultados debido a una cancelación de errores. Por otro lado, los funcionales que mostraron mejor desempeño fueron los GGA híbridos. Los resultados podrían ser mejorados si se seleccionara el mejor método para el cálculo de $\Delta\Delta G_{solv}^{\circ}$ junto con el mejor funcional para *AE*. Sin embargo, nuestro objetivo es emplear un método simple para evaluar potenciales de reducción. Otro factor que podría ayudar a mejorar los resultados es la elección de otras reacciones de referencia.

7.4 Conclusiones

En el presente capítulo se presenta una evaluación de diferentes funcionales de DFT en la predicción de *AEs* y potenciales de reducción. En una situación ideal, podríamos esperar un podio con algunos funcionales que presenten un buen desempeño para el cálculo de estas propiedades. Sin embargo, como ya es conocido existen funcionales DFT adecuados para cada problema específico en vez de un funcional universal que pueda resolver casi todas las situaciones.

Para el estudio de compuestos con afinidades electrónicas negativas superiores a -1,75 eV, los funcionales GGA híbridos dan mejores resultados que los GGA puro (siendo BPW91 el mejor GGA puro), debido a la alta posibilidad de encontrar aniones tipo V y bajos valores de rangos de dispersión. Entre los funcionales GGA híbridos debemos destacar el desempeño de B3PW91 con buena exactitud y precisión. Por su parte, B3LYP y B3LYP-D poseen una buena exactitud pero una pobre precisión como se refleja en los valores de dispersión. Finalmente, se pueden seleccionar a TPSS y M06 como los mejores meta GGA y meta GGA híbrido, respectivamente. Cabe mencionar que los funcionales doble híbridos (B2PLYP y mPW2PLYP, considerados de última generación) y el método *ab initio* MP2 presentaron un rendimiento muy pobre con una DMA de 0,38 y 0,89 eV, respectivamente.

Para aquellos compuestos con *AEs* menores a -1,75 eV, que representan los casos límites, hay más posibilidades de obtener buenos valores con los funcionales híbridos, siendo LC-BLYP el mejor funcional de este grupo. BPW91 presenta el mejor desempeño para el grupo GGA puro y TPSS para los meta GGA.

Finalmente, se pudo observar que los cálculos de los potenciales de reducción son dependientes de la calidad de la energía de solvatación computada de las especies cargadas (aniones y RAs) como evidencian los valores erróneos del potencial de referencia (valores de ordenada al origen columna 6 de la Tabla 7. 3). Sin embargo, hay una mejora sustancial si se emplea una reacción de oxidación como referencia. Los mejores resultados se obtuvieron con los funcionales GGA híbridos, especialmente con B3PW91 y PBE0. De los funcionales

meta GGA TPSSh y M06 mostraron el mejor desempeño. Por su parte, el grupo GGA puro da buenos resultados, con bajos rangos de dispersión pero altos valores de DMA.

Finalmente, después de un profundo estudio de diversos métodos, y como manera de conclusión, se podría recomendar a B3PW91 y M06 como los mejores funcionales para el modelado de aniones. Además, se pudo ver que los funcionales populares B3LYP y PBE0 presentaron un correcto desempeño en el cálculo de las propiedades en cuestión. Particularmente, se debe tener especial cuidado al usar los funcionales doble híbridos y el método *ab initio* MP2.

7.5 Bibliografía

1. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H.P.; Izmaylov, A.F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J.L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery Jr., J.A.; Peralta, J.E.; Ogliaro, F.o.; Bearpark, M.J.; Heyd, J.; Brothers, E.N.; Kudin, K.N.; Staroverov, V.N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.P.; Burant, J.C.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N.J.; Klene, M.; Knox, J.E.; Cross, J.B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.E.; Yazyev, O.; Austin, A.J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.W.; Martin, R.L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V.G.; Voth, G.A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Dapprich, S.; Daniels, A.D.; Farkas, Á.d.n.; Foresman, J.B.; Ortiz, J.V.; Cioslowski, J. y Fox, D.J., *Gaussian 09*, 2009, Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA.
2. Puiatti, M.; Vera, D.M.A. y Pierini, A.B. Species with negative electron affinity and standard DFT methods. Finding the valence anions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2008, **10** (10), p. 1394.
3. Puiatti, M.; Vera, D.M.A. y Pierini, A.B. In search for an optimal methodology to calculate the valence electron affinities of temporary anions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2009, **11** (40), p. 9013.
4. Vera, D.M.A. y Pierini, A.B. Species with negative electron affinity and standard DFT methods. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2004, **6** (11), p. 2899.
5. Jordan, K.D. y Burrow, P.D. Temporary anion states of polyatomic hydrocarbons. *Chemical Reviews*, 1987, **87** (3), p. 557.
6. Glendening, E.D.; Landis, C.R. y Weinhold, F. Natural bond orbital methods. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 2012, **2** (1), p. 1.
7. Pople, J.A.; Head-Gordon, M.; Fox, D.J.; Raghavachari, K. y Curtiss, L.A. Gaussian-1 theory: A general procedure for prediction of molecular energies. *The Journal of Chemical Physics*, 1989, **90** (10), p. 5622.
8. Curtiss, L.A.; Raghavachari, K.; Trucks, G.W. y Pople, J.A. Gaussian-2 theory for molecular energies of first- and second-row compounds. *The Journal of Chemical Physics*, 1991, **94** (11), p. 7221.
9. Curtiss, L.A.; Raghavachari, K.; Redfern, P.C.; Rassolov, V. y Pople, J.A. Gaussian-3 (G3) theory for molecules containing first and second-row atoms. *The Journal of Chemical Physics*, 1998, **109** (18), p. 7764.

10. Jensen, F. Describing Anions by Density Functional Theory: Fractional Electron Affinity. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2010, **6** (9), p. 2726.
11. Trasatti, S. Interfacial behaviour of non-aqueous solvents. *Electrochimica Acta*, 1987, **32** (6), p. 843.
12. Guerard, J.J. y Arey, J.S. Critical Evaluation of Implicit Solvent Models for Predicting Aqueous Oxidation Potentials of Neutral Organic Compounds. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2013, **9** (11), p. 5046.
13. Davis, A.P. y Fry, A.J. Experimental and Computed Absolute Redox Potentials of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons are Highly Linearly Correlated Over a Wide Range of Structures and Potentials. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2010, **114** (46), p. 12299.
14. Konezny, S.J.; Doherty, M.D.; Luca, O.R.; Crabtree, R.H.; Soloveichik, G.L. y Batista, V.S. Reduction of Systematic Uncertainty in DFT Redox Potentials of Transition-Metal Complexes. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2012, **116** (10), p. 6349.
15. Roy, L.E.; Jakubikova, E.; Guthrie, M.G. y Batista, E.R. Calculation of One-Electron Redox Potentials Revisited. Is It Possible to Calculate Accurate Potentials with Density Functional Methods? *The Journal of Physical Chemistry A*, 2009, **113** (24), p. 6745.
16. Koper, C.; Sarobe, M. y Jenneskens, L.W. Redox properties of non-alternant cyclopenta-fused polycyclic aromatic hydrocarbons: The effect of peripheral pentagon annelation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2004, **6** (2), p. 319.

CONCLUSIONES GENERALES

Los métodos de la química computacional son muy útiles en distintos sistemas de interés orgánico y bioorgánico. La aplicación del modelado y simulaciones puede brindar información valiosa, que en ocasiones no puede ser obtenida mediante técnicas experimentales, para el entendimiento de distintos sistemas. Además, mediante la información brindada por estos métodos, en oportunidades, es posible realizar predicciones sobre el comportamiento químico y/o físico de un sistema.

Durante esta tesis se adquirió experiencia en la aplicación de métodos computacionales en sistemas orgánicos y enzimáticos. Mediante estas técnicas, se estudió, en una primera parte, inhibidores de la enzima AChE y, en una segunda, aniones orgánicos inestables.

La primera parte de la tesis se abocó al estudio de complejos entre la AChE y compuestos orgánicos naturales y semisintéticos. Además, los esfuerzos se enfocaron en el diseño de un modelo de predicción de inhibidores duales.

Como se mencionó anteriormente la enzima AChE es uno de los blancos más importantes en el tratamiento de la EA. Ésta afecta a millones de personas en el mundo generando dependencia y discapacidad en quienes las padecen. Hasta el momento solo hay aprobados cuatro fármacos, inhibidores de la AChE, aprobados por la FDA para el tratamiento de dicha enfermedad. Cabe mencionar que estos tratamientos son paliativos, es decir, mejoran la sintomatología sin detener el avance neurodegenerativo de la enfermedad.

Teniendo en cuenta esto es muy importante desarrollar nuevos fármacos para combatir a la EA, y mejorar la calidad de vida de los pacientes que la poseen. En este terreno, el diseño racional, basado en procedimientos computacionales, toma gran relevancia.

En la tesis, los primeros inhibidores estudiados fueron los extraídos de la

Huperzia Saururus. Experimentalmente, se ha encontrado que dos de los alcaloides son inhibidores de la AChE, mientras que el uno de ellos no presenta actividad. Teniendo en cuenta esta información, se exploró el modo de unión de estos compuestos mediante *docking* molecular. Luego, a través de un refinado de la energía de unión con métodos MM-GBSA y MM-PBSA se discriminó, de mejor manera, entre los compuestos activos y el inactivo; con preferencia de unión por dos sitios bien definidos y característicos de la enzima: SA y SAP. Posteriormente, se llevaron a cabo simulaciones de DM para cada complejo derivado de la unión de los compuestos en el SA y SAP. La aplicación del método de MM-GBSA derivó en un ordenamiento exitoso de las energías de unión respecto a su actividad experimental. Los compuestos activos mostraron una marcada preferencia por el SA, donde las interacciones más importantes fueron con Trp86 y Glu202. A diferencia del compuesto inactivo, que no presentó una preferencia por algunos de los dos sitios explorados en las simulaciones.

Posteriormente, se exploraron los modos de unión del alcaloide esteroideal solanocapsina y sus derivados semisintéticos. Se determinó el modo de unión para cada uno de estos inhibidor duales, encontrándose principalmente dos (**Modo A y B**). Como tendencia general, para ambos modos, podemos notar que los inhibidores se acomodan de tal manera de ubicar la carga positiva en la cavidad catalítica de la enzima.

Mediante DM se exploraron los distintos complejos y una descomposición de la energía de unión por residuo mostró que las interacciones catión- π con los residuos Trp84 y Phe330, y las de van der Waals con Phe331 y Trp279 son las más importantes para la unión de solanocapsina y sus derivados. Por otra parte, para los inhibidores híbridos las interacciones destacadas son las de puente salino con Asp72 y puente hidrógeno con Tyr334 y Ser286.

El último trabajo expuesto, en esta primera parte de la tesis, es el desarrollo de un modelo de predicción de inhibidores duales. En primera instancia, se pudo obtener un modelo lineal, correlacionando energías de unión obtenidos de una DM y valores de IC_{50} , empleando un conjunto de entrenamiento conformado por 21 alcaloides esteroideales. Además, a través la descomposición de la energía de unión se pudo distinguir que las interacciones con los residuos

Glu199, Trp84 y Phe330 son muy importantes en aquellos compuestos con buena actividad inhibitoria. Por otro lado, se amplió el modelo con la incorporación de inhibidores híbridos con tacrina como parte de su estructura. En este caso, las energías de unión no resultaron adecuadas para llevar a cabo las correlaciones. Por esta razón, se emplearon índices de eficiencia para construir el modelo. El índice $\Delta H/\text{masa molecular}$ presentó mejores parámetros estadísticos en los ajustes.

En una segunda parte se evaluaron distintas metodologías computacionales para el modelado de aniones orgánicos. Como ya sabemos los aniones orgánicos son importantes intermediarios en reacciones polares y de transferencia de electrones. Desde el punto de vista computacional existen controversias acerca de cuál de la mejor manera de modelar estas especies químicas. Son particularmente conflictivos aquellos aniones inestables respecto de la molécula neutra de la cuál derivan. Para el modelado de estos aniones inestables se han informado en bibliografía muchas metodologías, las cuales emplean métodos *ab initio* y DFT.

En esta segunda parte, se ofrece una evaluación de diferentes funcionales de DFT para el modelado de aniones inestables. Para valorar las ventajas y desventajas de cada método se computan las *AEs* y potenciales de reducción de moléculas orgánicas de tamaño medio.

Para el estudio de compuestos con afinidades electrónicas negativas superiores a -1,75 eV, los funcionales híbridos dan mejores resultados que los puro GGA, debido a la alta posibilidad de encontrar aniones tipo V. Entre los funcionales híbridos debemos destacar el desempeño de B3LYP-D, B3PW91 y B3LYP con desviación media absoluta (DMA) menores a 0,1 eV. Por otro lado, para aquellos compuestos con *AEs* menores a -1,75 eV, que representan los casos límites, se aplicó la metodología de desolvatación, encontrándose nuevamente que hay más posibilidades de obtener buenos valores con los funcionales híbridos, siendo LC-BLYP el mejor funcional para este grupo.

Finalmente, se pudo observar que los cálculos de los potenciales de reducción son dependientes de la calidad de la energía de solvatación de las especies cargadas. Sin embargo, hay una mejora sustancial cuando se empleó una

reacción de oxidación como referencia. En este caso, los funcionales GGA híbridos, mostraron un buen desempeño, especialmente B3PW91 y PBE0. Los funcionales meta GGA TPSSh y M06 mostraron el mejor desempeño. Por su parte, el grupo GGA puro da buenos resultados, con bajos rangos de dispersión pero altos valores de DMA.

ANEXOS

ANEXOS	195
Anexo A	197
Anexo B	199
Bibliografía.....	216

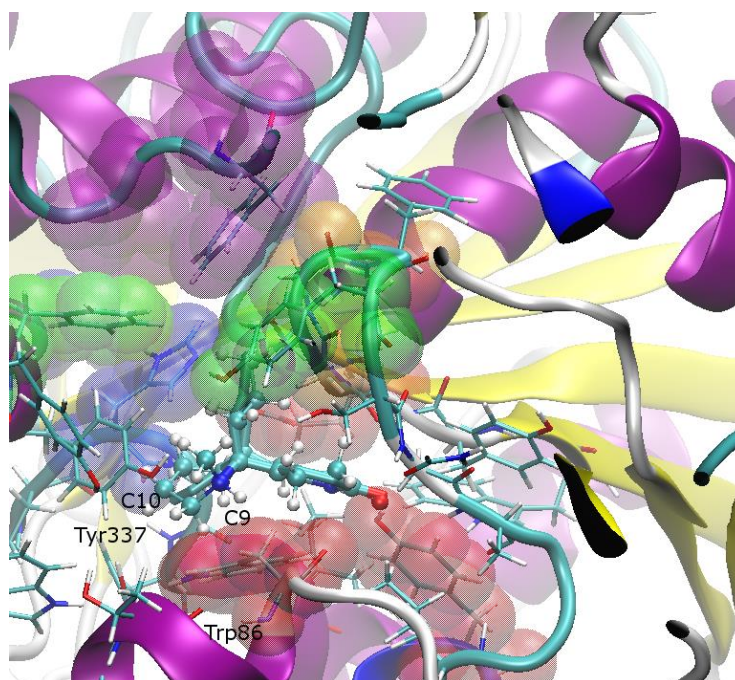
Anexo A

Figura A. 1. Representación de las geometría superpuesta de **3.7** en la obtenida de **2.8** en el *docking* en el SA. En bastones color azul verdoso se representa a **2.8** y en esferas y bastones a **3.7** (**3.7a**).

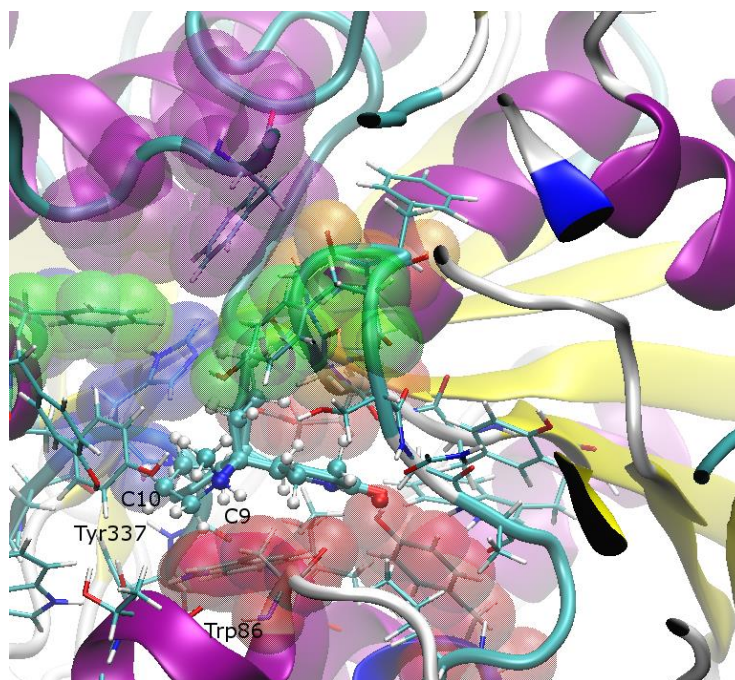


Figura A. 2. Representación de las geometría superpuesta de **2.8** en la obtenida de **3.7** en el *docking* en el SA. En bastones color azul verdoso se representa a **2.8** y en esferas y bastones a **3.7** (**3.7b**).

Tabla A. 1. Energías de unión obtenidas mediante *docking* molecular.

Inhibidor	Sitio	ΔG de Unión (kcal/mol)					IC ₅₀ (μM)
		A3	A4.2	AV	MM-PBSA	MM-GBSA	
3.5	SA	-12,0	-4,7	-7,9	-28,0	-31,7	Inactivo
	SAP	-9,0	-5,3	-7,6	-29,1	-28,8	
3.6	SA	-10,5	-5,3	-4,4	-34,1	-41,5	296,8
	SAP	-8,9	-5,7	-7,8	-16,7	-22,8	
3.7	SA	-9,8	-4,8	-6,7	-23,3	-38,2	32,3
	SAP	-9,8	-3,1	-8,5	-18,5	-25,8	
2.8	SA	-10,7	-4,1	-7,2	-36,0	-40,4	0,082
	SAP	-9,0	-4,8	-6,8	-26,3	-26,7	

Tabla A. 2. Energías de unión de los complejos obtenidas con el método de MM-PBSA. Dinámica molecular.

Inhibidor	ΔH de Unión (kcal/mol)		ΔG de Unión (kcal/mol)		IC ₅₀ (μM)
	SA	SAP	SA	SAP	
3.5	-9,3 ± 6,6	-24,3 ± 3,5	29,3 ± 6,6	13,7 ± 3,5	Inactivo
3.6	-29,8 ± 4,4	-22,2 ± 3,4	6,9 ± 4,4	15,4 ± 3,4	296,8
3.7	a) -27,7 ± 3,8 b) -31,6 ± 4,0	-21,2 ± 3,0	a) 13,8 ± 3,8 b) 10,0 ± 4,0	20,7 ± 3,0	32,3
2.8	-46,9 ± 4,5	-24,8 ± 3,4	-7,3 ± 4,5	16,2 ± 3,4	0,082

Anexo B

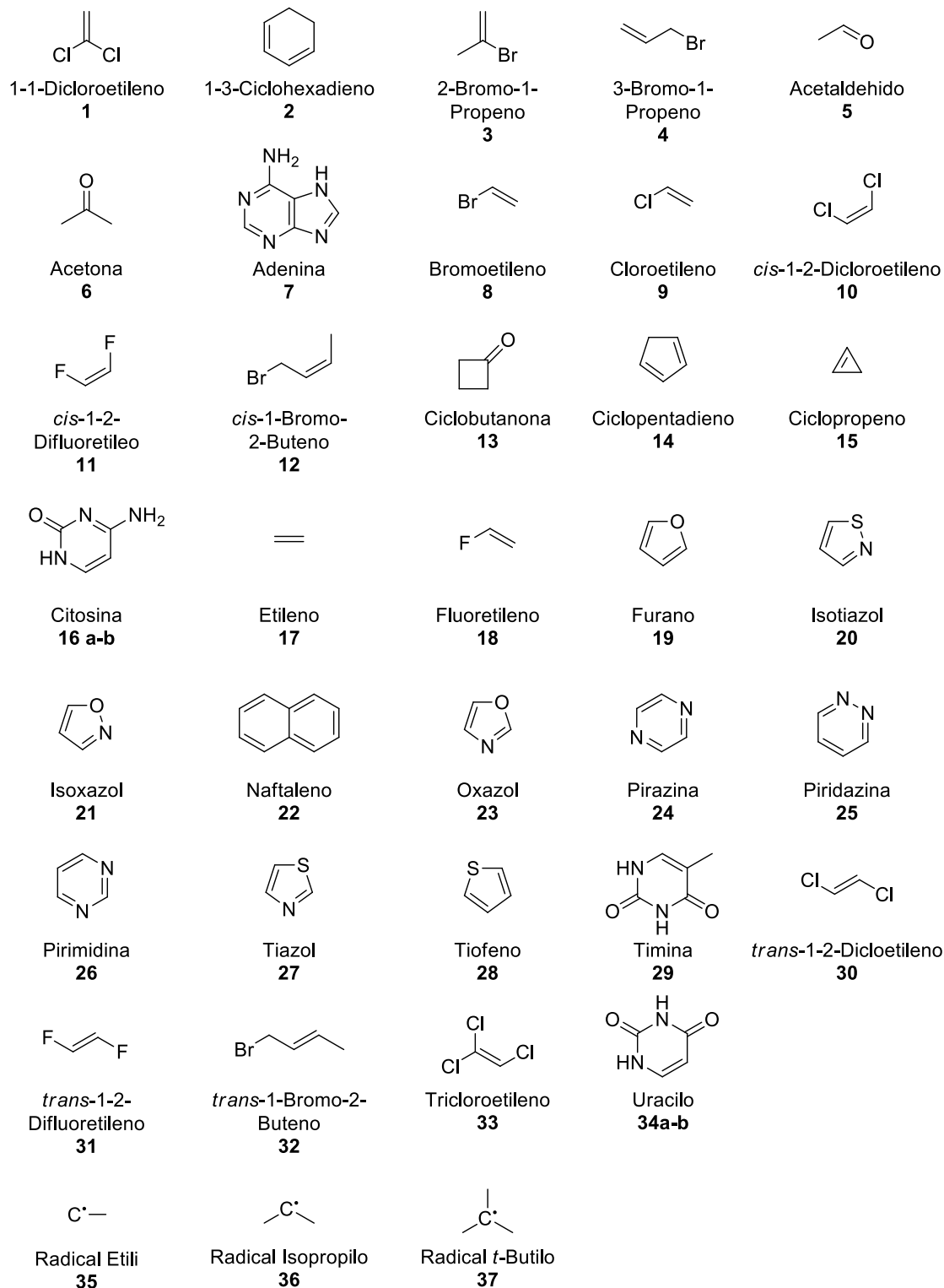


Figura B. 1. Compuestos seleccionados con AEs negativas.

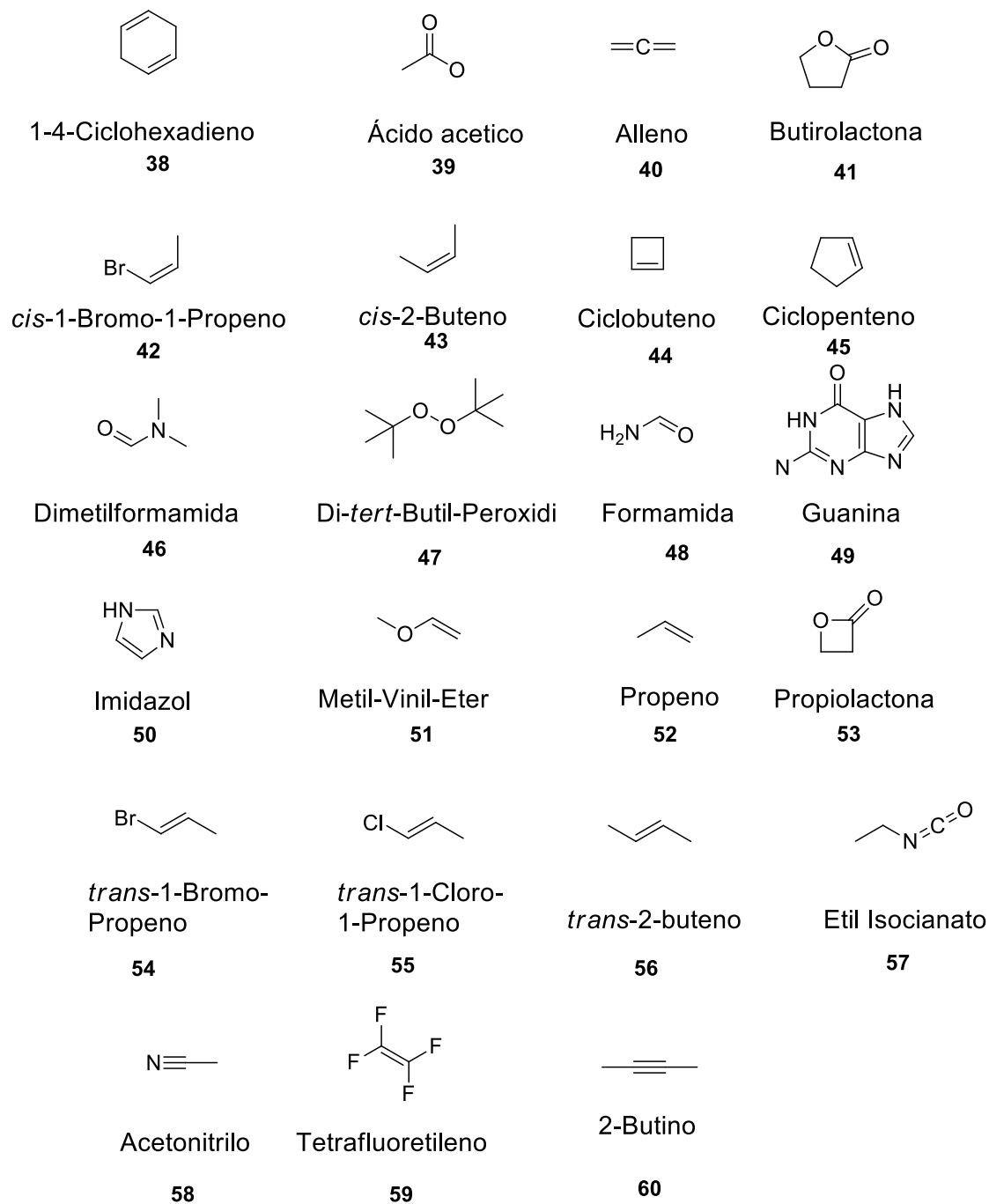


Figura B. 2. Compuestos seleccionados con AEs negativas.

Tabla B. 1. Listado de los valores experimentales de *AEs* de los compuestos mostrados en la Figura B. 1.

	Molécula	<i>AE</i> exp (eV)	Ref.
1	1-1-Dicloroetileno	-0,76	[1]
2	1-3-Ciclohexadieno	-0,8	[2]
3	2-Bromo-1-Propeno	-1,31	[3]
4	3-Bromo-1-Propeno	-0,6	[3]
5	Acetaldehido	-1,19	[4]
6	Acetona	-1,51	[4]
7	Adenina	-0,54	[5]
8	Bromoetileno	-1,17	[3]
9	Cloroetileno	-1,28	[1]
10	<i>cis</i> -1-2-Dicloroetileno	-1,11	[1]
11	<i>cis</i> -1-2-Difluoretileno	-2,18	[6]
12	<i>cis</i> -1-Bromo-2-Buteno	-0,68	[3]
13	Ciclobutanona	-1	[3]
14	Ciclopentadieno	-1,19	[7]
15	Ciclopropeno	-1,73	[8]
16	Citosina (vertical)	-0,32	[5]
	(adiabatica)	-0,06	
17	Etileno	-1,78	[2]
18	Fluoretileno	-1,91	[6]
19	Furano	-1,76	[4]
20	Isotiazol	-0,63	[3]
21	Isoxazol	-1,09	[3]
22	Naftaleno	-0,19	[4]
23	Oxazol	-1,44	[3]
24	Pirazina	-0,07	[9]
25	Piridazina	-0,32	[9]
26	Pirimidina	-0,25	[9]
27	Tiazol	-0,8	[3]
28	Tiofeno	-1,17	[4]
29	Timina	-0,29	[5]
30	<i>trans</i> -1-2-Dicloroetileno	-0,80	[1]
31	<i>trans</i> -1-2-Difluoretileno	-1,84	[6]
32	<i>trans</i> -1-Bromo-2-Buteno	-0,68	[3]
33	trichloroethylene	-0,59	[1]
34	Uracilo (vertical)	-0,22; -0,19	[5, 10]
	(adiabatica)	0,15	
35	Radical Etilo (adiabatica)	-0,26	[11]
36	Radical Isopropilo (adiabatica)	-0,32	[11]
37	Radical <i>t</i> -butilo (adiabatica)	-0,16	[11]

Tabla B. 2. Listado de los valores experimentales de *AEs* de los compuestos mostrados en la Figura B. 2

	Molécula	<i>AE</i> exp. (eV)	Ref.
38	1-4-Ciclohexadieno	-1,75	[2]
39	Ácido Acético	-1,8	[12]
40	Alleno	-1,90	[13]
41	Butirolactona	-1,98	[14]
42	<i>cis</i> -1-Bromo-1-Propeno	-1,49	[3]
43	<i>cis</i> -2-Buteno	-2,22	[2]
44	Ciclobuteno	-2	[8]
45	Ciclopenteno	-2,14	[8]
46	Dimetilformamida	-2,4	[12]
47	Di- <i>tert</i> -Butil-Peroxido	-2	[15]
48	Formamida	-2,05	[16]
49	Guanina	-1,4	[5, 10]
50	Imidazol	-2,13	[3]
51	Metil-Vinil-Eter	-2,3	[17]
52	Propeno	-1,99	[2]
53	Propiolactona	-1,9	[18]
54	<i>trans</i> -1-Bromo-Propeno	-1,3	[3]
55	<i>trans</i> -1-chloro-1-Propeno	-1,49	[19]
56	<i>trans</i> -2-buteno	-2,1	[4]
57	Etilisocianato	-2,63	[20]
58	Acetonitrilo	-2,84	[4]
59	Tetrafluoretileno	-3	[6]
60	2-Butino	-3,34	[21]

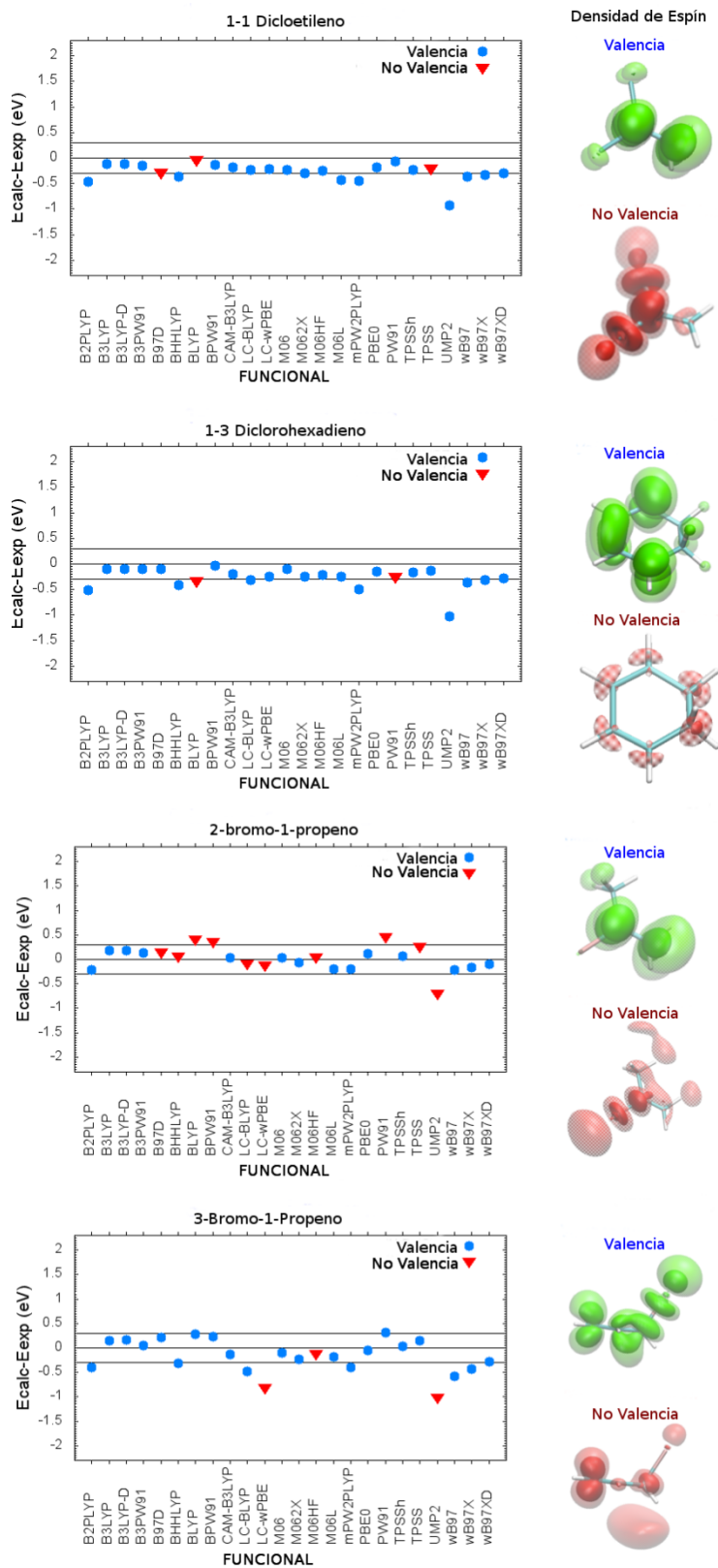


Figura B. 3. Desviaciones entre los valores calculados y experimentales

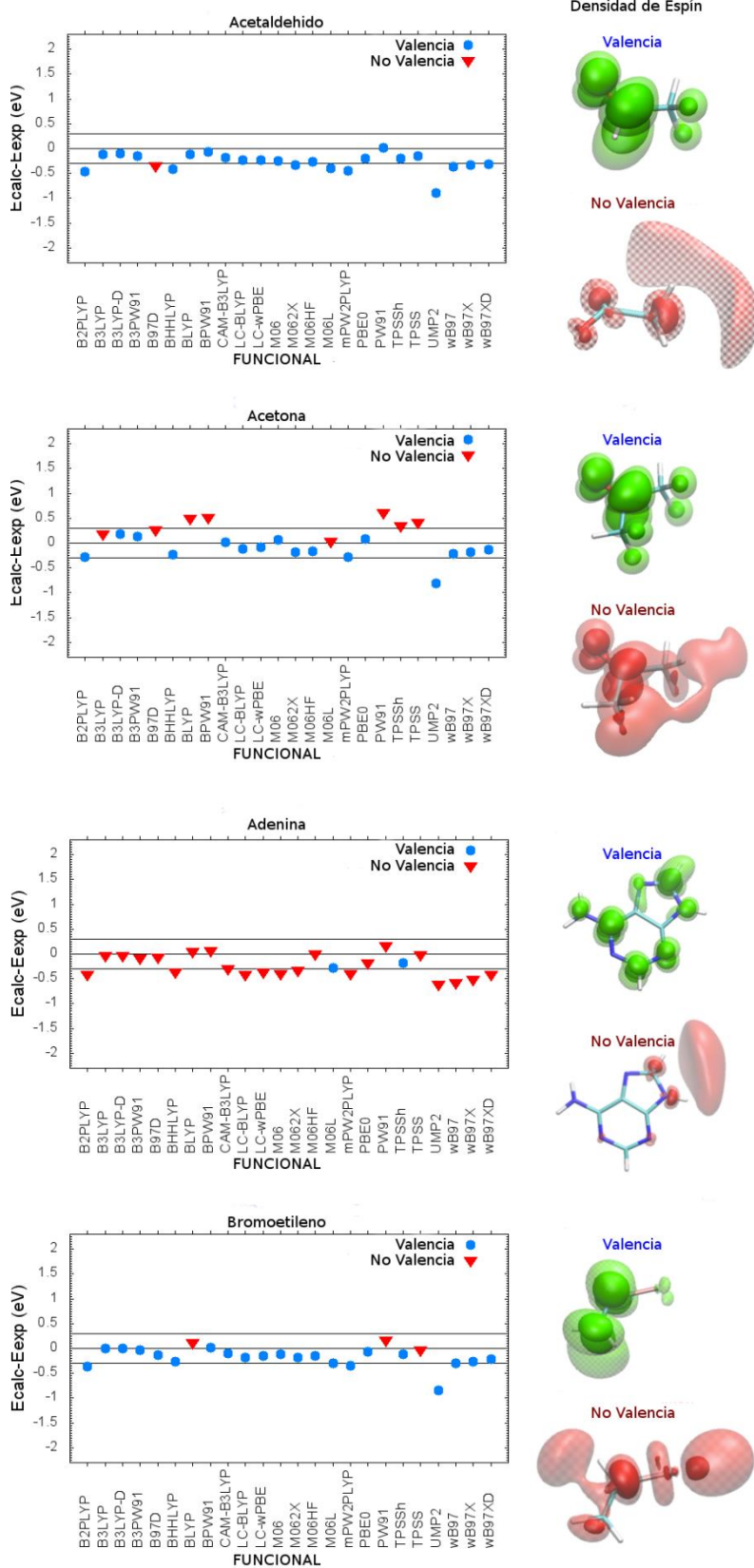


Figura B. 4. Desviaciones entre los valores calculados y experimentales.

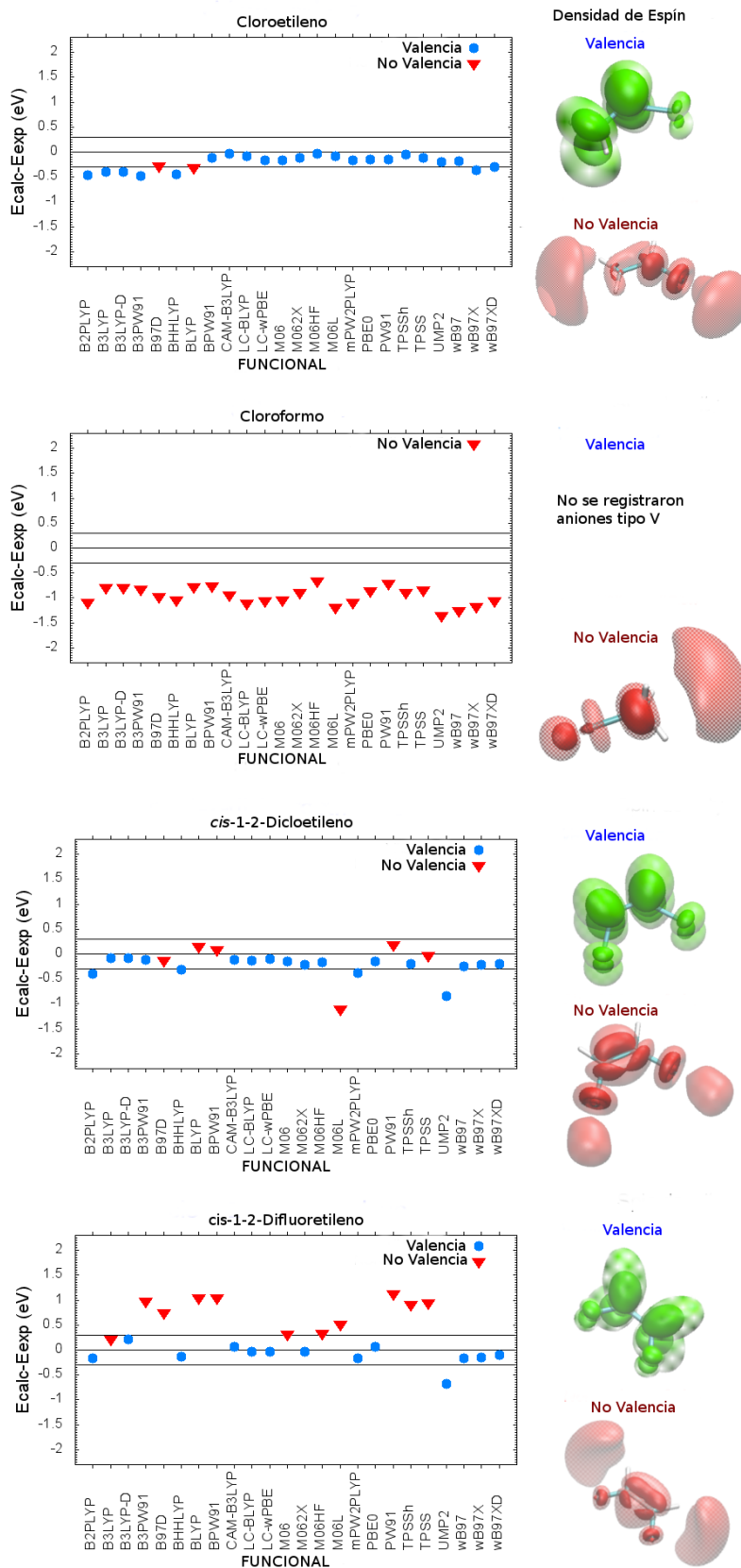


Figura B. 5. Desviaciones entre los valores calculados y experimentales.

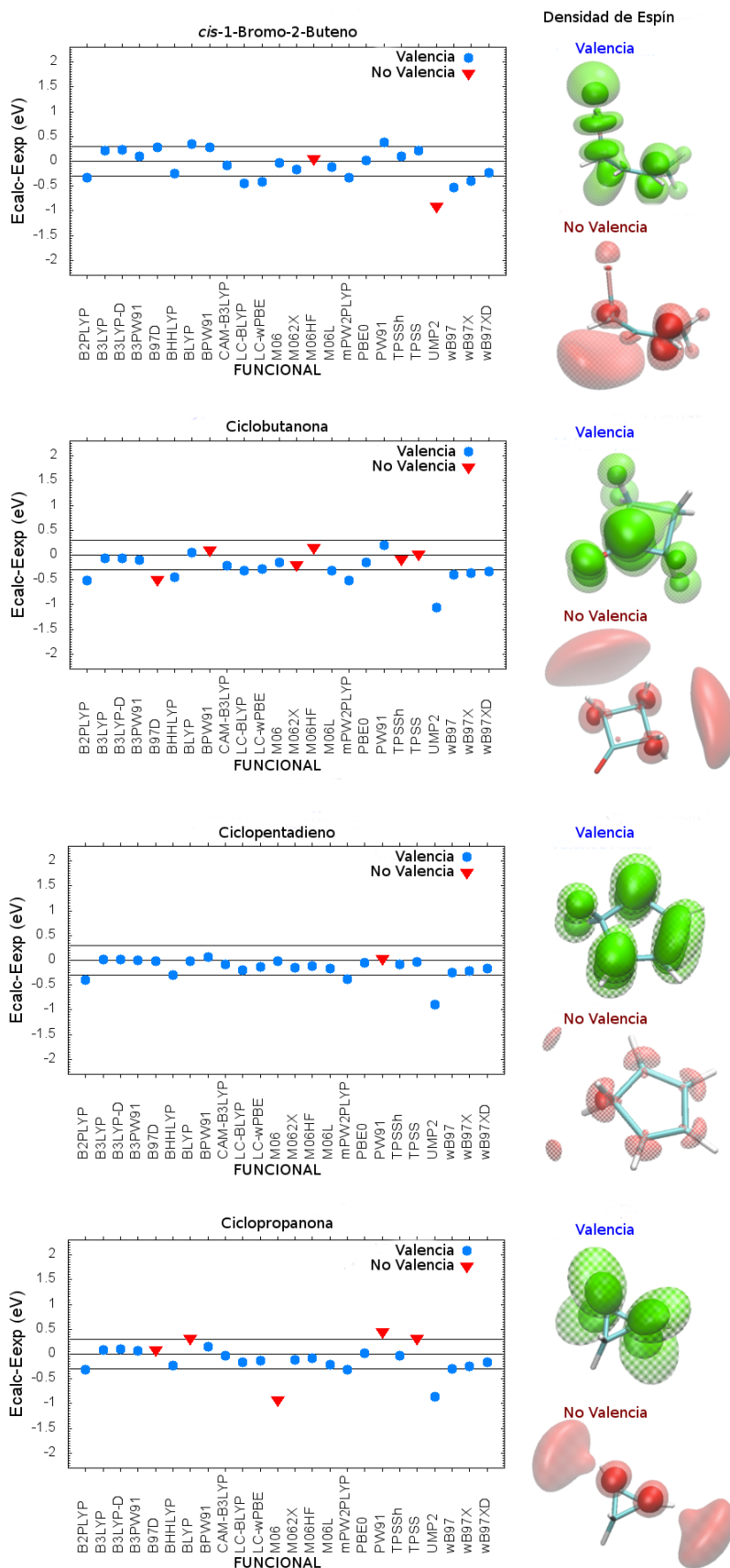


Figura B. 6. Desviaciones entre los valores calculados y experimentales.

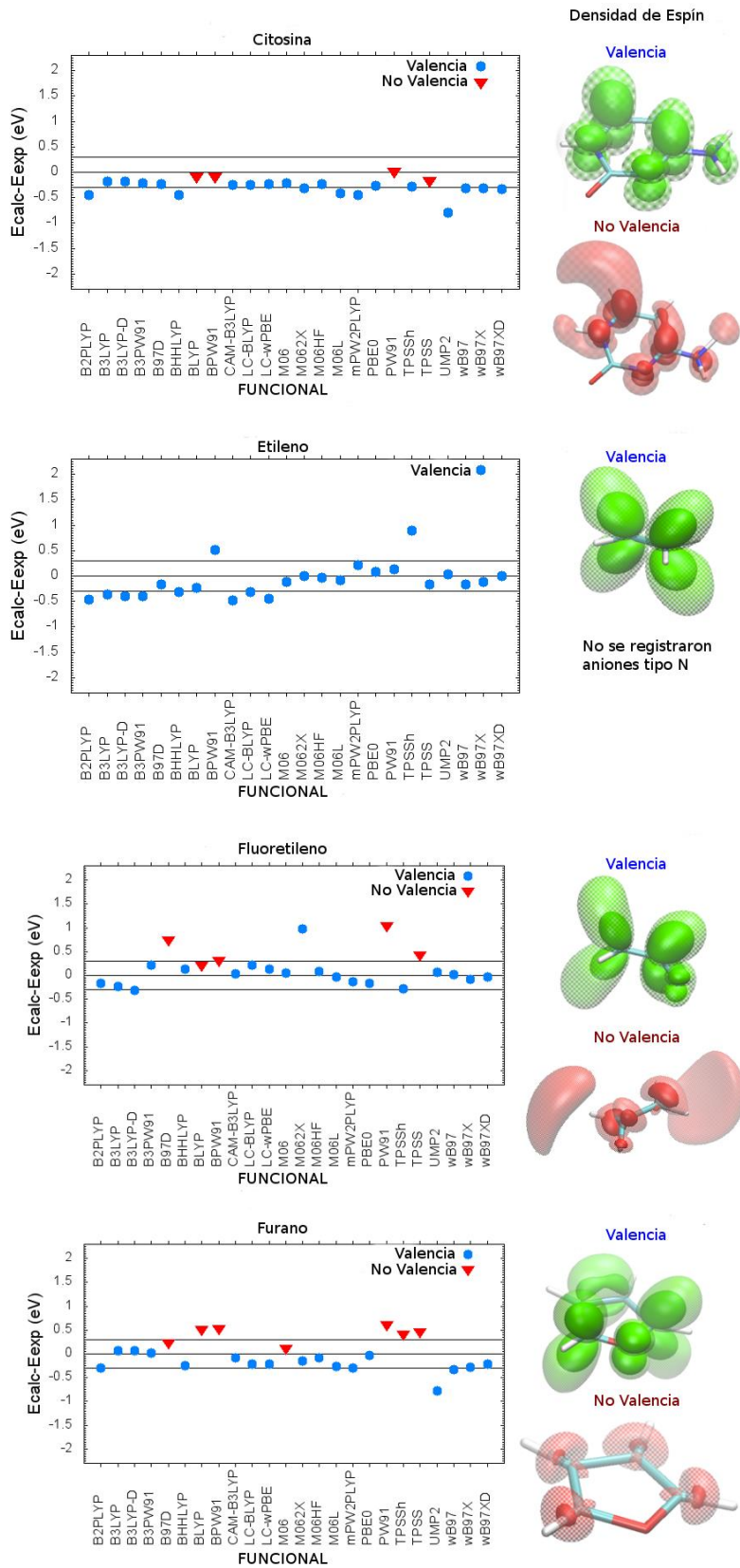


Figura B. 7. Desviaciones entre los valores calculados y experimentales.

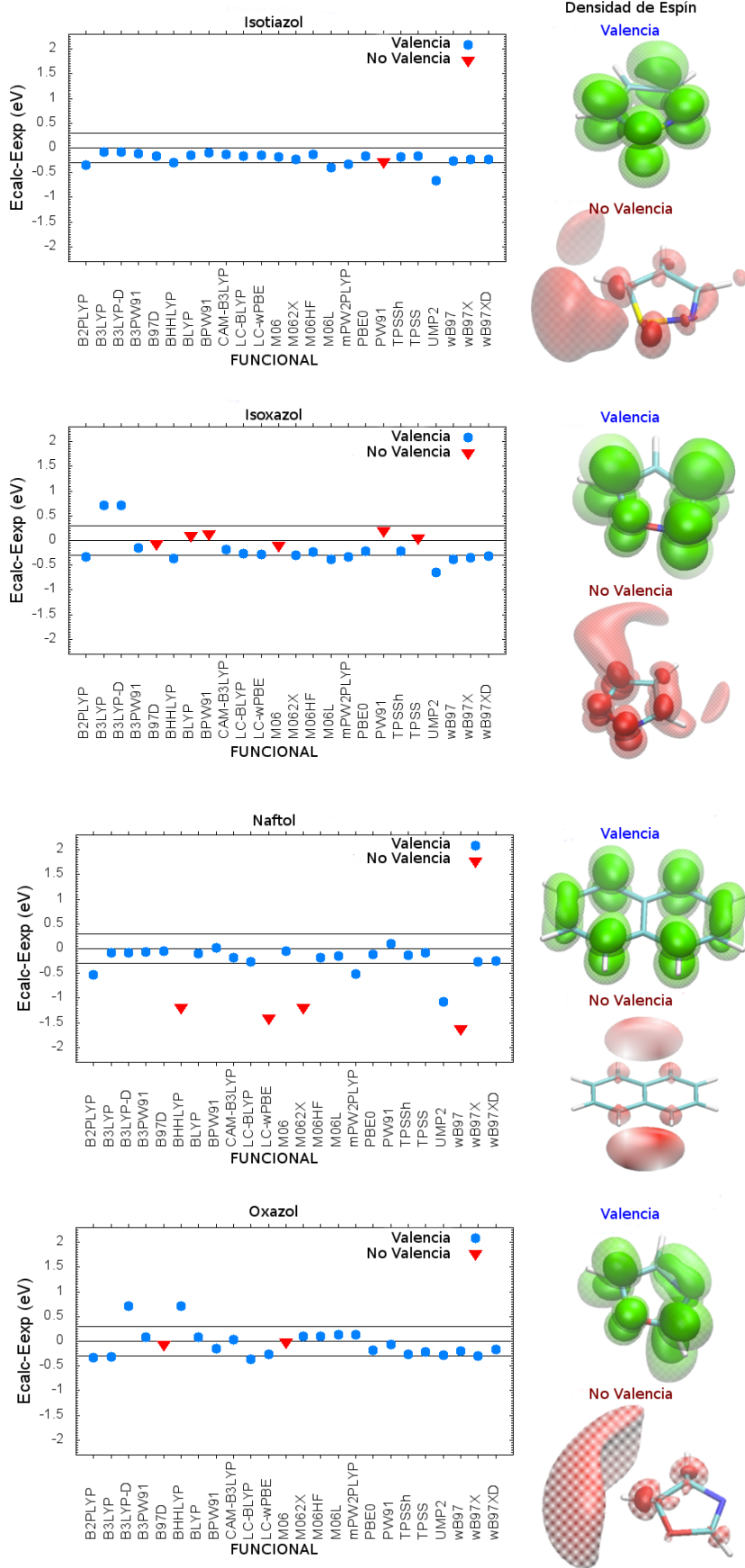


Figura B. 8. Desviaciones entre los valores calculados y experimentales.

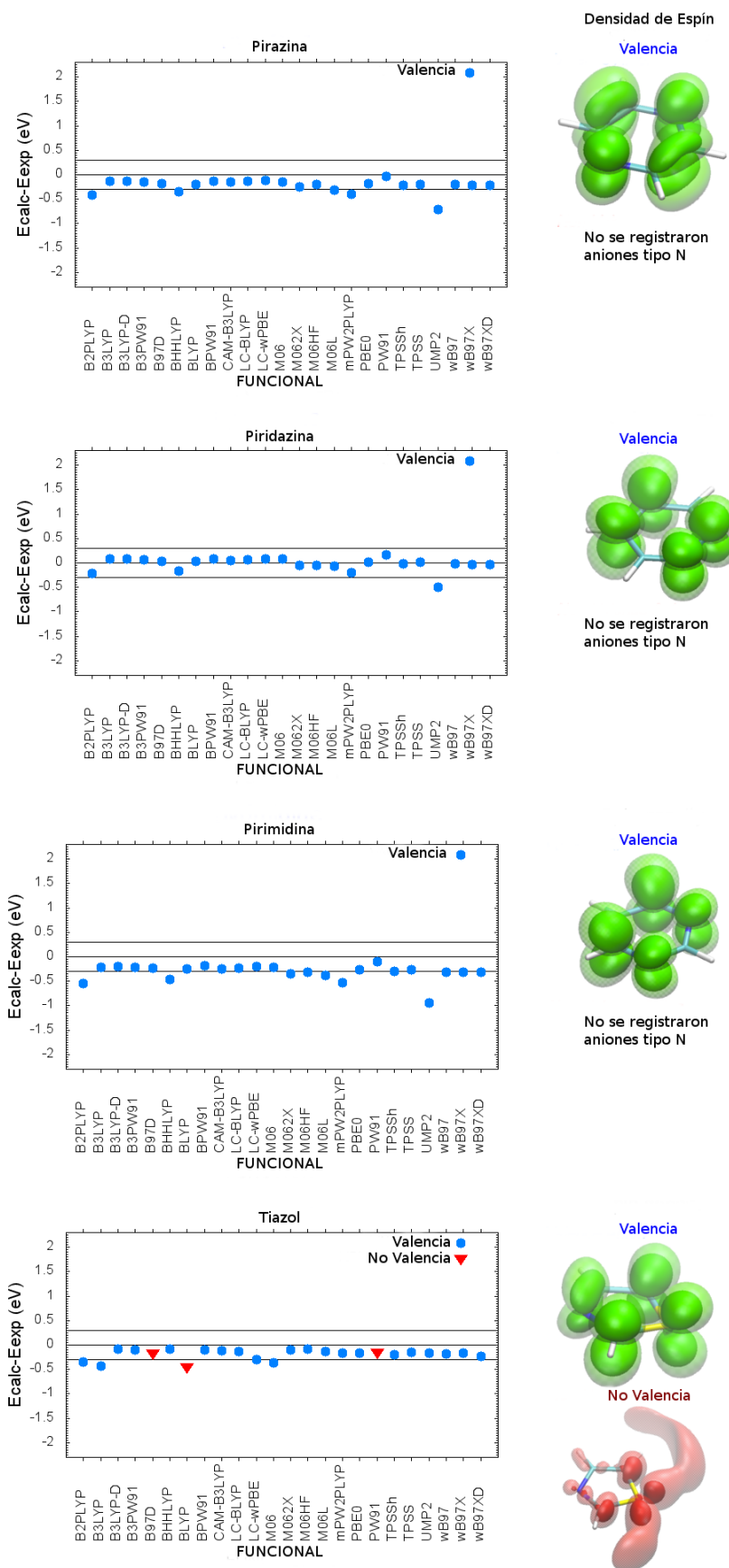


Figura B. 9. Desviaciones entre los valores calculados y experimentales.

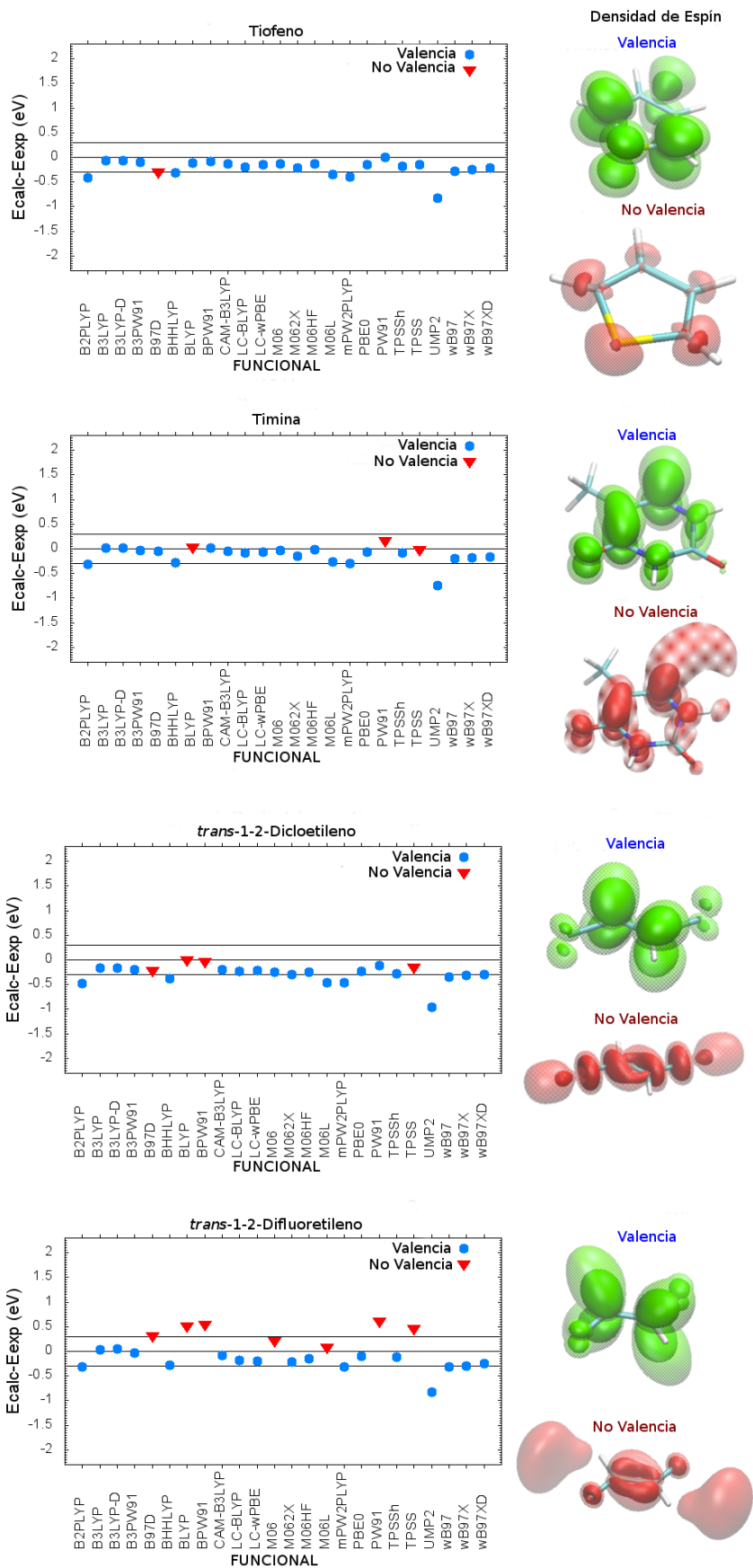


Figura B. 10. Desviaciones entre los valores calculados y experimentales.

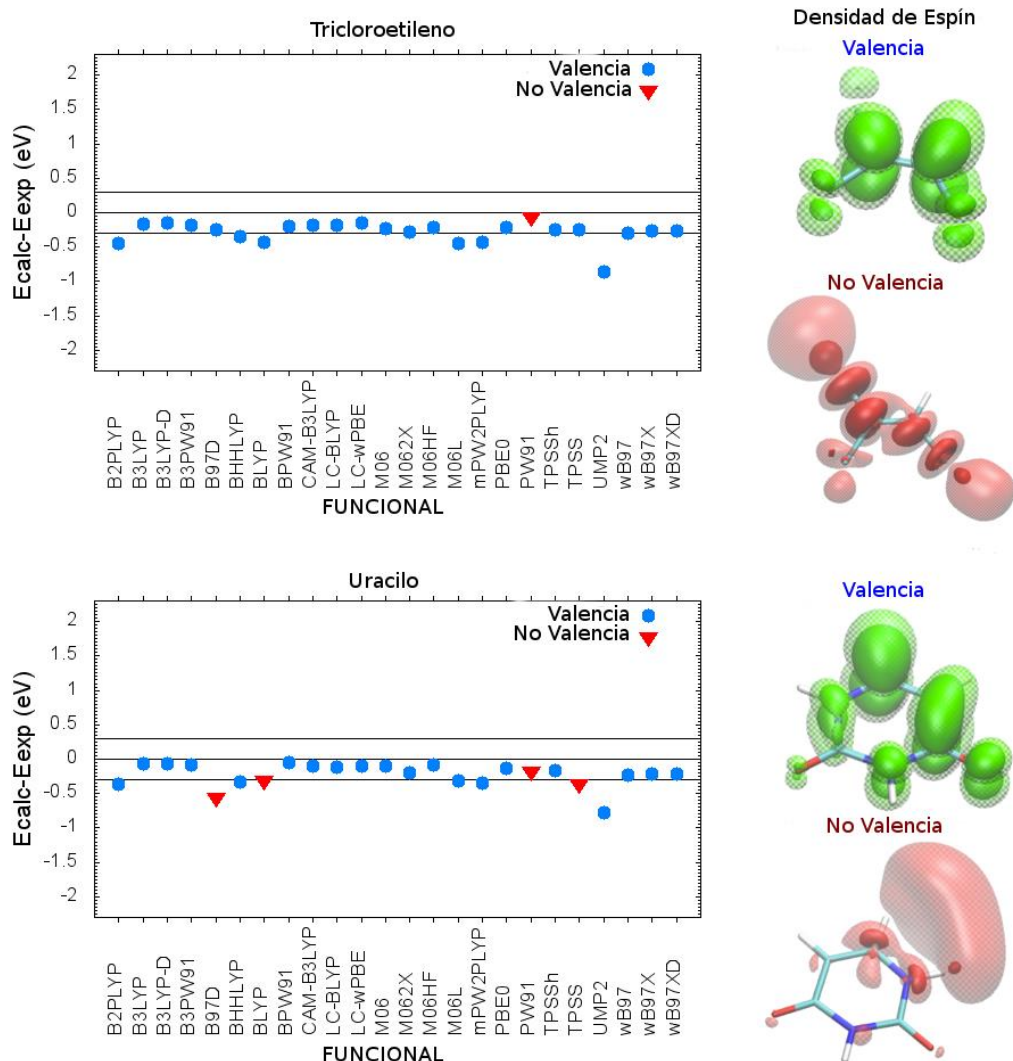


Figura B. 11. Desviaciones entre los valores calculados y experimentales.

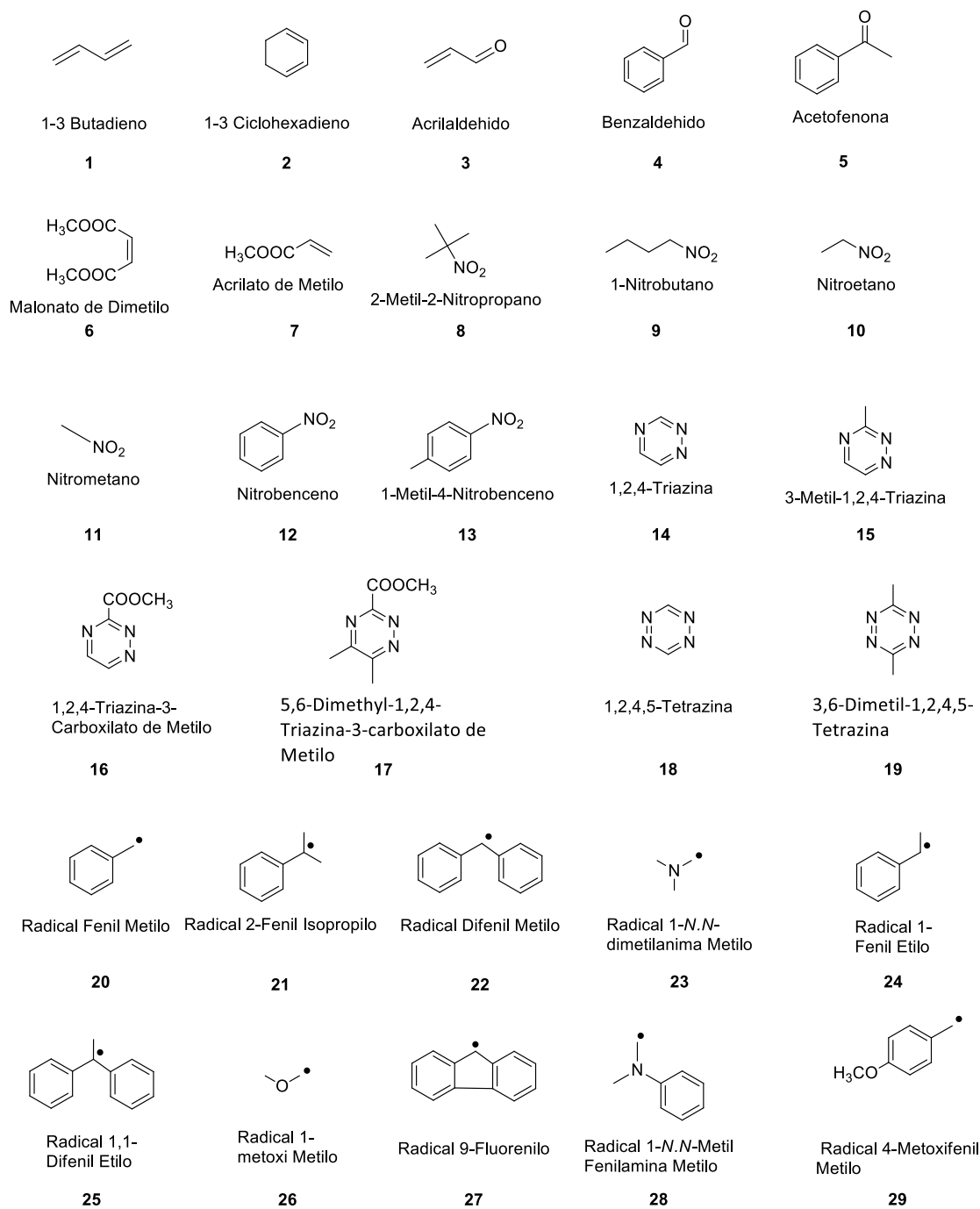


Figura B. 12. Compuestos empleados en el cálculo de potenciales de reducción.

Anexos

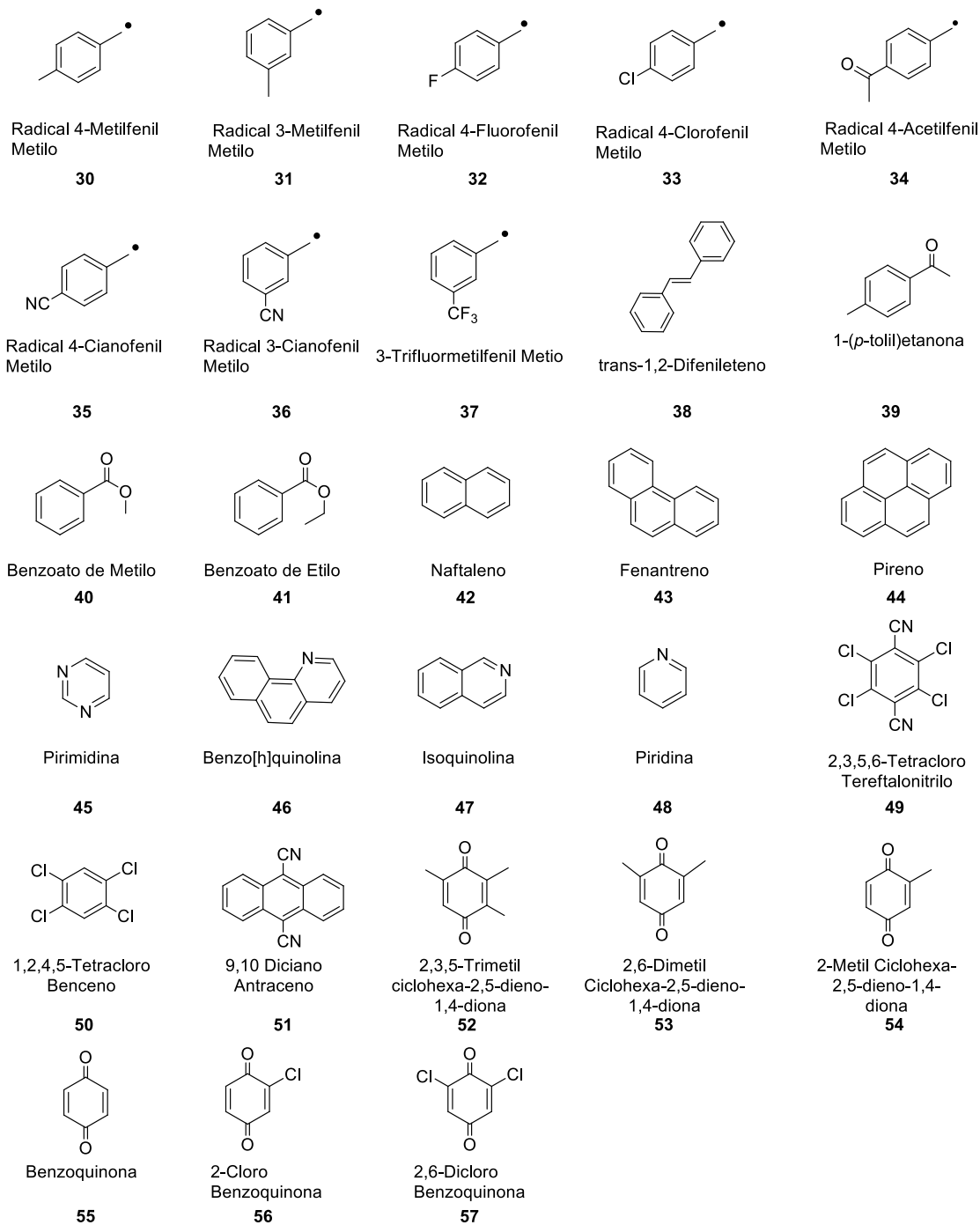


Figura B. 13. Compuestos empleados en el cálculo de potenciales de reducción.

Tabla B. 3. Listado de los valores de potenciales de reducción de los compuestos empleados.

	Molécula	Potencial de Reducción (V)	Ref.
1	1-3 Butadieno	-2,56	[22]
2	1-3 Ciclohexadieno	-2,71	
3	Acrilaldehido	-1,19	[23]
4	Benzaldehido	-1,38	
5	Acetofenona	-1,55	
6	Malonato de Dimetilo	-1,29	[24]
7	Acrilato de Metilo	-1,86	
8	2-Metil-2-Nitropropano	-1,545	[25]
9	1-Nitrobutano	-1,43	
10	Nitroetano	-1,4	
11	Nitrometano	-1,385	
12	Nitrobenceno	-0,95	
13	1-Metil-4-Nitrobenceno	-0,97	
14	1,2,4-Triazina	-1,39	
15	3-Metil-1,2,4-Triazina	-1,46	
16	1,2,4-Triazina-3-Carboxilato de Metilo	-1,18	
17	5,6-Dimethyl-1,2,4-Triazina-3-carboxilato de Metilo	-1,42	
18	1,2,4,5-Tetrazina	-0,63	
19	3,6-Dimetil-1,2,4,5-Tetrazina	-0,79	[27]
20	3,6-Dimetil-1,2,4,5-Tetrazina	-1,21	
21	Radical 2-Fenil Isopropilo	-1,49	[28]
22	Radical Difenil Metilo	-0,9	[27]
23	Radical 1-N.N-dimetilanimina Metilo	-1,76	[28]
24	Radical 1-Fenil Etilo	-1,36	
25	Radical 1,1-Difenil Etilo	-1,1	
26	Radical 1-metoxi Metilo	-1,06	
27	Radical 9-Fluorenilo	-0,52	
28	Radical 1-N.N-Metil Fenilamina Metilo	-1,79	
29	Radical 4-Metoxifenil Metilo	-1,51	[29]
30	Radical 4-Metilfenil Metilo	-1,38	
31	Radical 3-Metilfenil Metilo	-1,26	
32	Radical 4-Fluorofenil Metilo	-1,26	
33	Radical 4-Clorofenil Metilo	-1,16	
34	Radical 4-Acetilfenil Metilo	-0,47	
35	Radical 4-Cianofenil Metilo	-0,53	
36	Radical 3-Cianofenil Metilo	-0,87	
37	3-Trifluormetilfenil Metio	-0,96	[30]
38	<i>trans</i> -1,2-Difenileteno	-1,96	[31]

Tabla B. 4. Listado de los valores de potenciales de reducción de los compuestos empleados.

	Molécula	Potencial de Reducción (V)	Ref.
39	1-(p-tolil)etanona	-1,96	[31]
40	Benzoato de Metilo	-2,13	
41	Benzoato de Etilo	-2,16	
42	Naftaleno	-2,42	[32]
43	Fenantreno	-2,38	
44	Pireno	-1,98	
45	Pirimidina	-2,1	[33]
46	Benzo[h]quinolina	-1,968	
47	Isoquinolina	-1,98	
48	Piridina	-2,396	
49	2,3,5,6-Tetracloro Tereftalonitrilo	-0,71	[34]
50	1,2,4,5-Tetracloro Benceno	-0,5	
51	9,10 Diciano Antraceno	-0,65	
52	2,3,5-Trimetil ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona	-0,51	
53	2,6-Dimetil Ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona	-0,39	
54	2-Metil Ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona	-0,34	
55	Benzoquinona	-0,23	
56	2-Cloro Benzoquinona	-0,1	
57	2,6-Dicloro Benzoquinona	0,06	

Bibliografía

1. Burrow, P.D.; Modelli, A.; Chiu, N.S. y Jordan, K.D. temporary Σ and Π anions of the chloroethylenes and chlorofluoroethylenes. *Chemical Physics Letters*, 1981, **82** (2), p. 270.
2. Jordan, K.D.; Michejda, J.A. y Burrow, P.D. Electron transmission studies of the negative ion states of substituted benzenes in the gas phase. *Journal of the American Chemical Society*, 1976, **98** (23), p. 7189.
3. Modelli, A. y Jones, D. Empty Level Structure and Dissociative Electron Attachment Cross Sections in Saturated and Unsaturated Bromohydrocarbons. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2004, **108** (3), p. 417.
4. Jordan, K.D. y Burrow, P.D. Studies of the temporary anion states of unsaturated hydrocarbons by electron transmission spectroscopy. *Accounts of Chemical Research*, 1978, **11** (9), p. 341.
5. Aflatooni, K.; Gallup, G.A. y Burrow, P.D. Electron Attachment Energies of the DNA Bases. *The Journal of Physical Chemistry A*, 1998, **102** (31), p. 6205.
6. Chiu, N.S.; Burrow, P.D. y Jordan, K.D. Temporary anions of the fluoroethylenes. *Chemical Physics Letters*, 1979, **68** (1), p. 121.
7. Staley, S.W.; Bjorke, M.D.; Giordan, J.C.; McMillan, M.R. y Moore, J.H. Negative ion states of cyclopentadiene derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 1981, **103** (24), p. 7057.
8. Staley, S.W.; Howard, A.E. y Strnad, J.T. Hyperconjugative effects on π^* negative-ion states. Electron transmission spectroscopy of cycloalkenes. *The Journal of Organic Chemistry*, 1992, **57** (3), p. 895.
9. Nenner, I. y Schulz, G.J. Temporary negative ions and electron affinities of benzene and N-heterocyclic molecules: pyridine, pyridazine, pyrimidine, pyrazine, and s-triazine. *The Journal of Chemical Physics*, 1975, **62** (5), p. 1747.
10. Sevilla, M.D.; Besler, B. y Colson, A.-O. Ab Initio Molecular Orbital Calculations of DNA Radical Ions. 5. Scaling of Calculated Electron Affinities and Ionization Potentials to Experimental Values. *The Journal of Physical Chemistry*, 1995, **99** (3), p. 1060.

11. DePuy, C.H.; Gronert, S.; Barlow, S.E.; Bierbaum, V.M. y Damrauer, R. The gas-phase acidities of the alkanes. *Journal of the American Chemical Society*, 1989, **111** (6), p. 1968.
12. Pearson, R.G. Absolute electronegativity and hardness: application to inorganic chemistry. *Inorganic Chemistry*, 1988, **27** (4), p. 734.
13. Ciommer, B.; Nguyen, K.M.; Schwarz, H.; Frenking, G.; Kwiatkowski, G. y Illenberger, E. Theoretical and experimental investigation of the electron affinities of allene and propyne. *Chemical Physics Letters*, 1984, **104** (2-3), p. 216.
14. Stepanović, M.; Pariat, Y. y Allan, M. Dissociative electron attachment in cyclopentanone, γ -butyrolactone, ethylene carbonate, and ethylene carbonate-d₄: Role of dipole-bound resonances. *The Journal of Chemical Physics*, 1999, **110** (23), p. 11376.
15. Modelli, A. y Galasso, V. Dissociative Electron Attachment to Di-tert-butylperoxide, Artemisinin, and β -Artemether. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2007, **111** (32), p. 7787.
16. Seydou, M.; Modelli, A.; Lucas, B.; Konate, K.; Desfrancois, C. y Schermann, J.P. Electron attachment to strongly polar clusters. *Eur. Phys. J. D*, 2005, **35** (2), p. 199.
17. Bulliard, C.; Allan, M. y Grimme, S. Electron energy loss and dissociative electron attachment spectroscopy of methyl vinyl ether and related compounds. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2001, **205** (1-3), p. 43.
18. Modelli, A. y Martin, H.-D. Temporary Anions and Empty Level Structure in Cyclobutanediones: Through-Space and Through-Bond Interactions. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2002, **106** (32), p. 7271.
19. Modelli, A. Electron attachment and intramolecular electron transfer in unsaturated chloroderivatives. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2003, **5** (14), p. 2923.
20. Modelli, A. y Jones, D. Temporary Anion States and Dissociative Electron Attachment to Isothiocyanates. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2006, **110** (49), p. 13195.
21. Ng, L.; Jordan, K.D.; Krebs, A. y Rueger, W. Electron transmission study of the splitting of the π^* molecular orbitals of angle-strained cyclic acetylenes: implications for the electrophilicity of alkynes. *Journal of the American Chemical Society*, 1982, **104** (26), p. 7414.

22. Breslow, R.; Johnson, R.W. y Krebs, A. Electrochemical oxidation and reduction of a tetraalkylated cyclobutadiene. *Tetrahedron Letters*, 1975, **16** (40), p. 3443.
23. Loutfy, R.O. y Loutfy, R.O. Correlation between the n, π * triplet energy of some ketones and aldehydes and their electroreduction potential. *The Journal of Physical Chemistry*, 1973, **77** (3), p. 336.
24. Tyssee, D.A. y Baizer, M.M. Electrocarboxylation. II. Electrocarboxylative dimerization and cyclization. *The Journal of Organic Chemistry*, 1974, **39** (19), p. 2823.
25. Hojo, M.; Nishikawa, K.; Akita, Y. y Imai, Y. The Specific Effects of Tetraalkylammonium and Alkali Metal Ions on the Polarographic Reduction of Nitroalkanes and Nitrobenzenes in Acetonitrile. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1986, **59** (12), p. 3815.
26. Troll, T. Reduction potentials of substituted as-triazines and s-tetrazines in acetonitrile. *Electrochimica Acta*, 1982, **27** (9), p. 1311.
27. Wayner, D.D.M. y Griller, D. Oxidation and reduction potentials of transient free radicals. *Journal of the American Chemical Society*, 1985, **107** (25), p. 7764.
28. Wayner, D.D.M.; McPhee, D.J. y Griller, D. Oxidation and reduction potentials of transient free radicals. *Journal of the American Chemical Society*, 1988, **110** (1), p. 132.
29. Sim, B.A.; Griller, D. y Wayner, D.D.M. Reduction potentials for substituted benzyl radicals: pKa values for the corresponding toluenes. *Journal of the American Chemical Society*, 1989, **111** (2), p. 754.
30. Hapiot, P.; Konovalov, V.V. y Saveant, J.-M. Application of Laser Pulse Photoinjection of Electrons from Metal Electrodes to the Determination of Reduction Potentials of Organic Radicals in Aprotic Solvents. *Journal of the American Chemical Society*, 1995, **117** (4), p. 1428.
31. Fukuzumi, S.; Koumitsu, S.; Hironaka, K. y Tanaka, T. Energetic comparison between photoinduced electron-transfer reactions from NADH model compounds to organic and inorganic oxidants and hydride-transfer reactions from NADH model compounds to p-benzoquinone derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 1987, **109** (2), p. 305.

32. Koper, C.; Sarobe, M. y Jenneskens, L.W. Redox properties of non-alternant cyclopenta-fused polycyclic aromatic hydrocarbons: The effect of peripheral pentagon annelation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2004, **6** (2), p. 319.
33. Millefiori, S. Polarographic reduction of azines in acetonitrile. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 1970, **7** (1), p. 145.
34. Speelman, A.L. y Gillmore, J.G. Efficient Computational Methods for Accurately Predicting Reduction Potentials of Organic Molecules. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2008, **112** (25), p. 5684.