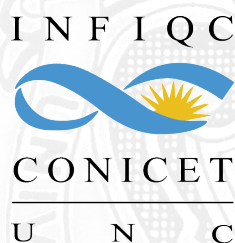


Tesis Doctoral

*“Estudio Computacional de Procesos
de Interés Orgánico y Biológicos”*

Gabriel Ernesto Jara



2012

Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba
Departamento de Química Orgánica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

-2012-

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

DIRECTOR

Dr. D. Mariano A. Vera

COMISIÓN DE TESIS

**Dra. Adriana B.
Pierini**

Dr. Ezequiel P.M. Leiva

**Dr. Guillermo G.
Montich**

EVALUADOR EXTERNO

Dr. Damián A. Scherlis

Universidad de Buenos Aires

A mis padres

A Caro

A mis amigos

Agradecimientos

A la comisión de tesis: los Dres. Guillermo Montich, Ezequiel Leiva y Adriana Pierini, por sus aportes a esta tesis que siempre resultaron muy útiles. Además por tener siempre muy buena predisposición y darme apoyo a cada iniciativa como curso de doctorado. En especial a Adriana, quien me guió muchísimo y le dio un aporte muy grande a esta tesis gracias a la rigurosidad de sus correcciones, críticas constructivas y sugerencias.

A mi director, Mariano, por confiar siempre en mí, además de darme la oportunidad de conocer y entrar en el maravilloso mundo de la química computacional y darme siempre la libertad para trabajar.

Al Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y al INFIQC por brindarme el lugar de trabajo y los recursos necesarios para el desarrollo de mi tesis. En particular a los profesores del grupo por sus aportes en distintos seminarios.

A CONICET, por su apoyo económico que me permitió realizar esta tesis.

Al Dr. Cristián Sánchez, a quien considero un gran amigo y por quien empecé a entender la química cuántica. Gracias además, por el apoyo moral y académico.

Al Dr. Marcos Villarreal por toda su ayuda con sugerencias, discusiones y explicaciones.

Al Dr. Sergio Garay de la Universidad Nacional de Litoral quien dictó el curso de doctorado sobre modelado por homología a partir del cual empecé la aplicación de dicho método. Así también por el material bibliográfico que me facilitó.

A los Dres. Raúl Leguizamón y Ernesto Hliba por tener siempre las puertas de su casa abierta para ayudarme con mis inquietudes.

A mis padres, por la educación recibida, la cual considero que me permitió llegar a la conclusión de esta tesis, superando los obstáculos. A mi papá por los innumerables consejos, compañía, apoyo, y por el infinito amor que me ofrece todos los días. A mi mamá, por sus consejos de vida cuando quise un segundo punto de vista distinto al mío sobre los hechos. A mis hermanos que aportaron muy lindos momentos en mi vida.

A Caro, por todo su amor, ese amor comprensivo y compañero. Por estar conmigo en todo momento, antes y durante la escritura de esta tesis. Por los momentos compartidos juntos, en los cuales su mirada, palabras y presencia me transportan a un lugar donde pareciera que no pasa el tiempo.

A Christian porque siempre lo sentí más que como un amigo, como un hermano mayor. Gracias por ayudarme a crecer como persona y guiarme.

A amigos: Elias, Martín, Vane y Walter, amigos que estuvieron, están y estarán siempre. Gracias por todo, no sólo los lindos momentos compartidos y aquellos en los que recurrí a ustedes. A mis amigos de la facu: Agus, Ceci, Eze, Guada, Juli, Nico, y Raque. Por todas las tardes en Marconi, juntadas, cumpleaños etc. en las cuales la pasé genial y siempre me hicieron sentir muy bien. A Flor por su amistad y las charlas. A mis amigos Marce y Pencho, que siempre me ayudaron un montón en todo y siempre con muy buena predisposición en todo. Gracias a Marce, por toda su ayuda en esta tesis, en lo académico y en lo personal.

A los queridos compañeros del lab, Pupi, Diego, Javi B., Kari, Lili y Naty T. En especial a Diego por las discusiones y correcciones.

A Rocío y Mariana, amigas desde el cursillo, siempre destaco su sinceridad y su gran amistad y aprecio.

A mis compañeros, los chicos del *ET team*, Silvia B., Javi G., Euge, Gise, Rodri, Vicky, Natividad, Pauli, Pablo, Paulo, Sol, Guille, Tomás, Sergio, Jorge, Daiann, Lydia, Andrea, Dani, Adrián, Silvi, Fabri, Gabriela y Mario con quienes compartí todos estos años algunas juntadas, palabras de aliento, sonrisas, mates, ayudas, etc.

A Fabián K. por los mates, charlas de cada mañana y siempre muy buena onda.

A todos mis demás compañeros tanto del Departamento de Química Orgánica como de Farmacia.

A los secretarios del Departamento de Química Orgánica, por su gran disposición y paciencia cuando muchas veces llegué a último momento con algún *curriculum vitae* u trámite administrativo.

Quisiera reconocer que el hecho de exponer una lista de personas siempre da lugar al riesgo de olvidar a alguna de ellas, especialmente en esta etapa donde uno llega agotado. A estas personas deseo pedirles mil disculpas y muchas gracias.

Índice de abreviaturas

$^1\text{O}_2$	oxígeno singlete
$^3\text{O}_2$	oxígeno triplete
^1S	estado singlete
^3S	estado triplete
ABC	superfamilia <i>ATP-binding cassette</i>
ACF	función de autocorrelación de la energía potencial
ADP	adenosín difosfato
AG	algoritmo genético
ATP	adenosín trifosfato
BE	bomba de eflujo
BL	búsqueda local
BO	aproximación de Born-Oppenheimer
DCE	1,2 dicloroetano
DFT	Teoría del Funcional de la Densidad (<i>Density Functional Theory</i>)
DM	dinámica molecular
E/M	complejo enzima/modulador
E/S	complejo enzima/sustrato
EC ₅₀	concentración efectiva al 50%
EE	estado específico (<i>specific state</i>) aproximación de solvatación del estado excitado
FC	Franck-Condon
FEP	energía libre de perturbación (<i>free energy perturbation</i>)
GAFF	campo de fuerza general de AMBER, para moléculas orgánicas (<i>generalized amber force field</i>)

GGA	aproximación de gradiente generalizado (<i>generalized gradient approximation</i>)
GPU	tarjeta gráfica de procesamiento (<i>graphics processing unit</i>)
H	hamiltoniano
HF	Hartree-Fock
HK	Hohemberg-Kohn
HOMO	orbital ocupado de mayor energía (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
ICT-TICT	transferencia de carga intramolecular-transferencia de carga intramolecular sesgada (<i>intramolecular charge transfer-twisted intramolecular charge transfer</i>)
KS	Kohn-Sham
LDA	aproximación local de la densidad
LIE	energía libre de interacción lineal (<i>linear interaction energy</i>)
LUMO	orbital molecular desocupado de menor energía (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
MATE	superfamilia <i>multidrug and toxic compound extrusion</i>
MDR	resistencia a múltiples drogas (<i>multidrug resistance</i>)
MF	superfamilia <i>major facilitator</i>
MM	mecánica molecular
NAD	nicotinamida adenina dicleótido
NBD	dominio de unión de nucleótido (<i>nucleotic binding domain</i>)
NPT	condiciones de control de presión y temperatura en simulaciones de DM
NVT	condiciones de control de volumen y temperatura en simulaciones de DM
ONL	óptica no lineal
P-gp	P-glicoroteína humana (<i>human P-glycoprotein</i>)
PACT	PDT antimicrobiana (<i>photodynamic antimicrobial chemotherapy</i>)
PCM	modelo de solvente continuo polarizable (<i>polarizable continuum model</i>)
PDR	resistencia pleiotrópica de drogas (<i>pleiotropic drug resistance</i>)
PDT	terapia fotodinámica (<i>photodynamic therapy</i>)
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina
PS	fotosensibilizador (<i>photosensitizer</i>)
QM	mecánica cuántica
QM/MM	simulación híbrida de mecánica cuántica / mecánica molecular
RG	Runge-Gross
RHF	cálculo de Hartree Fock restringido (<i>restricted HF</i>)

RL	respuesta lineal (<i>linear response</i>) aproximación de solvatación del estado excitado
RMN	resonancia magnético nuclear
RMSD	desviación cuadrática media (<i>root mean square deviation</i>)
ROS	especies reactivas de oxígeno (<i>reactive oxygen species</i>)
S-QM/MM	QM/MM secuencial
SA	templado simulado (<i>simulated annealing</i>)
SCRF	campo de reacción autoconsistente (<i>self-consistent reaction field</i>)
SMR	superfamilia <i>small multidrug resistance</i>
TD-DFT	Teoría del Funcional de la Densidad dependiente del tiempo (<i>time dependent DFT</i>)
TM	α -hélice de transmembrana
TMD	dominio transmembrana
u.a.	unidades arbitrarias
UHF	cálculo de Hartree Fock irrestricto (<i>unrestricted HF</i>)
VIH	virus de inmuno deficiencia humana
VM	violeta de metileno
XR9576	tariquidar
Ψ	función de onda
ϵ	constante dieléctrica
η	índice de refracción

Prefacio

Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él.

Louis Pasteur (1822-1895) Químico y microbiólogo francés.

Concepto de modelado molecular.

En la historia de la ciencia, se puede encontrar que muchas veces el hombre empleó modelos o teorías aproximadas para entender o predecir fenómenos. Por ejemplo, a lo largo de la historia, se propusieron distintos modelos del sistema solar para explicar el período de las estaciones, el comportamiento del sol y las estrellas, como los de Kepler, Copérnico, Galileo y demás. Mientras, en el caso de la química, la estructura atómica tuvo varias explicaciones sobre la base de los modelos de Thompson, Rutherford y Bohr, hasta llegar al actual que logra dar respuesta a mayor cantidad de preguntas y observaciones experimentales.

Según una de las acepciones de la Real Academia Española, se define modelo como “*esquema teórico, generalmente en forma matemática, de un sistema o de una realidad compleja, como la evolución económica de un país, que se elabora para facilitar su comprensión y el estudio de su comportamiento*”. El diccionario inglés de Oxford agrega a la definición que “*es la descripción simplificada o idealizada de un sistema o proceso...*”.¹

Es así que podemos definir la Química computacional como el estudio de los procesos químicos a través del empleo de *modelos* para simular el comportamiento de sistemas moleculares.¹ A su vez, el “*Modelado Molecular*” es el área que se enfoca en proponer modelos cada vez más eficientes.² Mediante el mismo se estudian sistemas de diversos tamaños mediante el uso de modelos expresados en algoritmos matemáticos. Estos algoritmos están escritos en un cierto lenguaje de programación, a través del cual se realiza el cálculo. Los modelos pueden emplear Mecánica Molecular (**MM**) o Mecánica Cuántica (**QM**), o una combinación de ambos (**QM/MM**).

Debido a que en mecánica cuántica muy pocos problemas pueden ser resueltos en forma exacta (átomo de hidrógeno), en la mayoría de los casos son necesarias aproximaciones teóricas de diferente nivel y características. Estas aproximaciones se denominan métodos. Los métodos de la Mecánica Molecular se llaman campos de fuerza y permiten realizar simulaciones de tipo Monte Carlo y de Dinámica Molecular. Dentro de los basados en la Mecánica Cuántica, encontramos los semi-empíricos y los *ab initio* como Hartree-Fock, Post-Hartree-Fock y la Teoría del Funcional de la Densidad (**DFT**), entre otros.

El Modelado Molecular puede, en algunos casos, realizarse mediante un lápiz, un papel y una calculadora de mano, como en el caso de método de Hückel- π aplicado a una molécula de eteno, catión propilio o benceno. Sin embargo, las técnicas computacionales han revolucionado dicha área al punto de que la mayoría de los cálculos no pueden ser desarrollados sin el uso de una computadora (o procesador). Esto no implica que un modelo más sofisticado es mejor que uno más simple. Por otra parte las computadoras han ampliado el campo de aplicabilidad de los modelos (el tamaño molecular del sistema).¹ Por ejemplo, en 1985, Dewar *et al* propusieron el método semi-empírico AM1, con el cual se podían calcular moléculas orgánicas de menos de 20 átomos,³ mientras que en la actualidad el número de átomos llega a centenas con los métodos semi-empíricos comunes y a miles de átomos con los métodos de escaleo lineal, como LocalSCF.⁴

En la actualidad, los métodos semi-empíricos dejaron el paso a otros más exactos, como lo son los métodos de **DFT**. Ésto último se logró gracias a que la capacidad de cálculo de las computadoras es cada vez mayor, permitiendo emplear métodos cada vez más costosos. En conjunción con este hecho, va asociada la sorprendente rapidez del desarrollo tecnológico, que produce computadoras cada vez más rápidas y de costos mucho menores a los requeridos para la investigación experimental. En la actualidad, además de computadoras se cuenta con el importante desarrollo de placas gráficas (**GPUs**) y el lenguaje de programación adecuado para ellas.

Otro hecho, el cual no habría que dejar de considerar, es que junto con el desarrollo de computadoras más potentes y de menor tamaño, crece en la misma proporción el de los dispositivos de almacenamiento. Estos dispositivos son cada vez más pequeños y de más rápida escritura.

Desarrollo de modelos y teorías sobre bases experimentales

La comparación entre los resultados experimentales y los obtenidos mediante un modelo pueden indicar discrepancias entre la predicción teórica y los experimentos. Este hecho puede deberse tanto a las características del modelo como a las aproximaciones de las teorías en las cuales se enmarca dicho modelo. La comparación de los resultados experimentales y de los teóricos, obtenidos mediante simulación, representan un método valioso para la verificación de las teorías⁵.

Desde otro punto de vista, es posible utilizar la simulación como un método de evaluación del modelo o de la aproximación utilizada. Si los resultados de la simulación son comparables con los experimentales podremos establecer, sobre la base de la concordancia, el grado de confiabilidad del método para representar la realidad. Este aspecto es de primordial importancia ya que se presentan grandes posibilidades para simulación. Consideremos, por ejemplo, que se analiza un modelo de agua y, mediante simulación, encontramos que el mismo satisface adecuadamente los resultados experimentales disponibles. A partir del mismo sería posible simular aspectos y situaciones de difícil realización experimental (agua confinada en estrechos capilares o capas delgadas, presiones y temperaturas extremas, etc.). La simulación en esas circunstancias tiene poder *predictivo*. Puesto que la predicción es una de las características de la ciencia, la potencialidad de la simulación resulta enorme dentro del marco del método científico. Dado que la simulación no es teoría ni tampoco experimento, se podría sugerir como un tercer método en la ciencia.⁵

Los alcances del modelado, no terminan en el poder predictivo, sino que permiten entender detalles atomísticos, que difícilmente se puedan observar experimentalmente, como el tipo de interacciones involucrados en la unión de un inhibidor a una proteína y qué aminoácidos de la misma participan en tal interacción. En otros casos, permite desacoplar dos eventos independientes que un experimento *ve* solapados, como es el caso de la espectroscopía UV-Vis, donde existen acoples vibracionales, efectos de solvente, distintos estados excitados involucrados, etc. Además, mediante el modelado, se pueden conocer de qué origen son las transiciones observadas, cuáles son los orbitales moleculares involucrados, de qué tipo son, qué grado de transferencia de carga involucran, etc.

- 1 Leach, A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. 2nd edition. Addison Wesley Longman Limited. Edinburgh, Harlow, England. **1997**.
- 2 Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry*. 2nd edition. John Wiley & Sons, Ltd. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England. **2004**.
- 3 Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F. and Stewart, J. J. P. (1985) AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model, *Journal of American Chemical Society* *107*, 3902-3909.
- 4 Anikin, N. A.; Anisimov, V. M.; Bugaenko, V. L.; Bobrikov, V. V. and Andreyev, A. M. (2004) LocalSCF method for semiempirical quantum-chemical calculation of ultralarge biomolecules, *Journal of Chemical Physics* *121*, 1266-1270.
- 5 Grigera, J. R. *Simulación mediante Dinámica Molecular*. 1era edición. Editorial IFLP. La Plata, Argentina. 2008. Curso CABBIO **2008**.

1. Introducción y Objetivos

Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores.

Julius Robert Oppenheimer (1904-1967) Físico estadounidense.

1.1. Resistencia a Múltiples Drogas

La capacidad de una célula, procariota o eucariota, de resistir a un tratamiento de drogas citotóxicas y estructuralmente diversas, se conoce como resistencia a múltiples drogas (**MDR**, *multidrug resistance*). Esta resistencia presenta un problema clínico, que afecta a los tratamientos quimioterapéuticos en infecciones por bacterias u hongos.^{1,2} Además de su efecto en el tratamiento de infecciones microbianas, la **MDR** tiene un impacto muy importante en la quimioterapia contra cáncer.³

1.1.1. Mecanismos de MDR

Existen varios mecanismos de acción por el cual se produce la **MDR**. En el caso de bacterias, se pueden mencionar: mutaciones cromosómicas (el antimicrobiano pierde afinidad por la proteína blanco por una o más mutaciones en el sitio de unión) y resistencia adquirida (ejemplo, producción de β -lactamasasⁱ);¹ en células tumorales: ADN topoisomeras II y mecanismos de reparación del ADN.³ Sin embargo, el mecanismo de resistencia de mayor relevancia en los tres reinos es aquel que involucra a proteínas de transmembrana, comúnmente conocidas como bombas de eflujo (**BE**). Su acción consiste en transportar diferentes drogas citotóxicas hacia el exterior celular, utilizando algún tipo de fuerza

ⁱ Enzimas bacterianas que pueden transferirse a través de elementos genéticos móviles e hidrolizan antibióticos β -lactámicos, como la penicilina.

1. Introducción y Objetivos

impulsora para actuar en contra del gradiente de concentración del sustrato. Dichos sustratos pueden ser compuestos estructuralmente muy diferentes.

1.1.2. Transportadores ABC

Las BEs están constituidas por cinco superfamilias de proteínas: **SMR** (*Small Multidrug Resistance*), **MF** (*Major Facilitator*), **RND** (*Resistance/Nodulation/cell Division*), **MATE** (*Multidrug and toxic compound extrusion*) y **ABC** (*ATP-Binding Cassette*). La superfamilia **ABC** utiliza como fuerza impulsora de su actividad la hidrólisis de ATP, mientras que las restantes, usan el gradiente de protones (Figura 1). En bacterias, la mayoría de las BEs que confieren resistencia, pertenecen a las superfamilias que utilizan el gradiente de protones o cationes sodio en el caso de la superfamilia **MATE**. En contraste, en eucariotas, la mayoría de las BEs expresadas son de la superfamilia **ABC**, aún cuando éstas también están presentes en procariotas y arqueas.⁴ En el reino animal, sólo la superfamilia **ABC** se encuentra presente.

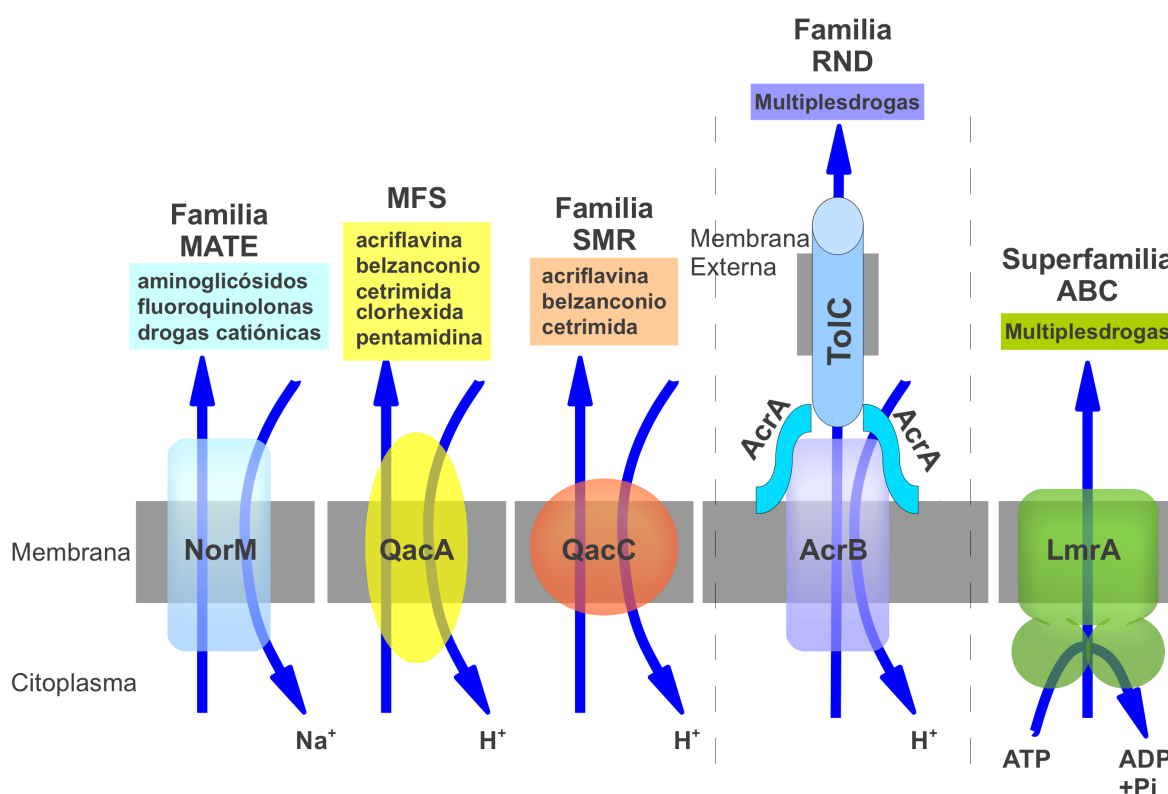


Figura 1: Las cinco superfamilias de transportadores de membrana. Las primeras cuatro superfamilias tienen como fuerza impulsora el gradiente de cationes. La superfamilia ABC utiliza la hidrólisis de ATP.

La superfamilia **ABC** es la mayor de las mencionadas, y está compuesta de siete subfamilias, las cuales se encuentran designadas con las letras de la **A** a la **G** (por ejemplo,

1. Introducción y Objetivos

ABCE), de acuerdo a su homología estructural y secuencial.⁵ Entre los miembros de esta familia se encuentran proteínas transportadoras de hongos patógenos (conocidos como **Resistencia Pleiotrópica de Drogas o PDR**), que confieren resistencia a antimicrobianos, por ejemplo, CDR1 de *Candida albicans*.^{6,7} Muchos de los hongos patógenos que producen **MDR** son oportunistas, generando un gran inconveniente en pacientes inmunodeprimidos (ejemplo, pacientes con SIDA o bajo terapia antitumoral).⁶

Si bien la primera función que se conoció de las **PDR** fue la de **MDR**, estudios sobre las proteínas CDR1 y CDR2 de *C. albicans*, demostraron que su función fisiológica es la de transportar fosfolípidos y esteroides a través de la membrana. Muy posiblemente, este comportamiento sea así para los genes ortólogosⁱⁱ de otros hongos patógenos.⁷

1.1.3. P-glicoproteína humana

Otra proteína relacionada con las **PDR**, es la P-glicoproteína humana (**P-gp**; **MDR1**; **ABCB1**, ver Figura 2), la cual tiene un efecto importante en la resistencia a drogas antitumorales. Al igual que las **PDR** en hongos, la **P-gp**, además de su actividad **MDR**,

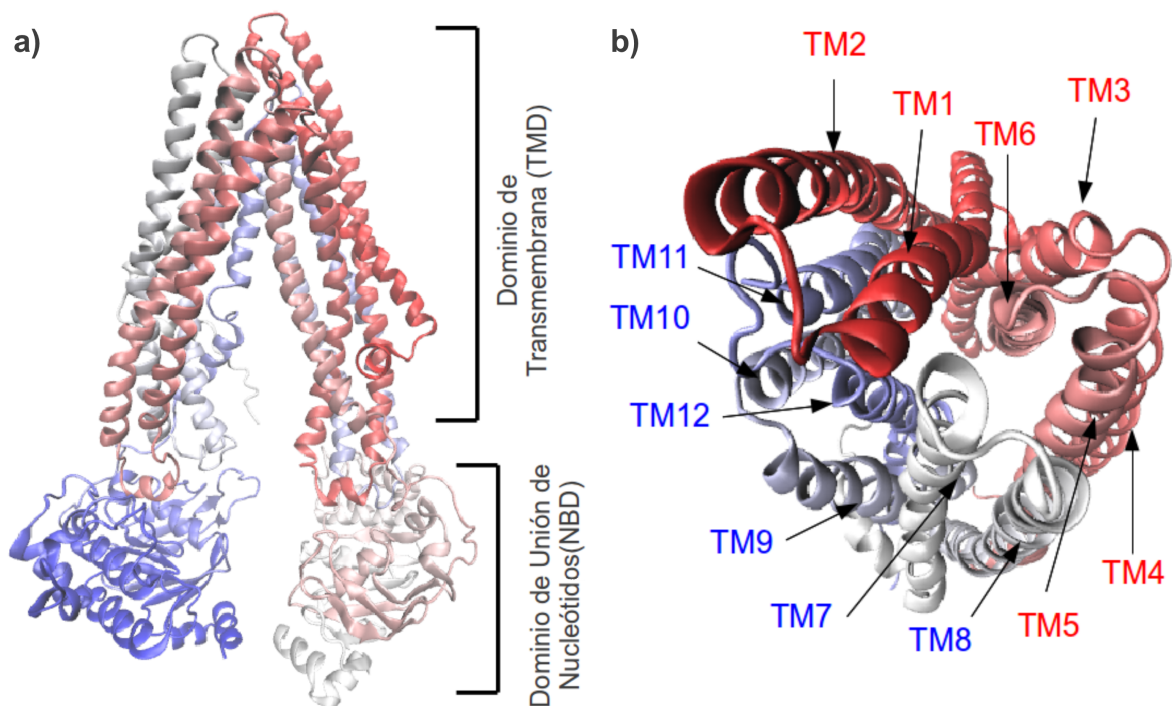


Figura 2 a) La **P-gp** está compuesta por dos dominios **TMD** y dos **NBD**. La coloración empieza en el rojo (*N*-terminal) y sigue hasta el azul (*C*-terminal). b) en rojo se muestran los **TMs** del **TMD1** y en azul del **TMD2**.

ii Gen ortólogo: gen proveniente de un ancestro en común que deriva en genes homólogos de dos especies diferentes.

1. Introducción y Objetivos

cumpliría la función fisiológica de proteger al organismo de las toxinas en la dieta y las provenientes del ambiente, por eso naturalmente se encuentra sobreexpresada en hígado, riñones e intestino.^{8,9,10} Además, también podría tener un rol fundamental en la regulación de la diferenciación celular, proliferación e inhibición de la apoptosis.¹¹ Su expresión, relativamente alta en los órganos mencionados anteriormente, puede afectar la farmacocinética y la eficacia de varios medicamentos, como los anti-neoplásicos y antivirales. A su vez, la sobre-expresión de **P-gp** en algunas células tumorales es un obstáculo importante en regímenes de quimioterapia contra el cáncer.^{12,13} Por lo tanto, su principal función natural dificulta el tratamiento terapéutico de muchas enfermedades relevantes^{12,13,14}.

Debido a los inconvenientes que genera en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades humanas, la **P-gp** es, probablemente, la más conocida de la superfamilia **ABC** y, por lo tanto, puede ser considerada como un modelo paradigmático de esta familia de transportadores.^{15,16,17,18,19,20} Sus 1.280 aminoácidos se organizan como una sola cadena peptídica con dos mitades homólogas las que poseen una identidad de secuencia del 43%. Las dos regiones homólogas están unidas por aproximadamente 60 aminoácidos, los que constituyen la región de unión.²¹ Cada mitad tiene seis α -hélices de transmembrana (**TM**) que conforman un sólo dominio de transmembrana (**TMD**), y un dominio hidrofílico, ubicado en el citosol, que contiene un sitio de unión a ATP, conocido como dominio de unión de nucleótidos (**NBD**), ver Figura 2.^{22,23,24,25,26}

1.1.3.1. Mecanismo de funcionamiento de la P-gp

El mecanismo de acción de la **P-gp** es bastante discutido. Todavía no está bien esclarecido si la **P-gp** se comporta como un “*hydrophobic vacuum cleaner*” (aspiradora hidrofóbica), tomando el sustrato desde la membrana y expulsándolo al exterior celular, o como una flipasa, moviendo el sustrato desde la capa citoplasmática de la membrana lipídica hacia la capa extracelular.^{27,30} Más allá de las discrepancias, los siguientes aspectos están generalmente aceptados: el mecanismo de acción comienza con la unión del sustrato a la **P-gp** libre de nucleótido (estado de reposo o relajado), que en este estado tiene una gran afinidad por el sustrato. La unión se produce en la región **TMD** inserta en la membrana. Loo *et al.* propusieron, sobre la base de datos experimentales, que los pares de **TMs** 2-11 y 5-8 actúan como puertas de ingreso de los sustratos a la región **TMD**. La unión de los sustratos provoca

1. Introducción y Objetivos

cambios conformacionales en los **NBDs** que permiten la unión de una o las dos moléculas de ATP y posterior dimerización de los dos **NBDs** (es decir se acercan hasta acoplarse),²⁸ seguida por la hidrólisis consecutiva de dos moléculas de ATP (Figura 3).²⁹ Estas dos hidrólisis producen una re-acomodación del sustrato a un estado de baja afinidad y luego su expulsión. Por último, la proteína vuelve a su estado de reposo, tras la liberación de ADP y fosfato.^{18,27}

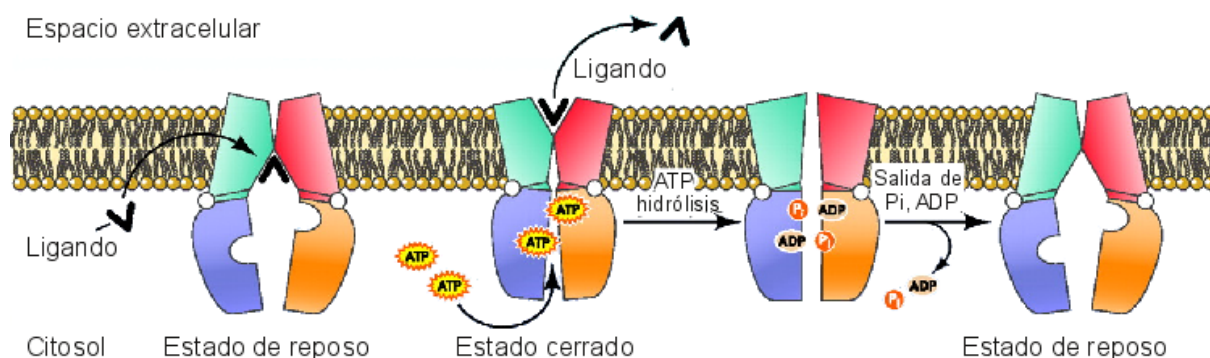


Figura 3: Mecanismo general de la **P-gp**, en el que se muestran que esta proteína adopta al menos dos estados estructuralmente distintos a lo largo de su mecanismo de acción

1.1.3.2. *Sustratos y Moduladores*

La **P-gp** puede interactuar con una gran variedad de compuestos estructuralmente distintos. (Figura 4). Entre los sustratos naturales que esta proteína transporta, se encuentran drogas quimioterapéuticas, esteroides, colorantes fluorescentes, ionóforos, péptidos lineales y cíclicos (Figura 4).³⁰ Entre los más conocidos se encuentran los de la familia de las rodaminas (rodamina 123, 6G y B), las cuales han sido muy utilizadas a nivel experimental debido a que, por su propiedad fluorescente, se puede cuantificar la cantidad de rodamina que es retenida dentro de la célula si la **P-gp** es inhibida, así como también en estudios de transporte de sustratos.^{30,31,32} Como se mencionó anteriormente, las drogas antivirales y antitumorales (como los mostrados a la izquierda de la Figura 4) también son sustratos de la **P-gp**, hecho que le atribuye la relevancia farmacológica mencionada.

Además de sus sustratos naturales, la **P-gp** puede unirse a otro tipo de drogas, a menudo llamadas moduladores de **MDR**, que presentan el interesante potencial de inhibir o modular su actividad (Figura 4). Los moduladores de **MDR** son objeto de intensa investigación farmacéutica, debido a que podrían ser co-administrados con el sustrato (droga citotóxica) a fin de controlar o inhibir la extrusión de las mismas. El diseño de los mismos ha sido un desafío importante en los últimos tiempos.^{33,34,35,36,37,38,39,40}

Uno de los mayores objetivos actuales dentro de la problemática de **MDR**, es encontrar las

1. Introducción y Objetivos

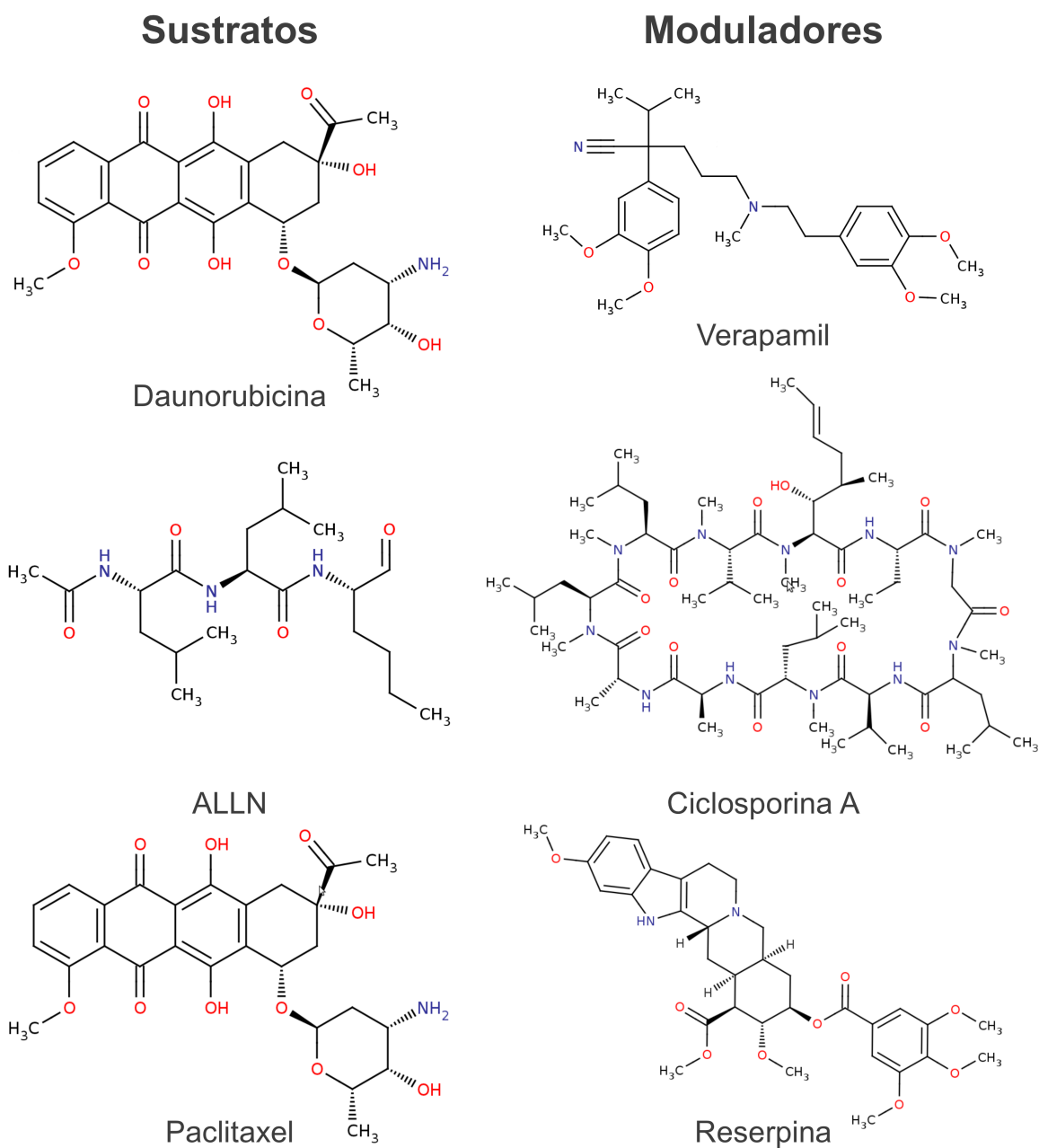


Figura 4: Algunos compuestos que tiene actividad como sustratos o como moduladores de la P-gp. Los sustratos mostrados son drogas antitumorales.

característica físico-químicas que determinan a un compuesto como modulador o como un mal sustrato,⁴¹ es decir hallar características que asistan al diseño racional de moduladores. Entre los descriptores postulados, se pueden hallar el tamaño molecular, la hidrofobicidad, el momento dipolar, la capacidad aceptora o donora de puentes hidrógeno, cantidad de grupos aromáticos, etc.^{35,42,43}

Si bien hay una cantidad considerable de estudios fisiológicos y bioquímicos

1. Introducción y Objetivos

relacionados con la actividad de **P-gp**,²²⁻⁴⁰ el diseño de fármacos eficaces capaces de controlar la actividad **MDR** tiene dos obstáculos principales. En primer lugar, es una tarea intrínsecamente compleja debido a que la **P-gp** reconoce una amplia variedad de compuestos (sean sustratos o moduladores) estructuralmente diferentes, lo que no permite emplear extensamente relaciones de estructura-actividad. Su capacidad para interactuar con un gran número de compuestos puede ser atribuida a la existencia de varios sitios de unión de drogas separados o a un sitio de unión de drogas grande y flexible.³⁰ Por otra parte, la ausencia de una descripción detallada de su estructura a nivel atómico impidió por mucho tiempo el uso de muchas herramientas de modelado computacional para hacer frente a estos estudios.

Inicialmente los moduladores de **P-gp** fueron drogas conocidas y aplicadas a otros tratamientos, como, por ejemplo, el verapamil (bloqueador del canal de calcio), la reserpina (antipsicótico y antihipertensivo) y la cicloporina A (inmunodepresor). Debido a que fueron los primeros en ser probados, se los conoce como moduladores de 1ra generación. Éstos resultaron ser efectivos *in vitro*. Sin embargo, presentaron importantes efectos colaterales propios ya que los compuestos no fueron específicamente diseñados para combatir **MDR**, y las dosis requeridas para generar inhibición eran demasiado tóxicas.^{27,44} Posteriormente, surgió una segunda generación de moduladores de **MDR**, basada sobre los compuestos de la primera, los cuales fueron químicamente modificados de forma de reducir los efectos colaterales y la elevada toxicidad. Por ejemplo, el enantiómero R del verapamil mostró ser un bloqueador de canales de calcio más débil que el estereoisómero S, pero aproximadamente igual de efectivo en la modulación de **P-gp**. Lamentablemente, esta generación de compuestos no resultaron ser mejores inhibidores de **MDR** en los ensayos clínicos, ya que no produjeron una inhibición significativa *in vivo* de la **P-gp**.⁴⁵

La tercera generación de moduladores está caracterizada por su alta afinidad de unión a **P-gp** (u otros **BEs ABC**) logrando, en ensayos *in vitro*, la inhibición en concentraciones de droga de escala nanomolar. Estos compuestos surgen de programas de desarrollo de drogas y actualmente se encuentran en etapas de investigación clínica sobre formas específicas de cáncer avanzado.⁴⁵ Entre los moduladores de tercera generación, se encuentra el XR9576 o tariquidar (estudiado en el capítulo 3), el cual es uno de los compuestos más prometedores de la generación. Éste superó con éxito de pruebas clínicas de fase I y II, debido a que tiene una potencia 100 o 1000 veces mayor que los compuestos de las otras generaciones. Además,

1. Introducción y Objetivos

tiene la habilidad de discriminar entre la **P-gp** y la MRP1 (otro transportador humano **ABC**) y tiene larga duración de su acción.^{44,45,46}

En el diseño de moduladores, un estudio de mapeo de los farmacóforos sugirió que la interacción **P-gp**/modulador está mayormente determinada por la distribución de parámetros físico-químicos de los compuestos, como interacciones π - π , dipolares, hidrofóbicas, capacidad aceptora o donora de puentes de hidrógeno, etc., y no tanto por las características estructurales o grupos funcionales.⁴⁴ En este contexto, Ecker *et al.* propusieron que la capacidad aceptora de puentes de hidrógeno era un parámetro importante que indicaba la potencialidad de un modulador.^{35,47}

Es importante entender qué tipo de inhibición producen los moduladores. Al igual que otros aspectos de la **P-gp**, la respuesta no es clara. Algunos estudios experimentales proponen una inhibición competitiva y otros alostérica.^{39,48,49,50,51} En 2003, Clarke *et al.* propusieron que la inhibición se basa en que los moduladores inducen cambios conformacionales que se transmiten hacia la región de **NBDs** provocando que éstos no se acerquen lo suficiente o de la forma adecuada para que la hidrólisis de ATP ocurra.⁵²

1.1.3.3. Sitios de unión

A diferencia de la mayoría de las proteínas, la **P-gp** no tiene un sitio activo claro donde se unen los sustratos. En cambio, toda la región de **TMD** es un sitio de unión donde el compuesto se une, se re-orienta (después de la hidrólisis de ATP) y desde el cual es expulsado. Se cree que los dos **TMDs** (**TMD1** y **2**) participan de la unión del sustrato, ya que el sitio de unión pareciera estar en la interfaz entre ambos. Por otro lado, no se logra dar una explicación unívoca a la capacidad de la **P-gp** de reconocer una gran diversidad de compuestos. Se han propuesto dos mecanismos posibles: un ajuste inducido (*induced fit*) debido a la flexibilidad del sitio o la existencia múltiples sitios de unión.^{39,53,54} Dentro de este último, algunos estudios proponen que existen varios sitios para los distintos sustratos y moduladores. Algunos de estos sitios pueden producir una inhibición alostérica ó competitiva, esto último en el caso de que el sustrato y el modulador compartan el mismo sitio.³⁹ Mediante escaneo mutagénico de cisteínas y marcado de fotoafinidad se encontró que todos los **TMs** parecen participar de la unión con distintos ligandos.⁵⁵ Algunos de los aminoácidos más importantes pertenecientes a estos **TMs**, y que participan de la unión son:

1. Introducción y Objetivos

S222 del **TM4**;⁵⁶ I306 del **TM5**;^{38,56} L339, I340, A342, F343 y G346 del **TM6**;^{38,57,58,59} F942 y T945(**TM11**);⁵⁷ L975, V982 y A985 (**TM12**).^{38,60} El aminoácido F343(**TM6**) ha sido propuesto para participar en la unión de rodamina B, mientras que I306(**TM5**) y V982(**TM12**) en la de verapamil, proponiendo los autores diferentes sitios de unión para el sustrato y el modulador.³⁸ En la propuesta de estos sitios de unión, **TM6** sería de suma importancia, ya que la interacción de un sustrato o modulador con este **TM** produciría cambios conformacionales que alterarían la hidrólisis de ATP, ya que el **TM6** está unido directamente con **NBD1**. En el caso de la interacción con moduladores la actividad ATPasa de la **P-gp** se vería reducida, y en el caso de los sustratos incrementada.^{58,59,61} Algunas de estas propuestas podrán ser evaluadas a lo largo de la tesis empleando las herramientas del Modelado Molecular.

1.1.4. **P-gp como modelo de BE tipo ABC**

El conocimiento sobre los sitios de unión de la **P-gp**, su mecanismo de **BE**, así como los compuestos que modulan su actividad pueden aplicarse en el estudio de otros transportadores **ABCs** tanto procariotas como eucariotas, debido a que el mecanismo por el cual reconocen sustratos y llevan su actividad sería muy similar. Asimismo, fue demostrado que muchos de los compuestos que son capaces de modular o inhibir a la **P-gp** son capaces de inhibir a transportadores de las otras superfamilias.⁶² Por ejemplo, la reserpina y el verapamil logran inhibir a NorA, perteneciente a la superfamilia **MF**.⁶³

Este hecho motivó la realización de un trabajo en colaboración con el Dr. George Tegos (Universidad de Ioannina, Ioannina, Grecia) quien estudió metabolitos secundarios de plantas que posean potenciales capacidades antimicrobianas o moduladoras de **MDR**. Al parecer, las plantas producen compuestos antimicrobianos que serían de un espectro reducido o poco eficaces. Sin embargo, en uno de sus trabajos mostró que, en realidad, la actividad antimicrobiana de muchos compuestos naturales, como la berberina, se encuentra enmascarada debido a las **BEs**. En dicho trabajo, mostró también que la actividad antimicrobiana de tales metabolitos secundarios puede incrementarse, si se administran conjuntamente con inhibidores de **BEs**.^{64,65} En estos trabajos, se emplea la berberina, no sólo porque es buen modelo de un antimicrobiano proveniente de planta, sino también porque sirve como marcador fluorescente, pudiendo monitorear su acumulación dentro de la célula.

1. Introducción y Objetivos

Conjuntamente con estos hallazgos, otros trabajos independientes, ponderan el uso de metabolitos secundarios de plantas como inhibidores de **BEs**, por ejemplo los flavonoides.⁶⁶

Dos metabolitos secundarios, neohesperidósidos poliacetilados de *Geranium caespitosum*, presentan una importante actividad de inhibición de **BEs** bacterianas, según los resultados experimentales del Dr. Tegos. En aporte al trabajo en colaboración, se estudió mediante técnicas de modelado molecular la interacción de ambos metabolitos con la **P-gp** y cuál sería el sitio de mayor afinidad de ambos, así como también la dinámica de la interacción. Los resultados encontrados fueron comparados con los encontrados para moduladores de primera y tercera generación.

1.1.5. Otras estrategias para eludir la MDR

La estrategia que presenta mayores esfuerzos de investigación es la de diseñar moduladores que puedan inhibir a la proteína causante de la MDR, permitiendo que la droga antimicrobiana o antitumoral produzca su efecto citotóxico. Sin embargo, debido a las dificultades para encontrar parámetros que permitan tal diseño y a la complejidad de la **MDR** que puede deberse a otras causas, además de la expresión de **BEs**, surgieron otras estrategias para inhibir la **MDR** o eludir su mecanismo.

Una de las estrategias para la inhibición de **MDR** es la utilización de oligonucleótidos antisentidoⁱⁱⁱ para regular genéticamente la expresión (disminuyéndola) de las **BEs**. En tanto, otra es la de controlar diversos mecanismos fisiológicos involucrados en la regulación de las proteínas **MDR**. La inducción de la expresión del gen *MDR1* en las células tumorales ocurre después del tratamiento con drogas citotóxicas, mientras que esta respuesta es inhibida mediante inhibidores de la señal dependiente de calcio.⁴⁵

A diferencia de estas estrategias, otras no buscan inhibir la **MDR**, sino eludirla. Entre estas, se pueden encontrar, 1) diseño de drogas citotóxicas que sean malos sustratos para las **BEs** 2) inmunización con vacunas diseñadas a partir de células tumorales autólogas^{iv} 3) terapia anti-

iii Los oligonucleótidos antisentido son cadenas simples de ADN o ARN que son complementarios a una secuencia elegida. En el caso de ARN antisentido que impiden la traducción de proteínas de ciertas cadenas de ARN mensajero por su unión a ellos. El ADN antisentido puede ser utilizado para apuntar un específico, complementario (codificación o no codificación-) ARN. Si el enlace tiene lugar este ADN / ARN híbrido puede ser degradado por la enzima ARNasa H.

iv Célula cancerosa del propio tumor de un individuo.

1. Introducción y Objetivos

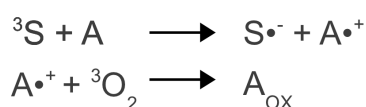
angiogénica,^v a través de compuestos que lograrían evitar la proliferación de vasos sanguíneos que nutren al tumor.⁴⁵ Estas opciones se comienzan a discutir en el ámbito de la **MDR** en cáncer, pero no son alternativas para infecciones microbianas resistentes.

1.2. Terapia Fotodinámica como estrategia para infecciones resistentes (MDR de patógenos).

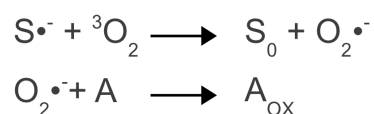
Una estrategia que propone una alternativa al uso de inhibidores de **MDR** como método de superar esta problemática es la terapia fotodinámica (**PDT**). Éste es un tratamiento que utiliza un compuesto químico no tóxico, denominado fotosensibilizador (**PS**), el cual, en combinación con luz visible de baja intensidad y en presencia de oxígeno, produce especies citotóxicas que provocan la muerte celular, mediante un daño oxidativo. Al no ser tóxico, no produce efectos adversos. La **PDT** sólo tiene efecto en la zona irradiada, por lo que es un tratamiento localizado.

1.2.1. Mecanismos de acción de la PDT

El proceso de la **PDT** involucra la formación del estado singlete excitado del **PS** (¹S), mediante la absorción de un fotón con la frecuencia apropiada (usualmente en rango visible) y posterior decaimiento hacia el estado triplete (³S) mediante un entrecruzamiento de sistemas (Esquema 1). El estado triplete puede reaccionar posteriormente con las biomoléculas circundantes o con el oxígeno endógeno de la célula. En el primer caso, se denominan reacciones de Tipo I (Esquema 1), las cuales son radicalarias o redox, donde el estado triplete reacciona con una biomolécula vecina A (puede ser ADN, proteína, lípidos, etc.), a través de transferencia de un electrón o de un átomo de hidrógeno:



o también

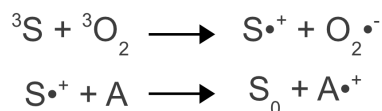


^v El tratamiento antiangiogénico realizaría una acción antitumoral de forma indirecta mediante la inhibición de la vascularización del tumor e impidiendo que se le aporten los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo.

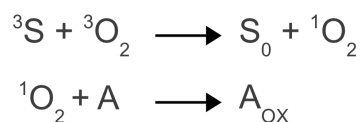
1. Introducción y Objetivos

En ambos casos, A_{OX} es la biomolécula A oxidada.

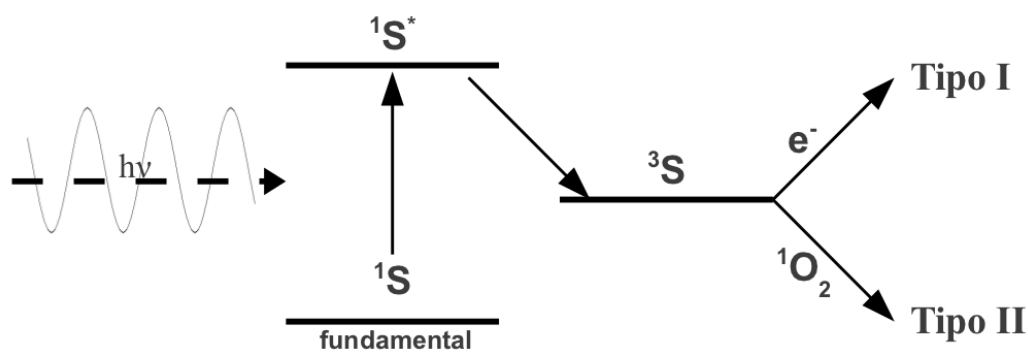
Una vía alternativa a las reacciones fotoquímicas Tipo I es la reacción del estado triplete con el oxígeno molecular, resultando en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como, superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno, quedando entonces:



Los procesos de Tipo II involucran la transferencia de energía desde el estado triplete hacia la molécula de oxígeno en su estado fundamental, es decir triplete (3O_2), dando la formación de oxígeno singlete (1O_2) el cual es muy reactivo, como se muestra en la ecuación siguiente:



En este caso, el oxígeno singlete es una especie de vida relativamente corta dentro de la célula (menos de $0,05\mu s$) y es el que ocasiona el daño celular, mediante la oxidación de biomoléculas.^{67,68,69}

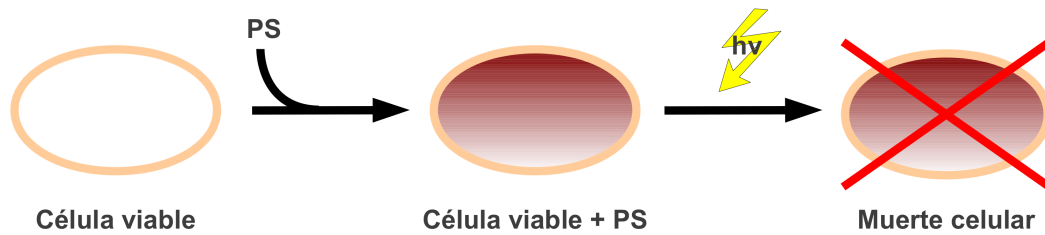


Esquema 1: La formación del estado triplete del PS a través del entrecruzamiento de sistemas. Una buena producción del estado triplete es necesaria para un buen tratamiento de PDT, debido a que es éste, quien lleva a cabo las posteriores reacciones fotoquímicas.

Este proceso produce importantes daños dentro de la célula y no siempre son reparables o reparables a tiempo. El daño en el ADN, puede producir considerables modificaciones en vías tanto catabólicas como anabólicas esenciales para la vida o la replicación. Otro ejemplo, es el daño en los lípidos o esteroides, el cual causa daños estructurales significativos. Además, tanto las reacciones de Tipo I como de Tipo II, pueden generar reacciones en cadena terminando en la muerte celular.

1. Introducción y Objetivos

En resumen, un **PS** es una molécula no tóxica que al ser irradiada por luz visible, genera un estado triplete capaz de reaccionar directa o indirectamente (producción de oxígeno singlete) con biomoléculas presentes en el medio de reacción (ejemplo, membrana celular, núcleo celular, etc.) para hacerlas muy activas químicamente y generar procesos en cadena que lleven a la muerte celular (Esquema 2).



Esquema 2: Acción de un fotosensibilizador (PS) en la terapia fotodinámica

1.2.2. PDT en el tratamiento del cáncer

En los últimos 30 años, la **PDT** ha sido usada clínicamente en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer localizados.

La **PDT** puede proveer un tratamiento alternativo para tumores con **MDR**, debido a que los **PSs** se acumulan preferencialmente en la zona tumoral, posibilitando así la muerte de células cancerosas resistentes o la modulación de su fenotipo **MDR**.⁶⁸ Esta acumulación se debe a diferencias fisiológicas entre el tejido tumoral y el normal, como por ejemplo, los tejidos tumorales tiene un volumen intersticial mayor que el de los tejidos normales y además el pH extracelular es bajo en el caso de los tumores.⁶⁷

La preferencia de la acumulación de los **PSs** en tejidos tumorales produce que la **PDT** sea menos tóxica que los tratamientos usando moduladores de **MDR**. Otra ventaja es que la **PDT**, en principio, funciona sobre todos los tipos de cáncer, a diferencia de la quimioterapia o la radioterapia. Además, debido a que los **PSs** no tienen efectos acumulativos la **PDT** puede ser repetida muchas veces, así como también aplicada sobre personas mayores de edad o demasiado débiles para enfrentar un tratamiento quirúrgico.⁶⁸

Sin embargo, una de las principales desventajas es la sensibilización por parte de los pacientes a la luz, viéndose obligados a evitar la exposición en forma directa a la luz solar o la luz brillante de interiores por al menos un lapso de 6 semanas. Otras de las principales desventajas, es que para asegurar una cantidad de luz incidente suficiente en el tejido a

1. Introducción y Objetivos

irradiar, el rango de absorción por parte de los **PSs** debe ser entre 600 y 800 nm. No puede ser por debajo de 600 nm porque la hemoglobina absorbe luz entre 400 y 600 nm. Asimismo, no puede ser mucho mayor que 800 nm por inconvenientes experimentales, aún cuando la energía del singlete excitado del oxígeno molecular está aún algo más al infrarrojo (1270 nm).⁶⁸

Por otro lado, está claro que los **PSs** pueden ser sustratos de las **BEs** y, por lo tanto, ser expulsados por éstas (**P-gp** principalmente, en el caso de cáncer), por lo tanto, una motivación es encontrar **PSs** que sean inadecuados sustratos para las **BEs**.⁶⁸

Un potencial prometedor de la **PDT**, recientemente explorado, es su aplicación en sí misma como inhibidor de la **MDR**. Ésto sería en principio posible, puesto que la **P-gp** sería una de las biomoléculas que sufre el daño oxidativo.⁶⁸ Asimismo, podría inhibir la **MDR** no por inhibición de la proteína en sí, sino activando un regulador transcripcional, que disminuiría el nivel de expresión del transportador.⁷⁰

1.2.3. PDT en el tratamiento de infecciones resistentes

Si bien en los últimos 30 años la **PDT** tomó popularidad al haber sido usada clínicamente en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer localizados, el concepto de **PDT** se inició en 1900 cuando Raab describió la acción antimicrobiana de la acridina y la luz sobre especies *Paramecium*.⁷¹ La **PDT** aplicada a infecciones microbianas se conoce como **PDT** antimicrobiana (*photodynamic antimicrobial chemotherapy*, **PACT**).⁶⁹

La utilización de la **PACT** ha tomado relevancia debido al uso indiscriminado de compuestos antimicrobianos, lo que promovió el surgimiento de cepas resistentes (bacterias, hongos, parásitos y virus) a varios de éstos, provocando **MDR** microbiana.⁶⁹

A diferencia de los antibióticos convencionales (naturales o sintéticos), el uso de **PACT** presenta interesantes ventajas para infecciones localizadas no sólo por su carácter no invasivo, sino porque se propone que no induce **MDR** a futuro, debido que los tratamientos en **PACT** no son prolongados.⁷² Lamentablemente, muchos colorantes utilizados como **PSs** en **PACT**, son también sustratos de las **BEs** que producen **MDR**.^{74,73} Del mismo modo que la terapia antimicrobiana tradicional, la **PACT** también puede ser potenciada para células microbianas con **MDR** adquirida si se combina el **PS** con inhibidores apropiados de **MDR** o si pueden

1. Introducción y Objetivos

encontrarse **PSs** que no sean sustratos de las bombas eflujo de **MDR**.^{73,74}

Se refiere a compuestos antimicrobianos en general debido a que pueden ser aplicados a bacterias (tanto Gram positivas como negativas), hongos, parásitos y hasta virus. En este último caso, se aplica en infecciones cutáneas, como el Herpes. Asimismo, actualmente existe sumo interés en aplicar **PACT** sobre productos sanguíneos para eliminar VIH (*virus de la inmunodeficiencia humana*).⁶⁹

Las contribuciones de la **PACT** a la mejora de la quimioterapia antimicrobiana de infecciones localizadas incluyen la reducción de los costos y tiempo del tratamiento, como así también la disminución de los efectos adversos observados en administración sistemática de antibióticos.⁶⁹

1.2.4. Fotosensibilizadores

La mayoría de los **PSs** que están en investigación para el tratamiento de cáncer y otras enfermedades de tejido están basados en un núcleo tetrapirrólico, como por ejemplo, porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas y texafirinas.⁷⁵ Estas moléculas han sido seleccionadas por su especificidad hacia las células tumorales. Sin embargo, recientemente ha aumentado el interés en el uso de **PSs** con aplicaciones en infecciones microbianas.⁷⁶ Entre éstos se pueden incluir los xantenos (ej. rosa de bengala), fenotiazinas (ej. violeta de metileno y azul de metileno), acridinas (ej. naranja de acridina) y perilenquinonas (ej. hipericina).⁷⁵

Algunos estudios han mostrado que las bacterias Gram-positivas son las más susceptibles hacia el tratamiento con **PDT**. Ésta es también factible sobre bacterias Gram-negativas, aunque algunos trabajos experimentales mostraron la existencia de resistencia hacia **PDT** por parte de estas bacterias.^{76,77} Esta resistencia puede ser superada mediante una adecuada selección del **PS**. Entre estos, se encuentran los **PSs** catiónicos que tienen una producción significativa de oxígeno singlete. Estos compuestos, debido a su carga positiva, pueden ingresar en bacterias Gram-negativas, gracias al potencial negativo de la membrana de estos organismos. Dentro de este grupo, las moléculas líderes en términos del descubrimiento de drogas pertenecen a la familia de las fenotiazinas, las cuales, además son selectivamente captadas por parte de las bacterias.⁷⁸ Entre los grandes referentes de este grupo se encuentran el azul de metileno y el azul de toluidina-O (**TBO**), los cuales han mostrado una importante actividad antimicrobiana.⁷⁹ Sin embargo, el Dr. Tegos en un trabajo del 2006, demostró que

1. Introducción y Objetivos

las fenotiazinas son también sustrato de las **BEs**. Esto abre la posibilidad de utilizar **PSs** en conjunción con moduladores de **MDR**.⁷⁷

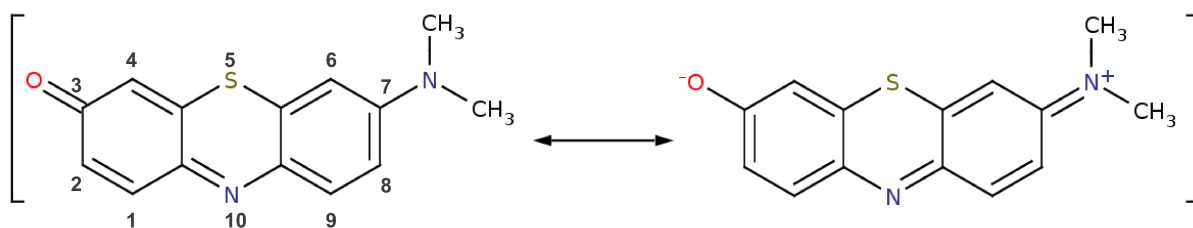
La desinfección de la sangre o de sus derivados usando **PACT**, ha atraído un gran interés en investigaciones recientes.^{79,80} Esto se debe a que la transfusión de la sangre y el uso de productos derivados de ella son esenciales en la medicina moderna.⁷⁸ La sangre está compuesta principalmente por tres fracciones: plasma, plaquetas y células rojas. Cada uno de estos componentes son usados en el tratamiento de la hemofilia.⁸¹ Por ejemplo, concentrados de glóbulos rojos son utilizados en mejorar la capacidad portadora de oxígeno debida a la pérdida de sangre luego de un trauma o una cirugía.^{78,79} Sin embargo, la sangre puede estar contaminada con bacterias, parásitos, hongos o virus y, por lo tanto, se requiere métodos eficaces de descontaminación.^{78,81}

En nuestra región en particular, el azul de metileno se utiliza en bancos de sangre para la foto-descontaminación en prevención de la enfermedad de Chagas, causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*.⁷⁶ Sin embargo, la **PACT** usando el azul de metileno produce una elevada hemólisis. Otro inconveniente que tiene este **PS** es que no inactiva el VIH intracelular o se desactiva poco en el caso del VSV (*vesicular stomatitis virus*). Esto se debe a que su naturaleza hidrofílica es desfavorable para la penetración celular. De este modo, para los casos de inactivación de virus intracelulares, resultan mucho más eficiente moléculas más lipofílicas, como el violeta de metileno.^{81,82} Esta es una fenotiazina neutra que resulta ser mucho más efectiva contra los virus intracelulares de glóbulos rojos, que el azul de metileno que es un catión hidrofílico.^{78,79,82}

1.2.5. Violeta de metileno (VM)

El violeta de metileno de *Bernthsen* (**VM**, Esquema 3) es un colorante sintético, perteneciente a la familia de las fenotiazinas. Han sido reportadas muchas aplicaciones, tanto biológicas como no biológicas. Entre ellas, se ha investigado el **VM** como potencial **PS** para la inactivación "*in situ*" de agente biológicos en glóbulos rojos.^{83,84,85} La viabilidad de las células también fue investigada usando el **VM**, el cual aparentemente sólo puede penetrar células muertas.⁸⁶ Por otro lado, el **VM** también fue usado para la detección amperométrica de peróxido de hidrógeno (como indicador de estrés oxidativo) y de nicotinamida adenina dinucleótido (**NAD**).⁸⁷ También es un inhibidor efectivo de corrosión de acero en medio

1. Introducción y Objetivos



Esquema 3: Estructuras de resonancia del Violeta de Metileno, junto con la numeración de la nomenclatura IUPAC con números en negrita.

ácido.⁸⁸

Además, una de las características más importantes del **VM**, es que tiene una potencial aplicación como crómoforo *push-pull*. Estas moléculas *push-pull* tienen un donador de electrones acoplado a través de un sistema π con un aceptor de electrones. El estado basal de estas moléculas está representado por dos estructuras de resonancia: una completamente neutra y otra zwitteriónica, resultante de la deslocalización electrónica (Esquema 3).⁸⁹ Las moléculas *push-pull* presentan propiedades de óptica no lineal (**ONL**) y, por ello, tienen potenciales aplicaciones en distintos materiales donde estas propiedades son muy importantes. Algunas de las aplicaciones más importantes son: tecnología láser, telecomunicaciones, dispositivos de memoria e interruptores ópticos (*optical switches*).^{90,91} Las propiedades de estos materiales están fuertemente afectadas por acoplamiento electrón-fonón y efectos de solvente.^{92,93,95} El análisis del corrimiento solvatocrómico de la frecuencia de absorción y/o emisión es uno de los métodos más usados para dar una estimación del momento dipolar mesomérico, el cual es la variación del momento dipolar con la excitación. Éste es un importante parámetro para caracterizar el comportamiento **ONL** de crómoforos *push-pull*. Además su determinación resulta importante para propósitos teóricos o experimentales.⁹⁵

Las propiedades fotofísicas del **VM** (y de otros dos derivados cercanos) fueron estudiados por Otsuki *et al.* en solventes apróticos y mezclas de agua:dioxano.^{94,95} De acuerdo con estos estudios, la fotofísica del **VM** mostró particularidades significativas en lo referente a su solvatocromismo, es decir el cambio de las energías de absorción y fluorescencia con el cambio de la polaridad del medio. Por ejemplo, un análisis de Lippert-Mataga^{vi} presentaría típicamente un comportamiento lineal (a menos que haya interacciones muy específicas con el solvente), donde la pendiente del gráfico es el cambio de momento dipolar entre los estados involucrados en las transiciones. Sin embargo, el **VM** mostró un comportamiento inusual, la

vi El análisis de Lippert-Mataga consiste en graficar la diferencia de frecuencias entre el máximo de absorción y el de fluorescencia (llamado corrimiento de Stokes $(\Delta\nu) = \nu_{a\max} - \nu_{f\max}$) versus un parámetro que contempla la polaridad del solvente. Se hará una descripción más detallada en la sección 2.6 del Capítulo 4.

1. Introducción y Objetivos

pendiente del gráfico cambiaba desde negativa en solventes de baja polaridad hacia positiva en solventes polares. Este hecho fue explicado asumiendo que la fluorescencia del colorante surge a partir de dos estados excitados diferentes, cuya predominancia depende de la polaridad del medio. En analogía con los modelos **ICT-TICT** (transferencia de carga intramolecular - transferencia de carga intramolecular sesgada^{vii}),⁹⁴ Otsuki *et al.* propusieron que el **VM** podría existir como dos conformeros (tanto en estado basal como en los singletes excitados), que involucran la rotación del enlace entre la amina alifática y el anillo aromático.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivos Generales

El objetivo central que motivó esta tesis doctoral es el estudio de sistemas enzimáticos usando modelos y métodos de la Química Computacional, en el marco de un proyecto multidisciplinario, a fin de obtener una detallada descripción a nivel molecular que asista al diseño racional de fármacos.

1) El primer sistema de estudio fue la P-glicoproteína humana (en adelante **P-gp**), y la interacción con sus sustratos e inhibidores. La **P-gp** es una proteína transportadora de transmembrana y está implicada en la resistencia a múltiples drogas (**MDR**). Su sobreexpresión en tumores conlleva al fracaso de tratamientos quimio-terapéuticos. Esto es debido a que tiene como principal función la eliminación de compuestos tóxicos para la célula, y entre ellos se encuentran las drogas antitumorales. La **P-gp** pertenece a una familia de proteínas denominada **ABC**. La presencia de homólogos, pertenecientes a la familia **ABC**, en bacterias y hongos patógenos también producen **MDR** y, por ende, serios problemas en el tratamiento de infecciones. Por ello, la **P-gp**, además, sirve como modelo de estudio para proteínas homólogas expresadas en bacterias que producen infecciones resistentes.⁹⁶ La resistencia adquirida debido a la presencia de esta proteína u homólogos, motiva el gran interés que existe en el diseño de moduladores,⁹⁷ es decir, drogas capaces de controlar o inhibir la actividad de la proteína, referidos en esta tesis como inhibidores. Para ello, se planteó identificar el o los sitios de unión para sustratos e inhibidores (experimentalmente no se ha podido establecer con claridad cuál o cuáles son estos sitios de unión) y caracterizar las

vii En inglés intramolecular *charge transfer* – *twisted intramolecular charge transfer*.

1. Introducción y Objetivos

interacciones relevantes con la enzima. Se eligieron sustratos e inhibidores de actividad conocida, planteando entender cuáles son las características físico-químicas que convierten a un compuesto en inhibidor. La información obtenida a partir de los estudios propuestos será de utilidad para el diseño de moduladores, aplicables en terapias antitumorales prolongadas. Este tema será discutido en detalle en el capítulo 3.

El desarrollo de agentes efectivos en **PACT** involucra diferentes aportes del Modelado. Entre ellos pueden mencionarse la predicción de estructuras y propiedades de los colorantes en sus estados fundamentales y diferentes estados excitados, la simulación de espectros de absorción y de emisión, la predicción de la capacidad para formar oxígeno singlete y el estudio de los potenciales redox para otros procesos asociados a la formación de ROS, como así también la variación de estas propiedades al ir de medios de diferentes polaridades, próticos y apróticos hasta sistemas organizados como bicapas lipídicas. También está el interrogante de si los PSs desarrollados serán o no sustratos de las bombas de eflujo (lo que disminuiría su eficacia). El aporte de este trabajo de tesis se centra en los procesos primarios más básicos de la problemática de los **PSs** arrancando desde la fotofísica y fotoquímica de los colorantes.

1.3.2. Objetivos específicos

En relación al problema de **MDR** y el modelado de transportadores **ABC**, se usaron modelos de la mecánica clásica: *docking* molecular y dinámica molecular. Estos dos métodos, se aplican a problemas distintos, y se explicarán en el Capítulo 2. Como modelo de la **P-gp** humana se utilizó la estructura cristalográfica de la **P-gp** de ratón,⁹⁸ con la cual comparte un ~90% de identidad de amino-ácidos. El alto porcentaje de identidad permite ser usado como una aproximación de la **P-gp** humana, cuya estructura cristalográfica todavía no se ha obtenido.

Los objetivos específicos planteados son: 1) Caracterizar una familia de moduladores de **MDR** de actividad conocida, mediante cálculos cuánticos. 2) Determinar los sitios de unión y estimar las afinidades de cada uno por cada sitio, mediante *docking* molecular. 3) Caracterizar dinámicamente complejos E/M (enzima/modulador) y E/S (enzima/sustrato) para sistemas seleccionados y explicar las actividades usando simulaciones cortas de dinámica molecular en un modelo de proteína en una caja de moléculas de agua. Ésta también servirá a fin de estimar

1. Introducción y Objetivos

las energías de ligado de los inhibidores en diferentes sitios.

Por otra parte, el conocimiento adquirido con estos estudios permite evaluar nuevos posibles inhibidores, como los que se están estudiando en colaboración con grupo del Prof. Tegos.

A su vez, se plantea construir un modelo de proteína inserta en una bicapa lipídica que permitirá realizar simulaciones de larga duración. De este modo, se espera poder describir con un mayor nivel de realismo las interacciones entre la proteína y sus potenciales inhibidores.

Por otro lado, los resultados obtenidos con ambos modelos se compararon, tanto los sitios de unión encontrados como la afinidad de cada sustrato e inhibidor por ellos. La comparación permitiría confirmar los resultados obtenidos con la **P-gp** de ratón o analizar las diferencias y el porqué.

En relación a los estudios relacionados con **PACT**, apuntamos específicamente al diseño y evaluación de **PS**, combinando ensayos *in vitro* e *in vivo* con métodos de la Química Computacional y estudios fotoquímicos y fotofísicos. La optimización de estos agentes para **PACT** apunta a: i) obtener óptimas longitudes de onda de absorción, rendimiento cuántico de entrecruzamiento al estado triplete y consiguiente óptima producción de oxígeno singlete molecular y otras especies reactivas de oxígeno que confieren la toxicidad microbiana; ii) lograr una alta concentración intracelular de estas especies, lo cual depende de sus propiedades físico-químicas, como la lipofilidad y de qué tan buenos sustratos sean de las bombas de eflujo de **MDR** (lo que reduciría su acumulación en la célula microbiana) y iii) encontrar los inhibidores más adecuados para potenciar su actividad vía la inhibición de **MDR**. Los estudios computacionales retroalimentarán los ensayos fotoquímicos (Río Cuarto) y biológicos (Grecia).

En relación al estudio de **PSs**, si bien las interacciones de drogas en sus estados fundamentales con diferentes medios (solvente, micelas, bicapas) y con blancos específicos (proteínas) pueden estudiarse con diferentes metodologías probadas, cuando hay estados electrónicamente excitados involucrados, existe un largo camino de desarrollo por andar.

Debido a sus especiales características el **VM** es un desafío interesante para utilizarse como banco de pruebas que permita desarrollar metodologías computacionales que resulten útiles tanto para el modelado de colorantes utilizados como **PSs** como así también en otras aplicaciones básicas y tecnológicas (como marcadores o como cromóforo *pull-push*). En el

1. Introducción y Objetivos

caso de los **PSs**, la variedad de aplicaciones donde el Modelado Molecular resulta una herramienta invaluable es enorme, ya que abarca desde la predicción de espectros de absorción y emisión hasta propiedades de los tripletes y propiedades redox de especies difícilmente caracterizables por medios experimentales. Sin embargo al momento de finalizar la redacción de estas tesis, algo tan sencillo como obtener una frecuencia de absorción en agua (como modelo de solvente prático y solvente por excelencia de procesos biológicos) ya resulta todo un desafío para las metodologías computacionales disponibles al momento.

1. Introducción y Objetivos

- 1 Alekshun, M. N. and Levy, S. B. (2007) Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 128, 1037-1050.
- 2 Gulshan K. and Moye-Rowley W. S. (2007) Multidrug Resistance in Fungi. *Eukaryotic Cell* 6, 1933-1942.
- 3 Lage, H. (2008) An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cellular and Molecular Life Science* 65, 3145-3167.
- 4 Borges-Walmsley, M. I., McKeegan K. S. and Walmsley, A. R. (2003) Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochemical Journal*. 376, 313-338.
- 5 a) Fletcher, J. I., Haber, M., Henderson, M. J., Norris, M. D. (2010) ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nature Reviews Cancer* 10, 147-156. b) Sturm, A., Cunningham, P. & Dean, M. (2009) The ABC transporter gene family of *Daphnia pulex*. *Genome Biology* 10, 170-188. c) Dean, M., Hamon, Y. and Chimini, G. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research* 42, 1007-1017.
- 6 Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R., Niimi, K., Baret, P. V., Keniya, M. V., Tanabe, K., Niimi, M., Goffeau, A. and Monk, B. C. (2009) Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 2, 291-321.
- 7 Coleman, J. and Mylonakis, E. (2009) Efflux in fungi: la pièce de résistance. *PLoS Pathogens* 5, e1000486.
- 8 Gottesman M.M., Fojo T., and Bates S.E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* 2, 48-58.
- 9 Hrycyna C.A. (2001) Molecular Genetic Analysis and Biochemical Characterization of Mammalian P-glycoproteins *Seminars in Cell and Developmental Biology* 12, 247-256.
- 10 Loo T. W. and Clarke D. M. (1999) Molecular dissection of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Biochemical Cell Biology* 77, 11-23.
- 11 Johnstone, R. W. Ruefli, a a; Smyth, M. J. (2000) Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends in Biochemical Sciences* 25, 1-6.
- 12 Lee C.G., Gottesman M.M., Cardarelli C.O., Ramachandra M., Jeang K.T., Ambudkar S.V., Pastan I. and Dey S. (1998) HIV-1 Protease Inhibitors Are Substrates for the **MDR1** Multidrug Transporter. *Biochemistry* 37, 3594-3601.
- 13 Thomas H., and Coley H. M. (2003) Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the strategy of inhibiting P-glycoprotein. *cancer Control* 10 159-165.
- 14 Paterson K., Ludwig J.A., Booth-Genthe C. and Gottesman M.M.(2006) Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Reviews DrugDiscovery* 5, 219-234.
- 15 Higgins C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology* 8, 67-113.
- 16 Dean M., Rzhetsky A., and Allikmets R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research* 11, 1156-1166.
- 17 Schinkel A. H., and Jonker J. W. (2003) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Review* 55, 3-29.
- 18 Linton K. J. (2007) Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology* 22, 122-130.
- 19 Lubelski J., Konings W. N. and Driessen A. J. M. (2007) Distribution and Physiology of ABC-Type Transporters Contributing to Multidrug Resistance in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71, 463-476.
- 20 Sharom F. J. (2008) ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*. 9, 105-127.
- 21 Chen C. J., Chin J. E., Ueda K., Clark D. P., Pastan I., Gottesman M. M. and Roninson I. B. (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the **MDR1** (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47, 381-389.
- 22 Loo T. W. and Clarke D. M. (1995) Membrane Topology of a Cysteine-less Mutant of Human P-glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 270, 843-848.
- 23 Kast C., Canfield V., Levenson R. and Gros P. (1996) Transmembrane Organization of Mouse P-glycoprotein Determined by Epitope Insertion and Immunofluorescence. *Journal of Biological Chemistry* 271, 9240-9248.
- 24 Loo T. W. and Clarke D.M. (1996) The Minimum Functional Unit of Human P-glycoprotein Appears to be a Monomer. *Journal of Biological Chemistry* 271, 27488-27492.
- 25 Loo T. W. and Clarke D.M. (1994) Reconstitution of drug-stimulated ATPase activity following co-expression of each half of human P-glycoprotein as separate polypeptides. *Journal of Biological Chemistry* 269, 7750-7755.
- 26 Loo T.W. and Clarke D.M. (1999) The Transmembrane Domains of the Human Multidrug Resistance P-glycoprotein Are Sufficient to Mediate Drug Binding and Trafficking to the Cell Surface. *Journal of Biological Chemistry* 274, 24759-24765.

1. Introducción y Objetivos

- 27 Hennessy, M. and Spiers, J. P. (2007) A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacological Research* 55, 1-15.
- 28 Loo, T. W., Bartlett, M. C. and Clarke, D. M. (2003) Drug binding in human P-glycoprotein causes conformational changes in both nucleotide-binding domains. *Journal of Biological Chemistry* 278, 1575-1578.
- 29 Loo, T. W., & Clarke, D. M. (2002). Vanadate trapping of nucleotide at the ATP-binding sites of human multidrug resistance P-glycoprotein exposes different residues to the drug-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3511-3516.
- 30 Sharom F. J. (2006) Shedding light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1). *Biochemistry and Cell Biology* 84, 979-992.
- 31 Sreeramulu, K., Liu, R. and Sharom, F. J. (2007) Interaction of insecticides with mammalian P-glycoprotein and their effect on its transport function., *Biochimica et Biophysica Acta* 1768, 1750-1757.
- 32 Prates, R. a, Kato, I. T., Ribeiro, M. S., Tegos, G. P., and Hamblin, M. R. (2011) Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*., *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66, 1525-1532.
- 33 Dodic N., Dumaitre B., Daugan M. and Pianetti P. (1995) Synthesis and Activity against Multidrug Resistance in Chinese Hamster Ovary Cells of New Acridone-4-carboxamides. *Journal of Medicinal Chemistry* 38, 2418-2426.
- 34 Dhainaut A., Regnier G., Tizotv, Pierre A., Leonce S., Guilbaud N., Kraus-Berthier N. and Atassi G. (1996) New Purines and Purine Analogs as Modulators of Multidrug Resistance. *Journal of Medicinal Chemistry* 29, 4099-4108.
- 35 Ecker G., Chiba P., Hitzler M., Schmid D., Visser K., Cordes H. P., Csölleiv, Seydel J. K. and Schaper K. J. (1996) Structure-Activity Relationship Studies on Benzofuran Analogs of Propafenone-Type Modulators of Tumor Cell Multidrug Resistance. *Journal of Medicinal Chemistry* 39, 4767-4774.
- 36 Pajeva I., and Wiese M. (1998) Molecular Modeling of Phenothiazines and Related Drugs As Multidrug Resistance Modifiers: A Comparative Molecular Field Analysis Study. *Journal of Medicinal Chemistry* 41, 1815-1826.
- 37 Gruol D. J., King M. N., and Kuehne M. E. (2002) Evidence for the Locations of Distinct Steroid and Vinca Alkaloid Interaction Domains within the Murine **MDR1b** P-Glycoprotein. *Molecular Pharmacology* 62, 1238-1248.
- 38 Loo T. W., Bartlett M. C. and Clarke D. M. (2003) Methanethiosulfonate Derivatives of Rhodamine and Verapamil Activate Human P-glycoprotein at Different Sites. *Journal of Biological Chemistry* 278, 50136-50141.
- 39 Martin C., Berridge G., Higgins C. F., Mistry P., Charlton P. and Callaghan R. (2000) Communication between Multiple Drug Binding Sites on P-glycoprotein. *Molecular Pharmacology*. 58, 624-632.
- 40 Garrigues A., Loiseau N., Delaforge M., Ferté J., Garrigos M., André F. O. and Orłowski S. (2002) Characterization of Two Pharmacophores on the Multidrug Transporter P-Glycoprotein. *Molecular Pharmacology* 62, 1288-1299.
- 41 Choi, C.-H. (2005) ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell International* 5, 30.
- 42 Bain, L. J., McLachlan, J. B. and LeBlanc, G. A. (1997) Structure-activity relationships for xenobiotic transport substrates and inhibitory ligands of P-glycoprotein. *Environmental Health Perspectives* 105, 812-818.
- 43 König, G., Chiba, P. and Ecker, G. F. (2008) Hydrophobic moments as physicochemical descriptors in structure-activity relationship studies of P-glycoprotein inhibitors. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly* 139, 401-405.
- 44 McDevitt, C. and Callaghan, R. (2007) How can we best use structural information on P-glycoprotein to design inhibitors? *Pharmacology & Therapeutics* 113, 429-441.
- 45 Liscovitch, M. and Lavie, Y. (2002) Cancer multidrug resistance: a review of recent drug discovery research. *Idrugs* 5, 349-55.
- 46 Kelly, R. J., Draper, D., Chen, C. C., Robey, R. W., Figg, W. D., Piekarz, R. L., Chen, X., Gardner, E. R., Balis, F. M., Venkatesan, A. M., Steinberg, S. M., Fojo, T., and Bates, S. E. (2011) A pharmacodynamic study of docetaxel in combination with the P-glycoprotein antagonist tariquidar (XR9576) in patients with lung, ovarian, and cervical cancer., *Clinical Cancer Research* 17, 569-580.
- 47 Ecker, G., Huber, M., Schmid, D., and Chiba, P. (1999) The importance of a nitrogen atom in modulators of multidrug resistance., *Molecular Pharmacology* 56, 791-796.
- 48 Stein, W. D. (1998) Kinetics of the P-glycoprotein, the multidrug transporter. *Experimental Physiology* 83, 221-232.

1. Introducción y Objetivos

- 49 Litman, T., Zeuthen, T., Skovsgaard, T. and Stein, W. D. (1997) Competitive, non-competitive and cooperative interactions between substrates of P-glycoprotein as measured by its ATPase activity. *Biochimica & Biophysica. Acta* 1361, 169–176.
- 50 Dey, S., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M. M. and Ambudkar, S. V. (1997) Evidence for two nonidentical drug interaction sites in the human P-glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94, 10594–10599.
- 51 Maki, N., Hafkemeyer, P. and Dey, S. Allosteric modulation of human P-glycoprotein. Inhibition of transport by preventing substrate translocation and dissociation. *Journal of Biological Chemistry* 278, 18132–18139.
- 52 Loo, T.W., Bartlett, M.C. and Clarke, D.M. (2003) Drug binding in human P-glycoprotein causes conformational changes in both nucleotide-binding domains. *Journal of Biological Chemistry* 278, 1575-1578.
- 53 Loo, T. W., Bartlett, M. C. and Clarke, D. M. (2003) Substrate-induced conformational changes in the transmembrane segments of human P-glycoprotein. Direct evidence for the substrate-induced fit mechanism for drug binding. *Journal of Biological Chemistry* 278, 13603-13606.
- 54 Maki, N. and Dey, S. (2006) Biochemical and pharmacological properties of an allosteric modulator site of the human P-glycoprotein (ABCB1). *Biochemical Pharmacology* 72, 145-155.
- 55 Loo, T. W. and Clarke, D. M. (2008) Mutational analysis of ABC proteins., *Archives of Biochemistry and Biophysics* 476, 51-64.
- 56 Loo, T. W., Bartlett, M. C. and Clarke, D. M. (2004) The drug-binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein is accessible to the aqueous medium. *Biochemistry* 43, 12081-12089.
- 57 Loo, T. W. and Clarke, D. M. (1999) Identification of residues in the drug-binding domain of human P-glycoprotein. Analysis of transmembrane segment 11 by cysteine-scanning mutagenesis and inhibition by dibromobimane. *Journal of Biological Chemistry* 274, 35388-35392.
- 58 Rothnie, A., Storm, J., McMahon, R., Taylor, A., Kerr, I. D., and Callaghan, R. (2005) The coupling mechanism of P-glycoprotein involves residue L339 in the sixth membrane spanning segment., *FEBS Letters* 579, 3984-3990.
- 59 Storm, J., O'Mara, M. L., Crowley, E. H., Peall, J., Tieleman, D. P., Kerr, I. D., and Callaghan, R. (2007) Residue G346 in transmembrane segment six is involved in inter-domain communication in P-glycoprotein., *Biochemistry* 46, 9899-9910.
- 60 Loo, T. W., and Clarke, D. M. (1997) Identification of residues in the drug-binding site of human P-glycoprotein using a thiol-reactive substrate., *Journal of Biological Chemistry* 272, 31945-31948.
- 61 Rothnie, A., Storm, J., Campbell, J., Linton, K. J., Kerr, I. D. and Callaghan, R. (2004) The topography of transmembrane segment six is altered during the catalytic cycle of P-glycoprotein., *Journal of Biological Chemistry* 279, 34913-34921.
- 62 Amaral, L., Martins, M., Viveiros, M., Micobacterias, U. D. and Lisboa, U. N. D. (2007) Enhanced killing of intracellular multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis by compounds that affect the activity of efflux pumps, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59, 1237 -1246.
- 63 Aeschlimann, J. R., Dresser, L. D., Kaatz, G. W., and Rybak, M. J. (1999) Effects of NorA Inhibitors on In Vitro Antibacterial Activities and Postantibiotic Effects of Levofloxacin, Ciprofloxacin, and Norfloxacin in Genetically Related Strains of Staphylococcus aureus, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 335–340.
- 64 Stermitz, F. R., Cashman, K. K., Halligan, K. M., Tegos, G. P., and Lewis, K. (2003) Polyacylated Neohesperidosides From Geranium caespitosum: Bacterial Multidrug Resistance Pump Inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13, 1915-1918.
- 65 Tegos, G. P., and Stermitz, F. (2002) Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 3133-3141.
- 66 Bansal, T., Jaggi, M., Khar, R. K., and Talegaonkar, S. (2009) Emerging significance of flavonoids as P-glycoprotein inhibitors in cancer chemotherapy., *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 12, 46-78.
- 67 Patrice, T. Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences: Photodynamic Therapy. Volume 2. RSC, Cambridge, England. 2003.
- 68 Capella, M. A. M. and Capella, L. S. (2003) A light in multidrug resistance: photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors., *Journal of Biomedical Science* 10, 361-366.
- 69 O'Riordan, K., Akilov, O. and Hasan, T. (2005) The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2, 247-262.
- 70 Tang, P. M.-K., Zhang, D.-M., Xuan, N.-H. B., Tsui, S. K.-W., Waye, M. M.-Y., Kong, S.-K., Fong, W.-P., and Fung, K.-P. (2009) Photodynamic therapy inhibits P-glycoprotein mediated multidrug resistance via JNK activation in human hepatocellular carcinoma using the photosensitizer pheophorbide a., *Molecular cancer* 8, 56.
- 71 Raab O. (1900) Ueber die Wirkung Fluorescierenden Stoffe auf Infusorien. *Zeitschrift für Biologie* 39, 524-

1. Introducción y Objetivos

- 546.
- 72 Calzavara-Pintón P. G.; Venturini, M. and Sala R. (2005) A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 78, 1-6.
 - 73 a) Tegos, G. P., Demidova T. N., Arcila-Lopez D., Wharton T., Gali H. and Hamblin M. R. (2005) Cationic Fullerenes Are Effective and Selective Antimicrobial Photosensitizers. *Chemistry & Biology*, 12, 1127-1135.
b) Tegos, G. and Hamblin, M. R. (2006) Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 196-203.
 - 74 Tegos, G. and Stermitz, F. (2002) Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 3133-3141.
 - 75 Hamblin, M. R. and Hasan, T. (2004) Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?, *Photochemical & photobiological sciences* 3, 436-450.
 - 76 Meisel, P. and Kocher, T. (2005) Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art., *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 79, 159-170.
 - 77 Tegos, GP and Hamblin, M. R. (2006) Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 196-203.
 - 78 Wainwright, M., Mohr, H., and Walker, W. H. (2007) Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products., *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 86, 45-58.
 - 79 Wainwright, M. (2000) Methylene blue derivatives--suitable photoantimicrobials for blood product disinfection?, *International journal of antimicrobial agents* 16, 381-94.
 - 80 Cassidy, C. M., Tunney, M. M., McCarron, P. a, and Donnelly, R. F. (2009) Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice., *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 95, 71-80.
 - 81 Baptista, M. S. and Wainwright, M. (2011) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 44, 1-10.
 - 82 Skripchenko, A., Robinette, D. and Wagner, S. J. (1997) Comparison of methylene blue and methylene violet for photoinactivation of intracellular and extracellular virus in red cell suspensions, *Photochemistry and Photobiology* 65, 451-455.
 - 83 Skripchenko, A., Robinette, D., and Wagner, S. J. (1997) Comparison of methylene blue and methylene violet for photoinactivation of intracellular and extracellular virus in red cell suspensions, *Photochemistry and Photobiology* 65, 451-455.
 - 84 Wainwright, M. (2000) Methylene blue derivatives--suitable photoantimicrobials for blood product disinfection?, *International Journal of Antimicrobial Agents* 16, 381-94.
 - 85 Wainwright, M. (2003) Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application, *Dyes and Pigments* 57, 245-257.
 - 86 De Nicola, R., and Walker, G. M. (2009) Accumulation and cellular distribution of zinc by brewing yeast, *Enzyme and Microbial Technology* 44, 210-216.
 - 87 Vreeke, M., Maidan, R. and Heller, A. (1992) Development of a gradient ion-pair chromatographic procedure for the simultaneous detection of nitrogen-sulfur oxides produced during the reaction of SO_x and NO_y species in aqueous solution. *Analytical. Chemistry* 64, 3004-3006.
 - 88 Ashassi-Sorkhabi, H., Seifzadeh, D. and Hosseini, M. G. (2008) EN, EIS and polarization studies to evaluate the inhibition effect of 3H-phenothiazin-3-one, 7-dimethylamin on mild steel corrosion in 1M HCl solution, *Corrosion Science* 50, 3363-3370.
 - 89 Painelli, A. (1999) A non-perturbative approach to solvatochromic shifts of push-pull chromophores, *Chemical Physics Letters* 312, 211-220.
 - 90 Lu, D., Chen, G., Perry, J. W. and Goddard III, W. A. (1994) Valence-bond charge-transfer model for nonlinear optical properties of charge-transfer organic molecules, *Journal of the American Chemical Society* 116, 10679-10685.
 - 91 Kanis, D. R., Ratner, M. a., and Marks, T. J. (1994) Design and construction of molecular assemblies with large second-order optical nonlinearities. Quantum chemical aspects, *Chemical Reviews* 94, 195-242.
 - 92 Painelli, A. (1999) Amplification of NLO responses: vibronic and solvent effects in push-pull polyenes, *Chemical Physics* 245, 185-197.
 - 93 Painelli, Anna and Terenziani, F. (2000) Solvent and vibrational effects on linear and non-linear spectral properties of push-pull chromophores, *Synthetic Metals* 109, 229-233.
 - 94 Otsuki, S., and Taguchi, T. (1996) Solvent-dependent photophysical properties of a phenothiazone dye as an optical probe. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 69, 2525-2531.
 - 95 Otsuki, S., and Taguchi, T. (1997) Solvent-dependent photophysical properties of aminophenoxazone dyes as

1. Introducción y Objetivos

optical probes, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 104, 189-195.

- 96 a) Juranka, P., Zastawny, R., and Ling, V. (1989) P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB Journal* 3, 2583-2592. b) Hollenstein, K., Dawson, R. J. P., and Locher, K. P. (2007) Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current opinion in structural biology* 17, 412–418. c) Sheps, J. A., and Ling, V. (2007) Preface: the concept and consequences of multidrug resistance. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 453, 545-553.
- 97 McDevitt, C. A., and Callaghan, R. (2007) How can we best use structural information on P-glycoprotein to design inhibitors? *Pharmacology & therapeutics* 113, 429-441.
- 98 Aller, S. G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P. M., Trinh, Y. T., Zhang, Q., Urbatsch, I. L., and Chang, G. (2009) Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 323, 1718-1722.

2. Modelos y Métodos

La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio.

Gregorio Marañón (1887-1960) Médico y escritor español.

2.1. Breve introducción

En este capítulo, se realiza un breve repaso de los modelos y métodos computacionales, los cuales son herramientas de la Química Computacional. Éstos han sido de invaluable utilidad, no sólo para responder algunas preguntas planteadas, sino, además, por abrir nuevas. Se desarrollan en este capítulo los modelos de Mecánica Molecular y Mecánica Cuántica. Ambas familias de modelos están basada, en principio en la aproximación de Born-Oppenheimer.

El postulado fundamental de la Mecánica Cuántica es que las propiedades (observables físicas) de cualquier sistema están descritas por una función de onda (Ψ). La energía del sistema puede obtenerse mediante la acción de un operador Hamiltoniano (\mathbf{H}) actuando sobre la función de onda mediante la ecuación de autovalores:

$$\mathbf{H} \Psi = E \Psi \quad (2.1)$$

donde el escalar E es el autovalor de energía del sistema para un estado estacionario, es decir un sistema donde el potencial externo no cambia con el tiempo. La autofunción, expandida sobre un conjunto de M bases convenientes, puede ser representada por un vector columna de N componentes y el operador \mathbf{H} , como una matriz $N \times M$.¹

La función de onda, Ψ , no es por sí misma una observable, pero el producto de Ψ por su

2. Modelos y Métodos

compleja conjugada, es decir $|\Psi^*\Psi|$, es una densidad de probabilidad. Entonces la probabilidad de que un sistema químico sea encontrado dentro de alguna región del espacio multidimensional es igual a la integral de $|\Psi^*\Psi|$ sobre esa región del espacio.

Para que Ψ se considere como una función aceptable, debe ser integrable cuadráticamente. Además, la integración $|\Psi^*\Psi|$ sobre todo el espacio cartesiano debe resultar en el número de N de electrones. Una función de onda con estas características, se denomina *función de onda aceptable de N -electrones*. Esto último implica que la función tenga sentido físico. Sin embargo, a pesar de esta restricción y la representación formal, la naturaleza de Ψ es difícil de hallar. A lo largo del capítulo, se mostrará en qué forma Ψ puede ser expresada.

En general, la ecuación 2.1 tiene muchas autofunciones Ψ aceptables para una dada molécula, resultando en diferentes autovalores E asociados a cada autofunción. Entonces, existe un conjunto completo de autofunciones Ψ_i con autovalores E_i asociados, si aquellas son ortonormales, es decir:

$$\int \Psi_i \Psi_j d\tau = \delta_{ij} \quad (2.2)$$

donde δ_{ij} es el delta de Kronecker, cuyo valor es 1 si $i=j$, o bien es cero en cualquier otro caso. Esta integral implica la integración de las autofunciones en un elemento de volumen $d\tau$ del espacio $3N$ -dimensional de coordenadas cartesianas (donde N es la cantidad de partículas del sistema) y N coordenadas de espín. En adelante, omitimos esta dependencia, aún cuando en todo momento se intentará encontrar autofunciones del operador de espín cuadrado y del hamiltoniano molecular simultáneamente, toda vez que resulte posible.

Esta es la denominada ecuación de Schrödinger independiente del tiempo y no relativista. Se puede escribir de una forma más rigurosa, como sigue:

$$\mathbf{H}_{tot}(\mathbf{Q}, \mathbf{q})\Psi(\mathbf{Q}, \mathbf{q}) = E_{tot}\Psi(\mathbf{Q}, \mathbf{q}) \quad , \text{ con} \quad (2.3)$$

$$\mathbf{H}_{tot}(\mathbf{Q}, \mathbf{q}) = \mathbf{T}_n(\mathbf{Q}) + \mathbf{T}_e(\mathbf{q}) + \mathbf{V}_{nn}(\mathbf{Q}) + \mathbf{V}_{ne}(\mathbf{Q}, \mathbf{q}) + \mathbf{V}_{ee}(\mathbf{q}) \quad (2.4)$$

Extendiendo cada operador de la parte derecha de la ecuación y empleando unidades atómicas se obtiene:

2. Modelos y Métodos

$$\mathbf{H}_{tot} = -\frac{1}{2} \sum_{A=1}^M \frac{1}{M_A} \nabla_A^2 - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (2.5)$$

donde \mathbf{Q} representa el conjunto de las coordenadas espaciales de los núcleos y \mathbf{q} a las coordenadas espaciales y de espín de los electrones. La parte derecha de la ecuación 2.5 contiene, los operadores de energía cinética nuclear y electrónica y los correspondientes a los potenciales núcleo-núcleo, núcleo-electrón y repulsión interelectrónica, respectivamente.^{1,2}

El hamiltoniano de la ecuación 2.5 contiene términos de atracción y repulsión de a pares, implicando que ninguna partícula se mueve independiente de las demás restantes. Precisamente, se refiere esta interdependencia con el término “correlación”, el cual es ampliamente utilizado en bibliografía y lo será en adelante. El empleo de este hamiltoniano que involucra el movimiento correlacionado de las partículas hace que resulte muy difícil encontrar las funciones de onda exactas, ya que la ecuación (2.5) de N -partículas no resulta separable.¹

2.2. Principio Variacional

Cuando un sistema está en un estado Φ , el cual puede o no satisfacer la ecuación 2.1, el valor de expectación de la energía del sistema es:

$$E[\Phi] = \frac{\int \Phi^* H \Phi d\mathbf{r}}{\int |\Phi|^2 d\mathbf{r}} \quad (2.6)$$

La energía computada a través de una función de onda de prueba es superior o igual a la energía real del sistema en su estado basal, E_0 .

$$\frac{\int \Phi^* H \Phi d\mathbf{r}}{\int |\Phi|^2 d\mathbf{r}} = E[\Phi] \geq E_0 \quad (2.7)$$

A través de la minimización completa de la energía como un funcional de la función de onda, $E[\Phi]$, con respecto a todas las funciones de onda aceptables de N -electrones, se obtiene

2. Modelos y Métodos

el estado basal real, Φ_0 con una energía $E[\Phi_0]$ igual a E_0 , es decir:

$$E_0 = \min_{\Phi} E[\Phi] \quad (2.8)$$

Una comprobación del Principio Variacional detallada puede hallarse en bibliografía de Química Cuántica o Computacional.^{1,3,4,6}

El Principio Variacional expresado a través de la ecuación 2.7, presenta consecuencias realmente relevantes. La más importante, es que permite encontrar funciones de onda aceptables de N -electrones (Φ) mediante la variación funcional (Principio Variacional Funcional) de $E\{\Phi\}$ o bien expresando Φ como una combinación lineal en términos de una base apropiada $\Phi = \sum c_i \phi_i$, lo que permite encontrarla mediante la variación del conjunto de coeficientes $\{c_i\}$ de la expansión ($E\{\Phi[c_i]\}$, Principio Variacional Lineal). Por consiguiente, abre la posibilidad de utilizar métodos iterativos para converger hacia valores cada vez menores de energía, es decir más cercanos a E_0 . En general la resolución de la ecuación anterior sólo puede obtenerse aplicando restricciones de algún tipo, por ejemplo condiciones de normalización y ortogonalidad, de modo que en realidad se resolverá un sistema Lagrangiano asociado a la ecuación 2.8.^{1,4}

2.3. Aproximación de Born-Oppenheimer

Para simplificar el problema electrónico molecular de algún modo, se utiliza la aproximación de Born-Oppenheimer (**BO**). Esta aproximación se basa en la consideración práctica de que incluso el más pequeño de todos los núcleos, el protón (^1H), pesa más de 1.800 veces que un electrón, y para un núcleo típico como el del carbono, la relación es de 20.000. En otras palabras, el relajamiento electrónico respecto al movimiento nuclear es instantáneo. En virtud de estas consideraciones, es conveniente desacoplar los movimientos electrónicos y nucleares, y computar la energía electrónica para posiciones nucleares fijas. Por ello, la aproximación de **BO** corresponde a despreciar el acoplamiento entre las velocidades de los núcleos y electrones, es decir que los núcleos estarían quietos desde el punto de vista electrónico.

Desde este punto de vista, 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

2. Modelos y Métodos

la repulsión entre núcleos (\mathbf{V}_{nn}) es una constante (ecuación 2.4). Entonces el Hamiltoniano de esta ecuación se reduce al llamado Hamiltoniano electrónico:

$$\mathbf{H}_{tot} = \mathbf{T}_{nuc} + \mathbf{H}_{elec} \Rightarrow \mathbf{H}_{tot} = \mathbf{H}_{elec} \quad (2.9)$$

siendo \mathbf{H}_{elec}

$$\begin{aligned} &= -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N v(\mathbf{r}_i) + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \\ &= \mathbf{T}_e(\mathbf{q}) + \mathbf{V}_{ne}(\mathbf{Q}, \mathbf{q}) + \mathbf{V}_{ee}(\mathbf{q}) + \mathbf{V}_{nuc}(\mathbf{Q}) \end{aligned} \quad (2.10)$$

Se define el término $v(\mathbf{r})$ como “potencial externo”, el cual no es más que el que actúa sobre los electrones, debido a la carga de los núcleos.⁴ Esta definición se usará más extensamente en la sección 2.6.

$$v(\mathbf{r}_i) = \sum_A^M \frac{Z_A}{|\mathbf{r}_{iA}|} \quad (2.11)$$

La ecuación de Schrödinger para el movimiento electrónico está dada por:

$$\mathbf{H}_{elec} \Psi_{elec}(\mathbf{Q}, \mathbf{q}) = E_{elec} \Psi_{elec}(\mathbf{Q}, \mathbf{q}) \quad (2.12)$$

Tanto la función de onda electrónica Ψ_{elec} como la E_{elec} dependen paraméricamente de las coordenadas nucleares, ya que según la aproximación de **BO** depende de las posiciones de los núcleos y no de sus momentos. De este modo se puede expresar E_{elec} en función de la coordenadas nucleares, es decir, $E_{elec}(\mathbf{Q})$.

De esta forma se puede calcular el estado físico de un sistema para una determinada configuración nuclear resolviendo la ecuación de Schrödinger electrónica. Debido a que por cada configuración de las coordenadas nucleares hay una Ψ_{elec} y una E_{elec} correspondiente al estado fundamental (por lo tanto una E_{tot}) se puede construir un superficie de energía potencial del sistema.

Según la aproximación de **BO**, el movimiento nuclear se encuentra desacoplado del movimiento electrónico. Entonces, los electrones ven un potencial externo que corresponde a

2. Modelos y Métodos

los núcleos que están fijos. En tanto, desde la perspectiva de los núcleos, éstos perciben un potencial externo debido a los electrones que se ajusta instantáneamente a su movimiento. 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 $E_{elec}(\mathbf{Q})$ a $E_{elec}(\mathbf{Q}+\Delta\mathbf{Q})$. 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. Los electrones actúan como una nube de carga negativa que aporta un potencial que mantiene cerca los núcleos cargados positivamente. Por consiguiente, la ecuación de Schrödinger para el movimiento nuclear es:

$$\mathbf{H}_N \Psi_N = E \Psi_N \quad (2.13)$$

donde

$$\mathbf{H}_N = -\frac{1}{2} \sum_{A=1}^M \frac{1}{M_A} \nabla_A^2 + E_{elec}(\mathbf{Q}) \quad (2.14)$$

Las variables en la ecuación de Schrödinger nuclear son las coordenadas nucleares. La energía E (ecuación 2.13) es la energía total de la molécula, ya que el hamiltoniano nuclear (ecuación 2.14) incluye el operador para la energía cinética nuclear y el término correspondiente a la energía electrónica, E_{elec} , que juega el rol de una *energía potencial*, como era de esperarse en este contexto de esta aproximación.

La ecuación 2.14 y la aproximación de **BO** volverán a ser tratadas en la sección 2.12. (Dinámica Molecular).^{1,2,3,5}

2.4. Método de Hartree-Fock

2.4.1. El determinante de Slater y las ecuaciones de Hartree-Fock

La resolución de la ecuación 2.7 mediante la búsqueda de todas las funciones de onda aceptables de N -electrones resulta imposible debido a que su conjunto dentro del espacio de

2. Modelos y Métodos

Hilbert es inmenso. En este sentido, la aproximación de Hartree-Fock (**HF**) presenta un esquema simple que combina el Principio Variacional junto con la aproximación de que la función de onda que describe el sistema molecular, puede expresarse por un producto de N funciones de onda de un electrón. Ahora bien, como los electrones son *fermiones* con espín = $\frac{1}{2}$, función de onda electrónica debe ser antisimétrica respecto al intercambio de las coordenadas de espín y espaciales de los electrones. El principio de antisimetría representa la generalización de Mecánica Cuántica del Principio de Exclusión de Pauli.^{1,2} En virtud de estos principios, una función de onda aceptable debe cambiar su signo si las coordenadas de un par de electrones son cambiadas, aunque su densidad de probabilidad no cambia, esto es:

$$|\Psi(\mathbf{q}_1, \mathbf{q}_2, \dots, \mathbf{q}_i, \mathbf{q}_j, \dots, \mathbf{q}_N)|^2 = -|\Psi(\mathbf{q}_2, \mathbf{q}_1, \dots, \mathbf{q}_j, \mathbf{q}_i, \dots, \mathbf{q}_N)|^2 \quad (2.15)$$

El requisito de la ecuación anterior no puede satisfacerse con un simple producto de funciones de onda de un electrón, pero sí en cambio si el producto es antisimetrizado. El producto antisimétrico de N funciones de onda de un electrón se puede expresar en la forma de un determinante. A éste, se lo conoce como determinante de Slater, Φ_{SD} que se expresa en la siguiente ecuación:

$$\Psi_0 \approx \Phi_{SD} = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_1(\mathbf{q}_1) & \chi_2(\mathbf{q}_1) & \cdots & \chi_N(\mathbf{q}_1) \\ \chi_1(\mathbf{q}_2) & \chi_2(\mathbf{q}_2) & & \chi_N(\mathbf{q}_2) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \chi_1(\mathbf{q}_N) & \chi_2(\mathbf{q}_N) & \cdots & \chi_N(\mathbf{q}_N) \end{vmatrix} \quad (2.16)$$

Las funciones de un electrón $\chi_1(\mathbf{q}_1)$ son llamadas orbitales de espín, los cuales son el producto de un orbital espacial $\varphi(\mathbf{r}_1)$ que depende de las coordenadas espaciales y una función de espín, $\alpha(s)$ ó $\beta(s)$, la cual depende de las coordenadas de espín. De esta forma, el orbital de espín queda definido como:

$$\chi_1(\mathbf{q}_1) = \varphi(\mathbf{r}_1) \alpha(m_s) \quad (2.17)$$

Los orbitales de espín se eligen de manera que sean ortonormales, como se verá más adelante.^{3,27}

El determinante de Slater cumple con los requerimientos de una función de onda aceptable,

2. Modelos y Métodos

pero representa una aproximación drástica a la función de onda exacta, porque es la solución exacta de un sistema de electrones hipotéticos sin correlación (no interaccionan instantáneamente).

La flexibilidad del determinante de Slater está dada por los orbitales de espín. Esta flexibilidad es la que permite encontrar el determinante de Slater de mejor energía utilizando el Principio Variacional.

El valor de expectación del operador Hamiltoniano con un determinante de Slater puede obtenerse expandiendo el determinante y construyendo los términos individuales con respecto a las distintas partes del hamiltoniano. Esta derivación puede encontrarse en varios libros de texto básicos de Química Computacional.^{1,6,24,27}

La energía de **HF**, como resultado final, está dada por:

$$E_{HF} = \int \Phi^* \mathbf{H} \Phi = \sum_i^N H_i + \frac{1}{2} \sum_i^N \sum_j^N J_{ij} - K_{ij} \quad (2.18)$$

donde

$$H_i = \int \chi_i^*(\mathbf{q}_1) \left\{ -\frac{1}{2} \nabla^2 - \sum_A^M \frac{Z_A}{r_{1A}} \right\} \chi_i(\mathbf{q}_1) d\mathbf{x}_1 \quad (2.19)$$

define la contribución de la energía cinética y la atracción electrón-núcleo, mientras que el término de repulsión electrón-electrón está definido por los dos siguientes términos:

$$J_{ij} = \iint |\chi_i(\mathbf{q}_1)|^2 \frac{1}{r_{12}} |\chi_j(\mathbf{q}_2)|^2 d\mathbf{q}_1 d\mathbf{q}_2$$

y

$$K_{ij} = \iint \chi_i(\mathbf{q}_1) \chi_j^*(\mathbf{q}_1) \frac{1}{r_{12}} \chi_j(\mathbf{q}_2) \chi_i^*(\mathbf{q}_2) d\mathbf{q}_1 d\mathbf{q}_2 \quad (2.20)$$

Estos términos son las integrales de Coulomb e intercambio, respectivamente.⁷

Para aplicar Principio Variacional y minimizar la energía, se impone la condición de ortonormalidad de los orbitales de espín, empleando los multiplicadores indeterminados *Lagrange*, ε_{ij} . De resolver el Lagrangiano con estas restricciones, resultan las ecuaciones de

2. Modelos y Métodos

Hartree-Fock, las cuales determinan los orbitales de espín para los cuales la E_{HF} resulta la más baja (más cercana a la real, recordar Principio Variacional). Dichas ecuaciones son:

$$f_i(\mathbf{q}_1)\chi_i(\mathbf{q}_1) = \sum_j \varepsilon_{ij}\chi_j(\mathbf{q}_1) \quad (2.21)$$

La matriz de multiplicadores es hermítica y puede encontrarse una transformación unitaria que la diagonalice. Como resultado se obtienen las ecuaciones de Hartree-Fock en términos de *orbitales de espín canónicos*.²⁷

$$f_i(\mathbf{q}_1)\tilde{\chi}_i(\mathbf{q}_1) = \tilde{\varepsilon}_i(\mathbf{q}_1)\tilde{\chi}_i(\mathbf{q}_1) \quad (2.22)$$

La interpretación física de los ε_i es que son las energías de cada uno de los orbitales de espín. Por comodidad suprimimos en adelante las tildes.

Existen N ecuaciones, debido a que f_i es el *operador de Fock*, el cual es de un electrón, es decir opera sobre un orbital de espín. Se define como:

$$f_i(\mathbf{q}_1) = -\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_A \frac{Z_A}{r_{iA}} + \mathbf{V}_{HF}(\mathbf{q}_1) \quad (2.23)$$

El primer término es la energía cinética y el segundo la energía potencial de atracción electrón-núcleo. El término $\mathbf{V}_{HF}(\mathbf{q}_1)$ es el potencial de Hartree-Fock, el cual es un potencial promedio de repulsión que experimenta un electrón en el campo del resto de los $N-1$ electrones. Entonces, el complicado operador de repulsión interelectrónico del Hamiltoniano (ecuación 2.5), es reemplazada por un simple operador de un electrón, donde la repulsión es sólo calculada de manera promedio. El potencial de Hartree-Fock está compuesto por las dos componentes siguientes:

$$\mathbf{V}_{HF}(\mathbf{q}_1) = \sum_j^N (\mathbf{J}_j(\mathbf{q}_1) - \mathbf{K}_j(\mathbf{q}_1)) \quad (2.24)$$

Donde $\mathbf{J}_j(\mathbf{q}_1)$ y $\mathbf{K}_j(\mathbf{q}_1)$ son el operador de Coulomb y de intercambio, respectivamente. Ellos se definen como:

2. Modelos y Métodos

$$\mathbf{J}_j(\mathbf{q}_1) = \int |\chi_j(\mathbf{q}_2)|^2 \frac{1}{r_{12}} d\mathbf{q}_2 \quad (2.25)$$

$$\mathbf{K}_j(\mathbf{q}_1)\chi_i(\mathbf{q}_1) = \left[\int \chi_j(\mathbf{q}_2)^* \frac{1}{r_{12}} \chi_i(\mathbf{q}_2) d\mathbf{q}_2 \right] \chi_j(\mathbf{q}_1) \quad (2.26)$$

El operador de Coulomb representa el potencial que experimenta un electrón en la posición \mathbf{q}_1 debido a la distribución promedio de carga de otro electrón en el orbital de espín χ_j . Esto se debe a que $|\chi_j(\mathbf{q}_2)|^2 d\mathbf{q}_2$ representa la probabilidad de que un electrón esté dentro del elemento de volumen $d\mathbf{q}_2$.

El operador intercambio, que no tiene interpretación clásica, opera intercambiando las coordenadas de los electrones de dos orbitales de espín. La contribución debida al operador intercambio sobre el potencial de Hartree-Fock sólo existe cuando computa dos orbitales de espín de electrones con espines paralelos. La interpretación física de este hecho es que cuando se calcula el potencial \mathbf{V}_{HF} , el operador intercambio descuenta la energía de dos electrones con espín paralelo que evitan aproximarse (Principio de Exclusión de Pauli). La resta se realiza sobre el operador de Coulomb debido a que no tiene en cuenta esta correlación.

Otro hecho para destacar es que en la doble sumatoria de la ecuación 2.18 el término $i=j$ está permitido, es decir, la interacción de un electrón consigo mismo está permitida, lo cual no tiene sentido físico. En este caso, las contribuciones debidas al operador de Coulomb y al de intercambio son iguales, pero de signo contrario; cancelando así lo que se conoce como *auto-interacción*.²

2.4.2. Ecuaciones de Roothaan-Hall

Las ecuaciones de Roothaan-Hall representan la formulación matricial del método de Hartree-Fock, a través de la expansión de los orbitales espaciales (recordar ecuación 2.17) en términos de un conjunto de funciones base conocidas $\{ \phi_v(\mathbf{q}_1) \}$ como sigue:

$$\varphi_1(\mathbf{q}_1) = \sum_{v=1}^k C_{v1} \phi_v(\mathbf{q}_1) \quad (2.27)$$

2. Modelos y Métodos

Esta ecuación es válida para un sistema de capa cerrada, en el cual los N electrones se acomodan en $N/2$ orbitales de espín. Este régimen se denomina *Hartree-Fock Restringido* (**RHF**, *Restricted Hartree-Fock*).

Reemplazando esta expresión de la ecuación 2.27 en la ecuación 2.22 se obtiene:

$$f_i(\mathbf{q}_1) \sum_{v=1}^k C_{vi} \phi_v(\mathbf{q}_1) = \epsilon_i \sum_{v=1}^k C_{vi} \phi_v(\mathbf{q}_1) \quad (2.28)$$

Multiplicando por $\phi_\mu^*(\mathbf{q}_1)$ a ambos miembros e integrando, resulta:

$$\sum_{v=1}^k C_{vi} \int \phi_\mu^*(\mathbf{q}_1) f_i(\mathbf{q}_1) \phi_v(\mathbf{q}_1) d(\mathbf{q}_1) = \epsilon_i \sum_{v=1}^k C_{vi} \int \phi_\mu^*(\mathbf{q}_1) \phi_v(\mathbf{q}_1) d(\mathbf{q}_1) \quad (2.29)$$

De esta ecuación se definen los elementos de matriz de solapamiento como

$$S_{\mu v} = \int \phi_\mu^*(\mathbf{q}_1) \phi_v(\mathbf{q}_1) d(\mathbf{q}_1) \quad (2.30)$$

y la matriz de Fock como

$$F_{\mu v} = \int \phi_\mu^*(\mathbf{q}_1) f_i(\mathbf{q}_1) \phi_v(\mathbf{q}_1) d(\mathbf{q}_1) \quad (2.31)$$

Entonces la ecuación 2.29 se puede reescribir de la siguiente manera

$$\sum_{v=1}^k F_{\mu v} C_{vi} = \epsilon_i \sum_{v=1}^k S_{\mu v} C_{vi} \quad (2.32)$$

quedando la representación matricial como,

$$FC = SC \epsilon \quad (2.33)$$

Para poder resolver la ecuación 2.33 se realiza una transformación matricial que involucra la diagonalización de S , obteniéndose

2. Modelos y Métodos

$$F' C' = C' \epsilon \quad (2.34)$$

De la cual se consiguen los coeficientes C_{vi} como autovectores y las energías de los orbitales, ϵ_i , como autovalores. Esta ecuación debe resolverse auto-consistentemente, debido a que F depende de C . Por lo tanto se parte de orbitales de espín de prueba (con sus coeficientes $C_{\mu\nu}$) y se computa la ecuación 2.34 iterativamente hasta alcanzar auto-consistencia.^{1,3,27}

Entre los criterios de convergencia se puede establecer que la diferencia entre dos valores sucesivos de energía total sea no mayor a un determinado δ . Un valor de $\delta=10^{-6}$ Hartrees es adecuado para la mayoría de los propósitos. Alternativamente, se puede requerir que la desviación cuadrática media de los elementos de la matriz C sea menor que δ .⁷

El desarrollo expuesto en los párrafos anteriores se realizó para **RHF**, es decir cuando todos los electrones están apareados. Cuando una molécula tiene uno o más electrones desapareados (capas abiertas), las ecuaciones de Hartree-Fock se pueden aplicar por separado a los orbitales de espín con coordenadas α respecto de los de coordenadas β , alcanzando también la auto-consistencia por separado. El acople entre ellos está dada por la interacción de coulomb promedio entre los orbitales de espín α (ó β) y los orbitales β (ó α). Este acople está explícito en cada una de las ecuaciones autoconsistentes (para α y para β). El sistema de ecuaciones equivalente al desarrollo de Roothaan-Hall (independiente para α y β) se denominan ecuaciones de Pople – Nesbect, que justifican el régimen **UHF** (*Unrestricted Hartree-Fock*) capaz de tratar especies de capa abierta.⁷

2.4.3. Correlación Electrónica: las limitaciones de Hartree-Fock

Una consecuencia de tratar solamente en forma aproximada la repulsión interelectrónica es que la verdadera función de onda de un sistema multielectrónico nunca es un determinante de Slater (aunque sin duda, en algunos casos resulta una aproximación útilⁱ). En realidad, la función de onda antisimétrica en general puede ser escrita como un conjunto completo de determinantes, pero en el método de **HF** solamente un determinante es considerado.²⁷

Debido a que el operador de Fock es un operador monoelectrónico efectivo, las ecuaciones

i En términos generales, o sea a cuántos hartrees de diferencia energética se está de Full CI, **HF** no resulta una buena aproximación. Ocurre que en reacciones isodésmicas con especies de capa cerrada neutras, los grandes errores de **HF** se autocancelan, produciendo cambios de energía más o menos aceptables.

2. Modelos y Métodos

2.21 y 2.22 describen a un sistema de N -electrones que no interactúan entre ellos, pero sí experimentan un potencial efectivo V_{HF} . El determinante de Slater es la función de onda de este sistema N -electrónico no-interactuante.^{1,2}

Las ecuaciones de **HF** derivadas del empleo de un determinante de Slater, tratan a cada electrón como sujeto a un potencial efectivo, considerando la interacción con los otros electrones como un promedio. Físicamente, un producto de funciones de un electrón implica que los electrones no interactúan entre sí instantáneamente (sólo se considera el promedio espacial de los otros electrones, cuyo potencial efectivo está en los operadores de Fock **J** y **K**). En el sistema real el movimiento de los electrones está correlacionado, tendiendo a evitarse los unos a los otros, disminuyendo la energía del sistema. Sin embargo, estas interacciones particulares e instantáneas entre los pares de electrones no son descritas en **HF**, con lo cual predice una energía (E_{HF}) superior a la exacta (E_0). La diferencia entre E_0 y E_{HF} es la denominada energía de correlación electrónica (E_{corr}):

$$E_{corr} = E_0 - E_{HF} \quad (2.35)$$

El valor de E_{corr} es negativo, dado que en virtud del Principio Variacional la energía del sistema es superior o igual a la del sistema real. 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 puede producir resultados irreales. Por ejemplo, el método **HF** predice que la densidad electrónica de la molécula de H_2 se concentra entre los núcleos a separación infinita sólo en el caso **RHF**.^{1,2,7,8,24}

2.5. Teoría del Funcional de la Densidad - DFT

La teoría funcional de la densidad (**DFT**, *Density Functional Theory*) es una aproximación a la estructura electrónica de átomos y moléculas, que en las últimas décadas se ha tornado muy importante (Figura 1). A diferencia de la formulación de **HF**, esta teoría contempla inherente y explícitamente la correlación electrónica. Muchos problemas que antes eran tratados con Hartree-Fock, o con métodos post-Hartree-Fock (no se desarrollan en esta tesis debido a que no fueron usados, pero el lector interesado puede consultar las ref. 1,3,6,24,27), son actualmente tratados empleando **DFT**, el cual, en algunos casos, presenta mejor

2. Modelos y Métodos

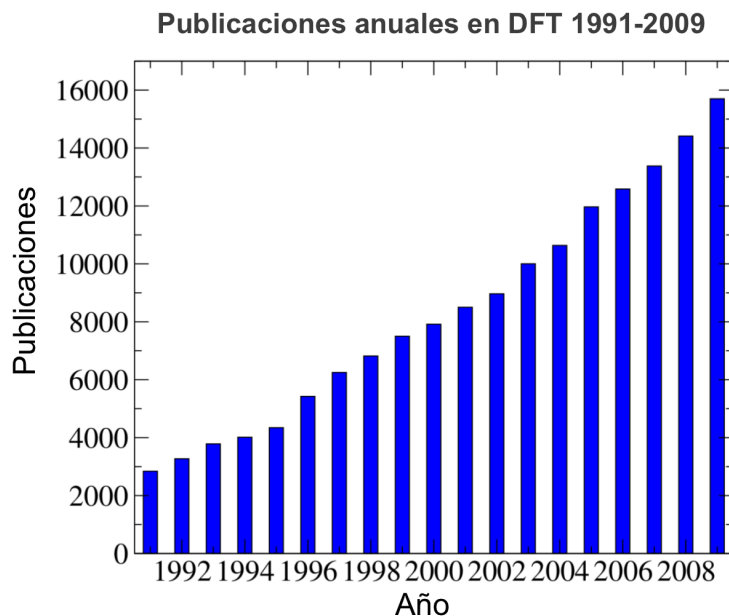


Figura 1: Crecimiento casi exponencial de las publicaciones utilizando **DFT** en las dos últimas décadas.

concordancia con los datos experimentales. Además, posee un fuerte atractivo, debido a que puede ser aplicado al estudio de sistemas de tamaño moderado a grande ($N_{\text{átomos}} \geq 20$) obteniendo resultados con una exactitud aceptable. El costo computacional es semejante o menor al de **HF** (debido a que su implementación es similar) y, algunas veces, es una fracción del requerido utilizando métodos de correlación electrónica como Teoría de Perturbaciones de Muchos Cuerpos (métodos basados en Moeller-Plesset) y *Coupled Cluster*.²⁷ Asimismo, **DFT** llega a proporcionar resultados de calidad comparable con *Coupled Cluster*.^{3,9} El desarrollo de funcionales de correlación-intercambio (ver más adelante), de algoritmos más eficientes y la implementación de éstos en varios paquetes de programas de cálculo (GAMESS, Gaussian, NWCHEM, Siesta, ADF, etc.) contribuyó en forma significativa a la popularidad de los métodos de **DFT**.^{3,27}

Un tratamiento más detallado de la teoría y su desarrollo histórico puede revisarse en bibliografía.^{2,4}

2.6. Teoremas de Hohenberg-Kohn

DFT se basa en el uso de la densidad electrónica ($\rho(\mathbf{r})$) en vez de una función de onda. El uso de la densidad electrónica como una variable fundamental en la descripción de un sistema electrónico se remonta a inicios del siglo XX, cuando Drude aplicó a la teoría de los gases a

2. Modelos y Métodos

un metal, considerando a los electrones como un gas homogéneo, a fin de poder desarrollar una teoría sobre la conducción térmica y eléctrica.¹⁰ Desde entonces, varios modelos (Drude, Sommerfield, Thomas-Fermi, Dirac) fueron propuestos y perfeccionados. El modelo de Thomas-Fermi se valió de argumentos estadísticos para aproximar la distribución electrónica a un gas uniforme de electrones (*gue*), dando como resultado una expresión para la energía cinética de este sistema (T_{gue} , ecuación 2.36).^{1,27}

$$T_{gue}[\rho(\mathbf{r})] = \frac{3}{10} (3\pi^2)^{2/3} \int \rho^{5/3}(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (2.36)$$

Cabe destacar que la energía cinética T está en función de la densidad, mientras que la densidad en sí es una función de las coordenadas espaciales (\mathbf{r}). Una función cuyo argumento es otra función se denomina *funcional*.^{1,3,2}

El modelo de Thomas-Fermi fue perfeccionado por Dirac, el cual añadió a la ecuación el término correspondiente a la energía de intercambio.^{2,27}

El uso de la densidad electrónica como variable básica fue rigurosamente fundamentada con la publicación de dos teoremas de Hohenberg y Kohn en 1964,¹¹ los cuales proporcionan las bases de la Teoría Funcional de la Densidad moderna.

2.6.1. Primer Teorema de Hohenberg-Kohn

El primer teorema de Hohenberg-Kohn (**HK**) establece que la densidad electrónica de un estado basal no degenerado determina en forma unívoca el operador Hamiltoniano (dentro de la aproximación de **BO**) y, con ello, todas las propiedades del sistema. En otras palabras, el teorema demuestra que la densidad determina al potencial externo, $v(\mathbf{r})$ y al número de electrones, N , y con ello el Hamiltoniano. La demostración de este teorema puede ser encontrada en las ref. 1, 2, 3, 4 y 11)

$$\rho_0 \Rightarrow \{N, v(\mathbf{r})\} \Rightarrow \mathbf{H} \Rightarrow \Psi_0 \Rightarrow E_0 \text{ (y todas las demás propiedades del sistema)}$$

Como consecuencia de que la energía del estado basal es un funcional de densidad electrónica de ese estado, también lo deben ser cada uno de los componentes de la energía.

2. Modelos y Métodos

$$\begin{aligned}
 E_0 = E_V[\rho_0] &= T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] + E_{Ne}[\rho_0] \\
 &= F[\rho_0] + E_{Ne}[\rho_0]
 \end{aligned}
 \tag{2.37}$$

conteniendo F a la energía cinética y la interacción interelectrónica

En la ecuación 2.37, el subíndice V es colocado para explicitar la dependencia con el potencial externo.

En dicha ecuación, el término T es la energía cinética de los electrones, E_{ee} el potencial de repulsión interelectrónica y E_{Ne} el potencial de atracción núcleo-electrón, este término contiene al potencial externo. En el caso de una molécula aislada el potencial externo es precisamente el generado por los núcleos $v_{\text{ext}}(\mathbf{r})$. La ecuación 2.37 posee los mismo términos que la ecuación 2.10, a excepción del potencial de repulsión núcleo-núcleo, la cual es una constante dentro de la aproximación de BO y varía con la posición espacial de los mismos.

El funcional de la energía de la ecuación 2.37, define el funcional $F[\rho]$ que es un *funcional universal*, porque es independiente de $v(\mathbf{r})$ y, por ende, del sistema también.

La aproximación más simple, si se evalúa *a priori* la energía molecular usando sólo la densidad electrónica como una variable, es considerar el sistema en forma clásica, en cuyo caso la atracción entre los núcleos y los electrones es:

$$\begin{aligned}
 E_{Ne}[\rho] &= \int \rho(\mathbf{r}) \left(\sum_A^M \frac{Z_A}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}_A|} \right) d\mathbf{r} \\
 &= \int \rho(\mathbf{r}) v(\mathbf{r}) d\mathbf{r}
 \end{aligned}
 \tag{2.38}$$

y el término E_{ee} se puede escribir para mayor claridad de la siguiente forma:

$$\begin{aligned}
 E_{ee}[\rho] &= J[\rho] + \text{términos no clásicos} \\
 &= \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 + \text{términos no clásicos}
 \end{aligned}
 \tag{2.39}$$

donde $J[\rho]$ es el término clásico para la repulsión electrónica y los términos no clásicos son muy importantes y elusivos de formular matemáticamente. Éstos poseen la mayor parte de la energía de correlación-intercambio que serán definidos en la sección 2.7. El término E_{ee} contiene los efectos de corrección de auto-interacción (términos no clásicos, final de la

2. Modelos y Métodos

sección 2.4.1.), contribución de Coulomb, de intercambio y de correlación (sección 2.4.3.).

2.6.2. Segundo Teorema de Hohenberg-Kohn

El segundo teorema establece que, habiendo cualquier densidad electrónica aproximada, $\tilde{\rho}(\mathbf{r})$, de modo que $\tilde{\rho}(\mathbf{r}) \geq 0$ y $\int \tilde{\rho}(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = N$, la energía total será siempre mayor o igual a la energía exacta del sistema en su estado fundamental, es decir, $E[\tilde{\rho}] \geq E[\rho_0] = E_0$.

La densidad electrónica, $\tilde{\rho}(\mathbf{r})$, define su propio $\tilde{v}(\mathbf{r})$ y, por consiguiente, el Hamiltoniano $\tilde{\mathbf{H}}$ y la función de onda $\tilde{\Phi}(\mathbf{q})$. Esta función de onda, a su vez, puede ser usada como una función de onda de prueba para el Hamiltoniano exacto, es decir, el que posee el $v(\mathbf{r})$ real del sistema. Recordando el Teorema Variacional, ecuación 2.7, se obtiene,

$$\frac{\int \Phi^* \mathbf{H} \Phi d\mathbf{r}}{\int |\Phi|^2} d\mathbf{r} = E[\Phi] = T[\tilde{\rho}] + E_{ee}[\tilde{\rho}] + \int \tilde{\rho}(\mathbf{r}) v(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = E[\tilde{\rho}] \geq E_0 \quad (2.40)$$

Resumiendo, los teoremas de **HK** demuestran que las propiedades de un sistema químico pueden ser determinadas a partir de la densidad electrónica de su estado fundamental y ésta puede ser hallada mediante el Principio Variacional. Sin embargo, hay ciertas restricciones, la primera es la V -representabilidad, que restringe las posibles $\tilde{\rho}(\mathbf{r})$, a aquellas que generen el potencial externo real del sistema electrónico. En la mayoría de los problemas de estructura electrónica, el potencial externo puede ser fácilmente obtenido (o una aproximación de él) a través del conocimiento del sistema químico, es decir, generalmente se conocen las coordenadas de los núcleos y sus cargas. En la segunda restricción las $\tilde{\rho}(\mathbf{r})$, deben ser N -representables, es decir deben ser generadas a partir de una función de onda antisimétrica con el número de electrones del sistema real^{1,2,4,27}.

2.7. Ecuaciones de Kohn-Sham

Una idea muy sorprendente fue la de Kohn y Sham (**KS**), quienes en 1965, propusieron usar uno de electrones no-interactuantes (ficticio) como sistema de referencia, tal que tenga la misma densidad electrónica del estado basal que el sistema real (interactuante). Luego podemos reescribir la ecuación 2.37 de la siguiente forma:

2. Modelos y Métodos

$$E[\rho]=T_{ni}[\rho]+E_{ne}[\rho]+J[\rho]+\Delta T[\rho]+\Delta E_{ee}[\rho] \quad (2.41)$$

donde los términos de la derecha, se refieren a la energía cinética de los electrones no-interactuantes, T_{ni} , a la atracción núcleo-electrón, E_{ne} , a la repulsión electrón-electrón clásica, J , a la corrección a la energía cinética debida a la naturaleza interactuante de los electrones, ΔT y, por último, a todas las correcciones no-clásicas a la repulsión electrón-electrón, ΔE_{ee} .

Nótese que se conoce la expresión de los tres primeros términos. El primer término es la sumatoria de la energía cinética de cada uno de los electrones no-interactuantes (primer término de la derecha del operador monoelectrónico de Fock, ecuación 2.23); el segundo y el tercer término se presentaron en las ecuaciones 2.38 y 2.39, respectivamente. Los términos $\Delta T[\rho]$ y $\Delta E_{ee}[\rho]$ son los difíciles de conocer y pueden ser agrupados en un sólo término, que comúnmente se conoce como energía de correlación e intercambio, $E_{xc}[\rho]$.

De acuerdo con Kohn y Sham, es posible utilizar un sistema de referencia de electrones no-interactuantes. Si las partículas son no-interactuantes, su Hamiltoniano es separable en N Hamiltonianos de una partícula, con un potencial efectivo, $v_{ef}(\mathbf{r})$.

$$\mathbf{h}_i^{KS} = -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_{ef}(\mathbf{r}_i) \quad (2.42)$$

El operador Hamiltoniano de **KS**, realmente describe un sistema de electrones no-interactuantes, para el cual la densidad electrónica exacta del estado basal es ρ . Debido a la naturaleza de este operador, la función de onda que representa a su estado basal es el ya conocido determinante de Slater (ecuación 2.16). En similitud con las ecuaciones de Hartree-Fock (2.22 y 2.23), podemos expresar el operador monoelectrónico de **KS**,

$$\mathbf{h}_i^{KS} \chi_i^{KS}(\mathbf{q}_1) = \left(-\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_{ef}(\mathbf{r}_i) \right) \chi_i^{KS}(\mathbf{q}_1) = \epsilon_i(\mathbf{q}_1) \chi_i^{KS}(\mathbf{q}_1) \quad (2.43)$$

A partir de la anterior ecuación se pueden obtener los llamados orbitales de espín de Kohn-Sham.

2. Modelos y Métodos

Este planteo propone que toda la descripción de las interacciones no clásicas estén dentro del potencial efectivo, permitiendo utilizar un sistema de referencia simple como lo es el sistema de partículas no- interactuantes, pero que generará la densidad del sistema real, en virtud del 1^{er} Teorema de HK.

$$\rho_{KS}[\mathbf{r}] = \sum_i^N |\chi_i^{KS}(\mathbf{q}_1)|^2 = \rho_0[\mathbf{r}] \quad (2.44)$$

El potencial efectivo es obtenido minimizando el Lagrangiano de la expresión en la ecuación 2.41 empleando como restricción que las funciones de espín sean ortonormales (de manera similar al desarrollo de **HF**). Una derivación detallada se puede encontrar en la ref. 4. Entonces, el potencial efectivo se expresa como:

$$v_{ef}(\mathbf{r}) = v(\mathbf{r}) + \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + v_{xc}(\mathbf{r}), \text{ con} \quad (2.45)$$

$$v_{xc}(\mathbf{r}) = \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r})} \quad (2.46)$$

En esta última ecuación, se aprecia que $v_{ef}(\mathbf{r})$ comprende un primer término debido a la atracción núcleo electrón, un segundo término de repulsión culómbica clásica y un v_{xc} que colecciona todas las contribuciones no clásicas; v_{ef} depende de $\rho(\mathbf{r})$; por lo tanto, las ecuaciones 2.43, 2.44 y 2.45 deben ser resueltas auto-consistentemente.

El desarrollo expuesto presenta mucha similitud entre **DFT** y **HF**. La diferencia importante es que **DFT** no contiene aproximaciones, es exacto. El problema surge en que se desconoce la expresión exacta de v_{xc} , por lo tanto se deben introducir, de todos modos, aproximaciones sobre este funcional.^{1,2,3,4,27}

2.7.1. Funcionales de Correlación-Intercambio

La piedra angular de **DFT** es la descripción exacta del funcional de correlación-intercambio, 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,

2. Modelos y Métodos

existe un esfuerzo muy importante en el desarrollo de nuevos y mejores funcionales. Sin embargo, se está muy lejos de un funcional universal. Los funcionales E_{xc} se dividen en familias de acuerdo a cómo se implementó su aproximación. Las familias más importantes son Aproximación de la Densidad Local (**LDA**), Aproximación de Gradiente Generalizado (**GGA**) y Conexión Adiabática (híbridos y meta-**GGA**).^{1,2,3,27}

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 $\rho(\mathbf{r})$:

$$E_{xc}[\rho(\mathbf{r})] = \int \rho(\mathbf{r}) \epsilon_{xc}[\rho(\mathbf{r})] d\mathbf{r} \quad (2.47)$$

La densidad de energía, ϵ_{xc} , se trata siempre como una suma individual de contribuciones de intercambio y de correlación, es decir, $\epsilon_{xc} = \epsilon_x + \epsilon_c$.ⁱⁱ

El primer método, **LDA**, se basa en la teoría del gas de electrones homogéneo para derivar las funciones de correlación-intercambio aproximadas. 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 la predicción de estructuras, en especial de metales de transición y de sistemas en el estado sólido.^{1,2,3,27}

A pesar de su éxito en la descripción de algunos sistemas, en otros la densidad electrónica está lejos de ser espacialmente uniforme, y por ello la **LDA** tiene sus limitaciones. En la aproximación de **GGA**, se incluye, entonces, el cambio local de la densidad electrónica, es decir su gradiente, $\rho(\mathbf{r})$. 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 1988.¹² Este funcional se abrevia como “B” (en algunas ocasiones B88) e incorpora un parámetro experimental.^{1,2,3,27} 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**).¹²

Por otro lado, otros funcionales de correlación e intercambio no tienen parámetros

ii Es interesante mencionar que no existe una demostración formal de que realmente la energía de correlación e intercambio pueda ser particionada en dos contribuciones aditivas.

2. Modelos y Métodos

empíricos. Entre los más conocidos se encuentra el de Perdew, Burke y Ernzerhof (**PBE**).¹³

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**).^{1,2,3,27}

Otra forma de mejorar los funcionales de correlación-intercambio han sido desarrolladas. Una de ellas es extender 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 interactúan. Estos funcionales son llamados meta-**GGA**.²⁷

En esta tesis sólo se usaron los funcionales híbridos. Estos incorporan en el funcional de intercambio parte o toda la energía de intercambio obtenida mediante el método de Hartree-Fock. Esto se debe a que, como se explicó en la sección anterior, este método calcula de forma exacta la energía de intercambio.^{1,2,3,27} En algunos funcionales como B3LYP, se incorporan parámetros empíricos que son coeficientes para pesar las contribuciones locales y no locales a la densidad ϵ_{xc} y la parte de **DFT** y de **HF** para el intercambio ϵ_x .¹⁴

Los funcionales híbridos se basan en el Método de Conexión Adiabática. Este método aproxima el cálculo de la energía de correlación-intercambio, mediante la conversión paulatina de un sistema no-interactuante de **KS** de referencia a uno real, interactuante, a través del empleo de teorema de Hellmann-Feynmann.^{1,2,3,27}

En esta tesis se utilizaron principalmente funcionales híbridos, entre ellos B3LYP, CAM-B3LYP, LC-BLYP y PBE0. Este último, emplea un sólo parámetro no optimizado empíricamente, sino basados en argumentos de la Teoría de Perturbaciones.¹⁵

2.8. Teoría del Funcional de la Densidad Dependiente del Tiempo

El formalismo de **DFT** basado en las ecuaciones de **KS** está limitado a sistemas independientes del tiempo, es decir, al estado basal. Sin embargo, si se desea establecer, por analogía, una teoría dependiente del tiempo, se deben formular y comprobar primero las versiones dependientes del tiempo de los dos teoremas de **HK**, para, luego, derivar de las ecuaciones de **KS** dependientes del tiempo.

2. Modelos y Métodos

En este sentido, el teorema de Runge-Gross (**RG**) puede ser visto como la versión dependiente del tiempo de los teoremas de **HK** y se constituye en la base en la que se fundamenta formalmente el formalismo de **KS** dependiente del tiempo. El teorema de **RG** establece que la densidad electrónica exacta dependiente del tiempo, $\rho(\mathbf{r},t)$, determina el potencial externo dependiente del tiempo, $v(\mathbf{r},t)$, y la función de onda dependiente del tiempo, $\Psi(\mathbf{r},t)$ (ref 17, pagina 10). Así se establece que tanto el potencial externo como la función de onda dependiente del tiempo son funcionales de $\rho(\mathbf{r},t)$.

$$\rho(\mathbf{r},t) \Leftrightarrow v[\rho](\mathbf{r},t)+C(t) \Leftrightarrow \Psi[\rho](\mathbf{r},t)e^{-i\alpha(t)} \quad (2.48)$$

Una vez establecido de forma unívoca que la densidad electrónica dependiente del tiempo determina tanto el $v(\mathbf{r},t)$ como la $\Psi(\mathbf{r},t)$, el segundo requerimiento es establecer la existencia de un Principio Variacional en analogía al caso independiente del tiempo, el cual fue descrito anteriormente por el segundo teorema de **HK**. Entonces, si $\Psi(\mathbf{r},t)$ es una solución de la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo, se establece que la condición inicial, es decir a tiempo t_0 :

$$\Psi[\rho](\mathbf{r},t_0)=\Psi_0[\rho](t) \quad (2.49)$$

luego, la $\Psi_0(t)$ corresponde a un punto estacionario de la integral de acción:^{16,17}

$$A[\rho]=\int_{t_0}^{t_1} dt \left\langle \Psi[\rho](\mathbf{r},t) \left| i \frac{\partial}{\partial t} - \mathbf{H}(\mathbf{r},t) \right| \Psi[\rho](\mathbf{r},t) \right\rangle \quad (2.50)$$

Seguidamente, la densidad electrónica exacta, $\rho(\mathbf{r},t)$, puede obtenerse de la ecuación de Euler,¹⁷

$$\frac{\delta A[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r},t)}=0 \quad (2.51)$$

ésto aplicando las condiciones de contorno apropiadas. En resumen, la variación de la integral de acción con respecto a $\rho(\mathbf{r},t)$ indica la forma de obtener la densidad exacta.

Este principio de acción estacionario puede ser aplicado a fin de derivar la ecuación de **KS**

2. Modelos y Métodos

dependiente del tiempo, en analogía con la versión independiente del tiempo. Así, en analogía a la ecuación 2.43, la ecuación de **KS** dependiente del tiempo se puede escribir:

$$i \frac{\partial}{\partial t} \psi(\mathbf{q}_1, t) = \left(-\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_{ef}(\mathbf{r}_i, t) \right) \psi(\mathbf{q}_1, t) \quad (2.52)$$

donde v_{ef} es análogo a su versión independiente del tiempo (ec. 2.45), es decir, es el potencial local efectivo que al ser aplicado produce una densidad electrónica de electrones no-interactuantes que es exactamente igual a la densidad electrónica del sistema real, interactuante.

$$v_{ef}(\mathbf{r}, t) = v(\mathbf{r}, t) + \int \frac{\rho(\mathbf{r}', t)}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + \frac{\delta A_{xc}[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r}, t)} \quad (2.53)$$

En esta ecuación $v(\mathbf{r}, t)$ es el potencial externo dependiente del tiempo y A_{xc} , el último término de la parte derecha de la ecuación 2.53, corresponde a la parte de correlación-intercambio de la integral de acción. En A_{xc} se colectan todos los efectos de correlación y de intercambio, en analogía a la versión de **KS** independiente del tiempo, donde esos efectos eran colectados por E_{xc} (ecuación 2.46). Al igual que con E_{xc} , en la versión independiente del tiempo, la forma exacta de A_{xc} no se conoce y, por lo tanto, son necesarias aproximaciones para este funcional.

2.8.1. Respuesta lineal en TD-DFT

Las energías de excitación y la fuerza del oscilador (proporcional a la constante de absorptividad molar en espectroscopía) pueden ser obtenidas mediante las ecuaciones de **KS** dependiente del tiempo, utilizando dos estrategias diferentes. Una alternativa es propagar estas ecuaciones en el tiempo, lo cual se conoce como **TD-DFT** en tiempo real.^{18,19} La otra estrategia es la respuesta lineal de la ecuación de **KS** dependiente del tiempo (**LR-TDDFT**), la cual es la utilizada en esta tesis mediante el empleo del programa Gaussian.

En **LR-TDDFT** se analiza cómo cambia la densidad electrónica del sistema debido a una perturbación dependiente del tiempo δv_{ef} en el potencial efectivo. La perturbación que se incluye es de primer orden, es decir:

2. Modelos y Métodos

$$v_{ef}^{pert}(\mathbf{r}, \mathbf{t}) = v_{ef}(\mathbf{r}, \mathbf{t}) + \delta v_{ef}(\mathbf{r}, \mathbf{t}) \quad (2.54)$$

siendo los términos que contienen δv_{ef} los términos perturbativos. Así, también se puede expresar la función de onda y la densidad electrónica dependiente del tiempo mediante un esquema de perturbación de primer orden.

$$\begin{aligned} \psi_1(\mathbf{r}, \mathbf{t}) &= e^{-i\epsilon_1 t} \chi^{KS}(\mathbf{q}_1) + \delta \psi_1(\mathbf{r}, \mathbf{t}) \\ \rho(\mathbf{r}, \mathbf{t}) &= \rho(\mathbf{r}) + \delta \rho(\mathbf{r}, \mathbf{t}) \end{aligned} \quad (2.55)$$

donde $\chi^{KS}(\mathbf{q}_1)$ y $\rho(\mathbf{r})$ son el orbital molecular de KS y la densidad electrónica, respectivamente, en el esquema independiente del tiempo.

Luego, en el desarrollo posterior del método de **LR-TDDFT**, el término perturbativo de $\delta \rho(\mathbf{r}, \mathbf{t})$, se convierte en el dominio de las frecuencias, ω , mediante su transformación de Fourier, quedando definido como $\delta \rho(\mathbf{r}, \omega)$.

$$\delta \rho(\mathbf{r}, \omega) = \sum_{ia} 2P_{ia}(\omega) \chi_i(\mathbf{q}_1) \chi_a(\mathbf{q}_1) \quad (2.56)$$

donde

$$P_{ia}(\omega) = \frac{\omega_{ia}}{\omega_{ia}^2 - \omega^2} \delta v_{ia}^{pert} \quad (2.57)$$

donde δv_{ia}^{pert} es una observable que da cuenta de la probabilidad de perturbar el sistema llevando el electrón del orbital ocupado i al virtual a . El hecho de que $\delta \rho(\mathbf{r}, \omega)$ sea una sumatoria, indica que la perturbación del sistema que termina en la formación de un estado excitado puede conllevar la contribución de varias transiciones electrónicas, cada una con su peso P_{ia} en la sumatoria.

Finalmente, mediante el desarrollo de estas expresiones puede llegarse a una ecuación de autovalores, de la cual se obtiene la frecuencia, ω , a la que ocurre la excitación. El desarrollo detallado se puede revisar en las referencias.^{16,17,20}

2.9. Solvente Implícito

La mayoría de los procesos químicos ocurren en solución, es decir donde el medio es un solvente. Éste, en algunos casos, puede participar directamente del proceso químico, como por ejemplo, una reacción de hidrólisis de éster o una solvólisis en S_N1 . En otros casos, el solvente no interviene directamente, pero ofrece un ambiente que afecta la estabilidad de las distintas especies presentes en la reacción (reactantes, estados de transición, intermediarios o productos). Por ejemplo, afecta la velocidad al determinar la energía relativa del estado de transición en una reacción S_N2 . En este último caso, una variedad de modelos de solvente implícito han sido propuestos, tanto para Mecánica Cuántica como Mecánica Molecular.

La energía libre de solvatación (ΔG_{sol}) se puede descomponer en tres contribuciones:

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{elec} + \Delta G_{cav} + \Delta G_{vdw} \quad (2.58)$$

El primer componente es el electrostático, el segundo es el costo de cavitación,ⁱⁱⁱ y el último es el que refiere a las interacciones de van der Waals entre solvente-soluto, el cual puede ser dividido en un término repulsivo (ΔG_{rep}) y otro de dispersión atractivo (ΔG_{disp}). El término más crítico es el primero, relacionado con la contribución electrostática a la solvatación. En esta sección, se tratarán sólo los modelos de solvente implícito dentro de los cálculos de Mecánica Cuántica.

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 (Figura 2).²⁴ El **RF** dentro de la Mecánica Cuántica, se conoce como *campo de reacción auto-consistentemente* (**SCRf**) considerando el hamiltoniano del sistema (H_{tot}) como hamiltoniano en fase gaseosa (H_0) más una perturbación (H_P) impuesta por la presencia del solvente.

$$H_{tot} = H_0 + H_P \quad (2.59)$$

Hay distintos modelos de **SCRf** que varían fundamentalmente en cómo se define la

iii Costo 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.

2. Modelos y Métodos

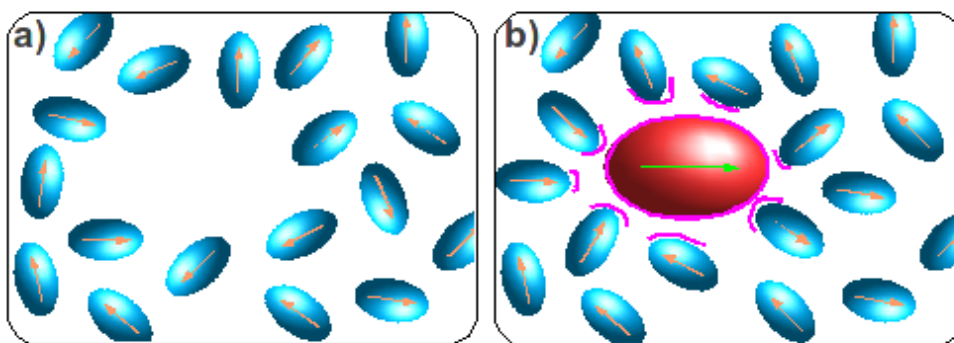


Figura 2: Representación esquemática de las contribuciones a la solvatación en el planteo del campo de reacción. a) Se genera la cavidad donde va el soluto (pérdida de entropía asociada a la “energía de cavitación”). b) El soluto es polarizado por el solvente y este a su vez se polariza por el soluto, lo que se asocia a la contribución electrostática; además habrá un potencial de interacción de van der Waals a nivel superficial (corta distancia, resaltado en fucsia)

cavidad y la distribución de cargas del soluto.

El modelo de **SCRF** utilizado en esta tesis es el **PCM** (método del Continuo Polarizado).²¹ En el **PCM**, la cavidad está definida por la conjunción de esferas con radios atómicos de van der Waals aumentados un 20% aproximadamente.²⁷ La distribución de carga del soluto, $q(\mathbf{r})$, es la suma de la distribución de carga nuclear discreta, $q_{\text{nuc}}(\mathbf{r})$, 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. Entonces la distribución de cargas del soluto genera cargas superficiales devenidas 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.²²

El segundo y el tercer término correspondientes 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, son los términos más sencillos de calcular. 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 largamente de su polarizabilidad y tamaño atómico.^{22,23}

2.10. *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 (QM). Debido a que los métodos QM tratan a los electrones explícitamente, la resolución de la ecuación de Schrödinger, es muy costosa computacionalmente. La mecánica molecular (MM) es entonces usada para calcular propiedades de sistemas con un gran número de átomos. En algunos casos, a partir de los métodos MM se obtienen resultados con una exactitud igual a los cálculos QM de más alto nivel, pero en una fracción de tiempo mucho menor. Sin embargo, los métodos MM no pueden evaluar propiedades que dependan de la densidad electrónica ni describir formación y/o ruptura de enlaces.

Los métodos MM funcionan adecuadamente debido a la validez de varias aproximaciones. La primera de éstas aproximaciones es la de Born-Oppenheimer (sección 2.3.), sin la cual sería imposible describir la energía del sistema en función de las coordenadas nucleares.^{1,3,27,24}

$$\mathbf{H}_{nuc} = - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + E_{elec} \quad (2.60)$$

No obstante, en la ecuación de Schrödinger para los núcleos (comparar ecuaciones 2.14 y 2.60) el primer término es la energía cinética nuclear y el segundo justamente la energía electrónica que se intentó calcular en las secciones anteriores referidas a las aproximaciones de Mecánica Cuántica. En vez de resolver el problema cuántico electrónico para obtener E_{elec} , la MM trata de aproximarla mediante potenciales analíticos clásicos muy convenientes computacionalmente que describan todas las interacciones intra- o intermoleculares. Por ejemplo, el potencial asociado a la distancia entre los núcleos en una molécula de hidrógeno, puede ser aproximado por un potencial de Morse $V(r) = D_e [1 - e^{-a(r-r_e)}]^2$ donde r es la distancia entre los núcleos, r_e es la distancia de equilibrio, D_e es el potencial mínimo, a es un parámetro asociado a una constante de fuerza del potencial próximo al mínimo. Este potencial puede ser utilizado para calcular la energía empleando una forma analítica sencilla para cualquier posición de los núcleos. En estas fórmulas en las que la presencia de los electrones no es tomada en cuenta explícitamente se denominan *campos de fuerza* y serán de gran utilidad

2. Modelos y Métodos

para las simulaciones de Dinámica Molecular (sección 2.12.)²⁷

La descripción del potencial de interacción de un sistema de muchas partículas se obtiene a partir del potencial de interacción de pares, triples, cuádruples, etc. La segunda aproximación, es que, dado un potencial de interacción entre dos partículas v_{ij} , el potencial para las N partículas del sistema se obtiene como la suma sobre todos los pares posibles, es decir:

$$V(r_1, r_2, \dots, r_N) = \sum_{i < j}^N v_{ij} \quad (2.61)$$

Esta aproximación se ha obtenido dejando de lado los potenciales de interacción de orden mayor a dos y tomando sólo las interacciones de a pares.²⁵

Resumiendo, la definición de los potenciales clásicos no es independiente de las propiedades cuánticas de las interacciones. En primer lugar, la dinámica de los núcleos y de los electrones se desacopla siguiendo la aproximación de Born-Oppenheimer. De este modo, pasa a tener sentido la propagación de las trayectorias de los núcleos en una superficie de energía potencial generada por los electrones. Esta superficie podría ser obtenida por cálculos de estructura electrónica en todos los pasos de la trayectoria. En la práctica, estos cálculos pueden ser hechos para grupos pequeños de partículas. Funciones analíticas, como el potencial de Morse, son entonces ajustadas a las curvas de energía potencial obtenidas. Estas curvas son usadas para construir la superficie de energía potencial generada por los electrones en sistemas más complejos, pero sin la necesidad de la realización de cálculos de estructura electrónica.²⁷

Diversos tipos de potenciales analíticos pueden ser usados para las interacciones entre partículas. Éstos deben ser escogidos para cada tipo de interacción, buscando la mejor representación de la curva de energía de potencial verdadera, de acuerdo con los recursos computacionales disponibles y con el tipo de fenómeno observado. Estos potenciales analíticos podrían ser usados para propagar la trayectoria, tanto cuánticamente, de acuerdo con la ecuación de Schrödinger, como clásicamente por las ecuaciones de Newton. El cálculo de las trayectorias usando Mecánica Clásica es, evidentemente mucho más rápido. Para el estudio de propiedades dinámicas de biomoléculas a la temperatura ambiente, esto resulta computacionalmente muy conveniente, por lo que una de las principales aplicaciones de la

2. Modelos y Métodos

MM es aportar potenciales para las simulaciones de Dinámica Molecular de sistemas de tamaño considerable.²⁷

La energía térmica típica ($\sim k_B T$) de un sistema a la temperatura ambiente es del orden de 0,593 kcal/mol. Por lo tanto, la energía de la mayoría de los enlaces covalentes es 2 o 3 órdenes de magnitud mayor que la energía $k_B T$.²⁶ La ruptura de un enlace covalente no es estadísticamente relevante en una simulación de cientos de nanosegundos. De esta forma, no es necesario representar toda la curva de energía potencial de la molécula mediante un potencial disociativo, como el de Morse. El enlace covalente tendrá siempre una distancia próxima a la correspondiente al mínimo de energía. En esta región, el potencial puede ser aproximado de forma conveniente por un potencial armónico (ley de Hook). Este es el caso de todos los enlaces covalentes en moléculas comunes, en particular en biomoléculas, en las temperaturas y escalas de tiempo que son generalmente estudiadas por Dinámica Molecular.²⁷

2.10.1. Campos de Fuerza

La mayoría de los campos de fuerza usados en la actualidad para sistemas biológicos de tamaño considerable contienen las expresiones de energía más sencillas, entre los posibles diseños de fórmulas. Estos pueden ser expresados por un potencial de interacción de cinco términos, que describe potenciales intra- e intermoleculares dentro de un sistema.

$$\begin{aligned}
 E_{total} = & \sum_{enlaces} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{ángulos} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \\
 & + \sum_{diédros} \frac{V}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \\
 & + \sum_{\substack{(Van\ der \\ Waals)}} \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \sum_{(coulómbicas)} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}
 \end{aligned} \tag{2.62}$$

Los tres primeros términos se refieren a las interacciones intramoleculares (enlazantes), estos son: energía de estiramiento de enlace, energía de deformación de ángulos y energía de rotación de enlace o variación de ángulo diedro, respectivamente. La desviación de los enlaces y ángulos, respecto a sus valores de equilibrio (r_{eq} y θ_{eq}), tiene asociada penalidades energéticas. Los dos últimos términos corresponden a las interacciones intermoleculares (no

2. Modelos y Métodos

enlazantes). De este modo, el penúltimo término de la ecuación 2.62 expresa la energía de van der Waals y el último la energía coulombica.

Los campos de fuerzas más complejos pueden tener términos adicionales, como aquel que describe el acople entre los términos no enlazantes u otro que tiene en cuenta las interacciones de puente de hidrógeno.

Para definir el campo de fuerza, se debe especificar, no sólo la forma funcional, sino también los parámetros (es decir, constantes como K_r , V_n y A_{ij} en la ecuación 2.62); dos campos de fuerza pueden usar formas funcionales idénticas, pero tener parámetros muy diferentes. A pesar de ello, campos de fuerza con la misma forma funcional, pero con diferentes parámetros, y campos de fuerza con diferentes formas funcionales, pueden dar resultados de exactitud comparable.²⁴ Debido a que utiliza un potencial de a pares (ecuación 2.61), la parametrización incluye el efecto de muchos cuerpos. Este potencial, así parametrizado, se denomina *potencial efectivo*.

Otro punto importante a tener en cuenta, es el concepto de “tipo de átomo”, el cual es común en la gran mayoría de campos de fuerza. Así, se asigna a cada átomo un tipo de átomo, el cual confiere la información del número atómico, hibridización y entorno (otros átomos a los que está unido).²⁴ Cada parámetro tiene en cuenta los tipos de átomos que involucra, debido a que, en general, debe haber una distinción entre, por ejemplo, el nitrógeno con hibridización sp^3 de uno sp^2 . Además, siguiendo con el ejemplo, dentro de este último grupo se debe distinguir el entorno atómico, es decir, no es lo mismo un nitrógeno amida, que uno imina o uno en un anillo aromático. Los tipos de átomos y diferencias varían con el campo de fuerza.

Uno de los mayores desafíos para la realización de Dinámica Molecular es la parametrización de los campos de fuerza. No siempre el ajuste de curvas de energía potencial obtenidas por cálculos de estructura electrónica de pequeños grupos de moléculas es satisfactorio. Un campo de fuerza está generalmente parametrizado para reproducir ciertas propiedades, generalmente, estructurales o termodinámicas, por ejemplo, entalpía de vaporización y densidad en el caso de los líquidos, energía libre de solvatación en el caso de los iones solvatados; factores de estructura obtenidos por rayos X para sólidos (metales, óxidos, sales, etc.), el coeficiente de transporte, entre otras.^{24,27}

Una característica importante de los campos de fuerza es la transferibilidad de la forma

2. Modelos y Métodos

funcional y de los parámetros. Esto significa que el conjunto de parámetros con el cual se diseñó el campo de fuerzas puede ser transferido a moléculas relacionadas, sin la necesidad de tener que ajustarlos a cada nueva molécula.²⁴ El término transferibilidad no significa que los parámetros no sean transferibles entre distintos campos de fuerza. Ésto es debido a que cada uno de ellos utiliza diferentes formas funcionales y diferentes correlaciones entre los parámetros y su respectivo potencial clásico.²⁷

En el caso de moléculas como las proteínas, la parametrización es todavía más compleja. La cantidad de datos termodinámicos experimentales que están disponibles para las proteínas es bastante limitado. Por esta razón, la parametrización de un campo de fuerza para proteínas, generalmente involucra un trabajo sistemático que intenta reproducir datos energéticos obtenidos a partir de cálculos **QM**. Los datos experimentales son usados cuando se encuentran disponibles, como por ejemplo, las frecuencias de estiramiento de diversos enlaces covalentes de aminoácidos.²⁷

2.11. Docking Molecular

2.11.1. Reconocimiento Molecular

Un fármaco (ligando) es una molécula que actúa en el organismo con el fin de producir o bloquear una respuesta biológica. El fármaco interacciona en el organismo con una determinada macromolécula receptora (en general una proteína), la cual es la responsable de algún efecto biológico que desea activar o bloquear. Los fármacos se unen a una región específica (sitio) de la proteína receptora, esta región puede ser un sitio activo de la proteína o un sitio alostérico. El reconocimiento molecular receptor-ligando depende de la complementariedad de características estructurales y fisico-químicas de las moléculas interactuantes. Las características fisico-químicas definen el grado de afinidad y de especificidad entre el ligando y el bioreceptor, los cuales están dados por interacciones intermoleculares, que comprenden fuerzas electrostáticas, de dispersión, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno.

La interacción ligando-proteína no siempre es fácil de caracterizar experimentalmente, ya sea por microscopía de rayos X, escaneo mutagénico de cisteínas usando ligando tio-reactivos

2. Modelos y Métodos

o marcado de fotoafinidad mediante MALDI-TOF, entre otros métodos.^{28,29,30} Muchos de estos experimentos se basan en mutantes de la proteína de interés, los cuales no siempre se logran producir sin ver alterada la función o estructura proteica. Aún más difícil es caracterizar cuáles son los tipos de interacciones específicas, es decir describir la interacción a nivel atómico. En este sentido, el *docking* molecular es un método que predice el lugar y modo en que un ligando se une a la proteína, y con que afinidad (estimación de la energía de ligado).

La mayoría de los algoritmos de *docking* molecular predicen el lugar, modo y afinidad de ligado a través de pasos: 1) generar un número grande de modos conformacionales del ligando (conformeros), recorriendo el espacio configuracional, es decir, variando su posición, orientación y la rotación de diedros, 2) evaluar la interacción entre el ligando y la proteína, y así determinar la energía de unión del conformero a la proteína 3) establecer un orden de los conformeros generados de acuerdo a su variación estructural y afinidad por la proteína (energía de unión), permitiendo identificar aquel de mayor interés. La evaluación de la energía de unión, y con ello la predicción de la actividad biológica, se realiza a través de una función de evaluación (en inglés *scoring*).

El método de *docking* es una pieza clave dentro del área de Diseño Racional de Fármacos, permitiendo una descripción adecuada del proceso de reconocimiento molecular. Esta descripción permite conocer cuáles son las características físico-químicas por las cuales la unión de ligando a una proteína promueve la modulación de una respuesta biológica (activación o inhibición). El conocimiento de estas características permite plantear el diseño de nuevos y mejores fármacos, asistiendo así a un diseño racional dirigido sin la necesidad de realizar una búsqueda farmacológica ciega.^{1,24,27,31}

2.11.2. Funciones de Evaluación (*Scoring Functions*)

La evaluación precisa, con un costo computacional razonable, de la afinidad de interacción entre los ligandos y sus receptores sería de enorme beneficio para el diseño racional de fármacos. Este hecho posibilitaría 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, el proceso de obtener una estimación adecuada de la energía libre de unión de un complejo ligando-proteína es una tarea bastante costosa computacionalmente

2. Modelos y Métodos

(por ejemplo, a través de métodos perturbativos como FEP³² u otros más eficientes como LIE³³). 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 validación del complejo ligando-proteína. Dentro de ese gran número, se pueden encontrar principalmente tres clases:³¹ 1) funciones basadas en campos de fuerza, 2) funciones empíricas y 3) funciones basadas en conocimiento. Las habituales funciones de evaluación basadas en campos de fuerzas tienen limitaciones muy importantes porque fueron originalmente formuladas a fin de modelar contribuciones entálpicas en fase gaseosa sin incluir términos de solvatación y entrópicos.^{27,31}

En esta tesis se utilizó el programa de *docking* llamado Autodock,³⁴ el cual pertenece a la clase de algoritmos basados en campos de fuerza. En este caso, el campo de fuerza fue calibrado usando un conjunto de estructuras conocidas de complejos ligando-proteína³⁴

2.11.3. Autodock

El paquete de programas *Autodock*,³⁴ aplica *docking* para buscar complejos proteína-proteína, ligando-proteína y sitios activos dentro de proteínas. Este programa, que fue el utilizado a lo largo de la tesis, utiliza funciones basadas en el campo de fuerza AMBER.³⁵

Para remediar algunas de las deficiencias de los campos de fuerza tradicionales, el programa *Autodock* utiliza funciones de energía libre empíricas que intentan reproducir las constantes de unión observadas. Como aproximación, *Autodock* agrega dos términos: uno que tiene en cuenta la solvatación y otro que tiene en cuenta la entropía debida a la restricción en los grados de libertad conformacionales del ligando luego de la unión.³⁴

El ΔG de unión en solvente es calculado por *Autodock* a través de un ciclo termodinámico formulado por Wesson y Eisenberg (Figura 3).³⁶ En la figura, se puede observar que varias moléculas de solvente (diagramadas con círculos, Figura 3) que estaban solvatando (ordenadas) a la proteína y al ligando se liberan (desordenándose) cuando ocurre la formación del complejo proteína-ligando. Esto produce un efecto entrópico, que es parte del efecto hidrofóbico. El orden del solvente alrededor de la proteína y del ligando, cuando están unidos como cuando no lo están, está fuertemente influenciado por la formación de puentes hidrógeno entre las moléculas de solvente y la proteína o el ligando. La función de evaluación de *Autodock* puede estimar la contribución entálpica debida a la formación de puentes

2. Modelos y Métodos

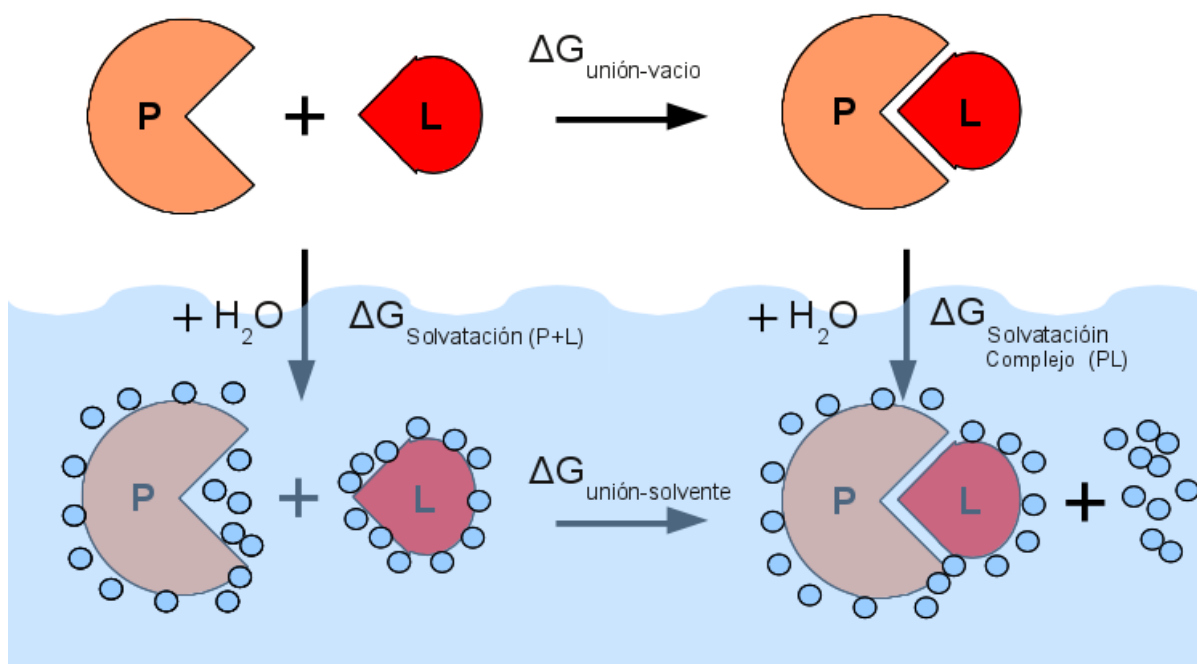


Figura 3: El ciclo termodinámico que emplea el programa Autodock para realizar las estimaciones de los ΔG de unión proteína (P) - Ligando (L)

hidrógeno.³⁷

De acuerdo con la ley de Hess, el cambio de energía libre entre dos estados será la misma, sin importar el camino. De esta forma, se puede seguir el ciclo termodinámico mostrado en la Figura 3 y calcular la energía libre de unión en el disolvente mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{unión}^{solvente} = \Delta G_{unión}^{vacío} + \Delta G_{Solvatación Complejo (PL)} - \Delta G_{Solvatación (P+L)} \quad (2.63)$$

Esta ecuación se puede escribir de una forma más conveniente y relacionada a lo que es una función de evaluación.³⁴

$$\begin{aligned} \Delta G_{unión}^{solvente} = & W_{vdw} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{puente H} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) \\ & + W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{tor} N_{tor} + W_{desolv} \sum_{i_c, j} (S_i V_j) e^{-r_{ij}^2 / 2\sigma^2} \end{aligned} \quad (2.64)$$

donde i , es el átomo del ligando y j el átomo del receptor. Los cinco factores W son coeficientes empíricos determinados mediante un análisis de regresión lineal utilizando un

2. Modelos y Métodos

conjunto de energías de unión de complejos proteína-ligando experimentales. Los subíndices de estos coeficientes son: *vdw* (interacción de van der Waals), *punte H* (puente de hidrógeno), *elec* (interacción electrostática), *tor* (modela la restricción a los grados de libertad de diedros, rotacionales y de translación debidos a la unión) y *desolv* (modela la desolvatación y el efecto hidrofóbico debido a la unión). Las restantes variables de la ecuación 2.64 son: r_{ij} (distancia entre el átomo i y j), $E(t)$ (función peso basada en el ángulo t del puente hidrógeno), $\varepsilon(r_{ij})$ (función dieléctrica dependiente de la distancia)³⁸, N_{tor} (número de enlaces simples que pueden rotar), S_i (parámetro de solvatación para el átomo i , siendo éstos sólo los carbonos apolares del ligando, i_c), V_j (volumen parcial para el átomo j) y σ (constante de distancia gaussiana, cuyo valor es 3,5Å).³⁴ Los parámetros dentro de cada sumatoria son obtenidos a partir de parámetros del campo de fuerza AMBER (ver próxima sección).

La función de evaluación de *Autodock* fue parametrizada ajustando los valores de W_i (siendo i , *vdw*, *punte H*, *elec*, *tor* o *desolv*) de la ecuación 2.64 a través de la correlación lineal con los ΔG_{obs} a partir de las constantes de inhibición (K_i) de una gran cantidad de complejos proteína-inhibidor según la ecuación:

$$\Delta G_{unión}^{solvente} = \Delta H_{unión}^{solvente} - T \Delta S_{unión}^{solvente} = RT \ln(K_i) \quad (2.65)$$

El valor de $\Delta G_{unión}^{solvente}$ (unión del inhibidor de la enzima en solución), se obtiene a través del cálculo de $\Delta G_{unión}^{vacío}$, que se obtiene de la simulación de *docking*, y estimando el cambio de energía libre de solvatación de las moléculas separadas, **P** y **L**, y para el complejo, **PL** (términos $\Delta G_{solvatación (P+L)}$ y $\Delta G_{solvatación Complejo (PL)}$, respectivamente; ver ecuación 2.63). Por lo tanto, a partir de la energía libre de unión en solución, se puede estimar la constante de inhibición K_i para el ligando, **L**, a partir de la ecuación 2.65.³⁷

Para predecir la conformación y orientación de un ligando en un sitio de unión de la proteína, y con ello su actividad biológica, el *Autodock* realiza una búsqueda conformacional y evalúa las funciones de evaluación de cada complejo proteína-ligando que encuentra. La búsqueda conformacional se realiza manteniendo la proteína fija y variando posición, orientación y ángulos diedros del ligando. Entonces la cantidad de las posibles conformaciones de un ligando que pueden generarse debidas sólo a la rotación de los diedros es igual a:

2. Modelos y Métodos

$$\text{Número de conformaciones} = \prod_{i=1}^N \frac{360}{\theta_i} \quad (2.66)$$

donde θ_i es el incremento (en grados) del ángulo de la torsión para el enlace i . El número de conformaciones crece en un modo excepcional con el número de enlaces que pueden rotar (enlaces simples). Por ejemplo, si hay cinco enlaces simples con un incremento de 30° , para cada enlace, entonces se generarían 248.832 estructuras. Si el número de enlaces simples se incrementa a siete, entonces las estructuras generadas incrementarían a casi 36 millones.^{24,31} Si se quisiera realizar una búsqueda conformacional sistemática para explorar el espacio conformacional y encontrar la conformación que mejor se ajuste con la proteína, el primer ejemplo llevaría 69 horas, y el segundo ejemplo 415 días de cálculo. Entonces, ya que una búsqueda sistemática resulta inviable para la mayoría de los casos, hay que pensar en otras alternativas. Debido a este inconveniente, existen distintos algoritmos de búsqueda conformacional implementados en el programa *Autodock*, ellos son: *simulated annealing* (**SA**), algoritmo genético (**AG**), búsqueda local (**BL**) y algoritmo genético lamarkiano (**AG lamarkiano**). Sólo se comenta este último debido a que en el transcurso de esta tesis se utilizó el **AG lamarkiano**.

2.11.4. Algoritmo Genético Lamarkiano

El algoritmo genético lamarkiano es un método que combina otros dos: el algoritmo genético con el de búsqueda local adaptativa. El AG lamarkiano mejora el rendimiento en comparación con **SA** y **AG**.³⁴

Los algoritmos genéticos (**AG**) son una clase de métodos basados en evolución biológica y se plantearon con el fin de encontrar las soluciones óptimas a los problemas.³⁹ El primer paso es crear una “población” de posibles soluciones. Esta población inicial, correspondería a un conjunto de conformaciones de la molécula creadas al azar. Cada miembro de la población está codificado por un “cromosoma”, que está guardado en una secuencia lineal de bits (es decir, ceros y unos). El cromosoma codifica los valores de torsión, posición y orientación. El código binario que codifica a cada torsión, traslación o rotación, se denomina “gen” (Figura 4). La población inicial se obtiene fácilmente a través de una configuración aleatoria de los ceros y unos del cromosoma. La creación de la población inicial es seguida de ciclos sobre

2. Modelos y Métodos

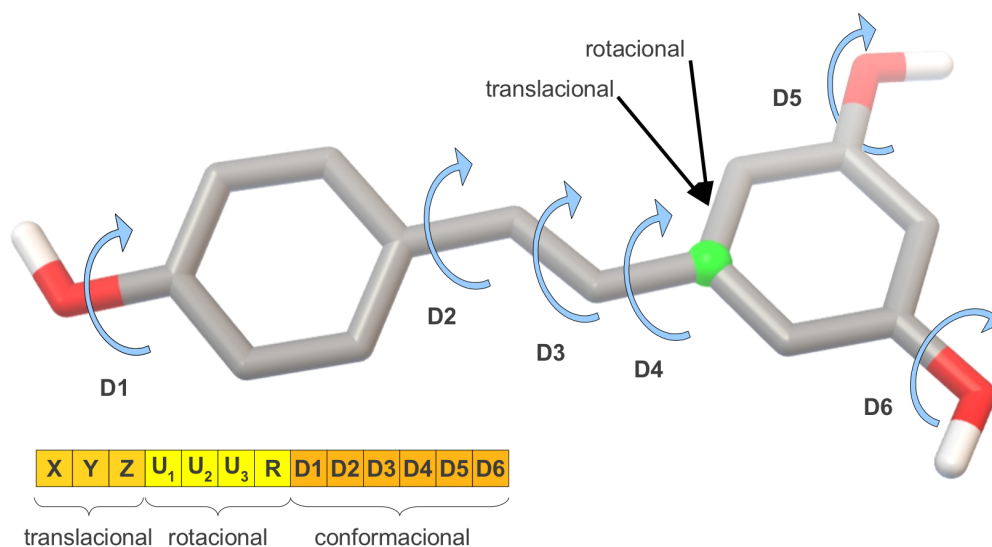


Figura 4: El cromosoma que contiene cada una de las torsiones de la molécula, la rotación (definida como cuaternión) y la translación. Cada torsión, translación o rotación es un gen. La translación y la rotación se definen a partir de centro de rotación (punto en verde) que puede o no coincidir con el centro masas.

generaciones, que se repiten hasta que se alcance el máximo número de generaciones o de evaluaciones de energía, lo que ocurra primero. Cada generación consiste de cinco etapas: 1) transducción y evaluación de la función aptitud, 2) selección 3) entrecruzamiento 4) mutación y 5) selección elitista. En el **AG** lamarkiano, cada generación es seguida de una búsqueda local, que se realiza sobre una fracción predeterminada de la población. Cada uno de estos cinco pasos consisten en :

1. La **transducción** decodifica el cromosoma de cada miembro de la población y le asigna los valores de diedros, rotación y traslación. Luego, la función aptitud de cada miembro es evaluada. Esta función es la suma de las energías de interacción intermolecular proteína-ligando e intramolecular del ligando.
2. La **selección** establece (a través de una ecuación, ref. 34) cuáles son los individuos que pueden reproducirse, teniendo mayor probabilidad aquellos cuya aptitud es mayor que la promedio.
3. El **entrecruzamiento** primero selecciona al azar un porcentaje pre-establecido de individuos y luego selecciona aleatoriamente una posición i ($1 \leq i \leq l-1$, donde l es la longitud cromosoma) en el cromosoma para realizar el entrecruzamiento. Dos nuevos cromosomas son creados mediante el intercambio de bits entre la posición $i+1$ y l . Por ejemplo, supongamos los dos cromosomas siguientes:

2. Modelos y Métodos

▼
0 0 1 0 0 0 1 1 1 1 0 0 0 1
1 1 0 0 0 0 1 1 0 0 1 1 0 0
▲

Los triángulos indican el punto de entrecruzamiento. Entonces los nuevos cromosomas son:

▼
0 0 1 0 0 0 1 1 0 0 1 1 0 0
1 1 0 0 0 0 1 1 1 1 0 0 0 1
▲

En este caso la descendencia reemplaza a los progenitores.

4. En la **mutación** se selecciona aleatoriamente un bit del cromosoma y lo cambia de cero a uno o viceversa. La mutación usualmente tiene baja probabilidad de ser aplicada. En este caso, también el hijo reemplaza al padre.
5. Luego, de los pasos de selección, entrecruzamiento y mutación, se establece un orden de los individuos de la población de acuerdo a su función aptitud. A partir de este orden, la **selección elitista** determina cuáles sobreviven en la siguiente generación. La cantidad de sobrevivientes está predeterminada.

Los algoritmos genéticos fueron originalmente propuestos como una técnica para llevar a cabo búsquedas conformacionales y encontrar mínimos globales. Aunque en el análisis conformacional de moléculas complejas el objetivo es tener un método efectivo para generar un número muy grande de buenas soluciones (estructuras de baja energía).^{24,34,40,41}

En la búsqueda **AG** lamarkiana, la aptitud asociada con un individuo en el algoritmo de selección **AG** se actualiza siempre utilizando la búsqueda local, la cual se efectúa sólo sobre los diedros. Además, en cada generación se puede realizar búsqueda local sobre una fracción de la población, la cual está previamente determinada.

En el caso del programa *Autodock* el método de búsqueda local está basado en el de Solis y Wets,⁴² el cual tiene la gran ventaja de no requerir la información de gradientes del entorno local de energía, facilitando así la búsqueda en el espacio de los diedros. Asimismo, este método es adaptativo, ajustando el tamaño del paso de búsqueda dependiendo de las energías que encuentra en iteraciones previas.³⁴

Al finalizar una serie de simulaciones de **AG** lamarkiano se tienen una colección de los

2. Modelos y Métodos

mejores individuos de cada simulación (o sea conformaciones del ligando en el sitio). Para analizar estos conjuntos de resultados estas conformaciones son agrupadas siguiendo criterios de similitud conformacional del ligando en el sitio, que se pueden obtener a partir del cálculo de la desviación de la geometría obtenida respecto de una de referencia (la de más baja energía, la primera obtenida, una estructura cristalográfica con el ligando co-cristalizado con la proteína o cualquier otra referencia conveniente). Para cuantificar dicha desviación puede utilizarse la desviación cuadrática media (definida en la sección 2.12.6.). Este tipo de agrupación se denomina análisis de *cluster* y resulta útil para distinguir entre estructuras que tienen conformaciones substancialmente diferentes en un mismo sitio o entre aquellas que van a sitios diferentes que pueden estar relativamente próximos.

2.11.5. Mapas de Grilla

Una forma simple y rápida de resolver las interacciones entre cada conformero y la enzima es utilizar una grilla que rodea al sitio de unión (de interés) de la enzima o incluso toda la enzima (Figura 5). Por cada tipo de átomo del ligando se construye una grilla, calculando en cada punto de ella la energía de interacción culómbica y de van der Waals entre este tipo de átomo del ligando y los tipos de átomos de la proteína. Estos datos son almacenados y, luego, computada la energía de interacción entre la proteína y ligando en una conformación particular, asignando cada átomo al punto de la grilla más cercano (o interpolando, lo cual es computacionalmente costoso), y el valor de energía correspondiente para este tipo de átomo en ese punto. La disminución del espaciamiento entre los puntos de la grilla aumenta la precisión en el cálculo de la energía, como también su costo.^{1,27,37}

La grilla tiene en cuenta sólo los términos de la ecuación 2.64 que involucran la interacción del ligando con la proteína (puente de hidrógeno, culómbica y de van der Waals). Aunque, en *Autodock*, los términos de solvatación también son pre-calculados para el ligando partir de la grilla.³⁴ En el caso de 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 pre-calculados.

2. Modelos y Métodos

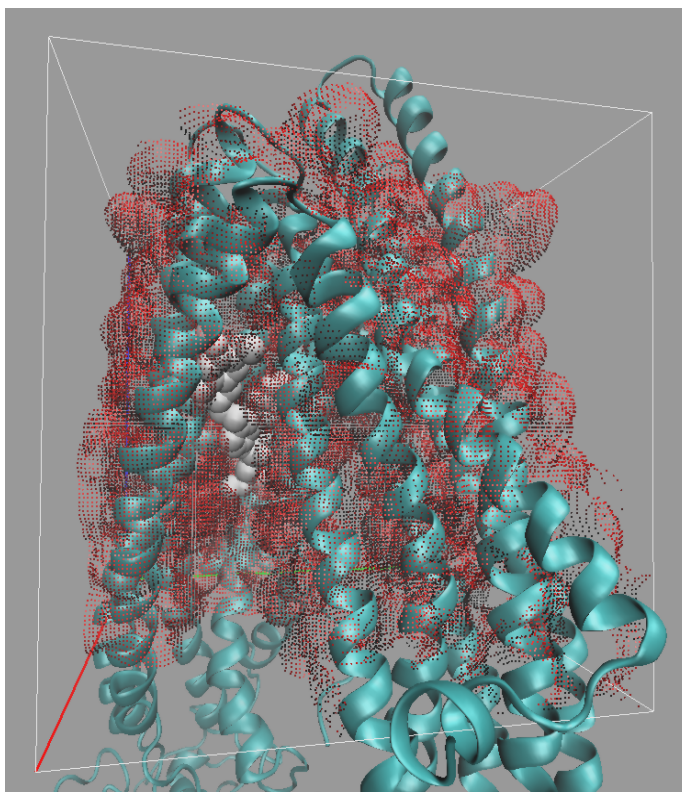


Figura 5: Mapa de grilla para el carbono alifático del ligando (puntos en rojo). La proteína está representada en cintas verdes y el ligando dockeado por esferas blancas que representan a sus radios de Van der Waals. Se puede ver el tamaño total de la caja de la grilla en las líneas blancas.

2.12. Dinámica Molecular

La Dinámica Molecular es una simulación computacional en donde se determinan los movimientos de las partículas de cualquier sistema, conociendo el potencial de interacción entre las partículas del sistema y las ecuaciones que rigen su movimiento. Siendo las interacciones entre las partículas descritas generalmente por un campo de fuerza.

Por lo tanto, la Dinámica Molecular permite estudiar la evolución temporal de las configuraciones del sistema y, con ellas, determinar las propiedades macroscópicas conforme a los principios de la Mecánica Estadística.

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 de la capacidad computacional disponible, pero sobre todo, debe ser representativo del sistema macroscópico real. En la actualidad, es posible estudiar sistemas que poseen hasta 10^6 átomos. Las propiedades de equilibrio del sistema de estudio son determinadas a partir de los promedios temporales sobre

2. Modelos y Métodos

un intervalo de tiempo suficientemente grande en la escala atómica, aproximadamente entre 10^{-11} a 10^{-8} segundos de tiempo real. 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 largas para poder converger.

Una característica importante del método de Dinámica Molecular es que se establece una fuerte sinergia con los estudios experimentales. Los resultados de las investigaciones experimentales, generalmente, motivan y guían los estudios de Dinámica Molecular. A su vez, los resultados obtenidos mediante Dinámica Molecular proporcionan explicaciones detalladas a nivel atómico de las observaciones experimentales. Otra característica importante es la gran diversidad de sistemas que puede ser estudiados mediante esta metodología, que van desde sistemas homogéneos como gases, fluidos supercríticos, líquidos, soluciones y mezclas, hasta sistemas poco homogéneos como interfaces, biomembranas, polímeros orgánicos e inorgánicos, polisacáridos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y sus complejos, y también sistemas como zeolitas, sólidos cristalinos y vítreos, y nanomateriales, entre otros.

Existen distintos campos de fuerza aplicados a la Dinámica Molecular, 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, viene como un paquete de programas, incluyen un integrador de las ecuaciones de movimiento, y herramientas de análisis.

2.12.1. 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 limite con el vacío. Esta condición, si bien en general inapropiada, puede ser parcialmente aceptable para moléculas aisladas pero no resulta apropiada en absoluto para simular líquidos, soluciones o sólidos, a no ser que se esté particularmente interesado en simular la interfaz sistema-vacío.

La simulación del sistema inmerso en el vacío produce efectos generalmente indeseados.

2. Modelos y Métodos

Si se trata de una molécula única, aquellos átomos en contacto con el vacío estarán afectados por fuerzas diferentes a las que existen en un sistema con las condiciones de borde reales produciendo una distorsión de la superficie. Para macromoléculas esto significa que la conformación superficial estará deformada; para moléculas chicas la conformación de toda la molécula puede verse afectada. Para un fluido —gas o líquido— la simulación en vacío es altamente artificial y probablemente el sistema comenzará a vaporizarse lentamente. Es claro que podemos tratar de evitar, al menos en parte, estos efectos indeseados introduciendo ciertas particularidades en el campo de fuerzas. En términos generales, ya sean moléculas en solución como sólidos, el sistema estará inmerso en un fluido, sea un solvente o un gas.

Ninguno de los problemas mencionados existiría para un sistema lo suficientemente grande. Pese al enorme desarrollo de los equipos de computación es evidente que el número de partículas que se pueden manejar es pequeño respecto de cualquier sistema real. En una muestra macroscópica, cuyo número de partículas es del orden de 10^{24} , la mayoría de las moléculas están en el “interior” de la muestra. No ocurre lo mismo en una muestra de tamaño reducido. Por ejemplo, un sistema de alrededor de 1000 partículas; suponiendo una distribución regular en un cubo, 522 de ellas estarán en la superficie. Una solución consiste en utilizar condiciones periódicas de contorno.

El establecer condiciones periódicas de contorno significa que el sistema está determinado por una celda unidad de determinadas dimensiones que se repite periódicamente en el espacio. Tanto la celda unidad como sus imágenes son consideradas para el cálculo. Podemos ver en la Figura 6 el caso bidimensional (por simplicidad en el dibujo) dado por un rectángulo y sus imágenes. Para situaciones más realistas, de tres dimensiones, se toma un paralelepípedo (por ejemplo, un cubo) y sus 26 imágenes.

En la Figura 6 se observa que cada partícula está rodeada por otras, es decir que no hay partículas en la superficie —no hay superficie—. 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 una dada, la “real” y su imagen (en la Figura 6 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. El radio de corte no puede ser muy corto, puesto que produciría una situación muy artificial, ni debe superar la mitad de la caja ($R_c \leq$

2. Modelos y Métodos

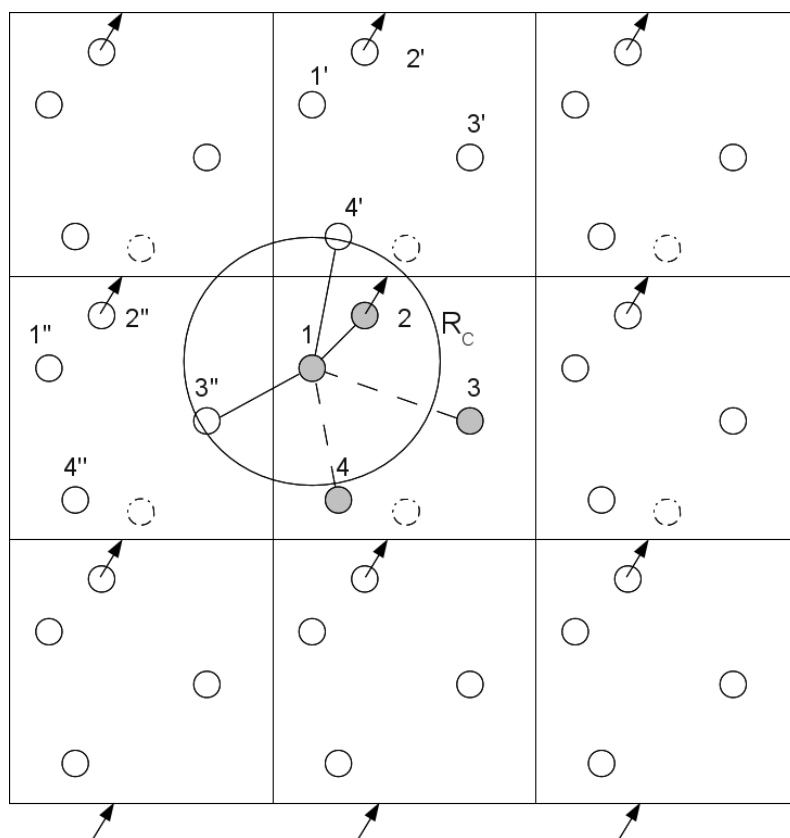


Figura 6: Condiciones periódicas de contorno para sistema de dos dimensiones. "n'" indica la imagen de partículas.

$L/2$, donde L es la longitud de la arista menor) puesto que no lograría el efecto buscado. En la Figura 6 vemos que la partícula 1 interactúa con las 2, 3" y 4', los cuales están dentro de R_c . Resumiendo, cada partícula interactúa con las otras o sus imágenes según cual de ellas se encuentra más próxima. Otra ventaja es que, al no existir superficie, ninguna de las partículas puede abandonar la caja. Si alguna, en su trayectoria, abandona la caja, una de sus imágenes ingresa por el lado opuesto. De ésta manera se mantiene constante el número de partículas que estamos simulando.^{1,24,25,27}

2.12.2. Algoritmo General de una Dinámica Molecular

2.12.2.1. Condiciones Iniciales

En la Dinámica Molecular, el sistema parte de una configuración inicial, y su evolución es dirigida por los potenciales intermoleculares de las partículas interactuantes. Conociendo las posiciones y velocidades iniciales (tiempo t_0) de todas las partículas, el sistema entra en

2. Modelos y Métodos

movimiento, luego se computan las fuerzas que se aplican sobre cada partícula debidas a sus interacciones con las demás (y/o interacción con campos externos), y así se determinan las posiciones y velocidades en instantes de tiempo posterior, $t_0+\delta t$, a través de las ecuaciones de movimiento de Newton para un sistema de N partículas:

$$\mathbf{F}_i = m_i \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2} = m_i \mathbf{a}_i, i=1, \dots, N \quad (2.67)$$

$$\mathbf{F}_i = \sum_j \mathbf{F}_{ij} = -\frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (2.68)$$

donde \mathbf{F} y \mathbf{r} representan a los vectores fuerza y posición, respectivamente, t al tiempo y V al energía potencial expresada en las ecuaciones 2.61 y 2.62.

Las nuevas posiciones y velocidades son utilizadas para obtener las nuevas fuerzas y, de ellas, las nuevas posiciones en $t_0+2\delta t$. Este procedimiento es realizado sucesivamente, generando trayectorias moleculares para todo el sistema.

Las posiciones y velocidades iniciales de todos los átomos del sistema deben ser especificadas para que las ecuaciones de movimiento puedan ser resueltas, ya que son de segundo orden. Las posiciones iniciales pueden ser obtenidas a partir de datos experimentales (por ejemplo rayos X o resonancia magnética nuclear), de modelos teóricos (modelado por homología) o de una combinación de los dos. Las velocidades iniciales pueden ser establecidas mediante diversas maneras, pero una de las más empleadas es asignar aleatoriamente velocidades a cada átomo usando una distribución de Maxwell-Boltzmann para una temperatura de interés:

$$\frac{3}{2} N k_B T = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2 \quad (2.69)$$

en donde N es el número de partículas, k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura, y m_i y v_i la masa y velocidad del átomo i , respectivamente.

También se pueden atribuir velocidades iniciales nulas a todos los átomos y dejar que el sistema evolucione a partir del reposo. Sea cual fuere la elección de las velocidades iniciales,

2. Modelos y Métodos

es importante que la suma de las velocidades sobre todas las partículas del sistema sea un vector nulo, evitando el desplazamiento de la caja como un todo.^{1,24,25,27}

2.12.2.2. Integración de las Ecuaciones

Los sistemas de interés involucran muchas partículas, volviéndose así un problema de muchos cuerpos, cuyas ecuaciones analíticas de movimiento no pueden ser resueltas analíticamente. Debido a esta circunstancia, dichas ecuaciones deben ser integradas usando algún método de diferenciación finita a partir de potenciales continuos, que sólo involucran interacción de a pares.²⁴ 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 ella, ecuación 2.68. A partir de la fuerza, se puede conocer la aceleración de las partículas (ecuación 2.67), 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 Dinámica Molecular. Todos los algoritmos asumen que las posiciones, velocidades y aceleraciones pueden ser aproximadas mediante expansiones en series de Taylor:^{1,24,27}

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \frac{d\mathbf{r}(t)}{dt} \delta t + \frac{2}{2!} \frac{d^2\mathbf{r}(t)}{dt^2} (\delta t)^2 + \frac{1}{3!} \frac{d^3\mathbf{r}(t)}{dt^3} (\delta t)^3 + \mathcal{O}(\delta t^4) \quad (2.70)$$

2.12.2.2.1. Algoritmo de Verlet

En el método de Verlet, se considera la suma de la expansión de Taylor correspondiente a los pasos de integración hacia adelante y hacia atrás, $t + \delta t$ y $t - \delta t$, respectivamente. En la sumatoria todas las derivadas de orden impar desaparecen, ya que tienen signo opuesto en las

2. Modelos y Métodos

expansiones de Taylor. Reordenando la ecuación y despreciando los términos de cuarto orden o mayores se encuentra la siguiente expresión:

$$\begin{aligned}
 r(t+\delta t) &= r(t) + \frac{dr(t)}{dt}\delta t + \frac{1}{2!}\frac{d^2r(t)}{dt^2}(\delta t)^2 + \frac{1}{3!}\frac{d^3r(t)}{dt^3}(\delta t)^3 + \mathcal{O}(\delta t^4) \\
 &+ \\
 r(t-\delta t) &= r(t) - \frac{dr(t)}{dt}\delta t + \frac{1}{2!}\frac{d^2r(t)}{dt^2}(\delta t)^2 - \frac{1}{3!}\frac{d^3r(t)}{dt^3}(\delta t)^3 + \mathcal{O}(\delta t^4) \\
 \hline
 r_i(t+\delta t) &\approx -r_i(t-\delta t) + 2r_i(t) + \frac{d^2r(t)}{dt^2}(\delta t)^2 \\
 &\approx -r_i(t-\delta t) + 2r_i(t) + a(t)
 \end{aligned} \tag{2.71}$$

Sin embargo, la velocidad no aparece en forma explícita en las ecuaciones de Verlet, ésta necesita ser conocida para calcular la energía cinética. La velocidad puede ser estimada si de la ecuación 2.71 se realiza una resta en lugar de una suma, obteniendo así:

$$\frac{dr(t)}{dt} = v(t) \approx \frac{r(t+\delta t) - r(t-\delta t)}{2\delta t} \tag{2.72}$$

Un inconveniente importante del algoritmo de Verlet es la posible pérdida en la precisión debido a que, para obtener las posiciones en un $t+\delta t$, se añade un término de magnitud pequeña ($(\delta t)^2 a(t)$) a la diferencia de dos términos de magnitud mucho más grande. 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 (ver ecuación 2.72). Sumado a estos inconvenientes, quizás el más importante, es que al realizar el primer paso de integración ($t=0$) no se conocen las posiciones del paso de integración previo ($t-\delta t$). Una forma de obtenerlas ($r(t-\delta t)$) es usando una serie de Taylor (ecuación 2.70). En ella se desprecian los términos a partir del segundo orden,^{1,24,27} entonces:

$$r(t-\delta t) = r(0) - v(t)\delta t + \frac{1}{2}a(t)(\delta t)^2 \tag{2.73}$$

2.12.2.2.2. Otros algoritmos de integración

Un método muy utilizado es el salto de rana (*leap-frog*), el cual es una variante de Verlet,

2. Modelos y Métodos

pero con mayor precisión, debido a que la velocidad es calculada explícitamente. Las velocidades son calculadas en un intervalo de tiempo $\delta t/2$.

El nombre salto de rana, se debe a que las velocidades y posiciones van desfasadas en el tiempo a medida que el cálculo avanza. El método de salto de rana tiene dos ventajas principales sobre Verlet: 1) calcula las velocidades en forma explícita 2) no requiere el cálculo de diferencias entre números de magnitudes grandes. Sin embargo, su principal desventaja, es que, al estar desincronizadas las velocidades y las posiciones, las energías cinética y potencial no pueden ser calculadas al mismo tiempo.^{1,24,27}

Otro método es Verlet-velocidad, el cual es una mejora sobre el algoritmo de Verlet. Este método también requiere que el cálculo de velocidad se realice en un paso de integración intermedio, $\delta t/2$.

En el algoritmo de Verlet-velocidad se calculan las posiciones y velocidades en el tiempo $(t+\delta t)$ de la siguiente forma:

$$\mathbf{r}(t+\delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\delta t) \quad (2.74)$$

$$\mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\delta t) = \mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\delta t) + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t + \delta t)\delta t \quad (2.75)$$

Este método permite que se use menor cantidad de memoria porque sólo un conjunto de posiciones, velocidades y fuerzas necesita ser calculado en cada paso de integración.^{1,24,27}

2.12.3. Dinámica Molecular con restricciones

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 como la fuerza se asume constante durante el paso de integración, si éste es muy grande 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

2. Modelos y Métodos

“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 se permiten variar de acuerdo a su propia dinámica. El algoritmo más utilizado para este fin es SHAKE,⁴³ que permite incrementar el paso de integración de hasta 2fs.^{1,24,25,27}

2.12.4. Control de presión y temperatura

En esta tesis se realizó el estudio de los sistemas dentro de un ensamble canónico (NVT o NPT). En estos ensambles se mantiene constante el número de N partículas de sistema, la temperatura T y la presión P ó el volumen V .

En Dinámica Molecular, a medida que la simulación avanza, el sistema encuentra 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 convierten consecuentemente en energía cinética, aumentando la temperatura del sistema. Existen varios métodos para enfriar el sistema, todos ellos acoplan un baño térmico al sistema. Entre estos métodos, se encuentra el Termostato de Berendsen,⁴⁴ 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 pasos de integración. Este método utiliza un tiempo de decaimiento τ (en unidades de tiempo) 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 elaborados, permiten intercambios estocásticos de calor entre los grados de libertad del sistema y del baño térmico. Entre ellos los referentes son el termostato de Nosé-Hoover y de Langevin.^{1,25,24,27,45,46}

La simulación en un ensamble NTP mantiene 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” análogo al baño de temperatura, que modifica las dimensiones de la caja cada una cantidad de pasos. Al igual que en el baño térmico, existe una constante de acoplamiento τ_P , y además otra que tiene en cuenta en las ecuaciones la compresibilidad del sistema, κ (que en sistemas

2. Modelos y Métodos

bioorgánicos es usualmente la compresibilidad del agua). Ésta mide la magnitud de la fluctuación de volumen. Este método de regulación de la presión se conoce como barostato de Berendsen.⁴⁴ Otro barostato usado en esta tesis es el pistón de Langevin usando el método de Nosé-Hoover, el cual es estocástico.^{46,47} 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, dos sólo 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.⁴⁸

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

La cantidad de términos covalentes (enlaces, ángulos y diedros) a 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 la teoría de Dinámica Molecular, 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 debido a que, por ejemplo, las interacciones de van der Waals decaen muy rápido con la distancia. Una solución a este inconveniente es cortar la interacción a una distancia donde la misma sea despreciable. Sin embargo, para las interacciones electrostáticas, no es el caso, porque son interacciones de muy largo alcance, incluso involucrando interacciones con átomos en las celdas 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.^{24,25,27}

2.12.6. Análisis de una Dinámica Molecular

Por lo general, una Dinámica Molecular está conformada por una etapa de preparación, que involucra, entre otras cosas, un relajamiento del sistema a partir de optimizaciones; en el caso de proteínas protonación de sus residuos.^{iv} A esta etapa le sigue la de equilibración del

iv Los experimentos de difracción de rayos X sólo resuelven la posiciones de los átomos pesados.

2. Modelos y Métodos

sistema, en la cual el sistema llega al equilibrio, 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 caso de los líquidos o un soluto pequeño en un solvente, se puede observar la variación de su densidad en función del tiempo, la función de distribución radial ($g(r)$) que da cuenta del orden estructural del líquido. Esta función da cuenta de la densidad de una partícula B en una capa de solvatación de espesor dr , a una distancia r de una partícula A (donde A y B puede ser de la misma especie) respecto a la densidad de B promedio en todo el medio. Así en el caso de un líquido observando $g(r)$ a distintos tiempos se puede observar cuando este se aproxima al experimental. Por otro lado, el análisis de $g(r)$ muestra a qué distancia se encuentran las distintas capas de solvatación.

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

$$RMSD(t) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [r_i(t) - r_0]^2}{N}} \quad (2.76)$$

donde r_i es la coordenada del átomo i en el tiempo t , 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 (*backbone*^v de la proteína por ejemplo) convergió. Además el **RMSD** sirve para determinar, en el tiempo, cambios conformacionales de la macromolécula, dentro de la etapa de producción.²⁷

El factor B es otro parámetro de análisis relacionado con **RMSD**,²⁷ y da cuenta de la movilidad atómica, la cual se puede comparar con la observada en rayos X. También puede ser útil para saber cómo la unión de un ligando a la proteína afecta la movilidad de ésta.

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

2. Modelos y Métodos

También útil resulta, el análisis de la formación y ruptura de puentes de hidrógeno en función del tiempo. De esta forma, a través de su persistencia en el tiempo, se puede inferir qué puentes de hidrógeno son relevantes en una estructura proteica o para la unión de algún ligando y cuales son los aminoácidos (o residuos) involucrados.

En el capítulo 5, se estudia el violeta de metileno, se realizó un análisis de la función de la autocorrelación de la energía potencial (ACF).

$$C(t) = \langle E(t_0) E(t_0 + t) \rangle_{t_0} \quad (2.77)$$

En Dinámica Molecular, la configuración entre un paso de integración y el siguiente no varía significativamente, es decir están correlacionados. La correlación puede durar varios pasos de integración. Para conocer el tiempo τ en el que la correlación se pierde se utiliza ACF, cuya integral en el tiempo es τ . Este procedimiento sirve para líquidos moleculares y un soluto en dichos líquidos.⁴⁹

2.13. *Energía Libre de Unión - SIETRAJ*

En el estudio de unión de ligandos a proteínas, el *docking* sirve para predecir la estructura de algún complejo de unión, pero estima muy crudamente su energía libre. Otro planteo que aproxima mejor la predicción, es la utilización de Dinámica Molecular del complejo proteína-ligando, la cual, tiene en cuenta toda la descripción dinámica de la interacción. Sin embargo, cuando se desconoce el complejo proteína-ligando en forma experimental, muchas veces se parte de aquel encontrado mediante *docking*.

El programa de SIETRAJ,⁵⁰ presenta una función de energía libre que consiste en términos utilizados en el campo de fuerza AMBER, los cuales se complementan con términos de solvatación. En este método, se utilizan las conformaciones de la proteína y de ligando, y el solvente se simula a través de una solución aproximada de la ecuación de Poisson.⁵¹ Este programa utiliza el formalismo de energía de interacción solvatada (*solvated interaction energy-SIE*) para aproximar la energía libre de unión proteína-ligando:

2. Modelos y Métodos

$$\Delta G_{unión}^{calc} = \underbrace{E_{inter}^C + \Delta G_{unión}^R}_{\Delta G_{unión}^{elec}} + \underbrace{E_{inter}^{vdw} + \Delta G_{unión}^{solnp}}_{\Delta G_{unión}^{np}} \quad (2.78)$$

Esta ecuación puede ser dividida en dos grupos, uno que se refiere a la contribución electrostática a la unión, $\Delta G_{unión}^{elec}$, y otro que alude a una parte no polar, $\Delta G_{unión}^{np}$. En el primer grupo se encuentran la energía de interacción electrostática intermolecular, E_{inter}^C , y el cambio en el campo de reacción entre los estados libre (separado, inicial) y unido (final), $\Delta G_{unión}^R$. En tanto, al segundo grupo corresponden, la energía de interacción intermolecular de van der Waals, E_{inter}^{vdw} , y el cambio en la energía libre de solvatación no polar entre los estados inicial y final, $\Delta G_{unión}^{solnp}$. Este último término comprende a la energía de van der Waals soluto^{vi}-agua y el costo de cavitación. Este último, puede ser tomado como proporcional al cambio en la superficie de solvente excluido (ΔSA). La energía de van der Waals soluto-agua puede ser incorporada dentro de ΔSA o en un factor de proporcionalidad, γ , del siguiente modo:

$$\Delta G_{unión}^{solnp} = \gamma \Delta SA \quad (2.79)$$

La ecuación 2.78 puede ser expresada en una forma funcional parametrizada.

$$\Delta G_{unión}^{calc}(\rho, D_{in}, \alpha, \gamma, C) = \alpha [E_{inter}^C(D_{in}) + \Delta G_{unión}^R(\rho, D_{in}) + E_{inter}^{vdw} + \gamma \Delta SA(\rho)] + C \quad (2.80)$$

donde ρ es un parámetro de proporcionalidad para los radios atómicos de campo de fuerzas AMBER, D_{in} es la constante dieléctrica interna dentro del formalismo de Poisson y α es un parámetro que reduce la energía potencial y la solvatación a fin tener en cuenta en la ecuación el cambio de entropía configuracional surgido de la unión.

En SIETRAJ, los cinco parámetros del modelo fueron sistemáticamente escudriñados y ajustados, sobre un conjunto de 99 complejos proteína-ligando, para obtener la menor desviación cuadrática media entre las energías libres de unión experimentales y las predichas. El procedimiento se describe en detalle en la ref. 50.

vi Por soluto se entiende tanto la proteína como el ligando.

2.14. *Modelado por Homología*

El modelado por homología o modelo comparativo, es la predicción de la estructura de proteína cuya estructura experimental no se conoce, utilizando como molde la estructura experimental de proteína. Este método se basa en ambas secuencias comparten un grado de homología importante. La aproximación está basada principalmente en dos observaciones:

- La estructura de una proteína es determinada únicamente por su secuencia de aminoácidos.⁵²
- Durante la evolución, los cambios en la estructura proteica tienen una frecuencia menor que los cambios en la secuencia. Entonces, a pesar de que dos proteínas relacionadas poseen secuencias distintas, pueden seguir manteniendo estructuras similares.⁵³

Sobre la base de esto, se puede construir un gráfico que relacione el porcentaje de identidad de secuencia con la longitud de la misma. Éste permite determinar sobre qué región del gráfico es posible la construcción de un modelo por homología a partir de un alineamiento de secuencias y sobre qué región del mismo no es posible.⁵⁴

El modelado por homología es la única manera de obtener información estructural cuando las técnicas experimentales fallan. Esto se debe a que muchas proteínas son demasiado grandes para un análisis de RMN y resultan muy difíciles de cristalizar para su análisis de rayos X, como por ejemplo, las proteínas de transmembrana.⁵⁵

El modelado por homología involucra tres etapas:

1. **Alineamiento de secuencia.** La secuencia de aminoácidos de la proteína cuya estructura se quiere modelar (objetivo) se alinea con otra, de la cual se conoce la estructura experimental (modelo). El alineamiento se lleva a cabo utilizando una matriz de sustitución que da un peso probabilístico a alinear dos pares de aminoácidos de cada secuencia. Por ejemplo, alinear dos aminoácidos similares como una fenilalanina con una tirosina, tendría una probabilidad mayor que si se alinea esa fenilalanina con una lisina. Para este propósito las matrices de sustitución más conocidas son PAM y BLOSUM. El alineamiento secuencial en sí es realizado por programas como ClustalW, BLAST, PSI-BLAST, los cuales también son capaces de buscar en base de datos secuencias homologas a la de interés y establecer un orden de

2. Modelos y Métodos

similitud.

2. **Construcción del modelo.** EL alineamiento entre el objetivo y el molde sirve de entrada para el programa que realiza la construcción del modelo. En el caso de esta tesis, el programa utilizado fue Modeller,⁵⁶ el cual aplica restricciones espaciales obtenidas de dos maneras: 1) a partir del alineamiento y 2) restricciones estereoquímicas obtenidas del campo de fuerza CHARMM-22 y de datos estadísticos obtenido de un conjunto representativo de estructuras proteicas conocidas. Luego, empleando gradiente conjugado y Dinámica Molecular, se optimiza el modelo aplicando restricciones espaciales, que pueden ser de origen experimental.⁵⁷
3. **Evaluación del modelo.** Luego de la construcción del modelo, éste debe ser evaluado a fin de asegurar que las características estructurales del modelo sean consistentes con el sentido físico-químico. Una alternativa, puede ser hecha tanto controlando anomalías en los ángulos ϕ - ψ (gráfico de Ramachandrán), en la longitud de los enlaces, *close contacts*, etc. Otra, es comparar parámetros estadísticos como características espaciales e interacciones energéticas obtenidos de estructuras determinadas experimentalmente con aquellos existentes en el modelo. De esta forma, reconocer que regiones del modelo están plegados correctamente y cuáles no, necesitando ser refinadas. Entre las herramientas virtuales más conocidas se encuentran: Procheck,⁵⁸ ANOLEA,⁵⁹ WHATIF⁶⁰ y Verify3D.^{61,62}

Luego del paso de evaluación es posible encontrar errores estructurales, los cuales pueden ser corregidos volviendo a etapas anteriores del proceso de modelado, según sea necesario.⁵⁷

2.15. *Mecánica Cuántica/Mecánica Clásica (QM/MM)*

Hasta el momento, se han tratado dos modelos que tienen repuestas distintas: Mecánica Molecular y Mecánica Cuántica. El primero sirve para estudiar sistemas de miles de átomos, respondiendo preguntas sobre su comportamiento dinámico e interacciones no enlazantes, mientras que no puede tratar la ruptura, formación de enlaces o transferencia electrónica, es decir, reacciones químicas. En tanto que el segundo, puede ser aplicado al estudio de reacciones químicas, aunque la cantidad posible de átomos a ser estudiada es limitada. Sin embargo, la región del espacio donde ocurren las reacciones químicas es relativamente pequeña en comparación al sistema total de simulación. Así, por ejemplo, una enzima

2. Modelos y Métodos

generalmente posee un pequeño sitio activo donde cataliza la reacción, mientras que el resto de la misma aporta un entorno electrostático y estructural.¹ Otro ejemplo, es estudiar las transiciones electrónicas de un soluto en un solvente explícito; en este caso, el cambio en la estructura electrónica ocurre en el soluto, mientras que el solvente sólo ejerce un efecto perturbativo que altera la estructura electrónica del soluto.

De este modo, es posible estudiar cambios en la estructura electrónica de una región limitada de un sistema empleando la Mecánica Cuántica, mientras que la región circundante con un nivel de cálculo menor (por ejemplo, Mecánica Molecular). Por ejemplo en la Figura 7 se muestra esta división, donde el soluto (violeta de metileno) es tratado cuánticamente (**QM**) y el solvente (metanol) clásicamente (**MM**).

Entonces, el sistema entero es dividido en una región interior **QM** y otra exterior que es tratada en forma **MM**. Debido a las interacciones entre las regiones **QM** y **MM**, la energía total del sistema no puede ser aproximada como la suma de las partes. Los términos de acoplamiento deben ser considerados, y el límite de separación entre ellos debe ser elegido

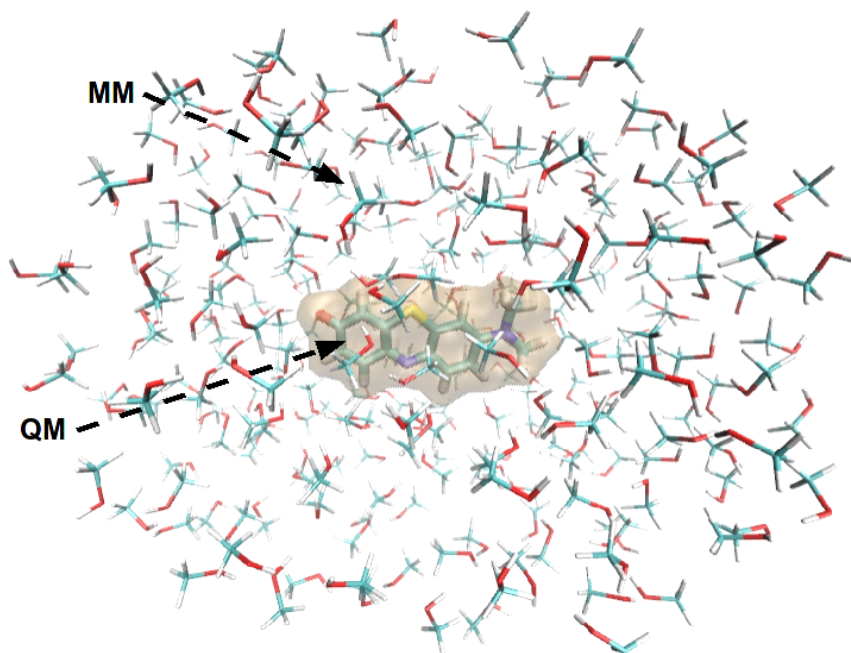


Figura 7: Sistema **QM/MM**, donde la densidad electrónica del soluto (**QM**) se observa en ocre, y el resto de las moléculas (**MM**) en licorice.

cuidadosamente, en especial cuando estos pasan por un enlace covalente.⁶³

En **QM/MM** existen dos esquemas o planeamientos de la expresión de la energía del sistema, el esquema *aditivo* y el *sustractivo*.

2. Modelos y Métodos

$$E_{QM/MM}^{aditivo}(\mathbf{S}) = E_{MM}(\mathbf{O}) + E_{QM}(\mathbf{I}) + E_{QM-MM}(\mathbf{I}, \mathbf{O}) \quad (2.81)$$

$$E_{QM/MM}^{sustractivo}(\mathbf{S}) = E_{MM}(\mathbf{S}) + E_{QM}(\mathbf{I}) - E_{MM}(\mathbf{I}) \quad (2.82)$$

donde \mathbf{S} es el sistema, \mathbf{I} es la región interior y \mathbf{O} es la región exterior. En esta tesis, se usó el esquema *sustractivo* ONIOM basado en los trabajos del grupo del Prof. Morokuma para estudiar las transiciones electrónicas del violeta de metileno en metanol como solvente explícito.⁶⁴

La principal ventaja de este esquema es que se pueden combinar diferentes niveles de **QM** (regiones cuánticas más precisas y costosas cerca de la zona de interés y menos precisas y computacionalmente económicas en zonas menos interesantes) además de combinar la parte clásica. La principal desventaja es el hecho de que la energía así obtenida está afectada por el error proveniente de las limitaciones de los modelos clásicos ya que estos modelos también tratan la zona de interés; por ejemplo, en condiciones de ruptura/formación de enlaces,.

2. Modelos y Métodos

- 1 Cramer, C. J. *Essential of Computational Chemistry. Theories and Models*. 1st edition. John Wiley & Sons, Ltd. Baffins Lane, Chichester, West Sussex PO19 1UD, England. **2002**.
- 2 Koch, W. and Holthausen, M. C. *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*. 2nd edition. WILEY-VCH Verlag GmbH, D-69469 Weinheim, Federal Republic of Germany. **2001**.
- 3 Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry*. 2nd edition. John Wiley & Sons Ltd. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England. **2007**.
- 4 Parr, R. G. and Yang, W. *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*. 1st edition. Oxford University Press, Inc., 200 Avenue, New York, New York 10016. **1989**.
- 5 Levine, I. N. *Quantum Chemistry*. 5th edition. Prentice-Hall. Upper Saddle River, New Jersey 07458, USA. **2000**.
- 6 Beltrán, J. y Andrés J. *Química Teórica y Computacional*. 1era edición. Universitat Jaume I, Edifici de Rectorat i Serveis Centrals. Campus del Riu Sec. 12071 - Castelló de la Plana. **2000**.
- 7 Szabo, A. and Ostlund, N. S. *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. 1st edition, revised. Dover Publications, Inc. Mineola, New York, USA. **1996**.
- 8 Cook, M., and Karplus, M. (1987) Electron correlation and density-functional methods, *Journal of Physical Chemistry* *91*, 31–37.
- 9 Oliphant N., and Bartlett. R. J. (1994) A systematic comparison of molecular properties obtained using Hartree–Fock, a hybrid Hartree–Fock density-functional-theory, and coupled-cluster methods. *Journal of Chemical Physics* *100*, 6550-6561.
- 10 Ashcroft, N. W. and Mermin, N. D. *Solid State Physics*. 1st edition. Saunders College. United States of America. **1976**.
- 11 Hohenberg, P. and Kohn, W. (1964) Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review B* *136*, B864.
- 12 a) Lee, C., Yang, W., Parr, R. G. (1988) Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B* *37*, 785-789; b) Miehlich, B., Savin, A., Stoll, H., Preuss, H. (1989) Results obtained with the correlation energy density functionals of Becke and Lee, Yang and Parr. *Chemical Physics Letters* *157*, 200-206.
- 13 Perdew, J. P., Burke, K. and Ernzerhof, M. (1996) Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Physical Review Letters* *77*, 3865–3868.
- 14 a) Becke, A. D. (1993) Densityfunctional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *Journal of Chemical Physics* *98*, 5648-5652; b) Stephens, P. J., Devlin, F. J., Chabalowski, C. F., and Frisch, M. J. (1994) Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. *Journal of Physical Chemistry* *98*, 11623-11627.
- 15 Adamo, C. and Barone, V. (1999) Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. *Journal of Chemical Physics* *110*, 6158–6170.
- 16 Neugebauer, J. (2010) Chromophore-specific theoretical spectroscopy: From subsystem density functional theory to mode-specific vibrational spectroscopy, *Physics Reports*, *489*, 1-87.
- 17 Dreuw, A., and Head-Gordon, M. (2005) Single-reference ab initio methods for the calculation of excited states of large molecules, *Chemical reviews*, *105*, 4009–4037.
- 18 Yabana, K. and Bertsch, G. F. (1996) Time-dependent local-density approximation in real time. *Physical Review B* *54*, 4484-4487.
- 19 Marques, M. A.L., Castro, A., Bertsch, G. F. Bertsch and Rubio, A. (2003) octopus: a first-principles tool for excited electron–ion dynamics, *Computer Physics Communications* *151*, 60-78.
- 20 Stratmann, R. E., Scuseria, G. E., and Frisch, M. J. (1998) An efficient implementation of time-dependent density-functional theory for the calculation of excitation energies of large molecules, *The Journal of Chemical Physics* *109*, 8218.
- 21 Miertus, S., Scrocco, E. and Tomasi, J. (1981) Electrostatic Interaction of a Solute with a Continuum-A direct utilization of *Ab Initio* Molecular Potentials for the Provision of Solvent Effects. *Chemical Physics* *55*, 117-129.
- 22 a) Tomasi, J. and Persico, M. (1994) Molecular Interactions in Solution: An Overview of Methods Based on Continuous Distributions of the Solvent. *Chemical Reviews* *94*, 2027-2094. b) Tomasi, J., Mennucci, B. and Cammi, R. (2005) Quantum mechanical continuum solvation models. *Chemical Reviews* *105*, 2999-3093.
- 23 Langlet, J., Claverie, P., Caillet, J. and Pullman, A. (1988) Improvements of the Continuum Model. 1. Application to the Calculation of the Vaporization Thermodynamic Quantities of Nonassociated Liquids. *Journal of Physical Chemistry* *92*, 1617-1631.
- 24 Leach, A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. 2nd edition. Addison Wesley Longman Limited. Edinburgh, Harlow, England. **1997**.
- 25 Grigera, J. R. *Simulación mediante Dinámica Molecular*. Curso CABBIO 2008. 1era edición. Editorial IFLP. La Plata, Argentina. **2008**.

2. Modelos y Métodos

- 26 a) Blanksby, S. J. and Ellison, G. B. (2003) Bond Dissociation Energies of Organic Molecules. *Accounts of Chemical Research* 36, 255-263. b) Bruice, P. Y. Tabla 3.1 de la página 122. *Organic Chemistry*. 2nd edition. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey 07458, USA. **1998**.
- 27 Coutinho K., Morgon, N. H. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. 1a Edição. Editora Livraria da Física. São Paulo, Brasil. **2007**.
- 28 Loo, T. W. Bartlett, M. C.; Clarke, D. M. (2003) Methanethiosulfonate derivatives of rhodamine and verapamil activate human P-glycoprotein at different sites. *Journal of Biological Chemistry* 278, 50136-50141.
- 29 Ecker, G. F., Csaszar, E., Kopp, S., Plagens, B., Holzer, W., Ernst, W., and Chiba, P. (2002) Identification of ligand-binding regions of P-glycoprotein by activated-pharmacophore photoaffinity labeling and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Molecular pharmacology* 61, 637-648.
- 30 Pleban, K., Kopp, S., Csaszar, E., Peer, M., Hrebicek, T., Rizzi, A., Ecker, G. F., and Chiba, P. (2005) P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach. *Molecular Pharmacology* 67, 365-374.
- 31 Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., and Bajorath, J. (2004) Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews. Drug Discovery* 3, 935-949.
- 32 Van Gunsteren, W. F., King, P. M., and Mark, A. E. (1994) Fundamentals of drug design from a biophysical viewpoint. *Quarterly Reviews of Biophysics* 27, 435-481.
- 33 Hansson, T., Marelius, J., and Åqvist, J. (1998) Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. *Journal of Computational-Aided and Molecular Design* 12, 358-365.
- 34 Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. and Olson, A. J. (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* 19, 1639-1662.
- 35 Case D. A., Cheatham T. E., Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz K. M., Onufriev Jr. A., Simmerling C., Wang B., and Woods R. (2005) The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry* 26, 1668-1688.
- 36 Wesson, L. and Eisenberg, D. (1992) Atomic solvation parameters applied to molecular dynamics of proteins in solution. *Protein Science* 1, 227-235.
- 37 Morris, G. M., Goodsell, D. S., Huey, R., Hart, W. E., Halliday, S., Belew, R., Olson, A. J. Automated docking of Flexible Ligands to Receptors. AutoDock User's Guide. Version 3.0.5
- 38 Mehler, E.L. and Solmajer, T. (1991) Electrostatic effects in proteins: comparison of dielectric and charge models. *Protein Engineering* 4, 903-910.
- 39 Goldberg, D. E. Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning. Reading, Massachusetts, Addison-Wesley. **1989**.
- 40 Judson, R., Jaeger, E., Treasurywala, A. and Peterson, M. (1993) Conformational searching methods for small molecules. II. Genetic algorithm approach. *Journal Computational Chemistry* 14, 1407-1414.
- 41 McGarrah, D. and Judson, R. (1993) Analysis of the genetic algorithm method of molecular conformation determination. *Journal Computational Chemistry* 14, 1385-1395.
- 42 Solis, F. J. and Wets, R. J.-B. (1981) Minimization by Random Search Technique.s *Mathematics of Operations Research* 6, 19-30.
- 43 Ryckaert, J. P., Cicotti, G. and Berendsen, H. J. C. (1977) Numerical Integration of the Cartesian equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of *n*-Alkanes. *Journal of Computational Physics*, 23, 327-341.
- 44 Berendsen, H. J. C., Postman, J. P. M., van Gunsteren, W.F, Di Nola, A. and Haak, J. R. (1984) Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *Journal of Computational Physics* 81, 3684-3690.
- 45 Izaguirre, J. A, Catarello, D.P., Wozniak, J.M. and Skeel, R.D. (2001) Langevin stabilization of molecular dynamics. *The Journal of Chemical Physics* 114, 2090-2098.
- 46 Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L., and Schulten, K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry* 26, 1781-1802.
- 47 Quigley, D. & Probert, M.I.J. (2004) Langevin dynamics in constant pressure extended systems. *Journal of Chemical Physics* 120, 11432-11441.
- 48 Jójárt, B. & Martinek, T.A. (2007) Performance of the general amber force field in modeling aqueous POPC membrane bilayers. *Journal of Computational Chemistry* 28, 2051-2058.
- 49 Frenkel, D., and Smit, B. *Understanding molecular simulation: from algorithms to applications*. 2nd edition. Academic Press. 525 B St., Suite 1900, San Diego, California 92101-4495, USA. **2002**.
- 50 Naïm, M., Bhat, S., Rankin, K. N., Dennis, S., Chowdhury, S. F., Siddiqi, I., Drabik, P., Sulea, T., Bayly, C.

2. Modelos y Métodos

- I., Jakalian, A., and Purisima, E. O. (2007) Solvated interaction energy (SIE) for scoring protein-ligand binding affinities. 1. Exploring the parameter space. *Journal of Chemical Information and Modeling* 47, 122-133.
- 51 a) Purisima, E. O. and Nilar, S. H. (1995) A simple yet accurate boundary element method for continuum dielectric calculations. *Journal of Computational Chemistry* 16, 681-689. b) Purisima, E. O. (1998) Fast summation boundary element method for calculating solvation free energies of macromolecules. *Journal of Computational Chemistry* 19, 1494-1504.
- 52 Epstein, C. J., Goldberger, R. F. and Anfinsen, C. B. (1963) The Genetic Control of Tertiary Protein Structure: Studies With Model Systems. *Cold Spring Harbor Symposia Quantum Biology* 28, 439-449.
- 53 Chothia, C. and Lesk, A. M. (1986) The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO Journal* 5, 823-826.
- 54 Sander, C. and Schneider, R. (1991) Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 9, 56-68.
- 55 Gu, J. and Bourne, P. E. Structural Bioinformatics. 2nd edition. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey, USA. **2009**.
- 56 Šali, A. and Blundell, T. L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology* 234, 779-815.
- 57 Fiser, A. and Sali, A. (2003) Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods in Enzymology* 374, 461-491.
- 58 Laskowski, R. A., Macarthur, M. W., Moss, D. S. and Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures *Journal of Applied Crystallography* 26, 283-291.
- 59 Melo, F., and Feytmans, E. (1998) Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *Journal of Molecular Biology* 277, 1141-1152.
- 60 Vried, G. (1990) Whatif: a molecular modeling and drug design program. *Journal of Molecular Graphics* 8, 52-56.
- 61 Eisenberg, D., Lüthy, R., and Bowie, J. U. (1997) VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods in enzymology*, 277, 396-404.
- 62 Xiong, J. Essential Bioinformatics. 1st edition. Cambridge University Press. Cambridge cb2 2ru, UK. 2006.
- 63 Senn, H. M. and Thiel, W. (2009) QM/MM methods for biomolecular systems. *Angewandte Chemie (International Edition. in English)* 48, 1198-229.
- 64 a) Dapprich, S., Komáromi, I., Byun, K. S., Morokuma, K. and Frisch, M. J. (1999) A New ONIOM Implementation in Gaussian 98. Part 1. The Calculation of Energies, Gradients and Vibrational Frequencies and Electric Field Derivatives, *Journal of Molecular Structure (Theochem)* 462, 1-21.

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

Research is what I'm doing when I don't know what I'm doing.

Wernher von Braun (1912 – 1977) Ingeniero aeroespacial alemán, nacionalizado estadounidense

3.1. Introducción

En el capítulo de introducción se mencionó que la resolución de estructuras cristalográficas de proteínas de transmembrana es todo un desafío. Este inconveniente presentó un importante escollo en el estudio de modelado molecular de transportadores **ABC**, implicados en **MDR**, principalmente los que involucran a la P-gp humana. Rosenberg *et al.* fueron los primeros en determinar la estructura de la P-gp purificada y reconstituida en liposomas mediante microscopía electrónica. Sin embargo, la resolución estructural fue de tan sólo 25 Å.¹ En un trabajo posterior, los mismos autores obtuvieron una estructura tridimensional de la P-gp unida a nucleótido con una resolución de 8 Å.² Debido a la baja resolución, estas estructuras han sido de poca o ninguna utilidad para ser empleadas en estudios de Modelado Molecular.

Sin embargo, este inconveniente pudo ser superado en el año 2001, cuando Chang *et al.* publicaron la estructura de la MsbA, un transportador **ABC** de *E. coli*, con una resolución de 4,5 Å.³ Esta proteína tiene un 34% de identidadⁱ con la P-gp humana. Posteriormente, este mismo grupo de investigación determinó la estructura de la MsbA de *Vibrio cholerae* con una resolución de 3,8 Å y con un 27% de identidad.⁴ Estas estructuras fueron utilizadas para el diseño de varios modelos por

i El porcentaje de identidad se refiere al de la cantidad de aminoácidos que se encuentran conservados entre dos secuencias. Además, este porcentaje indica qué tan cerca están, evolutivamente, dos proteínas. El modelado por homología (Capítulo 2) tendrá más chances de éxito cuando más cercana sea la proteína que se está utilizando como molde.

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

homología de P-gp humana.^{5,6,7,8,9} La mayoría de estos trabajos refirieron que la estructura cristalográfica de la MsbA presenta discrepancias con los datos experimentales obtenidos mediante entrecruzamiento de cisteínas. Sin embargo, para la preparación de los modelos se aplicaron como condiciones de restricción,⁶ las distancias entre aminoácidos obtenidas a partir de experimentos de entrecruzamiento de cisteínas.^{5,7}

Lamentablemente los modelos basados sobre esta proteína se tuvieron que descartar (entre ellos el de Stenham,⁵ utilizado en este trabajo de Tesis) debido a que la estructura de la MsbA sobre la que se había basado fue retractada por sus autores.¹⁰ Este inconveniente trajo como consecuencia que nuestro grupo invirtiera una enorme cantidad de tiempo (parte de esta tesis) y recursos en vano, de la misma manera que otros grupos de investigación. Los autores adujeron un error en un programa de procesamiento de datos elaborado por ellos mismos.

En el mismo período en que ocurrió la retractación, se publicó la estructura cristalizada de Sav1866, otro transportador ABC bacteriano, esta vez de *S. aureus* (Figura 1).^{11,12} Esta proteína es un transportador ABC con una función fisiológica desconocida,¹³ la cual fue

atrapada en una conformación unida a ATP, donde la cavidad acuosa se encuentra expuesta hacia el exterior. Esto se debe a que fue cristalizada unida a AMP-PNPⁱⁱ, coincidiendo con la conformación en una etapa del mecanismo de la proteína en donde se produce la liberación del sustrato, es decir, que no corresponde con la conformación inicial, a la cual se une el sustrato.^{11,12}



Sav1866

Figura 1: Estructura cristalográfica del Sav1866, en su conformación en la etapa de hidrólisis

Tieleman *et al.* utilizaron principalmente la estructura Sav1866 para construir un modelo de la P-gp humana que concuerde con el estado de reposo y de mayor afinidad por sustratos de la proteína.¹⁴ En un trabajo posterior, Globisch *et al.* obtuvieron un modelo de P-gp humana a partir de la estructura de Sav1866 que representa una conformación más cercana a la primera etapa de la hidrólisis de ATP, en lugar de una conformación que corresponde al estado de reposo con ATP unido.¹⁵ Sin embargo, el primer paso (es decir, la unión del ligando) se produce en la P-gp sin la

ii AMP-PNP: adenosina-5'-(β,γ -imido) trifosfato, un análogo no hidrolizable del ATP.

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

unión a nucleótidos.¹⁶

Al comienzo de este trabajo de Tesis se trabajó con el modelo por homología construido por Stenham *et al.* (ref. 5) y posteriormente se comenzó a utilizar el de Tieleman *et al.*. Sobre estos modelos se realizaron estudios de *docking* y dinámica molecular, e incluso se había comenzado a construir un modelo de P-gp inserta en una membrana lipídica sobre el modelo de Stenham.

Sin embargo, el modelo por homología basado en la Sav1866 fue dejado de lado, ya que la primera estructura de una P-gp de mamífero, la P-gp de ratón, logró ser cristalizada y resuelta su estructura con una resolución de 3,8 Å. Esta proteína comparte un alto grado de identidad de secuencia con la P-gp humana (86%) y representa el estado de reposo (sin ATP), capaz de unir ligandos (sustratos o inhibidores).¹⁷ La obtención de la estructura cristalográfica de la P-gp de ratón representa una oportunidad muy valiosa para evaluar las interacciones de inhibidores conocidos usando un modelo de P-gp cristalográfico,¹⁸ muy semejante a la P-gp humana, o también la posibilidad de la construcción de modelos por homología mucho más confiables que los existentes basados en transportadores procariotas.¹⁹ Recientemente, han sido publicadas dos estructuras de homología de la P-gp humana basadas en la P-gp de ratón. Una de ellas sobre la P-gp de ratón unida al ligando QZ59-SSS (código PDB: 3G61),²⁰ y otra sobre la estructura libre de ligando y de nucleótidos (código PDB: 3G5U),²¹ es decir en su estado de reposo.

Un hecho remarcable es que la estructura de la P-gp de ratón, es notablemente diferente al modelo de homología propuesto por Tieleman *et al.* a partir del Sav1886. Sin embargo, a pesar de tratarse de una estructura experimental y de la proteína de un mamífero, algunos autores siguieron utilizando modelos anteriores basados en el Sav1886, argumentando que las estructuras de la P-gp de ratón no están en un estado capaz de unir drogas (*drug-binding capable state*), aunque recientemente se ha demostrado lo contrario.¹⁷

En el presente capítulo, presentamos la construcción de un modelo por homología propio de la P-gp humana basado en la misma proteína de ratón. Sobre ambas proteínas se realizaron estudios de *docking* molecular y se compararon entre sí los resultados obtenidos, así como con la evidencia experimental disponible. En estos estudios se utilizaron sustratos y moduladores conocidos, a fin de localizar sitios activos y evaluar las afinidades relativas. Luego, sobre la base de este conocimiento, se evaluaron y compararon dos compuestos de

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

origen natural (*BNeo1* y *BNeo2*) cuyas actividades como moduladores fueron estudiadas experimentalmente por el Dr. Tegos, en un trabajo en colaboración.

La experiencia lograda en la construcción de sistema de P-gp (modelo de Stenham) inserta en una membrana lipídica fue empleada para la construcción del análogo usando la P-gp de ratón.

Además, se realizaron estudios de dinámica molecular sobre un sustrato, dos moduladores conocidos y sobre uno de los nuevos inhibidores propuestos, *BNeo2*. De este estudio se obtuvieron datos de cambio en la energía libre de formación del complejo P-gp/ligando, de formación de puentes de hidrógeno y de qué aminoácidos participan directamente en la interacción y la movilidad de éstos.

Por otro lado, se evaluaron a nivel de modelado molecular, la lipofilidad de los distintos sustratos y moduladores, correlacionándolas a su afinidad energética por la P-gp.

3.2. Construcción del modelo por homología

La obtención de la estructura tridimensional de la P-gp humana, mediante la construcción de un modelo por homología, es uno de los objetivos en este trabajo de Tesis.

En la preparación del modelo por homología, primero se alineó la secuencia PDB de ratón (código PDB: 3G5U) con la secuencia humana P-gp (número de identificación: p08183) utilizando el programa ClustalW.²² Posteriormente, cada dominio transmembrana (**TMD1**: **TM1-6** y **TMD2**: **TM7-12**) y cada **NBD** (**NBD1** y **NBD2**) fueron modelados por separado utilizando el programa Modeller9v7²³. Este programa generó cinco modelos, de los cuales se eligió aquel con menor desviación de *backbone*ⁱⁱⁱ respecto de la P-gp de ratón para ser alineados con su respectivo dominio; dicha desviación se juzga a través del RMSd (desviación cuadrática media; Capítulo 2, sección 2.12.6). Después de la alineación, con el programa Leap del paquete AMBER, se creó el enlace peptídico entre los aminoácidos de los dominios **TMD1** y **NBD1** y otro entre los homólogos **TMD2** y **NBD2**, ya que cada dominio se modeló por separado. Los enlaces creados debieron ser optimizados a su distancia de equilibrio. Para ello, los aminoácidos en la secuencia de unión entre **TMD1-NBD1** y **TMD2-NBD2** se optimizaron con 2000 pasos de *Steepest Descent*, manteniendo a los átomos del *backbone* de

iii Es la cadena polimérica principal de proteína, se refiere al conjunto de átomos que participan directamente en enlaces amida entre los aminoácidos (o sea excluyendo las cadenas laterales).

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

la proteína restringidos. De esta manera, se pudo unir los últimos aminoácidos de **TMD1** y los primeros del **NBD1** (y lo mismo con el **TMD2** y el **NBD2**). Luego se llevó a cabo una relajación de la geometría final en todas las cadenas laterales de la proteína con otras 2000 etapas de minimización con *Steepest Descent*.

3.3. Validación del modelo por homología

Los parámetros estructurales de la proteína se validaron usando el programa PROCHECK.²⁴ A partir de los parámetros estructurales, se obtuvo un gráfico de Ramachandran,²⁵ el cual ubicó más del 84% de los aminoácidos en las regiones muy favorecidas, el 15% en las regiones favorecidas y 0,8% en las no favorecidas. El RMSD correspondiente al *backbone* fue de 0,77 Å comparada con la estructura experimental de la P-gp de ratón.

Las estructuras terciaria y cuaternaria fueron validadas siguiendo un procedimiento similar al informado por Globisch *et al.*,¹⁵ en el que las distancias entre los aminoácidos del modelo se comparan con aquellas obtenidas a través de datos experimentales obtenidos por entrecruzamiento (*cross-linking*) de cisteínas.²⁶ En el caso de esta tesis, el modelo por homología fue validado mediante la ejecución de una dinámica estocástica, tipo Gō,²⁷ en los átomos de C α , usando unidades reducidas sin condiciones periódicas de contorno (paso de integración 0,0005 ps; radio de corte para van der Waals y de Coulomb de 2,0 nm y la temperatura de 80 unidades reducidas). Esta dinámica permite tener en cuenta la variación de las distancias intermoleculares, sobre la base de considerar las fluctuaciones moleculares alrededor de la estructura de equilibrio ocasionadas por la temperatura.^{iv}

Se compararon las distancias entre los carbonos α (C α) de los aminoácidos involucrados en el entrecruzamiento de cisteínas con las obtenidas en esta simulación.²⁶ En la Figura 2 se muestra dicha comparación. Los valores informados en dicha figura presentan una distancia adicional de 5,5 Å, la cual contempla la distancia entre el átomo de azufre de la cisteína y el C α . Notese que las distancias entre los aminoácidos: S222(TM4)-I868(TM10), S222(TM4)-G872(TM10), I306(TM5)-I868(TM10), I306(TM5)-G872(TM10), I306(TM5)-T945(TM11), I306(TM5)-V982(TM12), I306(TM5)-G984(TM12), L339(TM6)-I868(TM10) y L339(TM6)-G872(TM10) están dentro del rango de distancias

iv La temperatura en la que se realiza el entrecruzamiento de cisteínas es de 4°C, ref. 26.

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

experimentalmente halladas por Loo *et al.*²⁶ Sin embargo, las distancias observadas entre L339(TM6)-F942(TM11), L339(TM6)-T945(TM11), L339(TM6)-V982(TM12) y L339(TM6)-A985(TM12) fueron inferiores a las informadas por Loo *et al.* (Figura 2, Tabla 1).²⁶

Tabla 1: Comparación entre las distancias de los pares de aminoácidos medidos en nuestro modelo por homología contra los valores experimentales.

Pares de aminoácidos	Modelo por Homología: distancias promedio (Å)	Distancia Experimental (Å)
S222(TM4)-I868(TM10)	30,5	16,8-31,1
S222(TM4)-G872(TM10)	30,7	16,8-31,1
I306(TM5)-I868(TM10)	29,6	20,0-31,1
I306(TM5)-G872(TM10)	28,9	20,0-31,1
I306(TM5)-T945(TM11)	31,0	20,0-31,1
I306(TM5)-V982(TM12)	19,5	20,0-31,1
I306(TM5)-G984(TM12)	22,6	20,0-31,1
L339(TM6)-I868(TM10)	23,1	20,0-31,1
L339(TM6)-G872(TM10)	23,6	20,0-31,1
L339(TM6)-F942(TM11)	24,3	31,1
L339(TM6)-T945(TM11)	22,4	27,3-31,1
L339(TM6)-V982(TM12)	15,4	23,6-31,1
L339(TM6)-A985(TM12)	16,4	27,3-31,1

Finalmente, la validez del modelo fue lograda, no sólo por la alta identidad de secuencia con la P-gp de ratón y verificaciones estructurales (PROCHECK), sino porque, además, se condice muy bien con las distancias experimentales obtenidas por entrecruzamiento de cisteínas. Esta observación permitió confirmar que nuestro modelo realmente conserva la estructura del estado de reposo.

En adelante, el modelo de homología de la P-gp humana y la de ratón se utilizarán para encontrar el sitio de unión de distintos ligandos y comparar los resultados entre ambos.

3.4. Sustratos y Moduladores

A lo largo de esta tesis se han estudiado diversos sustratos, algunos sintéticos como las rodaminas 123 y 6G, usados como sondas fluorescentes en experimentos de retención de la sonda (*uptake* de rodamina) como también sustratos naturales como la berberina. Esta última presenta una importante actividad antimicrobiana, la cual se encuentra enmascarada debido a

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

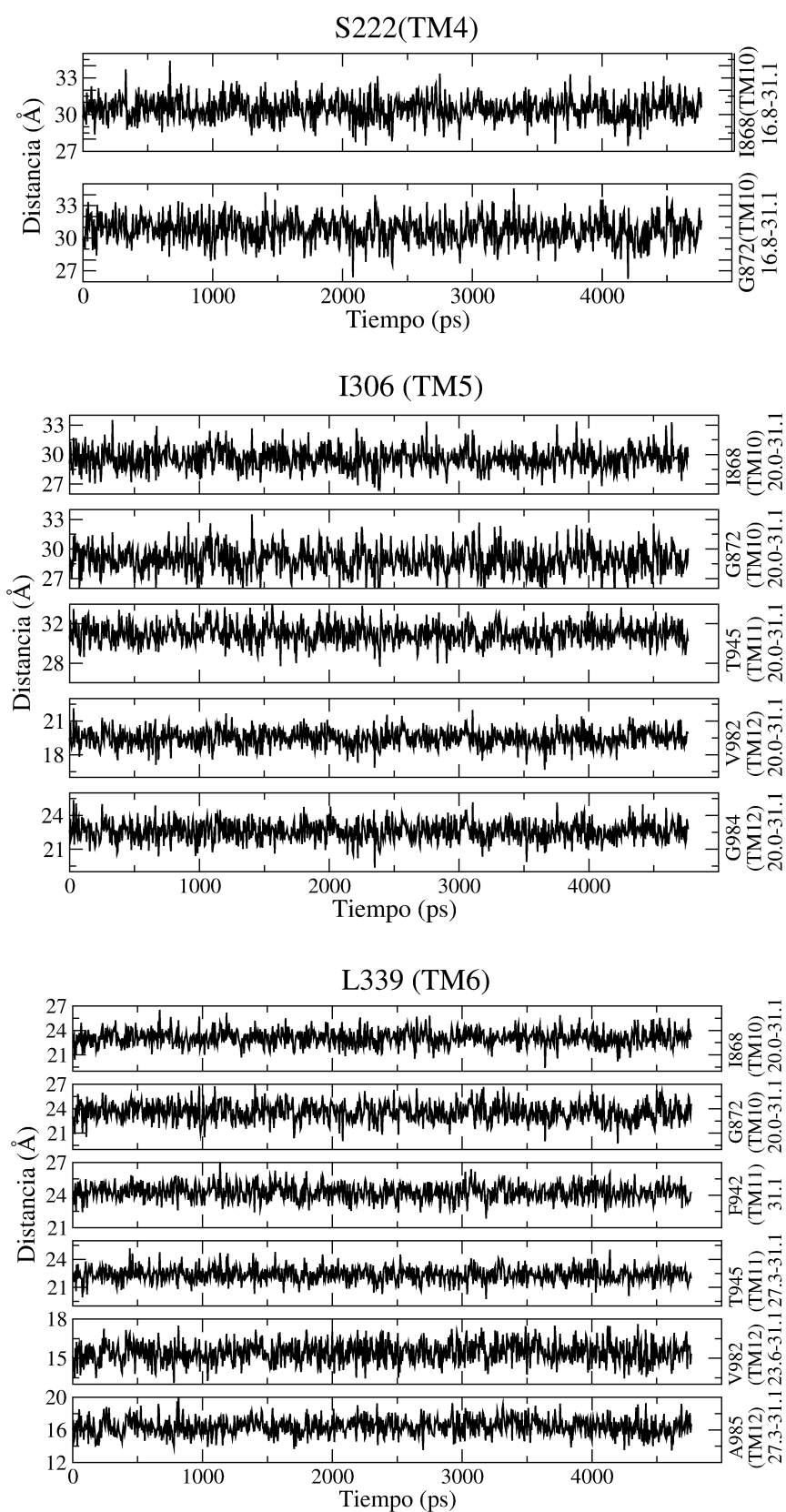


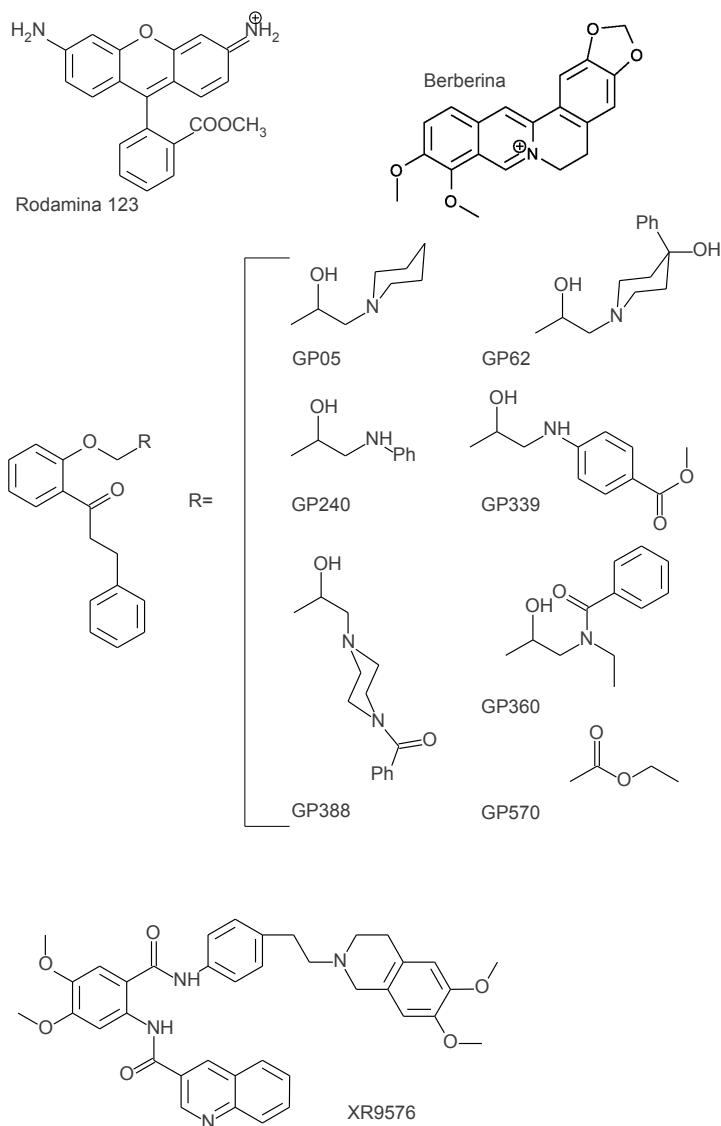
Figura 2: Distancias medidas, a partir de la dinámica estocástica, entre los aminoácidos S222, I306 o L339 y los que se muestran a la derecha de cada gráfico junto con el rango de distancias observadas experimentalmente. Entre paréntesis se informa el TM al cual corresponde cada aminoácido.

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

la acción de diversas bombas de eflujo (**BEs**) relacionadas con la P-gp (Esquema 1).

En el caso de moduladores (o inhibidores como los hemos llamado hasta ahora), se probaron inhibidores de primera generación como el verapamil y la reserpina (menos potentes), y de tercera generación (más potentes) como el tariquidar (XR9576).²⁸ También se estudió una familia de inhibidores derivados de la propiofenona, llamados familia de los GPs (Esquema 1), estudiados por Ecker *et al.* para tener una familia de compuestos relacionados cuyas actividades fueron medidas en las mismas condiciones.²⁹

El conocimiento de los sitios principales de unión y las energías de *docking*, encontradas para los moduladores modelos (tanto de primera como de tercera generación), permitiría evaluar dos metabolitos secundarios, neohesperidósidos poliacetilados, extraídos del *Geranium caespitosum*, *BNeo1* y *BNeo2*. Como se mencionó en el capítulo 1, según los resultados experimentales del Dr. Tegos, estos compuestos presentan una importante actividad de inhibición de **BEs** bacterianas, potenciando la eficacia de antimicrobianos de plantas y convencionales. Tanto *BNeo1* como *BNeo2* no presentan actividad antimicrobiana *per se*. Sin embargo, *BNeo1* presenta un actividad inhibitoria de **BE** preferencialmente sobre bacterias Gram-positivas, mientras que *BNeo2* tiene un amplio espectro de acción, actuando también como un potente modulador de **MDR** sobre *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*. Tanto *BNeo1* como *BNeo2* potencian la actividad antimicrobiana de berberina en *S. aureus* (Gram-positivas). Mientras que en *B.*



Esquema 1: Algunos de los sustratos y moduladores estudiados.

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

cereus (Gram-positiva) y en *P. syringae*, la acumulación intracelular de berberina es significativamente incrementada en la presencia de *BNeo2*, en comparación a cuando está presente *BNeo1*. La actividad inhibitoria de ambos *BNeos* es comparable con la mostrada por los inhibidores sintéticos, INF₂₇₁ y PaßN. De igual forma, los dos *BNeos* afectan la acumulación de rodamina 6G.³⁰

Primero se presentarán los resultados de docking de los compuestos sustratos e inhibidores más estudiados a nivel experimental, estos son rodamina 123 como sustrato y la familia de moduladores de GPs, el verapamil, un modulador de primera generación y el tariquidar, uno de tercera generación. Los estudios de docking se realizaron sobre la estructura cristalográfica de la P-gp de ratón y la estructura por homología de la P-gp humana validada en la sección anterior. Mediante los resultados obtenidos se propondrán los sitios principales de unión para sustratos y moduladores, es decir regiones de transmembranas (**TM**) y aminoácidos (residuos) involucrados. Luego, los resultados se compararán con los obtenidos a partir de datos experimentales de compuestos de actividad conocida.

En segundo lugar, se realizó la dinámica molecular (**DM**) de los complejos P-gp/sustrato o P-gp/modulador utilizando como coordenadas iniciales las estructuras de los complejos de más baja energía de *docking* (más estables). La **DM** se llevó a cabo solamente con la P-gp de ratón.

3.5. Docking de sustratos y moduladores

La estructura cristalográfica cruda de P-gp ratón fue sujeto de 4000 pasos de minimización con gradiente conjugado. Las estructuras optimizadas de los sustratos y moduladores fueron obtenidas mediante optimizaciones con métodos de gradiente conjugado utilizando el funcional de DFT,³¹ B3LYP^{32, 33} y la base 6-31+G(d,p). El carácter de mínimo en la superficie de energía potencial fue caracterizado calculando las frecuencias armónicas a partir de la diagonalización de la matriz Hessiana usando el programa Gaussian 03.³⁴ A partir del potencial electrostático de los cálculos a nivel QM³⁵ se obtuvieron las cargas atómicas parciales RESP, que se utilizaron en los cálculos de docking y posteriormente, en dinámica molecular.³⁶ Como se dijo antes, el programa de docking usado fue el paquete de programas Autodock 3.³⁷ Las estructuras de docking más estables fueron seleccionadas después de 4000 corridas de algoritmo genético (creando de 50 a 100 individuos por generación realizando

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

tantas corridas o simulaciones como fueran necesarias para alcanzar 5×10^6 evaluaciones de energía o 1×10^5 generaciones) seleccionando un sobreviviente por cada corrida. De esta forma, se generaron en total 4000 complejos P-gp/sustratos o P-gp/modulador por cada compuesto. Las estructuras y energías de docking mostradas son el resultado de un análisis de *clusters* sobre los 4000 complejos obtenidos usando como criterio 2,5 Å de RMSD y 0,5 kcal/mol (Capítulo 2, sección 2.11.4).

Los resultados de *docking* en ambos modelos fueron muy similares. En el resto de este Capítulo se hablará de ellos de manera indistinta, poniendo la letra y número del residuo (aminoácido) correspondiente a la P-gp humana entre paréntesis, lo que es posible gracias el alto grado de conservación entre las dos secuencias.

La búsqueda conformacional se realizó en todo el dominio **TMD**, sin realizar ninguna suposición sobre la localización de un sitio de unión en particular. La región principal de unión para rodamina resultó ser un bolsillo hidrofóbico en el que participan los **TMs** 4, 5 y 6,

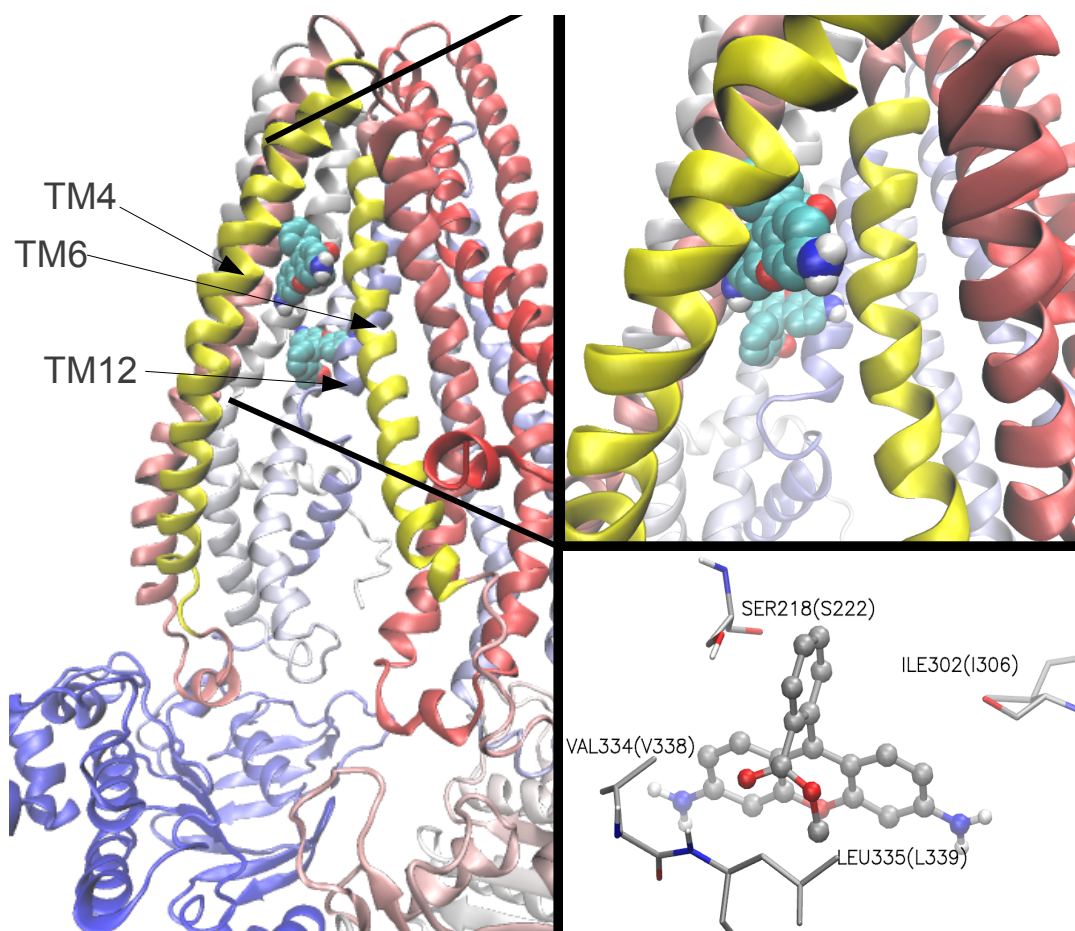


Figura 3: Conformaciones de docking de la rodamina123 en el sitio P1 (TM 4, 5, 6) y en el TM12 hacia atrás de la P-gp de ratón (izquierda). Aminoácidos de ratón P-gp residuos alrededor de rodamina en el sitio P1 (entre paréntesis aminoácidos de la P-gp humana) (abajo a la derecha).

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

el cual se denominó “sitio P1”, que contiene importantes residuos tanto en ratón como en humano por ejemplo: S218 (S222, TM4), I302 (I306, TM5), V334 (V338, TM6), L335 (L339, TM6), que ya se han propuesto sobre bases experimentales para desempeñar un papel crucial en la unión del sustrato.^{17,29,38,39,40} La energía de *docking* del conformero más estable de rodamina 123 fue de -10,66 kcal/mol, perteneciente a un total de 1075 conformeros que se ubican en ese sitio (Tabla 2, Figura 3). El sitio P1 resultó ser una región hidrofóbica que se caracteriza por un potencial electrostático relativamente negativo (Figura 4). Este resultado parece ser lógico para un catión con su carga positiva deslocalizada sobre todo el sistema aromático como la rodamina 123. Se encontró también una región secundaria (sitio P2) que consiste en residuos hidrofóbicos y aromáticos del TM12. Ésta última, con una energía de

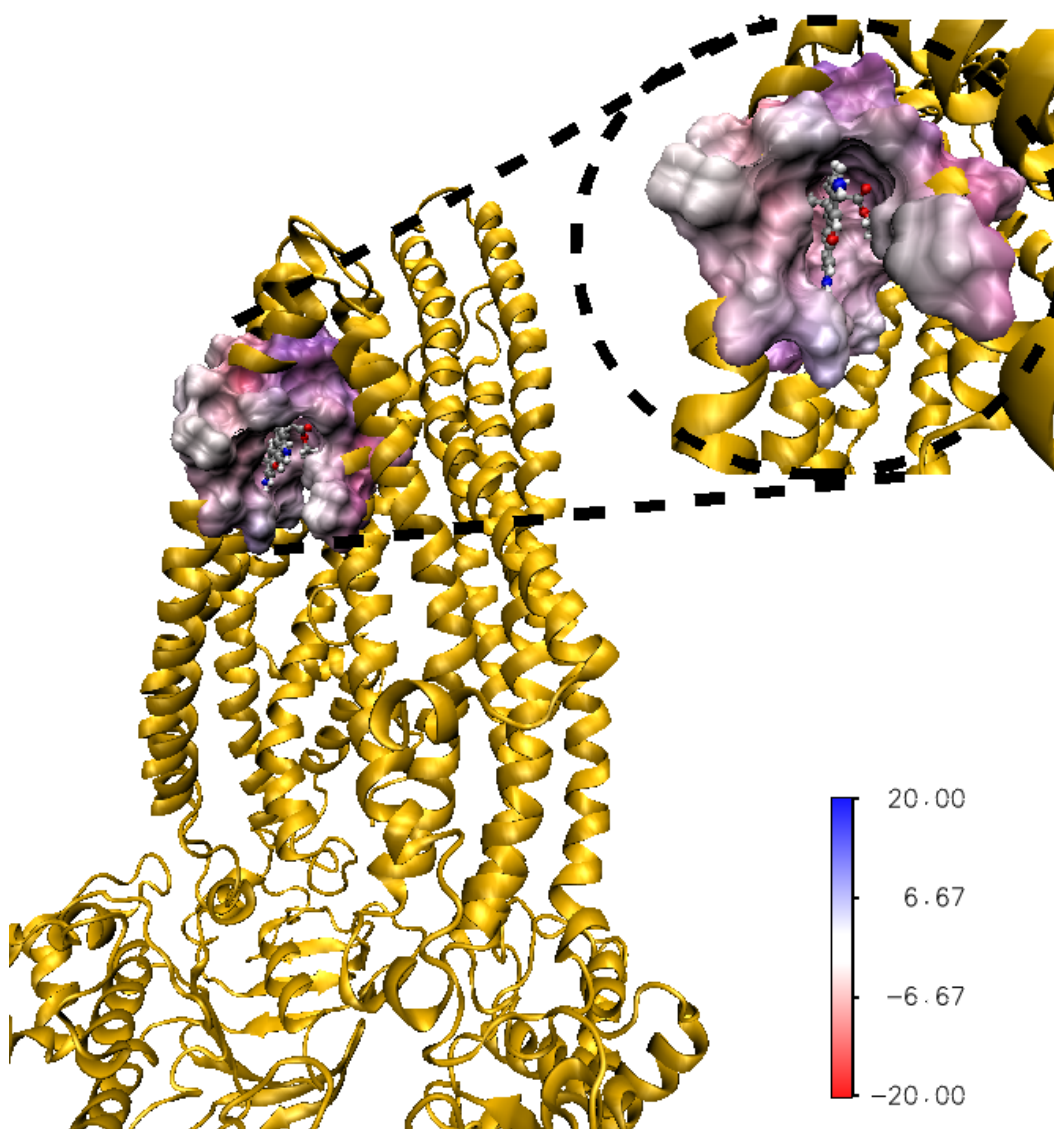


Figura 4: Potencial electrostático de la P-gp en el sitio P1. Rodamina 123 en esferas y cilindros. El potencial electrostático va del negativo (rojo) al positivo (azul)

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

Tabla 2: Resumen de la energía de docking (estimación de $\Delta G_{unión}$) y $\Delta G_{unión}$ calculada a través de **DM** para la P-gp de ratón.^a Los valores se encuentran en kcal/mol.

Sustrato/Modulador	Actividad Experimental		Energía de docking		$\Delta G_{unión}$ (MD)
	EC50 Rodamina	Log EC50	Mejor conformero (la mayoría en el sitio P1)	Mejor conformero afuera del sitio P1	
Rodamina123	referencia	sustrato	-10,66	-9,21 ^b	-7,70
GP05	1,45	0,161	-12,77	-11,88 ^b	-8,22
GP240	17,61	1,246	-12,71	-12,36 ^c	
GP339	4,57	0,660	-13,61	-13,04 ^d	
GP360	2,57	0,410	-13,59	-13,11 ^b	
GP388	0,36	-0,444	-14,36	-14,2 ^b	
GP570	44,45	1,648	-11,50	-11,88 ^b	
GP62	0,11	-0,959	-13,54	-13,15 ^b	
Verapamil	---	---	-10,58	-9,21 ^b	
XR9576	---	< -1	-15,21	-13,66 ^d	-11,83
Productos Naturales					
Berberina	---	---	-9,06	-7,92 ^e	-9,35;-9,39*
BNeo1	---	---	-16,28	-16,73 ^b	
Bneo2	---	---	-16,66	-16,91 ^b	

a) Experimentos de ref. 26 b) involucran al TM12. c) Sitio homólogo al Sitio P1, TMs 10, 11 y 12.

d) involucran a los TMs 5, 7, 8, 9 y 12. e) sitio P3, TMs 3, 10 y 11. *sitio P2

unión levemente mayor (es decir, menos estable), de -9,21 kcal/mol para el grupo de mayor afinidad (número de conformeros en el sitio 270). Entre los aminoácidos implicados en la región de unión se encuentra el M982(M986) perteneciente al **TM12**.⁴¹ Existe otro sitio importante de unión de rodamina (sitio P3) por su cantidad de conformeros (725), aunque de mayor energía que el del sitio P1 y levemente mayor que el del sitio P2 que involucra al **TM12** (-9,16 kcal/mol). Este sitio involucra a los **TMs** 2, 3 y 10 y 11, y dentro de este último

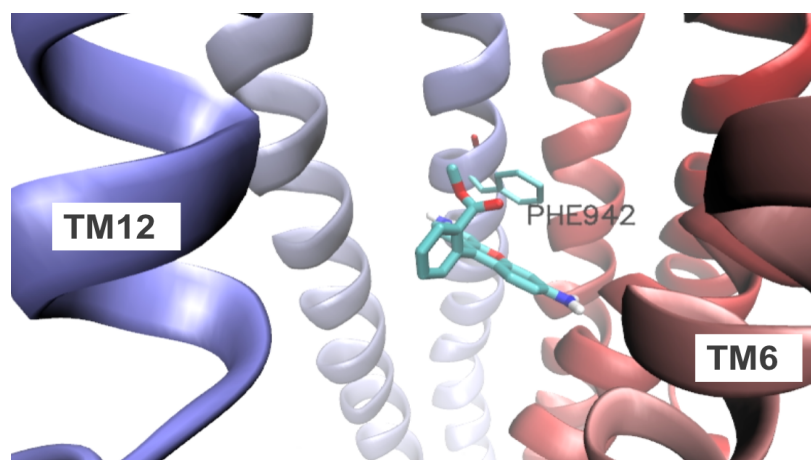


Figura 5: Tercer sitio de unión de rodamina 123, en el cual interacciona con el aminoácido Phe942.

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

al aminoácido Phe983(Phe942) perteneciente al **TM11** (Figura 5).³⁹

Otra rodamina ampliamente usada a nivel experimental es la rodamina 6G, en esta Tesis tuvo un particular interés debido a que fue la empleada en los estudios de inhibición de los *BNeos* por la contraparte experimental. Se encontró, mediante los resultados de *docking*, que la rodamina 6G presenta los mismos sitios de unión que su análoga la rodamina 123, aunque con energías de *docking* levemente más bajas: -12,63 kcal/mol, -12,02 kcal/mol y -11,95 kcal/mol para los sitios P1, P2 y P3.

Los mejores moduladores también tienen sus conformaciones de más baja energía en el sitio P1, superponiéndose a la región donde se encontraron las conformaciones más estables del sustrato rodamina 123 (Figura 6). En este sitio P1 participan los **TMs** 4, 5 y principalmente el **TM6**. También se encontraron otros sitios, que involucran al **TM12**. La preferencia por el sitio P1 es evidente, especialmente para los mejores moduladores. Por ejemplo, XR9576, el más potente en estudio,^{28,42} tiene casi todos los grupos de baja energía en

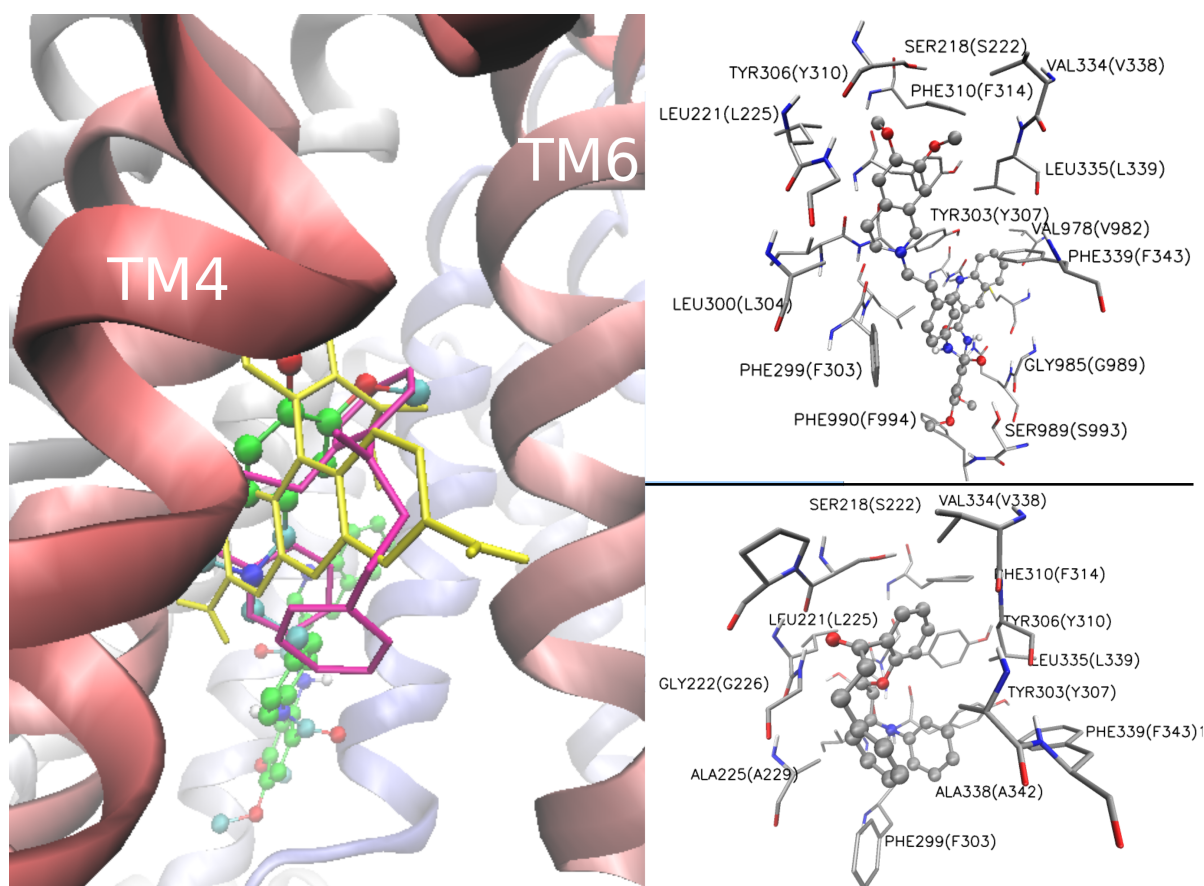


Figura 6: a) Conformeros de más baja energía para rodamina 123 (fucsia), GP240 (amarillo) y XR9576 (en cilindros y esferas). b) y c) Residuos próximos a XR9576 y GP240, respectivamente.

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

el sitio P1 (Figura 7). Además, el XR9576 ocupó en su conformación de más baja energía (-15,21 kcal/mol) tanto el sitio P1 como el segundo sitio de rodamina 123 que involucra al **TM12**. Este hecho se debe a que el XR9576 es una molécula de gran tamaño y flexibilidad. Además de estos dos sitios principales, el XR9576, ocupa otros sitios de rodamina, siempre con energías de docking menores (~ 2 kcal/mol).

En el caso del GP570, uno de los moduladores más pobres de la familia de los **GPs** de acuerdo con las energías de *docking* calculadas y con su valor experimental de EC_{50} ,²⁹ su mejor energía en el sitio P1 fue de -11,50 kcal/mol. Esta energía es ligeramente inferior, pero aún cercana a la energía encontrada para rodamina. La mayoría de los conformeros de la familia de los **GPs** se encuentran en el sitio P1 con energías sensiblemente más estables que la

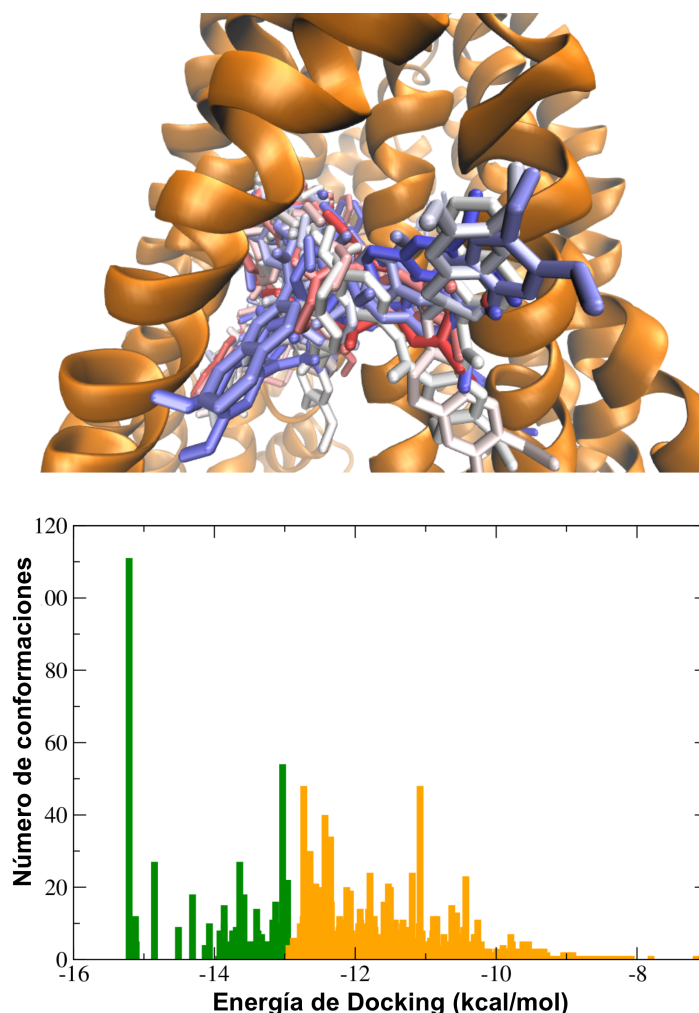


Figura 7: Conformaciones de energía más baja de cada uno de los primeros 50 grupos (color verde en el histograma de la distribución de las conformaciones de grupo frente a la energía de docking) obtenidos para XR9576 en la P-gp. Cada conformero está coloreado desde el rojo al azul de -16 a -13 kcal / mol en energía de docking.

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

que corresponde a la de rodamina. Mientras que los restantes no cubren todos los sitios de unión donde se encontró rodamina. Los resultados de *docking* para los conformeros más estables de cada GP en el sitio P1 o en cualquier otro, se encuentran detallados en la Tabla 2.

El otro modulador fue el verapamil, el cual presenta -9.5 kcal/mol de energía de unión por el sitio P1, comparable a la rodamina 123, lo que está de acuerdo con su actividad inhibitoria experimental, sensiblemente menor que los otros compuestos estudiados.

La Tabla 3 presenta la energía de *docking* de las estructuras más estables de la familia GP, rodamina 123, para el verapamil y XR9576 con el modelo por homología de la P-gp humana presentado. El sitio P1 nuevamente fue el lugar donde tienen mayor afinidad los conformeros. Una excepción es la rodamina, cuyo conformero de menor energía se sitúa interaccionando con el TM12. Pero la diferencia energética con el conformero que le sigue en energía que se sitúa en el sitio P1, no es significativa (0,01 kcal/mol, ver Tabla 3).

Los resultados de *docking*, que se resumen en las Tablas 2 y 3, confirman la importancia del sitio P1, el cual sería el más favorable para la unión. Sin embargo, también otros sitios que involucran al TM12 (y en algunos casos al TM5) podrían ser muy relevantes.

La relación entre el EC₅₀ y las energías de unión de un sitio localizado no se espera que sea

Tabla 3: Resumen de la Energía de docking en el modelo de P-gp humana.^a

Sustrato/Modulador	Actividad experimental		Energía de docking (kcal/mol)		
	EC ₅₀ Rodamina	Log EC ₅₀	Mejor conformero (la mayoría en el sitio P1)	Mejor conformero afuera del sitio P1	El conformero más poblado
Rodamina123	referencia	sustrato	-9.66*	-9.65**	-8.68 ^e
GP05	1,45	0,161	-13,58	-12.39 ^b	-13.21 ^f
GP240	17,61	1,246	-13,17	-12.04 ^c	-12.64 ^f
GP339	4,57	0,660	-14,72	-13.69 ^b	-12.85 ^f
GP360	2,57	0,410	-14,66	-13.5 ^c	-11.38 ^b
GP388	0,36	-0,444	-15,17	-13.85 ^b	-13.18 ^f
GP570	44,45	1,648	-11,01	-10.7 ^c	-10.34 ^f
GP62	0,11	-0,959	-14,93	-11.89 ^b	-11.89 ^b
Verapamil	---	---	-11,01	-9,47 ^b	-6,96 ^b
XR9576		< -1	-15,99	-11.98 ^d	-15.43 ^g
Productos Naturales					
Berberina	---	---	-8,23	-8,91 ^h	-8,91 ^h
BNeo1	---	---	-16,05	-16,03 ^b	-13,59 ^h
Bneo2	---	---	-17,33	-17,84 ^b	-15,12 ^h

a) Experimentos de ref. 26 b) principalmente TMs 5 and 12 c) principalmente TMs 9 and 12

d) TMs 10 and 11 e) TMs 3 and 6 f) Sitio P1 g) Sitio P1 and TM12 h) sitio P3

* no localizado en el Sitio P1 **localizado en el Sitio P1

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

tan simple como una correlación lineal debido a la complejidad del sistema y otros factores tales como la pérdida de afinidad en la etapa final del ciclo de la extrusión (en el cual la cavidad acuosa se abre hacia el exterior celular, estado cerrado) o a la lipofilidad necesaria para difundir a través de la membrana celular, entre otros. A pesar de estos hechos, la correlación entre la afinidad por este sitio y las actividades experimentales (como $\text{Log}(EC_{50})$)²⁹ para la mayoría de los inhibidores resulta bastante lineal. Estos resultados se presentan en la Figura 8. Tanto los resultados en la P-gp de ratón y humana apoyan la hipótesis de que P1 es el sitio más importante para la unión. La correlación lineal razonable encontrada para la mayoría de los inhibidores es compatible con la hipótesis de que el sitio P1 parece ser el más relevante en la unión proteína-ligando. En este punto, la hipótesis es además, compatible con los siguientes hechos: i) uno de los mejores moduladores conocidos en la actualidad (XR9576) tiene una preferencia clara para el sitio P1, ii) la región entre los TMs 4 y 6, implicadas en la unión ya ha sido propuesta para desempeñar un papel central en la unión de la rodamina y otros sustratos, sobre bases experimentales.^{38-40,43}

Algunas de las principales interacciones responsables de la unión en el sitio P1 se muestran en las Figuras 3 y 6 para rodamina, GP240 y XR9576. La cavidad, que está formada por los

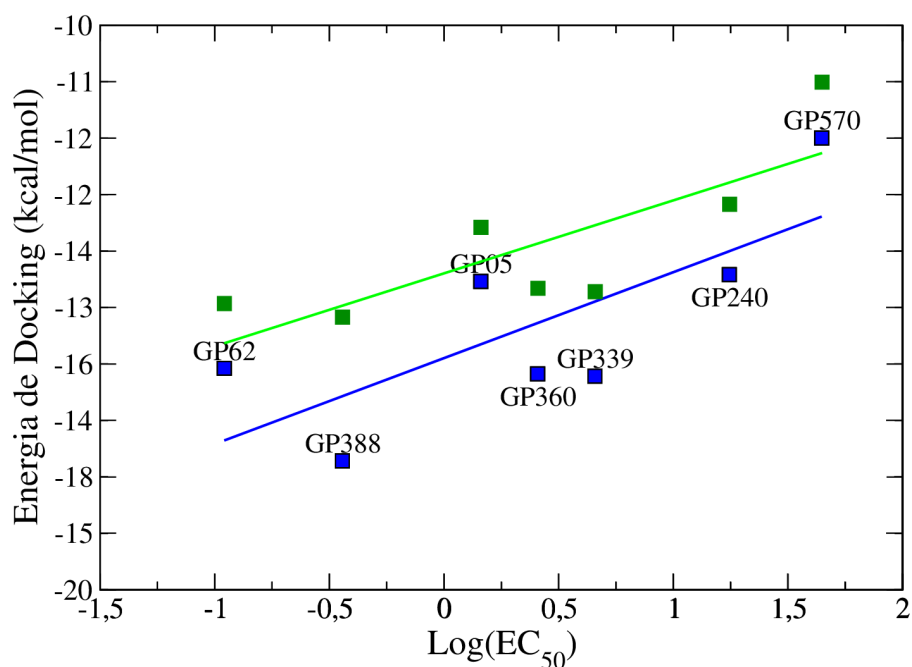


Figura 8: Correlación en las energías de docking para los conformeros más estables de la familia de los GPs y sus actividades experimentales (ref. 26). En verde, para la P-gp humana y en azul para la P-gp de ratón. Las líneas representan la regresión lineal.

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

TMs 4, 5 y 6, es un “bolsillo” que implica principalmente contactos hidrofóbicos entre los ligandos y residuos que participan en la unión. Según lo confirmado más tarde por las simulaciones **DM**, la presencia de interacciones de puente hidrógeno carecerían de importancia. En el caso de XR9576 las interacciones más importantes son estrictamente hidrofóbicas (con aminoácidos de cadenas no polares) y de naturaleza π - π *stacking* (con aminoácidos como la fenilalanina y tirosina), a pesar de que este compuesto tiene varios grupos aceptores de puente hidrógeno.

Los resultados obtenidos con el modelo por homología construido a partir de la estructura experimental de ratón, se relacionan estrechamente con lo anteriormente discutido y con la conformación de más baja energía de *docking* obtenida (Figura 9) para los ligandos Gp570, GP240 y XR9576 (tariquidar).

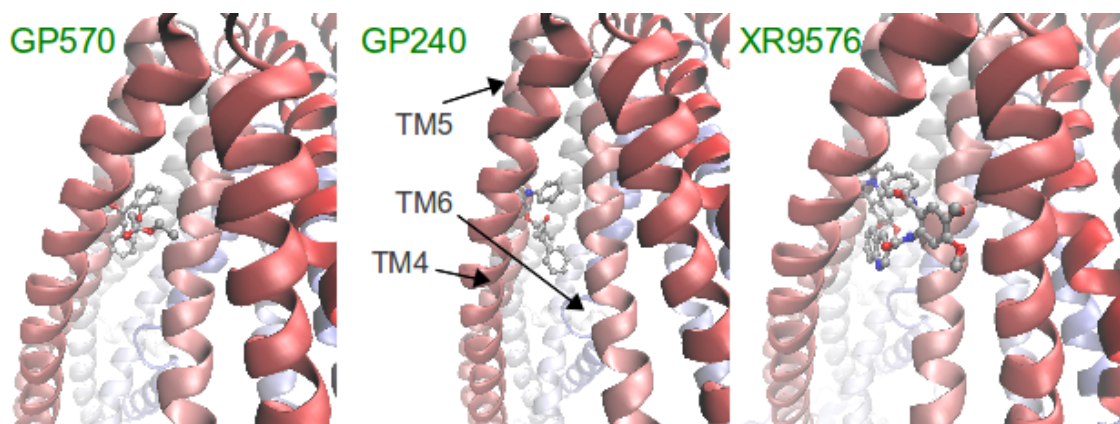


Figura 9: Los conformeros más estables para el GP570, GP240 y XR9576. Todos en el sitio P1

3.5.1. Compuestos de origen natural

Stermitz *et al.* propusieron que las plantas se protegen contra agentes patógenos mediante la sinergia de metabolitos secundarios; uno de los cuales actúa como antimicrobiano y otro como inhibidor de las **BE**s.⁴⁴ Esta observación se basa en que muchos antimicrobianos provenientes de plantas tiene su actividad enmascarada por la acción de **BE**s, como es en el caso de la berberina. El Dr. Tegos mostró que la actividad de este compuesto puede ser mejorada significativamente por la acción de metabolitos secundarios de plantas que actúan como inhibidores de **BE**s.⁴⁵

La berberina es sustrato de NorA, un **MF** de *Staphylococcus aureus*, y también lo sería de **BE**s de la familia **ABC**.^{44,46} Por lo tanto, sería importante conocer el o los sitios principales de unión en un modelo de **BE**s como lo es la P-gp, así como estimar si sus sitios de unión

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

resultan los mismos que aquellos donde se ubicaron los inhibidores estudiados en las secciones anteriores.

El comportamiento de berberina fue muy similar al descrito anteriormente para rodamina 123 y 6G. El sitio de unión principal para berberina fue el P1 (-9,06 kcal/mol), pero con una energía de docking menor en 1 kcal/mol que rodamina 123 y 3 kcal/mol que rodamina 6G; guardando la misma relación en los demás sitios. En el caso de la P-gp humana, el sitio principal continúa siendo el P1, con una energía de docking de -9,45 kcal/mol y más de 1000 conformaciones en ese sitio. Mientras que el segundo sitio de importancia es el sitio P3 y el sitio P2 pasa a ser el tercero, con energías de -8,91 y -7,55 kcal/mol, respectivamente. Como sucedió en el modelo de la P-gp de ratón, el sitio P3 tiene mayor población de conformeros que el sitio P2, 576 contra 467, respectivamente (sobre un total de 4000 conformeros). Las similitudes entre la berberina y las rodaminas resultan razonables teniendo en cuenta que son todos cationes deslocalizados en sistemas π extensos.

Los nuevos neohesperidósidos poliacetilados *BNeo1* y *BNeo2* (Figura 10) presentan un tamaño molecular comparable con el del XR9576, aunque tiene mayor flexibilidad (22 y 25 diedros rotables respectivamente contra 11 del XR9576). La capacidad moduladora de **MDR** de ambos *BNeos* fue propuesta sobre la base de datos experimentales obtenidos por el Dr. Tegós (trabajo en colaboración).

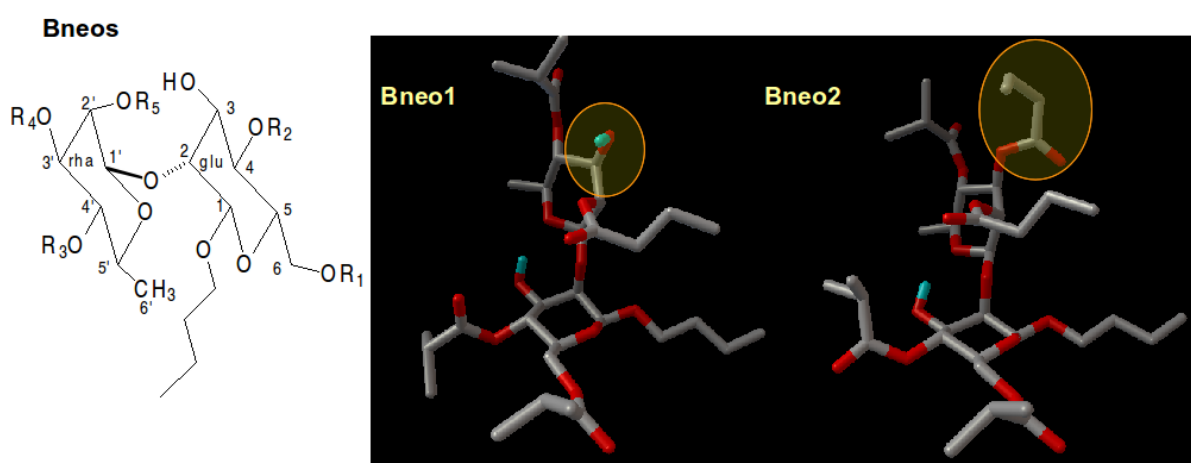


Figura 10. Fórmulas y estructuras tridimensionales de los nuevos inhibidores propuestos *BNeo1* y *BNeo2*. La principal diferencia estructural se muestra en amarillo.

Las conformaciones de menor energía de *docking* para el *BNeo1* y el *BNeo2* se ubicaron en los sitios P1 y P2, sin diferencias energéticas significativas entre ellos (0,5 kcal/mol). Las energías de *docking* en el sitio P1 fueron de -16,28 y -16,66 kcal/mol, para *BNeo1* y *BNeo2*,

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

respectivamente (Tabla 2). Ambos compuestos presentan su conformación de mayor afinidad en el sitio P2 con energías de *docking* de -16,73 y -16,87 kcal/mol para el *BNeo1* y *BNeo2*, respectivamente. El análisis conformacional reveló que ambos *BNeos* tienen un especificidad menor por el sitio P1 que la encontrada para el XR9576. Asimismo, se ubican en todos los sitios descriptos para los sustratos y, en todos los casos, con energías de *docking* 2 kcal/mol menores que la de sustratos. Si bien las afinidades de *BNeo1* y *BNeo2* son similares, este último posee mayor especificidad en sus conformaciones de menor energía por los sitios P1 y P2 que el *BNeo1* (Figura 11) Por lo tanto, el *BNeo2* muestra un comportamiento similar al hallado para XR9576, tanto en sus sitios de unión como en la magnitud de su afinidad por estos sitios. En la Figura 12 se muestra la superposición de las conformaciones más estables para la rodamina 6G, XR9576 y *BNeo2*.

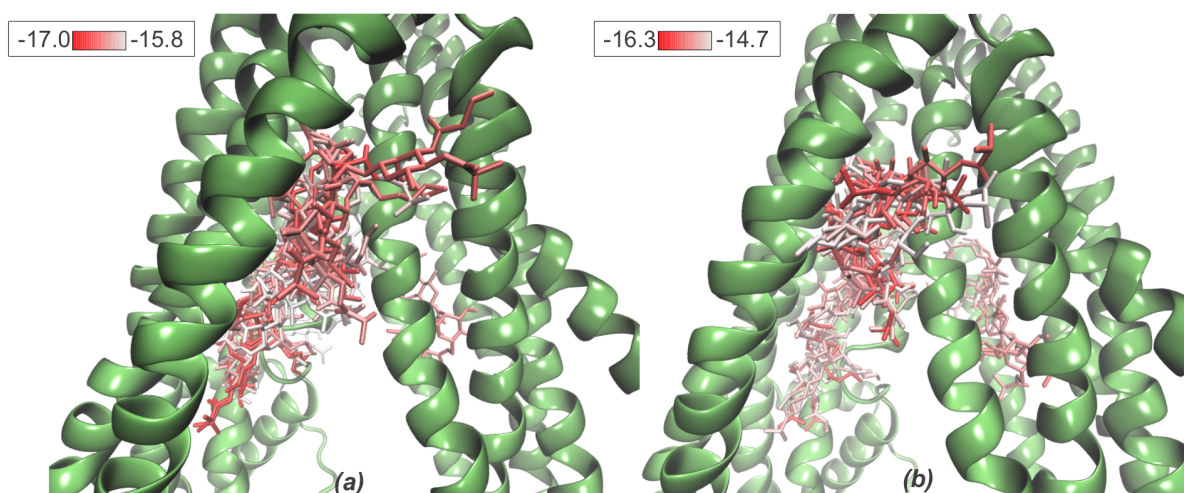


Figura 11: Superposición de las primeras 20 conformaciones de mínima energía coloreadas de acuerdo a su energía de *docking* (correspondiente a la escala de color en cada figura). *BNeo2* a) posee mayor cantidad de estructuras en el sitio de los sustratos y con energías más favorables que *BNeo1* b).

También en el modelo humano, los *BNeos* mostraron un patrón de unión similar al mostrado en el caso de ratón. Aunque en el caso del *BNeo2* con una mayor afinidad que el XR9576 por la proteína (Tabla 3).

De esta forma, según los resultados obtenidos mediante *docking* molecular el *BNeo2* tendría una mayor potencia moduladora que el *BNeo1*, lo cual concuerda con las observaciones hechas por el Dr. Tegos a nivel experimental.³⁰

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

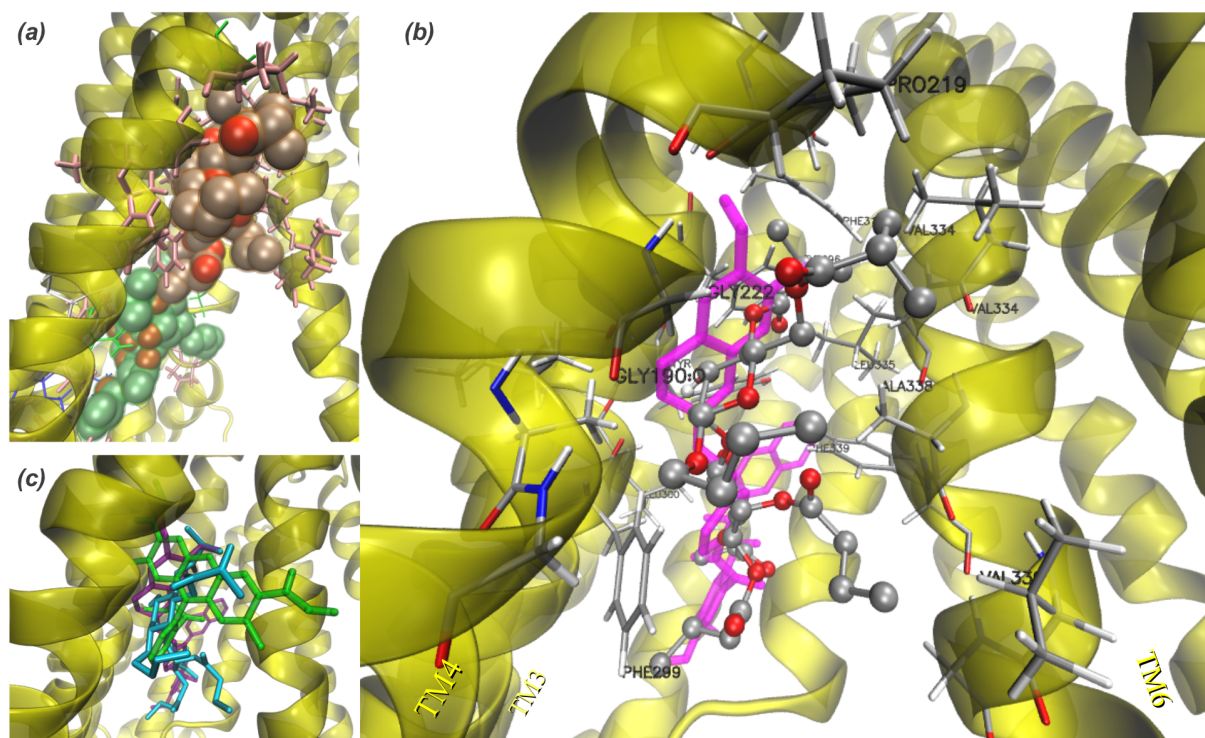


Figura 12: a) Las dos conformaciones de más baja energía de docking encontradas para el BNeo2. La verde (-16,91kcal/mol) solapa con los sitios primario y secundario de rodamina. La próxima en energía (ocre) ocupa plenamente el sitio P1. Los aminoácidos hidrofóbicos están coloreados en rosa. b) Pose del BNeo2 (-16,87kcal/mol) que comparte la mayor cantidad de aminoácidos hidrofóbicos que contacta el XR9576 (en fucsia). c) Superposición de las estructuras del BNeo2 (en ciano), rodamina 6G (en verde) y XR9576 (en violeta) en el principal sitio de sustratos (P1).

3.6. Construcción de la P-gp de ratón inserta en una membrana lipídica

Los cálculos de *docking* mostrados hasta el momento se basan en la aproximación de que la región de TMD de la P-gp está inmersa en un medio acuoso y no en una bicapa lipídica, la cual correspondería al ambiente natural en el que se encuentra la P-gp. Por lo tanto, para controlar los resultados de docking se construyó un modelo de P-gp de ratón inserta en una membrana lipídica. Se utilizó una membrana compuesta solamente de 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (POPC), el lípido más abundante en las bicapas lipídicas de mamíferos. El hecho de utilizar sólo un tipo de fosfolípido y no una bicapa real, es que esta última es muy compleja, tanto en componentes como en dimensiones, lo que hace muy complicado su simulación con los métodos y alcances computacionales actuales.

Para la construcción de este modelo se utilizó una membrana lipídica POPC pre-equilibrada, donde cada molécula de lípido se parametrizó usando GAFF.⁴⁷ La estructura de la membrana con el lípido ya parametrizado fueron gentilmente otorgados por el Prof. Dr.

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

Martinek.⁴⁷ El alineamiento fue hecho manteniendo el eje de inercia Z de la P-gp perpendicular al plano de la membrana. La membrana se ubicó de forma tal que el plano compuesto por los residuos de colina quede alineado con los residuos triptófano de la P-gp (Figura 13).^{v,48} De este alineamiento resultaron solapados proteína y lípidos. Luego, se siguió un protocolo similar al utilizado por Kandt *et al.*,⁴⁹ el cual consiste en separar los lípidos expandiendo las dimensiones de la caja de simulación en el plano xy , mientras se mantiene la proteína fija en el centro de la caja. Los lípidos que aún estaban solapados con la proteína fueron eliminados, manteniendo siempre la paridad de la cantidad de lípidos entre las dos capas de la bicapa. Posteriormente, se realizaron 25 pasos de contracción de las dimensiones de la caja y cada uno de estos pasos fue seguido de una optimización estructural mediante 1100 pasos de gradiente conjugado (Figura 14). Finalmente, el sistema fue solvatado con moléculas de agua TIP3P y neutralizado con contraiones. Seguido a la solvatación la energía del sistema se minimizó con 2000 pasos adicionales de gradiente conjugado (manteniendo toda la proteína fija). De esta forma se obtuvo un sistema P-gp/POPC/TIP3P armado, pero no

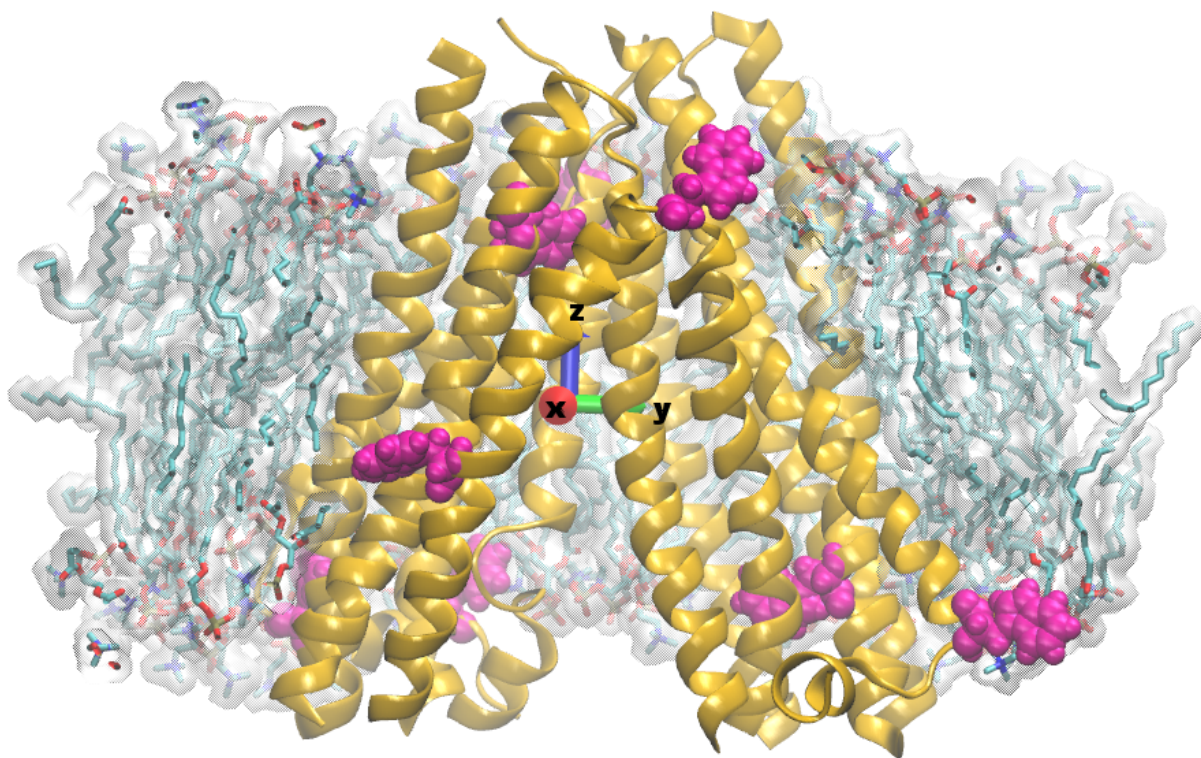


Figura 13: P-gp de ratón (backbone en cintas doradas) alineada con la membrana POPC. En magenta se muestran a los aminoácidos triptófanos que sirvieron para el alineamiento. En el medio de la imagen se muestra que la proteína se encuentra alineada con el eje de coordenadas y la membrana sobre el plano x - y . Para mayor simplicidad no se muestran las regiones **NBDs**.

v Una generalidad de las proteínas de transmembrana es que poseen aminoácidos tirosina y triptófano que se encuentran ubicados en el mismo plano de los grupos colina de la membrana (ver ref. 48)

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

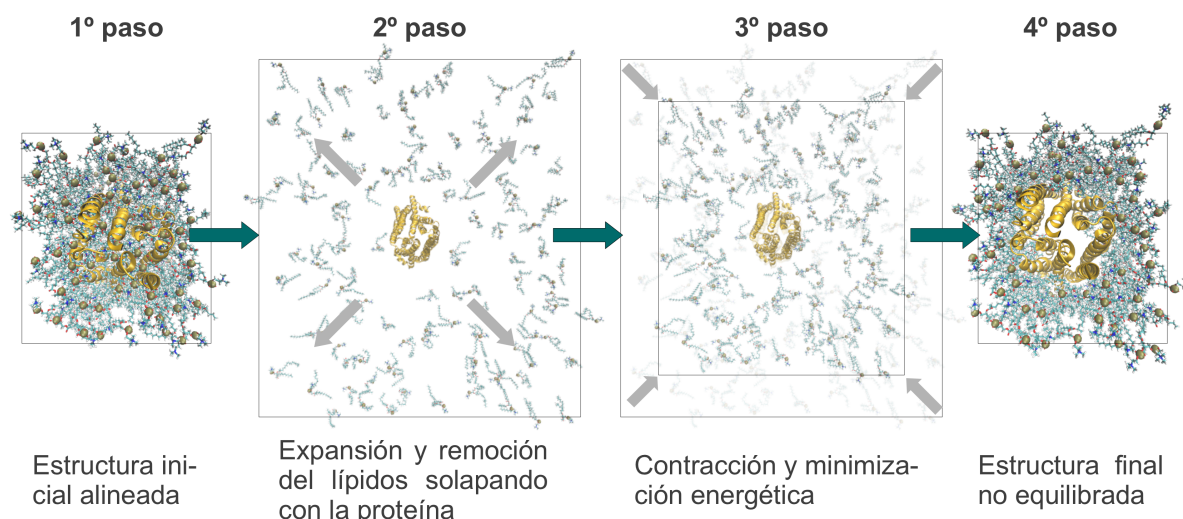


Figura 14: Protocolo seguido para el armado de la P-gp de ratón inserta en una membrana POPC. En el 1° paso se alinea la proteína y la membrana, en el 2° se expande la caja en las dimensiones x-y y con ellas las coordenadas del centro de masa de los lípidos en el mismo plano. Esto es seguido del 3° paso, en el cual se realizan pequeños pasos de contracción de la caja en el plano x-y, cada paso es seguido de una optimización de la geometría. Luego de varios pasos de contracción/optimización se llega a la estructura final del sistema no equilibrada. En la figura se muestra a la proteína en cintas doradas y los lípidos en licorice y los fósforos del grupo fosfato de cada lípido en ocre.

equilibrado. Para llevar a cabo esto último se equilibró la membrana (manteniendo fijas las posiciones de los átomos de la proteína) con 38 ns de **DM** a presión y temperatura constantes (1 bar y 310 K, respectivamente) usando el programa NAMD. Como la proteína se mantuvo fija, se simuló sólo la parte inserta en la membrana. De esta forma, se ahorró tiempo computacional al utilizar una caja de menores dimensiones, 89x90x95 Å (Figura 13). La equilibración de la membrana se siguió mediante el monitoreo de la energía potencial total del sistema y de la de interacción proteína-lípido.

Finalmente, se obtuvo un modelo P-gp/membrana con una membrana equilibrada útil para realizar docking, puesto que las coordenadas de la proteína son las mismas que las cristalográficas.^{vi}

Sin embargo, la equilibración del sistema prosigue, ahora liberando las cadenas laterales de los aminoácidos mientras se mantiene restringido el *backbone* de la proteína. Esto se debe a que el objetivo final es obtener un sistema equilibrado, no sólo a nivel de membrana sino del sistema entero, para poder realizar futuras simulaciones de dinámica molecular P-gp libre y P-gp/ligandos de tiempo tan largo como 20 ns sin riesgo de que la proteína se desnaturalice por no estar en un ambiente adecuado.

^{vi} Salvo pequeños cambios que son producto de minimizaciones de la geometría inicial realizadas para eliminar posiciones atómicas muy cercanas de átomos no enlazados.

3.7. DM de los complejos P-gp/sustrato y P-gp/modulador en el sitio P1.

A fin de lograr introducir los efectos dinámicos que ejercen los ligandos sobre la proteína y que están ausentes en el enfoque de docking estático (en el cual la proteína se mantiene fija), se realizaron simulaciones **DM** con una duración de al menos 4 ns para la enzima de ratón unida a ligandos. El tiempo de simulación de la **DM** es acotado debido a que estas simulaciones se llevan a cabo en una caja de moléculas de agua, sin membrana. Si se emplearan tiempos de simulación más prolongados, se podrían producir cambios en la estructura secundaria o terciaria de la proteína (desnaturalización). Por otro lado, un tiempo de 4 ns de **DM** se puede considerar suficiente para el objetivo de lograr una mejor comprensión de la naturaleza de las interacciones con los inhibidores mediante la revelación de las características dinámicas de los modos de unión de los complejos. Además de las simulaciones de los complejos P-gp/ligando, se realizó la simulación de la enzima libre, es decir sin ligando, a fin de comparar cambios conformacionales o de interacciones (formación y ruptura de puentes de hidrógeno, interacciones π - π , hidrofóbicas, puentes salinos, etc). Asimismo, esta simulación es útil para tener certeza de que los cambios conformacionales que pudieran ocurrir en los complejos P-gp/ligando se deban a la interacción molecular y no a las condiciones de simulación (sin membrana).

El **RMSD** del *backbone* de la enzima libre muestra que ésta se estabilizó a partir de los 700 ps, manteniéndose por debajo de 3,5 Å hasta el final de la simulación (en la Figura 15 se muestran el **RMSD** del *backbone*, de toda la estructura y de los distintos dominios). En el caso de los complejos P-gp/XR9576, P-gp/GP240 y P-gp/rodamina, se observaron valores de **RMSD** similares.

Los conformeros más estables de rodamina 123, Gp240 y XR9576 en la P-gp fueron utilizados como estructura inicial para ejecutar la simulación **DM**, que se extendió hasta ~5 ns. Estas simulaciones se compararon entre sí y contra la enzima libre. En el caso del XR9576, su conformero más estable ocupa tanto el sitio P1 como el P2 (Figura 6).

3.7.1. Energía Libre de Interacción

El análisis energético de los complejos se realizó a través de SIETRAJ,⁵⁰ utilizando el

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

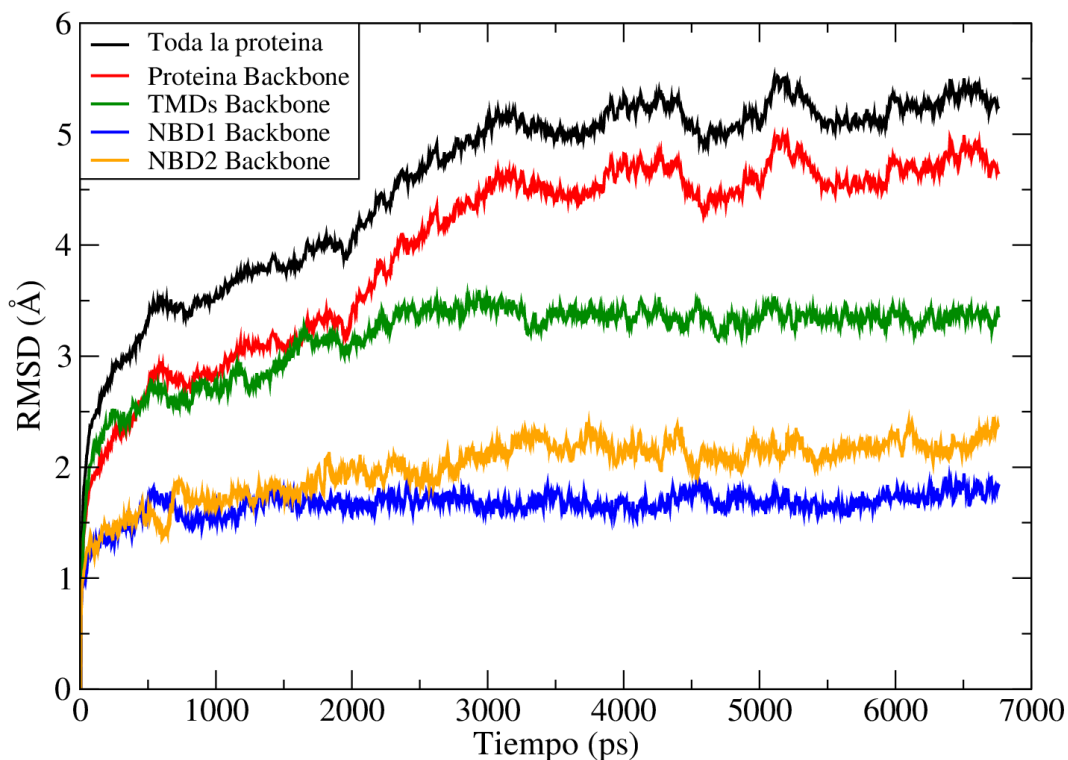


Figura 15: RMSD de toda la proteína, del backbone de la proteína, de todo el dominio de transmembrana (TMDs) y de los dos dominios de unión de nucleótidos (NBD1 y NBD2)

último nanosegundo de cada simulación. A través de su análisis se logra determinar la energía libre de unión y sus componentes (interacciones de van der Waals, electrostáticas, cavitación, etc.; sección 2.13 del Capítulo 2). Los valores de energía libre de unión obtenidos a partir de la dinámica siguen el mismo orden relativo obtenido de los estudios de *docking* (Tabla 2), es decir, la estabilidad de XR9576 y GP240 uniéndose al sitio P1 es alrededor de 6 y 2 kcal/mol mayor respectivamente que la unión de rodamina. Este hecho confirma las consideraciones anteriores acerca de las afinidades relativas de los inhibidores a los sitios y la importancia relativa de los diferentes sitios, a pesar de las limitaciones del enfoque del *docking* molecular. La contribución favorable (negativa) más importante en todos los casos es del tipo van der Waals. Asimismo, el GP240 y el XR9576 también tienen contribuciones favorables de interacción electrostática y cavitación (Figura 16). Sin embargo, el $\Delta G_{unión}^R$ (campo de reacción; sección 2.13 del Capítulo 2) es más desfavorable que en GP240. Mientras tanto en el caso de rodamina 123, este último tipo de contribución es favorable y, a su vez, la contribución electrostática es desfavorable (Figura 16). Esto último puede deberse a que la carga positiva de la Lys230 (Lys234) se mantiene cercana a una distancia que varía entre los 9 y 15 Å de la rodamina 123 (catión hidrofóbico).

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

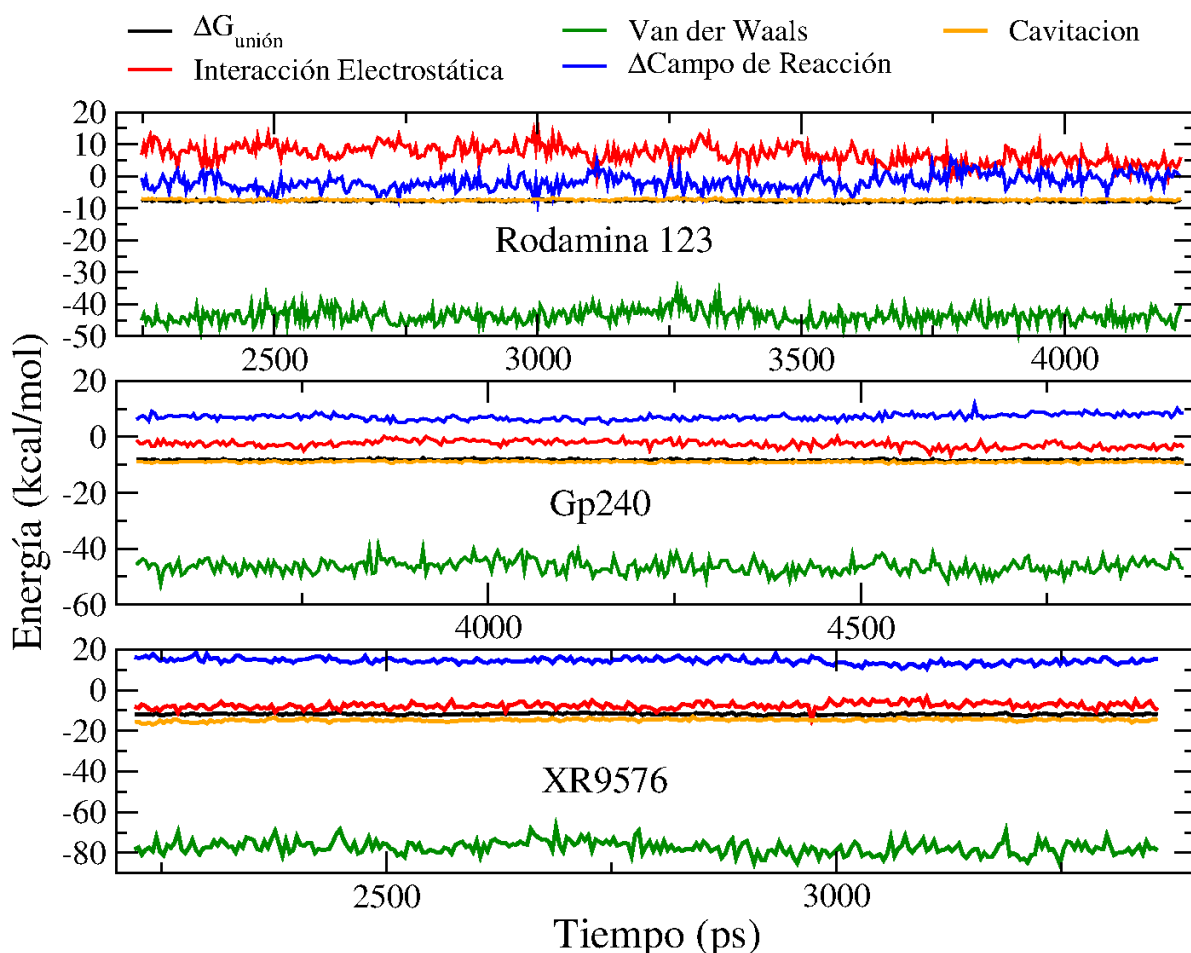


Figura 16: Análisis energético con SIETRAJ para el sustrato modelo rodamina 123 y los moduladores GP240 y XR9576. Se puede apreciar que en todos los casos el principal aporte energético a la estabilidad corresponde a la interacción de van der Waals y Cavitación.

3.7.2. Análisis de Contactos Cercanos y Movilidad

El análisis de la trayectoria de **DM** permitió identificar cuáles son los aminoácidos más cercanos a cada sustrato (es decir, a una distancia no mayor a 4 Å) y el porcentaje del tiempo de simulación en el que se mantienen dentro de esa distancia, es decir el grado de persistencia en la interacción. Con los datos recolectados se construyó un histograma de la persistencia de la interacción versus el aminoácido, que se muestra en la Figura 17 como picos de color rojo, cuya máxima intensidad (100%) indica que están en contacto con el ligando dentro de un radio de 4 Å en todo el tiempo de producción de la trayectoria (aproximadamente desde los 1000 ps). Esta figura se encuentra resumida en la Tabla 4 en la cual se muestran los residuos con un porcentaje de persistencia de interacción mayor al 50% para rodamina 123, GP240 y XR9576. Además, muchos de los residuos que interaccionan tanto con rodamina 123, GP240 o XR9576 fueron propuestos recientemente en forma experimental (Tabla

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

4).^{38,39,51,52,53,54,55,56,57,58,59} Dentro de estos residuos, los aminoácidos S222 (TM4), I306 (TM5), V338 (TM6) y A342 (TM6), son comunes para la rodamina 123, GP240 y XR9576. La mayoría de los contactos de la conformación original de *docking* se conservan, y otros nuevos se forman debido a que algunos aminoácidos hidrofóbicos se acercan al inhibidor. Incluso en el caso de GP240, que se une con mucha menos afinidad a la P-gp que el XR9576, el TM12 se acerca al ligando formando contactos con Phe979 (Phe983) y Met982 (Met986).

Por otra parte, la unión de XR9576 reduce la movilidad de toda la proteína (comparando principalmente en los TMs que pertenecen al sitio P1 en las trayectorias de DM de la enzima libre y del complejo). La movilidad de los residuos en el complejo P-gp/XR9576 y de la proteína libre se muestran en la Figura 17 como factores de movilidad β en verde y violeta, respectivamente.

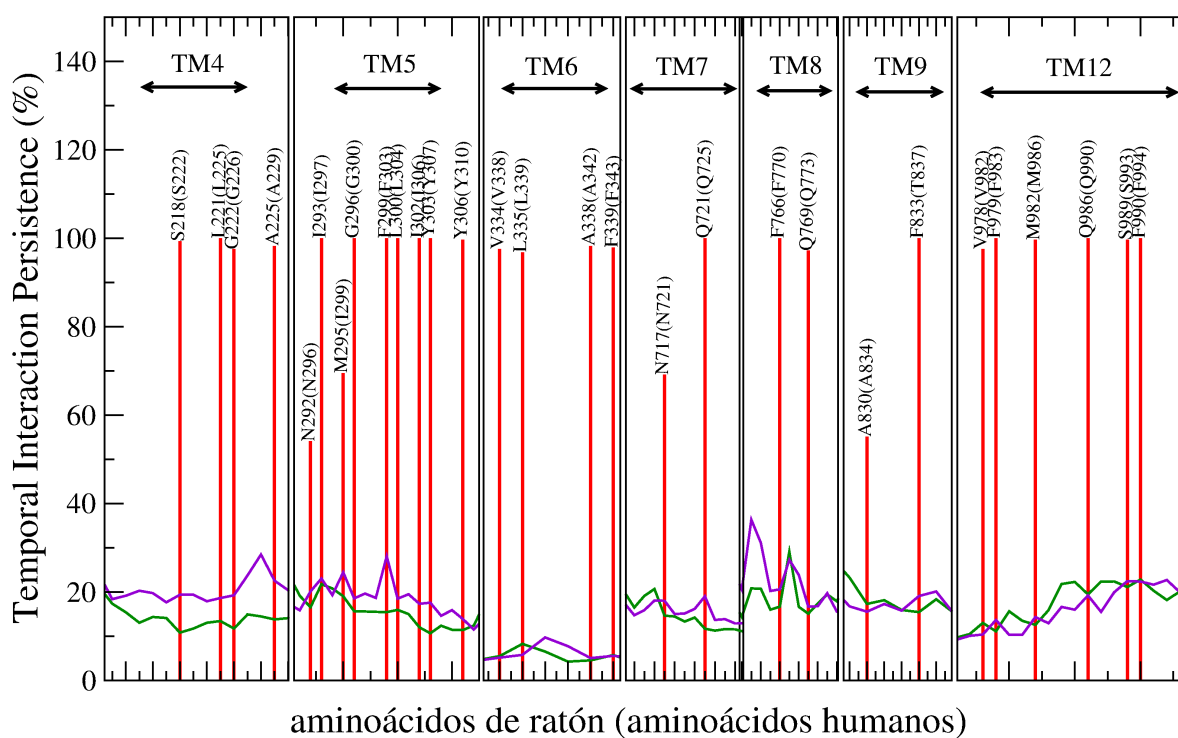


Figura 17: Porcentaje (%) de persistencia de las interacciones de los aminoácidos en el sitio P1 a lo largo de la simulación de DM en el complejo XR9576 (los residuos en contacto con cerca de 4 Å en rojo (100% intensidad máxima indica que están en contacto con el inhibidor en todo el tiempo entre 1000 a 4000 ps de la trayectoria). Factores beta (movilidad) de los residuos para el complejo y la proteína libre en verde y violeta, respectivamente. Aminoácidos de ratón P-gp (entre paréntesis humanos P-gp).

La unión de XR9576, produce cambios conformacionales que no se observan ni en la proteína libre ni en el complejo de ésta con el GP240. El más importante, de dichos cambios, es que la separación de los **NBD** aumenta con el tiempo, desde 46 Å iniciales a 56 Å a los 4

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

Tabla 4: Aminoácidos (a.a.) de la P-gp de ratón que interaccionan con residuos a un radio de 4Å de la P-gp.

TM	a.a. Ratón	Sustrato	Moduladores				Referencia
	(a.a. Humano)		R123	GP240	XR9576	BNeo2	
3	T195(T199)					X	[51]
	F196(F200)						
	G199(G203)						
4	I214(I218)			X(40%)			[52,53]
	L215(L219)						
	S218(S222)	X	X	X	X		
	P219(P223)	X					
	L221(L225)	X	X	X	X		
	G222(G226)	X	X	X	X		
	L223(L227)	X					
	A225(A229)		X	X	X		
	G226(A230)	X	X		X		
	A229(A233)		X		X	X	
S233(S237)					X(40%)		
5	N292(N296)			X(40%)		X	[53]
	I293(I297)			X		X	
	M295(I299)			X(60%)	X	X	
	G296(G300)			X		X	
	F299(F303)		X	X	X	X	
	L300(L304)	X	X	X			
	I302(I306)	X	X	X	X		
	Y303(Y307)		X	X	X		
	A304(A308)	X					
	Y306(Y310)	X	X	X	X		
6	V334(V338)	X	X		X(40%)		[38]
	L335(L339)			X			[39,55]
	G337(G341)	X					
	A338(A342)	X	X	X	X		[39,55]
	F339(F343)		X	X			[54]
	V341(V345)	X	X		X		
	G342(G346)		X		X		[56]
	S345(S349)		X		X		
I348(I352)					X(40%)		
7	I711(V715)					X(40%)	[57]
	A7149A718)					X	
	N717(N721)			X		X(40%)	
	Q721(Q725)		X	X			
8	F766(F770)			X		X	
	Q769(773)			X		X	
	G770(G774)					X(30%)	
	F773(F777)					X	
9	K822(K826)					X	
	G823(G827)					X	
	G826(G930)					X	
	L829(L833)					X	
	A830(A834)			X(50%)		X	
	F833(T(T837)			X		X	

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

Continuación Tabla 4

12	V978(V982)			X			[39,51,55]
	F979(F983)		X	X			
	M982(M986)	X	X	X		X	[58]
	G985(G989)					X	[58]
	Q986(Q990)			X	X	X	[59]
	S989(S993)			X		X	
	F990(F994)			X		X	
	A991(A995)					X	
	P992(P996)					X	

*ubicado en el sitio P2

ns. Este comportamiento pareciera concordar con las conclusiones de Clarke *et al.*, quien propone que un inhibidor produce una separación de los **NBD**, evitando así el acoplamiento para la hidrólisis de ATP.⁶⁰

3.7.3. Análisis de Puente de Hidrógeno

La rodamina 123 tiene 5 grupos aceptores de puente de hidrógeno y 2 donores. Sin embargo, no forma puentes hidrógenos con una persistencia mayor al 10%. Por otro lado, los moduladores participan de las interacciones de puente hidrógeno con una persistencia variada. Por ejemplo, el grupo NH del GP240 (Esquema 1) actúa como donador de puente de hidrógeno interaccionando con el oxígeno del *backbone* de la Ala338(Ala342) con un 55% de persistencia (Figura 18). Este puente hidrógeno actuaría como un ancla para facilitar la orientación de los restos hidrofóbicos de GP240 en el interior del bolsillo del sitio P1. Por otro lado, el nitrógeno quinolínic del XR9576 fue el grupo aceptor de puente hidrógeno en la interacción (98% de persistencia) entre éste y el hidrógeno del grupo amida de la cadena lateral del Gln721(Gln725). Asimismo, también tiene capacidad donadora, formando un puente de hidrógeno con la Gln986 (Gln990) con una persistencia del 55% (Tabla 5). Resulta importante destacar que estos aminoácidos que participan de la interacción de puentes de hidrógeno fueron propuestos sobre bases experimentales para participar de la unión (Tabla 4).

Como se mencionó en el Capítulo de introducción, se propuso que la capacidad aceptora de puentes hidrógeno,²⁹ es una de las principales características de un modulador. En este Capítulo, se observa que la capacidad moduladora no está dada principalmente por potenciales grupos aceptores de puentes hidrógeno, debido a que el XR9576 sólo forma un puente hidrógeno como aceptor teniendo 10 grupos aceptores. El planteo sugerido en esta

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

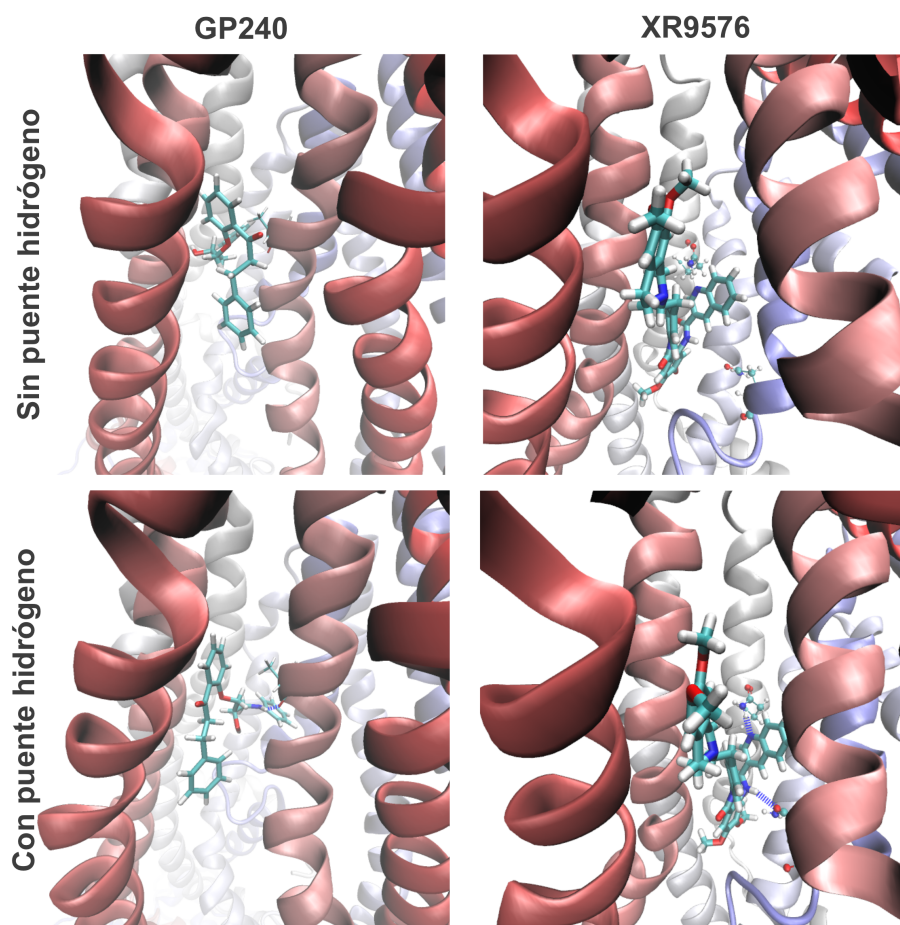


Figura 18: Sólo los puentes hidrógeno para GP240 y XR9576. En ambos casos, los inhibidores actúan como donores de los puentes hidrógeno, y la persistencia de la interacción no es mayor al 50% de la trayectoria equilibrada de la dinámica molecular.

Tesis es que la hidrofobicidad y flexibilidad de la molécula tienen una relevancia mucho más destacada en la capacidad inhibitoria.

Tabla 5: Puentes de hidrógeno formados entre la P-gp y los distintos moduladores probados.

	GP240	XR9576	BNeo2 sitio P1	BNeo2**
Nº puentes de hidrógeno*	1	2	1	1
Aminoácido	A338(A342)	Q721(Q725)	S345(S349)	N292(N296)
TM	6	7	6	5
Persistencia%	55	98	94	86
Donor/Aceptor	Donor	Aceptor	Aceptor	Aceptor
Aminoácido	---	Q986(Q990)	---	---
TM	---	12	---	---
Persistencia%	---	55	---	---
Donor/Aceptor	---	Donor	---	---

* con Persistencia mayor al 50%

**en su conformación de más baja energía

3.7.4. Análisis del comportamiento dinámico de los *BNeos*

Los *BNeos* mostraron ser potenciales moduladores a nivel de *docking* y experimental.³⁰ Un hecho a destacar es que *BNeo2* mostró mayor afinidad por ambos sitios de sustratos que el *BNeo1*. Además, a nivel experimental, una comparación similar llevó a los mismos resultados, es decir, con el *BNeo2* exhibiendo mayor potencial de inhibición y mayor espectro de acción.

El *BNeo2*, en las dos primeras conformaciones de menor energía, se localizó tanto en el sitio P1 y el sitio P2, a diferencia del XR9576, el cual debido a su extensión y flexibilidad ocupó ambos sitios. A fin de evitar descartar alguna posibilidad, se simuló el *BNeo2* en ambos sitios mediante **DM**.

En el análisis energético, calculado con SIETRAJ,⁵⁰ ambos sitios mostraron un comportamiento semejante al de los moduladores mostrados en la Figura 16, donde el principal aporte energético a la estabilidad de la interacción es debido a la parte hidrofóbica. Sin embargo, el $\Delta G_{\text{unión}}$ calculado para el *BNeo2* fue inferior al del XR9576 en 2,5 kcal/mol, un resultado opuesto al encontrado por *docking*, donde el *BNeo2* mostró ser más estable que el XR9576 en 1 kcal/mol. Sin embargo, el *BNeo2* siguió siendo teniendo una afinidad mayor que el modulador GP240 (1,1 kcal/mol) y el sustrato rodamina 123 (1,5 kcal/mol, ver Tabla 2), lo cual demostraría su potencial actividad moduladora.

En el análisis de contactos cercanos, el *BNeo2* comparte muchos de los aminoácidos que también interaccionan con el XR9576. Sin embargo, una mayor cantidad de aminoácidos informados en bibliografía se encuentran interaccionando con *BNeo2* en el sitio P1 en comparación con la simulación en el sitio P2. Esto, sumado a la insignificante diferencia energética en el $\Delta G_{\text{unión}}$ entre ambos sitios, confiere otra evidencia más al planteo de que el sitio P1 es el principal sitio de unión.

Por otro lado, la movilidad de la proteína se modifica solamente por la simulación en el sitio P2, disminuyendo la de los aminoácidos pertenecientes al **TM5**.

El *BNeo2*, a pesar de tener 15 grupos aceptores y un grupo donador, forma un sólo puente de hidrógeno en ambas simulaciones. Estas interacciones son muy persistentes y, en ambas, actúa como aceptor. Este comportamiento se asemeja mucho al observado para el XR9576, descrito anteriormente. Así se podría confirmar, según estos resultados, que la capacidad formadora de puente hidrógeno no es la principal característica a buscar en un modulador.

3.8. Lipofilicidad (LogP)

Los moduladores presentan algunas características comunes a las de los sustratos, interaccionan con un sitio de unión y, en muchos casos, también son transportados por la P-gp. El modo de acción de los moduladores pareciera estar conectado con la presencia de la membrana, y con su rápida velocidad de difusión a través de ella.⁶¹ Mientras que los sustratos de la P-gp tienen una velocidad relativamente lenta en comparación con la de los moduladores.⁶² Entonces, se propuso que los sustratos y moduladores presentan un comportamiento similar respecto a P-gp, siendo ambos transportados por ella mediante la hidrólisis de ATP. Tanto unos como otros son expulsados, reingresan en la bicapa lipídica, donde son captados por la P-gp para ser nuevamente expulsados al exterior celular. De este modo, los sustratos tendrían un reingreso en la bicapa muy lento, mientras que el de los moduladores sería muy rápido, y el mecanismo de inhibición es que la proteína se encuentra la mayor parte del tiempo expulsando a un modulador y no al sustrato. Resumiendo, este modelo sugiere, que un modulador es un compuesto con una alta afinidad por el sitio de sustratos y con una alta velocidad de difusión a través de la membrana.^{63,64}

Así, anteriormente se mostró la gran afinidad de los moduladores por los sitios de sustratos y que los *BNeos* muestran características similares al modulador de tercera generación, XR9576; especialmente el *BNeo2*. Sin embargo, queda abierta la pregunta si la relación principalmente energética hallada para los moduladores, guarda relación con su coeficiente de partición agua/membrana lipídica y, por consiguiente, con la velocidad de difusión a través de la membrana.

Para ello, se calculó el LogP del coeficiente de partición octanol/agua, utilizándose como aproximación 1,2-dicloroetano/agua (de aquí en más simplemente dicloroetano).^{vii} El LogP se aproxima como la diferencia entre las energías libres de solvatación en agua (W) y en dicloroetano (DCE), como sigue:

$$\begin{aligned} \log(P) &\approx \{ \Delta G_{solv}^W - \Delta G_{solv}^{DCE} \} \\ &\approx \{ \Delta \Delta G_{solv} \} \end{aligned} \quad (3.1)$$

donde la diferencia de solubilidades se puede reescribir como $\Delta \Delta G_{solv}$. El ΔG_{solv} en cada

vii En lugar de *n*-octanol, los cálculos se realizaron usando 1,2-dicloroetano, por ser el más cercano en el valor de ϵ de los solventes disponibles en el paquete gaussian 03.

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

solvente se define como el cambio en energía libre necesaria para llevar al compuesto desde la fase gaseosa hacia la fase solvente en su geometría optimizada en fase gaseosa.

Los resultados mostraron que los mejores moduladores (con mayor afinidad por el sitio de unión de sustratos) son más liposolubles, es decir presentan un LogP o un $\Delta\Delta G_{\text{solv}}$ más positivo. Por ejemplo, en la Tabla 6 se puede apreciar que el XR9576 es más liposoluble que el verapamil. A su vez, el verapamil, un modulador de primera generación poco potente, tiene un LogP, similar al de los sustratos, mientras el LogP del XR9576 es significativamente mayor.

Tabla 6: Cálculo de $\Delta\Delta G$ de solubilidad agua/1,2-dicloroetano y estimación del Log P mediante el programa comercial ACDLabs

Nivel QM: BLYP/6-31+G*	Moduladores				Sustratos		
	Bneo1	Bneo2	XR9576	Verapamil	Berberina	Rodamina 6G	Rodamina 123
$\Delta\Delta G_{\text{solv}}$	5,18	10,18	6,17	2,37	1,44	3,6	-0,33
LogP(ACDLabs)	5,93	8,07	6,38	3,90	-0,99	6,62	1,21
LogP empírico	---	---	---	---	---	2,62	---

Asimismo, los *BNeos* presentaron una lipofiliidad similar al del XR9576, sugiriendo otra evidencia de que son moduladores con potencia semejante a la de un modulador de tercera generación. Siguiendo los valores de LogP, nuevamente se observa que el BNeo2 sería más potente que el *BNeo1*, lo cual se condice con los datos experimentales de inhibición llevados a cabo por el Dr. Tegos y es racionalizado por la sustitución de un grupo OH (hidrofílico) por un éster butílico (hidrofóbico) en su estructura (Figura 10).

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

- 1 Rosenberg, M. F., Callaghan, R., Ford, R. C., and Higgins, C. F. (1997) Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis., *Journal of Biological Chemistry* 272, 10685-10694.
- 2 Rosenberg, M. F., Callaghan, R., Modok, S., Higgins, C. F., and Ford, R. C. (2005) Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state., *The Journal of Biological Chemistry* 280, 2857-2862.
- 3 Chang, G., and Roth, C. B. (2001) Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters., *Science* 293, 1793-1800.
- 4 Chang, G. (2003) Structure of MsbA from *Vibrio cholerae*: A Multidrug Resistance ABC Transporter Homolog in a Closed Conformation, *Journal of Molecular Biology* 330, 419-430.
- 5 Stenham, D. R., Campbell, J. D., Sansom, M. S. P., Higgins, C. F., Kerr, I. D., and Linton, K. J. (2003) An atomic detail model for the human ATP binding cassette transporter P-glycoprotein derived from disulfide cross-linking and homology modeling. *FASEB journal* 17, 2287-9.
- 6 Shilling, R. a, Venter, H., Velamakanni, S., Bapna, A., Woebking, B., Shahi, S., and van Veen, H. W. (2006) New light on multidrug binding by an ATP-binding-cassette transporter., *Trends in Pharmacological Sciences* 27, 195-203.
- 7 Vandevuer, S., Van Bambeke, F., Tulkens, P. M., and Prévost, M. (2006) Predicting the three-dimensional structure of human P-glycoprotein in absence of ATP by computational techniques embodying crosslinking data: Insight into the mechanism of ligand migration and binding sites, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 63, 466–478.
- 8 Pleban, K., Kopp, S., Cszasz, E., Peer, M., Hrebicek, T., Rizzi, A., Ecker, G. F., and Chiba, P. (2005) P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach, *Molecular Pharmacology* 67, 365-374
- 9 Omote, H., and Al-Shawi, M. K. (2006) Interaction of transported drugs with the lipid bilayer and P-glycoprotein through a solvation exchange mechanism., *Biophysical Journal* 90, 4046-4059.
- 10 Chang, G., Roth, C. B., Reyes, C. L., Pornillos, O. Chen, Y.-J. and Chen, A. P. Retraction, *Science*, 314 (2006) 1875.
- 11 Dawson, R. J. P., and Locher, K. P. (2006) Structure of a bacterial multidrug ABC transporter., *Nature* 443, 180-185.
- 12 Dawson, R. J. P., and Locher, K. P. (2007) Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* in complex with AMP-PNP., *FEBS letters* 581, 935-938.
- 13 Sav1866 es capaz de transportar sustratos típicos de la P-gp humana, como también ser inhibido por verapamil. Ver: Velamakanni, S., Yao, Y., and Gutmann, D. (2008) Multidrug Transport by the ABC Transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus*, *Biochemistry* 47, 9300-9308.
- 14 O'Mara, M. L., and Tieleman, D. P. (2007) P-glycoprotein models of the apo and ATP-bound states based on homology with Sav1866 and MalK., *FEBS letters* 581, 4217-4222.
- 15 Globisch, C., Pajeva, I. K., and Wiese, M. (2008) Identification of putative binding sites of P-glycoprotein based on its homology model., *ChemMedChem* 3, 280-295.
- 16 Loo, T. W., and Clarke, D. M. (2002) Vanadate trapping of nucleotide at the ATP-binding sites of human multidrug resistance P-glycoprotein exposes different residues to the drug-binding site., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3511-3516.
- 17 Gutmann, D. A. P., Ward, A., Urbatsch, I. L., Chang, G., and van Veen, H. W. (2010) Understanding polyspecificity of multidrug ABC transporters: closing in on the gaps in ABCB1., *Trends in biochemical sciences* 35, 36-42.
- 18 Ecker, G., Huber, M., Schmid, D., and Chiba, P. (1999) The importance of a nitrogen atom in modulators of multidrug resistance., *Molecular pharmacology* 56, 791-796.
- 19 Aller, S. G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P. M., Trinh, Y. T., Zhang, Q., Urbatsch, I. L., and Chang, G. (2009) Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding., *Science* 323, 1718-22.
- 20 Tarcsey, Á. and Keserü, G. (2011) Homology modeling and binding site assessment of human P-glycoprotein. *Future Medicinal Chemistry* 3, 297-307.
- 21 Klepsch, F., Chiba, P., and Ecker, G. F. (2011) Exhaustive sampling of docking poses reveals binding hypotheses for propafenone type inhibitors of p-glycoprotein., *PLoS computational biology* 7, e1002036.
- 22 Thompson, J. D., Higgins, D.G., and Gibson, T. J. (1994) CLUSTALW. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- 23 Copyright © 1989-2011 Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. a, Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen,

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

- M.-Y., Pieper, U., and Sali, A. (2006) Comparative protein structure modeling using MODELLER., *Current Protocols in Bioinformatics*, Chapter 5, Unit 5.6.1-5.6.30.
- 24 <http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck/procheck.htm>
- 25 Ramachandran, G.N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. (1963). "Stereochemistry of polypeptide chain configurations". *Journal of Molecular Biology* 7, 95–99.
- 26 Loo, T. W., and Clarke, D. M. (2001) Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers., *The Journal of biological chemistry* 276, 36877-36880.
- 27 Clementi, C., Nymeyer, H., and Onuchic, J. N. (2000) Topological and energetic factors: what determines the structural details of the transition state ensemble and “en-route” intermediates for protein folding? An investigation for small globular proteins., *Journal of molecular biology* 298, 937-53.
- 28 Globisch, C., Pajeva, I. K., and Wiese, M. (2006) Structure-activity relationships of a series of tariquidar analogs as multidrug resistance modulators., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, 1588-1598.
- 29 Ecker, G., Chiba, P., Hitzler, M., Schmid, D., Visser, K., Cordes, H. P., Csöllei, J., Seydel, J. K., and Schaper, K. J. (1996) Structure-activity relationship studies on benzofuran analogs of propafenone-type modulators of tumor cell multidrug resistance., *Journal of medicinal chemistry* 39, 4767-74.
- 30 Nifli, A.-P., Jara, G. E., Vera, D. M. A., Bastia, D., Prates, R., Ball, R., Higginbotham, A., Coleman, J. J., Pierini, A. B., Stermitz, F. R., Lewis, K., Holmes, A., Cannon, R., Mylonakis, E., Hamblin, M. R., Sklar, L. A., Tegos, G. (2012) The case for versatile inhibitors of microbial multidrug resistance pumps; Neohesperidosides from *Geranium caespitosum*. En tramite de envío a *Pathogens*.
- 31 Kohn, W. and Sham, I. (1965) Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Journal of Physical Review* 140, A1133-A1138.
- 32 Becke, A.D. (1988) Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A* 38, 3098–3100.
- 33 Lee, C., Yang, W. and Parr, R. G. (1988) Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B* 37, 785–789.
- 34 Gaussian 03, Revision B.04, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003; <http://www.gaussian.com>.
- 35 Suarez, D. and Merz, K.M. Jr. (2001) Molecular dynamics simulations of the mononuclear zinc- β -lactamase from *Bacillus Cereus*. *Journal of American Chemical Society* 123, 3759-3770.
- 36 Bayly, C.I., Cieplak, P., Cornell, W.D. and Kollman, P.A. The procedure of the determination of RESP charges. *Journal of Physical Chemistry* 97, 10269–10275.
- 37 Olson, A.J., Graber, P., Garrett, M.M. Goddsell, D.S. and Huey, R. Autodock 3.0.5, Copyright © 1999-2001, The Scripps Research Institute.
- 38 Loo, T. W., and Clarke, D. M. (1994) Mutations to amino acids located in predicted transmembrane segment 6 (TM6) modulate the activity and substrate specificity of human P-glycoprotein., *Biochemistry* 33, 14049-14057.
- 39 Loo, T. W., and Clarke, D. M. (1997) Identification of residues in the drug-binding site of human P-glycoprotein using a thiol-reactive substrate., *The Journal of biological chemistry* 272, 31945-31948.
- 40 Rothnie, A., Storm, J., McMahon, R., Taylor, A., Kerr, I. D., and Callaghan, R. (2005) The coupling mechanism of P-glycoprotein involves residue L339 in the sixth membrane spanning segment., *FEBS letters* 579, 3984-3990.
- 41 Loo, T. W., and Clarke, D. M. (1997) Drug-stimulated ATPase activity of human P-glycoprotein requires movement between transmembrane segments 6 and 12, *Journal of Biological Chemistry*, 272, 20986-20989.
- 42 Liscovitch, M., and Lavie, Y. (2002) Cancer multidrug resistance: a review of recent drug discovery research., *IDrugs* 5, 349-355.
- 43 Loo, T. W., Bartlett, M. C., and Clarke, D. M. (2004) Val133 and Cys137 in transmembrane segment 2 are close to Arg935 and Gly939 in transmembrane segment 11 of human P-glycoprotein., *Journal of Biological Chemistry* 279, 18232-18238.

3. Resistencia a Múltiples Drogas – P-glicoproteína

- 44 Stermitz, F. R., Lorenz, P., Tawara, J. N., Zenewicz, L. a, and Lewis, K. (2000) Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1433-1437.
- 45 Tegos, G. P., and Stermitz, F. (2002) Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 3133-3141.
- 46 Pan, G.-yu, Wang, G.-J., Liu, X.-D., Fawcett, J. P., and Xie, Y.-Y. (2002) The involvement of P-glycoprotein in berberine absorption., *Pharmacology & Toxicology* 91, 193-7.
- 47 Jójárt, B., and Martinek, T. A. (2007) Performance of the general amber force field in modeling aqueous POPC membrane bilayers, *Journal of Computational Chemistry* 28, 2051–2058.
- 48 Yau, W., Wimley, W., and Gawrisch, K. (1998) The Preference of Tryptophan for Membrane Interfaces, *Biochemistry* 37, 14713-14718.
- 49 Kandt, C., Ash, W. L., and Tieleman, D. P. (2007) Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins., *Methods* 41, 475-88.
- 50 Naïm, M., Bhat, S., Rankin, K. N., Dennis, S., Chowdhury, S. F., Siddiqi, I., Drabik, P., Sulea, T., Bayly, C. I., Jakalian, A., and Purisima, E. O. (2007) Solvated interaction energy (SIE) for scoring protein-ligand binding affinities. 1. Exploring the parameter space., *Journal of chemical information and modeling* 47, 122-133.
- 51 Loo, T. W., Bartlett, M. C., and Clarke, D. M. (2007) Suppressor mutations in the transmembrane segments of P-glycoprotein promote maturation of processing mutants and disrupt a subset of drug-binding sites., *The Journal of biological chemistry* 282, 32043-32052.
- 52 Loo, T. W., and Clarke, D. M. (2001) Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil., *Journal of Biological Chemistry* 276, 14972-14979.
- 53 Loo, T. W., and Clarke, D. M. (2000) Identification of residues within the drug-binding domain of the human multidrug resistance P-glycoprotein by cysteine-scanning mutagenesis and reaction with dibromobimane., *The Journal of biological chemistry* 275, 39272-39278.
- 54 Loo, T. W., Bartlett, M. C., and Clarke, D. M. (2003) Methanethiosulfonate derivatives of rhodamine and verapamil activate human P-glycoprotein at different sites., *The Journal of biological chemistry* 278, 50136-50141.
- 55 Ecker, G. F., Csaszar, E., Kopp, S., Plagens, B., Holzer, W., Ernst, W., and Chiba, P. (2002) Identification of ligand-binding regions of P-glycoprotein by activated-pharmacophore photoaffinity labeling and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry., *Molecular Pharmacology* 61, 637-648.
- 56 Storm, J., O'Mara, M. L., Crowley, E. H., Peall, J., Tieleman, D. P., Kerr, I. D., and Callaghan, R. (2007) Residue G346 in transmembrane segment six is involved in inter-domain communication in P-glycoprotein., *Biochemistry* 46, 9899-9910.
- 57 Loo, T. W., Bartlett, M. C., and Clarke, D. M. (2006) Transmembrane segment 7 of human P-glycoprotein forms part of the drug-binding pocket., *Biochemical Journal* 399, 351-9.
- 58 Loo, T. W., and Clarke, D. M. (1997) Drug-stimulated ATPase activity of human P-glycoprotein requires movement between transmembrane segments 6 and 12, *Journal of Biological Chemistry*, 272, 20986-20989.
- 59 Loo, T. W., and Clarke, D. M. (2008) Mutational analysis of ABC proteins., *Archives of biochemistry and biophysics* 476, 51-64.
- 60 Loo, T. W., Bartlett, M. C., and Clarke, D. M. (2003) Drug binding in human P-glycoprotein causes conformational changes in both nucleotide-binding domains., *The Journal of biological chemistry* 278, 1575-1578.
- 61 Eytan, G. D., and Kuchel, P. W. (1999) Mechanism of action of P-glycoprotein in relation to passive membrane permeation. *International Review of Cytology* 190, 175–250.
- 62 Eytan, G. D., Regev, R., Oren G., Assaraf, Y. G. (1996) The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 12897–12902.
- 63 Eytan, G. D. (2005) Mechanism of multidrug resistance in relation to passive membrane permeation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 59, 90–97.
- 64 You, G., Morris, M. E., and Wang, B. (2007) Drug transporters: molecular characterization and role in drug disposition, *Pharmacological reviews*, p 899, Wiley-Interscience.

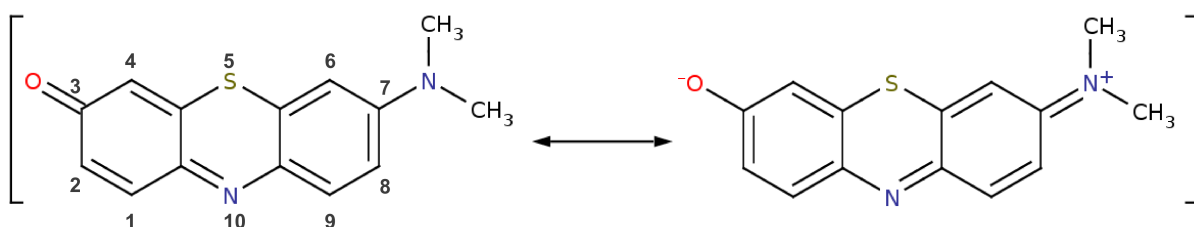
4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

Science cannot solve the ultimate mystery of nature. And that is because, in the last analysis, we ourselves are part of nature and therefore part of the mystery that we are trying to solve.

Max Karl Ernst Ludwig Planck (1858 – 1947) Físico alemán.

4.1. Introducción

Se han informado numerosas aplicaciones del Violeta de Metileno (**VM**) (Esquema 1), por ejemplo su empleo como sensibilizador en reacciones de transferencia de electrones, como se mencionó en el Capítulo 1. Sin embargo, pese a las interesantes particularidades y peculiaridades (por ejemplo, solvatocromismo atípico) que presenta este colorante (ver sección 1.2.5, del capítulo de introducción), la información básica de las propiedades de sus estados singletes y tripletes, necesaria para entender su comportamiento fotoquímico, está poco descrito en la literatura.



Esquema 1: Estructuras de resonancia del VM, junto con la numeración IUPAC.

Se planeó brindar una visión detallada de la fotofísica de este colorante que permita aportar datos y ampliar el escaso conocimiento de las propiedades informadas en

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

bibliografía.¹ Como metodología empleada para realizar este objetivo se llevaron a cabo estudios teóricos realizados en esta tesis y experimentales a través de la colaboración con el Dr. Carlos A. Chesta (Universidad Nacional de Río Cuarto). Asimismo, se buscaron los protocolos más convenientes para la comprensión a nivel básico y aplicado de este colorante, considerándolo tanto como modelo de fotosensibilizador como crómoforo *push-pull*. Para ello, inicialmente se estableció cuál es la metodología adecuada para describir el problema (funcionales, bases, modelos de solvatación, etc.) y luego se realizó una investigación sistemática sobre la influencia del solvente sobre las propiedades espectrocópicas de absorción y emisión del estado singlete basal y de absorción de los estados tripletes.

4.2. Consideraciones sobre la geometría molecular del VM

A fin de corroborar la posibilidad de conformeros interconvertibles en torno al enlace C–N(CH₃)₂ que absorbieran y emitieran en diferentes medios (propuesta por Otsuki, mencionada en la sección 1.2.5 del capítulo 1), primero se realizó un estudio conformacional en torno a este enlace. Se obtuvo una barrera de 10,5 kcal/mol para dicha rotación en metanol, utilizando un nivel B3LYP/6-311+G(d,p). Además, la optimización de estructura del primer estado excitado con los metilos a 90° del plano del anillo aromático convergió hacia la estructura con ellos alineados con dicho plano. Esta primera inspección permitió descartar esta posible explicación y fue luego confirmada al llevar a cabo la optimización sistemática de la geometría del estado fundamental y varios estados singletes y tripletes excitados en diferentes solventes, empleando diversos funcionales y modelos de solvatación (siguiente sección).

4.3. Funcionales y métodos de solvatación

El espectro de absorción del VM posee solamente un máximo de absorción en solventes apróticos, el cual presenta un corrimiento batocrómico (hacia el rojo) con el aumento de la polaridad del medio. El mismo presenta (Figura 1). En el caso de la emisión, resulta interesante que este espectro no es la imagen especular del de absorción, como usualmente lo es, presentando un máximo acompañado por uno o dos hombros. Las bandas de absorción y de emisión (tomando, en el último caso el primer máximo u hombro), presentan un corrimiento al rojo con el aumento de la polaridad del solvente

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

El estudio teórico de los espectros de absorción se realizó empleando la Teoría del Funcional de la Densidad Dependiente del Tiempo (**TD-DFT**).² Este formalismo permite estudiar las propiedades de los estados excitados, tales como las energías de absorción de excitaciones verticales y frecuencias del oscilador (proporcionales a la intensidad). Otras propiedades que se pueden estudiar son: momento dipolar, frecuencias del estado excitado, qué orbitales moleculares están involucrados en el estado excitado, potencial electrostático, su distribución de carga y propiedades electrónicas, etc. Entonces, el método de **TD-DFT** permite obtener una descripción detallada a nivel molecular tanto del estado basal como del excitado, observando los cambios provocados por la transición electrónica.

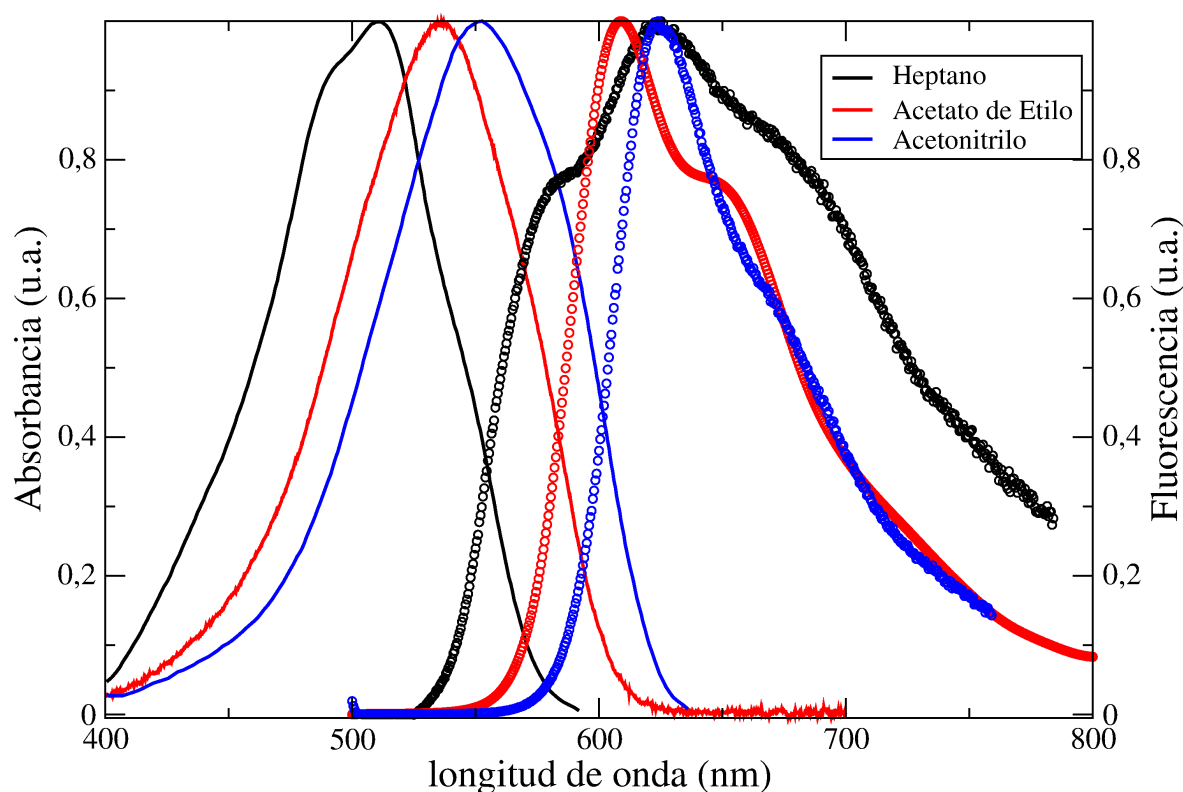


Figura 1: Espectros de absorción (en líneas) y de emisión (en puntos) del VM en solventes apróticos de diferente polaridad.

Para los cálculos de **TD-DFT**, la solvatación del VM en su estado basal se realizó empleando el modelo continuo polarizable (**PCM**),³ el cual se encuentra dentro de la aproximación de campo de reacción autoconsistente (**SCRF**, ver la sección 2.9 del capítulo 2). Este mismo modelo puede ser utilizado para la solvatación del estado excitado, aplicando algunas modificaciones para representar la transición vertical. Para ello hay dos aproximaciones distintas, una es Respuesta Lineal (**RL**) y la otra es Estado Específico (**EE**).

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

Los términos que diferencian a estos dos métodos, tienen orígenes físicos distintos: **EE** tiene en cuenta una parte de los grados de libertad del solvente para seguir los cambios en la función de onda del soluto después de la excitación, es decir una componente de polarización rápida del solvente. Este término no aparece en **RL**, el cual tiene en cuenta una corrección dinámica a la energía del estado excitado. Este término está relacionado con la respuesta del solvente a la oscilación de la densidad de carga del soluto.⁴

El primer paso en este estudio fue evaluar cuál es el funcional y método de solvatación del estado excitado (**RL** o **EE**) que predicen mejor las transiciones electrónicas del sistema observadas experimentalmente. Para ello, se compararon los funcionales B3LYP^{5,6} y PBE0,^{7,8} usando **RL** o **EE**. En ambos casos, la base utilizada fue 6-311+G(d,p) y el programa Gaussian 09.⁹ La selección de los funcionales es un paso muy importante, ya que los resultados con **TD-DFT** son muy sensibles a los funcionales de correlación-intercambio utilizados.^{10,11} Se eligió PBE0 por su exactitud, según bibliografía, en la predicción de las energías de transiciones electrónicas, principalmente aquellas que involucran tanto estados de valencia como Rydberg.^{8,12,13} A su vez, B3LYP es uno de los funcionales más empleados y versátiles, utilizado tanto en el estudio de estados excitados como en optimizaciones y en el estudio de propiedades electrónicas en general.^{13,14}

El método **RL**, con ambos funcionales, predijo máximos de absorción más cercanos a los experimentales que aquellos obtenidos con el método **EE**. Por otro lado, al compararse los dos funcionales B3LYP y PBE0, los resultados del primero fueron más cercanos a los experimentales independientemente del método de solvatación utilizado, ver Tabla 1. Por ello, de aquí en adelante, el sistema fue estudiado utilizando el funcional B3LYP y el método de solvatación para el estado excitado, **RL**.

Tabla 1: Comparación de las energías de transición calculadas (expresadas en nm) para el 1^{er} y 2^{do} estado excitado.

Solventes	B3LYP		PBE0		Experimental
	RL	EE	RL	EE	
heptano	490,43	477,18	477,78	465,13	512
acetato de etilo	530,39	492,79	487,67	480,01	536
acetonitrilo	556,28	502,8	542,21	489,47	553

Resulta necesario comentar que los cálculos descritos en esta sección se tuvieron que realizar dos veces. En la primera vez los cálculos se realizaron con la versión A.01 de Gaussian09. Sin embargo, estos resultados se tuvieron que descartar, ya que en esta versión la

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

rutina necesaria para realizar los cálculos de **EE**, no funcionaba en forma apropiada, por lo que no calculaba la componente de polarización rápida del solvente. Este inconveniente produjo que los resultados encontrados a partir de ambos métodos de solvatación fueran idénticos. En la versión B.01 este error fue corregido, de modo que los resultados obtenidos con ella son los que se muestran en este Capítulo.

Asimismo, los resultados obtenidos fueron interesantes, porque se esperaba que **EE** diera resultados más precisos que **RL**.^{10,15} Sin embargo, se logró la predicción de valores que se encuentran dentro de un error de 20 nm en el caso del heptano, como límite superior y de 3 nm en acetonitrilo, como límite inferior. Estos, errores no son significativos, siendo que el error esperado para **TD-DFT** se encuentra entre ~15-70nm^{11,13} e incluso mayores en sistemas con fuerte reorganización de carga.¹⁶ Además, es importante tener en cuenta que el colorante en estudio es un cromóforo *push-pull*, el cual involucra transferencia de carga, característica que en general, resulta problemática para el tratamiento de **TD-DFT**.^{10,11}

4.4. Absorción

4.4.1. Solvatocromismo

El máximo de absorción de VM (Figura 1) en los distintos solventes apróticos se correspondió con la primera transición electrónica que se muestra en la Tabla 2. Esta transición es HOMO→LUMO del tipo $\pi\rightarrow\pi^*$ (Figura 2).

En fase gaseosa, la primera transición electrónica correspondió a una transición HOMO-2→LUMO que es del tipo $n\rightarrow\pi^*$. Por el contrario, las transiciones que dieron origen al segundo y al tercer estado excitado fueron del tipo $\pi\rightarrow\pi^*$, siendo HOMO→LUMO y HOMO-1→LUMO, respectivamente (Figura 2). A medida que la polaridad del medio aumentaba, el orbital n se estabilizó más que el orbital LUMO, incrementando la energía de la transición $n\rightarrow\pi^*$ (Figura 2). Este hecho hizo que la transición $n\rightarrow\pi^*$ pasara de ser el primer estado excitado en fase gaseosa, a ser la segunda en heptano y la tercera en acetato de etilo y acetonitrilo. En este caso, esta transición no se observa en el espectro experimental ya que las transiciones (radiativas) $n\rightarrow\pi^*$ están prohibidas por simetría, teniendo una absorptividad molar muy baja y en el caso de los cálculos corresponden a una fuerza del oscilador cercana a cero.

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

Por el contrario, las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ presentaron un corrimiento hacia menores energías de absorción debido a que aumentó la estabilización de orbital LUMO con la polaridad del solvente, disminuyendo así la energía de esta transición (Figura 2).

El VM en su estado basal relajado (es decir con su geometría optimizada) presentó un importante momento dipolar, $|\vec{\mu}_B|$, de 10,72 D en fase gaseosa, el cual incrementó su magnitud al aumentar la polaridad del solvente, pasando de 12,90 D para heptano a 17,68 D en acetonitrilo, lo que se atribuyó a una mayor polarización de la molécula debida al solvente (Tabla 2).

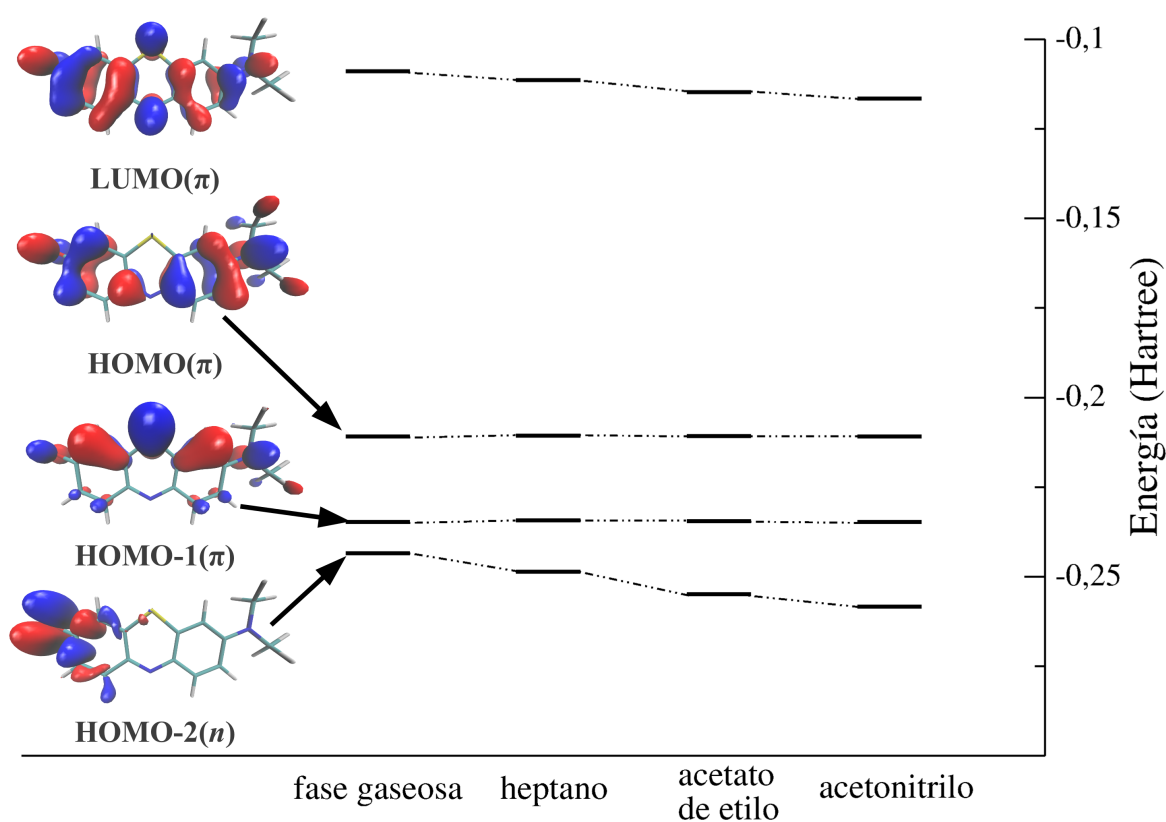


Figura 2: Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas del VM y la variación de su energía con el cambio de solvente. Entre paréntesis se muestra el tipo de orbital. Isodensidad 0,035 u.a.

Lo mismo ocurrió con los estados excitados, es decir, el módulo de su momento dipolar aumentó al hacerlo la polaridad del medio (Tabla 2). Este momento dipolar, $|\vec{\mu}_E^*|$, correspondió a la geometría del estado excitado no relajado (transición vertical o de Franck-Condon (FC)). En la tabla mencionada, se puede observar que el $|\vec{\mu}_E^*|$ de la primera transición electrónica $\pi \rightarrow \pi^*$ (más corrida hacia el rojo) fue mayor que el de la segunda del mismo tipo, en acetato de etilo y en acetonitrilo. Sin embargo, esto no ocurrió en fase gaseosa

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

y heptano. En el caso del VM en fase gaseosa, podría deberse a que la primera transición electrónica $\pi \rightarrow \pi^*$ no fue solamente HOMO \rightarrow LUMO, sino que tiene un 20% de contribución HOMO-1 \rightarrow LUMO, mientras que la segunda transición $\pi \rightarrow \pi^*$ la relación se invierte, quedando un 80% de contribución HOMO-1 \rightarrow LUMO. Por otro lado, el $|\vec{\mu}_E^*|$ correspondiente a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ fue mayor que aquella $n \rightarrow \pi^*$, esto podría atribuirse a que en esta última la densidad electrónica se desplaza en sentido contrario al vector momento dipolar de la molécula (ver Figuras 2 y 3).

Tabla 2: Absorción del VM en solventes apróticos y comparación con la fase gaseosa. La energía de las transiciones se encuentran en nm, los momentos dipolares en D, la variación del $|\Delta\mu_{Abs}|$ y ángulo que forma $\vec{\mu}_E^$ del estado en cuestión respecto al $\vec{\mu}_B$ del estado basal (θ). H es HOMO y L, LUMO.*

Solventes	Estado excitado	Absorción				Momento Dipolar		$\Delta \mu_{Abs} $ /D	θ /grados		
		Valor/nm	f^a	Exp.	Transición ^b	Estado	Valor/D				
fase gaseosa	1	472,99	0,0000	---	H-2 \rightarrow L ($n \rightarrow \pi^*$)	Basal	10,72	-5,26	12,20		
	2	464,46	0,4661	---	H \rightarrow L ($\pi \rightarrow \pi^*$)	1er E. Exc.	5,46			1,30	5,18
	3	426,16	0,1370	---	H-1 \rightarrow L ($\pi \rightarrow \pi^*$)	2er E. Exc.	12,02			4,10	5,48
heptano	1	490,43	0,7374	512	H \rightarrow L ($\pi \rightarrow \pi^*$)	Basal	12,90	2,47	2,83		
	2	457,21	0,0000	---	H-2 \rightarrow L ($n \rightarrow \pi^*$)	1er E. Exc.	15,37			-6,51	12,75
	3	442,48	0,0643	---	H-1 \rightarrow L ($\pi \rightarrow \pi^*$)	2er E. Exc.	6,39			3,58	7,07
acetato de etilo	1	530,39	1,0203	536	H \rightarrow L ($\pi \rightarrow \pi^*$)	Basal	15,83	3,47	1,62		
	2	460,03	0,0212	---	H-1 \rightarrow L ($\pi \rightarrow \pi^*$)	1er E. Exc.	19,30			2,92	8,08
	3	438,94	0,0000	---	H-2 \rightarrow L ($n \rightarrow \pi^*$)	2er E. Exc.	18,75			-8,36	13,93
acetonitrilo	1	556,28	1,1593	551	H \rightarrow L ($\pi \rightarrow \pi^*$)	Basal	17,68	3,73	1,33		
	2	469,64	0,0127	---	H-1 \rightarrow L ($\pi \rightarrow \pi^*$)	1er E. Exc.	21,40			2,55	8,36
	3	428,63	0,0000	---	H-2 \rightarrow L ($n \rightarrow \pi^*$)	2er E. Exc.	20,22			-9,65	14,86

^a frecuencia del oscilador; ^b H=HOMO L=LUMO

Este aumento en el módulo de $|\vec{\mu}_E^*|$ con la polaridad del solvente se vio reflejado en el cambio del módulo de momento dipolar correspondiente a la transición electrónica de absorción $\Delta|\mu_{Abs}^{\vec{}}|$:

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

$$\Delta|\mu_{Abs}^{\vec{}}| = |\mu_{E}^{*}| - |\mu_{B}^{\vec{}}| \quad (4.1)$$

es decir el estado final e inicial para la absorción, respectivamente.

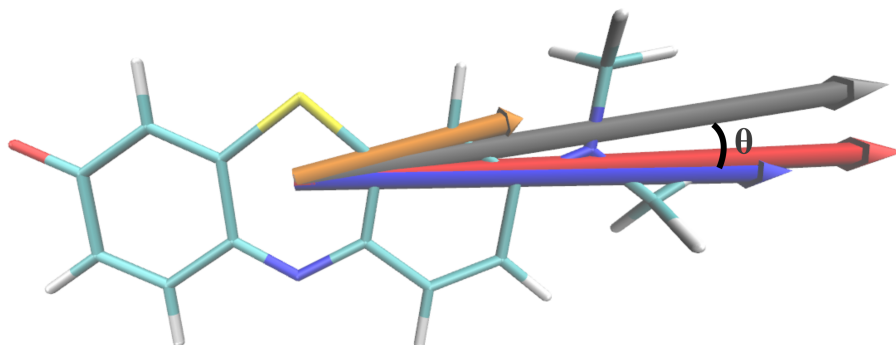


Figura 3: Momentos dipolares para el estado basal (azul), primer estado excitado (rojo), segundo estado excitado (gris) y tercer estado excitado (naranja) en acetato de etilo. También válido en acetonitrilo. A su vez, el vector momento dipolar en gris corresponde al tercer estado excitado para el VM en heptano. Se muestra el ángulo θ entre los vectores momento dipolar de estado basal y segundo estado excitado.

Para el primer estado excitado en fase gaseosa, $\Delta|\mu_{Abs}^{\vec{}}|$ fue negativo, es decir que el momento dipolar del estado excitado fue menor al del estado basal. Esto puede atribuirse a que la transición electrónica involucrada fue $n \rightarrow \pi^*$ y, por lo tanto, la densidad electrónica que estaba localizada en el orbital n sobre el oxígeno carbonílico (en parte polarizando la molécula) pasó a deslocalizarse en un orbital π^* ubicado sobre gran parte de la molécula, disminuyendo su momento dipolar en forma considerable.

En cambio, el $\Delta|\mu_{Abs}^{\vec{}}|$ del segundo y tercer estado excitado fueron positivos. En la segunda transición electrónica, la densidad electrónica ubicada de alrededor del nitrógeno $-N(CH_3)_2$ se desplazó hacia el azufre y el nitrógeno en el anillo fenotiazina (posición 10) (Figura 2), en favor del vector momento dipolar del VM fundamental (Figura 3). Este hecho se puede observar en la parte derecha de la Figura 4, donde el nitrógeno $-N(CH_3)_2$ aumenta su carácter electropositivo y el parte derecha de la molécula su carácter electronegativo.

A su vez, en la tercera transición, el aumento en el módulo del momento dipolar se produjo debido a que parte de la densidad electrónica ubicada sobre el nitrógeno $-N(CH_3)_2$, el azufre y el carbono **6**, se trasladó hacia el resto de la molécula, en especial los carbonos **1** y **2** (ver Esquema 1 y Figura 2). Sin embargo, en este caso, el aumento fue significativamente menor debido a que la transferencia de densidad electrónica no fue en el mismo sentido del momento

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

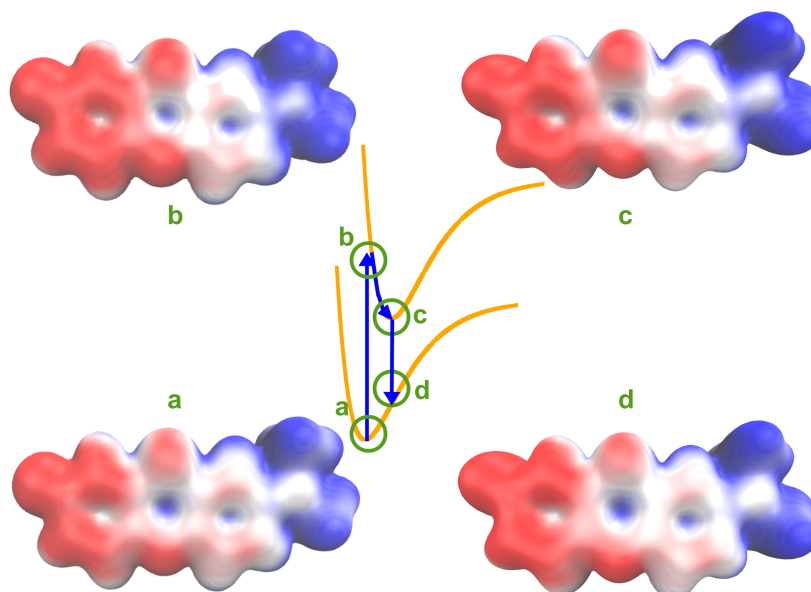


Figura 4: Potencial electrostático del VM en sus estados basal relajado (a), excitado no relajado o Franck-Condon vertical (b), excitado relajado (c) y basal no relajado (d). Se muestra la superficie de isodensidad electrónica (0,01 u.a.) coloreada con el potencial electrostático desde el negativo en rojo hasta el positivo en azul, con un rango que va desde -0,01 a 0,07 u.a.

dipolar de la molécula (ver Figuras 2 y 3). Este hecho se pudo apreciar en el cambio en la dirección entre los vectores $\vec{\mu}_E^*$ respecto de $\vec{\mu}_B$, el cual ocurrió en el plano de la molécula, como se muestra en la Figura 3.

El $\Delta|\vec{\mu}_{Abs}^*|$ para la primera transición electrónica $\pi \rightarrow \pi^*$ aumentó gradualmente y en forma no lineal, partiendo de 1,30 D en fase gaseosa hasta 3,77 D en acetonitrilo. Esta transición presentó la misma transferencia de densidad electrónica que la segunda transición electrónica en fase gaseosa (Figura 4). En cambio, el valor de $\Delta|\vec{\mu}_{Abs}^*|$ de la segunda transición $\pi \rightarrow \pi^*$, si bien fue positivo, su comportamiento fue contrario al de la primera transición, disminuyendo su valor desde 4,10 D en fase gaseosa hasta 2,55 D en acetonitrilo. Asimismo, el carácter positivo de $\Delta|\vec{\mu}_{Abs}^*|$ concordó con el corrimiento hacia el rojo (más detalle en la sección 4.6.) observado experimentalmente para la primera transición electrónica, y teóricamente para la segunda (que no se observaría por poseer un frecuencia del oscilador relativamente baja).

Por otro lado, en la transición $n \rightarrow \pi^*$ el valor de $\Delta|\vec{\mu}_{Abs}^*|$ fue negativo, lo cual concordó con el corrimiento hipsocrómico (hacia el azul) observado en los cálculos.

Otro aspecto del corrimiento solvatocrómico es la dirección del momento dipolar, siendo máximo cuando los vectores $\vec{\mu}_E^*$ y $\vec{\mu}_B$ son colineales.¹⁷ En el caso del VM, se midió el

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

ángulo θ entre los vectores $\vec{\mu}_E^*$ y $\vec{\mu}_B$ (cambio en la dirección del momento dipolar por la transición electrónica, ver Figura 3). El ángulo θ tuvo un comportamiento opuesto al $\Delta|\vec{\mu}_{Abs}|$. En el caso del primer estado excitado $\pi \rightarrow \pi^*$, θ disminuyó con la polaridad del solvente, mientras que $\Delta|\vec{\mu}_{Abs}|$ aumentó conjuntamente con ella. En el caso de la segunda transición $\pi \rightarrow \pi^*$ y la transición $n \rightarrow \pi^*$, se observó un aumento en el ángulo θ con el incremento en la polaridad del solvente, mientras que con $\Delta|\vec{\mu}_{Abs}|$ ocurrió lo contrario (Tabla 2).

4.5. Emisión

4.5.1. Solvatocromismo

La fluorescencia se calculó a partir de la geometría optimizada (relajada) del primer estado excitado. La transición electrónica con la máxima frecuencia del oscilador fue asignada a la longitud de onda máxima del espectro de emisión experimental (Figura 1).ⁱ Así, en fluorescencia en los distintos solvente, la transición es entre el primer estado excitado optimizado y el estado basal no relajado (estado FC).

Los resultados teóricos mostraron un corrimiento hacia el rojo de todas las transiciones del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ con el incremento en la polaridad del solvente (Figura 1 y Tabla 3). Sin embargo, si se tiene en cuenta el máximo de emisión experimental en heptano y acetonitrilo, se observa una discrepancia con los valores calculados (Figura 1). Además, el grado de exactitud de los máximos de emisión no fue tan significativo como el encontrado en la absorbancia, un ejemplo es el caso del VM en heptano. Aunque el máximo de emisión en heptano podría deberse a un estado vibrónico, y el máximo observado por el estudio teórico corresponderse con el hombro a ~578 nm (Figura 1).

Las transiciones electrónicas de fluorescencia involucraron a los mismos orbitales moleculares descritos anteriormente para absorbancia (Figura 2), con la excepción de la fase gaseosa, en la cual el orbital HOMO-1 es el orbital n localizado sobre el carbonilo, aquel que en la sección anterior era el HOMO-2. Asimismo, el orbital molecular π que en la absorbancia

ⁱ Se optimizaron otros estados excitados y a partir de ellos se obtuvieron energías de transición electrónica para ese estado. Sin embargo, no todas las optimizaciones convergieron y en aquellas que alcanzaron la convergencia no se observaron diferencias significativas con los valores expuestos en la Tabla 3. Por ello, se muestran los valores obtenidos a partir de la optimización del 1^{er} estado excitado, como una buena estimación.

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

era el HOMO-1, en la estructura optimizada del primer estado excitado en fase gaseosa fue el HOMO-2.

Siguiendo con el análisis de los resultados obtenidos, el módulo de los momentos dipolares del estado basal no relajado ($|\vec{\mu}_B^*|$) y el primer estado excitado relajado ($|\vec{\mu}_E|$) aumentaron con el incremento en la polaridad del solvente (Tabla 3).

En forma análoga a $\Delta|\mu_{Abs}^*|$, se define el cambio en el momento dipolar de emisión, $\Delta|\mu_{Emi}^*|$, el que se representa como:

$$\Delta|\mu_{Emi}^*| = |\vec{\mu}_B^*| - |\vec{\mu}_E| \quad (4.2)$$

correspondiéndose a la diferencia entre el módulo del momento dipolar del estado basal sin relajar y el estado excitado relajado, es decir entre el estado final y el inicial para la emisión,

Tabla 3: Estados excitados en el espectro de emisión, Las energías de las transiciones se encuentran en nm, los momentos dipolares en D, la variación del $|\Delta\mu_{Emi}|$ y ángulo que forma $\vec{\mu}_E$ del estado en cuestión respecto al $\vec{\mu}_B^$ del estado basal (θ). H es HOMO y L, LUMO.*

Solventes	Estado excitado	Emisión				Momento Dipolar		$\Delta \mu_{Emi} $ /D	θ /grados
		Valor/nm	f ^a	Exp.	Transición ^b	Estado	Valor/D		
fase gaseosa	1	618,5	0,0000	—	L→H-1 ($\pi^* \rightarrow n$)	Basal	12,42	5,03	9,09
	2	519,82	0,3153	—	L→H ($\pi^* \rightarrow \pi$)	1er E. Exc.	7,39		
	3	467,89	0,2566	—	L→H-2 ($\pi^* \rightarrow \pi$)				
heptano	1	565,3	0,406	623	L→H ($\pi^* \rightarrow \pi$)	Basal	14,19	0,54	6,42
	2	513,23	0,008		L→H-2 ($\pi^* \rightarrow n$)	1er E. Exc.	13,65		
	3	472,66	0,4053		L→H-1 ($\pi^* \rightarrow \pi$)				
acetato de etilo	1	576,06	0,848	610	L→H ($\pi^* \rightarrow \pi$)	Basal	17,21	-0,46	3,17
	2	530,35	0,0855		L→H-1 ($\pi^* \rightarrow \pi$)	1er E. Exc.	17,67		
	3	473,96	0,0000		L→H-2 ($\pi^* \rightarrow n$)				
acetonitrilo	1	591,35	1,0854	626	L→H ($\pi^* \rightarrow \pi$)	Basal	18,93	-1,43	1,97
	2	545,74	0,0478		L→H-1 ($\pi^* \rightarrow \pi$)	1er E. Exc.	20,36		
	3	454,65	0,0000		L→H-2 ($\pi^* \rightarrow n$)				

^a frecuencia del oscilador; ^b H=HOMO L=LUMO

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

respectivamente.

El $\Delta|\mu_{Emi}^{\vec{}}|$ presentó un incremento lineal con el aumento en la polaridad del medio. Su valor pasó de positivo en fase gaseosa y solventes de baja polaridad a negativo en solventes de mayor polaridad.

En fase gaseosa el $\Delta|\mu_{Emi}^{\vec{}}|$ de la primera transición electrónica tiene un valor de 5,03 D, donde $|\mu_E^{\vec{}}|$ posee un momento dipolar menor que $|\mu_B^{*\vec{}}|$. Se propuso la misma explicación expresada anteriormente para la transición electrónica $n \rightarrow \pi^*$ en la absorción, aunque en sentido inverso. Así, la densidad electrónica ubicada en el orbital π^* (LUMO) pasó a uno n (HOMO-1) ubicado sobre el oxígeno carbonílico. Con lo que $|\mu_B^{*\vec{}}|$ aumentó respecto al estado de partida (Tabla 3).

En el cálculo de la emisión en los distintos solventes, la transición del primer estado excitado fue del tipo $\pi^* \rightarrow \pi$, entre los orbitales LUMO \rightarrow HOMO. El valor de $\Delta|\mu_{Emi}^{\vec{}}|$ se disminuyendo con el aumento en la polaridad del medio, pasando de 0,54 D en heptano a -0,46 D en acetato de etilo y -1,43 D en acetonitrilo. Esta observación también se puede apreciar al comparar el potencial electrostático del estado excitado relajado y del basal sin relajar (Figura 4). Este comportamiento se debió a que el primer estado excitado tiene una contribución mayoritaria de LUMO \rightarrow HOMO y otra minoritaria LUMO \rightarrow HOMO-1. La contribución de esta última transición fue disminuyendo con el aumento de la polaridad del medio desde un 25% en heptano a 13% en acetato de etilo y a 0% en acetonitrilo, lo que explicó este aumento en el módulo del momento dipolar del primer estado excitado.

Asimismo, el ángulo θ que representa el cambio en la dirección del momento dipolar en la transición electrónica debido a la emisión, presentó un comportamiento similar al encontrado en absorción. El ángulo θ entre $\mu_E^{\vec{}}$ y $\mu_B^{*\vec{}}$ disminuye su magnitud con el aumento en la polaridad del solvente. En este caso, dicha disminución fue mucho más marcada que la observada en la absorción, comparando sólo el primero estado excitado.

Por otro lado, comparando el módulo de los momentos dipolares de los estados relajados (basal o excitado) en los distintos solventes, se observó que fueron menores que los correspondientes estados sin relajar o verticales (Tablas 2 y 3), a excepción del caso de fase gaseosa. Es decir que ocurrió una reducción en el módulo del momento dipolar al relajarse el estado desde su geometría **FC** a su geometría de equilibrio.

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

4.6. Modelos Solvatócromicos

El efecto del solvente generalmente es analizado a nivel experimental mediante modelos solvatócromicos. Estos modelos se presentan en gráficos (por ejemplo, Lippert-Mataga)^{14,18} que muestran la variación de la absorción, emisión o corrimiento de Stokes en función de parámetros del solvente, como por ejemplo la constante dieléctrica. Los modelos tienen la siguiente expresión general:

$$\tilde{\nu}_{a,f} = m(\mu_B, \mu_E) * f(\epsilon, n) * g(a) + constante \quad (4.3)$$

donde $m(\mu_B, \mu_E)$ es una función que describe el cambio en el módulo del momento dipolar debido a la transición electrónica, $f(\epsilon, n)$ es una función que depende la constante dieléctrica del solvente (ϵ) y del índice de refracción (n), y $g(a)$ es una función geométrica que describe la forma de la cavidad generada por el soluto, siendo a , comúnmente, el radio de la cavidad de Onsager (ver sección de métodos de solvatación continuos en el capítulo 2). Por lo general, $\tilde{\nu}_{a,f}$ puede ser presentado por el valor experimental de la frecuencia máxima de absorción, $\tilde{\nu}_a^{max}$, así como por el de la frecuencia máxima de fluorescencia, $\tilde{\nu}_f^{max}$, o por el del corrimiento de Stokes $(\tilde{\nu}_a^{max} - \tilde{\nu}_f^{max})$.^{14,18} La representación de la fórmula 4.3 depende del modelo que se aplique: por ejemplo, Lippert, Bakhshiev, McRae's Suppan's, Kawski-Chamma-Viallet's.^{14,18,19} Estos modelos representan muy bien el solvatócromismo cuando el soluto no tiene interacciones considerables con el solvente., en tales casos la relación $\tilde{\nu}_{a,f}$ versus $f(\epsilon, n)$ es lineal. Sin embargo, estos modelos no consideran diversas características del solvente como son: la polarizabilidad, el efecto de puente de hidrógeno, formación de complejos, entre otras. Estas interacciones pueden modificar el momento dipolar del estado basal o del excitado y es por ello que, en muchos casos, se puede encontrar que la relación $\tilde{\nu}_{a,f}$ versus $f(\epsilon, n)$ no es lineal.

Por lo tanto, para incluir los efectos anteriormente mencionados, es mejor utilizar otro parámetro que los considere, éste es la polaridad microscópica de solvente, E_T^N . La base teórica para la correlación entre el solvatócromismo espectral y E_T^N , fue propuesta por Reichart,¹⁹ y luego, desarrollada por Ravi *et al.*:²⁰

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

$$\Delta \tilde{\nu} = \tilde{\nu}_a \max - \tilde{\nu}_f \max = 11307,6 \left[\left(\frac{\Delta |\vec{\mu}|}{\Delta |\vec{\mu}_{bet}|} \right)^2 \left(\frac{a_{bet}}{a} \right)^3 \right] E_T^N + constante \quad (4.4)$$

donde $\Delta |\vec{\mu}|$ es el cambio en el módulo del momento dipolar, es decir, $|\vec{\mu}_E| - |\vec{\mu}_B|$. El subíndice *bet* se refiere al colorante betaína, usado como referencia para desarrollar los valores de E_T^N .¹⁹

La mayoría de los modelos solvatocrómicos, incluido el de Ravi, involucran un importante número de aproximaciones. Una de ellas es que se supone que el momento dipolar del estado excitado no relajado ($\vec{\mu}_E^*$) y del estado excitado relajado ($\vec{\mu}_E$) son colineales y el $\Delta |\vec{\mu}|$ se mantiene aproximadamente constante con el cambio de solvente. Lo mismo se aplica para el momento dipolar del estado basal no relajado y relajado.^{14,17,19} Por esta razón, es muchas veces conveniente analizar el efecto del medio sobre la absorción y la emisión por separado:^{14,21,22}

$$\tilde{\nu}_a \max = 11307,6 \left[\left(\frac{|\mu_B| (|\mu_B| - |\mu_E^*|)}{\Delta |\vec{\mu}_{bet}|^2} \right) \left(\frac{a_{bet}}{a} \right)^3 \right] E_T^N + constante \quad (4.5)$$

$$\tilde{\nu}_f \max = 11307,6 \left[\left(\frac{|\mu_E| (|\mu_B^*| - |\mu_E|)}{\Delta |\vec{\mu}_{bet}|^2} \right) \left(\frac{a_{bet}}{a} \right)^3 \right] E_T^N + constante \quad (4.6)$$

Las ecuaciones 4.4, 4.5 y 4.6 fueron graficadas en función de los datos experimentales que se muestran en la Tabla 4 (ver Figura 5). En dicha tabla se muestran los valores en cm^{-1} . Por otro lado, la contraparte experimental propuso una transición entre el nivel vibracional $\nu=0$ del estado basal y el mismo estado vibracional del estado excitado para la absorbancia ($\nu_a 0-0$), diferente de aquel para fluorescencia ($\nu_f 0-0$), como se muestra en la Tabla 4. En esta figura, también se muestran los resultados de absorción, emisión y corrimiento de Stokes para el VM en los solventes calculados.

Los resultados obtenidos en los cálculos de la absorbancia son muy similares a los experimentales. La pendiente negativa, se condice con el hecho de que ocurre un aumento en el momento dipolar de la molécula con la excitación (tanto en su estructura no relajada como en la relajada), lo cual produce un corrimiento hacia el rojo. Según estos resultados, se podría

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

Tabla 4: Solventes probados a nivel experimental. Se muestra la polaridad microscópica de solvente E_T^N , los máximos de absorbancia ($\nu_a \text{max}$) y fluorescencia ($\nu_f \text{max}$), las transiciones 0-0 de absorbancia ($\nu_a 0-0$) y fluorescencia ($\nu_f 0-0$), y la diferencia entre $\nu_a \text{max}$ y $\nu_f \text{max}$ ($\Delta\nu$). Los valores de absorbancia y fluorescencia se informan en cm^{-1} .

Solvente	E_T^N	$\nu_a \text{max}$	$\nu_f \text{max}$	$\nu_a 00$	$\nu_f 00$	$\Delta\nu$
ciclohexano	0,006	19417	15963	18278	17194	3454
heptano	0,009	19512	16000	18410	17282	3512
éter dibutílico	0,071	19201	15637	18096	16875	3564
benceno	0,111	18769	15361	17665	16572	3408
acetato de etilo	0,228	18650	16380	17501	16405	2270
1,1-diclorometano	0,309	18215	16207	17174	16137	2008
1,2-dicloroetano	0,327	18202	16181	17172	16156	2021
acetona	0,355	18215	16051	17223	16047	2164
butanitrilo	0,364	18255	16103	17216	16054	2152
propionitrilo	0,398	18175	16038	17191	16020	2137
acetonitrilo	0,46	18136	16026	17144	15965	2110

utilizar la absorbancia, debido a la linealidad entre ésta y E_T^N , dentro del modelo solvatocrómico descrito por la ecuación 4.5, lo que es un indicio de ausencia de interacciones discretas con el solvente.

Sin embargo, la tendencia en los resultados teóricos de la emisión presentan una relación

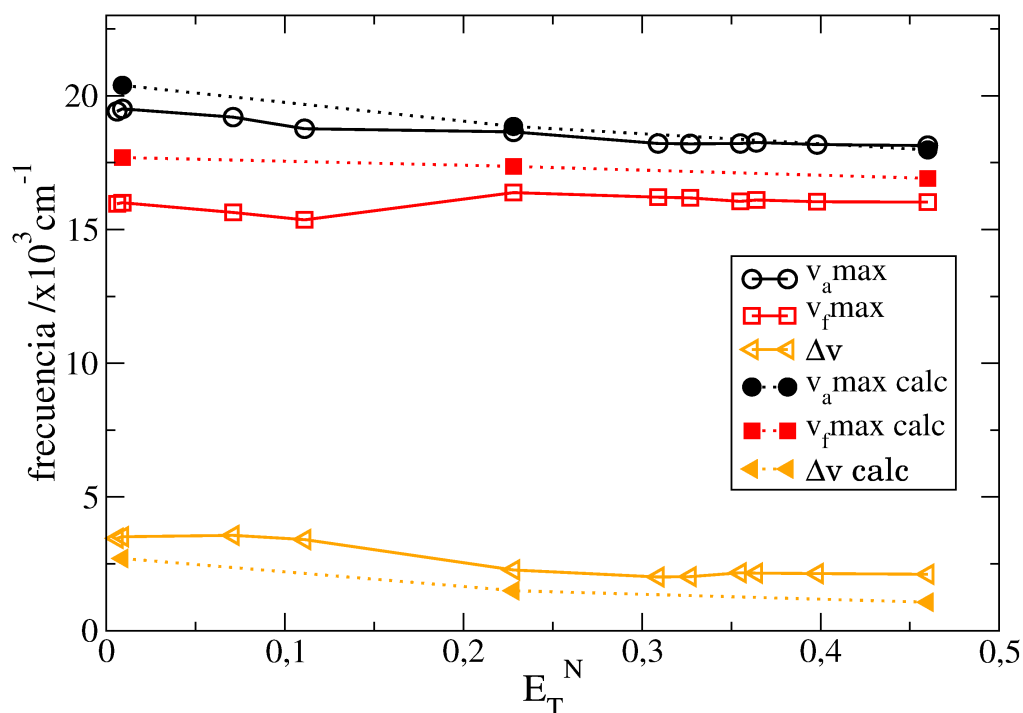


Figura 5: Comparación de los valores de las frecuencias máximas de absorción ($\nu_a \text{max}$), emisión ($\nu_f \text{max}$) y corrimiento de Stokes ($\Delta\nu$), tanto experimentales como calculadas.

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

menos lineal que los encontrados para el caso de la absorción (Figura 5). Una de las razones, es la gran variación en $\Delta|\mu_{Emi}^{\rightarrow}|$, en especial su cambio de signo, lo cual tiene como principal consecuencia la poca posibilidad de poder aplicar modelos solvatocrómicos que tengan en cuenta las energías de fluorescencia para lograr estimar de los momentos dipolares de $|\mu_E^{\rightarrow}|$ y $|\mu_B^{\rightarrow*}|$ o predecir energías de absorción (Tabla 3). Además, el cambio en $\Delta|\mu_{Emi}^{\rightarrow}|$ podría explicar por qué los máximos de emisión observados experimentalmente no presentan un corrimiento claro, ni hacia el azul ni hacia el rojo.

Otra razón que dé alguna posible explicación al corrimiento de los máximos de emisión, ν_{max} , es que en algunos casos éste se debe a un transición vibrónica 0-0 y en otros 0-1 (Tabla 4). Este planteo fue posible gracias al empleo del modelo teórico de Franck-Condon, abordados experimentalmente (este modelo será descrito en mayor detalle en la sección 2.3, del capítulo 5). Por lo tanto, estos mismos detalles dan una explicación posible al quiebre en los gráficos de los corrimientos de Stokes.

Por otro lado, el mayor error en la predicción de la frecuencia de emisión se obtuvo en heptano, en el cual la transición electrónica sería la menos vertical respecto a otros solventes. Sin embargo, esto resulta razonable si se tiene en cuenta que es el solvente donde existe mayor diferencia estructural (reflejado en el **RMSD**) entre el estado excitado **FC** y el relajado (Tabla 5). Además, este hecho también se refleja en las diferencias de energías entre el estado excitado **FC** y el relajado: 1077, 623 y 489 cm^{-1} , para heptano, acetato de etilo y acetonitrilo respectivamente.

Tabla 5: Variación en el RMSD entre las geometrías de equilibrio del primer estado excitado y el basal.

Solvente	RMSD
heptano	0,0652
acetato de etilo	0,0326
acetonitrilo	0,0246

Por último, es importante destacar que todas las observaciones y explicaciones realizadas hasta el momento, pudieron ser hechas gracias al planteo de un modelo de cuatro estados: estado basal, excitado relajado, basal no relajado y excitado no relajado.¹⁴

4.7. Estados Tripletos

4.7.1. Introducción

El estudio del estado triplete, así como la relación energética entre los diferentes estados singletes y tripletes presentan un notable interés debido a su reactividad con el oxígeno molecular, generando especies reactivas de oxígeno (ver Capítulo 1). Además, el espectro de absorción triplete-triplete del VM no ha sido informado en la literatura hasta el momento.

El espectro de absorción de especies transitorias del VM en ciclohexano,ⁱⁱ acetato de etilo y acetonitrilo (todos desoxigenados) se muestran en la Figura 6. El espectro muestra dos absorciones positivas una entre 350-450 (banda I) y otra entre 600-850 nm (banda II). Además de las bandas I y II, también muestra otra, aunque negativa, centrada en 520-550 nm (banda

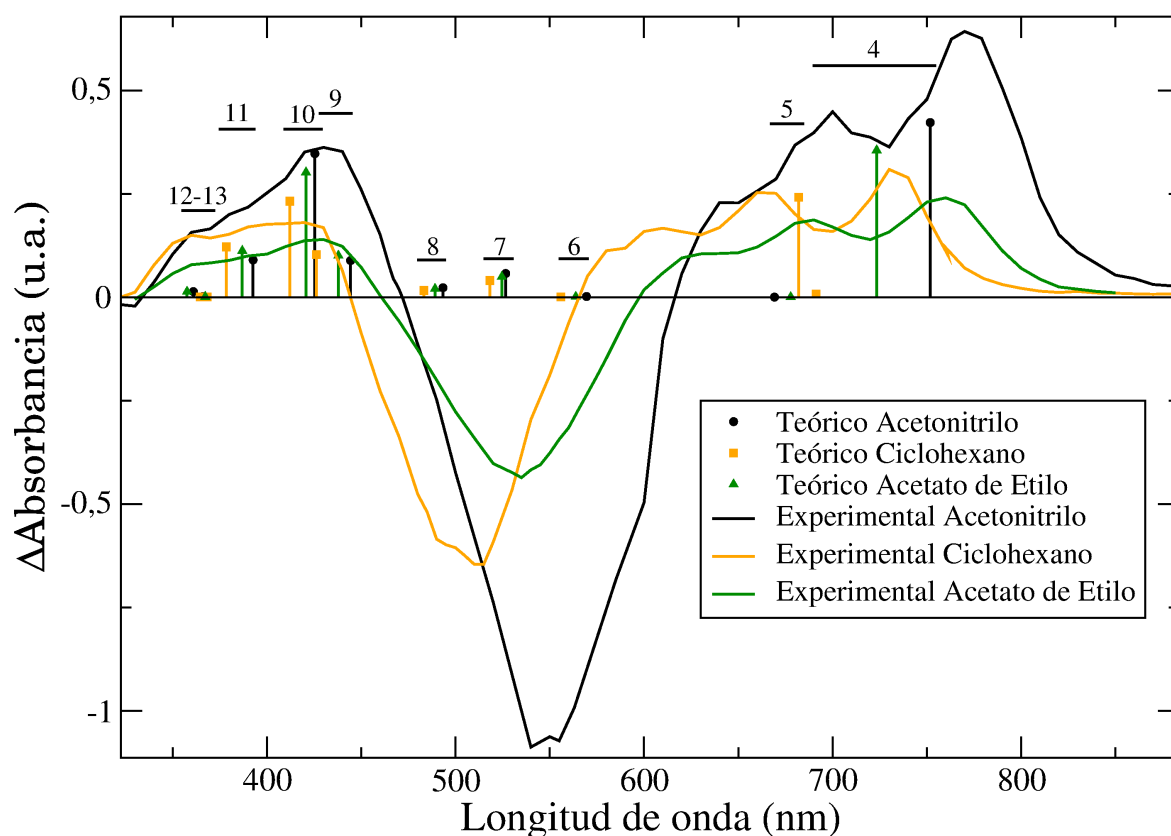


Figura 6: Espectro de absorción de especies transitorias experimental en líneas continuas y transiciones verticales de los estados tripletes en líneas verticales. Las líneas horizontales agrupan a una misma transición electrónica y el número se refiere al n del estado triplete T_n que se forma en esa transición.

ii No se realizó en heptano, pero los resultados encontrados a través de los cálculos para ciclohexano y heptano (no mostrados) son semejantes. Eso es razonable, ya que ambos solventes poseen una constante dieléctrica (ϵ) similar.

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

III), la cual puede ser atribuida al *bleaching* del estado basal (singlete) del VM. Como se esperaba, las bandas negativas presentan un corrimiento hacia el rojo observado para la absorción del estado singlete basal (ver sección 4.4.). Este comportamiento también se observa en las bandas I y II. Sin embargo, el corrimiento de la banda I hacia el rojo no muestra ser tan significativo como el de las bandas II y III.

4.7.2. Tripletes de menor energía

La diferencia de energía entre S_0 y el primer triplete excitado es una magnitud esencial para caracterizar un fotosensibilizador o colorante en general y poderlo comparar con otras especies relacionadas, como así también para entender el destino final del estado triplete en procesos de transferencia de energía (por ejemplo, produciendo oxígeno singlete). A diferencia de otros estados excitados, el triplete de menor energía es en sí un estado fundamental en el espacio de autofunciones de S^2 con autovalor 2 ($\langle S^2 \rangle = S(S+1)$). Desde el punto de vista del cálculo se utilizan los mismos formalismos para calcular S_0 en su versión irrestricta (UHF, Capítulo 2, sección 2.4) y no están involucradas las aproximaciones de TD-DFT ni las relacionadas con el tratamiento de la solvatación específica para estados excitados, por lo tanto la diferencia S_0-T_1 (referida a menudo como *gap* triplete-singlete) es una magnitud sencilla de obtener y mucho más confiable que las energías de los otros estados excitados singletes y tripletes. Esto constituye un ejemplo de una magnitud accesible al modelado y de difícil obtención por medios experimentales. Así, el valor empírico de algunas fenotiazinas ha sido determinado de forma indirecta con co-sensibilizadores.¹⁴ En efecto, la energía de T_1 del VM fue sólo estimada experimentalmente cerca de 10500 cm^{-1} en acetonitrilo; esta diferencia de energía no ha sido informada en bibliografía. Los valores calculados para la diferencia S_0-T_1 fueron muy cercanos a la estimación experimental, siendo: 10677 cm^{-1} en ciclohexano y 10493 cm^{-1} en acetonitrilo. Este último valor es comparable al del azul de metileno en dicho solvente, que tienen un rendimiento de producción de oxígeno singlete similar al del VM.¹⁴

4.7.3. Asignación de bandas

Se optimizó el estado triplete basal del VM utilizando UB3LYP, mediante el régimen de UHF. Sobre esta geometría optimizada se realizaron cálculos de TD-DFT, cuyos resultados

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

Tabla 6: Transiciones de absorción triplete con valores teóricos y experimentales. Se muestran los momentos dipolares de cada estado.

Solventes	T _n n=	Absorción			Exp.	Momento Dipolar		$\Delta \mu_{AbsT} $ /D	θ /grados
		Valor/nm	f ^c	Transición ^b		Estado	Valor		
Fase Gaseosa	2	1.541,91	0,0000	H-2→H ^a (n→π*)		Basal ^d	10,95	---	9,99
						2	5,53	-5,42	
	3	1.211,51	0,0169	H-1→H ^a (π→π*)		3	14,34	3,39	1,38
	4	693,57	0,0001	H-4→H ^a (n→π*)		4	12,44	1,49	-13,10
	5	641,15	0,1574	H-3→H ^a (π→π*)		5	13,98	3,03	-4,34
	6	550,92	0,0014	L→L+1 (π→π*)		6	11,29	0,34	-2,43
	7	506,95	0,0275	H-5→H ^a (π→π*)		7	13,64	2,70	-2,37
	8	478,52	0,0148	L→L+2 (π→π*)		8	12,23	1,29	1,49
	9	416,12	0,0660	H-1→L ^a (π→π*)		9	12,74	1,80	4,02
	10	403,14	0,1865	L→L+4 (π→π*)		10	13,85	2,91	1,81
	11	381,44	0,0016	L→L+3 (π→π*)		11	3,78	-7,17	82,39
	12	376,64	0,0000	H-2→H ^a (n→π*)		12	4,2883	-6,66	23,75
Ciclohexano	2	1.356,73	0,0316	H-1→H ^a (π→π*)		Basal ^d	13,60	---	2,74
						2	17,04	3,44	
	3	1.343,67	0,0017	H-2→H ^a (n→π*)		3	7,12	-6,48	9,89
	4	691,30	0,0077	H-4→H ^a (n→π*)		4	15,10	1,50	-12,54
	5	682,06	0,2415	H-3→H ^a (π→π*)	730	5	16,80	3,20	-5,37
	6	555,82	0,0009	H-5→H ^a (π→π*)		6	15,11	1,51	-3,59
	7	518,22	0,0406	L→L+1 (π→π*)		7	15,48	1,88	-1,49
	8	483,28	0,0163	L→L+2 (π→π*)		8	15,15	1,55	1,84
	9	426,28	0,1029	H-1→L ^a (π→π*)		9	15,56	1,96	4,36
	10	412,05	0,2322	L→L+3 (π→π*)	421	10	16,90	3,30	2,04
	11	378,40	0,1216	H-6→H ^a (π→π*)		11	15,99	2,39	-0,37
	12	368,27	0,0011	H-4→L ^a (n→π*)		12	16,51	2,91	-9,08

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

Continuación Tabla 6

Acetato de Etilo	2	1.530,08	0,0640	H-1→H ^a (π→π*)	Basal ^d	16,59	—		
					2	21,19	4,60	3,82	
	3	1.156,52	0,0000	H-3→H ^a (n→π*)		3	7,20	-9,39	13,38
	4	723,37	0,3554	H-2→H ^a (π→π*)	763	4	20,18	3,60	-5,99
	5	677,82	0,0005	H-4→H ^a (n→π*)	693	5	17,84	1,26	-12,81
	6	563,79	0,0014	H-5→H ^a (π→π*)		6	18,81	2,22	-3,98
	7	524,55	0,0495	L→L+1 (π→π*)		7	17,76	1,17	-1,03
	8	489,15	0,0204	L→L+2 (π→π*)		8	18,83	2,24	2,49
	9	437,88	0,1009	H-1→L ^a (π→π*)	432	9	18,59	2,00	4,32
	10	420,70	0,3020	L→L+3 (π→π*)		10	19,87	3,28	2,25
	11	386,93	0,1123	H-6→H ^a (π→π*)		11	19,87	3,28	-0,45
	12	367,29	0,0012	H-4→L ^a (n→π*)		12	19,52	2,93	-9,32
Acetonitrilo	2	1.663,38	0,0910	H-1→H ^a (π→π*)	Basal ^d	18,89	—		
					2	23,21	4,32	2,30	
	3	1.061,65	0,0000	H-3→H ^a (n→π*)		3	7,24	-11,65	16,18
	4	751,72	0,4223	H-2→H ^a (π→π*)	775	4	22,22	3,33	-6,31
	5	669,17	0,0003	H-4→H ^a (n→π*)	705	5	19,59	0,70	-12,79
	6	569,48	0,0018	H-5→H ^a (π→π*)		6	20,79	1,90	-3,76
	7	526,62	0,0574	L→L+1 (π→π*)		7	19,68	0,79	-1,13
	8	493,34	0,0230	L→L+2 (π→π*)		8	21,51	2,62	3,01
	9	444,34	0,0888	H-1→L ^a (π→π*)	435	9	20,50	1,61	4,05
	10	425,43	0,3471	L→L+3 (π→π*)		10	21,96	3,06	2,30
	11	392,66	0,0902	H-6→H ^a (π→π*)		11	22,37	3,47	-0,45
	12	365,90	0,0017	H-4→L ^a (n→π*)		12	21,67	2,78	-9,39

a es transición entre orbitales β bH=HOMO, L=LUMO; ^c frecuencia del oscilador ^d T₁

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

se resumen en la Tabla 6 para fase gaseosa, ciclohexano, acetato de etilo y acetonitrilo. Los resultados de estos cálculos mostraron una fuerte estabilización de las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ al aumentar la polaridad del solvente, de la misma manera que se observó para el espectro de absorción y emisión. Este hecho hace que el HOMO-2 (del tipo n) en ciclohexano se corresponda con el HOMO-3 en los dos solventes restantes. Más importante aún, se determinó que el máximo de la banda II corresponde a la transición HOMO-2 \rightarrow HOMO (β) (HOMO-3 en ciclohexano),ⁱⁱⁱ y que esta transición es del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Es importante aclarar que la estabilización de las transiciones electrónicas $n \rightarrow \pi^*$, produce grandes reordenamientos en el orden de las mismas. Por lo tanto, el máximo de la banda II, que en solventes más polares corresponde a la transición 4, en ciclohexano se corresponde con la 5 (ver Tabla 6 y Figura 6).

4.7.4. Solvatocromismo y momento dipolar

En la banda I participan 3 transiciones, todas del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, la transición 9, HOMO-1 \rightarrow LUMO (β), la 10, LUMO \rightarrow LUMO+3 (α) y la 11, HOMO-6 \rightarrow HOMO(β). Todas las transiciones presentan un efecto batocrómico respecto al aumento en la polaridad del solvente. Sin embargo, la transición a 600-850 nm muestra un mayor corrimiento hacia el rojo debido a un incremento en la polaridad del medio (Figura 6), lo cual no se logró explicar convincentemente. Asimismo, el corrimiento a menores energías de absorción de ambas bandas (I y II) podría deberse a la diferencia en el cambio del momento dipolar $\Delta|\mu_{AbsT}^{\rightarrow}|$,^{iv} el cual es positivo en todas las transiciones electrónicas correspondientes a las bandas I y II.

Simultáneamente, se calculó el ángulo θ entre el vector momento dipolar del estado basal y el correspondiente al del estado excitado (Tabla 6). Para los estados excitados producto de las transiciones electrónicas de las bandas I y II, este ángulo es positivo en todos los casos. El mayor efecto batocrómico de la banda II respecto a la banda I podría deberse a que el cambio en θ con la polaridad del solvente para el estado excitado correspondiente al máximo de esta banda (T_4 en acetato de etilo y acetonitrilo, y T_5 en ciclohexano) es mayor que aquel correspondiente al estado T_{10} perteneciente al máximo de la banda I.

iii En β el HOMO está desocupado, es decir sería el LUMO, pero se define HOMO porque corresponde en numeración de orbital molecular al HOMO en el régimen RHF utilizado en las secciones anteriores, a modo de mantener una convención.

iv El $\Delta|\mu_{AbsT}^{\rightarrow}|$ en todas las transiciones electrónicas, correspondientes a las bandas I y II, son positivas. En los resultados, se observa un aumento en 0,3 D del $\Delta\mu_{AbsT}$ de la banda.

4.7.5. Rendimiento Cuántico de formación del estado triplete

La generación del estado triplete basal (T_1) a partir del primer estado singlete excitado (S_1), es decir $S_1 \rightarrow T_1$, puede suceder mediante un acoplamiento espín-órbita entre el estado S_1 y un estado vibracional de alta energía del estado T_1 , o a partir de un acoplamiento espín-órbita entre el estado S_1 y un estado triplete excitado (T_n) al cual le sigue una rápida conversión entre tripletes, $T_n \rightarrow T_1$. Este mecanismo de entrecruzamiento de sistemas se encuentra determinado por dos factores importantes: 1) la diferencia de energía entre el singlete y el triplete involucrados en el acoplamiento (T_n ó T_1) y 2) la configuración electrónica de los estados inicial y final.¹⁴

El rendimiento cuántico de triplete (Φ_T) fue muy similar en los tres solventes utilizados: 0,55 en ciclohexano, 0,48 en acetato de etilo y 0,51 en acetonitrilo. Una explicación parcial de esta observación experimental se basa en que no existe una diferencia energética significativa entre S_1 y el orbital T_n más próximo energéticamente (Figura 7).

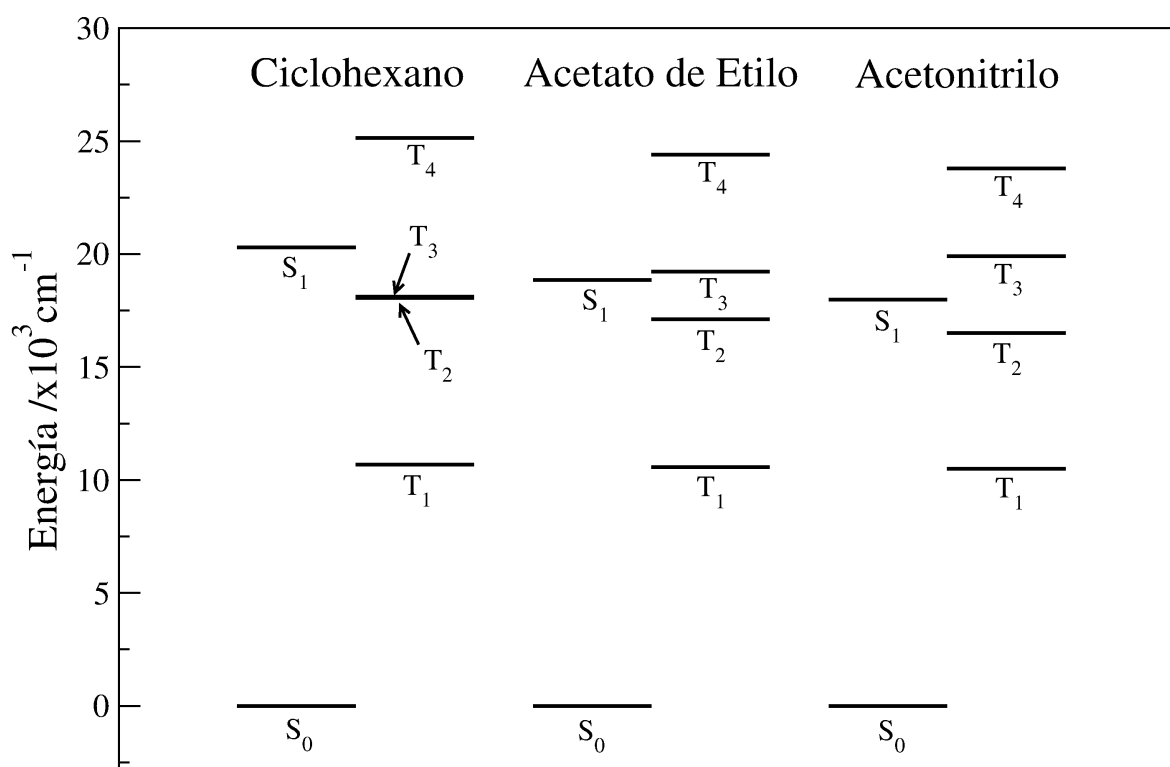


Figura 7: Diagrama de estados que muestra la relación energética entre los estados triplete y el primer singlete excitado.

4. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes apróticos

- 1 Otsuki, S., and Taguchi, T. (1997) Solvent-dependent photophysical properties of aminophenoxazone dyes as optical probes, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 104, 189-195.
- 2 Bauernschmitt, R. and Ahlrichs, R. (1996) Treatment of electronic excitations within the adiabatic approximation of time dependent density functional theory. *Chemical Physical Letters* 256, 454-64.
- 3 Tomasi, J., Mennucci, B., and Cammi, R. (2005) Quantum mechanical continuum solvation models. *Chemical Reviews*, 105, 2999-3093.
- 4 Cammi, R., Corni, S., Mennucci, B., and Tomasi, J. (2005) Electronic excitation energies of molecules in solution: State specific and linear response methods for nonequilibrium continuum solvation models, *The Journal of chemical physics* 122, 104513.
- 5 Becke, A. D. (1988) Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A* 38, 3098-3100.
- 6 Lee, C., Yang, W. and Parr, R.G. (1988) Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B* 37, 785-789.
- 7 Perdew, J. P., Burke, K. and Ernzerhof, M. (1997) "Errata: Generalized gradient approximation made simple," *Physical Review Letters* 78, 1396.
- 8 Adamo, C. and Barone, V. (1999) "Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model," *Journal of Chemical Physics* 110, 6158-69.
- 9 Gaussian 09, Revision A.1, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- 10 Liu, X., Yang, D., Ju, H., Teng, F., Hou, Y., and Lou, Z. (2011) Experimental and PCM/TD-DFT investigation on the absorption and emission spectra of a light emitting material in various solvents, *Chemical Physics Letters*, Elsevier B.V. 503, 75-79.
- 11 Jacquemin, D., Wathelet, V., and Perpète, Eric A. and Adamo, C. (2009) Extensive TD-DFT benchmark: singlet-excited states of organic molecules, *Journal of Chemical Theory and Computation* 5, 2420-2435.
- 12 Adamo, C. and Barone, V. (2000) Inexpensive and accurate predictions of optical excitations in transition-metal complexes: the TDDFT/PBE0 route. *Theoretical Chemistry Accounts: Theory, Computation, and Modeling (Theoretica Chimica Acta)* 105, 169-172.
- 13 Dreuw, A., and Head-Gordon, M. (2005) Single-reference ab initio methods for the calculation of excited states of large molecules, *Chemical reviews*, ACS Publications 105, 4009-4037.
- 14 Glusko, C. a., Previtali, C. M., Vera, D. M. a., Chesta, C. a., and Montejano, H. a. (2011) An experimental and theoretical study on the photophysical properties of methylene green, *Dyes and Pigments*, Elsevier Ltd 90, 28-35.
- 15 Improta, R., Barone, V., Scalmani, G., and Frisch, M. J. (2006) A state-specific polarizable continuum model time dependent density functional theory method for excited state calculations in solution., *The Journal of chemical physics* 125, 054103.
- 16 C. L. Ramirez, L Trupp, C. Pegoraro, A. Bruttomesso, V.T. Amorebieta, D. M. A. Vera, A Parise, (2011) Charge transfer properties of Tröger base derivatives, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011), 20076-20080
- 17 Suppan, P. (1990) Invited review solvatochromic shifts: The influence of the medium on the energy of electronic states, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Elsevier 50, 293-330.
- 18 Homocianu, M. (2011) Solvent effects on the electronic absorption and fluorescence spectra, *Journal of Advanced Research in Physics* 2, 011105.
- 19 Reichardt, C., and Welton, T. (2011) Solvents and solvent effects in organic chemistry, *Strategies* 4th ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., Boschstrasse 12, 69469 Weinheim, Germany.
- 20 Ravi, M., and Samanta, A and Radhakrishnan, T. P. (1994) Excited state dipole moments from an efficient analysis of solvatochromic stokes shift data, *Journal of Physical Chemistry* 98, 9133-9136.
- 21 Amos, A. T. and Burrows, B. L. (1973) Solvent-Shift Effects on Electronic Spectra and Excited-State Dipole Moments and Polarizabilities. *Advances in Quantum Chemistry* 7, 289-313.
- 22 Lombardi, J. R. (1998) Solvatochromic shifts: a reconsideration, *The Journal of Physical Chemistry A*, ACS Publications 102, 2817-2823.

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

Were I to await perfection, my book would never be finished.

Historia de la escritura china – Tai T'ung, siglo XIII

5.1. Problemas y desafíos encontrados en solventes próticos

En el Capítulo anterior, referido a este colorante en solventes apróticos se seleccionaron funcional, base y método de solvatación de estado excitado (**LR** o **EE**) que mejor aproximen los máximos calculados a los experimentales (ver sección 2.9 del Capítulo 2). Sin embargo, esta selección, que brindó excelentes resultados para los estudios de absorción, emisión y absorción de tripletes en solventes apróticos, no arrojó resultados satisfactorios para la absorción del VM en solventes próticos (se probaron varios alcoholes, Tabla 1). El hecho de que los resultados no hayan sido satisfactorios, se constata en que el máximo de absorbancia se encontró ~60 nm corrido hacia el azul, respecto del experimental.

Por otra parte, a partir de los espectros simulados no es posible encontrar una hipótesis que explique el hombro que aparece en estos solventes entre 550 y 560 nm (hombro que se convierte en una segunda banda de intensidad comparable al máximo al ir en la serie metanol hasta 1-hexanol). Esta banda podría corresponder, por ejemplo, a un segundo estado excitado próximo en energía y con una fuerza del oscilador (intensidad) importante (Figura 1 y Tabla 1).

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

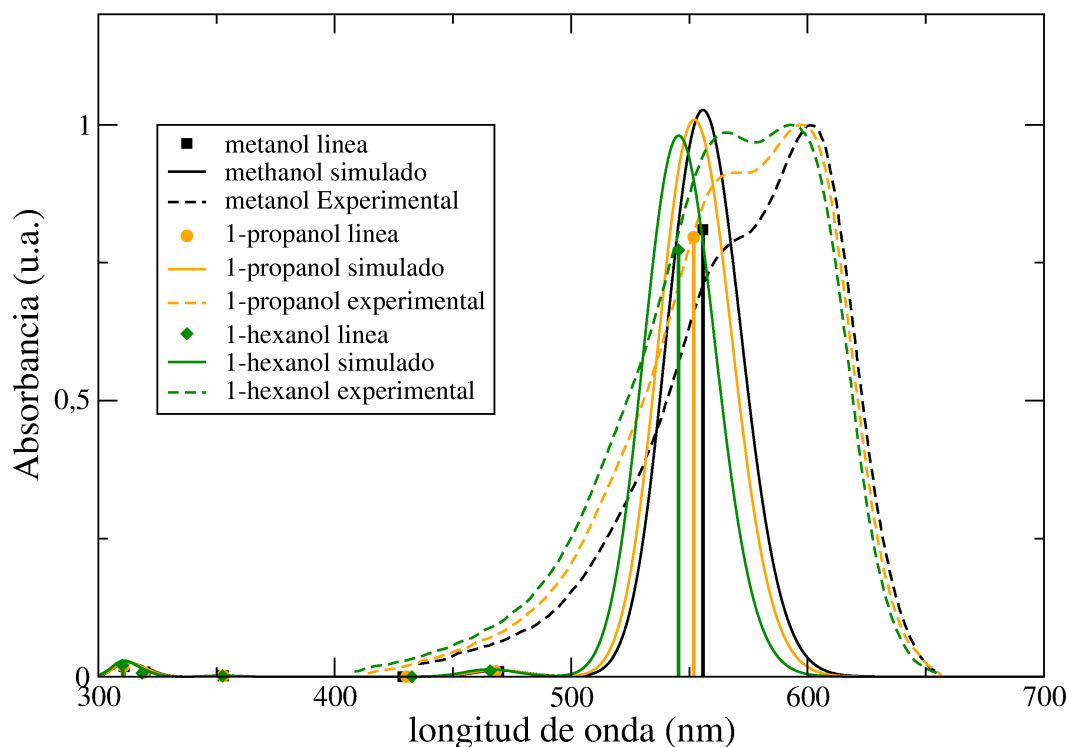


Figura 1: Comparación del el espectro de absorción experimental del VM en solventes próticos contra el valor de las transiciones electrónicas calculadas para los seis primeros estados excitados (líneas), simulando el efecto inhomogéneo mediante gaussianas.

Por lo tanto, debido a estos inconvenientes, se probó nuevamente el funcional PBE0 y el método de solvatación EE, sin lograr mejoría en los resultados. Al igual que en la absorbancia del VM en los solventes apróticos, en este caso los resultados arrojaron mayor desviación respecto de B3LYP (Tabla 1).

5.2. Modelos para considerar explícitamente las interacciones con el solvente prótico

Hasta aquí, los dos funcionales utilizados para caracterizar los estados excitados del VM en metanol y en acetonitrilo dieron resultados muy similares, con diferencias tan pequeñas como las diferencias en las constantes dieléctricas entre los dos solventes ($\epsilon_{\text{acetonitrilo}}=35,7$ y $\epsilon_{\text{metanol}}=32,6$). Sin embargo, este hecho difiere cualitativamente de los espectros de absorción experimentales, en los cuales el máximo de absorción en metanol se encuentra desplazado ~ 60 nm hacia el rojo respecto de aquel en acetonitrilo (Tabla 1). Además, presentan diferente forma, como se mencionó, debido a la presencia de un hombro entre 550-560 nm.

El error en la determinación teórica de los máximos de absorbancia pudo estar relacionado

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

Tabla 1: Energías de transiciones electrónicas obtenidas para el VM optimizado en solventes próticos y su respectiva fuerza del oscilador (f). Comparación de funcionales B3LYP y PBE0 y los métodos de solvatación del estado excitado **RL** y **EE**.

Solventes	Estado Excitado	RL				EE		Exp.
		B3LYP	f	PBE0	f	B3LYP	PBE0	
acetonitrilo	1	556,28	1,1593	542,21	1,1899	502,8	489,47	553
	2	469,64	0,0127	451,46	0,0172	—	—	—
metanol	1	555,7	1,1565	541,64	1,1870	502,42	489,11	602
	2	469,43	0,0128	451,26	0,0174	—	—	571
1-propanol	1	551,85	1,1372	537,85	1,1672	501,51	488,22	598
	2	468,05	0,0136	449,9	0,0186	—	—	568
1-hexanol	1	545,48	1,1042	531,56	1,1335	499,58	486,33	593
	2	465,7	0,0150	447,59	0,0208	—	—	566

a que el solvente implícito no tiene en cuenta los puentes de hidrógeno (**puentes H**) de manera explícita. Por lo tanto, su descripción no es completa, debido a que la interacción sólo es considerada en términos de las contribuciones de solvatación dentro del modelo **PCM** (polar y van der Waals, cavitación, etc.).¹

Como primera y más sencilla aproximación para dar cuenta de estas interacciones se construyeron modelos de una molécula de VM inmersa en un continuo dieléctrico (solvente implícito) con una molécula o dos de solvente explícitas formando interacciones de **puente H**, corrigiendo así la predicción en el corrimiento de la banda de absorción.^{2,3,4}

Las estructuras fueron optimizadas sin restricciones de geometría desde diferentes posiciones iniciales. Las estructuras de menor energía se forman con los tres átomos formando la interacción $O_{\text{metanol}} \cdots H_{\text{metanol}} \cdots Y$ ($Y=N$ u O) en el plano de los anillos de la fenotiazina, como se muestra en la Figura 2. Se utiliza el funcional B3LYP, debido a que con éste se obtuvieron los mejores resultados en el caso de los apróticos.

En el caso de la geometría con el **puente H** involucrando al oxígeno carbonílico (más estable de los dos) se obtuvo una longitud de onda de absorción para el primer estado excitado prácticamente indistinguible del obtenida en ausencia de molécula discreta de metanol (sin formación de **puente H**) y, como se mencionó, similar al obtenido en acetonitrilo como solvente aprótico con similar ϵ . El segundo estado excitado aumenta la intensidad ligeramente pero sigue siendo muy pequeño en comparación con la intensidad del primero y sigue siendo imposible reproducir el espectro experimental. Resultó sorprendente que no se encontraran cambios sustanciales debido a la presencia de la molécula de metanol en su posición para la interacción energéticamente más favorable con el colorante. De las especies con puente, el

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

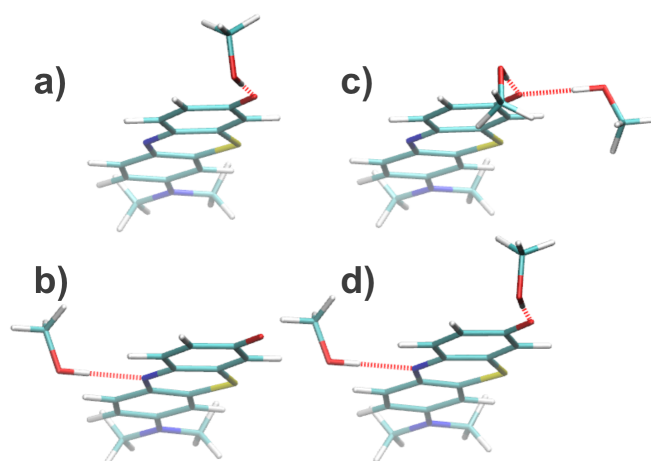


Figura 2: Estructuras optimizadas de moléculas de VM y metanol formando **puentes H** en una pose con el N y otra con el O. En ambos casos el OH enlaza el heteroátomo en el plano de la fenotiazina.

que está enlazado al nitrógeno de la fenotiazina presenta el mayor corrimiento pero sólo se corre 10 nm al rojo siguiendo muy lejos del máximo de absorción de mayor intensidad, alrededor de 600 nm en los solventes próticos.

También se optimizaron estructuras con dos puentes de hidrógeno, ambos al carbonilo o bien uno al oxígeno carbonílico y otro al N del anillo. Los resultados del VM en metanol sin y con **punte H** se resumen en la Tabla 2. Como puede apreciarse, no hay cambios notables respecto de lo obtenido con el solvente implícito sin moléculas discretas de metanol que, a su vez, es similar a las longitudes de onda para acetonitrilo.

La mayor contribución en la descripción de la interacción de **punte H** es del tipo

Tabla 2: Comparación de las energías de las transiciones verticales del VM en solvente implícito sin, con una y con dos moléculas de metanol.

Puente de hidrógeno	Estado Excitado	Transición	λ / nm	f^e
sin MeOH	1	H→L	555,7	1,1564
	2	H-1→L	469,4	0,0128
O carbonílico ^a	1	H→L	557,8	1,1872
	2	H-1→L	475,9	0,0099
N fenotiazina ^b	1	H→L	566,3	1,1403
	2	H-1→L	482,1	0,0118
dos al O carbonílico ^c	1	H→L	558,5	1,1967
	2	H-1→L	480,8	0,0104
dos: uno al O carbonílico y otro al N fenotiazina ^d	1	H→L	568,3	1,1722
	2	H-1→L	488,7	0,0085

^{a, b, c, d} se refieren a las figuras 2a, 2b, 2c y 2d respectivamente.

^e frecuencia del oscilador.

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

electrostático. Sin embargo, el aporte de la dispersión de London en la interacción de **punte H** no resultaría despreciable.⁵ Las interacciones de dispersión de London se encuentran mucho mejor descritas por métodos DFT meta-GGA y DFT-D (DFT con correcciones de dispersión). Por lo tanto, con el fin de incorporar estas descripciones se probaron el funcionales M06-2X (meta-GGA) y el ω B97X-D (DFT-D).^{6,7}

Los resultados no mostraron mejoría respecto a los obtenidos anteriormente con B3LYP, sino que tuvieron un error aún mayor. Tanto el funcional M06-2X⁶ como el ω B97X-D⁷ mostraron una diferencia de ~10 nm entre VM sin y con **punte H**. Esta diferencia estuvo muy lejos de justificar aquella de 60 nm observada en el espectro experimental. Además, los máximos de absorción obtenidos estuvieron muy corridos hacia el azul respecto al experimental (100 nm). Contrariamente a lo que se sugiere en la ref. 5, el funcional que dio resultados más próximos a los experimentales siguió siendo B3LYP.

En lo referente a la distribución de carga de especies débilmente enlazadas, se han propuesto diferentes aproximaciones para subsanar los problemas de autocancelación para distancias interelectrónicas grandes que tienen los funcionales convencionales. Entre estas mejoras los funcionales más probados son el LC-BLYP y CAM-B3LYP^{8,9} sobre todo este último aportaría el mejor balance entre la calidad de un funcional híbrido, para reproducir valores termodinámicos, con el tratamiento exacto de Hartree-Fock de interacciones a larga distancia. El mayor efecto de separación entre los máximos de las especies con y sin **punte H** se nota con CAM-B3LYP, pero sigue siendo insignificante (8 nm) y ambas especies aparecen muy corridas al azul, alejándose aún más que B3LYP del máximo de absorción experimental (a 100 nm del experimental en el mejor caso para CAM-B3LYP). Nuevamente las simulaciones con estos funcionales arrojan espectros muy similares para metanol y acetonitrilo. Con lo cual queda claro que los problemas no vienen de un funcional en particular. No obstante, a pesar de haber considerado las interacciones específicas con el solvente a través de las estructuras optimizadas del colorante con uno o dos **puentes H**, parece no haber diferencias entre un solvente aprótico como el acetonitrilo y uno prótico del mismo ϵ como el metanol.

5.3. Modelado de la estructura vibrónica del espectro de absorción.

En las secciones desarrolladas hasta el momento, se aproximaron las energías de

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

transiciones verticales sin tener en cuenta la corrección de punto cero (**ZPE**) y las transiciones entre los distintos niveles vibracionales de los dos estados involucrados en la absorción. Esta aproximación, ha sido utilizada en distintos estudios de estados excitados.^{10,11}

Las transiciones entre distintos estados vibracionales del estado basal y excitado, pueden producir un ensanchamiento del máximo de absorción, como así también, ser los responsables de la aparición de otros máximos u hombros. Por este motivo, se realiza un estudio detallado de los modos normales de vibración de los estados fundamental y excitado involucrados. Además, en el caso particular del espectro de absorción del VM en solventes próticos, el hombro de 560 nm podría deberse a un estado vibracional.

La simulación del espectro del VM en solventes próticos, se realizó utilizando el programa FCClasses de Santoro *et al.*,^{12,13,14} que permite resolver la estructura vibro-rotacional del espectro electrónico. El método utiliza la aproximación de expresar el momento dipolar de transición (función de las coordenadas nucleares) como una serie de Taylor. El término cero o término Franck-Condon, es decir constante respecto a las coordenadas nucleares, simula el espectro mediante la resolución de las integrales de Franck-Condon (**FC**). Además, se puede tener en cuenta el primer término de la serie de Taylor, es decir la dependencia lineal del momento dipolar de transición respecto de las coordenadas nucleares, lo que se conoce como efecto o aproximación de Herzberg-Teller (**HT**) el cual tiene en cuenta un acoplamiento electrón-fonón débil.^{15,16} Además, el método de Santoro *et al.* permite incluir temperatura en el cálculo, a fin de tener en cuenta las transiciones que parten desde estados vibracionales excitados del estado electrónico basal.^{12,13,14,15}

Para el estudio de las transiciones vibrónicas, fue necesario calcular las frecuencias y los modos normales de vibración de las geometrías optimizadas de los estados basal y excitado. Este cálculo se realizó con B3LYP/6-311+G(d,p) para el VM en metanol, 1-propanol y 1-hexanol como solvente implícito (**PCM**).

Las simulaciones de los espectros electrónicos mediante la resolución vibracional mostraron una concordancia aparentemente muy buena con el espectro experimental (Figura 3). Se encontró que la diferencia en la longitud de onda de los máximos de absorción fueron similares a las observadas en el espectro experimental (resaltadas con elipses en la Figura 3). Además, así como los máximos entre 548-560 nm del espectro simulado concordaron con los hombros de los espectros experimentales que se encuentran entre 565-570 nm, también lo

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

hicieron las intensidades relativas, habiendo sido reproducido en la simulación el efecto de la disminución de la absorbancia relativa de la banda más al azul con el acortamiento de la cadena carbonada del alcohol (1-hexanol > 1-propanol > metanol, ver Figura 3). También se reprodujo la tendencia de la disminución de la longitud de onda de absorción al aumentar la cadena carbonada del alcohol (Figura 3).

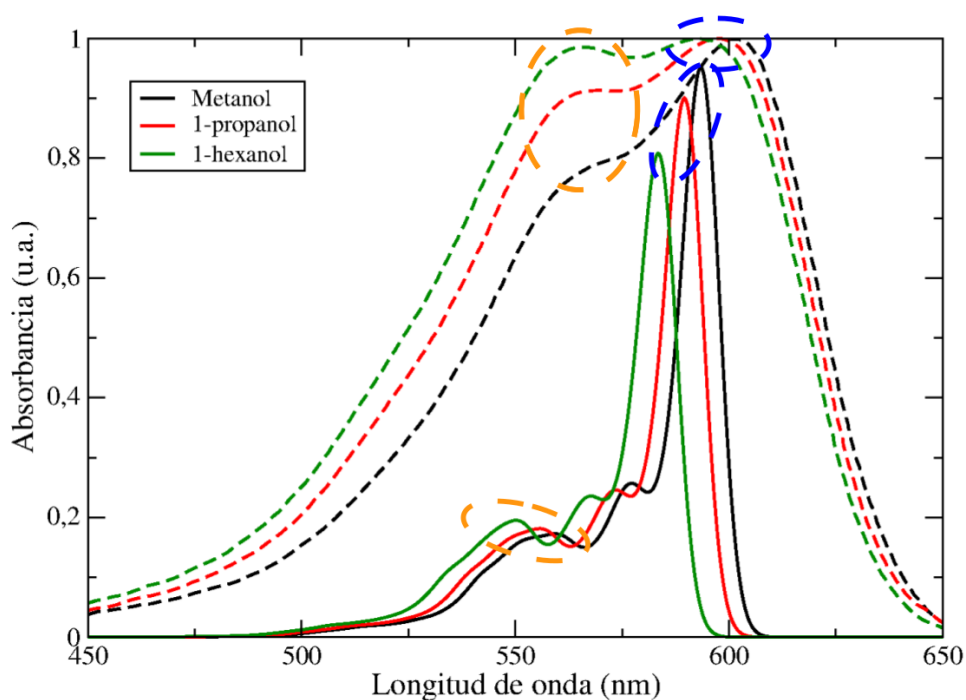


Figura 3: Comparación de los espectros simulados (líneas continuas) versus los experimentales (líneas discontinuas). Los círculos sirven a modo de comparación entre los máximos de los espectros simulados y experimentales.

La transición que produce el máximo de absorbancia, sería la transición entre todos los modos normales de vibración del estado vibracional $\nu=0$ de los estados electrónicos involucrados (transición 0-0). A su vez, en el máximo a ~ 550 nm que aparece como producto de la transición entre el $\nu=0$ del estado basal y el $\nu=1$ del estado excitado solamente el modo normal vibracional 42° estaría involucrado en la transición (42^{11}), ver Figura 4.

La temperatura puebla estados vibracionales de mayor energía que el $\nu=0$ en el estado basal. Este hecho provoca posibles transiciones entre los estados vibracionales $\nu>0$ del estado electrónico basal y distintos estados vibracionales del estado electrónico excitado. Estas transiciones son conocidas como “bandas calientes”. En la Figura 4, las bandas calientes están precedidas por una “m” y pueden implicar a más de un estado vibracional de partida en la transición (ejemplo, m14 en la Figura 4). De la figura, se puede observar que el efecto de

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

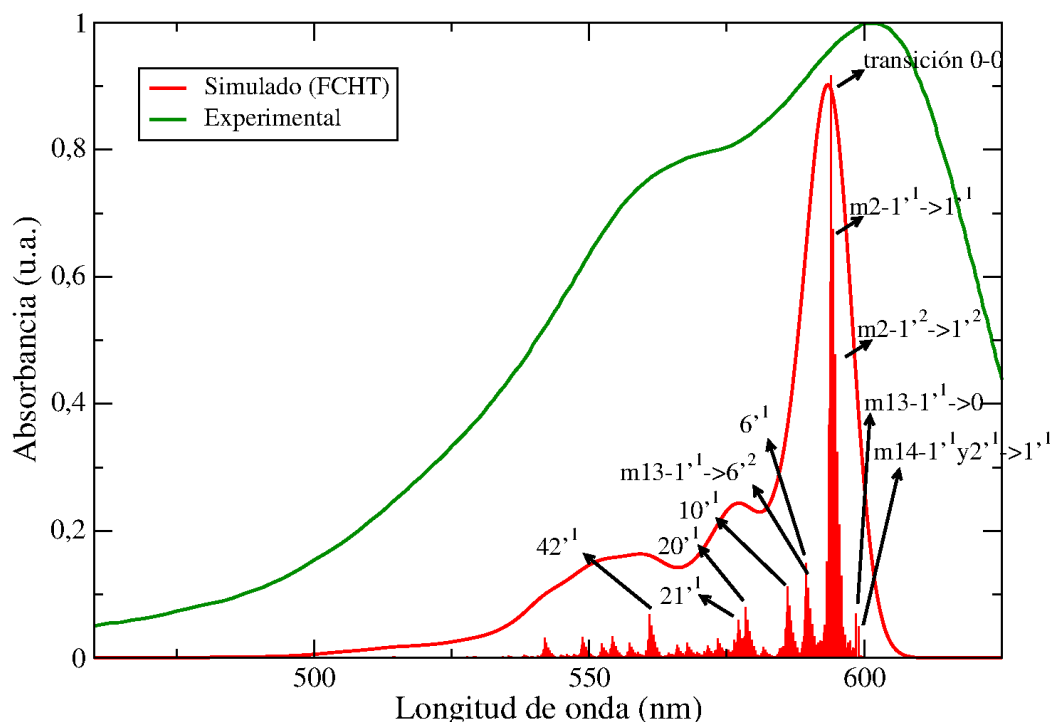


Figura 4: Análisis detallado de las vibraciones involucradas en la transición electrónica para el metanol. La banda X^y indica que es la transición entre todos los modos normales de vibración del estado vibracional $v=0$ del estado electrónico basal y el modo normal X y el estado vibracional y del estado excitado.

temperatura no modifica significativamente la forma del espectro simulado, sino que produce un ensanchamiento de banda. Dicha forma está dada principalmente por las transiciones que involucran a $v=0$ en el estado basal.

Estas observaciones sugerirían que el hombro del espectro es producto de una transición vibrónica entre el estado basal y el primer estado excitado. A pesar del aparente buen acuerdo con los espectros experimentales (excepto por la intensidad de vibrónico), se tratará de verificar esta hipótesis en posteriores estudios computacionales y experimentales.

5.3.1. Estudio de transiciones vibrónicas en solventes apróticos

Los resultados logrados mediante esta metodología parecen describir satisfactoriamente las transiciones electrónicas y vibrónicas para el VM en los solventes próticos, excepto por la intensidad algo baja del hombro de 545-560 nm que se vuelve una segunda banda al ir en la serie metanol, propanol y hexanol. Por este motivo, se probó también esta metodología para el VM en solventes apróticos.

Sin embargo, en los espectros vibrónicos simulados en solventes apróticos, solamente

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

aquel en heptano fue cercano al experimental. En tanto que, en acetato de etilo y acetonitrilo, el espectro simulado tuvo un corrimiento hacia el rojo de ~30 nm y ~40 nm en comparación al experimental, respectivamente (Figura 5). Como se mencionó en la sección anterior, el modelo de utilizar la energía vertical como aproximación a la energía del máximo de absorción fue muy satisfactoria en los solventes apróticos para el VM y otras fenotiazinas similares.^{17,18,19}

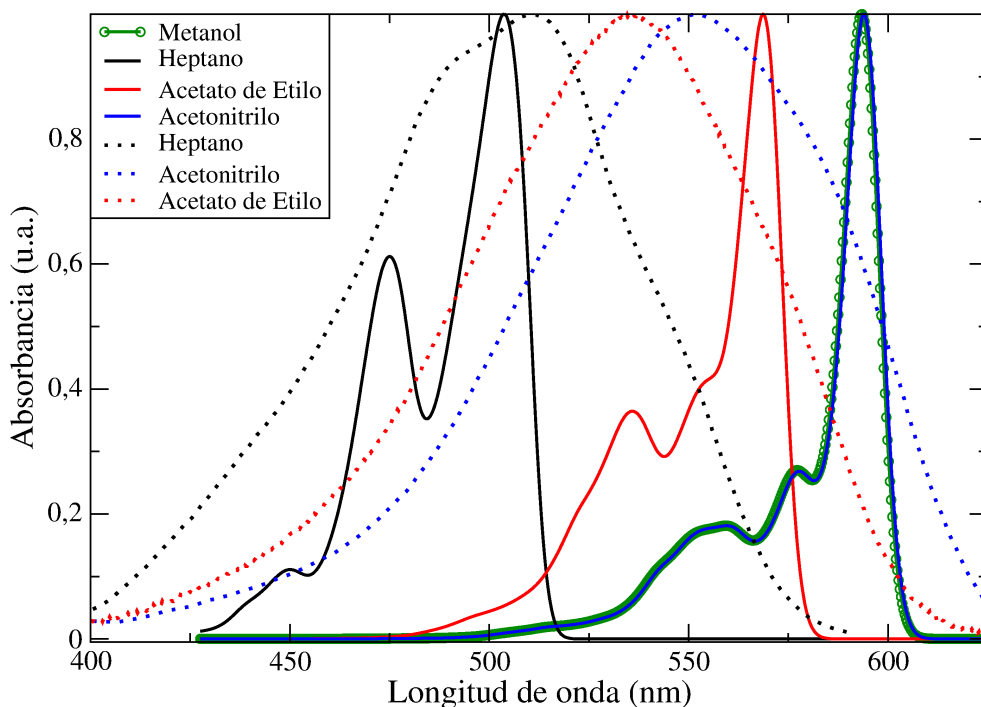


Figura 5: Espectro simulado del VM en solvente apróticos y comparación con el espectro del metanol simulado y espectros experimentales (línea punteada). Los espectros experimentales y simulados se encuentran normalizados.

5.3.1.1. Cambio de funcional

Como los resultados en el espectro del VM en acetonitrilo y en metanol resultaron ser muy similares, se consideraron diferentes opciones de cálculo que pudieran estar más de acuerdo con las observaciones experimentales. Como primera medida, se volvió a probar el funcional PBE0, pero en esta oportunidad solamente en acetonitrilo y metanol (a modo de prueba). En la Figura 6, se muestra que el funcional PBE0, no marca una diferencia en el máximo de absorción para el VM en los solventes mencionados. Sin embargo, se observa que el espectro global es diferente, siendo más intensas las bandas I y II, indicadas en dicha figura.

En conclusión, PBE0, al igual que B3LYP, no logra resolver la diferencia en el λ_{\max} del VM en acetonitrilo y metanol.

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

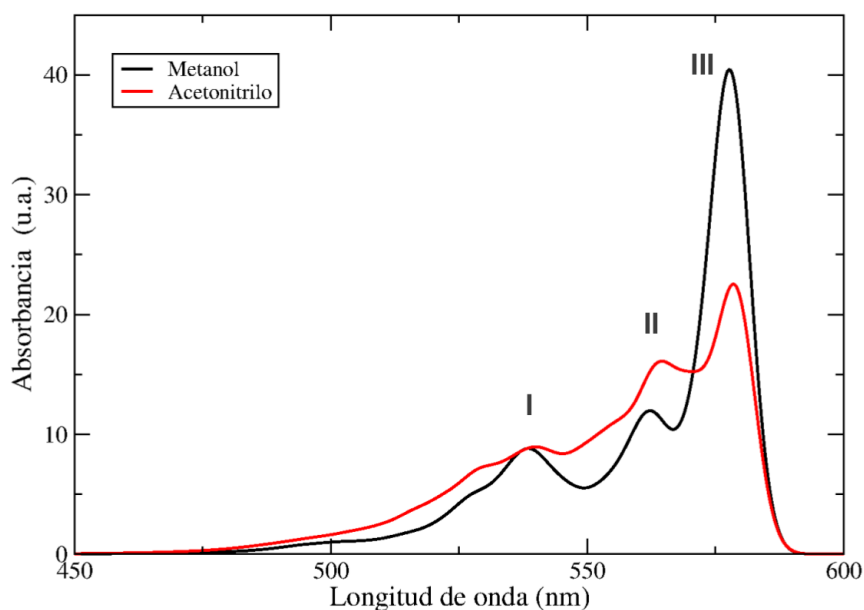


Figura 6: Comparación entre espectro del VM en acetonitrilo y en metanol usando el funcional PBE0. Se puede observar que sigue sin haber diferencia en la λ_{max} del absorción del VM en estos dos solventes (las intensidades no están normalizadas).

A partir de estas consideraciones resulta claro que la hipótesis de adjudicar el hombro de 550-560 nm a un vibrónico no resulta tan convincente como se estimó.

5.4. En busca de nuevas metodologías.

Como ya se destacó, los espectros simulados en acetonitrilo y en metanol son muy similares. Este comportamiento se observó antes cuando se mostraron los resultados de absorciones verticales (usando B3LYP y respuesta lineal, Tabla 1) en los cuales los máximos de absorbancia entre VM en acetonitrilo y metanol diferían en 1 nm. Posteriormente, cuando se tuvieron en cuenta moléculas discretas de metanol, el panorama no cambió significativamente, es decir, no parecen tener importancia alguna las interacciones discretas con el solvente donador de **puentes H** (Tabla 2).

Nuevamente se consideró el modelo de una molécula discreta de metanol formando **punto H** con el colorante. Se utilizó una de las estructuras optimizadas en la sección 5.2. y se llevaron a cabo las simulaciones vibrónicas. A modo de ejemplo se muestra lo obtenido en metanol para el colorante sin **punto H** explícito y en su estructura optimizada formando un **punto H** con el metanol en la geometría optimizada de la Figura 2a. Como puede apreciarse en la Figura 7, prácticamente, no hay cambios por la presencia de este **punto H**.

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

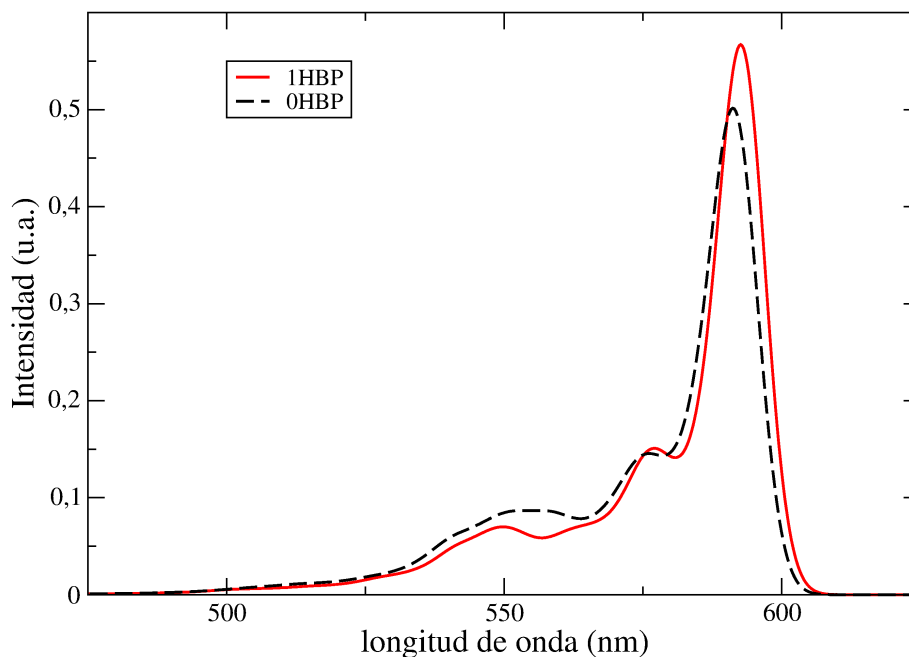


Figura 7: Simulación en metanol con el colorante libre y comprometido en un puente **H** en la geometría de mínima energía.

En virtud de estas consideraciones, a pesar del aparente buen acuerdo con los espectros experimentales en los tres solventes próticos que se ve en la Figura 5, estos resultados fueron sometidos a posteriores análisis tanto computacionales como experimentales para confirmar la naturaleza del máximo de absorción a 600 nm y el hombro o segunda banda entre 545-560 nm, que se detallan a continuación.

- 1) La simulación en acetonitrilo y otros solventes apróticos (no sólo los simulados sino otros 7 solventes) fue analizada por la contraparte experimental, empleando un modelo teórico de Franck-Condon que utiliza factores de Huang-Rhys para ajustar los espectros experimentales. Según este modelo, la principal transición vibrónica no sería la 0-0, sino la 0-1 o la 0-3 según el solvente aprótico, en contradicción con lo obtenido en la simulación. Por otra parte, se observó que siempre la simulación obtiene la banda 0-0 como la más intensa, lo que no es común en fotoquímica excepto para sistemas muy rígidos y simétricos.²⁰

Los problemas de estas simulaciones podrían deberse a diferentes factores, entre ellos:

- La existencia de un fuerte acoplamiento electrón-fonón, lo cual justificaría un error en el cálculo de las intensidades de las integrales de Franck-Condon.^{21,22,23}

Cuando la variación de la transición de momento dipolar ocurre lentamente con

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

las coordenadas nucleares, el acoplamiento electrón-fonón puede ser aproximado de una manera satisfactoria por el efecto Herzberg-Teller, ya que los términos mayores al de primer orden pueden ser despreciados. Por otro lado, cuando la separación de los estados electrónicos es baja, la aproximación de Born-Oppenheimer ya no constituye una buena descripción de los estados electrónicos y la mezcla de los estados, a través del operador energía cinética nuclear, se vuelve significativa. En algunos casos, el término de segundo orden de la serie de Taylor no puede ser despreciado.²⁴

- En el estado excitado, los grados de libertad lentos del solvente (reorganización) relajan el sistema llevando a una configuración de equilibrio, afectando dicho estado electrónico.²⁵ De este modo, surge la posibilidad de que el espectro de absorbancia resuelto vibracionalmente no pueda ser descrito a partir del cálculo de las vibraciones del estado excitado relajado, porque éste implicaría un estado electrónico diferente al no relajado, o vertical. Una prueba de esto se encuentra en la diferencia de momentos dipolares entre el estado excitado relajado y el no relajado encontrado en los resultados de esta Tesis.
- 1) Los colaboradores experimentales realizaron un cuidadoso estudio de efecto de temperatura en los tres solventes próticos. A partir del análisis de este estudio, se deduce que al aumentar la temperatura, la banda de 545-560 nm (el hombro o segunda banda) se conserva mientras que la banda más intensa de cerca de 600 nm desaparece. Desaparece más rápido en el caso de los alcoholes de cadena más larga. Este comportamiento descarta categóricamente la posibilidad que la multiplicidad de picos se deba a vibrónicos (sólo cambiaría el ensanchamiento).
 - 2) En virtud de la dependencia de la temperatura se deduce que sólo se puede explicar la absorción a 600 nm como debida a una segunda especie molecular, con energía libre de formación negativa, que podría ser el VM enlazado por **puentes H** al solvente (en ese caso, nuestra descripción de dichos **puentes H** hasta aquí fue no satisfactoria) o bien la formación de dímeros o interacciones con otros iones. La contraparte experimental no encuentra ningún cambio en la forma espectral ni en las longitudes de onda variando la concentración hasta diluciones de 5-6 órdenes de magnitud lo que descartaría la presencia de dímeros. Computacionalmente se intentó formar diferentes

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

dímeros tipo π - π *stacking*, sin obtener resultados concluyentes, y con cambios irrelevantes en el espectro. Finalmente, el VM es una de las pocas fenotiazinas neutras, lo que permite trabajar en condiciones de fuerza iónica prácticamente cero. De todo esto, se deduce que sólo resta la posibilidad de que la especie que absorbe cerca de 600 nm sea el VM interaccionando con una o más moléculas de metanol de forma discreta. En este caso la descripción de dicha interacción empleando el modelo estático de la geometría optimizada del colorante formando puentes H en su geometría de mínima energía no ha resultado satisfactoria.

Naturalmente, la simulación cuántica del colorante en su estado basal y excitado en solvente, con suficientes moléculas discretas de metanol, empleando dinámica molecular para dar cuenta de todos los aspectos dinámicos e interacciones específicas está por el momento lejos del alcance computacional disponible. Además, uno de los principales objetivos de este capítulo no sólo es entender la fotoquímica del VM en sí mismo, sino encontrar los protocolos que permitan tratar diversas familias de colorantes que puedan utilizarse en **PACT** y otras aplicaciones medicinales y tecnológicas, con lo que el costo computacional resultaría injustificado.

En las siguientes secciones se tratará de construir modelos plausibles, a un costo computacional razonable, para recuperar los aspectos dinámicos de las interacciones con el solvente prótico aparentemente perdidos con los otros modelos hasta aquí probados.

5.5. *QM/MM Secuencial*

El sistema real no se encuentra representado sólo por la geometría del soluto en su mínimo energético o por una sola configuración de **punto H**. Además, el solvente implícito, si bien genera un campo de reacción en la molécula, es una descripción simplificada del efecto de solvatación. Esta descripción no tiene en cuenta al entorno microscópico de solvente que rodea al soluto, como así tampoco la influencia de interacciones específicas.^{26,27} Por ejemplo, Canuto *et al.* mostraron que en el estudio de las transiciones electrónicas del uracilo en agua, los resultados con el método **PCM** mejoran significativamente cuando se involucran moléculas de agua discreta. Según los autores, de esta forma se permite deslocalizar la función de onda del soluto en las moléculas de aguas cercanas.²⁸

Por tal motivo, una de las posibles estrategias para mejorar la exactitud en el cálculo de las

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

energías de transición del VM en los solventes próticos, es hacer explícitas las capas de solvatación. De esta forma, se permite que las moléculas de solvente cercanas al VM puedan interactuar con éste de manera específica.

El método de Simulación Híbrido Cuántico/Clásica Secuencial (**S-QM/MM**) propuesto por Canuto *et al.*,²⁹ es un método **QM/MM**. En este método se aplica los métodos **QM** y **MM** en forma consecutiva, es decir, el cálculo cuántico se realiza sobre geometrías (o configuraciones) obtenidas mediante un cálculo clásico. Primero, se realiza una simulación de Monte Carlo, de la cual se seleccionan configuraciones estadísticamente representativas del sistema. Luego, sobre estas configuraciones seleccionadas se realizan cálculos de **QM**, de los cuales se puede obtener un promedio estadístico de la observable.

Esta metodología fue propuesta como una forma de solucionar algunos inconvenientes de los métodos **QM/MM** convencionales y, al mismo tiempo, elaborar una metodología capaz de garantizar que los resultados obtenidos fueran estadísticamente correctos.

En el método **QM/MM**, la separación entre la parte clásica y la cuántica es definida *a priori*, lo cual no siempre es fácil de establecer. La separación en algunos casos es inmediata, por ejemplo, en el caso del sitio de activo de una enzima (**QM**), donde ocurren las reacciones químicas. Mientras que en otros casos, no es directa, como por ejemplo la interacción entre un soluto polar en un solvente (polar o apolar). En este caso, el dipolo del soluto afecta moléculas de solvente a grandes distancias. Por lo tanto, es difícil, *a priori*, determinar hasta dónde esa interacción es significativa con el fin de definir el límite de aplicabilidad de la parte cuántica. Por ejemplo, el corrimiento de una banda de absorción electrónica de una molécula en agua, en el límite de diluciones altas, generalmente no puede ser descrita únicamente por las moléculas de solvente de la primera capa de solvatación.

La selección de configuraciones estadísticamente representativas es otro punto importante a tener en cuenta, ya que sólo las configuraciones estadísticamente descorrelacionadas son relevantes a la media final. A su vez, las configuraciones estadísticamente correlacionadas no contienen información estadística nueva y, por lo tanto, es un consumo innecesario de recursos computacionales.

La mayor parte de las configuraciones obtenidas durante un cálculo de **QM/MM** convencional son estadísticamente no relevantes, llevando un costo computacional innecesario, que dependiendo del tamaño del sistema, puede resultar en la factibilidad o no de

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes práticos

su estudio a través de **QM/MM** convencional.

Finalmente, en la mayoría de los casos hay una propiedad específica de interés que se busca calcular, pero si, posteriormente, se desea obtener otra propiedad de interés, una nueva simulación **QM/MM** requiere ser realizada, quizás teniendo que definir un límite distinto entre la parte cuántica y clásica. Un tratamiento secuencial elimina todos estos inconvenientes. Aunque, el método secuencial también introduce algunas limitaciones nuevas, como por ejemplo, la polarización del soluto.³⁰

5.5.1. Dinámica Molecular

En el método **S-QM/MM** se utiliza el método de Monte Carlo como método **MM** para generar las configuraciones. Sin embargo, en el trabajo de estas tesis se empleó dinámica molecular (**DM**), debido a la experiencia en el grupo de investigación sobre esta metodología y, además, debido a que la parametrización del VM resulta simple usando el paquete AMBER. Por ello, se realizó una dinámica molecular del VM en metanol. Se eligió metanol como solvente, debido a que es el solvente prático más simple. Además, se evitó usar agua como primera simulación debido a que es uno de los solventes más complejos.

El sistema está constituido de VM inmerso en un caja de moléculas de metanol de dimensiones 37x30x27Å. Se usó el campo de fuerza de *Generalized Amber Force Field* (**GAFF**) para describir tanto al VM como al metanol. La parametrización del VM fue idéntica a la realizada para los ligandos de la **P-gp**. Las condiciones de simulación fueron a presión y temperatura constantes (**NTP**), con un paso de integración de 2 fs. La temperatura se mantuvo en 300 K usando el termostato de Nosé-Hoover³¹ con un acoplamiento térmico de 0,1 ps. La presión se mantuvo isotrópica e igual a 1 bar usando el barostato de Parrinello-Rahman³² con un acoplamiento de presión de 0,5 ps y una compresibilidad de $4 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$. Las posiciones atómicas de la molécula de VM estuvieron restringidas con una fuerza de $10000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ durante toda la **DM**. El paquete de programas de GROMACS se usó como integrador de la **DM**.³³ El análisis fue realizado con los programas de los paquetes AMBER³⁴ y GROMACS.

En la equilibración, se monitoreo el **RMSD** de VM y la densidad del solvente, las cuales tuvieron un valor promedio de 0,001 Å y 0,738 g cm⁻³ (0,791 g cm⁻³ densidad experimental del metanol a 300K y 1 bar)³⁵, respectivamente. Además, la estructura del solvente fue caracterizada a través de la función de distribución radial ($g(r)$) de los átomos de oxígeno del

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

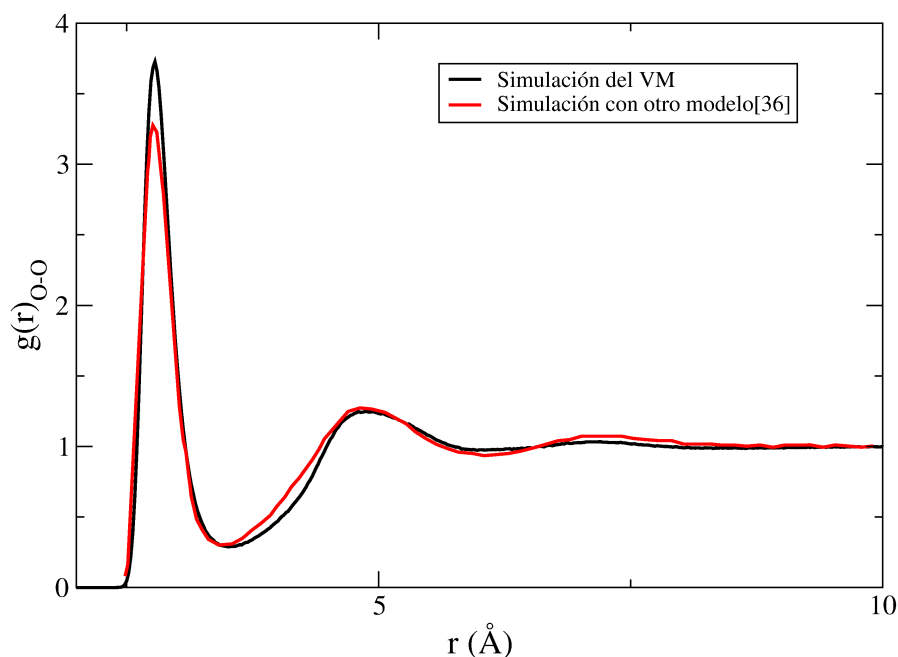


Figura 8: Función de distribución radial de los oxígenos del metanol obtenidos a partir de la **DM** del VM. Comparación contra otro modelo de metanol simulado por **DM** ref. 36

metanol. Esta $g(r)$ se comparó con la obtenida por otro modelo publicado (Figura 8),³⁶ obteniéndose una estructura aceptable del solvente. Asimismo, el valor de la distancia intermolecular oxígeno-oxígeno del metanol obtenido de la $g(r)$ (2,78 Å), fue muy próximo al experimental (2,8 Å).³⁷

5.5.1.1. Puentes de Hidrógeno

La **DM** mostró la formación persistente de **puentes H** entre el metanol y el VM (Figura 9). El análisis de **puentes H** mostró que las principales interacciones de este tipo fueron con el

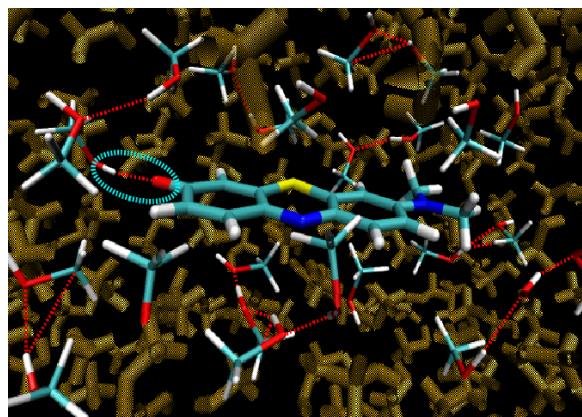


Figura 9: VM forma la mayor parte del tiempo de simulación **puentes H** con una o dos moléculas de metanol.

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

Tabla 3: Análisis de la persistencia de **punte H** entre el VM y el metanol.

Átomo Aceptor	Donor	%persistencia	Distancia (Å)	Ángulo (°)
O1	solvente	110,7	2,83	21,3
N1	solvente	7,3	3,92	31,0
S1	solvente	1,2	3,26	35,2
N2	solvente	1,1	3,22	35,6

oxígeno carbonílico de VM con un 110% de persistencia (Tabla 3). Este porcentaje mayor al 100% indica que en todo el tiempo de simulación se forman uno o más **puentes H**. En la Tabla 3, se observa que los restantes heteroátomos no contribuyen significativamente en la interacción a través de **puentes H** con el metanol. En la Figura 10, se muestran las etiquetas de los átomos usadas en la **DM**, que permiten entender la Tabla 3.

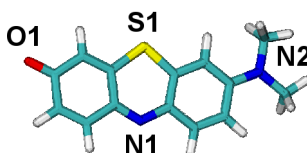


Figura 10: Etiquetas del VM utilizado en los cálculos de dinámica molecular.

Además, se analizó cuántos **puentes H** se forman a cada tiempo (o configuración). A partir de este análisis se separaron las configuraciones en poblaciones sin, con uno, dos y tres **puentes H** y se construyó un histograma con el número de configuraciones de las poblaciones del sistema sin (**0HBP**), con uno (**1HBP**), dos (**2HBP**) y tres **puentes H** (**3HBP**) (Figura 11).

El histograma muestra que la mayoría de las configuraciones presentaron la formación de un **punte H**, seguida de aquella con dos. Esto concuerda con lo expuesto en la Tabla 3, en la cual se observó que hay una persistencia de **punte H** del 110% entre el oxígeno carbonílico del VM y el hidrógeno del hidroxilo del metanol. Este hecho también se puede apreciar, si se observan las configuraciones de las poblaciones **1HBP** y **2HBP**, como se muestra en la Figura 12. En el caso del grupo **2HBP**, varias configuraciones presentaron un **punte H** con el oxígeno carbonílico y otro con el nitrógeno del anillo de fenotiazina. Sin embargo, la mayoría de las configuraciones involucran la formación de dos **puentes H** al oxígeno carbonílico. Por otro lado, cuando ocurre la formación de tres **puentes H** participa, además, otro heteroátomo del VM, el nitrógeno del anillo fenotiazina. Sin embargo, el grupo **3HBP** no presenta un peso estadístico importante, ya que sólo está representado por una pequeña proporción de

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

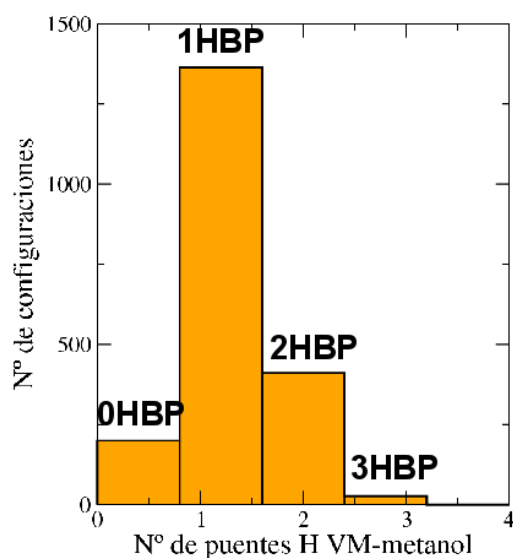


Figura 11: Histograma del análisis de **puentes H** del VM

configuraciones (Figura 11).

Vale destacar, que el peso estadístico de las configuraciones sin **puente H** es importante, presentando una cantidad cercana a las del grupo **2HBP**. Esto podría mostrar la complejidad del sistema, el cual, probablemente no pueda ser representado por un sólo tipo de configuraciones de **puentes H**.

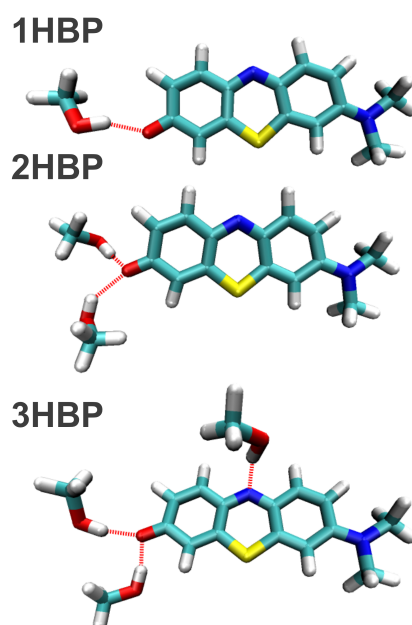


Figura 12: Algunas configuraciones (estructuras no optimizadas) mostrando algunas de todas las posibles configuraciones con 1, 2 y 3 **puentes H** tomadas de la dinámica.

5.5.1.2. *Correlación Estadística*

Como se mencionó anteriormente, un paso importante del método **S-QM/MM** es la obtención de configuraciones descorrelacionadas a partir del método de Monte Carlo o, como en este caso, de una **DM**. La pérdida de la correlación se estima a partir de la autocorrelación de la función de la energía potencial (**ACF**).

$$ACF(t) = \frac{\langle \delta E_i \delta E_{i+t} \rangle}{\delta E^2} = \frac{\sum_i (E_i - \langle E \rangle)(E_{i+t} - \langle E \rangle)}{\sum_i (E_i - \langle E \rangle)^2} \quad (5.1)$$

donde E_i es la energía del sistema en una determinada configuración temporal, $\langle E \rangle$ el promedio temporal y E_{i+t} la energía de las configuraciones temporales posteriores a la configuración i .

Una vez calculada la **ACF** se la ajusta a una función $C(t)$, que es la sumatoria de dos funciones de decaimiento exponencial, como sigue:

$$C(t) = A e^{-\frac{t}{\tau_1}} + B e^{-\frac{t}{\tau_2}} \quad (5.2)$$

donde t es cada tiempo de la simulación **DM**.

La integral de esta función es τ , el cual es el tiempo de correlación, es decir, el tiempo en el que se pierde la correlación entre las configuraciones. En general, el valor de τ se corresponde con un tiempo en el que se tiene, aproximadamente, un 15% de correlación.³⁸

$$\tau = \int C(t) dt \quad (5.3)$$

En este sistema el tiempo de correlación de la **DM** fue de 1,5 ps, pero a fin de obtener un porcentaje de correlación menor al 15%, se seleccionaron y extrajeron las configuraciones cada 2 ps (tiempo τ). En la Figura 13 se muestra el **ACF** obtenido para la **DM** del VM en la caja de metanol, también se puede apreciar que en 2 ps la correlación es menor al 15%.

Una trayectoria descorrelacionada se construyó tomando las configuraciones cada 2 ps. Sobre esta trayectoria se realizó un análisis de la cantidad **puentes H**, que permitió conocer

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

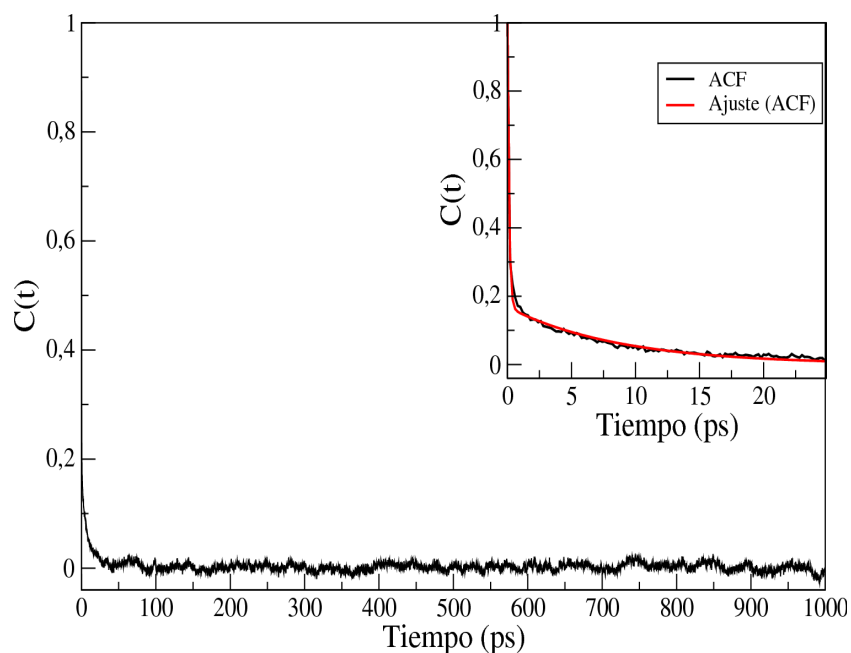


Figura 13: Cálculo de *ACF* sobre la *DM* del *VM*. En el cuadro superior derecho se muestra la función de ajuste $C(t)$.

las configuraciones sin **punte H**, con uno, dos y tres **puentes H**, para luego separarlas en los grupos: **0HBP**, **1HBP**, **2HBP** y **3HBP**.

Se seleccionaron 150 configuraciones a partir de la trayectoria descorrelacionada. El número de configuraciones de cada grupo se eligió manteniendo la relación de poblaciones encontradas en el histograma, quedando: 15 configuraciones **0HBP**, 100 **1HBP**, 30 **2HBP** y 2 **3HBP**. Cada una de estas configuraciones tienen la totalidad de los átomos involucrados en la simulación de **DM**.

5.6. ONIOM / TD-DFT

La energía de absorción de una molécula está dada por todas las configuraciones representativas en un sistema con movimiento dinámico, a una temperatura dada. Cada configuración está rodeada por una primera capa de solvente, que interacciona fuertemente con el soluto. Ésta presenta distintas configuraciones que pueden afectar las propiedades ópticas del soluto, polarizándolo. El empleo de ONIOM permite, en forma explícita, incluir el efecto de la primera capa de solvatación sobre el soluto. En el sistema en estudio, se calculó la energía de absorción para cada una de las 150 configuraciones anteriormente mencionadas. Cada configuración fue dividida en dos capas **QM:QM**.

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

En este esquema, la primera capa cuántica que corresponde a cada una de las configuraciones **0HBP**, **1HBP**, **2HBP** o **3HBP**, con las moléculas de metanol que forman el **punte H**, pero sin la capa de solvatación (Figura 12). Esta capa es la de mayor nivel de teoría cuántica (B3LYP/6-311+G**). La segunda capa cuántica, que es de menor nivel de teoría (B3LYP/6-31G*), estuvo representada por la primera esfera de solvatación de moléculas de metanol (7 Å alrededor del VM). La última y tercer capa está formada por las cargas atómicas de las restantes moléculas de metanol, las cuales permiten polarizar las dos capas **QM** (Figura 14).

Con este esquema, se obtuvieron las energías de transición vertical para los seis primeros estados excitados de cada una de las 150 configuraciones, mencionadas anteriormente. Las intensidades y energías (en longitud de onda) resultantes se muestran como líneas de intensidad en la Figura 15. El espectro resultante para cada grupo se aproxima a través de envolventes gaussianas. En tanto, en la Figura 16 se compara el espectro experimental con el simulado, resultante de envolventes gaussianas de cada una de las líneas de intensidad.

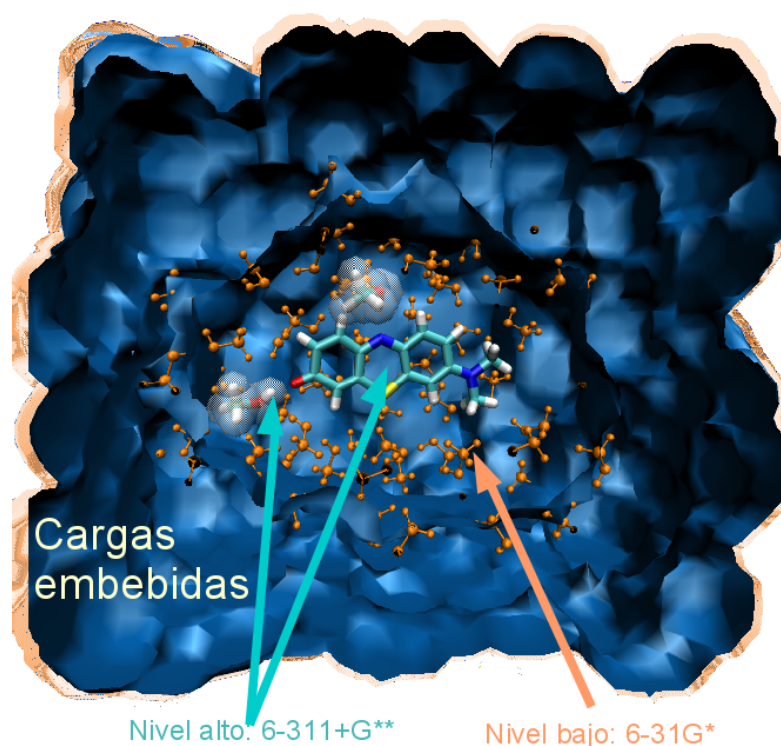


Figura 14: Esquema del sistema aplicado dentro del formalismo de ONIOM. La capa de alto nivel de teoría, está señalada por las flechas color ciano, la de bajo nivel de teoría por la flecha naranja. El fondo en azul representa a las cargas puntuales de las moléculas restantes de metanol.

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

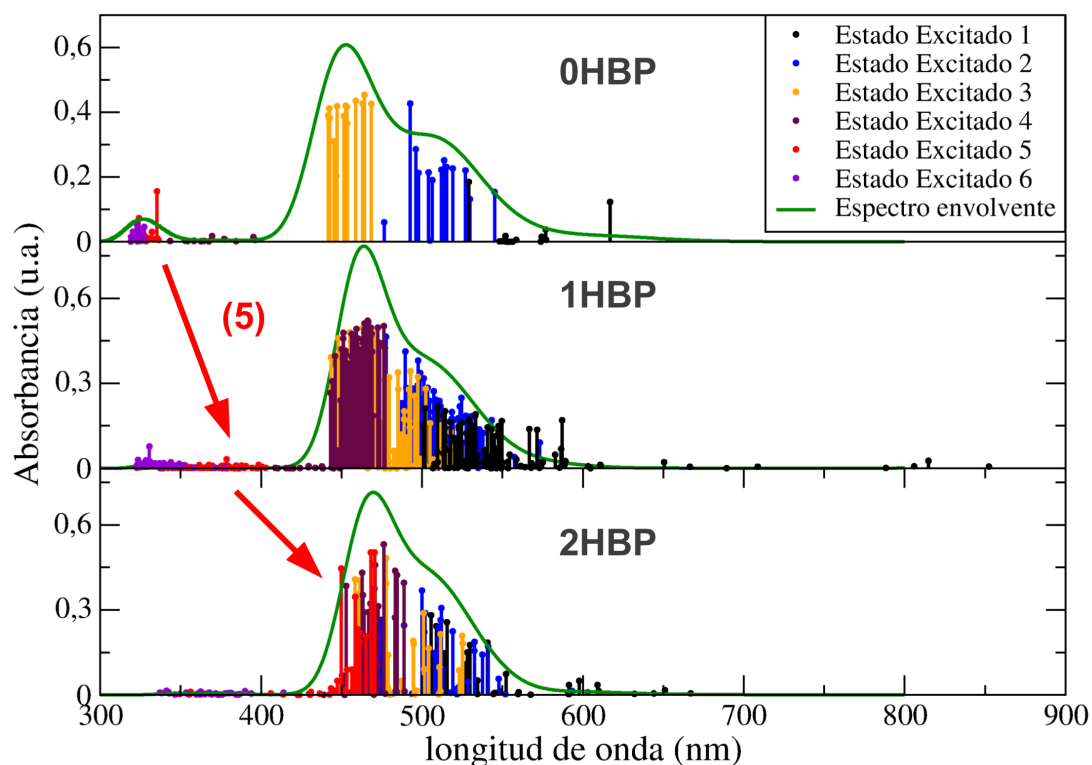


Figura 15: Espectro del VM simulado con *S-QM/MM* y *ONIOM*. En líneas verticales se muestran las intensidades de absorción para cada estado excitado de cada una de las configuraciones. En línea continua verde el espectro simulado resultante de la envolvente. La flecha roja muestra como la cantidad de puentes de hidrógeno afecta la intensidad y la λ_{max} de absorción del estado excitado 5.

El resultado de esta estrategia, dentro del formalismo de ONIOM, no mejora los obtenidos hasta el momento. Se puede ver en este sistema de estudio un fuerte corrimiento de los máximos hacia el azul respecto al espectro de metanol experimental (Figura 16). A su vez, si se comparan cada uno de los espectros simulados entre sí se observa, como es de esperarse, que las configuraciones con mayores cantidades de puentes de H presentan mayor corrimiento hacia el rojo.

En el caso de las configuraciones **0HBP** los estados excitados 2 y 3 son los que mayor contribución dan al espectro simulado. Por otro lado, en las configuraciones **1HBP** se ve involucrado, además, el estado excitado 4 (con un corrimiento de ~80nm), y en el caso de las configuraciones **2HBP** también participa el estado excitado 5 (Figura 15). De este modo, se observa que los **puentes H** afectan fuertemente a los estados excitados de mayor energía (principalmente a los estados excitados 4 y 5). La interacción modifica no sólo sus máximos de absorción, sino también sus intensidades (Figura 15).

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

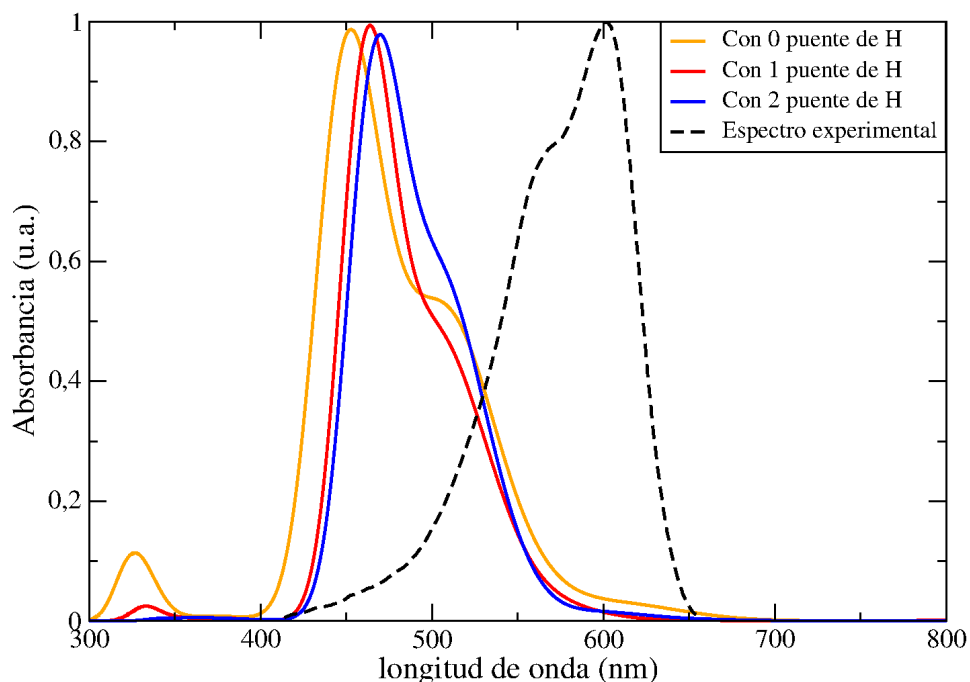


Figura 16: Espectro del VM simulado con *S-QM/MM* y *ONIOM*. En líneas gruesas el espectro experimental.

5.7. PCM / TD-DFT

La utilización de **ONIOM** con dos capas **QM**, ambas a nivel de **DFT** tuvo un importante costo computacional (5 horas usando 8 procesadores Xeon X5450 para cada una de las 150 configuraciones) y no arrojó mejoras respecto de los cálculos realizados con metanol como solvente implícito. Quizás, el problema se situó en el formalismo sustractivo de **ONIOM**, debido a que los estados excitados involucrados y sus energías se asemejan a un comportamiento del sistema en fase gaseosa.

Por lo tanto, a pesar de que con la estrategia anterior no se obtienen resultados que puedan explicar con un grado de aproximación aceptable el sistema en estudio, se llevó a cabo otra similar. En ella, se reemplaza la capa explícita de la primera esfera de solvatación y las cargas atómicas puntuales por el empleo de solvente implícito (**PCM**). Al igual que se explicó en la sección anterior, se calculan los primeros seis estados excitados de las 150 configuraciones (**0HBP**, **1HBP**, **2HBP** y **3HBP**). De este modo, se tienen configuraciones (grupos **1HBP**, **2HBP** y **3HBP**) con el **puente H** explícito, y el resto del solvente simulado en forma implícita (Figura 17).

Los espectros de absorción UV-Vis obtenidos con el modelo **PCM/TD-DFT** fueron muy aproximados al experimental. El máximo de absorción encontrado mediante esta simulación

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

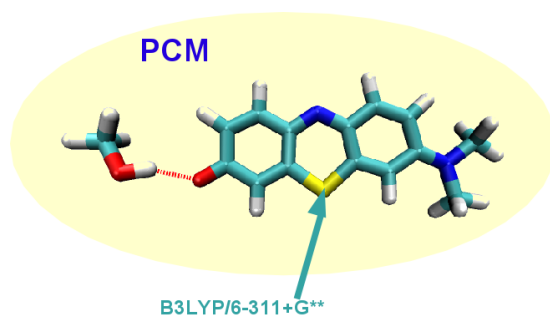


Figura 17: Esquema del cálculo de las 150 configuraciones dentro de un solvente implícito.

tuvo un error de 20 nm respecto del valor experimental (Figura 18).

La transición HOMO \rightarrow LUMO es la de mayor contribución en el primer estado excitado con un 90%, mientras que la transición HOMO-1 \rightarrow LUMO involucra un \sim 10% de contribución para este estado excitado (Figura 19). En ambas contribuciones, las transiciones son del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$.

En el segundo estado excitado los porcentajes de contribución se revierten, respecto al primer estado excitado y, además, aparece una pequeña contribución HOMO-2 \rightarrow LUMO

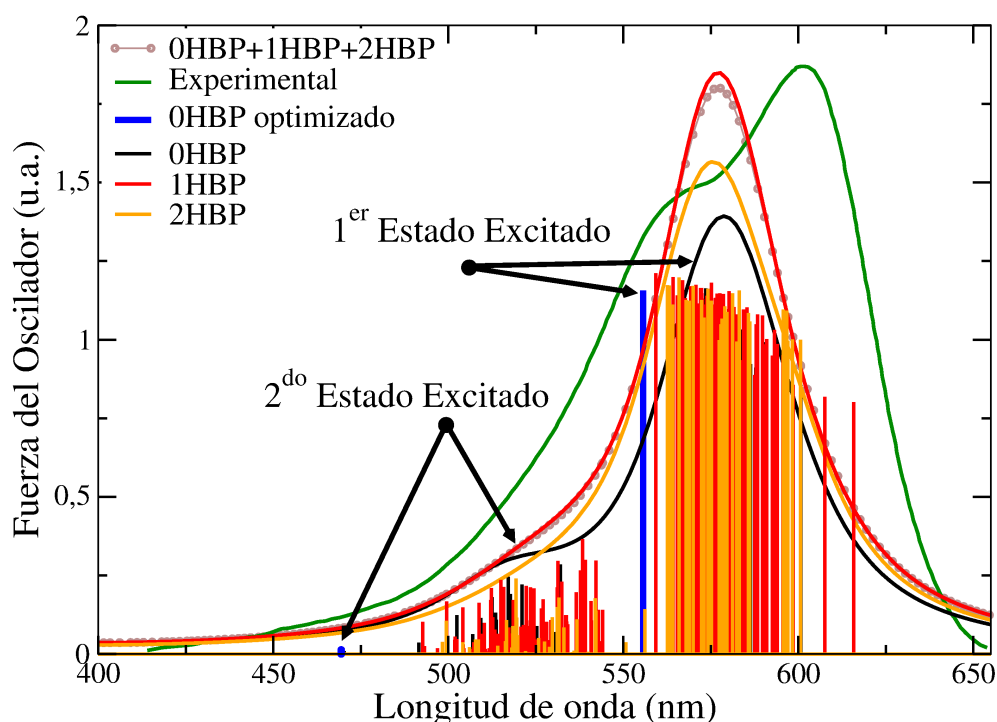


Figura 18 Espectro de simulación del VM con PCM, con las primeras y segundas transiciones electrónicas de las 150 configuraciones obtenidas mediante DM. En línea azul, la primera y segunda energía de transición electrónica para el sistema optimizado de VM sin moléculas de metanol (0HBP optimizado). El sistema optimizado de VM con una y dos moléculas de metanol no se muestra, debido a que la variación respecto a 0HBP no fue significativa. En línea verde continua el espectro experimental. 0HBP+1HBP+2HBP Las líneas envolventes no están escaleadas para que puedan visualizarse en el gráfico.

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

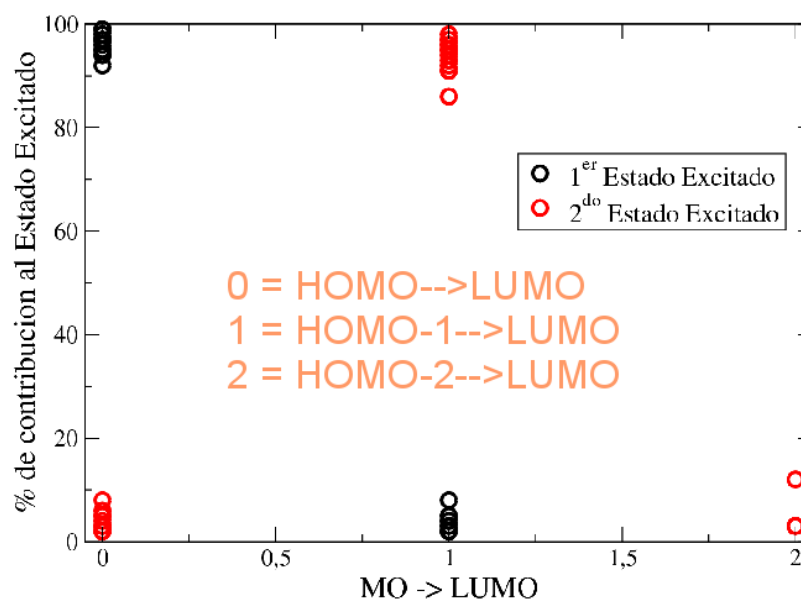


Figura 19 Contribuciones de las transiciones entre los orbitales moleculares para el primer y segundo estado excitado.

(Figura 19). La intensidad calculada para este estado sólo podría contribuir a la cola hacia el azul, de acuerdo con el espectro experimental.

Si bien la envolvente de las contribuciones da un pico a sólo 20 nm del experimental, lo cual es un excelente acuerdo, como se explicó en el capítulo anterior, hay otros aspectos sumamente relevantes que pueden extraerse de la Figura 18. En primer lugar, hay una importante contribución de líneas que aparecen entre 585 y 620 nm, alrededor de la banda experimental. En estas configuraciones puede apreciarse, en forma evidente, dos aspectos no triviales de la solvatación de la especie que absorbe. En la Figura 20 se muestra una configuración en la que el metanol forma una interacción “puente de hidrógeno” con el lóbulo π del nitrógeno del LUMO de la fenotiazina. En esta geometría la aproximación es prácticamente perpendicular al plano de la fenotiazina.

Al contrario de lo que ocurre en la estructura de menor energía utilizada en la sección 5.2., en la que el **puente H** O-H \cdots N está en el plano de la fenotiazina, interaccionando con el par solitario (en el plano) del nitrógeno (no involucrado en el LUMO). Como se ve claramente en la Figura 20, la interacción de **puente H** del metanol es directa con el orbital LUMO, orbital molecular involucrado en la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ de menor energía. Si bien, esta interacción es algo más débil que aquella coplanar a los anillos, en términos de estabilidad del estado fundamental, cualquiera de ellas es frecuentemente visitada a temperatura ambiente. Sin

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

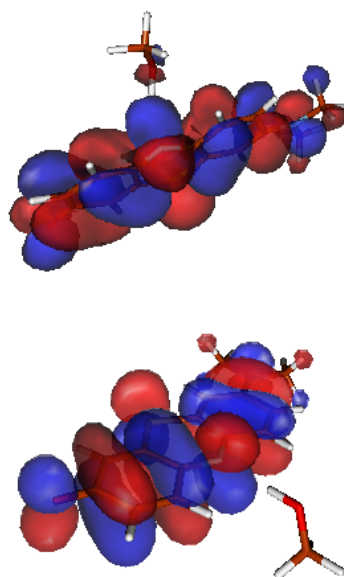


Figura 20 Arriba: una molécula de metanol interaccionando en geometría perpendicular al plano de la fenotiazina afecta la forma y la energía (0.5 eV) del LUMO involucrado en la transición al estado excitado más bajo e intenso. Abajo, en la geometría en el plano de los anillos (plano nodal para el LUMO) afecta sólo en 0.2 eV la energía del LUMO. Las diferencias que se reflejan en el gap HOMO- LUMO son de 0.21 y <0.05 eV respectivamente. La geometría de arriba rinde una banda de 615 nm mientras que la de abajo de 568 nm (sólo ligeramente corrida respecto de la estructura sin ningún puente)

embargo, sólo aquellas perpendiculares, (como la mostrada en la parte de arriba de la Figura 20) afectan sensiblemente la energía (como también la distribución electrónica) del orbital de Kohn-Sham involucrado en la transición (Figura 21). De hecho, en la configuración de mínima energía total (molécula de metanol en el plano) se afecta a otros orbitales (HOMO-2 \rightarrow LUMO, por ejemplo), pero estos no se encuentran involucrados en la transición de menor energía (están asociadas a estados excitados superiores que aparecen muy corridos al ultravioleta para ser detectados o bien tienen intensidades demasiado bajas para moldear la forma del espectro). En el caso del oxígeno carbonílico, nuevamente los **puentes H** más estables (los únicos que serían accesibles en una optimización en el modelo estático utilizado en las secciones anteriores, aún cuando las otras configuraciones tengan relevancia a temperatura ambiente) también acomodan el OH del solvente en el plano nodal del orbital

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

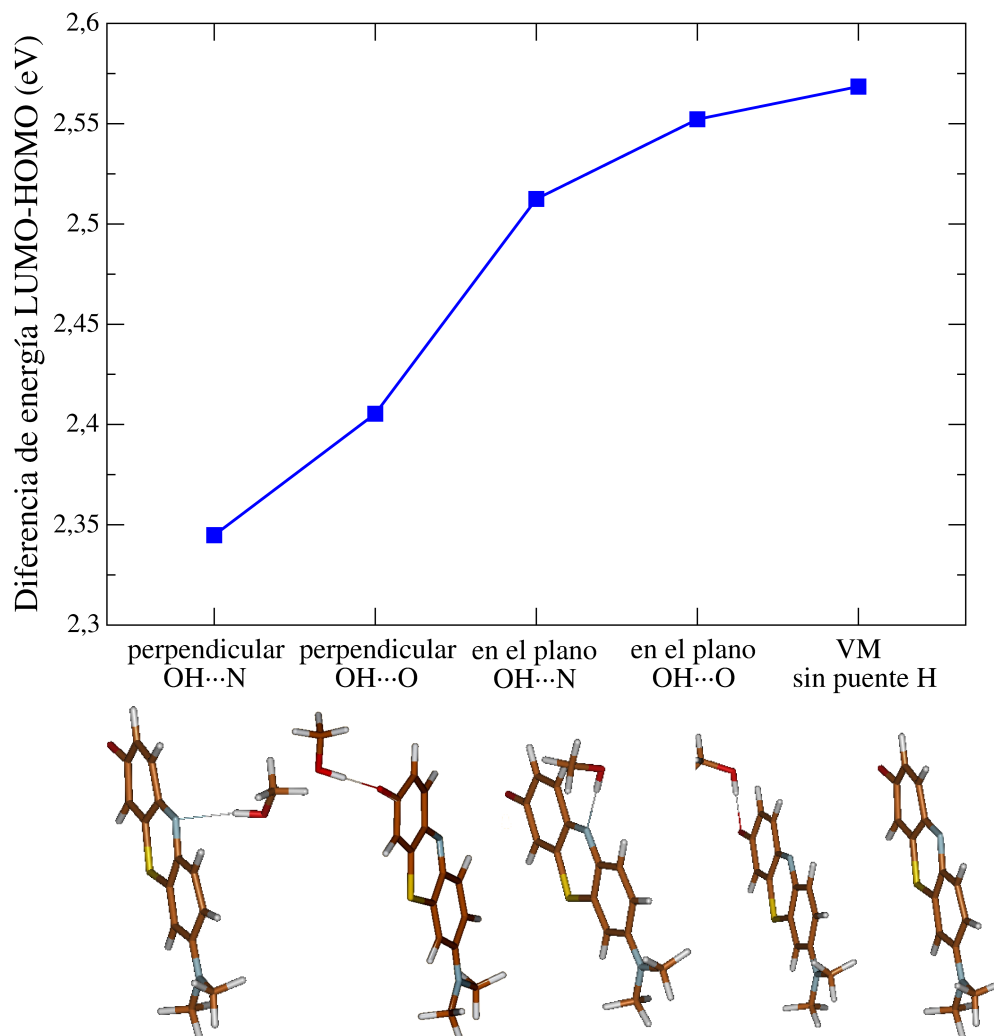


Figura 21: Variación de la diferencia de energía entre los orbitales moleculares LUMO y HOMO de acuerdo a la orientación del **puente H** y a qué heteroátomo involucra. Se compara con el VM sin **puente H**.

involucrado en la primera transición, teniendo una menor influencia en el sistema π que participa en la transición.

A fin de corroborar estas aseveraciones se inspeccionaron la energía de los HOMOs y LUMOs de las configuraciones utilizadas en las secciones anteriores (optimización hacia la configuración más estable, en el plano del anillo) y se ve que todos los funcionales empleados sólo muestran cambios muy pequeños ($<0,1$ eV) respecto de los correspondientes orbitales sin **puente H**. Independientemente, un cálculo CCSD/6-31+G* (se utiliza una base mucho más pequeña para la prueba, pero aún así los orbitales de **HF** no estarían afectados por ningún problema inherente a la descripción de **DFT**) muestra una tendencia similar: el **puente H** en el plano de la fenotiazina afecta a la diferencia de energía entre estos orbitales π señalados en

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

menos de 0,13 eV, en tanto que cambia en 0,34 eV para el caso del **punte H** perpendicular al plano de los anillos (apuntando al lóbulo π).

En otras configuraciones en la región 585 y 620 nm de la Figura 18 se encuentra que no hay una interacción tan clara, pero que la geometría está distorsionada fundamentalmente a nivel de enlace C-N y N-C y ángulo diedro CCNC de la fenotiazina, afectando las propiedades y la forma del orbital LUMO y, por lo tanto, la energía de la transición. Nuevamente, ciertas interacciones con el solvente no afectan sensiblemente la energía del estado fundamental (por lo tanto son accesibles a temperatura ambiente) pero sí afectan las energías de los orbitales (sobre todo el LUMO) directamente involucrados en la transición de el estado en cuestión. Este tipo de efectos no se puede contemplar siquiera en los modelos estáticos donde sólo aparece la configuración de mínima energía del **punte H**.

Esto ratifica que es imprescindible tener en cuenta los aspectos dinámicos de la solvatación, puesto que existen numerosas configuraciones ligeramente por encima del mínimo en energía del estado fundamental, cuyos orbitales vacantes son fuertemente afectados por las interacciones por arriba o por debajo del plano del anillo por los OH del solvente, frecuentemente visitados a temperatura ambiente.

A modo de perspectiva, queda pendiente completar el estudio a través de una simulación mediante un campo de fuerza polarizable o con términos específicos para el **punte H**, que permita hacer una dinámica a altas temperaturas (cercanas al punto de ebullición) y compararlas con los resultados experimentales a distintas temperaturas. De este modo, permitiría reproducir mejor la proporción de **puentes H** representativos a elevadas temperaturas. Con el modelo utilizado al momento esto no es posible, debido a que es muy sencillo como para reproducir densidad, punto de ebullición etc. También queda abierta la posibilidad de realizar una **DM** del VM en acetonitrilo, con el fin de confirmar las diferencias con el espectro en metanol.

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

- 1 Tomasi, J., Mennucci, B., and Cammi, R. (2005) Quantum mechanical continuum solvation models., *Chemical reviews* 105, 2999-3093.
- 2 Han, W.-G., Liu, T., Himo, F., Toutchkine, A., Bashford, D., Hahn, K. M., and Noodleman, L. (2003) A theoretical study of the UV/visible absorption and emission solvatochromic properties of solvent-sensitive dyes., *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 4, 1084-94.
- 3 Zhao, G. J., and Han, K. L. (2008) Time-dependent density functional theory study on hydrogen-bonded intramolecular charge-transfer excited state of 4-dimethylamino-benzonitrile in methanol, *Journal of computational chemistry*, 29, 2010–2017.
- 4 Liu, Y., Ding, J., Liu, R., Shi, D., and Sun, J. (2009) Time-dependent density functional theory study on the electronic excited-state geometric structure, infrared spectra, and hydrogen bonding of a doubly hydrogen-bonded complex, *Journal of computational chemistry*, 30, 2723–2727.
- 5 Thanthiriwatte, K. S., Hohenstein, E. G., Burns, L. A., and Sherrill, C. D. (2011) Assessment of the performance of DFT and DFT-D methods for describing distance dependence of hydrogen-bonded interactions, *Journal of Chemical Theory and Computation* 7, 88-96.
- 6 Zhao, Y., and Truhlar, D. G. (2007) The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals, *Theoretical Chemistry Accounts* 120, 215-241.
- 7 Chai, J.-D., and Head-Gordon, M. (2008) Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom–atom dispersion corrections, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10, 6615–6620.
- 8 Iikura, H., Tsuneda, T., Yanai, T., and Hirao, K. (2001) A long-range correction scheme for generalized-gradient-approximation exchange functionals. *Journal of Chemical Physics* 115, 3540-3544.
- 9 Yanai, T., Tew, D. P., and Handy, N. C. (2004) A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP), *Chemical Physics Letters* 393, 51-57.
- 10 Amat, A., Clementi, C., De Angelis, F., Sgamellotti, A., Fantacci, S. (2009) Absorption and emission of the apigenin and luteolin flavonoids: a TDDFT investigation. *Journal of Physical Chemistry. A* 113, 15118-26.
- 11 Liu, X., Yang, D., Ju, H., Teng, F., Hou, Y., Lou, Z. (2011) Experimental and PCM/TD-DFT investigation on the absorption and emission spectra of a light emitting material in various solvents. *Chemical Physics Letters* 503, 75-79.
- 12 Santoro, F., Imbrota, R., Lami, A., Bloino, J., Barone, V. (2007) Effective method to compute Franck-Condon integrals for optical spectra of large molecules in solution. *Journal of Chemical Physics* 126, 084509.
- 13 Santoro, F., Lami, A., Imbrota, R., Barone, V. (2007) Effective method to compute vibrationally resolved optical spectra of large molecules at finite temperature in the gas phase and in solution. *Journal of Chemical Physics* 126, 184102.
- 14 Santoro, F., Lami, A., Imbrota, R., Bloino, J., Barone, V. (2008) Effective method for the computation of optical spectra of large molecules at finite temperature including the Duschinsky and Herzberg-Teller effect: the Qx band of porphyrin as a case study. *Journal of Chemical Physics* 128, 224311.
- 15 Small, G. J. (1971) Herzberg–Teller vibronic coupling and the Duschinsky effect, *The Journal of Chemical Physics* 54, 3300-3306.
- 16 Negri, F., and Orlandi, G. (2005) IV. Electronic and vibronic spectra of molecular systems: Models and simulations based on quantum chemically computed molecular parameters, *Theoretical and Computational Chemistry* 16, 129–169.
- 17 Glusko, C. a., Previtali, C. M., Vera, D. M. A., Chesta, C. A., and Montejano, H. a. (2011) An experimental and theoretical study on the photophysical properties of methylene green, *Dyes and Pigments* 90, 28-35.
- 18 Cossi M, and Barone V. (2001) Time-dependent density functional theory for molecules in liquid solutions. *Journal of Chemical Physics* 115, 4708-4717.
- 19 Imbrota, R., Barone, V., Scalmani, G., and Frisch, M. J. (2006) A state-specific polarizable continuum model time dependent density functional theory method for excited state calculations in solution. *Journal of Chemical Physics* 125, 054103.
- 20 Turro, N. J., Ramamurthy, V., and Scaiano, J. C. *Principles of Molecular Photochemistry: An introduction*. 1st edition. University Science Books. Sausalito, California, United States of American. 2009.
- 21 Koch, J., von Oppen, F., and Andreev, A. (2006) Theory of the Franck-Condon blockade regime, *Physical Review B* 74, 1-19.
- 22 Painelli, A. (1998) Vibronic contribution to static NLO properties: exact results for the DA dimer, *Chemical physics letters*, Elsevier 285, 352–358.
- 23 Painelli, A., and Terenziani, F. (2000) Optical spectra of push-pull chromophores in solution: a simple model, *The Journal of Physical Chemistry A* 104, 11041–11048.
- 24 Breiland, W., and Harris, C. (1973) Breakdown of the born–oppenheimer approximation in radiative

5. Estados Excitados del Violeta de Metileno en solventes próticos

- transitions, *Chemical Physics Letters* 18, 309–314.
- 25 Painelli, A. (1999) A non-perturbative approach to solvatochromic shifts of push-pull chromophores, *Chemical physics letters* 312, 211-220.
- 26 Martín, M. E., Sánchez, M. L., Olivares del Valle, F. J., and Aguilar, M. a. (2000) A multiconfiguration self-consistent field/molecular dynamics study of the $(n \rightarrow \pi^*)^1$ transition of carbonyl compounds in liQquid water, *The Journal of Chemical Physics* 113, 6308.
- 27 Manzoni, V., Lyra, M. L., Coutinho, K., and Canuto, S. (2011) Comparison of polarizable continuum model and Qquantum mechanics/molecular mechanics solute electronic polarization: Study of the optical and magnetic properties of diazines in water, *The Journal of Chemical Physics* 135, 144103.
- 28 Ludwig, V., Coutinho, K., and Canuto, S. (2007) A Monte Carlo-Qquantum mechanics study of the lowest $n \rightarrow \pi^*$ and $\pi \rightarrow \pi^*$ states of uracil in water., *Physical chemistry chemical physics* 9, 4907-12.
- 29 Georg, H. C, Coutinho, K. and Canuto, S. (2007) Solvent effects on the UV-visible absorption spectrum of benzophenone in water: a combined Monte Carlo Qquantum mechanics study including solute polarization. *Journal of Chemical Physics* 126, 034507.
- 30 Coutinho K., Morgon, N. H. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. 1a Edição. Editora Livraria da Física. São Paulo, Brasil. 2007.
- 31 Hoover, W. G. (1986) Constant pressure eQuations of motion *Physical Review A* 34, 2499–2500.
- 32 Parinello, M. and Rahman, A. (1980) Crystal structure and pair potentials: a molecular-dynamics study 45, 1196–1199.
- 33 van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., Berendsen, H. J. C. (2005Q) GROMACS: Fast, Flexible and Free. *J. Comp. Chem.* 26,1701–1718.
- 34 Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham, T. E., III, Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Walker, R. C., Zhang, W., Merz, K. M., Roberts, B. P., Wang, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Kolossváry, I., Wong, K.F., Paesani, F., Vanicek, J., Liu, J., Wu, X., Brozell, S. R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Cai, QQ., Ye, X., Wang, J., Hsieh, M. -J., Cui, G., Roe, D. R., Mathews, D. H., Seetin, M. G., Sagui, C., Babin, V., Luchko, T., Gusarov, S., Kovalenko, A., and Kollman, P.A. (2010) *AMBER 11*, University of California, San Francisco.
- 35 James W. Caldwell and Peter A. Kollman. (1995Q) Structure and Properties of Neat LiQquids Using Nonadditive Molecular Dynamics: Water, Methanol, and N-Methylacetamide. *Journal of Physical Chemistry* 99, 6208-6219
- 36 Svishchev, I., and Kusalik, P. (1994) Structure in liQquid methanol from spatial distribution functions, *Journal of Chemical Physics* 100, 5165-5171.
- 37 Narten, a. H., and Habenschuss, a. (1984) Hydrogen bonding in liQquid methanol and ethanol determined by x-ray diffraction, *Journal of Chemical Physics* 80, 3387-3391.
- 38 Coutinho, K., Canuto, S., and Zerner, M. C. (2000) A Monte Carlo-Qquantum mechanics study of the solvatochromic shifts of the lowest transition of benzene. *Journal of Chemical Physics* 112, 9874-9880.

6. Conclusiones

"Me lo contaron y lo olvidé; lo vi y lo entendí; lo hice y lo aprendí."

Confucio (551 a. C. – 479 a. C.) filósofo chino,

6.1. Estudios de MDR

Ante la falta de una estructura cristalográfica de la P-gp humana, la construcción de un modelo por homología surge como necesidad para poder comprender en detalle y a nivel atómico las interacciones entre la proteína y sustratos e inhibidores. La obtención de la estructura cristalográfica de la P-gp de ratón,¹ la cual comparte un 86% de identidad de secuencia con su homóloga humana, brinda una oportunidad muy importante para la construcción de un modelo por homología de la P-gp humana. Por lo tanto, con esta motivación, se planteó la construcción de un modelo por homología de la P-gp humana, usando la P-gp de ratón como estructura molde.

Este modelo fue caracterizado mediante el programa PROCHECK, el cual mostró que la mayoría de sus parámetros estructurales de los aminoácidos se encontraban dentro de los valores esperados. Así, por ejemplo, el gráfico de Ramachadrán indica que 84% de los residuos se localizan en regiones muy favorables de dicho gráfico. Además, las distancias entre aminoácidos fueron semejantes a las encontradas experimentalmente mediante entrecruzamiento de cisteínas.² De este modo, se comprobó que el modelo reproduce, no sólo la estructura secundaria, sino, aparentemente, también la terciaria y cuaternaria (al menos con los datos recolectados experimentalmente).

Finalmente, las evaluaciones realizadas permitieron confirmar que nuestro modelo realmente conserva la estructura del estado de reposo.

La construcción de este modelo permitió, mediante estudios de *docking* molecular

6. Conclusiones

encontrar los sitios de unión más probables energéticamente. Los resultados indicaron que el sitio P1 es el sitio de unión más importante de la P-gp para los sustratos. Este sitio se encontró comprendido principalmente por los TMs 4, 5 y 6. Muchos de los aminoácidos implicados en este sitio fueron propuestos sobre bases experimentales (como muestra la tabla 4 del capítulo 3. Entre tales aminoácidos se pueden mencionar: S222 (TM4), I306 (TM5), V338 (TM6), L339 (TM6), A342 (TM6), F343 (TM6) y V982 (TM12). Las principales interacciones con los sustratos o moduladores, en esta región son del tipo hidrofóbico. Asimismo, el sitio posee un potencial electrostático ligeramente negativo que hace factible la unión de sustratos del tipo cationes hidrofóbicos como las rodaminas y la berberina. Un segundo sitio para los sustratos involucró al TM12.

El principal sitio de unión para los moduladores fue el P1, pero cada uno con diferente afinidad. No todos los moduladores ocuparon otros sitio secundarios de sustratos. El verapamil tuvo una energía de *docking* semejante a la de los sustratos, lo que es de esperar a partir del hecho de que este inhibidor es de primera generación, presentando una actividad experimental pobre. La familia de los GPs mostró una relación lineal entre la actividad experimental de cada GP y su energía de *docking* en el sitio P1, el cual resultó ser su principal sitio de unión. Un análisis de las conformaciones más favorables describió que la principal interacción fue del tipo hidrofóbico y π - π *stacking*. Este hecho fue contrario a lo propuesto por Ecker *et al.*, los cuales sugirieron que la capacidad moduladora de la familia GP estaba dada por su capacidad aceptora de puente de hidrógeno (**puente H**).³ En el caso del XR9576, un modulador de tercera generación y de potente actividad, tuvo una energía de *docking* mucho más favorable que la de los sustratos en todos los sitios de unión. Además, el confórmero del XR9576 de más baja energía de *docking* abarcó tanto el sitio P1 como el segundo sitio de unión de rodamina, que involucra al TM12 (sitio P2). Nuevamente se observó que la unión con la P-gp fue descrita principalmente por las mismas interacciones mencionadas para la familia de los GPs. Sin embargo, la gran flexibilidad del XR9576, dada por una cantidad grande de diedros, sugirió ser otro de los factores que explicarían la gran afinidad mostrada por este potente modulador.

Por otro lado, las conclusiones logradas a partir de lo observado con los sustratos y moduladores conocidos, permitieron ganar conocimiento sobre el sistema para luego evaluar dos compuesto de origen natural, los cuales poseen una potencial actividad moduladora sobre bases experimentales (trabajo en colaboración). Estos compuestos, llamados *BNeo1* y *BNeo2*,

6. Conclusiones

tuvieron energías de *docking* similares a las encontradas por el XR9576 y más favorables que las encontradas para los sustratos. Asimismo, mostraron también una flexibilidad para acomodarse en cada sitio de unión semejante a la mostrada por ese modulador de tercera generación. Sin embargo, el sitio de mayor afinidad para estos compuestos de origen natural fue el sitio P2.

Respecto a la comparación entre el modelo por homología (P-gp humana) y el cristalográfico (P-gp ratón), no se encontraron diferencias significativas en los resultados obtenidos con ambos modelos.

El hecho de que los cálculos de *docking* hayan sido realizados sobre la P-gp sin una membrana lipídica, puede haber afectado el resultado. En especial, debido a que el sitio P1, donde se ubican los TMs 4 y 6, presenta un apertura que expuesta a la membrana lipídica y a las moléculas de agua. Para controlar los resultados antes descritos por *docking* y mejorar el modelo, se construyó un sistema de P-gp inserta en un membrana lipídica **POPC**. El *docking* sobre este sistema no afectó significativamente los resultados antes descritos.

Sobre la base del estudio de *docking*, se seleccionaron tres compuestos: un sustrato, rodamina 123, un modulador de la familia GP, GP240 y el modulador de tercera generación, XR9576, para evaluar sus interacciones y energética mediante **DM**. Con respecto al análisis energético, se mantuvo la relación encontrada mediante el estudio de *docking*: XR9576 >GP240>rodamina 123, en orden de afinidad energética por la proteína. El XR0576 y el GP240 fueron más estables que la rodamina 123 en 6 y 2 kcal/mol, respectivamente. Las principales interacciones son de origen hidrofóbico. A pesar de que los moduladores tienen varios grupos aceptores y donores, formaron poca cantidad de **punte H**, en algunos casos bastante persistentes (como donores). Por lo tanto, la capacidad aceptora de **punte H** no resultó ser un aspecto determinante de la propiedad de un modulador, lo que se ilustra finalmente con el hecho de que los compuestos con mayor cantidad de grupos aceptores de **puentes H** (tariquidar, por ejemplo) no formaron interacciones persistentes. Otro aspecto, es que la presencia del XR9576 redujo la movilidad de la P-gp respecto a la proteína libre.

Por otro lado, un aspecto que parece importante de los moduladores, que podría diferenciarlos de los sustratos, es la capacidad de penetrar la membrana lipídica. Esto fue confirmado mediante cálculos de lipofilidad de sustratos y moduladores, mediante el cálculo del $\Delta\Delta G_{\text{solv}}$ de 1,2-dicloroetano/agua y estimaciones del LogP utilizando programas

6. Conclusiones

comerciales. Los resultados mostraron que, efectivamente, los moduladores más potentes tiene una mayor lipofilicidad que el verapamil. En tanto que este último presenta un valor de $\Delta\Delta G_{\text{solv}}$ semejantes a la de los sustratos. Una tendencia semejante a la encontrada antes mediante cálculos de *docking*.

La simulación de **DM** con uno de los nuevos neohesperidósidos propuestos, *BNeo2*, puso en evidencia nuevamente la gran flexibilidad que tiene este compuesto para acomodar sus ramificaciones hidrofóbicas, estableciendo interacciones persistentes y muy favorecidas energéticamente. Este hecho está de acuerdo con su versatilidad y actividad demostrada experimentalmente. Por otra parte, el *BNeo2* tuvo interacciones persistentes con la mayoría de los aminoácidos con los interactúa el XR9576. Estas y otras consideraciones, como por ejemplo su afinidad por el sitio P1, permitieron predecir que ambos serían mejores inhibidores que los de primera generación y que *BNeo2* sería mejor inhibidor que el *BNeo1* y al menos comparable a uno de los más potentes actualmente evaluados, hechos que fueron plenamente confirmados por la contraparte experimental.

Muchos de los aminoácidos que participaron de las interacciones en forma persistente a lo largo de toda la **DM**, fueron propuestos sobre bases experimentales como directamente involucrados en el sitio de unión o muy cercano a éste para sustratos de interés farmacológico. Además, muchos de estos aminoácidos pertenecen al **TM6**, el cual estaría involucrado en la activación posterior del proceso de hidrólisis de ATP que conlleva la extrusión del sustrato.⁴

Más allá de la descripción fisico-química de las interacciones proteína/inhibidor, el aporte de evidencia computacional que permitirá justificar la importancia de segmentos específicos de la secuencia propuesta en base a estudios bioquímicos y fisiológicos. El trabajo realizado logró aportar un modelo útil de la P-gp humana y de este transportador inserto en una bicapa lipídica, el cual será de utilidad para llevar a cabo futuros estudios que permitirán obtener conocimiento básico (por ejemplo cambios conformacionales de largo alcance en dinámicas mucho más largas) y aplicado (por ejemplo diseño y evaluación de nuevos inhibidores).

6.2. Modelado de la fotofísica del violeta de metileno

6.2.1. Solventes apróticos: absorción, emisión y absorción de tripletes

El funcional B3LYP produjo resultados más cercanos a los experimentales en comparación al funcional PBE0. Además, el método **RL** sobre los funcionales B3LYP y PBE0 mejoró los resultados respecto al método **EE**.

Los cálculos de transiciones verticales a partir del estado basal optimizado dio buenos resultados para el VM en solvente apróticos. En todas las transiciones electrónicas correspondientes al primer estado excitado, el electrón excitado se ubicó en el orbital molecular LUMO (π^*) para todos los solventes estudiados.

Al aumentar la polaridad del medio, hubo un efecto marcado sobre las transiciones electrónicas $n \rightarrow \pi^*$, las cuales aumentaron su energía, debido a que el orbital n se estabilizaba. En cambio, las transiciones de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ disminuyeron su energía en menor magnitud, debido a una estabilización del orbital LUMO (π^*) con la polaridad del solvente, aunque en menor medida que lo ocurrido con el orbital molecular n . La transición electrónica tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ fue la que produjo el máximo de absorción y ocurrió entre los orbitales moleculares HOMO \rightarrow LUMO.

El momento dipolar es un observable muy importante en óptica. El momento dipolar del estado basal como el de los distintos estados excitados aumentó con la polaridad del solvente. Además, fue útil para evaluar el cambio de momento dipolar producido por la excitación, $\Delta|\mu_{\text{Abs}}^{\vec{}}|$, la cual tuvo un valor positivo para las transiciones electrónicas permitidas ($\pi \rightarrow \pi^*$). Ésto explicó el porqué el VM tiene un fuerte corrimiento solvatocrómico observado experimentalmente.

La emisión involucró los mismos orbitales moleculares para las mismas transiciones antes descritas para la absorción. Sin embargo, tanto en la predicción de los máximos de fluorescencia como en las observaciones teórico-experimentales resultaron menos evidentes que en el caso de la absorción. Esto, quizás se debió a que los máximos involucran estados vibrónicos que el cálculo no tiene en cuenta. Estos estados vibrónicos fueron propuestos, en base a modelos teóricos, por la contraparte experimental. Asimismo, los momentos dipolares de los estados que involucrados aumentan con la polaridad del solvente.

6. Conclusiones

El valor $\Delta|\mu_{\text{Emi}}^{\rightarrow}|$ disminuyó con el aumento de la polaridad del solvente yendo de valores positivos a negativos. Este comportamiento dificulta la posibilidad de utilizar los valores experimentales de emisión en los modelos solvatocrómicos, donde la diferencia en el momento dipolar precisa ser constante.

A pesar de que la estimación de las energías de emisión no resultó marcar la misma tendencia que los valores experimentales, el corrimiento de Stokes sí lo hizo.

Otra explicación es que las aproximaciones típicas a las propiedades espectrales en modelos solvatocrómicos son bastante drásticas, es decir, asumen que los procesos de relajación del solvente (reorganización) no afectan a las propiedades electrónicas, considerando al estado electrónico excitado como “rígido”. Si esto resultara así, los espectros de absorción y de emisión sería imágenes especulares uno del otro. Este comportamiento, en el caso de colorantes *push-pull* como el VM, no resulta de este modo.⁵ Esto último ilustraría el valor de obtener una detallada descripción con modelos de *ab initio* de la distribución electrónica de los estados excitados en diferentes medios.

Además de la absorción y emisión por fluorescencia se estudió el entrecruzamiento de sistemas al estado triplete y su solvatocromismo. Nuevamente se observó que el cambio de solvente tiene un efecto mucho más marcado sobre las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ que sobre las $\pi \rightarrow \pi^*$. Estas últimas fueron las responsables de los máximos de absorción. Se encontraron las dos transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ que explican los dos máximos observados experimentalmente (banda I y II).

Por otro lado, se pudo dar una posible explicación al hecho de que el rendimiento cuántico (Φ_T) de tripletes del VM en los distintos solventes resulte similar.

6.2.2. Solventes próticos

La aproximación a la predicción de las energías de absorción para el caso del VM en solventes apróticos fue en general muy buena, pero no arrojó buenos resultados para el caso donde los solventes próticos estuvieron involucrados. En este caso, los resultados aparentaron ser regidos por el valor de la constante dieléctrica, ya que acetonitrilo y metanol tienen constantes dieléctricas semejantes y tuvieron resultados muy parecidos.

Luego, intentando mejorar el modelo, se calcularon las transiciones verticales

6. Conclusiones

introduciendo moléculas discretas de metanol que formen **puentes H** con el VM y optimizando la geometría del sistema VM+metanol. Esta aproximación no mejoró los resultados respecto al cálculo de las transiciones electrónicas sin moléculas discretas.

El empleo de funcionales más recientemente desarrollados, que describirían mejor la interacción de **punte H** (M06-2X y ω B97X-D) y otros la distribución de carga de especies débilmente enlazadas (LC-BLYP y CAM-B3LYP), no mejoró los resultados. Estos funcionales arrojaron máximos de absorción 100 nm corridos hacia el azul. Además, la diferencia entre los máximos de absorción del VM sin y con puentes de hidrógeno no justificó la diferencia entre el máximo y el hombro del espectro experimental.

Por otro lado, se realizó la simulación del espectro de absorción del primer estado excitado calculando los factores de Franck-Condon para observar si el acople vibracional tiene algún efecto en la forma del espectro y cuáles son los estados vibracionales involucrados. A pesar del aparente buen acuerdo con los espectros experimentales en algunos solventes próticos, un cuidadoso escrutinio de los resultados, sumados a la posterior evidencia experimental (espectro del VM en solventes próticos a diferentes temperaturas) y a la aplicación de estos modelos al cálculo de los espectros en solventes apróticos (que no resultó satisfactorio), anularon la posibilidad de que el hombro observado en el espectro del VM en solventes próticos sea de origen vibrónico. En la retroalimentación entre los resultados calculados y experimentales fue posible obtener hipótesis que permitirían subsanar deficiencia en los modelos empleados.

Debido a que las metodologías que sólo consideran la geometría optimizada del sistema, sin tener en cuenta otras presentes en el proceso dinámico de solvatación se realizó una **DM** del VM en metanol (solvente prótico más sencillo). A partir de ella se obtuvieron configuraciones temporales para el VM sin, con 1, 2 y 3 **puentes H** con moléculas de metanol. Estas configuraciones se utilizaron para los cálculos de ONIOM / **TD-DFT** y PCM / **TD-DFT**.

El modelo de ONIOM / **TD-DFT** arrojó resultados muy diferentes a los experimentales. Sería necesaria una mayor investigación que explique el porqué de estos resultados.

En cambio, el modelo de PCM / **TD-DFT** produjo resultados muy semejantes a los experimentales. Además, éstos permitieron comprender dónde estarían las principales limitaciones de los modelos estáticos antes utilizados y puso de manifiesto la relevancia de

6. Conclusiones

incorporar aspectos dinámicos de la solvatación en el caso de solventes próticos, debido a la naturaleza mucho más fuerte de las interacciones de las moléculas de solvente con el soluto que en el caso de los apróticos.

La observación de que en la conformación de mínima energía ($\text{OH}\cdots\text{N}$ u $\text{OH}\cdots\text{O}$ en el plano de los anillos de la fenotiazina) con una molécula de metanol no cambia sensiblemente la frecuencia del primer estado excitado resultó correcta (aunque otros estados excitados, que no son observados en la ventana espectral o no tienen intensidad para afectar la forma del espectro si cambian notablemente, puesto que involucran los orbitales n , en el plano de la fenotiazina). Asimismo, al considerar un modelo de mínima energía de soluto más una (o varias) moléculas de solvente se ignora la contribución de una variedad de conformaciones ligeramente por encima de ella, que, sin embargo, tienen un importante peso a temperatura ambiente y que, a diferencia de aquella, sí afectan sensiblemente la energía del estado excitado. Concretamente se encontraron configuraciones donde, sin modificar sensiblemente la estabilidad del estado fundamental, la energía del primer estado excitado es fuertemente afectada: 1) especies donde el **punte H** está perpendicular al anillo fenotiazina, y por lo cual afecta mucho más el lóbulo π del orbital molecular LUMO, que su equivalente coplanar, el cual se orienta hacia el plano nodal del orbital molecular, 2) distorsiones en el anillo fenotiazina que afectan la energía del orbital LUMO.

Las interacciones que afectaron fuertemente la energía del LUMO sobre todo resultaron ser las responsables de la banda de 600-610 nm en los alcoholes. Experimentos a alta temperatura confirmaron esta afirmación, dado que dicho pico disminuye según el solvente. El pico u hombro (según el alcohol) de 550-560 nm resulta ser producto de moléculas de soluto que no están formando **puentes H** o lo hacen de modo “inofensivo”, es decir, afectando principalmente los orbitales n de los heteroátomos y las energías de otros orbitales (no tanto la diferencia energética HOMO-LUMO) y de estados excitados superiores. Al no haber involucradas asociaciones específicas con moléculas de solvente en una determinada orientación, esta banda no debería depender marcadamente de la temperatura, tal como se observó experimentalmente.

Se estableció un protocolo donde se puede incorporar los aspectos dinámicos de la solvatación en un medio prótico al combinar la dinámica molecular clásica con cálculos de **TD-DFT** sobre un subconjunto estadísticamente representativo de configuraciones y a un

6. Conclusiones

costo computacional razonable. Estos avances serán de utilidad para la evaluación de otros fotosensibilizadores de mayor interés clínico como así también de colorantes *pull-push* u otras moléculas con potencial como dispositivos ópticos, es decir en general en sistemas donde haya una fuerte dependencia de las energías de excitación con la polaridad y naturaleza del medio.

6. Conclusiones

- 1 Aller, S. G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P. M., Trinh, Y. T., Zhang, Q., Urbatsch, I. L. and Chang, G.. (2009) Structure of P-Glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding, *Science* 323, 1718-1722.
- 2 Loo, T. W. and Clarke, D. M. (2001) Determining the Dimensions of the Drug-binding Domain of Human P-glycoprotein Using Thiol Cross-linking Compounds as Molecular Rulers. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 36877-36880.
- 3 Ecker G., Chiba P., Hitzler M., Schmid D., Visser K., Cordes H.P., Csölleiv, Seydel J.K., and Schaper K.J. (1996) Structure–Activity Relationship Studies on Benzofuran Analogs of Propafenone-Type Modulators of Tumor Cell Multidrug Resistance. *Journal of Medicinal Chemistry* 39, 4767-4774.
- 4 Loo, T. W., and Clarke, D. M. (1994) Mutations to amino acids located in predicted transmembrane segment 6 (TM6) modulate the activity and substrate specificity of human P-glycoprotein., *Biochemistry* 33, 14049-57.
- 5 Painelli, A. (1999) A non-perturbative approach to solvatochromic shifts of push-pull chromophores, *Chemical physics letters* 312, 211-220.