

Simulaciones de la química computacional en las prácticas de laboratorio

María Silvia Polzella⁽¹⁾ y Penélope Lodeyro⁽²⁾

(1) Centro de Investigaciones de la Facultad de Filosofía y Humanidades de la Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, marsipol@gmail.com

(2) Instituto de Humanidades de la Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, loopenelope@gmail.com

Resumen

En los últimos años la filosofía ha considerado más sistemáticamente el tema de las simulaciones computacionales. Asimismo, se ha puesto de relieve que el empleo de computadoras ha implicado una diferencia sustantiva en la capacidad de construir modelos. Sin embargo, en general estos tratamientos toman a las mismas en forma descontextualizada, es decir, independientemente de su empleo concreto. Los mismos se concentran en las distintas instancias de su fase constructiva hasta que se constituyen como un producto acabado. Es decir, destacan el hecho de que incluso aquellas simulaciones que nacen de modelos teóricos bien estructurados adquieren identidad propia, debido a que para su implementación el modelo teórico sufre diversas transformaciones. Estos tratamientos iluminan aspectos centrales, pero no atienden al modo en que se desempeñan en el laboratorio donde es posible notar que el paquete de simulación no es un producto cerrado o paquete. Nuestro enfoque pone en evidencia que una vez construido el paquete de simulación resta otro proceso para poder extraer información del fenómeno en cuestión. En vez de analizar la relación de la teoría con la simulación, nos ocupamos de la instancia concreta en la que ésta se conecta con el sistema en estudio, mostrando cómo operan integradas a un experimento.

Palabras clave: simulaciones computacionales, experimento, integración

1. Introducción

La filosofía de la experimentación ha focalizado su atención en la complejización creciente de los experimentos que incorporan instrumentos de alta tecnología, modelos, y mediciones cada vez más precisas. Las simulaciones computacionales han ganado terreno en la vida de los laboratorios, generando importantes cambios en esta actividad que afectan de manera fundamental nuestra imagen de cómo se produce el conocimiento científico. No obstante, los trabajos que toman en consideración el modo en que la intervención de las computadoras y las simulaciones computacionales están modificando las prácticas experimentales, son aun pocos. Si bien la filosofía ha considerado más sistemáticamente el tema de las simulaciones computacionales, sin embargo, no se ha atendido tanto a la cuestión de cómo se integran a un experimento. El trabajo pionero de Humphreys (1990) ha señalado que las simulaciones han mejorado nuestras habilidades para modelar matemáticamente el mundo. En los últimos años, el foco ha estado puesto en el proceso de construcción de las simulaciones, especialmente en la implementación del modelo matemático (Weisberg 2013, Winsberg 2010, Farge 2007, Lenhard 2007, Humphreys 2004, Guala 2002). En general, esos trabajos toman las simulaciones en forma descontextualizada, es decir, independientemente de su aplicación concreta. En nuestro caso, analizamos cómo se integran las simulaciones computacionales en un diseño experimental. En vez de analizar la relación de la teoría con la simulación, nos ocupamos de la instancia concreta en la que ésta se vincula con el sistema en estudio. Consideramos que allí se hace patente el rol protagónico que desempeñan en la obtención de nuevo conocimiento relevante.

Esta perspectiva pone de relieve que las simulaciones computacionales no constituyen un producto cerrado como usualmente se las considera. Mostramos que, una vez construido el paquete de simulación, está abierto a otro procedimiento que las localiza en las situaciones específicas y es el que permite la obtención de conocimiento. Nos referimos a la instancia en la que la simulación incorpora información producida por las técnicas experimentales sobre el sistema en estudio. Ilustraremos estas cuestiones con un caso donde las simulaciones se encuentran integradas al diseño experimental, y el conocimiento novedoso que proporcionan pasa a formar parte del resultado final del experimento.

2. La relevancia de las simulaciones computacionales en el estudio de reacciones enzimáticas

Los organismos biológicos están constituidos principalmente de moléculas carbonadas. La posibilidad del átomo de carbono de unirse a cuatro radicales distintos determina una característica particular, su configuración tridimensional es asimétrica y no superponible con su imagen refleja. Se dice de ella que es una molécula quiral y de sus dos formas posibles, que son enantiómeras.¹ Según su geometría serán derechas o izquierdas. Esta propiedad determina la alta especificidad de la dinámica biológica, a través del reconocimiento estereoselectivo entre moléculas. Las proteínas, de fundamental importancia para la vida, son quirales. Son los agentes activos de la bioquímica, ya que participan en prácticamente todos los procesos celulares claves. Las mismas están compuestas por una secuencia específica de aminoácidos encadenados formando polímeros lineales que constituyen su estructura primaria. A su vez, esta cadena se pliega en estructuras regulares como la hélice α , la hoja β , giros y bucles. Asimismo, la estructura compacta, asimétrica, tridimensional que forman las proteínas se conoce como su estructura terciaria. Algunas proteínas que presentan más de una cadena forman estructuras cuaternarias. Se presentan desde los casos más simples, como la unión de dos subunidades idénticas, hasta la unión de docenas de subunidades diferentes. No obstante, es la secuencia de aminoácidos de la cadena simple la que determina su configuración tridimensional (Stryer et al. 2013).

Cabe notar que las unidades de aminoácido están compuestas de alrededor de 20 átomos y cuentan con aproximadamente 80 electrones. Las proteínas más simples pueden tener alrededor de 100 residuos de aminoácidos. Por ejemplo, una proteína intermedia como la anhidrasa carbónica presenta 259 residuos, lo que implica miles de átomos. Por lo que respecta a las dimensiones, la distancia entre aminoácidos adyacentes en una hélice alfa es de 1,5 Å (10^{-10} m), mientras que en una lámina beta es de 3,5 Å. Las hélices alfa pueden medir entre 45 Å y 1000 Å. Una buena parte de las proteínas tiene una estructura sumamente compacta.

Esta breve descripción permite presumir las dificultades para el acceso experimental al estudio de una proteína determinada, su estructura primaria, secundaria y su configuración tridimensional. En esta dirección, puede pensarse cuánto más complicado resulta el estudio de sus funciones. Un grupo particular de proteínas lo constituyen las enzimas que tienen la función de modificar la velocidad de las reacciones bioquímicas. Esta acción tiene lugar en el centro activo altamente específico de la enzima. Dicha especificidad obedece a la compleja estructura tridimensional de la proteína enzimática. En algunos casos, como el de la anhidrasa carbónica, acelera la velocidad de reacción un millón de veces, y fundamentalmente, esta reacción ocurre a 600.000 recambios por segundo. Así, el acceso experimental de las interacciones entre enzima y sustrato no sólo se ve afectado por la numerosa cantidad de átomos y lo compacto de

¹ Las moléculas quirales tienen la propiedad de hacer girar el plano de una luz polarizada en un cierto ángulo. En relación a la dirección del giro de la luz serán dextrógiras o levógiras.

las configuraciones tridimensionales, sino también debido a la velocidad a la que ocurren las reacciones.

Las investigaciones de la interacción precisa de la enzima-sustrato y los estados de transición son de gran relevancia porque posibilitan el diseño de medicamentos altamente específicos. Considerada la complejidad de estos sistemas, cabe preguntarse cómo se puede acceder al estudio de reacciones enzimáticas. Como se expresó anteriormente, en química biológica la mayoría de las moléculas y sus interacciones están constituidas por numerosos átomos. Ello hace que sean inabordables como un sistema completo. Esto vale tanto para el tratamiento teórico como experimental. Desde lo teórico, se hace necesario apelar a aproximaciones drásticas. Por su parte, las técnicas experimentales aportan algunos datos, pero ninguna puede proporcionar toda la información que se pretende obtener de un sistema.

A modo de ejemplo del alcance experimental, mencionaremos dos de las principales técnicas utilizadas actualmente. La cristalografía de rayos X aporta información estructural de proteínas que pueden cristalizarse y es más útil si el cristal que forman es muy ordenado. La información que aporta es de una proteína estática; no se conocen mediante esta técnica sus posibles configuraciones, sus vibraciones, ni sus interacciones, aunque de los datos que aportan los rayos X se puede inferir movimiento. Otra limitación es que la información obtenida no es representativa de las condiciones naturales que podría tener la proteína en la célula, pues debe estudiarse aislada de su medio circundante. Una técnica complementaria es la espectroscopia de resonancia magnética nuclear. Aporta información de la parte dinámica de la estructura de moléculas en disolución, como cambios conformacionales, plegamientos e interacciones. Pero, sólo es apropiada para proteínas más bien pequeñas (alrededor de 100 residuos). En ambos métodos, la reconstrucción de la estructura tridimensional se realiza a través de herramientas computacionales. No obstante, ambas técnicas presentan un alto grado de dificultad. En la cristalografía, la cantidad exorbitante de patrones de difracción y, en la resonancia, los espectros de átomos muy abundantes como el hidrógeno, son muy complejos de analizar.

Por lo que respecta al alcance de las teorías, la dificultad no es menor. Ya en la mecánica clásica se sabía de la imposibilidad de resolver analíticamente las interacciones entre más de dos cuerpos (problema de los tres cuerpos). En el contexto de la mecánica cuántica, aún resulta insoslayable el problema de la interacción de las numerosas partículas interactuantes en átomos y moléculas (problema de los N cuerpos). Dada la desesperanza de encontrar soluciones exactas, el desafío de la química teórica fue desarrollar procedimientos matemáticos de aproximación que pudieran ayudar a la interpretación de los fenómenos químicos y que tuvieran suficiente capacidad predictiva. En este sentido, el arribo de las computadoras, y con ellas de las simulaciones computacionales, marcó un hito fundamental. Puesto que las mismas constituyen una poderosa herramienta que posibilita el estudio de sistemas moleculares, en virtud de las ventajas pragmáticas de los métodos aproximativos.

3. Las simulaciones integradas al diseño experimental

El caso que hemos seleccionado para ilustrar estas cuestiones exhibe una rica interacción entre los elementos constituyentes del experimento (Lingenfelder et al. 2007, Tomba et al. 2007). El diseño contó con simulaciones computacionales de dinámica molecular (MD) clásica y de la Teoría del funcional de la densidad (DFT) - Car-Parrinello²; con un microscopio de escaneo dinámico de efecto túnel (STM); y con otra técnica experimental, la espectroscopia de fotoelectrones inducidos por rayos X (XPS).

² El desarrollo de Car-Parrinello (1985) combina dinámica molecular y teoría del funcional de la densidad en un enfoque unificado que es considerado un método de dinámica molecular *ab initio*.

La intención del experimento fue indagar, a nivel atómico, el proceso que podría tener lugar en el reconocimiento estereoselectivo específico entre enzima y sustrato. Como señaláramos anteriormente, estos sistemas presentan una gran complejidad para ser abordados como un sistema completo. Por ello, se realizó una simplificación tanto para el tratamiento computacional como experimental. La investigación consideró a nivel de molécula simple la dinámica de este proceso.

Para el estudio de microscopía se depositaron sobre una lámina de cobre ambos enantiómeros de un dímero (difenilalanina) del aminoácido fenilalanina, que es una unidad constitutiva de las proteínas. El microscopio de escaneo dinámico de efecto túnel (STM) permite trazar un mapa de la distancia entre varios puntos, con el que se generan imágenes tridimensionales a nivel de superficie de los átomos de una molécula (Binnig y Rohrer 1982). La resolución del mismo es de 1 Å de resolución lateral y 0,1 Å de resolución en profundidad. La secuencia de fotogramas obtenidos se ensambla para captar la dinámica molecular. No obstante, se limita a copiar la topología de la molécula sólo a nivel de superficie. Además, en este caso, la frecuencia en la secuencia de imágenes obtenidas fue de 68 s. El microscopio permitió observar las sucesivas orientaciones, rotaciones y grados de inclinación respecto al sustrato de cobre. Fundamentalmente, las imágenes pusieron en evidencia el proceso de reconocimiento entre moléculas de igual quiralidad. Como, por una parte, el alcance del STM es a nivel de superficie, y por la otra, las imágenes fueron tomadas cada 68 segundos, para completar la información en la secuencia de los pasos intermedios que tienen lugar a nivel atómico y de grupos funcionales se emplearon simulaciones computacionales.

En este caso, la configuración del dímero se consiguió a través de una simulación DFT - Car-Parrinello. Con la configuración obtenida, se llevó a cabo una simulación de dinámica molecular (MD) clásica, durante 5 ns (10^{-9} s) a 400 K, para estudiar su comportamiento en forma aislada. La molécula exhibió una alta flexibilidad que le permitió acceder a un amplio rango de conformaciones. Dentro del tiempo simulado, adoptó principalmente dos conformaciones denominadas icónicamente C y S.

Luego, se realizó una serie de simulaciones DFT – Car-Parrinello en las que se modelizó la lámina de cobre empleada en el estudio con el microscopio STM y, asimismo, se tomaron en consideración las conformaciones C y S. Ello se hizo para investigar los modos de enlace de las moléculas aisladas con la lámina de cobre. Se estudiaron tres conformaciones posibles de la forma icónica S. Los resultados de estas simulaciones mostraron dos configuraciones diferentes de enlace a la lámina de cobre, las cuales no eran consistentes con los valores experimentales volcados por el microscopio. Por ello, se realizó una nueva simulación para analizar la dinámica de relajación partiendo de una configuración C. Los resultados obtenidos acordaban con las imágenes del microscopio STM y la dinámica llevaba a una estructura de mínima energía que era la más estable. Sin embargo, lo llamativo era que dos moléculas en conformación C saturarían sus funcionalidades, impidiendo la formación de cadenas. Mientras que, para permitir el acoplamiento de moléculas y la formación de cadenas supramoleculares, era necesario que la molécula se encontrara en la conformación S, dado que en esta conformación podrían ensamblarse en estructuras lineales de longitud arbitraria.

Para explorar la posibilidad de acoplamiento entre moléculas de la misma y de diferente quiralidad, se llevaron a cabo simulaciones clásicas de dinámica molecular. Las simulaciones mostraron la formación de cadenas estables de igual quiralidad de hasta nueve moléculas que podían prolongarse. Contando con esta información, se realizaron entonces, simulaciones DFT – Car-Parrinello colocando periódicamente varias moléculas en conformación S. Ellas mostraron la formación de un enlace hidrógeno entre dos moléculas adyacentes durante 590 fs (10^{-15} s). Este enlace aseguraba la estabilidad de la cadena periódica “indeterminada” de moléculas de igual quiralidad. Es decir, que la cadena así constituida podía continuarse indefinidamente. Al comparar estos resultados con los datos provenientes del STM, hubo una discrepancia en cuanto al ángulo medido por el STM de la inclinación de la cadena respecto a la lámina de cobre. Para investigar esta cuestión se llevó a cabo una nueva simulación DFT – Car-Parrinello, colocando la estructura de la cadena sobre la superficie según el modo de

adsorción indicado por la simulación previa para la molécula simple. Durante el tiempo simulado de 4,2 ps (10^{-12} s), la simulación mostró que la molécula sufre un sustancial re-arreglo conformacional caracterizado por el cambio del ángulo de adsorción respecto a la lámina de cobre. El valor del ángulo obtenido en esta instancia coincidió con el valor experimental. Además, el estado químico y los detalles de la estructura de la cadena supramolecular fueron investigados por espectroscopía de fotoelectrones inducidos por rayos X (XPS). Los datos de la espectroscopía eran consistentes con los estados de carga de las cadenas ensambladas por enlaces hidrógeno, volcados por la simulación. La simulación señaló que las moléculas del aminoácido, en la proximidad para el ensamble, sufrían un cambio de conformación pasando de la geometría C a la geometría S con los inherentes cambios de la posición relativa de los grupos funcionales manifiestos en el cambio de altura de los mismos respecto al sustrato. Las imágenes del STM constituyeron una evidencia experimental de tales cambios conformacionales al registrar en las moléculas aisladas el doble de la altura del eje principal que la que presentaban las moléculas en cadena.

Sólo a través del despliegue pormenorizado exhibido en las simulaciones computacionales de la dinámica de los cambios conformacionales y de las interacciones moleculares entre los dipéptidos y con la lámina de cobre como sustrato, se pudo obtener un modelo del fenómeno con suficiente nivel de detalle del proceso de acoplamiento estereoselectivo. Las partes fundamentales de este proceso, como los cambios conformacionales y el enlace puente hidrógeno, conseguidas mediante las simulaciones pasaron a formar parte de los resultados del experimento.

Las simulaciones computacionales brindan conocimiento novedoso. En otros trabajos mostramos los aspectos de la fase constructiva de las mismas, en esta oportunidad queremos resaltar un ámbito particular que es el de su uso, integradas a un experimento, porque allí se hace patente como trabajan para este fin. En efecto, si bien en estos casos se parte de paquetes de simulación, aparentemente cerrados, es posible notar que, en esta instancia de interacción entre simulaciones y técnicas e instrumentos experimentales, las simulaciones incorporan información proveniente de ambas fuentes que las sitúan en el caso específico. Es en virtud de este procedimiento que las simulaciones generan conocimiento novedoso en relación al sistema estudiado. En esta instancia de indagación, la contrastación experimental con más de una técnica de ciertos puntos de los resultados provistos por las simulaciones hace que este conocimiento gane en fiabilidad.

4. Consideraciones Finales

El foco puesto en el empleo de las simulaciones computacionales integradas a un experimento nos permitió poner de relieve su papel preponderante en estos ámbitos donde los sistemas moleculares resultan inaccesibles teóricamente y experimentalmente debido a su complejidad. El proceso estereo-selectivo detallado de la dinámica quiral, a nivel de molécula simple, sólo pudo obtenerse con el aporte de las simulaciones computacionales. Hemos mostrado que instrumentos y simulaciones trabajan codo a codo en el desarrollo del experimento. La interacción de distintas simulaciones entre sí y con el microscopio de escaneo dinámico de efecto túnel STM, permitió desentrañar las componentes de los movimientos a nivel atómico. En este sentido, hemos destacado que las simulaciones no son paquetes cerrados, sino que se ajustan al caso de estudio.

Las simulaciones computacionales además de interpretar los datos provistos por el STM, brindaron nueva información relevante: el hecho de que sólo en la proximidad las moléculas sufrían grandes cambios conformacionales que les posibilitaban el acoplamiento y además, la formación de un enlace hidrógeno que estabilizaba la unión en cadena. Como hemos puesto de relieve, el experimento proporcionó como resultado un modelo del fenómeno en el que se incorporó esta información brindada por las simulaciones. Si bien, para establecer su fiabilidad, la misma había sido contrastada por otra técnica experimental.

La integración de las simulaciones computacionales a los diseños experimentales potencia el estudio de los sistemas moleculares. La interacción analizada entre STM y simulaciones computacionales DFT – Car-Parrinello se encuentra consolidada como una nueva y más precisa metodología para la determinación sin ambigüedad de la estructura de moléculas simples. Asimismo, esta metodología constituye una potente herramienta para el estudio de las dinámicas moleculares.

5. Referencias bibliográficas

Binnig, Gerd, Rohrer, Heinrich (1982), "Scanning Tunneling Microscope", *United States Patent, International Business Machines Corporation*, Patent Number 4, 343, 993 (August 10), 1-11.

Car, Roberto, Parrinello, Michelle (1985), "Unified Approach for Molecular Dynamics and Density-Functional Theory", *Physical Reviews Letters* (55), 2471-2474.

Farge, Marie (2007), "Numerical Experimentation: A Third Way to Study Nature", en Yukio Kaneda, Hiroshi Kawamura, y Masaki Sasai (eds.) *Frontiers of Computational Sciences*. Berlin, Springer-Verlag, 15-30.

Guala, Francesco (2002), "Models, Simulation, and Experiments", en Lorenzo Magnani y Nancy Nersessian (eds.) *Model-Based Reasoning: Science, Technology, Values*. Nueva York, Kluwer, 59-74.

Humphreys, Paul (2004), *Extending ourselves: computational science, empiricism, and scientific method*, USA, Oxford University Press.

Humphreys, Paul (1990), "Computer Simulations", *PSA: Proceedings of the Biennial Meeting of the Philosophy of Science Association*, 497-506.

Lenhard, Johannes (2007), "Computer simulation: The cooperation between experimenting and modeling", *Philosophy of Science* 74 (2), 176-194.

Lingenfelder, Magalí, Tomba, Giulia, Costantini, Giovanni, Colombi Ciacchi, Lucio, De Vita, Alessandro, Kern, Klaus (2007), "Tracking the Chiral Recognition of Adsorbed Dipeptides at the Single-Molecule Level", *Angewandte Chemie International Edition* 46 (24), 4492-4495.

Stryer, Lubert L., Berg, Jeremy M., Tymoczko, John L. (2013), *Bioquímica*, 7º edición. España, Editorial Reverté, 2 vols.

Tomba, Giulia, Lingenfelder, Magalí, Costantini, Giovanni, Kern, Klaus, Klappenberger, Florian, Barth, Johannes V., Colombi Ciacchi, Lucio, De Vita, Alessandro (2007) "Structure and Energetics of Diphenylalanine Self-Assembling on Cu (110)", *The Journal of Physical Chemistry A* (111), 12740-12748.

Weisberg, Michael (2013), *Simulation and Similarity: Using Models to Understand the World*, Oxford, Oxford University Press.

Winsberg, Eric (2010), *Science in the Age of Computer Simulation*, Chicago, University of Chicago Press.