

## HIDRATACIÓN DE LA $\beta$ -ALANINA EN SOLUCIÓN. UN ESTUDIO POR DINÁMICA MOLECULAR

M. G. Campo\*, C. A. Glusko

Departamento de Física - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad Nacional de La Pampa  
Uruguay 151 – (6300) - Santa Rosa (LP) -Argentina.  
e-mail:mario@exactas.unlpam.edu.ar

Se realizó una simulación de la molécula de  $\beta$ -alanina zwitteriónica a dilución infinita utilizando dinámica molecular. Se calcularon las funciones de distribución radial de átomos del solvente alrededor de los átomos de la  $\beta$ -alanina. Se analizaron los puentes de hidrógeno entre átomos del soluto y del solvente y entre las moléculas de agua entre sí alrededor de la  $\beta$ -alanina. El análisis de la estructura de hidratación se completó calculando las funciones de distribución angular de dipolos de las moléculas de agua alrededor de átomos del soluto. Similarmente a lo obtenido en un trabajo anterior para la glicina zwitteriónica, se halló que la molécula estudiada posee un comportamiento hidrofílico. Alrededor de la  $\beta$ -alanina se produjo una modificación de la estructura del solvente, aumentando la proporción de moléculas de agua que establecían sólo uno o dos puentes de hidrógeno, y disminuyendo las que establecían dos o tres entre sí, en comparación con lo que ocurre en el bulk del solvente.

A molecular dynamics simulation of zwitterionic  $\beta$ -alanine at infinite dilution was carried out. The radial distribution functions of solvent atoms around of  $\beta$ -alanine atoms were calculated. The analysis of the hydrogen bonds around the  $\beta$ -alanine was carried out between solute atoms and water molecules, and between water molecules between them. The analysis of the hydration structure was completed calculating the angular distribution functions of the dipoles of the water molecules around solute atoms. It was obtained that the studied molecule possesses a hydrophilic behavior, similarly to that found for the zwitterionic glycine in a previous work. A modification of the solvent structure around the  $\beta$ -alanine took place, increasing the proportion of water molecules that established only one or two hydrogen bonds, and diminishing those that established two or three hydrogen bonds to each other, comparing with that that occurs in the bulk of the solvent.

### I. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de las características de hidratación de los aminoácidos como la  $\beta$ -alanina resulta fundamental para comprender las propiedades funcionales y estructurales de las proteínas. Los aminoácidos forman zwitteriones ( $^+H_3N-X-CO_2^-$ ) en el estado sólido y en medios polares, y moléculas neutras ( $_2HN-X-CO_2H$ ) en fase gaseosa o en vacío.<sup>(1)(2)(3)(4)(5)(6)</sup>

La  $\beta$ -alanina en particular interviene en diversos procesos biológicos de interés, tales como procesos de neurotransmisión en sistemas nerviosos de mamíferos,<sup>(7)(8)</sup> indicador de degradación de material orgánico,<sup>(9)(10)</sup> o efector osmótico que modifica las propiedades eléctricas en solución del ADN,<sup>(11)(12)(13)</sup> entre otros.

Otros aminoácidos similares (como la glicina zwitteriónica) muestran un comportamiento hidrofílico en los grupos  $-NH_3^+$  y  $COO^-$ , y un comportamiento hidrofóbico en los grupos  $CH_2$  de la zona central de la molécula.<sup>(14)(15)(16AFA)(17)</sup> Este comportamiento produce una alteración de la estructura del agua que rodea la molécula y, a grandes concentraciones, modifica también la estructura y comportamiento de todo el solvente.<sup>(17)(18)</sup>

El comportamiento conformacional de la molécula de  $\beta$ -alanina en solución acuosa se ha establecido por métodos de RMN. Se encontró que los mínimos de energía corresponden a conformaciones internas con el ángulo  $\Phi \approx -60^\circ$  (gauche), y  $\Phi \approx 180^\circ$  (trans o anti-gauche), con una leve preferencia de la conformación anti-gauche (ver Figura 1).<sup>(19)(20)(21)</sup>

Resultados de cálculos ab initio sugieren que, en la fase gaseosa, la conformación trans de la molécula de  $\beta$ -alanina es menos estable que la conformación gauche en alrededor de 20 o más kcal/mol.<sup>(22)(23)</sup> La atracción electrostática no produce, como habría de esperarse, un máximo acercamiento entre los grupos  $-NH_3$  y  $-CO_2$ . Así, el valor de  $\Phi$  no es  $0^\circ$ , sino que resulta en todos los casos mayor que  $44^\circ$ . Gregoire et al.<sup>(19)</sup> indica que este hecho se debe a la existencia de un equilibrio entre las fuerzas de atracción electrostática y a la repulsión estérica entre aquellos grupos.

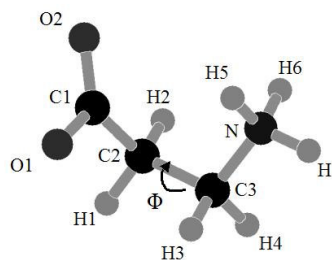


Figura 1: Esquema del modelo de  $\beta$ -alanina utilizado.

Dragčević, et al.<sup>(24)</sup> realizó medidas de potencial de superficie y tensión superficial de  $\beta$ -alanina en interfases electrolito-aire y agua de mar – aire. Según sus resultados, a concentraciones salinas menores a  $5 \text{ g/l}$  y bajas concentraciones de  $\beta$ -alanina ( $c < 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ), el grupo  $-COO^-$  apunta hacia el aire, mientras que  $-NH_3^+$  queda sumergido en el solvente. Los autores sugieren que esto resulta un indicador de que ocurre una mejor

estabilización por parte del solvente del grupo amino que del grupo carboxílico.

En este trabajo se estudió la hidratación de la molécula de  $\beta$ -alanina y la modificación de la estructura del agua en su entorno, utilizando dinámica molecular clásica (MD). Se adoptó un modelo de  $\beta$ -alanina acorde a los resultados ab-initio, con configuraciones internas gauche y anti-gauche.

## II. MÉTODO

La dinámica molecular se realizó utilizando el paquete de simulación GROMOS96<sup>(25)</sup>. Un análisis detallado del potencial de interacción y de los programas utilizados puede encontrarse en las Ref. 16, 17 y 25.

Se utilizaron para la molécula de  $\beta$ -alanina los parámetros conformacionales correspondientes a la base MT43A1 de GROMOS96. Se incorporó un potencial de ángulo diedro para que la molécula adopte las configuraciones internas gauche y trans. Para calcular las cargas parciales de los átomos de la  $\beta$ -alanina se utilizó el programa GAUSSIAN<sup>(26)</sup> con el método AIM<sup>(27)</sup> (Atoms In Molecules) y la base HF/6-31G\*\* (ver Tabla 1). Como solvente se usó el modelo de molécula de agua SPC/E<sup>(28)</sup> cuya distancia  $H_w - O_w$  es de 0,1 nm, la carga del  $O_w$  es  $-0,8476 e$ , la carga del  $H_w$  es  $0,4238 e$ , y el ángulo H-O-H  $109,47^\circ$ .

TABLA 1: CARGAS DE LOS ÁTOMOS DE  $\beta$ -ALANINA

Átomo	Carga / e
O1	-0,74
C1	0,69
O2	-0,74
C2	-0,40
H1	0,20
H2	0,20
C3	-0,25
H3	0,22
H4	0,22
N	-0,83
H5	0,46
H6	0,46
H7	0,46

El sistema simulado estuvo constituido por una molécula de  $\beta$ -alanina y 244 moléculas de agua, lo que corresponde a una dilución infinita de la molécula. Con el programa PROBOX de GROMOS96 se creó la celda unidad de simulación con las coordenadas iniciales de las moléculas del agua y de la  $\beta$ -alanina. El procedimiento computacional constó de una minimización de energía inicial en la cual se sometió a la molécula de  $\beta$ -alanina a una restricción posicional, hasta que el cambio de la energía potencial total entre pasos sucesivos de simulación resultase menor a 2 kJ/mol. La MD se inició con una simulación de 10 ps a volumen constante, asignando velocidades iniciales a las moléculas del sistema utilizando una distribución de Boltzmann con una temperatura de equilibrio de 300 K.<sup>(29)</sup> Posteriormente

se acoplaron al sistema un baño térmico (300 K) y un baño hidrostático (1 atm). Se consideró al sistema estabilizado cuando éste alcanzó un volumen, una energía total y una temperatura constantes, lo cual se logró con 10 ps de simulación adicionales. El volumen del sistema osciló alrededor de los  $1,89 \times 1,92 \times 2,09 \text{ nm}^3$ , que corresponde a una densidad del agua de alrededor de  $0,97 \text{ g/cm}^3$ . Se agregaron 1,2 ns de simulación que se utilizaron para el análisis de los resultados, en los cuales los parámetros de simulación fueron: tiempos de relajación de 0,1 ps y 0,5 ps para los baños térmico e hidrostático respectivamente, un paso de simulación temporal de 1 fs, un radio de corte  $R_E = 1,1 \text{ nm}$  para el cálculo de las interacciones de van der Waals, y  $R_S = 0,7 \text{ nm}$  y  $R_C = 1,1 \text{ nm}$  como radios de corte para las interacciones electrostáticas de no enlace.

En el análisis de los resultados, además de las funciones de distribución radial (RDFs), se calcularon las funciones de distribución angular  $\langle \cos \theta(r) \rangle_A$  y  $\langle \cos \alpha(r) \rangle$  en el entorno de la molécula de  $\beta$ -alanina.

La función de distribución angular de dipolos de agua alrededor de un dipolo de agua de referencia,  $\langle \cos \alpha(r) \rangle$ , permite analizar la correlación angular entre las moléculas del solvente en función de la distancia entre ellas. El ángulo  $\alpha$  es el ángulo entre el dipolo de referencia y los dipolos que lo rodean, y  $r$  es la distancia entre los oxígenos de las moléculas de agua en cuestión.

Las funciones de distribución angular  $\langle \cos \theta(r) \rangle_A$  muestran la orientación de dipolos de agua alrededor de un determinado átomo A del soluto, en función de la distancia  $r$  entre dicho átomo y los oxígenos de los átomos de agua. En este caso,  $\theta$  es el ángulo entre la distancia A.. $O_w$  y el dipolo del agua.

En el caso de las distribuciones angulares, cuando arrojan valores alejados de 0 (que corresponde a  $\theta = 90^\circ$ ) indican una mayor orientación del agua entorno al átomo de referencia.

Para el cálculo de las distribuciones de puentes de hidrógeno (HBs) se utilizaron como criterios de formación de HB una distancia máxima entre los átomos donador (A) y aceptor (B) de  $3 \text{ \AA}$ , y un ángulo mínimo de  $145^\circ$  grados entre los enlaces  $A_{\text{donor}}-H \dots B_{\text{aceptor}}$ . En el cálculo de los números de hidratación se integró hasta el primer mínimo la función de distribución radial correspondiente.

## III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 2 muestra la RDF de oxígenos de agua ( $O_w$ ) alrededor de un oxígeno de agua de referencia,  $g_{O_w O_w}(r)$ . Esta función presenta un pico principal a los  $2,7 \text{ \AA}$  que corresponde a la distancia entre estos átomos cuando las moléculas de agua establecen puentes de hidrógeno. Integrando hasta el primer mínimo de esta función se encuentra que el número de hidratación de la

molécula de agua es  $N_{O_wO_w}=3.8$  (número promedio de moléculas de agua en el entorno del  $O_w$  de referencia).

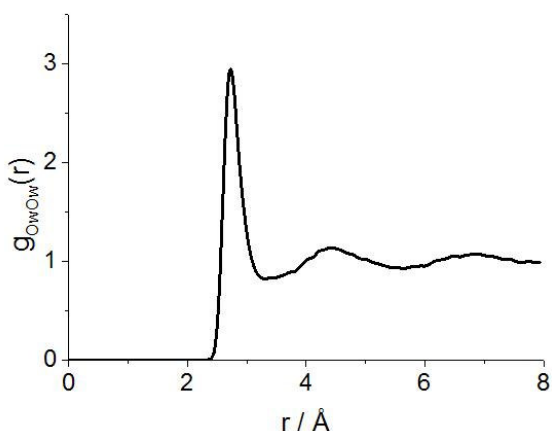


Figura 2: Función de distribución radial de oxígenos de agua alrededor de oxígenos de agua.

La función  $\langle \cos \alpha(r) \rangle$  (Figura 3) presenta un pico a los 2,4 Å y dos mínimos a los 4,1 Å y 6,1 Å, distancias entre  $O_w$  para las cuales la orientación entre las moléculas de agua es máxima.

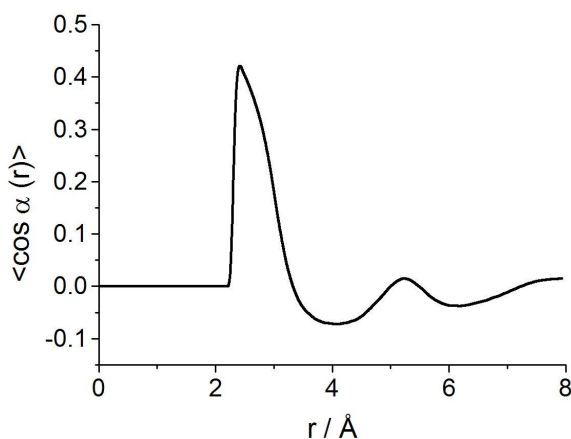


Figura 3: Función de distribución angular  $\langle \cos \alpha(r) \rangle$ . Ver el texto para más detalles

La Figura 4 muestra la distribución de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua en promedio en todo el sistema, donde puede observarse que las moléculas de agua establecen en su mayoría 2 y 3 puentes de hidrógeno entre sí.

Las funciones  $g_{O_wO_w}(r)$ ,  $\langle \cos \alpha(r) \rangle$ , distribución de puentes de hidrógeno y el número de hidratación  $N_{O_wO_w}$  son similares a los obtenidos en simulaciones sin soluto.<sup>(17)(28)</sup> Los parámetros obtenidos corresponden a la estructura aproximadamente tetraédrica que presenta el modelo SPC/E de agua utilizado.

Las RDFs de oxígenos de agua alrededor de algunos átomos de la  $\beta$  -alanina permiten realizar un

primer análisis de la estructuración del solvente alrededor de esta molécula.

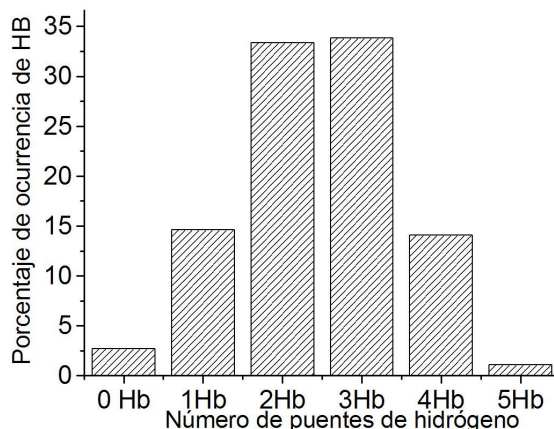


Figura 4: Distribución de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua en el sistema, expresada en porcentaje de ocurrencia de 0 a 5 puentes de hidrógeno en una molécula de agua, en promedio, por paso de simulación.

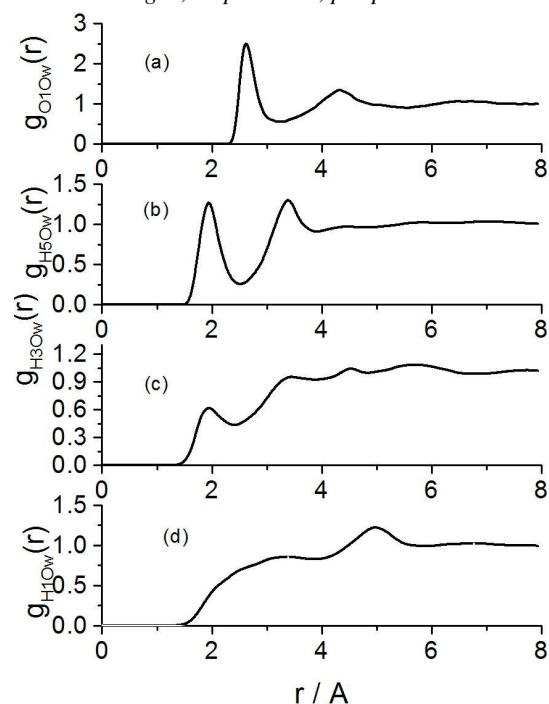


Figura 5: Funciones de distribución radial de oxígenos de agua alrededor de oxígenos del grupo  $ClO_2$  (a), e hidrógenos de los grupos  $-NH_3$  (b),  $-C_3H_2$  (c) y  $-C_2H_2$  (d).

La RDF de  $O_w$  alrededor de hidrógenos del grupo  $-NH_3$ ,  $g_{H_5O_w}(r)$ , se muestra en la Figura 5 (b). El primer pico en  $r \approx 1,8$  Å corresponde a moléculas de agua ligadas al hidrógeno de referencia, mientras que el segundo pico corresponde a aguas ligadas a otro hidrógeno del mismo grupo. El número de hidratación de los hidrógenos del grupo ( $N_{H_5O_w}= 1,01$ ) indica que hay

alrededor de 3 aguas en la primer capa de hidratación en esta zona de la molécula. Los cálculos de puentes de hidrógeno indican que en promedio 2,51 aguas establecen puentes de hidrógeno por paso de simulación con el grupo (ver Tabla 2).

TABLA 2: OCURRENCIA PROMEDIO DE PUENTES DE HIDRÓGENO (HB) ENTRE ÁTOMOS DE  $\beta$ -ALANINA Y MOLÉCULAS DE AGUA

Átomo/s	HB
O1/O2	2,62
H1/2	0,15
H3/4	0,46
H5/6/7	0,84

Las RDFs de oxígenos de agua alrededor de hidrógenos de los grupos  $-\text{CH}_2$  y los respectivos números de hidratación indican un comportamiento hidrofóbico de éstos grupos de la molécula. El grupo  $-\text{C}_2\text{H}_2$  resulta el más hidrofóbico. La RDF  $g_{\text{H}_{10\text{w}}}(r)$  no posee un pico en la zona  $r < 2,3 \text{ \AA}$  y  $N_{\text{H}_{10\text{w}}} = 0,66$  (Figura 5(d)). La ocurrencia de puentes de hidrógeno es mucho menor que el número de hidratación ( $\text{HB}_{\text{H}_1} = 0,15$ ).

Por otro lado, el primer pico de la RDF  $g_{\text{H}_{30\text{w}}}(r)$  a los  $\approx 1,9 \text{ \AA}$  (que corresponde al grupo  $-\text{C}_3\text{H}_2$ ) tiene una altura de apenas  $\approx 0,5$ . El número de hidratación en este último caso es de  $N_{\text{H}_{10\text{w}}} = 0,76$  (Figura 5(c)), y el número medio de puentes de hidrógeno entre los hidrógenos del grupo y el solvente es  $\text{HB}_{\text{C}_3} = 0,46$ .

Por el contrario, se encuentra una estructura de hidratación muy definida alrededor del grupo  $-\text{CO}_2$ . Un pico de  $\approx 2,5$  de altura se encuentra a  $\approx 2,7 \text{ \AA}$  en la RDF  $g_{\text{O}_{10\text{w}}}(r)$ , siendo  $N_{\text{O}_{10\text{w}}} = 3,44$  y  $\text{HB}_{\text{O}_1} = 2,66$ .

De esta manera se observa que el grupo amino ( $-\text{NH}_3$ ) y el grupo carboxilato ( $-\text{CO}_2$ ) poseen un comportamiento hidrofílico, mientras que los dos grupos  $-\text{CH}_2$  de la  $\beta$ -alanina resultan hidrofóbicos.

La función  $\langle \cos \theta(r) \rangle_{\text{O}_1}$  muestra que para  $r \approx 2,7 \text{ \AA}$  (pico de  $g_{\text{O}_{10\text{w}}}(r)$ ) los dipolos de agua se encuentran orientados (en promedio) a  $\theta \approx 61^\circ$  de la distancia  $\text{O}_1 \dots \text{O}_w$ , indicando una marcada orientación de las moléculas del solvente alrededor del grupo carboxilato (ver figura 6). Un fenómeno similar se observa alrededor del grupo amino, donde la función  $\langle \cos \theta(r) \rangle_{\text{N}}$  presenta a  $r \approx 2,7 \text{ \AA}$  (pico de  $g_{\text{N}_{0\text{w}}}(r)$ ) correspondiente a la distancia de puentes de hidrógeno  $\text{N}-\text{H}_{5,6,7} \dots \text{O}_w$  una orientación de  $\theta \approx 138^\circ$ .

También la función  $\langle \cos \theta(r) \rangle_{\text{C}_3}$  a los  $r \approx 2,7 \text{ \AA}$  muestra una orientación de los dipolos a  $\theta \approx 132^\circ$ . Esta estructuración orientacional esta asociada al comportamiento hidrofóbico de esta zona de la molécula. Por el contrario se observa una orientación menor alrededor del  $\text{C}_2$ , posiblemente debida a la influencia del grupo carboxilato vecino. Se analizan las distribuciones de puentes de hidrógeno tomando como referencia moléculas de agua en tres capas sucesivas (de  $3,2 \text{ \AA}$ ) alrededor de la  $\beta$ -alanina (Figura 7). A medida que nos alejamos de la molécula el número de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua aumenta, mientras que en la primer capa de hidratación es mayor la frecuencia de "no formación" (cero HBs) entre moléculas de agua y formación de un HB entre moléculas de agua. Este

resultado es esperable, dado la alta estructuración del solvente alrededor de la  $\beta$ -alanina, estructuración en la cual se combinan efectos hidrofóbicos e hidrofílicos.

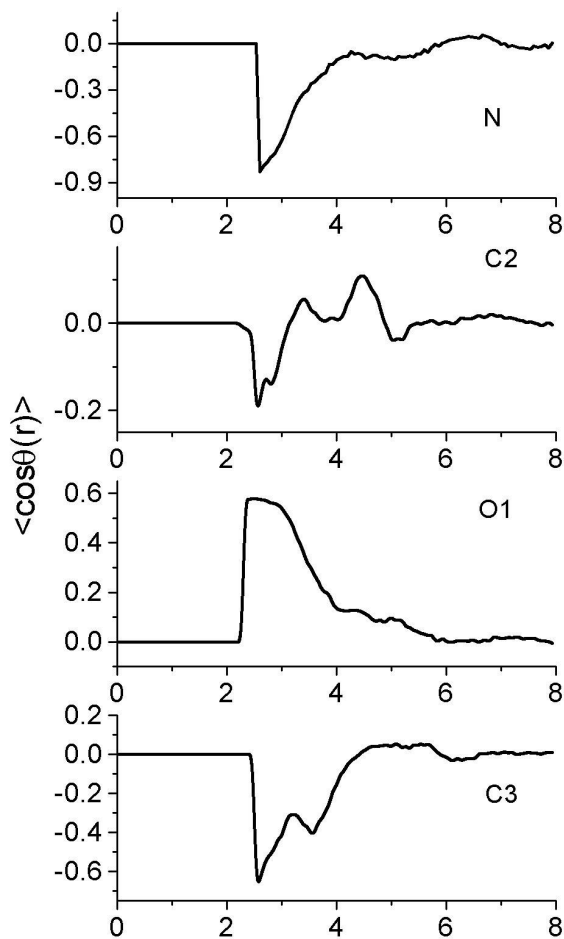


Figura 6: Funciones de distribución angular de dipolos de moléculas de agua alrededor de los átomos N (N), C2 (C2), O1 (O1) y C3 (C3).

El comportamiento hidrofóbico de la zona central de la molécula de  $\beta$ -alanina, e hidrofílico en los grupos  $-\text{NH}_3$  y  $-\text{CO}_2$  coincide con resultados anteriores de trabajos que corresponden a la glicina, un aminoácido que tiene los mismos grupos terminales.<sup>(30)(31)(32)</sup> Medidas de difracción de neutrones indican que hay 3 y 4 moléculas de agua alrededor de tales grupos.<sup>(33)(34)</sup>, mientras que cálculos ab initio indican que estos valores son 3 y 4,7.<sup>(30)</sup>, en acuerdo con los resultados de este trabajo. La estructura del solvente alrededor de la molécula es afectada en mayor medida por el grupo  $-\text{CO}_2$ , el cual posee los mayores números de hidratación y HBs con el soluto. Este resultado en particular parece contradecir las observaciones realizadas por Dragčević, et al.<sup>(24)</sup>, quien indica que el grupo  $-\text{NH}_3$  resulta ser más estabilizado por el agua. Sin embargo, dado que esta observación se realiza en experimentos donde la  $\beta$ -alanina se encuentra en una interfase aire-agua, podría ocurrir que haya algún efecto de superficie en la estructura del agua que no ocurre en el bulk del solvente. Es decir, este fenómeno en

particular posiblemente requiera un estudio más profundo y complementario al realizado en este trabajo.

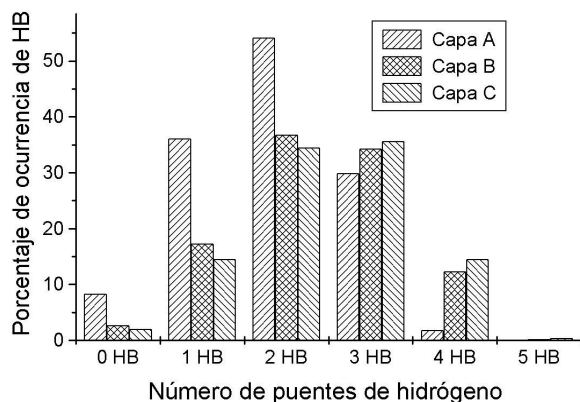


Figura 4: Distribución de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua en diferentes capas de hidratación alrededor de la  $\beta$ -alanina. Capa A: 0 – 3,2 Å, Capa B: 3,2 – 6,4 Å, Capa C: 6,4 – 9,6 Å. Ver el texto para más detalles.

#### IV. CONCLUSIÓN

Se estudió la hidratación de la molécula de  $\beta$ -alanina en su estado zwitteriónico a dilución infinita utilizando la técnica de dinámica molecular clásica. A solución diluida la suma de los números de hidratación de los átomos de la  $\beta$ -alanina en los grupos amino, C2H2, C3H2 y carboxílico es 3, 1,3, 1,5 y 6,9 respectivamente. Además, por paso de simulación cada uno de esos grupos establece con las aguas que lo rodean 2,5, 0,6, 0,9 y 5,7 puentes de hidrógeno respectivamente.

Los dipolos de la moléculas de agua que rodean a la  $\beta$ -alanina se orientan preferentemente a  $61^\circ$  alrededor de los oxígenos del grupo  $-\text{CO}_2$ , y a  $138^\circ$  alrededor del nitrógeno del grupo  $-\text{NH}_3$  (ángulo determinado por el átomo del soluto, el oxígeno del agua y el dipolo del agua). Esta correlación orientacional es apreciable hasta  $\sim 4$  Å alrededor de la  $\beta$ -alanina. Estos resultados indican la formación de una fuerte capa de hidratación, caracterizada por la presencia de puentes de hidrógeno entre el soluto y el solvente, lo que indica un comportamiento hidrofílico de la  $\beta$ -alanina.

El modelo utilizado muestra un acuerdo general con resultados previos de simulación y experimentales, lo que indica que puede utilizarse para estudiar diferentes fenómenos en los cuales la  $\beta$ -alanina interviene, utilizando la técnica de dinámica molecular.

#### Referencias

- 1 - Jonsson, P. G., Kvick, A., Acta Cryst. B, 28, 1827 (1972).
- 2 - Tortonda, F. R., Pascual-Ahuir, J. L., Silla, E., Tuñón, I., Chem. Phys. Lett., 260, 21 (1996).
- 3 - Bonacorsi, R., Palla, P., Tomasi, J., J. Am. Chem. Soc., **106**, 1945 (1984).
- 4 - Geoffrey, L., Biochemistry, Addison-Wesley, USA, 1984.
- 5 - Albrecht, G., Corey, R. B., J. Am. Chem. Soc., 61, 1087 (1939).

- 6 - Ding, Y., Krogh-Jespersen, K., Chem. Phys. Lett., 199, 261 (1992).
- 7 - Schmieden, V., Kuhse, J., Betz, H., Science, 262, 256 (1993)
- 8 - Decker, R., Von Stuckrad-Barre, S., Milakofsky, L., Hofford, J. M., Harris, N., Vogel, W.H., Life Sci., 57, 1781 (1995).
- 9 - Cowie, G.L., Hedges, J.I., Nature 369, 304 (1994).
- 10 - Dauwe, B., Middelburg, J.J., Limnol. Oceanogr. 43, 782 (1998)
- 11 - Buche, A., Colson, P., Houssier, C., J. of Biomolecular Structure & Dynamics 13, 601 (1990).
- 12 - Flock, S., Labarbe, R., Houssier, C., Biophysical J. 70, 1456 (1996).
- 13 - Flock, S., Labarbe, R., Houssier, C., Biophysical J. 71, 1519 (1996).
- 14 - Romano, S., Clementi, E., Int. J. of Quantum Chem., 14, 839 (1978).
- 15 - Watanabe, T., Hashimoto, K., Takase, H., J. of Mol. Structure, 397, 113 (1997).
- 16 - Campo, M. G., Grigera, J. R., Anales AFA, 16, 249 (2004).
- 17 - Campo, M. G., J. Chem. Phys., 125, 114511 (2006).
- 18 - Tsurko, E., N., Bondarev, N. V., J. Mol. Liq., 113, 29 (2004).
- 19 - Gregoire, F., Wei, S., H., Stree, E., W., Brameld K. A., Fort, D., Hanel, L. J., Goddard, W. A., Roberts, J. D., J. Am. Chem. Soc., 120, 7537 (1998).
- 20 - Abraham, R. J., Loftus, P., Thomas, A., W. Tetrahedron, 33, 1227 (1977).
- 21 - Nielse, P. A., Norrby, P., Liljefors, T., Rega, N., Barone, V., J. Am. Chem. Soc., 122, 3151 (2000).
- 22 - Gresh, N.; Pullman, A.; Claverie, P. Theor. Chim. Acta 67, 11 (1985).
- 23 - Ford, G. P.; Wang, B. J. Am. Chem. Soc., 114, 10563 (1992).
- 24 - Dragčević, Đ., Bišćan, J., Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 223, 35 (2003).
- 25 - van Gusteren, W., Berendsen, H., GRONINGEN MOLECULAR SIMULATION PACKAGE. Available from Biomos n.v. Ninborgh 16, 47 67 AG Groningen, The Netherlands.
- 26 - Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, Zakrzewski, J. R. V. G., Montgomery, Jr., J. A., Stratmann, R. E., Burant, J. C., Dapprich, S., Millam, J. M., Daniels, A. D., Kudin, K. N., Strain, M. C., Farkas, O., Tomasi, J., Barone, V., Cossi, M., Cammi, R., Mennucci, B., Pomelli, C., Adamo, C., Clifford, S., Ochterski, J., Petersson, G. A., Ayala, P. Y., Cui, Q., Morokuma, K., Malick, D. K., Rabuck, A. D., Raghavachari, K., Foresman, J. B., Cioslowski, J., Ortiz, J. V., Baboul, A. G., Stefanov, B. B., Liu, G., Liashenko, A. Piskorz, P., Komaromi, I., Gomperts, R., Martin, R. L., Fox, D. J., Keith, T., Al-Laham, M. A., Peng, C. Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P. M. W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M. W., Andres, J. L., Gonzalez, C., Head-Gordon, M. E., Replogle, S., and

- Pople, J. A., Gaussian 98, Revision A.9, Gaussian, Inc, Pittsburgh PA, 1998.
- 27 - R. F. W. Bader, *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*, Oxford Univ. Press: Oxford, 1990.
- 28 - Berendsen, H. J. C., Grigera, J. R., Straatsma, T. P., *J. Phys. Chem.*, **91**, 6269 (1987).
- 29 - Berendsen, H., Postma, J., van Gasteren, W, Di Nola, A., y Haak, J, *J. Chem. Phys.*, **81**,3684 (1984).
- 30 - Leung, K. , Rempe, S. B., *J. Chem. Phys.* 122 (18), 184506 (2005).
- 31 - Sato, T., Buchner, R., Fernandez, S., Chiba, A., Werner, K., *J. Mol. Liq.* 117, 93 (2005).
- 32 - Alagona G., y Guio, C., *J. Mol. Liq.* 47, 139 (1990).
- 33 - Kameda, Y., Ebata, H., Usuki, T., Uemura, O., Misawa, M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 67, 3159 (1994)
- 34 - Motoya, S., Kameda, Y., Yaegashi, M., Usuki, T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 76, 2293 (2003).