

## Tesis de Posgrado

# Simulación de reactividad química en hemoproteínas

Scherlis Perel, Damián Ariel

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Scherlis Perel, Damián Ariel. (2002). Simulación de reactividad química en hemoproteínas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3438\\_ScherlisPerel.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3438_ScherlisPerel.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Scherlis Perel, Damián Ariel. "Simulación de reactividad química en hemoproteínas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3438\\_ScherlisPerel.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3438_ScherlisPerel.pdf)

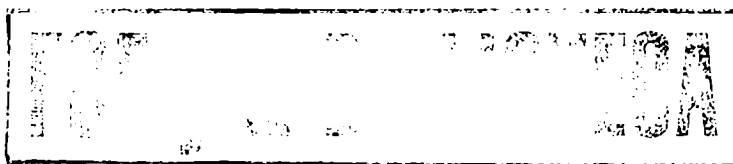
**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



# Simulación de reactividad química en hemoproteínas

Autor  
Damián Scherlis Perel

Director  
Darío Estrin

Departamento de Química Inorgánica,  
Analítica y Química Física.  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.  
Universidad de Buenos Aires

2002

3438  
Gj 2

## Resumen

El trabajo de tesis puede subdividirse en dos incisos generales: el desarrollo de técnicas de simulación computacional orientadas al tratamiento de los efectos del entorno en sistemas moleculares de gran tamaño, y la aplicación de estas y otras metodologías de cálculo a diversos problemas atinentes a la reactividad de las hemoproteínas.

En relación con el primer ítem, se halla la implementación de un método híbrido que combina el cálculo de estructura electrónica con un campo de fuerzas clásico, introduciendo de manera autoconsistente en el hamiltoniano mecanocuántico el potencial electrostático proveniente de una distribución de cargas parciales. Esta clase de técnicas, denotada habitualmente con las siglas QM-MM (Quantum Mechanics-Molecular Mechanics), resulta útil para el estudio de los efectos del entorno, por ejemplo un solvente o una proteína. La implementación del método híbrido fue realizada sobre el programa SIESTA, un algoritmo de cómputo basado en la teoría de los funcionales de la densidad (DFT) que utiliza funciones de base numéricas y pseudopotenciales.

En lo que respecta al segundo inciso, se realiza en primer término un estudio metodológico tendiente a evaluar la aptitud de los diferentes tratamientos mecanocuánticos para describir la configuración electrónica de las metaloporfirinas. Seguidamente la investigación se focaliza sobre tres problemas específicos: (i) inhibición del citocromo P450 por el óxido nítrico; (ii) relación entre la afinidad por el oxígeno molecular y las uniones hidrógeno en la cavidad distal de la hemoglobina; (iii) modulación del efecto trans negativo del NO en el sitio activo de diferentes hemoenzimas, y sus implicancias en la activación de la guanilato ciclasa. A través de estos ejemplos se realiza una lectura microscópica de la actividad de las hemoproteínas, de sus propiedades reactivas, y de la modulación que sobre el sitio activo ejerce el entorno. Se estudian los efectos de los residuos proximales y distales, y se caracterizan distintos aspectos energéticos, estructurales y electrónicos que contribuyen a la interpretación de observaciones experimentales.

**Palabras clave:** *hemoproteínas, DFT, QM-MM, porfirinas, simulación computacional*

## Abstract

This thesis has two main goals: the development of computer simulation schemes to model environment effects in large systems and the application of these techniques to the investigation of chemical reactivity in heme proteins.

Regarding the first goal, we have implemented a hybrid methodology combining an electronic structure calculation with a classical force field, including the electrostatic effects of the classical subsystem self-consistently in the Hamiltonian of the quantum subsystem. This kind of techniques, known usually as QM-MM (Quantum Mechanics- Molecular Mechanics), are specially useful to model environment effects in solution and in proteins. We have employed the SIESTA pseudopotential numerical basis set implementation of density functional theory (DFT) to describe the quantum subsystem, due to its computational performance.

The implemented computational schemes have been used to investigate the following problems: (i) inhibition of cytochrome P450 by nitric oxide; (ii) role of hydrogen bonding in oxygen affinity of hemoglobins; (iii) modulation of nitric oxide negative trans effect in the active site in different heme proteins and its connection with the activation of guanylate cyclase. Through these examples, we have tried to provide a microscopic insight of the role of the environment on the chemical reactivity of heme proteins. We have investigated the effects of the distal and proximal residues, characterizing structural and energetical parameters which contribute to the interpretation of experimental results.

**Keywords:** *heme-proteins, DFT, QM-MM, porphyrins, computer simulation*

# Contenidos

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>4</b>
1.1	Química cuántica y biología . . . . .	4
1.2	Hemoproteínas . . . . .	7
1.3	Después de Schrödinger . . . . .	11
1.4	Lineamientos y objetivos . . . . .	15
<b>2</b>	<b>Aspectos teóricos y metodología</b>	<b>18</b>
2.1	De la ecuación de Schrödinger al principio variacional . . . . .	18
2.2	La aproximación de Hartree-Fock . . . . .	24
2.3	Los tratamientos semiempíricos . . . . .	29
2.4	El método de perturbaciones de Møller Plesset . . . . .	31
2.5	Teoría de los funcionales de la densidad: $\rho$ versus $\Psi$ . . . . .	34
2.6	Esquemas de cálculo DFT . . . . .	42
2.7	Técnicas híbridas QM-MM . . . . .	49
<b>3</b>	<b>Estructura electrónica de hemoporfirinas a través de un sistema modelo: confrontación de aproximaciones mecanocuánticas</b>	<b>56</b>
3.1	Características del hemo e implicancias para la simulación computacional . . . . .	56
3.2	Sistema modelo . . . . .	58
3.3	Detalles metodológicos . . . . .	59
3.4	Estados de espín del átomo de hierro y de sus especies iónicas	61
3.5	Sistema pentacoordinado . . . . .	63
3.6	Sistema hexacoordinado . . . . .	69
3.7	Algunas consideraciones generales . . . . .	71

<b>4</b>	<b>Inhibición del citocromo P450 por el óxido nítrico</b>	<b>74</b>
4.1	Acerca del citocromo P450 . . . . .	74
4.2	Modelo computacional . . . . .	77
4.3	El sitio activo en el estado basal . . . . .	82
4.4	El complejo nitrosilado . . . . .	86
4.5	Reacción de intercambio de ligandos . . . . .	91
4.6	Efecto de la proteína . . . . .	92
4.7	Sumario . . . . .	94
<b>5</b>	<b>Afinidad de la hemoglobina por el O<sub>2</sub>: rol de los aminoácidos distales</b>	<b>96</b>
5.1	La hemoglobina y el oxígeno . . . . .	96
5.2	Contexto y método de simulación . . . . .	99
5.3	Estabilización del O <sub>2</sub> en el sitio activo . . . . .	100
5.4	Dogma y sutilezas sobre la constante de afinidad . . . . .	105
<b>6</b>	<b>Modulación del efecto trans negativo del óxido nítrico e implicancias en la activación de la guanilato ciclasa</b>	<b>108</b>
6.1	¿Por qué la guanilato ciclasa? . . . . .	108
6.2	Validación del tratamiento computacional . . . . .	110
6.3	Unión hidrógeno a la histidina y ruptura del enlace proximal .	112
6.4	Comentarios finales . . . . .	119
<b>7</b>	<b>Conclusiones y perspectivas</b>	<b>122</b>
	Bibliografía . . . . .	126

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1 Química cuántica y biología

Elucidar los procesos biológicos en términos microscópicos, desentrañar su naturaleza a través de una descripción a nivel molecular y eventualmente atómico, constituye acaso uno de los objetivos primordiales de la bioquímica, y de una parte importante de la biología. Figuras protagónicas de tales procesos, piezas esenciales de este engranaje nanométrico, las proteínas aparecen en el centro de la escena. Estas moléculas están involucradas en prácticamente todo proceso biológico: catálisis, transporte, control del crecimiento y diferenciación celular, además de su función como soporte mecánico y motor molecular [1, 2]. Los mecanismos enzimáticos, la interacción con sustratos y otros agentes, la transmisión de información, así como la correlación entre su conformación y la secuencia de los aminoácidos que las componen, y, a nivel más general, entre función y estructura, son aspectos fundamentales cuya investigación ha concitado enorme interés y esfuerzo, y al presente representa uno de los desafíos más atractivos y ambiciosos de las ciencias naturales.

A lo largo de las décadas últimas se han realizado avances formidables en el conocimiento del comportamiento de las proteínas a escala microscópica. La biología molecular experimental, principalmente a partir de las técnicas de secuenciación y ADN recombinante, se halla entre los mayores responsables de tal progreso. Pero la evolución que ha tenido lugar sería impensable sin los aportes provenientes de la física y la fisicoquímica, en especial a través de la espectroscopia de rayos X y RMN, entre otras, y de los métodos de purificación como la cromatografía o la electroforesis [1].

Parejamente, en los años más recientes, un enfoque distinto, la simulación computacional, ha comenzado a utilizarse en la exploración de los aspectos microscópicos de las biomoléculas. Lo cual no debería en modo alguno sorprender, pues es natural que el estudio del comportamiento molecular, aun en un marco biológico, se desarrolle mediante herramientas de origen fisicoquímico. Los cálculos de dinámica molecular y de estructura electrónica han adquirido enorme difusión dentro de la comunidad biológica, y se han implementado con relativo éxito en multitud de ejemplos, permitiendo obtener información estructural, termodinámica, espectroscópica, e incluso dinámica, que en ciertos casos resulta inaccesible por medios experimentales [3, 4].

Básicamente, esta clase de simulaciones puede estar sustentada en los principios de la mecánica clásica o de la mecánica cuántica: tal distinción es apropiada para establecer una categorización preliminar. En los métodos clásicos los átomos interactúan mediante potenciales parametrizados *ad hoc*, que conforman un campo de fuerzas. Los electrones no son tratados de modo explícito (su existencia está implícitamente presente a través de los parámetros) y por lo tanto no son aptos para el estudio de reacciones químicas o de cualquier proceso que involucre transferencia o reordenamiento de carga. En cambio, tienen aplicación en el cálculo de propiedades estructurales y dinámicas, en especial en sistemas con un número elevado de átomos en los que el tratamiento cuántico resulta excesivamente costoso o directamente impracticable, como en el caso de las biomoléculas o de los polímeros en general. La investigación del plegamiento y la conformación de las proteínas, o de las interacciones proteína-ligando, siempre que no haya asociada una



transformación química, son ejemplos de las aplicaciones que encuentran los métodos clásicos en biología [5].

Las técnicas fundadas en la mecánica cuántica —los llamados métodos de estructura electrónica— proporcionan resultados de mayor calidad, y por lo demás permiten acceder a aspectos ajenos a las simulaciones clásicas, como lo son las reacciones químicas o los espectros electrónicos. En un principio, sin embargo, su costo computacional no hizo factible su aplicación a sistemas biológicos, circunstancia que se ha modificado sólo recientemente a partir del notable incremento en la velocidad de cálculo de los microprocesadores. Asimismo, se han formulado diversas parametrizaciones para aliviar el esfuerzo computacional, dando origen a los modelos semiempíricos. Estos permiten el tratamiento de sistemas formados por cientos de átomos, aunque, lógicamente, no tienen el grado de confiabilidad de los denominados métodos cuánticos *ab initio*, en los que la dependencia respecto de parámetros experimentales es mínima o nula.

Consecuentemente con los desarrollos teóricos y metodológicos y con la evolución en la capacidad de cómputo, las implementaciones mecanocuánticas en biología se han extendido de modo considerable, si bien al día de hoy la simulación *ab initio* de una molécula de proteína de unos cuantos cientos de átomos está en el límite de lo posible. Es por eso que en la práctica se suele seleccionar sólo una porción de la macromolécula, un subsistema compuesto por un número acotado de átomos y relacionado directamente con la función biológica, normalmente el sitio activo, que se examina en el vacío o inmerso en un medio uniforme con una constante dieléctrica que simula el efecto del entorno proteico hidrofóbico. Tal simplificación coloca el estudio de las proteínas al alcance de los métodos *ab initio*, y resulta eficiente toda vez que el subsistema considerado se comporte, en cierta medida, como una entidad independiente.

En los últimos diez años un tipo de aproximación que combina el formalismo cuántico con el clásico comenzó a utilizarse en la simulación de biomoléculas [6, 7]. Con el nombre de metodologías híbridas o cuántico-clásicas, y denotadas habitualmente como QM-MM (del inglés Quantum Mechanical-

Molecular Mechanical). fueron concebidas para el cálculo de sistemas con muchos átomos. En un principio estuvieron vinculadas principalmente al estudio de la solvatación y la reactividad de moléculas pequeñas en fases condensadas [8]; posteriormente su utilización se extendió a diversas aplicaciones: reactividad de superficies y catálisis [9, 10], fenómenos de cristalización [11], y, como se ha dicho, procesos enzimáticos y bioquímicos en general. La estrategia de las metodologías híbridas consiste en dividir al sistema en dos. Uno de los subsistemas contiene la región donde puede haber ruptura y formación de enlaces, efectos de polarización, transferencia de protón, u otros fenómenos que requieran de una descripción cuántica. El otro, habitualmente de mayor tamaño, no está sujeto a transformaciones químicas y por lo tanto es tratado con las herramientas de la mecánica molecular clásica. Ambas regiones interactúan a través de un Hamiltoniano híbrido, que introduce en la estructura electrónica el efecto del entorno, y viceversa. Tal procedimiento posibilita la inspección de un complejo enzimático a un costo accesible.

Bajo esta perspectiva, es evidente que la simulación computacional se halla en posición de contribuir significativamente al esclarecimiento y la interpretación de la reactividad enzimática, porque permite un acercamiento al comportamiento de la proteína a nivel molecular. Si bien al presente suele utilizarse como un complemento de la investigación experimental, no es exagerado suponer que con el perfeccionamiento de los métodos cuánticos será una herramienta fundamental para acceder a mecanismos y detalles microscópicos invaluable y difíciles de obtener por cualquier otro medio.

## 1.2 Hemoproteínas

Dentro de la vasta diversidad de proteínas conocidas, las hemoproteínas conforman un conjunto muy extenso y de una enorme relevancia biológica. Las funciones que desempeñan se pueden condensar en cinco grupos: transferencia de electrones (citocromos b y c), transporte y almacenamiento de O<sub>2</sub> (hemoglobina y mioglobina), conversión del oxígeno molecular en agua (ci-

tocromo oxidasa), oxigenación de substratos orgánicos (citocromo P450), y reducción de peróxidos (catalasas y peroxidases) [12].

A pesar de tan amplia variedad de capacidades, todas estas proteínas poseen el mismo centro activo: el complejo de hierro-protoporfirina, conocido como el grupo hemo. Se trata de una unidad compuesta de cuatro pirroles interconectados por puentes meteno, que conforman un anillo tetrapirrónico en cuyo centro se aloja un átomo de hierro. Semejante arreglo define un macrociclo aproximadamente plano y que puede presentar distintos sustituyentes laterales: en la figura 1.1 se muestran los ejemplos más frecuentes en biología.

Aparte de las cadenas laterales alifáticas, y con la excepción del citocromo  $cd_1$ , la estructura del grupo prostético se conserva inalterada en las diferentes hemoproteínas. De ahí que A. Munro y otros [12], en consideración a la variedad de funciones en que está implicado, se refirieran al hemo como "el centro redox más versátil en biología". La unidad aislada exhibe una potencialidad asombrosa, pero evidentemente es el polipéptido quien determina cuales capacidades estarán activadas, interviniendo al mismo tiempo en su modulación. La forma en que lo hace permanece en muchos casos sin esclarecer, y su investigación constituye de hecho una parte no menor de esta tesis.

La reactividad del hemo está estrechamente relacionada con el metal. Este se halla unido a aquel por coordinación a cuatro átomos de nitrógeno, pero además de estos enlaces es capaz de formar otros dos adicionales, uno a cada lado del plano de la porfirina. Mediante esos sitios axiales el hierro puede establecer uniones con un quinto y un sexto ligando. Generalmente, al menos uno de tales ligandos es un residuo aminoacídico, que constituye un punto de contacto entre el grupo prostético y la proteína (también los sustituyentes laterales contribuyen en distinta medida al anclaje del hemo en la estructura terciaria). El aminoácido coordinado axialmente al Fe se denomina residuo proximal, y su naturaleza es determinante respecto a la actividad de la proteína. Si el hierro se encuentra pentacoordinado, esto es, si existe un único residuo proximal, entonces dispone todavía de un sitio libre

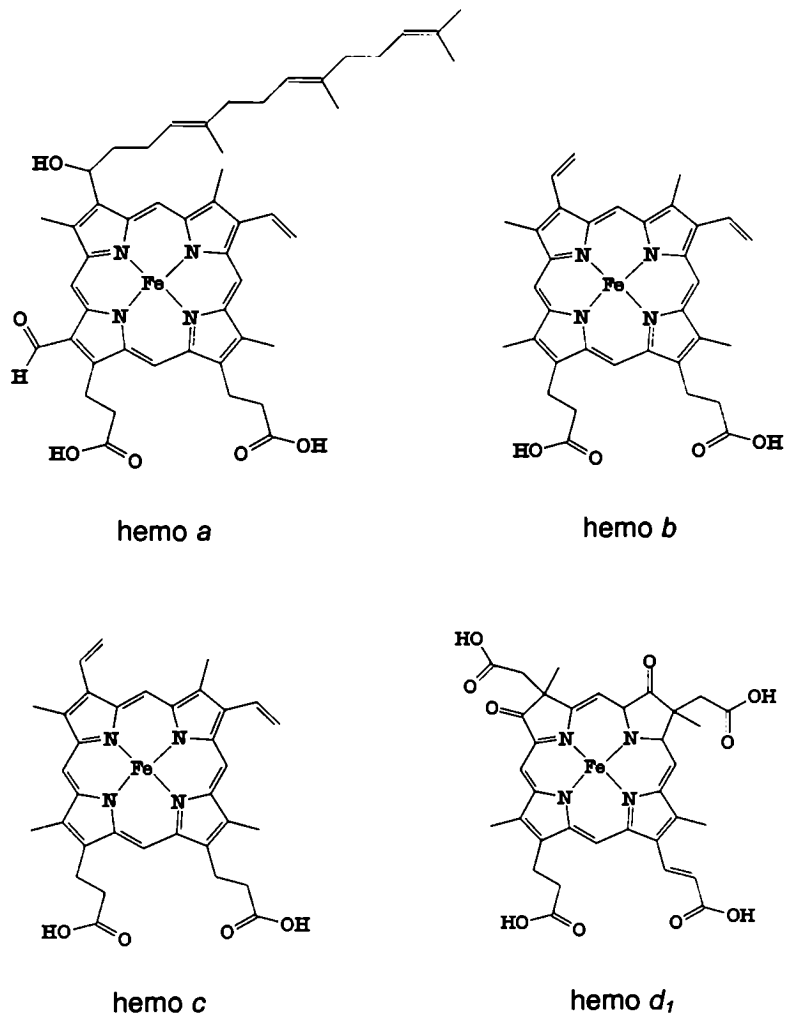


Figura 1.1: Hemoporfirinas presentes en sistemas biológicos.

para interactuar con ligandos exógenos, cual ocurre en el caso de oxidasas y oxigenasas. Contrariamente, en las hemoproteínas involucradas en procesos de transferencia electrónica, el hierro se halla habitualmente hexacoordinado. La presencia de dos aminoácidos proximales bloquea las posiciones axiales para prevenir cambios químicos en el entorno del centro metálico [12].

Si bien los residuos proximales son normalmente los responsables principales de la modulación de la actividad del hemo, el resto del entorno proteico también ejerce cierto control sobre su función y sus propiedades reactivas. En casos como la hemoglobina o la mioglobina, por ejemplo, se ha determinado que la afinidad por el  $O_2$  y otras moléculas pequeñas está condicionada por la naturaleza de los aminoácidos en la cavidad distal. Así se identifica a la región contenida en la vecindad del sitio libre del metal y delimitada por la estructura polipeptídica, donde acontece la interacción hierro-ligando. Los residuos distales, evidentemente, desempeñan un papel esencial en la accesibilidad y estabilización de sustratos en el sitio activo. Pero el efecto del polipéptido sobre el comportamiento del hemo puede darse asimismo a través de mecanismos menos localizados o más indirectos. A partir de interacciones específicas con un sustrato las estructuras terciaria y cuaternaria son susceptibles de sufrir cambios conformacionales: modificaciones en la tensión del enlace con el residuo proximal o en el entorno químico resultan capaces de alterar la reactividad del hemo. El comportamiento alostérico de la hemoglobina es un ejemplo de esto. Dicha proteína es un tetrámero, cada una de cuyas cuatro subunidades contiene un grupo hemo b. El efecto alostérico, caracterizado porque la oxigenación de una cadena induce un incremento de afinidad en las otras, es consecuencia de un complejo reordenamiento estructural iniciado por la unión de  $O_2$  a uno de los sitios activos [1].

Otra faceta particular que exhiben las hemoproteínas guarda relación con su momento magnético. La reactividad del sitio activo, como la de cualquier centro metálico, es dependiente del estado de espín, que a su vez está determinado por el esquema de coordinación [13]. Distorsiones sutiles en la geometría pueden ocasionar cambios en la configuración electrónica que alteren el momento magnético. Por eso no es poco frecuente que el espín

total se modifique en el curso de un proceso reactivo. Este hecho añade otro ingrediente a la química de las hemoproteínas e ilustra su complejidad. El delicado equilibrio entre espín y estructura es tema de análisis en el presente trabajo.

La relevancia biológica de las hemoproteínas ha motivado su estudio desde múltiples flancos. La espectroscopía aportó, y continúa haciéndolo, enorme cantidad de información sobre características estructurales; en la actualidad existen decenas de hemoproteínas cuyo arreglo espacial es conocido. Los ensayos bioquímicos han elucidado su función y propiedades reactivas, y junto con las técnicas de biología molecular, han sido decisivos para el establecimiento de la estructura primaria. Mediante experimentos de mutagénesis, a partir de la supresión o modificación de residuos seleccionados y la posterior medición de constantes cinéticas, se ha conseguido en ciertos casos individualizar los efectos de la matriz proteica sobre la actividad. En esta tarea de discriminación de los efectos del entorno también ha sido significativa la contribución proveniente de la química inorgánica o bioinorgánica, gracias a la experimentación sobre sistemas modelo del hemo sintetizados en el laboratorio. Finalmente, en tiempos más cercanos, la simulación computacional también ha comenzado a mostrar su utilidad para interpretar y convalidar resultados experimentales, pero también como instrumento de valor intrínseco en la exploración de los más variados aspectos de las hemoproteínas.

### **1.3 Después de Schrödinger**

La fractura en la ciencia física ocasionada por el advenimiento de la mecánica cuántica en la década del 20 supuso una nueva fase en el conocimiento de la materia. Las formulaciones de Heisenberg, Schrödinger, Dirac y otros, constituían la llave para acceder al misterio de los átomos y las moléculas. En efecto, la nueva mecánica describía el comportamiento de las partículas microscópicas, que la física clásica no lograba explicar. La resolución de la ecuación de Schrödinger proporcionaba la información sobre cualquier aspec-

to del sistema. Aplicada a una molécula permitiría acceder a sus propiedades espectroscópicas, eléctricas o magnéticas, obtener la energía y por lo tanto su estructura.

Sin embargo, esta ecuación no tiene solución analítica para sistemas con más de un electrón. Se planteaba consecuentemente la necesidad de hallar aproximaciones que posibilitaran el cálculo de átomos polielectrónicos y moléculas. La búsqueda de métodos aproximados para resolver la ecuación de Schrödinger signó el desarrollo de la química cuántica. Desde la aparición de la teoría hasta hoy, se ha dedicado un esfuerzo ininterrumpido tendiente a derivar técnicas eficientes para resolver el problema electrónico con el mayor grado de exactitud. La mayor parte de las aproximaciones que se formularon desde entonces están sustentadas en el principio variacional, o bien en la teoría de perturbaciones [14]. La implementación de cualquiera de estos métodos conduce a soluciones numéricas sumamente arduas. Sistemas de pocos átomos implican ecuaciones de enorme dimensionalidad, cuya manipulación es impensable sin la utilización de computadoras. Asimismo, el precio de elevar mínimamente la exactitud del cálculo resulta formidable. Por ello la utilización de la mecánica ondulatoria en el tratamiento de la estructura electrónica estuvo expuesta a una fuerte reactivación a partir del avance vertiginoso de la tecnología informática.

Históricamente, el método de Hartree-Fock, concebido alrededor de 1930, es posiblemente el que ha tenido mayor presencia y repercusión, al punto que al día de hoy se sigue empleando en gran cantidad de estudios mecano-cuánticos. Pertenece a la categoría de metodologías *ab initio* o de primeros principios, caracterizadas porque se derivan de la teoría sin la incorporación de parámetros ajustables, más allá de las constantes físicas fundamentales. Esto les diferencia de las técnicas semiempíricas, en las que se utiliza un Hamiltoniano simplificado, y muchos elementos de matriz, que de otro modo se evaluarían a través de integraciones costosas, están preasignados en función de datos experimentales. Tales características les permiten disminuir considerablemente el número de cálculos, por lo que pueden aplicarse a sistemas de muchos más átomos de los que los procedimientos *ab initio* están

en condiciones de afrontar. Por supuesto, se trata de un compromiso entre velocidad de cómputo y calidad de los resultados. El método de Hückel fue uno de los modelos semiempíricos más populares, aunque en la actualidad es prácticamente obsoleto.

Tanto el de Hartree-Fock como las aproximaciones semiempíricas modernas, son métodos de campo autoconsistente. Tal denominación hace referencia a que el Hamiltoniano contiene de alguna manera la solución, de modo que uno y otra son interdependientes, y por consiguiente el problema debe resolverse autoconsistentemente. La convergencia a una solución estable no está garantizada, y se vuelve más difícil en tanto aumenta el número de electrones. Las técnicas numéricas utilizadas en química cuántica son diversas y desempeñan un papel vital, constituyendo además un continente en sí mismas.

Los métodos de estructura electrónica han evolucionado en muchas direcciones. Tradicionalmente proponen como solución un determinante de Slater [14], porque esta forma matemática satisface el requerimiento de antisimetría dictado por la teoría. Pero esa aproximación descuida la correlación electrónica, falencia que puede subvertirse si la solución se expresa como combinación lineal de varios determinantes. Este tratamiento se conoce como interacción de configuraciones (CI), y proporciona resultados de mayor exactitud, siendo particularmente útil para el cálculo de estados excitados. El costo de semejante implementación es sin embargo tan exagerado, que en su versión *ab initio* sus aplicaciones quedan restringidas a sistemas de muy pocos átomos.

Un capítulo aparte merece la teoría de los funcionales de la densidad (DFT), que ha adquirido vasta difusión en casi todas las aplicaciones de la química cuántica. En sus orígenes estuvo circunscripta al cálculo de sólidos, pero desde los años 90 su uso se fue extendiendo con éxito a sistemas moleculares. Los tratamientos cuánticos tradicionales propenden a la obtención de la función de onda, entidad matemática sin significado físico que constituye la solución de la ecuación de Schrödinger y que contiene toda la información del sistema. La teoría de los funcionales de la densidad, basada en los



formalismos propuestos por Pierre Hohenberg, Walter Kohn y Lu Sham a mediados de los 60 [15, 16], traslada el foco del problema desde la función de onda a la densidad electrónica, reduciendo el número de variables involucradas y por lo tanto los requerimientos computacionales en comparación con los métodos *ab initio*. La formulación de Kohn y Sham, sin embargo, contiene un término, denominado funcional de intercambio y correlación, cuya expresión analítica no se conoce, si bien puede calcularse mediante distintas aproximaciones, muchas de las cuales involucran parámetros experimentales. Es por ello que no suele considerarse dentro de los métodos *ab initio*, sino que por lo general se le sitúa en una categoría separada. La exactitud del cálculo DFT, pues, depende del acierto con que se estima dicho término. Existen muchas líneas de investigación tendientes a perfeccionar el funcional de intercambio y correlación. Empero, como acontece en general, el incremento en la sofisticación de las aproximaciones reviste un aumento en el esfuerzo computacional.

Durante un largo periodo, el tiempo y los requerimientos de hardware que implicaban los cálculos *ab initio* más sencillos resultaron exorbitantes para los recursos computacionales disponibles. Por eso desde finales de los años 70 y a lo largo de los 80, los métodos semiempíricos fueron la opción más frecuente para el estudio de sistemas de varios átomos. Con la expansión de los recursos de cómputo la tendencia se modificó en favor de las técnicas *ab initio*. En la actualidad, los modelos semiempíricos se reservan para los casos en que el número de átomos vuelve imposible un tratamiento más exacto. Por su parte, debido a su costo moderado y a la buena calidad de los resultados en comparación con métodos *ab initio* como Hartree-Fock, DFT ha recibido una gran aceptación. Al extremo que se ha convertido en uno de los procedimientos más utilizados en sistemas de tamaño intermedio, que van desde unas pocas decenas hasta un centenar de átomos. Su futuro, aunque promisorio, está cifrado en la búsqueda de un funcional que se acerque cada vez más al exacto.

## 1.4 Lineamientos y objetivos

Responder a una serie de interrogantes centrales en la química de las hemoproteínas por medio de la simulación computacional es el propósito del presente trabajo. También lo es, en segunda instancia, la implementación de técnicas híbridas cuántico-clásicas orientadas al cálculo de sistemas de gran tamaño y al tratamiento de los efectos del solvente.

Más allá del punto de vista computacional, los problemas abordados son de carácter muy actual y constituyen materia de discusión y origen de controversia en estudios biofísicos, químicos y biológicos. Nuestra intención ha sido contribuir al esclarecimiento de estos aspectos esenciales mediante un enfoque microscópico, capaz de complementar la información experimental y de brindar fundamento a interpretaciones mecanísticas. Para ello se han utilizado distintas herramientas de simulación, en particular los métodos de estructura electrónica, y principalmente DFT. Hemos apelado a desarrollos metodológicos ya existentes, pero también a implementaciones propias. Un resumen de las técnicas y del marco teórico correspondiente puede hallarse en el capítulo 2, donde se exponen de manera sintética los conceptos y fundamentos de los métodos mecanocuánticos y QM-MM.

El capítulo 3 está dedicado al estudio sistemático de los estados de espín y la estructura de un modelo del complejo hierro-protoporfirina. Dicho modelo —una simplificación del grupo hemo que conserva el esquema de coordinación del hierro— fue utilizado a fin de aligerar el costo del gran número de cálculos necesario para completar el análisis. Uno de los objetivos de esta parte de la tesis es evaluar la aptitud de los diversos métodos de estructura electrónica en la predicción de las propiedades del hemo. Los resultados, publicados recientemente [17], conforman el prólogo y punto de referencia para el resto del trabajo, y a la vez un importante antecedente en el cálculo de hemoporfirinas.

Los tres capítulos siguientes, a través de la exploración de varios problemas específicos, ofrecen una lectura microscópica de la actividad de las hemoproteínas, de sus propiedades reactivas, y de la modulación que sobre el sitio

activo ejerce el entorno. Se estudian los efectos de los residuos proximales y distales, y se caracterizan distintos aspectos energéticos, estructurales y electrónicos que contribuyen a la interpretación de observaciones experimentales. Si bien nuestro estudio abarca un número acotado de hemoproteínas, tiene un alcance que excede a los cinco o seis ejemplos presentados. Los casos examinados revelan características generales que recorren de modo exhaustivo la química de estas macromoléculas e ilustran sus aristas principales. El contenido de estos capítulos ha sido compilado en los diversos artículos citados en la referencia [18]. En conjunto, representan una suerte de disección sobre los múltiples aspectos del comportamiento de las hemoproteínas, efectuada con la ayuda de la poderosa lupa que constituyen los métodos de estructura electrónica.

activo ejerce el entorno. Se estudian los efectos de los residuos proximales y distales, y se caracterizan distintos aspectos energéticos, estructurales y electrónicos que contribuyen a la interpretación de observaciones experimentales. Si bien nuestro estudio abarca un número acotado de hemoproteínas, tiene un alcance que excede a los cinco o seis ejemplos presentados. Los casos examinados revelan características generales que recorren de modo exhaustivo la química de estas macromoléculas e ilustran sus aristas principales. El contenido de estos capítulos ha sido compilado en los diversos artículos citados en la referencia [18]. En conjunto, representan una suerte de disección sobre los múltiples aspectos del comportamiento de las hemoproteínas, efectuada con la ayuda de la poderosa lupa que constituyen los métodos de estructura electrónica.



## Capítulo 2

# Aspectos teóricos y metodología

En este capítulo se presenta resumidamente la teoría asociada al cálculo de la estructura electrónica. En tal contexto, se explican y desarrollan los fundamentos de diversas técnicas, como la aproximación de Hartree-Fock o el método de perturbaciones. Especial atención se dedica a la teoría de los funcionales de la densidad, posiblemente la herramienta de simulación preponderante en el curso de la tesis. Oportunamente se introducen algunos detalles técnicos relacionados con aspectos prácticos, lo que se acentúa en las dos secciones que cierran el capítulo, donde el énfasis recae en la implementación computacional.

### 2.1 De la ecuación de Schrödinger al principio variacional

Cualquier aproximación desde primeros principios al estudio de sistemas atómicos o moleculares debe considerar la teoría que describe el comportamiento de las partículas microscópicas: la mecánica cuántica, resumida en la ecuación de Schrödinger.

$$-\frac{\hbar}{i} \frac{\partial \Psi(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \Psi(\mathbf{r}, t) + V(\mathbf{r}, t) \Psi(\mathbf{r}, t) \quad (2.1)$$

Se trata de una ecuación diferencial cuya resolución proporciona la función de onda  $\Psi(\mathbf{r}, t)$ , una descripción matemática del sistema de partículas cuánticas sujetas al potencial  $V(\mathbf{r}, t)$ . Se dice que la función de onda contiene toda la información del sistema porque a partir de aquella, por medio de los procedimientos algebraicos apropiados, puede calcularse cualquiera de las propiedades de este. El problema fundamental de la química cuántica es, pues, resolver la ecuación de Schrödinger para un sistema de núcleos y electrones. Ya que la resolución exacta no es posible, el objetivo es entonces hallar un método aproximado. A modo de un primer acercamiento, en la mayor parte de las aplicaciones es lícito considerar un potencial independiente del tiempo. En ese caso  $\Psi(\mathbf{r}, t)$  se puede escribir como producto de dos factores, uno de los cuales depende de las coordenadas espaciales y el otro de la temporal. Esta escisión permite reducir la ecuación de Schrödinger a una forma independiente de  $t$ ,

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \Psi(\mathbf{r}) + V(\mathbf{r}) \Psi(\mathbf{r}) = E \Psi(\mathbf{r}) \quad (2.2)$$

o bien, definiendo el operador Hamiltoniano  $H = -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V$ ,

$$H \Psi(\mathbf{r}) = E \Psi(\mathbf{r}) \quad (2.3)$$

con  $E$  la energía del sistema, y  $\mathbf{r}$  las coordenadas espaciales de las partículas cuánticas. Para el caso de un sistema conformado por electrones y núcleos, el Hamiltoniano expresado en unidades atómicas<sup>1</sup> adopta la forma siguiente:

<sup>1</sup>La introducción de las unidades atómicas simplifica la escritura del Hamiltoniano. Bajo esta convención, la unidad de carga es la carga del protón, la unidad de masa es la del electrón, y el momento angular se mide en múltiplos de  $\hbar$ . Consecuentemente las unidades de energía y de longitud resultan respectivamente

$$1 \text{ hartree} = e^2/4\pi\epsilon_0 a_0 \quad 1 \text{ bohr} = \hbar^2/m_e e^2$$

$$H = - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (2.4)$$

donde los subíndices  $i$  y  $j$  refieren a los electrones y  $A$  y  $B$  a los núcleos, siendo  $N$  el número de estos y  $M$  el de aquellos. Así, los primeros dos términos representan la energía cinética electrónica y la nuclear respectivamente, el tercero proviene de la atracción entre electrones y núcleos, el cuarto de la interacción entre electrones, y el quinto entre núcleos.

Un procedimiento común a prácticamente cualquier método de química cuántica consiste en desacoplar el movimiento de los núcleos del de los electrones, a fin de resolver el problema electrónico separadamente. Tal proceder se conoce como la aproximación de Born-Oppenheimer [19], y desde un punto de vista cualitativo tiene su justificación en la velocidad relativa de los electrones respecto a la de los núcleos, mucho más pesados. En cierto modo, se trata de asumir que los electrones se mueven en un potencial de cargas puntuales positivas estáticas, o bien que responden instantáneamente a cualquier cambio de las coordenadas nucleares. Bajo tal aproximación, el segundo término de la ecuación (2.4) desaparece, y el último se convierte en una constante. Los términos restantes conforman el Hamiltoniano electrónico, que está asociado a la función de onda electrónica, la cual a su vez tendrá una dependencia explícita respecto a las coordenadas electrónicas pero paramétrica respecto a las nucleares.

Si se considera el espín de los electrones, entonces debe satisfacerse el principio de antisimetría para fermiones postulado por la mecánica cuántica. El cual exige una función de onda antisimétrica frente al intercambio de la coordenada  $\mathbf{x}$  entre dos electrones cualesquiera,

$$\Psi(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_i, \dots, \mathbf{x}_j, \dots, \mathbf{x}_N) = -\Psi(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_j, \dots, \mathbf{x}_i, \dots, \mathbf{x}_N) \quad (2.5)$$

donde  $\mathbf{x}$  especifica la posición y el espín. Definiendo el espín-orbital  $\chi$  como la función de onda de una partícula, entonces el requerimiento de antisimetría se verifica al expresar la función de onda multielectrónica como un determinante



de Slater:

$$\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N) = (N!)^{-1/2} \begin{vmatrix} \chi_i(\mathbf{x}_1) & \chi_j(\mathbf{x}_1) & \dots & \chi_k(\mathbf{x}_1) \\ \chi_i(\mathbf{x}_2) & \chi_j(\mathbf{x}_2) & \dots & \chi_k(\mathbf{x}_2) \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ \chi_i(\mathbf{x}_N) & \chi_j(\mathbf{x}_N) & \dots & \chi_k(\mathbf{x}_N) \end{vmatrix} \quad (2.6)$$

Este determinante involucra  $N$  electrones indistinguibles distribuidos en  $N$  espín-orbitales  $\chi$ , con  $\mathbf{x}_i$  las coordenadas espaciales y de espín del electrón  $i$ . Dos partículas distintas en el mismo orbital implican dos columnas idénticas, lo cual anula el determinante, en acuerdo con el principio de exclusión de Pauli [19]. Así, un determinante de Slater es la forma matemática más sencilla para expresar una función de onda antisimétrica.

Ahora bien, las consideraciones efectuadas hasta el momento se refieren a la ecuación de Schrödinger y a la forma matemática que deberá presentar su solución, la función de onda. No obstante, no hemos aún establecido cómo encontrarla. En esa tesitura, el principio variacional constituye un recurso inestimable, en tanto permite hallar las soluciones de un problema de autovalores —como lo es la ecuación de Schrödinger— sin resolverlo en el sentido estricto. De hecho, la mayor parte de las técnicas de estructura electrónica descritas y empleadas en la presente tesis se sustentan en el método variacional. Antes de adelantar en esta dirección, notemos que dado el operador  $H$ , existe un conjunto infinito de soluciones de la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo:

$$H|\Psi_\alpha\rangle = E_\alpha|\Psi_\alpha\rangle \quad \alpha = 0, 1, \dots \quad E_0 \leq E_1 \leq \dots \leq E_\alpha \leq \dots$$

Siendo  $H$  un operador hermítico, los autovalores  $E_\alpha$  son reales, con  $E_0$  la energía del estado fundamental, y  $|\Psi_\alpha\rangle$  las autofunciones ortonormales, tal que verifican  $\langle\Psi_\alpha|\Psi_\beta\rangle = \delta_{\alpha\beta}$ . Así, multiplicando a la izquierda por  $\langle\Psi_\beta|$  en la ecuación de valores propios, se tiene

$$\langle\Psi_\beta|H|\Psi_\alpha\rangle = E_\alpha\delta_{\alpha\beta} \quad (2.7)$$

Además, asumiendo que  $\{|\Psi_\alpha\rangle\}$  es un conjunto completo, cualquier función  $|\tilde{\Psi}\rangle$  con las mismas condiciones de contorno puede escribirse como combinación lineal,

$$|\tilde{\Psi}\rangle = \sum_{\alpha} |\Psi_\alpha\rangle c_{\alpha} = \sum_{\alpha} |\Psi_\alpha\rangle \langle\Psi_\alpha|\tilde{\Psi}\rangle \quad (2.8)$$

y

$$\langle \tilde{\Psi} | = \sum_{\alpha} c_{\alpha}^* \langle \Psi_{\alpha} | = \sum_{\alpha} \langle \tilde{\Psi} | \Psi_{\alpha} \rangle \langle \Psi_{\alpha} | \quad (2.9)$$

Si la función de onda  $|\tilde{\Psi}\rangle$  está normalizada, el teorema variacional sostiene que el valor esperado del Hamiltoniano será igual o mayor a la energía del estado fundamental. Es decir, si

$$\langle \tilde{\Psi} | \tilde{\Psi} \rangle = 1 \quad (2.10)$$

entonces

$$\langle \tilde{\Psi} | H | \tilde{\Psi} \rangle \geq E_0 \quad (2.11)$$

La demostración se realiza expandiendo  $\langle \tilde{\Psi} | H | \tilde{\Psi} \rangle$  en función de (2.8) y (2.9). En ese caso, introduciendo la relación (2.7),

$$\langle \tilde{\Psi} | H | \tilde{\Psi} \rangle = \sum_{\alpha\beta} \langle \tilde{\Psi} | \Psi_{\alpha} \rangle \langle \Psi_{\alpha} | H | \Psi_{\beta} \rangle \langle \Psi_{\beta} | \tilde{\Psi} \rangle = \sum_{\alpha} E_{\alpha} |\langle \Psi_{\alpha} | \tilde{\Psi} \rangle|^2 \quad (2.12)$$

Ya que además  $E_{\alpha} \geq E_0$  para todo  $\alpha$ ,

$$\langle \tilde{\Psi} | H | \tilde{\Psi} \rangle \geq \sum_{\alpha} E_0 |\langle \Psi_{\alpha} | \tilde{\Psi} \rangle|^2 = E_0 \sum_{\alpha} |\langle \Psi_{\alpha} | \tilde{\Psi} \rangle|^2 \quad (2.13)$$

Por otra parte, dada la condición de ortonormalidad, y recurriendo nuevamente a las expansiones (2.8) y (2.9):

$$\begin{aligned} \langle \tilde{\Psi} | \tilde{\Psi} \rangle = 1 &= \sum_{\alpha\beta} \langle \tilde{\Psi} | \Psi_{\alpha} \rangle \langle \Psi_{\alpha} | \Psi_{\beta} \rangle \langle \Psi_{\beta} | \tilde{\Psi} \rangle = \sum_{\alpha\beta} \langle \tilde{\Psi} | \Psi_{\alpha} \rangle \delta_{\alpha\beta} \langle \Psi_{\beta} | \tilde{\Psi} \rangle \\ &= \sum_{\alpha} \langle \tilde{\Psi} | \Psi_{\alpha} \rangle \langle \Psi_{\alpha} | \tilde{\Psi} \rangle = \sum_{\alpha} |\langle \Psi_{\alpha} | \tilde{\Psi} \rangle|^2 \end{aligned} \quad (2.14)$$

Al insertar este resultado en (2.13) se recupera la desigualdad (2.11), es decir, se demuestra el teorema variacional.

La aplicación del principio variacional al problema electrónico es evidente: se trata de hallar la función que minimice la energía del sistema,  $\langle \tilde{\Psi} | H | \tilde{\Psi} \rangle$ . En la práctica, para facilitar el tratamiento algebraico, la función de onda se expresa como una combinación lineal,

$$|\tilde{\Psi}\rangle = \sum_{i=1}^N c_i |\phi_i\rangle \quad (2.15)$$

siendo  $\{|\phi_i\rangle\}$  un conjunto prestablecido de  $N$  funciones de base, en general reales y ortogonales. De esta forma, el objetivo se traslada a hallar los coeficientes  $c_i$  que minimizan el valor esperado de la energía a través de la expansión (2.15).

$$\langle \tilde{\Psi} | H | \tilde{\Psi} \rangle = \sum_{ij} c_i \langle \phi_i | H | \phi_j \rangle c_j = \sum_{ij} c_i c_j H_{ij} \quad (2.16)$$

donde definimos  $H_{ij} = \langle \phi_i | H | \phi_j \rangle$ , los elementos de matriz del Hamiltoniano en la base  $\{|\phi_i\rangle\}$ . Puesto que  $|\tilde{\Psi}\rangle$  está normalizada, los coeficientes se encuentran vinculados de la siguiente manera:

$$\langle \tilde{\Psi} | \tilde{\Psi} \rangle = \sum_{ij} c_i c_j \langle \phi_i | \phi_j \rangle = \sum_i c_i^2 = 1 \quad (2.17)$$

A fin de minimizar la energía observando la restricción que surge de (2.17), se utiliza el método de los multiplicadores indeterminados de Lagrange [19]. Para ello se construye una función  $L$  agregando el término  $E(\langle \tilde{\Psi} | \tilde{\Psi} \rangle - 1)$  a la expresión original, lo cual es equivalente a añadir cero, según (2.17), y por lo tanto el mínimo de  $L$  y el de  $\langle \tilde{\Psi} | H | \tilde{\Psi} \rangle$  corresponderán a los mismos valores de  $c_i$ . Este procedimiento introduce un nuevo grado de libertad a través del multiplicador  $E$ , permitiendo obtener los coeficientes  $c_i$  óptimos cual si fuesen independientes.

$$\frac{\partial L}{\partial c_k} = 0 = \sum_j c_j H_{kj} + \sum_i c_i H_{ik} - 2E c_k \quad (2.18)$$

Como el Hamiltoniano es hermítico y las funciones de base reales, la matriz  $\mathbf{H}$  es simétrica. Luego la ecuación anterior se puede escribir

$$\sum_j H_{ij} c_j - E c_i = 0 \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (2.19)$$

o bien, en notación matricial,

$$\mathbf{Hc} = E\mathbf{c} \quad (2.20)$$

donde  $\mathbf{c}$  representa un vector con elementos  $c_i$ . La ecuación (2.20) es un problema de valores propios que tiene por solución un conjunto de  $N$  autovalores  $\mathbf{c}^\alpha$  con sus correspondientes autovalores  $E_\alpha$ . Introduciendo la matriz diagonal de los autovalores  $\mathbf{E}$ , y definiendo las columnas de la matriz  $\mathbf{C}$  a

partir de los  $N$  autovectores  $\mathbf{c}^\alpha$ , el problema se condensa en la siguiente relación:

$$\mathbf{HC} = \mathbf{CE} \quad (2.21)$$

La resolución de (2.21) conduce a  $N$  autofunciones,

$$|\tilde{\Psi}_\alpha\rangle = \sum_{i=1}^N C_{i\alpha} |\phi_i\rangle \quad \alpha = 0, 1, \dots, N-1 \quad (2.22)$$

cada una de las cuales tendrá asociado el autovalor  $E_\alpha$ . Puesto que los autovectores  $\mathbf{c}^\alpha$  son ortonormales, es posible demostrar que dichos  $E_\alpha$  corresponden al valor esperado del Hamiltoniano de la respectiva autofunción  $|\tilde{\Psi}_\alpha\rangle$ :

$$\begin{aligned} \langle \tilde{\Psi}_\beta | H | \tilde{\Psi}_\alpha \rangle &= \sum_{ij} C_{i\beta} \langle \Phi_i | H | \Phi_j \rangle C_{j\alpha} = \sum_{ij} C_{i\beta} H_{ij} C_{j\alpha} \\ &= (\mathbf{c}^\beta) \mathbf{H} \mathbf{c}^\alpha = E_\alpha (\mathbf{c}^\beta) \mathbf{c}^\alpha = E_\alpha \delta_{\alpha\beta} \end{aligned} \quad (2.23)$$

y del mismo modo en que el autovalor más bajo es una cota superior de la energía del estado fundamental, puede mostrarse que el resto de los  $E_\alpha$  acotan la energía de los distintos estados excitados.

En esta forma, el método variacional lineal permite, mediante la diagonalización de la matriz  $\mathbf{H}$ , obtener  $N$  soluciones para la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo. La función de onda del estado fundamental electrónico,  $|\tilde{\Psi}_0\rangle$ , es, pues, la autofunción correspondiente al autovalor más bajo.

## 2.2 La aproximación de Hartree-Fock

Poco después de la aparición de la teoría cuántica comenzaron a desarrollarse aproximaciones que pretendían resolver la ecuación de Schrödinger para un sistema de electrones y núcleos. A pesar de que el método de Hartree-Fock se remonta a este período temprano de la química cuántica, su importancia ha trascendido hasta hoy. Pues además de prevalecer entre las técnicas de estructura electrónica de uso frecuente, constituye el punto de partida para diversos procedimientos más exactos y sofisticados. En esencia, se trata de aplicar

el principio variacional a un sistema descrito por un Hamiltoniano como el que se propone en (2.4), utilizando la aproximación de Born-Oppenheimer, y postulando la función de onda electrónica en términos de un determinante de Slater.

En primer lugar se define el operador  $\hat{H}_{el}$ , el Hamiltoniano electrónico compuesto por el primero, el tercero y el cuarto término de la expresión (2.4).

$$\hat{H}_{el} = - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (2.24)$$

Si la función de onda  $\Psi$  se representa mediante un determinante de Slater compuesto por los orbitales  $\chi_i$  como en (2.6), entonces la energía electrónica resulta

$$E = \langle \Psi | \hat{H}_{el} | \Psi \rangle = \sum_{i=1}^N H_{ii}^{core} + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N (J_{ij} - K_{ij}) \quad (2.25)$$

donde hemos introducido las integrales de Coulomb,  $J_{ij}$ , y de intercambio,  $K_{ij}$ , dependientes de las coordenadas de dos electrones, y el término  $H_{ii}^{core}$ , proveniente de la integración sobre las coordenadas de un electrón. Considerando orbitales reales,

$$J_{ij} \equiv \langle \chi_i(1) \chi_j(2) | r_{12}^{-1} | \chi_i(1) \chi_j(2) \rangle \quad (2.26)$$

$$K_{ij} \equiv \langle \chi_i(1) \chi_j(2) | r_{12}^{-1} | \chi_j(1) \chi_i(2) \rangle \quad (2.27)$$

$$H_{ii}^{core} \equiv -\frac{1}{2} \langle \chi_i(1) | \nabla_1^2 | \chi_i(1) \rangle - \langle \chi_i(1) | \sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{r_{1\alpha}} | \chi_i(1) \rangle \quad (2.28)$$

Mientras que  $H_{ii}^{core}$  representa la energía cinética del electrón  $i$  y su interacción con los núcleos, la integral de Coulomb se identifica con la repulsión entre electrones. La integral de intercambio, por su parte, es consecuencia de la antisimetrización de la función de onda y no encuentra analogía en el marco de la mecánica clásica. Sin embargo por lo general su contribución a la energía electrónica total está lejos de ser despreciable.

De acuerdo al teorema variacional, la función de onda del sistema será la que provenga de los espín-orbitales  $\chi_i$  que lleven al mínimo el valor de la energía. Si se minimiza la expresión (2.25) conservando la condición de

ortonormalidad de los  $\chi_i$ , es posible derivar una serie de relaciones integro-diferenciales para los espín-orbitales óptimos. Estas relaciones se conocen como las ecuaciones de Hartree-Fock [19], cuya forma abreviada es

$$\hat{F}(1)|\chi_i(1)\rangle = \sum_{j=1}^N \varepsilon_{ji} |\chi_j(1)\rangle \quad (2.29)$$

donde los  $\varepsilon_{ji}$  son los multiplicadores indeterminados de Lagrange asociados a los  $N$  espín-orbitales  $\chi_i$ , denominados también orbitales moleculares de Hartree-Fock, y  $\hat{F}$  es el operador de Fock, que puede escribirse a su vez como la combinación de tres operadores distintos,

$$\hat{F}(1) = \hat{H}^{core}(1) + \sum_{j=1}^N [\hat{J}_j(1) - \hat{K}_j(1)] \quad (2.30)$$

estando cada uno de los tres definido según su acción sobre el orbital  $\chi_i$ :

$$\hat{H}^{core}(1)\chi_i(1) \equiv -\frac{1}{2}\nabla_1^2\chi_i(1) - \sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{r_{1\alpha}}\chi_i(1) \quad (2.31)$$

$$\hat{J}_j(1)\chi_i(1) \equiv \left[ \int d\mathbf{x}_2 \chi_j^*(2)\mathbf{r}_{12}^{-1}\chi_j(2) \right] \chi_i(1) \quad (2.32)$$

$$\hat{K}_j(1)\chi_i(1) \equiv \left[ \int d\mathbf{x}_2 \chi_j^*(2)\mathbf{r}_{12}^{-1}\chi_i(2) \right] \chi_j(1) \quad (2.33)$$

El primero,  $\hat{H}^{core}$ , opera sobre las coordenadas de un electrón. En cambio,  $\hat{J}_j$  y  $\hat{K}_j$ , designados respectivamente como los operadores de Coulomb y de intercambio, involucran integraciones sobre las coordenadas de dos electrones. En particular, el operador de intercambio se diferencia del de Coulomb porque aquel depende del valor de  $\chi_i$  en todo el espacio; se trata de un operador no local, es decir, no puede representarse en forma de un potencial unívocamente definido en cada punto del espacio, lo cual sí es posible para  $\hat{J}_j$ , que es de hecho un operador local. El operador de Coulomb evalúa la repulsión entre pares asumiendo que sobre cada electrón  $i$  obra un potencial efectivo —o promediado— debido al electrón  $j$ .

Mediante una transformación unitaria de los  $\chi_i$  en  $\chi'_i$  es posible diagonalizar la matriz de los multiplicadores de Lagrange en (2.29) sin alterar el valor absoluto del determinante de Slater.  $\hat{F}$  es asimismo invariante a tal transformación, con lo cual las ecuaciones de Hartree-Fock se reducen a su forma

canónica:

$$\hat{F}(1)|\chi'_i(1)\rangle = \varepsilon'_i|\chi'_i(1)\rangle \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (2.34)$$

Las autofunciones  $\chi'_i$  son los espín-orbitales canónicos, cuyas energías están dadas por los autovalores  $\varepsilon'_i$ . En lo sucesivo se denotará  $\chi_i$  a los orbitales canónicos y  $\varepsilon_i$  a los componentes de la matriz diagonal.

En este punto, disponemos de las ecuaciones que deben satisfacer los espín-orbitales que determinarán la función de onda. No obstante, consisten en una serie de ecuaciones de valores propios en las que el operador  $\hat{F}$  depende de sus mismas autofunciones, de las que por otra parte no se conoce siquiera su forma funcional. La resolución analítica de este sistema es en principio inabordable sin recurrir a alguna clase de aproximación. Así, para hallar los orbitales a partir de las ecuaciones de Hartree-Fock resulta conveniente expandir los  $\chi_i$  en una base finita, tal que

$$|\chi_i\rangle = \sum_{\mu=1}^M C_{\mu i}|\phi_\mu\rangle \quad (2.35)$$

con lo cual el problema se reduce a encontrar el valor de los coeficientes  $C_{\mu i}$ . Un número  $M$  suficientemente grande de funciones de base  $\phi_\mu$  permitirá una representación satisfactoria de los orbitales moleculares. La substitución de la expansión (2.35) en las ecuaciones de Hartree-Fock conlleva a la igualdad

$$\sum_{\mu=1}^M C_{\mu i}\hat{F}|\phi_\mu\rangle = \varepsilon_i \sum_{\mu=1}^M C_{\mu i}|\phi_\mu\rangle \quad (2.36)$$

Aplicando  $\langle\phi_\nu|$  sobre ambos miembros, se obtiene un sistema de  $M$  ecuaciones lineales homogéneas

$$\sum_{\mu=1}^M C_{\mu i}(\langle\phi_\nu|\hat{F}|\phi_\mu\rangle - \varepsilon_i\langle\phi_\nu|\phi_\mu\rangle) = 0 \quad \mu = 1, 2, \dots, M \quad (2.37)$$

que reciben el nombre de ecuaciones de Roothaan y constituyen la puerta de acceso a los coeficientes orbitales. Si se definen los elementos de matriz de  $\mathbf{F}$ ,  $F_{\nu\mu} \equiv \langle\phi_\nu|\hat{F}|\phi_\mu\rangle$ , y de  $\mathbf{S}$ ,  $S_{\nu\mu} \equiv \langle\phi_\nu|\phi_\mu\rangle$ , las ecuaciones de Roothaan pueden formularse

$$\mathbf{FC} = \mathbf{SC}\varepsilon \quad (2.38)$$

siendo  $\mathbf{C}$  la matriz formada por los coeficientes  $C_{\mu i}$ , y  $\boldsymbol{\varepsilon}$  la matriz diagonal que contiene los  $M$  autovalores  $\varepsilon_i$ , los cuales pueden hallarse a través de la ecuación secular

$$\det(\mathbf{F} - \boldsymbol{\varepsilon}\mathbf{S}) = 0 \quad (2.39)$$

La diagonalización de (2.38) proporciona los coeficientes necesarios para construir los orbitales moleculares y calcular la energía. Empero, la matriz de Fock depende de tales coeficientes, como puede verse al escribir explícitamente sus elementos

$$\begin{aligned} F_{\nu\mu} = & \langle \phi_\nu(1) | \frac{1}{2} \nabla_1^2 | \phi_\mu(1) \rangle - \sum_\alpha \langle \phi_\nu(1) | \frac{Z}{r_{1\alpha}} | \phi_\mu(1) \rangle \\ & + \sum_a^N \sum_\lambda^M \sum_\sigma^M C_{\lambda a} C_{\sigma a} \left[ \langle \phi_\nu(1) \phi_\mu(1) | r_{12}^{-1} | \phi_\sigma(2) \phi_\lambda(2) \rangle \right. \\ & \left. - \langle \phi_\nu(1) \phi_\lambda(1) | r_{12}^{-1} | \phi_\sigma(2) \phi_\mu(2) \rangle \right] \end{aligned} \quad (2.40)$$

y por ello el sistema ha de resolverse de manera iterativa. En la práctica, para llevar a cabo un cálculo de Hartree-Fock, se propone inicialmente una matriz  $\mathbf{C}$  tentativa a partir de la cual se evalúa  $\mathbf{F}$ . Diagonalizando (2.38) se recupera un nuevo conjunto de  $C_{\mu i}$ , que se utiliza para volver a computar  $\mathbf{F}$ . Sólo es preciso recalcular el último término de la derecha en (2.40), puesto que la parte restante de  $F_{\nu\mu}$ , al igual que los elementos de  $\mathbf{S}$ , dependen únicamente de las funciones de base y no se modifican en cada iteración. El procedimiento se repite hasta que la matriz  $\mathbf{C}$  no difiera significativamente de la obtenida en el paso precedente, es decir, hasta alcanzar autoconsistencia. Las integrales de dos electrones que aparecen en (2.40) representan la parte más demandante del cálculo Hartree-Fock, no ya por la dificultad que ofrece su resolución —si se usan funciones de base Gaussianas la integración es de hecho analítica—, sino por el enorme número que comportan.

La calidad de la energía y de la función de onda obtenidas por el método de Hartree-Fock estarán en consonancia con el tamaño y con la capacidad de la base para representar adecuadamente los estados electrónicos. Cuanto más completo es el conjunto  $\{|\phi_i\rangle\}$ , tanto mayor es la flexibilidad para expandir los orbitales moleculares y menor el valor de  $\langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle$ . Sin embargo, al evaluar la repulsión entre los electrones a partir de un potencial de campo



medio, la aproximación de Hartree-Fock ignora la correlación procedente de sus posiciones instantáneas. En efecto, puede pensarse en una región de exclusión alrededor de cada electrón, la cual es omitida en la aproximación de campo medio que por eso sobrestima la energía total. Por tal motivo, aun en el hipotético caso en que se usara una base completa, la energía de Hartree Fock siempre resultaría superior a la exacta en una cantidad que se denomina precisamente energía de correlación.

$$E_{corr} \equiv E_0 - E_{HF} \quad (2.41)$$

$E_0$  representa la energía no relativista correspondiente al Hamiltoniano exacto dentro de la aproximación de Born-Oppenheimer, en tanto  $E_{HF}$  indica el límite de Hartree-Fock. Existen diversos caminos para introducir la correlación en la función de onda. Uno de ellos consiste en expresar esta como combinación de múltiples determinantes de Slater provenientes de varias configuraciones electrónicas asociadas a estados excitados, en lugar de un único determinante formado por los espín-orbitales del estado fundamental. Tal es la base del método de interacción de configuraciones (CI), cuyo costo computacional es naturalmente muy superior al de Hartree-Fock. Entre las otras alternativas posibles para incorporar la energía de correlación, se cuentan la teoría de perturbaciones de Møller Plesset y el método de los funcionales de la densidad. Sobre ambos nos extenderemos en mayor o menor medida a lo largo de las secciones siguientes.

## 2.3 Los tratamientos semiempíricos

El número mínimo de funciones de base involucrado en la representación de la función de onda mediante un cálculo de estructura electrónica está en relación con la cantidad de átomos que componen el sistema. Típicamente, una molécula con una decena de átomos requiere cuanto menos unas cien funciones de base, lo cual supone la diagonalización de una matriz de Fock de  $100 \times 100$ , mientras que el número de integrales de dos electrones asciende al orden de  $10^7$ . Estas consideraciones ponen en evidencia la magnitud del esfuerzo de cómputo asociado a todo tratamiento *ab initio*. A fin de reducir

esta dificultad, a partir de los años 30 fueron propuestas una serie de aproximaciones que apuntaban a simplificar el Hamiltoniano o la forma de evaluar los términos de la matriz de Fock. Ciertos elementos de matriz fueron definidos de manera de ajustar valores experimentales, y por esa razón recibieron el nombre de modelos semiempíricos.

La etapa más intensiva de un cálculo autoconsistente está determinada por las integrales de dos electrones, y por eso constituyen el blanco principal de los métodos semiempíricos. Un modo de disminuir su número es considerar explícitamente tan sólo las integrales relacionadas con los electrones de valencia, responsables de los enlaces y del comportamiento químico, y asumir que la configuración de los electrones internos se conserva inalterada en los distintos entornos del átomo. Otra característica común a los tratamientos semiempíricos consiste en despreciar el solapamiento diferencial entre funciones de base distintas o bien correspondientes a diferentes átomos, tal que  $\phi_\nu \phi_\mu d\mathbf{r} = 0$ . Esta suposición vuelve nulas todas las integrales de tres y cuatro centros, simplificando considerablemente las ecuaciones de Roothaan, y propicia la distinción entre tres tipos de elementos de matriz  $F_{\nu\mu}$ : los diagonales, los correspondientes a funciones de base  $\phi_\nu$  y  $\phi_\mu$  centradas sobre el mismo átomo, y finalmente los asociados a funciones de base pertenecientes a átomos diferentes [20]. Tal clasificación es un primer paso hacia la aproximación —o la supresión— racional de los elementos de  $\mathbf{F}$ . Un recurso adicional es la utilización de funciones de base ortonormales, condición que se impone incluso entre  $\phi_\nu$  localizadas en distintos átomos, de modo de reducir  $\mathbf{S}$  a la matriz identidad, con lo que las ecuaciones de Roothaan adquieren la forma

$$\mathbf{FC} = \epsilon \mathbf{C} \quad (2.42)$$

Los modelos AM1 y PM3 se encuentran posiblemente entre las técnicas semiempíricas de aplicación general más utilizadas en la actualidad. Ambas son derivaciones del modelo más antiguo MNDO (Modified Neglect of Diatomic Overlap), que emplea el solapamiento diferencial nulo entre funciones de base centradas sobre átomos distintos. Los dos métodos revisten en esencia las mismas aproximaciones: la diferencia entre ellos concierne la parametrización.

Las siglas SAM1 (Semi Ab initio Model 1) [21] designan un desarrollo más reciente basado en el modelo AM1, que se distingue de este y del método PM3 por la evaluación explícita de las integrales de dos electrones, las cuales son aproximadas en aquellos por expansiones multipolares parametrizadas. Esta modificación facilita en SAM1 la incorporación de elementos pesados con electrones  $d$ , en contraste con la dificultad que representa su parametrización en los métodos más primitivos. En efecto, la disponibilidad de desarrollos semiempíricos preparados para el tratamiento de sistemas con metales de transición es acotada. Las innovaciones introducidas en el modelo SAM1 incrementan los costos computacionales respecto a su predecesor, pero por otra parte se ven justificadas en el avance a nivel de hardware que se ha verificado desde la formulación del método AM1.

## 2.4 El método de perturbaciones de Møller Plesset

La teoría perturbativa proporciona una forma de hallar la energía y la función de onda asociada a cierto Hamiltoniano  $\hat{H}$ , conociendo la solución de la ecuación de Schrödinger para un Hamiltoniano similar  $\hat{H}^\circ$ . La idea subyacente presume que si  $\hat{H}$  difiere sólo ligeramente de  $\hat{H}^\circ$ , cabe esperar que  $E$  y  $\Psi$  no se aparten sensiblemente de  $E^\circ$  y  $\Psi^\circ$ , al punto que aquellas puedan representarse mediante una expansión de Taylor en función de estas [14]. Más específicamente, si definimos la perturbación  $\hat{H}' \equiv \hat{H} - \hat{H}^\circ$ , e introducimos el factor  $\lambda=1$ , entonces podemos escribir

$$\hat{H} = \hat{H}^\circ + \lambda\hat{H}' \quad (2.43)$$

$$\hat{H}\Psi_n = (\hat{H}^\circ + \lambda\hat{H}')\Psi_n = E_n\Psi_n \quad (2.44)$$

donde  $n$  refiere el nivel. En este contexto, es posible considerar a  $\Psi_n$  y a  $E_n$  como funciones de  $\lambda$ , tal que  $\Psi_n|_{\lambda=0} = \Psi_n^\circ$ , y  $E_n|_{\lambda=0} = E_n^\circ$ . Luego, es lícito expandirlas en series de Taylor:

$$\Psi_n = \Psi_n|_{\lambda=0} + \frac{\partial\Psi_n}{\partial\lambda}|_{\lambda=0} \lambda + \frac{\partial^2\Psi_n}{\partial\lambda^2}|_{\lambda=0} \frac{\lambda^2}{2!} + \dots \quad (2.45)$$

$$E_n = E_n|_{\lambda=0} + \frac{dE_n}{d\lambda}|_{\lambda=0} \lambda + \frac{d^2 E_n}{d\lambda^2}|_{\lambda=0} \frac{\lambda^2}{2!} + \dots \quad (2.46)$$

El problema se resume a encontrar los coeficientes de la expansión. Si la perturbación es pequeña, entonces bastará tomar los primeros términos de la serie para conseguir una aproximación razonable. Definiendo la condición de normalización intermedia  $\langle \Psi_n^\circ | \Psi_n \rangle = 1$ , es posible derivar las expresiones de los coeficientes que aparecen en la serie de Taylor. Para el caso de la energía, la expansión a segundo orden resulta

$$E_n \approx E_n^\circ + \langle \Psi_n^\circ | \hat{H}' | \Psi_n^\circ \rangle + \sum_{m \neq n} \frac{|\langle \Psi_m^\circ | \hat{H}' | \Psi_n^\circ \rangle|^2}{E_n^\circ - E_m^\circ} \quad (2.47)$$

El segundo y el tercer término de la derecha corresponden a las correcciones a orden uno y a orden dos respectivamente. Correcciones a órdenes superiores conducen a expresiones de complejidad cada vez mayor.

Møller y Plesset propusieron la aplicación de la teoría perturbativa a los sistemas atómicos y moleculares, empleando para ello las soluciones provenientes del cálculo Hartree-Fock. El método denominado MP2, uno de los más utilizados en química cuántica a la hora de incluir la correlación electrónica, consiste precisamente en obtener las correcciones a segundo orden de la función de onda y la energía de Hartree-Fock. En el marco del tratamiento MP2,  $\hat{H}^\circ$  es la suma de los operadores de Fock, y la perturbación se convierte en la diferencia entre el Hamiltoniano electrónico verdadero y  $\hat{H}^\circ$ .

$$\hat{H}' = \hat{H} - \hat{H}^\circ = \sum_l \sum_{m>l} \frac{1}{r_{lm}} - \sum_{m=1}^N \sum_{j=1}^N [\hat{J}_j(m) - \hat{K}_j(m)] \quad (2.48)$$

La inserción de  $\hat{H}'$  en la ecuación (2.47) proporciona la expresión de la energía de Hartree-Fock corregida a segundo orden. La sumatoria en (2.47), sin embargo, abarca todas las soluciones posibles asociadas a  $\hat{H}^\circ$ , que en este caso consisten en los diferentes determinantes de Slater contruídos a partir de los  $N$  espín-orbitales  $\chi_i$ . Los  $\chi_i$  son autofunciones de  $\hat{F}$  con autovalores  $\varepsilon_i$ , mientras que los determinantes  $\Psi_m^\circ$  son autofunciones de  $\hat{H}^\circ$  cuyos autovalores son la sumatoria de los  $\varepsilon_i$  correspondientes a los espín orbitales de los que tales determinantes están compuestos. Si consideramos el nivel fundamental,  $\Psi_n^\circ$  es  $\Psi_0^\circ$ , el determinante de Slater integrado por los  $N$  espín-orbitales

ocupados. El resto de los  $\Psi_m^\circ$  está formado por las posibles combinaciones que incluyan uno o más espín-orbitales desocupados (o virtuales). Puede demostrarse [19] que todos los elementos de matriz  $\langle \Psi_m^\circ | \hat{H}' | \Psi_0^\circ \rangle$  son iguales a cero, salvo aquellos en los que  $\Psi_m^\circ$  y  $\Psi_0^\circ$  difieran exactamente en dos de los  $\chi_i$ . Dicho de otro modo, sólo serán distintos de cero aquellos elementos en los que el determinante  $\Psi_m^\circ$  contenga dos orbitales virtuales. Tales  $\Psi_m^\circ$  se conocen como determinantes doblemente excitados, y son autofunciones de  $\hat{H}^\circ$  con autovalores  $E_m$  que difieren de  $E_0$  a causa de los  $\varepsilon_i$  asociados a los  $\chi_i$  virtuales. Más claramente, si  $\Psi_m^\circ$  se construye sustituyendo en  $\Psi_0^\circ$  los espín orbitales  $\chi_i$  y  $\chi_j$  por  $\chi_a$  y  $\chi_b$  (donde  $i$  y  $j$  denotan orbitales ocupados, y  $a$  y  $b$  orbitales desocupados), entonces  $E_0 - E_m = \varepsilon_i + \varepsilon_j - \varepsilon_a - \varepsilon_b$ . Estas propiedades permiten reescribir (2.47) para obtener la corrección a orden dos ( $E_0^{(2)}$ ) en función de los espín-orbitales.

$$E_0^{(2)} = \sum_{b=a+1} \sum_{a=N+1} \sum_{i=j+1}^N \sum_{j=1}^{N-1} \frac{|\langle ab | r_{12}^{-1} | ij \rangle - \langle ab | r_{12}^{-1} | ji \rangle|^2}{\varepsilon_i + \varepsilon_j - \varepsilon_a - \varepsilon_b} \quad (2.49)$$

donde

$$\langle ab | r_{12}^{-1} | ij \rangle = \int \int \chi_a(1) \chi_b(2) r_{12}^{-1} \chi_i(1) \chi_j(2) dx_1 dx_2 \quad (2.50)$$

Puede mostrarse fácilmente que la suma de los dos primeros términos del desarrollo de Taylor,  $E_0^\circ$  y  $E_0^{(1)}$ , es igual a la energía de Hartree Fock:

$$\begin{aligned} E_0^\circ + E_0^{(1)} &= \langle \Psi_0^\circ | \hat{H}^\circ | \Psi_0^\circ \rangle + \langle \Psi_0^\circ | \hat{H}' | \Psi_0^\circ \rangle \\ &= \langle \Psi_0^\circ | \hat{H}^\circ + \hat{H}' | \Psi_0^\circ \rangle = \langle \Psi_0^\circ | \hat{H} | \Psi_0^\circ \rangle = E_{HF} \end{aligned} \quad (2.51)$$

y por consiguiente la energía MP2 resulta

$$E_{MP2} = E_{HF} + E_0^{(2)} \quad (2.52)$$

En el tratamiento perturbativo, pues, al igual que en el método CI, se realiza una suma sobre diferentes estados asociados a determinantes excitados. Esto es consecuencia de que las expansiones requieran un conjunto completo de funciones, que se consigue combinando las soluciones linealmente independientes de la ecuación de Schrödinger. Pero la inclusión de estados excitados es causa de que el costo computacional exceda sensiblemente al correspondiente a Hartree-Fock. Aun así, los cálculos MP2 son notablemente más veloces que los CI.

Existen implementaciones que incorporan correcciones a ordenes más elevados, lo cual extrema desmesuradamente los requerimientos de cálculo. MP4, el método perturbativo más usual después de MP2, involucra sumatorias sobre determinantes simple, doble, triple, y cuádruplemente excitados.

## 2.5 Teoría de los funcionales de la densidad: $\rho$ versus $\Psi$

Una aproximación mecanocuántica sustentada en la densidad electrónica resulta acaso más atrayente que la formulación basada en la función de onda, porque comporta una concepción más física del problema. Los precedentes en tal sentido son contemporáneos al método de Hartree-Fock: el modelo de Thomas-Fermi [22] data de finales de los treinta, aunque por sus inexactitudes en el cálculo de átomos y moléculas nunca alcanzó la repercusión que obtuvo aquel. Así la idea original de Thomas y Fermi permaneció subyacente a lo largo de décadas, sin recibir aportes relevantes. Salvo quizá por el desarrollo de Slater conocido como el método  $X\alpha$ , que encontró aplicación en el área de la física del estado sólido. Pero la contribución verdaderamente significativa no se materializó hasta los años 60, cuando Hohenberg y Kohn propusieron dos teoremas que hicieron posible reformular de un modo riguroso el problema electrónico en función de la densidad de carga, adjudicando a esta variable el protagonismo que antes recaía en la función de onda. La sustitución de la variable  $\Psi$ , dependiente de las coordenadas de  $N$  electrones, por la densidad, función exclusiva de la posición, propicia una forma particular de abordar el cálculo de átomos y moléculas. El formalismo que surge alrededor de esta nueva perspectiva es la teoría de los funcionales de la densidad, designada comunmente con las siglas DFT (Density Functional Theory).

El primero de los teoremas de Hohenberg y Kohn [22] establece que la función de onda —y por lo tanto la energía y cualquiera de las propiedades electrónicas— se halla unívocamente determinada por la densidad  $\rho(x, y, z)$ . Antes de ir más adelante, conviene notar que es el Hamiltoniano del sistema,

o más precisamente, el potencial externo  $v(\mathbf{r})$ , quien prescribe junto con el número de electrones, a través de la ecuación de Schrödinger, la función de onda y los niveles de energía accesibles. Hohenberg y Kohn probaron que  $v(\mathbf{r})$  queda a su vez definido al especificar la densidad electrónica, de donde se sigue que existe una relación <sup>biv</sup>única entre  $\rho_0$  y  $\Psi_0$ , y consiguientemente la energía puede considerarse un funcional de la densidad,  $E_0 = E_0[\rho_0]$ .

La reciprocidad entre  $v(\mathbf{r})$  y  $\rho_0$  puede demostrarse por el absurdo [22]. Para ello baste suponer que dos potenciales distintos  $v(\mathbf{r})$  y  $v'(\mathbf{r})$  producen la misma densidad en el estado fundamental,  $\rho_0$ . En ese caso existirían dos Hamiltonianos  $\hat{H}$  y  $\hat{H}'$ , provenientes de  $v(\mathbf{r})$  y  $v'(\mathbf{r})$  y asociados a sendas soluciones  $\Psi$  y  $\Psi'$ , a las cuales correspondería idéntica densidad. Es decir,  $\int \cdots \int |\Psi|^2 d\mathbf{r}_2 \cdots d\mathbf{r}_N = \int \cdots \int |\Psi'|^2 d\mathbf{r}_2 \cdots d\mathbf{r}_N = \rho_0(\mathbf{r})$ . Ahora bien, de acuerdo al principio variacional,

$$E_0 < \langle \Psi' | \hat{H} | \Psi' \rangle = \langle \Psi' | \hat{H}' | \Psi' \rangle + \langle \Psi' | \hat{H} - \hat{H}' | \Psi' \rangle \quad (2.53)$$

Puesto que  $\hat{H}$  y  $\hat{H}'$  sólo difieren debido a  $v(\mathbf{r})$  y  $v'(\mathbf{r})$ , entonces:

$$\begin{aligned} \langle \Psi' | \hat{H} - \hat{H}' | \Psi' \rangle &= \langle \Psi' | \sum_{i=1}^N v(\mathbf{r}_i) - \sum_{i=1}^N v'(\mathbf{r}_i) | \Psi' \rangle \\ &= \int \sum_{i=1}^N [v(\mathbf{r}_i) - v'(\mathbf{r}_i)] |\Psi'|^2 d\mathbf{r}_i = \int N[v(\mathbf{r}) - v'(\mathbf{r})] |\Psi'|^2 d\mathbf{r} \\ &= \int [v(\mathbf{r}) - v'(\mathbf{r})] \rho_0(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \end{aligned} \quad (2.54)$$

Sustituyendo este resultado en (2.53),

$$E_0 < E'_0 + \int [v(\mathbf{r}) - v'(\mathbf{r})] \rho_0(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (2.55)$$

Si en (2.53) se emplea  $\Psi$  en lugar de  $\Psi'$  como función de prueba para el Hamiltoniano  $\hat{H}'$ , se obtiene análogamente

$$E'_0 < E_0 + \int [v'(\mathbf{r}) - v(\mathbf{r})] \rho_0(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (2.56)$$

Combinando (2.55) y (2.56) surge la desigualdad

$$E_0 + E'_0 < E'_0 + E_0 \quad (2.57)$$

de lo cual se desprende que la hipótesis de dos potenciales distintos vinculados a la misma densidad electrónica en el estado fundamental es incorrecta.

Resulta claro, pues, que  $\rho$  determina la función de onda y todas las propiedades asociadas a esta, por ejemplo las diferentes contribuciones a la energía total.

$$E[\rho] = T[\rho] + V_{ee}[\rho] + V_{ne}[\rho] \quad (2.58)$$

$T$  denota la energía cinética y  $V_{ee}$  la energía potencial procedente de la repulsión interelectrónica. El término  $V_{ne}$  representa la interacción entre núcleos y electrones, cuya forma funcional respecto a la densidad es:

$$\begin{aligned} V_{ne} &= \langle \Psi | \sum_{i\alpha} \frac{Z_\alpha}{r_{i\alpha}} | \Psi \rangle = \int \sum_i v(\mathbf{r}_i) |\Psi|^2 d\mathbf{r}_i \\ &= \int N v(\mathbf{r}) |\Psi|^2 d\mathbf{r} = \int v(\mathbf{r}) \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \end{aligned} \quad (2.59)$$

El segundo aporte fundamental a la teoría de los funcionales de la densidad se conoce como el teorema variacional de Hohenberg y Kohn. En él se postula que para cualquier  $\rho'$  tal que  $\int \rho'(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = N$  y  $\rho'(\mathbf{r}) \geq 0$  en todo el espacio, entonces  $E[\rho'] \geq E_0$ . La igualdad se verifica si  $\rho'$  es la densidad del estado fundamental, lo que equivale a decir que  $\rho_0$  minimiza el funcional de la energía  $E[\rho]$  de forma semejante a como  $\Psi_0$  vuelve mínima la integral  $\langle \Psi | H | \Psi \rangle$ . Si se considera la conexión unívoca entre  $\rho$  y  $\Psi$ , entonces el teorema de Hohenberg y Kohn se concluye directamente del principio variacional. Supóngase cierta  $\rho'$  asociada al operador Hamiltoniano  $\hat{H}' = \hat{T} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{ne}$ .

$$\begin{aligned} \langle \Psi' | \hat{H}' | \Psi' \rangle &= \langle \Psi' | \hat{T} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{ne} | \Psi' \rangle \\ &= T[\rho'] + V_{ee}[\rho'] + \int v(\mathbf{r}) \rho'(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = E[\rho'] \geq E_0 \end{aligned} \quad (2.60)$$

Al sustituir  $\Psi'$  por  $\Psi$  se comprueba que la igualdad ocurre si  $\rho' = \rho_0$ .

La teoría examinada hasta aquí vincula la energía y la densidad electrónica, sin embargo no prevé la manera de calcular una u otra. En el año 1965 Walter Kohn y Lu Sham introdujeron una aproximación para la forma funcional de la energía cinética  $T[\rho]$ , a través de la cual es posible evaluar la densidad y obtener la energía total [16]. Este procedimiento, referido como el método



Kohn-Sham, transmutó la teoría de los funcionales de la densidad en una herramienta de cálculo de estructura electrónica.

La aproximación de Kohn y Sham considera un sistema de referencia ficticio compuesto por electrones que no interactúan entre sí (indicado mediante el subíndice  $s$ ), y cuya densidad  $\rho_s$  es igual a la del sistema real,  $\rho_0$ . De esta forma, el potencial externo  $v_s(\mathbf{r})$  debe ser tal que produzca en el sistema de electrones independientes una densidad igual a la que corresponde a los  $N$  electrones interactuantes sometidos al potencial  $v(\mathbf{r})$ . El Hamiltoniano  $\hat{H}_s$  vinculado a este sistema de referencia es

$$\hat{H}_s = \sum_{i=1}^N \left[ -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_s(\mathbf{r}_i) \right] \equiv \sum_{i=1}^N \hat{h}_i^{KS} \quad (2.61)$$

donde hemos definido  $\hat{h}_i^{KS} \equiv -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_s(\mathbf{r}_i)$ , el operador unielectrónico de Kohn-Sham. Pues bien, la función de onda  $\Psi_s$  de un sistema de electrones independientes puede calcularse como el determinante de Slater de las autofunciones de  $\hat{h}_i^{KS}$ . En otras palabras, si  $\chi_i^{KS}$  son los espín-orbitales del sistema de referencia tal que

$$\hat{h}_i^{KS} \chi_i^{KS} = \varepsilon_i \chi_i^{KS} \quad (2.62)$$

luego

$$\Psi_s(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N) = (N!)^{-\frac{1}{2}} \begin{vmatrix} \chi_i^{KS}(\mathbf{x}_1) & \chi_j^{KS}(\mathbf{x}_1) & \cdots & \chi_k^{KS}(\mathbf{x}_1) \\ \chi_i^{KS}(\mathbf{x}_2) & \chi_j^{KS}(\mathbf{x}_2) & \cdots & \chi_k^{KS}(\mathbf{x}_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_i^{KS}(\mathbf{x}_N) & \chi_j^{KS}(\mathbf{x}_N) & \cdots & \chi_k^{KS}(\mathbf{x}_N) \end{vmatrix} \quad (2.63)$$

y la densidad electrónica se evalúa según

$$\rho_s = \sum_{i=1}^N |\chi_i^{KS}|^2 \quad (2.64)$$

La razón que alentó a Kohn y Sham a emplear un modelo de electrones no interactuantes se relaciona con que la energía cinética de este sistema se calcula directamente mediante la expresión

$$T_s = -\frac{1}{2} \langle \Psi_s | \sum_i \nabla_i^2 | \Psi_s \rangle = -\frac{1}{2} \langle \chi_i^{KS} | \sum_i \nabla_i^2 | \chi_i^{KS} \rangle \quad (2.65)$$

Si se denota  $\Delta T$  a la diferencia entre la energía cinética verdadera y la del sistema de referencia,  $\Delta V_{ee}$  a la parte no clásica de la interacción entre electrones, y se reúnen después ambas contribuciones en un nuevo funcional  $E_{xc}[\rho]$ , tal que

$$\Delta T[\rho] \equiv T[\rho] - T_s[\rho] \quad (2.66)$$

$$\Delta V_{ee}[\rho] \equiv V_{ee} - \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \quad (2.67)$$

$$E_{xc}[\rho] = \Delta T[\rho] + \Delta V_{ee}[\rho] \quad (2.68)$$

luego la forma funcional en (2.58) puede reescribirse:

$$E[\rho] = T_s[\rho] + V_{ne}[\rho] + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 + E_{xc}[\rho] \quad (2.69)$$

donde  $T_s$  y  $V_{ne}$  están dados en (2.65) y (2.59). De esta manera,  $E_0$  podría evaluarse a partir de  $\rho_0$ , a no ser por la contribución —relativamente pequeña— de  $E_{xc}$ , término conocido como la energía de intercambio y correlación. El método Kohn-Sham plantea así un funcional que es por definición exacto, adscribiendo a  $E_{xc}$  los efectos de intercambio y correlación relacionados con la naturaleza cuántica de los electrones. Pero la dependencia de  $E_{xc}$  con la densidad no se conoce, de modo que en la práctica la exactitud del cálculo DFT está supeditada a la de la aproximación que se utilice para describirlo. El funcional  $E_{xc}$  exacto puede idealmente descomponerse en una serie de aportes energéticos que son (a) la correlación cinética, definida en (2.66); (b) la correlación Coulómbica, asociada a la repulsión electrónica; (c) el intercambio, proveniente del principio de antisimetría para fermiones; (d) la corrección a la autointeracción: puesto que la integral  $\int \int \rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)r_{12}^{-1} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2$  incluye la interacción del electrón con su propia densidad de carga, es preciso introducir una corrección a fin de recuperar la interacción Coulómbica exacta.

Originariamente Hohenberg y Kohn sugirieron adoptar la expresión

$$E_{xc}[\rho] = \int \rho(\mathbf{r})\varepsilon_{xc}(\rho) d\mathbf{r} \quad (2.70)$$

con  $\varepsilon_{xc}(\rho)$  la energía de intercambio  $\varepsilon_x$  más la de correlación  $\varepsilon_c$  correspondientes a un electrón inmerso en un gas homogéneo y neutro de electrones

con densidad  $\rho$ .

$$\varepsilon_x(\rho) = -\frac{3}{4} \left( \frac{3}{\pi} \right)^{1/3} (\rho(\mathbf{r}))^{1/3} \quad (2.71)$$

La correlación  $\varepsilon_c(\rho)$  puede describirse por medio de una función obtenida por Vosko, Wilk y Nusair en los años ochenta a partir del ajuste de valores procedentes de simulaciones Monte Carlo [23]. El funcional que se construye para  $E_{xc}$  mediante este procedimiento se denomina LDA (Local Density Approximation), y LSDA (Local Spin Density Approximation) en el caso de la implementación para sistemas de capa abierta. Puesto que está modelado a partir del gas uniforme de electrones, resulta en especial adecuado cuando la densidad varía sólo suavemente con la posición. Esto no se cumple en general para los sistemas reales, a pesar de lo cual la aproximación LDA permite obtener propiedades moleculares —geometrías, frecuencias de vibración o momentos dipolares— con bastante acierto, si se compara con el método de Hartree-Fock o incluso con otras técnicas que incorporan efectos de correlación. Presenta sin embargo alguna tendencia a sobrestimar energías de enlace. Al LDA sucedieron otros tantos funcionales de mayor sofisticación, capaces de proporcionar resultados más exactos; acerca de ellos nos extendemos hacia el término de esta sección.

La relación (2.69) puede llevarse a la forma más explícita

$$\begin{aligned} E[\rho] = & - \sum_{\alpha} Z_{\alpha} \int \frac{\rho(\mathbf{r}_1)}{r_{1\alpha}} d\mathbf{r}_1 - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \langle \chi_i^{KS} | \sum_i \nabla_i^2 | \chi_i^{KS} \rangle \\ & + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 + E_{xc}[\rho] \end{aligned} \quad (2.72)$$

Mediante esta expresión, y en tanto se conozcan los orbitales de Kohn y Sham, es en principio posible obtener la energía como función de la densidad. Por otra parte, la densidad puede a su vez calcularse de los  $\chi_i^{KS}$  según (2.64), con lo cual el problema recae en la manera de hallar dichos orbitales. Recurriendo al teorema variacional de Hohenberg y Kohn, e imponiendo la condición de ortonormalidad entre  $\chi_i^{KS}$ , se hallan las ecuaciones que deben satisfacer los orbitales que minimizan la expresión (2.72), tal que se cumpla

$$\frac{\partial E[\rho(\mathbf{r})]}{\partial \rho(\mathbf{r})} = 0 \quad (2.73)$$

El procedimiento es análogo al que se utiliza para obtener las ecuaciones de Fock, de donde luego se calculan los orbitales moleculares. En el caso presente el sistema de autovalores resultante se conoce como las ecuaciones de Kohn-Sham.

$$\left[ -\frac{1}{2}\nabla_1^2 - \sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{r_{1\alpha}} + \int \frac{\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_2 + v_{xc}(1) \right] \chi_i^{KS}(1) = \varepsilon_i^{KS} \chi_i^{KS}(1) \quad (2.74)$$

Puede verse que esta es la igualdad de (2.62), donde se ha hecho explícita la forma de  $\hat{h}^{KS}$ . La función  $v_{xc}$ , denominada potencial de intercambio y correlación, no es otra cosa que la derivada funcional de  $E_{xc}$ . En general puede evaluarse a partir de la fórmula del funcional  $E_{xc}[\rho]$ ; para el caso de la aproximación LDA [14], por ejemplo, resulta

$$v_{xc}^{LDA} = \frac{\delta E_{xc}^{LDA}}{\delta \rho} = \varepsilon_{xc}(\rho(\mathbf{r})) + \rho(\mathbf{r}) \frac{\partial \varepsilon_{xc}(\rho)}{\partial \rho} = -\left[ \frac{3}{\pi} \rho(\mathbf{r}) \right]^{\frac{1}{3}} + v_c^{LDA} \quad (2.75)$$

La clave para evaluar los orbitales de Kohn-Sham reside en expresarlos como combinación lineal de funciones de base  $\phi_{\mu}$ , tal como se muestra en (2.35) para los orbitales de Hartree-Fock. Este recurso permite formular el problema en ecuaciones semejantes a las de Roothaan.

$$\sum_{\mu=1}^M C_{\mu i} (\langle \phi_{\nu} | \hat{h}^{KS} | \phi_{\mu} \rangle - \varepsilon_i \langle \phi_{\nu} | \phi_{\mu} \rangle) = 0 \quad \mu = 1, 2, \dots, M \quad (2.76)$$

En forma matricial el sistema se escribe

$$\mathbf{h}^{KS} \mathbf{C} = \mathbf{S} \mathbf{C} \boldsymbol{\varepsilon} \quad (2.77)$$

donde  $\mathbf{h}^{KS}$  es la matriz compuesta por los elementos  $h_{\nu\mu}^{KS}$

$$\begin{aligned} h_{\nu\mu}^{KS} &\equiv \langle \phi_{\nu} | \hat{h}^{KS} | \phi_{\mu} \rangle \\ &= -\frac{1}{2} \int \phi_{\nu}(\mathbf{r}_1) \nabla_1^2 \phi_{\mu}(\mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1 - \sum_{\alpha} Z_{\alpha} \int \frac{\phi_{\nu}(\mathbf{r}_1) \phi_{\mu}(\mathbf{r}_1)}{r_{1\alpha}} d\mathbf{r}_1 \\ &+ \int \int \frac{\rho(\mathbf{r}_2) \phi_{\nu}(\mathbf{r}_1) \phi_{\mu}(\mathbf{r}_1)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 + \int v_{xc}(\rho(\mathbf{r}_1)) \phi_{\nu}(\mathbf{r}_1) \phi_{\mu}(\mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1 \end{aligned} \quad (2.78)$$

y  $\mathbf{C}$  la matriz que contiene los coeficientes de la expansión. De la ecuación secular —análoga a (2.39)— se calcula  $\boldsymbol{\varepsilon}$  y luego se diagonaliza (2.77). Los elementos de  $\mathbf{h}^{KS}$  dependen de la densidad y por lo tanto de  $\mathbf{C}$ , por lo

cual la resolución se realiza iterativamente, al igual que en el método de Hartree-Fock. Se parte de un conjunto preliminar de coeficientes que se usa para calcular  $\rho$  a través de (2.64), con la densidad se construye  $\mathbf{h}^{\mathbf{KS}}$ , y posteriormente se resuelve (2.77) para hallar un nuevo conjunto de  $C_{\nu\mu}$ . El proceso se reitera hasta converger a una matriz  $\mathbf{C}$  autoconsistente.

La exactitud de los resultados DFT está condicionada por la descripción del intercambio y la correlación. La principal limitación de las aproximaciones LDA y LSDA se vincula con el modelo del gas de electrones uniforme, inadecuado para representar variaciones abruptas en  $\rho$ . Con el objeto de superar esta deficiencia, se procuró incorporar al funcional alguna información acerca de la variación de  $\rho$  con la posición, lo cual puede hacerse por ejemplo introduciendo una dependencia con el gradiente de la densidad,  $\nabla\rho$ . Los de esta clase se denominan funcionales corregidos por gradiente, y se designan de ordinario usando las siglas GGA (Generalized Gradient Approximation). Normalmente las contribuciones al intercambio y a la correlación se modelan separadamente, tal que  $E_{xc} = E_x + E_c$ . Algunos modelos pueden estar basados en consideraciones exclusivamente teóricas, por ejemplo el intercambio de Perdew y Wang PW86 [24], o el PBE, funcional de intercambio y correlación propuesto por Perdew, Burke y Ernzerhof [25]. Otros incluyen términos que pretenden ajustar resultados experimentales, como el de intercambio de Becke (B88 o B) [26], cuya expresión es:

$$E_x^{B88} = E_x^{LSDA} - b \sum_{\sigma=\alpha,\beta} \int \frac{\rho_\sigma^{-4/3} |\nabla\rho_\sigma|^2}{1 + 6b |\nabla\rho_\sigma| / \rho_\sigma^{4/3} \sinh^{-1}[|\nabla\rho_\sigma| / \rho_\sigma^{4/3}]} \quad (2.79)$$

donde  $\sigma$  se refiere al espín, y  $b$  es un parámetro empírico escogido para reproducir la energía de intercambio de Hartree-Fock de diversos átomos. Funcionales de correlación usuales son el de Lee, Yang y Parr (LYP) [27], el de Perdew P86 [28], o el de Perdew y Wang PW91 [29]. Dado que las contribuciones de intercambio y de correlación se construyen en general de manera independiente, en un cálculo DFT es lícito utilizar un funcional  $E_x^{GGA}$  en combinación con cualquier  $E_c^{GGA}$ .

El tratamiento Hartree-Fock involucra el intercambio exacto (expresado en (2.27)), circunstancia que ha motivado su incorporación al método DFT para

originar los llamados funcionales híbridos. En estos se combina el intercambio de Hartree-Fock ( $E_x^{HF}$ ) con el intercambio y la correlación de diversos funcionales GGA. Así, el B3LYP [30], funcional híbrido que ha recibido gran aceptación, está definido de acuerdo a:

$$E_{xc}^{B3LYP} = \left[ (1 - a_0 - a_x) E_x^{LSDA} + a_0 E_x^{HF} + a_x E_x^{B88} \right] \\ + (1 - a_c) E_c^{VWN} + a_c E_c^{LYP} \quad (2.80)$$

donde  $E_c^{VWN}$  se refiere al funcional de correlación de Vosko, Wilk y Nusair. Los parámetros  $a_0$ ,  $a_x$  y  $a_c$  (0.20, 0.72 y 0.81 respectivamente) fueron ajustados para optimizar valores de energías de atomización, potenciales de ionización y afinidades protónicas de una serie de átomos y moléculas.

Los funcionales GGA supusieron un notable avance respecto al LDA y al LSDA, mejorando geometrías y demás propiedades del sistema, en particular las energías de enlace. No obstante, su exactitud es aún insuficiente para proporcionar respuestas definitivas a problemas químicos sutiles, y en la actualidad es considerable el esfuerzo dedicado a obtener aproximaciones más realistas. Dentro de la nueva generación de funcionales cabe mencionar a los llamados meta-GGA [31], que introducen el Laplaciano de la densidad  $\nabla^2\rho$ , y los denominados funcionales de intercambio exacto, diseñados para eliminar el error debido a la autointeracción [32]. La superioridad de estas nuevas aproximaciones sobre las ya tradicionales GGA, sin embargo, no ha sido hasta el momento corroborada positivamente.

## 2.6 Esquemas de cálculo DFT

En este apartado se describen brevemente los rudimentos técnicos de las dos clases de implementaciones de DFT correspondientes a las simulaciones presentadas en esta tesis. La primera es la formulación de DFT en bases Gaussianas, acaso la más utilizada en cálculos moleculares e incorporada en diverso software de química cuántica, en particular en el código desarrollado en nuestro laboratorio (Molecole) [33] y en el programa Gaussian98 [34]. La segunda constituye el método SIESTA (Spanish Initiative for Electronic

Simulations with Thousands of Atoms), un esquema de cálculo que emplea funciones de base numéricas y pseudopotenciales para representar el núcleo y los electrones internos (el *core*), características que reducen considerablemente el costo computacional y permiten el tratamiento de moléculas de gran tamaño.

### DFT con bases Gaussianas

La adopción de funciones de base Gaussianas para expandir los orbitales moleculares según (2.35) se remonta a los años cincuenta. Su conveniencia está ligada a que la integral  $\int \int \phi_\mu(\mathbf{r}_1)\phi_\nu(\mathbf{r}_1)r_{12}^{-1}\phi_\lambda(\mathbf{r}_2)\phi_\sigma(\mathbf{r}_2)d\mathbf{r}_1d\mathbf{r}_2$ , con  $\phi_i(\mathbf{r})$  una Gaussiana centrada en un punto cualquiera del espacio, tiene solución analítica, lo cual simplifica sustancialmente el cálculo de los elementos de matriz. Las funciones utilizadas para representar los orbitales de Koh-Sham tienen la forma

$$g_u = N x_A^i y_A^j z_A^k e^{-\alpha r_A^2} \quad (2.81)$$

donde  $N$  es un factor de normalización,  $i, j$ , y  $k$  son potencias enteras mayores o iguales a cero, y  $x_A$ ,  $y_A$ , y  $z_A$  son las coordenadas espaciales con el origen en el núcleo  $A$ . El parámetro  $\alpha$  es el exponente orbital; se elige de modo de optimizar la forma de la función, por ejemplo ajustando orbitales atómicos de tipo Slater, o tal que minimice la energía de un cálculo DFT. Si  $i+j+k = 0$  la función es una Gaussiana tipo  $s$ , si la suma es igual a 1 entonces la Gaussiana es tipo  $p$ , y si es igual a 2 entonces es tipo  $d$ . Existen pues seis proyecciones de Gaussianas  $d$ , correspondientes a los factores  $x^2, y^2, z^2, xy, xz, yz$ , que pueden a su vez combinarse linealmente para dar origen a funciones con el mismo comportamiento angular que los cinco orbitales atómicos  $3d$ . La práctica usual consiste en utilizar funciones de base  $\phi_i$  formadas por combinaciones de  $g_u$  localizadas sobre el mismo átomo y con los mismos  $i, j$  y  $k$ , pero con distintos exponentes orbitales,

$$\phi_i = \sum_u \gamma_{ui} g_u \quad (2.82)$$

Las funciones expresadas en esta forma, denominadas contracciones, permiten reducir el número de coeficientes variacionales necesarios para describir satisfactoriamente la densidad, siempre que los  $\gamma_{ui}$  se seleccionen con el criterio adecuado.

Reescribiendo (2.64) en términos de las funciones de base la densidad de un sistema de capa cerrada resulta

$$\rho(\mathbf{r}) = 2 \sum_{\lambda=1}^{N/2} \sum_{ij} C_{i\lambda} C_{j\lambda} \phi_i(\mathbf{r}) \phi_j(\mathbf{r}) = \sum_{ij} P_{ij} \phi_i(\mathbf{r}) \phi_j(\mathbf{r}) \quad (2.83)$$

donde hemos introducido  $P_{ij}$ , los elementos de la matriz densidad  $\mathbf{P}$ ,

$$P_{ij} = 2 \sum_{\lambda=1}^{N/2} C_{i\lambda} C_{j\lambda} \quad (2.84)$$

En ciertas implementaciones de DFT, por ejemplo en el código Molecule, se emplea un conjunto de funciones de base adicional  $\{g_k\}$  para expandir la densidad de carga. Para este fin resulta conveniente utilizar una base sin contraer como la que se muestra en (2.81), y así

$$\rho(\mathbf{r}) \approx \tilde{\rho}(\mathbf{r}) = \sum_k a_k g_k(\mathbf{r}) \quad (2.85)$$

Mediante esta aproximación el costo para computar el término de Coulomb  $\int \int \phi_\nu(\mathbf{r}_1) \phi_\mu(\mathbf{r}_1) r_{12}^{-1} \phi_\nu(\mathbf{r}_2) \phi_\mu(\mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2$  que escala con  $M^4$ , pasa a depender de  $M^2 B$  para  $\int \int \tilde{\rho}(\mathbf{r}_2) r_{12}^{-1} \phi_\nu(\mathbf{r}_1) \phi_\mu(\mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2$ , donde  $M$  y  $B$  denotan respectivamente las dimensiones de las bases en las que se expanden los orbitales y la densidad. En el programa Gaussian98, en cambio, no se introduce una base auxiliar para la representación de  $\rho$ , por lo tanto el algoritmo escala con el número de átomos a la cuarta, como ocurre en un cálculo Hartree-Fock.

Tanto en el código Molecule como en el de Gaussian98 el potencial y la energía de intercambio y correlación,  $\varepsilon_{xc}$  y  $v_{xc}$ , se evalúan en una grilla tridimensional, y la integral  $V_{ij}^{xc} = \int v_{xc}(\rho(\mathbf{r})) \phi_i(\mathbf{r}) \phi_j(\mathbf{r}) d\mathbf{r}$ , presente en los elementos de la matriz de Kohn-Sham, es obtenida de forma numérica, de la misma manera que el término  $\int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon_{xc}(\rho) d\mathbf{r}$ , implicado en el cálculo de la energía total. En este esquema las ecuaciones de Kohn-Sham se escriben

$$\sum_j (T_{ij} + V_{ij}^{ne} + V_{ij}^{ee} + V_{ij}^{xc}) C_{j\lambda} = \varepsilon_\lambda \sum_j S_{ij} C_{j\lambda} \quad (2.86)$$

donde  $T_{ij}$ ,  $V_{ij}^{ne}$  y  $V_{ij}^{ee}$  representan respectivamente los elementos de matriz de la energía cinética, de la atracción nuclear y de la repulsión electrónica.

$$T_{ij} = \int \phi_i(\mathbf{r}) \nabla^2 \phi_j(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (2.87)$$



$$V_{ij}^{ne} = \sum_{\alpha} Z_{\alpha} \int \frac{\phi_{\nu}(\mathbf{r})\phi_{\mu}(\mathbf{r})}{r_{1\alpha}} d\mathbf{r} \quad (2.88)$$

$$V_{ij}^{ee} = \sum_k a_k \int \int \frac{\phi_i(\mathbf{r}_1)\phi_j(\mathbf{r}_1)g_k(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \quad (2.89)$$

En esta última ecuación se hace uso de la expansión (2.85). Por su parte, si la densidad electrónica se representa mediante la base auxiliar, la energía se expresa como

$$E = \sum_{ij} P_{ij}(T_{ij} + V_{ij}^{ne}) + \sum_k a_k \sum_{ij} P_{ij} \int \int \frac{\phi_i(\mathbf{r}_1)\phi_j(\mathbf{r}_1)g_k(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 - \frac{1}{2} \sum_{ij} a_i a_j \int \int \frac{g_i(\mathbf{r}_1)g_j(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 + \int \rho(\mathbf{r}_1)\epsilon_{xc}(\rho(\mathbf{r}_1))d\mathbf{r}_1 \quad (2.90)$$

El primero de los términos que aparecen a la derecha en (2.90) se relaciona con la energía cinética y la atracción núcleo electrón. El segundo representa la repulsión interelectrónica, mientras que el siguiente se introduce para corregir el error causado en el término de Coulomb al reemplazar  $\rho$  por  $\tilde{\rho}$ . Finalmente, el último es la energía de intercambio y correlación, que se obtiene integrando numéricamente sobre la grilla. En la implementación Molecule se recurre a una grilla adaptable centrada en los núcleos diseñada por Becke [35]. A los efectos de la integración numérica,  $\rho$  se evalúa en cada elemento de volumen a través de la ecuación (2.64). Con el valor de la densidad electrónica,  $\epsilon_{xc}$  se computa en cada punto de la grilla.

### El método SIESTA

La característica más notable que presenta esta técnica de cálculo DFT es posiblemente la utilización de funciones de base numéricas definidas en una grilla tridimensional. Esta particularidad permite en principio emplear cualquier tipo de función en la descripción de los orbitales de Kohn-Sham, lo que supone una notable ventaja en lo que respecta a la flexibilización de la base [36]. Por otra parte, al estar tales funciones acotadas en una grilla, los orbitales —y por lo tanto la distribución de carga,  $\rho(\mathbf{r})$ — permanecen confinados dentro de cierta región, más allá de la cual su valor será exactamente cero. Esta propiedad conduce a la anulación de los elementos de matriz no diagonales asociados a núcleos suficientemente lejanos, y por consiguiente la

cantidad de integrales en la matriz de Kohn-Sham pasa a depender aproximadamente del número de átomos  $N$  (o del de funciones de base, que es proporcional a este), en lugar de estar sujeto a  $N^4$  o  $N^3$ , cual ocurre en las implementaciones convencionales. Si la resolución de las ecuaciones de autovalores se realiza mediante el procedimiento adecuado, entonces el costo del cálculo total escala linealmente con el número de átomos. De esta manera el SIESTA puede ser utilizado como método de orden  $N$ , a través de la minimización de un funcional dependiente de los elementos de matriz que constituye una vía alternativa para resolver el problema de autovalores [36]. El uso de este funcional de orden  $N$  para sustituir la diagonalización directa, no obstante, supone un costo adicional que sólo se justifica si el número de átomos excede el centenar. De todas maneras, aun operando bajo el algoritmo de diagonalización estándar, el esquema numérico de SIESTA resulta extremadamente eficiente y la ganancia en términos de rapidez respecto a los métodos con bases Gaussianas es notoria para sistemas que superan los quince o veinte átomos.

El uso de pseudopotenciales alivia por una parte el número de cálculos en cuanto omite los electrones internos, y por otra evita cambios bruscos del potencial en el entorno de los núcleos, suavizando la densidad de carga en la grilla y minimizando los errores de la integración numérica. Si bien el código admite en principio funciones de base de cualquier índole, resulta conveniente la adopción de los llamados orbitales pseudoatómicos (PAOs), consistentes en las soluciones de los átomos con los correspondientes pseudopotenciales. Los PAOs de rango finito adaptados al método SIESTA se obtienen confinando las autofunciones del pseudopotencial al interior de una esfera en cuyas paredes el potencial es infinito, lo que determina que más allá del radio de confinamiento el orbital decaiga a cero. Un recurso para establecer el radio de los distintos orbitales de la base de manera equilibrada es a través de la selección del parámetro  $\Delta E_{PAO}$  (pseudoatomic orbital energy shift), que especifica el incremento en la energía del orbital asociado al confinamiento. Cuanto más pequeño sea este parámetro, tanto más extendidas serán las funciones de base y mayor la calidad del cálculo. Dependiendo del sistema, valores de  $\Delta E_{PAO}$  situados entre 100 y 200 meV revisten una preci-

sión acorde a la exactitud provista por los funcionales GGA de uso corriente [37]. En el programa SIESTA está disponible el funcional PBE [25], además del LDA y del LSDA.

La descripción de los núcleos y los electrones internos se realiza mediante los pseudopotenciales propuestos por N. Troullier y J. L. Martins [38]. En el contexto de la aproximación del pseudopotencial no local implementado en SIESTA el Hamiltoniano de Kohn-Sham adopta la forma

$$H = T + \sum_{\alpha} [V_{\alpha}^{local} + V_{\alpha}^{nl}] + V^H(\mathbf{r}) + V^{xc}(\mathbf{r}) \quad (2.91)$$

siendo  $\alpha$  el índice que denota los núcleos, y  $V^H$  el potencial Hartree (vinculado a la repulsión electrónica). El pseudopotencial está dividido en dos contribuciones: un componente local,  $V_{\alpha}^{local}$ , independiente del momento angular  $lm$  de los electrones presentes en el *core*, y que determina la interacción a largo alcance; y un componente no local,  $V_{\alpha}^{nl}$ , que opera selectivamente sobre los distintos electrones de valencia.

$$\hat{V}_{\alpha}^{nl} = \sum_{lm} |\phi_{\alpha lm}^{KB}\rangle \epsilon_{\alpha l}^{KB} \langle \phi_{\alpha lm}^{KB}| \quad (2.92)$$

con

$$\phi_{\alpha lm}^{KB}(\mathbf{r}) = [V_{\alpha l}(\mathbf{r}) - V_{\alpha}^{local}(\mathbf{r})] \psi_{\alpha lm}(\mathbf{r}) \quad (2.93)$$

$$\epsilon_{\alpha l}^{KB} = \langle \psi_{\alpha lm} | V_{\alpha l} - V_{\alpha}^{local} | \psi_{\alpha lm} \rangle^{-1} \quad (2.94)$$

donde  $\psi_{\alpha lm}$  son los pseudo-orbitales atómicos, por ejemplo las autofunciones del potencial  $V_{\alpha l}(\mathbf{r})$ . Las funciones  $\phi_{\alpha lm}^{KB}$  se conocen como los proyectores de Kleinman-Bylander [39]. Su utilización en  $\hat{V}_{\alpha}^{nl}$  permite discriminar el efecto del *core* sobre los electrones de distinto momento angular: el potencial no local experimentado por los electrones de valencia provendrá esencialmente de los electrones internos con igual componente angular. Asimismo, los electrones con  $lm$  distinto al de los electrones del *core* sólo estarán expuestos al potencial local. Por otra parte, puesto que si  $r > r_{\alpha}^{core}$  entonces  $V_{\alpha l}(\mathbf{r}) - V_{\alpha}^{local}(\mathbf{r}) = 0$ , tenemos que  $V_{\alpha}^{nl}$  también se anulará más allá de dicho radio, lo que muestra que es un potencial de corto alcance.

Llamando  $\rho_{\alpha}^{atom}$  a la distribución de carga de los átomos aislados, es posible

definir las variable  $\rho^{na}(\mathbf{r})$  y  $\delta\rho(\mathbf{r})$  tal que

$$\rho^{na}(\mathbf{r}) = \sum_{\alpha} \rho_{\alpha}^{atom}(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_{\alpha}|) \quad (2.95)$$

$$\delta\rho(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r}) - \rho^{na}(\mathbf{r}) \quad (2.96)$$

La magnitud  $\delta\rho$  es la diferencia entre la densidad autoconsistente y la correspondiente a los átomos sin perturbar, y representa un valor muy pequeño frente a  $\rho$ . La sustitución de  $\rho$  por  $\delta\rho$  incrementa la precisión de las integrales numéricas, y permite reformular el Hamiltoniano del siguiente modo [36]:

$$H = T + \sum_{\alpha} V_{\alpha}^{nl} + \sum_{\alpha} V_{\alpha}^{na}(\mathbf{r}) + \delta V^H(\mathbf{r}) + V^{xc}(\mathbf{r}) \quad (2.97)$$

con

$$V_{\alpha}^{na}(\mathbf{r}) = V_{\alpha}^{local}(\mathbf{r}) + \int \rho^{na}(\mathbf{r}_1) r_{\alpha 1}^{-1} d\mathbf{r}_1 \quad (2.98)$$

y  $\delta V^H$  el potencial asociado a  $\delta\rho$ . Los elementos de matriz correspondientes a los dos primeros términos a la derecha en (2.97) involucran integrales de dos centros que se evalúan por única vez al comienzo del cálculo en el espacio recíproco. Los términos restantes se obtienen integrando numéricamente las funciones de base en el espacio real. En los incisos siguientes se expone esquemáticamente la estructura autoconsistente del programa:

1. Elección de la base,  $\{\phi_1 \cdots \phi_b\}$ , y cálculo de los elementos de matriz no autoconsistentes,  $T$  y  $V_{\alpha}^{local}$ .
2. Estimación inicial de los coeficientes orbitales  $C_{ij}$  (por ejemplo asumiendo  $\rho = \rho^{na}$ ).
3. Obtención de la distribución de carga a partir de la matriz densidad,  $\rho = \sum_{\mu\nu} P_{\mu\nu} \phi_{\mu} \phi_{\nu}$ , y de  $\delta\rho = \rho - \rho^{na}$ .
4. Obtención de  $\delta V^H$ , el potencial Hartree generado por  $\delta\rho$ , mediante la inversión de la ecuación de Poisson ( $\nabla^2 V = -\rho/\epsilon_0$ ) en el espacio recíproco.
5. Cálculo de  $V^{xc}$  en la grilla tridimensional.
6. Evaluación de las integrales asociadas a los elementos de matriz de  $V_{\alpha}^{na}(\mathbf{r})$ ,  $\delta V^H(\mathbf{r})$ , y  $V^{xc}(\mathbf{r})$ , por integración numérica en el espacio real.

7. Diagonalización del problema de autovalores para recuperar un nuevo conjunto de  $C_{ij}$ .
8. Construcción de la matriz densidad  $\mathbf{P}^{n+1}$  correspondiente a los  $C_{ij}$  actuales, comparación con  $\mathbf{P}^n$  y determinación de autoconsistencia. En el caso que esta no se verifique, se retorna al paso 3.
9. Cálculo de la energía y demás propiedades electrónicas.

Bajo este esquema, la energía total que incluye la repulsión entre núcleos puede escribirse

$$E = \sum_{\mu\nu} P_{\mu\nu} H_{\mu\nu} - \frac{1}{2} \int V^H(\mathbf{r}) \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + \int (\epsilon^{xc}(\mathbf{r}) - V^{xc}(\mathbf{r})) \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + \frac{1}{2} \sum_{\alpha\beta} \frac{Z_\alpha Z_\beta}{r_{\alpha\beta}} \quad (2.99)$$

donde  $Z_\alpha$  representa la carga del *core* y  $\epsilon^{xc}(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r})$  es la densidad de energía de intercambio y correlación [36]. El cálculo de  $\delta V^H$  en el paso 4 se realiza a partir de  $\rho(\mathbf{r})$ , resolviendo la ecuación de Poisson por una transformada de Fourier. Dicho procedimiento posibilita expresar el potencial autoconsistente como una función en el espacio real, lo cual evita el costo de evaluar las integrales de dos electrones y cuatro centros que se hallan habitualmente asociadas al término de Coulomb.

El potencial se evalúa en el espacio recíproco, por lo cual presenta, igual que la densidad, propiedades periódicas de contorno. Esta cualidad predispone al método SIESTA para el cálculo de sólidos y fases extendidas. Puesto que  $V(\mathbf{r})$  y  $\rho(\mathbf{r})$  son funciones periódicas, en las aplicaciones a sistemas finitos debe prevenirse que la molécula interactúe con sus réplicas. Tal exigencia se verifica naturalmente en lo concerniente a  $\rho(\mathbf{r})$ , ya que la distribución de carga decae a cero en un rango finito. Sin embargo, eso no es válido para  $V(\mathbf{r})$ ; luego, en los cálculos de sistemas moleculares es necesario definir una grilla suficientemente grande de modo que en los bordes la magnitud del potencial no sea significativa. Respecto a la precisión de la grilla, se define a través de la energía de la onda plana de frecuencia más alta que es posible representar en ella [40]. Este valor se denota  $E_{cut}$  (energy cutt-off) y

habitualmente se expresa en Rydbergs. Su valor elevado asegura una grilla de mayor exactitud.

## 2.7 Técnicas híbridas QM-MM

Estas metodologías combinan el cálculo de estructura electrónica con la mecánica molecular a través de la utilización de un Hamiltoniano mixto  $H_{qm-mm}$  que acopla dos subsistemas, de los cuales uno recibe un tratamiento cuántico y el otro clásico (véanse por ejemplo las referencias [6, 7, 8, 9]). La técnica QM-MM resulta particularmente provechosa para la simulación de los efectos de un entorno —modelado mediante la mecánica molecular y frecuentemente identificado como el solvente— sobre la estructura electrónica del sistema principal, el soluto. Si el número de átomos que componen el entorno es importante, este procedimiento disminuye drásticamente el esfuerzo de cómputo, en comparación con el que insume tratar al sistema por medios mecanocuánticos en su totalidad. El término de acoplamiento contiene las interacciones entre la región cuántica y la clásica. Normalmente estas interacciones pueden modelarse dentro de dos categorías: electrostáticas y de Lennard-Jones.

En general se designa el Hamiltoniano total  $H_{tot}$  que opera sobre  $\Psi$ , la función de onda del sistema.

$$H_{tot} \Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}, \tau) = E_{tot}(\mathbf{R}, \tau) \Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}, \tau) \quad (2.100)$$

donde  $\tau$  representa las coordenadas de los átomos clásicos,  $\mathbf{R}$  las de los núcleos cuánticos, y  $\mathbf{r}$  las de los electrones. Este Hamiltoniano contiene el aporte de tres términos: un Hamiltoniano cuántico, por ejemplo como los definidos en (2.24) o en (2.61), un Hamiltoniano que describe las interacciones en la región clásica, y un término mixto.

$$H_{tot} = H_{qm} + H_{mm} + H_{qm-mm} \quad (2.101)$$

Lo mismo es válido para la energía total,

$$E_{tot} = E_{qm} + E_{mm} + E_{qm-mm} \quad (2.102)$$

La contribución puramente clásica,  $E_{mm}$ , proviene de un campo de fuerzas adecuado a la descripción del comportamiento del entorno. Ejemplos de tales potenciales clásicos son las parametrizaciones AMBER [41] y CHARMM [42], usadas en proteínas, o los modelos TIP4P y SPC para representar moléculas de agua [43]. En el caso de los métodos híbridos adaptados a un esquema DFT, cual los empleados en esta tesis, el término  $E_{qm}$  está dado por (2.69), mientras que el acoplamiento puede desarrollarse según

$$E_{qm-mm} = \sum_{i=1}^A q_i \int \frac{\rho(\mathbf{r})}{|\mathbf{r} - \tau_i|} d\mathbf{r} + \sum_{i=1}^A \sum_{\alpha=1}^B \frac{q_i Z_{\alpha}}{|\mathbf{R}_{\alpha} - \tau_i|} + E_{qm-mm}^{LJ} \quad (2.103)$$

siendo  $A$  el número de átomos en la región clásica, representados mediante una distribución de cargas parciales  $q_i$  (determinadas por el campo de fuerzas elegido para modelar el solvente), y  $\alpha$  un índice que recorre los  $B$  núcleos del sistema cuántico con carga  $Z_{\alpha}$ . El primer término del miembro derecho en (2.103) proporciona la interacción electrostática entre los electrones y las cargas puntuales, y es justamente el que introduce de modo autoconsistente el efecto del entorno sobre la densidad. En un esquema de Gaussianas puede calcularse de forma analítica, por ejemplo expandiendo  $\rho(\mathbf{r})$  como se muestra en (2.85). El término siguiente proviene de la interacción entre los núcleos de la región cuántica y las cargas puntuales. Finalmente,  $E_{qm-mm}^{LJ}$  deriva del potencial de Lennard-Jones que obra entre los núcleos de ambos subsistemas, de manera de simular efectos repulsivos y de Van der Waals ausentes en la descripción clásica. Este último término puede ser vital para la relajación de geometrías o para cálculos de dinámica molecular, pues su componente repulsivo impide que los átomos cuánticos colapsen sobre las cargas puntuales. Una reseña que cubre el desarrollo y las aplicaciones de estas metodologías puede hallarse en la referencia [6].

### Implementación en el método SIESTA

La implementación computacional del formalismo QM-MM en el método SIESTA, llevada a cabo dentro del marco de esta tesis, no puede efectuarse por procedimientos analíticos como en los esquemas basados en funciones Gaussianas. Por esa razón la inclusión del potencial electrostático del solvente puede suponer un costo no despreciable dentro del cálculo autoconsistente cuando el sistema clásico consta de un número elevado de átomos. Sin em-

bargo, aun considerando este costo adicional, que depende sensiblemente del tamaño del soluto cuántico, la implementación híbrida del método SIESTA continúa resultando mucho más eficiente para la simulación de sistemas extensos que los algoritmos con bases Gaussianas.

En el esquema numérico del SIESTA el potencial está definido para las  $L$  subdivisiones de la grilla, que se identifican en adelante con el subíndice  $n$ . Previamente a la obtención de los elementos de matriz en cada iteración, se añade al potencial Hartree la contribución del solvente

$$V_n^H = V_n^H + \sum_{i=1}^A \frac{q_i}{|\tau_i - \mathbf{r}_n|} \quad n = 1, 2, \dots, L \quad (2.104)$$

Consistentemente, la interacción entre los electrones y las cargas parciales — el primer término de la derecha en (2.103)— se computa como una integral sobre la grilla. Si  $v_n$  simboliza el volumen de cada uno de los elementos de esta, dicha integral se obtiene mediante la siguiente suma:

$$E_{qm-mm}^\rho = - \sum_{i=1}^A q_i \sum_{n=1}^L \frac{[\rho_n^{na} + \delta\rho_n]}{|\tau_i - \mathbf{r}_n|} v_n \quad (2.105)$$

La segunda contribución a  $E_{qm-mm}$  se calcula igual que en la ecuación (2.103), pero reemplazando  $Z_\alpha$  por la carga del *core*.

El término  $E_{qm-mm}^{LJ}$  se encuentra dado por:

$$E_{qm-mm}^{LJ} = \sum_{i=1}^A \sum_{\alpha=1}^B 4\epsilon_{i\alpha} \left[ \left( \frac{\sigma_{i\alpha}}{|\tau_i - \mathbf{R}_\alpha|} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{i\alpha}}{|\tau_i - \mathbf{R}_\alpha|} \right)^6 \right] \quad (2.106)$$

donde  $\epsilon_{i\alpha}$  y  $\sigma_{i\alpha}$  son parámetros del campo de fuerzas que modulan la interacción entre los átomos. El primero está relacionado con la distancia de equilibrio y el segundo con la energía potencial.

En cuanto al término  $E_{mm}$ , puede construirse usando cualquiera de los potenciales clásicos de interacción de pares. Por lo general suele contener tres contribuciones,

$$E_{mm} = E_{mm}^{elec} + E_{mm}^{LJ} + E_{mm}^{intra} \quad (2.107)$$



Las dos primeras representan la interacción electrostática y de Lennard-Jones en el solvente.  $E_{mm}^{elec}$  tiene la forma  $\sum_{i \neq j} q_i q_j r_{ij}^{-1}$ , mientras que la expresión para  $E_{mm}^{LJ}$  es análoga a la de  $E_{qm-mm}^{LJ}$  dada en (2.106). Con frecuencia en ambos términos las interacciones sólo se computan entre átomos pertenecientes a distintas moléculas —como es el caso en esta implementación—, o al menos entre pares no enlazados. Por el contrario,  $E_{mm}^{intra}$  modela las uniones dentro de la molécula, y suele contener potenciales de interacción entre pares de átomos separados por uno, dos, y hasta tres enlaces. Normalmente consisten en potenciales armónicos determinados por constantes de fuerza que controlan distancias de unión, ángulos y torsiones. En particular, dentro del presente esquema híbrido se incluyó un potencial intramolecular para H<sub>2</sub>O que responde a la ecuación

$$E_{mm}^{intra} = k_d \left[ (d_1 - d_0)^2 + (d_2 - d_0)^2 \right] + k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (2.108)$$

Esta expresión proporciona la energía por molécula:  $d_1$  y  $d_2$  corresponden a las distancias O-H, y  $\theta$  al ángulo H-O-H;  $d_0$  y  $\theta_0$  son los parámetros de equilibrio, gobernado por las constantes de fuerza  $k_d$  y  $k_\theta$ .

Los cálculos de optimización estructural o de dinámica molecular requieren la obtención de las fuerzas que actúan sobre los átomos en cada subsistema:

$$\mathbf{F}_\alpha = - \frac{\partial E_{qm}[\mathbf{R}]}{\partial \mathbf{R}_\alpha} - \frac{\partial E_{qm-mm}[\mathbf{R}, \tau]}{\partial \mathbf{R}_\alpha} \quad (2.109)$$

$$\mathbf{F}_i = - \frac{\partial E_{mm}[\tau]}{\partial \tau_i} - \frac{\partial E_{qm-mm}[\mathbf{R}, \tau]}{\partial \tau_i} \quad (2.110)$$

El primer sumando en (2.109) supone la derivación de (2.99), incorporada en la estructura original del SIESTA para evaluar las fuerzas sobre los átomos cuánticos. La fórmula en el caso híbrido es la misma, con la salvedad que  $V^H$  incluye la contribución del solvente. El segundo término en  $\mathbf{F}_\alpha$  puede obtenerse derivando (2.103). Si  $\xi$  denota una coordenada genérica ( $x$ ,  $y$ , o  $z$ ), la expresión analítica es

$$\begin{aligned} - \frac{\partial E_{qm-mm}[\mathbf{R}, \tau]}{\partial \xi_\alpha} &= \sum_{i=1}^A \frac{Z_\alpha q_i}{|\mathbf{R}_\alpha - \tau_i|^3} (\xi_\alpha - \xi_i) \\ &+ \sum_{i=1}^A \left[ 12 \frac{4\epsilon_{i\alpha} \sigma_{i\alpha}^{12}}{|\mathbf{R}_\alpha - \tau_i|^{14}} - 6 \frac{4\epsilon_{i\alpha} \sigma_{i\alpha}^6}{|\mathbf{R}_\alpha - \tau_i|^8} \right] (\xi_\alpha - \xi_i) \end{aligned} \quad (2.111)$$

Esta relación provee la fuerza electrostática inducida en el *core* por las cargas puntuales, más la de Lennard-Jones.

En lo que respecta a las fuerzas sobre el solvente,

$$\frac{\partial E_{mm}[\tau]}{\partial \tau_i} = \frac{\partial E_{mm}^{elec}[\tau]}{\partial \tau_i} + \frac{\partial E_{mm}^{LJ}[\tau]}{\partial \tau_i} + \frac{\partial E_{mm}^{intra}[\tau]}{\partial \tau_i} \quad (2.112)$$

Las contribuciones electrostáticas y de Lennard-Jones son semejantes a las expresadas en (2.111). En el caso del H<sub>2</sub>O, las fuerzas intramoleculares se hallan derivando (2.108) en función de las coordenadas del átomo de oxígeno y de los de hidrógeno.

El gradiente de la energía de acoplamiento,  $\partial E_{qm-mm}[\mathbf{R}, \tau]/\partial \tau_i$ , rige las fuerzas que ejerce el subsistema cuántico sobre el clásico. Los átomos del solvente se ven afectados por el soluto a través de los parámetros de Lennard-Jones, y debido a las interacciones electrostáticas con el *core* y con los electrones. Las fuerzas procedentes del potencial de Lennard-Jones y de la interacción con el *core* se obtienen de la ecuación (2.111) trocando alternativamente los subíndices  $\alpha$  e  $i$ . Por su parte, el efecto de la distribución electrónica sobre las cargas puntuales surge de derivar el término  $E_{qm-mm}^{\rho}$  en función de las coordenadas del solvente. En base a estas consideraciones puede escribirse

$$\begin{aligned} -\frac{\partial E_{qm-mm}[\mathbf{R}, \tau]}{\partial \xi_i} &= -q_i \sum_{n=1}^L \frac{[\rho_n^{na} + \delta \rho_n]}{|\tau_i - \mathbf{r}_n|^3} v_n(\xi_i - \xi_n) + \sum_{\alpha=1}^B \frac{Z_{\alpha} q_i}{|\mathbf{R}_{\alpha} - \tau_i|^3} (\xi_i - \xi_{\alpha}) \\ &+ \sum_{\alpha=1}^B \left[ 12 \frac{4\epsilon_{i\alpha} \sigma_{i\alpha}^{12}}{|\mathbf{R}_{\alpha} - \tau_i|^{14}} - 6 \frac{4\epsilon_{i\alpha} \sigma_{i\alpha}^6}{|\mathbf{R}_{\alpha} - \tau_i|^8} \right] (\xi_i - \xi_{\alpha}) \end{aligned} \quad (2.113)$$

Mediante el cálculo de las fuerzas que obran sobre cada átomo es posible hallar la geometría que minimiza la energía del sistema, usando por ejemplo el método de los gradientes conjugados (CG) [20]. También puede efectuarse la dinámica de los núcleos (cuánticos y clásicos al unísono) integrando las ecuaciones de movimiento

$$\mathbf{F}_{\alpha} = m_{\alpha} \frac{\partial^2 \mathbf{R}}{\partial t^2} \quad (2.114)$$

$$\mathbf{F}_i = m_i \frac{\partial^2 \tau}{\partial t^2} \quad (2.115)$$

para lo cual el programa SIESTA dispone de varios algoritmos que permiten realizar simulaciones a energía [44] o a temperatura [45] constante.



## Capítulo 3

# Estructura electrónica de hemoporfirinas a través de un sistema modelo: confrontación de aproximaciones mecanocuánticas

### 3.1 Características del hemo e implicancias para la simulación computacional

La presencia de las hemoporfirinas en un conjunto prominente de moléculas biológicas y su participación en infinidad de procesos bioquímicos ha desencadenado, paralelamente a la investigación experimental, una notable cantidad de estudios teóricos. Pueden hallarse a lo largo de los veinticinco últimos años multitud de ejemplos en el área de la química cuántica en los que se utilizan procedimientos semiempíricos [46, 47, 48] y DFT [49, 50, 51, 52, 53] procurando dar respuesta a cuestiones estructurales, electrónicas, espectroscópicas, y energéticas del sistema hierro-porfirina. Dentro de las técnicas mecanocuánticas disponibles, DFT ha sido la más frecuentada en los estudios recientes. Se trata de una metodología que introduce los efectos de correlación electrónica a cambio de un esfuerzo computacional semejante al que reviste un cálculo Hartree-Fock. Esta característica le convierte en la opción más

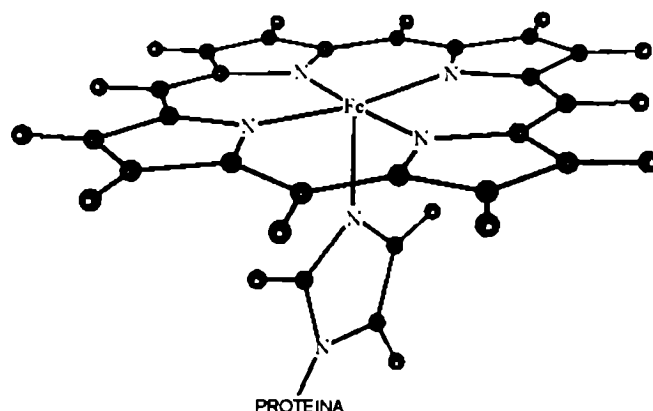


Figura 3.1: Grupo hemo coordinado axialmente a un anillo imidazólico, como en el sitio activo de la hemoglobina. En el esquema se suprimen los sustituyentes laterales de la protoporfirina para mayor claridad.

usual para tratar sistemas de tamaño intermedio donde la correlación desempeña un papel importante, como ocurre en los compuestos organometálicos de transición, y en el complejo de hierro-porfirina en particular [4].

Este sistema constituye el sitio activo de las hemoproteínas, de las que la mioglobina y la hemoglobina son ejemplos característicos. En ambas moléculas el metal se halla pentacoordinado y en el estado de oxidación Fe(II). Además de la unión a los nitrógenos del hemo, el hierro se encuentra enlazado axialmente a un quinto átomo de nitrógeno perteneciente al imidazol de una histidina proximal (ver figura 3.1). Por medio de esta unión el grupo hemo se conecta al polipéptido. En el estado basal la otra posición axial se halla libre; a través de ella la hemoglobina y la mioglobina pueden coordinarse al oxígeno molecular, al monóxido de carbono, o a otros ligandos. En la oxihemoglobina el metal se encuentra hexacoordinado y en un estado de bajo espín, mientras que en la hemoglobina libre se presenta pentacoordinado y con alto espín [54, 55]. Este estado paramagnético también ha sido observado en porfirinas sintéticas conteniendo Fe(II) pentacoordinado [56, 57, 58]. Atendiendo a tal comportamiento, es esencial que los métodos de química cuántica elegidos para tratar este problema sean capaces de proveer una correcta descripción de las configuraciones electrónicas asociadas al hierro, ya sea aislado o en sus diferentes entornos. Se trata de un requisito de-

cisivo, especialmente cuando se pretenden estudiar interacciones con ligandos que inducen transiciones de espín, como la unión al  $O_2$  o a otras moléculas diatómicas. Con el objeto de evaluar la aptitud de los tratamientos de estructura electrónica en ese sentido, en lo que sigue se examina el comportamiento de la aproximación de Hartree-Fock y de diversas formulaciones de la teoría de los funcionales de la densidad frente a varios sistemas, comenzando por el hierro atómico y sus especies iónicas en el vacío, y prosiguiendo luego con estructuras modelo para la desoxi y la oxihemoglobina. Parejamente a este análisis sistemático, se investigan propiedades estructurales y energéticas del complejo.

### 3.2 Sistema modelo

Para la realización de este estudio se empleó un compuesto modelo adoptado previamente en otros experimentos de simulación [59, 60], y que se exhibe en la figura 3.2. En él se substituye el anillo tetrapirrólico por dos ligandos amidinato, lo que conserva al mismo tiempo el esquema de coordinación del hierro y la deslocalización electrónica  $\pi$  en el macrociclo. Esta simplificación preserva el entorno químico del centro metálico reduciendo significativamente el costo computacional. Puesto que uno de nuestros intereses primarios es hallar un método apropiado para describir el sitio activo en la hemoglobina y la mioglobina, los cálculos se efectuaron sobre el complejo de Fe(II), el estado de oxidación formal que presenta el metal en estas proteínas. En tal estado de oxidación el sistema no tiene carga neta y sus electrones suman un número par, por lo cual los valores que puede adquirir la multiplicidad de espín son  $S = 0, 1, 2$ , etc. Los parámetros geométricos del anillo fueron asignados de acuerdo a distancias y ángulos medios correspondientes a diversas porfirinas y compilados por Marques et al. [61]. A fin de reproducir las condiciones en la hemoglobina, el átomo de Fe se une a un ligando imidazol. Evidencia teórica y experimental [51, 61] muestra que, dada la rigidez del anillo, las coordenadas internas de la porfirina no se ven apreciablemente afectadas por la naturaleza del ligando o por el estado de espín. Frente a esta consideración, los parámetros geométricos relativos a los átomos del

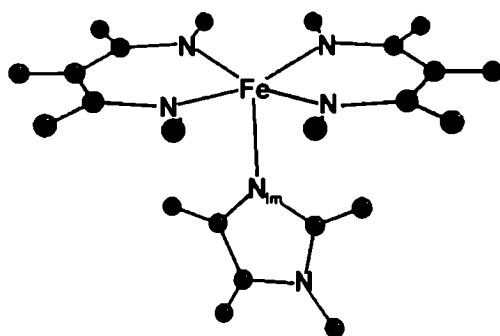


Figura 3.2: Estructura modelo de la hemoporfirina pentacoordinada.

ciclo se mantuvieron invariantes, en tanto la posición del hierro, junto con las distancias y ángulos entre el hemo y los ligandos, fueron optimizados sin restricciones de simetría. Dicho procedimiento pretende introducir en el relajamiento del sistema modelo los mismos grados de libertad que presenta el grupo hemo en la estructura terciaria de la proteína.

### 3.3 Detalles metodológicos

Las simulaciones presentadas en esta parte del trabajo se llevaron a cabo utilizando el programa Gaussian98 [34]. Los cálculos se efectuaron dentro de la aproximación no restringida (UHF), verificando la estabilidad de la función de onda obtenida en cada caso. En la descripción del hierro se usó un conjunto de funciones Gaussianas triple zeta (TZV) propuesto por Schäfer, Huber y Ahlrichs [62], con un patrón de contracción (842111/631/411). Para el resto de los elementos fue empleado un conjunto de base doble zeta con polarización (DZVP) adaptado para DFT por Godbout y colaboradores [63],

cuyos patrones de contracción son (621/41/1) para el carbono, el nitrógeno y el oxígeno, y (41) para el hidrógeno.

A fin de establecer la influencia de efectos relativistas en la estructura electrónica del hierro, fueron calculadas las especies Fe, Fe<sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, y Fe<sup>3+</sup> por medio del potencial efectivo Stuttgart/Dresden [64]. Este pseudopotencial modela un *core* con la estructura del Ne (Fe<sup>16+</sup>), y está construido dentro del formalismo de Dirac-Fock, que contempla el comportamiento cuántico relativista inherente a los electrones internos.

Varias metodologías fueron probadas y comparadas: Hartree-Fock (HF), el método perturbativo de Møller Plesset truncado a orden dos (MP2) [65], DFT, y esquemas híbridos que conjugan HF con la teoría de los funcionales de la densidad. Los cálculos DFT se realizaron en el marco de la aproximación de los gradientes generalizados (GGA), usando el funcional de intercambio de Becke B88 [26] complementado con el funcional de correlación de Perdew [28] o el de Lee-Yang-Parr [27], combinaciones denotadas convencionalmente BP86 y BLYP.

El método híbrido introduce el intercambio de Hartree-Fock en el intercambio y la correlación de DFT, de manera que el término de la energía correspondiente adquiere la siguiente forma general:

$$E_{XC}(\text{hibrido}) = c_1 E_X(\text{HF}) + c_2 E_X(\text{LSDA}) + c_3 \Delta E_X(\text{no - local}) \\ + c_4 E_C(\text{LSDA}) + c_5 \Delta E_C(\text{no - local}) \quad (3.1)$$

donde  $E_X$  y  $E_C$  refieren la energía de correlación y de intercambio respectivamente, y LSDA a la aproximación de Vosko, Wilk y Nusair [23]. La cantidad  $\Delta E(\text{no - local})$ , igual a  $E(\text{GGA}) - E(\text{LSDA})$ , incorpora correcciones por gradiente. En este estudio hacemos uso de dos implementaciones diferentes de la metodología híbrida, ambas propuestas por Becke: los funcionales mixtos B3LYP [30] y *half-and-half* [66]. El primero tiene un origen semiempírico, en tanto los coeficientes  $c_i$  de la ecuación (3.1) fueron ajustados en base a datos termoquímicos. El segundo ha sido derivado como extrapolación lineal de la fórmula de conexión adiabática [67]. Este proceder conlleva a la mezcla por partes iguales del intercambio de Hartree-Fock con el intercambio y la



correlación de la teoría de los funcionales de la densidad. Recurriendo al funcional LSDA para la contribución asociada a DFT, se obtiene la siguiente expresión:

$$E_{XC}(\text{half - and - half}) = \frac{1}{2}E_X(\text{HF}) + \frac{1}{2}E_X(\text{LSDA}) + \frac{1}{2}E_C(\text{LSDA}) \quad (3.2)$$

### 3.4 Estados de espín del átomo de hierro y de sus especies iónicas

Cualquier técnica que pretenda ser aplicada exitosamente a sistemas con metales de transición, y en particular al estudio de procesos que pueden involucrar cambios de espín, debe cuanto menos predecir acertadamente el orden relativo de energías asociado a los diferentes estados electrónicos del átomo neutro y de los iones. El hierro es un elemento de transición de número atómico 26, y de acuerdo a la información espectroscópica presenta en fase gaseosa la configuración  $4s^23d^6$  asociada al término  $5D$ . Si bien este elemento ha sido investigado por medios mecanocuánticos en fases extendidas o en nanoagregados, el número de estudios dedicados a la determinación de las propiedades electrónicas de las especies aisladas es limitado. Harris, Loew y Komornicki reportan que los resultados de cálculos DFT-GGA irrestrictos (UHF) para las transiciones de espín en el ion férrico coinciden satisfactoriamente con valores espectroscópicos [68]. No obstante, parece probable que el acuerdo provenga de que tales cálculos se obtuvieron bajo el esquema restringido para capa abierta (ROHF), que proporciona resultados significativamente distintos a los UHF. Las energías de excitación correspondientes a Fe y Fe<sup>+</sup> fueron asimismo estimadas con el funcional B3LYP por el grupo de Holthausen [69].

Las simulaciones correspondientes a esta sección pretenden delinear un escenario coherente sobre el cual juzgar el comportamiento de ciertos tratamientos *ab initio* y DFT en el caso del hierro. En la tabla 3.1 se presentan las diferencias energéticas experimentales [70] entre los estados de espín de menor energía del hierro atómico e iónico, junto con valores obtenidos mediante varios métodos de estructura electrónica. En los casos del Fe y del ion

**Tabla 3.1** Separaciones energéticas (kcal/mol) calculadas y experimentales [70] entre los dos estados de espín de menor energía de las especies  $\text{Fe}^0$ ,  $\text{Fe}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  en fase gaseosa.

		HF	MP2	BLYP	BP86	B3LYP	h. h.	Exp.
$\text{Fe}^0$	S=1	59.7	21.3	21.4	23.5	26.5	40.4	34.2
	S=2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
$\text{Fe}^+$	S= $\frac{3}{2}$	41.1	1.5	0.0	0.0	0.3	18.5	5.4
	S= $\frac{5}{2}$	0.0	0.0	4.8	3.3	0.0	0.0	0.0
$\text{Fe}^{2+}$	S=1	59.0	54.8	34.8	36.1	38.5	51.1	55.5
	S=2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
$\text{Fe}^{3+}$	S= $\frac{3}{2}$	93.6	87.4	56.8	57.6	62.7	80.8	92.2
	S= $\frac{5}{2}$	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

$\text{Fe}^{2+}$ , los dos estados accesibles a menor energía corresponden al quintuplete y al triplete. Para  $\text{Fe}^+$  y  $\text{Fe}^{2+}$ , estos son cuatriplete y sextuplete. Inspeccionando la información en la tabla 3.1, puede verse que la técnica DFT al nivel GGA subestima sistemáticamente los gaps energéticos, favoreciendo la estabilización de los estados de menor multiplicidad. En cuanto al método de Hartree-Fock, proporciona una buena estimación de la transición en el  $\text{Fe}^{3+}$ , e igualmente para el  $\text{Fe}^{2+}$ . No obstante, no muestra un acuerdo aceptable con el experimento para el  $\text{Fe}^+$  y el Fe. Aparentemente descuidar los efectos de la correlación electrónica es crucial en los últimos dos casos. De hecho, la inclusión de la correlación dinámica por medio de MP2 conduce a un decremento de los gaps, que corrige parcialmente la inexactitud en las especies neutra y de carga uno.

Consideremos seguidamente los funcionales mixtos DFT-HF. Se ha señalado que estas metodologías fueron aplicadas con éxito a una variedad de problemas bioquímicos que involucran elementos de transición [4]. En este caso, los resultados conseguidos con B3LYP aportan mejoras de orden menor, en comparación con los correspondientes cálculos GGA. Un acuerdo más satisfactorio con los experimentos se logra mediante la implementación *half-and-half*. De todas maneras, está claro que ninguno de estos tratamientos consigue la erradicación de los errores, y evidentemente el problema excede la exactitud de cualquiera de ellos. La utilización de esquemas más sofisticados tales como cálculos CI multi-referentes, posiblemente reduzca de modo significa-

**Tabla 3.2** Separaciones energéticas (kcal/mol) entre los dos estados de espín accesibles a menor energía para las diferentes especies del hierro, calculadas con el pseudopotencial relativista de Stuttgart/Dresden.

		HF	MP2	BLYP	BP86	B3LYP	h. h.	Exp.
Fe <sup>0</sup>	S=1	59.1	32.4	19.1	20.6	23.0	39.2	34.2
	S=2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Fe <sup>+</sup>	S= $\frac{3}{2}$	43.7	9.5	0	1.5	2.4	22.4	5.4
	S= $\frac{5}{2}$	0.0	0.0	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0
Fe <sup>2+</sup>	S=1	54.5	56.2	34.2	35.0	37.9	52.9	55.5
	S=2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Fe <sup>3+</sup>	S= $\frac{3}{2}$	88.4	88.6	56.0	56.2	61.7	83.7	92.2
	S= $\frac{5}{2}$	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

tivo estas inexactitudes. Empero, tales tratamientos se hallan hoy día fuera de consideración, siquiera para los modelos más simples de porfirinas con relevancia biológica.

Puesto que los efectos electrónicos relativistas pueden en ocasiones desempeñar un papel significativo en los átomos de los metales de transición, hemos explorado el uso de potenciales de *core* efectivos (ECP) que implícitamente incorporan tales efectos. Los resultados exhibidos en la tabla 3.2 no difieren sustancialmente de los correspondientes a los cálculos que incluyen la totalidad de los electrones dentro de la aproximación no relativista. Al contrario, estos valores indican, en acuerdo con otras investigaciones que aplican el método DFT al Fe y al Fe<sup>+</sup> [71], y al complejo Fe(II)-porfirina [72], que la consideración de factores relativistas mediante el uso de ECPs no altera apreciablemente las energías relativas de los estados de espín de las especies y los compuestos del hierro.

### 3.5 Sistema pentacoordinado

En la tabla 3.3 son presentadas las separaciones energéticas entre los tres estados de espín de menor energía para el modelo pentacoordinado de la figura 3.2, calculadas mediante Hartree-Fock, DFT (BLYP), y los dos métodos híbridos. En la tabla también se muestran dos parámetros estructurales re-

levantes. Uno corresponde a la distancia desde el metal al plano definido por los átomos de nitrógeno de la porfirina modelo, que se designa habitualmente como el desplazamiento fuera del plano ( $d_{\text{Fe-p}}$ ). El otro es la longitud del enlace entre el hierro y el nitrógeno del imidazol ( $d_{\text{Fe-N}_{\text{im}}}$ ). Ambos se hallan estrechamente relacionados con la función del grupo hemo y con sus estados de espín, como se verá más adelante, en este y en los siguientes capítulos. En particular, fueron optimizadas las coordenadas del Fe y la posición relativa del imidazol respecto a la porfirina, con la excepción del grado de libertad asociado a la torsión N-Fe-N<sub>im</sub>-C. Tal restricción fue adoptada en virtud del impedimento estérico existente en la situación fisiológica, el cual, según se cree, previene la rotación del grupo hemo en torno al eje Fe-N<sub>im</sub> [57].

Un examen preliminar de la tabla 3.3 revela que sólo el método de Hartree-Fock y la implementación *half-and-half* predicen correctamente una configuración de alto espín (quintuplete) para el estado fundamental del modelo pentacoordinado. Contradictoriamente, los cálculos BLYP y B3LYP indican un estado fundamental triplete. Obsérvese que tales resultados son consistentes con el error que estos dos métodos cometen al subestimar las energías de transición en el Fe y en sus especies iónicas, tendencia discutida hace un momento. Los valores DFT-GGA son asimismo comparables con aquellos que reportan Rovira y sus colaboradores para un modelo completo de porfirina [51]. Por medio de un esquema DFT adaptado al algoritmo de Car-Parrinello, usando una base de ondas planas y el funcional BP86, en este trabajo se obtiene un estado fundamental triplete para el sistema pentacoordinado. Es posible encontrar una interpretación simple de estos resultados en el contexto de la teoría del campo ligando. Esta procura explicar la estructura electrónica de los complejos de los metales de transición en términos de la distorsión que provocan los ligandos sobre los orbitales *d* del metal aislado. Ahora bien, si el gap entre el estado de espín alto y el intermedio es demasiado pequeño en las especies aisladas del hierro, la perturbación inducida por el campo del ligando puede ser suficiente para estabilizar en la metaloporfirina la configuración triplete por debajo del quintuplete, invirtiendo el orden observado en ausencia del campo. Del mismo modo, si este gap es sobrestimado, como ocurre para las simulaciones HF, la separación

**Tabla 3.3** Separaciones energéticas y parámetros geométricos seleccionados para los diferentes estados de espín del sistema pentacoordinado.<sup>a</sup>

		$E_{rel}^b$	$d_{Fe-p}^c$	Fe-N <sub>im</sub>
HF	singulete	52.6	0.20	2.45
	triplete	37.9	0.17	2.55
	quintuplete	0.0	0.52	2.30
BLYP	singulete	11.4	0.17	1.95
	triplete	0.0	0.12	2.34
	quintuplete	15.7	0.26	2.25
B3LYP	singulete	15.1	0.17	1.98
	triplete	0.0	0.12	2.37
	quintuplete	8.2	0.44	2.21
h. and h.	singulete	36.3	0.16	2.00
	triplete	15.6	0.12	2.33
	quintuplete	0.0	0.25	2.25
Exp. <sup>d</sup>	quintuplete	0.0	0.3 - 0.6	2.1 - 2.2

<sup>a</sup>Energías en kcal/mol y distancias en Å. <sup>b</sup>Energía relativa referida al estado fundamental. <sup>c</sup>Distancia del átomo de Fe al plano de la porfirina.

<sup>d</sup>Datos de las referencias [13] y [77], correspondientes a valores medidos en hemos pentacoordinados de origen sintético y natural.

energética entre el quintuplete y el triplete resultará seguramente excesiva también en el compuesto modelo. Los valores de la tabla 3.3 ponen pues en evidencia la importancia de un tratamiento exacto a nivel de las especies atómicas aisladas para conseguir buenos resultados en la molécula. Desafortunadamente, no nos es posible establecer la calidad de las energías de transición obtenidas mediante los distintos métodos, en tanto no existen medidas experimentales contra las cuales compararlas. Como sea, estamos en posición de anticipar que la tendencia registrada en las especies aisladas se trasladará al comportamiento manifestado en el complejo metálico.

Investigaciones teóricas basadas en un modelo estadístico cuántico sencillo [73] han sugerido la existencia de un equilibrio térmico entre dos estados de espín diferentes en el complejo pentacoordinado. Fenómenos de esta índole han sido efectivamente observados en algunos derivados porfirínicos [74] u otros complejos del hierro [75, 76]. Este argumento justificaría los resultados B3LYP y BLYP a 0 K, que pronostican un estado triplete para el hemo pen-

tacoordinado, cuando los experimentos —correspondientes a temperaturas distintas al cero absoluto— muestran que el estado fundamental de la desoxihemoglobina y de los sistemas modelo es de alto espín. De acuerdo a la hipótesis de la interconversión térmica, a medida que la temperatura asciende el estado de alto espín se observa como consecuencia de las fluctuaciones del átomo de hierro alrededor de su posición de equilibrio. La transición se produce si la distorsión geométrica es tal que estabiliza preferentemente al quintuplete, el cual pasaría a ser el estado fundamental. A fin de aportar nuevos indicios para esclarecer esta conjetura, se llevaron a cabo una serie de cálculos usando los funcionales B3LYP y *half-and-half*, en los que se optimizó la geometría de los estados de espín involucrados, para algunos valores predeterminados de  $d_{\text{Fe-p}}$ . La figura 3.3 muestra las energías de los mínimos correspondientes a cada valor del desplazamiento fuera del plano. Se observa que de acuerdo al funcional *half-and-half* el quintuplete resulta el estado fundamental en todo el rango de  $d_{\text{Fe-p}}$ . Por otra parte, los valores obtenidos con B3LYP son consistentes con la hipótesis de la interconversión: la energía potencial del triplete crece rápidamente, y a desplazamientos poco mayores al de equilibrio se desestabiliza ante el quintuplete. Estos cálculos B3LYP muestran acuerdo con los obtenidos por el grupo de Rovira en el sistema hierro-porfirina usando el funcional BP86 [51].

Cada uno de estos dos métodos plantea otro escenario posible: los dos, sin embargo, son consecuentes con los resultados experimentales, que reportan una configuración quintuplete a temperatura ambiente. De todas maneras, en vista de que ambas implementaciones híbridas adolecen de serias inexactitudes en la estimación de los gaps de las especies atómicas, no es posible en este punto establecer cual de ellas es la más acertada.

Regresando a la tabla 3.3, es posible comprobar que el desplazamiento fuera del plano del hierro en el estado quintuplete exhibe una fuerte dependencia del nivel de teoría, cubriendo un rango que va de 0.25 a 0.52 Å. Esto es una consecuencia natural de la escasa curvatura de la superficie de energía potencial, que se ve en la figura 3.3, y resulta a la vez consistente con que el movimiento del Fe sobre el eje Fe-N<sub>im</sub> es asignado usualmente a

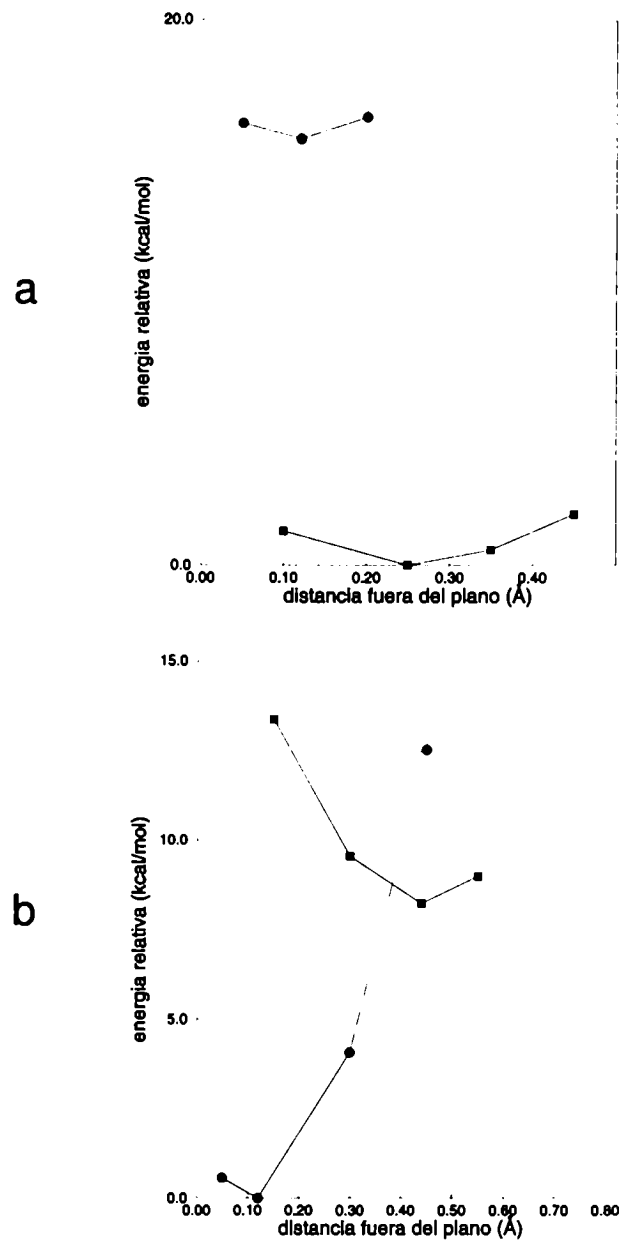


Figura 3.3: Energía del modelo pentacoordinado como función del desplazamiento del Fe fuera del plano, calculada con los funcionales *half-and-half* (a) y B3LYP (b) en los estados triplete (círculos) y quintuplete (cuadrados).

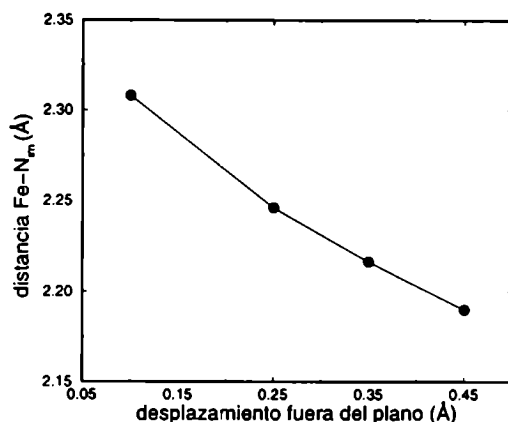


Figura 3.4: Correlación entre la longitud del enlace Fe-N<sub>im</sub> y el desplazamiento del Fe fuera del plano.

un modo normal de baja frecuencia. La amplitud en el rango es también coincidente con los datos recogidos en estructuras hierro-porfirínicas coordinadas al grupo imidazol (sea en hemoproteínas o en sistemas modelo), en las cuales los valores medidos para el desplazamiento del hierro fuera de plano varía en el intervalo 0.3-0.6 Å [13, 77]. Cabe destacar que en lo concerniente a los parámetros estructurales, todos los tratamientos examinados proveen resultados cercanos a los experimentales.

Desviemos por un momento la atención hacia la distancia Fe-N<sub>im</sub>. Si graficamos este parámetro en función del desplazamiento fuera del plano del hierro, podemos obtener ciertas conclusiones de interés. La figura 3.4 ilustra la correlación entre ambos parámetros geométricos tal cual surge de las optimizaciones *half-and-half* en el quintuplete (los cálculos B3LYP proporcionan resultados similares). Es posible notar que la longitud del enlace Fe-N<sub>im</sub> decrece sensiblemente en la medida que el Fe se aleja del plano. Semejante tendencia respalda la idea que propone como causa principal del desplazamiento fuera del plano del metal a la interacción desfavorable entre el ligando axial y los orbitales de los nitrógenos pertenecientes a la porfirina, en contraste con la hipótesis corriente, que atribuye la distorsión a una marcada expansión de la esfera de coordinación en tanto aumenta la multiplicidad del hierro. En efecto, cálculos DFT en la porfirina aislada (tetracoordinada)



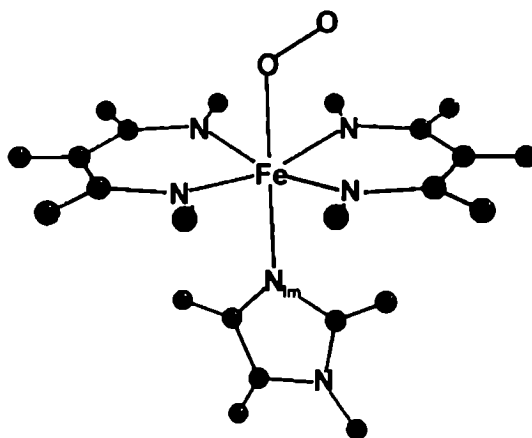


Figura 3.5: Estructura modelo de la hemoporfirina hexacoordinada.

reportan para el estado de alto espín un desplazamiento de  $0.08 \text{ \AA}$ , mientras que ante la presencia de un ligando imidazol esta distorsión se torna cuatro veces superior [51]. Así, la magnitud de  $d_{\text{Fe-p}}$  parece ser con mayor probabilidad el resultado de un balance entre la atracción  $\text{Fe-N}_{im}$  y la repulsión entre orbitales no ligantes, antes que una consecuencia del radio atómico del hierro.

### 3.6 Sistema hexacoordinado

La interacción entre las hemoproteínas y el  $\text{O}_2$  entraña un interés de primer orden, al extremo de constituir el objeto central en una fracción significativa de los estudios dedicados a la investigación en hemoporfirinas. A fin de examinar la aplicabilidad de los métodos híbridos al tratamiento de este problema, hemos acudido a los funcionales *half-and-half* y B3LYP para optimizar una estructura modelo del oxihemo a diferentes multiplicidades de espín. En este sistema, mostrado en la figura 3.5, el hierro se encuentra hexacoordinado, y de acuerdo a la información experimental, la molécula de  $\text{O}_2$  se une axialmente en una configuración angular, formando un complejo de bajo espín. Las optimizaciones parciales llevadas a cabo sobre este modelo comprendieron los mismos grados de libertad estructurales minimizados en

**Tabla 3.4** Separaciones energéticas y parámetros geométricos relevantes para los diferentes estados de espín del sistema hexacoordinado.<sup>a</sup>

		$E_{rel}^b$	Fe-N <sub>im</sub>	Fe-O	O-O	Fe-O-O
B3LYP	singulete <sup>c</sup>	0.0	2.31	2.13	1.26	119.7
	singulete	19.7	2.15	1.77	1.28	123.5
	triplete	3.0	2.18	1.92	1.30	118.9
	quintuplete	10.8	2.40	2.08	1.27	126.1
half and half	singulete	53.8	2.10	1.82	1.25	124.2
	triplete	23.7	2.09	1.88	1.28	117.3
	quintuplete	0.0	2.35	1.90	1.29	125.2
Exp. <sup>d</sup>	singulete	0.0	2.12	1.95	1.25	117.5

<sup>a</sup>Energías en kcal/mol y distancias en Å. <sup>b</sup>Energía relativa referida al estado fundamental. <sup>c</sup>Estado de capa abierta. <sup>d</sup>Datos cristalográficos [78].

el sistema pentacoordinado, más las coordenadas de la molécula de oxígeno. La tabla 3.4 expone alguno de los parámetros geométricos, junto con las diferencias energéticas entre estados de espín.

El método B3LYP establece que el estado fundamental correspondiente a este sistema es un singulete de capa abierta. Los estados singulete de capa cerrada, triplete, y quintuplete, se sitúan 19.7, 3.0, y 10.8 kcal/mol por encima del estado de mínima energía, respectivamente. El análisis de la densidad de espín, calculada como

$$\rho^{spin}(A) = \sum_{\mu} [P_{\mu\mu}^{\alpha} - P_{\mu\mu}^{\beta}] S_{\mu\mu} \quad (3.3)$$

con  $P_{\mu\mu}$  y  $S_{\mu\mu}$  los elementos de la matriz densidad y del solapamiento, respectivamente, y  $\mu$  refiriendo las funciones de base centradas en el átomo A, revela que en el singulete de capa abierta los electrones desapareados se concentran claramente en los átomos de oxígeno y sobre el hierro. En efecto, la densidad de espín resulta muy cercana a cero en todos los átomos, con excepción del Fe, donde vale aproximadamente -1, y de los oxígenos, que en conjunto suman 1, compensando la densidad negativa en el metal. Esta imagen se aproxima al modelo propuesto por Goddard para describir la unión Fe-O<sub>2</sub> [79, 80], consistente en un estado diamagnético con dos orbitales semiocupados, uno de ellos con carácter  $d$  y el otro  $\sigma_{\pi}$ . Rovira y Parrinello [81], por otra parte, obtienen consistentemente un singulete de capa abierta para

el estado fundamental del complejo hexacoordinado, con una distribución de espín de  $+0.88/-0.88$  localizada en los orbitales  $d$  del hierro y  $\pi^*$  del  $O_2$ .

Opuestamente a estos resultados, el funcional *half-and-half* predice un estado fundamental quintuplete, seguido por un singulete de capa abierta, un triplete, y un singulete de capa cerrada, distantes en 20.7, 23.7, y 53.8 kcal/mol, respectivamente. Tal ordenamiento está en contradicción con la evidencia experimental que indica que la estructura electrónica del oxihemo y de los sistemas modelo hexacoordinados corresponden a una configuración singulete [13, 54, 55]. Los resultados provistos por el método *half-and-half* parecen ser consistentes con la tendencia que ha demostrado al favorecer las configuraciones de alto espín, que se manifiesta especialmente en las especies Fe y  $Fe^+$ . Teniendo esto presente, es esperable que DFT al nivel GGA proporcione un estado fundamental singulete. De hecho, en los estudios citados de Rovira [51, 81], se informa la obtención mediante el funcional BP86 de un singulete de capa cerrada muy próximo al singulete de capa abierta, ambos mucho más estables que los estados de multiplicidad alta.

### 3.7 Algunas consideraciones generales

Hemos visto que las distintas aproximaciones mecanocuánticas ofrecen diferencias significativas en la determinación del orden de los estados de espín de los modelos penta y hexa coordinados. Tales discrepancias pueden adscribirse a los correspondientes errores en la descripción del metal aislado. La omisión de los efectos de correlación electrónica conduce a serias inexactitudes en las energías de transición, como puede apreciarse revisando los resultados de los cálculos Hartree-Fock. El esquema DFT que corresponde al funcional *half-and-half* proporciona estimaciones consistentes con la información experimental para las especies atómicas del hierro y para el sistema pentacoordinado, pero falla al ser aplicado al caso hexacoordinado. Por su parte, el funcional B3LYP brinda una descripción plausible del complejo hexacoordinado, pero para que los cálculos en el sistema pentacoordinado resulten compatibles con los experimentos, debe asumirse la existencia de un

equilibrio térmico que provoca la interconversión de espín. Sumariando esta situación, podemos afirmar que aquellos métodos con propensión a favorecer los estados de alta multiplicidad en el hierro atómico e iónico responderán correctamente —en un sentido cualitativo— en el sistema pentacoordinado pero ofrecerán una descripción deficiente de la porfirina hexacoordinada. Lo opuesto será cierto para aquellos tratamientos con tendencia a estabilizar las configuraciones de bajo espín. El problema recuerda al de una manta excesivamente corta, tal que cuando se tira de ella para cubrir el cuello, se dejan a la intemperie los pies.

Es esperable que resultados más cercanos a los experimentales puedan conseguirse con el uso de DFT, a través del perfeccionamiento del funcional de intercambio y correlación. En tal sentido, la exploración de los funcionales de intercambio exacto [32] podría devenir en una herramienta sumamente valiosa para el tratamiento de sistemas con metales de transición como el presente, donde el estado de espín parece ser resultado de efectos sutiles a nivel electrónico y geométrico. Por lo pronto, ciñéndonos a lo visto en este capítulo, los esquemas híbridos no son suficientes para suprimir las inexactitudes asociadas a los métodos de los que provienen, esto es, Hartree-Fock y DFT. Aun así, el esquema B3LYP y las aproximaciones GGA se muestran adecuadas en cuanto a la descripción de geometrías, y pueden resultar eficientes en investigaciones estructurales o para el estudio de interacciones que no involucren cambios en el espín. Por el contrario, la aplicación de estos métodos a la obtención de energías de unión, por ejemplo, al  $O_2$ , proceso que supone una transición de quintuplete a singulete, derivará en resultados poco fiables y de escaso valor cuantitativo.



## Capítulo 4

# Inhibición del citocromo P450 por el óxido nítrico

### 4.1 Acerca del citocromo P450

Bajo la denominación citocromo P450<sup>1</sup> se engloba a un conjunto de hemoenzimas que intervienen en la oxidación de diferentes compuestos de gran diversidad estructural. Estas enzimas se conocen como monoxigenasas, por catalizar la incorporación de un átomo de O<sub>2</sub> a un sustrato, en tanto el otro átomo es reducido a H<sub>2</sub>O. Son responsables de transformaciones fisiológicas esenciales y están a la vez involucradas en la detoxificación de sustancias potencialmente peligrosas [82, 83, 84, 85]. Entre sus funciones, por cierto, se encuentra la catálisis de las reacciones de hidroxilación vinculadas a la síntesis de todas las hormonas esteroides. El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa y reactiva que toma parte en la regulación de un amplio número de funciones biológicas. Varias líneas de evidencia indican que el NO podría afectar la esteroideogénesis, y se ha sugerido que el citocromo P450 constituye el blanco de acción de esta pequeña molécula [86, 87].

A pesar de que el ciclo catalítico de la enzima se conoce en detalle, el mecanismo por el cual el óxido nítrico modula la actividad del P450 no ha sido establecido de un modo inequívoco. Esta familia de citocromos se caracteriza

---

<sup>1</sup>En lo sucesivo adoptaremos la designación usual P450 para referirnos a este citocromo.

**Tabla 4.1** Parámetros cristalográficos de hierro porfirinas con un ligando cisteína, correspondientes a diferentes hemoenzimas (distancias en Å, ángulos en grados).

	Estructuras de rayos X			
	P450 Bm3 <sup>c</sup>	P450 Bm3 <sup>d</sup>	P450 Cam <sup>e</sup>	CPO <sup>f</sup>
nro de coord. <sup>a</sup>	6	6	5	5
Fe-N <sup>b</sup>	1.99	1.99	2.02	2.04
Fe-S	2.04	2.11	2.34	2.35
Fe-O	1.95	1.89	-	-
Fe-S-C	111.7	107.6	108.8	107.5
S-Fe-O	177.3	176.3	-	-

<sup>a</sup>El centro metálico es penta o hexa coordinado, dependiendo de las condiciones experimentales. <sup>b</sup>Distancia promedio de los cuatro enlaces. <sup>c</sup>Referencia [93]. <sup>d</sup>Referencia [96]. <sup>e</sup>Referencia [97]. <sup>f</sup>Referencia [98].

por contener una cisteína en el sitio proximal, de manera que la unión entre el grupo hemo y la proteína se verifica a través de un puente tiolato entre el hierro y el átomo de azufre de este aminoácido (ver figura 4.1). En la primera etapa del ciclo, el citocromo libre de substrato retiene una molécula de agua axialmente coordinada al Fe. Tras unirse al substrato, la molécula de H<sub>2</sub>O es liberada y el centro metálico es reducido de Fe(III), el estado de oxidación basal, a Fe(II) [82, 83, 84, 85]. Un aumento de la multiplicidad acompaña esta transformación, en acuerdo con la correlación entre número de coordinación y estado de espín observada en hierro-porfirinas. En efecto, se conoce que la mayor parte de las hierro-porfirinas pentacoordinadas presentan un estado de alto espín [61]. El siguiente paso en el ciclo enzimático involucra la unión a O<sub>2</sub>, y la subsecuente restitución a la configuración de bajo espín. De acuerdo a las hipótesis corrientes, este paso es sucedido por la formación de una especie con carácter de superóxido férrico, que precipita la reducción del metal a expensas de la hidroxilación del substrato, tras lo cual el centro reactivo retorna al estado férrico hexacoordinado y de baja multiplicidad. En este capítulo examinamos la interacción entre el Fe(III)-hemo del citocromo y el óxido nítrico, como una vía de inactivación de la proteína. Nuestro propósito es analizar la factibilidad termodinámica para el desplazamiento del H<sub>2</sub>O por NO, proceso que eventualmente bloquearía el sitio activo.

Si bien existen antecedentes en la investigación del citocromo P450 por métodos teóricos, hasta el momento no se reportan estudios específicos sobre la interacción con NO. Casi una década atrás, Danni Harris y Gilda Loew intentaron por métodos semiempíricos explicar la correlación entre el espectro y los estados de espín del citocromo férrico [88]. Más recientemente, el grupo de de Groot [89] obtuvo por simulación *ab initio* las estructuras optimizadas de los complejos de alto espín de Fe(II) y Fe(III)-porfirinas coordinadas a un ligando SCH<sub>3</sub>, para modelar el sitio activo pentacoordinado del P450. Harris, Loew y Waskell [90], recurriendo al método DFT dentro de la aproximación de los gradientes generalizados (GGA), calcularon dos intermediarios oxidativos del ciclo de mono-oxigenación del citocromo sobre la base del mismo sistema modelo. Paralelamente Green, usando asimismo DFT, realizó un análisis de la naturaleza de la unión hierro-azufre y el rol del ligando axial tiolato en relación al espín del citocromo P450 en estado basal [91]. A principios del año 2002 Pudzianowski presentó un artículo que explora la inhibición de la enzima a causa de distintos ligandos orgánicos por medio de la técnica semiempírica SAM1 [92]. Por los motivos expuestos en los capítulos previos, la teoría de los funcionales de la densidad ha sido a menudo utilizada y continúa siendo la opción más frecuente para el cálculo de estos sistemas. En el presente estudio empleamos DFT en combinación con el método SAM1 para establecer los estados de espín del acuo-complejo y del aducto nitrosilado del hemo en el citocromo P450 férrico, e investigar el balance energético correspondiente al intercambio de ligandos. Asimismo, a fin de estimar en qué medida la proteína afecta la estructura electrónica del sitio activo, efectuamos una serie de cálculos usando un esquema híbrido cuántico clásico, que incluye el campo electrostático asociado a una distribución de cargas puntuales representando el resto de la enzima. El subsistema cuántico seleccionado para modelar el sitio activo consiste en la hierro-porfirina más el residuo de cisteína, con una geometría derivada de la estructura de rayos X de un P450 nativo [93]. Hemos incluido el aminoácido completo en el subsistema cuántico para retener los efectos de los átomos inmediatos sobre la densidad electrónica del azufre, involucrada directamente en el comportamiento del complejo metálico. Las simulaciones suministran información que concierne a las energías relativas, la densidad de espín, y la distribución



de carga en términos de orbitales unielectrónicos. En varios sentidos, estos resultados contribuyen a la interpretación y la comprensión de los mecanismos de inhibición del P450 en particular, y, en un contexto más amplio, a la química entre el hemo y el óxido nítrico.

## 4.2 Modelo computacional

### El sitio activo

El sistema empleado para modelar el sitio activo comprende la hierro-porfirina más el residuo de cisteína adyacente al metal, incluyendo los enlaces peptídicos (ver figura 4.1). Con el objeto de describir la enzima libre de sustrato, las simulaciones se efectuaron sobre los complejos de hierro(III). En este estado de oxidación el sistema no tiene carga neta, y el número total de electrones es impar. Consiguientemente, cuando el ligando es  $H_2O$ , los tres estados de espín de menor multiplicidad corresponden al doblete, cuatriplete y sextuplete, que devienen en un singulete, un triplete y un quintuplete si el ligando es NO.

La geometría corresponde a la estructura cristalográfica del citocromo P450 monoxigenasa reportada en la referencia [93] y compendiada en la tabla 4.1. Los sustituyentes laterales de la protoporfirina fueron omitidos, y los hidrógenos se añadieron a la estructura de rayos X usando la interfase HyperChem 5.1 Pro [94]. La estructura cristalina corresponde al citocromo libre de sustrato, en el que una molécula de agua se halla coordinada al hierro. Teniendo en cuenta el hecho que en la proteína el sitio activo está restringido a una geometría que no estaría representada por una relajación en el vacío, hemos evitado optimizar el acuo-complejo. Puesto que las interacciones que emergen del empaquetamiento entre las macromoléculas del cristal son menores e indirectas, mediadas por una o varias capas de solvente, raramente afectan la estructura global de la proteína, más allá de algunas cadenas laterales [2]. Consecuentemente, hemos juzgado que las coordenadas de rayos X representan más exactamente la enzima activa que la estructura optimizada en el vacío. En el caso del aducto nitrosilado, para el cual no se

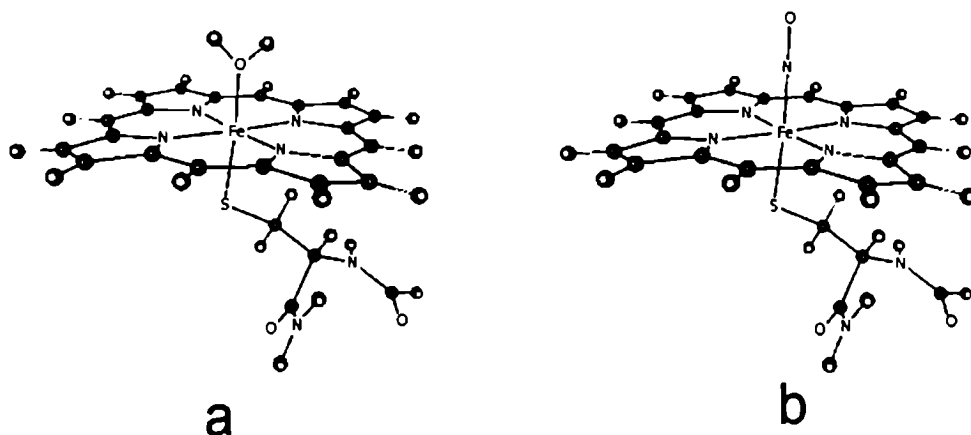


Figura 4.1: Modelo del sitio activo del citocromo P450: (a) complejo acuoso; (b) complejo nitrosilado.

encuentran disponibles estructuras cristalográficas, hemos asumido la misma geometría del sitio activo, relajando la posición de la molécula de NO a través de cálculos SAM1 (Semi Ab initio Method, version 1 [21, 95]).

#### Validación del método SAM1

La técnica SAM1 se aplicó bajo el esquema irrestricto (UHF) en todos los casos. A fin de establecer su exactitud en el cálculo de los sistemas en cuestión, se llevó a cabo un estudio preliminar donde el método semiempírico fue testeado sobre diferentes compuestos de coordinación del hierro y sobre hemoporfirinas unidas a ligandos diatómicos. La tabla 4.2 presenta algunos de los parámetros geométricos obtenidos para los complejos  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  y  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ , junto con los resultados de cálculos DFT y los correspondientes valores experimentales. Se ha señalado que, en este tipo de sistemas, las simulaciones DFT efectuadas usando la aproximación de la densidad local (LDA) tienden a subestimar ligeramente las distancias metal-ligando, si bien el acuerdo con los experimentos es similar al que ofrecen los cálculos GGA [103]. La calidad a nivel global de las optimizaciones practicadas con SAM1 en estos compuestos es similar a la obtenida usando DFT-GGA.

El método semiempírico fue además probado sobre ferro-porfirinas con ligandos diatómicos. La tabla 4.3 exhibe los resultados de las relajaciones

**Tabla 4.2** Parámetros geométricos relevantes<sup>a</sup> de los aniones  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  y  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$  (distancias en Å, ángulos en grados).

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$				
	SAM1	DFT-GGA <sup>b</sup>	DFT-LDA	Exp <sup>c</sup>
Fe-C	2.000	1.976	1.886	1.93
C-N	1.172	1.197	1.192	1.17
$[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$				
	SAM1	DFT-GGA <sup>d</sup>	DFT-LDA	Exp <sup>e</sup>
Fe-C <sub>eq</sub> <sup>f</sup>	1.967-1.971	1.948-1.960	1.896-1.900	1.928-1.936
Fe-NO	1.592	1.652	1.621	1.652
(C-N) <sub>ax</sub>	1.156	1.180	1.175	1.150
(C-N) <sub>eq</sub>	1.153	1.181	1.173	1.153
C <sub>eq</sub> -Fe-C <sub>eq</sub>	170.7	168.8	167.7	169.1

<sup>a</sup>Los datos SAM1 y DFT-LDA se obtuvieron en el marco del presente trabajo. <sup>b</sup>Referencia [99]. <sup>c</sup>Referencia [100]. <sup>d</sup>Referencia [101]. <sup>e</sup>Referencia [102]. <sup>f</sup>Aparecen dos valores debido a que los cuatro enlaces ecuatoriales Fe-C no son equivalentes.

estructurales, e incluye los valores provenientes de cálculos DFT-GGA, y de mediciones experimentales en sistemas modelo. Las geometrías optimizadas con SAM1 resultan comparables o incluso de calidad superior respecto a las obtenidas por aproximaciones más exactas, con errores en las distancias y ángulos que no sobrepasan el 4% al contrastar con los experimentos. Una excepción es la longitud X-O, sobrestimada sistemáticamente por SAM1; esto también se observa en el caso de DFT, especialmente para el ligando nitrosilo. A este respecto, se ha sugerido que la distancia N-O se halla sensiblemente subestimada en la estructura cristalina [51]. A fin de establecer la confiabilidad de los cálculos sobre los estados de espín de mayor energía, el complejo Fe(II)-porfirina aislado (tetracoordinado) fue parcialmente optimizado a tres multiplicidades distintas. Para el estado fundamental SAM1 predice un triplete, en coincidencia con lo que se ha establecido experimentalmente para compuestos relacionados, como la Fe(II)-tetrafenilporfirina [107]. Las energías de excitación adiabática a los estados singulete y quintuplete resultan 11.9 y 14.6 kcal/mol, respectivamente, mientras que las diferencias energéticas que surgen de simulaciones DFT [51] son de 12.7 y 14.7 kcal/mol.

**Tabla 4.3** Parámetros estructurales para los complejos de hierro(II)-porfirina con ligandos diatómicos XO (X=C, N, O) optimizados con SAM1 (distancias en Å, ángulos en grados).

		FePCO	FePNO	FePO <sub>2</sub>
Fe-X	SAM1	1.72	1.65	1.76
	DFT	1.69	1.69	1.74
	exp	1.77	1.71	1.75
X-O	SAM1	1.20	1.18	1.26
	DFT	1.17	1.19	1.28
	exp	1.12	1.12	1.15-1.17 <sup>a</sup>
Fe-X-O	SAM1	180	153	115
	DFT	180	150	123
	exp	179	149	120 <sup>b</sup>
Fe-N <sub>p</sub>	SAM1	2.03	2.00	2.01
	DFT	1.99	2.02	2.00
	exp	2.02	2.00	1.98
referencias	SAM1	esta tesis	esta tesis	esta tesis
	DFT	[51]	[51]	[51]
	ex	[104]	[105]	[106]

En el caso de las especies CO y O<sub>2</sub>, existe un ligando trans imidazol. El complejo FePNO, en cambio, es pentacoordinado. Fe-N<sub>p</sub> indica la distancia media a los nitrógenos del anillo. <sup>a</sup>La separación O-O es extremadamente corta si se la compara con la distancia de 1.21 Å en el oxígeno molecular. La causa podría estar relacionada con cierto error en la resolución de la estructura experimental [106]. <sup>b</sup>El ángulo Fe-O-O varía de una estructura cristalina a otra. Por cierto, la curvatura de la superficie de energía potencial provista por SAM1 resulta apreciablemente suave entre 110 y 125°. 120° es el valor medio en oxihemoglobina [77].

### Cálculos DFT

Una implementación Gaussiana de DFT (programa Molecule [33]) fue utilizada para calcular las energías a geometría fija del sitio activo coordinado a H<sub>2</sub>O y a NO. En esta el procedimiento autoconsistente de Kohn-Sham se aplica a la obtención de la densidad electrónica y la energía a través de la expansión de un conjunto de orbitales unielectrónicos. Los elementos de matriz del potencial de intercambio y correlación son calculados mediante un algoritmo de integración numérica [35]. Funciones de base doble zeta con polarización (DZVP) desarrolladas para DFT por el grupo de Godbout [63] fueron empleadas en la representación de los átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, y azufre. Para el hierro fue escogida la base DZV definida en la referencia [108]. Los patrones de contracción corresponden a (4333/431/41) para el Fe, (6321/521/1) para el S, (41) para el H, y (621/41/1) para el C, el N, y el O. Para las bases auxiliares usadas en la expansión de la densidad electrónica estos son (1111111/11/11) para el C, el N, y el O [109, 110], (1111111111111/111/111) para el Fe [108], (111111111/1111/1111) para el S [63], y (1111) para el H [63]. Los cálculos se efectuaron dentro de las aproximaciones LDA y GGA. Para el primer caso se adoptó el funcional de Vosko-Wilk-Nusair [23]. Para el segundo se utilizó la combinación de los funcionales de Becke [26] y Perdew [28] para el intercambio y la correlación.

### El esquema híbrido clásico cuántico

Los efectos del entorno proteico sobre la estructura electrónica del sitio activo fueron modelados por medio de un esquema mixto de mecánica cuántica y mecánica molecular (QM-MM) [111]. El subsistema QM corresponde al modelo de sitio activo descrito arriba. Para el subsistema clásico, fueron considerados 7091 átomos dentro de un radio de corte (*cutoff*) de 30 Å desde el centro metálico. La figura 4.2 muestra la estructura de rayos X del citocromo, realzando los átomos explícitamente incluidos en la simulación. La energía total está dada por la suma de la energía del subsistema cuántico  $E_{qm}$  y la del acoplamiento  $E_{qm-mm}$ , según se explica en la sección 2.7. El campo electrostático de la proteína fue representado por un conjunto de cargas atómicas puntuales asignadas según la parametrización AMBER [41]. La contribución del término puramente clásico  $E_{mm}$ , dependiente de las cargas

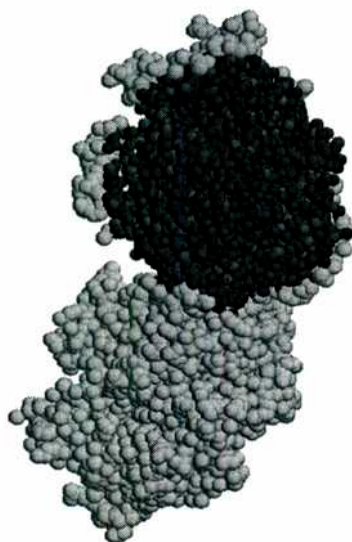


Figura 4.2: Estructura cristalina del citocromo P450 Bm3. La enzima posee dos cadenas, cada una de las cuales contiene un grupo hemo. Los átomos excluidos del cálculo (fuera del radio de corte) se exhiben en un tono más claro. La estructura fue extraída de la referencia [93].

parciales y de sus coordenadas, no fue considerada puesto que permanece constante y su aporte a las diferencias energéticas es nulo.

### 4.3 El sitio activo en el estado basal

El complejo coordinado a una molécula de  $H_2O$  es un modelo del P450 en su estado basal. En la tabla 4.1 pueden hallarse los parámetros estructurales cristalográficos del sistema usado en las simulaciones, junto con los correspondientes valores para otras tres hierro-porfirinas hexa y penta coordinadas con un ligando cisteína. Es interesante notar cómo el número de coordinación determina el desplazamiento del hierro fuera del plano de la porfirina. La asimetría en la esfera de coordinación distorsiona la posición del metal, lo cual se ve reflejado en las distancias Fe-N. No es siempre posible definir de un modo unívoco la distancia fuera del plano, ya que los átomos de nitrógeno del anillo no se sitúan necesariamente sobre un plano. De todas maneras, independientemente del plano escogido, el desplazamiento observado en este

**Tabla 4.4** Energías relativas para los diferentes estados de espín (kcal/mol). R-FeP indica la Fe(III)-porfirina más el residuo de cisteína.

	R-FeP-H <sub>2</sub> O		
	doblete	cuatriplete	sextuplete
fase gas, LDA	0	53.9	88.5
fase gas, GGA	0	41.6	-
proteína, GGA	0	35.1	-
fase gas, SAM1	0	12.8	49.1

	R-FeP-NO		
	singulete	triplete	quintuplete
fase gas, LDA	0	18.1	61.0
fase gas, GGA	0	12.6	52.8
proteína, GGA	0	16.0	-
fase gas, SAM1	0	27.0	29.2

caso para el citocromo P450 Bm3 es bastante pequeño (inferior a 0.1 Å), característico de las hierro-porfirinas de bajo espín [61]. Los cálculos convalidan esta regla empírica. En la tabla 4.4 se muestran las energías relativas de los estados de espín más estables, halladas mediante las distintas metodologías cuánticas: todas coinciden en que el estado fundamental corresponde a un doblete. Cabe señalar que los valores de la tabla 4.4 no representan las transiciones adiabáticas, sino las diferencias energéticas verticales, que resultan de los cálculos a geometría fija de la estructura de rayos X, a la que identificamos con el estado fundamental. Luego, asumimos que la configuración de espín asociada al estado fundamental es la que produce la mayor estabilización en la energía electrónica de la estructura experimental.

Según puede apreciarse, los distintos tratamientos concuerdan respecto al orden relativo de los estados de espín. Aun en el caso de SAM1, que predice las diferencias energéticas más pequeñas, estas son lo suficientemente importantes para suponer que el acuo-complejo presentará una configuración de bajo espín. En el capítulo precedente se discutieron las falencias del método DFT para establecer el orden relativo asociado a las energías de los estados de espín de las Fe-hemoporfirinas. Por lo visto entonces, podemos decir que la exactitud de las diferencias energéticas exhibidas en la tabla

**Tabla 4.5** Poblaciones de Mulliken de espín desapareado para el estado fundamental del acuo-complejo, calculadas mediante DFT al nivel GGA.<sup>a</sup>

	Fe	S	O (H <sub>2</sub> O)	C <sub>t</sub> <sup>b</sup>
fase gas	0.568	0.437	0.011	0.022
proteína	0.635	0.363	0.017	0.018

<sup>a</sup>Los átomos no exhibidos presentaron valores inferiores a 0.01. <sup>b</sup>C<sub>t</sub> alude al carbono alifático terciario de la cisteína.

4.4 es altamente cuestionable. No obstante, en lo que concierne al orden relativo de multiplicidades, se estableció que la teoría de los funcionales de la densidad brinda una descripción cualitativamente correcta de las especies hexacoordinadas, y es de esperar que también este caso la tendencia sea acertada. Un estudio reciente sobre el ion férrico hexa acuo, [Fe(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup>, ha mostrado que DFT al nivel GGA proporciona valores de energía razonables para las transiciones verticales entre estados de espín, una propiedad que resulta sobrestimada por las técnicas convencionales *ab initio* como Hartree-Fock o MP2 en el caso del complejo férrico [68].

Las poblaciones de Mulliken de espín desapareado ofrecen información muy interesante concerniente a la reactividad del complejo. La tabla 4.5 reúne las poblaciones sobre el Fe y los átomos próximos calculada según la ecuación (3.3). Los valores LDA (no incluidos) no difieren significativamente de los GGA. La densidad de electrón desapareado se distribuye esencialmente en torno a dos átomos: el hierro y el azufre. El oxígeno adyacente no comparte apreciablemente esta densidad de espín, aun cuando la distancia Fe-O es algo menor que el enlace Fe-S. Una localización tan pronunciada del electrón desapareado será importante en cuanto a la reactividad del sitio activo, en particular frente a un agente radical como el NO. La tabla 4.5 sugiere que la afinidad de una especie radical por el átomo de azufre unido al hierro no debe ser menospreciada. Más exactamente, es esperable una competencia entre el Fe y el S como aceptores de la densidad de espín desapareado del óxido nítrico. Cálculos previos realizados mediante el método mixto B3LYP [91] para el acuo-complejo de la Fe(III) S-metil porfirina indican que en el estado sextuplete una fracción apreciable de la densidad de espín (más del



10%) se concentra en el átomo de azufre. No obstante, esto no se observa en el estado fundamental doblete, para el cual prácticamente toda la densidad se asienta sobre el hierro. Las discrepancias entre tales resultados y los nuestros acaso deban su origen a la diferencia entre los sistemas modelo (y los funcionales). En el trabajo citado la cisteína se sustituye por un grupo SCH<sub>3</sub>; no es impensable que este truncamiento afecte en alguna medida la distribución del electrón desapareado en los átomos inmediatos.

Un medio conveniente de evaluar la reactividad del sistema es a través de la denominada función de Fukui,  $f(\mathbf{r})$ , que constituye por cierto el índice de reactividad natural en el contexto de la teoría de los funcionales de la densidad [22]. Esta función es la derivada funcional del potencial químico  $\mu$  respecto al potencial externo  $v$ , equivalente a la derivada de la densidad de carga respecto al número de electrones  $N$ .

$$f(\mathbf{r}) = \left[ \frac{\delta \mu}{\delta v(\mathbf{r})} \right]_N = \left[ \frac{\partial \rho(\mathbf{r})}{\partial N} \right]_v \quad (4.1)$$

Consideremos la derivada de la densidad,  $\partial \rho / \partial N$ : en general tendrá un límite por la derecha y otro por la izquierda, denotados respectivamente  $f^+(\mathbf{r})$  y  $f^-(\mathbf{r})$ . El primero se refiere a la variación en la densidad cuando el número de electrones se incrementa infinitesimalmente de  $N$  a  $N + \delta$ . En ese caso, el cambio en la densidad se producirá en las regiones del espacio más favorables a aceptar la carga adicional, es decir, en el primer orbital molecular desocupado (LUMO). Análogamente, el aumento desde  $N - \delta$  a  $N$  afectará en particular la región delimitada por el orbital ocupado de mayor energía (HOMO). Luego, con tal que la función de Fukui esté normalizada,  $\int f(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = 1$ , puede escribirse:

$$f^+(\mathbf{r}) = \left[ \frac{\partial \rho(\mathbf{r})}{\partial N} \right]_v^+ \approx \rho^{LUMO}(\mathbf{r}) \quad (4.2)$$

$$f^-(\mathbf{r}) = \left[ \frac{\partial \rho(\mathbf{r})}{\partial N} \right]_v^- \approx \rho^{HOMO}(\mathbf{r}) \quad (4.3)$$

Volvamos al significado físico de  $f(\mathbf{r})$ . Conceptualmente, se trata de una medida de la sensibilidad de  $\mu$  ante una perturbación externa. En el marco de la teoría propuesta por Fukui y sus colaboradores (*frontier-electron theory*,

[112]), es el índice espacial de la susceptibilidad química:  $f^+(\mathbf{r})$  mide la reactividad respecto de un agente nucleofílico,  $f^-(\mathbf{r})$  respecto a uno electrofílico, y el promedio de ambas,  $f^0(\mathbf{r})$ , caracteriza la reactividad frente a una especie radicalaria.

$$f^0(\mathbf{r}) = \frac{1}{2} [f^+(\mathbf{r}) + f^-(\mathbf{r})] \approx \frac{1}{2} [\rho^{HOMO}(\mathbf{r}) + \rho^{LUMO}(\mathbf{r})] \quad (4.4)$$

La figura 4.3(a) reproduce un contorno tridimensional de isodensidad de  $f^0(\mathbf{r})$ , correspondiente a la distribución electrónica proveniente del cálculo DFT-GGA en vacío. Puede apreciarse que las contribuciones principales proceden de los orbitales  $p$  y  $d$  del azufre y del hierro. Una inspección de los coeficientes orbitales conduce a la misma conclusión, aunque de un modo menos gráfico. Esta evidencia, añadida al análisis de las poblaciones de Mulliken de espín desapareado (tabla 4.5), confirma que el ataque del NO estará en esencia dirigido sobre alguno de estos dos átomos. De hecho, se cree que el óxido nítrico es capaz de unirse al átomo de azufre en el residuo proximal del P450, y se ha sugerido que esta reacción podría asimismo ser causante de la inhibición del citocromo. Existe evidencia experimental [87] que indica que el NO puede interactuar con el P450 de dos maneras: a través de una unión reversible al hemo, formando complejos nitrosilados del hierro, o también por intermedio de una nitrosilación del tiolato proximal, lo que provocaría una inactivación irreversible.

## 4.4 El complejo nitrosilado

Según se menciona más arriba, no se encuentran disponibles geometrías experimentales para el citocromo P450. Por causa de la rigidez del anillo, las coordenadas internas en las distintas porfirinas no presentan mayores diferencias debidas a los sustituyentes o al esquema de coordinación, como se observa al comparar datos experimentales o resultados teóricos. Por tal razón se asumió la misma estructura para el sistema nitrosilado que para el acuo-complejo. Una molécula de óxido nítrico se situó en reemplazo del ligando  $H_2O$ , y sus coordenadas se optimizaron usando el método SAM1. La

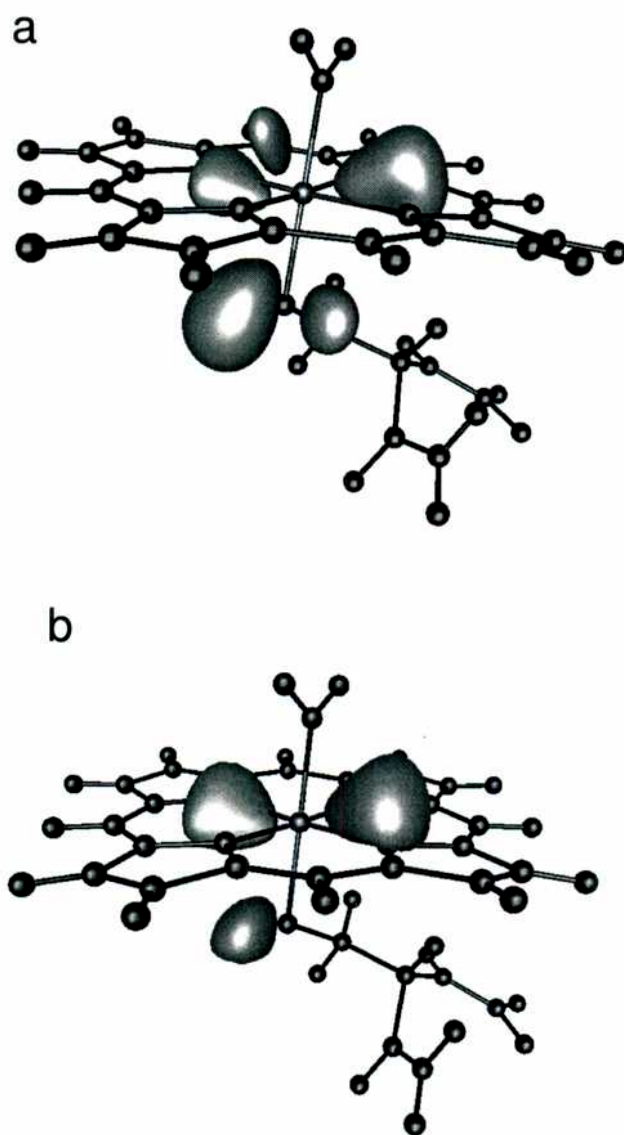


Figura 4.3: Superficies de isodensidad de Fukui para el acuo-complejo: (a) en vacío; (b) en la proteína. Los contornos corresponden a  $f^0(\mathbf{r}) = 0.075$  au.

**Tabla 4.6** Parámetros geométricos optimizados con SAM1 para el sitio activo nitrosilado (distancias en Å, ángulos en grados).

	singulete	triplete	quintuplete	experimental <sup>a</sup>
Fe-N-O	178.7	151.1	143.3	175.6 (3.0)
Fe-N	1.70	1.80	1.92	1.66 (0.05)
N-O	1.17	1.17	1.18	1.11 (0.08)

<sup>a</sup>Los valores experimentales son promedios evaluados sobre siete sistemas modelo [114], con los desvíos estándar entre paréntesis.

geometría inicial se estableció a semejanza de la que se observa para el NO en la nitroso-hemoglobina [78]. En la tabla 4.4 se muestran las energías relativas asociadas a los estados de espín. Los cálculos muestran que también en este caso el estado fundamental es de baja multiplicidad. La combinación de dos especies radicales produce el apareamiento de la densidad de espín, generando un estado singulete. Estos resultados, así como los del acuo-complejo, manifiestan concierto con la tendencia a formar sistemas de bajo espín observada de ordinario en hierro-porfirinas hexacoordinadas [113]. Tal como ocurre en el complejo acuoso, los gaps obtenidos mediante LDA son mayores a los GGA.

La tabla 4.6 agrupa parámetros geométricos relevantes optimizados usando el método semiempírico sobre el complejo nitrosilado para los tres estados de espín considerados. En la misma tabla incluimos valores experimentales medidos en una serie de derivados hexacoordinados de la nitrosil-hierro(III)-porfirina. Los parámetros que se reportan en la tabla son valores medios procedentes de los compuestos modelo considerados en la referencia [114], con las correspondientes desviaciones estándar. Los ángulos y las longitudes de enlace muestran una correlación aceptable con los que provee el cálculo semiempírico para el estado fundamental del sitio activo nitrosilado. No disponemos de estimaciones para las geometrías de los estados de espín de mayor energía. No obstante, en lo concerniente a tales geometrías, es posible realizar un interesante análisis dentro del contexto del formalismo de Enemark y Feltham (*electron-counting formalism*, [115]). En este formalismo, útil para la descripción de metaloporfirinas nitrosiladas, el grupo MNO (M es el metal) es tratado como unidad independiente, considerándosele la entidad respon-

sable por los modos de coordinación. En la notación  $\{MNO\}^n$ ,  $n$  indica el número de electrones  $d$  del metal más el electrón asociado a los orbitales  $\pi^*$  del NO. Así, el estado de oxidación férrico o hierro(III) está representado por el esquema  $\{FeNO\}^6$  y el estado ferroso o hierro(II) por  $\{FeNO\}^7$ . En los compuestos  $\{FeNO\}^6$  la geometría Fe-N-O es lineal, y cuando la cantidad de electrones  $d$  aumenta, el ángulo tiende a disminuir: en los complejos  $\{FeNO\}^7$  es cercano a  $145^\circ$ , mientras que para los sistemas  $\{MNO\}^8$  —como en los nitrosilos de Co(II)— se halla próximo a  $120^\circ$  [114]. Este cambio estructural puede interpretarse en términos de una estabilización de los orbitales anti-ligantes  $d_{z^2}$  y  $d_{\pi}$ , derivada de la deformación angular del grupo M-N-O. En los complejos  $\{FeNO\}^6$  estos orbitales permanecen vacíos, pero en los sistemas  $\{MNO\}^7$  o  $\{MNO\}^8$ , uno de ellos se ocupa. Una alteración del ángulo M-N-O y de la distancia M-N posibilita la relajación de los orbitales antienlazantes, a través de la disminución del solapamiento  $d_{z^2} - n_{NO}$  y  $d_{xz} - \pi_{NO}^*$  [114, 116]. Semejante comportamiento explica la tendencia observada en el sitio activo nitrosilado (tabla 4.6) para los estados de espín de mayor energía. Si se examina la estructura orbital en el singulete, se descubre que el HOMO posee un carácter ligante, lo cual no es cierto para los dos orbitales siguientes —LUMO y LUMO<sup>+1</sup>. En el triplete y en el quintuplete, uno o ambos de estos dos últimos orbitales están poblados, de manera que podemos esperar una tendencia similar a la que se observa en las especies  $\{MNO\}^7$  y  $\{MNO\}^8$ . En el caso del triplete, cuya estructura electrónica semeja la de los complejos  $\{MNO\}^7$ , el ángulo Fe-N-O es muy cercano al que se mide en nitrosilos de Fe(II), y la longitud Fe-N se alarga consecuentemente. De hecho, para las especies de  $\{FeNO\}^7$  se informan distancias entre 1.72 y 1.80 Å [114]. La diferencia entre las configuraciones electrónicas del quintuplete y de los sistemas  $\{MNO\}^8$  es mayor puesto que, a pesar de presentar igual número de electrones antiligantes, el primero tiene dos orbitales ligantes semi-ocupados. Como sea, la propensión al estiramiento de la unión Fe-N y a la disminución del ángulo Fe-N-O aún se manifiesta, si bien en el quintuplete el efecto de relajación geométrica parece ser más significativo en la distancia que en el ángulo (en la referencia [114] se reportan distancias experimentales M-N entre 1.83 y 1.86 Å).

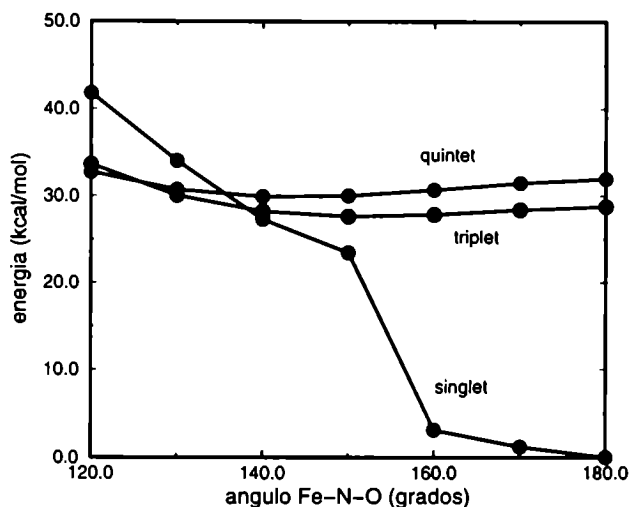


Figura 4.4: Superficies de energía potencial para la deformación angular Fe-N-O en el sitio activo, correspondientes a los tres estados de espín accesibles a menor energía.

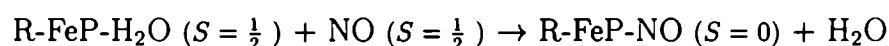
La variación de la energía en función del ángulo Fe-N-O para cada estado de espín (figura 4.4) proporciona una estimación de la magnitud de la estabilización asociada a la deformación. Las curvas expuestas en la figura 4.4 fueron obtenidas por el método SAM1, relajando la torsión  $N_{\alpha}$ -Fe-N-O y la distancia Fe-N para cada ángulo ( $N_{\alpha}$  simboliza el nitrógeno de la porfirina situado aproximadamente sobre el carbono unido al azufre, formando un ángulo diedro  $N_{\alpha}$ -Fe-S-C de  $5.6^{\circ}$ ). De manera similar a lo que se observa en otras hemoporfirinas coordinadas a ligandos diatómicos, la energía total no se ve sustancialmente afectada por este ángulo diedro, con lo que la torsión es prácticamente libre. La curvatura de las superficies de energía potencial correspondientes a los estados de espín excitados es extremadamente suave, lo que sugiere que la estabilización derivada de la deformación es pequeña (de acuerdo a los cálculos SAM1, no sería mayor a 2 kcal/mol). No obstante, parece suficiente para causar perturbaciones considerables en las geometrías, según se ha visto. Por otra parte, la figura 4.4 muestra que, para el estado fundamental singlete, donde no hay electrones antienlazantes involucrados, la flexión del NO implica un costo energético más alto.

**Tabla 4.7** Energías de reacción para el intercambio de ligandos (kcal/mol).

fase gas. LDA	fase gas. GGA	proteína. LDA	proteína. GGA
-28.1	-18.0	-24.6	-14.5

## 4.5 Reacción de intercambio de ligandos

Concentrémonos ahora en la reacción que acontece entre el acuo-complejo y el NO. Su relevancia reside, como se ha destacado, en el hecho de que podría tratarse de la etapa clave en la inactivación del P450. El proceso modelado es el siguiente:



La notación R-FeP simboliza a la hemoporfirina más el residuo de cisteína. En la tabla 4.7 se exhiben los cambios energéticos DFT calculados como  $\Delta E_r = E(\text{H}_2\text{O}) + E(\text{RFeP} \cdot \text{NO}) - E(\text{NO}) - E(\text{RFeP} \cdot \text{H}_2\text{O})$ , donde  $E$  representa la energía total del estado fundamental en cada caso. A fin de obtener  $\Delta E_r$  en el entorno proteico, las energías del H<sub>2</sub>O y del NO fueron obtenidas usando el esquema de Onsager con una constante dieléctrica igual a 78.5, para reproducir las condiciones de la solvatación acuosa [102, 117]. Los resultados indican que en la fase gaseosa, al igual que en el seno de la proteína, la reacción es marcadamente exérgica, por lo que cabe esperar que la sustitución de H<sub>2</sub>O por NO prevalezca incluso a bajas concentraciones de óxido nítrico. Puesto que no se dejó relajar la geometría del sitio activo,  $\Delta E_r$  corresponderá precisamente a la diferencia entre las energías de unión. Esto significa que, en la hemoporfirina, el enlace Fe-N(NO) es bastante más estable que el Fe-O(H<sub>2</sub>O). En estudios recientes, las constantes de equilibrio para la unión reversible del NO a diferentes ferrihemoproteínas fue medida en solución acuosa [118]. Los valores obtenidos, correspondientes al ferricitocromo c, a la metamioglobina y a la metahemoglobina, están situados en el rango de 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>. Bajo el supuesto que, para esta reacción,  $\Delta G_r \approx \Delta E_r$ , hallamos que los valores para  $\Delta E_r$  en solución son cercanos a las 5 kcal/mol, una cantidad del orden de la que predicen las simulaciones DFT. Al compa-

rar estos resultados, debe tenerse presente que la coordinación del metal en el P450 es diferente a la de las proteínas investigadas en los experimentos, en las que el ligando proximal es histidina.

Tanto en vacío como en presencia del campo electrostático de la proteína, la aproximación GGA proporciona valores menos negativos de  $\Delta E_r$ . Este punto se esclarece al recordar que las energías de enlace LDA resultan sistemáticamente mayores a las GGA (en ocasiones hasta en un 100% [119]) y que el NO se une más fuertemente al sitio activo que el H<sub>2</sub>O. La conjunción de ambas circunstancias explica la tendencia en los valores de  $\Delta E_r$ , que difieren en alrededor del 50%.

## 4.6 Efecto de la proteína

El entorno puede afectar a un sistema molecular de manera sustancial, al extremo que, en muchas situaciones, el solvente vuelve factible un proceso que jamás ocurriría en la fase gaseosa. En el caso presente, donde el sitio activo no se halla expuesto a la solución, sino emplazado en el interior de la estructura terciaria del P450, el entorno es esencialmente hidrofóbico, y por lo tanto, ante la ausencia de interacciones específicas, no esperamos que las propiedades difieran drásticamente de las que se manifiestan en el vacío [2]. No obstante, en tanto se ignore la magnitud de este campo electrostático y cuán grande su influjo podría ser, constituye un interés de primer orden el establecer hasta qué punto el comportamiento del sitio activo se halla modulado por la presencia de la proteína. Este análisis reviste importancia no sólo en lo concerniente al caso particular del P450, sino también porque contribuye a determinar la idoneidad de los experimentos sobre sistemas modelo aislados para describir el sitio activo bajo condiciones fisiológicas.

Consideremos en primer lugar los estados de espín. La tabla 4.4 indica que la proteína tiene el efecto de reducir el gap energético entre la configuración de multiplicidad baja e intermedia cuando el ligando es H<sub>2</sub>O, y aumentarlo cuando es NO. En cualquiera de los dos casos, sin embargo, el campo electrostático



provoca perturbaciones leves que lejos están de causar una inversión en el orden relativo de los estados de espín. Es interesante notar que la densidad de espín resulta efectivamente afectada por el potencial electrostático clásico. De hecho, la presencia de la proteína induce la transferencia de densidad de espín desde el átomo de azufre hacia el metal (tabla 4.5). Ante la incorporación del campo, las poblaciones de Mulliken de electrón desapareado ascienden de 0.568 a 0.635 a.u. en el hierro, al tiempo que en el azufre decaen desde 0.437 a 0.363 a.u., permaneciendo prácticamente constantes en todos los otros núcleos. Estos resultados sugieren que los datos experimentales procedentes de porfirinas modelo puede ser de utilidad en la determinación del estado de espín del grupo hemo en la enzima, que parece ser una propiedad controlada por el esquema de coordinación. Pero esto no necesariamente se aplica a la predicción de otros parámetros: el momento magnético medido en la hierro-porfirina aislada, por ejemplo, difícilmente coincida con el valor en la proteína. Por otro lado, esperamos que la localización del electrón desapareado sea responsable en gran medida de la interacción entre el NO y el sitio activo. Como se ha mencionado más arriba, la reacción del óxido nítrico con el átomo de azufre de la cisteína proximal podría ser un mecanismo alternativo para la inactivación del P450, que involucraría la modificación del enlace Fe-S [87]. Los cambios en las poblaciones de espín ante la incorporación del potencial electrostático sugieren que la presencia de la proteína disminuye la reactividad del azufre. A la misma conclusión se arriba al examinar el valor promedio de la función de Fukui en el vacío y bajo la influencia del solvente. En la figura 4.3 se aprecia claramente el efecto de la proteína en la densidad electrónica del HOMO y del LUMO, reflejada en las superficies de isodensidad de  $f^0(\mathbf{r})$ : parte de la densidad desaparece del azufre y se concentra en torno al metal. De esta manera, las tendencias manifestadas en las poblaciones de espín se corresponden con los cambios observados en  $f^0(\mathbf{r})$ . A pesar de la controversia vigente acerca de si la inhibición del citocromo P450 procede por la formación de un aducto de hierro-nitrosilo, o a través de la nitrosilación del azufre, lo cierto es que ambos mecanismos tienen cierta probabilidad de ocurrir. En este punto, lo que podemos decir es que, si tal competencia existiese, la proteína favorecerá que la reacción transcurra por el primer camino.

Finalmente, en lo que respecta al balance termodinámico del intercambio de ligandos (tabla 4.7), notamos que la proteína reduce en un 12% el valor de  $\Delta E_r$  de acuerdo a las estimaciones LDA y en un 20% según las GGA. Parece evidente que el potencial electrostático se opone a la reacción, pero no tanto como para impedir que suceda. Este decrecimiento coloca el valor de  $\Delta E_r$  más cerca de los valores que se reportan para otras hemoproteínas en la referencia [118]. La presencia de la proteína, por supuesto, involucra otros aspectos a considerar, por ejemplo, la accesibilidad del NO a la cavidad distal junto al centro activo del citocromo. Esto concierne a la dinámica del proceso global, más allá de los alcances de esta investigación.

## 4.7 Sumario

Este estudio ha discurrido acerca de la factibilidad termodinámica del desplazamiento de  $H_2O$  por NO como el primer paso en la inhibición reversible del citocromo P450. El examen de la configuración electrónica de las especies involucradas establece que el estado fundamental en ambos complejos es de bajo espín. Las densidades electrónicas asociadas al HOMO y al LUMO del acuo-complejo fueron a su vez investigadas, exhibiendo una distribución preferencial alrededor de los núcleos de hierro y de azufre. Este resultado, junto con la alta localización de las poblaciones de espín, sugiere que el ataque del óxido nítrico estará dirigido sobre alguno de estos dos sitios. Un mecanismo alternativo de inhibición enzimática iniciado a partir de la interacción entre el NO y el azufre de la cisteína probablemente involucre la ruptura del enlace Fe-S, conduciendo a cambios conformacionales en la proteína. Por tal razón, la posibilidad de modelar este proceso reviste una complejidad que sobrepasa el dominio de los métodos de estructura electrónica convencionales. Por otra parte, se vió que el campo electrostático de la proteína no afecta el estado de espín o la viabilidad termodinámica de la reacción, aunque modifica significativamente la magnitud de los cambios energéticos y la localización del electrón desapareado en el estado basal del P450.

## Capítulo 5

# Afinidad de la hemoglobina por el O<sub>2</sub>: rol de los aminoácidos distales

### 5.1 La hemoglobina y el oxígeno

La hemoglobina es una proteína que resulta muy familiar a biólogos y a químicos, en particular por su capacidad para transportar oxígeno y dióxido de carbono en el sistema vascular de los animales. En la especie humana es un tetrámero formado por dos cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\beta$  (figura 5.1), cada una de las cuales contiene un sitio activo que puede capturar al oxígeno molecular. Este centro activo, presente también en la molécula de mioglobina, consiste en un hemo b que se une a la proteína a través de un enlace entre el metal y un átomo de nitrógeno imidazólico perteneciente a un aminoácido histidina, tal como se ilustra en la figura 3.1. La mioglobina, por su parte, está constituida por una cadena única, y es capaz de interactuar con el O<sub>2</sub> de un modo similar, si bien su función está emparentada antes con la acumulación del oxígeno que con su transporte [1]. La estructura tridimensional del monómero de mioglobina se aproxima de manera sorprendente a la de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  —las cuales son semejantes entre sí. Curiosamente, sin embargo, las tres secuencias coinciden en menos del 20% de los aminoácidos. Tal conservación de la estructura terciaria por sobre la primaria pone en evidencia el vínculo

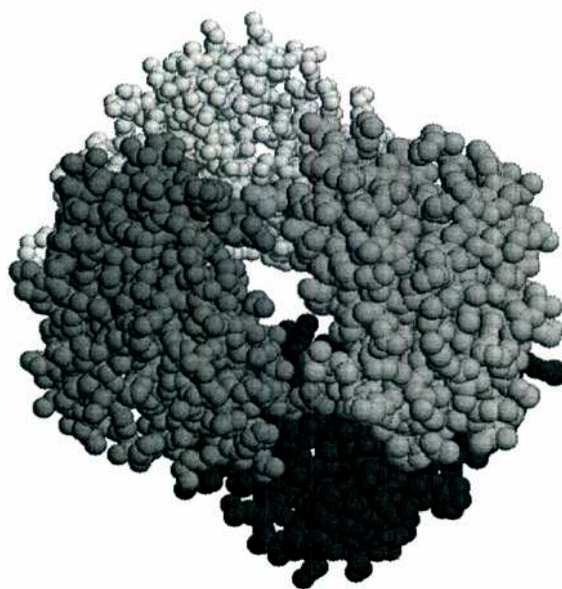
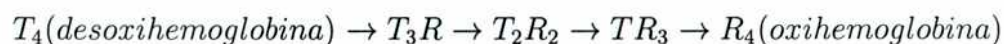


Figura 5.1: Estructura de rayos X de la hemoglobina humana [78]. Cada monómero se representa en un tono diferente.

entre función y conformación espacial.

La afinidad de la mioglobina por el  $O_2$  es mayor a la de la hemoglobina, pero similar a la de las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$  aisladas. El tetrámero se caracteriza por el denominado comportamiento alostérico, que involucra un mecanismo cooperativo tal que la oxigenación de alguna de las subunidades eleva la afinidad en las demás. El proceso de oxigenación suele expresarse mediante la secuencia siguiente:



Cada etapa supone la unión de una molécula de  $O_2$ . T (Tense) y R (Relaxed) representan los monómeros desoxigenados y oxigenados respectivamente: el estado T muestra una afinidad mayor que el R. La interpretación más difundida para esta conducta sostiene que está desencadenada por la modificación en el esquema de coordinación del hierro asociada a la unión a  $O_2$ , lo cual altera la ubicación del Fe respecto al plano del hemo. Este desplazamiento provoca una tensión sobre el enlace Fe- $N_{im}$  que deriva en la interrupción de ciertas interacciones electrostáticas entre grupos de carga opuesta —conocidas como enlaces salinos— sobre la superficie de contacto  $\alpha_1\beta_2$  y  $\alpha_2\beta_1$ , causando un

cambio conformacional que en algunos núcleos supone reacomodamientos de hasta 7 Å [1]. El estado R comporta una estructura de menor rigidez y un sitio activo menos impedido, lo que explicaría el aumento en la afinidad.

Si bien la hemoglobina se caracteriza por el transporte de O<sub>2</sub>, mediante el diseño de la cavidad distal, sin embargo, puede adaptarse a otras funciones biológicas. A través de la sustitución de unos pocos aminoácidos la afinidad puede elevarse en varios órdenes de magnitud, y así la unión reversible al oxígeno, esencial para el transporte fisiológico, es reemplazada por actividades catalíticas que involucran la metabolización del O<sub>2</sub> [120]. Un ejemplo de tan extraordinaria afinidad por el dióxígeno se encuentra en la hemoglobina del parásito *Ascaris lumbricoides*. Se trata de un organismo anaerobio capaz de infectar a humanos, y cuya hemoglobina es un octámero formado por ocho subunidades idénticas, cada una de las cuales posee dos grupos hemo [121]. Estudios recientes han mostrado que esta hemoglobina es en realidad una desoxigenasa que consume O<sub>2</sub> de manera enzimática a través de una reacción mediada por óxido nítrico, conservando así condiciones de hipoxia en el fluido perientérico del parásito [122]. Se ha sugerido [121, 123, 124] que la constante de equilibrio inusualmente alta observada en esta hemoglobina se debe a la formación de uniones hidrógeno entre el oxígeno y dos aminoácidos de la cavidad distal: tirosina B10 y glutamina E7 (figura 5.2a).

Basándose en análisis espectroscópicos de rayos X, Shaanan propuso que un puente de hidrógeno con la histidina E7, conocida como el residuo distal, estabiliza el O<sub>2</sub> en el sitio activo en la subunidad  $\alpha$  (figura 5.2b), y que en cambio no existe tal unión hidrógeno en la cadena  $\beta$  [125, 126]. Estas conclusiones son asimismo sustentadas por los experimentos de mutagénesis realizados por Olson y su equipo [127], quienes sustituyeron la histidina E7 por una glicina, suprimiendo de esta manera el imidazol distal y por lo tanto el posible puente de hidrógeno. Sus investigaciones muestran que en el estado R la mutación disminuye la afinidad por el oxígeno en la subunidad  $\alpha$  y en la mioglobina, mientras que no produce cambios importantes en la afinidad de la cadena  $\beta$ . A pesar de esta presunta diferencia estructural la afinidad por el O<sub>2</sub> es del mismo orden en ambas subunidades [127, 128], mientras que

en la hemoglobina de *Ascaris* es sorprendentemente más elevada. En lo que concierne a la hemoglobina humana, la explicación usual aduce que en la cadena  $\beta$  efectos proximales y una región distal más accesible compensan la ausencia de unión hidrógeno, lo que confluye a la igualación de las constantes de equilibrio globales de los dos monómeros [126, 127]. Juntos, todos estos resultados vuelven manifiesto que el papel del puente de hidrógeno en la afinidad es aún uno de los aspectos más enigmáticos de la química de las hemoproteínas.

## 5.2 Contexto y método de simulación

Si bien son numerosos los estudios de simulación dedicados a la investigación de hierro-porfirinas y a su interacción con oxígeno y otros ligandos — las secciones 3.1 y 4.1 contienen una selección de citas representativas—, la exploración computacional de los efectos distales es un área con escasos precedentes. Una buena parte de los trabajos que pueden contarse dentro de esta línea apunta a explicar la discriminación entre el CO y el O<sub>2</sub> en el sitio activo de la mioglobina. El papel que los aminoácidos distales y el resto del entorno proteico desempeñan en este fenómeno ha sido inspeccionado mediante varios enfoques, que incluyen análisis teóricos del potencial electrostático usando un esquema de Poisson-Boltzman [129, 130], tratamientos QM-MM donde el polipéptido es representado mediante un campo de fuerzas [131], o cálculos DFT que incorporan explícitamente el residuo distal [132]. Ciertamente, hemos escogido un acercamiento de este último tipo, en este caso con el objeto de estimar las energías asociadas a la interacción puente de hidrógeno en el sitio activo de diferentes monómeros de la hemoglobina. Más específicamente, nos hemos propuesto esclarecer en qué medida esta interacción afecta la constante de equilibrio, para lo cual se practicó una serie de simulaciones sobre sistemas modelo de la hemoglobina de *Ascaris*, y de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la hemoproteína humana en el estado R. Existe una gran cantidad de estudios experimentales que pretenden determinar la influencia del residuo distal sobre la afinidad (ver por ejemplo las referencias [121], [127], [133] o [134]), pero que sin embargo no poseen un correlato a ni-

vel teórico. En el trabajo presente hemos utilizado complementariamente los métodos SAM1 y DFT: el primero se empleó en la optimización parcial de las geometrías, mientras que los valores de las energías y otros datos cuantitativos fueron obtenidos mediante el segundo. Los cálculos DFT corresponden al funcional de intercambio y correlación BLYP, y se llevaron a cabo por medio del programa Gaussian98 [34], adoptando funciones de base TZV para el hierro [62] y DZVP para los demás elementos [63]. Este esquema es el mismo que el descrito en el primer párrafo de la sección 3.3.

El modelo usado para representar el sitio activo de la proteína de *Ascaris*, detallado en la figura 5.2a, es un sistema de 67 átomos que comprende el grupo hemo más el residuo proximal (histidina F8) y los aminoácidos distales (glutamina E7 y tirosina B10), truncados convenientemente a fin de preservar la función química. La geometría corresponde a una estructura cristalográfica [124]. Fueron considerados además otros dos modelos que contienen alternativamente sólo uno de los residuos distales, a los efectos de estudiar sus contribuciones individuales. Por otra parte, con el propósito de modelar el sitio activo en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , se adoptó la estructura de 57 átomos exhibida en la figura 5.2b, que incluye la hemoporfirina y los residuos distal y proximal (histidina E7 e histidina F8 respectivamente). En este caso la geometría proviene del espectro de rayos X presentado en la referencia [126]. Los cálculos se efectuaron sobre los complejos de hierro(II), neutros y de bajo espín, según corresponde al estado fundamental del sitio activo hexacoordinado de la hemoglobina. En atención a los vínculos que limitan el movimiento del hemo y de los residuos circundantes en el seno del polipéptido, se preservó la geometría del cristal; sólo las coordenadas del  $O_2$  y de los átomos de hidrógeno fueron optimizadas con el método SAM1. Las estructuras resultantes se usaron en los cálculos DFT a geometría fija.

### 5.3 Estabilización del $O_2$ en el sitio activo

La tabla 5.1 contiene las energías de las uniones hidrógeno obtenidas mediante DFT bajo la aproximación de los gradientes generalizados (GGA). Esta

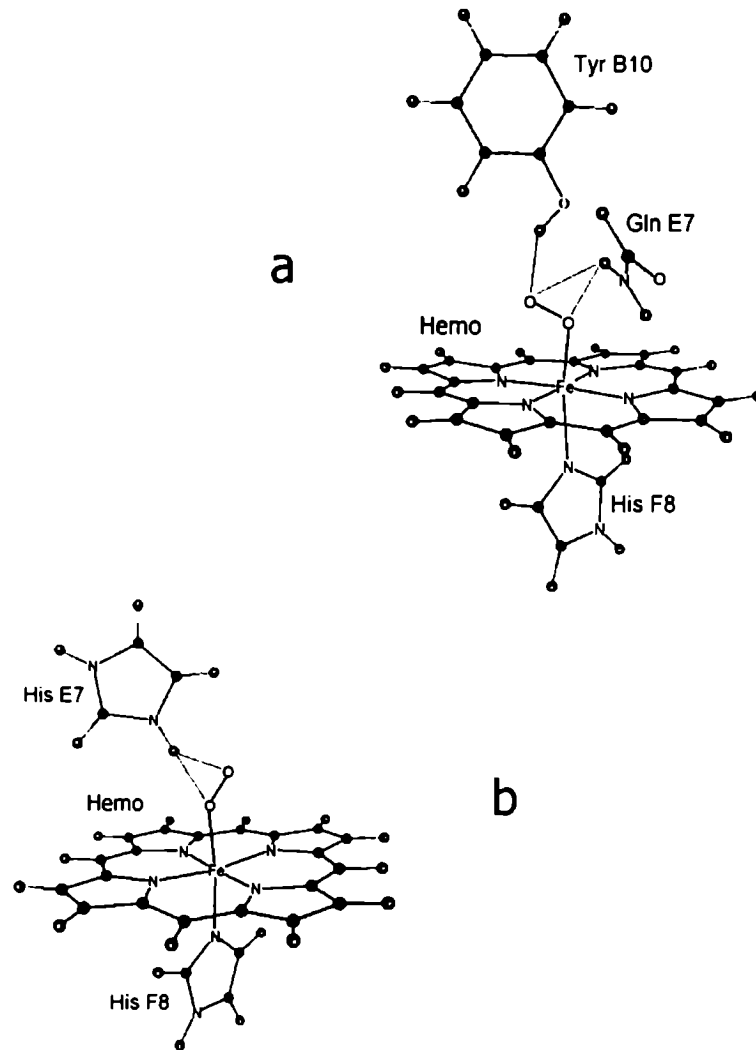


Figura 5.2: Modelo del sitio activo para la hemoglobina de *Ascaris* (a) y la hemoglobina humana (b). Las líneas de puntos indican uniones hidrógeno.



**Tabla 5.1** Energías de interacción ( $E_{int}$ ) y cargas de Mulliken sobre átomos relevantes de los sistemas exhibidos en la figura 5.2.

	$E_{int}$ (kcal/mol)	Cargas de Mulliken		
		Fe	O1 <sup>a</sup>	O2
Ascaris (B10+E7)	-12.8	1.13	-0.15	-0.22
Ascaris (B10)	-7.2	1.1	-0.12	-0.21
Ascaris (E7)	-4.3	1.09	-0.11	-0.20
subunidad $\alpha$	-4.1	1.08	-0.10	-0.21
subunidad $\beta$	-6.8	1.10	-0.19	-0.26

<sup>a</sup>O1 indica el oxígeno enlazado al hierro.

metodología se ha aplicado satisfactoriamente a la descripción de puentes hidrógeno en una variedad de sistemas; algunos ejemplos ilustrativos pueden hallarse en las referencias [110] y [135]. Los valores de  $E_{int}$  representan exactamente la interacción del sitio activo oxigenado con los aminoácidos distales. Para su determinación, fueron calculadas las energías de los tres sistemas modelo y luego las de los fragmentos A y B aislados (ver figura 5.3), también en los tres casos. Seguidamente el valor de  $E_{int}$  fue evaluado como

$$E_{int} = E_{TOT} - (E_A + E_B) \quad (5.1)$$

La energía obtenida por este proceder corresponde específicamente a la estabilización causada por la interacción entre el o los residuos distales y el oxígeno, e incluye los efectos relacionados con la unión Fe-O. En los fragmentos A y B se dejaron relajar las coordenadas de la molécula de oxígeno y de los protones directamente implicados en la interacción. Encontramos que la magnitud de la unión hidrógeno es significativa en todos los casos. Este resultado era en cierto modo previsible, puesto que existe una transferencia de carga apreciable desde el hierro a la molécula de oxígeno, lo cual se ve reflejado en la poblaciones electrónicas de Mulliken (tabla 5.1). Esta polarización del enlace Fe-O puede ser explicada en términos de una considerable retrodonación  $\pi^*$  metal-ligando.

En el caso de la molécula de *Ascaris*, los datos en las tablas 5.1 y 5.2 muestran que el hidrógeno de la tirosina B10 (H B10) forma un puente muy estable con el segundo oxígeno (O2), mientras que la contribución del protón perteneciente a la glutamina (H E7), situado a más de 2.5 Å de distancia de

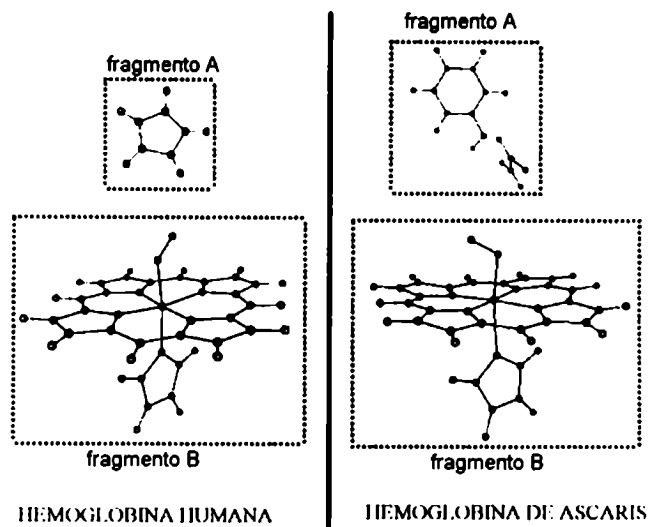


Figura 5.3: Fragmentos asociados al cálculo de  $E_{int}$ .

cualquiera de los núcleos de oxígeno, resulta menor. Un aspecto interesante surge al comparar en la hemoglobina de *Ascaris* el efecto de los residuos distales juntos y por separado. Este análisis evidencia que las contribuciones de los residuos no son aditivas. Aparentemente, la interacción entre la glutamina y la tirosina polariza el grupo hidroxilo de esta última, lo que desemboca en un efecto cooperativo: la presencia conjunta de ambos aminoácidos refuerza el puente H(B10)-O<sub>2</sub>.

En relación a la proteína humana, por otra parte, los resultados de la tabla 5.2 señalan que para la subunidad  $\alpha$  las distancias H(E7)-O son menores que en la  $\beta$ , lo cual es consistente con los trabajos experimentales que proponen la existencia de un puente de hidrógeno en el primer caso y su ausencia en el segundo. Lo sorprendente, sin embargo, es que la energía de interacción  $E_{int}$  resulte superior en el sitio distal de la cadena  $\beta$ , según puede verse en la tabla 5.1. Estos resultados, que parecen en principio desconcertantes, se reconcilian si se presta atención a la distancia Fe-O. La longitud de este enlace es sensiblemente mayor en el sitio activo de la subunidad  $\alpha$  que en el de la  $\beta$ , es decir, la interacción hierro-oxígeno es más fuerte en la segunda. De todos modos, el valor de  $E_{int}$  no refleja la fuerza de este enlace, sino la estabilización derivada de los aminoácidos distales. ¿Cómo se explica esta diferencia en la

**Tabla 5.2** Distancias seleccionadas ( $\text{\AA}$ ) en el sitio activo de las tres hemoglobinas. Los átomos pertenecen a los residuos identificados entre paréntesis.

	Ascaris	subunidad $\alpha$	subunidad $\beta$
Fe-N(F8)	2.201	1.934	2.065
Fe-O1	1.837	1.857	1.817
H(E7)-O1	2.691	2.073	2.312
H(E7)-O2	2.722	1.717	2.831
H(B10)-O1	2.646	-	-
H(B10)-O2	1.900	-	-

energía de estabilización y en la distancia Fe-O? Una interpretación plausible consiste en suponer una competencia entre la histidina distal y el metal respecto al  $\text{O}_2$ . De hecho, cabe esperar que la magnitud del enlace Fe-O no sea muy diferente a la energía de puente de hidrógeno. En el caso de la cadena  $\alpha$ , la histidina distal desestabilizaría parcialmente la unión del  $\text{O}_2$  al hierro, lo cual explicaría que la interacción neta sea mayor en la subunidad  $\beta$ . De todas maneras, no parece probable que esta supuesta competencia sea el único factor que determina la diferencia en las distancias Fe-O. En los fragmentos B aislados estas distancias son de hecho distintas, lo cual sugiere que los efectos proximales no están exentos de responsabilidad. La discrepancia en la longitud Fe-O ya se manifiesta sin la influencia de los residuos distales, si bien estos acentúan la diferencia. Es decir, afectan más significativamente la unión metal-ligando en el monómero  $\alpha$  que en el  $\beta$ . Nótese así que  $E_{int}$  no contiene solamente el aporte del puente de hidrógeno, sino también las fluctuaciones que este origina en la energía de la unión hierro-oxígeno.

Los valores de la tabla 5.1 para la hemoglobina humana son del mismo orden que la estabilización por puente de hidrógeno propuesta para la mioglobina, estimada en 4 kcal/mol a partir de experimentos de mutagénesis [136]. Nuestros resultados, pues, confirman la existencia de uniones hidrógeno importantes en la hemoglobina de *Ascaris* y en la cadena  $\alpha$  de la hemoglobina humana, pero revelan además la existencia de una interacción de este tipo en la subunidad  $\beta$ , en contradicción con observaciones previas [126, 127].

## 5.4 Dogma y sutilezas sobre la constante de afinidad

Arribados a este punto, conviene notar que la constante de equilibrio global para la unión de un ligando a cierta hemoproteína corresponde a un fenómeno complejo, el cual, a los fines de esta discusión, y apelando a una simplificación extrema, puede ser modelado en tres etapas [137]. La primera concierne a la partición entre el solvente (la fase acuosa) y la matriz proteica. La siguiente está vinculada al transporte del ligando a través de la estructura polipeptídica, desde la parte exterior hasta el sitio de coordinación. Y finalmente el proceso de unión en sí, que involucra la reactividad del centro metálico y los efectos distales. La afinidad observada puede estimarse como el producto de las constantes asociadas a estos tres pasos, a los que es posible tratar a su vez como equilibrios intermedios [137]. Así, el puente de hidrógeno es sólo un factor entre las múltiples contribuciones que determinan la constante de equilibrio global. Los efectos proximales ejercen por su parte cierto control sobre la reactividad respecto al  $O_2$  a través de la distancia Fe-N y la orientación de la histidina F8 [126, 138].

En el caso de la hemoglobina de *Ascaris* parece probable, como lo sugieren Peterson y otros [139], que la estructura y el campo electrostático de la cavidad distal conformen una jaula efectiva donde el  $O_2$  permanece atrapado. A este respecto, existe evidencia de una unión hidrógeno entre el protón H(E7) y el grupo hidroxilo del residuo de tirosina, el cual aproximaría las cadenas distales entre sí, favoreciendo la probabilidad de reasociación del oxígeno al sitio axial.

A propósito del rol del puente de hidrógeno sobre la afinidad, resulta de mucho interés el trabajo publicado por Miele y sus colaboradores [134], quienes sustituyeron los residuos nativos B10 y E7 de la hemoglobina humana por tirosina y glutamina respectivamente, con la idea de reproducir el comportamiento observado en la proteína de *Ascaris*. Opuestamente a lo esperado, los mutantes exhibieron un decrecimiento en la afinidad por el  $O_2$ . En el mismo contexto es asimismo valiosa la comparación entre las hemoglobinas

de las especies *Ascaris* y *Lucina pectinata* elaborada en la referencia [139]. Ambas hemoproteínas contienen tirosina y glutamina en las posiciones B10 y E7 de la cavidad distal. Sin embargo, sus constantes de afinidad son desconcertantemente distintas (la hemoglobina de *Lucina* presenta una afinidad comparable a la de la mioglobina). En la referencia citada, se atribuye esta diferencia a una red de uniones hidrógeno presente en la región distal de la hemoglobina de *Ascaris* que origina una estructura rígida y obstaculiza la ruta de escape de los ligandos. En contraste, una red semejante no se detecta en el sitio activo de la proteína de *Lucina*, por lo cual las cadenas laterales gozan de una flexibilidad que no restringe la disociación del O<sub>2</sub>.

Los experimentos de mutagénesis practicados sobre las hemoglobinas de diversas especies muestran que el aumento en la cinética de disociación derivado de la supresión de un puente de hidrógeno en la zona distal, está casi invariablemente acompañado por un incremento en la constante de velocidad de asociación [127]. Esto sugiere que los residuos involucrados en el puente de hidrógeno representan a la vez, en alguna medida, una barrera cinética, y así una unión hidrógeno muy estable no necesariamente supone una constante de afinidad excepcionalmente elevada. Nuestros resultados señalan que las interacciones de puente hidrógeno juegan un papel primario en la avidéz de la hemoglobina por el oxígeno. No obstante, un análisis basado en esta contribución única puede conducir a conclusiones apresuradas. El rol de factores menos directos que este y que los efectos proximales deben asimismo ser contemplados a fin de obtener una visión más acabada de la afinidad de las hemoproteínas por la molécula de O<sub>2</sub>.



## Capítulo 6

# Modulación del efecto trans negativo del óxido nítrico e implicancias en la activación de la guanilato ciclasa

### 6.1 ¿Por qué la guanilato ciclasa?

Entre las diversas proteínas caracterizadas al día de hoy, la guanilato ciclasa soluble se distingue por ser el único receptor de la molécula de óxido nítrico [140, 141]. El NO —un mensajero generado por la NO-sintasa— regula procesos como la vasodilatación, la relajación muscular en el sistema vascular, la inhibición de la agregación plaquetaria, o la neurotransmisión, a través de la activación de la guanilato ciclasa [142]. Con este nombre se designa a una familia de enzimas que catalizan la conversión de guanosina trifosfato (GTP) en guanosina cíclica monofosfato (cGMP), un segundo mensajero relacionado con varios mecanismos de transducción celular, incluyendo las funciones mencionadas arriba. Existen dos variedades de esta enzima, de las cuales la isoforma soluble es la única proteína conocida que se comporta como receptor del óxido nítrico. Se trata de un heterodímero  $\alpha_1\beta_1$ , que contiene al menos un grupo hemo b ferroso, pentacoordinado y de alto espín. No se encuentran disponibles estructuras cristalográficas de la enzima, aunque experimentos de

mutagénesis y espectroscópicos [143] han identificado a la histidina 105 de la subunidad  $\beta_1$  como el ligando axial. Además, se han caracterizado dos sitios catalíticos localizados en los fragmentos C-terminales de cada monómero. Una cualidad particular de esta hemoenzima es su inusual afinidad por los ligandos diatómicos: para el  $O_2$  es tan reducida que en solución saturada de aire permanece pentacoordinada [144], en contraste con las demás hemoproteínas, que se unen al oxígeno rápidamente. Por el CO exhibe cierta afinidad, aunque muy inferior a la observada en otras proteínas ferrosas con protoporfirina IX pentacoordinada a imidazol, tales como la hemoglobina y la mioglobina. Lo mismo ocurre para el NO, que suele asociarse a los sistemas modelo de forma virtualmente irreversible. En el caso de la guanilato ciclasa, en cambio, se ha medido una cinética de disociación relativamente alta [145]. Esta selectividad frente a las especies diatómicas, indispensable para el funcionamiento de la enzima, se ha atribuido a las propiedades electrostáticas de la cavidad distal [146].

La presencia de NO eleva la actividad de la guanilato ciclasa soluble unas cuatrocientas veces [147]. Los detalles moleculares de la activación y la desactivación no se han elucidado completamente, aunque se sabe que está mediada por la interacción entre el hemo y el óxido nítrico. En efecto, los experimentos revelan que ante la remoción del grupo prostético el heterodímero preserva la actividad catalítica basal, pero pierde la capacidad de responder al NO [148]. Curiosamente, el complejo nitrosilado (activado) no exhibe un estado de coordinación seis: los espectros UV [144], EPR [149], y Raman resonante [150, 151] muestran que el hemo se halla pentacoordinado y en una configuración de bajo espín, siendo el NO el único ligando axial. La unión del óxido nítrico reviste un efecto trans negativo que debilita el enlace hierro histidina [152], lo cual conduce a la formación de un centro metálico pentacoordinado, si bien se detecta un estado transiente hexacoordinado con un tiempo de vida media del orden del segundo [140]. Esta ruptura del enlace proximal es necesaria para la activación de la enzima [153]. A pesar de que el mecanismo no se ha establecido, se supone que la disociación de la histidina induce un cambio conformacional que altera la estructura de los sitios catalíticos, desencadenando el incremento de la actividad [140, 154].



¿Qué particularidad distingue a la guanilato ciclasa de otras hemoproteínas con histidina proximal, para que su unión al NO provoque la pérdida de la coordinación octaédrica, con la subsecuente activación de la enzima? Se conocen en realidad algunas otras proteínas en las que el óxido nítrico induce una ruptura trans axial, reflejada en una disminución de la frecuencia vibracional del enlace Fe-N<sub>im</sub> ( $\nu_{Fe-N}$ ). Esto es observable incluso en la hemoglobina condicionada al estado T por inositol hexafosfato [155], y en la mioglobina a pH ácido o bajo la acción de dodecil sulfato de sodio [156]. Procurando interpretar tal comportamiento, recientemente Schelvis y sus colaboradores realizaron un estudio comparativo sobre varias hemoproteínas coordinadas a histidina que exhiben distintos valores de  $\nu_{Fe-N}$  [157]. En base a este análisis, proponen que la posible ruptura proximal está controlada por un puente de hidrógeno al N $\delta$  del imidazol axial (figura 6.1). Tal interacción modula la densidad de carga sobre el anillo imidazólico. Una unión hidrógeno intensa proporcionaría al ligando un carácter negativo suficiente para compensar el efecto trans del óxido nítrico, evitando así la disociación. Con la intención de someter esta hipótesis a un análisis teórico, en este capítulo presentamos un conjunto de simulaciones QM y QM-MM que examinan la relación entre el puente de hidrógeno a la histidina y el efecto trans negativo del NO en varias hemoproteínas. En particular, fue calculada la energía del enlace hierro-imidazol en el complejo nitrosilado, como una medida de la disociación causada por el óxido nítrico. Como podrá verse a continuación, los cálculos corroboran el nexo entre esta variable y la magnitud de la interacción sobre el protón del nitrógeno  $\delta$ . De esta manera, el puente de hidrógeno al imidazol constituiría un factor determinante en el esquema de coordinación del metal, y por lo tanto en el proceso de activación de la guanilato ciclasa.

## 6.2 Validación del tratamiento computacional

Las optimizaciones parciales sobre las estructuras modelo se efectuaron por medio del método SIESTA y de la correspondiente implementación QM-MM descrita en la sección 2.7. Puesto que no existen precedentes en la aplicación

**Tabla 6.1** Distancias ( $\text{\AA}$ ) y ángulos para el sistema modelo de la figura 3.2, obtenidos mediante los programas Gaussian98 y SIESTA.

		pentacoordinado <sup>a</sup>		hexacoordinado <sup>b</sup>		
		Fe-N <sub>im</sub>	d <sub>Fe-p</sub> <sup>c</sup>	Fe-N <sub>im</sub>	Fe-N <sub>NO</sub>	Fe-N-O
sistema neutro	G98	2.21	0.44	2.50	1.94	127
	SIESTA	2.19	0.21	2.33	1.77	134
sistema negativo	G98	2.09	0.60	2.10	1.81	140
	SIESTA	2.15	0.35	2.16	1.77	135

<sup>a</sup>Estado quintuplete. <sup>b</sup>Complejo nitrosilado, estado doblete.

<sup>c</sup>Desplazamiento del Fe fuera del plano de los nitrógenos.

del programa SIESTA a esta clase de compuestos, se llevó a cabo una serie de cálculos sobre sistemas afines tendiente a establecer la aptitud de la metodología en la investigación del presente problema. La tabla 6.1 contiene los parámetros geométricos para la estructura modelo examinada en el capítulo 3 (figura 3.2), incluyendo resultados en el complejo nitrosilado, optimizados con DFT bajo la aproximación de los gradientes generalizados. En la tabla se confrontan los valores obtenidos mediante los programas SIESTA y Gaussian98. Para los cálculos B3LYP efectuados con Gaussian98 se adoptaron orbitales de base DZVP [63], excepto para el hierro, descrito por un conjunto de funciones TZV [62]. Se ha escogido el funcional híbrido B3LYP en virtud de su buen desempeño en sistemas biológicos con metales de transición [4]. Por otra parte, esta y las restantes simulaciones realizadas por el método SIESTA que reportamos en el capítulo actual, emplearon el funcional PBE [25] (el único de clase GGA disponible en el código) y un conjunto de funciones de base numéricas DZVP. El pseudopotencial incorporado en el metal es el que se propone en la referencia [158], al que se aplica la corrección no lineal sobre la carga del *core* [159]. Se utilizó una grilla con un  $E_{cut}$  correspondiente a 150 Rydbergs, y un valor de  $\Delta E_{PAO}$  de 25 meV (ver detalles en la sección 2.6).

En los datos de la tabla se manifiesta claramente el efecto trans negativo del óxido nítrico (véase el sistema neutro). Ambos métodos predicen

un alargamiento importante en la distancia hierro histidina (0.29 y 0.14 Å según Gaussian98 y SIESTA, respectivamente). En la misma tabla se exhiben los resultados correspondientes al complejo con carga -1 —sin el protón del nitrógeno  $\delta$ . Mediante este artefacto extremo pretendemos simular el carácter de imidazolato que adquiere el ligando proximal a causa de un puente de hidrógeno al  $N_\delta$ . Es interesante comprobar que en este caso la densidad negativa compensa el efecto trans axial, anulando casi por completo el alargamiento que se observa en el sistema neutro.

En la tabla 6.2 se considera una serie de parámetros estructurales de la hemoporfirina penta y hexacoordinada con distintos ligandos, en el estado de espín fundamental. La tabla compara los valores calculados por el método SIESTA contra los obtenidos mediante un esquema DFT de ondas planas que usa el funcional BP86 [51]. Se incluyen también datos experimentales. En general, vemos que los resultados provistos por el algoritmo SIESTA revisten una exactitud satisfactoria, aunque a un costo computacional muy inferior al que insume una técnica de Gaussianas. En particular, la longitud X-O que reportan los experimentos difiere de la calculada. Se ha observado que los valores de rayos X pueden ser muy imprecisos respecto a este parámetro [106], y de hecho resulta demasiado pequeño si se lo compara con las distancias en las moléculas diatómicas aisladas.

### 6.3 Unión hidrógeno a la histidina y ruptura del enlace proximal

Una particularidad que presenta el ligando NO con especial interés en química de coordinación es el llamado efecto trans negativo. Los experimentos [152, 114] y los cálculos computacionales indican que la unión de óxido nítrico al hierro en la hemoporfirina debilita el enlace trans axial a la histidina. A la vez, la distancia Fe-NO es mayor que en ausencia del imidazol trans (ver valores teóricos y experimentales en la tabla 6.2), lo cual sugiere una interferencia recíproca entre ambos ligandos. Tal comportamiento no se ha observado en las otras especies diatómicas. El CO, por ejemplo, exhibe el

**Tabla 6.2** Parámetros geométricos<sup>a</sup> del complejo hierro-porfirina (FeP) coordinado axialmente a imidazol (Im) y a distintos ligandos diatómicos XO (X = C, N, O).

		Fe-X	X-O	Fe-X-O	Fe-N <sub>im</sub>
FePCO	SIESTA	1.71	1.18	179	
	DFT-BP86 <sup>b</sup>	1.69	1.17	180	
	exp <sup>c</sup>	1.77	1.12	179	2.10
FePNO	SIESTA	1.73	1.20	142	
	DFT-BP86 <sup>b</sup>	1.69	1.19	150	
	exp <sup>d</sup>	1.72	1.12	149	
FePO <sub>2</sub>	SIESTA	1.75	1.28	122	
	DFT-BP86 <sup>b</sup>	1.74	1.28	123	
	exp <sup>e</sup>	1.75	1.20	131	
FeP(Im)CO	SIESTA	1.76	1.18	180	2.11
	DFT-BP86 <sup>b</sup>	1.72	1.17	180	2.07
	exp <sup>c</sup>	1.77	1.12	179	2.10
FeP(Im)NO	SIESTA	1.75	1.21	139	2.29
	DFT-BP86 <sup>b</sup>	1.72	1.20	138	2.22
	exp <sup>f</sup>	1.74	1.12	142	2.18
FeP(Im)	SIESTA				2.21
	DFT-BP86 <sup>b</sup>				2.10
	exp <sup>g</sup>				2.1-2.2

<sup>a</sup>Distancias en Å, ángulos en grados. <sup>b</sup>Referencia [51]. <sup>c</sup>Corresponde a un sistema modelo con un ligando axial piridina [104]. <sup>d</sup>Referencia [105].  
<sup>e</sup>Corresponde a un modelo con metil imidazol axial [106]. <sup>f</sup>Referencia [160].  
<sup>g</sup>Datos de las referencias [13] y [77], correspondientes a valores medidos en hemos pentacoordinados de origen sintético y natural.

efecto contrario: cuando se une de forma trans a un imidazol los dos enlaces axiales resultan estabilizados y la disociación se reduce respecto al complejo pentacoordinado.

Ahora bien, el debilitamiento del enlace proximal responsable de la activación en el caso de la guanilato ciclasa, se ha observado en mayor o menor medida en otras hemoproteínas. La frecuencia del estiramiento Fe-N<sub>im</sub> obtenida por espectroscopía Raman resonante es un índice de la ruptura proximal. Schelvis y otros investigadores [157] han advertido que el carácter negativo del imidazol puede contrarrestar el efecto trans del NO, y consecuentemente han procurado establecer una correlación entre la frecuencia vibracional y la fuerza de una unión hidrógeno a la histidina —que modificaría la densidad electrónica en el anillo imidazólico— en diversas proteínas cuyas estructuras cristalinas son conocidas. Con el propósito de brindar una base cuantitativa a esta proposición, hemos seleccionado cuatro ejemplos que cubren un rango amplio de  $\nu_{Fe-N}$ , para los que calculamos la magnitud de la unión hidrógeno al N<sub>δ</sub> del imidazol, y la energía del enlace hierro histidina. Las estructuras escogidas corresponden a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la hemoglobina humana en presencia de inositol hexafosfato, a la proteína FixL, y a una peroxidasa (*horseradish peroxidase* C o HRP), y comprenden un espectro de  $\nu_{Fe-N}$  que va de 207 a 244 cm<sup>-1</sup> (se ha sugerido que el sistema puede considerarse hexacoordinado a partir de 210 cm<sup>-1</sup> [157]). FixL es una proteína de membrana perteneciente a la bacteria *Rhizobium meliloti*, que además del hemo posee un dominio quinasa. El O<sub>2</sub> controla la actividad de la quinasa a través de su unión al hierro [161]. La enzima HRP cataliza la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y la oxidación concomitante de una variedad de moléculas aromáticas [162]. Las estructuras cristalográficas de estas proteínas indican la existencia de un puente de hidrógeno que involucra el protón N<sub>δ</sub> de la histidina proximal (figura 6.1). En la hemoglobina la unión tiene lugar entre el imidazol y un grupo carbonilo correspondiente a un enlace amídico del polipéptido, mientras que en la macromolécula de HRP la interacción se produce con el carboxilato de un residuo de ácido aspártico. En el caso de la proteína FixL, la interacción ocurre mediante una red de uniones hidrógeno en la que interviene un residuo de asparagina y una molécula de agua.

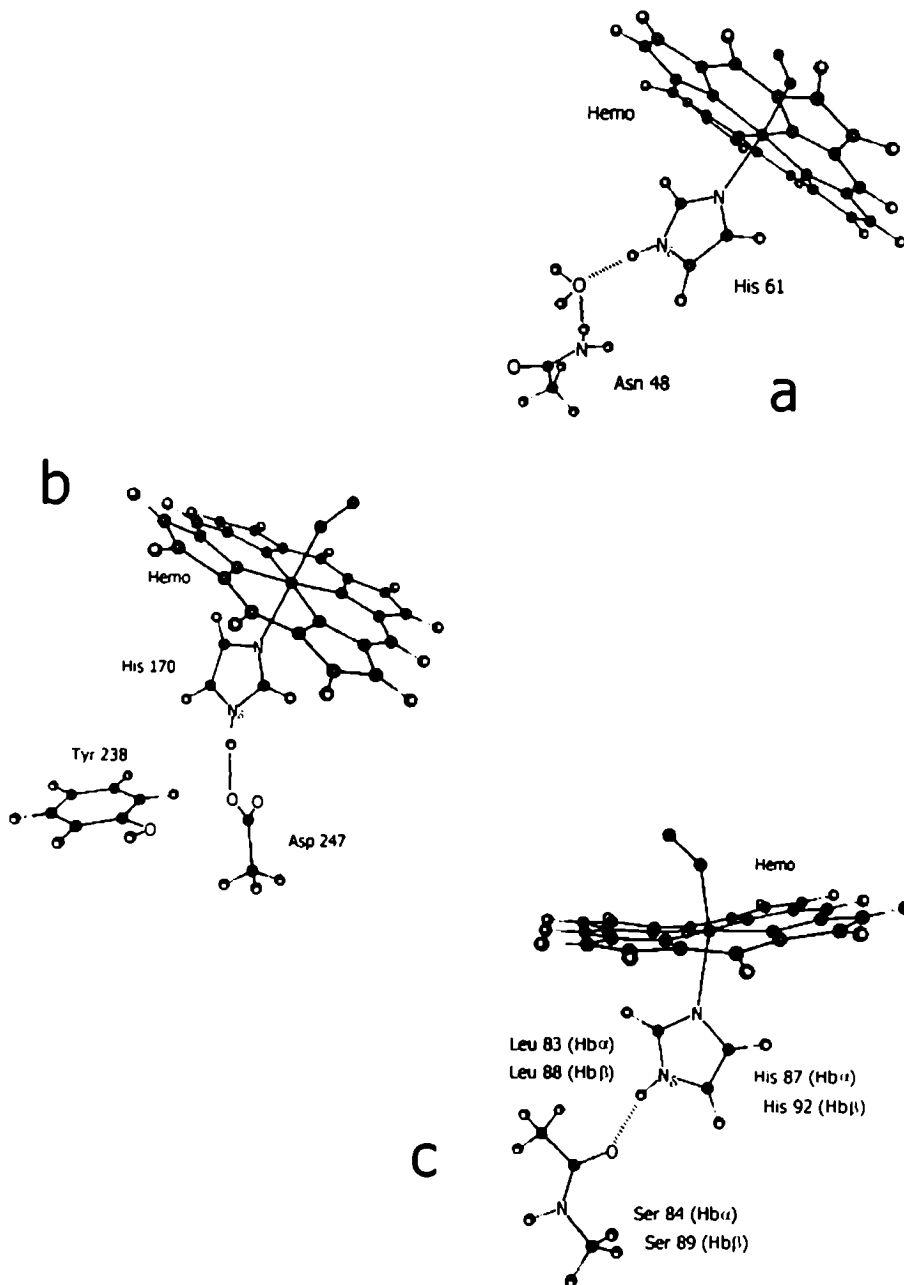


Figura 6.1: Modelo del sitio activo para FixL (a), HRP (b), y hemoglobina humana (c). Los trazos de puntos indican uniones hidrógeno.

Las geometrías utilizadas en los cálculos fueron obtenidas de datos espectroscópicos de rayos X.<sup>1</sup> Sin embargo, las estructuras disponibles no provienen en todos los casos de la especie con actividad biológica (pentacoordinada y ferrosa) y por lo tanto es de esperar que ciertos parámetros en la proteína cristalizada discrepen de los de la proteína activa, en particular la posición del Fe y la distancia al imidazol. Una minimización total no es adecuada para modelar el problema, pues en la proteína los movimientos del hemo y del imidazol están restringidos dentro de la estructura terciaria. Un camino posible para tratar este sistema es asignar la distancia desde el centro de la porfirina al imidazol según la distancia correspondiente optimizada en el sitio activo aislado (en ausencia del entorno proteico). Luego, con este parámetro fijo, hemos incluido los residuos del entorno y permitido la relajación del átomo de Fe, del NO, y del protón  $\delta$  que participa de la unión hidrógeno.

### Cálculos cuánticos

La tabla 6.3 muestra los resultados de las simulaciones efectuadas sobre las estructuras de la figura 6.1, en las que todos los átomos fueron tratados mecanocuánticamente. Puede apreciarse que las energías del enlace hierro imidazol están en consonancia con las frecuencias vibracionales experimentales. También parece haber una correlación entre estas y la interacción sobre el protón del  $N_\delta$ , si bien hay una inversión entre los valores esperados para FixL y el monómero  $\alpha$  de la hemoglobina. En el caso de la enzima HRP, para el cual la unión hidrógeno al  $N_\delta$  resulta estabilizada por la carga negativa de un carboxilato, la energía de disociación Fe-histidina es sensiblemente más alta que en los otros ejemplos. Consistentemente, la frecuencia de estiramiento experimental es notablemente mayor.

Si se comparan las poblaciones de Mulliken en el imidazol contra las correspondientes al sistema aislado (tabla 6.5), se advierte que existe una transferencia de carga hacia el ligando proximal relacionada con el puente de hidrógeno. La inyección de carga adicional promueve la donación  $\sigma$  hacia el metal, lo cual deriva en la neutralización parcial del efecto trans negativo. Este reajuste supone una mayor disponibilidad de densidad

---

<sup>1</sup>Las geometrías cristalográficas PDB de la hemoglobina, la proteína FixL, y la enzima HRP, corresponden a las estructuras 1HGB, 1DRM, y 1ATJ, respectivamente.

**Tabla 6.3** Resultados QM (SIESTA) correspondientes a la energía de la unión hidrógeno ( $\Delta E_{H-N\delta}$  en kcal/mol), la energía de disociación Fe-imidazol ( $\Delta E_{Im}$  en kcal/mol), y las cargas de Mulliken sobre grupos de átomos, y frecuencia de estiramiento Fe-His ( $\text{cm}^{-1}$ ) para FixL, HRP, y las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la hemoglobina humana.

	$\alpha$ Hb	FixL	$\beta$ Hb	HRP
$\Delta E_{H-N\delta}$	-10.9	-4.9	-11.1	-40.3
$\Delta E_{Im}$	5.8	6.9	12.3	18.1
$q_{Im}$	0.04	0.09	-0.03	-0.02
$q_{NO}$	-0.08	-0.04	-0.08	-0.09
$\nu_{Fe-His}$	207 <sup>a</sup>	210 <sup>b</sup>	220 <sup>a</sup>	244 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Referencia [155]. <sup>b</sup>Referencias [161] y [163]. <sup>c</sup>Referencia [164].

electrónica sobre el Fe que aumenta la retrodonación  $\pi$  hacia el NO, como lo reflejan las poblaciones de Mulliken negativas sobre el ligando diatómico.

### Cálculos híbridos QM-MM

La tabla 6.4 contiene los mismos parámetros incluidos en la precedente, pero en este caso sólo el complejo FeP(Im)NO fue representado mediante una descripción cuántica, en tanto los átomos del entorno involucrados en el puente de hidrógeno y cercanos a la histidina proximal se modelaron a través del campo de fuerzas AMBER [41], usando el esquema QM-MM del programa SIESTA. Este enfoque implica una considerable ganancia en términos de costo computacional. Al mismo tiempo, la posibilidad de contrastar los resultados contra el esquema puramente cuántico constituye una prueba preliminar previa a la incorporación del entorno proteico completo. Los valores de  $\Delta E_{Im}$  están en buen acuerdo con los de la tabla 6.3. La misma observación es válida para las energías de las uniones hidrógeno, si bien aquí las diferencias que surgen son algo mayores. En particular, la inversión que se observaba entre los comportamientos de la proteína FixL y de la subunidad  $\alpha$  tiende a desaparecer. El método QM-MM reproduce entonces satisfactoriamente la modulación del efecto trans negativo, lo que podemos justificar en cierta medida si consideramos que la unión hidrógeno consiste esencialmente en una interacción electrostática. No obstante, la inspección de la tabla 6.4 permite comprobar que las cargas de Mulliken en el imidazol exhiben la ten-



**Tabla 6.4** Energía de la unión hidrógeno (kcal/mol), energía de disociación Fe-imidazol (kcal/mol) y cargas de Mulliken sobre grupos de átomos, calculadas mediante la implementación QM-MM del método SIESTA.

	$\alpha$ Hb	FixL	$\beta$ Hb	HRP
$\Delta E_{H-N\delta}$	-9.3	-7.2	-17.3	-35.7
$\Delta E_{Im}$	6.3	6.9	12.3	15.4
$q_{Im}$	0.12	0.13	0.16	0.23
$q_{NO}$	-0.08	-0.06	-0.07	-0.11

dencia opuesta a la que se observa para los cálculos QM. A pesar de ello, los resultados sobre la energía son coincidentes. ¿Cómo se explica esto? Mediante la aproximación QM-MM no es posible modelar la transferencia de carga asociada a la unión hidrógeno, que en tal caso queda reducida a un efecto de polarización. Cuanto más fuerte es el puente de hidrógeno, más se polariza el imidazol. Este efecto permite la estabilización de cierta carga positiva en la histidina, de manera que finalmente se favorece la redistribución electrónica que fortalece la donación  $\sigma$  y por tanto la unión al hierro. De esta manera, la omisión de la transferencia de carga en el cálculo mixto cuántico-clásico no invalida los resultados.

El acuerdo entre los resultados QM y QM-MM propicia la realización de simulaciones híbridas que contemplen la totalidad de la proteína. La tabla 6.5 presenta los valores obtenidos para tres de los cuatro ejemplos examinados, donde el polipéptido completo es incorporado a la simulación a través del campo de fuerzas (en la figura 7.1 se esquematiza el arreglo espacial en el caso de la proteína FixL). Las energías de disociación Fe-imidazol no se apartan significativamente de los valores de la tabla 6.4, salvo quizá para la enzima HRP. En términos generales, podemos decir que la unión hidrógeno al residuo proximal prevalece sobre los posibles efectos distales o de largo alcance. En el caso particular de la enzima HRP, la optimización estructural revela la existencia de una unión hidrógeno entre el NO y un protón de la cavidad distal, ligado al nitrógeno de un enlace peptídico. La polarización inducida sobre el óxido nítrico, reflejada en las poblaciones de Mulliken, supone un aumento en la migración de densidad electrónica a lo largo del eje  $N_{Im}$ -Fe-N que explicaría el incremento en  $\Delta E_{Im}$ . Aún así, la modulación proximal

**Tabla 6.5** Energía de la unión hidrógeno (kcal/mol), energía de disociación Fe-imidazol (kcal/mol), y cargas de Mulliken, calculadas en presencia del entorno proteico completo mediante la implementación QM-MM del método SIESTA.

	$\alpha$ Hb	FixL	HRP
$\Delta E_{Im}$	3.7	10.7	22.9
$q_{Im}$	0.09	0.17	0.28
$q_{NO}$	-0.01	-0.09	-0.19

parece ser el factor dominante.

## 6.4 Comentarios finales

Los resultados de la simulación computacional respaldan la interpretación que atribuye a la unión hidrógeno la atenuación del efecto trans negativo del NO. En la tabla 6.6 presentamos datos correspondientes a la hemoporfirina con imidazol y con un ion imidazolato coordinados en forma trans al NO, obtenidos mediante cálculos QM en el vacío, relajando las coordenadas del hierro y de los ligandos axiales. El acuerdo entre los parámetros geométricos de la tabla 6.6 con los correspondientes al compuesto modelo de dos amidinatos (tabla 6.1) es una evidencia de que la estructura simplificada resulta apropiada para describir a la hemoporfirina. El complejo ionizado es una representación radicalizada de la perturbación ejercida por la unión hidrógeno al  $N_{\delta}$ . La comparación de ambos sistemas muestra que el incremento de la densidad electrónica en el imidazol refuerza considerablemente el enlace con el hierro, reduciendo al mismo tiempo la distancia Fe- $N_{im}$  en detrimento de la longitud Fe-NO. Esta influencia sobre la unión hierro histidina se manifiesta en mayor o menor medida en las cuatro estructuras examinadas en las tablas 6.3, 6.4 y 6.5.

Claramente, pues, la densidad de carga sobre el imidazol controla su disociación del metal. En la proteína, la densidad electrónica resulta modulada a través de la unión hidrógeno al  $N_{\delta}$  del residuo proximal. Esta interacción se convierte así en un factor determinante respecto del estado de coordinación

**Tabla 6.6** Energía de disociación Fe-N<sub>im</sub> (kcal/mol), cargas de Mulliken, y distancias de enlace (Å), calculadas para la hemoporfirina nitrosilada coordinada a imidazol (sistema neutro) e imidazolato (sistema negativo).

	sistema neutro	sistema negativo
$\Delta E_{Im}$	8.3	29.6
$q_{Im}$	0.12	-0.65
$q_{NO}$	-0.06	-0.13
Fe-N <sub>im</sub>	2.29	2.09
Fe-N(NO)	1.75	1.79

del hierro. En ausencia de puente de hidrógeno la histidina neutra no es capaz de compensar el efecto trans negativo del óxido nítrico. La connotación que estos resultados adquieren en relación al problema de la guanilato ciclasa tiene un enorme interés. Si bien no disponemos de la estructura cristalina de la enzima, se ha obtenido para el estiramiento Fe-histidina una frecuencia de 204 cm<sup>-1</sup> [150]. Se trata de un valor pequeño en comparación al de las otras proteínas consideradas. Cabe conjeturar, entonces, que la ruptura del enlace proximal responsable de la estimulación catalítica está asociada a la inexistencia de una interacción significativa sobre el protón  $\delta$  de la histidina 105. La disociación proximal se ha observado también en otras hemoproteínas. Sin embargo, sólo en el caso de la guanilato ciclasa conduce a un cambio conformacional que tiene el efecto de multiplicar extraordinariamente la actividad enzimática.



## Capítulo 7

### Conclusiones y perspectivas

Si se consideran las hemoproteínas a la luz de la evidencia articulada en las páginas precedentes, no puede menos que reconocerse la singular adaptabilidad del grupo hemo. La misma evidencia establece que es el entorno proteico el responsable de explotar semejante versatilidad, determinando en última instancia la funcionalidad del sitio activo. Desde la oxidación de un compuesto orgánico al transporte de electrones, las múltiples tareas que puede acometer el hemo aparecen regladas por el polipéptido. Esto pone de relieve la importancia objetiva de atender a los efectos del entorno al momento de emprender el estudio del centro metálico en una hemoproteína. Resulta innegable que la exploración de sistemas modelo constituye un atajo sumamente valioso en esta dirección, aunque su aporte concierne exclusivamente a las propiedades generales de las hemoporfirinas. Es cierto que la evolución de la química bioinorgánica ha vuelto posible la síntesis de compuestos que reproducen con bastante aproximación el entorno estructural inmediato del hemo en la proteína [77]; sin embargo los efectos del entorno pueden ser sutiles o manifestarse a través de interacciones indirectas, por lo cual representar cabalmente la actividad del grupo prostético a partir de un modelo mínimo no es siempre factible.

La relevancia que a nivel fisiológico supone el estudio de las hemoproteínas se debe en buena parte a la posibilidad de elucidar los mecanismos de modulación de la actividad biológica. La interpretación y el esclarecimiento de ta-

les mecanismos entrañan un enorme valor, cuya trascendencia se materializa por ejemplo en las posibles aplicaciones terapéuticas. Pero la flexibilidad que muestra el grupo hemo y su respuesta al entorno lo han convertido además en objeto de interés para otras áreas. Su versatilidad en cuanto centro redox le predispone para potenciales aplicaciones en electroquímica o en ciencia de los materiales.

Si convenimos en que el conocimiento de los detalles moleculares resulta imprescindible para la investigación del comportamiento enzimático, entonces debemos admitir que los métodos de química cuántica ocupan un lugar nada despreciable. Son capaces de suministrar información que a menudo se halla fuera del alcance de los procedimientos experimentales, o bien que sólo podría obtenerse mediante técnicas muy costosas. En principio, permiten simular casi cualquier experimento imaginable sobre un sistema molecular y medir todas las variables involucradas. En la práctica, están sometidos a serias limitaciones asociadas principalmente al tamaño del sistema. En el caso de una proteína se hace necesario recurrir a simplificaciones, por ejemplo las que proponen los tratamientos híbridos QM-MM. Este enfoque reduce las demandas de hardware, mostrándose valioso en una variedad de aplicaciones. Al momento, posiblemente es la herramienta de simulación computacional más eficiente para el cálculo de estructura electrónica en proteínas, y no sería sorprendente que en el futuro su uso se generalice a otras macromoléculas o a sistemas extendidos.

En este trabajo, según conviniera al problema particular, se optó por optimizar las coordenadas del sistema o bien por adoptar la estructura de rayos X. Esta tesitura es útil para acceder a propiedades de equilibrio. No obstante, comporta una limitación en tanto ofrece un punto de vista estrictamente estático. En la figura 7.1 se esquematiza el polipéptido correspondiente a la proteína FixL. Se destaca el grupo hemo y algunos átomos de su entorno. Posiblemente la figura proporcione de un modo bastante gráfico una idea de la movilidad que en condiciones fisiológicas puede llegar a exhibir la estructura terciaria y en especial las cadenas laterales. Considerar los aspectos dinámicos de la proteína puede resultar esencial a muchos fines prácticos,

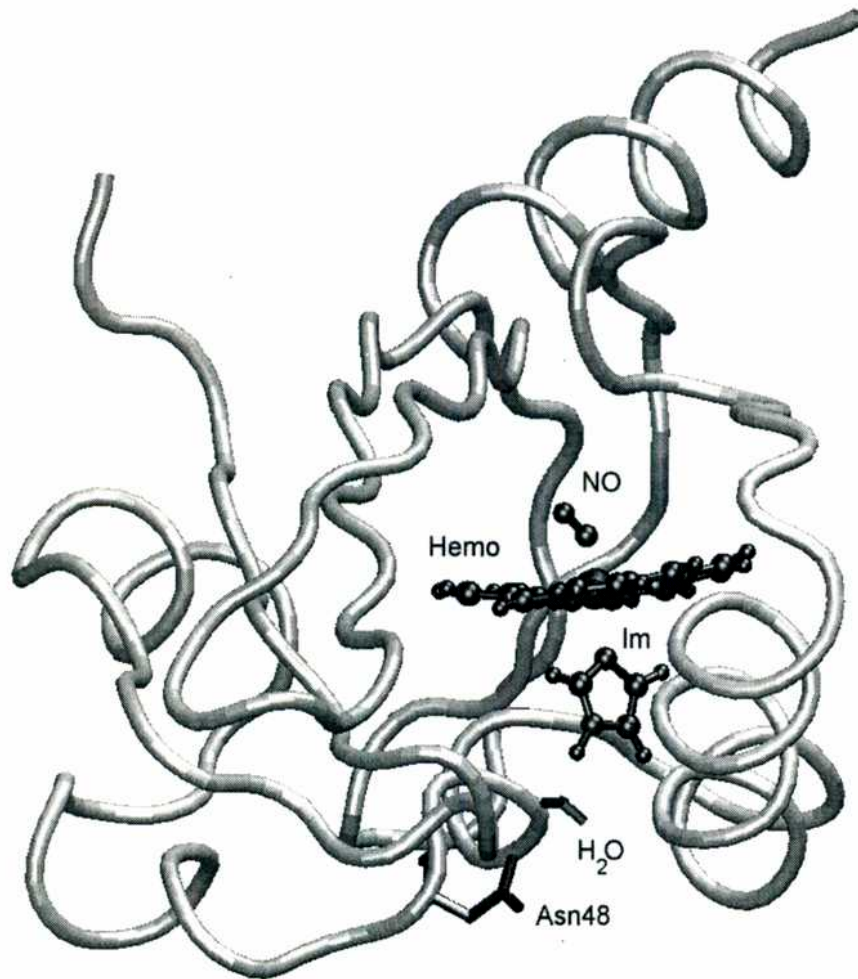


Figura 7.1: Representación de la proteína FixL.

por ejemplo para la estimación de constantes de afinidad o cinéticas, para determinar canales y mecanismos de transporte intramolecular, o para simular explícitamente efectos cooperativos. En la actualidad se llevan a cabo rutinariamente simulaciones de dinámica molecular sobre macromoléculas mediante la utilización de métodos clásicos, con las consabidas limitaciones que presuponen. La dinámica molecular *ab initio* o DFT sobre proteínas es por el momento un objetivo demasiado ambicioso, que los métodos de orden N y los tratamientos QM-MM pretenden aseguir. Pero aún recurriendo a las aproximaciones híbridas, el tamaño del subsistema QM con frecuencia impide realizar una simulación lo suficientemente prolongada para ser estadísticamente significativa. Es fundamental disponer de métodos veloces capaces de minimizar el tiempo demandado por cada iteración. En tal sentido, la implementación QM-MM del método SIESTA se halla bien posicionada; su aplicación a la dinámica de proteínas constituye uno de nuestros objetivos a mediano plazo.

Resulta difícil especular acerca de la trascendencia que los métodos de química cuántica y física molecular llegarán a adquirir dentro de las ciencias naturales. Por el momento puede anticiparse que su evolución pondrá a su alcance sistemas cada vez más complejos, situando bajo su órbita una parte importante del universo material. Después de todo, no es impensable que los progresos metodológicos apuntalados por el formidable desarrollo tecnológico coloquen a la simulación computacional en una situación privilegiada, a la misma altura que los experimentos convencionales, pero con una potencialidad extraordinariamente mayor.



# Bibliografía

- [1] Strayer, L. *Biochemistry*, 4th ed. (W. H. Freeman and Company, New York, 1995).
- [2] Branden, C.; Tooze, J. *Introduction to Protein Structure*; Garland Publishing, Inc., New York and London, 1991.
- [3] Loew, G. H.; Harris, D. L. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 407.
- [4] Siegbahn, P. E. M.; Blomberg, M. R. A. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 421.
- [5] (a) Daggett, V. *Methods. Mol. Biol.* **2001**, *168*, 215. (b) Wang, W; Donini, O.; Reyes, C. M.; Kollman P. A. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, *30*, 211.
- [6] Monard, G.; Merz, K. M. Jr. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 904.
- [7] Orozco, M.; Luque, F. J. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4187.
- [8] Gao, J. Methods and applications of combined quantum mechanical and molecular mechanical potentials. En *Reviews in Computational Chemistry*; Lipkowitz, K. B., Boyd, D. B., Eds.; VCH Publishers: New York, 1996; Vol. 7.
- [9] Carmer, C. S.; Weiner, B.; Frenklach, M. *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 1356.
- [10] Sherwood, P.; de Vries, A. H.; Collins, S. J.; Greatbanks, S. P.; Burton, N. A.; Vincent, M. A.; Hillier, I. H. *Faraday Discuss.* **1997**, *106*, 79.
- [11] Ferenczy, G. G.; Csonka, G. I.; Náray Szabó, G.; Ángyán, J. G. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 38.
- [12] Chapman, S. K.; Daff, S.; Munro, A. W. Heme: The most versatile redox centre in biology? En *Metal Sites in Proteins and Models. Iron Centers*; Hill, H. A. O., Sadler, P. J., Thomson, A. J., Eds.; Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1997; Vol. 88.

- [13] Scheidt, W. R.; Reed, C. A. *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 543.
- [14] Levine, I. N. *Quantum Chemistry*, Fifth Edition, Prentice-Hall, Inc., New Jersey, 2000.
- [15] Hohenberg, P.; Kohn, W. *Phys. Rev.* **1964**, *136*, B864.
- [16] Kohn, W.; Sham, L.J. *Phys. Rev.* **1965**, *140*, A1133.
- [17] Scherlis, D. A.; Estrin, D. A. *Int. J. Quantum Chem.* **2002**, *87*, 158.
- [18] (a) Scherlis, D. A.; Cymeryng, C. B.; Estrin, D. A. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 2352. (b) Scherlis, D. A.; Estrin, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8436. (c) Scherlis, D. A.; Marti, M.; Estrin, D. A.; Ordejón, P.; enviado para su publicación.
- [19] Szabo, A.; Ostlund, N. S. *Modern Quantum Chemistry*, First Edition, Mc Graw-Hill Publishing Company, New York, 1989.
- [20] Leach, A. R. *Molecular Modelling*, Addison Wesley Longman Limited, 1996.
- [21] Dewar, M. J. S.; Jie, C.; Ju, J. *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 5003.
- [22] Parr, R. G.; Yang, W. *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, New York, 1989.
- [23] Vosko, S. H.; Wilk, L.; Nusair, M. *Can. J. Phys.* **1980**, *58*, 1200.
- [24] Perdew, J. P.; Wang, Y. *Phys. Rev. B* **1986**, *33*, 8800.
- [25] Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3865.
- [26] Becke, A. D. *Phys. Rev.* **1988**, *A38*, 3098.
- [27] Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.
- [28] Perdew, J. P. *Phys. Rev. B* **1986**, *33*, 8822.
- [29] Perdew, J. P.; Wang, Y. *Phys. Rev. B*, **1992**, *45*, 13244.
- [30] Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.
- [31] Cohen, A. J.; Handy, N. C. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *316*, 160.
- [32] Görling, A. *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *83*, 5459.
- [33] Estrin, D. A.; Corongiu, G.; Clementi, E. *METECC, Methods and Techniques in Computational Chemistry*, Clementi, E., Ed.; Stef: Cagliari, Italy, 1993.

- [34] M. J. Frisch *et al.*, GAUSSIAN 98, Revision A.7 (Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1998).
- [35] Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1988**, *88*, 2547.
- [36] Sánchez-Portal, D.; Ordejón, P.; Artacho, E.; Soler, J. M. *Int. J. Quantum Chem.* **1997**, *65*, 453.
- [37] Artacho, E.; Sánchez-Portal, D.; Ordejón, P.; García, A.; Soler, J. M. *Phys. Stat. Sol. b* **1999**, *215*, 809.
- [38] Troullier, N.; Martins, J. L. *Phys. Rev. B* **1991**, *43*, 1993.
- [39] Kleinman, L.; Bylander, D. M. *Phys. Rev. Lett.* **1982**, *48*, 1425.
- [40] Press, W. H.; Teulosky, S. A.; Vetterling, W. T.; Flannery, B. P. *Numerical Recipes. The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.
- [41] Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz Jr., K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179.
- [42] Brooks, B.R.; Bruccoleri, R.E.; Olafson, B.D.; States, D.J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. *J. Comp. Chem.* **1983**, *4*, 187.
- [43] Allen, M. P.; Tildesley, D. J. *Computer Simulations in Chemical Physics*, NATO ASI Series 397, Ed. Kluwer, Dordrecht (1993).
- [44] Allen, M. P.; Tildesley, D. J. *Computer Simulation of Liquids*, Clarendon Press, Oxford (1986).
- [45] Nosé, S. *Mol. Phys.* **1984**, *53*, 255.
- [46] Case, D. A.; Huynh, B. H.; Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4433.
- [47] Zelck, S. H.; Loew, G. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 1815.
- [48] Edwards, W. D.; Weiner, B.; Zerner, M. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2196.
- [49] Jones, D. H.; Hinman, A. S.; Ziegler, T. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 2092.
- [50] Ghosh, A.; Bocian, D. F.; *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 6363.
- [51] Rovira, C.; Kunc, K.; Hutter, J.; Ballone, P.; Parrinello, M. *J. Phys. Chem.* **1997**, *101*, 8914.

- [52] Kozlowski, P. M.; Spiro, G. T.; Bérces, A. B.; Zgierski, M. Z. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 2603.
- [53] Ghosh, A.; Wondimagegn, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8101.
- [54] Perutz, M. F. *Nature* **1970**, *228*, 726.
- [55] Hoard, J. L. *Science* **1971**, *174*, 1295.
- [56] J. P. Collman, J. P.; Reed, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2048.
- [57] Spertalian, K.; Lang, G.; Collman, J. P.; Gagne, R. R.; Reed, C. A. *J. Chem. Phys.* **1975**, *63*, 5375.
- [58] Jameson, G. B.; Molinaro, F.; Ibers, J. A.; Collman, J. P.; Brauman, J. I.; Rose, E.; Suslick, K. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3224.
- [59] Maseras F. *New J. Chem.* **1998**, *22*, 327.
- [60] Jewsbury, P.; Yamamoto, S.; Minato, T.; Saito, M.; Kitagawa, T. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 12677.
- [61] Marques, H. M.; Munro, O. Q.; Grimmer, N. E.; Levendis, D. C.; Marsicano, F.; Patrick, G.; Markoulides, T. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1995**, *91*, 1741.
- [62] Schfer, A.; Huber, C.; Ahlrichs, R. *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 5829.
- [63] Godbout, N.; Salahub, D. R.; Andzelm, J.; Wimmer, E. *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 560.
- [64] Dolg, M.; Wedig, U.; Stoll, H.; Preuss, H. *J. Chem. Phys.* **1987**, *86*, 2123.
- [65] (a) Head-Gordon, M.; Pople, J. A.; Frisch, M. J. *Chem. Phys. Lett.* **1988**, *153*, 503. (b) Frisch, M. J.; Head-Gordon, M.; Pople, J. A. *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *166*, 275. (c) Frisch, M. J.; Head-Gordon, M.; Pople, J. A. *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *166*, 281.
- [66] Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 1372.
- [67] (a) Harris, J.; Jones, R. O. *J. Phys. F* **1974**, *it 4*, 1170. (b) Gunnarsson O.; Lundqvist, B. I. *Phys. Rev. B* **1976**, *13*, 4274. (c) Langreth, D. C.; Perdew, J. P. *Phys. Rev. B* **1977**, *15*, 2884. (d) Harris, J. *Phys. Rev. A* **1984**, *29*, 1648.
- [68] Harris, D.; Loew, G. H.; Komornicki, A. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 3959.

- [69] Holthausen, M. C.; Fiedler, A.; Schwarz, H.; Koch, W. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 6236.
- [70] Atomic Spectra Database at the National Institute of Standards and Technology. URL: <http://physics.nist.gov> (June 2000).
- [71] Glukkhovtsev, M. N.; Bach, R. D.; Nagel, C. J. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 316.
- [72] Liu, Y. *J. Chem. Information and Computer Sci.* **2001**, *41*, 22.
- [73] Lee, X. Y.; Zgierski, M. Z. *Chem. Phys. Lett.* **1992**, *188*, 16.
- [74] Scheidt, W. R.; Geiger, D. K. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1974**, 1154.
- [75] Létard, J. F.; Guionneau, P.; Rabardel, L.; Howard, J. A. K.; Goeta, A. E.; Chasseau, D.; Kahn, O. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 4432.
- [76] Blakesley, D. W.; Payne, S. C.; Hagen, K. S. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 1979.
- [77] Momenteau, M.; Reed, C. A. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 659.
- [78] Vasquez, G. B.; Ji, X.; Pechik, I.; Fronticelli, C.; Gilliland, G. L. *Estructura de Rayos X de la alfa-oxi beta-(C112g)desoxi hemoglobina humana*. PDB Id: 1GBV. Protein Data Bank at the National Library of Medicine (US). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- [79] Olafson, B. D.; Goddard III, W. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 1315.
- [80] Goddard III, W. A.; Olafson, B. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 2335.
- [81] Rovira, C.; Parrinello, M. *Int. J. Quantum Chem.* **1998**, *70*, 387.
- [82] (a) Lewis, D. F.; Pratt, J. M. *Drug Metab. Rev.* **1998**, *30*, 739. (b) Poulos, T. L. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 767.
- [83] Ortiz de Montellano, P. R. *Cytochrome P-450: Structure, Mechanism and Biochemistry*; Plenum Press, New York, 1995.
- [84] Guengerich, F. P.; MacDonald, T. L. *FASEB J.* **1990**, *4*, 2453.
- [85] Dawson, J. H.; Sono, M. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1255.

- [86] (a) Hanke, C. J.; Drewett, J. G.; Myers, C. R.; Campbell, W. B. *Endocrinology* **1998**, *139*, 4053. (b) del Punta, K.; Charreau, E. H.; Pignataro, O. *Endocrinology* **1996**, *137*, 5337. (c) Van Voorhis, B. J.; Dunn, M. S.; Snyder, G. D.; Weiner, C. P. *Endocrinology* **1994**, *135*, 1799.
- [87] Minamiyama, Y.; Takemura S.; Imaoka, S.; Funae, Y.; Tanimoto Y.; Inoue, M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *283*, 1479.
- [88] Harris, D.; Loew, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5799.
- [89] de Groot, M. J.; Havenith, R. W. A.; Vinkers, H. M.; Zwaans, R.; Vermeulen, N. P. E.; van Lenthe, J. H. *J. Comput.-Aided Mol. Design* **1998**, *12*, 183.
- [90] Harris, D.; Loew, G. H.; Waskell, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4308.
- [91] Green, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10772.
- [92] Pudzianowski, A. *Int. J. Quantum Chem.*, en prensa.
- [93] Yeom, H.; Sligar, S. G.; Li, H.; Poulos, T. L.; Fulco, A. J. *Biochemistry* **1995**, *34*, 14733.
- [94] *HYPERCHEM*, Release 5.1 Pro. Hypercube, Inc.; 1997.
- [95] (a) *AMPAC 5.0*, 1994 Semichem, 7128 Summit, Shawnee, KS 66216. (b) Holder, A. J.; Ward, R. *Abstracts of Papers of the Am. Chem. Soc.* **1998**, *216*, 174. (c) White, D. A.; Holder, A. J.; Jie, C. *Abstracts of Papers of the Am. Chem. Soc.* **1998**, *216*, 182.
- [96] Li, H.; Poulos, T. L. *Acta Crystallogr.* **1995**, *D51*, 21.
- [97] Schlichting, I.; Jung, C.; Schulze, H. *FEBS Lett.* **1997**, *3*, 253.
- [98] Sundaramoorthy, M.; Turner, J.; Poulos, T. L. *Structure (London)* **1995**, *3*, 1367.
- [99] Estrin, D.; Hamra, O. Y.; Paglieri, L.; Slep, L.; Olabe, J. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 6832.
- [100] Taylor, J. C.; Mueller, M. H.; Hitterman, R. L. *Acta Crystallogr.* **1974**, *A26*, 559.
- [101] Estrin, D.; Baraldo, L.; Slep, L.; Barja, B.; Olabe, J.; Paglieri, L.; Corongiu, G. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 3897.
- [102] Bottomley, F.; White, P. S. *Acta Crystallogr.* **1979**, *B35*, 2193.

- [103] Bray, M.; Deeth, R.; Paget, V.; Sheen, P. *Int. J. Quantum Chem.* **1996**, *61*, 85.
- [104] Peng, S. M.; Ibers, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 8032.
- [105] Scheidt, W. R.; Frisse, M. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 17.
- [106] Jameson, G. B.; Rodley, G. A.; Robinson, W. T.; Gagne, R. R.; Reed, C. A.; Collman, J. P. *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 850.
- [107] (a) Lang, G.; Spartalian, K.; Reed, C. A.; Collman, L. *J. Chem. Phys.* **1978**, *69*, 5424. (b) Goff, H.; La Mar, G. N.; Reed, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *77*, 3641.
- [108] Andzelm, J.; Radzio, E.; Salahub, D. R. *J. Comput. Chem.* **1985**, *6*, 520.
- [109] Sim, F.; Salahub, D. R.; Chin, S.; Dupuis, M. *J. Chem. Phys.* **1991**, *95*, 4317.
- [110] Sim, F.; St.-Amant, A.; Papai, I.; Salahub, D.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4391.
- [111] (a) Elola, M. D.; Laria, D.; Estrin, D. A. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 5105. (b) Stanton, R. V.; Little, L. R.; Merz, K. M. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17344.
- [112] (a) Fukui, K. *Theory of Orientation and Stereoselection*; Berlin: Springer-Verlag, 1975. (b) Fukui, K. *Science* **1987**, *218*, 747. (c) Fukui, K.; Yonezawa, T.; Shingu, H. *J. Chem. Phys.* **1952**, *20*, 722. (d) Fukui, K.; Yonezawa, T.; Nagata, C.; Shingu, H. *J. Chem. Phys.* **1954**, *22*, 1433.
- [113] (a) Collman, J. P.; Sorrell, T. N.; Hoffman, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 913. (b) Collman, J. P.; Sorrell, T. N.; Hodgson, K. O.; Kulshrestha, A. K.; Strouse, C. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5180. (c) English, D. R.; Hendrickson, D. N.; Suslick, K. S.; Eigenbrot, C. W.; Scheidt, W. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7258.
- [114] Scheidt, W. R.; Ellison, M. K. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 350.
- [115] Enemark, J. H.; Feltham, R. D. *Coord. Chem. Rev.* **1974**, *13*, 339.
- [116] (a) Hoffmann, R.; Chen, M. M. L.; Elian, M.; Rossi, A. R.; Mingo, D. M. P. *Inorg. Chem.* **1974**, *13*, 2666. (b) Wayland, B. B.; Olson, L. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 6037.
- [117] Wong, M. W.; Wiberg, K. B.; Frisch, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1645.

- [118] Hoshino, M.; Maeda, M.; Konishi, R.; Seki, H.; Ford, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5702.
- [119] Ziegler, T. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 651.
- [120] Kiyohiro, I. *Nature* **1999**, *401*, 437.
- [121] Goldberg, D. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3371.
- [122] Minning, D. M.; Gow, A. J.; Bonaventuras, J.; Braun, R.; Dewhirst, M.; Goldberg, D. E.; Stamler, J. S. *Nature* **1999**, *401*, 497.
- [123] DeBaere, I.; Perutz, M. F.; Liger, L.; Marden, M. C.; Poyart, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 1594.
- [124] Jian, Y.; Kloek, A. P.; Goldberg, D. E.; Mathews, F. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 4224.
- [125] Shaanan, B. *Nature* **1982**, *296*, 683.
- [126] Shaanan, B. *J. Mol. Biol.* **1983**, *171*, 31.
- [127] (a) Olson, J. S.; Mathews, A. J.; Rohlf, R. J.; Springer, B. A.; Egeberg, K. D.; Sligar, S. G.; Tame, J.; Renaud, J. P.; Nagai, K. *Nature*, **1988**, *336*, 265. (b) Mathews, A. J.; Rohlf, R. J.; Olson, J. S.; Tame, J.; Renaud, J. P.; Nagai, K. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 16573.
- [128] Unzai, S.; Eich, R.; Shibayama, N.; Olson, J. S.; Morimoto, H. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 23150.
- [129] Phillips, G. N. Jr.; Teodoro, M. L.; Li, T.; Smith, B.; Olson, J. S. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8817.
- [130] Spiro, T. G.; Kozlowski, P. M. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 137.
- [131] Rovira, C.; Schulze, B.; Eichinger, M.; Jeffrey, D. E.; Parrinello, M. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 435.
- [132] Sigfridsson, E.; Ryde, U. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 99.
- [133] Kiger, L.; Rashid, A. K.; Griffon, N.; Haque, M.; Moens, L.; Gibson, Q. H.; Poyart, C.; Marden, M. C. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 990.
- [134] Miele, A. E.; Santanché, S.; Travaglini-Allocatelli, C.; Vallone, B.; Brunori, M.; Bellelli, A. *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*, 515.
- [135] (a) Estrin, D. A.; Paglieri, L.; Corongiu, G.; Clementi, E. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 8701. (b) Bruge, F.; Bernasconi, M.; Parrinello, M. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 4734.



- [136] Olson, J. S.; Phillips, G. N. Jr. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1997**, *2*, 544.
- [137] (a) Mims, M. P.; Porras, A. G.; Olson, J. S.; Noble, R. W.; Peterson, J. A. *J. Mol. Biol.* **1983**, *258*, 14219. (b) Walda, K. N.; Liu, X. Y.; Sharma, V. S.; Magde, D. *Biochemistry* **1994**, *33*, 2198.
- [138] Springer, B. A.; Sligar, S. G.; Olson, J. S.; Phillips, G. N. Jr. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 699.
- [139] Peterson, E. S.; Huang, S.; Wang, J.; Miller, M. L.; Vidugiris, G.; Kloek, A. P.; Goldberg, D. E.; Chance, M. R.; Wittenberg, J. B.; Friedman, J. M. *Biochemistry* **1997**, *36*, 13110.
- [140] Stone, J. R.; Marletta, M. A. *Biochemistry* **1996**, *35*, 1093.
- [141] Garbers, D. L.; Lowe, D. G. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 30741.
- [142] Koshland, D. E., Jr. *Science* **1992**, *258*, 1861.
- [143] Zhao, Y.; Schevis, J.; Babcock, G. T.; Marletta, M. A. *Biochemistry* **1998**, *37*, 4502.
- [144] Stone, J. R.; Marletta, M. A. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5636.
- [145] Palmer, R. M. J.; Ferrige, A. G.; Moncada, S. *Nature* **1987**, *327*, 524.
- [146] Kim, S.; Deinum, G.; Gardner, M. T.; Marletta, M. A.; Babcock, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8769.
- [147] Stone, J. R.; Marletta, M. A. *Biochemistry* **1995**, *34*, 14668.
- [148] Ignarro, L. J.; Degnan, J. N.; Baricos, W. H.; Kadowitz, P. J.; Wolin, M. S. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *718*, 49.
- [149] Stone, J. R.; Sands, R. H.; Dunham, W. R.; Marletta, M. A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *207*, 572.
- [150] Deinum, G.; Stone, J. R.; Babcock, G. T.; Marletta, M. A. *Biochemistry* **1996**, *35*, 1540.
- [151] (a) Tomita, T.; Ogura, T.; Tsuyama, S.; Imai, Y.; Kitagawa, T. *Biochemistry* **1997**, *36*, 10155. (b) Yu, A. E.; Hu, S.; Spiro, T. G.; Burstyn, J. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4117.
- [152] Traylor, T. G.; Sharma, V. S. *Biochemistry* **1992**, *31*, 2847.
- [153] Dierks, E. A.; Hu, S.; Vogel, K. M.; Yu, A. E.; Spiro, T. G.; Burstyn, J. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7316.

- [154] Zhao, Y.; Hoganson, C.; Babcock, G. T.; Marletta, M. A. *Biochemistry* **1998**, *37*, 12458.
- [155] Nagai, K.; Welborn, C.; Dolphin, D.; Kitagawa, T. *Biochemistry* **1980**, *19*, 4755.
- [156] (a) Duprat, A. F.; Traylor, T. G.; Wu, G. Z.; Coletta, M.; Sharma, V. S.; Walda, K. N.; Magde, D. *Biochemistry* **1995**, *34*, 2634. (b) Tomita, T.; Hirota, S.; Ogura, T.; Olson, J. S.; Kitagawa, T. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 7044.
- [157] Schelvis, J. P. M.; Seibold, S. A.; Cerda, J. F.; Garavito, R. M.; Babcock, G. T. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 10844.
- [158] Izquierdo, J.; Vega, A.; Balbás, L. C.; Sánchez-Portal, D.; Junquera, J.; Artacho, E.; Soler, J. M.; Ordejón, P. *Phys. Rev. B* **2000**, *61*, 13639.
- [159] Louie, S. G.; Froyen, S.; Cohen, M. L. *Phys. Rev. B* **1982**, *26*, 1738.
- [160] (a) Piciulo, P. L.; Rupprecht, G.; Scheidt, W. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 5293. (b) Piciulo, P. L.; Scheidt, W. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1913.
- [161] Lukat-Rodgers, G. S.; Rodgers, K. R. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4178.
- [162] Hashimoto, S.; Takeuchi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11012.
- [163] Rodgers, K. R.; Lukat-Rodgers, G. S.; Tang, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11241.
- [164] Teraoka, J.; Kitagawa, T. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 3969.

En estos casos suele adjuntarse una apostilla de agradecimientos. Confieso que había considerado rehuir esta costumbre, pues siempre la he juzgado un recurso innecesario, ante la posibilidad de expresar mi reconocimiento oportunamente y en forma privada a aquellos a quienes lo debo. No obstante, en virtud de mi carácter abúlico, es posible que jamás lo hiciera. Valgan estas palabras, pues, como justificación de lo que sigue.

En primer lugar me gustaría agradecer y manifestar mi aprecio a Darío. Entre otros motivos, por aproximarse tanto como es posible al concepto de jefe ideal.

A Valeria y a Dolores, generosos manantiales de conocimiento, por su ayuda y por su amistad.

A las personas que conocí en la facultad durante estos años de tesis o poco antes. Hablo de Nano, Adrián, Marcelo, Gustavo, Daniel, Ernesto, Diana, Pesto, Diego, Germán, el chino, entre otros tantos. A Pedro, por su eficiencia y buena predisposición para facilitar mis maniobras de último momento. A Karin.

A Pablo Ordejón y a Enric Canadell.

A mis padres y hermanos, siempre presentes para bien.

A mis amigos entrañables, que están todos dispersos, pero que sabrán aquí reconocerse.

A Verónica.