

# ESTUDIO TEÓRICO SOBRE LA REACTIVIDAD QUÍMICA DE BIOMOLÉCULAS

TESIS QUE PRESENTA

FELIPE APARICIO PLATAS

PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

JULIO DE 2004

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ASESOR:

DR. MARCELO E. GALVÁN ESPINOSA

B

# ESTUDIO TEÓRICO SOBRE LA REACTIVIDAD QUÍMICA DE BIOMOLÉCULAS

TESIS QUE PRESENTA  
FELIPE APARICIO PLATAS  
PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

JULIO DE 2004

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ASESOR:  
DR. MARCELO E. GALVÁN ESPINOSA





ESTA TESIS SE DESARROLLO EN EL AREA DE FISICOQUIMICA TEORICA DEL DEPARTAMENTO DE QUIMICA DE LA UAM-I, BAJO LA DIRECCION DEL DR. MARCELO GALVAN ESPINOSA.

EL EXAMEN DE GRADO SE LLEVO A CABO EL DIA 29 DE JULIO DE 2004 A LAS 10:00 HRS, EN LA SALA DE CONFERENCIAS DEL DEPARTAMENTO DE QUIMICA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA – IZTAPALAPA.

EL JURADO ESTUVO FORMADO POR LOS SIGUIENTES SINODALES:

Dr. José Luis Gázquez Mateos	Presidente
Dr. Arturo Rojo Domínguez	Secretario
Dra. Annik Vivier Jegoux	Vocal
Dr. Andreas Max Köster	Vocal
Dr. Alejandro Ramírez Solís	Vocal



# Agradecimientos

Es difícil imaginar cómo sería el andar cotidiano sin el apoyo de mis padres y mis hermanos. A ellos agradezco su inmenso amor y comprensión.

Mi agradecimiento sincero al Dr. Marcelo Galván, director de esta tesis y buen amigo. Marcelo ha influido en mí no sólo por su calidad científica sino por su calidad humana. Muchas gracias, Marcelo, por tu apoyo, tus consejos y tu orientación.

Agradezco a la Dra. Annik Vivier Jegoux, al Dr. Andreas M. Köster, al Dr. José Luis Gázquez Mateos, al Dr. Alejandro Ramírez Solís y al Dr. Arturo Rojo Domínguez, por la revisión de esta tesis y por sus valiosos comentarios.

A los compañeros del Area de Fisicoquímica Teórica de la UAM-I, va mi gratitud por su amistad.

Este trabajo no se habría realizado sin la formación que recibí en el Departamento de Química de la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa. Agradezco a todos los que contribuyeron en mi formación académica.

Agradezco al CONACyT por financiar mis estudios a través de una beca crédito.

También agradezco al Laboratorio de Visualización y Cómputo en Paralelo de la UAM-I, a la D.G.S.C.A. de la U.N.A.M., por las facilidades que me dieron para usar sus equipos de cómputo.

Finalmente, quiero agradecer a los viejos y nuevos amigos, porque sin ellos el trabajo sería menos divertido y algunos días habrían sido más difíciles.



*Cuatro Soles* fueron anteriores a esta *era* en que vivimos, los que tuvieron por objeto la evolución que cada vez permitiera el mejoramiento de los seres humanos, de los animales y las plantas, hasta llegar a la *Quinta Epoca* llamada del *Sol de Movimiento*.

A muchos milenios de tiempo está la primera fundamentación de la tierra.

Mas estos años que cobijan nuestra existencia, según los dioses de nuestros antepasados, constituyen la edad maravillosa de la Perfección, de la Armonía que había sido forjada con el aprovechamiento de las experiencias de anteriores épocas.

Pero tal vez la agitada vida de esta *era* del *Quinto Sol*, se esté acercando a su final. Tal vez algún día no muy lejano termine...

Este Sol, su nombre *Cuarto Movimiento*,  
este es nuestro Sol, en el que vivimos ahora.  
Y aquí está su señal, como cayó en el fuego el Sol,  
en el fogón divino, allá en Teotihuacán.  
Igualmente fue este el Sol de nuestro príncipe,  
en Tula, o sea de Quetzalcóatl.  
El *Quinto Sol*, *Cuarto Movimiento* su signo,  
se llama *Sol de Movimiento* porque se mueve, sigue su camino.  
Y como andan diciendo los viejos,  
en él habrá movimiento de tierra,  
habrá hambre y con esto pereceremos.

Cuando esto suceda, cuando no exista ni una brizna de paja sobre la tierra, aún existirá el mundo mágico de los dioses.

Y allá en la inmensidad de los trece cielos, después del cataclismo que destruya el *Quinto Sol*, los dioses volverán a pensar en forjar otro mundo mejor, un mundo en el que no existan las ambiciones humanas, en el que el hermano ame con verdad al hermano, en donde desaparezcan las guerras fratricidas, en el que los guidores de los pueblos sean hombres justicieros y honrados, y la desmedida fiebre del oro, aquella que todo lo prostituye, sea erradicada.





# Resumen

Esta tesis presenta un estudio teórico sobre la reactividad química de sistemas macromoleculares de interés biológico. A partir de los conceptos de reactividad, definidos en la Teoría de Funcionales de la Densidad, se analizaron las propiedades reactivas de dos toxinas bloqueadoras de canales de potasio: la toxina BgK y la caribdotoxina. Para obtener estas propiedades, se calculó la estructura electrónica de las macromoléculas usando un método basado en las técnicas tipo Car-Parrinello, el cual es eficiente para modelar sistemas moleculares con cientos e incluso miles de átomos. Los resultados obtenidos concuerdan aceptablemente con las observaciones experimentales, pero además, muestran nuevas evidencias para explicar la reactividad química de estos sistemas.



# Índice general

Agradecimientos	III
Resumen	VII
Índice general	IX
Introducción	1
<b>1. Fundamento teórico</b>	<b>7</b>
1.1. Teoría de funcionales de la densidad . . . . .	8
1.1.1. Energía de intercambio y correlación . . . . .	11
1.1.2. Autointeracción electrónica . . . . .	13
1.2. Método de la energía total por pseudopotenciales . . . . .	19
1.2.1. Ecuaciones de Kohn-Sham en espacio recíproco . . . . .	20
1.2.2. Pseudopotenciales . . . . .	23
1.2.3. Técnicas de minimización . . . . .	26
1.2.4. Cálculo de las fuerzas . . . . .	28
1.3. Reactividad química . . . . .	30
1.3.1. Reactividad global . . . . .	30
1.3.2. Reactividad local . . . . .	32
1.3.3. Selectividad y activación . . . . .	33
<b>2. Reactividad química de moléculas pequeñas</b>	<b>35</b>
2.1. Planteamiento del problema . . . . .	36
2.2. Detalles computacionales . . . . .	39
2.3. Resultados y discusión . . . . .	40
2.3.1. Análisis de la reactividad global . . . . .	45
2.3.2. Análisis de reactividad local . . . . .	47
<b>3. Reactividad de la toxina BgK</b>	<b>53</b>
3.1. Planteamiento del problema . . . . .	54

---

3.1.1. Toxina BgK . . . . .	56
3.2. Detalles computacionales . . . . .	58
3.3. Resultados . . . . .	61
3.3.1. Estados intersticiales . . . . .	61
3.3.2. Influencia de la ocupación en los estados intersticiales . . . . .	63
3.3.3. Efectos del solvente en los estados intersticiales . . . . .	66
3.3.4. Efecto de la autointeracción electrónica en los estados intersticiales . . . . .	67
3.4. Discusión . . . . .	71
<b>4. Reactividad de la caribdotoxina</b>	<b>77</b>
4.1. Planteamiento del problema . . . . .	77
4.1.1. La caribdotoxina . . . . .	79
4.2. Detalles computacionales . . . . .	82
4.2.1. Modelo de la caribdotoxina y sus mutantes . . . . .	83
4.3. Resultados . . . . .	85
4.3.1. Estructura electrónica de las toxinas . . . . .	85
4.3.2. Reactividad global de la ChTX y sus mutantes . . . . .	87
4.3.3. Reactividad local de la ChTX y sus mutantes . . . . .	90
4.4. Discusión . . . . .	93
<b>Conclusiones</b>	<b>99</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>101</b>
<b>A. Publicaciones del autor</b>	<b>103</b>
<b>B. Nomenclatura de aminoácidos</b>	<b>105</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>107</b>

# Introducción

*Clarity in writing is everything: As scientists, our job is to explain why or how some phenomena happens, and the better we do this the better the work is.*

— Walter Kohn

En el estado actual del conocimiento humano, la *mecánica cuántica* es la teoría fundamental para el estudio de los fenómenos atómicos. Esta teoría ha tenido un impacto importante en la concepción del mundo porque permite describir, correlacionar y predecir el comportamiento de una amplia variedad de sistemas, desde partículas elementales hasta sólidos pasando por átomos y moléculas. El desarrollo de la mecánica cuántica ha hecho posible generar conceptos y modelos que, hoy en día, conforman el campo teórico de la química y la física.

El éxito de la mecánica cuántica – en lo que a la química teórica corresponde – consiste en que permite describir y racionalizar las propiedades geométricas y de reactividad de un sistema a partir de su estructura electrónica. Determinar la estructura electrónica de un sistema implica resolver la ecuación de Schrödinger<sup>1</sup> y obtener la función de onda ( $\Psi$ ) correspondiente de dicho sistema, el cual se encuentra inmerso en un potencial externo ( $v(\mathbf{r})$ ) generado por la distribución en el espacio de los núcleos atómicos; en algunos casos, el

potencial externo también incluye el efecto de un campo eléctrico o magnético. La solución de la ecuación de Schrödinger se puede obtener usando técnicas basadas en uno o más determinantes de Slater,<sup>2</sup> como el método de Hartree-Fock (HF), el método de interacción de configuraciones (CI), entre otros, o usando a la densidad electrónica como la variable fundamental, como es el caso de la *Teoría de Funcionales de la Densidad* (TFD).<sup>3</sup>

Si bien es cierto que el objetivo principal de la química teórica es determinar la estructura electrónica de un sistema, en su estado de mínima energía, otro objetivo no menos importante es el aportar criterios de reactividad para entender las propiedades químicas de dicho sistema. En este sentido, la TFD ofrece el marco teórico apropiado para lograr estos objetivos. Propuesta por Thomas<sup>4</sup> y Fermi<sup>5</sup> en 1927, la TFD obtuvo carácter formal con los teoremas de Hohenberg y Kohn<sup>6</sup> en 1964 y adquirió la forma de un método práctico para el cálculo de la estructura electrónica, con el método de Kohn-Sham.<sup>7</sup> Hoy en día, se puede identificar un área conceptual dentro de la TFD en la cual se han definido, con formalidad matemática,<sup>8,a</sup> varios conceptos de reactividad como la *electronegatividad*, la *dureza química* y la *blandura química*, originalmente propuestos en forma intuitiva por los químicos experimentales. En este marco conceptual, la TFD también ha permitido racionalizar algunos principios usados tradicionalmente como el *principio de igualación de electronegatividades de Sanderson*<sup>10</sup> o el *principio de ácidos y bases duros y blandos de Pearson*,<sup>11</sup> pero además, se han definido nuevos conceptos para describir la reactividad y selectividad de sitios específicos en una molécula, como la *función de Fukui*, la *blandura local*, la *electrofilia local*, etc.<sup>3</sup>

Los conceptos de reactividad definidos en la TFD se han aplicado a una gran variedad de sistemas químicos; sin embargo, todos esos sistemas se caracterizan porque están formados por un número pequeño de átomos ( $\leq 100$  átomos). El estudio de la reactividad química de sistemas de gran tamaño, como biomoléculas o sistemas extendidos, implica calcular su

---

<sup>a</sup>El formalismo matemático en estas definiciones incluye el uso de relaciones de Maxwell.<sup>9</sup>

estructura electrónica, lo que representa un problema desde el punto de vista computacional.

Esta tesis presenta un estudio sobre la reactividad química de biomoléculas, usando una metodología eficiente para calcular la estructura electrónica de sistemas de gran tamaño.

El objetivo principal de esta tesis es aplicar los conceptos de reactividad, definidos en la TFD, para describir las propiedades químicas de dos toxinas bloqueadoras de canales de potasio: la *toxina BgK* y la *caribdotoxina* (ChTX). Estas toxinas son polipéptidos que tienen una alta afinidad por los canales iónicos; tales canales son proteínas, ubicadas en la membrana celular, que permiten el flujo selectivo y regulado de iones metálicos ( $K^+$ ,  $Ca^{+2}$ ) de la región extracelular hacia la región intracelular o viceversa.

Para alcanzar este objetivo, la tesis está estructurada de la siguiente manera: en el primer capítulo se describen en forma general, los conceptos fundamentales de la TFD, incluyendo el problema de la autointeracción electrónica y los métodos para resolverlo. El interés en las correcciones de la autointeracción electrónica se debe a que en esta tesis se analizan los efectos de dicha corrección en la reactividad química. En este capítulo también se describe un método para resolver las ecuaciones de Kohn-Sham, alternativo al procedimiento convencional que usa funciones de base localizadas. Este método, conocido como el *Método de la Energía Total por Pseudopotenciales* (METP), se basa en el uso de ondas planas como funciones de base para resolver las ecuaciones de Kohn-Sham en espacio recíproco y además utiliza la aproximación por pseudopotenciales. El método es eficiente para calcular la estructura electrónica de sistemas con cientos o miles de átomos. Este primer capítulo se termina con una revisión detallada y completa de los conceptos (índices) usados para estudiar la reactividad química de moléculas.

El segundo capítulo de esta tesis muestra la forma práctica, usada actualmente, para calcular los índices de reactividad en moléculas pequeñas. Para este propósito, en el capítulo se presenta un estudio detallado sobre la reactividad de peróxidos de la forma  $XOOH$ , con



$X = \text{H}, \text{NO}_2, \text{CO}_2^-$  y  $\text{SO}_3^-$  e incluyendo el efecto del solvente. El estudio ilustra el uso de los conceptos de reactividad en un sentido global y local. Cabe mencionar que los índices globales describen el carácter reactivo de una molécula como un todo, mientras que los índices locales permiten describir la reactividad y selectividad de sitios específicos de la molécula. En este capítulo se usa la forma convencional para estudiar la reactividad de moléculas pequeñas, entendiendo por convencional el hecho de que las ecuaciones de Kohn-Sham se resuelven usando funciones de base localizadas. Esta característica contrasta con el método usado para el estudio de la reactividad de las toxinas, como se mostrará en los capítulos siguientes.

El tercer capítulo está dedicado al estudio de la reactividad de la toxina BgK. Esta toxina, segregada por una anémona marina, es un polipéptido que inhibe el funcionamiento de los canales de  $\text{K}^+$ . La geometría de esta toxina permite la coexistencia, en una misma región, de dos aminoácidos cargados positivamente. En este capítulo se estudia el efecto de esta propiedad estructural sobre la reactividad química de la toxina. El estudio se basa en el uso del METP para describir la estructura electrónica de la toxina BgK. En el capítulo se muestran las ventajas de usar técnicas basadas en funciones de base deslocalizadas (ondas planas), para calcular la estructura electrónica de sistemas moleculares con cientos de átomos.

En el cuarto capítulo se hace un estudio detallado de la reactividad de la caribdotoxina (ChTX) y seis de sus mutantes. Esta toxina, aislada del veneno del alacrán, se ha usado experimentalmente para explicar las propiedades del vestíbulo de los canales de  $\text{K}^+$ . Debido a la alta afinidad de la toxina por el canal, se han hecho experimentos de mutagénesis dirigida con los que se ha obtenido información sobre la cinética del proceso de asociación y disociación de la toxina con el canal. En este capítulo se correlacionan los índices globales de reactividad calculados para la ChTX y seis de sus mutantes, con los resultados experimentales de cinética. Adicionalmente, en el capítulo se estudian las propiedades locales de

reactividad de estas toxinas.

Finalmente, las conclusiones generales y las perspectivas de esta tesis se presentan en las dos últimas secciones.

Cabe mencionar que excepto el capítulo 1, el resto de los capítulos de esta tesis son contribuciones originales de investigación, publicadas o en proceso de publicación (capítulo 4) en revistas con arbitraje internacional.<sup>a</sup>

---

<sup>a</sup>En el apéndice A se presenta la lista completa de publicaciones, a la fecha, hechas por el autor de esta tesis.



# Capítulo 1

## Fundamento teórico

En este capítulo se presentan los conceptos de la *Teoría de Funcionales de la Densidad* (TFD) en los que se basan los estudios hechos en esta tesis. En la primera sección se describe el método de Kohn-Sham y se hace una breve discusión sobre el funcional de energía de intercambio y correlación; después se plantea el problema de la autointeracción electrónica y se revisan dos modelos para resolverlo. Los efectos de la autointeracción en la estructura electrónica de biomoléculas son un tema de interés en esta tesis. En la segunda sección de este capítulo, se presenta un método para resolver las ecuaciones de Kohn-Sham basado en las técnicas tipo Car-Parrinello, conocido como el *Método de la Energía Total por Pseudopotenciales* (METP). Este método es una forma práctica para obtener la estructura electrónica de sistemas como sólidos, superficies, macromoléculas y moléculas pequeñas. En esta tesis, el METP se usa para calcular las propiedades electrónicas de biomoléculas. Finalmente, en la última sección de este capítulo se presentan los conceptos de reactividad, definidos en el marco de la TFD, que se usan para describir la reactividad química de los sistemas estudiados.

## 1.1. Teoría de funcionales de la densidad

La Teoría de Funcionales de la Densidad (TFD), es una representación de la mecánica cuántica que utiliza a la densidad electrónica,  $\rho(\mathbf{r})$ , como variable fundamental para describir las propiedades de un sistema, el cual puede ser cualquier colección de núcleos y electrones como un átomo, una molécula o un sólido. El uso de la densidad electrónica como variable se sustenta en los teoremas de Hohenberg y Kohn (HK).<sup>6</sup>

En la TFD definida por Hohenberg y Kohn, la energía total de un sistema se puede escribir como<sup>a</sup>

$$E[\rho(\mathbf{r})] = F[\rho(\mathbf{r})] + \int \rho(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r}, \quad (1.1)$$

donde  $F[\rho(\mathbf{r})]$  es un *funcional universal*<sup>b</sup> y  $v(\mathbf{r})$  es el potencial externo generado por los núcleos atómicos del sistema. Este potencial también puede contener los efectos de un campo eléctrico o magnético.

Hohenberg y Kohn mostraron que la densidad electrónica del estado basal de un sistema,  $\rho_o(\mathbf{r})$ , es la densidad que minimiza al funcional de la ecuación (1.1). El valor mínimo de  $E[\rho(\mathbf{r})]$  es la energía del estado basal ( $E_o$ ) de dicho sistema. La ecuación (1.1) es un resultado exacto, sin embargo, los teoremas de HK no son constructivos en el sentido de que no dan información acerca de la forma analítica del funcional universal.

En 1965, Kohn y Sham (KS)<sup>7</sup> propusieron que el comportamiento de un sistema real (sistema de electrones interactuantes) se puede aproximar mediante un sistema de electrones no interactuantes que se mueven en un potencial externo,  $v_{KS}(\mathbf{r})$ . Con esta idea escribieron

---

<sup>a</sup>Excepto cuando se especifique lo contrario, todas las ecuaciones en esta tesis están escritas en unidades atómicas.

<sup>b</sup>Un *funcional* es una regla matemática que transforma una función en un número. Una *función* es una regla matemática que transforma una variable en un número.

el funcional universal como

$$F[\rho(\mathbf{r})] = T_s[\rho(\mathbf{r})] + J[\rho(\mathbf{r})] + E_{xc}[\rho(\mathbf{r})], \quad (1.2)$$

donde  $T_s[\rho(\mathbf{r})]$  es la energía cinética de un sistema de electrones no interactuantes en el estado basal, con densidad  $\rho(\mathbf{r})$ ,  $J[\rho(\mathbf{r})]$  es la energía coulombica clásica definida como

$$J[\rho(\mathbf{r})] = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}d\mathbf{r}', \quad (1.3)$$

y  $E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$  es la energía de intercambio y correlación, representada como

$$E_{xc}[\rho(\mathbf{r})] = T[\rho(\mathbf{r})] - T_s[\rho(\mathbf{r})] + E_{ee}[\rho(\mathbf{r})] - J[\rho(\mathbf{r})]. \quad (1.4)$$

donde  $T[\rho(\mathbf{r})]$  y  $E_{ee}[\rho(\mathbf{r})]$  son la energía cinética y la energía de interacción de los electrones del sistema real, respectivamente. Así, la energía de intercambio y correlación contiene la diferencia entre la energía cinética de los electrones del sistema real y del sistema de electrones no interactuantes, además de la parte no clásica de  $E_{ee}[\rho(\mathbf{r})]$ . En otras palabras, el funcional de energía  $E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$  contiene los efectos de interacción entre todos los electrones (efectos de muchos cuerpos) involucrados en un sistema microscópico.

A partir de las ideas de KS, la energía de un sistema se puede escribir como un funcional de la densidad electrónica en la forma

$$E[\rho(\mathbf{r})] = T_s[\rho(\mathbf{r})] + J[\rho(\mathbf{r})] + E_{xc}[\rho(\mathbf{r})] + \int \rho(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r}. \quad (1.5)$$

Además de la partición de la energía total representada por la última ecuación, otra contribución de KS fue expresar a la densidad electrónica en términos de un conjunto de

orbitales  $\{\psi_i(\mathbf{r})\}$  (*orbitales de Kohn-Sham*), en la forma

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_i f_i |\psi_i(\mathbf{r})|^2, \quad (1.6)$$

donde  $f_i$  es el número de ocupación de cada orbital.<sup>a</sup>

Expresando la ecuación (1.5) en el lenguaje orbital y minimizando el funcional resultante con respecto a los orbitales de Kohn-Sham, con la restricción de que los orbitales sean ortonormales,<sup>b</sup> se obtiene un conjunto de ecuaciones de la forma

$$\left( -\frac{1}{2}\nabla^2 + v_{ef}(\mathbf{r}) \right) \psi_i(\mathbf{r}) = \varepsilon_i \psi_i(\mathbf{r}), \quad (1.7)$$

donde  $v_{ef}(\mathbf{r})$  es el *potencial efectivo de Kohn-Sham*, definido como

$$v_{ef}(\mathbf{r}) = v(\mathbf{r}) + \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + v_{xc}(\mathbf{r}). \quad (1.8)$$

En esta ecuación,  $v(\mathbf{r})$  es el potencial externo, el segundo sumando es el potencial coulombiano clásico y  $v_{xc}(\mathbf{r})$  es el potencial de intercambio y correlación. Este último potencial se determina mediante la ecuación

$$v_{xc}(\mathbf{r}) = \frac{\delta E_{xc}}{\delta \rho(\mathbf{r})}. \quad (1.9)$$

Las ecuaciones (1.7) y (1.8) son la base del *método de Kohn-Sham*; la ecuación (1.7) se resuelve iterativamente mediante un proceso autoconsistente.<sup>3,7</sup> En esencia, el método de Kohn-Sham transforma el problema de modelar un sistema de muchas partículas en el problema de resolver un conjunto de ecuaciones de una partícula.

<sup>a</sup> $f_i = 2$  para estados ocupados y 0 para estados virtuales en un esquema de espín restringido.

<sup>b</sup>La condición de ortonormalidad es:  $\int \psi_i^*(\mathbf{r})\psi_j(\mathbf{r}) = \delta_{ij}$

### 1.1.1. Energía de intercambio y correlación

El método de Kohn-Sham es una implementación práctica de la TFD en el que para determinar la energía total de un sistema electrónico es necesario conocer la energía de intercambio y correlación, como lo establece la ecuación (1.5); para ello se requiere la energía cinética ( $T$ ) y la energía de interacción entre los electrones ( $E_{ee}$ ) del sistema real. Como estos términos no se conocen, es necesario hacer aproximaciones al funcional  $E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$  de la ecuación (1.4). La primera y más simple es la *Aproximación Local de la Densidad* (LDA, por sus siglas en inglés).<sup>7</sup> Esta aproximación define a  $E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$  como

$$E_{xc}^{LDA}[\rho(\mathbf{r})] = \int \varepsilon_{xc}(\rho)\rho(\mathbf{r})d\mathbf{r}, \quad (1.10)$$

donde  $\varepsilon_{xc}(\rho)$  es la energía de intercambio y correlación de un gas homogéneo de electrones con densidad  $\rho(\mathbf{r})$ . Es importante notar que  $\varepsilon_{xc}$  es una función de  $\rho(\mathbf{r})$  y no un funcional. Esta función se puede expresar como

$$\varepsilon_{xc}(\rho) = \varepsilon_x(\rho) + \varepsilon_c(\rho), \quad (1.11)$$

donde la parte de intercambio ( $\varepsilon_x$ ) se calcula mediante la ecuación de Dirac para la energía de intercambio

$$\varepsilon_x(\rho) = -\frac{3}{4} \left( \frac{3}{\pi} \right)^{\frac{1}{3}} \rho(\mathbf{r})^{\frac{1}{3}}, \quad (1.12)$$

y la parte de correlación ( $\varepsilon_c$ ) se calcula usando técnicas de Monte Carlo cuántico.<sup>12,13</sup>

A pesar de su simplicidad, el método LDA permite calcular geometrías, frecuencias de vibración y otras propiedades estructurales de sistemas fuertemente enlazados (moléculas y sólidos) con un error menor al 1% de su valor experimental.<sup>14</sup> Sin embargo, si se desea calcular la geometría de sistemas débilmente enlazados (sistemas con puentes de hidrógeno o con interacciones de van der Waals) o si se calculan energías de ionización de átomos,



energías de disociación de moléculas y energías de cohesión en sólidos, la aproximación LDA genera errores del orden de 10-20 %.<sup>14</sup>

No existe una forma sistemática para mejorar la aproximación LDA, pero el primer intento para superar sus deficiencias fue hacer una expansión completa de  $E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$  en potencias del gradiente de la densidad y considerar a  $E_{xc}^{LDA}$  como el primer término de dicha expansión. Para sistemas con densidad homogénea o con cambios ligeros en la densidad, esta aproximación es mejor que la LDA, pero para sistemas reales la expansión completa en gradientes de la densidad falla porque la serie de potencias es divergente y los términos de segundo o mayor orden violan la regla de la suma.<sup>15</sup>

Los problemas de la expansión en gradientes se resuelven parcialmente con la *Aproximación de Gradientes Generalizados* (GGA, por sus siglas en inglés).<sup>16-19</sup> Esta aproximación satisface la regla de la suma para el hueco de intercambio y correlación, pero no describe correctamente el comportamiento asintótico del potencial  $v_{xc}$  en las regiones lejanas a los núcleos atómicos. Los funcionales de intercambio y correlación GGA mejoran la descripción energética de los sistemas químicos, con errores de 5-7 kcal/mol (por cada enlace) respecto al valor experimental.<sup>14</sup>

La combinación de la energía de correlación exacta de Hartree-Fock<sup>2</sup> con las aproximaciones LDA o GGA, dio origen a los *funcionales híbridos*<sup>20</sup> de los cuales el funcional B3LYP es el más utilizado. Los funcionales híbridos pueden reducir el error en el cálculo de la energía de sistemas químicos hasta el orden de 2-3 kcal/mol,<sup>14</sup> respecto al valor experimental. Esta condición no es general, porque algunos funcionales híbridos se parametrizan para reproducir la energética de un conjunto particular de moléculas.

### 1.1.2. Autointeracción electrónica

Uno de los problemas importantes de la química teórica es entender el comportamiento de átomos, moléculas o sólidos, los cuales son sistemas que tienen varios electrones. En estos sistemas, desde el punto de vista clásico, la energía de interacción de un electrón con el resto de los electrones se puede describir mediante la ley de Coulomb, cuyo operador tiene la forma

$$\hat{V}_{ee} = \frac{1}{2} \sum_i \sum_{j \neq i} \frac{1}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|}. \quad (1.13)$$

En 1934, Thomas y Fermi<sup>4,5</sup> propusieron aproximar el valor esperado de  $\hat{V}_{ee}$  mediante el funcional de energía coulombica

$$J[\rho(\mathbf{r})] = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}d\mathbf{r}'. \quad (1.14)$$

Es evidente que un electrón no puede interactuar coulombicamente consigo mismo (autointeracción). En la ecuación (1.13), las contribuciones a la energía coulombica debidas a la autointeracción electrónica no se consideran, sin embargo, no ocurre lo mismo con el funcional de energía coulombica  $J[\rho(\mathbf{r})]$ , de la ecuación (1.14). Esto implica que, por definición, el funcional  $J[\rho(\mathbf{r})]$  no es libre de autointeracción.

En la TFD, comúnmente se expresa a la energía de intercambio y correlación como la suma de una parte de intercambio y otra de correlación,  $E_{xc} = E_x + E_c$ . En un sistema de un electrón no hay energía de correlación ( $E_c = 0$ ), por lo que el término de energía coulombica  $J[\rho(\mathbf{r})]$ , de la ecuación (1.5), se debe cancelar completamente con la energía de intercambio del funcional  $E_{xc}$  en la misma ecuación.<sup>a</sup> En un sistema de varios electrones, en el lenguaje de KS, la contribución a la energía coulombica debida a la interacción de un

<sup>a</sup>En el método de Hartree-Fock ocurre lo mismo para sistemas de cualquier número de electrones, porque la parte diagonal de las integrales coulombicas  $J_{ii}$  se cancela exactamente con la parte diagonal de las integrales de intercambio  $K_{ii}$ . Por esta razón el método de Hartree-Fock es libre de autointeracción.

electrón consigo mismo, se debe cancelar con su correspondiente contribución a la energía de intercambio, mientras que la energía de correlación del electrón consigo mismo debe ser exactamente cero. Esto implica que el funcional  $E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$  exacto debe cumplir con estas condiciones, por tanto debe ser libre de autointeracción. Sin embargo, en la práctica esto no ocurre porque las aproximaciones LDA y GGA no cancelan correctamente el término de autointeracción coulombica.

A pesar de que la forma exacta del funcional  $E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$  no se conoce, hay algunas propiedades bien establecidas que debe cumplir el potencial asociado a dicho funcional. Una de estas propiedades es el comportamiento asintótico de  $v_{xc}(\mathbf{r})$ , definido como

$$\lim_{|\mathbf{r} \rightarrow \infty|} \frac{\delta E_{xc}}{\delta \rho(\mathbf{r})} \approx -\frac{1}{|\mathbf{r}|} + k, \quad (1.15)$$

donde  $k$  es una constante.<sup>21-24</sup> Debido a la autointeracción electrónica, los potenciales obtenidos con los funcionales LDA y GGA no tiene el comportamiento asintótico correcto; en lugar de ello muestran un decaimiento exponencial.<sup>25</sup> Como consecuencia, algunas propiedades de los sistemas químicos no se describen apropiadamente.<sup>26,27</sup> Por ejemplo, si se usara el funcional de intercambio y correlación exacto, la energía del orbital más alto ocupado (HOMO) sería igual al negativo del potencial de ionización ( $I$ ).<sup>28-30</sup> Sin embargo, las energías HOMO obtenidas con las aproximaciones LDA y GGA subestiman los valores experimentales del  $I$ .<sup>31,32</sup> Algunos funcionales híbridos, como el B3LYP, mejoran la comparación entre los potenciales de ionización y las energías HOMO,<sup>33</sup> pero no corrigen completamente el error.<sup>34</sup>

En la literatura existen varios métodos para hacer la corrección de la autointeracción (SIC) entre los que se encuentran el método de Perdew y Zunger (SIC-PZ)<sup>13</sup> y el método de Krieger, Li e Iafrate (KLI) con un *Potencial Efectivo Optimizado* (SIC-OEP).<sup>35-37</sup> Estos dos métodos se usaron en uno de los estudios hechos en esta tesis, por lo que en las siguientes

líneas se describen sus características; para mayor claridad se incluye explícitamente la variable de espín ( $\sigma = \alpha$  o  $\beta$ ).

En el método de Perdew y Zunger (SIC-PZ), la autointeracción electrónica se corrige de la siguiente manera:

$$E_{xc}^{SIC}[\rho_\alpha, \rho_\beta] = E_{xc}^{approx}[\rho_\alpha, \rho_\beta] - \sum_{\sigma} \sum_{i=1}^{N_{\sigma}} (E_{xc}^{approx}[\rho_{i\sigma}, 0] + J[\rho_{i\sigma}]), \quad (1.16)$$

donde  $\rho_{i\sigma}$  es la densidad del  $i$ -ésimo espín-orbital de KS y  $E_{xc}^{approx}$  es cualquier aproximación al funcional de intercambio y correlación no libre de autointeracción. La característica de esta aproximación es que la corrección se aplica a cada espín-orbital, lo cual implica que se obtienen potenciales diferentes para cada uno de ellos. La dependencia del potencial con los espín-orbitales hace que estos pierdan ortogonalidad, la cual se tiene que recuperar posteriormente. Otro hecho importante es que la corrección SIC-PZ sólo se aplica a los estados ocupados.

El método SIC-PZ se ha usado para obtener la energía total, la energía de orbitales y los potenciales de intercambio y correlación de átomos.<sup>13</sup> También se ha usado para estudiar el efecto del SIC en la energía de moléculas diatómicas<sup>38</sup> y para calcular la diferencia de energía entre la banda de valencia y la banda de conducción de sólidos y semiconductores.<sup>39,40</sup>

Por otra parte, existe un método diferente para aproximar la interacción no clásica entre los electrones, conocido como el método del Potencial Efectivo Optimizado (OEP).<sup>41,42</sup> Este método se basa en la idea de encontrar un potencial, el mismo para todos los electrones, tal que cuando dicho potencial sufra una pequeña variación, la energía del sistema permanezca inalterada. Esta aproximación implica resolver un conjunto de ecuaciones similares a las

ecuaciones de KS, de la forma

$$\left(-\frac{1}{2}\nabla^2 + V_\sigma^{OEP}(\mathbf{r})\right)\psi_{i\sigma}(\mathbf{r}) = \varepsilon_{i\sigma}\psi_{i\sigma}(\mathbf{r}), \quad (1.17)$$

donde el potencial efectivo optimizado  $V_\sigma^{OEP}(\mathbf{r})$ , se obtiene imponiendo la condición

$$\left.\frac{\delta E^{OEP}[\{\psi_{i\alpha}, \psi_{j\beta}\}]}{\delta V_\sigma(\mathbf{r})}\right|_{V_\sigma^{OEP}} = 0, \quad (1.18)$$

con

$$E^{OEP}[\{\psi_{i\alpha}, \psi_{j\beta}\}] = T_s[\{\psi_{i\alpha}, \psi_{j\beta}\}] + J[\{\psi_{i\alpha}, \psi_{j\beta}\}] + E_{xc}[\{\psi_{i\alpha}, \psi_{j\beta}\}] + \int \rho(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r}. \quad (1.19)$$

La ecuación (1.19) tiene la misma forma que el funcional de energía de Kohn-Sham (ec. 1.5), donde la energía total es un funcional de la densidad y  $\rho(\mathbf{r})$  se determina con los espín-orbitales  $\{\psi_{i\alpha}, \psi_{j\beta}\}$ .

Usando la regla de la cadena para las derivadas funcionales, la ecuación (1.18) se puede escribir como

$$\sum_j \int d\mathbf{r}' \frac{\delta E^{OEP}[\{\psi_{i\alpha}, \psi_{i'\beta}\}]}{\delta \psi_{j\sigma}(\mathbf{r}')} \cdot \frac{\delta \psi_{j\sigma}(\mathbf{r}')}{\delta V_\sigma^{OEP}(\mathbf{r})} + c.c. = 0. \quad (1.20)$$

A pesar de que el significado físico de la aproximación OEP es claro, esta última ecuación es una ecuación integral difícil de resolver. Krieger, Li e Iafrate (KLI) propusieron una solución a este problema, simplificando el cálculo de  $V_\sigma^{OEP}$  mediante la solución de ecuaciones lineales simples.<sup>35-37</sup> Estos autores mostraron que el comportamiento asintótico correcto del funcional  $E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$  se puede obtener empleando un funcional de intercambio y correlación dependiente explícitamente de un conjunto de espín-orbitales de KS, en lugar de depen-

der de la densidad electrónica. El método de KLI permite obtener un potencial efectivo optimizado libre de autointeracción. De acuerdo al procedimiento propuesto por KLI, la ecuación diferencial que se debe resolver es

$$\left( -\frac{1}{2}\nabla^2 + \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + v(\mathbf{r}) + V_{xc,\sigma}^{OEP-KLI}(\mathbf{r}) \right) \psi_{i\sigma}(\mathbf{r}) = \varepsilon_{i\sigma} \psi_{i\sigma}(\mathbf{r}), \quad (1.21)$$

donde el potencial  $V_{xc,\sigma}^{OEP-KLI}$  se obtiene por

$$V_{xc,\sigma}^{OEP-KLI}(\mathbf{r}) = \sum_{i=1}^{N_\sigma} \frac{\rho_{i\sigma}(\mathbf{r}) v_{xc}^{i\sigma}(\mathbf{r})}{\rho_\sigma(\mathbf{r})} + \sum_{\substack{i=1 \\ i \neq HOMO_\sigma}}^{N_\sigma} \frac{\rho_{i\sigma}(\mathbf{r}) [\bar{V}_{xc,i\sigma}^{OEP-KLI} - \bar{v}_{xc}^{i\sigma}]}{\rho_\sigma(\mathbf{r})}, \quad (1.22)$$

con

$$v_{xc}^{i\sigma}(\mathbf{r}) = - \int \frac{\rho_{i\sigma}(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' - \frac{\delta E_{xc}[\rho_{i\sigma}, \theta]}{\delta \rho_{i\sigma}(\mathbf{r})}, \quad (1.23)$$

y

$$\bar{v}_{xc}^{i\sigma} = \int v_{xc}^{i\sigma}(\mathbf{r}) \rho_{i\sigma}(\mathbf{r}) d(\mathbf{r}). \quad (1.24)$$

La constante  $\bar{V}_{xc,i\sigma}^{OEP-KLI}$  se obtiene al resolver el siguiente sistema de ecuaciones lineales:

$$\sum_{i=1}^{N_\sigma - HOMO_\sigma} (\delta_{ij,\sigma} - M_{ji,\sigma}) (\bar{V}_{xc,i\sigma}^{OEP-KLI} - \bar{v}_{xc}^{i\sigma}) = \bar{V}_{xc,\sigma}^S - \bar{v}_{xc}^{j\sigma}, \quad j = 1, 2, \dots, (N_\sigma - HOMO_\sigma) \quad (1.25)$$

donde

$$M_{ji,\sigma} = \int \frac{\rho_{j\sigma}(\mathbf{r}) \rho_{i\sigma}(\mathbf{r})}{\rho_\sigma(\mathbf{r})} d\mathbf{r} \quad (1.26)$$

y

$$\bar{V}_{xc,\sigma}^S = \int \rho_{j\sigma}(\mathbf{r}) \sum_{i=1}^{N_\sigma} \frac{\rho_{i\sigma}(\mathbf{r}) v_{xc}^{i\sigma}(\mathbf{r})}{\rho_\sigma(\mathbf{r})} d(\mathbf{r}). \quad (1.27)$$

Para encontrar el potencial efectivo optimizado se sigue un proceso iterativo autocon-

sistente de la siguiente manera: dado un conjunto inicial de espín-orbitales, se evalúan las constantes definidas por la ecuaciones (1.24), (1.26) y (1.27) y se determina el valor de  $\bar{V}_{xc,i\sigma}^{OEP-KLI}$  con la ecuación (1.25). El valor de  $\bar{V}_{xc,i\sigma}^{OEP-KLI}$  se usa para calcular el potencial efectivo optimizado  $V_{xc,\sigma}^{OEP-KLI}$  de la ecuación (1.22). Sustituyendo este potencial en la ecuación (1.21) se obtiene un nuevo conjunto de espín-orbitales y el proceso iterativo autoconsistente continua hasta alcanzar convergencia en el potencial.

Tong y Chu<sup>43,44</sup> propusieron combinar el método OEP-KLI y el modelo de SIC-PZ, generando el método SIC-OEP. Este método define el funcional de energía SIC como:

$$E_{xc}^{SIC-OEP}[\{\psi_{i\alpha}, \psi_{i\beta}\}] = E^{OEP}[\{\psi_{i\alpha}, \psi_{i\beta}\}] - \sum_{\sigma} \sum_{i=1}^{N_{\sigma}} (E_{xc}^{approx}[\rho_{i\sigma}, \theta] + J[\rho_{i\sigma}]), \quad (1.28)$$

donde el funcional  $E^{OEP}[\{\psi_{i\alpha}, \psi_{i\beta}\}]$  está definido por la ecuación (1.19) y el potencial efectivo optimizado se obtiene al resolver la ecuación (1.22) con

$$v_{xc}^{i\sigma}(\mathbf{r}) = - \int \frac{\rho_{i\sigma}(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' - \frac{\delta E_{xc}^{approx}[\rho_{i\sigma}, \theta]}{\delta \rho_{i\sigma}(\mathbf{r})}. \quad (1.29)$$

Existen dos formas prácticas para resolver las ecuaciones KLI en el método SIC-OEP: la primera fue propuesta por Tong y Chu<sup>43,44</sup> y se basa en la idea de que como la ecuación (1.21) se resuelve autoconsistentemente, es suficiente con proponer un valor inicial de  $\bar{V}_{xc,i\sigma}^{OEP-KLI}$ , sin necesidad de resolver el sistema de ecuaciones (1.25) ni calcular las constantes  $M_{ji,\sigma}$  y  $\bar{V}_{xc,\sigma}^S$ . Este procedimiento genera el mismo resultado convergido que el obtenido al evaluar las constantes.<sup>43,44</sup> La segunda forma práctica, propuesta por Garza y colaboradores,<sup>45,46</sup> consiste en evaluar algebraicamente las constantes  $M_{ji,\sigma}$  y  $\bar{V}_{xc,\sigma}^S$ .

Una característica importante del método SIC-OEP es que permite obtener el mismo potencial local para todos los orbitales (ocupados y virtuales), con el comportamiento asintótico correcto. Esta es una diferencia importante del método OEP con respecto al méto-

do HF, porque en éste último, el potencial efectivo para los estados ocupados es diferente respecto al de los estados virtuales. Además, por la sumatoria involucrada en la ecuación (1.22), con el método SIC-OEP se puede obtener un potencial efectivo con todos los orbitales ocupados o con un conjunto de ellos (*espacio activo*). De esta manera, se puede corregir la autointeracción de los orbitales en un espacio activo de interés.

El método SIC-OEP se ha usado para calcular el la diferencia de energía HOMO-LUMO de átomos y moléculas pequeñas; los resultados obtenidos son una buena estimación de la primera energía de excitación de estos sistemas<sup>45</sup>. Sin embargo, no se han estudiado los efectos de la corrección de la autointeracción en la geometría y en la densidad electrónica de moléculas de gran tamaño, como las biomoléculas. En esta tesis se presenta un estudio de los efectos de la autointeracción electrónica en sistemas biológicos.

## 1.2. Método de la energía total por pseudopotenciales

La ventaja de usar a la densidad electrónica como variable fundamental es que sólo depende de tres coordenadas espaciales, a diferencia de la función de onda que depende de  $3N$  coordenadas, donde  $N$  es el número total de electrones. Sin embargo, al representar a la densidad en términos de orbitales de acuerdo con el método de Kohn-Sham, la complejidad del problema aumenta. La razón es que se requiere un conjunto completo de funciones de base para representar a los orbitales de KS  $\{\psi_i(\mathbf{r})\}$ , lo que implica que la minimización de la ecuación (1.7) se debe hacer sobre  $NM$  grados de libertad, donde  $M$  es el número de funciones de base usadas. Estas funciones de base pueden ser orbitales atómicos, funciones gaussianas u ondas planas. En la literatura hay varios trabajos que muestran el uso de orbitales atómicos y funciones gaussianas para resolver las ecuaciones de Kohn-Sham.<sup>47</sup> Debido a que es poco común el uso de ondas planas como funciones de base en problemas de interés químico, en las siguientes secciones se presentan las características de un método



que utiliza estas funciones de base.

### 1.2.1. Ecuaciones de Kohn-Sham en espacio recíproco

Si se quiere estudiar un sistema que se repite periódicamente en todo el espacio, las ecuaciones de Kohn-Sham se pueden resolver en *espacio recíproco*.<sup>48,49,a</sup> En un sistema con condiciones de frontera periódicas, el potencial efectivo es invariante con respecto a las traslaciones,  $v_{ef}(\mathbf{r} + \mathbf{R}) = v_{ef}(\mathbf{r})$ . Esto permite usar el teorema de Bloch<sup>50</sup> por medio del cual los orbitales  $\psi_i(\mathbf{r})$  se pueden expresar como un conjunto de ondas planas, en la forma

$$\psi_{i,\mathbf{k}}(\mathbf{r}) = \sum_{\mathbf{G}} c_{i,\mathbf{k}+\mathbf{G}} e^{i(\mathbf{k}+\mathbf{G})\cdot\mathbf{r}}, \quad (1.30)$$

donde  $\mathbf{G}$  son los vectores de la red recíproca definidos por la ecuación  $\mathbf{G} \cdot \mathbf{l} = 2\pi m$ , para todo  $\mathbf{l}$ , donde  $\mathbf{l}$  es un vector de red en espacio real,  $m$  es un número entero y  $\mathbf{k}$  es cualquier vector dentro de la primera zona de Brillouin.<sup>b</sup> En principio, el conjunto de base para un  $\mathbf{k}$  dado es infinito, pero en la práctica el conjunto de ondas planas se restringe a una esfera en espacio recíproco definida por un parámetro conocido como *energía de truncamiento* o *energía de corte*,  $q_c$ .<sup>51</sup> Para todos los valores de  $\mathbf{G}$  usados en la expansión de la ecuación (1.30) se cumple que

$$\frac{1}{2}|\mathbf{k} + \mathbf{G}|^2 \leq q_c, \quad (1.31)$$

De esta manera, la convergencia de un cálculo con respecto al conjunto de ondas planas se puede controlar variando únicamente el valor de  $q_c$ . Esta es una ventaja muy importante respecto a muchos otros métodos en los cuales las propiedades calculadas muestran

---

<sup>a</sup>Espacio formado por el conjunto de vectores de onda que satisfacen la ecuación  $e^{i\mathbf{G}\cdot(\mathbf{r}+\mathbf{R})} = e^{i\mathbf{G}\cdot\mathbf{r}}$ , para toda  $\mathbf{R} = c_1\mathbf{l}_1 + c_2\mathbf{l}_2 + c_3\mathbf{l}_3$ , donde  $c_i$  son números enteros y  $\{\mathbf{l}_i\}$  son los vectores que definen la celda unitaria en espacio real o *malla de Bravais*.

<sup>b</sup>Celda unitaria en el espacio recíproco.

frecuentemente una alta sensibilidad a pequeños cambios en el conjunto de base.

Cuando se usan ondas planas como conjunto de base, las ecuaciones de Kohn-Sham toman una forma particularmente simple. Substituyendo la ecuación (1.30) en la ecuación (1.7) e integrando sobre  $\mathbf{r}$ , se obtiene la ecuación secular

$$\sum_{\mathbf{G}'} \left[ \frac{1}{2} |\mathbf{k} + \mathbf{G}|^2 \delta_{\mathbf{G}\mathbf{G}'} + v_J(\mathbf{G} - \mathbf{G}') + v_{xc}(\mathbf{G} - \mathbf{G}') + v(\mathbf{G} - \mathbf{G}') \right] c_{i,\mathbf{k}+\mathbf{G}'} = \varepsilon_i c_{i,\mathbf{k}+\mathbf{G}}. \quad (1.32)$$

En esta ecuación, el término de energía cinética ( $\frac{1}{2} |\mathbf{k} + \mathbf{G}|^2 \delta_{\mathbf{G}\mathbf{G}'}$ ) es diagonal y los diferentes potenciales se representan por su transformada de Fourier. Específicamente, el potencial coulombiano clásico en espacio recíproco se calcula como

$$v_J(\mathbf{G}) = 4\pi \frac{\rho(\mathbf{G})}{\mathbf{G}^2}, \quad (1.33)$$

donde  $\rho(\mathbf{G})$  es la transformada de Fourier de la densidad electrónica. El término  $v_{xc}(\mathbf{G} - \mathbf{G}')$  es la transformada de Fourier del potencial de intercambio y correlación que se obtiene calculando este potencial en una malla en espacio real, mediante la ecuación (1.9), y después se hace la transformada de Fourier numérica sobre la misma malla. La representación en espacio recíproco del potencial externo  $v(\mathbf{G} - \mathbf{G}')$  de la ecuación (1.32) se analiza en la siguiente sección.

La solución de la ecuación (1.32) implica la diagonalización de una matriz hamiltoniana cuyos elementos están definidos por los términos en el corchete de esta ecuación. El tamaño de esta matriz depende del valor de  $q_c$  seleccionado.

En principio, la densidad electrónica  $\rho(\mathbf{r})$  se obtiene como un promedio del valor de esta cantidad en cada punto  $\mathbf{k}$  de la primera zona de Brillouin (ZB)

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V_{ZB}} \int_{ZB} \rho_{\mathbf{k}}(\mathbf{r}) d\mathbf{k}, \quad (1.34)$$

donde  $\rho_{\mathbf{k}}(\mathbf{r}) = \sum_{i=1}^N f_i |\psi_i(\mathbf{r})|^2$ . En la práctica, la densidad se calcula como

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{\mathbf{k}} w_{\mathbf{k}} \sum_{i=1}^N f_{\mathbf{k}i} |\psi_{\mathbf{k}i}(\mathbf{r})|^2, \quad (1.35)$$

donde la primera suma se realiza sobre un conjunto discreto de vectores  $\mathbf{k}$  (conjunto de puntos  $\mathbf{k}$ ) a los cuales se les asigna un cierto peso,  $w_{\mathbf{k}}$ . El conjunto de puntos  $\mathbf{k}$  se debe seleccionar con cuidado para asegurar la convergencia de los resultados.<sup>52</sup> El paso de la ecuación 1.34 a la ecuación 1.35 se basa en el hecho de que la variación entre las eigenfunciones correspondientes a un conjunto de vectores  $\mathbf{k}$ , cercanos en el espacio recíproco, es muy pequeña.

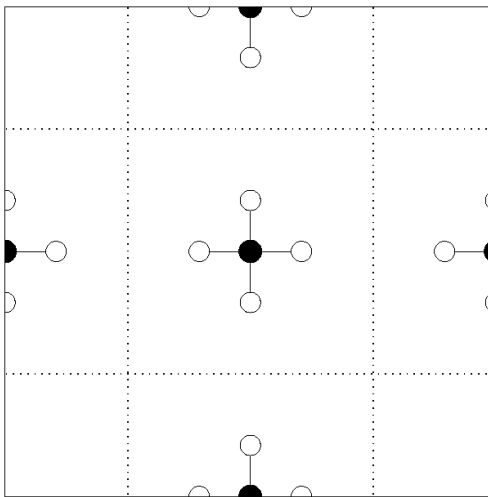
El número de puntos  $\mathbf{k}$  necesarios para tener una descripción adecuada de un sistema, varía inversamente con el volumen de la celda unitaria.<sup>a</sup> En la literatura, existe una amplia discusión sobre el número óptimo de puntos  $\mathbf{k}$  necesarios para los cálculos en sistemas sin condiciones periódicas. Se sabe que una molécula aislada no presenta mucha dispersión, i.e., no hay variaciones importantes en  $E$  y en  $\rho$  con respecto al conjunto de puntos  $\mathbf{k}$ .<sup>53</sup> Por tanto, se pueden calcular estas cantidades en moléculas usando un sólo punto  $\mathbf{k}$ . En los cálculos de la estructura electrónica de los sistemas estudiados en esta tesis, utilizamos el punto  $\Gamma(0, 0, 0)$ , que se define como el origen en el espacio  $\mathbf{k}$ .

El uso de ondas planas y condiciones de frontera periódicas para resolver las ecuaciones de Kohn-Sham en espacio recíproco es lo más adecuado cuando se estudian las propiedades electrónicas de sólidos, los cuales tienen simetría traslacional, pero si se desea estudiar sistemas sin simetría traslacional como las moléculas, es necesario introducir condiciones de frontera periódicas de forma artificial. Esto se logra mediante la construcción de una *supercelda*, como se muestra en la figura (1.1). En la aproximación de supercelda, los cálculos se hacen para un arreglo periódico de moléculas, separadas por amplias regiones de vacío.

---

<sup>a</sup>El volumen de la primera zona de Brillouin es inversamente proporcional al volumen de la celda unitaria

En el límite cuando el espacio vacío es muy grande, los resultados corresponden a los de una molécula aislada. Sin embargo, se debe tener cuidado al convergir los resultados con el tamaño de una supercelda de volumen finito.



**Figura 1.1:** Representación esquemática de una molécula en una supercelda. La supercelda es la región encerrada entre las líneas punteadas.

El problema más importante al usar ondas planas como funciones de base, es el gran número de funciones que se requieren para representar a los orbitales de Kohn-Sham. Este problema se resuelve utilizando pseudopotenciales.

### 1.2.2. Pseudopotenciales

Si todos los electrones de un sistema se incluyen explícitamente en un cálculo y si el potencial externo se construye usando el potencial coulombico completo, el costo computacional es muy elevado al usar ondas planas como conjunto de base. La razón de lo anterior es que se requiere un número muy grande de ondas planas para representar a los orbitales de los electrones internos y para describir las rápidas oscilaciones de las funciones de on-

da de los electrones de valencia en la región cercana al núcleo atómico. Estas oscilaciones se deben al fuerte potencial iónico que hay en la región ocupada por los electrones internos, y garantizan la ortogonalidad de las funciones de valencia con los estados electrónicos internos.

La mayoría de las propiedades de un sistema químico dependen de los electrones de valencia más que de los electrones internos, por lo que el fuerte potencial iónico, debido a la interacción de los electrones internos con los núcleos, se puede reemplazar por un pseudopotencial más débil, que actúe sobre un conjunto de pseudofunciones de onda de valencia en lugar de las funciones de onda de valencia verdaderas. Así, el pseudopotencial se construye para cada átomo tomando en cuenta los efectos del núcleo y de los electrones internos.<sup>54</sup> Las pseudofunciones correspondientes a este potencial modificado no tienen las oscilaciones de las funciones de onda verdaderas, por lo que se reduce de manera importante el número de ondas planas necesarias para su representación. De esta forma, en la solución de la ecuación (1.32) solo se consideran explícitamente a los electrones de valencia y el potencial externo  $v(\mathbf{G} - \mathbf{G}')$  se sustituye por la transformada de Fourier del pseudopotencial total del sistema,  $v_{ps}(\mathbf{G} - \mathbf{G}')$ .<sup>51</sup>

Para un átomo  $\alpha$ , la forma general de un pseudopotencial es

$$v_{ps}^{\alpha} = \sum_{lm} |Y_{lm}\rangle v_{ps,l}^{\alpha} \langle Y_{lm}|, \quad (1.36)$$

donde  $|Y_{lm}\rangle$  son esféricos armónicos y  $v_{ps,l}^{\alpha}$  es el pseudopotencial que actúa sobre la componente de la función de onda con momento angular  $l$ . Esta es la forma de un pseudopotencial no local.<sup>a</sup> Kleinman y Bylander<sup>55,56</sup> propusieron dividir el pseudopotencial de la ecuación

---

<sup>a</sup>A diferencia de los pseudopotenciales no locales, los pseudopotenciales locales no dependen de la componente angular y sólo son función de la distancia a los núcleos.

(1.36) en una parte local y una parte no local factorizable, de la forma

$$v_{ps}^{\alpha} = v_{ps,loc}^{\alpha} + \sum_{l,m} (v_{ps,l}^{\alpha} - v_{ps,loc}^{\alpha}) \hat{P}_{l,m}, \quad (1.37)$$

donde el término  $v_{ps,loc}^{\alpha}$  es alguno de los  $v_{ps,l}^{\alpha}$  y el segundo sumando es la parte no local.  $\hat{P}_{l,m}$  son operadores de proyección de las funciones de onda sobre las eigenfunciones con diferente momento angular. La elección de  $v_{ps,loc}^{\alpha}$  es arbitraria y cuando es igual a alguno de los  $v_{ps,l}^{\alpha}$ , se elimina la necesidad de usar el conjunto de proyectores de momento angular.

Para un sistema químico, el pseudopotencial total en espacio real se expresa como<sup>49</sup>

$$v_{ps}(\mathbf{r}) = \sum_l \sum_{\alpha} v_{ps}^{\alpha}(\mathbf{r} - \mathbf{l} - \mathbf{R}_{\alpha}) \quad (1.38)$$

donde  $\mathbf{R}_{\alpha}$  denota las posiciones de los átomos en la celda unitaria y  $\mathbf{l}$  son los vectores de la malla de Bravais. En espacio recíproco el pseudopotencial se escribe como

$$v_{ps}(\mathbf{k} + \mathbf{G}, \mathbf{k} + \mathbf{G}') = S(\mathbf{G})[v_{ps,loc}(\mathbf{G}) + v_{ps,l}(\mathbf{k} + \mathbf{G}, \mathbf{k} + \mathbf{G}')], \quad (1.39)$$

con  $S(\mathbf{G}) = \sum_{\alpha} e^{-i\mathbf{G}\cdot\mathbf{R}_{\alpha}}$  (factor de estructura).<sup>50</sup> Las transformadas de Fourier de la parte local y no local del pseudopotencial son

$$v_{ps,loc}(\mathbf{G}) = \sum_{\alpha} \int e^{-i\mathbf{G}\cdot\mathbf{r}} v_{ps,loc}^{\alpha}(\mathbf{r} - \mathbf{R}_{\alpha}) d\mathbf{r} \quad (1.40)$$

y

$$v_{ps,l}(\mathbf{k} + \mathbf{G}, \mathbf{k} + \mathbf{G}') = \sum_{\alpha} \int e^{-i(\mathbf{k}+\mathbf{G})\cdot\mathbf{r}} v_{ps,l}^{\alpha} e^{-i(\mathbf{k}+\mathbf{G}')\cdot\mathbf{r}} d\mathbf{r}, \quad (1.41)$$

respectivamente.

Gran parte de los cálculos en esta tesis se hicieron con pseudopotenciales con conservación de la norma<sup>57,58</sup> los cuales cumplen con las siguientes propiedades:

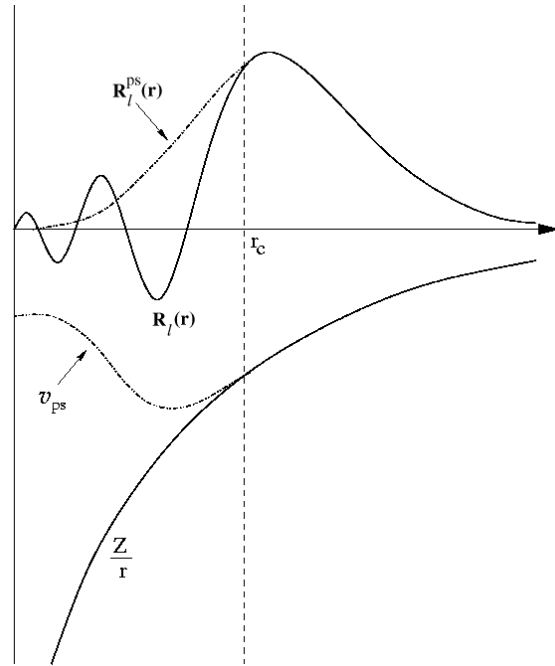
- La parte radial de la pseudofunción de onda  $R_l^{ps}(r)$  con momento angular  $l$ , es igual a la parte radial de la función de onda atómica  $R_l(r)$ , a partir de un *radio de core* ( $r_c$ ) medido desde el núcleo atómico; esto es,  $R_l^{ps}(r) = R_l(r)$  para  $r \geq r_c$ . (Ver fig. 1.2)
- La densidad de carga de la función atómica y de la pseudofunción deben ser iguales dentro del  $r_c$ ; esto es,  $\int_0^{r_c} |R_l^{ps}(r)|^2 r^2 dr = \int_0^{r_c} |R_l(r)|^2 r^2 dr$ . Esta propiedad se conoce como *conservación de la norma*.
- Deben ser iguales los eigenvalores obtenidos con la pseudofunción  $R_l^{ps}(r)$  y con la función de onda  $R_l(r)$ ; esto es,  $\varepsilon_l^{ps} = \varepsilon_l$ .
- Las derivadas logarítmicas de la función de onda verdadera y de la pseudofunción, así como sus primeras derivadas con respecto a la energía, deben ser iguales después de  $r_c$ .

Hay varios esquemas para generar pseudopotenciales de este tipo, como el método de Troullier y Martins<sup>58</sup> y el método de Rappe y colaboradores (RRKJ).<sup>59,60</sup> Estos procedimientos generan pseudopotenciales transferibles entre una amplia variedad de ambientes químicos, lo que caracteriza a los pseudopotenciales con conservación de la norma.

En este punto es importante mencionar que la aproximación por pseudopotenciales tiene la ventaja de que la remoción de los electrones internos implica el cálculo de un menor número de funciones de onda electrónicas. Sin embargo, esta aproximación también tiene la desventaja de no describir correctamente las propiedades que dependen de los electrones internos, como las propiedades ópticas y magnéticas.

### 1.2.3. Técnicas de minimización

Los problemas de eigenvalores comúnmente se resuelven mejorando sucesivamente una función de onda de prueba. Las ecuaciones de Kohn-Sham en espacio real (ec. 1.7) y en



**Figura 1.2:** Representación esquemática de un potencial real y un pseudopotencial con sus correspondientes funciones de onda. El punto en el cual el potencial verdadero y el pseudopotencial coinciden se conoce como *radio de core*,  $r_c$ .

espacio recíproco (ec. 1.32), son un ejemplo de este tipo de problemas. Una forma de resolver estas ecuaciones consiste en construir una densidad electrónica a partir de las funciones de prueba y calcular el  $v_{ef}$ . El hamiltoniano efectivo resultante se diagonaliza para encontrar sus eigenestados y eigenfunciones. Con estas funciones se construye una nueva densidad electrónica la cual se usa en el ciclo autoconsistente hasta que la densidad obtenida es consistente con la iteración previa. En este procedimiento el costo de cada iteración está dominado por la diagonalización del hamiltoniano efectivo, el cual es  $O(M^3)$ , donde  $M$  es el número de funciones de base. La diagonalización produce  $M$  eigenestados, pero el cálculo de la energía total solo requiere los  $N/2$  estados más bajos, donde  $N$  es el número de electrones. Como  $N$  es mucho más pequeño que  $M$ , este procedimiento es ineficiente a medida que el conjunto de base crece.



El uso de pseudopotenciales reduce considerablemente el número de ondas planas necesarias para describir un sistema, pero a pesar de esta reducción, el número de ondas planas necesarias para estudiar sistemas con pocos átomos ( $\sim 10$ ) es del orden de miles,<sup>51</sup> lo que vuelve inconveniente el uso de las técnicas tradicionales de diagonalización de matrices en la solución de las ecuaciones de Kohn-Sham en espacio recíproco (ec. 1.32). Sin embargo, se pueden resolver estas ecuaciones usando las técnicas de minimización iterativa, propuestas originalmente por Car y Parrinello.<sup>61</sup> La idea básica de estas técnicas es buscar directamente el conjunto de coeficientes  $c_{i,\mathbf{k}+\mathbf{G}}$  de la función  $\psi_{i,\mathbf{k}}(\mathbf{r})$ , definida en la ecuación (1.30), que sean solución de la ecuación (1.32). Estas técnicas se han implementado eficientemente a través de dinámicas electrónicas ficticias o mediante gradientes conjugados.<sup>51,62</sup> En esta tesis, las ecuaciones de Kohn-Sham en espacio recíproco se resolvieron usando la técnica de gradientes conjugados. Payne y col.<sup>51</sup> hacen una revisión detallada de las técnicas tipo Car-Parrinello y muestran que son computacionalmente más eficientes porque escalan como  $M \ln M$ , donde  $M$  es el número de funciones de base (ondas planas).

#### 1.2.4. Cálculo de las fuerzas

Cuando se calcula la energía total de un sistema utilizando la aproximación de pseudopotenciales, es común que se desee conocer las fuerzas sobre los iones.<sup>a</sup> Estas fuerzas se pueden calcular mediante el *teorema de Hellman-Feynmann*,<sup>63</sup> el cual es válido sólo cuando la energía del sistema corresponde exactamente a la del estado basal. Las fuerzas se pueden usar para dos propósitos: el primero es para resolver las ecuaciones clásicas de movimiento de los iones, lo que permite hacer dinámica molecular; el segundo es para determinar las posiciones de los iones en el estado basal, lo cual implica encontrar una configuración de los iones tal que las fuerzas entre ellos sea igual a cero (minimización iónica).

La fuerza sobre un ion  $\alpha$ ,  $F_\alpha$ , es el negativo de la derivada de la energía del sistema con

---

<sup>a</sup>En el METP, un ion está formado por los núcleos y los electrones internos de un átomo.

respeto a la posición  $\mathbf{R}$  del ion

$$F_\alpha = -\frac{dE}{d\mathbf{R}_\alpha}. \quad (1.42)$$

Cuando un ion se mueve de una posición a otra, las funciones de onda deben cambiar para reproducir los eigenestados de Kohn-Sham correspondientes a la nueva posición. Los cambios en las funciones de onda electrónicas contribuyen a las fuerzas entre los iones, como se puede ver si la ecuación (1.42) se representa en la forma <sup>a</sup>

$$F_\alpha = -\frac{\partial E}{\partial \mathbf{R}_\alpha} - \sum_i \frac{\partial E}{\partial \psi_i} \frac{\partial \psi_i}{\partial \mathbf{R}_\alpha} - \sum_i \frac{\partial E}{\partial \psi_i^*} \frac{\partial \psi_i^*}{\partial \mathbf{R}_\alpha}. \quad (1.43)$$

Si el conjunto  $\{\psi_i\}$  es el del estado basal del sistema, los dos términos de la última ecuación deben ser igual a cero. Cuando el conjunto  $\{\psi_i\}$  se representa con funciones de bases localizadas en los núcleos atómicos, los dos últimos términos de la ecuación (1.43) no son exactamente cero debido al truncamiento de la base y a los errores numéricos del proceso autoconsistente. Para eliminar este error, es necesario incluir la correcciones de Pulay,<sup>64</sup> lo que implica que el cálculo requiera mayor esfuerzo computacional. Sin embargo, si el conjunto  $\{\psi_i\}$  se representa con ondas planas, los dos últimos términos de la ecuación (1.43) son exactamente cero, porque las ondas planas no dependen de las posiciones nucleares.

El uso de ondas planas como funciones de base tiene ventajas con respecto a los otros conjuntos; por ejemplo: la simplicidad de las funciones, la ausencia del error de superposición de base y la facilidad para calcular eficientemente las fuerzas entre los átomos. Sin embargo, también tiene desventajas importantes como la dificultad para calcular cargas iónicas u ordenes de enlace.

---

<sup>a</sup>Esta forma se obtiene con el mismo procedimiento para deducir la expresión tradicional del teorema,  $F_\alpha = \langle \Psi | \frac{\partial \hat{H}_{KS}}{\partial R_\alpha} | \Psi \rangle$ , pero usando un conjunto de funciones de base  $\{\psi_i(\mathbf{r})\}$  para representar a la función de onda  $\Psi$ .

### 1.3. Reactividad química

La TFD es un modelo teórico útil para el estudio de las propiedades electrónicas de sistemas moleculares.<sup>3</sup> En esta teoría se ha desarrollado un marco teórico<sup>65</sup> con el que se pueden formalizar muchos conceptos intuitivos utilizados por los químicos experimentales, como la electronegatividad,  $\chi$ ,<sup>8</sup> la dureza química,  $\eta$ ,<sup>66,67</sup> y la electrofilia,  $\omega$ .<sup>68</sup> Estas ideas describen la reactividad de una molécula como un todo, por lo que se les conoce como parámetros globales de reactividad. Por otra parte, como la densidad electrónica contiene toda la información necesaria para describir a un sistema en su estado basal, en la TFD se han propuesto diferentes parámetros de reactividad local basados en esta variable, como la función de Fukui,  $f(\mathbf{r})$ ,<sup>69,70</sup> la blandura local,  $s(\mathbf{r})$ ,<sup>71</sup> y la electrofilia local,  $\omega(\mathbf{r})$ ,<sup>72</sup> entre otros. Estos índices de reactividad permiten evaluar la selectividad de los sitios atómicos de una molécula en una reacción química.<sup>73-75</sup> Además, la blandura local y la función de Fukui, calculadas en dos estados diferentes de una molécula, se pueden usar para definir un modelo de activación de sitios.<sup>73-75</sup>

#### 1.3.1. Reactividad global

Dentro de la formulación de Parr y Yang de la DFT,<sup>3</sup> la energía es una función del número total de electrones,  $N$ , y es un funcional del potencial externo,  $v(\mathbf{r})$ . En esta formulación, los cambios en la energía se deben a variaciones tanto en  $N$  como en  $v(\mathbf{r})$ . Estos cambios se expresan mediante la siguiente ecuación

$$dE = \mu dN + \int \rho(\mathbf{r}) dv(\mathbf{r}) d\mathbf{r}, \quad (1.44)$$

donde  $\mu$  es el *potencial químico electrónico* definido como<sup>3</sup>

$$\mu = \left( \frac{\partial E}{\partial N} \right)_{v(\mathbf{r})}. \quad (1.45)$$

Esta cantidad es el descriptor natural de la transferencia de carga; el negativo de  $\mu$  se relaciona con el concepto clásico de *electronegatividad* ( $\mu = -\chi$ ).<sup>3,8</sup> En este punto es conveniente mencionar que cuando un sistema interacciona con su entorno, los electrones fluyen de una región de baja electronegatividad ( $\mu$  grande) hacia una región de alta electronegatividad ( $\mu$  pequeña). Los cambios de  $\mu$  con respecto al número de electrones, a potencial externo constante, están asociados con el concepto de *dureza química* propuesto por Pearson<sup>66,67</sup> y definido como

$$\eta = \left( \frac{\partial \mu}{\partial N} \right)_{v(\mathbf{r})} = \left( \frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right)_{v(\mathbf{r})}. \quad (1.46)$$

El inverso de la dureza química es la *blandura global*,  $S = 1/\eta$ , que es una cantidad vinculada con la polarizabilidad de los sistemas.<sup>76,77</sup> Mientras  $\eta$  se puede interpretar como una medida de la resistencia del sistema para intercambiar densidad de carga con su entorno,<sup>67</sup>  $S$  es una medida de la habilidad del sistema para dicho intercambio. Tanto el potencial químico electrónico como la dureza se pueden expresar, por diferencias finitas, en términos del potencial de ionización ( $I$ ) y de la afinidad electrónica ( $A$ ) del sistema, en la forma  $\mu \approx -(I + A)/2$  y  $\eta \approx (I - A) \geq 0$ , respectivamente. Otro índice de reactividad es la *electrofilia global*, definida por Parr y col.<sup>68</sup> como

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta}. \quad (1.47)$$

Este índice mide la estabilización en energía que logra un sistema cuando obtiene carga

adicional de su entorno,  $\Delta N_{max} = -\frac{\mu}{\eta}$ . La electrifilia global describe simultáneamente la capacidad de un sistema (electrófilo) para obtener carga adicional ( $\mu^2$ ) y la resistencia del mismo para intercambiar carga con su entorno ( $\eta$ ). En este sentido, un buen electrófilo se caracteriza por un valor grande de  $\mu$  y un valor pequeño de  $\eta$ .

### 1.3.2. Reactividad local

Las funciones de respuesta local están asociadas con la *selectividad* de los sitios reactivos en las moléculas,<sup>73-75</sup> i.e. son cantidades que describen cómo se manifiesta el carácter reactivo de una molécula, definido por los parámetros globales, en regiones específicas de la misma. Uno de los índices de reactividad local más útil es la *función de Fukui*, definida como<sup>69,70</sup>

$$f(\mathbf{r}) \equiv \left( \frac{\delta\mu}{\delta v(\mathbf{r})} \right)_N = \left( \frac{\partial\rho(\mathbf{r})}{\partial N} \right)_{v(\mathbf{r})}. \quad (1.48)$$

Esta cantidad mide qué tan sensible es el potencial químico electrónico frente a una perturbación externa localizada,  $\delta v(\mathbf{r})$ . La función de Fukui también cuantifica las variaciones sobre la densidad electrónica, en cada punto del espacio, cuando el sistema recibe o dona  $\Delta N$  electrones mientras interacciona con su entorno.

Otra cantidad importante es la *blandura local*, definida como<sup>71</sup>

$$s(\mathbf{r}) \equiv \left( \frac{\partial\rho(\mathbf{r})}{\partial\mu} \right)_{v(\mathbf{r})}. \quad (1.49)$$

La blandura local y la función de Fukui están relacionadas por  $s(\mathbf{r}) = f(\mathbf{r})S$ ; esto es,  $s(\mathbf{r})$  es una medida de cómo la blandura global se distribuye en una molécula de acuerdo a la función de Fukui.  $s(\mathbf{r})$  y  $f(\mathbf{r})$  tienen la misma información acerca de los sitios reactivos en una molécula, pero la blandura local contiene información adicional sobre la polarizabilidad global de dicha molécula.

Un índice de reactividad local que da información sobre la máxima cantidad de carga que puede aceptar un sitio  $k$  en un molécula es la *electrofilia local*, definida como<sup>72</sup>

$$\omega(\mathbf{r}) = \mu^2 s(\mathbf{r}). \quad (1.50)$$

### 1.3.3. Selectividad y activación

La selectividad de una molécula se puede expresar en términos de la función de Fukui condensada.<sup>78</sup> Hay varios métodos para calcular esta cantidad,<sup>65</sup> uno de los cuales usa la aproximación

$$f_k^\varphi = \sum_{\mu \in k} f_\mu^\varphi = \sum_{\mu \in k} \left[ |c_{\mu\varphi}|^2 + c_{\mu\varphi} \sum_{\nu \neq \mu} c_{\nu\varphi} S_{\mu\nu} \right], \quad (1.51)$$

donde  $c_{\mu\varphi}$  son los coeficientes del orbital molecular de frontera  $\varphi$  y  $S_{\mu\nu}$  son los elementos de la matriz de traslape de los orbitales atómicos. La ecuación (1.51) es la aproximación de la función de Fukui condensada propuesta por Contreras y col.<sup>79,80</sup> como  $f(\mathbf{r})^\varphi \approx |\phi_{KS}^\varphi(\mathbf{r})|^2$ , donde  $\varphi$  es el LUMO para un ataque nucleofílico ( $\varphi = +$ ) o el HOMO para un ataque electrofílico ( $\varphi = -$ ).<sup>81,82</sup> En este punto es importante mencionar que el carácter electrofílico local de un sitio  $k$  en una molécula, que se mide por el índice  $f_k^+$ , revela la capacidad de este sitio para recibir ataques nucleofílicos, mientras que el carácter nucleofílico local de otro sitio  $k$  revela la capacidad de ese sitio para recibir ataques electrofílicos, capacidad que se mide por el índice  $f_k^-$ . Con la función de Fukui regional calculada, la blandura local se puede obtener como  $s_k^\varphi = f_k^\varphi S$ .

La activación de sitios en una molécula se puede obtener analizando las variaciones de la blandura local entre dos estados del sistema; por ejemplo, el estado basal y estado de transición.<sup>83</sup> Estas variaciones se pueden calcular como

$$\Delta s_k \approx f_k^\# \Delta S + S^o \Delta f_k, \quad (1.52)$$

donde las propiedades de los dos estados se toman en cuenta al definir  $\Delta S = S^\# - S^o$  y  $\Delta f_k = f_k^\# - f_k^o$ . Así, la activación de sitios en una molécula incluye las propiedades globales y locales del estado basal ( $o$ ) y de otro estado ( $\#$ ), que puede ser el estado de transición si la molécula participa en una reacción.

## Capítulo 2

# Reactividad química de moléculas pequeñas

En este capítulo se presenta un estudio sobre la reactividad química de peróxidos de la forma  $XOOH$ , donde  $X = H, NO_2, CO_2^-$  y  $SO_3^-$ . Son dos objetivos los que se persiguen con este capítulo: el primero es mostrar la forma como se calculan los índices de reactividad en moléculas pequeñas y el segundo es ilustrar el carácter reactivo de los peróxidos, incluyendo los efectos del solvente. En relación con el primer objetivo, en este capítulo se describe cómo el uso de funciones de base localizadas, para resolver las ecuaciones de Kohn-Sham, es eficiente para estudiar la reactividad de moléculas pequeñas. Respecto al segundo propósito, el interés particular en los peróxidos se debe a que son sistemas que pueden presentar una reacción de desplazamiento interno de hidrógeno, generando moléculas reactivas, que pueden ser útiles en procesos de oxidación.<sup>a</sup>

---

<sup>a</sup>Este capítulo está basado en el artículo *Global and Local Reactivity and Activation Patterns of HOOX (X = H, NO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) Peroxides with Solvent Effects* por Felipe Aparicio, Renato Contreras, Marcelo Galván y Andrés Cedillo *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 10098-10104.



## 2.1. Planteamiento del problema

Las reacciones de oxidación son un grupo importante de transformaciones químicas y en particular las reacciones de transferencia de oxígeno que involucran la ruptura de un enlace oxígeno-oxígeno (*transferencia oxo*), tienen un papel importante en la química orgánica.<sup>84,85</sup> Estas reacciones también se han propuesto como posibles mecanismos de oxidación en sistemas biológicos.<sup>86</sup> Aún cuando el mecanismo de oxidación no se conoce completamente, se sabe que algunos reactivos como el peróxido de hidrógeno (HOOH), el ácido peroxinitrico (HOONO<sub>2</sub>), el ion peroximonocarbonato (HOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y el ion peroximonosulfato (HOOSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) están involucrados en este tipo de reacciones.<sup>85</sup>

El HOOH despierta particular interés por su actividad en los procesos de oxidación, sin embargo, también un isómero estructural de este peróxido empieza a ganar la atención de los químicos, porque puede existir como intermediario en estos procesos. Este isómero se conoce como *oxiagua* u *óxido de agua* (H<sub>2</sub>O-O).<sup>87</sup> A diferencia del peróxido de hidrógeno, que se ha estudiado ampliamente tanto teórica<sup>88-93</sup> como experimentalmente,<sup>94-101</sup> la oxiagua rara vez se menciona en la literatura. La primera evidencia experimental de que esta especie puede existir proviene de los experimentos de Bain y Giguere,<sup>87</sup> sobre el espectro infrarrojo del peróxido de hidrógeno usando sustituciones isotópicas. Estos autores no pudieron observar la frecuencia característica del enlace O-O en el peróxido de hidrógeno, lo que les llevó a la conclusión de que podría existir una forma tautomérica de la molécula de HOOH con la forma H<sub>2</sub>O-O. En 1996, Schröder y col.<sup>102</sup> usando espectroscopía de masas de neutralización y reionización,<sup>103</sup> mostraron la existencia de la oxiagua neutra.

Hay varios estudios teóricos para demostrar que la oxiagua existe.<sup>104</sup> El primero de ellos fue hecho en 1966 por Kalder y Shavitt.<sup>105</sup> En 1983, Pople y colaboradores<sup>106</sup> estudiaron varias reacciones de desplazamiento intramolecular de hidrógeno, incluyendo la reacción HOOH → H<sub>2</sub>O-O y concluyeron que la oxiagua no puede existir porque esta especie no es

un mínimo en la superficie de energía potencial de la reacción. Estos autores basaron su conclusión en estudios teóricos hechos a un nivel MP4SQD/6-31G\*\*//HF/6-31G\*. Sin embargo, Meredith y col.<sup>107</sup> establecieron que la conclusión de Pople no era definitiva, porque la optimización de la estructura de la oxigua no se hizo con un nivel de teoría mejor a HF. Bach y col.<sup>100,108</sup> optimizaron las estructuras del peróxido de hidrógeno y de la oxigua con un mejor nivel de teoría (post Hartree-Fock) y concluyeron que la oxigua si es un mínimo de la superficie de energía potencial. En 1996, Huang, Xie y Schaefer,<sup>109</sup> con un cálculo a nivel CCSD(T)/TZ2P+f, concluyeron que la oxigua puede existir el tiempo suficiente para ser detectada experimentalmente. Recientemente, Schalley y colaboradores<sup>110</sup> calcularon la superficie de energía potencial de los sistemas  $^1[\text{H}_2, \text{O}_2]$  y  $^3[\text{H}_2, \text{O}_2]$ , a un nivel B3LYP/6-311++G(d,p) y demostraron que la oxigua está contenida en esta superficie. Estos autores predijeron que la oxigua neutra con multiplicidad singulete es estable en fase gas.

La oxigua puede tener importantes aplicaciones en química. Esta molécula no sólo es interesante desde el punto de vista académico por el átomo hipervalente que tiene, sino porque se ha propuesto como un posible intermediario en la oxidación de aminas y compuestos azufrados con peróxido de hidrógeno<sup>111</sup> o en reacciones de oxidación en el área de la bioquímica.<sup>112,113</sup> Por esta razón, es interesante estudiar la reactividad y los patrones de activación del peróxido de hidrógeno y de la oxigua, además de otros peróxidos que presentan la reacción de desplazamiento interno de hidrógeno, tales como el ácido peroxinitrico ( $\text{HOONO}_2$ ), el ion peroximonocarbonato ( $\text{HOOCO}_2^-$ ) y el ion peroximonosulfato ( $\text{HOOSO}_3^-$ ).

El ácido peroxinitrico tiene especial importancia en química atmosférica<sup>114</sup> y recientemente ha aumentado el interés sobre su reactividad en solución acuosa.<sup>115</sup> En medio acuoso, el  $\text{HOONO}_2$  es un fuerte oxidante que reacciona rápidamente con nucleófilos cargados como los haluros ( $\text{I}^-$ ,  $\text{Br}^-$  y  $\text{Cl}^-$ ) y el benceno.<sup>115</sup> El mecanismo para la oxidación de haluros no se conoce completamente, sin embargo se sabe que este involucra un ataque nucleofílico del

ion haluro sobre el oxígeno enlazado al hidrógeno en la molécula de  $\text{HOONO}_2$ , generando  $\text{HOX}$  ( $X = \text{I}, \text{Cl}, \text{Br}$ ) y  $\text{NO}_3^-$  como productos primarios. Los resultados experimentales muestran que el  $\text{HOONO}_2$  presenta una cinética similar a la del  $\text{HOOSO}_3^-$  como oxidante de haluros. Experimentalmente se sabe que el  $\text{HOONO}_2$  es más reactivo que el  $\text{HOOH}$  en los procesos de oxidación de haluros.

Por otra parte, generalmente se considera que la oxidación de sulfuros orgánicos por peróxidos procede vía un ataque nucleofílico del azufre sobre el oxígeno electrofílico del peróxido. Los experimentos de cinética de esta reacción muestran que el ion peroximono-carbonato es moderadamente reactivo frente a sulfuros. Esta reactividad es intermedia entre aquella mostrada por el  $\text{HOOH}$  y por el ion peroximono-sulfato.<sup>116</sup> Las reacciones de oxidación usando  $\text{HOOCO}_2^-$  son de interés debido a que esta especie actúa como donador de oxígeno no radical en sistemas biológicos, un hecho importante pero raramente mencionado en la literatura.<sup>117</sup>

El ion peroximono-sulfato es un oxidante aniónico y soluble en agua, muy versátil para transformar sulfuros orgánicos en sulfóxidos y eventualmente hasta sulfonas y tioésteres.<sup>118-120</sup> Ruff and Kucsman<sup>121</sup> propusieron un probable mecanismo de oxidación de sulfuros por el ion  $\text{IO}_4^-$ , el cual se puede interpretar como un ataque nucleofílico del azufre sobre el átomo de oxígeno, con posterior desplazamiento de  $\text{IO}_3^-$ . Un mecanismo similar se puede considerar para la oxidación de los mismos sulfuros usando  $\text{HOOSO}_3^-$ , incluyendo una transferencia de protón al mismo tiempo o después de la transferencia de oxígeno.

En resumen y como es de esperarse para ataques nucleofílicos sobre oxidantes electrofílicos, se observa una oxidación más rápida si se incrementa el poder nucleofílico o electrofílico de las especies. En este sentido, la oxiguada y los productos de la reacción de desplazamiento interno de hidrógeno en el  $\text{HOONO}_2$ , el  $\text{HOOCO}_2^-$  y el  $\text{HOOSO}_3^-$ , pueden ser mejores oxidantes en los procesos donde participan estos peróxidos.

Debido a que la principal actividad química de reactivos oxidantes como el HOOH, el HOONO<sub>2</sub>, el HOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup> y el HOOSO<sub>3</sub><sup>-</sup> se lleva a cabo en solución acuosa, es necesario incluir los efectos del solvente. En el caso particular de las especies que presentan la reacción de desplazamiento de hidrógeno, los solventes polares juegan un papel importante en su estabilización.<sup>106</sup>

## 2.2. Detalles computacionales

El estado basal de cada uno de los peróxidos se optimizó a nivel B3LYP/6-311G\*\*, con el programa gaussian98.<sup>122</sup> Los estados de transición y las estructuras tipo oxiagua de cada peróxido se determinaron con el mismo nivel de teoría. El estado de transición de cada peróxido se caracterizó por un análisis de frecuencias. Este análisis mostró que cada estado de transición tenía una sola frecuencia negativa (un solo valor negativo en la matriz Hessiana). Se realizaron cálculos de la *coordenada de reacción intrínseca* (IRC, por sus siglas en inglés), con los cuales se demostró que cada estado de transición es parte de la reacción de desplazamiento interno de hidrógeno correspondiente.

Existen dos grandes grupos de métodos para incluir los efectos del solvente en los cálculos de estructura electrónica: los modelos de solvente continuo<sup>123</sup> y los modelos de solvente discreto.<sup>124</sup> En los modelos continuos, el solvente se describe como un dieléctrico isotrópico infinito, rodeando a la molécula de soluto la cual se coloca en una cavidad. En las aproximaciones discretas, las moléculas de solvente se tratan explícitamente tomando en cuenta las interacciones específicas entre el solvente y el soluto. En este estudio, los efectos del solvente se incluyeron usando un modelo continuo de campo de reacción representado por el *Modelo de Isosuperficie de Densidad Continua* (IPCM, por sus siglas en inglés).<sup>125</sup> El método IPCM se ha usado ampliamente para el estudio de moléculas neutras e iones sencillos.<sup>126,127</sup> Las geometrías optimizadas en fase gas se utilizaron en los cálculos con el

campo de reacción. En el modelo IPCM se usó la constante dieléctrica del agua ( $\epsilon = 78.39$ ) para definir el solvente y se usó el valor de 0.001 electrones por bohr cúbico como valor de isodensidad. Recientemente, Zhan y Chipman<sup>127</sup> mostraron que este valor de isodensidad es apropiado para obtener una buena precisión en los cálculos con el modelo IPCM.

El análisis de la reactividad global y local se hizo con la estructura optimizada del estado basal, del estado de transición y del complejo tipo oxiguano de cada peróxido. La dureza química se calculó para cada estructura, usando el teorema de Koopmans,<sup>a</sup> comúnmente expresado en términos de los valores propios de los orbitales moleculares de frontera HOMO ( $H$ ) y LUMO ( $L$ ), esto es como  $\eta = (I - A) \approx \epsilon_L - \epsilon_H$ . La blandura global se obtuvo como  $1/\eta$ . Las funciones de Fukui condensadas electrofílicas (+), nucleofílicas (-) y de radical libre (0), se calcularon tanto para el estado basal como para el estado de transición, usando la ecuación (1.51) de la página 33. Con las propiedades en el estado basal y en el estado de transición en mano, se calculó la activación de los átomos de oxígeno que forman el enlace peroxo en cada especie, usando la ecuación (1.52) descrita en la página 33.

### 2.3. Resultados y discusión

Dentro de los modelos de solvente continuo, existen varios que permiten incluir los efectos del solvente en un cálculo de estructura electrónica, entre ellos el modelo IPCM y el *Modelo de Isosuperficie de Densidad Continua Autoconsistente* (SCIPCM, por sus siglas en inglés).<sup>123-127</sup> El primer modelo permite incluir el efecto del solvente en cálculos de *un solo punto*<sup>b</sup> sobre la *superficie de energía potencial* (PES, por sus siglas en inglés), mientras que el segundo método permite hacer optimizaciones de geometría. Con la finalidad de mostrar los efectos acoplados de la optimización y del solvente, se calculó el estado basal del

<sup>a</sup>Aún cuando el teorema de Koopmans solo está definido en el método de Hartree-Fock, en la TFD se ha usado una aproximación de este teorema con resultados aceptables.<sup>128</sup>

<sup>b</sup>Significa que el cálculo se hace para una geometría específica de la molécula.

HOOH usando el modelo SCIPCM. En la figura 2.1 se muestran los parámetros geométricos de este sistema, obtenidos en fase gas y con el modelo SCIPCM. Se puede ver que no hay variaciones importantes en las distancias y ángulos de enlace obtenidos con ambos métodos. Adicionalmente, los cálculos con el modelo SCIPCM requieren más tiempo de cómputo respecto a los cálculos IPCM. Por esta razón, en este trabajo se incluyó el efecto del solvente con el modelo IPCM usando las estructuras optimizadas en fase gas.

El estudio de la PES correspondiente a la transferencia interna de un átomo de hidrógeno (reacción de desplazamiento de hidrógeno) en los peróxidos HOOH, HOONO<sub>2</sub>, HOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup> y HOOSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, revela que en el estado basal, la sustitución de un átomo de hidrógeno por un grupo NO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub><sup>-</sup> o SO<sub>3</sub><sup>-</sup> induce pequeños cambios en la geometría de la región O–O–H, como se muestra en la figura 2.1. El estado basal del HOOH no tiene una conformación *cis* ni *trans*, sino una conformación conocida como *skew* (torcida)<sup>93</sup> con respecto al enlace O–O, mientras que el estado basal de los otros peróxidos tiene una conformación *cis*. Esto se debe a que los peróxidos HOONO<sub>2</sub>, HOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup> y HOOSO<sub>3</sub><sup>-</sup> logran una estabilización extra por la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre el átomo de hidrógeno de la región O–O–H y un átomo de oxígeno del sustituyente correspondiente.

Otro aspecto importante de la PES del HOOH, HOONO<sub>2</sub>, HOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup> y del HOOSO<sub>3</sub><sup>-</sup> es que todos estos sistemas presentan transferencia interna de hidrógeno para formar complejos tipo oxiagua.<sup>100–108</sup> Para los sistemas HOOH, HOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup> y HOOSO<sub>3</sub><sup>-</sup> las barreras de isomerización son de aproximadamente 50.0 kcal/mol. La barrera energética para la isomerización del HOONO<sub>2</sub> es 8.7 kcal/mol más alta. Las características estructurales y energéticas de la reacción de isomerización de los cuatro peróxidos en fase gas y en solución, se presenta en la figura 2.2. Esta figura incluye la estructura del estado basal (**I**), del estado de transición (**II**) y del complejo tipo oxiagua (**III**) de los peróxidos estudiados en este trabajo. Los cálculos predicen que el solvente polar induce una estabilización de al menos 3 kcal/mol en los complejos tipo oxiagua, lo que sugiere que un solvente polar puede

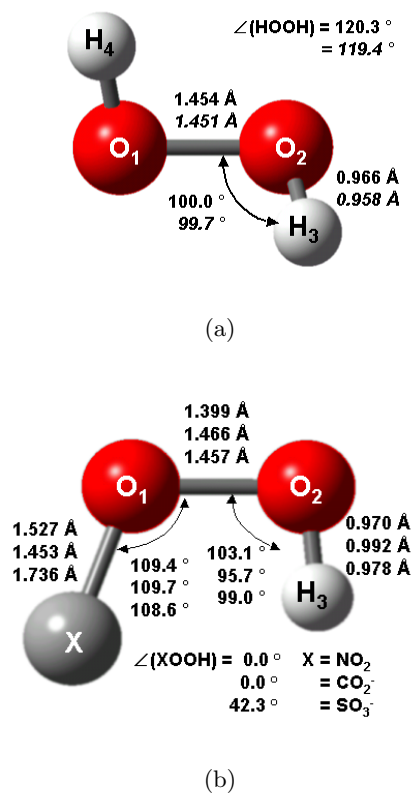


Figura 2.1: Parámetros geométricos del estado basal del (a) peróxido de hidrógeno y (b) de las moléculas XO<sub>2</sub>H (X = NO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub><sup>-</sup> o SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en fase gas. Estos parámetros se obtuvieron a nivel B3LYP/6-311G\*\* y se usaron en los cálculos con el campo de reacción IPCM. Los valores en *itálica* en el peróxido de hidrógeno corresponden a los parámetros obtenidos con el modelo SCIPCM.

jugar un papel importante en este tipo de reacción de isomerización. Este resultado coincide con el trabajo reportado por Okajima,<sup>104</sup> quien estudió la isomerización del peróxido de hidrógeno a oxiagua con un conjunto  $n$  de moléculas de agua ( $n = 0, \dots, 3$ ) y demostró que un solvente prótico como el  $\text{H}_2\text{O}$  juega un papel significativo en la formación de la oxiagua.

Es importante notar que el estado de transición involucrado en las reacciones de isomerización de los diferentes peróxidos tiene un *enlace de tres centros y dos electrones*.<sup>108</sup> Gritsenko y col.<sup>129</sup> mostraron que algunos funcionales GGA sobrestiman la estabilidad del estado de transición de reacciones que involucran enlaces de tres centros y dos o cuatro electrones; sin embargo, estos mismos autores concluyeron que los funcionales híbridos como el B3LYP mejoran la descripción energética de estos sistemas. Para aumentar la confianza en los cálculos reportados en esta tesis, se compararon los resultados obtenidos en este trabajo con la PES calculada por Schaefer y colaboradores,<sup>107,109</sup> hecha a nivel CCSD(T)/TZ2P+f, para la reacción  $\text{HOOH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}-\text{O}$  en fase gaseosa. Los cálculos de Schaefer predicen una energía de activación de 52.4 kcal/mol. En esta tesis se predice un valor de 53.2 kcal/mol (figura 2.2). Además, la diferencia de energía entre el estado de transición y la oxiagua es de 5.7 kcal/mol en el trabajo de Schaefer y 5.0 kcal/mol en este trabajo.

En este punto es importante mencionar que el estado basal, el estado de transición y los complejos tipo oxiagua de los cuatro peróxidos son singulete, por lo que la reacción de isomerización de estos peróxidos ocurre vía un canal singulete. Las diferencias de energía vertical singulete–tripleto se muestran en la tabla 2.1. De los datos de esta tabla se puede ver que el estado de transición singulete es más estable que el estado de transición tripleto vertical para la reacción de transferencia de hidrógeno en todos los peróxidos ( $\Delta E \geq 37.0$  kcal/mol). Cabe mencionar que el tripleto optimizado, análogo a la oxiagua, corresponde a un complejo de van der Waals formado por una molécula de agua y un átomo de oxígeno tripleto. Este complejo de van der Waals es  $\sim 15$  kcal/mol más estable que la oxiagua singulete.



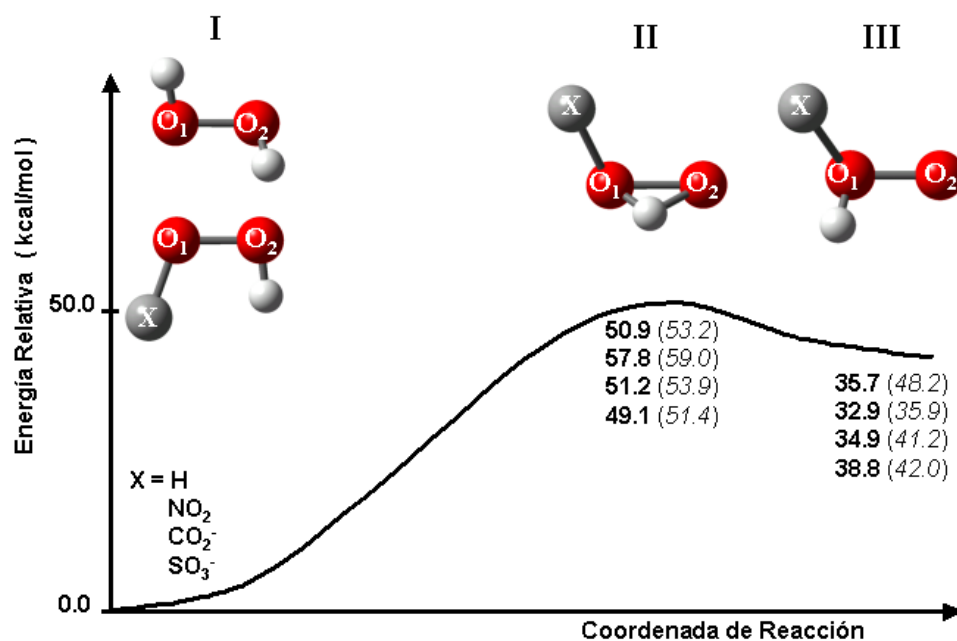


Figura 2.2: Conformación estructural y superficie de energía potencial para la reacción de desplazamiento interno de hidrógeno en peróxidos, calculada a nivel B3LYP/6-311G\*\* y con efectos de un solvente polar, modelado con el método IPCM. Se muestran las estructuras del estado basal (I), del estado de transición (II) y del complejo tipo oxiaqua (III) para cada peróxido. Los valores de energía son relativos al estado basal y no incluyen correcciones de punto cero en la energía. Los valores de energía en paréntesis fueron calculados en fase gaseosa.

**Tabla 2.1:** Diferencias de energía vertical singulete-triplete<sup>a</sup> para el estado basal (I), el estado de transición (II) y el complejo tipo oxi-agua (III). La quinta columna muestra la frecuencia de vibración armónica del estado de transición (ET) singulete involucrado en la reacción de isomerización.<sup>b</sup>

Molécula	$\Delta E_{vertical}$ (kcal/mol)			Frecuencia del ET <sup>c</sup>
	I	II	III	singulete ( $\text{cm}^{-1}$ )
HOOH	107.2	37.0	47.9	1000.85 <i>i</i>
HOONO <sub>2</sub>	103.5	63.7	12.5	1629.00 <i>i</i>
HOOCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	95.4	51.8	73.1	1126.68 <i>i</i>
HOOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	96.7	46.4	68.4	1222.87 <i>i</i>

<sup>a</sup> Sin correcciones de punto cero en la energía.

<sup>b</sup> Los cálculos del estado singulete y triplete de cada peróxido incluyen el efecto del solvente.

<sup>c</sup> El estado de transición en todas las reacciones tiene sólo una frecuencia imaginaria.

### 2.3.1. Análisis de la reactividad global

La reactividad global de las moléculas se puede describir convenientemente en términos de las funciones de respuesta global tales como la dureza y la blandura químicas,<sup>3,66,67</sup>  $\eta$  y  $S$  respectivamente, así como la electrofilia global,  $\omega$ .<sup>68</sup> Estas cantidades se evaluaron para las estructuras del estado basal y el estado de transición asociadas con el rearrreglo interno de los peróxidos considerados en este estudio. Los resultados se muestran en la tabla 2.2. De los datos en esta tabla se observa que la dureza del estado basal para los cuatro peróxidos es mayor que la dureza correspondiente a los estados de transición, un resultado consistente con el principio de máxima dureza.<sup>130</sup> En la misma tabla se reportan los valores de la blandura global de activación,  $\Delta S = S^\# - S^o$ . Se puede ver que el HOONO<sub>2</sub> presenta el valor más alto de la blandura de activación para la formación del correspondiente complejo tipo oxiagua con NO<sub>2</sub>; además, esta especie presenta al mismo tiempo la más alta energía de activación para el proceso de isomerización. Este resultado se puede deber a una polarización

importante de la estructura del estado de transición inducida por el comportamiento electroattractor fuerte del grupo  $\text{NO}_2$ . Para el resto de los sistemas sustituidos, la carga negativa de los grupos  $\text{CO}_2^-$  y  $\text{SO}_3^-$  ejerce un efecto electrodonador que influye en la activación, por lo que sus energías de activación son menores que la correspondiente al peróxido con  $\text{NO}_2$ .

**Tabla 2.2:** Índices globales de reactividad de los peróxidos, incluyendo los efectos del solvente polar (agua). Las etiquetas I, II y III se refieren al estado basal, estado de transición y complejo tipo oxiagua, respectivamente.<sup>a</sup>

Molécula	estado	$\epsilon_{HOMO}$	$\epsilon_{LUMO}$	$\mu$	$\eta$	S	$\Delta S$	$\omega$
HOOH	I	-0.28	0.01	-0.13	<b>0.29</b>	3.43		<b>0.81</b>
	II	-0.28	-0.09	-0.18	0.20	5.09	<b>1.67</b>	2.35
	III	-0.23	-0.02	-0.13	0.21	4.66		1.00
HOONO <sub>2</sub>	I	-0.33	-0.08	-0.21	<b>0.24</b>	4.11		<b>2.38</b>
	II	-0.28	-0.11	-0.20	0.17	5.87	<b>1.76</b>	3.10
	III	-0.26	-0.14	-0.20	0.12	8.34		4.63
HOOCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	I	-0.24	0.03	-0.10	<b>0.27</b>	3.67		<b>0.54</b>
	II	-0.23	-0.02	-0.13	0.20	4.91	<b>1.23</b>	1.07
	III	-0.18	0.04	-0.07	0.23	4.44		0.30
HOOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	I	-0.27	0.00	-0.14	<b>0.27</b>	3.74		<b>0.95</b>
	II	-0.26	-0.06	-0.16	0.21	4.85	<b>1.11</b>	1.67
	III	-0.22	-0.04	-0.13	0.18	5.59		1.24

<sup>a</sup> Todas las cantidades están expresadas en unidades atómicas, excepto la electrofilia global  $\omega$ , que se expresa en eV.

El análisis de la electrofilia global muestra que mientras el estado basal del HOOH es moderadamente electrofílico, el estado basal del HOONO<sub>2</sub> es altamente electrofílico (ver tabla 2.2). Para el caso de los peróxidos cargados HOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup> y HOOSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, los resultados muestran que son electrófilos moderados. Un hecho importante es que la electrofilia tanto del HOOH como del HOONO<sub>2</sub> se incrementa fuertemente en la estructura de transición (**II**) que conecta a estos dos peróxidos con sus correspondientes complejos tipo oxiagua. Sin embargo, la estructura del estado de transición asociada con cada uno de los peróxidos cargados

$\text{HOOCO}_2^-$  y  $\text{HOOSO}_3^-$  tiene pequeños valores de electrofilia. Por otra parte, la oxiagua muestra una ligera activación electrofílica con respecto al estado basal del  $\text{HOOH}$ , mientras que el correspondiente complejo tipo oxiagua derivado del  $\text{HOONO}_2$  (**III**) muestra un gran incremento en su electrofilia, aún mayor que el valor mostrado por la estructura de transición de este sistema. Este resultado se debe probablemente al fuerte efecto electroattractor del grupo  $\text{NO}_2$  sobre el sitio  $\text{O}_1$ .

### 2.3.2. Análisis de reactividad local

Para caracterizar los sitios electrofílicos, nucleofílicos o de tipo radical del estado basal y las formas activadas de los peróxidos, se hizo un análisis de la reactividad local en términos de la función de Fukui. Es importante mencionar que el efecto del solvente en la función de Fukui condensada en sitios atómicos, se ha discutido ampliamente en la literatura; por ejemplo, Fuentealba y col.<sup>80</sup> usando un modelo de campo de reacción continuo, y Balawender y col.<sup>131</sup> usando un modelo discreto, mostraron que el solvente no tiene un efecto significativo en la función de Fukui. Esto significa que la naturaleza electrofílica, nucleofílica o de radical libre de un determinado sitio en una molécula en fase gas, se mantiene cuando dicha molécula se encuentra en presencia de un solvente.

La tabla 2.3 muestra los resultados obtenidos para la serie completa de peróxidos considerados en este estudio. En esta tabla se puede ver que la simetría del estado basal del  $\text{HOOH}$  se mapea sobre la función de Fukui; esto es, en el estado **I** del  $\text{HOOH}$ , las funciones de Fukui sobre los átomos de oxígeno son idénticas. Sin embargo, la estructura del estado de transición asimétrico (**II**) muestra una alta selectividad para recibir ataques electrofílicos sobre el  $\text{O}_2$ , que es el sitio que se desprotona al formar el complejo oxiagua. Este átomo de oxígeno también es un sitio activo para recibir ataques nucleofílicos y de radicales libres, aunque en menor proporción que los ataques electrofílicos. La oxiagua (**III**) es de particular interés porque esta estructura se ha propuesto como un intermediario en varios procesos

químicos, incluyendo la epoxidación de alquenos.<sup>132</sup> Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede afirmar que la oxiguapa se caracteriza por tener una alta electrofilia en los protones ácidos (70 % del carácter electrofílico está distribuido en los átomos de hidrógeno unidos al centro O<sub>2</sub>) y una completa desactivación del O<sub>1</sub>. El comportamiento nucleofílico local, medido por el índice  $f_k^-$ , revela que el sitio O<sub>2</sub> es altamente propenso a recibir ataques electrofílicos. La actividad como radical libre de este sitio es menor que aquella presentada por el estado de transición (II). Este resultado sugiere que es probable que la oxiguapa esté involucrada en procesos iónicos más que en procesos de radicales libres; este resultado es consistente con la reactividad conocida y reportada para esta especie.<sup>93</sup>

**Tabla 2.3:** Función de Fukui regional electrofílica (+), nucleofílica (-) y de radical libre (0) para las especies involucradas en la reacción de transferencia interna de hidrógeno en peróxidos (isomerización).<sup>a</sup> Ver el texto para los detalles.

Molécula	sitio	I			II			III		
		$f^+$	$f^-$	$f^0$	$f^+$	$f^-$	$f^0$	$f^+$	$f^-$	$f^0$
HOOH	O <sub>1</sub>	0.33	0.48	0.41	0.26	0.11	0.19	0.00	0.04	0.02
	O <sub>2</sub>	0.33	0.48	0.41	0.63	<b>0.87</b>	0.75	0.30	0.95	<b>0.62</b>
HOONO <sub>2</sub>	O <sub>1</sub>	0.04	0.16	0.10	0.25	0.17	0.21	0.20	0.08	0.14
	O <sub>2</sub>	0.00	0.47	0.24	0.11	<b>0.74</b>	0.42	0.27	0.50	<b>0.39</b>
HOOCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	O <sub>1</sub>	0.41	0.39	0.40	0.31	0.14	0.22	0.01	0.09	0.04
	O <sub>2</sub>	0.35	0.42	0.39	0.58	<b>0.77</b>	0.68	0.13	0.86	<b>0.50</b>
HOOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	O <sub>1</sub>	0.37	0.00	0.18	0.27	0.10	0.19	0.13	0.07	0.10
	O <sub>2</sub>	0.36	0.00	0.18	0.60	<b>0.84</b>	0.72	0.10	0.86	<b>0.48</b>

<sup>a</sup> Todas las cantidades están expresadas en unidades atómicas.

Otra observación interesante relacionada con la reactividad local de la oxiguapa es que esta especie posiblemente participa en el mecanismo de epoxidación de alquenos, como lo ha propuesto Jursic.<sup>132</sup> El autor sugiere que el mecanismo de esta reacción implica un ataque electrofílico del átomo O<sub>2</sub> de la oxiguapa sobre el doble enlace de los alquenos, a

partir de la información que obtuvo con cálculos a nivel semiempírico AM1. Este resultado es consistente con el hecho de que la función de Fukui nucleofílica, en el O<sub>2</sub> de la oxiagua, tiene un valor excepcionalmente grande como se muestra en la tabla 2.3. Adicionalmente, en la misma tabla se puede notar que la estructura del estado de transición (II) también es una forma activada del peróxido de hidrógeno que puede participar en ataques electrofílicos sobre el sistema  $\pi$  (rico en electrones) de los alquenos.

Para el peróxido HOONO<sub>2</sub> neutro, el análisis de la reactividad local también se muestra en la tabla 2.3. El estado basal de esta molécula se predice que es activo para ataques electrofílicos sobre el sitio O<sub>2</sub>. Sin embargo, el carácter nucleofílico del sitio O<sub>2</sub> es ligeramente menor que aquel presentado por el sitio similar en la molécula de HOOH, por lo que se puede concluir que la sustitución de un átomo de hidrógeno por un grupo NO<sub>2</sub> neutro tiene un efecto muy ligero (marginal) de desactivación de este sitio. La actividad electrofílica local de los átomos involucrados en el enlace peroxo, medida por el índice  $f_k^+$ , es marginal y mucho menor que el carácter electrofílico local predicho para la molécula de HOOH. Además, el grupo sustituyente NO<sub>2</sub> tiene un efecto de desactivador de estos sitios para ataques nucleofílicos. La estructura del estado de transición de este peróxido muestra una importante activación nucleofílica del sitio O<sub>2</sub>, la cual es mucho menor que la activación nucleofílica del mismo sitio en la molécula de HOOH. Se puede notar que el sitio O<sub>2</sub> del complejo tipo oxiagua, NHO<sub>2</sub>O–O, se activa menos que el mismo sitio de la molécula H<sub>2</sub>O–O.

Para los dos peróxidos cargados negativamente, HOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup> y HOOSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, el sitio O<sub>2</sub> se predice como ligeramente electrofílico. Además, de los resultados presentados en la tabla 2.3 se puede ver que, en el estado de transición de estos peróxidos, el sitio O<sub>2</sub> es más activo para ataques electrofílicos. El carácter electrofílico en este sitio, medido por el índice  $f_k^+$ , es más cercano a aquel mostrado por el estado de transición del HOOH que del HOONO<sub>2</sub>. Con este resultado, se puede esperar que tanto el HOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup> como el HOOSO<sub>3</sub><sup>-</sup> sean agentes

epoxidantes eficientes cuando reaccionan con alquenos. Por otra parte, los complejos tipo oxigua con los sustituyentes  $\text{CO}_2^-$  y  $\text{SO}_3^-$  (estructuras **III**) muestran una importante activación nucleofílica en el sitio  $\text{O}_2$ .

**Tabla 2.4: Análisis de la activación local electrofílica (+), nucleofílica (-) y de radical libre (0) de los peróxidos.** <sup>a,b</sup>

Molécula	sitio	$f_k^+ \Delta S$	$S \Delta f_k^+$	$\Delta s_k^+$	$f_k^- \Delta S$	$S \Delta f_k^-$	$\Delta s_k^-$	$f_k^0 \Delta S$	$S \Delta f_k^0$	$\Delta s_k^0$
HOOH	$\text{O}_1$	0.55	-0.23	0.31	0.81	-1.27	-0.46	0.68	-0.75	-0.07
	$\text{O}_2$	0.55	1.04	1.59	0.81	1.32	2.13	0.68	1.18	1.86
HOONO <sub>2</sub>	$\text{O}_1$	0.01	0.44	0.45	0.28	0.05	0.33	0.17	0.45	0.63
	$\text{O}_2$	0.07	0.85	0.93	0.83	1.10	1.93	0.42	0.77	1.19
HOOCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	$\text{O}_1$	0.50	-0.36	0.14	0.48	-0.92	-0.44	0.49	-0.64	-0.15
	$\text{O}_2$	0.44	0.88	1.31	0.52	1.29	1.81	0.48	1.08	1.56
HOOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	$\text{O}_1$	0.41	-0.36	0.05	0.00	0.38	0.38	0.2	0.01	0.21
	$\text{O}_2$	0.40	0.91	1.31	0.00	3.11	3.11	0.2	2.01	2.21

<sup>a</sup> Todas las cantidades están expresadas en unidades atómicas.

<sup>b</sup> Las cantidades involucradas en esta tabla se definen en la página 33, después de la ecuación 1.52 (capítulo 1).

En general, se puede notar que la serie completa de peróxidos estudiados en este trabajo muestra un patrón de reactividad local que es marcadamente iónico. Este es un resultado que es consistente con la actividad observada de estos compuestos, que les permite ser considerados como oxidantes iónicos eficientes.<sup>93</sup>

El análisis de la activación de sitios basado en la blandura local permite obtener una descripción complementaria de los patrones de reactividad local de los sistemas estudiados en esta tesis. Este análisis introduce, además de las variaciones en la función de Fukui del estado basal a cualquier forma activada de la molécula incluyendo el estado de transición, el efecto de la activación global el cual es medido por los cambios en la blandura global. La ecuación 1.52 es un ejemplo de cómo se puede realizar un análisis de activación de sitios. En

la tabla 2.4 se muestran los valores de la activación de sitios electrofílicos, nucleofílicos y de radical libre, representados por la cantidad  $\Delta s_k^\alpha$  la cual está definida por la ecuación 1.52. Los dos primeros renglones corresponden a los patrones de activación de los sitios  $O_1$  y  $O_2$  del HOOH. A partir de estos datos se puede establecer que la activación electrofílica del centro  $O_2$ , se debe principalmente a una activación local originada por un incremento en el valor de la función de Fukui electrofílica en este sitio. Por otra parte, el sitio  $O_1$  muestra una ligera activación electrofílica, resultado de una moderada activación electrofílica global y una ligera desactivación electrofílica local en ese sitio. El análisis de la activación nucleofílica sobre el mismo sistema muestra una fuerte activación del sitio  $O_2$ , que es principalmente de naturaleza local.

De los resultados en la tabla 2.4, se puede ver que el HOONO<sub>2</sub> muestra una baja activación electrofílica en el sitio  $O_2$ , en comparación con los peróxidos cargados HOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup> y HOOSO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Con los resultados de la activación electrofílica en el centro  $O_2$ , que incluye la activación global debida a los cambios en la blandura global del estado basal al estado de transición, se puede suponer que estos peróxidos cargados actuarán como reactivos eficientes en las reacciones de transferencia de oxígeno. Con los resultados reportados en la tabla 2.4 se puede ver que el modelo de activación de sitios basado en los cambios de la blandura local, predice que el HOONO<sub>2</sub> tiene una ligera activación electrofílica en el sitio  $O_2$ .

En conclusión, con este trabajo mostramos la existencia de los complejos tipo oxiagua de otros peróxidos diferentes al HOOH. Las barreras energéticas de la reacción de desplazamiento interno de hidrógeno, que conduce a estos complejos, se modifican por la inclusión de un solvente polar. Mostramos que la oxiagua y los complejos tipo oxiagua de los otros tres peróxidos son un mínimo en su correspondiente superficie de energía potencial. El análisis desarrollado en este trabajo puede ser una guía útil en la búsqueda de estructuras de estados de transición de aquellos procesos donde se ha sugerido la presencia de complejos tipo oxiagua, tal es el caso de las reacciones de epoxidación de alquenos.<sup>132</sup>



Finalmente, este estudio permitió mostrar la forma cómo se calculan los diferentes índices de reactividad definidos en la TFD. Hoy en día, esta es la forma convencional para estudiar la reactividad de moléculas pequeñas. Esto es, usando funciones de base localizadas para obtener la estructura electrónica de un sistema, se puede evaluar la reactividad a un nivel atómico de dicho sistema. Esta forma para estudiar la reactividad contrasta con aquella que se puede usar en el estudio de la reactividad química de moléculas de gran tamaño, como las biomoléculas. Este contraste se mostrará en los próximos capítulos.

## Capítulo 3

# Reactividad de la toxina BgK

En este capítulo se presenta un estudio sobre la reactividad química de la toxina BgK. En la primera parte se describe la importancia biológica de esta toxina y el interés por el estudio de su reactividad. En la segunda sección se explican los cálculos realizados para obtener la estructura electrónica de este sistema. En contraste con el capítulo anterior, donde se mostró el análisis detallado que hoy en día se puede hacer para estudiar la reactividad de sistemas pequeños, en este capítulo se describen las dificultades al usar funciones de base localizadas para estudiar la reactividad de sistemas con cientos de átomos; adicionalmente, se muestra la ventaja de usar ondas planas como funciones de base para estudios de reactividad. En la tercera parte se presentan los resultados, mostrando la existencia de *estados electrónicos intersticiales*. En la última sección se discute el papel que juegan los estados intersticiales en la reactividad química de la toxina BgK.<sup>a</sup>

---

<sup>a</sup>Este capítulo se basa en el artículo *On the Existence of Electronic States Confined by Charged Groups in Proteins* por Felipe Aparicio, Joel Ireta, Arturo Rojo, Laura Escobar, Andrés Cedillo y Marcelo Galván *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 1692-1697.

### 3.1. Planteamiento del problema

Uno de los objetivos principales de toda teoría en química es dar información sobre la estabilidad relativa entre las moléculas y describir sus propiedades reactivas bajo ciertas condiciones. La teoría de reactividad definida en la TFD cumple con este objetivo. Esta teoría permite describir la reactividad de un sistema a partir del cálculo de su estructura electrónica. Sin embargo, dentro de la química teórica, en particular en la TFD, el problema práctico más importante para obtener la estructura electrónica de una molécula es el tamaño de la misma.

Como se mencionó en la sección 1.2.3 del capítulo 1, las ecuaciones de Kohn-Sham representan un problema de eigenvalores que se resuelve autoconsistentemente en forma iterativa, donde el esfuerzo de cómputo de cada iteración está dominado por la diagonalización del hamiltoniano efectivo. Cuando se usan funciones de base localizadas,<sup>a</sup> a medida que se incrementa el número de átomos, el número de electrones se incrementa y por tanto el número de funciones de base  $M$  se incrementa, por lo que el esfuerzo computacional es del orden de  $O(M^4)$ . El uso de métodos basados en funciones de base localizadas, permite estudiar la reactividad química al nivel de detalle como se describió en el capítulo anterior, porque en estos métodos el procedimiento para determinar propiedades localizadas en los átomos está bien definido.

El Método de la Energía Total por Pseudopotenciales (METP) es una alternativa útil para superar la dificultad del tamaño del sistema, porque el esfuerzo computacional de este método escala como  $M \ln M$ , donde  $M$  es el conjunto de funciones de base usado. Como se mencionó en el capítulo 1, el METP se basa en el uso de ondas planas como conjunto de funciones de base, donde el tamaño de este conjunto no depende directamente del número

---

<sup>a</sup>Las funciones de base localizadas son un conjunto de funciones centradas en los núcleos atómicos, como los orbitales tipo Slater o las funciones gaussianas.

de átomos del sistema, sino del parámetro  $q_c$ . Con el METP y el poder de cómputo en paralelo actual, se puede calcular la estructura electrónica de sistemas con cientos e incluso miles de átomos. Esto hace posible estudiar la reactividad química de sistemas tan grandes como algunas de las biomoléculas.

En particular, la reactividad química de biomoléculas como las toxinas bloqueadoras de canales iónicos es un tema de interés en áreas como la fisiología celular y la farmacología.<sup>133</sup> El interés se basa en el hecho de que estas toxinas bloquean selectivamente los canales iónicos, como los canales conductores de iones potasio, alterando procesos biológicos esenciales.<sup>133</sup>

Los canales de potasio conducen iones  $K^+$  a través de la membrana celular y están involucrados en procesos celulares como la regulación del volumen de las células, la secreción de hormonas y la generación de impulsos en células excitables eléctricamente.<sup>134</sup> Las características más importantes de los canales de  $K^+$  son: una selectividad casi perfecta por los iones  $K^+$  respecto de los iones  $Na^+$  y una alta velocidad de conducción de los iones potasio.<sup>135</sup> Dependiendo de la forma en la que los canales se abren, estos se clasifican en canales controlados por ligantes y en canales controlados por voltaje (Kv). En el primer grupo, la apertura del canal está energéticamente acoplada a la unión de un ion, de una molécula orgánica pequeña o incluso en algunos casos, de una proteína.<sup>136</sup> En el segundo grupo, la apertura del poro está energéticamente acoplada al movimiento de un sensor de voltaje dentro del campo eléctrico de la membrana.<sup>137</sup>

Las toxinas bloqueadoras de canales de potasio son una familia de polipéptidos que tienen una alta afinidad por estos canales.<sup>138</sup> Además de su selectividad por una familia de canales de  $K^+$ , las toxinas bloqueadoras actúan en una estequiometría 1:1 y se unen a la misma región del canal (región P). Las toxinas bloqueadoras se encuentran en el veneno de víboras, alacranes, caracoles y anémonas marinas y se han usado para estudios

de estructura-función de los canales de  $K^+$ , particularmente en canales tipo Kv, como los de la subfamilia Kv1.<sup>139,140</sup>

### 3.1.1. Toxina BgK

La toxina BgK es un polipéptido producido por una anémona marina llamada *Bunodosoma granulifera* y pertenece a una clase de toxinas que se unen a los canales sensibles a iones potasio.<sup>138</sup> Esta toxina tiene 37 aminoácidos (581 átomos), un punto isoelectrico básico y una carga neta de +5 debido a la existencia de 3 grupos cargados negativamente y 8 grupos cargados positivamente, además de la región carboxílica inicial (negativa) y la región amino terminal (positiva). En la figura 3.1 se muestra una de las 15 estructuras de la BgK, determinadas por experimentos de resonancia magnética nuclear y reportadas por Dauplais y col.<sup>141</sup> en el *Protein Data Bank* ([www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)), con código 1BGK. Esta estructura contiene dos  $\alpha$ -hélices que van de los residuos 9 al 16 y del 24 al 31, además de 3 puentes disulfuro que unen los residuos 20-34, 11-30 y 2-37.<sup>141</sup> Las características estructurales de la BgK la hacen una toxina globular compacta y rígida. La rigidez se debe principalmente a los puentes disulfuro.

La estructura de la toxina BgK muestra la complejidad de las cadenas polipeptídicas. Esta complejidad puede incluir la existencia de una estructura secundaria formada por hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$ , además de la asociación de subunidades y la posibilidad de formar enlaces covalentes entre regiones independientes, conocidos como puentes disulfuro.<sup>142</sup> Un hecho importante es que estos sistemas complejos pueden tener regiones intersticiales, que son zonas sin átomos rodeadas por grupos funcionales específicos. Estas regiones intersticiales se pueden encontrar como cavidades internas o superficiales y pueden jugar un papel importante desde el punto de vista de la estructura electrónica. La existencia de grupos cargados en estas regiones intersticiales da lugar a diferentes situaciones: regiones intersticiales rodeadas por grupos funcionales positivos, negativos o una mezcla de residuos positivos y

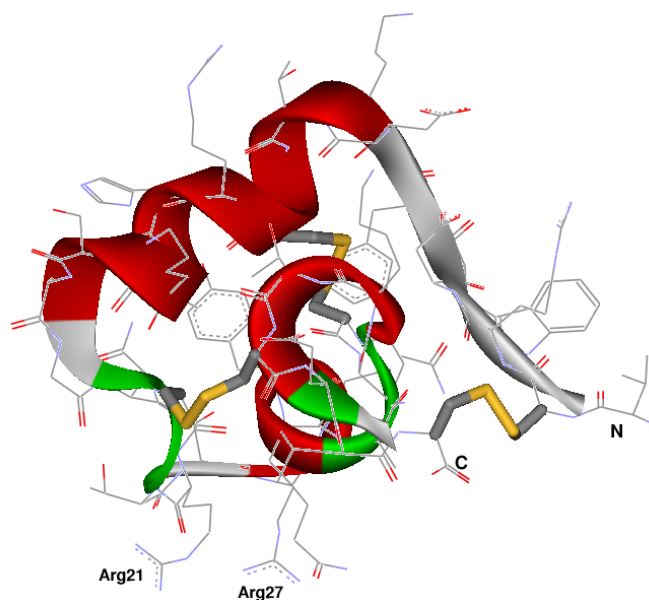


Figura 3.1: Estructura de la toxina BgK. La secuencia de aminoácidos es: VCRDWFKE-TACRHA KSLGNCR TSQKYRANCAKTCELC (ver Apéndice B para la nomenclatura). La estructura secundaria de la toxina está formada por dos  $\alpha$ -hélices representadas en color rojo y por tres puentes disulfuro mostrados en color amarillo. Los grupos terminales amino y carboxilo se representan con las letras N y C respectivamente. Para resaltar las características de la estructura, no se presentan explícitamente los átomos de hidrógeno.

negativos.<sup>143</sup> La interacción entre estos grupos cargados es parte de la complejidad de los polipéptidos. Generalmente, las interacciones electrostáticas entre grupos cargados son importantes para determinar la estructura y función de proteínas en una amplia variedad de procesos celulares y biológicos.<sup>144</sup> Se han reportado varias proteínas con grupos cargados cercanos entre si y formando cavidades; estos sistemas se han estudiado ampliamente.<sup>145</sup>

La toxina BgK posee una región intersticial formada por dos residuos de arginina, que son grupos cargados positivamente, ubicados en la posición 21 y 27 de la secuencia de esta toxina (fig. 3.1). Experimentalmente se sabe que los residuos serina 23 (Ser23), lisina 25 (Lys25) y tirosina 26 (Tyr26)<sup>a</sup> determinan la afinidad de la toxina por los canales de potasio

<sup>a</sup>En este capítulo se usarán los símbolos en el idioma inglés para representar a los aminoácidos. Ver

del tipo Kv1. En particular, cuando el residuo Lys25 se remueve, la afinidad de la BgK por estos canales decrece dramáticamente.<sup>146</sup> Cabe mencionar que la región intersticial de la BgK están localizada en la misma zona donde se encuentra la Lys25.

En este trabajo se analiza la estructura electrónica y la reactividad química de la toxina BgK, poniendo especial atención en la región intersticial. En general, para evaluar la estructura electrónica de un polipéptido de este tipo es necesario tomar en cuenta las siguientes restricciones: el polipeptido debe ser pequeño para que sea posible calcular la estructura electrónica del sistema completo; se debe conocer la geometría experimental de la macromolécula para evitar la necesidad de buscar su conformación de equilibrio; en el caso particular de las toxinas con regiones intersticiales, los grupos cargados que forman estas cavidades deben tener la conformación apropiada.

### 3.2. Detalles computacionales

Los cálculos de la estructura electrónica de la BgK hechos en este trabajo se basan en el Método de la Energía Total por Pseudopotenciales (METP)<sup>51</sup>, descrito en la página 19. Las ecuaciones de Kohn-Sham en espacio recíproco se resolvieron con el método desarrollado por Arias y col.<sup>147</sup> La implementación práctica de este método se encuentra en el código desarrollado por Joannopoulos y colaboradores.<sup>51,148</sup> Para tener una descripción cualitativa de la estructura electrónica de la toxina completa, se hizo un cálculo de un solo punto usando una de las 15 estructuras de RMN determinadas experimentalmente.<sup>141</sup> Se usó la aproximación LDA de Vosko, Wilk y Nusair (VWN)<sup>3</sup> para el funcional de intercambio y correlación. La expansión en ondas planas se truncó a una energía de 6 Ry.<sup>a</sup> Aún cuando esta energía de truncamiento representa un bajo nivel de cálculo, se ha mostrado que con este valor se pueden describir apropiadamente muchos aspectos de la estructura electrónica

---

Apéndice B

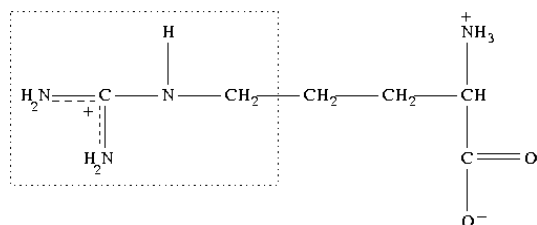
<sup>a</sup>En el METP la energía de truncamiento comúnmente se expresa en Rydberg (Ry). 1Ry = 0.5 Hartree.

de sistemas moleculares.<sup>149,150</sup> Por otra parte, la toxina se colocó dentro de una supercelda de  $26.6\text{\AA} \times 23.3\text{\AA} \times 27.0\text{\AA}$ , la cual cumple con la condición de que la distancia mínima entre átomos de celdas vecinas es de  $5\text{\AA}$ .<sup>59</sup> Por las dimensiones de la supercelda utilizada, es suficiente con usar un solo punto  $\mathbf{k}$  para resolver las ecuaciones de Kohn-Sham en espacio recíproco.<sup>59</sup> En el presente trabajo, todos los cálculos se realizaron evaluando la función de onda en el punto  $\Gamma(0,0,0)$  de la primera zona de Brillouin. Además, como el METP sólo considera a los electrones de valencia, se diseñaron pseudopotenciales con conservación de la norma usando el método de Rappe y col. (método RRKJ),<sup>60</sup> con una energía de truncamiento de 40 Ry. Estos pseudopotenciales son del tipo *s local* y *p no local* para los átomos de H, C, N y O, mientras que para el átomo de S son del tipo *s local*, *p* y *d no local* de acuerdo con la representación de Kleinman y Bylander.<sup>55</sup>

En este trabajo se analiza la estructura electrónica de la toxina BgK poniendo especial atención en una región intersticial formada por dos argininas. Esta región se muestra en la figura 3.1. Para una región como ésta se puede esperar que las ondas planas, que son funciones de base deslocalizadas, den una descripción aceptable. Sin embargo, cuando la expansión en ondas planas se trunca, se obtiene una descripción pobre de la región cercana a los núcleos porque en esa región la densidad cambia rápidamente. Para verificar que la energía de truncamiento de 6 Ry no genere resultados espurios en este estudio, se hicieron varias pruebas. La primera de ellas fue calcular la estructura electrónica de un fragmento de 7 aminoácidos, que incluye los residuos arginina 21 (Arg21) y arginina 27 (Arg27); para este cálculo se conservaron las coordenadas de los 7 residuos tal y como se encuentran en la secuencia de la BgK. Los residuos 22 al 26 se sustituyeron por alaninas y se saturaron los enlaces de los fragmentos extremos para completar los residuos de arginina. El sistema resultó con carga +2. Para el cálculo de este fragmento se usó una expansión en ondas planas con una energía de truncamiento de 20 Ry, lo que representa un mejor nivel de cálculo para describir apropiadamente las regiones internas y externas de la densidad electrónica



de valencia.<sup>149,150</sup> Para este fragmento se usó una supercelda de 15.9Å x 12.4Å x 16.7Å que cumple con el criterio de 5Å de distancia entre átomos de celdas vecinas. La segunda prueba consistió en calcular la estructura electrónica del mismo fragmento usando el método B3LYP/6-31G\*\*, con el programa gaussian98.<sup>122</sup> La razón de esta segunda prueba fue usar un funcional de intercambio y correlación híbrido, más allá de la aproximación LDA, y un conjunto de funciones de base localizadas. Si se obtiene una descripción cualitativamente similar de la región de interés con ambas pruebas, entonces se puede tener confianza, al menos cualitativamente, en los resultados del cálculo de ondas planas de la toxina completa. Una tercera prueba consistió en evaluar el efectos del solvente en la estructura electrónica de un modelo de 2 argininas. Este modelo se construyó usando la conformación original de la Arg21 y Arg27 en la secuencia de la BgK. En este sistema se usaron los siguientes niveles de teoría: B3LYP/6-31G\*\* y LDA/pseudopotenciales/ondas planas con una energía de truncamiento de 20 Ry y una supercelda de 10.3Å x 12.6Å x 13.1Å.



**Figura 3.2:** Estructura del residuo de arginina. El grupo guanidinio está en la zona del rectángulo punteado.

Finalmente, para evaluar los efectos de la autointeracción electrónica en los estados intersticiales, se calculó la estructura electrónica de los grupos guanidinio de la Arg21 y Arg27 (fig. 3.2) en la conformación de la BgK. Para este estudio se usaron los métodos HF/6-31G\*\*, SIC-OEP LDA/cc-pVTZ y SIC-PZ LDA/ondas planas/40 Ry.

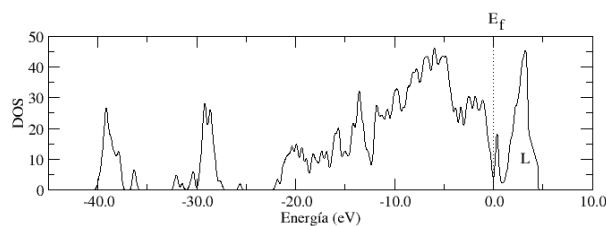


Figura 3.3: Densidad de estados (DOS) de la toxina BgK.  $E_f$  es el nivel de Fermi y L la banda LUMO.

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Estados intersticiales

En sistemas sólidos, polímeros y superficies, el lenguaje de bandas es la forma natural para referirse a la estructura electrónica de estos sistemas, porque el número de estados electrónicos es tan grande que no se alcanzan a distinguir en forma individual. En una escala de energía, la distribución de las bandas es la *huella digital* de cada sistema y ésta se puede representar mediante una gráfica de *densidad de estados* (DOS).<sup>151</sup> La densidad de estados de la toxina BgK se presenta en la figura 3.3. Esta gráfica muestra un patrón similar a la DOS de una toxina del veneno de alacrán<sup>150</sup> y a la DOS de nanotubos construidos con aminoácidos.<sup>152</sup>

Un hecho importante es que el concepto de orbitales frontera, comúnmente usado en estudios de reactividad química, se ha extendido al concepto de bandas frontera;<sup>151</sup> esta extensión es muy útil en el análisis de la estructura electrónica de proteínas.<sup>153</sup> Para la toxina BgK, la primera banda de estados desocupados (banda LUMO) tiene un ancho de 3.1 eV e integra a 30 estados virtuales. La mayoría de estos estados se localizan alrededor de los aminoácidos cargados positivamente, como se ve en la figura 3.4, y algunos están localizados en la región de los puentes disulfuro. La superficie amarilla en la figura 3.4 muestra las regiones donde la densidad orbital de la banda LUMO es mayor que 0.1 u.a.

La característica más importante en el comportamiento local de la banda LUMO es que muestra una acumulación de densidad orbital, en una región libre de átomos, entre la Arg21 y la Arg27. Esta región está dentro del círculo punteado de la figura 3.4. Los aminoácidos Arg21 y Arg27 se encuentran muy cercanos entre sí, debido al plegamiento particular de la toxina, formando una pequeña región intersticial entre ellos. La distancia entre los átomos más cercanos de estos dos residuos es de 2.24 Å, como se ve en la figura 3.5. La isosuperficie de la banda LUMO muestra que la densidad orbital se localiza sobre una región sin enlaces ni átomos, además de que en esa región no hay posibilidad de formación de puente de hidrógeno de acuerdo con el criterio estándar para este tipo de enlaces.<sup>154</sup>

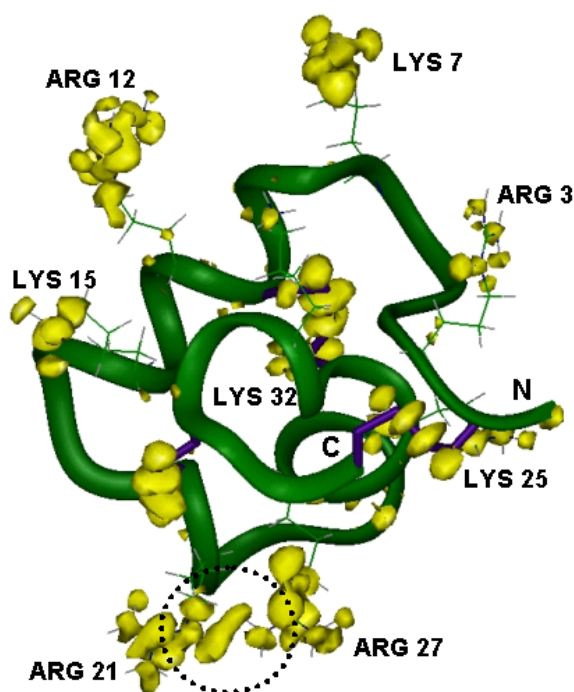


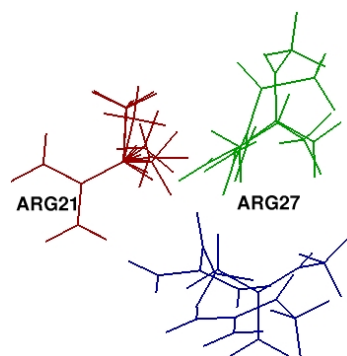
Figura 3.4: Isosuperficie de densidad orbital de la banda LUMO, formada por 30 estados virtuales, de la toxina BgK. La isosuperficie se creó usando un valor de 0.1 u.a. Para tener puntos de referencia en la estructura, se etiquetaron los aminoácidos con carga positiva y se muestran completas sus cadenas laterales. El resto de los aminoácidos se ocultaron para simplificar la presentación de la estructura. Los puentes disulfuro están marcados en color púrpura. La región de interés en este trabajo se resalta con el círculo punteado.

En la figura 3.6 se muestra el comportamiento de la densidad orbital LUMO para el fragmento que contiene siete aminoácidos. Se puede ver que los estados intersticiales aparecen tanto a nivel ondas planas/20 Ry como a nivel B3LYP/6-31G\*\*. Con estos resultados se puede afirmar que la existencia de los estados intersticiales no es un efecto artificial de las ondas planas, porque los estados existen aún cuando se usa un conjunto de bases localizadas.

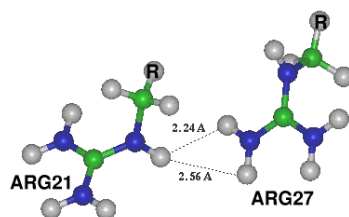
### 3.3.2. Influencia de la ocupación en los estados intersticiales

Para el análisis de los estados intersticiales, se calculó la estructura electrónica de un modelo de dos argininas, Arg21 y Arg27, a nivel B3LYP/6-31G\*\* y a nivel LDA con pseudopotenciales, ondas planas y una energía de truncamiento de 20 Ry. Este modelo resultó con una carga de +2. Se analizaron los estados desocupados cuyos eigenvalores quedaron incluidos en el rango de 2.0 eV por arriba del LUMO. Los resultados mostraron que para ambos niveles de cálculo, los primeros dos orbitales de Kohn-Sham desocupados son degenerados y la densidad orbital se localiza en los grupos guanidinio de las argininas. Además, estos cálculos mostraron que el tercer estado virtual es el estado intersticial. Es importante mencionar que este estado tiene un comportamiento local similar a aquel encontrado en el modelo de siete aminoácidos.

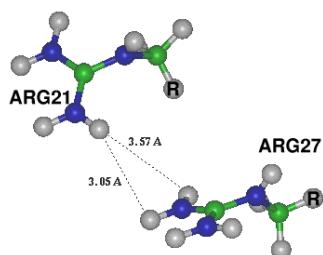
En este punto cabe mencionar que el comportamiento de los estados virtuales está determinado por el potencial efectivo de Kohn-Sham generado por los estados ocupados. A diferencia de los estados ocupados, los estados virtuales no están bajo la influencia de repulsiones coulómbicas ni por interacciones de intercambio y correlación. Estas interacciones pueden cambiar el comportamiento local de los estados virtuales, particularmente si estos se localizan lejos de la influencia de los núcleos atómicos. Una forma de evaluar esta situación consiste en ocupar los estados virtuales y analizar los cambios inducidos. Para ocupar el estado intersticial, se hizo un cálculo con ondas planas/20 Ry y seis electrones adicionales, para asegurar la ocupación del tercer orbital desocupado, en el modelo de dos argininas. El



(a)

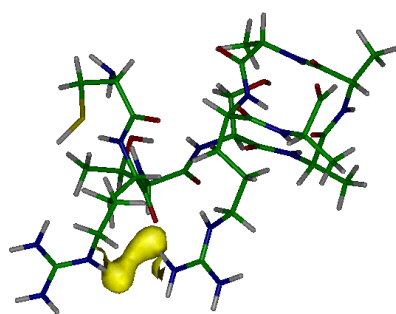


(b)

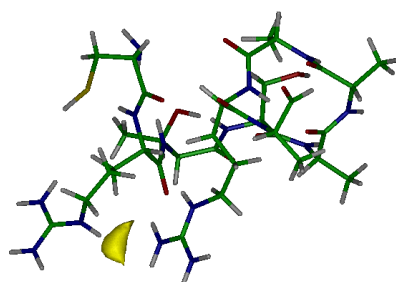


(c)

Figura 3.5: Conformación de la Arg21 y la Arg27 en 6 de las 15 estructuras de RMN de la BgK, donde se encontraron los estados intersticiales. (a) Superposición de las seis estructuras, tomando al grupo guanidinio de la Arg21 como punto de referencia. El residuo Arg27 muestra claramente dos patrones de conformación: (b) conformación 1 y (c) conformación 2. La estructura estudiada en esta tesis tiene la conformación 1. Para obtener estos modelos, la estructura de la BgK se simplificó removiendo todos los átomos más allá del sitio marcado con la letra R. Los enlaces modificados se saturaron con átomos de hidrógeno.



(a)



(b)

Figura 3.6: Isosuperficie de la banda LUMO del fragmento de siete aminoácidos (Arg21 a la Arg27) de la BgK. Los cálculos se hicieron con (a) el METP usando una expansión en ondas planas con una energía de truncamiento de 20 Ry y (b) con el método B3LYP/6-31G\*\*. La secuencia de este fragmento es RAAAAAR y se conserva en la geometría original de la BgK. Este sistema tiene una carga neta de +2. Para ambos casos, el valor de la isosuperficie es de 0.15 u.a.

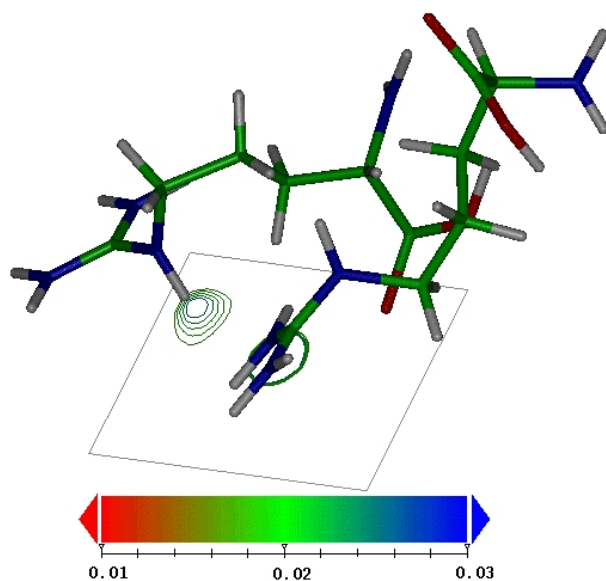


Figura 3.7: Contornos de la densidad orbital del HOMO para el modelo de dos aminoácidos (Arg21 y Arg27), calculada con seis electrones adicionales. La geometría de los residuos es la misma que tienen en la estructura completa de la BgK. El sistema tiene una carga de -4. El cálculo se hizo con el METP usando una expansión en ondas planas con una energía de truncamiento de 20 Ry. El plano del contorno pasa por los tres átomos de hidrógeno más cercanos en la región intersticial. Los contornos tienen valores de 0.015, 0.017, 0.019, 0.021 y 0.023 u.a.

nuevo sistema iónico tiene una carga de -4 y el HOMO corresponde al estado intersticial. En la figura 3.7 se muestra un diagrama de contornos de la densidad orbital del HOMO del sistema aniónico. El plano de contornos contiene a los 3 átomos de hidrógeno más cercanos de las dos argininas. En esta figura es claro que el orbital HOMO se mantiene localizado en la región intersticial lo cual indica que las interacciones electrón-electrón involucradas en este estado no eliminaron su naturaleza.

### 3.3.3. Efectos del solvente en los estados intersticiales

La geometría de la toxina BgK usada en este estudio proviene de experimentos de RMN, lo que implica que la estructura corresponde a la de una especie solvatada. Por esta

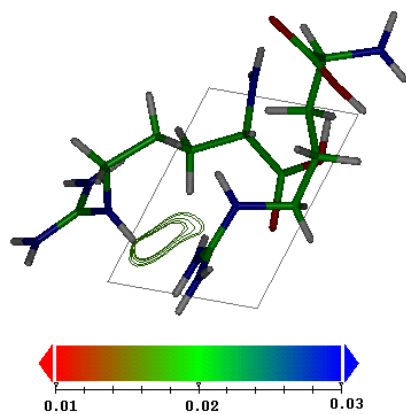
razón, es importante incluir los efectos del solvente y analizar su impacto en los estados intersticiales. Para este propósito, se hizo un cálculo a nivel B3LYP/6-31G\*\* del sistema de dos argininas con carga +2 y usando el modelo de campo de reacción continuo (PCM), con agua como solvente.<sup>155</sup> En la figura 3.8(a) se muestra el comportamiento del estado intersticial con el campo de reacción y se compara con el estado intersticial obtenido en vacío de la figura 3.8(b). Se puede ver que el estado intersticial se localiza en la misma región pero con pequeñas diferencias en su comportamiento local. Cabe mencionar que el eigenvalor correspondiente a este estado se estabiliza en 0.6 eV respecto del mismo estado sin el campo de reacción. Es claro que esta estabilización se debe a la presencia del solvente polar.

#### 3.3.4. Efecto de la autointeracción electrónica en los estados intersticiales

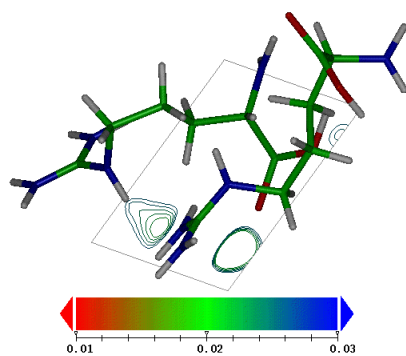
El método Hartree-Fock no contiene autointeracción porque la contribución a la energía total debida al término de energía de interacción coulombica clásica entre los electrones, se cancela exactamente con la parte diagonal de la energía de intercambio.<sup>2</sup> Sin embargo, en la TFD los funcionales LDA y B3LYP usados en los cálculos anteriores, contienen el efecto espurio de la autointeracción. Para evaluar el efecto de la autointeracción en los estados intersticiales, se calculó la estructura electrónica del modelo de 2 argininas a nivel HF/6-31G\*\*. Los resultados muestran que el estado intersticial se mantiene. Además, el comportamiento local de este estado es similar al obtenido a nivel B3LYP/6-31G\*\*.

Por otra parte, el cálculo de la estructura electrónica de un modelo de dos guanidinos a nivel LDA/cc-pVTZ, con correcciones SIC-OEP, muestra que el estado intersticial se preserva, pero con cambios apreciables en su comportamiento local, como se puede ver en la figura 3.9. Una característica importante del método SIC-OEP es que permite corregir la autointeracción usando el conjunto completo de orbitales ocupados o un subconjunto de ellos (espacio activo). El uso de un espacio activo representa una ventaja porque requiere



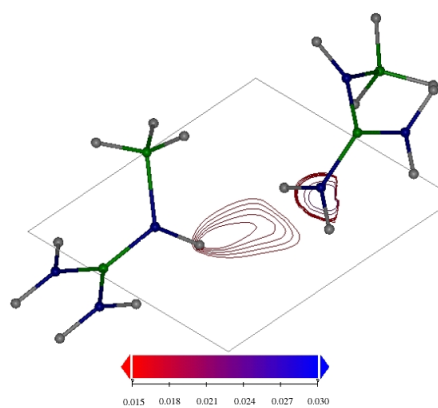


(a)

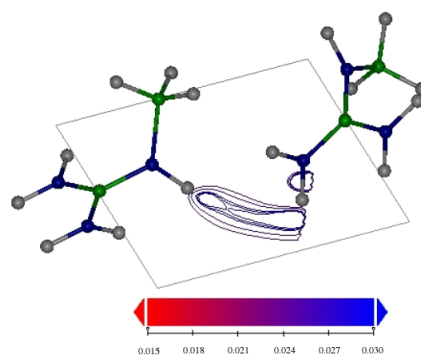


(b)

Figura 3.8: Comportamiento local del estado intersticial en (a) vacío y (b) con solvente (agua). Las gráficas de contornos están en el mismo plano que en la figura 3.7. Los valores de los contornos son 0.020, 0.022, 0.024, 0.026 y 0.028 u.a.



(a)

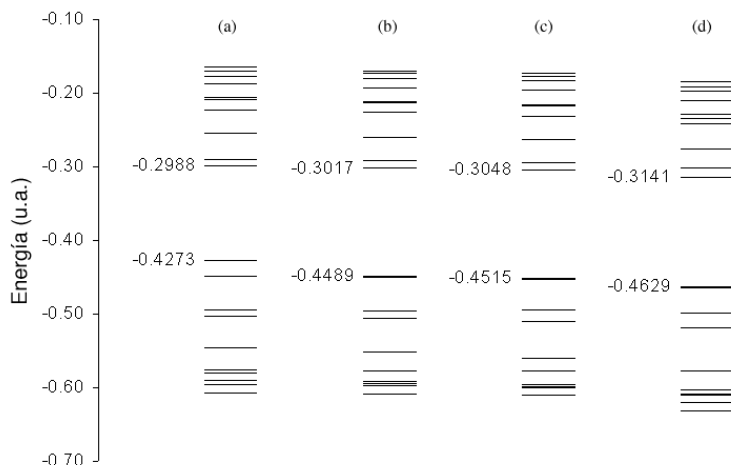


(b)

Figura 3.9: Isosuperficie de densidad del tercer estado desocupado (LUMO+2) del modelo de dos guanidinos (a) sin corrección de la autointeracción y (b) con corrección usando el método SIC-OEP. Los cálculos se hicieron a nivel LDA/cc-pVTZ.

menos tiempo de cálculo del que sería necesario si se corrigen todos los orbitales. Esto se debe a que en cada ciclo autoconsistente del método SIC-OEP, es necesario resolver las integrales de las ecuaciones (1.26) y (1.27) de la página 17. En este trabajo se corrigió la autointeracción en el HOMO, en 5 y en 10 de los orbitales más altos ocupados. En la figura 3.10 se puede ver que el orbital HOMO en el modelo de dos guanidinos se estabiliza por 13.55 kcal/mol (0.0216 u.a.) cuando se corrige la autointeracción de dicho orbital. Si se corrigen los cinco orbitales más altos ocupados, el HOMO se estabiliza en 15.19 kcal/mol, respecto del mismo estado sin corrección. Si el espacio activo es de los 10 orbitales más altos ocupados, el HOMO se estabiliza en 22.34 kcal/mol, respecto del HOMO sin corrección. Estos resultados muestran que la corrección del HOMO impacta en mayor medida en la distribución de los estados electrónicos que si se usa un espacio activo mayor. En estudios hechos sobre átomos, se ha reportado que cuando se corrige la autointeracción usando únicamente el orbital HOMO, se obtiene una buena descripción de la primera energía de excitación experimental.<sup>46</sup> Esto es consecuencia de que los orbitales HOMO y LUMO están mejor descritos que con cualquier aproximación sin corrección SIC. Cabe señalar que en los estudios de reactividad es muy importante tener una buena descripción de los orbitales frontera, porque muchas de las aproximaciones se basan en ellos.

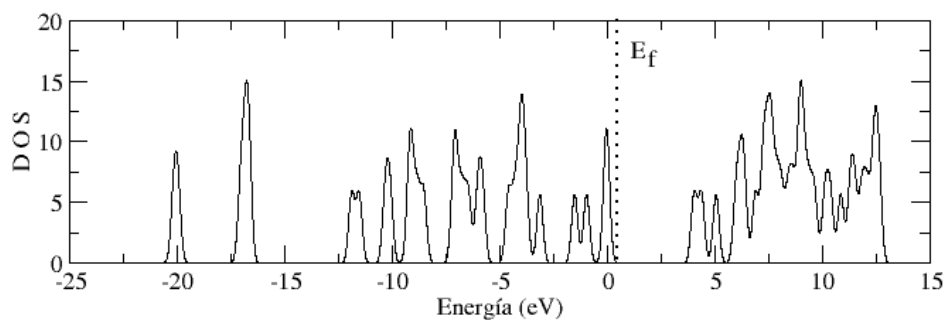
Finalmente, el cálculo de la estructura electrónica de los dos guanidinos con el método SIC-PZ/ondas planas/40 Ry, mostró que los estados intersticiales se conservan. Sin embargo, es conveniente recordar que el método SIC-PZ no corrige la autointeracción en los estados virtuales. Este hecho es evidente en la DOS del sistema de dos guanidinos (fig. 3.11) obtenida con y sin corrección. Se puede ver que la banda LUMO no presenta cambios en la distribución de sus estados; el único cambio apreciable es el incremento en la energía del *gap* ( $gap = \epsilon_{LUMO} - \epsilon_{HOMO}$ ). Las correcciones SIC-PZ hacen que el *gap* del sistema aumente de 3.1 eV a 4.2 eV. Este aumento se debe a que los estados ocupados sufren una estabilización por la corrección SIC, mientras los estados virtuales permanecen inalterados.



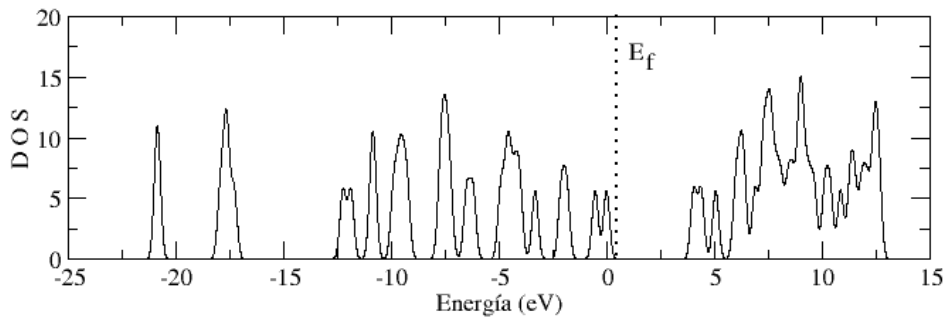
**Figura 3.10:** Comportamiento de los 10 estados más altos ocupados y más bajos desocupados del modelo de dos guanidinos (a) sin corrección de la autointeracción, (b) con corrección del HOMO, (c) con corrección de los 5 orbitales más altos ocupados y (d) con corrección de los 10 orbitales más altos ocupados. Los cálculos se hicieron a nivel LDA/cc-pVTZ con el modelo SIC-OEP. Se muestran explícitamente los eigenvalores del HOMO y LUMO en u.a.

### 3.4. Discusión

Los resultados de este trabajo muestran que una característica importante de la banda LUMO es que contiene estados cercanos al nivel de Fermi, localizados alrededor de la región intersticial del polipéptido. Esta región está rodeada por grupos cargados positivamente. Se puede establecer que las cargas favorecen la estabilización de los estados desocupados cercanos a los grupos cargados, independientemente del nivel de teoría que se use. Al parecer, la distribución de la carga positiva en las cadenas laterales de Arg21 y Arg27, genera un potencial que estabiliza a los estados desocupados dentro de la región intersticial. En este



(a)



(b)

Figura 3.11: Densidad de estados (DOS) del modelo de dos guanidinos. (a) representa el cálculo a nivel LDA/ondas planas/40 Ry sin correcciones de la autointeracción y (b) es el cálculo con el mismo nivel de teoría pero con correcciones SIC-PZ. Los valores de energía son relativos al nivel de Fermi.

punto es importante recordar que la toxina BgK se enlaza al vestíbulo externo del canal de potasio que contiene varios grupos cargados negativamente.<sup>156</sup> Debido a que el estado intersticial es uno de los primeros orbitales desocupados de Kohn-Sham y es espacialmente accesible porque está localizado en la parte externa de la toxina, este estado puede participar en interacciones con los sitios activos del canal. En este contexto, es importante notar que la naturaleza intersticial del estado no se ve modificada por la posibilidad de ser ocupado, tal como lo muestra la figura 3.7. Aún cuando no se ha demostrado, es posible que ocurra una transferencia de carga en el proceso de interacción toxina–canal; si es así, el estado intersticial puede estar involucrado en este proceso. Por esta razón es relevante la existencia de los estados intersticiales. Como se mencionó en la introducción de este capítulo, la Ser23, la Lys25 y la Tyr26 son los sitios activos de la toxina BgK. La región intersticial está ubicada junto a estos residuos y en la misma cara de la toxina.

En la literatura se ha documentado el efecto de desplazamiento en la energía de los orbitales debido al solvente.<sup>153</sup> En este trabajo se observa un desplazamiento similar, pero además, como se ve en la figura 3.6, el comportamiento local del estado intersticial permanece cualitativamente igual en presencia del solvente.

Una consecuencia directa en la química de la BgK, debido a la presencia de los estados intersticiales, es el incremento del carácter electrofílico de la región marcada por el círculo en la figura 3.4 (página 62). Esto se debe al hecho de que, además de los estados desocupados localizados en los sitios atómicos, hay otro estado en una región intersticial disponible para procesos de transferencia de carga, logrando un efecto acumulativo de carga positiva en la misma región.

Los resultados presentados en este trabajo muestran lo importante que es hacer el análisis de reactividad química a una escala que no necesariamente coincide con el tamaño de los grupos funcionales. Además, para estudiar la estructura electrónica de proteínas en busca

de estados intersticiales, es recomendable usar un conjunto de base de ondas planas o incluir orbitales flotantes en los conjuntos estándar de bases localizadas. Es importante notar que el conjunto de base de ondas planas, con un valor pequeño de energía de truncamiento, describe cualitativamente bien la estructura electrónica de los estados intersticiales en proteínas, lo que implica una reducción importante en el esfuerzo computacional necesario para estudiar estas propiedades en sistemas complejos.

El análisis de los efectos dinámicos sobre los estados intersticiales no es parte de los objetivos de este trabajo, sin embargo, para explorar preliminarmente en esta dirección se calculó la densidad orbital LUMO, a nivel B3LYP/6-31G\*\*, de las 6 estructuras de la figura 3.5. El análisis de esta densidad mostró que existe el estado intersticial en todas estas estructuras. El hecho de que 6 de las 15 estructuras experimentales presenten estados intersticiales, es un indicio de que las fluctuaciones térmicas pueden influir en la formación de estos estados. Saber si los estados intersticiales sólo existen en la BgK o si son característicos de las proteínas con empaquetamiento globular compacto es un tema que requiere más trabajo. Hasta ahora, los estados intersticiales se han identificado en la BgK y en la caribdotoxina (ChTX),<sup>157</sup> una toxina aislada del veneno del alacrán. En esta última toxina, el estado intersticial se localizó en una región interna entre la Lys27 y la Arg34. La BgK y la ChTX pertenecen a una familia de toxinas pequeñas y de estructura compacta con grupos cargados y varios puentes disulfuro que generan importantes restricciones estructurales. Este puede ser el tipo de sistemas donde se podrían encontrar estados intersticiales.

En este punto es importante mencionar que las interacciones electrostáticas juegan un papel fundamental para determinar la estructura y función de las proteínas.<sup>144</sup> Los estudios sobre las interacciones electrostáticas en proteínas se basan principalmente en el modelo electrostático clásico,<sup>158</sup> que ha alcanzado un alto nivel de precisión.<sup>159–162</sup> Por ejemplo, se han estudiado las interacciones electrostáticas entre dos argininas, que son residuos cargados positivamente.<sup>143,145,163–166</sup> Estos pares iónicos se han encontrado en muchas proteínas (en

particular se localizan en regiones expuestas al solvente) y se ha propuesto que tales pares deben tener un efecto importante en la estructura y estabilidad de estas moléculas, sin embargo no existe una explicación convincente del fenómeno.<sup>167</sup> Es conveniente resaltar que los estados intersticiales no se pueden identificar con aproximaciones clásicas; tales estados sólo se pueden obtener con un tratamiento mecánico cuántico.

La actividad biológica de la BgK y de la familia de toxinas bloqueadoras de canales de  $K^+$ , está relacionada con la naturaleza electrofílica de la macromolécula porque esta interacciona con el vestíbulo externo del canal de potasio, que es un *mar* de electrones.<sup>150</sup> Saber si el carácter electrofílico extra de una toxina es relevante o no en su actividad biológica, es un tema que se analiza en el capítulo 4.

Por último, el análisis de la densidad orbital de la banda LUMO revela una característica interesante relacionada con la reactividad química de proteínas: el fuerte carácter electrofílico de los puentes disulfuro. Esto explica la gran labilidad de los puentes disulfuro frente a procesos de reducción.<sup>168</sup>

Con los resultados en este capítulo, se muestra la existencia de estados electrónicos intersticiales en proteínas de estructura compacta y con grupos cargados positivamente en una misma región. Estos estados deben tener un efecto importante en la electrofilia de la toxina. Los resultados sugieren que para obtener una descripción completa de la reactividad química de polipéptidos, es muy recomendable analizar las regiones intersticiales.





## Capítulo 4

# Reactividad de la caribdotoxina

En este capítulo se presenta un estudio de la reactividad química de la caribdotoxina (ChTX) y seis de sus mutantes. En la primera sección se describe la importancia biológica de la ChTX y sus características estructurales. Los detalles de los cálculos realizados para obtener la estructura electrónica de estos sistemas se presentan en la segunda parte. En la tercera sección se muestran los resultados de la reactividad global y local de las toxinas estudiadas. Finalmente, en la última sección se analiza la relación entre los parámetros de reactividad calculados y los resultados experimentales sobre la cinética de interacción toxina–canal.<sup>a</sup>

### 4.1. Planteamiento del problema

Muchos fenómenos biológicos están gobernados por procesos de reconocimiento proteína–proteína; sin embargo, no se han explicado satisfactoriamente las causas de estos procesos a

---

<sup>a</sup>Este capítulo se basa en el artículo *Prediction of Chemical Reactivity of Charybdotoxin, a K<sup>+</sup> Channel Blocker* por Felipe Aparicio, Nelly González, Joel Ireta, Arturo Rojo, Laura Escobar, Andrés Cedillo y Marcelo Galván *en preparación*

nivel molecular. En particular, se sabe que una proteína se puede unir a diferentes receptores y a su vez un receptor puede interactuar con proteínas de similar o diferente estructura, pero no se conoce el mecanismo que rige estas interacciones.<sup>169</sup> Entre los sistemas que más se han usado para investigar los fenómenos moleculares que ocurren en las interacciones proteína-proteína, están los canales iónicos y las toxinas bloqueadoras de estos canales. Específicamente, se han utilizado los canales de potasio controlados por voltaje (Kv) y las toxinas contenidas en el veneno de alacranes, víboras, anemonas marinas y caracoles.<sup>139</sup> Los estudios hechos sobre estos sistemas han permitido conocer que los factores que determinan la función de una proteína y su afinidad por otra, generalmente se asocian con un número pequeño de aminoácidos activos.

En la interacción entre las toxinas y los canales de potasio del tipo Kv, hay controversia respecto a los aminoácidos involucrados. Por una parte, se ha propuesto que un residuo de lisina (Lys)<sup>a</sup>, localizado en la región  $\beta$  de las toxinas, interactúa directamente con un residuo tirosina (Tyr) del vestíbulo del canal de potasio Kv.<sup>170</sup> Además, se ha observado que varias toxinas bloqueadoras, con estructura y origen diferentes, poseen una díada formada por la lisina que interactúa con el vestíbulo y por un residuo aromático.<sup>141,171</sup> Algunos autores sugieren que la conservación de esta díada es el resultado de la evolución de las toxinas y es el factor más importante en el proceso de interacción de estas macromoléculas con los canales de K<sup>+</sup>. Sin embargo, hay otras toxinas que no poseen esta díada pero bloquean los canales Kv e incluso hay toxinas que tienen la díada pero no inhiben el funcionamiento de los canales.<sup>172,173</sup> Esto sugiere la idea de que además de la díada, existen otros residuos que participan en la interacción toxina-canal.

Existen varios trabajos experimentales dedicados a investigar las interacciones entre los canales de potasio y las toxinas bloqueadoras,<sup>174</sup> los cuales intentan describir estas

---

<sup>a</sup>A lo largo de este capítulo se usarán los símbolos en el idioma inglés para representar a los aminoácidos. Ver Apéndice B

interacciones a partir de las propiedades de los canales y de las toxinas por separado. Para este propósito, usan técnicas como la mutagénesis<sup>175</sup> tanto en los canales como en las toxinas. En estos experimentos, uno de los sistemas que más se ha usado para estudiar las propiedades de los canales de potasio es la caribdotoxina (ChTX).<sup>176,177</sup>

#### 4.1.1. La caribdotoxina

La ChTX es una toxina que se encuentra en el veneno de alacrán y es un potente inhibidor de varios tipos de canales de  $K^+$  de la familia Kv, activados por iones  $Ca^{2+}$ . Esta toxina es un polipéptido globular pequeño de aproximadamente  $20\text{\AA} \times 20\text{\AA} \times 25\text{\AA}$ , formado por 37 aminoácidos;<sup>157</sup> tiene un punto isoeléctrico básico y una carga neta de +6 a pH neutro, debido a la existencia de 2 grupos cargados negativamente y 8 grupos cargados positivamente. En la figura 4.1 se muestra la estructura de la ChTX usada en este trabajo, la cual es un promedio de las 12 estructuras obtenidas experimentalmente por Bontems y col.<sup>178</sup> En esta figura se puede ver que la estructura secundaria de la ChTX está formada por una  $\alpha$ -hélice (residuos 11 al 19) y una hoja  $\beta$  triplemente trenzada (residuos 1 al 5, 25 al 29 y 32 al 36), además de que contiene 3 puentes disulfuro que unen los residuos 7-28, 13-33 y 17-35.<sup>178</sup> Al igual que la BgK, la ChTX es una proteína compacta y rígida. La estabilidad de su estructura se debe a los tres puentes disulfuro y a un *cúmulo* hidrofóbico formado por las cadenas laterales Thr3, Val5, Val16 y Leu20. Experimentalmente se ha demostrado que los residuos Lys27 y Tyr36 forman la díada en esta toxina.

La caribdotoxina ha sido una herramienta muy útil en la elucidación de las propiedades y función de los canales de  $K^+$ ; en particular, los experimentos de mutagénesis en la ChTX han permitido identificar la estructura del vestíbulo externo de los canales de potasio<sup>179</sup> y estimar las dimensiones del poro externo del mismo.<sup>180,181</sup>

Existen varios estudios experimentales sobre el mecanismo de bloqueo de los canales

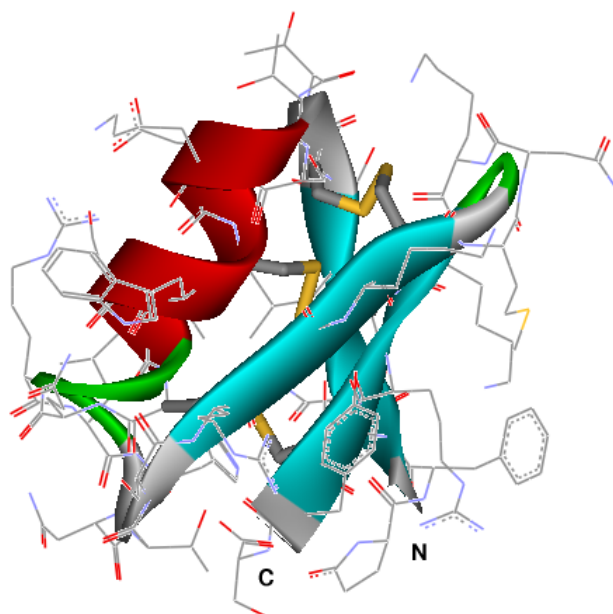
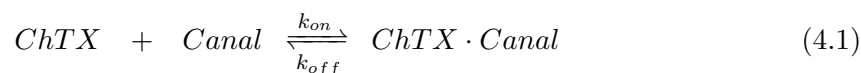


Figura 4.1: Estructura de la toxina ChTX. Esta es el promedio de las 12 estructuras reportadas por Bontems y col.<sup>178</sup> en el *Protein Data Bank* ([www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)). La secuencia de aminoácidos es: pQFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCR-CYS (ver Apéndice B para la nomenclatura). El primer residuo pQ es piroglutamina. La  $\alpha$ -hélice de la toxina se muestra en color rojo, las componentes de la hoja  $\beta$  en color azul y los puentes disulfuro se muestran en color amarillo. Los grupos terminales amino y carboxilo se representan con las letras N y C respectivamente. Para resaltar las características de la estructura, no se muestran explícitamente los átomos de hidrógeno.

de  $K^+$  por la ChTX. En particular, Miller y colaboradores<sup>182</sup> hicieron experimentos de cinética de la reacción



usando mutantes de ChTX. Estos autores encontraron que las mutaciones de residuos individuales alteran la constante de disociación ( $k_{off}$ ) en mayor medida que la constante de asociación ( $k_{on}$ ). Con esta información clasificaron los residuos de la toxina ChTX en *cruciales*, *accidentales* e *indiferentes*. Un residuo crucial es aquel que al ser mutado por

otro aminoácido químicamente similar, cambia la constante de velocidad  $k_{off}$  en 8 o más órdenes de magnitud, un residuo accidental es aquel que cambia la constante  $k_{off}$  entre 3 y 8 órdenes de magnitud y un residuo indiferente al ser sustituido por un aminoácido químicamente diferente, altera la constante de velocidad  $k_{off}$  en 3 veces o menos órdenes de magnitud. Como cruciales están los residuos Ser10, Trp14, Arg25, Lys27, Met29, Asn30, Arg34 y Tyr36. A este grupo pertenece la díada Lys27–Tyr36. Los residuos accidentales son pGlu1, Phe2, Thr3 y Ser37 y los aminoácidos indiferentes son Asn4, Val5, Ser6, Thr8, Lys11, Glu12, Ser16, Gln18, Arg19, Leu20, His21, Asn22, Ser24, Lys31 y Lys32. Aunque esta clasificación es arbitraria, los datos experimentales de cinética muestran que la reacción 4.1 es de primer orden y la interacción entre la toxina y el canal es estrictamente *bimolecular*.<sup>156,183</sup> Estos experimentos son de un alto nivel de precisión porque se hacen manipulando un solo canal.<sup>179,182,183</sup> Experimentalmente se ha demostrado que la Lys27 es determinante en la actividad de la ChTX. La mutación de este residuo conduce a la pérdida completa de la afinidad de la toxina por el canal de potasio.<sup>182</sup>

El reconocimiento molecular entre la ChTX y el canal de  $K^+$  es un proceso complejo que involucra interacciones estéricas, formación de puentes de hidrógeno, afinidad hidrofóbica, interacciones electrostáticas y procesos de transferencia de carga.<sup>184</sup> Experimentalmente se sabe que el vestíbulo del canal está cargado negativamente. Este hecho, aunado a la evidencia de que la ChTX es una especie cargada positivamente, sugiere la idea de que puede ocurrir un proceso de transferencia de carga desde el canal hacia la toxina. Para estudiar efectos de transferencia de carga entre la ChTX y el canal, desde el punto de vista de la química teórica, es necesario conocer la geometría de ambas macromoléculas y calcular la estructura electrónica de las mismas. Hasta la fecha, el único estudio teórico dedicado a elucidar las propiedades reactivas de la ChTX es el de Ireta y col.<sup>150</sup> En este trabajo, además de mostrar la utilidad del Método de la Energía Total por Pseudopotenciales para calcular la estructura electrónica de macromoléculas, los autores concluyen que

para tener una descripción apropiada de la interacción entre la ChTX y los canales de  $K^+$ , es necesario analizar el potencial electrostático y la blandura local como dos cantidades complementarias.

El trabajo que se describe en este capítulo, lejos de dar una descripción completa de las interacciones en el complejo ChTX–canal, es un intento para determinar si los efectos de corto alcance (transferencia de carga) juegan un papel importante en estas interacciones. Aun cuando ya se conoce la primera estructura cristalina de un canal de potasio,<sup>184</sup> en este trabajo sólo se utiliza a la ChTX y algunas de sus mutantes como moléculas de prueba para estudiar estos efectos.

El objetivo principal es hacer un análisis de la reactividad química de estos sistemas, usando índices de reactividad global y local. En particular, se busca una relación entre la constante de velocidad experimental  $k_{off}$  y el índice de electrofilia global, el cual ha mostrado una buena correlación con velocidades de reacción en procesos biológicos.<sup>68,185</sup> Además, moléculas como la ChTX y sus mutantes pueden tener muchos sitios capaces de recibir electrones, pero no todos ellos contribuyen de igual manera a estabilizar la carga adicional que proviene del canal. Por esta razón, otro objetivo de este trabajo es identificar los sitios en las toxinas que se pueden estabilizar en mayor medida durante un proceso de transferencia de carga; para ello se evalúa el índice de electrofilia local de estos sistemas.

## 4.2. Detalles computacionales

La estructura electrónica de cada uno de los sistemas estudiados en este capítulo se obtuvo usando el METP.<sup>51</sup> Las ecuaciones de Kohn-Sham en espacio recíproco (ec. 1.32 de la página 21) se resolvieron con el método desarrollado por Arias y col.<sup>147</sup> y usando la aproximación LDA-VWN<sup>3</sup> para el funcional de intercambio y correlación. La implementación práctica de este método se encuentra en el código desarrollado por Joannopoulos y colabo-

radores.<sup>51</sup> En el METP sólo se considera a los electrones de valencia, por lo que se diseñaron pseudopotenciales con conservación de la norma usando el método de Rappe y colaboradores (método RRKJ),<sup>60</sup> con una energía de truncamiento de 40 Ry. Para los átomos de H, C, N y O los pseudopotenciales son del tipo *s local* y *p no local*, mientras que para el átomo de S son del tipo *s local*, *p* y *d no local* de acuerdo con la representación de Kleinman y Bylander.<sup>55</sup> Una de las limitaciones al utilizar el METP en el estudio de biomoléculas es que estos sistemas contienen átomos del primer periodo de la tabla periódica. Para generar los pseudopotenciales de estos átomos con la metodología de RRKJ, se necesitan valores grandes en la energía de truncamiento ( $\geq 40Ry$ ). Esto requiere que en la solución de las ecuaciones de Kohn-Sham en espacio recíproco se debe usar el mismo valor de energía de truncamiento.<sup>60</sup> Cuando se estudian sistemas con cientos de átomos como la ChTX y sus mutantes, el uso de valores grandes de  $q_c$  implica trabajar con cientos de miles de funciones de base, lo cual hace que el método sea imposible de aplicar desde el punto de vista computacional. Para salvar esta dificultad, hay dos alternativas posibles: la primera es *recortar* a la biomolécula hasta obtener una fracción de ella que conserve el comportamiento del sistema real; la segunda es hacer el cálculo con una energía de truncamiento menor al valor usado para generar los pseudopotenciales. En este trabajo se usó un esquema combinado, esto es, la estructura de la ChTX y de las mutante se recortó como se describe en la sección siguiente, y la expansión en ondas planas se truncó a una energía de 6 Ry. Aun cuando este valor de  $q_c$  representa un bajo nivel de cálculo, se ha mostrado que es suficiente para describir apropiadamente los aspectos importantes de la estructura electrónica de sistemas moleculares.<sup>149,150</sup>

#### 4.2.1. Modelo de la caribdotoxina y sus mutantes

La estructura inicial de la ChTX se obtuvo promediando las 12 estructuras reportadas experimentalmente<sup>178</sup>(fig. 4.1). A partir de la estructura promedio se generaron seis nuevas



estructuras (mutantes) mediante la sustitución del residuo tirosina (Y), ubicado en la posición 36 de la secuencia original, por los siguientes aminoácidos: fenilalanina (F), asparagina (N), leucina (L), alanina (A), histidina (H) y prolina (P). La estructura de cada grupo sustituyente, incluyendo el residuo Y36 en la ChTX original, se optimizó mediante técnicas de dinámica molecular manteniendo fija la geometría del resto de los residuos en todas las toxinas. La elección de estas mutantes se basó en los resultados experimentales que muestran que la constante  $k_{off}$  de la reacción 4.1 con estas mutaciones se modifica entre 1 y 1900 veces, respecto del valor de la misma constante obtenida con la ChTX.<sup>182</sup>

Para hacer factible el estudio de las propiedades electrónicas y reactividad de estas toxinas, se diseñó un modelo reducido de cada estructura eliminando los residuos del 1 al 5 y del 19 al 21 en la secuencia original de la ChTX y de cada mutante. Los residuos 6, 18 y 22 que resultan como aminoácidos terminales, se pasivaron con átomos de hidrógeno. La eliminación de estos residuos se hizo considerando que están clasificados como indiferentes para la actividad de la ChTX, además de que al eliminarlos no se altera la estructura secundaria de las toxinas. La carga neta de cada sistema es de +4. En la tabla 4.1 se muestra comparativamente la secuencia de la ChTX y de las mutantes, así como la nomenclatura usada en este trabajo.

Es importante mencionar que para tener un punto de referencia, se calculó la estructura electrónica de la ChTX con geometría promedio, usando 6 Ry como valor de la energía de truncamiento. La supercelda de este sistema es de  $24.5\text{\AA} \times 24.8\text{\AA} \times 26.9\text{\AA}$  y cumple con la condición de que la distancia mínima entre átomos de celdas vecinas es de  $5\text{\AA}$ .<sup>59</sup> Todas las superceldas utilizadas en este trabajo cumplen con este criterio. Para el modelo simplificado de ChTX (Y36Y) se usó una supercelda de  $19.1\text{\AA} \times 24.6\text{\AA} \times 28.6\text{\AA}$ . Las superceldas para el resto de las mutantes son de tamaño similar. Por las dimensiones de las superceldas utilizadas, es suficiente con usar un solo punto  $k$  para resolver las ecuaciones de Kohn-Sham en espacio recíproco.<sup>59</sup> En este trabajo, todos los cálculos se realizaron evaluando la

función de onda en el punto  $\Gamma(0, 0, 0)$  de la primera zona de Brillouin.

**Tabla 4.1: Secuencia de la ChTX y sus mutantes. La secuencia de cada mutante está alineada con la secuencia de la ChTX, para mostrar los residuos eliminados. La letra en negrita representa el sitio de mutación.**

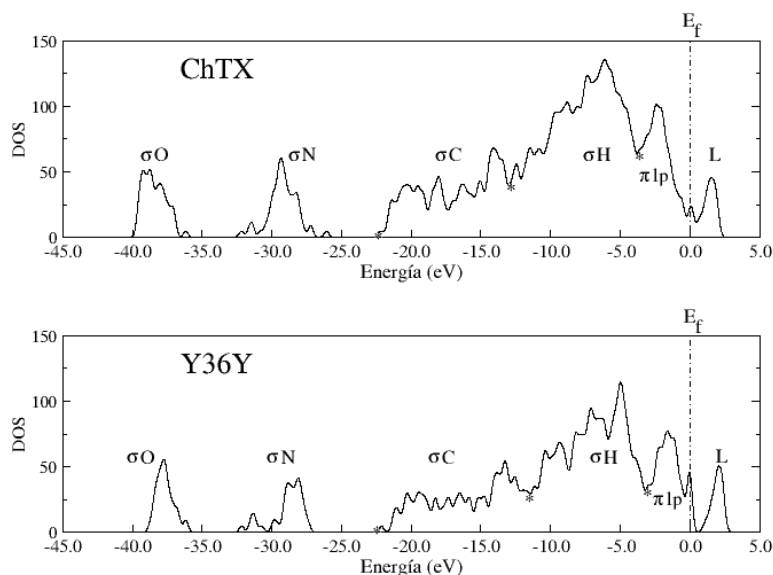
Toxina	Secuencia	
ChTX	pQFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	
Y36Y	SCTTSKECWSVCQ	NTSRGKCMNKKCRCYS
Y36F	SCTTSKECWSVCQ	NTSRGKCMNKKCRC <b>F</b> S
Y36N	SCTTSKECWSVCQ	NTSRGKCMNKKCRC <b>N</b> S
Y36L	SCTTSKECWSVCQ	NTSRGKCMNKKCRC <b>L</b> S
Y36A	SCTTSKECWSVCQ	NTSRGKCMNKKCRC <b>A</b> S
Y36H	SCTTSKECWSVCQ	NTSRGKCMNKKCRC <b>H</b> S
Y36P	SCTTSKECWSVCQ	NTSRGKCMNKKCRC <b>P</b> S

### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. Estructura electrónica de las toxinas

En la figura 4.2 se muestra la densidad de estados (DOS, por sus siglas en inglés), calculada en el punto  $\Gamma$  de la primera zona de Brillouin, de la ChTX original y del modelo simplificado Y36Y; se puede ver que ambas son muy similares, lo cual implica que los residuos eliminados en el modelo Y36Y no alteran la distribución de los estados electrónicos y por tanto se puede esperar que este modelo refleje adecuadamente la estructura electrónica de la ChTX.

Una característica importante en la DOS de la ChTX y del modelo Y36Y es que los estados ocupados se agrupan en cinco regiones bien definidas, de las cuales tres forman una banda ancha y las otras dos están separadas entre si por al menos 2 eV. En la figura 4.2, las regiones de la banda más ancha están delimitadas por el símbolo de asterisco. En ambos sistemas, el análisis de la densidad orbital de la primera región a la izquierda del nivel de Fermi (banda de valencia o banda  $\pi$ lp) muestra que esta banda está asociada con las nubes  $\pi$  de los aminoácidos aromáticos y con los pares libres de los átomos de nitrógeno, oxígeno y



**Figura 4.2:** Densidad de estados (DOS) de la ChTX y del modelo simplificado Y36Y.  $E_f$  representa la energía del nivel de Fermi. La escala de energía es relativa al nivel de Fermi. La banda LUMO está etiquetada con la letra L e integra a 30 estados virtuales.

azufre. La segunda y tercera región, etiquetadas como  $\sigma H$  y  $\sigma C$  en la figura, están asociadas con los enlaces sigma que involucran átomos de hidrógeno y carbono, respectivamente. Las bandas de menor energía etiquetadas como  $\sigma N$  y  $\sigma O$ , contienen los estados asociados con los enlaces sigma que involucran átomos de nitrógeno y oxígeno, respectivamente. En este punto es importante comentar que Ireta y colaboradores, usando un modelo reducido de la ChTX original y 6 Ry de energía de truncamiento, obtuvieron los mismos resultados sobre la naturaleza electrónica de cada banda.<sup>150</sup>

Por otra parte, la DOS de cada una de las mutantes tiene un perfil similar que la DOS para el modelo Y36Y, como se puede ver en la figura 4.3. Los resultados muestran que no hay cambios apreciables en la distribución de los estados electrónicos al cambiar el residuo

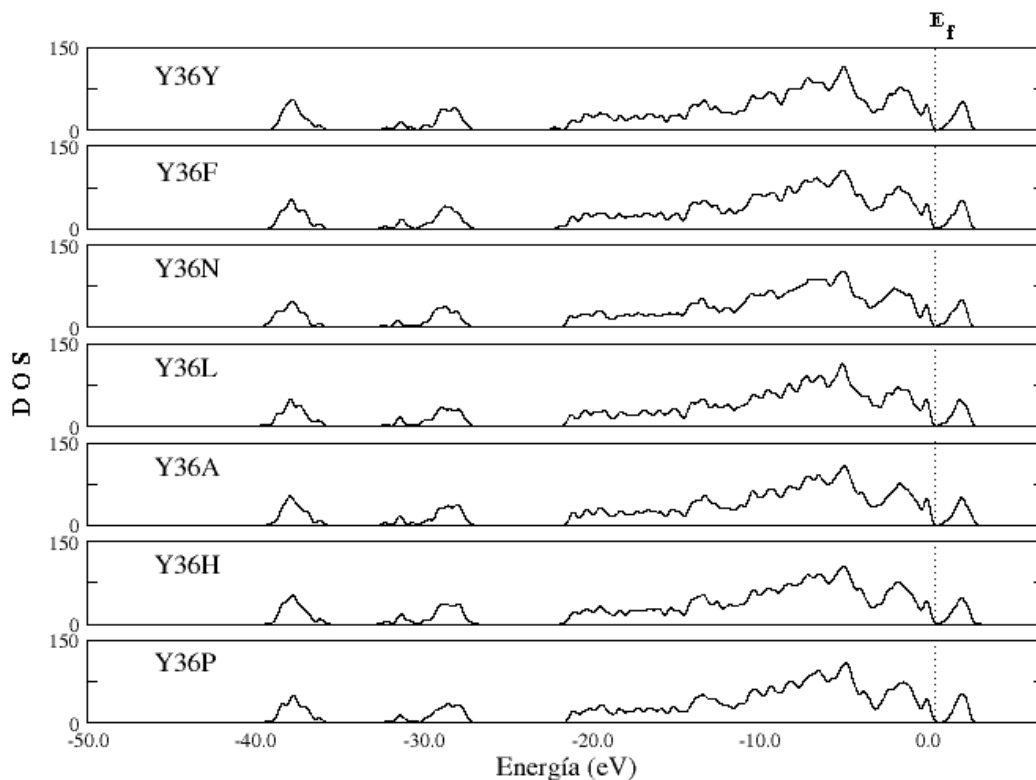


Figura 4.3: DOS de la toxina Y36Y y de las seis mutantes.  $E_f$  representa la energía del nivel de Fermi. La energía de las bandas se representa relativa al nivel de Fermi.

de Tyr36 por Phe, Asn, Leu, Ala, His y Pro. El análisis de la densidad orbital de cada banda en las mutantes, muestra la misma naturaleza que la observada para la ChTX.

#### 4.3.2. Reactividad global de la ChTX y sus mutantes

Las propiedades reactivas de las toxinas estudiadas en esta tesis se pueden describir en términos de parámetros globales como el potencial químico, la dureza, la blandura y la electrofilia global. Aun cuando estas cantidades se definieron en la sección 1.3.1 (página 30 y siguientes), en este trabajo el potencial químico se calculó como  $\mu = \varepsilon_{E_f}$ , donde  $\varepsilon_{E_f}$  es la energía de Fermi, la dureza global se determinó por  $\eta = \varepsilon_L - \varepsilon_H$ , donde  $\varepsilon_L$  y  $\varepsilon_H$  son los

eigenvalores del LUMO y HOMO respectivamente, la blandura global se calculó usando la definición  $S = 1/\eta$  y la electrofilia global  $\omega$  se obtuvo con la ecuación 1.47 de la página 31. Los resultados de estos parámetros globales se muestran en la tabla 4.2.

**Tabla 4.2: Índices de reactividad global del modelo Y36Y y de las seis mutantes.** <sup>a</sup>

Toxina	$\mu$	$\eta(\times 10^{-3})$	$S(\times 10^3)$	$\omega$
Y36Y	-2.504	0.38	2.605	8166.03
Y36F	-2.779	0.67	1.493	5765.35
Y36N	-2.564	1.86	0.538	1767.99
Y36L	-2.654	2.75	0.363	1279.76
Y36A	-2.856	3.32	0.301	1229.71
Y36H	-2.559	7.15	0.140	457.98
Y36P	-2.532	15.88	0.063	201.88

<sup>a</sup> Todas las cantidades están expresadas en eV

Como se mencionó en el capítulo 1, la aproximación LDA no describe correctamente las propiedades energéticas de un sistema, por lo que los números de la tabla 4.2 se deben interpretar con precaución. Además, el nivel de cálculo utilizado (6 Ry de energía de truncamiento) es otro factor que se debe considerar en la interpretación de estos números. En estos cálculos, las tendencias son más importantes que el valor *per se*.

Para evaluar el efecto del nivel de cálculo usado sobre las propiedades globales, se determinó la electrofilia global de un conjunto de moléculas pequeñas usando expansiones en ondas planas con energías de truncamiento de 6 Ry, 20 Ry y 40 Ry, y se compararon los valores obtenidos con cálculos a nivel B3LYP/6-311G\*\* reportados en la literatura.<sup>186,187</sup> Los resultados se muestran en la tabla 4.3.

Tabla 4.3: Electrofilia global de moléculas pequeñas.<sup>a</sup>

Molécula	Ondas planas			B3LYP/6-311G**
	6Ry	20Ry	40Ry	
CH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	12.40	17.81	18.33	9.98 <sup>b</sup>
CH <sub>2</sub> NHCH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	3.66	5.92	6.62	8.97 <sup>c</sup>
SO <sub>3</sub>	3.19	3.47	4.37	1.57 <sup>b</sup>
CH <sub>2</sub> CHCHO	1.49	3.21	3.73	1.84 <sup>c</sup>
HCOH	1.10	2.32	2.88	0.81 <sup>b</sup>
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	1.06	1.30	1.37	0.73 <sup>c</sup>
CH <sub>2</sub> CHN(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1.00	0.84	0.82	0.27 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Todas las cantidades están expresadas en eV.

<sup>b</sup> Valores obtenidos de la referencia<sup>186</sup>

<sup>c</sup> Valores obtenidos de la referencia<sup>187</sup>

Las moléculas de la tabla 4.3 se seleccionaron porque contienen átomos de C, H, O, N o S en su estructura, los cuales también son constituyentes de las toxinas estudiadas en este trabajo. Para estas moléculas pequeñas se construyeron superceldas con 10Å de distancia entre átomos de celdas vecinas, además de que el tamaño de la supercelda para cada molécula se mantuvo constante en los tres niveles de teoría. Excepto para la molécula de SO<sub>3</sub>, los resultados muestran que la tendencia en la electrofilia de las moléculas estudiadas se describe apropiadamente, aún con 6 Ry de energía de truncamiento, respecto a la naturaleza electrofílica de estos sistemas, reportada en la literatura. Con estos resultados, se pueden interpretar con confianza los valores de la electrofilia global de las toxinas mutantes.

Considerando que la electrofilia global es una medida de la estabilización energética que logra un sistema al recibir electrones, esta propiedad se puede usar para interpretar la afinidad de las toxinas con el canal de potasio. En este punto es importante mencionar que la constante de disociación  $k_{off}$ , en la reacción 4.1, es una medida de la afinidad entre la toxina y el canal. Un valor pequeño de  $k_{off}$ , implica que el equilibrio en la reacción 4.1 se desplaza hacia la derecha, lo que significa que el complejo toxina–canal es cinéticamente más estable que las especies por separado; por otra parte, un valor grande de  $k_{off}$  implica que el

equilibrio de la misma reacción se desplaza hacia la izquierda, por lo que la toxina y el canal por separado son cinéticamente más estables que el complejo. En la tabla 4.4 se presentan los valores de la electrofilia global, de las constantes de velocidad de la reacción 4.1 ( $k_{on}$  y  $k_{off}$ ) y de la constante de equilibrio de disociación  $K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}}$ . Los resultados en esta tabla muestran una relación inversa entre la constante  $k_{off}$  de cada toxina y su electrofilia global. Esta relación se muestra en la figura 4.4. La misma relación se presenta entre la electrofilia global y la  $K_D$ . Como se puede ver en la tabla 4.4, un hecho experimental interesante es que los cambios en la constante  $k_{on}$  debidos a las mutaciones son muy pequeños.

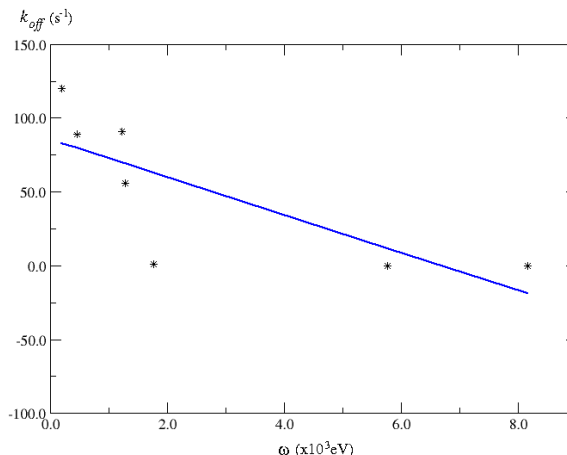
**Tabla 4.4: Electrofilia global y constantes de velocidad de disociación ( $k_{off}$ ), de asociación ( $k_{on}$ ) y de equilibrio ( $K_D$ ) del modelo Y36Y y de las seis mutantes.**

Toxina	$\omega$ (eV)	$k_{off}$ ( $\times 10^{-3} s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$k_{on}$ ( $\times 10^6 s^{-1} M^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$K_D$ (nM) <sup>a</sup>
Y36Y	8166.03	62±3	7.0±1.1	8.8
Y36F	5765.35	72±5	4.7±0.3	15
Y36N	1767.99	920±220	3.5±0.7	260
Y36L	1279.76	56000±2000	7.9±0.9	7000
Y36A	1229.71	91000±3000	9.7±1.5	9400
Y36H	457.98	89000±1000	4.9±0.5	19000
Y36P	201.88	120000±3000	1.3±0.1	94000

<sup>a</sup> Valores obtenidos de la referencia<sup>182</sup>

### 4.3.3. Reactividad local de la ChTX y sus mutantes

En el proceso de reconocimiento molecular entre la ChTX y el canal de  $K^+$ , se pueden identificar dos tipos de interacciones: de largo alcance y de corto alcance. Básicamente, los efectos de largo alcance son interacciones electrostáticas que deben ocurrir porque la toxina es una especie cargada positivamente y el vestíbulo del canal está cargado negativamente. En este punto es importante mencionar que 5 de los 8 grupos cargados positivamente en la ChTX, se encuentran en la misma cara de la toxina, como se ve en la figura 4.5. Tres de estos residuos son críticos (Arg25, Lys27 y Arg34) y dos son indiferentes (Lys11 y Lys31).



**Figura 4.4:** Relación entre la electrofilia global ( $\omega$ ) y la constante de velocidad de disociación del complejo toxina-canal ( $k_{off}$ ).

Por otra parte, las fuerzas de corto alcance están asociadas con la interacción de regiones específicas de las macromoléculas cuando estas entran en contacto. Estos efectos de corto alcance pueden estar relacionados con procesos de transferencia de carga. Para evaluar estos procesos en sitios específicos de las toxinas, se calculó la electrofilia local en el modelo de Y36Y y de las mutantes. Este cálculo se hizo a partir de la ecuación 1.50 de la página 33 y usando la aproximación de la blandura local  $s(\mathbf{r})$  en términos de la densidad local de estados  $g(E, \mathbf{r})$ .<sup>188</sup> De esta forma la electrofilia local se puede evaluar, en un lenguaje de bandas, como

$$\omega(\mathbf{r}) = \frac{\mu^2}{\Delta\mu} \int_{\mu}^{\mu+\Delta\mu} g(E, \mathbf{r}) dE. \quad (4.2)$$

donde  $\mu$  es el potencial químico electrónico (energía de Fermi) y  $\Delta\mu$  está asociado con el ancho de la banda de frontera LUMO. La integral que aparece en el lado derecho de la ecuación (4.2) se calcula a través de diferencias finitas, tomando en cuenta la banda más baja desocupada. Para todos los cálculos de electrofilia local presentados en este trabajo,  $\Delta\mu = 2.1$  eV.



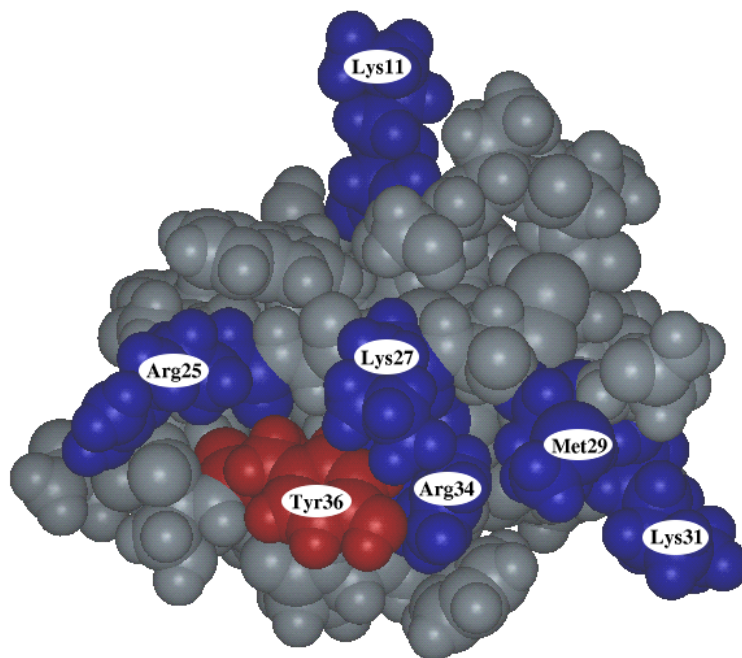


Figura 4.5: Superficie de interacción de la ChTX. En esta figura se muestra la cara de la ChTX que se enlaza al canal de  $K^+$ . En color azul se presentan los residuos con carga positiva en esta cara, además del residuo crítico Met29. El residuo Tyr36 que se sustituyó para generar las mutaciones estudiadas en este trabajo, se muestra en color rojo.

En la figura 4.6 se muestra la electrofilia local del modelo Y36Y y de las seis mutantes, proyectada sobre una superficie de esferas traslapantes centradas en los núcleos atómicos y con radio de 1.5 Å. La orientación de los polipéptidos es la misma de la figura 4.5 y que corresponde a la *cara* activa de la ChTX. En esta figura se puede ver que la electrofilia local en todas las toxinas se distribuye a lo largo de dos regiones bien definidas. La primera es una línea que va del residuo Lys11 hasta el residuo Arg34, incluyendo a los residuos Ser10 y Lys27 (ver fig. 4.5 para mayor claridad). La segunda región está formada por los residuos Tyr36, Arg34, Met29 y Lys31. Cabe mencionar que el residuo Arg25 presenta concentración de la electrofilia local, aunque en menor proporción que las dos regiones mencionadas. En la cara de la toxina que no se muestra, se observaron regiones con valores de  $\omega(\mathbf{r}) = 0$ .

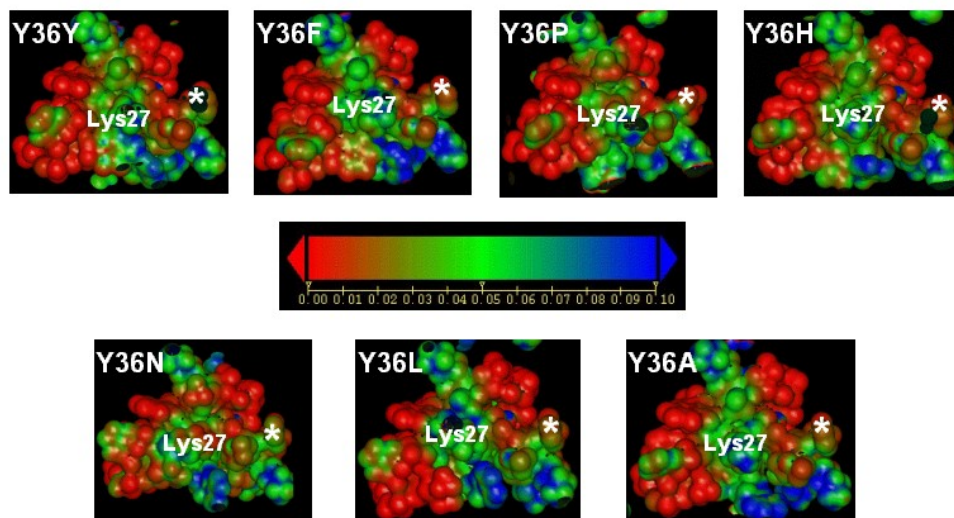


Figura 4.6: Electrofilia local  $\omega(r)$  de la toxina ChTX y sus mutantes, proyectada sobre la superficie de esferas traslapantes centradas en los núcleos atómicos. El radio de las esferas es de 1.5 Å. Para tener puntos de referencia, se etiquetó el residuo Lys27 y se marcó el residuo Met29 con un asterisco (\*). Las regiones en azul corresponden a los valores más grandes de  $\omega(r)$ , mientras que las regiones en rojo son los sitios donde  $\omega(r)$  es prácticamente cero.

#### 4.4. Discusión

En este trabajo, el análisis de la reactividad de la ChTX se hizo calculando las propiedades electrónicas de la toxina en fase gas. Sin embargo, el proceso de interacción de la toxina con el canal de  $K^+$  tiene lugar en un ambiente celular con presencia de agua como solvente. Es evidente que las propiedades reactivas de la ChTX pueden variar en presencia del solvente. Sin embargo, es conveniente considerar que los residuos involucrados en la interacción toxina–canal mantienen el complejo estable a través de interacciones de corto alcance, porque alteran principalmente la velocidad de disociación del sistema ChTX–canal. En este punto es importante mencionar que cuando dos moléculas se encuentran en contacto cercano, es poco probable que existan moléculas de solvente interaccionando directamente con los sitios activos, de modo que la interacción es dominada por las propiedades reactivas in-

trínsecas de las moléculas aisladas. Por esta razón, la descripción de la reactividad química de la ChTX y sus mutantes, obtenida como moléculas aisladas, no es inapropiado.

Por otra parte, el cálculo de la estructura electrónica de sistemas como la ChTX y sus mutantes, es un reto para los métodos ab-initio disponibles actualmente, pero el uso combinado del cómputo en paralelo y de técnicas tipo Car-Parrinello como el METP, son una excelente alternativa para hacer esta tarea. Sin embargo, a pesar de que los recursos metodológicos y de cómputo actuales hacen posible calcular la estructura electrónica de la ChTX y sus mutantes, en este trabajo fue necesario reducir el tamaño de estos sistemas, para hacer posible el estudio de todas las toxinas. Los resultados muestran que la distribución de los estados electrónicos de la ChTX y de las seis mutantes no se altera si se eliminan ocho residuos indiferentes en su estructura. Es claro que por el perfil de las DOS mostradas en las figuras 4.2 y 4.3, los estados electrónicos de los modelos Y36Y, Y36F, Y36N, Y36L, Y36A, Y36H y Y36P tienen la misma naturaleza que los de la ChTX. La diferencia más evidente entre la DOS de la ChTX y del modelo Y36Y es que el área bajo la curva de la primera es mayor que la segunda. Esto se debe a que el número de estados en la ChTX es mayor que en la Y36Y porque este último modelo es una simplificación de la primera. También hay variaciones en los estados cercanos al nivel de Fermi y en la diferencia de energía entre el HOMO y el LUMO de la ChTX y del modelo Y36Y. Aún cuando no se observa separación entre la banda HOMO (banda  $\pi_{lp}$ ) y la banda LUMO (banda L) en las gráficas de DOS de estos sistemas, la diferencia de energía entre estos dos estados de la toxina ChTX es de 0.0023 eV, mientras que en el modelo Y36Y es de 0.0038 eV. Estos valores sólo tienen significado cualitativo, porque se obtuvieron con un nivel de cálculo de 6 Ry.

El análisis de la reactividad global (tabla 4.2) muestra que el potencial químico electrónico es similar en todas las toxinas estudiadas y no presenta una tendencia particular. Esto implica que en términos de  $\mu$ , todas las toxinas tienen igual capacidad para la transferencia de carga. Sin embargo, los índices de dureza y blandura global,  $\eta$  y  $S$  respectivamente,

son diferentes entre cada uno de los sistemas. En la tabla 4.2 se puede ver que el modelo Y36Y, que representa a la toxina ChTX, es el sistema más blando. Este resultado implica que el vestíbulo del canal debe ser una especie blanda de acuerdo con el principio de *ácidos y bases duros y blandos* (HSAB) de Pearson,<sup>11,189</sup> el cual establece que *las especies duras prefieren enlazarse con especies duras y las especies blandas prefieren enlazarse con especies blandas*. Es importante mencionar que las interacciones duro–duro están relacionadas principalmente con efectos electrostáticos de largo alcance y que las interacciones blando–blando controlan efectos de corto alcance como la transferencia de carga.<sup>150</sup>

En el estudio de la reactividad global de la ChTX y sus mutantes, también se evaluó la electrofilia global  $\omega$ . Esta propiedad puede ser de utilidad para entender la estabilidad del complejo toxina–canal. De acuerdo con su definición, la electrofilia global es proporcional a la blandura, donde el factor de proporcionalidad es el cuadrado del potencial químico (ver ecuación 1.47 de la página 31). Si el potencial químico de un conjunto de sistemas es similar, entonces la electrofilia global permite establecer una escala relativa de estabilidad entre esos sistemas, cuando se encuentran en un mismo entorno capaz de ceder electrones. Este es el caso de las toxinas mutantes frente al canal de  $K^+$ . Como se puede ver en la tabla 4.2 la toxina Y36Y tiene el mayor valor de  $\omega$  en comparación con el resto de las mutantes. Esto significa que el sistema se estabilizará en mayor medida que el resto de las mutantes cuando reciba carga de su entorno. Debido al nivel de cálculo usado, podría pensarse que la tendencia en la electrofilia global, mostrada en la tabla 4.2, sea incorrecta. Sin embargo, los resultados de la tabla 4.3 muestran que la tendencia de los valores de  $\omega$ , para un conjunto de moléculas cuya naturaleza electrófilica está bien definida, es apropiada aún con una expansión en ondas planas con 6 Ry en energía de truncamiento. En la misma tabla se puede ver que incluso los valores de electrofilia global calculados con el método de ondas planas son del mismo orden de magnitud que aquellos obtenidos con un funcional híbrido y funciones de base localizadas. Con estos últimos resultados, las tendencias de  $\omega$

en las toxinas se pueden aceptar con confianza.

Cabe mencionar que la ChTX es la toxina que forma el complejo más estable con el canal de potasio, como lo demuestra el valor pequeño de la constante de velocidad de disociación ( $k_{off}$ ) o de la constante de equilibrio de disociación ( $k_D = k_{off}/k_{on}$ ), presentadas en la tabla 4.4. Los resultados del análisis de reactividad global muestran que la pérdida de afinidad de las toxinas mutantes por el canal se debe a que las mutaciones incrementan la dureza global de la toxina. Además, la correlación inversa entre  $\omega$  y  $k_{off}$  es una evidencia de que la primer cantidad permite describir comparativamente la afinidad de cada toxina por el canal de  $K^+$ . Un valor grande de  $\omega$  en una toxina significa que ésta se estabilizará en mayor medida que aquella con un valor pequeño cuando reciba carga ( $\Delta N$ ) de su entorno. Este es el caso de la toxina Y36Y con respecto al resto de las mutantes. Como se puede ver en la tabla 4.4, la toxina Y36P es la que tiene el menor valor de electrofilia global entre todas las mutantes, lo que significa que este sistema se estabilizará mucho menos cuando reciba una cantidad de carga ( $\Delta N$ ) de su entorno similar a la que puede recibir la Y36Y. Experimentalmente el complejo Y36Y–canal es el menos estable como lo muestra el valor tan grande de  $k_{off}$ .

Finalmente, el análisis de la electrofilia local muestra que la región formada por los residuos Met29 Lys31 y Arg34, es la que más contribuirá a la estabilización de la carga adicional que la ChTX y las mutantes reciban del canal de  $K^+$ . Esta región es la que tiene los valores más grandes de  $\omega(\mathbf{r})$ , pintados en color azul en la figura 4.6. Después de esta zona, la región formada por los residuos Ser10 y Lys11 y Lys27 también pueden participar en la estabilización energética de las toxinas frente al canal. De manera marginal el residuo Arg25 participará en este proceso, lo que indica que este residuo es clave fundamentalmente en interacciones electrostáticas. Es posible que este residuo tenga una función de *orientador* en el proceso de la interacción a largo alcance de la toxina y el canal. Este mapa coincide con el reportado por Ireta y col.<sup>150</sup> para la ChTX.

Los resultados presentados en este trabajo permiten concluir que la electrofilia global describe apropiadamente la afinidad de las toxinas bloqueadoras por los canales de potasio. Esta propiedad se complementa con la descripción que ofrece la blandura global. Aún cuando la electrofilia global permite establecer una escala relativa de afinidad de las toxinas por el canal, con los resultados de la electrofilia local no se puede proponer una escala entre regiones similares de las mutantes. Para esto es necesario desarrollar un esquema de análisis de la electrofilia local por regiones específicas de las toxinas, de tal manera que sea posible hacer comparaciones cuantitativas entre ellas. Pero a pesar de no tener este esquema, el análisis de la electrofilia local proporciona una idea cualitativa de los sitios que contribuyen en mayor medida a estabilizar la carga que provenga del canal.



## Conclusiones

Las conclusiones de esta tesis se pueden ubicar en dos campos: el primero corresponde a la metodología usada y el segundo al análisis de la reactividad de las biomoléculas y los peróxidos estudiados.

Respecto al primer campo, esta tesis ha permitido mostrar la versatilidad y eficiencia del Método de la Energía Total por Pseudopotenciales (METP), basado en las técnicas tipo Car-Parrinello, para calcular la estructura electrónica de biomoléculas o en general sistemas con cientos de átomos. Se mostró que con esta metodología, una vez definido el sistema, es posible controlar la calidad de los cálculos con un solo parámetro: la *energía de truncamiento o corte en la energía* ( $q_c$ ). Este parámetro determina el tamaño del conjunto de funciones de base, de tal manera que variando el valor de  $q_c$ , se puede ir de un cálculo cualitativo de la estructura electrónica hasta un cálculo que describa cuantitativamente la energética del sistema.

En este punto es importante mencionar el papel del supercómputo en paralelo como una herramienta útil en el METP. Los resultados presentados en esta tesis muestran que la combinación del METP con el cómputo en paralelo, permite calcular la estructura electrónica de sistemas de gran tamaño, como las toxinas estudiadas. Esto implica que con el METP y el poder de cómputo en paralelo actual es posible calcular la estructura electrónica de sistemas cada vez más cercanos a la nanoescala.



En relación con el segundo campo de conclusiones, los resultados presentados en esta tesis muestran la importancia del análisis de las propiedades de reactividad globales y locales, para describir el comportamiento de las toxinas estudiadas. Respecto a las propiedades globales, los resultados presentados en el capítulo 4 muestran que no hay una correlación lineal con los resultados experimentales, mientras que los resultados del análisis local sugieren que para obtener una descripción completa de la reactividad química de polipéptidos, es muy recomendable realizar el análisis de reactividad química a una escala que no necesariamente coincide con el tamaño de los grupos funcionales.

Por otra parte, se puede concluir que un estudio detallado de la reactividad química de biomoléculas, como el que se hizo para los peróxidos en el capítulo 2, hoy en día aún no se puede realizar. Esto se debe a dos razones principales. Por una parte, el tamaño de los sistemas biológicos es tal que el uso de funciones de base localizadas requiere un esfuerzo de cómputo muy importante, en la medida en que el conjunto de funciones de base es más grande. La otra razón es que calculando la estructura electrónica de las macromoléculas con funciones de base deslocalizadas (ondas planas), aún no es posible evaluar propiedades condensadas o localizadas en regiones atómicas.

Finalmente, en relación con los peróxidos estudiado en el capítulo 2, se puede concluir que es posible la formación de los complejos tipo oxiagua en peróxidos de la forma  $XOOH$ , donde  $X = H, NO_2, CO_2^-$  y  $SO_3^-$ . Estos complejos son claramente más reactivos que los peróxidos en su estado basal. Sin embargo, cabe mencionar que las barreras de activación en las reacciones de desplazamiento interno de hidrógeno, que dan lugar a estos complejos, son muy grandes ( $\sim 50.0$  kcal/mol). Esto implica que debe haber otros caminos de reacción en donde el solvente, puesto en forma explícita, disminuya las barreras de activación.

# Perspectivas

Los resultados presentados en esta tesis indican que el estudio de la reactividad química de sistemas biológicos tiene un futuro promisorio. En este sentido, una de las líneas de trabajo abiertas es el estudio de las interacciones de corto alcance entre las toxinas bloqueadoras de canales de  $K^+$  (BgK, ChTX, etc.) y el canal. Esta línea de investigación es posible porque hoy en día están bien caracterizadas las geometrías tanto de las toxinas y como de un canal de potasio; además, en la literatura se han reportado estudios de dinámica molecular que muestran la conformación más estable del complejo toxina–canal. Aun cuando este complejo es un sistema de miles de átomos, como trabajo futuro se propone diseñar un modelo reducido del vestíbulo del canal, usando métodos de mecánica molecular. El modelo de toxina–vestíbulo, junto con el Método de la Energía Total por Pseudopotenciales, permitirá evaluar procesos de transferencia de carga en el sistema toxina–canal. Otra alternativa será utilizar métodos tipo QM/MM.

Por otro lado, la existencia de los estados intersticiales localizados en la BgK, aunada a la evidencia de que existen más de 100 proteínas con interacciones Arg–Arg cuyos grupos guanidinio están a una distancia menor de  $5\text{Å}$ ,<sup>145</sup> plantea otra línea de trabajo futuro. El problema es estudiar si la presencia de las dos argininas en la misma vecindad de la biomolécula y con una conformación similar a la encontrada en la BgK, es condición necesaria y suficiente para la existencia de los estados intersticiales. Si es así, el trabajo futuro

implica reconocer el papel que juegan los estados intersticiales en la estabilidad y reactividad de los sistemas biológicos que los presenten, pero además, esta línea abierta implica estudiar la posible participación de los estados intersticiales en procesos de reconocimiento proteína-proteína, como es el caso de la interacción entre la BgK y los canales de  $K^+$ .

Finalmente, muchas de las aproximaciones usadas para describir la reactividad química se basan en el concepto de orbitales frontera, por lo que es importante tener una buena descripción de los mismos estados para una buena descripción de la reactividad. Los resultados sobre los efectos de la autointeracción electrónica en los orbitales frontera presentados en esta tesis, muestran la importancia de eliminar la autointeracción. Cuando se estudian sistemas macromoleculares con técnicas tipo Car-Parrinello, los pseudopotenciales con conservación de la norma usados en los cálculos de la estructura electrónica, no deben contener autointeracción. Por esta razón, una tercera línea de trabajo futuro es la implementación del método SIC-PZ o SIC-OEP en la metodología para diseñar pseudopotenciales.

## Apéndice A

# Publicaciones del autor

Contribuciones originales de investigación publicadas a la fecha, por el autor de la tesis, en revistas con arbitraje internacional.

1. Melin, J.; Aparicio, F.; Subramanian, V.; Galván, M.; Chattaraj, P. K. **Is the Fukui Function a Right Descriptor of Hard–Hard Interactions** *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 2487-2491.
2. Aparicio, F.; Contreras, R.; Galván, M.; Cedillo, A. **Global and Local Reactivity and Activation Patterns of HOOX (X = H, NO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) Peroxides with Solvent Effects** *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 10098-10104.
3. Melin, J.; Aparicio, F.; Galván, M.; Fuentealba, P.; Contreras, R. **Chemical Reactivity in the {N, N<sub>S</sub>, v(r)}** *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 3831-3835.
4. Aparicio, F.; Ireta, J.; Rojo, A.; Escobar, L.; Cedillo, A.; Galván, M. **On the Existence of Electronic States Confined by Charged Groups in Proteins** *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 1692-1697.
5. Ireta, J.; Aparicio, F.; Viniegra, M.; Galván, M. **The Role of the Protons and the Electrostatic Potential in the Reactivity of the (110) Sulfated Zirconia Surface** *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 811-818.
6. Aparicio, F.; Garza, J.; Cedillo, A.; Galván, M.; Vargas, R. **The Local Multiplicative Potential of the Self-Interaction Corrected Approximation**, publicado en *Reviews of Modern Quantum Chemistry, A Celebration of the Contributions of Robert G. Parr*, Editado por K. D. Sen; World Scientific, Singapore, **2003**, pp. 755-786.



## Apéndice B

# Nomenclatura de aminoácidos

Tabla B.1: Nombre de los aminoácidos y su representación en símbolo de una y tres letras.<sup>a</sup>

Nombre	Símbolo		
Glicina	Gli	(Gly)	G
Alanina	Ala	(Ala)	A
Valina	Val	(Val)	V
Leucina	Leu	(Leu)	L
Isoleucina	Ile	(Ile)	I
Serina	Ser	(Ser)	S
Treonina	Tre	(Thr)	T
Cisteína	Cis	(Cys)	C
Metionina	Met	(Met)	M
Acido aspártico	Asp	(Asp)	D
Asparagina	Asn	(Asn)	N
Acido glutámico	Glu	(Glu)	E
Glutamina	Gln	(Gln)	Q
Arginina	Arg	(Arg)	R
Lisina	Lis	(Lys)	K
Histidina	His	(His)	H
Fenilalanina	Fen	(Phe)	F
Tirosina	Tir	(Tyr)	Y
Triptófano	Trp	(Trp)	W
Prolina	Pro	(Pro)	P

<sup>a</sup> El símbolo en paréntesis corresponde a la nomenclatura en inglés.



# Bibliografía

- [1] Schrödinger, E. *Ann. Physik* **1926**, *79*, 361.
- [2] Szabo, A.; Ostlund, N. S. *Modern Quantum Chemistry, Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*; Dover Publications, Nueva York, 1996.
- [3] Parr, R. G.; Yang, W. *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*; Oxford University, Nueva York, 1989.
- [4] Thomas, L. H. *Proc. Cambridge Phil. Soc.* **1927**, *23*, 542.
- [5] Fermi, E. *Rend. Accad. Lincei* **1927**, *6*, 602.
- [6] Hohenberg, P.; Kohn, W. *Phys. Rev.* **1964**, *136*, 864B.
- [7] Kohn, W.; Sham, L. J. *Phys. Rev.* **1965**, *140*, 1133A.
- [8] Parr, R. G.; Donnelly, R. A.; Levy, M.; Palke, W. E. *J. Chem. Phys.* **1978**, *69*, 3801.
- [9] Nalewajski, R. F.; Parr, R. G. *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 399.
- [10] Sanderson, R. T. *Science* **1951**, *114*, 670.
- [11] Pearson, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533.
- [12] Ceperley, D. M.; Alder, B. J. *Phys. Rev. Lett.* **1980**, *45*, 566.
- [13] Perdew, J. P.; Zunger, A. *Phys. Rev. B* **1981**, *23*, 5048.
- [14] Kohn, W. *Rev. Mod. Phys.* **1999**, *71*, 1253.
- [15] Gunnarsson, O.; Lundqvist, B. I. *Phys. Rev. B* **1976**, *13*, 4274.
- [16] Perdew, J. P.; Wang, Y. *Phys. Rev. B* **1986**, *33*, 8800.
- [17] Perdew, J. P. *Phys. Rev. B* **1986**, *33*, 8822.
- [18] Becke, A. D. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098.
- [19] Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.



- [20] Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1996**, *104*, 1040.
- [21] Perdew, J. P.; Burke, K. *Int. J. Quantum Chem.* **1996**, *57*, 309.
- [22] Tozer, D. J.; Handy, N. C. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 2545.
- [23] Burke, K.; Perdew, J. P.; Wang, Y. *Electronic Density Functional Theory: Recent Progress and New Directions*; Plenum, Nueva York, 1997.
- [24] Tozer, D. J. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 10180.
- [25] Perdew, J. P.; Levy, M. *Phys. Rev. Lett.* **1983**, *51*, 1884.
- [26] Grabo, T.; Gross, E. K. U. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *240*, 141.
- [27] M. Petersilka, U. J. G.; Gross, E. K. U. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *76*, 1212.
- [28] Perdew, J. P.; Parr, R. G.; Levy, M.; Balduz, J. L. *Phys. Rev. Lett.* **1982**, *49*, 1691.
- [29] Almbladh, C. O.; von Barth, U. *Phys. Rev. B* **1985**, *31*, 3231.
- [30] Perdew, J. P.; Levy, M. *Phys. Rev. B* **1997**, *56*, 16021.
- [31] Politzer, P.; Abu-Awwaad, F.; Murray, J. S. *Int. J. Quantum Chem.* **1998**, *69*, 607.
- [32] Stowasser, R.; Hoffmann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3414.
- [33] Hirata, S.; Zhan, C. G.; Apra, E.; Windus, T. L.; Dixon, D. A. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 10154.
- [34] Salzner, U.; Lagowski, J. B.; Pickup, P. G.; Poirier, R. A. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1943.
- [35] Krieger, J. B.; Li, Y.; Iafrate, G. J. *Phys. Rev. A* **1992**, *45*, 101.
- [36] Krieger, J. B.; Li, Y.; Iafrate, G. J. *Phys. Rev. A* **1992**, *46*, 5453.
- [37] Krieger, J. B.; Li, Y.; Iafrate, G. J. *Phys. Rev. A* **1993**, *47*, 165.
- [38] Pederson, M. R.; Heaton, R. A.; Lin, C. C. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 2688.
- [39] Rieger, M. M.; Vogl, P. *Phys. Rev. B* **1995**, *52*, 16567 y referencias ahí contenidas.
- [40] Vogel, D.; Kruger, P.; Pollmann, J. *Phys. Rev. B* **1996**, *54*, 5495 y referencias ahí contenidas.
- [41] Sharp, R. T.; Horton, G. K. *Phys. Rev.* **1953**, *90*, 317.
- [42] Talman, J. D.; Shadwick, W. F. *Phys. Rev. A* **1976**, *14*, 36.
- [43] Tong, X. M.; Chu, S. I. *Phys. Rev. A* **1997**, *55*, 3406.

- [44] Tong, X. M.; Chu, S. I. *Phys. Rev. A* **1998**, *57*, 855.
- [45] Garza, J.; Nichols, J. A.; Dixon, D. A. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 7880.
- [46] Garza, J.; Vargas, R.; Nichols, J. A.; Dixon, D. A. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 639.
- [47] Fourier, R.; Andzelm, J.; Salahub, D. R. *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 6371.
- [48] Ihm, J.; Zunger, A.; Cohen, M. L. *J. Phys. C: Solid State Phys.* **1979**, *12*, 4409.
- [49] Denteneer, P.; van Haeringen, W. *J. Phys. C: Solid State Phys.* **1985**, *18*, 4127.
- [50] Ashcroft, N. W.; Mermin, N. D. *Solid State Physics*; Saunders Colleges, Philadelphia, 1976.
- [51] Payne, M. C.; Teter, M. P.; Allan, D. C.; Arias, T. A.; Joannopoulos, J. D. *Rev. Mod. Phys.* **1992**, *64*, 1045.
- [52] Monkhorst, H. J.; Pack, J. D. *Phys. Rev. B* **1976**, *13*, 5188.
- [53] Makov, G.; Shah, R.; Payne, M. C. *Phys. Rev. B* **1996**, *53*, 15513.
- [54] Yin, M. T.; Cohen, M. L. *Phys. Rev. B* **1982**, *25*, 7403.
- [55] Kleinman, L.; Bylander, M. D. *Phys. Rev. Lett.* **1982**, *4*, 1425.
- [56] Allan, D. C.; Teter, M. P. *Phys. Rev. Lett.* **1987**, *59*, 1136.
- [57] Hamman, D. R.; Schlüter, M.; Chiang, C. *Phys. Rev. Lett.* **1979**, *43*, 1494.
- [58] Troullier, N.; Martins, J. L. *Phys. Rev. B* **1991**, *43*, 1993.
- [59] Rappe, A.; Joannopoulos, J. D.; Bash, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6466.
- [60] Rappe, A.; Rabe, K.; Kaxiras, E.; Joannopoulos, J. D. *Phys. Rev.* **1990**, *B41*, 1227.
- [61] Car, R.; Parinello, M. *Phys. Rev. Lett.* **1985**, *55*, 2471.
- [62] Teter, M. P.; Payne, M. C.; Allan, D. C. *Phys. Rev. B* **1989**, *40*, 2471.
- [63] Feynmann, R. P. *Phys. Rev.* **1939**, *56*, 340.
- [64] Pulay, P. *Mol. Phys.* **1969**, *17*, 197.
- [65] Geerlings, P.; Proft, F. D.; Langenaeker, W. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1793.
- [66] Parr, R. G.; Pearson, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7512.
- [67] Pearson, R. G. *Chemical Hardness: Applications from Molecules to Solids*; Wiley-VHC: Weinheim, Alemania, 1997.

- [68] Parr, R. G.; Szentpály, L. V.; Liu, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1922.
- [69] Parr, R. G.; Yang, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4049.
- [70] Ayers, P. W.; Levy, M. *Theor. Chem. Acc.* **2000**, *103*, 353.
- [71] Yang, W.; Parr, R. G. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 6723.
- [72] Cedillo, A.; Contreras, R. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *sometido*.
- [73] Li, Y.; Evans, J. N. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7756.
- [74] Contreras, R.; Domingo, L. R.; Andrés, J.; Pérez, P.; Tapia, O. *J. Phys. Chem* **1999**, *103*, 1367.
- [75] Pérez, P.; Simón-Manso, Y.; Aizman, A.; Fuentealba, P.; Contreras, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4756.
- [76] Vela, A.; Gázquez, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1490.
- [77] Simón-Manso, Y.; Fuentealba, P. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 2029.
- [78] Yang, W.; Mortier, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5708.
- [79] Contreras, R.; Fuentealba, P.; Galván, M.; Pérez, P. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *304*, 405.
- [80] Fuentealba, P.; Pérez, P.; Contreras, R. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 2544.
- [81] Fukui, K. *Theory of Orientation and Stereoselection*; Springer-Verlag, Berlin, 1973.
- [82] Senet, P. J. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 2516.
- [83] Aizman, A.; Contreras, R.; Galván, M.; Cedillo, A.; Santos, J. C.; Chamorro, E. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 7844.
- [84] Carey, F. A.; Sundberg, R. J. *Advanced Organic Chemistry: Structure and Mechanisms*; Plenum: New York, 2000.
- [85] March, J. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*; Wiley: New York, 1992.
- [86] Walsh, C. *Enzymatic Reaction Mechanisms*; W. H. Freeman and Co.: San Francisco, 1979.
- [87] Bain, O.; Giguere, P. A. *Can. J. Chem.* **1955**, *33*, 527.
- [88] Giguere, P. A. *J. Chem. Phys.* **1950**, *18*, 88.
- [89] Massey, J. T.; Hart, R. W. J. *J. Chem. Phys.* **1955**, *23*, 942.

- [90] Giguere, P. A.; Srinivasan, T. K. K. *J. Mol. Spectrosc.* **1977**, *66*, 168.
- [91] Cremer, D.; Christen, D. *J. Mol. Spectrosc.* **1979**, *74*, 480.
- [92] Hillman, J. J.; Jennings, D. E.; Olson, W. B.; Goldman, A. *J. Mol. Spectrosc.* **1986**, *117*, 46.
- [93] Moiseev, I. I. *J. Mol. Cat.* **1997**, *127*, 1.
- [94] T. H. Dunning, J.; Winter, N. W. *Chem. Phys. Lett.* **1971**, *11*, 194.
- [95] Cremer, D. *J. Chem. Phys.* **1978**, *69*, 4440.
- [96] DeFrees, D. J.; Levi, B. A.; Pollack, S. K.; Hehre, W. J.; Binkley, J. S.; Pople, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4085.
- [97] Hout, E. F.; Levi, B. A.; Hehre, W. J. *J. Comput. Chem.* **1982**, *3*, 234.
- [98] Block, R.; Jansen, L. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 3322.
- [99] Politzer, P.; Baradon, R.; Miller, R. S. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 3191.
- [100] Bach, R. D.; McDouall, J. J. W.; Owensby, A. L.; Schlegel, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7065.
- [101] Hrusák, J.; Friedrichs, H.; Schwarz, H.; ; Razafinjanahary, H.; Chermette, H. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 100.
- [102] Schröder, D.; Schalley, C. A.; Goldberg, N.; Hrusák, J.; Schwarz, H. *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1235.
- [103] Schalley, C. A.; Hornung, G.; Schröder, D.; Schwarz, H. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 91.
- [104] Okajima, T. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2001**, *572*, 45 y referencias ahí contenidas.
- [105] Kalder, U.; Shavitt, L. *J. Chem. Phys.* **1966**, *44*, 1823.
- [106] Pople, J. A.; Raghavachari, K.; Frish, M. J.; Binkley, J. S.; v. R Schleyer, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6389.
- [107] Meredith, C.; Hamilton, T. P.; Schaefer, H. F. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 9250.
- [108] Bach, R. D.; Owensby, A. L.; González, C.; Schlegel, H. B.; McDouall, J. J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6001.
- [109] Huang, H. H.; Xie, Y.; Schaefer, H. F. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 6076.
- [110] Schalley, C. A.; Harvey, J.Ñ.; Schröder, D.; Schwarz, H. *J. Phys. Chem.* **1998**, *102*, 1021.

- [111] Bach, R. D.; Su, M.-D.; Schlegel, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5379.
- [112] Bach, R. D.; Su, M.-D. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5392.
- [113] Woon, D. E.; Loew, G. H. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 10380.
- [114] Goldman, A.; Murcray, F. J.; Blatherwick, R. D.; Koster, J. J.; Murcray, F. H.; Murcray, D. G. *Geophys. Res.* **1989**, *94*, 14945.
- [115] Appelman, E. H.; Gosztola, D. J. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 787 y referencias ahí citadas.
- [116] Bennett, D. A.; Yao, H.; Richardson, D. E. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 2996.
- [117] Richardson, D. E.; Yao, H.; Frank, K. M.; Bennett, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1729.
- [118] Bunton, C. A.; Foroudian, H. J.; Kumar, A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1995**, *2*, 33.
- [119] Blasko, A.; Bunton, C. A.; Kumar, A. *J. Phys. Org. Chem.* **1997**, *10*, 427.
- [120] Bunton, C. A.; Kumar, A. *J. Phys. Org. Chem.* **1998**, *11*, 803.
- [121] Ruff, F.; Kucsman, A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1985**, *2*, 683.
- [122] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A.; Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian 98, Revision A.7*; Gaussian, Inc., Pittsburgh PA., 1998.
- [123] Giesen, D. J.; Storer, J. W.; J. Cramer, C.; Truhlar, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1057 y referencias ahí citadas.
- [124] Maseras, F.; Morokuma, K. *J. Comput. Chem.* **1995**, *16*, 1170 y referencias ahí citadas.
- [125] Foresman, J. B.; Keith, T. A.; Wiberg, K. B.; Snoonian, J.; Frisch, M. J. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 16098.
- [126] Tomasi, J.; Persico, M. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2027.

- [127] Zhan, C.-G.; Chipman, D. M. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 10543.
- [128] Pearson, R. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 8440.
- [129] Gritsenko, O. V.; Ensing, B.; Schipper, P. R. T.; Baerends, E. J. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 8558.
- [130] Pearson, R. G. *J. Chem. Edu.* **1987**, *64*, 561.
- [131] Balawender, R.; Safi, B.; Geerlings, P. *J. Chem. Phys. A* **2001**, *105*, 6703.
- [132] Jursic, B. S. *J. Mol. Struct (Theochem.)* **1997**, *417*, 81.
- [133] Kaczorowski, G. J.; Garcia, M. L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 448.
- [134] Hille, B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*; Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA., 1992.
- [135] MacKinnon, R. *FEBS Letters* **2003**, *555*, 62.
- [136] Wickman, K.; Clapham, D. E. *Physiol. Rev.* **1995**, *75*, 865.
- [137] Bezanilla, F. *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 555.
- [138] Miller, C. *Neuron* **1995**, *15*, 5.
- [139] Chandy, K. G.; Gutman, G. A. *Handbook of Receptors and Channels*; CRC Press, Boca Raton, FL, 1995.
- [140] Jan, L. Y.; Jan, Y.-N. *Annu. Rev. Neurosci.* **1997**, *20*, 91.
- [141] Dauplais, M.; Lecoq, A.; Song, J.; Cotton, J.; Jamin, N.; Gilquin, B.; Roumestand, C.; Vita, C.; de Medeiros, C. L.; Rowan, E. G.; Harvey, A. L.; Ménez, A. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 4302.
- [142] Branden, C.; Tooze, J. *Introduction to Protein Structure*; Garland Publishing Inc., Segunda Edición, 1999.
- [143] No, K. T.; Nam, K. Y.; Scheraga, H. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12917.
- [144] Perutz, M. F. *Science* **1978**, *201*, 1187.
- [145] Magalhaes, A.; Maignret, B.; Hoflack, J.; Gomes, J.-N.; Scheraga, H. A. *J. Protein Chem.* **1994**, *13*, 195.
- [146] Alessandri-Haber, N.; Lecoq, A.; Gasparini, S.; Grangier-Macmath, G.; Jacquet, G.; Harvey, A. L.; Medeiros, C.; Rowan, E. G.; Gola, M.; Ménez, A.; Crest, M. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 35653.
- [147] Arias, T. A.; Payne, M. C.; Joannopoulos, J. D. *Phys. Rev.* **1992**, *B45*, 1538.

- [148] Ismail-Beigi, S.; Arias, T. A. *Comp. Phys. Comm.* **2000**, *128*, 1.
- [149] Ireta, J.; Galván, M. *J. Chem. Phys.* **1996**, *105*, 8231.
- [150] Ireta, J.; Galván, M.; Cho, K.; Joannopoulos, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9771.
- [151] Hoffmann, R. *Solids and Surfaces, A Chemist's View of Bonding in Extended Structures*; VCH Publishers, 1988.
- [152] Carloni, P.; Andreoni, W.; Parrinello, M. *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *79*, 761.
- [153] Ohno, K.; Kamiya, N.; Asakawa, N.; Inoue, Y.; Sakurai, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8161.
- [154] Jeffrey, G. A. *An Introduction to Hydrogen Bonding*; Oxford University Press, 1997.
- [155] Miertus, S.; Scrocco, E.; Tomassi, J. *Chem. Phys.* **1981**, *55*, 117.
- [156] Anderson, C.; MacKinnon, R.; Smith, C.; Miller, C. *J. Gen. Physiol.* **1988**, *91*, 317.
- [157] Miller, C.; Moczydlowski, E.; Latorre, R.; Phillips, M. *Nature* **1985**, *313*, 316.
- [158] Honig, B.; Nicholls, A. *Science* **1995**, *268*, 1144.
- [159] Lee, L. P.; Tidor, B. *J. Chem. Phys.* **1997**, *106*, 8681.
- [160] Wang, J.; Cieplak, P.; Kollman, P. A. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1049.
- [161] Wang, W.; Donini, O.; Reyes, C. M.; Kollman, P. A. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, *30*, 211.
- [162] Kumar, S.; Nussinov, R. *Chembiochem* **2002**, *3*, 604.
- [163] Boudon, S.; Wipff, G.; Maigret, B. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 6056.
- [164] Soetens, J.-C.; Millot, C.; Chipot, C.; Jansen, G.; Ángyán, J. G.; Maigret, B. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 10910.
- [165] Cho, K.-H.; No, K. T.; Scheraga, H. A. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 6505.
- [166] Nam, K.-Y.; Yoon, J. H.; No, K. T. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *319*, 391.
- [167] Mrabet, N. T.; van den Broeck, A.; van den Brande, I.; Stanssens, P.; Laroche, Y.; Lambeir, A. M.; Matthijssens, G.; Jenkins, J.; Chiadmi, M.; van Tilbeurgh, H.; Rey, F.; Janin, J.; Quax, W. J.; Lasters, I.; Maeyer, M. D.; Wodak, S. J. *Biochemistry* **1992**, *31*, 2239.
- [168] Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*; John Wiley and Sons Inc., Second Edition, 1999.

- [169] Delano, W. L.; Ultsch, M. H.; de Vos, A. M.; Wells, J. A. *Science* **2000**, *287*, 1279.
- [170] Aiyar, J.; Rizzi, J. P.; Gutman, G. A.; Chandy, K. G. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 31013.
- [171] Srinivasan, K.Ñ.; Sivaraja, V.; Huys, I.; Sasaki, T.; Cheng, B.; Kumar, T. K. S.; Sato, K.; Tytgat, J.; Yu, C.; San, B. C. C.; Ranganathan, S.; Bowie, H. J.; Kini, R. M.; Gopalakrishnakone, P. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 30040.
- [172] Koschak, A.; Bugianesi, R. M.; Mitterdorfer, J.; Kaczorowski, G. J.; Garcia, M. L.; Knaus, H. G. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2639.
- [173] Batista, C. V. F.; Gómez-Lagunas, F.; de la Vega, R. C. R.; Hajdu, P.; Panyi, G.; Gáspár, R.; Possani, L. D. *Biochim. Biophys. Acta: Proteins and Proteomics* **2002**, *1601*, 123.
- [174] Zhu, S.; Huys, I.; Dayson, K.; Verdonck, F.; Tytgat, J. *Proteins* **2004**, *54*, 361.
- [175] Gross, A.; MacKinnon, R. *Neuron* **1996**, *16*, 399.
- [176] Miller, C. *Science* **1991**, *252*, 1092.
- [177] García, M. L.; Knaus, H. G.; Munujos, P.; Slaughter, R. S.; Kaczorowski, G. J. *Am. J. Physiol.* **1995**, *269*, C1.
- [178] Bontems, F.; Roumestand, C.; Gilquin, B.; Mémez, A.; Toma, F. *Science* **1991**, *254*, 1521.
- [179] MacKinnon, R.; Miller, C. *Science* **1988**, *245*, 1382.
- [180] Goldstein, S. A.Ñ.; Pheasant, D. J.; Miller, C. *Neuron* **1994**, *12*, 1377.
- [181] Naranjo, D.; Miller, C. *Neuron* **1996**, *16*, 123.
- [182] Stampe, P.; Kolmakova-Partensky, L.; Miller, C. *Biochemistry* **1994**, *33*, 443.
- [183] Thompson, J.; Begenisich, T. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 2382.
- [184] Doyle, D. A.; Cabral, J. M.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. *Science* **1998**, *280*, 77.
- [185] Maynard, A. T.; Huang, M.; Rice, W. G.; Covell, D. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 11578.
- [186] Pérez, P.; Toro-Labbé, A.; Contreras, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5527.
- [187] Domingo, L. R.; Aurell, M. J.; Pérez, P.; Contreras, R. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 6871.



- [188] Brommer, K. D.; Galván, M.; Dal-Pino, A.; Joannopoulos, J. D. *Surf. Sci.* **1994**, *314*, 57.
- [189] Pearson, R. G. *J. Chem. Educ.* **1968**, *45*, 981.