



**Estudio Teórico de la Estructura Electrónica y  
Molecular de Complejos de  $\text{Cu}^{1+/2+}$  y  $\text{Fe}^{2+/3+}$  Relevantes  
en la Enfermedad de Alzheimer**

**Jorge Alí Torres**

**Tesis Doctoral**

**Programa de Doctorado en Química Teórica y Computacional**

**Directores:**

**Mariona Sodupe Roure**

**Luis Rodríguez Santiago**

**Departament de Química**

**Facultat de Ciències**

**2011**



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
DEPARTAMENT DE QUÍMICA  
UNITAT DE QUÍMICA FÍSICA

MARIONA SODUPE i ROURE, Catedràtica d'Universitat de la Unitat de Química Física del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, y LUÍS RODRÍGUEZ SANTIAGO, Profesor Titular de Química Física del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Certificamos:

Que **Jorge Isaac Alí Torres** ha realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona el trabajo que lleva por título:

**Estudio Teórico de la Estructura Electrónica y  
Molecular de Complejos de  $\text{Cu}^{1+/2+}$  y  $\text{Fe}^{2+/3+}$  Relevantes  
en la Enfermedad de Alzheimer**

Que se presenta en esta memoria para optar al grado de Doctor.

Mariona Sodupe i Roure

Luis Rodríguez Santiago

## PREFACIO

Esta tesis está centrada en los aspectos bioquímicos de la enfermedad de Alzheimer desde un punto de vista computacional. Los capítulos de resultados se presentan en orden de complejidad del sistema, partiendo de los sistemas modelos (Capítulo 3) y terminando con los complejos de los cationes  $\text{Cu}^{1+/2+}$  con el péptido  $\beta$ -amiloide, considerando los aminoácidos del 1 al 16 (Capítulo 6). En el Capítulo 5 estudiamos el efecto de la coordinación del  $\text{Cu}^{2+}$  en el  $\text{pK}_a$  de los imidazoles que lo coordinan. Los resultados de estos tres capítulos se discuten en el contexto de la biología de la enfermedad de Alzheimer.

Con el propósito de hacer más fluida la lectura de este trabajo, algunas figuras y tablas se presentan conjuntamente en el Apéndice, aunque los datos relevantes se mencionan en el texto principal. De igual manera se usan, en general, las siglas y abreviaturas de los términos en inglés, los cuales se definen en el texto, pero en algunos casos al ser ampliamente utilizados por los potenciales lectores de este trabajo su definición se omite.

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación a través de la beca predoctoral BES-2007-14304 y de los proyectos CTQ-2008-06381/BQU, CTQ-2008-06866-C02-01 y CSD-2007-00006; y al uso de recursos computacionales del Centro de Servicios Científicos y Académicos de Cataluña (CESCA).

## AGRADECIMIENTOS

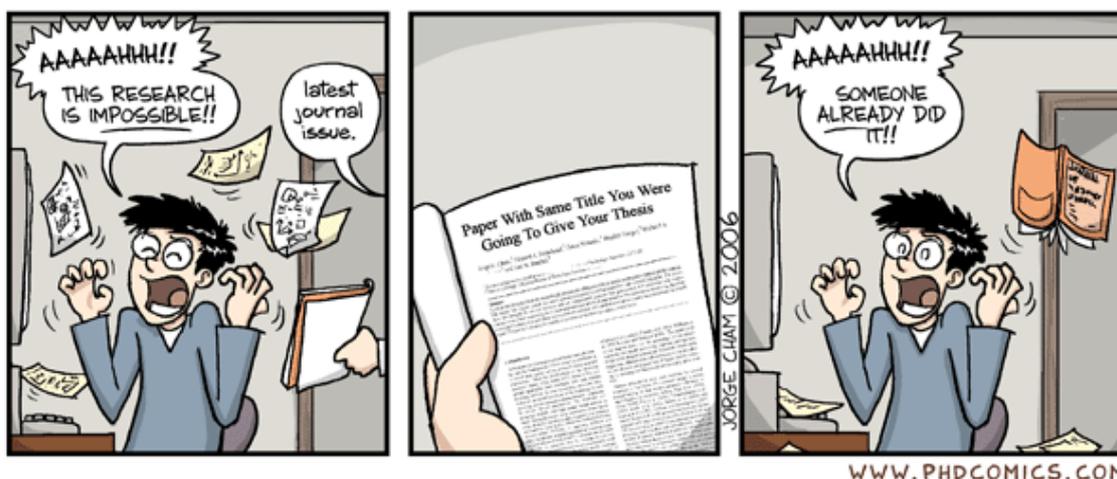
*...soy otro cuando soy, los actos míos  
son más míos si son también de todos,  
para que pueda ser he de ser otro,  
salir de mí, buscarme entre los otros,  
los otros que no son si yo no existo,  
los otros que me dan plena existencia,  
no soy, no hay yo, siempre somos nosotros,  
la vida es otra, siempre allá, más lejos,  
fuera de ti, de mí, siempre horizonte...*

(Fragmento del poema “Piedra de Sol” de Octavio Paz)

Cada vez que estoy a punto de cerrar un ciclo académico me detengo a pensar en las situaciones que me han llevado hasta esa situación. En este momento recuerdo que la misión de cada ser humano es tomar decisiones en el curso de la vida, y me llena de satisfacción saber que las decisiones que he tomado me han traído hasta aquí. Mi estancia en el grupo y en el país ha sido de mucho crecimiento personal y profesional gracias a que estuve rodeado de gente apasionada por la ciencia que me contagiaron rápidamente de esta pasión, para enriquecer esta experiencia académica con innumerables satisfacciones personales. En este apartado deseo expresar mi gratitud a todas las personas que han contribuido para que estos años de investigación hayan sido enormemente enriquecedores.

En primer lugar quiero expresar mi enorme gratitud a mis directores de tesis, Mariona Sodupe y Luis Rodríguez, por todo el apoyo y trabajo conjunto en todos estos años. Agradezco en especial su confianza y cercanía en los momentos más complicados del desarrollo de la tesis, lo que nos obligó incluso a cambiar un poco el rumbo de nuestras investigaciones. Sin embargo, estas etapas son las que más me han ayudado en

mi formación investigativa y siempre estaré agradecido de haberlas podido superar con su apoyo incondicional.



También quiero expresar mi agradecimiento a Jean-Didier Maréchal, cuya contribución fue esencial para el desarrollo del Capítulo 6 de la presente tesis y el artículo derivado. Agradezco en particular las horas que me dedicó para entrenarme en el manejo de algunos programas y por la paciencia que mantuvo durante ese periodo. También le agradezco los consejos sobre squash que me dio cuando en el torneo encarnada a “*l’enfant terrible*”.

De igual forma agradezco a todos los profesores de la unidad de Química Física, quienes de una u otra forma han participado en mi formación: como profesores, evaluadores o compartiendo tareas docentes.

A mis compañeros del despacho C7-149, quienes con su amabilidad hicieron agradables mis años en el grupo, ambientado con conversaciones sobre fútbol, política, música o cualquier otro tema de actualidad. A Xavi y Albert les agradezco su disponibilidad cuando algunas dudas científicas surgían y estuvieron prestos a darme sus opiniones siempre relevantes. A Carles, quien siempre estuvo dispuesto a contestar cualquier duda computacional que tuve, incluso antes de ser el técnico de la Unidad (y a dejarme escuchar sus listas de iTunes). A Fede, con quien comenzar una conversación es muy fácil, combinando la Liga Española con la “*Lega Calcio*”. A Javi, el nuevo del grupo y único madridista, le deseo lo mejor en sus cursos del Máster y en todo el

desarrollo de su tesis. Asimismo, agradezco a todos los antiguos miembros del grupo: Raquel, Erika, Marc, Pierre; quienes también fueron parte fundamental en mi adaptación.

A los miembros actuales de Transmet: Max, Sergi, Gabor, Eli, Manuel; y a los que estuvieron en el grupo: Aleix, Ainara, Luca; con quienes he compartido estos años en la Unidad de Química-Física. Fue bueno compartir con ellos los partidos de fútbol, el torneo de squash, o los cursos complementarios del doctorado.

Con mis amigos de Dynamics mantuve una relación bastante cercana. Siempre estaré agradecido con Juanma por los momentos compartidos y por la confianza que me brindó desde el primer momento que llegué al Departamento. Agradeceré también su esfuerzo por entender nuestra cultura y por aprenderse la letra de algún Vallenato. Con Juanmita compartí muchos buenos momentos y la hora de la comida se nos hacía corta escuchando sus chistes. A Edgar le agradezco toda su amistad y confianza, es una persona genial y ha sido todo un honor haberlo conocido y ser su amigo. Con Lea, con quien compartí las clases del Máster, le agradezco toda su confianza y cariño, al igual que haberme dejado compartir tiempo con su familia: Ricardo y Manuelito. A Marc le agradezco su sencillez y empatía, los viajes a Tarragona en coche, las conversaciones sobre el Barça y el Nastic, y las clases de QuiFi los lunes a las 9 de la mañana. A Edu “*el crack del balón*” le agradezco su amabilidad durante estos años y sus conversaciones sobre fútbol Español. Con Ajax tuve afinidad desde el primer momento y le deseo lo mejor en su etapa doctoral.

También agradezco a los experimentales: Felipe, Katherine, Hugo, Belén y Gemma. Con Gemma compartí muchos momentos y le agradezco enormemente todos los ratos que pasamos y las veces que estuvo dispuesta a darnos una mano.

De igual manera agradezco al Doctor Arvi Rauk y a los miembros de su grupo, en especial a Samir Roy y Tebikie Wondimagegn, de quienes aprendí mucho durante mi estancia en Canadá. También agradezco a Elizabeth Hernández del grupo de Tom Ziegler, por ayudarme durante mi periodo de adaptación y por escuchar mis historias.

Mi vida en este país no hubiera sido igual si no hubiese encontrado en mi camino gente que por fuera del ámbito académico me ayudaban a equilibrar la balanza emocional. Agradezco a Raquel Gutiérrez, Tero, Edna, Eric, Jordi, Matias, Luciana,

Roberto, Ana, Xavi, Anna Febrero y a todos mis amigos colombianos que están en España, por todo el apoyo durante estos años.

Agradezco de forma especial a mi familia en Barcelona por todos estos años compartidos en el piso de la Avenida de Roma. Muchas gracias a César e Isabel por todo su apoyo, cariño y disposición. También agradezco a Hansel y Orlando por los momentos compartidos, haciendo que la convivencia fuera más sencilla y que a veces se me olvidara que estaba en otro país. De igual forma agradezco a Betty, que aunque llegó hace poco ya hace parte de la familia y pronto pondremos su nombre en el buzón.

He sido afortunado al tener de este lado del “charco” a dos de mis mejores amigos. Me resulta imposible expresar en dos frases cortas mi profundo agradecimiento hacia ellos, pero me tranquiliza saber que ya lo saben. A mi amigo Francisco Núñez, uno de los grandes de la Costa Caribe Colombiana y que hace un estupendo arroz con Maggi, le agradezco los muchos años que hemos compartido y todas las experiencias que hemos vivido. A Ramón Valencia le agradezco todo el apoyo en Colombia y en España, en especial el primer año de mi estancia en el país, lo que me ayudó a no sentirme tan lejos. También le agradezco todas las conversaciones que hemos tenido y que me han ayudado en mi progreso personal y profesional.

Los dos últimos años han sido los más especiales de mi estancia en España. Mi felicidad creció de forma exponencial al encontrar el punto en el que convergen todos mis sueños. Muchas gracias Areli por todo lo que me has permitido vivir estos dos años. Al tener la seguridad de que seguirás a mi lado, tengo la certeza de que seguiré siendo feliz.

Esta tesis quiero dedicársela de manera especial a mi familia, quienes han hecho grandes esfuerzos por acortar las distancias, traducido en viajes transoceánicos para poder vernos. Y en especial a mi Madre, a quien ya he dedicado mis anteriores trabajos académicos. Pero este en especial es para ella, por su constancia, infinito apoyo y amor incondicional. No hay nadie en la vida a quien deba más y esta dedicatoria es una muestra más de mi infinito agradecimiento.



# CONTENIDO

	Página
<b>Capítulo 1: Introducción General.....</b>	<b>1</b>
1.1. Desarrollo Histórico del Concepto de Demencia Senil.....	1
1.2. La Enfermedad de Alzheimer.....	5
1.2.1. Hipótesis de la Degeneración Citoesquelética Neuronal.....	6
1.2.2. Hipótesis de la Cascada del Amiloide.....	6
1.3. Papel de los Iones Metálicos en la Enfermedad de Alzheimer.....	8
1.4. Interacción del Péptido A $\beta$ con Cationes de Hierro y Cobre.....	10
1.4.1. Interacción del Cu <sup>2+</sup> con el Péptido A $\beta$ .....	10
1.4.2. Interacción de los Cationes de Fe <sup>2+/3+</sup> con el Péptido A $\beta$ .....	13
<b>Capítulo 2: Objetivos.....</b>	<b>15</b>
<b>Capítulo 3: Aspectos Metodológicos del Cálculo Computacional de Sistemas Biológicos con Metales de Transición.....</b>	<b>19</b>
3.1. Métodos de Estructura Electrónica.....	20
3.1.1. El Método Hartree-Fock.....	21
3.1.2. Métodos Post Hatree-Fock.....	22
3.1.3. Teoría del Funcional de la Densidad.....	25
3.1.4. Métodos de Simulación con Solventes.....	34
3.2. Métodos Híbridos QM/MM.....	36
3.3. Modelado por Homología.....	38
<b>Capítulo 4: Sistemas Modelo con los Cationes Fe<sup>2+/3+</sup> y Cu<sup>2+</sup> Relevantes en la Enfermedad de Alzheimer.....</b>	<b>43</b>
4.1. Interacción de los Cationes Fe <sup>2+/3+</sup> con la Cu <sup>2+</sup> el Fragmento His13-His14, His6 y Tyr10.....	44
4.1.1. Detalles Computacionales para el Cálculo de los Sistemas de Hierro.....	46

4.1.2. Resultados del Estudio de la Coordinación del $\text{Fe}^{2+/3+}$ con Péptidos Modelo del A $\beta$ .....	51
4.2. Interacción del $\text{Cu}^{2+}$ con Ligandos Modelos del A $\beta$ .....	62
4.2.1. Detalles Computacionales para los Sistemas Modelo $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ (1-16).....	64
4.2.2. Resultados y Discusión para los Sistemas $[\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3\text{X}]$ .....	65
4.3. Conclusiones.....	69
<b>Capítulo 5: Variación del <math>\text{pK}_a</math> del Imidazol en Complejos de <math>\text{Cu}^{2+}</math> .....</b>	<b>73</b>
5.1. Ciclos Termodinámicos para Cálculos de $\text{pK}_a$ .....	75
5.2. Detalles Computacionales.....	79
5.3. Resultados y Discusión.....	80
5.3.1. $\text{pK}_a$ del Imidazol Protonado ( $\text{ImH}_2^+$ ).....	80
5.3.2. $\text{pK}_a$ del Imidazol ( $\text{ImH}$ ) Usando el Método Directo.....	81
5.3.3. Cálculos de $\text{pK}_a$ Usando Moléculas de Agua Explícitas.....	88
5.4. Conclusiones.....	96
<b>Capítulo 6: Modelos Computacionales del Sistema <math>\text{Cu}^{2+}</math>-A<math>\beta</math>(1-16).....</b>	<b>99</b>
6.1. Detalles Computacionales.....	100
6.2. Resultados y Discusión.....	106
6.2.1. Modelado por Homología.....	106
6.2.2. Cálculos Químico-Cuánticos.....	109
6.3. Conclusiones.....	125
<b>Capítulo 7: Conclusiones y Observaciones Generales.....</b>	<b>127</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>131</b>
<b>Apéndices.....</b>	<b>143</b>
Apéndice 1. Tablas suplementarias del Capítulo 4.....	143
Apéndice 2. Figura suplementaria del Capítulo 5.....	148
Apéndice 3. Tabla y figuras suplementarias del Capítulo 6.....	149

# 1

## INTRODUCCIÓN GENERAL

*“La vida no es la que uno vivió,  
sino la que uno recuerda,  
y cómo la recuerda para contarla...”*

Gabriel García Márquez (Vivir para contarla)

### 1.1. DESARROLLO HISTÓRICO DEL CONCEPTO DE DEMENCIA SENIL

Los antiguos filósofos griegos y romanos asociaban la vejez con la pérdida de las capacidades mentales relacionadas con la demencia.<sup>1</sup> Una de las primeras referencias a las deficiencias mentales debidas a la edad es atribuida a Pitágoras de Samos (ca. 582-507 a. C.). Pitágoras dividió los ciclos de la vida en cinco estados distintos, los cuales comenzaban a la edad de 7, 21, 49, 63 y 81 años. Los dos últimos estados eran referidos como “*senium*” o vejez, un periodo caracterizado por el declive y decadencia del cuerpo humano y la regresión de las capacidades mentales.<sup>2</sup> Era, según Pitágoras, en esta última etapa de la vida donde “la escena de la mortal existencia acaba. El hombre regresa a la imbecilidad de la primera época de la infancia”.<sup>3</sup>

Hipócrates (ca. 460-311 a. C.), considerado el padre de la medicina, también escribió acerca del declive mental asociado con la edad, sugiriendo que éste era debido a un desbalance de los cuatro fluidos corporales cardinales (sangre, flema, bilis amarilla y bilis negra).<sup>4</sup> Platón y su discípulo Aristóteles (ca. 384-322 a. C.) reflexionaron acerca de los fallos mentales presentes en la ancianidad. Sin embargo, los asumieron como una aflicción inexorable de la condición humana. Además, consideraban que dichos fallos eran debidos a problemas cardíacos, ya que Aristóteles afirmaba que el corazón era la fuente de la vida y la inteligencia humana.<sup>2</sup>

Por otro lado, el médico romano Galeno de Pérgamo (ca. 150-200 d. C.), reconocido, además de por las escrituras médicas que dominaron los siguientes 1000 años, por su punto de vista contrario a la escuela aristotélica, estableció que el cerebro es el centro de la inteligencia. Galeno introdujo el término “*morosis*” para referirse a la demencia senil. Los escritos de Galeno mostraban la vejez misma como un estado de enfermedad. Tal como lo expresó en uno de sus escritos: “la vejez no es natural en la misma manera que lo son comer o crecer; los dos últimos pueden ser considerados como procesos naturales, mientras que el primero no lo es, siendo en lugar de ello una inevitable infección del cuerpo”.<sup>2</sup>

Este pensamiento pesimista se mantuvo durante toda la edad media, en la cual aparecen pocos registros históricos sobre la disminución de las capacidades mentales. Una de las pocas referencias sobre demencia senil que puede encontrarse de este periodo proviene del franciscano Roger Bacon (1214-1294) quien, a pesar de las restricciones impuestas por la iglesia, realizó prolíficas observaciones e inventos. Por su brillante trabajo, al considerarlo la iglesia motivo de herejía, fue aprisionado y durante su encarcelamiento escribió su obra “*Métodos para prevenir la aparición de la senilidad*”, en la cual afirmaba, entre otras cosas, que “en la parte posterior del cerebro ocurre el olvido y la memoria”. Además, sostenía que “el daño en la facultad de razonar ocurre en la parte media del cerebro mientras que el daño en la imaginación ocurre en la parte anterior”.<sup>5</sup> Este trabajo se basó en las teorías de los galenos árabes, y reiteraba el postulado de la inevitabilidad del declive mental con la edad.

A pesar de esto, se puede afirmar que, hasta el siglo XIX, se llevaron a cabo muy pocos avances sobre la demencia senil, debido a que ésta continuó siendo vista como

una consecuencia inevitable de los años. De esta manera, los daños cognitivos relacionados con la edad siguieron siendo reconocidos y fueron asumidos como una característica de la vida. La literatura es muestra de ello: William Shakespeare (1564-1616) hace numerosas descripciones a través de sus personajes en diferentes obras, entre las que cabe destacar *Hamlet* y *El Rey Lear*. Shakespeare sin embargo, diferenciaba de forma clara entre “demencia común” y demencia relacionada con la edad, y hacía énfasis en los cambios tanto afectivos como cognitivos que acompañan a la demencia senil.<sup>6</sup> Una de las líneas más reveladoras se encuentra en la obra *El Rey Lear* (1605), acto IV, escena 7, en la cual el Rey Lear muestra señales de padecer principios de demencia senil:

*No te burles de mí, te lo ruego.  
Sólo soy un anciano que chochea,  
los ochenta ya pasados, ni un día menos,  
y, hablando con franqueza,  
me temo que no estoy en mi juicio.  
Creo que te conozco, a ti y a este hombre,  
pero estoy dudoso: ignoro del todo  
qué lugar es éste y, por más que lo intento,  
no recuerdo esta ropa; ni tampoco sé  
dónde he pasado la noche. No os riáis de mí,  
pues, tan verdad como que soy hombre, creo  
que esta dama es mi hija Cordelia.*

El siglo XIX trajo consigo cambios sustanciales e invaluablees que fueron fundamentales para el progreso en el tratamiento de los desórdenes mentales, incluyendo la demencia senil. El primer gran paso fue la reforma humanitaria impulsada por Phillippe Pinel (1745-1826), médico francés, profesor de patología e higiene, y consultor de Napoleón.<sup>7</sup> Hasta ese tiempo los enfermos mentales eran mantenidos encarcelados y sometidos a tratamientos inhumanos.<sup>4,5</sup> A pesar de ser una reforma impopular y que no era apoyada por el gobierno de la época, Pinel consiguió que se

estableciera la locura como una enfermedad y no como un crimen (Figura 1.1). Unos años después, Esquirol, discípulo de Pinel, estableció el sistema moderno de clasificación de las enfermedades mentales.<sup>7</sup> Es remarcable el hecho de que fue el primero en describir de manera exacta las progresiones reflejadas en la demencia senil, que serían luego contextualizadas en el siglo XX.<sup>6</sup>



**Figura 1.1.** Cuadro del pintor Tony Robert-Fleury ubicado en la *Bibliothèque des Arts Decoratifs* de París. En la obra quedó plasmada una escena en la que Philippe Pinel está quitando las cadenas a unos enfermos mentales en el famoso asilo Salpêtrière después de que la locura fuera considerada una enfermedad y no un crimen.

A finales del siglo XIX y principios del siglo XX se introdujeron las técnicas de tinción para el estudio cerebral y se comenzó a relacionar la demencia senil con la formación de estructuras fibrilares, a las que Max Bielschowsky (creador de la técnica de tinción con plata) le dio el nombre de neurofibrillas.<sup>8</sup> Usando esta técnica, Alois Alzheimer (1864-1915) describió una patología en el cerebro de una mujer (Auguste Deter, 1850-1906), quien había muerto unos años después de desarrollar una demencia clínica inusual a la edad de 51 años. Las nuevas características neuropatológicas que Alzheimer observó consistían en ovillos fibrilares dentro del citoplasma de las

neuronas, los cuales se observaban de forma nítida después de ser impregnadas con plata.

El 3 de noviembre de 1906, en el 37 encuentro de la Sociedad de Psiquiatría del Sureste Alemán en Tübingen (Alemania), Alois Alzheimer presentó las características clínicas y neuropatológicas de esta enfermedad. Unos años después, en 1910, Emil Kraepelin incluyó en la octava edición de su *Libro de Psiquiatría* una descripción detallada de la enfermedad como un subtipo especial de la demencia senil y le dio el nombre de enfermedad de Alzheimer.<sup>9</sup>

## 1.2. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la más común de las enfermedades neurodegenerativas, afectando de manera directa alrededor del 13% de los humanos mayores de 65 años y al 40% de los mayores de 85 años.<sup>10</sup> Es una enfermedad irreversible y progresiva que resulta en una pérdida de la memoria, un comportamiento inusual, cambios de la personalidad y una disminución de las habilidades para razonar.<sup>11</sup> La EA conlleva cambios estructurales en el cerebro que generan una pérdida progresiva de las capacidades neuronales.<sup>12</sup> Estos cambios se caracterizan por la formación de depósitos intracelulares conocidos como ovillos neurofibrilares (NFT, del inglés *NeuroFibrillary Tangles*), constituidos por una proteína del citoesqueleto modificada (la proteína  $\tau$ ), que distorsionan la arquitectura de los microtúbulos y microfilamentos a tal punto que impiden el flujo axonal.<sup>13</sup> También se forman depósitos extracelulares (del péptido amiloide beta,  $A\beta$ ) o placas seniles que interfieren en la sinapsis distorsionando la comunicación neuronal y por tanto, disminuyendo las capacidades mentales, además de participar en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) que provocan daño oxidativo a nivel cerebral.<sup>14</sup>

Las causas que generan la EA no son del todo claras. Dentro de las hipótesis que se han propuesto para explicar las marcas neuropatológicas de esta enfermedad, dos de ellas han sido más respaldadas por las investigaciones desarrolladas: la degeneración citoesquelética neuronal<sup>15</sup> y la cascada del amiloide.<sup>16</sup>

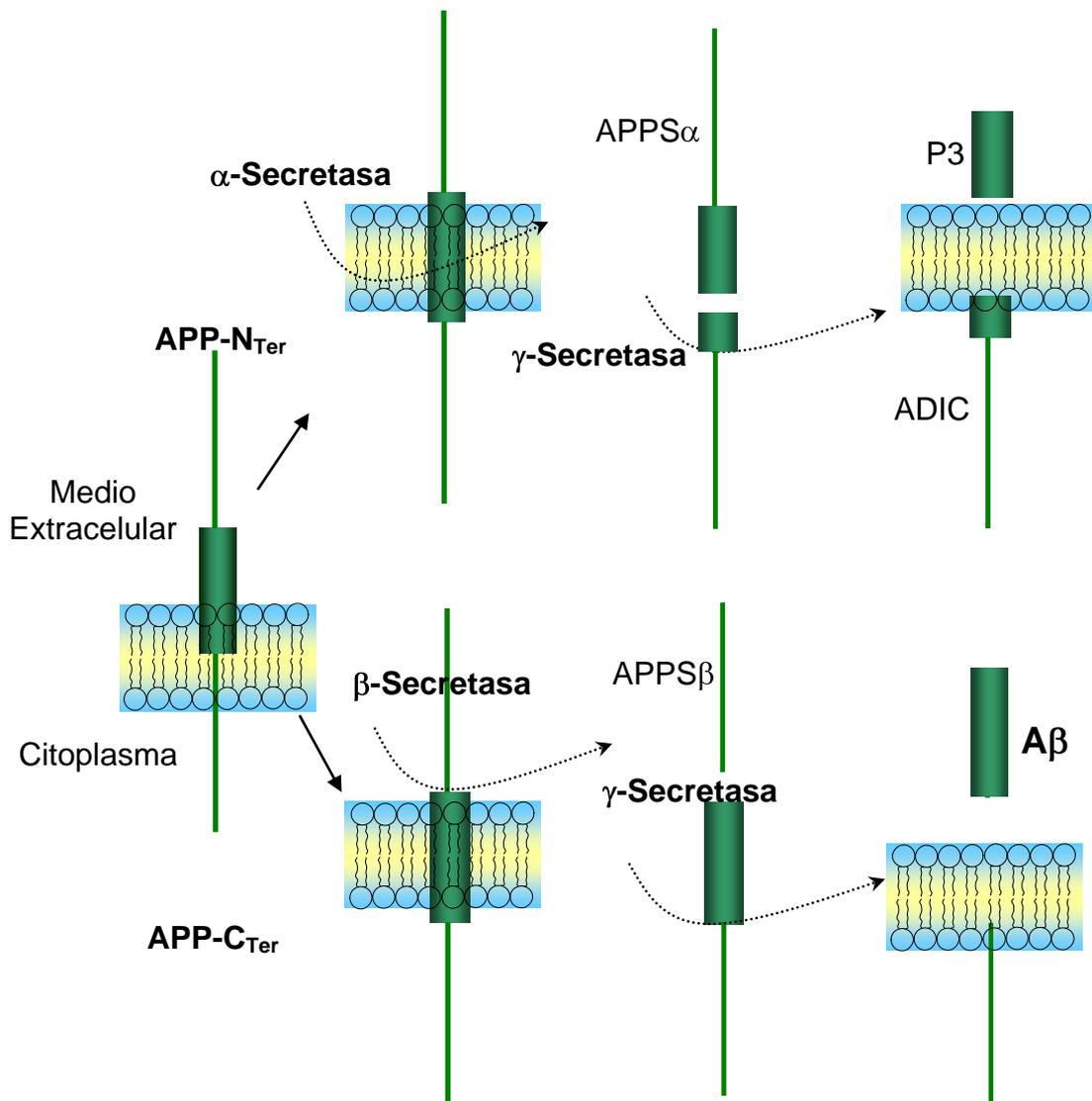
**1.2.1. Hipótesis de la Degeneración Citoesquelética Neuronal.** De acuerdo con esta hipótesis los cambios citoesqueléticos en las neuronas son las causas fundamentales que desencadenan la neurodegeneración en la EA.<sup>17</sup> Se ha sugerido que la formación de filamentos helicoidales apareados (PHFs, del inglés *Paired Helical Filaments*) y NFTs, que se generan debido a la hiperfosforilación y posterior deposición de las proteínas  $\tau$ , se encuentra relacionada con el daño a nivel de los microtúbulos de las neuronas y con la consecuente activación de procesos de muerte celular.<sup>18</sup> Se postula que la presencia de iones de aluminio ( $Al^{3+}$ ) podría favorecer la formación de estos filamentos a través de la interacción de este catión metálico con las proteínas hiperfosforiladas. Sin embargo, la relación entre el aluminio y la EA es bastante controvertida.<sup>19</sup>

La hipótesis de la degeneración citoesquelética neuronal ha sido motivo de debate ya que no hay evidencias genéticas sólidas que permitan relacionar a las proteínas  $\tau$  con la patología de la EA.<sup>20</sup> Sin embargo, la identificación de varias mutaciones en un tipo de enfermedad neurodegenerativa, conocida como demencia frontotemporal, y la enfermedad de Parkinson relacionada al cromosoma 17 (FTDP-17), la cuales son similares a la EA en cuanto a la formación de agregados de proteínas  $\tau$  y muerte neuronal en regiones selectivas del cerebro, ha reforzado esta hipótesis.<sup>9</sup>

**1.2.2. Hipótesis de la Cascada del Amiloide.** Esta hipótesis sostiene que la neurodegeneración en la EA comienza con el procesamiento anormal de la proteína precursora del amiloide (APP, del inglés *Amyloid Precursor Protein*) y termina en la producción, agregación y deposición del péptido  $A\beta$ .<sup>21</sup> Es posible que la cascada de amiloide pueda facilitar la formación de ovillos neurofibrilares y provocar la muerte celular, ya sea como resultado del daño acumulado y/o por apoptosis.<sup>22</sup>

La APP forma parte de una familia de proteínas glicosiladas de transmembrana, las cuales se expresan en todo el organismo pero de manera principal en el cerebro.<sup>23</sup> Aunque no se conoce con claridad su función, estudios *in vivo* con ratones a los cuales se les ha inhibido la producción de APP muestran incrementos en los niveles de cobre en el cerebro, lo que indica que esta proteína tiene un papel clave en la modulación de la homeóstasis del cobre neuronal.<sup>24</sup> La APP forma parte de una serie de glicoproteínas

multifuncionales y constituye una de las fuentes principales del A $\beta$  que forma los depósitos celulares que caracterizan a la EA.<sup>25</sup> La Figura 1.2 muestra de manera esquemática el procesamiento de la APP que puede generar la formación de estas placas cerebrales.



**Figura 1.2.** Proteólisis de la proteína precursora del amiloide (APP) por secretasas. En condiciones normales la mayoría de las proteólisis de la APP proceden por la ruta no amiloidogénica. En primer lugar la  $\alpha$ -secretasa corta la APP en el enlace peptídico entre los aminoácidos 687 y 688 que forman parte de la secuencia del A $\beta$ , lo que impide la formación de este péptido. Luego la  $\gamma$ -secretasa corta el fragmento carboxilo terminal, generando el péptido P3 y el APP de dominio intracelular (ADIC). La ruta alternativa, produce el péptido A $\beta$  por la acción de la  $\beta$ -secretasa y la  $\gamma$ -secretasa.

El mecanismo que relaciona al A $\beta$  con los daños celulares característicos de la EA no está muy bien definido ya que formas monoméricas, oligómeros solubles, oligómeros insolubles y fibrillas insolubles de amiloide se encuentran en equilibrio dinámico en el cerebro.<sup>26</sup> La toxicidad del A $\beta$  y otras proteínas amiloidogénicas ha sido relacionada con los intermedios monoméricos y oligoméricos solubles más que con las fibras insolubles.<sup>21</sup>

## 1.2. PAPEL DE LOS IONES METÁLICOS EN LA EA

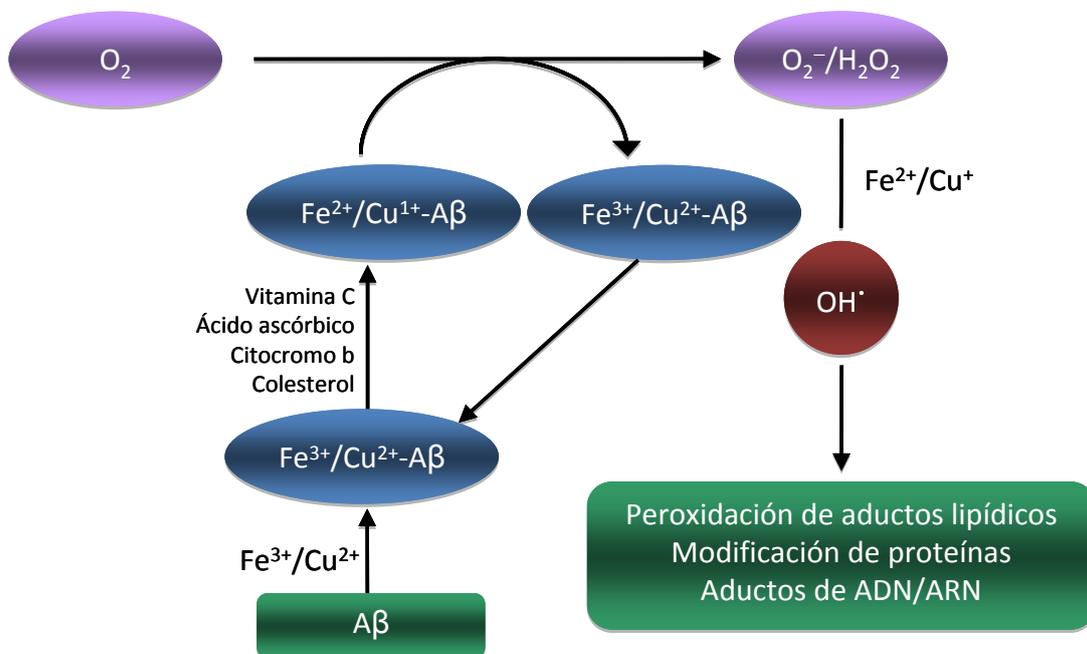
El A $\beta$  es un péptido de entre 39 y 43 aminoácidos, en el que la secuencia de 40 aminoácidos, A $\beta$ (1-40), y la de 42 aminoácidos, A $\beta$ (1-42), son las formas más abundantes. La secuencia del A $\beta$ (1-42) humano es la siguiente:

10	20	30	40
DAEFRHDSGY	EVHHQKLVFF	AEDVGSNKGA	IIGLMVGGVV IA

La forma A $\beta$ (1-40) es la más soluble y por tanto la más estudiada en ensayos *in vitro*. Los dos residuos adicionales en la secuencia del A $\beta$ (1-42) (isoleucina y alanina), debido a su alta hidrofobicidad, disminuyen la solubilidad del péptido y podrían tener influencia en la agregación del mismo.<sup>27</sup> Esto se relaciona con el hecho de que la concentración de A $\beta$ (1-42) secretada es alrededor del 10% de la de A $\beta$ (1-40), sin embargo, el A $\beta$ (1-42) es la forma más abundante en las placas cerebrales.<sup>28</sup>

Las altas concentraciones de iones metálicos encontradas en los análisis *post mortem* de placas cerebrales de pacientes que sufrieron la EA sugieren que la formación de estas agregaciones de péptidos podría estar mediada por algunos de estos iones metálicos esenciales. Varios estudios han demostrado que iones metálicos, tales como Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> o Zn<sup>2+</sup>, pueden inducir la agregación de las formas solubles del amiloide. Los iones de Zn<sup>2+</sup> inducen la agregación a pH 7.4 *in vitro*, mientras que los iones de Cu<sup>2+</sup> son más importantes en la agregación a pH entre 6.6 y 6.8, que representa una ligera acidosis fisiológica.<sup>29</sup> Estas reacciones de agregación son reversibles mediante el uso de agentes quelantes fuertes.<sup>30</sup>

Por otro lado, los iones de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  interactúan con el  $\text{A}\beta$  aumentando la toxicidad del péptido en cultivos celulares.<sup>31</sup> De esta manera los complejos que forman estos metales con el  $\text{A}\beta$  catalizan la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante la reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  y el  $\text{Fe}^{3+}$ , usando  $\text{O}_2$  y agentes reductores naturales (colesterol, vitamina C, ácido ascórbico, L-DOPA o dopamina) como sustratos.<sup>32-33</sup> También se ha sugerido que la reducción de los cationes metálicos está relacionada con la oxidación del  $\text{A}\beta$ , en particular con la tirosina 10 y la metionina 35.<sup>34,35</sup> Se ha encontrado además que el  $\text{A}\beta(1-42)$  contribuye más a la neurotoxicidad que el  $\text{A}\beta(1-40)$ .<sup>21,36</sup> Si no es neutralizado por defensas celulares tales como la catalasa y la glutatión peroxidasa, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido puede atravesar libremente las membranas celulares reaccionando con los iones metálicos reducidos ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{1+}$ ) para generar el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), mediante la reacción de Fenton, el cual a su vez genera la peroxidación de aductos lipídicos, modificaciones en las proteínas y aductos de ácidos nucleicos en varios compartimentos celulares.<sup>32,37</sup> Esta serie de reacciones se muestra de manera simplificada en la Figura 1.3, y constituyen el daño oxidativo característico de la neuropatología de la EA el cual precede a la deposición del  $\text{A}\beta$ .<sup>38,39</sup>



**Figura 1.3.** Producción de especies radicalarias de oxígeno mediante la reacción del oxígeno con complejos formados por los cationes de hierro y cobre con el  $\text{A}\beta$ .

## 1.4. INTERACCIÓN DEL PÉPTIDO A $\beta$ CON CATIONES DE HIERRO Y COBRE

El estudio de la coordinación de los iones metálicos con el péptido A $\beta$  es esencial para entender el papel que éstos tienen en la agregación del péptido y en la producción de especies radicalarias de oxígeno. Además, un buen conocimiento del entorno de coordinación de los cationes metálicos en el péptido es de gran importancia para el diseño racional de nuevos quelantes con potenciales aplicaciones terapéuticas, una área de investigación muy activa.<sup>40-47</sup> A pesar de que los cationes metálicos del zinc, hierro y cobre se encuentran relacionados con la precipitación del A $\beta$ , en esta sección describiremos en detalle los dos últimos, ya que constituyen el motivo central de esta tesis.

**1.4.1. Interacción del Cu<sup>2+</sup> con el Péptido A $\beta$ .** En los últimos años varios estudios han fijado su atención en la determinación de las propiedades de la coordinación de cationes metálicos con el péptido A $\beta$ , en especial el Cu<sup>2+</sup>, pero esta coordinación es aún controvertida y altamente dependiente del pH. Estudios de resonancia paramagnética de electrones (EPR, del inglés *Electron Paramagnetic Resonance*) y experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) en sistemas Cu<sup>2+</sup>-A $\beta$ (1-28) a pH fisiológico revelan una configuración plano cuadrada para el Cu<sup>2+</sup>, siendo la esfera de coordinación más probable del tipo 3N1O, con las histidinas 6, 13 y 14 formado parte de dicho entorno de coordinación.<sup>48</sup> A partir de experimentos de espectroscopía Raman el átomo de O fue inicialmente asignado al grupo hidroxilo de la tirosina 10. Sin embargo, estudios experimentales posteriores en los que se usó un mutante del péptido A $\beta$  en el cual la tirosina 10 fue reemplazada por una fenilalanina, dieron como resultado la misma esfera de coordinación y afinidades por cobre similares lo que sugiere que la presencia de dicho aminoácido es bastante improbable.<sup>49-52</sup> Viles *et al.*, usando un conjunto complementario de técnicas espectroscópicas que incluyen dicroísmo circular, EPR y RMN asignaron una coordinación tipo 4N que involucra las 3 histidinas antes mencionadas y el grupo N terminal a pH = 7.4, y coordinaciones que

involucran nitrógenos de grupos amida deprotonadas a pH superior.<sup>49</sup> Estudios EXAFS (*Extended X-ray absorption fine structure*) a pH = 7.4 proponen un entorno hexacoordinado del tipo 3N3O que incluye las tres histidinas, ácidos aspárticos y/o glutámicos y una molécula de agua en la posición axial.<sup>53</sup> Investigaciones más recientes por medio de espectroscopía CW-EPR (*continuous wave electron paramagnetic resonance*) y HYSCORE (*hyperfine sublevel correlation spectroscopy*) apoyan la hipótesis de una esfera de coordinación 3N1O.<sup>54-56</sup> A pH entre 6.3 y 6.9 estos experimentos indican que esta esfera de coordinación surge de la coordinación del grupo amino terminal, las histidinas 6 y 13 (o 14 en equilibrio) y un átomo de oxígeno del aspartato 1,<sup>54,56</sup> mientras que a pH ligeramente superior la coordinación es debida a las tres histidinas y el grupo carbonilo de la alanina 2.<sup>55</sup> Estos estudios también ponen de manifiesto que pueden coexistir entornos diferentes con valores de EPR casi indistinguibles. Por otro lado, otros estudios recientes de EPR indican que a pH = 9 sólo una de las histidinas junto con el grupo N terminal, el nitrógeno amida y el oxígeno carbonilo de la alanina 2 son ligandos ecuatoriales del Cu<sup>2+</sup>.<sup>56</sup> En general, todos estos estudios parecen indicar que el entorno de coordinación del Cu<sup>2+</sup> en el complejo Cu<sup>2+</sup>-A $\beta$  es bastante sensible al pH y que distintos modos de coordinación pueden coexistir en equilibrio.

Por otra parte, la coordinación del cobre con el A $\beta$  ha sido estudiada también desde un punto de vista computacional.<sup>57-61</sup> En particular, un estudio *ab initio* de ligandos modelo muestra que la metionina 35 y las cadenas laterales de las histidinas presentan una gran afinidad para coordinarse con el Cu<sup>2+</sup> en el A $\beta$ . El uso de ligandos modelo para simular las cadenas laterales de algunos de los aminoácidos que posiblemente se coordinan al cobre permitió calcular las energías de desplazamiento de una molécula de H<sub>2</sub>O o NH<sub>3</sub>, mostrando que el cobre prefiere entornos de coordinación que incluyan los grupos imidazoles de las histidinas, los grupos carboxilatos y/o el grupo N-terminal.<sup>57</sup> Sin embargo, no contempló la posibilidad de incluir las tres histidinas coordinadas al metal de manera simultánea, entorno que corresponde al modo de coordinación más aceptado, y tampoco consideró las desprotonaciones que puede presentar estas cadenas laterales en el medio celular, inducidas por la coordinación del metal.<sup>62</sup> También se ha estudiado el mecanismo de producción de peróxido de

hidrógeno debido a la coordinación del  $\text{Cu}^{2+}$  usando péptidos modelo. Este estudio propone como primer paso la reducción de los complejos de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$ , para luego formar un aducto con el  $\text{O}_2$ . Éste puede ser reducido mediante una transferencia de un electrón dando lugar al aducto  $\text{Cu}^{2+}\text{-OO}^-$ . La posterior transferencia de otro electrón, proveniente de un agente reductor externo, acoplado a un protón permite formar un aducto entre el  $\text{HOO}^-$  y el  $\text{Cu}^{2+}$ . Posteriormente, el  $\text{HOO}^-$  se protona generando  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante un mecanismo asociativo-disociativo.<sup>58</sup> En esta propuesta se encontró que la metionina 35 es clave en las reacciones de oxidación-reducción que se llevan a cabo, a la vez que descarta la participación de la tirosina 10 como candidato a este respecto, tal como habían propuesto Bush *et al.*<sup>63</sup> Estos estudios con sistemas modelo han proporcionado información muy valiosa, sin embargo, no tienen en cuenta los cambios conformacionales que puede sufrir el péptido debido a la coordinación del metal.

También, se han realizado estudios computacionales en sistemas más grandes considerando el  $\text{A}\beta$  completo mediante simulaciones de dinámica molecular clásica<sup>59,60,64</sup> y por consiguiente, sin introducir de manera explícita los sutiles efectos electrónicos del  $\text{Cu}^{2+}$ . Estas simulaciones muestran que el grupo amino terminal se puede coordinar al  $\text{Cu}^{2+}$ , cuando están coordinadas las tres histidinas, pero descarta la participación de la tirosina 10 y la metionina 35 en la esfera de coordinación del metal.<sup>65</sup> Asimismo, se han realizado simulaciones de dinámica molecular *ab initio* Carr Parrinello (CPMD) con el funcional PBE para modelos simplificados del complejo  $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta(1\text{-}14)$ , sin embargo, no se pudo extraer ninguna conclusión firme de estas simulaciones debido a que sólo se utilizó el esqueleto peptídico y algunas cadenas laterales, por lo que los autores sugirieron que es necesario un modelo más completo para poder entender completamente el papel de los diferentes componentes del sistema.<sup>61</sup> Las aproximaciones QM/MM que combinan métodos de mecánica cuántica (QM) con métodos de mecánica molecular (MM) tienen la virtud de que permiten tratar de manera detallada sistemas de tamaño más realistas. Estas dos estrategias han sido utilizadas con éxito para investigar, por ejemplo, la coordinación del cobre con la proteína Prion (PrP),<sup>66-69</sup> pero no para el estudio de la especificidad de las propiedades de los metales de transición en el proceso de agregación del  $\text{A}\beta$ .

**1.4.2. Interacción de los Cationes de Fe<sup>2+/3+</sup> con el Péptido Aβ.** El hierro es uno de los metales más abundantes en humanos y es esencial en la mayoría de las células. Entre otras cosas es fundamental para el normal funcionamiento del cerebro y está involucrado en funciones celulares tales como el transporte mitocondrial de electrones, la síntesis y degradación de proteínas y el ADN, la mielinización de los axones y el funcionamiento de enzimas, incluyendo aquellas involucradas en la producción y el metabolismo de neurotransmisores.<sup>70,71</sup> Los cationes metálicos del hierro se caracterizan por poseer una alta actividad redox y además, se encuentran presentes en las placas seniles de análisis *post mortem* de cerebros de personas que sufrieron la EA.<sup>72</sup> A pesar de su importancia, el hierro no ha sido investigado en profundidad, ni experimental ni teóricamente en el contexto del Aβ y la EA. De hecho, no hay datos suficientes acerca de la interacción de los cationes del hierro con el Aβ tales como su afinidad precisa, la esfera de coordinación del metal, los residuos relevantes implicados en la segunda esfera de coordinación o el estado de espín para el hierro. Estudios de espectroscopía Raman de los complejos Fe<sup>3+</sup>-Aβ, mostraron que el hierro se coordina al Aβ a través del oxígeno fenólico de la tirosina 10.<sup>73</sup> Asimismo, se sugiere que las histidinas en la región hidrofílica (aminoácidos del 1 al 16) del Aβ no se coordinan al Fe<sup>3+</sup>,<sup>74</sup> en contraste con lo que indica un estudio *in vitro* de Nakamura *et al.*<sup>75</sup> en el que se relacionan las tres histidinas con la actividad redox de los cationes de hierro presentes en las placas seniles. Por otro lado, algunos estudios recientes han demostrado que la interacción del Aβ con el hierro en la forma de grupo hemo resulta favorable y se proponen las histidinas, arginina y tirosina como los ligandos más probables.<sup>76-78</sup>

La relevancia del estudio de la coordinación del hierro con el Aβ radica en el hecho de que los complejos Fe<sup>2+/3+</sup>-Aβ pueden estar involucrados en la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de forma análoga a lo comentado anteriormente para los complejos Cu<sup>1+/2+</sup>-Aβ.<sup>79</sup> En este sentido, Jiang *et al.* calcularon el potencial de reducción estándar del complejo ternario Fe<sup>3+</sup>-Aβ-NIA (NIA = ácido nitriloacético)<sup>79</sup>, y concluyeron que el Aβ modula el potencial redox del hierro de forma que puede tener lugar un ciclo catalítico como el mostrado en la Figura 1.3. Con un exceso de peróxido de hidrógeno, y la presencia de

los cationes metálicos en su forma reducida, se dan las condiciones propicias para que se lleven a cabo reacciones tipo Fenton que desencadenan la generación de especies radicalarias de oxígeno, una de las marcas neuropatológicas más importantes de la EA. El posible papel de los iones de hierro en la patología de la EA constituye pues, una nueva e importante área de investigación dentro del mecanismo molecular de la EA. Por esta razón es necesario disponer de más información acerca de los tipos de interacciones presentes entre el hierro y el A $\beta$ .

Teniendo en cuenta el aumento registrado en la esperanza de vida, se espera que la población de adultos mayores aumente de forma considerable en los próximos años, lo que convierte a la EA en un importante problema de salud pública. En este contexto, el tratamiento de este problema requiere una comprensión a nivel molecular de los procesos que tienen lugar en el desarrollo de la enfermedad, por lo que se necesita un enfoque multidisciplinar para entender los mecanismos de la enfermedad, así como para proponer posibles moléculas para uso terapéutico. En este sentido, nuestra investigación está centrada en el estudio computacional de los procesos químicos a nivel molecular que implican la interacción de especies relevantes en la EA con los cationes metálicos Fe<sup>2+/3+</sup> y Cu<sup>1+/2+</sup>, y pretende aportar información acerca de la naturaleza de dichas interacciones y las consecuencias moleculares que éstas implican. En el siguiente capítulo se presenta una descripción más detallada de los objetivos planteados en esta tesis.

# 2

## OBJETIVOS

Uno de los retos actuales en la enfermedad de Alzheimer es la determinación de la estructura y reactividad de los complejos formados entre algunos cationes metálicos presentes en el medio cerebral, tales como el  $\text{Fe}^{2+/3+}$  y el  $\text{Cu}^{1+/2+}$ , y el péptido  $\beta$ -amiloide ( $\text{A}\beta$ ). Sin embargo, el avance en la investigación de estos sistemas se ha visto obstaculizado por el hecho de que los complejos de cationes metálicos con el  $\text{A}\beta$  no forman cristales que puedan ser analizados por experimentos de difracción de rayos X. Bajo estas consideraciones el modelado computacional puede proveer información estructural muy útil, así como una visión en profundidad sobre los mecanismos de interacción que permitan comprender su papel, tanto en la agregación como en las reacciones relacionadas con la neuropatología de la enfermedad.

En este contexto, en esta tesis nos hemos propuesto tratar diversos aspectos de relevancia en la enfermedad de Alzheimer, tales como la afinidad de los cationes  $\text{Cu}^{1+/2+}$  y  $\text{Fe}^{2+/3+}$  por el péptido  $\text{A}\beta$ , la determinación de entornos de coordinación de estos cationes metálicos, y el análisis en profundidad de la estructura electrónica de los complejos formados. Asimismo, determinamos la influencia de la coordinación en el potencial redox de los metales o en el  $\text{p}K_a$  de los ligandos que lo coordinan.

Para muchos de estos estudios el uso de sistemas modelo resultó de gran utilidad, pero los resultados derivados de éstos tienen un alcance limitado, lo que nos motivó a realizar estudios usando modelos más realistas. Para ello, fue necesario desarrollar un protocolo que permitiera construir y evaluar dichos modelos, para a partir de ellos obtener información relevante acerca del efecto de la coordinación del metal en la estructura completa del A $\beta$  y las propiedades de los complejos formados.

En este sentido, para desarrollar esta tesis nos planteamos cinco objetivos específicos que se describen de manera condensada en los siguientes puntos:

1. Evaluar las afinidades de los cationes Fe<sup>2+/3+</sup> con la secuencia His13-His14 presente en el A $\beta$ , así como con otros ligandos relevantes (His6 y Tyr 10), y analizar cómo la coordinación de estos ligandos modifica el potencial de reducción estándar del par Fe<sup>3+/2+</sup>. Asimismo, nos propusimos simular y analizar los espectros Raman de los complejos más estables con el Fe<sup>3+</sup> para poder compararlos con los datos experimentales disponibles.

2. Estudiar la esfera de coordinación de los complejos Cu<sup>2+</sup>-A $\beta$  a partir de cálculos DFT usando modelos simples que representen fragmentos del péptido con potencial afinidad por el Cu<sup>2+</sup>, tomando como base la hipótesis generalmente aceptada de que las tres histidinas están coordinadas simultáneamente.

3. Determinar la influencia de la coordinación del Cu<sup>2+</sup> en el pK<sub>a</sub> de las histidinas utilizando el imidazol como modelo, y mediante el uso de varios protocolos y cálculos cuánticos de alto nivel.

4. Construir modelos para el complejo Cu<sup>2+</sup>-A $\beta$ (1-16), que corresponde a la región de afinidad por cobre, a través de una propuesta metodológica que incluye el uso de técnicas de modelado por homología, cálculos ONIOM(DFT:UFF) y cálculos DFT de estructura electrónica; usando la información estructural obtenida en el Punto 2 para los sistemas modelo del Cu<sup>2+</sup> y las estructuras RMN del complejo Zn<sup>2+</sup>-A $\beta$ (1-16) depositadas en el PDB (*Protein Data Bank*).

5. Determinar la influencia de la coordinación del cobre al A $\beta$ (1-16) a partir de la reducción de los complejos Cu<sup>2+</sup>-A $\beta$ (1-16) más estables encontrados en el punto 4, y explicar estos resultados en el contexto de la bioquímica de la enfermedad de Alzheimer.



# 3

## ASPECTOS METODOLÓGICOS DEL CÁLCULO COMPUTACIONAL DE SISTEMAS BIOLÓGICOS CON METALES DE TRANSICIÓN

El estudio de la interacción de los cationes metálicos  $\text{Fe}^{2+/3+}$  y  $\text{Cu}^{1+/2+}$  con el péptido  $\text{A}\beta$  presenta dos características particulares que impiden una aplicación estándar de los métodos de la química computacional: *i*) todos estos metales de transición, excepto el  $\text{Cu}^{1+}$ , son metales de capa abierta y *ii*) el número de estructuras posibles de los complejos derivados de la interacción de estos cationes con el péptido  $\text{A}\beta$  es muy elevado.

El primero de estos puntos es muy importante ya que debido a la naturaleza de capa abierta de estos sistemas, pueden existir diversos estados electrónicos cercanos en energía entre sí y por tanto, deben explorarse todos ellos. Por otra parte, es importante utilizar un funcional de la densidad que describa correctamente la estabilidad relativa de los distintos estados electrónicos, y esto a menudo no es sencillo, especialmente cuando los estados electrónicos presentan distinto espín.

Respecto al segundo punto, se debe recurrir a estrategias que permitan combinar los datos experimentales disponibles, los métodos de la química cuántica y el modelado por

homología para determinar cuáles pueden ser las estructuras de los complejos metal-A $\beta$  más plausibles.

El objetivo del presente capítulo es hacer una revisión general de los métodos computacionales usados a lo largo de esta tesis, el cual está dividido en tres secciones que corresponden a los tipos de métodos computacionales usados. En la primera sección se consideran distintos métodos de estructura electrónica. A continuación se tratan los métodos híbridos QM/MM y, por último, se presentan los métodos de modelado por homología, los cuales se utilizaron para el estudio de los sistemas Cu<sup>2+</sup>-A $\beta$ (1-16) en combinación con los métodos de estructura electrónica. Los detalles específicos se detallan en cada capítulo junto con las funciones de bases seleccionadas y las aproximaciones utilizadas. Esta revisión no pretende ser un trabajo monográfico sobre los métodos computacionales, por consiguiente, se citan las referencias más relevantes, en caso de que el lector desee profundizar en los temas señalados.

### 3.1. MÉTODOS DE ESTRUCTURA ELECTRÓNICA

El objetivo final de los métodos de cálculo de la química cuántica es solucionar la ecuación de Schrödinger no relativista e independiente del tiempo:

$$\hat{H}\Psi(r, R) = E\Psi(r, R) \quad (3.1)$$

donde  $\Psi(r, R)$  es la función de onda que depende de las coordenadas nucleares y electrónicas,  $E$  es el valor numérico de la energía del estado descrito por  $\Psi$  y  $\hat{H}$  es el operador Hamiltoniano del sistema, considerando los  $M$  núcleos y  $N$  electrones que lo integran. Debido a que los núcleos se mueven mucho más lentamente que los electrones, se puede considerar que los electrones se mueven en el campo generado por los núcleos fijos. Esta aproximación se conoce como aproximación de Born-Oppenheimer, y reduce el problema a la solución de la ecuación de Schrödinger electrónica.

Usando esta aproximación se puede resolver de manera exacta la ecuación de Schrödinger para un sistema monoeléctrico; sin embargo, cuando se consideran sistemas de más de un electrón es necesario el cálculo de términos bielectrónicos, y por tanto deben considerarse nuevas aproximaciones. El método *ab initio* más simple para sistemas polielectrónicos es el método de Hartree-Fock,<sup>80</sup> que se describe en la siguiente sección.

**3.1.1. El Método de Hartree-Fock.** El método de Hartree-Fock (HF) es un método variacional que utiliza como función de prueba un producto antisimetrizado de funciones de onda monoeléctricas (espín-orbitales), conocido como determinante de Slater. Los espín-orbitales ( $\chi_i$ ) usados en el determinante de Slater son funciones ortonormales que representan un electrón del sistema y se forman del producto de una función orbital espacial  $\phi_i(\vec{r})$  y una función de espín,  $\alpha(s)$  o  $\beta(s)$ . El determinante de Slater que genera el valor más bajo posible de energía se obtiene minimizando la misma respecto a los espín-orbitales, bajo la condición de que permanezcan ortonormales durante la minimización. Las ecuaciones resultantes son las ecuaciones de HF:

$$\hat{f}\chi_i = \varepsilon_i \chi_i, \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (3.2)$$

Este procedimiento da como resultado  $N$  ecuaciones (siendo  $N$  el número de electrones del sistema) en los cuales las  $\varepsilon_i$  son las energías de los correspondientes espín-orbitales y  $\hat{f}$  es el operador de Fock, que incluye el potencial promedio creado por los núcleos y por el resto de electrones sobre el electrón  $i$ . Así, en el método de HF cada electrón se mueve en este campo promedio.

La expresión de  $\hat{f}$  incluye los espín-orbitales buscados y por tanto para poder solucionar las ecuaciones de Hartree-Fock se sigue un proceso iterativo conocido como método del campo autoconsistente (SCF, del inglés *Self-Consistent Field*).

**Conjunto de Funciones de Bases.** Para la resolución de las ecuaciones de HF, Roothaan<sup>81</sup> y Hall<sup>82</sup> propusieron expresar cada orbital molecular como una combinación

lineal de orbitales atómicos, que son los que constituyen el conjunto de funciones de bases:

$$\phi_i = \sum_{\nu}^K c_{\nu i} \varphi_{\nu} \quad (3.3)$$

En esta ecuación los coeficientes  $c_{\nu i}$  se determinan variacionalmente y el término  $\varphi_{\nu}$  son las llamadas funciones de bases. La menor energía posible mediante la aproximación HF (el límite HF) es la que se obtiene al considerar un número infinito de funciones de base. Dado que ello no es posible, se debe escoger un conjunto finito de funciones de bases. Un conjunto de funciones de base mínima consta de una función de base por orbital. Sin embargo, para mejorar los resultados es necesario usar conjuntos de bases más extensos. Estos conjuntos de bases son los llamados doble- $\zeta$ , triple- $\zeta$ , etc. dependiendo de si cada orbital atómico se describe con dos, tres, etc. funciones de bases. Además, funciones de momento angular más alto, llamadas funciones de polarización, son también necesarias para describir la distorsión de la distribución electrónica debida al enlace. Finalmente, funciones difusas con exponentes más pequeños, pero el mismo momento angular, permiten describir una densidad electrónica más expandida.

**3.1.2. Métodos Post Hartree-Fock.** La diferencia entre la energía exacta no relativista y la energía límite HF se denomina energía de correlación electrónica:<sup>83</sup>

$$E_{corr} = E_0 - E_{HF} \quad (3.4)$$

Esta energía de correlación es una medida del error introducido al usar el método HF y se debe principalmente a las repulsiones instantáneas de los electrones, la cual no se tiene en cuenta usando el método HF, ya que éste considera un potencial promedio que no impide que los electrones se acerquen demasiado, generando un aumento en la repulsión electrónica, lo que redundaría en un valor mayor de la  $E_{HF}$ . Este tipo de

correlación es la llamada correlación dinámica ya que está relacionada con el movimiento real de los electrones individuales. La segunda contribución importante a la energía de correlación es la llamada correlación no dinámica, la cual está relacionada con el hecho de que en ciertas circunstancias pueden existir otros determinantes de Slater de energías similares al determinante de Slater del estado fundamental.

Los métodos post Hartree-Fock introducen la energía de correlación partiendo del método HF. Dos de estos métodos, usados en el desarrollo de esta tesis, son el método perturbativo de Møller-Plesset,<sup>84,85</sup> y el método de *Coupled Cluster*.<sup>86-88</sup> Aunque de este último se ha desarrollado una variante multiconfiguracional que permite introducir correlación no dinámica, los cálculos *coupled cluster* realizados en esta tesis se basaron en el formalismo monodeterminantal.

**Métodos de Møller-Plesset.** El método Møller-Plesset se basa en la teoría de perturbaciones (*Many Body Perturbation Theory*),<sup>89,90</sup> la cual consiste en dividir el Hamiltoniano en dos contribuciones: una contribución de orden cero ( $\hat{H}_0$ ), de la cual se conocen las funciones propias  $\Psi_a^{(0)}$  y los valores propios  $E_a^{(0)}$  y un operador de perturbación ( $\hat{V}$ ):

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{V} \quad (3.5)$$

La función de onda y la energía son iguales a los valores de orden cero más los valores de todas las correcciones de orden superior consideradas:

$$\Psi_a = \Psi_a^{(0)} + \Psi_a^{(1)} + \Psi_a^{(2)} + \dots \quad (3.6)$$

$$E_a = E_a^{(0)} + E_a^{(1)} + E_a^{(2)} + \dots \quad (3.7)$$

Se puede demostrar que la corrección de orden  $n$  a la energía es:

$$E_a^{(n)} = \left\langle \Psi_a^{(0)} \left| \hat{V} \right| \Psi_a^{(n-1)} \right\rangle \quad (3.8)$$

En el método de Møller-Plesset el Hamiltoniano de orden cero se define como la suma de operadores de Fock monoeléctricos, de manera que la suma de  $E^{(0)}$  más  $E^{(1)}$  es igual a la  $E_{\text{HF}}$ , lo que significa que se deben tener en cuenta correcciones de orden superior para poder incorporar la correlación electrónica. La teoría de perturbaciones de segundo orden de Møller-Plesset (MP2) es con diferencia la más usada, ya que incorpora un gran porcentaje de la correlación electrónica a un coste computacional razonable.

**Métodos *Coupled Cluster*.** Este método es uno de los que incluyen la correlación electrónica de forma más exhaustiva. La función de onda en el método *coupled cluster* se expresa como:

$$\Psi_{CC} = e^{\hat{T}} \Psi_{HF} \quad (3.9)$$

donde  $\Psi_{HF}$  es la función de onda HF. La exponencial  $e^{\hat{T}}$  puede expandirse en serie como un sumatorio de todas las posibles excitaciones:

$$e^{\hat{T}} = 1 + \hat{T} + \frac{1}{2!} \hat{T}^2 + \frac{1}{3!} \hat{T}^3 + \dots \quad (3.10)$$

$$\hat{T} = \hat{T}_1 + \hat{T}_2 + \hat{T}_3 + \dots \quad (3.11)$$

donde  $\hat{T}$  es el operador *coupled cluster*, y  $\hat{T}_1, \hat{T}_2, \hat{T}_3 \dots$  etc, son los operadores que originan excitaciones simples, dobles, triples, de la función de onda de referencia. De esta manera, si aplicamos el operador  $\hat{T}_2$  sobre la función de onda HF nos queda:

$$\hat{T}_2 \Psi_0 = \sum_i^{\text{occ}} \sum_{j>i}^{\text{occ}} \sum_a^{\text{virt}} \sum_{b>a}^{\text{virt}} t_{ij}^{ab} \Psi_{ij}^{ab} \quad (3.12)$$

Con este procedimiento se generan los determinantes de las diexcitaciones  $\Psi_{ij}^{ab}$  mediante el intercambio de los espín-orbitales ocupados  $i$  y  $j$  con los espín-orbitales virtuales  $a$  y  $b$ . Los coeficientes *coupled cluster*  $t_{ij}^{ab}$  son también llamados amplitudes. Se puede observar que, como consecuencia de la expansión en serie de la función exponencial, tenemos unos componentes llamados conectados ( $\hat{T}_1, \hat{T}_2, \hat{T}_3 \dots$  etc) y otros componentes llamados desconectados ( $\hat{T}_1 \hat{T}_2, \hat{T}_1^2 \dots$  etc).

El método *coupled cluster* más usado (debido a su coste computacional) incluye las excitaciones simples y dobles (CCSD).<sup>91</sup> La expansión hasta  $\hat{T}_2$  tiene en cuenta las excitaciones triples desconectadas  $\hat{T}_1 \hat{T}_2, \hat{T}_1^3$  y la excitación cuádruple  $\hat{T}_2^2$ . Una variante del método CCSD es el método CCSD(T), en el que las excitaciones triples conectadas se introducen de forma perturbativa.<sup>92</sup>

Aunque la energía de correlación representa sólo ~1% de la energía total del sistema, es crucial en el cálculo de diferencias de energía. Esto hace que los métodos de función de onda que incorporan la energía de correlación sean de mucha utilidad. Sin embargo, la principal desventaja de estos métodos es que requieren un esfuerzo computacional elevado, por lo que sólo pueden ser aplicados a sistemas moleculares de tamaño limitado. Una alternativa más barata en términos computacionales para incorporar la energía de correlación son los métodos basados en la densidad electrónica, que describimos en la siguiente sección, partiendo de los principios básicos asociados a esta metodología hasta los diferentes tipos de funcionales utilizados hoy en día en química computacional, prestando especial interés en aquellos utilizados durante el desarrollo de esta tesis.

**3.1.3. Teoría del Funcional de la Densidad.** La DFT (del inglés *Density Functional Theory*) se ha afianzado en los últimos años como una herramienta poderosa para el estudio computacional de sistemas químicos. Esta teoría se basa en que la energía de un sistema electrónico puede ser definida en términos de su densidad electrónica ( $\rho$ ):

$$\rho(\vec{r}) = N \int \dots \int |\Psi(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N)|^2 d\vec{x}_1 d\vec{x}_2 \dots d\vec{x}_N \quad (3.13)$$

De esta manera, para un sistema con  $N$  electrones,  $\rho(\vec{r})d\vec{r}$  representa la probabilidad de encontrar cualquiera de los  $N$  electrones del sistema en el elemento de volumen  $d\vec{r}$ , independientemente de dónde se encuentren el resto de los  $N - 1$  electrones.  $\rho(\vec{r})$  es una función no negativa de las 3 coordenadas espaciales que se hace cero cuando  $\vec{r}$  tiende a infinito y que integra al número total de electrones del sistema:

$$\rho(\vec{r} \rightarrow \infty) = 0, \quad \int \rho(\vec{r})d\vec{r} = N \quad (3.14)$$

A diferencia de la función de onda, la densidad electrónica es un observable y puede ser medido experimentalmente (por ejemplo, por difracción de rayos X).

La ventaja que tienen los métodos del funcional de la densidad sobre los métodos basados en la función de onda, es que, para un sistema compuesto por  $N$  electrones, la función de onda depende de  $4N$  coordenadas (3 coordenadas por cada electrón y una más si se considera el espín); mientras que la densidad electrónica sólo depende de tres coordenadas, sin importar el número de electrones que constituyan el sistema.<sup>83</sup> Por lo tanto, mientras la complejidad de la función de onda aumenta con el número de electrones, la densidad electrónica mantiene el mismo número de variables, aunque se aumente el tamaño del sistema en estudio. Varios trabajos de revisión enfocados en la variedad de aspectos teóricos, desarrollos metodológicos y aplicación práctica de la DFT a problemas específicos se pueden encontrar en la literatura.<sup>93-103</sup>

La teoría de la DFT se basa en dos teoremas, los cuales describimos en la siguiente sección.

**El teorema de Hohenberg-Kohn.** Este teorema postula que cualquier observable de un estado fundamental no degenerado de un sistema electrónico de  $N$  partículas puede ser determinado a partir de la densidad electrónica de este estado fundamental.<sup>104</sup> En particular, la energía electrónica se puede expresar como:

$$E[\rho] = T[\rho] + E_{ee}[\rho] + E_{ext}[\rho] \quad (3.15)$$

donde  $T[\rho]$  es el funcional de energía cinética,  $E_{ee}[\rho]$  el funcional que representa las interacciones entre electrones, el cual puede descomponerse en dos componentes: uno coulombico y un componente que incluye todas las repulsiones bielectrónicas no clásicas. Finalmente  $E_{ext}[\rho]$  es la energía de interacción con un potencial externo, normalmente debido a la interacción entre los electrones y los núcleos.

El segundo teorema establece que la energía electrónica, calculada usando la Ecuación 3.15, a partir de cualquier densidad de prueba ( $\tilde{\rho}$ ), será siempre mayor o igual a la energía del estado fundamental. Esto es:

$$E_0 \leq E[\tilde{\rho}] = T[\tilde{\rho}] + E_{ee}[\tilde{\rho}] + E_{ext}[\tilde{\rho}] \quad (3.16)$$

Estos dos teoremas fundamentan la relación entre la densidad electrónica y la energía del estado fundamental, pero no establecen la forma del funcional.

W. Kohn y L. Sham<sup>104</sup> en 1965 propusieron un método que permite su implementación práctica utilizando orbitales atómicos.

**Metodología del Campo Autoconsistente de Kohn-Sham.** En este formalismo se introduce un sistema de electrones no interaccionantes descrito por funciones monoeléctricas, de tal forma que tiene la misma densidad  $\rho_s(\vec{r})$  que el sistema de electrones interaccionantes  $\rho(\vec{r})$ :

$$\rho_s(\vec{r}) = \sum_{i=1}^N |\phi_i|^2 = \rho(\vec{r}) \quad (3.17)$$

De esta forma, el funcional de la energía se redefine como:

$$E[\rho] = T_s[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho] + E_{ext}[\rho] \quad (3.18)$$

donde  $T_S[\rho]$  corresponde a la energía cinética del sistema de electrones sin interacción y viene dado por:

$$T_S = \sum_i^N \left\langle \chi_i \left| -\frac{1}{2} \nabla^2 \right| \chi_i \right\rangle \quad (3.19)$$

$J[\rho]$  es el funcional de las interacciones de Coulomb electrón-electrón clásicas y  $E_{XC}[\rho]$  es la energía de correlación intercambio que incluye las interacciones electrónicas no clásicas y la cinética de correlación ( $T_{XC}[\rho]$ ):

$$E_{XC}[\rho] = (T_{XC}[\rho]) + (E_{ee}[\rho] + J[\rho]) \quad (3.20)$$

De esta manera,  $E_{XC}[\rho]$  incluye todos los términos desconocidos.

La densidad electrónica se calcula solucionando las  $N$  ecuaciones monoeléctricas que resultan de minimizar la energía  $E[\rho]$  en el sentido variacional:

$$\hat{h}^{KS} \chi_i = \varepsilon_i \chi_i, \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (3.21)$$

Estas son las ecuaciones de Kohn-Sham, en las que  $\hat{h}^{KS}$  representa al operador de Kohn-Sham,  $\chi_i$  son los llamados espín-orbitales de Kohn-Sham y las  $\varepsilon_i$  son las energías asociadas a dichos orbitales.

Las ecuaciones de Kohn-Sham se solucionan de manera iterativa. Debido a que  $\hat{h}^{KS}$  depende de la densidad electrónica, se toma como punto de partida una densidad electrónica de prueba  $\tilde{\rho}$ , la cual para un sistema molecular puede ser obtenida mediante la superposición de las densidades de los átomos que lo constituyen.

Los orbitales Kohn-Sham se expresan como combinación lineal de un conjunto de funciones de bases. De esta manera, solucionar las ecuaciones de Kohn-Sham

corresponde a la determinación de los coeficientes de la combinación lineal, de forma similar al procedimiento usado en cálculos Hartree-Fock.

La principal dificultad de la DFT radica en que se desconoce la forma exacta del funcional  $E_{xc}[\rho]$ . Los diferentes métodos DFT usan diversas aproximaciones de este término para aplicar el método Kohn-Sham. Habitualmente, se separa esta energía en dos contribuciones: un término de intercambio  $E_x$  y un término de correlación  $E_c$ :

$$E_{xc}[\rho] = E_x[\rho] + E_c[\rho] \quad (3.22)$$

El término de intercambio está asociado con las interacciones entre los electrones del mismo espín, y el término de correlación son interacciones entre electrones de espines opuestos. Estos términos son conocidos como funcional de intercambio y funcional de correlación. Ambos pueden ser de dos tipos: locales, que dependen sólo de la densidad electrónica  $\rho$ , y del gradiente generalizado que dependen de  $\rho$  y de su gradiente  $\nabla\rho$ . Estos dos tipos de funcionales serán descritos en las siguientes secciones. A pesar del progreso en esta área, es importante tener en cuenta que la principal fuente de incertidumbre en la DFT sigue siendo debido a la naturaleza aproximada de este funcional.

**Aproximación de la Densidad Local.** La aproximación de la densidad local (LDA, del inglés *Local Density Approximation*) constituye la aproximación más simple para representar el funcional de correlación-intercambio. En esta aproximación se asume que la densidad puede ser tratada de manera local como la de un gas uniforme de electrones de la misma densidad. La energía de intercambio para la LDA viene dada por la ecuación de Dirac<sup>105</sup> aplicada al modelo de Thomas-Fermi,<sup>106,107</sup> modelo conocido como Thomas-Fermi-Dirac.

$$E_{X,Dirac}^{LDA}[\rho] = C_x \int \rho^{4/3}(r) dr, \quad C_x = -\frac{3}{4} \left( \frac{3}{\pi} \right)^{1/3} \quad (3.23)$$

Y la energía de correlación viene expresada por el funcional de Vosko, Wilk, Nusair (VWN):<sup>108</sup>

$$E_C^{VWN}[\rho] = \int \rho(r) \varepsilon_C^{VWN}(\rho) dr \quad (3.24)$$

En este modelo la densidad total es considerada como la suma de las densidades de espín  $\alpha$  y  $\beta$ . En el caso en el que estas densidades no sean iguales la aproximación de la densidad local de espín<sup>109</sup> (LSDA, del inglés *Local Spin Density Approximation*) es más apropiada. Esta aproximación representa una aplicación más general de la LDA.

A pesar de su simplicidad conceptual, la LDA proporciona resultados aceptables para una gran variedad de sistemas, aún teniendo algunas deficiencias. Una explicación parcial para este éxito radica en la cancelación sistemática de los errores. De hecho, la LDA subestima la  $E_X$  pero sobreestima la  $E_C$  lo cual genera un inesperado valor correcto para la  $E_{XC}$ .<sup>103</sup>

**Aproximación del Gradiente Generalizado.** En los métodos LDA la energía de correlación-intercambio depende de manera exclusiva de la densidad electrónica; es decir,  $E_{XC}[\rho] = f(\rho)$ . Por el contrario, en los métodos de la aproximación de gradiente generalizado (GGA, del inglés *Generalized Gradient Approximation*), el funcional de correlación-intercambio depende también del gradiente de la densidad. De esta manera, las variaciones de las densidades alrededor de cada punto de un sistema son tenidas en cuenta, con lo cual la densidad electrónica no se comporta como en un gas homogéneo de electrones debido a la presencia de los núcleos. Por lo tanto, la energía de correlación-intercambio es un funcional que depende tanto de la densidad electrónica  $\rho$  como del gradiente de la densidad electrónica  $\nabla\rho$ :

$$E_{XC}^{GGA}[\rho] = \int f(\rho, \nabla\rho) dr = E_X^{GGA}[\rho] + E_C^{GGA}[\rho] \quad (3.25)$$

Los funcionales GGA de correlación-intercambio pueden en muchos casos obtenerse a partir de los LDA ( $E_{XC}^{LDA}$ ), añadiendo las correcciones del gradiente ( $\Delta E_{XC}^{GGA}$ ). El desarrollo de métodos GGA se ha realizado siguiendo dos filosofías. La primera de ellas, de naturaleza más empírica, inicialmente propuesta por Becke,<sup>110-115</sup> está basada en procedimientos de ajustes numéricos que incluyen un conjunto grande de moléculas de prueba. Ejemplo de funcionales que siguen esta filosofía son los funcionales de intercambio Becke88 (B88),<sup>116</sup> Perdew-Wang modificado (mPW),<sup>117,118</sup> OptX (O),<sup>119</sup> y X<sup>120</sup>; y el de correlación-intercambio Perdew-Wang (PW).<sup>117</sup> El segundo grupo de métodos GGA, propuesto por Perdew,<sup>117,121,122</sup> considera que el desarrollo de funcionales de correlación-intercambio debe fundamentarse en principios derivados de la mecánica-cuántica. Ejemplos de funcionales basados en este razonamiento incluyen, entre otros, el funcional de intercambio Becke86 (B86),<sup>110</sup> el de correlación Perdew86 (P86),<sup>123</sup> y los de correlación-intercambio Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE),<sup>124</sup> y Perdew-Burke-Ernzerhof modificado (mPBE).<sup>124,125</sup>

De manera más reciente, se ha desarrollado una nueva clase de funcionales GGA que incluyen información semilocal adicional más allá del gradiente de densidad de primer orden contenido en los métodos GGA. Estos métodos, llamados meta-GGA (M-GGA), dependen explícitamente de los gradientes de densidades de orden superior y de la densidad de la energía cinética. Ejemplos de este tipo de funcionales incluyen el funcional de intercambio VSXC;<sup>126</sup> y los de correlación KCIS<sup>127</sup> y TPSS.<sup>128</sup>

**Métodos Híbridos del Funcional de la Densidad.** La característica principal de los funcionales híbridos de la densidad (H-GGA) es que combinan la correlación-intercambio de un método GGA con un porcentaje de intercambio exacto (Hartree-Fock). La combinación más simple para este tipo de funcionales se basa en la conexión adiabática y fue propuesta por Becke en 1993,<sup>129</sup> quien consideró una combinación lineal con un 50% de intercambio exacto. Este funcional se conoce como *half-and-half* en el cual la energía de correlación-intercambio viene expresado por:

$$E_{XC}^{BH} = \frac{1}{2} E_{XC}^{LSDA} + \frac{1}{2} E_X^{exacto} \quad (3.26)$$

Si utilizamos el funcional de intercambio B88 y el de correlación de LYP<sup>130</sup> obtenemos el funcional BH&HLYP.<sup>129,130</sup> La energía de correlación-intercambio en este funcional viene dado por la expresión:

$$E_{XC}^{BH\&HLYP} = \frac{1}{2} E_X^{LSDA} + \frac{1}{2} E_X^{exacto} + \frac{1}{2} \Delta E_X^{B88} + E_C^{LYP} \quad (3.27)$$

Este funcional incorpora un 50% de intercambio exacto, y ha demostrado dar buenos resultados en sistemas radicalarios.<sup>131-134</sup>

Uno de los funcionales híbridos más utilizados es el funcional de tres parámetros de Becke (B3),<sup>135</sup> en el cual la energía de correlación-intercambio se calcula como:

$$E_{XC}^{B3} = aE_X^{exacto} + (1-a)E_X^{LSDA} + b\Delta E_X^{B88} + E_C^{LSDA} + c\Delta E_C^{PW91} \quad (3.28)$$

Los valores de  $a$ ,  $b$  y  $c$  fueron parametrizados para reproducir una serie de propiedades tales como energías, potenciales de ionización, y afinidades protónicas. Los valores obtenidos fueron:  $a = 0.20$ ,  $b = 0.72$  y  $c = 0.81$ . El coeficiente  $a$  determina el porcentaje de intercambio exacto en el funcional (20%).

Al reemplazar el funcional de correlación en el B3 por el funcional de LYP se obtiene el funcional B3LYP<sup>113,136,137</sup> para el cual la energía de correlación-intercambio se expresa como:

$$E_{XC}^{B3LYP} = aE_X^{exacto} + (1-a)E_X^{LSDA} + b\Delta E_X^{B88} + cE_C^{LYP} + (1-c)E_C^{VWN} \quad (3.29)$$

Debido a que el funcional de LYP contiene una parte local y la corrección del gradiente, la parte local debe ser restada, esto se hace substrayendo el término  $E_C^{VWN}$  del término  $E_C^{LYP}$ , donde  $E_C^{VWN}$  es el término de correlación LSDA derivado por Vosko, Wilk y

Nusair.<sup>108</sup> Este funcional es el más usado en la actualidad, constituyendo alrededor del 80% de los reportados en la literatura.<sup>103</sup>

Otro de los funcionales usados en esta tesis es el MPWB1K,<sup>138</sup> que forma parte de una familia de funcionales desarrollados en los últimos años en los que se utilizan datos cinéticos para la parametrización. Estos funcionales conocidos como híbridos meta-GGA, incorporan intercambio exacto y de manera simultánea los gradientes de segundo orden y la densidad de energía cinética. Este funcional ha demostrado dar buenos valores para estudios cinéticos de metales de transición y sistemas con interacciones no covalentes.<sup>103</sup> La energía de correlación-intercambio para el funcional MPWB1K se calcula mediante la siguiente expresión:

$$E_{XC}^{MPWB1K} = E_{LDA}^{mPW} + a(E_X^{Exacto} - E_X^{mPW}) + E_C^{B95} \quad (3.30)$$

El parámetro  $a$  se optimizó en base a una serie de valores cinéticos y termoquímicos. El valor obtenido fue de 0.44, lo que corresponde a un 44% de intercambio exacto. Debido a que este funcional proporciona buenos valores en propiedades tales como interacciones no enlazantes, transferencias de carga y potenciales de ionización, entre otras, fue utilizado para el cálculo del  $pK_a$  de los sistemas  $Cu^{2+}$ -Imidazol (Capítulo 5) en el cual las propiedades antes mencionadas son relevantes.

**Error de Autointeracción.** Uno de los problemas que se pueden encontrar al utilizar los métodos del funcional de la densidad es el llamado error de autointeracción, que puede ser especialmente importante en el caso de sistemas a capa abierta como los tratados en esta tesis. La inclusión de un alto porcentaje de intercambio exacto corrige el error de auto-interacción de manera rigurosa. Una de las maneras más claras de entender en que consiste este error, es considerar el caso de un sistema monoelectrónico. De acuerdo con el método Hartree-Fock, la energía electrónica del sistema viene dada por:

$$E = \sum_{i=1}^N \varepsilon_i - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \left( J_{ij} - K_{ij} \right) \quad (3.31)$$

Donde  $\varepsilon_i$  es la energía del electrón  $i$ , y  $J$  y  $K$  son las integrales de Coulomb e intercambio. Para un sistema monoeléctrico, debido a que no existe repulsión electrón-electrón, los términos  $J$  y  $K$  son iguales y diferentes de cero, provocando la cancelación completa de la autointeracción del electrón  $i$ . En el esquema Kohn-Sham, el término  $J$  en un sistema monoeléctrico es diferente de cero, ya que contiene la falsa interacción de la densidad con ella misma. De esta forma, para que este término se cancele debe ser igual al término de correlación-intercambio  $E_{XC}[\rho]$  pero de diferente signo. Dado a que no es posible conocer de manera exacta la forma del funcional de correlación-intercambio, y se deben usar expresiones aproximadas, la diferencia de los términos  $J[\rho]$  y  $E_{XC}[\rho]$  no llegan a anularse completamente.

La corrección del error de autointeracción es incompleta en funcionales LDA y GGA, lo cual redundo en una sobreestabilización de las situaciones deslocalizadas. De hecho, estudios desarrollados en nuestro grupo en sistemas  $\text{Cu}^{2+}$ -ligando han demostrado que funcionales con diferentes porcentajes de intercambio exacto pueden proveer diferentes resultados cuando el grado de deslocalización de carga y espín es importante.<sup>131-134,139</sup> En estos casos la inclusión de intercambio exacto, reduce el error de autointeracción dando mejores resultados comparados con el método altamente correlacionado CCSD(T).<sup>139</sup>

**3.1.3. Métodos de Simulación con Solventes.** La inclusión de los efectos del solvente es un factor crítico en la modelización de sistemas que tienen lugar en solución. Debido a que la incorporación de moléculas de agua explícitas para simular los efectos del solvente eleva la complejidad del sistema, haciendo que en muchos casos resulte inabordable a ciertos niveles de teoría, el uso de modelos implícitos surge como una aproximación adecuada para tratar este tipo de problemas. Estos modelos están basados en la premisa de que el sistema se encuentra inmerso en un medio continuo polarizable de constante dieléctrica constante. De esta manera la energía libre de solvatación del sistema (considerado como el soluto) en el medio continuo (considerado como el solvente) se expresa mediante la ecuación:

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{cav} + \Delta G_{disp} + \Delta G_{electrost} \quad (3.32)$$

En esta ecuación el término  $\Delta G_{cav}$  corresponde a la energía asociada a la creación de la cavidad en el medio, por lo que se trata de un término desestabilizante. El segundo término ( $\Delta G_{disp}$ ) está asociado a las interacciones dispersivas-repulsivas de van der Waals entre el soluto y el solvente, que en conjunto contribuyen de manera favorable a la solvatación. Estos dos términos son conocidos como contribuciones no electrostáticas. El último término ( $\Delta G_{electrost}$ ) es un término estabilizante que toma en cuenta las contribuciones electrostáticas, e incluye dos componentes *i*) el trabajo necesario para crear la distribución de cargas en solución que tenía el soluto en la fase gaseosa; y *ii*) el trabajo requerido para polarizar la distribución de carga del soluto por el solvente.<sup>140</sup> De esta manera, la optimización de la función de onda se lleva a cabo realizando de manera iterativa la polarización mutua entre soluto y solvente hasta que se llega a la auto-consistencia. Este procedimiento es denominado campo de reacción auto-consistente (SCRf, del inglés *Self-Consistent Reaction Field*).

Para abordar el problema del solvente es importante tener en cuenta dos componentes del método: el modelo del solvente y el radio de solvatación. Dentro de los primeros los más comunes son, entre otros, el modelo PCM (del inglés, *Polarizable Continuum Model*), en los que la superficie de la cavidad se construye a partir de la superposición de esferas atómicas;<sup>141</sup> el modelo COSMO (del inglés *Conductor-like Screening Model*) en el que se considera que el solvente se comporta como un conductor, y la ventaja que presentan respecto a la versión dieléctrica original PCM (o D-PCM) es que las ecuaciones electrostáticas son considerablemente más sencillas.<sup>142</sup> El C-PCM<sup>143</sup> es una versión del modelo COSMO en el cual se incluye una función de escala para reproducir valores de energías libres de solvatación experimentales. El método IEFPCM (del inglés *Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Model*)<sup>144-146</sup> incorpora, además de la permitividad ( $\epsilon$ ), otras propiedades del líquido específico para tratar ambientes anisotrópicos, y puede ser generalizado para ser usado en muchos otros ambientes, por ejemplo, una interfase difusa con una permitividad eléctrica dependiente de la posición.<sup>147</sup> De hecho, este método es más general que el D-

PCM o COSMO; y además presenta una ventaja numérica, que redundará en una menor demanda computacional.

En los métodos anteriores, para crear la cavidad en el solvente se utiliza el modelo de esferas superpuestas, para el cual es necesario definir el radio de dichas esferas. Existen diferentes tipos de radios y durante el desarrollo de esta tesis hemos utilizado los radios UA0 y UAHF. Los radios UA0 consideran el modelo topológico de átomos unidos usando los radios atómicos del campo de fuerza UFF para los átomos pesados, en el cual los átomos de hidrógeno se consideran en la misma esfera del átomo pesado al que están unidos. Mientras que los radios UAHF usan el mismo modelo topológico de átomos unidos pero en este caso se utilizan radios optimizados al nivel de teoría HF/6-31(d).

### 3.2. MÉTODOS HÍBRIDOS QM/MM

A pesar del gran avance que ha tenido la química computacional como consecuencia del desarrollo de herramientas de cálculo cada vez más potentes, la simulación de sistemas grandes sigue siendo un reto importante en esta área de la química. Durante los últimos años se han utilizado las herramientas de la mecánica clásica para construir campos de fuerzas capaces de modelar sistemas grandes, tales como proteínas o materiales inorgánicos. Éstos son los denominados métodos de mecánica molecular (MM), los cuales han demostrado fiabilidad para reproducir muchas propiedades moleculares en este tipo de sistemas. Dichos métodos, sin embargo, son inadecuados al considerar procesos en los cuales la descripción electrónica es fundamental para entender el problema químico en cuestión. Para poder describir la estructura electrónica de estos sistemas de manera detallada es necesario el uso de metodologías cuánticas (QM, del inglés *Quantum Mechanics*), algunas de las cuales han sido abordadas en secciones precedentes de este capítulo. No obstante, el uso de estos métodos se hace más complicado al aumentar el número de átomos del sistema, con lo cual se limita a especies químicas de tamaño medio.

Una propuesta alternativa son los algoritmos que combinan los métodos QM con los métodos MM. Estos métodos, conocidos como métodos QM/MM, han emergido con

fuerza en los últimos años y constituyen una herramienta fiable (y en continua expansión). Varios artículos de revisión sobre el desarrollo conceptual e implementaciones computacionales de estos métodos se pueden encontrar en la literatura.<sup>148-158</sup>

Durante el desarrollo de esta tesis usamos el método ONIOM<sup>159-161</sup> (acrónimo de *Our N-layered Integrated molecular Orbital and molecular Mechanics*) implementado en los paquetes de programas Gaussian03/09. Esta metodología subdivide el sistema completo (*sistema real*) en varias capas, generalmente dos o tres, cada una de ellas descritas a un nivel de teoría diferente. La parte que requiere de una descripción electrónica más detallada se conoce como *sistema modelo* y se trata a un nivel de teoría elevado, mientras que el resto del sistema se trata con un nivel de teoría menor. De esta manera, al usar dos capas la energía del sistema completo se puede extrapolar a partir de tres cálculos independientes:

$$E^{ONIOM} = E^{real,bajo} + E^{Modelo,alto} - E^{Modelo,bajo} \quad (3.33)$$

Dos de los elementos críticos en el método ONIOM (y en general en los métodos QM/MM) son el tratamiento de las fronteras entre el *sistema modelo* y el resto del sistema, y el tratamiento de las interacciones entre los dos subsistemas. La solución al primero de estos problemas incluye principalmente el uso de dos aproximaciones: la de átomos de enlace (*link atoms*) y la de los orbitales locales. En la aproximación de los átomos de enlace se consideran átomos de hidrógeno adicionales para saturar los enlaces rotos en los átomos fronteras del *sistema modelo*.<sup>157,162</sup> Mientras que la aproximación de orbitales locales considera un conjunto de orbitales de enlace estrictamente localizados que son determinados a través de cálculos de modelos pequeños y se asume que son transferibles a modelos más grandes.<sup>163,164</sup> Otra aproximación es el método de orbitales híbridos generalizados (GHO, del inglés *Generalized Hybrid Orbital*), en la cual se considera un conjunto de cuatro orbitales híbridos  $sp^3$  que se asignan a cada átomo en la frontera MM.<sup>156,165,166</sup> El método ONIOM utiliza la primera de estas aproximaciones para el tratamiento de las fronteras de los subsistemas.

El acoplamiento entre los dos subsistemas puede incluir sólo el acoplamiento mecánico (*mechanical embedding*) o también el acoplamiento electrostático (*electrostatic embedding*). En el primer caso las interacciones entre estos dos subsistemas se tratan al nivel MM. Mientras que en el segundo caso, los cálculos QM para el *sistema modelo* se llevan a cabo considerando los términos que describen las interacciones electrostáticas entre los dos subsistemas como un operador monoeléctrico que se introduce al Hamiltoniano QM. El método ONIOM implementado en el paquete de programas Gaussian 09 permite utilizar estos dos esquemas de acoplamiento.

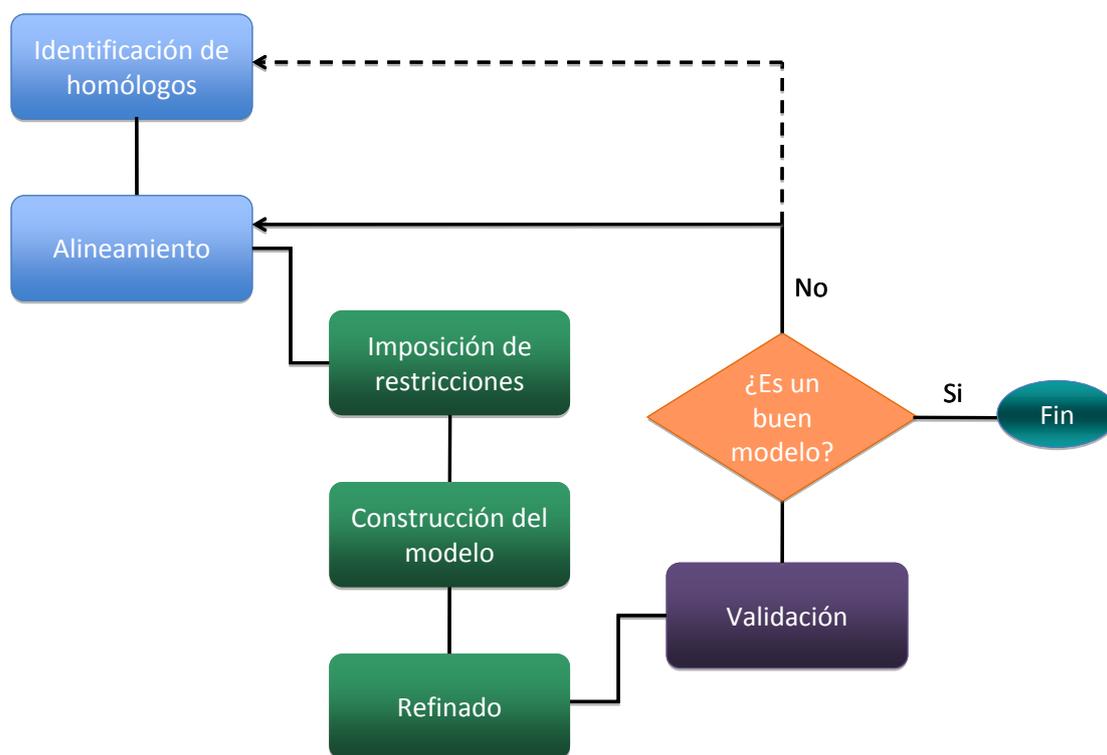
Este método lo usamos para estudiar los modelos  $\text{Cu}^{1+2+}\text{-A}\beta$ . Los detalles específicos de su implementación y los resultados de las mismas se describen en detalle en el Capítulo 6.

### 3.3. MODELADO POR HOMOLOGÍA

Las estructuras tridimensionales de las proteínas proporcionan información importante acerca de su función y propiedades moleculares, permitiendo obtener buenos puntos de partida para el diseño de experimentos, tales como mutagénesis dirigida, estudios de mutaciones relacionadas con enfermedades o diseño de inhibidores específicos basados en la estructura. Sin embargo, la obtención de estructuras tridimensionales de proteínas por métodos experimentales, tales como difracción de rayos X o técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear, conllevan un alto grado de complejidad, lo que no conduce en todos los casos a la resolución de dicha estructura. En la actualidad existen alrededor de 67,000 estructuras tridimensionales de proteínas depositadas en el banco de datos de proteínas<sup>167</sup> (PDB, del inglés *Protein Data Bank*). No obstante, este número de estructuras es pequeño comparado con el número de secuencias conocidas depositadas en el UniProt, el cual hasta el año 2010 era de cerca de 4.2 millones de secuencias.<sup>168</sup> De esta manera el uso de sistemas de modelado molecular para obtener estructuras 3D de proteínas de secuencia conocida se ha convertido en los últimos años en una herramienta de mucha utilidad.

Uno de estas metodologías computacionales es el método de Modelado por Homología (MH). El principal objetivo de este método es construir modelos 3D para una proteína de estructura desconocida (*target*) tomando como base la similitud de su secuencia con una (o unas) proteína de estructura conocida (*template*).<sup>169-173</sup> Este método se basa en la idea de que cuanto más alta sea la similaridad de las secuencias entre proteínas más alta será su similitud estructural. De esta manera, para poder construir un modelo útil se deben cumplir dos condiciones. En primer lugar la similitud de las secuencias entre el *target* y el *template* debe ser considerable; secuencias con una similitud menor al 20% por lo general dan como resultado estructuras 3D bastante diferentes. En segundo lugar, el alineamiento entre los aminoácidos de la secuencia del *template* y la secuencia *target* debe ser correcto, ya que diferencias en las secuencias podrían resultar en diferencias significativas en sus estructuras 3D.<sup>174</sup> En este sentido los métodos de MH constan de cuatro pasos secuenciales básicos:<sup>173</sup> identificación de *templates* relacionados con la secuencia *target*, alineamiento entre la secuencia del *target* y la secuencia del *template*, construcción del modelo para la secuencia *target* a partir de la estructura 3D del *template*, y evaluación del modelo. Este procedimiento se representa de manera simplificada en el Esquema 3.1.

En la actualidad se pueden encontrar varios programas para construir modelos mediante homología de proteínas, ejemplos de ellos incluyen, entre otros, los programas SwissModel,<sup>175-177</sup> Composer,<sup>178,179</sup> 3D-JIGSAW<sup>180</sup> y Modeller.<sup>181</sup> De estos programas, el Modeller tiene la particularidad de permitir incluir restricciones adicionales, tales como distancias exactas y/o ángulos diedros para construir los modelos, además de restricciones estereoquímicas, por lo que la construcción del modelo se realiza minimizando las violaciones de dichas restricciones.<sup>182-186</sup> Para construir los modelos usando el programa Modeller se utiliza como información de partida el alineamiento de la secuencia *target* con las secuencias de los *templates* relacionados. El resultado obtenido, si no se incluyen datos adicionales, es el modelo 3D para la secuencia *target* conteniendo todos los átomos pesados tanto de la cadena principal como de las cadenas laterales.



**Esquema 3.1.** Metodología básica utilizada por los métodos de MH para proponer modelos 3D de proteínas.

Con el fin de explorar el espacio conformacional, Modeller genera nuevos modelos imponiendo restricciones derivadas de análisis estadísticos de proteínas diversas que contienen fragmentos de alta similitud con la proteína *target*. En particular, se analizan las relaciones entre distancias y ángulos diédros de la cadena principal.<sup>187</sup> Estas relaciones se expresan como distribuciones de densidad de probabilidad condicional y pueden ser usadas directamente como restricciones espaciales. Una diferencia fundamental entre el Modeller y los demás programas, es que en el Modeller, además de las restricciones espaciales obtenidas empíricamente de una base de datos, el usuario puede introducir restricciones adicionales. Posteriormente las restricciones derivadas por homología y los términos de energía (calculados con el campo de fuerza CHARMM 23<sup>188</sup>) se combinan dentro de una “función objetivo” que se usa para imponer una correcta estereoquímica. De esta manera, el modelo se obtiene optimizando la función objetivo en el espacio. Esta optimización se lleva a cabo

mediante el uso del método de función-objetivo variable, empleando métodos de gradientes conjugados y dinámicas moleculares mediante *simulated annealing*.



# 4

## **SISTEMAS MODELO CON LOS CATIONES $\text{Fe}^{2+/3+}$ y $\text{Cu}^{2+}$ RELEVANTES EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

En el Capítulo 1 resaltamos varios estudios que ponen de manifiesto la importancia de la interacción de cationes metálicos, como el  $\text{Cu}^{2+}$  y el  $\text{Fe}^{2+/3+}$ , en la agregación y toxicidad del péptido A $\beta$ . Por consiguiente, el estudio de los complejos que forman estos metales con el A $\beta$  es esencial para comprender el papel de los mismos en estos procesos. El estudio de esta interacción analiza básicamente dos aspectos fundamentales: la coordinación que presenta el metal en el centro de unión y la conformación que adopta el péptido como producto de esta coordinación. El primero de estos puntos requiere un análisis electrónico detallado, por tanto su grado de dificultad no permite considerar el sistema completo. En estos casos el uso de sistemas modelo es de gran utilidad, ya que permite abordar el estudio de los centros de coordinación de los metalopéptidos con un grado de detalle importante, proporcionando información importante sobre la coordinación entre el metal y el péptido que además puede ser utilizada para el estudio del sistema completo. En este capítulo utilizamos métodos químico-cuánticos para estudiar el entorno de coordinación de los cationes  $\text{Fe}^{2+/3+}$  y

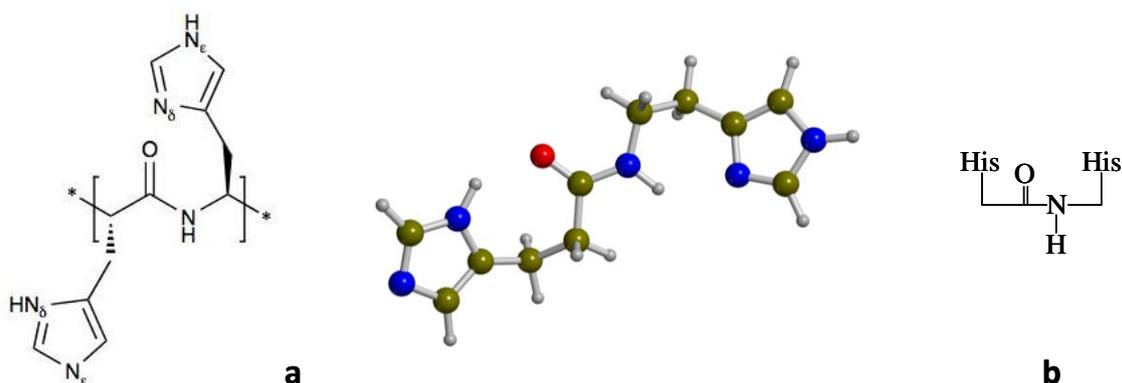
$\text{Cu}^{2+}$  en el complejo que forman con el A $\beta$ . En primer lugar describimos la coordinación de los iones de hierro con el A $\beta$ , usando péptidos modelo. Este estudio es el resultado de un trabajo realizado conjuntamente con el Profesor Arvi Rauk de la Universidad de Calgary, a través de una estancia de investigación. Posteriormente analizamos la coordinación del  $\text{Cu}^{2+}$  con los posibles ligandos con potencial afinidad por este catión metálico presentes en el A $\beta$ . Los complejos más estables obtenidos se considerarán en el Capítulo 6 como puntos de partida para construir modelos plausibles de la coordinación de este catión metálico con el péptido A $\beta$ (1-16), que es el fragmento más usado en estudios experimentales, ya que corresponde a la región hidrofílica del péptido y, por tanto, a la de mayor afinidad para cationes metálicos de hierro y cobre.

#### **4.1. INTERACCIÓN DE LOS CATIONES $\text{Fe}^{2+/3+}$ CON EL FRAGMENTO His13-His14, His6 y Tyr10**

El estudio de la interacción de los cationes de hierro con el A $\beta$  es relevante para entender la química de la EA, ya que estudios experimentales muestran que el A $\beta$  regula el potencial de reducción estándar del hierro, provocando la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  debida a la reducción del complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -A $\beta$ . Esta reacción es trascendental, ya que la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  regula la formación de especies radicalarias de oxígeno en el medio cerebral,<sup>79</sup> que son las responsables del daño neuronal observado en la EA. Además, se ha sugerido que las tres histidinas del A $\beta$  (a saber His6, 13 y 14) controlan la actividad redox de estos cationes, por lo que es razonable esperar que se coordinen a esta región del péptido.<sup>75</sup> Sin embargo, un estudio de espectroscopía Raman de los complejos  $\text{Fe}^{3+}$ -A $\beta$ (1-42) concluye que la coordinación del  $\text{Fe}^{3+}$  al A $\beta$  se realiza mediante la coordinación del grupo fenol de la cadena lateral de la tirosina 10, a la vez que descarta la coordinación de las histidinas antes mencionadas.<sup>73</sup>

Debido a que, según nuestro conocimiento, no existen estudios de cálculos teóricos de la interacción de los cationes de hierro con el A $\beta$ , nuestro propósito es utilizar las herramientas de la química computacional para profundizar en los aspectos moleculares de esta coordinación y relacionarlos con las observaciones experimentales

disponibles. De esta manera, realizamos un estudio de la interacción de los cationes  $\text{Fe}^{2+/3+}$  con el fragmento peptídico His13-His14 presente en el  $\text{A}\beta$  y que, tal como mencionamos antes, se encuentra en la región de interacción del hierro encontrada experimentalmente. Como punto de partida para este estudio consideramos los complejos de  $\text{Cu}^{2+}$  analizados por Rauk *et al.*,<sup>189</sup> en el cual se encontró que la conformación más favorable en términos energéticos corresponde a aquella en la cual las histidinas se encuentran coordinadas al catión metálico a través de los nitrógenos  $\delta$  (Figura 4.1). Esta coordinación permite la formación de metalaciclos más pequeños, lo que favorece la interacción del enlace peptídico con el centro metálico. Asimismo, podría disminuir suficientemente el  $\text{p}K_a$  del grupo N-H facilitando su desprotonación en condiciones fisiológicas.



**Figura 4.1.** a) Complejo *N*-(2-(1*H*-imidazol-4-il)etil)-3-(1*H*-imidazol-4-il)propanamida usado como modelo para el fragmento His13-His14 del  $\text{A}\beta$ . b) Representación esquemática usada para dicho fragmento, por simplicidad.

Modelamos el fragmento His13-His14 a través del complejo *N*-(2-(1*H*-imidazol-4-il)etil)-3-(1*H*-imidazol-4-il)propanamida. Además del mencionado fragmento, estudiamos la coordinación de dos ligandos presentes en el  $\text{A}\beta$  y que pueden coordinarse al hierro: la tirosina 10 (modelada usando el grupo fenol) y la histidina 6 (representada por el grupo imidazol). Para el fragmento His13-His14 y los ligandos antes mencionados se han calculado sus constantes de afinidad así como sus actividades redox. Además, se calcularon teóricamente los espectros Raman de los complejos más

estables del  $\text{Fe}^{3+}$  mediante el cálculo de frecuencias vibracionales armónicas. Los espectros obtenidos se compararon con los espectros experimentales reportados por Miura *et al.*<sup>73</sup>

#### 4.1.1. Detalles Computacionales para el Cálculo de los Sistemas de Hierro.

Las optimizaciones de las geometrías y los análisis de frecuencias vibracionales armónicas de los sistemas considerados se realizaron usando el funcional híbrido de tres parámetros de Becke (B3LYP)<sup>135,136,190</sup> con el conjunto de bases estándar 6-31+G(d) (en este capítulo utilizaremos la abreviación BP, base pequeña, para este conjunto de bases). Las energías de punto cero se escalaron con un factor de 0.9806<sup>191</sup>. Sin embargo, para derivar entropías y correcciones térmicas a la entalpía se usaron las frecuencias sin escalar. Asimismo, se sumó el término  $R \ln(n)$  a la entropía de cada especie, donde  $n$  es un valor que estima (basados en un conteo de rotámeros simples) el número de conformeros significativamente poblados.<sup>192</sup> Este término se incluye para tener en cuenta los cambios resultantes de las ganancias o pérdidas de entropía debido a la rotura o formación de estructuras cíclicas con el metal. Para obtener cambios de energías más precisos, y para determinar el efecto del incremento de la base, realizamos cálculos puntuales a la geometrías optimizadas con el funcional B3LYP y el conjunto de bases 6-311+G(2df,2p) (en adelante nos referiremos en este capítulo a este conjunto de bases como BG, base grande). Escogimos el funcional B3LYP ya que en un estudio previo se encontró que predice de manera satisfactoria el estado de espín más estable de los complejos de hierro.<sup>193</sup> Para los sistemas con  $\text{Fe}^{2+}$  se exploraron los estados de espín singlete, triplete y quintuplete; mientras que para el  $\text{Fe}^{3+}$  se consideraron los estados doblete, cuadruplete y sextuplete. Todos los cálculos se llevaron a cabo usando el formalismo de espín no restringido para sistemas de capa abierta. Para todos los complejos estudiados se determinó que el estado de espín alto era el más estable con B3LYP. Además, se realizaron cálculos puntuales MP2/BP para varios sistemas seleccionados, y en todos los casos las tendencias observadas en las energías relativas para las diferentes multiplicidades de espín estuvieron en concordancia con las encontrados con B3LYP (Tabla A4.1 del apéndice).

Para todos los sistemas, se realizaron cálculos puntuales al nivel MP2/BP sobre las geometrías B3LYP/BP de los estados de espín de más baja energía. Debido al coste computacional las energías MP2 con la base grande (“MP2/BG”) se estimaron mediante la siguiente aproximación aditiva:

$$E_{(\text{“MP2/BG”})} \approx E_{(\text{MP2/BP})} + E_{(\text{B3LYP/BG})} - E_{(\text{B3LYP/BP})} \quad (4.1)$$

Debe indicarse que, para el cálculo UHF/BP que precede al procedimiento UMP2, la función de onda B3LYP/BP se usó como “*guess*”, debido a que las funciones de onda UHF usualmente convergían a un estado más alto de la misma multiplicidad, o en muchos casos no convergían del todo. Debe mencionarse que las diferencias entre los valores calculados al nivel B3LYP/BG y al nivel “MP2/BG” son significativas, especialmente para los complejos de Fe<sup>3+</sup> (Tablas A4.2-A4.5 del apéndice). Para los complejos de Fe<sup>2+</sup> estas diferencias son menores a 12.4 kcal mol<sup>-1</sup>, mientras que para los complejos de Fe<sup>3+</sup> pueden llegar, en algunos casos, hasta 31.5 kcal mol<sup>-1</sup>. A pesar de ello, las tendencias generales en la estabilidad de los diferentes sistemas se preservan con ambos métodos. Sólo en unos pocos casos los resultados muestran que el B3LYP tiende a favorecer complejos menos coordinados. Por otra parte, resultados previos en sistemas similares de complejos de hierro muestran que la aproximación “MP2/BG” provee valores en muy buen acuerdo con los resultados experimentales.<sup>194</sup> Así, los valores de energía obtenidos mediante la Ecuación 4.1 son los que se han usado para la discusión de las energías de reacción.

Para incluir los efectos del solvente y calcular la energía de solvatación en agua usamos el modelo del continuo polarizable (PCM) mediante la variante del formalismo de la ecuación integral (IEFPCM)<sup>144</sup> con los radios UAHF, y usando un factor de escala de 1.2 para definir la cavidad del solvente.<sup>195</sup> Con el propósito de mejorar las energías de reacción calculadas, usamos el valor experimental para la energía libre de solvatación del H<sub>2</sub>O ( $\Delta G^*_{\text{solv}} = -6.32 \text{ kcal mol}^{-1}$ )<sup>196</sup> y el valor de consenso para la energía de solvatación del H<sup>+</sup> ( $\Delta G^*_{\text{solv}} = -265.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ ).<sup>197</sup> Existen en la literatura valores entre -261.4 y -265.9 kcal mol<sup>-1</sup> para  $\Delta G^*_{\text{solv}}(\text{H}^+)$ , lo cual genera una

incertidumbre importante en el cálculo de la energía de reacción.<sup>198</sup> Sin embargo, en los últimos años existe un consenso generalizado para usar como valor de referencia el obtenido por Tissandier *et al* ( $-265.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ ),<sup>199</sup> considerando el estado estándar corregido de  $1 \text{ mol L}^{-1}$  en fase gas/ $1 \text{ mol L}^{-1}$  en solución.<sup>196</sup> Adicionalmente, se añadieron  $2.4 \text{ kcal mol}^{-1}$  correspondiente al término  $RT \ln(55.34)$ , donde 55.34 corresponde a la concentración molar del agua pura en estado líquido.<sup>200,201</sup> Esta corrección corresponde al cambio de energía libre de  $n$  moles de  $\text{H}_2\text{O}$  de 1M a 55.34 M en el estado líquido. Debido a que las energías libres en fase gas están calculadas considerando un gas ideal a 1 atm como el estado estándar (denotado por el superíndice “<sup>0</sup>”), se necesita una corrección para convertirlas a un estado estándar de concentración  $1 \text{ mol L}^{-1}$  (denotado por el superíndice “<sup>\*</sup>”). Asumiendo un comportamiento de gas ideal, esta corrección se calcula mediante la expresión:

$$\Delta G^{0 \rightarrow *}=RT \ln \left( \frac{Q^*}{Q^0} \right) \quad (4.2)$$

donde  $Q$  es el cociente de reacción, evaluado con todas las especies en sus respectivas concentraciones en el estado estándar. Si consideramos que todas las especies en el estado estándar “<sup>0</sup>” están en fase gas a una presión de 1 atm y 298.15 K, la concentración de dichas especies es  $1/24.46 \text{ mol L}^{-1}$ ; y si además consideramos que todas las especies en el estado “<sup>\*</sup>” son soluciones a una concentración de  $1 \text{ mol L}^{-1}$  a la misma temperatura, entonces esta corrección se calcula de manera sencilla como:

$$\Delta G^{0 \rightarrow *}= \Delta nRT \ln(24.46) \quad (4.3)$$

donde  $\Delta n$  se refiere al cambio en el número de especies en la reacción.<sup>202</sup>

En las reacciones estudiadas, la coordinación del fenol y del grupo NH del enlace peptídico implica que éstos desprotonan, ya que tienen valores de  $\text{pK}_a$  superiores

a 7, por lo que se espera que a pH fisiológico (~7) se encuentren mayoritariamente en su forma protonada. Dado que las reacciones estudiadas en esta sección se consideran a pH fisiológico, para calcular las energías libres en solución acuosa a este valor de pH, asumimos que la concentración de todas las especies participantes es 1M, excepto la concentración del agua que es 55.34 M y la concentración de protones que viene determinada por el valor del pH del medio,  $[H^+] = 1 \times 10^{-7}$  M. Según las anteriores consideraciones, calculamos la energías libres de reacción en fase acuosa de acuerdo al procedimiento propuesto por Rickard *et al.*:<sup>57</sup>

$$\Delta G_{sol}^* = \Delta G_{sol}^* + RT \ln Q \quad (4.4)$$

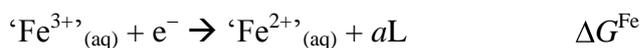
donde el término  $\Delta G_{sol}^*$  es la energía libre de reacción en fase acuosa, y  $Q$  representa el cociente de reacción, el cual puede simplificarse a  $[H^+]$  ya que, como se indicó antes, las demás especies relevantes tienen una concentración 1 M a pH 7.

Además, confirmamos la fiabilidad de esta aproximación realizando cálculos MP2/BG para algunos modelos seleccionados. Las energías de reacción calculadas usando los valores “MP2/BG” y los valores MP2/BG difieren por  $\sim 1.3$  kcal mol<sup>-1</sup>, siendo estas últimas sistemáticamente más exergónica cuando se usan los valores exactos MP2/BG (Tabla 4.1). Por estas razones, de aquí en adelante, la discusión de resultados se hará considerando los datos obtenidos al nivel “MP2/BG”.

**Tabla 4.1.** Energías en kcal mol<sup>-1</sup> para la disociación de la molécula de agua en los complejos  $[Fe^{2+/3+}(O-HisHis)(H_2O)_3]^{2+/3+}$  en solución acuosa calculada usando los valores MP2/BG exactos y los valores “MP2/BG” calculados con la aproximación aditiva descrita previamente.

Reacción	$\Delta G_{(g)}$	$\Delta \Delta G_{sol}^*$	$\Delta G_{sol}^*$
<b>“MP2/BG”</b>			
$[Fe^{2+}(O-HisHis)(H_2O)_3]^{2+} \rightarrow [Fe^{2+}(O-HisHis)(H_2O)_2]^{2+} + H_2O$	11.0	-6.2	4.8
$[Fe^{3+}(O-HisHis)(H_2O)_3]^{3+} \rightarrow [Fe^{3+}(O-HisHis)(H_2O)_2]^{3+} + H_2O$	22.7	-6.1	16.6
<b>MP2/BG</b>			
$[Fe^{2+}(O-HisHis)(H_2O)_3]^{2+} \rightarrow [Fe^{2+}(O-HisHis)(H_2O)_2]^{2+} + H_2O$	9.8	-6.2	3.6
$[Fe^{3+}(O-HisHis)(H_2O)_3]^{3+} \rightarrow [Fe^{3+}(O-HisHis)(H_2O)_2]^{3+} + H_2O$	21.4	-6.1	15.3

Además de las energías de reacción en solución acuosa, se calcularon los potenciales de reducción estándar,  $E^\circ(\text{'Fe}^{3+}/\text{'Fe}^{2+})$  vs el electrodo estándar de hidrógeno (EEH), para las semireacciones,



y



donde  $\text{'Fe}^{3+}$  y  $\text{'Fe}^{2+}$  representan las especies de hierro oxidadas y reducidas en disolución, respectivamente, y  $\Delta G^{\text{Fe}}$  y  $\Delta G^{\text{EEH}}$  son los cambios de energía libre para las respectivas semireacciones, ignorando el electrón. El término  $aL$  considera el hecho de que un número determinado de ligandos podría liberarse en el proceso de reducción, lo que tendría asociado un cambio de entropía importante. De esta manera, el potencial de reducción estándar se calcula como:

$$E^\circ(\text{'Fe}^{3+}/\text{'Fe}^{2+}) = -(\Delta G^{\text{Fe}} - \Delta G^{\text{EEH}})/F \quad (4.5)$$

Donde  $F$  es la constante de Faraday,  $F = 23.1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ V}^{-1}$ . Para la reducción del protón, adoptamos el valor experimental,  $\Delta G^{\text{EEH}} = -99.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ .<sup>203</sup> El potencial de reducción ( $E^\circ$ ) de la semireacción en las condiciones de reacción reales se relaciona con el potencial de reducción estándar, ( $E^\circ$ ) a través de la ecuación de Nernst:

$$E^\circ' = E^\circ - (RT/F) \ln Q \quad (4.6)$$

donde  $Q$  es el cociente de reacción especificando las concentraciones de los componentes oxidados y reducidos, y las demás especies asociadas a la reacción en el ambiente químico dado. En el caso especial en el que  $n$  protones se consumen en una solución amortiguadora a pH 7 bajo condiciones estándares, el cociente de reacción se reduce a  $Q = 10^{7n}$ , y potencial de reducción ( $E^\circ$ ) se calcula como:<sup>58</sup>

$$E^\circ' = E^\circ - (RT/F) \ln Q = E^\circ - 0.41n \text{ V} \quad (4.7)$$

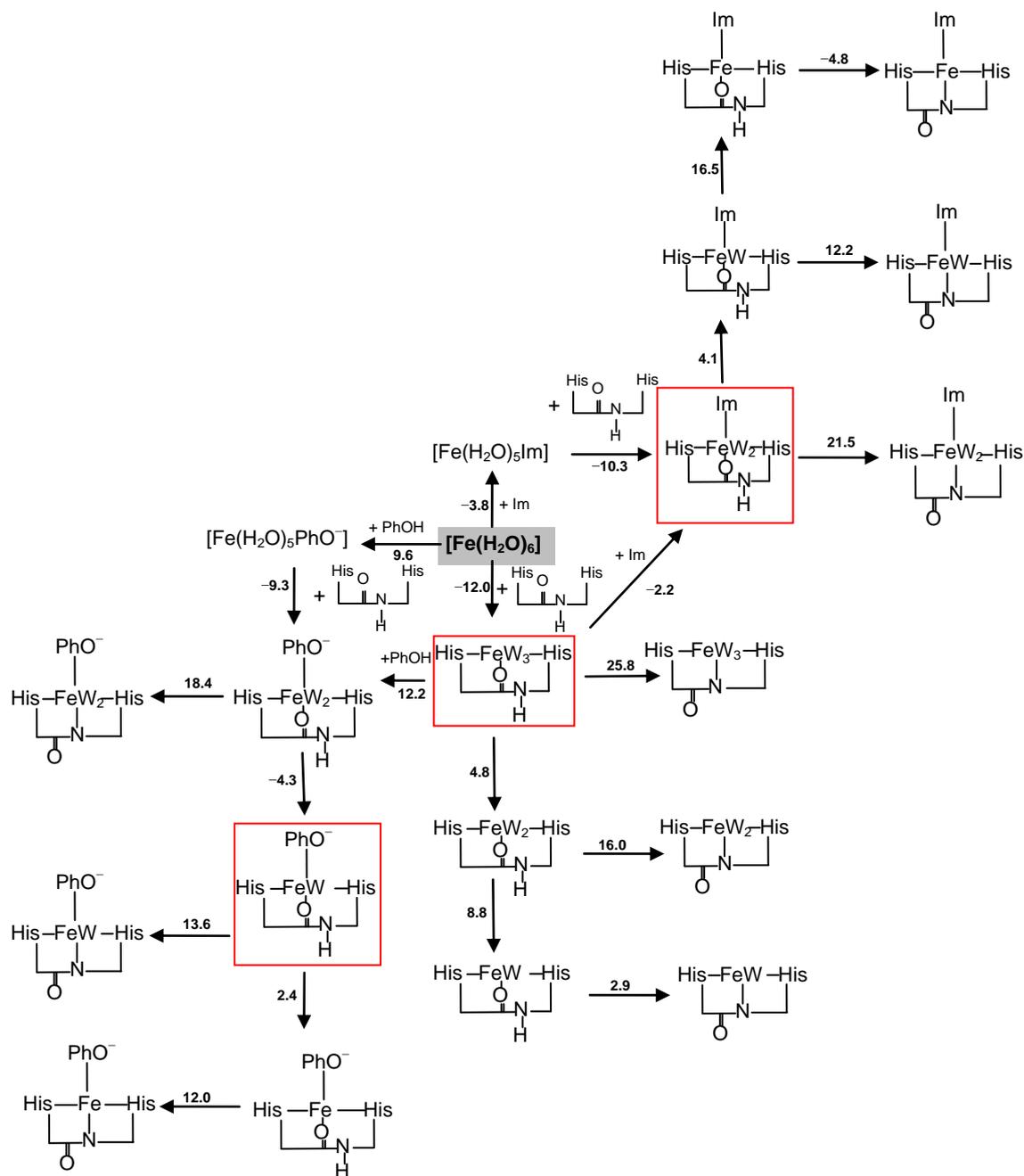
Todos los cálculos se llevaron a cabo usando los paquetes de programas Gaussian 03<sup>204</sup> y Gaussian 09.<sup>205</sup>

**4.1.2. Resultados del Estudio de la Coordinación del Fe<sup>2+/3+</sup> con el Aβ.** Para explorar las posibles reacciones del Fe<sup>2+/3+</sup> partimos de los complejos hexahidratados, [Fe<sup>2+</sup>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>2+</sup> y [Fe<sup>3+</sup>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup>. En primer lugar consideramos la sustitución simple de moléculas de agua por los ligandos imidazol, fenol o el fragmento His13-His14. Para este fragmento consideramos dos modos de coordinación: *i*) la coordinación a través del N<sub>δ</sub> de los imidazoles y el oxígeno de la cadena principal (O<sub>C</sub>), esta coordinación será referida de aquí en adelante como O-HisHis (e.g. [Fe<sup>2+</sup>(O-HisHis)(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>) y *ii*) la coordinación que involucra los mismos átomos de nitrógeno de los imidazoles y el átomo de nitrógeno de la cadena principal, el cual será referido de aquí en adelante con la notación N-HisHis. Nótese que esta última coordinación implica la desprotonación del grupo NH de la cadena principal. En los complejos formados se sustituyen moléculas de agua, de forma secuencial, por los ligandos en estudio para obtener los posibles complejos finales. Por último estudiamos las deshidrataciones o desprotonaciones que pudieran llevarse a cabo.

A partir de los modelos más estables de Fe<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup> con los ligandos antes mencionados, calculamos el potencial de reducción estándar del par Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> para analizar el efecto que tienen las variaciones encontradas en la producción de especies radicalarias de oxígeno en el contexto del Aβ y la enfermedad de Alzheimer. Por último los espectros Raman de los complejos más estables de Fe<sup>3+</sup> se comparan con los espectros experimentales obtenidos por Miura *et al* para analizar los posibles ligandos que pueden coordinar al Fe<sup>3+</sup>.

**Coordinación del Fe<sup>2+</sup> a la secuencia His13-His14, His6 y Tyr10.** Las energías de reacción asociadas con la secuencia His13-His14, His6 y Tyr10 al Fe<sup>2+</sup> (d<sup>6</sup>, quintuplete) y las diferentes reacciones consideradas se muestran de forma esquemática en la Figura 4.2, en la que se resaltan los complejos más estables de las rutas estudiadas. Por razones de simplicidad las moléculas de agua (se representan como W) y los

protones involucrados no se muestran cuando se liberan en las reacciones consideradas. Únicamente se muestran los resultados para el estado quintuplete ya que es el más estable en todos los casos considerados.



**Figura 4.2.** Reacciones estudiadas en las que se muestran los valores de energías libres de reacción en solución acuosa ( $\Delta G^*_{\text{sol}}$ ) en  $\text{kcal mol}^{-1}$  para los complejos de  $\text{Fe}^{2+}$ . El complejo de partida se resalta en gris y los modelos más estables de cada ruta se resaltan en cajas.

Las energías de reacción en solución acuosa muestran que la sustitución de una molécula de agua por el imidazol es exergónica ( $\Delta G^*_{\text{sol}} = -3.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) mientras que la sustitución por el fenol es endergónica ( $\Delta G^*_{\text{sol}} = 9.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) a  $\text{pH} = 7$ . Las constantes de afinidad (calculadas como  $K_{\text{aff}} = e^{-\Delta G/RT}$ ) son  $6.4 \times 10^2$  y  $9.7 \times 10^{-8}$ , respectivamente. Los cálculos indican que la coordinación del fragmento peptídico es más favorable a través del átomo de O que del de N. La sustitución de 3 moléculas de agua por el fragmento His13-His14 en solución acuosa es altamente exergónica ( $\Delta G^*_{\text{sol}} = -12.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), siendo la constante de afinidad calculada,  $K_{\text{aff}} = 6.3 \times 10^8$ , la cual es mayor que la calculada al mismo nivel de teoría para los complejos análogos de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $K_{\text{aff}} = 3.2 \times 10^6$ .<sup>206</sup> Los valores experimentales obtenidos para el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ (1-40) y fragmentos N-terminales varían de  $10^5$  a  $10^{10}$ ,<sup>207</sup> siendo más frecuentes los valores altos,<sup>208</sup> aunque se ha obtenido un valor bastante más alto,  $K_{\text{aff}} = 1.6 \times 10^{17}$  para el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ (1-42).<sup>209</sup> La desprotonación y coordinación a través del átomo de nitrógeno de la cadena principal es desfavorable para todas las posibles reacciones derivadas de este complejo. De esta manera, el complejo  $[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ , es el más estable para la sustitución simple del fragmento His13-His14.

Partiendo del complejo  $[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ , estudiamos la sustitución de una molécula de agua por un imidazol o un grupo fenol. Las energías de reacción calculadas indican que el desplazamiento por una molécula de imidazol es ligeramente exergónico ( $\Delta G^*_{\text{sol}} = -2.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $K_{\text{aff}} = 37.8$ ), lo cual corresponde a una energía libre global en solución acuosa de  $\Delta G^*_{\text{sol}} = -14.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ , si consideramos el complejo hexahidratado como punto de partida. Los resultados muestran que la reacción de desplazamiento cuando consideramos el fragmento His13-His14 es alrededor de tres veces más exergónica que la del tercer imidazol, partiendo del complejo de hierro hexahidratado, lo cual pone de manifiesto el efecto de la quelación y la importancia de la coordinación del péptido a través del oxígeno carbonilo. Las posibles disociaciones de moléculas de agua y la desprotonación de este complejo son desfavorables. De esta manera, el complejo  $[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ , conteniendo tanto el fragmento His13-His14 como el imidazol, es el más estable.

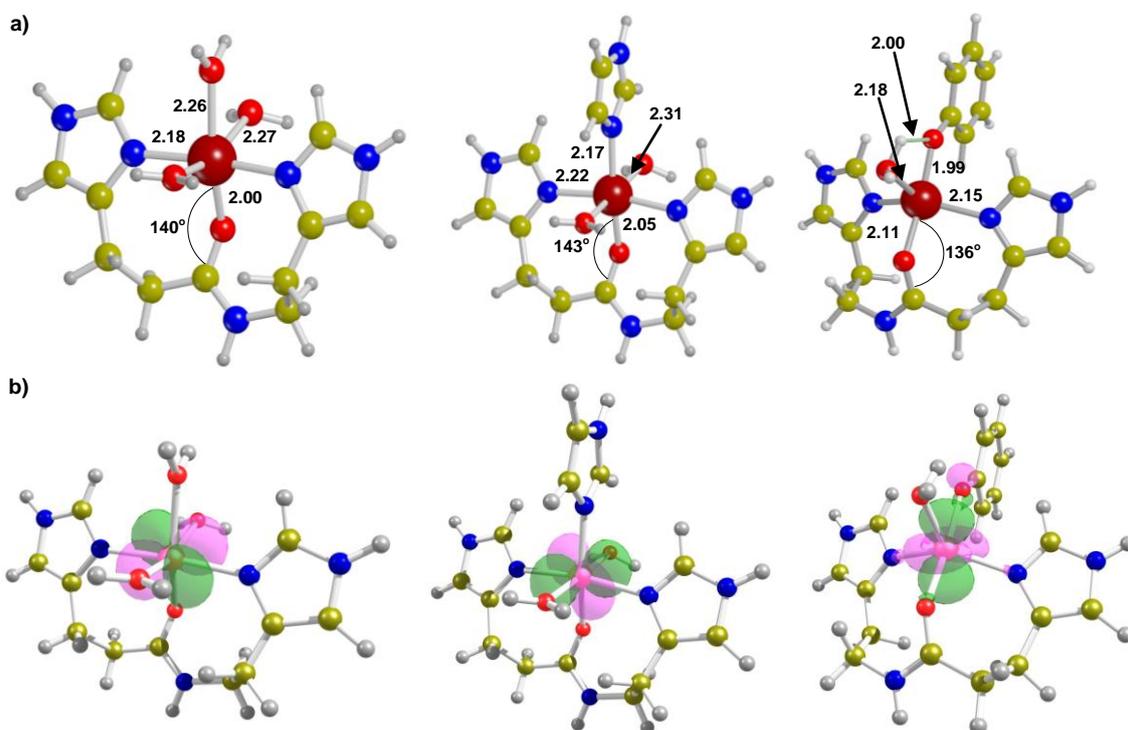
Por otro lado, la sustitución de una molécula de agua por el grupo fenol en el complejo  $[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$  es improbable. El cambio de energía libre en

solución acuosa para la reacción es de  $12.2 \text{ kcal mol}^{-1}$  a  $\text{pH} = 7$ , lo cual corresponde a una constante de afinidad calculada de  $K_{\text{aff}} = 1.2 \times 10^{-9}$ . La disociación de una molécula de agua de este complejo es exérgica ( $-4.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ ); por lo tanto, la reacción global hasta este punto, considerando el complejo hexahidratado como complejo de partida, es favorable por  $-4.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ . La desprotonación del grupo NH de la cadena principal y la disociación de moléculas de agua adicionales son procesos desfavorables desde un punto de vista termodinámico. Por lo tanto, el complejo  $[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{1+}$  es el más estable conteniendo tanto el fragmento His13-His14 como el fenolato de la Tyr10.

Las geometrías optimizadas de los complejos más estables de cada una de las rutas consideradas se muestran en la Figura 4.3, en la que también se muestran los orbitales d doblemente ocupados para cada uno de ellos. Estos complejos, en general, presentan distancias de enlace cortas, así como efectos Jan-Teller bastante bajos en las moléculas de agua axiales, como es de esperar para complejos  $d^6$  de alto espín. La coordinación del fragmento His13-His14 genera un complejo hexacoordinado en el que las demás posiciones están ocupadas por 3 moléculas de agua. Al coordinarse un imidazol adicional se forma un complejo octaédrico en el que una molécula de agua se sustituye por este grupo. Esta sustitución no tiene efectos geométricos significativos, como se puede deducir de los valores de distancias y ángulos, que son similares a las encontradas para el complejo con tres aguas coordinadas.

Por último, tal y como se observa en la Figura 4.2, el complejo más estable que contiene el fragmento His13-His14 y el fenol implica la pérdida de una molécula de agua, lo que resulta en un complejo pentacoordinado con una distancia  $\text{Fe}^{2+}-\text{O}_{\text{Ph}}$  bastante corta como resultado de una mayor atracción electrostática debido a la carga negativa del fenolato. Es remarcable también el puente de hidrógeno que se forma entre la molécula de agua coordinada en la posición axial y el átomo de oxígeno del grupo fenolato, lo que le brinda una estabilización adicional a este complejo. En estos tres sistemas el hierro presenta una densidad de espín de  $\sim 4.0$  y el orbital d doblemente ocupado corresponde se muestra en la Figura 4.3 b). Sólo en el caso de la coordinación del fenolato se observa una pequeña contribución de los ligandos al orbital doblemente

ocupado, que puede ser debida a la polarización producto de la carga negativa de este ligando.

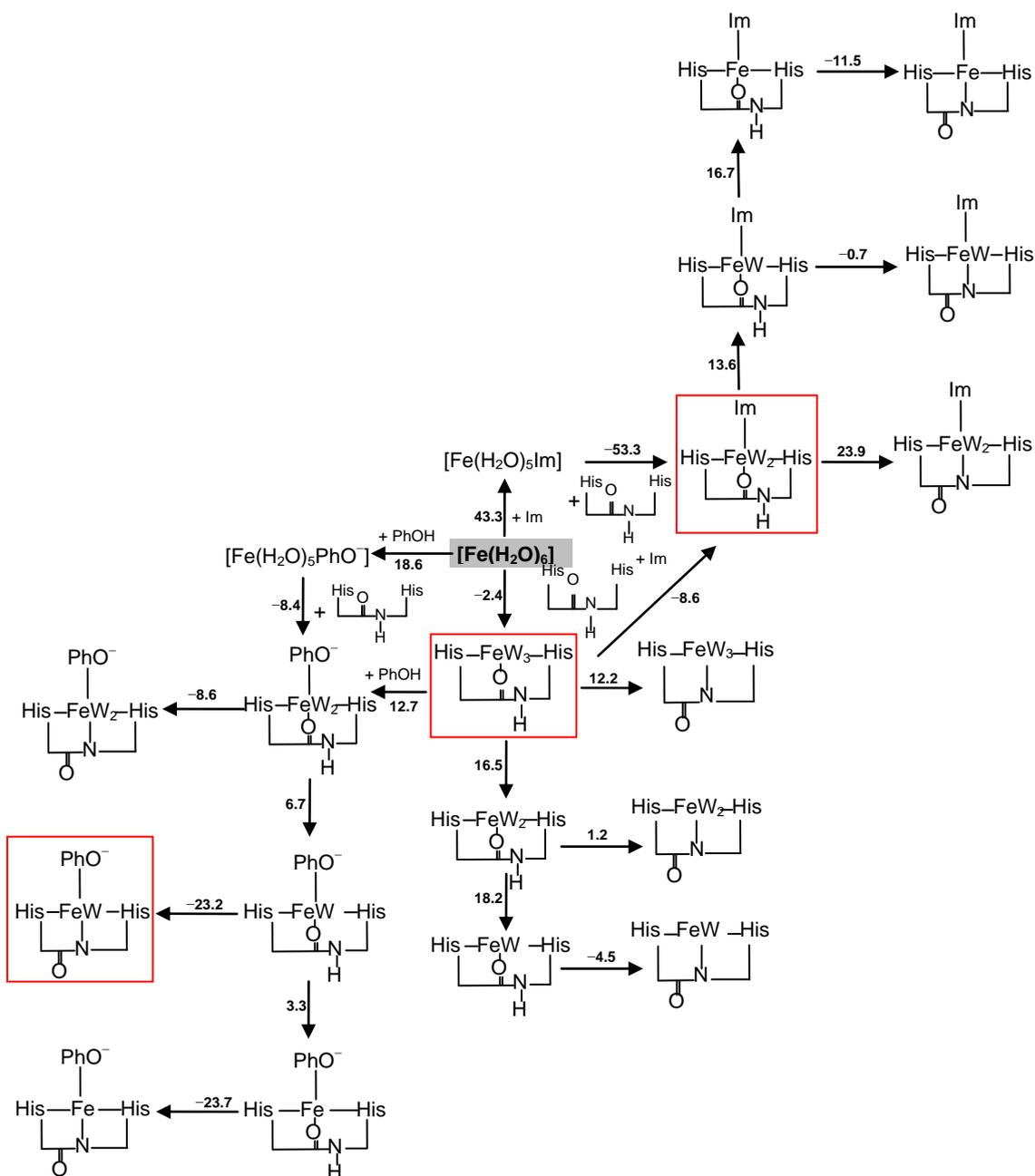


**Figura 4.3.** a) Geometrías optimizadas al nivel B3LYP/6-31+G(d) de los modelos más estables para los complejos de Fe<sup>2+</sup>. Las longitudes de enlace están dadas en Å y los ángulos en grados. b) Orbital d doblemente ocupado (d<sub>xz</sub>) del átomo de hierro en cada complejo.

**Coordinación del Fe<sup>3+</sup> a la secuencia His13-His14, His6 y Tyr10.** Las correspondientes reacciones para el Fe<sup>3+</sup> se representan de manera esquemática en la Figura 4.4. De manera análoga al caso del Fe<sup>2+</sup>, los modelos más estables se resaltan en recuadros.

La primera observación remarcable es que la sustitución simple de un ligando (imidazol o fenol) es altamente endérgica ( $\Delta G^*_{\text{sol}} = 42.3 \text{ kcal mol}^{-1}$  y  $\Delta G^*_{\text{sol}} = 18.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ , respectivamente) debido en parte a los cambios altamente desfavorables de las energías libres de solvatación ( $\Delta\Delta G^*_{\text{solv}}$  en la Tabla A4.3 del apéndice), y al hecho de que con estos ligandos se observa una transferencia electrónica importante de forma que el catión Fe<sup>3+</sup> oxida parcialmente a los ligandos (ver más adelante), por lo que la

naturaleza repulsiva de las cargas parciales que se forman desestabiliza los complejos formados. Sin embargo, la coordinación del dipéptido His13-His14 es favorable por  $-2.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ ; lo que nuevamente resalta la importancia del enlace peptídico y el efecto de esta quelación en la coordinación del metal.



**Figura 4.4.** Reacciones estudiadas para los complejos de  $\text{Fe}^{3+}$  en las que se muestran los valores de energías libres de reacción en solución acuosa ( $\Delta G_{\text{sol}}^*$ ) en  $\text{kcal mol}^{-1}$ .

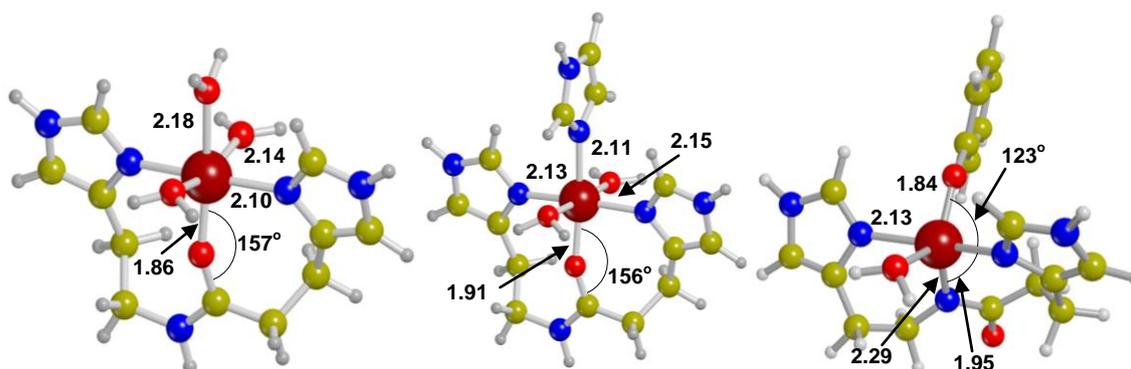
Las subsecuentes disociaciones de moléculas de agua y las desprotonaciones del grupo NH del enlace peptídico son energéticamente desfavorables y por consiguiente, la estructura más estable corresponde a aquella con tres moléculas de agua en la esfera de coordinación,  $[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+}$ .

Considerando el complejo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+}$  como punto de partida, y de manera similar al caso del  $\text{Fe}^{2+}$ , estudiamos las reacciones de desplazamiento de una molécula de agua de dicho complejo por una molécula de imidazol o fenol. La reacción con el imidazol es exergónica por  $-8.6 \text{ kcal mol}^{-1}$  y por tanto, más favorable que la reacción análoga con  $\text{Fe}^{2+}$  partiendo del complejo de hierro hexahidratado. Este cambio de energía libre en solución acuosa corresponde a una constante de afinidad calculada de  $2.0 \times 10^6$ . La reacción global partiendo del complejo hexahidratado es favorable por  $-11.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Además, las posibles disociaciones de moléculas de agua y reacciones de desprotonación son improbables para este complejo. Por otro lado, la reacción que involucra la sustitución de un fenol es endergónica por  $12.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Aunque la disociación de una segunda molécula de agua es también endergónica, la desprotonación del grupo NH en el complejo formado,  $[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  para generar el complejo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{1+}$ , es fuertemente exergónica ( $\Delta G^*_{\text{sol}} = -23.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). De hecho, los procesos de desprotonación en los complejos de  $\text{Fe}^{3+}$  son mucho más favorables que para los complejos de  $\text{Fe}^{2+}$ . Esto se debe principalmente a la mayor carga positiva en los complejos de  $\text{Fe}^{3+}$  lo cual produce un mayor incremento en la acidez del grupo NH. Como consecuencia, la formación global del complejo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{1+}$  es favorable por  $-6.2 \text{ kcal mol}^{-1}$  partiendo del complejo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ .

En este sentido y extrapolando los resultados antes mencionados en el contexto del A $\beta$ , el  $\text{Fe}^{3+}$  acuoso podría inicialmente coordinar al fragmento His13-His14, formando el complejo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+}$ , y subsecuentemente agregar una tercera histidina (e.g. His6). La adición de la Tyr10 puede proceder a través de un intermedio de alta energía que se desprotona y se reorganiza hacia el complejo coordinado a través del grupo amida desprotonado de la cadena principal, modelado por el complejo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{1+}$ . Las reacciones globales para formar los dos complejos partiendo del complejo hexahidratado de  $\text{Fe}^{3+}$  y el A $\beta$  son ambas

exergónicas a pH fisiológico ( $-6.2 \text{ kcal mol}^{-1}$  para el complejo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{1+}$  y  $-11.0 \text{ kcal mol}^{-1}$  para el  $[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ ). Así pues, estos resultados parecen indicar que la coordinación simultánea de ambos imidazoles y el ligando fenólico es plausible desde un punto de vista energético. Además, los espectros Raman calculados están de acuerdo con los obtenidos de manera experimental respecto a la coordinación del fenolato, tal y como se muestra en el siguiente apartado.

Las geometrías optimizadas de los modelos más estables de cada ruta se muestran en la Figura 4.5. Cabe mencionar, que en estos complejos los orbitales d del metal están monoocupados (configuración  $d^5$ ), por lo que las repulsiones entre los electrones d del metal y los electrones de los ligandos son menores, lo que, junto a la mayor carga positiva del metal, se refleja en unas longitudes de enlace más cortas que se observan en estos complejos respecto a sus análogos de  $\text{Fe}^{2+}$ . Los complejos que contienen el fragmento His13-His14 y el grupo imidazol adicional son hexacoordinados en los que el grupo CO del enlace peptídico interacciona directamente con el  $\text{Fe}^{3+}$ . Para estos dos complejos la densidad de espín en el hierro es  $\sim 4.2$ , el resto de la densidad de espín se encuentra distribuida entre el átomo de oxígeno del grupo CO del enlace peptídico y los nitrógenos de los imidazoles. Por el contrario, el complejo resultante de la sustitución de moléculas de agua por el fragmento His13-His14 y el grupo fenol es pentacoordinado. Debe señalarse que en este caso, a diferencia del complejo con  $\text{Fe}^{2+}$  en el que la coordinación del enlace peptídico del dipéptido al catión metálico se lleva a cabo por medio del nitrógeno amida, lo cual implica una desprotonación previa de este grupo. La densidad de espín sobre el átomo de hierro es en este caso de 4.05, distribuyéndose el resto de la densidad de espín esencialmente entre el N de la amida desprotonado y el anillo fenolato. La coordinación del nitrógeno del enlace peptídico implica la formación de metalaciclos más pequeños lo que aumenta la rigidez de la cadena peptídica, deformando notablemente la esfera de coordinación del metal, lo cual se refleja en el ángulo mostrado en la Figura 4.5 el cual es el menor de los complejos más estables obtenidos.

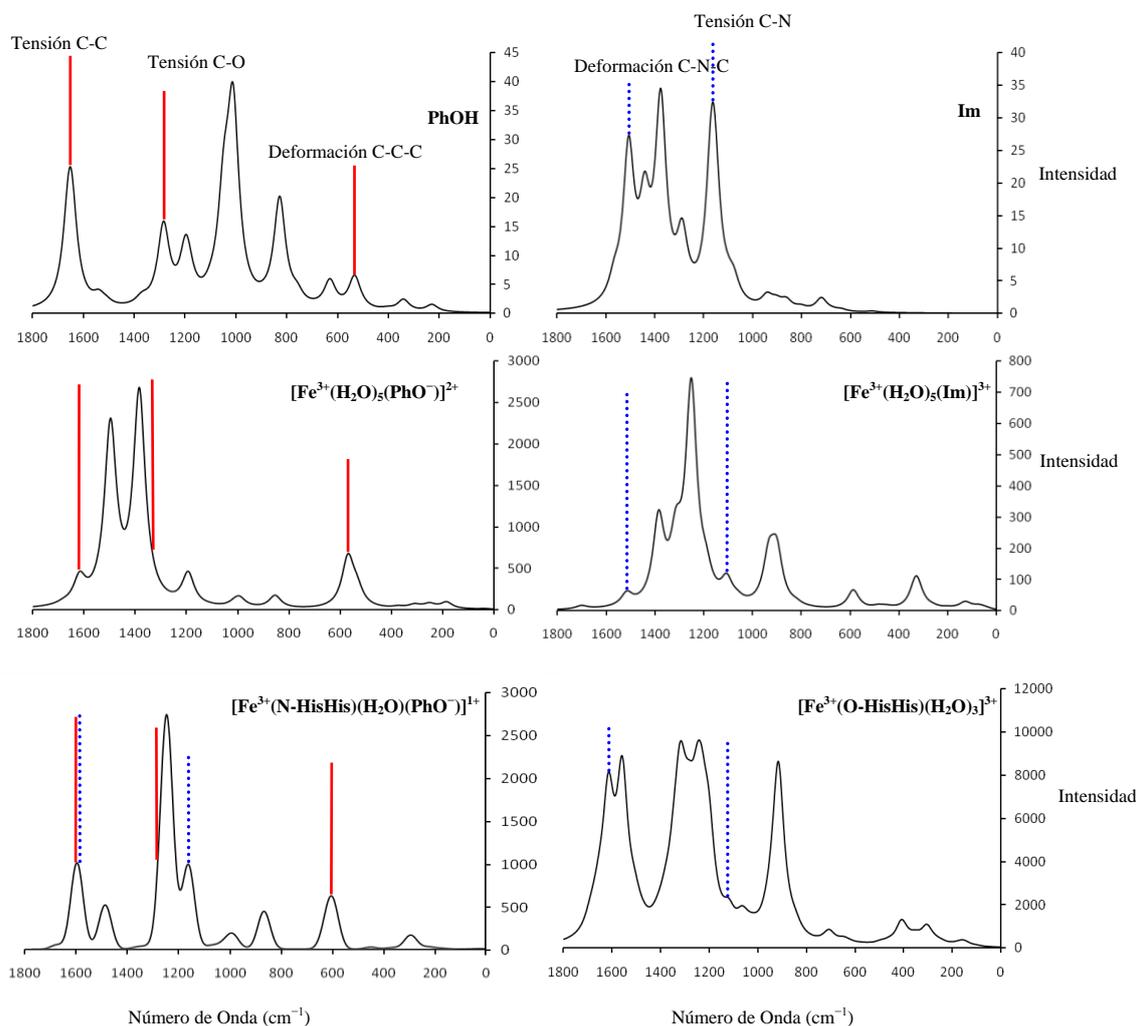


**Figura 4.5.** Geometrías optimizadas al nivel B3LYP/6-31+G(d) de los modelos más estables para los complejos de  $\text{Fe}^{3+}$ . Las longitudes de enlace están dadas en Å y los ángulos en grados.

**Espectros Raman para los Modelos más Estables del  $\text{Fe}^{3+}$ .** Los espectros Raman para los modelos más estables que contienen el grupo fenolato que representa la tirosina y el grupo imidazol representando la histidina, se obtuvieron mediante el cálculo de modos normales vibracionales armónicos escalados por un factor de 0.9806.<sup>191</sup> Los espectros más relevantes se muestran en la Figura 4.6 y los valores para las señales seleccionadas se detallan en la Tabla 4.2.

**Tabla 4.2.** Frecuencias Raman (en  $\text{cm}^{-1}$ ) de los modelos más estables de los complejos de  $\text{Fe}^{3+}$  al nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d).

Compuestos	C-N	C-N-C	C-O	C-C	C-C-C
	Imidazol		Fenol (o fenolato)		
PhOH			1286	1647	534
Im	1168	1508			
$[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{PhO}^-)]^{2+}$			1292	1638	570
$[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{Im})]^{3+}$	1133	1566			
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+}$	1120	1618			
$[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})(\text{PhO}^-)]^{1+}$	1185	1615	1267	1622	634



**Figura 4.6.** Espectros Raman de los complejos más estables de  $\text{Fe}^{3+}$ . Las líneas punteadas corresponden a las señales debidas a las vibraciones del imidazol y las líneas continuas a las contribuciones del grupo fenol (o fenolato). Nótese que se han utilizado diferentes escalas en el eje de intensidad para cada espectro.

Para analizar la influencia de la coordinación del  $\text{Fe}^{3+}$ , primero obtuvimos los espectros Raman del fenol e imidazol libres y seleccionamos algunas vibraciones específicas en la región de las huellas dactilares para compararlas con las experimentales. Para el fenol, seleccionamos la tensión C-C, la tensión C-O y la deformación C-C-C del anillo fenólico, las cuales ocurren en el rango de  $500\text{ cm}^{-1}$  a  $1700\text{ cm}^{-1}$ . Después obtuvimos los espectros de los complejos  $[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{Im})]^{3+}$  y  $[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{PhO}^-)]^{2+}$ , en los que el imidazol y el fenolato están coordinado al catión

metálico. Finalmente, también se obtuvieron los espectros de los complejos  $[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+}$  y  $[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{1+}$ , en el cual coexisten grupos imidazol y fenolato. El espectro Raman para el complejo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{PhO}^-)]^{2+}$  muestra un incremento importante en la intensidad de estas señales, respecto al espectro del ligando libre. Los desplazamientos observados después de la coordinación son, sin embargo, pequeños. Como era de esperar, y de acuerdo con lo encontrado experimentalmente por Miura *et al.*, el mayor incremento en los valores de las frecuencias de las vibraciones seleccionadas, es la calculada para la tensión C-O, debido a la interacción con el  $\text{Fe}^{3+}$ .

Para el imidazol, se seleccionaron como referencias las vibraciones correspondientes a la tensión C-N y la deformación C-N-C. En estos casos también observamos un incremento importante en la intensidad de estas señales en los complejos que contienen imidazol ( $[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_6(\text{Im})]^{3+}$  y  $[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+}$ ), al compararlos con el imidazol libre, y desplazamientos debidos a la coordinación del metal en las frecuencias de referencia. Es interesante ver que el pico correspondiente a la deformación C-N-C del imidazol se desplaza, siendo mayor que el pico correspondiente encontrado en el espectro del imidazol libre (Im en la Figura 4.6), lo que hace que aparezca a una frecuencia muy similar a la tensión C-C del fenolato en el espectro del complejo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})(\text{PhO}^-)]^{1+}$ . Por consiguiente, la banda a  $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$  en el espectro Raman del complejo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})(\text{PhO}^-)]^{1+}$ , el cual contiene tanto fenolato como ligandos imidazólicos, surge de la superposición de ambos modos vibracionales. Esta posibilidad no fue considerada por Miura *et al.* en su trabajo experimental, donde una banda a  $1604 \text{ cm}^{-1}$  fue asignada al tirosinato. Basados en nuestros cálculos, podemos sugerir que la coordinación del imidazol no debe ser excluida como indica el estudio experimental antes mencionado. Además, de acuerdo con las energías de reacción discutidas con anterioridad, la formación de un complejo de  $\text{Fe}^{3+}$  incluyendo tanto imidazol como fenolato es perfectamente posible.

**Potenciales Redox de los Complejos de Hierro.** Debido a que los complejos de  $\text{Fe}^{2+/3+}$  se han sugerido como especies participantes en la producción de peróxido de hidrógeno y de ión superóxido mediante una reacción de oxidación-reducción,

determinamos mediante cálculos computacionales la influencia de la coordinación del fragmento His13-His14, His6 y la Tyr10 en el potencial de reducción del par  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ . El valor experimental del potencial de reducción estándar para los complejos de hierro hexahidratados es de 0.77V (vs. el electrodo estándar de hidrógeno (EEH)).<sup>210</sup> Con el fin de validar la metodología usada, en una primera simulación calculamos la energía libre en solución ( $\Delta G^*_{\text{sol}} = -116.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) para la semireacción  $[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+} + \text{e}^- \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ , lo que corresponde a un potencial de reducción de 0.70 V, en muy buen acuerdo con el valor experimental. La coordinación del fragmento His13-His14 produce un aumento del potencial de reducción estándar siendo éste de 1.12 V, mientras que la coordinación sucesiva del tercer imidazol y el grupo fenol disminuye este valor a 0.84 y 0.61 V, respectivamente. En este último caso, además, la reducción del complejo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{1+}$  para producir  $[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{1+}$  implica la reprotonación de la cadena principal con lo cual el potencial de reducción en estas condiciones se calcula usando la ecuación de Nernst, dando un valor de  $E^{\text{o}'} = 0.20\text{V}$  a  $\text{pH} = 7$ . Este valor está en muy buen acuerdo con el calculado experimentalmente para el complejo ternario de hierro-A $\beta$ (1-16)-ácido nitriloacético (0.23 V vs EEH),<sup>79</sup> y además, es menor que el potencial de reducción estándar del par  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ ,<sup>210</sup> por lo que la producción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de  $\text{O}_2$  debido a la oxidación del complejo  $\text{Fe}^{2+}$ -A $\beta$  a  $\text{Fe}^{3+}$ -A $\beta$  estaría termodinámicamente favorecida. Este proceso requiere de la participación de especies reductoras externas capaces de reducir previamente el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -A $\beta$  a  $\text{Fe}^{2+}$ -A $\beta$ . Dicha reducción podría ser efectuada por especies presentes en el medio y que tienen potenciales de reducción inferiores a 0.23 V. Esta producción de peróxido de hidrógeno facilitaría la formación de especies radicalarias de oxígeno, lo que derivaría en los daños neuronales característicos en la enfermedad de Alzheimer.

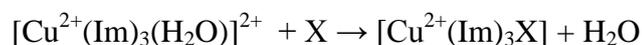
#### 4.2. INTERACCIÓN DEL $\text{Cu}^{2+}$ CON PÉPTIDOS MODELO DEL A $\beta$

A diferencia del hierro, el papel del cobre (en especial del  $\text{Cu}^{2+}$ ) ha sido abordado ampliamente por medios tanto teóricos como experimentales.<sup>26,208,211</sup> El  $\text{Cu}^{2+}$

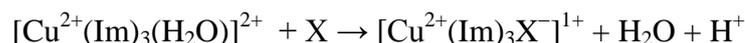
presenta una química particular debido a su configuración  $d^9$  (capa abierta), mostrando una particular flexibilidad en sus entornos de coordinación, que está además asociada de manera determinante al efecto Jahn-Teller que presentan sus complejos. La química de coordinación del  $\text{Cu}^{2+}$  está también condicionada por el carácter de ácido intermedio de Pearson de este catión, circunstancia que es común para los otros cationes divalentes en la segunda mitad de la primera serie de transición. Los entornos de coordinación del  $\text{Cu}^{2+}$ , al ser un doblete, pueden ser analizados por medio de EPR. La forma tetracoordinada del  $\text{Cu}^{2+}$  muestra un entorno de coordinación plano-cuadrado, mientras que el  $\text{Cu}^{1+}$ , un ión  $d^{10}$  (capa cerrada), tiene tendencia a formar complejos tetracoordinados en disposición tetraédrica, coordinaciones tricoordinadas con geometrías trigonales planas o bicoordinadas en una disposición lineal.

La hipótesis más generalizada sobre la coordinación del  $\text{Cu}^{2+}$  con el A $\beta$ , apunta a que las tres histidinas presentes en el A $\beta$ (1-42) (a saber, His6, His13 e His14) se encuentran coordinadas a este catión metálico,<sup>75,212</sup> siendo el cuarto ligando motivo de controversia. Debido a que existen diversos ligandos posibles presentes en la secuencia del A $\beta$ , en especial en la región de coordinación del cobre (aminoácidos del 1 al 16), y a la complejidad del sistema, las técnicas experimentales (e.g. EPR, DC, RMN, entre otras) no han permitido identificar sin ambigüedad todos los ligandos que conforman la esfera de coordinación del metal, siendo estos resultados altamente dependientes del pH del medio. Con el propósito de analizar la preferencia intrínseca que tiene el cobre por ligandos presentes en el A $\beta$  que han sido postulados como posibles grupos de coordinación, usamos el sistema  $[\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3\text{X}]$  para modelar la esfera de coordinación de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ , donde X puede ser uno de los posibles ligandos presentes en el A $\beta$ , que se muestra en la Figura 4.7.

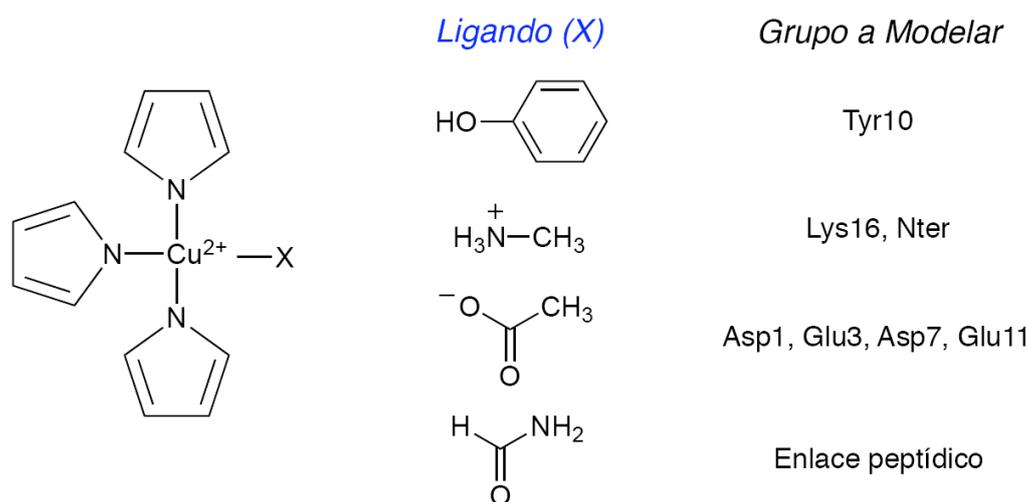
De esta manera, calculamos la energía de reacción en solución acuosa del desplazamiento de una molécula de agua del complejo  $[\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  por uno de los ligandos antes mencionados. Las energías de desplazamiento se calcularon a partir de la siguiente reacción general:



De los ligandos mostrados en la Figura 4.7, el fenol ( $C_6H_5OH$ ) y la metilamina ( $CH_3NH_3^+$ ) tienen valores de  $pK_a$  de 10.64 y 9.95 respectivamente. La coordinación de estos ligandos implica una desprotonación previa, por lo que la energía de desplazamiento se calcula mediante la siguiente reacción:



En la cual, para calcular el cambio de energía libre en solución acuosa añadimos el término de corrección del pH ( $RT \ln Q$ ) de forma análoga al procedimiento descrito para los complejos de hierro de la sección anterior.



**Figura 4.7.** Ligandos modelos utilizados para representar los posibles grupos que coordinan al cobre.

**4.2.1. Detalles Computacionales para los Sistemas Modelo  $Cu^{2+}$ -A $\beta$ .** Para el estudio de estos complejos realizamos optimizaciones de las geometrías y frecuencias vibracionales armónicas en fase gas considerando el formalismo no restringido mediante el uso de los funcionales híbridos de la densidad B3LYP y BHandHLYP<sup>129,136</sup> con la base de cálculo estándar 6-311++G(d,p) para los átomos de H, C, N y O; y la base de Watchers (15s11p6d1f)/[10s7p4d1f] para el átomo de Cu.<sup>213-215</sup>

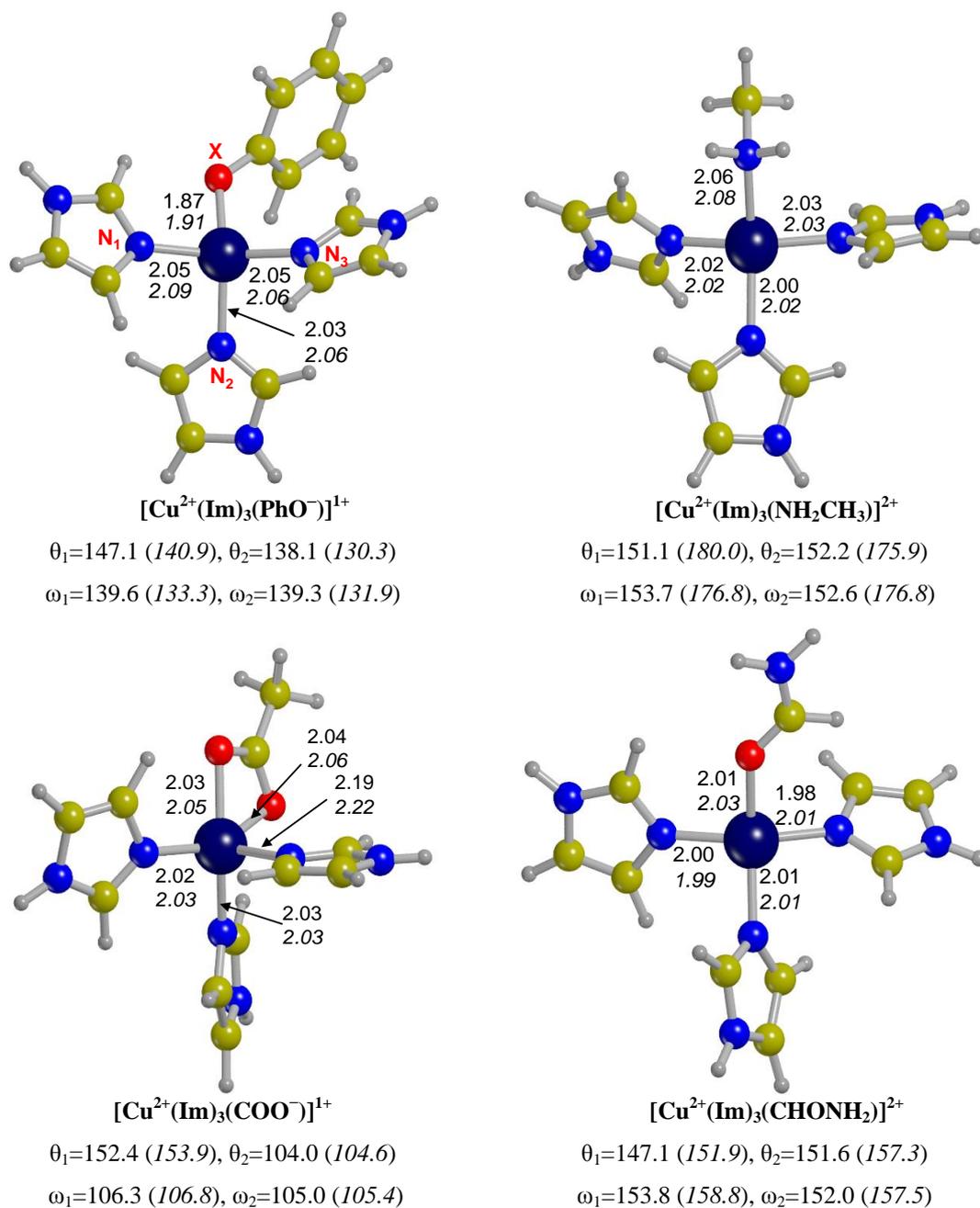
Los efectos del solvente fueron incluidos a través de cálculos puntuales de energía al mismo nivel de teoría, con agua como solvente, y usando el modelo del

continuo polarizable mediante el método del campo de reacción auto-consistente (SCRF = CPCM)<sup>143</sup> implementado en Gaussian 03.<sup>204</sup> Con el propósito de mejorar los cambios termodinámicos en las reacciones investigadas, consideramos el valor experimental para la energía libre de solvatación del agua y el valor de consenso para la energía de solvatación del proton, de forma similar a la descrita para el caso de los complejos de hierro de la sección anterior. Igualmente, las correcciones al valor de las energías libres de solvatación debidas a la concentración del agua y al cambio de entropía de fase gas a solución acuosa fueron también consideradas.<sup>216,200,201</sup>

Por otra parte, debido a que en el entorno del A $\beta$  las cadenas laterales de los residuos que coordinan al Cu<sup>2+</sup> no tienen una movilidad total como resultado de las restricciones impuestas por la estructura secundaria del péptido, se eliminaron los componentes rotacionales y traslacionales de la entropía para todas las especies, excepto para las moléculas de agua liberadas. Finalmente, los cálculos de las cargas atómicas y densidades de espín se determinaron a partir del análisis de población natural (NPA).<sup>217</sup>

**4.2.2. Resultados y Discusión para los Sistemas [Cu<sup>2+</sup>(Im)<sub>3</sub>X].** Las geometrías optimizadas de los complejos de Cu<sup>2+</sup> con los funcionales BH&HLYP y B3LYP se muestran en la Figura 4.8. Los dos funcionales presentan geometrías bastante similares, con distancias y ángulos de enlace ligeramente superiores para el caso del B3LYP. Este comportamiento se observa con más claridad en los casos en los que consideramos ligandos cargados negativamente, ya que éstos pueden deslocalizar la carga sobre el átomo de cobre más fácilmente.

En términos generales, los complejos presentan entornos plano-cuadrado distorsionados con ángulos planos ( $\theta_1$  y  $\theta_2$ ) entre  $\sim 130^\circ$  y  $\sim 180^\circ$ , a excepción del complejo [Cu<sup>2+</sup>(Im)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>)]<sup>1+</sup>, el cual presenta una configuración de pirámide de base cuadrada con los dos átomos de oxígeno del grupo carboxilo en posiciones ecuatoriales y uno de los imidazoles en posición axial. Esta última configuración es similar a la encontrada por Viles *et al.*<sup>49</sup> usando una serie de técnicas espectroscópicas complementarias aplicadas al sistema Cu<sup>2+</sup>-A $\beta$ (1-28).



**Figura 4.8.** Geometrías optimizadas para los complejos de cobre al nivel de cálculo BH&HLYP/6-311++G(d,p). Los valores B3LYP a la misma base de cálculo se muestran en cursiva. Todas las distancias están en Å y los ángulos en grados. Los ángulos mostrados se definen como:  $\theta_1=X-Cu-Im_2$ ,  $\theta_2=N_1-Cu-N_3$ ,  $\omega_1=N_3-Cu-N_2-N_1$ ,  $\omega_2=N_1-Cu-X-N_3$ .

Por otra parte, las distancias Cu-Im varían entre 1.98 y 2.08 Å, además, las distancias cobre-oxígeno encontradas son mayores que la distancia de enlace promedio

$(r_{\text{Cu-O}} = 1.93 \text{ \AA})^{218}$  reportada en estructuras cristalinas del PDB y *Cambridge Database* en las que el enlace Cu-O está presente en la esfera de coordinación. La distancia más cercana a este valor es la encontrada en el complejo  $[\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{PhO}^-)]^{1+}$ , debido a la mayor interacción electrostática entre el  $\text{Cu}^{2+}$  y el ligando cargado negativamente. En el caso del  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , a pesar de estar cargado negativamente, su coordinación bidentada y el hecho de que se formen estructuras resonantes, que deslocalizan la carga negativa sobre los dos oxígenos, hace que la distancia sea mayor. En términos generales, los entornos de coordinación encontrados son similares a los sugeridos experimentalmente para diferentes complejos  $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta$  ( $\text{A}\beta = 1\text{-}16, 28, 40$  y  $42$ ),<sup>219</sup> por lo que geoméricamente constituyen buenos puntos de partida para la construcción de los modelos más realistas del complejo  $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta$ .

Las energías libres de reacción en solución acuosa se calcularon de forma análoga al procedimiento descrito para el caso del  $\text{Fe}^{2+/3+}$ . Los valores para estas reacciones se detallan en la Tabla 4.3, para los dos funcionales utilizados. Los valores BH&HLYP muestran una preferencia del  $\text{Cu}^{2+}$  por el grupo  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  sobre los demás candidatos evaluados, siendo el grupo metilamina ( $\text{CH}_3\text{NH}_3^+$ ) el segundo candidato en términos energéticos, con una energía de reacción de  $\sim 3 \text{ kcal mol}^{-1}$  menor. Esto significa que las cadenas carboxílicas de los aminoácidos presentes en la región de afinidad por cobre del  $\text{A}\beta$  (Asp1, Glu 3, Asp7 y Glu11) son los que preferentemente coordinan al cobre, lo que resulta lógico teniendo en cuenta la carga negativa presente en estas cadenas laterales, lo que genera un aumento en las fuerzas electrostáticas que estabilizan el complejo formado. Sin embargo, el fenolato, aunque también presenta una carga negativa, muestra el mayor valor en las energías de desplazamiento dentro de los ligandos considerados, debido principalmente al hecho de que su coordinación requiere una desprotonación previa. Esta energía de reacción en solución refuerza las conclusiones obtenidas experimentalmente que descartan a este ligando como candidato a ocupar la cuarta posición en la esfera de coordinación del  $\text{Cu}^{2+}$ .<sup>49-52</sup> De esta manera, considerando los valores calculados en las energías de desplazamiento, el orden de preferencia para la coordinación del cuarto ligando es:  $\text{CH}_3\text{COO}^- > \text{CH}_3\text{NH}_3^+ > \text{CHONH}_2 > \text{PhOH}$ .

**Tabla 4.3.** Energías de reacción en solución acuosa (kcal mol<sup>-1</sup>) a 298 K para el desplazamiento de una molécula de agua por los ligandos propuestos.

Reacción <sup>a</sup>	$\Delta H_{(g)}$	$T\Delta S$	$\Delta G^o_{(g)}$	$\Delta\Delta G^*_{solv}$	$\Delta G^*_{sol}$
<b>BH&amp;HLYP</b>					
$C_1 + \text{PhOH} \rightarrow [\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{PhO}^-)]^{1+} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	170.2	19.6	150.6	-151.8	-11.2 <sup>1</sup>
$C_1 + \text{CH}_3\text{NH}_3^+ \rightarrow [\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{NH}_2\text{CH}_3)]^{2+} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	204.8	17.3	187.5	-197.1	-19.6 <sup>1</sup>
$C_1 + \text{CH}_3\text{COO}^- \rightarrow [\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{CH}_3\text{COO}^-)]^{1+} + \text{H}_2\text{O}$	-184.1	14.5	-198.7	175.8	-22.9
$C_1 + \text{CHONH}_2 \rightarrow [\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{CHONH}_2)]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	-14.2	13.1	-27.3	15.3	-12.0
<b>B3LYP</b>					
$C_1 + \text{PhOH} \rightarrow [\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{PhO}^-)]^{1+} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	163.6	21.3	142.3	-150.2	-17.9 <sup>1</sup>
$C_1 + \text{CH}_3\text{NH}_3^+ \rightarrow [\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{NH}_2\text{CH}_3)]^{2+} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	201.8	17.1	184.7	-198.0	-23.3 <sup>1</sup>
$C_1 + \text{CH}_3\text{COO}^- \rightarrow [\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{CH}_3\text{COO}^-)]^{1+} + \text{H}_2\text{O}$	-182.0	12.5	-194.5	174.1	-20.4
$C_1 + \text{NH}_2\text{CHO} \rightarrow [\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{CHONH}_2)]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	-13.0	12.9	-25.9	13.7	-12.2

<sup>a</sup>  $C_1 = [\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  valor obtenido añadiendo el término  $RT\ln Q$  (ver texto)

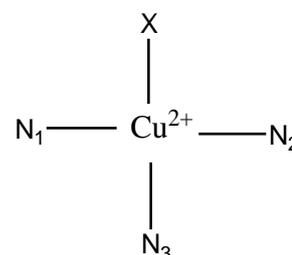
Por otro lado, los resultados B3LYP muestran un incremento importante en las energías libres de desplazamiento del grupo fenol y la metilamina comparadas con las obtenidas con el funcional BH&HLYP, y un ligero aumento en la reacción que involucra al grupo CHONH<sub>2</sub>; mientras que para la coordinación del acetato hay una disminución ligera en la energía de desplazamiento. Estas variaciones se deben esencialmente a diferencias de las energías libre en fase gas, como resultado de la deslocalización del espín sobre el cobre, tal como se muestra en la Tabla 4.4, en la que se presentan las densidades de espín calculadas mediante el análisis de población natural (NPA).

Estos valores son menores con el B3LYP, siendo especialmente mayores en los casos en los que especies cargadas se encuentran formando parte de la esfera de coordinación. Estos valores, además, permiten ver que la densidad de espín se mantiene sobre el catión metálico, incluso cuando el ligando es el fenolato, el cual ha sido propuesto como aminoácido clave en los procesos de oxidación-reducción que promueven los complejos Cu<sup>2+</sup>-Aβ.<sup>34</sup> Teniendo en cuenta que la energía de reacción en fase acuosa muestra que la coordinación de los otros ligandos que contienen oxígeno, y están presentes en la secuencia del Aβ, son más favorables para coordinar el Cu<sup>2+</sup>, y

considerando que la coordinación del fenol no genera la reducción del cobre, podemos sugerir que en caso de que el fenol participe en el proceso de oxidación-reducción, esta participación no se llevaría a cabo desde la primera esfera de coordinación del metal.

**Tabla 4.4.** Densidades de espín NPA para los complejos  $[\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3\text{X}]$  al nivel de cálculo BHandHLYP/6-311++G(d,p). Los valores B3LYP con la misma base de cálculo se muestran entre paréntesis.

Complejos	Cu	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	X
$[\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{PhO}^-)]^{1+}$	0.80 (0.55)	0.04 (0.06)	0.04 (0.05)	0.04 (0.05)	0.07 (0.17)
$[\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{NH}_2\text{CH}_3)]^{2+}$	0.78 (0.65)	0.05 (0.09)	0.06 (0.08)	0.05 (0.09)	0.06 (0.08)
$[\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{CH}_3\text{COO}^-)]^{1+}$	0.83 (0.63)	0.05 (0.08)	0.05 (0.08)	0.00 (0.07)	0.08 (0.14)
$[\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{CHONH}_2)]^{2+}$	0.81 (0.65)	0.05 (0.07)	0.05 (0.07)	0.06 (0.17)	0.03 (0.00)



### 4.3. CONCLUSIONES

En este capítulo se estudiaron sistemas modelo que contienen los cationes  $\text{Fe}^{2+/3+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$  y que podrían ser relevantes en la enfermedad de Alzheimer. Hemos explorado las posibles reacciones para la coordinación del imidazol, fenol, y el fragmento His13-His14 a los cationes metálicos  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , de manera secuencial, con el fin de determinar los complejos más estables que contienen dichos ligandos. Asimismo, se han calculado los espectros Raman de dichos complejo con el fin de compararlos con los obtenidos experimentalmente, y además, se ha determinado el papel de la coordinación de los residuos del A $\beta$  en el potencial redox de los complejos de hierro.

Explorando las posibles rutas encontramos que los modelos más estables que contienen tres grupos imidazoles son los complejos hexacoordinados  $[\text{Fe}^{2+/3+}-(\text{O}-\text{HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+/3+}$  en los cuales el dipéptido interacciona con el metal a través de los nitrógenos de los imidazoles y del oxígeno carbonilo. Por otro lado, el complejo más

estable que contiene el fragmento His13-His14 y el grupo fenolato son los complejos pentacoordinados  $[\text{Fe}^{2+}\text{-(O-HisHis)(PhO}^{\ominus}\text{)(H}_2\text{O)}]^{1+}$  y  $[\text{Fe}^{3+}\text{-(N-HisHis)(PhO}^{\ominus}\text{)(H}_2\text{O)}]^{1+}$ . Las energías de reacción calculadas para el  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  muestran que la coordinación simultánea del fenolato y el fragmento His13-His14 es favorable en términos termodinámicos. Además, los espectros Raman para los modelos más estables confirman la conclusión obtenida por Miura *et al.* según la cual la tirosina podría estar coordinada al  $\text{Fe}^{3+}$ . Sin embargo, los cambios calculados en las intensidades Raman para el complejo  $[\text{Fe}^{3+}\text{-(N-HisHis)(PhO}^{\ominus}\text{)(H}_2\text{O)}]^{1+}$  (comparados con el imidazol y el fenol no coordinados), así como el hecho de que algunas señales del fenolato e imidazol se solapan, haciendo que sean difíciles de diferenciar experimentalmente, no excluyen a las histidinas del A $\beta$  como posibles ligandos. Finalmente, cálculos de potenciales de reducción estándar de los complejos más estables de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  indican que la coordinación de la tirosina reduce el potencial de reducción del par  $\text{Fe}^{3+/2+}$  en más de 0.5 V en condiciones fisiológicas, comparado con el valor del hierro hexahidratado. El valor obtenido está en buen acuerdo con los resultados experimentales para los sistemas ternarios de  $\text{Fe}^{3+}$ -A $\beta$ (1-16)-ácido acetonitrilo, y permitirían la participación de los complejos  $\text{Fe}^{3+}$ -A $\beta$  en la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de ión superóxido a partir de oxígeno molecular. Este hecho es relevante en la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer, ya que el daño neuronal observado a nivel cerebral comienza con la producción excesiva de estas especies oxigenadas.

En cuanto a los complejos de  $\text{Cu}^{2+}$ , se han determinado las energías de desplazamiento de una molécula de agua del complejo  $[\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  por posibles ligandos presentes en la región de afinidad por el cobre del A $\beta$ . Estas energías de desplazamiento sugieren que en términos globales las preferencias del cobre por estos ligandos al nivel BH&HLYP sigue el orden:  $\text{CH}_3\text{COO}^- > \text{CH}_3\text{NH}_3^+ > \text{NH}_2\text{CHO} > \text{PhOH}$ . El  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  sería el ligando preferido de acuerdo con la mayor interacción electrostática, mientras que el fenol es el ligando con menor preferencia, en concordancia con los resultados experimentales. Por otra parte, el análisis de densidades de espín para el complejo con fenolato no muestra evidencias que permitan

relacionarlo con los procesos de oxidación-reducción de la enfermedad de Alzheimer, al menos no formando parte de la primera esfera de coordinación.

La comparación de los dos funcionales utilizados muestra que el B3LYP tiende a deslocalizar la densidad de espín en los ligandos coordinados, de forma similar a lo observado anteriormente en nuestro grupo para otros sistemas de  $\text{Cu}^{2+}$ . Dado que en estudios previos el funcional BH&HLYP mostró resultados en mejor acuerdo con los resultados CCSD(T), en el estudio de los sistemas  $\text{Cu}^{1+/2+}$ -A $\beta$ (1-16) del Capítulo 6 se considerará únicamente este funcional.

Las geometrías obtenidas para los sistemas modelo están en concordancia con las encontradas mediante estudios experimentales, por lo que constituyen un buen punto de partida para la construcción de modelos más completos de la coordinación del  $\text{Cu}^{2+}$  con el A $\beta$ .



# 5

## VARIACIÓN DEL $pK_a$ DEL IMIDAZOL EN COMPLEJOS DE $Cu^{2+}$

La interacción de un ligando con un catión metálico puede inducir cambios importantes en sus propiedades acido-base.<sup>220</sup> Así, por ejemplo, diversos estudios han mostrado que la coordinación de metales al N7 de la guanina aumenta de forma significativa la acidez del enlace N1-H, lo que genera variaciones de  $pK_a$  de unas tres unidades.<sup>221,222</sup> Asimismo, se ha encontrado que el grupo NH del imidazol disminuye su  $pK_a$  al coordinarse al  $Cu^{2+}$  en complejos con residuos de histidinas o histidil.<sup>223-226</sup> En uno de estos estudios, Martin *et al.* estudiaron la ionización del grupo imidazol en este tipo de complejos obteniendo disminuciones en el valor del  $pK_a$  de por lo menos 3 unidades.<sup>223</sup>

Un caso de complejos que contienen cationes de cobre coordinados a residuos de histidinas es el formado entre el  $Cu^{2+}$  y el A $\beta$ . Tal como se ha indicado a lo largo de este trabajo, este complejo está relacionado con la neurotoxicidad observada en la EA y en la formación de las placas seniles.<sup>26,227-229</sup> En el capítulo anterior consideramos complejos de  $Cu^{2+}$  coordinados a 3 residuos de histidina para modelar las posibles esferas de coordinación del complejo  $Cu^{2+}$ -A $\beta$ . En estos complejos, podría también esperarse que el  $Cu^{2+}$  acidificara los ligandos, de forma que uno de ellos podría desprotonar a valores

de pH cercanos al fisiológico, lo cual redundaría en importantes cambios estructurales.<sup>26,229</sup>

Otro caso particular en el que esta variación puede ser relevante es el de la citocromo *c* oxidasa (CcO), la enzima terminal en la cadena respiratoria de los organismos aeróbicos.<sup>230-235</sup> En esta enzima la química redox toma lugar en un centro binuclear el cual incluye un centro de coordinación al cobre (Cu<sub>B</sub>) coordinado a tres imidazoles de residuos de histidinas. Varios estudios sugieren que la desprotonación de uno de los anillos de imidazol enlazados al Cu<sub>B</sub> es un paso clave en el mecanismo de bombeo de protones propuesto.<sup>236-246</sup> Para este sistema, el p*K*<sub>a</sub> del imidazol puede variar de manera significativa dependiendo del estado de oxidación del Cu<sub>B</sub>. Es decir, en el estado que implica el Cu<sup>2+</sup> oxidado, el catión metálico puede inducir una disminución significativa del valor del p*K*<sub>a</sub> del imidazol (p*K*<sub>a</sub> ≈ 14 en agua)<sup>247-249</sup> permitiendo su desprotonación a pH fisiológico. Cálculos anteriores a nivel DFT discrepan enormemente en el valor del p*K*<sub>a</sub> del imidazol unido al centro Cu<sub>B</sub>, obteniéndose valores entre 6.3 y 26.9.<sup>242, 250</sup>

Las estimaciones fiables de los valores de p*K*<sub>a</sub> utilizando métodos químico-cuánticos son difíciles, ya que los cálculos de p*K*<sub>a</sub> implican especies iónicas para las cuales los modelos del solvente continuo pueden incurrir en errores significativos. Por esta razón se han desarrollado varias estrategias incluyendo diferentes ciclos termodinámicos para mejorar las estimaciones de energías libres en solución, y/o moléculas de aguas explícitas para mejorar las estimaciones de las interacciones soluto-solvente.<sup>198</sup> De esta manera, el propósito de esta sección es realizar un estudio que determine la influencia de la coordinación del Cu<sup>2+</sup> en el p*K*<sub>a</sub> del imidazol en un *bulk* de agua, usando varios protocolos y cálculos químico-cuánticos de alto nivel, para determinar si estas desprotonaciones son posibles en el medio celular. No tenemos conocimiento, hasta la fecha de escritura de esta tesis, de otro estudio sistemático que relacione el número de anillos de imidazol presentes en los complejos de Cu<sup>2+</sup> con la disminución del p*K*<sub>a</sub> de dichos ligandos usando distintos protocolos. El estudio de la variación del p*K*<sub>a</sub> en este tipo de sistemas es de alta relevancia para la química de la EA, ya que la posible desprotonación de una de las histidinas coordinadas al cobre introduce

un nuevo factor a tener en cuenta en la determinación de las propiedades de los complejos  $Cu^{2+}$ -A $\beta$ .

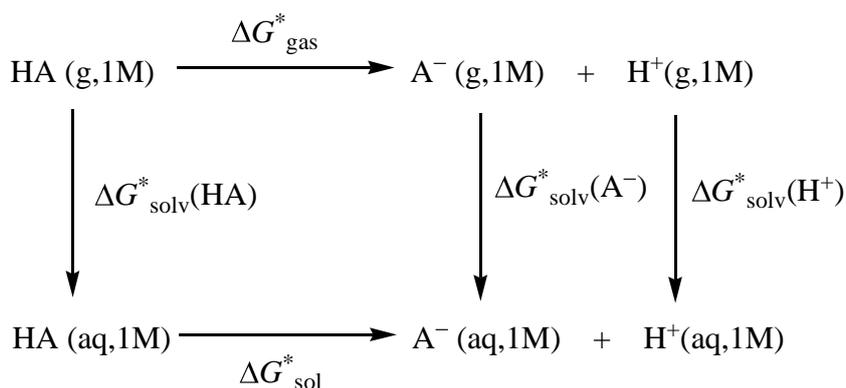
### 5.1. CICLOS TERMODINÁMICOS PARA CÁLCULOS DE $pK_a$

El valor del  $pK_a$  indica el grado de desprotonación de un ácido de Brønsted (HA) en solución y está relacionado de manera directa con el cambio de energía libre del proceso de disociación para un estado estándar de  $1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\Delta G^*_{\text{sol}}$ :

$$pK_a(\text{HA}) = \frac{1}{2.303RT} \Delta G^*_{\text{sol}} \quad (5.1)$$

Por lo tanto, la determinación computacional de un valor de  $pK_a$  implica el cálculo de la energía de Gibbs del proceso de disociación en solución,  $\Delta G^*_{\text{sol}}$ . Sin embargo, resulta complicado calcular de manera exacta este término, por lo que se han propuesto varias estrategias. El ciclo termodinámico más simple usado para determinar  $\Delta G^*_{\text{sol}}$  se muestra en el siguiente esquema (Ciclo 1):

#### Ciclo 1



En este ciclo el valor de  $\Delta G^*_{\text{gas}}$  calculado se combina con la energía de Gibbs de solvatación para cada especie involucrada en la reacción,  $\Delta G^*_{\text{solv}}$ . El primero puede determinarse con un buen nivel de exactitud por medio de métodos químico-cuánticos,

mientras que las energías de Gibbs de solvatación se obtienen habitualmente utilizando modelos del solvente continuo, los cuales están parametrizados para obtener valores precisos de las energías de solvatación. Según el Ciclo 1 la  $\Delta G_{\text{sol}}^*$  puede expresarse como:

$$\Delta G_{\text{sol}}^* = \Delta G_{\text{gas}}^* - \Delta G_{\text{solv}}^*(\text{HA}) + \Delta G_{\text{solv}}^*(\text{A}^-) + \Delta G_{\text{solv}}^*(\text{H}^+) \quad (5.2)$$

donde  $\Delta G_{\text{gas}}^*$  es la energía libre de reacción en fase gas usando un estado estándar de 1 mol L<sup>-1</sup> y  $\Delta G_{\text{solv}}^*(\text{AH})$ ,  $\Delta G_{\text{solv}}^*(\text{A}^-)$  y  $\Delta G_{\text{solv}}^*(\text{H}^+)$  son las energías estándar de solvatación en fase acuosa para las especies AH, A<sup>-</sup> y H<sup>+</sup>, respectivamente. Dado que para los valores calculados se ha usado un valor estándar de 1 atm, para convertir estas energías del estado estándar de 1 atm a un estado estándar de concentración 1 mol L<sup>-1</sup> añadimos la corrección  $1.89 \Delta n \text{ kcal mol}^{-1}$  a las energías libres de fase gas ( $\Delta G_{\text{(g)}}^0$ ), de manera análoga al procedimiento descrito en el Capítulo 4 para los complejos de hierro y cobre. Con lo cual el  $pK_a$  se calcula mediante la siguiente expresión:

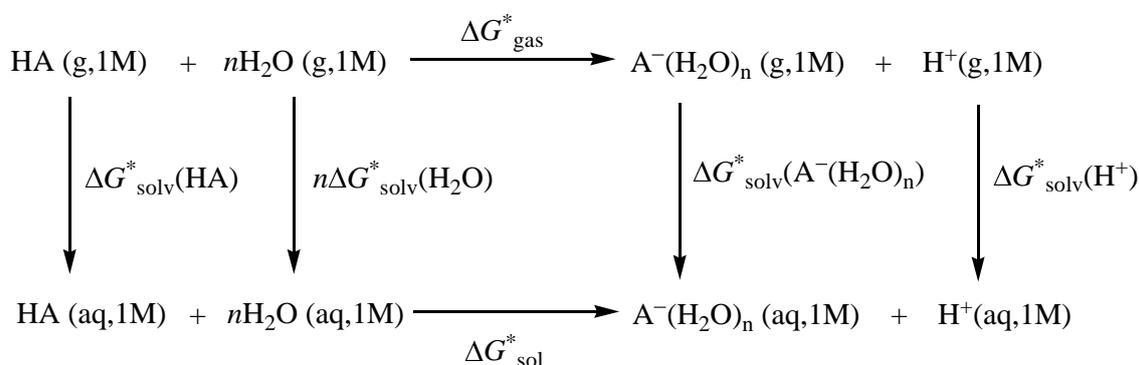
$$pK_a(\text{HA}) = \frac{1}{2.303RT} (\Delta G_{\text{gas}}^0 - \Delta G_{\text{solv}}^*(\text{HA}) + \Delta G_{\text{solv}}^*(\text{A}^-) + \Delta G_{\text{solv}}^*(\text{H}^+) + 1.89) \quad (5.3)$$

Este método requiere el uso de un valor experimental para la energía libre de solvatación del protón,  $\Delta G_{\text{solv}}^*(\text{H}^+)$ . La energía libre en fase gas del protón se calcula de manera sencilla, siendo  $G_{\text{(g)}}^0(\text{H}^+) = -6.28 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

Los modelos del solvente continuo se han aplicado de manera exitosa en la determinación de propiedades en fase líquida de moléculas neutras, incluyendo energías libres de solvatación. Sin embargo, la solvatación de una especie iónica es más problemática debido a los fuertes efectos electrostáticos que se presentan. Varios estudios han mostrado que reemplazando solutos iónicos por *clusters* hidratados, sobre

todo en el caso de aniones, se mejora el cálculo de la energía libre de solvatación<sup>198,200,251-255</sup> y, como consecuencia, el valor del  $pK_a$  calculado. Existen diferentes aproximaciones que combinan modelos del solvente implícito con moléculas de solvente explícitas para el cálculo del  $pK_a$ .<sup>198</sup> Uno de ellos<sup>253</sup> utiliza el ciclo termodinámico mostrado en el siguiente esquema:

**Ciclo 2**



El estado estándar del solvente en este ciclo es  $1 \text{ mol L}^{-1}$  y el cálculo del  $pK_a$  está asociado al cambio de energía libre del proceso de desprotonación considerando un estado estándar de una solución ideal diluida para la cual la concentración del agua es  $55.34\text{M}$ , por lo que se debe añadir un término de corrección  $\Delta G^{* \rightarrow l} = nRT \ln(55.34)$ , de forma similar a la realizada para los sistemas de hierro (Capítulo 4).<sup>200,201</sup>

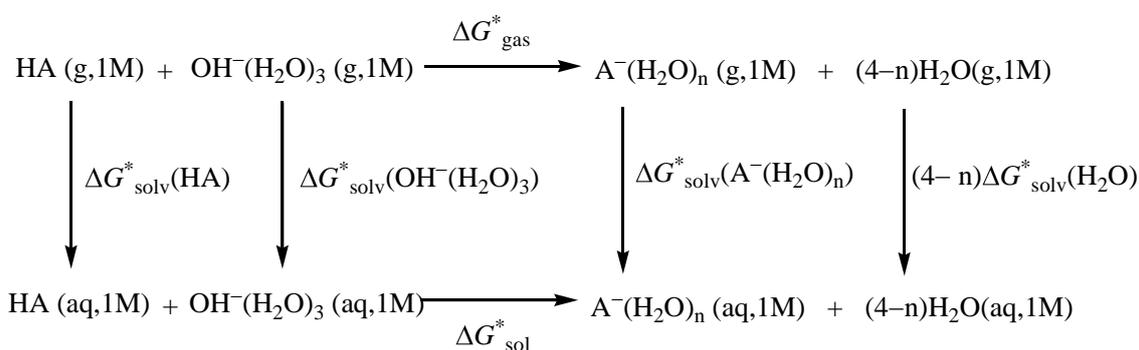
Usando el Ciclo 2, el valor del  $pK_a$  se obtiene a través de la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned}
 pK_a(\text{HA}) = \frac{1}{2.303RT} & (\Delta G_{\text{gas}}^0 - \Delta G_{\text{solv}}^*(\text{HA}) - n\Delta G_{\text{solv}}^*(\text{H}_2\text{O}) \\
 & + \Delta G_{\text{solv}}^*(\text{A}^-(\text{H}_2\text{O})_n) + \Delta G_{\text{solv}}^*(\text{H}^+) \\
 & + (1-n)1.89 - nRT \ln(55.34))
 \end{aligned} \quad (5.4)$$

Donde el valor de la energía libre estándar de hidratación del agua se toma de la literatura,  $\Delta G_{\text{solv}}^*(\text{H}_2\text{O}) = -6.32 \text{ kcal mol}^{-1}$ .<sup>196</sup>

Un modelo diferente es el que se conoce como modelo *clusters*-continuo, el cual incluye cálculos de energías de solvatación mediante el modelo del solvente continuo pero incluyendo además moléculas de agua explícitas.<sup>254</sup> En este modelo el valor del  $pK_a$  de un ácido se obtiene a través de una reacción de transferencia protónica entre el ácido y el anión hidroxilo solvatado, tal como se muestra en el siguiente esquema:

**Ciclo 3**



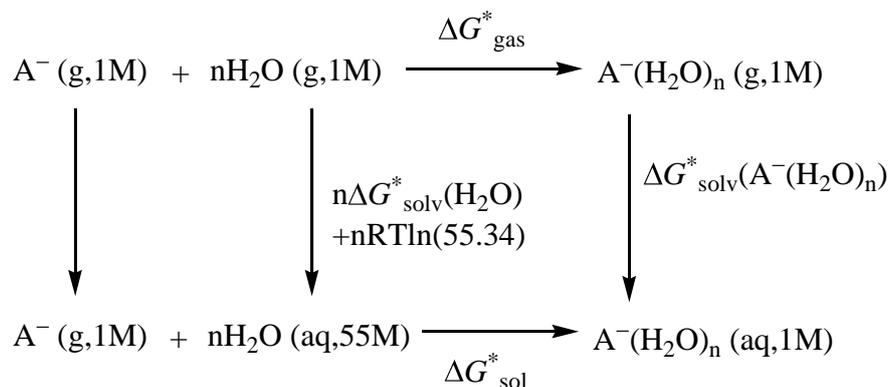
En este caso, usando las correspondientes correcciones que fueron descritas con anterioridad, el  $pK_a$  se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned}
 pK_a(\text{HA}) = 14 + \frac{1}{2.303RT} & (\Delta G_{\text{gas}}^0 - \Delta G_{\text{solv}}^*(\text{HA}) - \Delta G_{\text{solv}}^*(\text{OH}^-(\text{H}_2\text{O})_3) \\
 & + \Delta G_{\text{solv}}^*(\text{A}^-(\text{H}_2\text{O})_n) + (4-n)\Delta G_{\text{solv}}^*(\text{H}_2\text{O}) \\
 & + (3-n)1.89 + (4-n)RT\ln(55.34))
 \end{aligned} \quad (5.5)$$

El número de moléculas de agua (valor de  $n$ ) se determina usando una aproximación “variacional” de *cluster*-continuo para el cálculo de la energía libre de solvatación de la especie iónica  $\text{A}^-$ .<sup>256</sup> En esta aproximación,  $n$  corresponde al número de moléculas de agua para el cual el valor de  $\Delta G_{\text{solv}}^*(\text{A}^-)$  determinado usando el Ciclo 4 da el valor mínimo. Para el anión hidroxilo, el valor óptimo de  $n$  corresponde a 3 y para muchos otros iones monovalentes el número ideal varía entre 2 y 3.<sup>256</sup> Sin embargo, tal y como se demuestra en un artículo reciente por Ho *et al.*,<sup>198</sup> la inclusión de una molécula de

agua ( $n = 1$ ) ya redonda en una mejora del valor del  $pK_a$  con respecto al obtenido con el método directo (Ciclo 1).

#### Ciclo 4



Una revisión extensa de la fiabilidad de estos y otros ciclos termodinámicos para los cálculos de  $pK_a$  ha sido publicado recientemente por Ho *et al.*<sup>198</sup>

## 5.2. DETALLES COMPUTACIONALES

Las optimizaciones completas de las geometrías y los cálculos de frecuencias armónicas de los diferentes sistemas en fase gas se llevaron a cabo mediante el uso de los funcionales híbridos B3LYP<sup>135,136,190</sup> y MPWB1K.<sup>138</sup> Se utilizó el funcional B3LYP ya que ha sido adoptado de forma generalizada como un método efectivo y barato en términos computacionales para el estudio de los complejos de metales de transición. Sin embargo, tal y como se mencionó en el Capítulo 3, estudios desarrollados en nuestro grupo en sistemas  $Cu^{2+}$ -ligando han demostrado que funcionales con diferentes porcentajes de intercambio exacto pueden proveer diferentes resultados cuando el grado de deslocalización de carga y espín es importante.<sup>131-134</sup> Por ello, se realizaron cálculos con el funcional MPWB1K que contiene un porcentaje de intercambio exacto superior al B3LYP (44% vs 20%), ya que estudios previos para los sistemas  $Cu^{2+}(H_2O)_4$  han mostrado que proporciona resultados en buen acuerdo con los obtenidos a nivel CCSD(T).<sup>257</sup> No obstante, para confirmar la fiabilidad de los resultados DFT para los presentes sistemas, realizamos cálculos puntuales CCSD(T) sobre las geometrías

B3LYP y MPWB1K, para algunos casos seleccionados. Los cálculos CCSD(T) fueron llevados a cabo correlacionando todos los electrones, excepto los electrones 1s para los átomos de O, C y N, y los electrones 1s, 2s, 3s, y 3p para el átomo de Cu.

El conjunto de bases usado para los átomos de H, C, N y O fue la 6-311++G(d,p). Para el átomo de Cu usamos la base (15s11p6d1f)/[10s7p4d1f], basados en el conjunto de primitivas (14s9p5d) de Watchers,<sup>215</sup> complementada con una función difusa s, dos p y una d<sup>215,258,259</sup> y una función de polarización f.<sup>259</sup> Con el fin de analizar el efecto de extender la base, se realizaron también cálculos con el conjunto de base 6-311++G(2df,2pd). Las correcciones termodinámicas en fase gas se obtuvieron para los dos niveles de cálculo DFT considerando un gas ideal, frecuencias vibracionales armónicas no escaladas, y la aproximación del rotor rígido mediante métodos estadísticos estándares.<sup>260</sup>

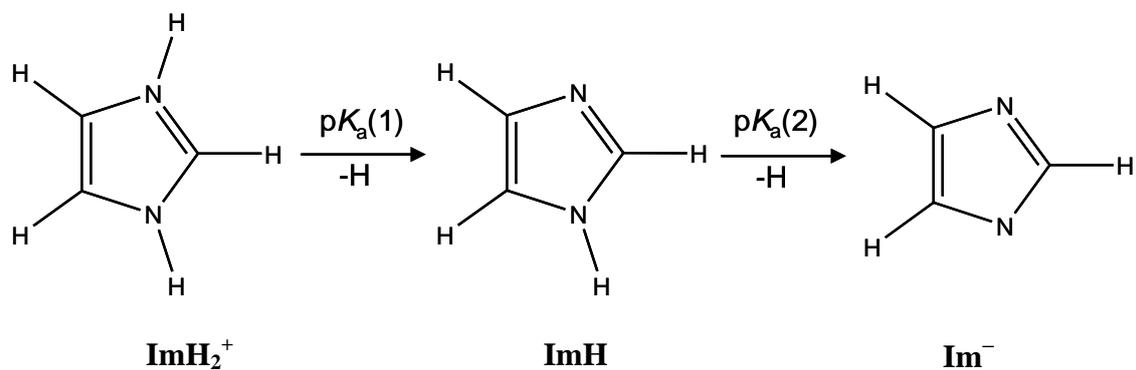
La energía de solvatación de cada especie se determinó mediante el método del continuo polarizable, CPCM,<sup>143,247</sup> implementado en Gaussian 03.<sup>204</sup> Estos cálculos se realizaron sobre las geometrías en fase gas usando los mismos métodos DFT y los mismos conjuntos de bases usados en las optimizaciones en fase gas. La cavidad del solvente se definió con el modelo UA0, implementado por defecto en Gaussian 03. Además, se realizaron cálculos usando el modelo UAHF, ya que este método ha mostrado dar energías de solvatación precisas de varios compuestos<sup>261,262</sup> y ha sido usado en la evaluación del pK<sub>a</sub> de las cadenas laterales de aminoácidos interactuando con cationes metálicos.<sup>263</sup>

Los cálculos de capa abierta se basaron en el formalismo no restringido. Todos los cálculos han sido realizados con el paquete de programas Gaussian 03.<sup>204</sup> Las cargas atómicas y las densidades de espín fueron obtenidas del análisis de población natural (NPA).<sup>217,264</sup>

### 5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**5.3.1. pK<sub>a</sub> del Imidazol Protonado (ImH<sub>2</sub><sup>+</sup>).** La Figura 5.1 muestra los procesos de desprotonación considerados en este estudio. Para determinar la exactitud de nuestros pK<sub>a</sub> calculados, en primer lugar determinamos el primer pK<sub>a</sub> absoluto para

el imidazol. Estos cálculos se llevaron a cabo usando los dos funcionales híbridos, B3LYP y MPWB1K, y el método CCSD(T), a ambas geometrías optimizadas. Los resultados obtenidos usando el Ciclo 1 se muestran en la Tabla 5.1 y demuestran que ambos funcionales dan buenos resultados comparados con los cálculos CCSD(T). Los valores de  $pK_a$  calculados son, sin embargo, también superiores al valor experimental de 7.0.<sup>265</sup> Debe tenerse en cuenta que una diferencia de  $pK_a$  de una unidad implica una diferencia energética de tan sólo  $1.36 \text{ kcal mol}^{-1}$ , lo cual indica que una pequeña desviación en una de las contribuciones que aparecen en la ecuación (4) puede causar una gran desviación en los valores de  $pK_a$  calculados. Puede observarse también que el efecto de extender el conjunto de bases en los valores de  $pK_a$  obtenidos es pequeño. Los valores de  $pK_a$  calculados usando la base 6-311++G(2df,2pd) para la energía potencial en fase gas son similares a los calculados con el conjunto de funciones base más pequeño, siendo la diferencia más grande de  $0.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ .



**Figura 5.1.** Primera y segunda desprotonación del imidazol.

**Tabla 5.1.** Valores de  $pK_a$  para el imidazol protonado ( $\text{ImH}_2^+$ ) a diferentes niveles de cálculo. (Valor experimental:  $pK_a(\text{ImH}_2^+) = 7.0$ ).

	B3LYP	MPWB1K	CCSD(T)//B3LYP	CCSD(T)//MPWB1K
<b>6-311++G(d,p)</b>	7.7	8.4	8.3	8.3
<b>6-311++G(2df,2pd)</b>	7.8	8.8	8.1	8.1

**5.4.2.  $pK_a$  del Imidazol (ImH) Usando el Método Directo.** La Tabla 5.2 muestra los valores de  $pK_a$  calculados para la segunda desprotonación del imidazol libre

y para los diferentes complejos  $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_m(\text{H}_2\text{O})_{4-m}$  (para valores de  $m = 1-3$ ) usando el Ciclo 1. Para el imidazol libre, puede observarse que los métodos considerados dan resultados similares, en el que los valores calculados difieren por menos de 1.1 unidades de  $\text{p}K_a$ . Sin embargo, la diferencia respecto al valor experimental reportado en la literatura ( $\text{p}K_a \approx 14$ )<sup>247-249</sup> es mucho mayor que para la primera desprotonación, probablemente debido a la variación de carga de 0 a  $-1$  en el proceso de desprotonación. Para los complejos  $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_m(\text{H}_2\text{O})_{4-m}$ , los valores de  $\text{p}K_a$  asociados a la desprotonación del imidazol, son significativamente inferiores (alrededor de 7-8 unidades) que los del imidazol libre. La disminución en los valores de  $\text{p}K_a$  resulta de la mayor acidez del imidazol debido a la coordinación del metal.

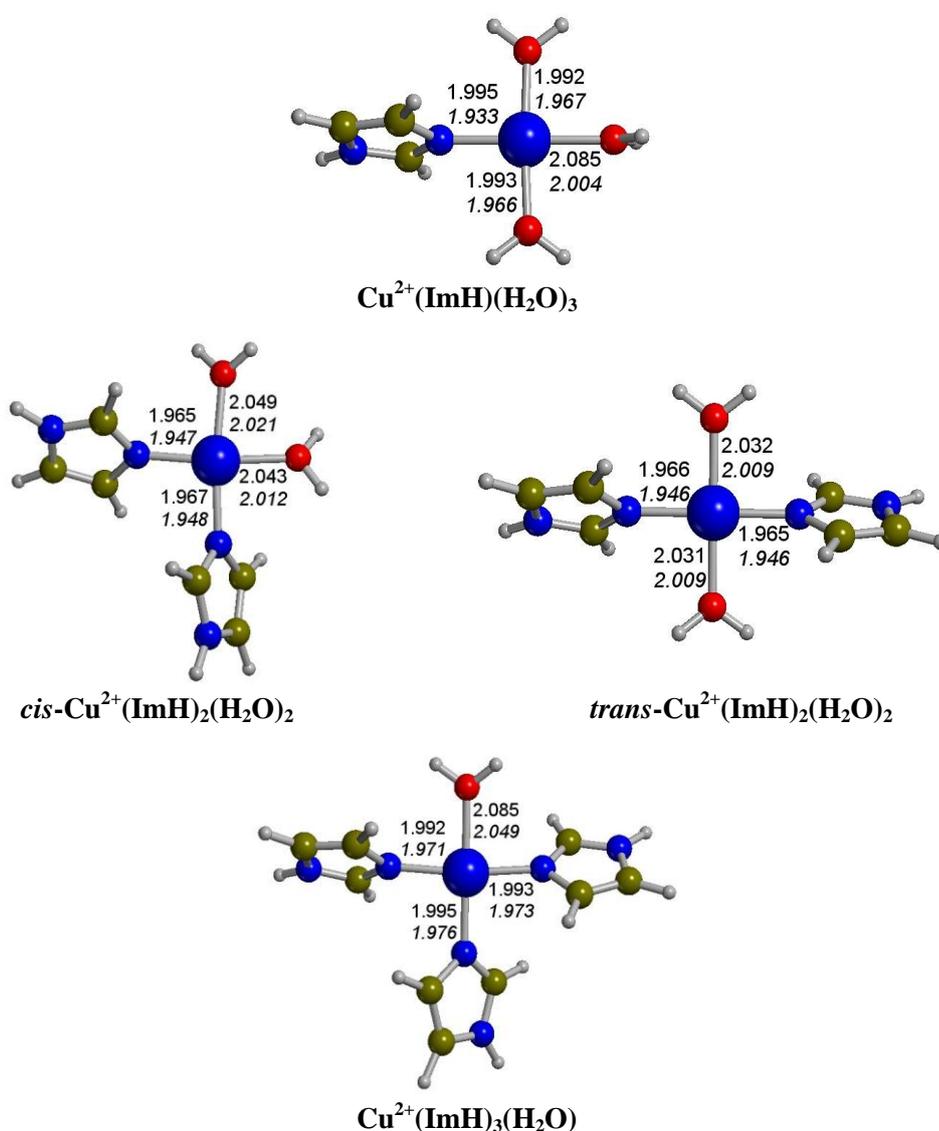
**Tabla 5.2.** Valores de  $\text{p}K_a$  para el imidazol y los complejos  $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_m(\text{H}_2\text{O})_{4-m}$  calculados usando el Ciclo 1 (Valor experimental:  $\text{p}K_a(\text{ImH}) \approx 14$ ).

	B3LYP	MPWB1K	CCSD(T)// B3LYP	CCSD(T)// MPWB1K
<b>Ciclo 1</b>				
ImH	20.6	21.5	21.0	20.4
$\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})(\text{H}_2\text{O})_3$	--	13.4	--	12.3
<i>cis</i> - $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2(\text{H}_2\text{O})_2$	13.2	15.6	14.9	14.7
<i>trans</i> - $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2(\text{H}_2\text{O})_2$	--	14.7	--	14.3
$\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_3(\text{H}_2\text{O}) \rightarrow$ <i>cis</i> - $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O}) + \text{H}^+$	13.9	16.0		
$\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_3(\text{H}_2\text{O}) \rightarrow$ <i>trans</i> - $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O}) + \text{H}^+$	12.7	15.9		

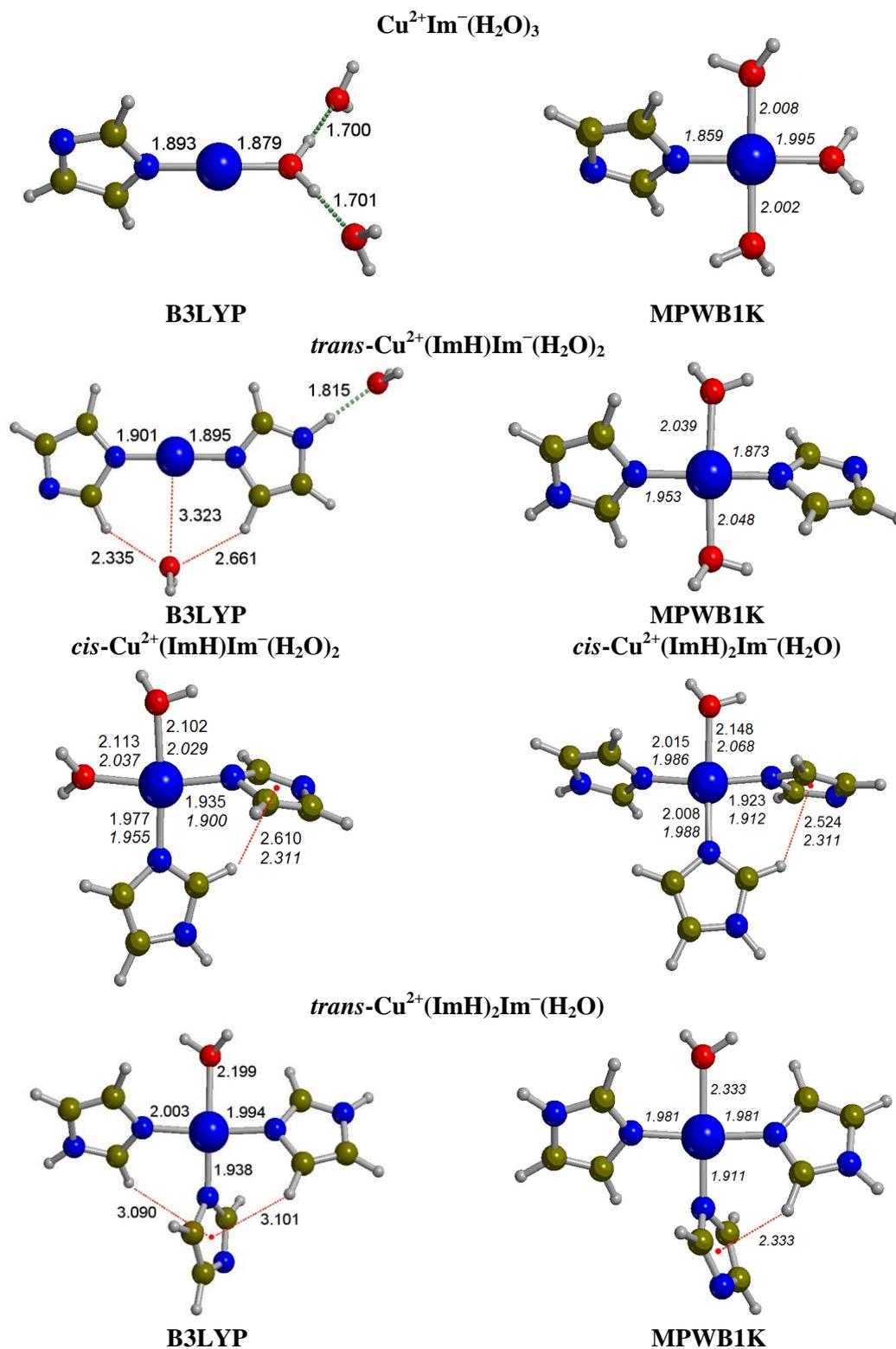
Las geometrías optimizadas de los complejos protonados y desprotonados a los niveles B3LYP y MPWB1K se muestran en las Figuras 5.2 y 5.3. Para los complejos protonados (Figura 5.2) ambos métodos proporcionan geometrías similares. Las principales diferencias corresponden a las distancias  $\text{Cu}^{2+}\text{-N}$  y  $\text{Cu}^{2+}\text{-O}$ , las cuales son entre 0.02 y 0.08 Å mayores con B3LYP. Por lo tanto, ambos funcionales proporcionan en todos los casos complejos plano-cuadrados, como es de esperar para complejos de  $\text{Cu}^{2+}$  tetracoordinados.

Sin embargo, en el caso de los complejos  $\text{Cu}^{2+}\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})_3$  y *trans*- $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})$  al nivel B3LYP, se observa que dos moléculas de agua se alejan

de la primera esfera de coordinación a la segunda, resultando en una coordinación lineal con el cobre dicoordinado. Es decir, para los complejos desprotonados se observan diferencias más importantes entre los funcionales B3LYP y MPWB1K (Figura 5.3), especialmente para los complejos  $\text{Cu}^{2+}\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})_3$  y *trans*- $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})_2$ , para los cuales las densidades de espín que se presentan en la Tabla 5.3 muestran que el funcional B3LYP da como resultado una estructura electrónica en la que el ión metálico se ha reducido a  $\text{Cu}^{1+}$  y la densidad de espín se encuentra en el imidazol desprotonado.



**Figura 5.2.** Estructuras optimizadas a los niveles B3LYP y MPWB1K (valores en cursiva) de los complejos  $[\text{Cu}(\text{ImH})_m(\text{H}_2\text{O})_{4-m}]^{2+}$  ( $m = 1-3$ ). Todas las distancias están dadas en Å.



**Figura 5.3.** Estructuras optimizadas de los complejos desprotonados a nivel B3LYP (valores MPWB1K en cursiva). Se muestran las geometrías obtenidas con los dos funcionales en los casos en los que difieren significativamente. Todas las distancias están dadas Å.

Por el contrario, con el funcional MPWB1K el átomo de cobre permanece en su estado de oxidación  $Cu^{2+}$  y, en consecuencia, la densidad de espín permanece principalmente en el catión metálico (Tabla 5.3).

**Tabla 5.3.** Densidades de espín del análisis NPA a los niveles B3LYP y MPWB1K (entre paréntesis). En los casos en que varias moléculas iguales estén presentes en el complejo, el valor que se muestra corresponde a la suma de la densidad de espín de cada una.

	Cu	(H <sub>2</sub> O) <sub>n</sub>	(ImH) <sub>(4-n-m)</sub>	(Im <sup>-</sup> ) <sub>m</sub>
<b>Protonado</b>				
$Cu^{2+}(ImH)(H_2O)_3$	0.71 (0.80)	0.17 (0.12)	0.08 (0.08)	
<i>cis</i> - $Cu^{2+}(ImH)_2(H_2O)_2$	0.66 (0.53)	0.09 (0.10)	0.25 (0.37)	
<i>trans</i> - $Cu^{2+}(ImH)_2(H_2O)_2$	0.69 (0.78)	0.12 (0.09)	0.19 (0.13)	
$Cu^{2+}(ImH)_3(H_2O)$	0.64 (0.74)	0.04 (0.04)	0.32 (0.22)	
<b>Desprotonado</b>				
$Cu^{2+}Im^{-}(H_2O)_3$	0.01 (0.78)	0.00(0.11)		0.99(0.11)
<i>cis</i> - $Cu^{2+}(ImH)Im^{-}(H_2O)_2$	0.63 (0.42)	0.08 (0.07)	0.11 (0.11)	0.18 (0.40)
<i>trans</i> - $Cu^{2+}(ImH)Im^{-}(H_2O)_2$	0.02(0.77)	0.00(0.07)	0.00(0.07)	0.98(0.09)
<i>cis</i> - $Cu^{2+}(ImH)_2Im^{-}(H_2O)$	0.63 (0.60)	0.05 (0.03)	0.16 (0.18)	0.14 (0.19)
<i>trans</i> - $Cu^{2+}(ImH)_2Im^{-}(H_2O)$	0.61 (0.73)	0.03 (0.04)	0.18 (0.14)	0.18 (0.09)

Este comportamiento ya ha sido observado en un estudio reciente realizado en nuestro grupo de investigación en complejos de  $Cu^{2+}(H_2O)_n$  (con  $n = 1-6$ ) en el cual se encontró que los funcionales no híbridos o con porcentajes bajos de intercambio exacto (tales como el BLYP y el B3LYP, respectivamente) no reproducen correctamente las energías relativas de las diferentes coordinaciones al ser comparadas con el método CCSD(T), debido a la reducción del  $Cu^{2+}$  que favorece estructuras poco coordinadas.<sup>266</sup>

Las diferencias entre los valores B3LYP y MPWB1K están relacionadas con la energía de ionización del  $Cu^{1+}$  al nivel B3LYP, la cual es demasiado alta a este nivel de cálculo. Como consecuencia, los sistemas de  $Cu^{1+}$  están estabilizados frente a los de  $Cu^{2+}$ , en especial en sistemas poco coordinados, lo que proporciona una situación deslocalizada del hueco electrónico. Como ya se ha comentado las situaciones deslocalizadas están sobreestabilizadas por funcionales con un porcentaje nulo o

pequeño de intercambio exacto. Como resultado, en los casos con dos moléculas de agua en posición *trans* el B3LYP conduce a estructuras donde el  $\text{Cu}^{2+}$  está reducido generando la típica coordinación lineal del  $\text{Cu}^{1+}$ .<sup>133</sup> Descontando estos casos particulares, los cambios geométricos observados al desprotonar un imidazol son similares con ambos métodos. Es decir, para todos los complejos tetracoordinados, la desprotonación del imidazol genera una ligera disminución en la distancia  $\text{Cu-Im}^-$ , mientras que el resto de distancias  $\text{Cu}^{2+}$ -Ligando aumentan. Esta disminución es debida a la mayor interacción electrostática entre el  $\text{Cu}^{2+}$  y el  $\text{Im}^-$ . Asimismo, se observan otras interacciones débiles tales como interacciones  $\text{CH-}\pi$  entre el imidazol desprotonado y el grupo  $\text{CH}$  de un imidazol adyacente (Figura 5.3). Estas interacciones se describen mejor con el funcional MPWB1K<sup>138</sup> y, como consecuencia de ello, las distancias entre el centroide del imidazol desprotonado y el grupo  $\text{CH}$  del imidazol adyacente en los complejos *cis*- $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})_2$ , *cis*- $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})$  y *trans*- $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})$  son inferiores con el funcional MPWB1K que con el B3LYP.

La estabilización del anión debida a la interacción con el  $\text{Cu}^{2+}$ , conduce a un incremento de la acidez del complejo. Esto puede observarse de forma clara en los valores de acidez en fase gas y en solución del imidazol y de los complejos de cobre que se presentan en la Tabla 5.4. Al nivel B3LYP la acidez en fase gas del  $\text{ImH}$  es  $342.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Este valor se reduce de manera considerable como consecuencia de la interacción con el  $\text{Cu}^{2+}$ , y los valores calculados para los complejos en fase gas oscilan entre  $174.4$  y  $187.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ . En solución acuosa estos efectos están apantallados considerablemente y el aumento de la acidez en fase gas (i.e. la disminución de la energía libre) de la desprotonación debido a la coordinación del metal se encuentra en el rango de  $9$  a  $10.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Al nivel MPWB1K los resultados que se obtienen proporcionan las mismas tendencias, tal y como se puede observar en la Tabla 5.4. En un ambiente proteínico, la constante dieléctrica es intermedia entre la del agua y la fase gas ( $\sim 4$ ) y los efectos de la coordinación del metal se espera que muestren también efectos intermedios entre los encontrados en fase gas y en solución. Sin embargo, en dicho entorno, otros factores tales como la accesibilidad de moléculas de solvente al centro metálico, deben ser también considerados.

**Tabla 5.4.** Cambio de energía libre en fase gas y en solución del ImH y los complejos  $Cu^{2+}(ImH)_m(H_2O)_{4-m}$  en  $kcal\ mol^{-1}$ .

	Fase Gas		Solución	
	B3LYP	MPWB1K	B3LYP	MPWB1K
ImH	342.1	344.0	28.0	29.3
$Cu^{2+}(ImH)(H_2O)_3$	--	169.3	--	18.2
<i>cis</i> - $Cu^{2+}(ImH)_2(H_2O)_2$	174.4	178.4	18.0	21.3
<i>trans</i> - $Cu^{2+}(ImH)_2(H_2O)_2$	--	180.7	--	20.1
$Cu^{2+}(ImH)_3(H_2O) \rightarrow$ <i>cis</i> - $Cu^{2+}(ImH)_2Im^-(H_2O) + H^+$	184.5	187.1	19.0	21.9
$Cu^{2+}(ImH)_3(H_2O) \rightarrow$ <i>trans</i> - $Cu^{2+}(ImH)_2Im^-(H_2O) + H^+$	187.0	190.2	17.4	21.7

En general, y excluyendo el caso conflictivo de los complejos  $Cu^{2+}Im^-(H_2O)_3$  y *trans*- $Cu^{2+}(ImH)Im^-(H_2O)_2$ , ambos métodos DFT dan como resultado valores de  $pK_a$  similares, siendo los calculados al nivel MPWB1K mayores (entre 2.1 y 3.2 unidades) que los calculados a nivel B3LYP. Por otra parte, puede observarse que los valores obtenidos al nivel MPWB1K para los complejos estudiados están en muy buen acuerdo con los obtenidos al nivel CCSD(T), tanto si se usan las geometrías B3LYP como las MPWB1K. La mayor diferencia se encontró en los valores de  $pK_a$  de los complejos  $Cu^{2+}(ImH)(H_2O)_3$  y  $Cu^{2+}(ImH)_2(H_2O)_2$ , pero ésta es tan sólo 1.1 unidades mayor que los valores calculados al nivel CCSD(T). Esta diferencia es aún menor para los complejos *cis*- $Cu^{2+}(ImH)_2(H_2O)_2$  y *trans*- $Cu^{2+}(ImH)_2(H_2O)_2$  con valores de 0.7 y 0.4, respectivamente, lo que indica que las energías obtenidas en fase gas al nivel MPWB1K son bastante precisas comparadas con las determinadas con el método CCSD(T), lo que confirma la fiabilidad del funcional MPWB1K para el estudio de estos sistemas.

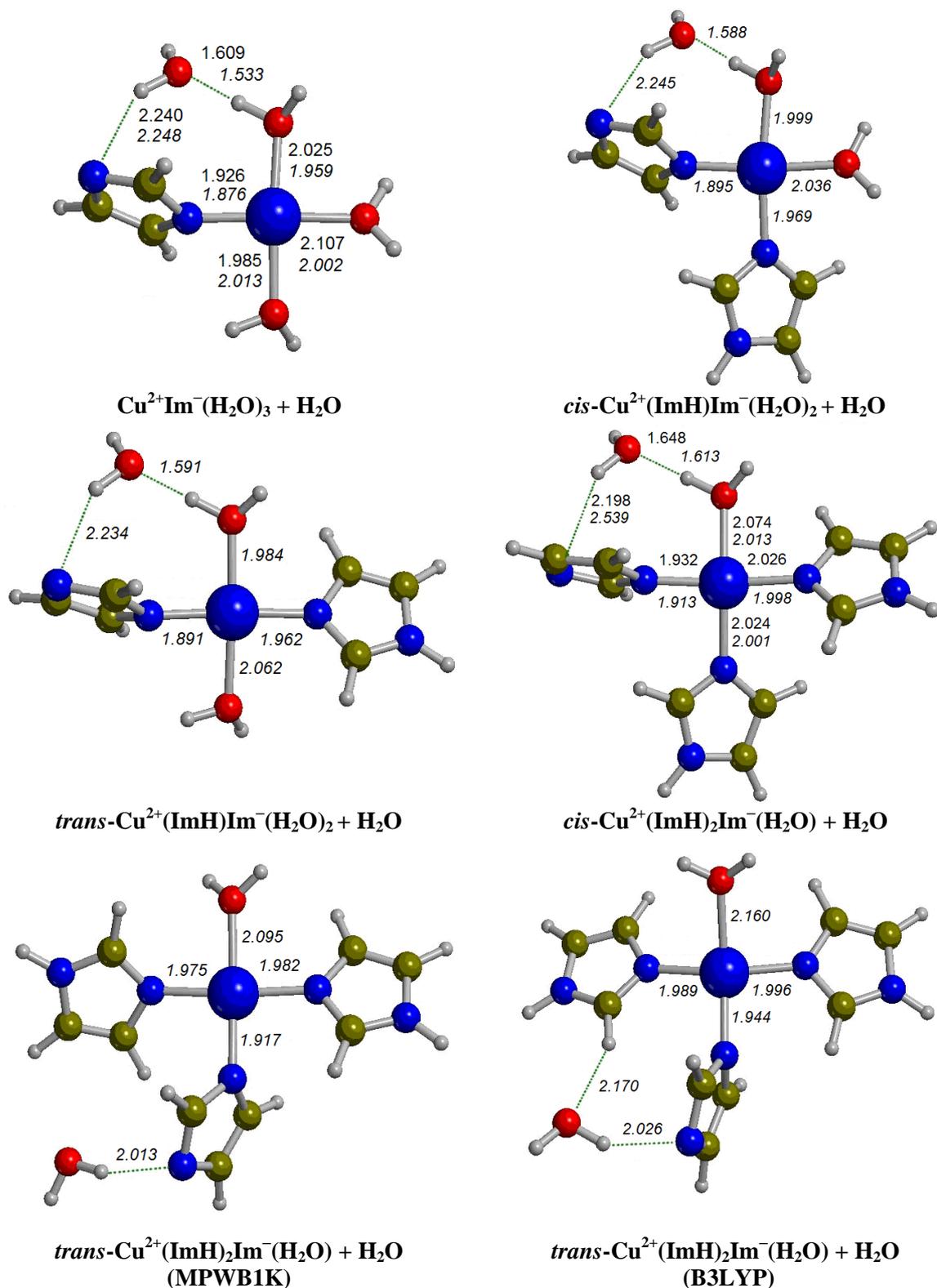
Los resultados mostrados hasta el momento incluyen cálculos puntuales en solución usando las geometrías optimizadas en fase gas. Para analizar si la optimización de las geometrías en solución tiene un efecto importante sobre los valores de  $pK_a$ , analizamos los casos del imidazol libre y del complejo *cis*- $Cu^{2+}(ImH)_2(H_2O)_2$ . Los resultados para el imidazol son similares a los obtenidos mediante cálculos puntuales en solución, siendo los valores de  $pK_a$  de 20.6 y 21.6 a los niveles B3LYP y MPWB1K, respectivamente. En el caso del complejo *cis*- $Cu^{2+}(ImH)_2(H_2O)_2$ , los resultados indican que la optimización de la geometría en solución reduce aún más el valor del  $pK_a$  de los

complejos con respecto al  $pK_a$  del imidazol libre (los valores del  $pK_a$  son 10.6 y 13.4 a los niveles B3LYP y MPWB1K, comparables a los 13.2 y 15.6 obtenidos usando geometrías en fase gas).

**5.3.3. Cálculos de  $pK_a$  Usando Moléculas de Agua Explícitas.** Como se ha visto, el  $pK_a$  calculado para el imidazol usando el Ciclo 1 es significativamente superior al valor experimental y decrece cuando coordina al  $Cu^{2+}$ . Debido a que varios estudios previos han sugerido que la inclusión de moléculas de agua explícitas puede ser importante para el cálculo de la energía libre de solvatación de algunos iones,<sup>198,200,253,254</sup> nos propusimos determinar el  $pK_a$  del imidazol usando los Ciclos 2 y 3 (con  $n = 1$ ). Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 5.5 y las geometrías optimizadas de los complejos desprotonados en la Figura 5.4.

En el caso del imidazol libre consideramos hasta dos moléculas de agua explícitas. En el método de *cluster*-continuo original el número de moléculas de agua se obtiene variacionalmente, es decir, se incluyen el número de moléculas de agua que generan el valor mínimo de la energía libre de solvatación.<sup>254,256</sup> Debe señalarse, que tal y como señaló Ho *et al.*,<sup>198</sup> este valor no proporciona en todos los casos el mejor resultado para el cálculo del  $pK_a$ . Por lo tanto, consideramos valores entre  $n = 0$  y  $n = 2$ . Las geometrías optimizadas de estos sistemas se muestra en la Figura A5.1 del Apéndice.

Los valores obtenidos mediante el Ciclo 2 para el  $pK_a$  del imidazol libre son aún mayores que los obtenidos usando el método directo (Ciclo 1) e incrementan con el número de moléculas de agua, de igual manera que fue encontrado en el trabajo de Ho *et al.*<sup>198</sup> En el caso del Ciclo 3, los valores obtenidos son mucho menores y aproximados a los valores experimentales cuando se incrementa el número de moléculas de agua explícitas. Debe destacarse que el valor B3LYP para  $n = 2$  se encuentra en muy buen acuerdo con el valor experimental. Los valores MPWB1K son algo menores que los B3LYP (entre 3.5 y 2.5 unidades de  $pK_a$ ), y la diferencia se reduce con el número de moléculas de agua.



**Figura 5.4.** Estructuras optimizadas al nivel B3LYP y MPWB1K (valores en cursiva) de los complejos desprotonados con una molécula de solvente explícita. Todas las distancias en Å.

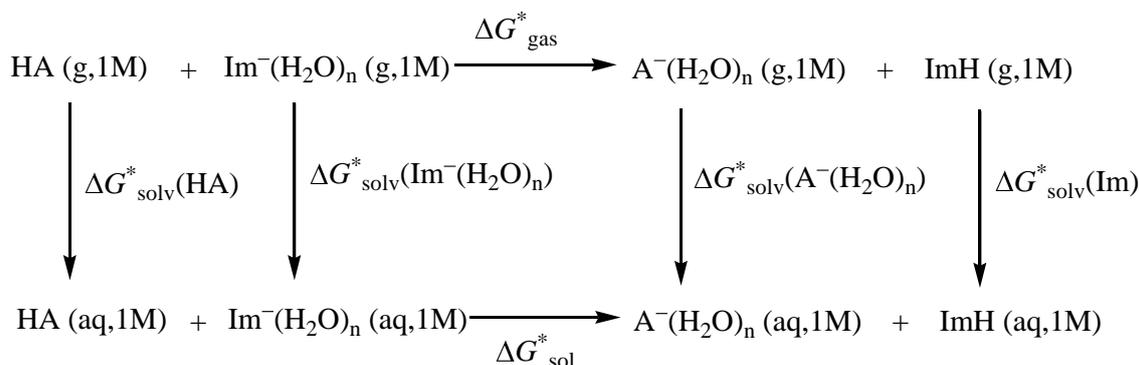
En el caso de los complejos de  $\text{Cu}^{2+}$ -imidazol sólo consideramos una molécula de solvente explícita debido a que la segunda molécula de agua se desplaza a la segunda esfera de coordinación y no solvata al nitrógeno desprotonado del imidazol. El valor de  $\text{p}K_a$  para estos complejos sigue la misma tendencia que los calculados para el imidazol libre. El Ciclo 2 da valores de  $\text{p}K_a$  algo menores que los calculados usando el Ciclo 1 mientras que el Ciclo 3 conduce a valores de  $\text{p}K_a$  considerablemente inferiores. A pesar de estas diferencias remarcables entre los valores calculados mediante los diferentes ciclos, puede observarse que el cambio en el  $\text{p}K_a$  del imidazol cuando éste se coordina al  $\text{Cu}^{2+}$  se mantiene constante (Tabla 5.5). Es decir, el error en el cálculo del  $\text{p}K_a$  del imidazol libre se transfiere de manera sistemática al cálculo del  $\text{p}K_a$  de los complejos.

**Tabla 5.5.** Valores de  $\text{p}K_a$  para el imidazol y los complejos  $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_m(\text{H}_2\text{O})_{4-m}$  usando los Ciclos 2 y 3 (Valor experimental:  $\text{p}K_a(\text{ImH}) \approx 14$ ).

	B3LYP	MPWB1K
<b>Ciclo 2</b>		
ImH (n=1)	21.1	22.5
ImH (n=2)	21.7	23.7
$\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})(\text{H}_2\text{O})_3$ (n=1)	--	13.8
<i>cis</i> - $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (n=1)	14.2	15.4
<i>trans</i> - $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (n=1)	--	15.4
$\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_3(\text{H}_2\text{O}) \rightarrow \text{cis-Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O}) + \text{H}^+$ (n=1)	15.3	15.4
$\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_3(\text{H}_2\text{O}) \rightarrow \text{trans-Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O}) + \text{H}^+$ (n=1)	17.8	19.3
<b>Ciclo 3</b>		
ImH (n=0)	12.8	9.3
ImH (n=1)	13.4	10.4
ImH (n=2)	14.0	11.5
$\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})(\text{H}_2\text{O})_3$ (n=0)	--	1.2
$\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})(\text{H}_2\text{O})_3$ (n=1)	--	1.7
<i>cis</i> - $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (n=0)	5.4	3.4
<i>cis</i> - $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (n=1)	6.4	3.2
<i>trans</i> - $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (n=0)	--	2.6
<i>trans</i> - $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (n=1)	--	3.2
$\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_3(\text{H}_2\text{O}) \rightarrow \text{cis-Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O}) + \text{H}^+$ (n=0)	6.2	3.9
$\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_3(\text{H}_2\text{O}) \rightarrow \text{cis-Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O}) + \text{H}^+$ (n=1)	7.6	3.2
$\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_3(\text{H}_2\text{O}) \rightarrow \text{trans-Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O}) + \text{H}^+$ (n=0)	5.0	3.8
$\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_3(\text{H}_2\text{O}) \rightarrow \text{trans-Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O}) + \text{H}^+$ (n=1)	10.1	7.2

Por tanto podemos corregir el valor del  $pK_a$  calculado de los complejos de  $Cu^{2+}$  con el error del cálculo del  $pK_a$  del imidazol libre. De esta manera, en cada caso el valor del  $pK_a$  corregido del complejo ( $pK_a'$ ) se pueden obtener como:  $pK_a'(Cu^{2+}(ImH)_m(H_2O)_{4-m}) = 14 - pK_a(ImH) + pK_a(Cu^{2+}(ImH)_m(H_2O)_{4-m})$ . De forma clara podemos ver que calculando los valores de  $pK_a$  de esta manera, todos los términos relacionados con el  $H^+$  y el  $H_2O$  en los Ciclos 1 y 2 o para el  $OH^-(H_2O)_3$  y  $H_2O$  en el Ciclo 3 se cancelan debido a que son iguales tanto para el imidazol libre. Por lo tanto, usar el imidazol para corregir los valores del  $pK_a$  es equivalente a usar el siguiente ciclo termodinámico:

**Ciclo 5**



El  $pK_a$  es entonces obtenido usando la ecuación (8):

$$\begin{aligned}
 pK_a(HA) = 14 + \frac{1}{2.303RT} & (\Delta G_{gas}^o - \Delta G_{solv}^*(HA) - \Delta G_{solv}^*(Im^-(H_2O)_n)) \\
 & + \Delta G_{solv}^*(Im) + \Delta G_{solv}^*(A^-)
 \end{aligned} \quad (5.6)$$

Este método con  $n = 0$  es conocido como método de intercambio de protón o del ácido de referencia, y ha sido ampliamente utilizado en la literatura ya que no requiere un valor experimental para el  $\Delta G_{solv}^*(H^+)$ . En su estudio reciente, Ho *et al.*<sup>198</sup> proponen como una aproximación “universal” para el cálculo del  $pK_a$  la combinación del método de intercambio de protones pero calculando las energías libres de solvatación de los iones mediante el método de *cluster*-continuo, tal y como se ha descrito previamente

(Ciclo 4). De esta manera, el  $pK_a$  se obtiene usando el Ciclo 5 con  $n = 0$  pero las energías libres de solvatación CPCM de los aniones son sustituidas por las energías libres de solvatación calculadas usando el Ciclo 4 variacionalmente, tal y como se describió con anterioridad. En la evaluación de este método, usando una base de datos de ácidos orgánicos e inorgánicos neutros, Ho *et al.* encontraron una precisión de 2 unidades de  $pK_a$ , usando metanol como ácido de referencia. Puede demostrarse que este método es equivalente al Ciclo 4 si el valor de  $n$  es el mismo para ambos iones. La principal diferencia es que en su caso el ácido considerado tiene la misma carga que el ácido de referencia y las especies cargadas se conservan en los dos lados de la reacción. De hecho, en nuestro caso el valor mínimo de la energía de solvatación calculada con el Ciclo 4 corresponde siempre a  $n = 0$  excepto para los complejos *cis*- $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})_2$  y *cis*- $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})$  al nivel MPWB1K donde el valor con  $n = 1$  ( $-70.7 \text{ kcal mol}^{-1}$  y  $-62.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) es un poco menor que el valor con  $n = 0$  ( $-70.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  y  $-61.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) (Tabla 5.6).

**Tabla 5.6.** Energía de Gibbs de solvatación de los complejos desprotonados calculados usando el Ciclo 4. Valores en  $\text{kcal mol}^{-1}$ .

Sistema	$n = 0$	$n = 1$	$n = 2$
<b>B3LYP</b>			
$\text{Im}^-$	-59.20	-58.50	-57.70
<i>cis</i> - $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})_2$	-67.16	-65.79	
<i>cis</i> - $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})$	-59.73	-57.87	
<i>trans</i> - $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})$	-63.83	-56.95	
<b>MPWB1K</b>			
$\text{Im}^-$	-60.03	-58.61	-57.08
$\text{Cu}^{2+}\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})_3$	-81.89	-81.23	
<i>cis</i> - $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})_2$	-70.46	-70.74	
<i>trans</i> - $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})_2$	-70.84	-69.97	
<i>cis</i> - $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})$	-61.85	-62.72	
<i>trans</i> - $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})$	-65.11	-60.44	

Por otra parte, se ha analizado la influencia de los radios de solvatación en el cálculo del  $pK_a$ . En la Tabla 5.7 se muestran los valores de  $pK_a$  usando el Ciclo 5 y los radios de solvatación UA0 y UAHF. Puede observarse que el uso de radios UAHF para definir la cavidad del solvente en el método CPCM conduce a resultados bastante similares. La variación más importante es de tan sólo 0.5 unidades de  $pK_a$  y corresponde a la desprotonación del complejo  $Cu^{2+}(ImH)_3(H_2O)$  para generar el complejo *trans*- $Cu^{2+}(ImH)_2Im^-(H_2O)$  con una molécula de agua explícita.

**Tabla 5.7.** Valores de  $pK_a$  calculados para los complejos  $Cu^{2+}(ImH)_m(H_2O)_{4-m}$  calculados usando el Ciclo 5. Los valores en paréntesis son los equivalentes usando radios UAHF.

Sistema	n = 0		n = 1	
	B3LYP	MPWB1K	B3LYP	MPWB1K
$Cu^{2+}(ImH)(H_2O)_3$	--	5.9 (5.6)	--	5.3 (4.3)
<i>cis</i> - $Cu^{2+}(ImH)_2(H_2O)_2$	6.6 (6.4)	8.1 (7.9)	7.1 (7.0)	6.9 (6.7)
<i>trans</i> - $Cu^{2+}(ImH)_2(H_2O)_2$	--	7.3 (7.1)	--	6.8 (6.8)
$Cu^{2+}(ImH)_3(H_2O) \rightarrow$ <i>cis</i> - $Cu^{2+}(ImH)_2Im^-(H_2O) + H^+$	7.4 (7.2)	8.5 (8.3)	8.2 (8.3)	6.9 (6.8)
$Cu^{2+}(ImH)_3(H_2O) \rightarrow$ <i>trans</i> - $Cu^{2+}(ImH)_2Im^-(H_2O) + H^+$	6.2 (6.3)	8.4 (8.5)	10.7 (10.8)	10.8 (11.3)

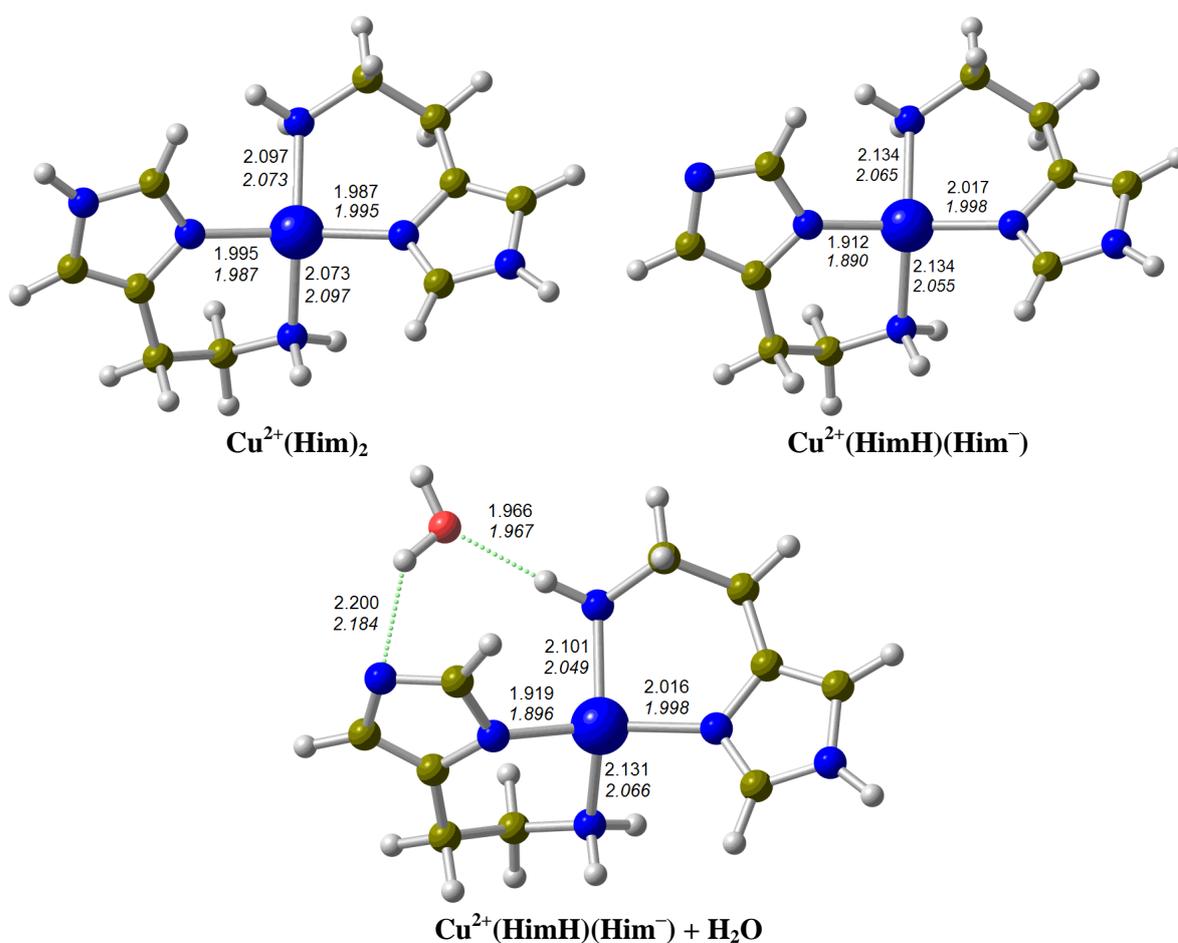
Al igual que con los ciclos anteriores se observa que la coordinación del  $Cu^{2+}$  induce una disminución importante del  $pK_a$  con respecto al imidazol libre ( $pK_a \approx 14$ ). En general, la reducción del  $pK_a$  es similar en todos los casos excepto para la desprotonación del complejo  $Cu^{2+}(ImH)_3(H_2O)$  para dar el complejo *trans*- $Cu^{2+}Im^-(ImH)_2(H_2O)$  calculado con una molécula de solvente explícito, donde el cambio observado es menor. Por ejemplo, si tomamos los valores MPWB1K (con  $n = 0$ ) el  $pK_a$  varía desde 5.9 unidades para el complejo  $Cu^{2+}(ImH)(H_2O)_3$  a 8.5 para la desprotonación del complejo  $Cu^{2+}(ImH)_3(H_2O)$  para producir el *cis*- $Cu^{2+}(ImH)_2Im^-(H_2O)$ . Para  $n = 1$ , el rango es aún más pequeño (de 5.3 para el complejo  $Cu^{2+}(ImH)(H_2O)_3$  a 6.9 para la desprotonación del  $Cu^{2+}(ImH)_3(H_2O)$  para dar el complejo *cis*- $Cu^{2+}(ImH)_2Im^-(H_2O)$ ). Sin embargo, la disminución en el caso de la desprotonación del  $Cu^{2+}(ImH)_3(H_2O)$  para dar el complejo *trans*- $Cu^{2+}(ImH)_2Im^-(H_2O)$  es mucho más pequeña ( $pK_a=10.8$ ). Este hecho puede ser explicado considerando los

enlaces de hidrógeno formados con la molécula de solvente considerada de forma explícita en los Ciclos 2, 3 y 5. En todos los casos, excepto para el *trans*- $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})$ , esta molécula establece enlaces de hidrógeno con el anillo de imidazol desprotonado y la molécula de agua enlazada al  $\text{Cu}^{2+}$ . En el complejo *trans*- $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_2\text{Im}^-(\text{H}_2\text{O})$  la interacción del imidazol desprotonado con la primera esfera de moléculas de agua de hidratación no es posible y el anión está menos estabilizado que en los otros casos (Figura 5.4). Por lo tanto, en un sistema “real” el valor del  $\text{p}K_a$  microscópico de un residuo aminoacídico dependerá de la accesibilidad de las moléculas del solvente, lo cual muestra la importancia del entorno químico en la determinación del  $\text{p}K_a$ .

El método de intercambio de protón depende en gran medida de la elección del ácido de referencia. Este ácido ha de ser estructuralmente similar al ácido en estudio para garantizar que los errores de los métodos del solvente continuo sean similares en los dos lados de la ecuación química, permitiendo así una mejor cancelación de los errores en el cálculo del  $\Delta G^*_{\text{sol}}$ . En nuestro caso la elección del imidazol como ácido de referencia implica que las cargas en los lados de reactivos y productos de la ecuación no se conservan. Con el propósito de verificar si la cancelación de errores es suficiente en nuestro caso, extendimos los cálculos considerando como ácido de referencia el complejo formado entre el  $\text{Cu}^{2+}$  y la histamina ( $\text{Cu}^{2+}-(\text{HimH})_2$ ) la cual tiene la misma carga que los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -Imidazol. El complejo  $\text{Cu}^{2+}-(\text{HimH})_2$  ha sido caracterizado experimentalmente<sup>267</sup> y la estructura más probable corresponde a un complejo plano-cuadrado en el cual las dos moléculas de histamina están dicoordinadas al catión metálico a través de un nitrógeno del imidazol y un nitrógeno amino. El valor del  $\text{p}K_a$  del grupo imidazol determinado experimentalmente es 11.1.<sup>268</sup>

Los valores de  $\text{p}K_a$  para los complejos  $\text{Cu}^{2+}-(\text{ImH})_m(\text{H}_2\text{O})_{4-m}$  usando el Ciclo 5 con  $\text{Cu}^{2+}-(\text{HimH})_2$  como ácido de referencia se muestran en la Tabla 5.8 y las estructuras optimizadas del complejo  $\text{Cu}^{2+}-(\text{HimH})_2$  en la Figura 5.5. En La Tabla 5.8 se puede observar que el cambio del  $\text{p}K_a$  ( $\Delta\text{p}K_a$ ) de los complejos de  $\text{Cu}^{2+}$ -ImH con respecto al imidazol aislado ( $\text{p}K_a = 14$ ) es menor cuando usamos el  $\text{Cu}^{2+}-(\text{HimH})_2$  como ácido de referencia en el Ciclo 5, con  $n = 0$ . El valor del  $\text{p}K_a$  para los distintos complejos de  $\text{Cu}^{2+}$  varía de 10.5 a 11.3 al nivel B3LYP y de 10.7 a 13.3 al nivel

MPWB1K. Sin embargo, cuando incluimos una molécula de agua explícita ( $n = 1$ ) el cambio de  $pK_a$  calculado es similar a los obtenidos usando imidazol como ácido de referencia. Los valores de  $pK_a$  al nivel B3LYP son casi idénticos con ambas referencias y el valor calculado al nivel MPWB1K es algo mayor (entre 1.3 y 1.4 unidades) con  $\text{Cu}^{2+}-(\text{HimH})_2$  como referencia.



**Figura 5.5.** Estructuras optimizadas a los niveles B3LYP de los complejos  $\text{Cu}^{2+}(\text{Him})_2$  y  $\text{Cu}^{2+}(\text{HimH})(\text{Him}^-)$ . Los correspondientes valores MPWB1K se muestran en cursiva. Todas las distancias están dadas en Å.

En lo mostrado hasta ahora, se puede ver que en varios casos el cambio del  $pK_a$  es significativo ( $\Delta pK_a$  de  $-2$  a  $-7$  unidades) indicando que la coordinación del  $\text{Cu}^{2+}$  puede influenciar el estado de protonación del imidazol. De esta manera, los cálculos indican que para los complejos de cobre con uno, dos o tres moléculas de imidazol en la

esfera de coordinación, el valor del  $pK_a$  puede aproximarse al valor del pH fisiológico. Así, dependiendo del microambiente proteínico, podría desprotonar, lo cual está en concordancia con los mecanismos de bombeo de protones propuestos para la CcO en la que se considera la desprotonación de uno de los anillos de imidazol unidos al  $Cu_B$ ,<sup>239,242-244,246</sup> y podría además tener efectos importantes en la estructura y estabilidad del complejo  $Cu^{2+}$ -A $\beta$ . En general, estos resultados indican que el valor local para el  $pK_a$  de un residuo aminoacídico en una proteína depende de varios factores tales como la coordinación del metal, los efectos electrostáticos del entorno proteínico, o los efectos del solvente, entre otros.

**Tabla 5.8.** Valores de  $pK_a$  para los complejos  $Cu^{2+}(ImH)_m(H_2O)_{4-m}$  calculados usando el complejo  $Cu^{2+}(HimH)_2$  como ácido de referencia en el Ciclo 4.

Complejos	$n = 0$		$n = 1$	
	B3LYP	MPWB1K	B3LYP	MPWB1K
$Cu^{2+}(ImH)(H_2O)_3$	--	10.7	--	6.6
<i>cis</i> - $Cu^{2+}(ImH)_2(H_2O)_2$	10.5	12.9	7.0	8.2
<i>trans</i> - $Cu^{2+}(ImH)_2(H_2O)_2$	--	12.1	--	8.2
$Cu^{2+}(ImH)_3(H_2O) \rightarrow$ <i>cis</i> - $Cu^{2+}(ImH)_2Im^-(H_2O) + H^+$	11.3	13.4	8.1	8.2
$Cu^{2+}(ImH)_3(H_2O) \rightarrow$ <i>trans</i> - $Cu^{2+}(ImH)_2Im^-(H_2O) + H^+$	10.3	13.3	10.6	12.1

## 5.4. CONCLUSIONES

La interacción de los cationes metálicos con residuos aminoacídicos puede modificar, de manera importante, el valor del  $pK_a$ , induciendo cambios relevantes en la estructura y reactividad de las biomoléculas. De esta manera, el conocimiento de cómo la coordinación del catión metálico modifica la acidez/basicidad de residuos relevantes es de gran importancia para entender la química de las metaloproteínas. La química computacional puede proporcionar información acerca de los cambios inducidos a nivel molecular; sin embargo, la determinación precisa de los valores del  $pK_a$  sigue siendo un reto, de forma particular para sistemas con metales de transición. En el presente capítulo

analizamos la influencia de la coordinación del  $Cu^{2+}$  en el  $pK_a$  del imidazol, un heterociclo aromático presente en biomoléculas importantes, tales como la histidina, la cual se encuentra con mucha frecuencia en sistemas biológicos relevantes coordinadas al  $Cu^{2+}$ , tales como el complejo  $Cu^{2+}$ -A $\beta$ . El  $pK_a$  del imidazol libre (ImH), y el  $pK_a$  del imidazol en complejos de cobre tipo  $Cu^{2+}(ImH)_m(H_2O)_{4-m}$  ( $m = 1-3$ ) fueron calculados usando los funcionales B3LYP y MPWB1K; y considerando varias estrategias que incluyen diferentes ciclos termodinámicos para mejorar las estimaciones de energías libres en solución. En general, los funcionales B3LYP y MPWB1K dan resultados similares excepto en algunos casos particulares donde las estructuras obtenidas al nivel B3LYP pueden ser muy diferentes a las determinadas al nivel MPWB1K, debido a que el primero tiende a sobreestabilizar complejos de baja coordinación en los cuales el  $Cu^{2+}$  se ha reducido a  $Cu^{1+}$ .

Los resultados muestran que el cálculo de los valores del  $pK_a$  puede depender, de manera importante, del ciclo termodinámico considerado. Teniendo en cuenta que la mejor referencia es el complejo de cobre con histamina ( $Cu^{2+}$ -(HimH)<sub>2</sub>) ya que la carga se conserva en ambos lados de la reacción, y la presencia de moléculas de agua explícitas en el ciclo termodinámico, el cambio en el  $pK_a$  ( $\Delta pK_a$ ) se encuentra en el rango de  $-2$  a  $-7$  unidades. De esta manera, y considerando que el imidazol libre tiene un  $pK_a = 14$ , esta disminución aproximaría en algunos casos al valor del  $pK_a$  del imidazol al valor del pH fisiológico y, dependiendo del microambiente proteínico, podría generar la desprotonación del imidazol en complejos de  $Cu^{2+}$ . Este aumento se atribuye a las mayores interacciones electrostáticas entre el anillo del imidazol aniónico y el  $Cu^{2+}$ , y la generación de nuevas interacciones ligando-ligando y solvente-ligando con el imidazol desprotonado, siendo estas últimas interacciones las responsables de las mayores diferencias de los cambios del  $pK_a$  entre los diferentes complejos estudiados. En este sentido, el menor cambio (2 unidades de  $pK_a$ ) fue encontrado para el imidazol en el complejo  $Cu^{2+}(ImH)_3(H_2O)$  que conduce al complejo *trans*- $Cu^{2+}(ImH)_2Im^-(H_2O)$  ya que en este caso el complejo establece interacciones más débiles con las moléculas del solvente que cuando la desprotonación del imidazol produce el complejo *cis*- $Cu^{2+}(ImH)_2Im^-(H_2O)$ . En este último caso el cambio de  $pK_a$  calculado fue de  $-5.8$  unidades. Sin considerar moléculas de agua explícitas los cambios en el  $pK_a$  son mucho

más pequeños lo cual pone de manifiesto la importancia del ambiente químico y en particular, la accesibilidad de las moléculas del solvente.

# 6

## MODELOS COMPUTACIONALES DEL SISTEMA

### $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ (1-16)

La elucidación de la coordinación de los iones metálicos al péptido A $\beta$  es esencial para entender su papel en la agregación de este péptido, y para el diseño racional de nuevos agentes quelantes con potenciales aplicaciones en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, lo que actualmente constituye un área de investigación en continuo crecimiento.<sup>40-47</sup> Por ello, en los últimos años varios estudios han centrado su atención en la determinación de las propiedades de coordinación de los iones de cobre al A $\beta$ .<sup>48-56,64,74,269</sup> Sin embargo, tan importante como la caracterización de la primera esfera de coordinación del metal es la determinación de la estructura completa del complejo cobre-amiloide, ya que la conformación que adquiere el péptido como resultado de esta coordinación está relacionada con sus propiedades moleculares, lo que puede servir de punto de partida para el estudio de la formación de las placas o para explicar la alta actividad redox observada en los complejos metálicos que se forman.

En este capítulo proponemos modelos plausibles para el sistema  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ (1-16), ya que como se ha comentado antes, corresponde a la región hidrofílica y de mayor afinidad para los cationes metálicos, mediante la combinación de técnicas de modelado por homología, métodos híbridos QM/MM y métodos DFT. Para construir estos

modelos partimos de los parámetros geométricos obtenidos en los sistemas modelos más estables encontrados en el Capítulo 4, los cuales se incluyen como restricciones en las simulaciones de modelado por homología.

La motivación para realizar este estudio, es que a pesar de la importancia que tiene la coordinación del  $\text{Cu}^{2+}$  al péptido  $\text{A}\beta(1-16)$  en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, no ha sido posible, hasta el momento de escritura de esta tesis, obtener experimentalmente, mediante técnicas de RMN o cristalografía de rayos X, la estructura del complejo  $\text{Cu-A}\beta$  monomérico. La estructura de este complejo ofrece un buen punto de partida para entender, desde un punto de vista molecular, los procesos de formación de placas y de generación de especies radicalarias de oxígeno, dos de las más importantes marcas neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer.

A pesar de que se han sugerido varias propuestas de coordinación para estos sistemas (tal y como describimos en el Capítulo 1), decidimos tomar como punto de partida modelos que incluyen tres histidinas coordinadas simultáneamente (a saber, histidinas 6,13 y 14) por dos razones: en primer lugar porque el complejo del  $\text{Zn}^{2+}$ , del cual se tiene información por RMN, y que se encuentra reportada en el PDB, presenta este tipo de coordinación; y en segundo lugar porque los estudios experimentales indican que esta es una de las coordinaciones más probables a pH fisiológico (o ligeramente superior).<sup>48,54</sup>

## 6.1. DETALLES COMPUTACIONALES

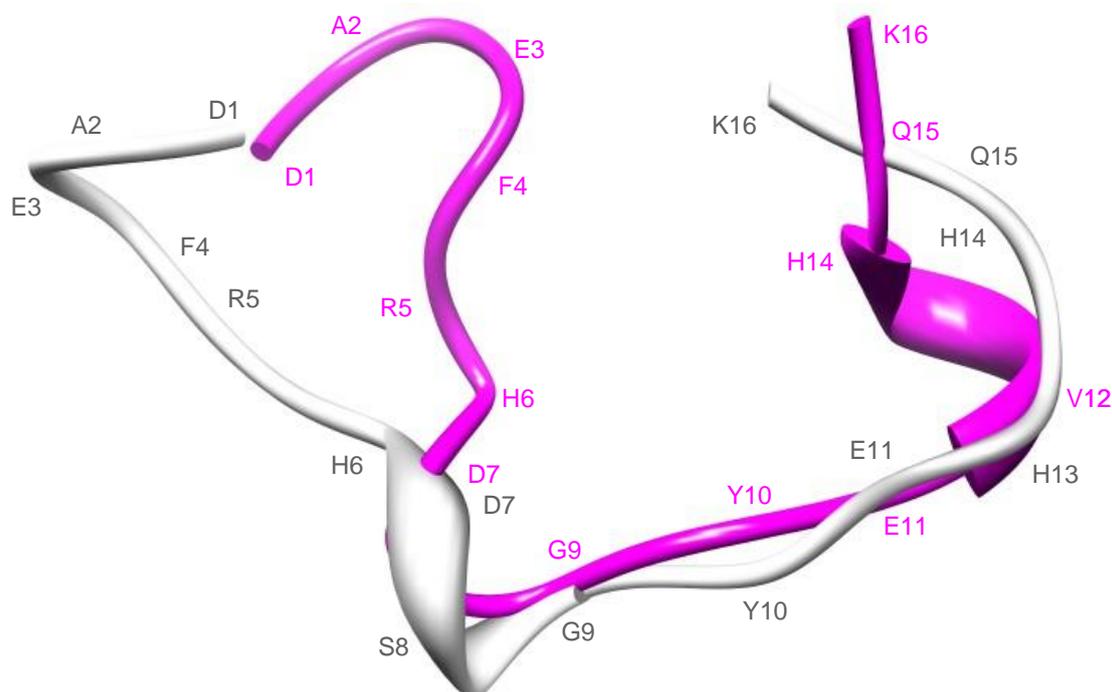
Las técnicas de modelado por homología son ampliamente utilizadas en bioquímica y farmacología para generar modelos tridimensionales de proteínas de estructura desconocida (*target*), a partir de estructuras de homólogos que si han sido resueltas experimentalmente (*templates*). Se basa en la idea de que cuanto más alta es la similitud entre las secuencias de dos proteínas, más alta será su semejanza estructural.<sup>174</sup> Los modelos tridimensionales de la proteína *target* se generan primero construyendo la cadena principal y luego haciendo búsquedas conformacionales del conjunto completo de las cadenas laterales. Los mejores modelos estructurales son aquellos en los cuales una “función objetivo”, que combina las restricciones derivadas del modelado por

homología y la energía del modelo, es mínima.<sup>270</sup> Al igual que muchas técnicas basadas en campos de fuerza, las aproximaciones de modelado por homología no están optimizadas para tratar iones metálicos, y mucho menos metales de transición con propiedades electrónicas sutiles como es el caso del cobre. Sin embargo, es posible simular el efecto de los iones metálicos en la estructura de la proteína *target* mediante la incorporación de datos obtenidos de análisis externos (e.g. cálculos QM) como restricciones adicionales en el proceso de modelado por homología.

Las simulaciones de modelado por homología se realizaron usando la conformación que adquiere el péptido  $\text{A}\beta(1-16)$  en el complejo  $\text{Zn}^{2+}$ - $\text{A}\beta(1-16)$  como *template*, el cual corresponde al modelo RMN depositado en el PDB bajo el código 1ZE9,<sup>271</sup> e incluyendo las restricciones geométricas (distancias y ángulos) deducidas de los modelos pequeños más estables obtenidos de cálculos DFT y que se han descrito en el Capítulo 4. Seleccionamos esta estructura como *template* ya que ésta se obtuvo en condiciones similares a aquellas en las que se espera que el cobre coordine al  $\text{A}\beta$ , con tres histidinas formando parte de la primera esfera de coordinación. En este punto, debe señalarse, que la principal limitación de nuestra aproximación es que los procedimientos de modelado por homología no podrían reproducir estructuras en las que la reorganización de la cadena principal en el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{A}\beta(1-16)$  sea significativamente diferente a la del complejo  $\text{Zn}^{2+}$ - $\text{A}\beta$ . Existen, sin embargo, varias evidencias experimentales que sugieren que estas diferencias podrían ser pequeñas. En particular, las estructuras experimentales del  $\text{A}\beta(1-16)$  libre (código PDB: 1ZE7) y el complejo  $\text{Zn}^{2+}$ - $\text{A}\beta(1-16)$  muestran que el principal cambio conformacional en la estructura coordinada al zinc en solución acuosa a pH fisiológico es la esperada compactación de la proteína como resultado de la coordinación del metal (Figura 6.1).<sup>271</sup> De esta manera, la coordinación provoca esencialmente una reorganización en las cadenas laterales del péptido con respecto a la forma no coordinada. Un comportamiento similar se espera que ocurra para el caso de la coordinación del  $\text{Cu}^{2+}$  al  $\text{A}\beta(1-16)$ .

Bajo estas consideraciones realizamos simulaciones de modelado por homología usando el paquete de programas Modeller 9v5.<sup>272</sup> Se evaluaron todas los posibles

modelos que contienen las coordinaciones ( $\delta$  y  $\epsilon$ ) de las histidinas 6, 13 y 14, así como la coordinación de los diferentes posibles candidatos que contienen oxígeno (Asp1, Glu3, Asp7, Glu11, y el grupo carbonilo ( $\text{CO}_{\text{Ala2}}$ ) de la cadena principal) y el grupo N-terminal, como cuarto ligando en la esfera de coordinación. Para cada tipo de coordinación se generaron 500 modelos, lo que garantiza una buena exploración del espacio conformacional, produciendo un total de 24,000 hipotéticos candidatos para los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{A}\beta(1-16)$ .

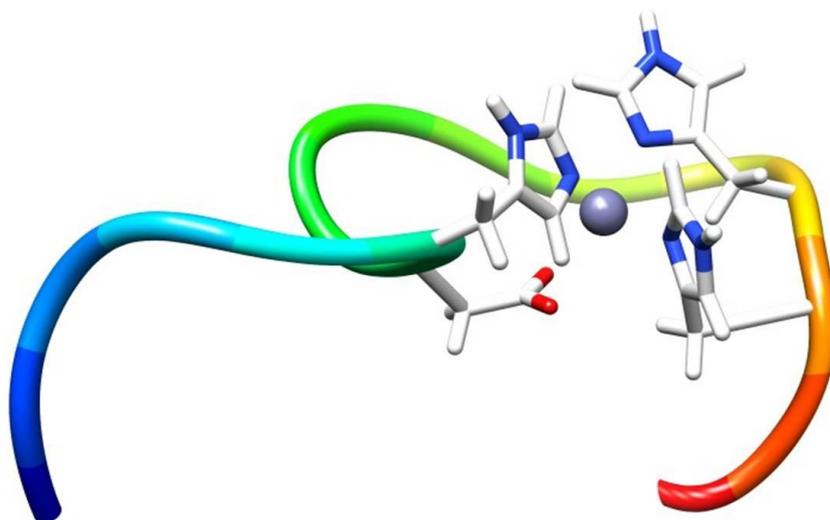


**Figura 6.1.** Superposición de las cadenas principales del péptido  $\text{A}\beta(1-16)$  no coordinado (plata) y del complejo  $\text{Zn}^{2+}$ - $\text{A}\beta(1-16)$  (magenta).

Los 500 modelos obtenidos para cada configuración se agruparon usando el algoritmo *NMRClust*<sup>273</sup> implementada en Chimera 1.5.2. Posteriormente, seleccionamos los modelos más representativos de cada *cluster*. Estos modelos fueron evaluados energéticamente y geoméricamente usando el método DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*)<sup>274</sup> implementado en Modeller 9v5, el cual usa funciones de densidad de probabilidad para puntuar los modelos de acuerdo a las desviaciones que presenten sus estructuras secundarias con las contenidas en un base de datos de estructuras

crystallográficas, y se seleccionó el modelo mejor puntuado entre los modelos más representativos de cada *cluster*.

Hasta este punto, en los modelos no se incluyen los efectos de la estructura electrónica del sitio de coordinación del metal en la estructura completa del complejo. Así pues, para incluir estos efectos se realizaron optimizaciones completas de las geometrías para cada uno de los candidatos seleccionados, usando el método QM/MM mediante el procedimiento ONIOM implementado en Gaussian 03. En estas simulaciones la partición QM se incluyen el átomo de cobre, los metilimidazoles de las histidinas 6,13 y 14 y la cadena lateral del ligando candidato para ocupar la cuarta posición en la esfera de coordinación (Figura 6.2).



**Figura 6.2.** Ejemplo de una de las particiones ONIOM usadas para optimizar los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{A}\beta(1-16)$ . Los átomos representados como barras y esferas indican la partición QM mientras que el resto del péptido se considera en la parte MM.

Para esta partición usamos el funcional híbrido de la densidad BH&HLYP en combinación con el pseudopotencial Lanl2dz y sus bases relacionadas para el cobre, y el conjunto de base 6-31G(d) para el resto de átomos (de aquí en adelante nos referiremos a este conjunto de funciones de base como “Base Pequeña”, BP). Para la parte MM usamos el campo de fuerza universal (UFF, del inglés *Universal Force Field*),<sup>275</sup> ya que este campo de fuerza está parametrizado para tratar con los cationes del cobre, y además

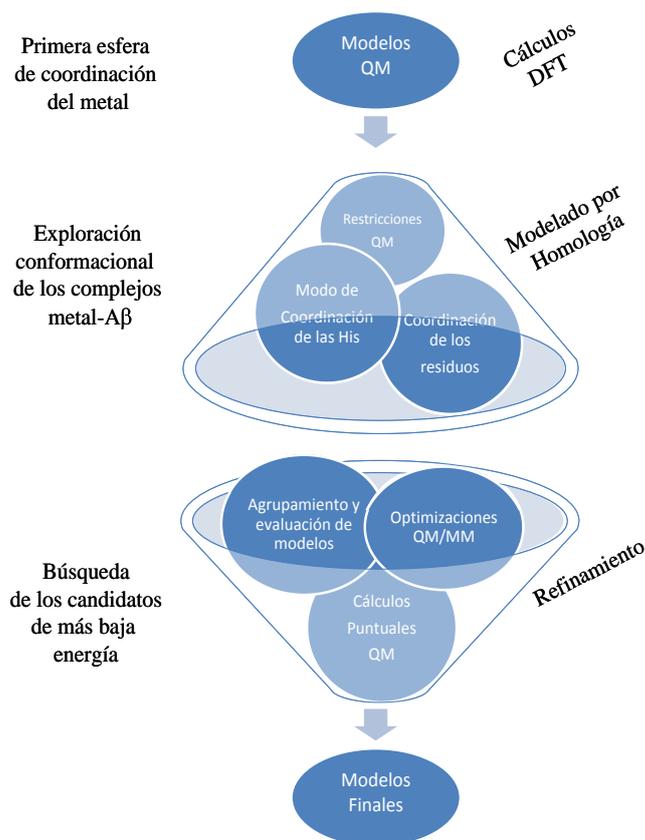
ha demostrado fiabilidad para determinar geometrías y diferencias conformacionales en sistemas organometálicos.<sup>276,277</sup>

El tratamiento de las fronteras entre la parte QM y MM se realizó considerando la aproximación de átomos de enlace. Debido a que las optimizaciones ONIOM se llevaron a cabo en fase gas, los residuos se consideraron en su forma neutra (excepto el grupo carboxilato coordinado al cobre). En caso contrario, es decir, si se consideraban los residuos en su estado de protonación en disolución, las optimizaciones venían dominadas por las fuertes interacciones electrostáticas entre los residuos cargados, lo cual conducía a la pérdida completa de la estructura secundaria del esqueleto peptídico obtenido de las simulaciones de modelado por homología. Sin embargo, en su forma neutra se simula el efecto apantallante que tendrían las moléculas de solvente en las cargas locales presentes en el péptido lo cual permite de manera efectiva mantener la estructura obtenida en el proceso de modelado por homología.

Para seleccionar los mejores modelos realizamos cálculos puntuales de energía para cada estructura optimizada al nivel BH&HLYP/BP. Asimismo, se realizaron cálculos puntuales del péptido A $\beta$ (1-16) neutro (es decir, con el carboxilato protonado) en la conformación del complejo metálico, al mismo nivel de teoría, para evaluar la estabilidad relativa de su estructura secundaria. Adicionalmente, y con el propósito de mejorar los resultados obtenidos, realizamos cálculos puntuales de energía para los modelos más estables al nivel BH&HLYP usando un conjunto de bases más amplio que incluye el pseudopotencial Lanl2dz, y sus bases asociadas para el cobre, y el conjunto de bases 6-31+G(d,p) para el resto de átomos (de aquí en adelante Base Grande, BG). Con el propósito de estimar la estabilidad relativa de los modelos finales en solución acuosa, realizamos cálculos puntuales en solución usando el procedimiento CPCM<sup>143</sup> implementado en Gaussian 09 al nivel BH&HLYP/BP. Además, incluimos las correcciones térmicas mediante cálculos de frecuencias armónicas al nivel ONIOM(BH&HLYP/BP:UFF).

En primer lugar, el cálculo cuántico de estos complejos puede presentar problemas de convergencias, o converger a un estado electrónico excitado. De hecho, en

algunos casos debe señalarse que los cálculos cuánticos conducían a un estado en el que se observó que el  $\text{Cu}^{2+}$  se reducía a  $\text{Cu}^{1+}$ , y en consecuencia, la densidad de espín sobre el cobre era cero, quedando el electrón desapareado en el glutamato desprotonado o en la cadena lateral de la Arg5. Esta reducción pudo evitarse para muchos de estos casos haciendo un análisis de los orbitales atómicos del sistema completo y realizando la inversión de orbitales adecuada para que el  $\text{Cu}^{2+}$  mantuviera su estado  $d^9$ . En unos pocos casos, sin embargo, el cambio del *guess* inicial no supuso ningún cambio en el resultado final, lo que permitía confirmar que en estas situaciones, el estado electrónico fundamental correspondía a un complejo de  $\text{Cu}^{1+}$ , con el electrón desapareado en uno de los ligandos. El procedimiento descrito anteriormente para la construcción y posterior evaluación de los distintos modelos, se muestra de manera simplificada en el Esquema 6.1.



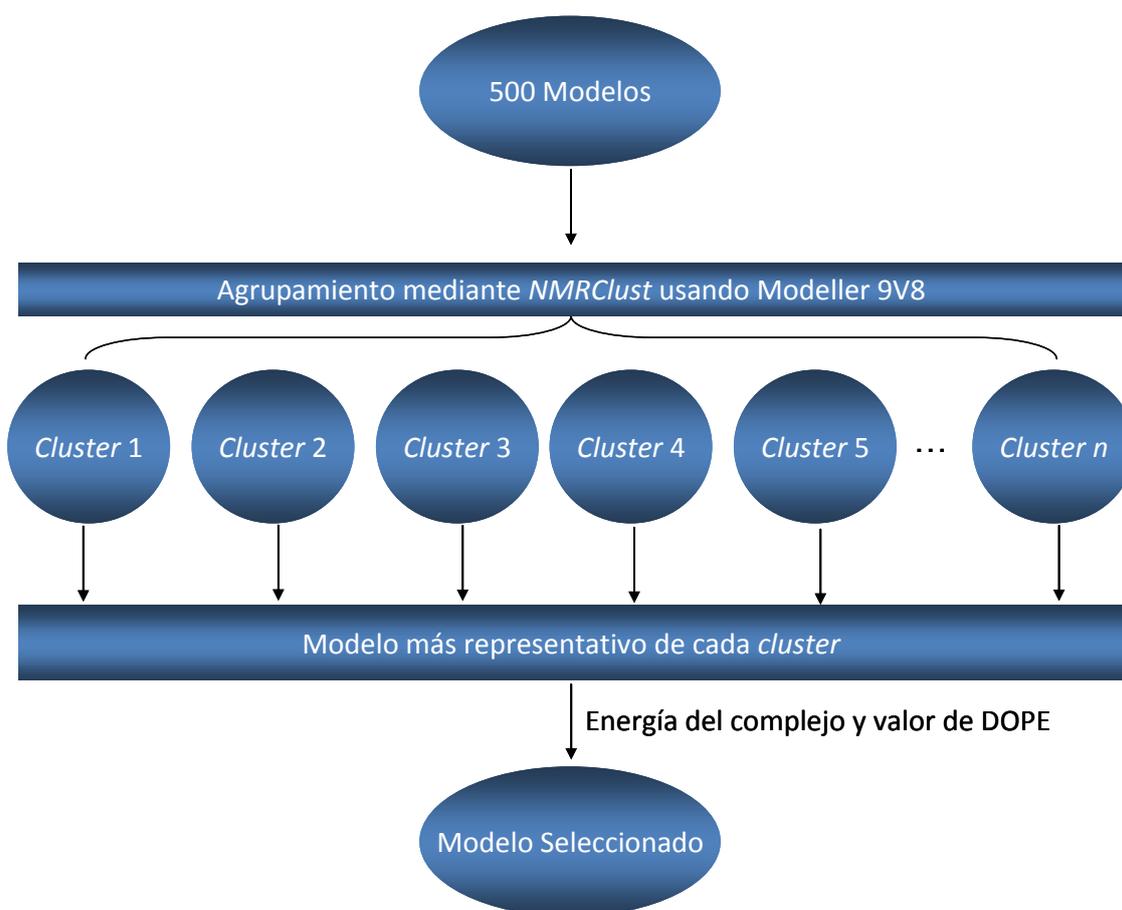
**Esquema 6.1.** Protocolo usado para la construcción y evaluación de los modelos  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ (1-16).

Todos los cálculos ONIOM y DFT se realizaron usando los paquetes de programas Gaussian 03<sup>204</sup> y Gaussian 09.<sup>205</sup>

## 6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

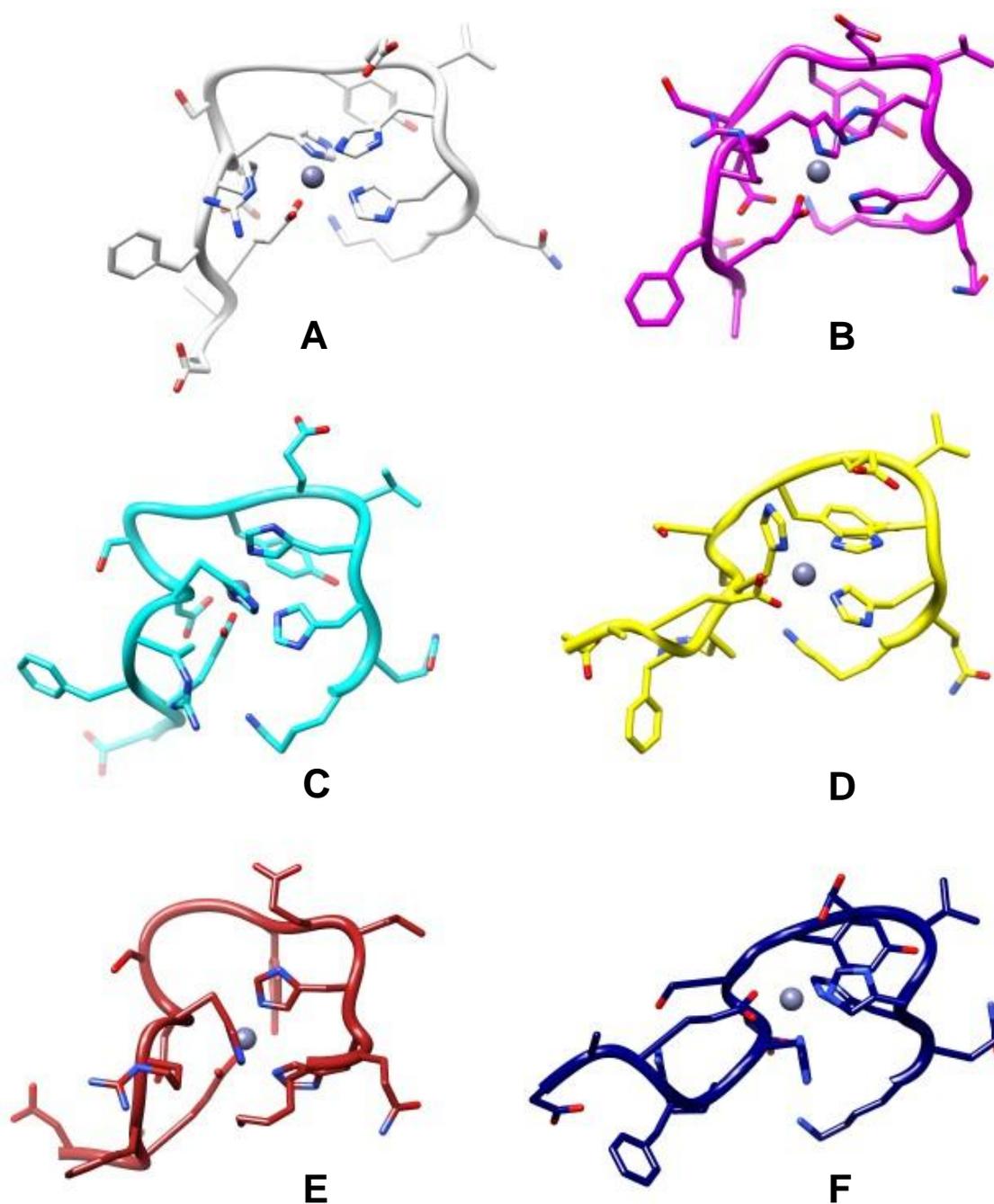
**6.2.1. Modelado por Homología.** Una vez construidos los 500 modelos de cada subgrupo de coordinación, aplicando el procedimiento descrito en la sección anterior, el siguiente paso fue evaluar estos modelos para poder seleccionar el más probable de cada uno de estos subgrupos, para posteriormente tratarlos con métodos químico-cuánticos. A continuación describiremos el procedimiento usado para realizar esta selección, tomando como ejemplo el subgrupo que presenta una esfera de coordinación del tipo  $[N_{\delta}^{H6}, N_{\varepsilon}^{H13}, N_{\varepsilon}^{H1}, O^{E3}]$ , que como veremos más adelante, es el modelo más estable dentro de los que contienen el grupo carboxilato como cuarto ligando.

El procedimiento de selección comienza con el agrupamiento de los modelos mediante el algoritmo *NMRClust*<sup>273</sup> implementado en Modeller 9v5, el cual agrupa los modelos en subgrupos conformacionalmente relacionados mediante la superposición de sus estructuras tridimensionales. Esta superposición genera una serie de distancias y valores de RMS (*root mean square*), que según unos valores de corte selecciona el número de elementos de cada *cluster*. Como elemento representativo de cada *cluster* el programa selecciona aquel modelo que esté más cerca del centroide de dicho *cluster*. Cada uno de los modelos representativos de cada *cluster* se evalúa energética y estructuralmente. Para la evaluación energética consideramos el valor de la energía CHARMM generada por Modeller durante el proceso de construcción de los modelos, y para la evaluación estructural usamos los puntajes de evaluación geométrica del algoritmo DOPE, el cual también viene implementado en Modeller 9v5. El procedimiento de agrupamiento y selección se muestra de manera simplificada en la Figura 6.3.



**Figura 6.3.** Proceso de agrupamiento y selección del modelo más probable a partir de los modelos generados en el proceso de modelado por homología.

Para nuestro ejemplo, el agrupamiento generó 59 *clusters*, de los cuales seleccionamos los que contenían un mayor número de estructuras, ya para ellos la *función objetivo* evaluada por Modeller es menor y, por tanto, es más probable que presenten una mejor calidad estructural. Los resultados del proceso de agrupamiento para este modelo de coordinación se presentan en la Tabla 6.1 y las estructuras representativas de cada uno los 6 *clusters* más poblados se muestran en la Figura 6.4. Cada modelo representa la exploración conformacional de una región espacial de las cadenas laterales manteniendo constantes los parámetros geométricos del centro metálico.



**Figura 6.4.** Estructuras representativas de los *clusters* más poblados de los modelos que contienen la esfera de coordinación  $[N_{\delta}^{H6}, N_{\epsilon}^{H13}, N_{\epsilon}^{H1}, O^{E3}]$ .

**Tabla 6.1.** Evaluación de los modelos representativos de los cluster más poblados para los modelos que presentan la esfera de coordinación  $[\text{N}_{\delta}^{\text{H6}}, \text{N}_{\epsilon}^{\text{H13}}, \text{N}_{\epsilon}^{\text{H1}}, \text{O}^{\text{E3}}]$ .

<i>Clusters</i>	Número de modelos (modelo representativo)	Energía CHARMM (kcal mol <sup>-1</sup> )	Energía DOPE (kcal mol <sup>-1</sup> )
1	81 (A)	539.5979	-322.0398
<b>2</b>	<b>60 (B)</b>	<b>516.3870</b>	<b>-500.0585</b>
3	50 (C)	584.1744	-360.3991
4	44 (D)	467.2506	-335.5285
5	34 (E)	649.6122	-166.0431
6	22 (F)	681.1614	-217.8028

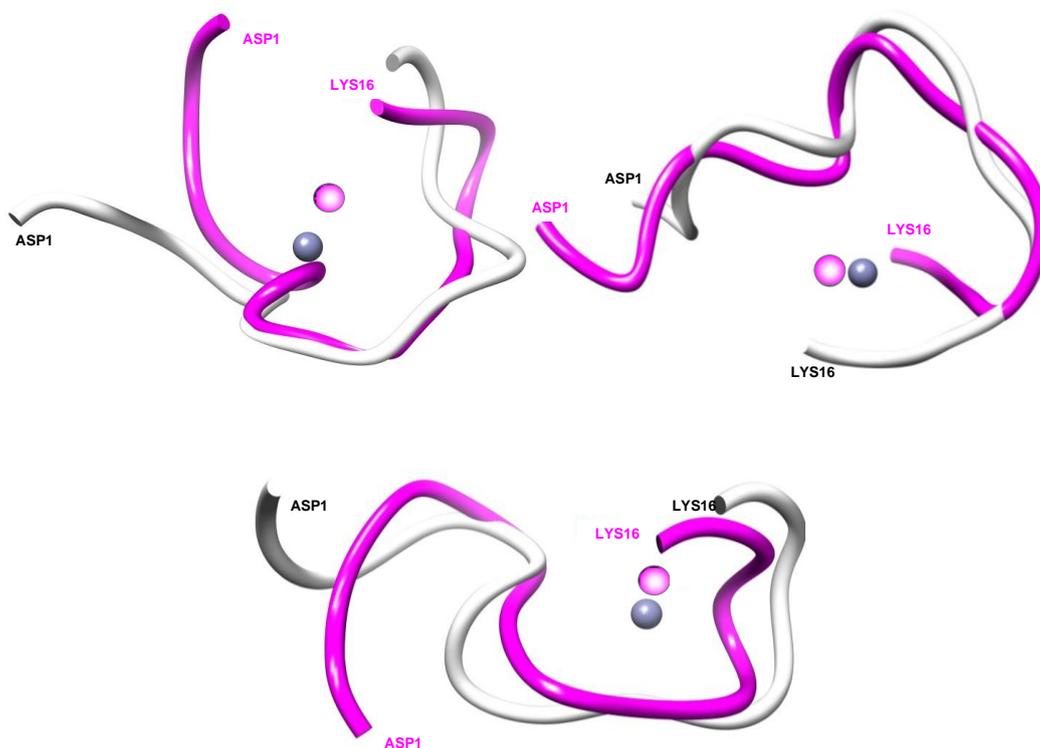
Estos valores indican que dentro de los modelos representativos de los *clusters* formados, el modelo **B** es el que presenta una mejor combinación de valores energéticos y energía DOPE. Este último parámetro indica que es el modelo que presenta mayores similitudes con una serie de estructuras cristalográficas de proteínas, determinando a partir de la comparación de las principales distancias de la proteína con las distancias encontradas en las proteínas depositadas en una base de datos de DOPE. De esta manera, la estructura **B** representa el modelo más probable dentro de los 500 modelos construidos, y constituye un buen punto de partida para este subgrupo de coordinación.

Este procedimiento se realizó de forma análoga para los otros 47 subgrupos, y los resultados de esta evaluación se muestran en la Tabla A6.1 del *Ápndice*.

**6.2.2. Cálculos Químico-Cuánticos.** Después de seleccionar el modelo más estable de cada subgrupo de coordinación, realizamos optimizaciones de las geometrías al nivel ONIOM (BH&HLYP/BP:UFF). Las geometrías de los complejos seleccionados para cada uno de los 48 subgrupos considerados en estas simulaciones se muestran en el *Ápndice A6*. Se muestran en primer lugar los modelos más estables para el sistema  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ (1-16) que contienen el grupo carboxilato de los aminoácidos Asp1, Glu3, Asp7 y Glu11 como cuarto ligando. Posteriormente describimos los modelos con el grupo carbonilo del enlace peptídico de la Ala2 ( $\text{CO}_{\text{Ala2}}$ ) como cuarto ligando, ya que un estudio reciente de EPR para el  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ (1-16), ha sido identificado como cuarto ligando a pH ligeramente superior al fisiológico.<sup>55</sup> También analizamos los modelos

resultantes de la coordinación del grupo N-terminal, ya que como mencionamos en el Capítulo 1, diversos trabajos experimentales y teóricos han sugerido también que podría formar parte de la esfera de coordinación.<sup>49,54,59</sup> Finalmente, comparamos los modelos más estables, para cada uno de los tres subgrupos antes mencionados, mediante cálculos de energía libre en solución acuosa, y calculamos el potencial de reducción estándar para cada uno de estos modelos estables. Los resultados obtenidos se discuten en el contexto de la biología de la enfermedad de Alzheimer.

**Modelos con el Grupo Carboxilato como Cuarto Ligando.** Las geometrías optimizadas al nivel ONIOM (BH&HLYP/BP:UFF) de los 32 modelos evaluados que contienen el grupo carboxilato como cuarto ligando se presentan conjuntamente en las Figuras A6.1-A6.8 del apéndice. En primer lugar, debe señalarse que las principales modificaciones observadas en el péptido durante las optimizaciones QM/MM, en la mayoría de los casos, corresponden fundamentalmente a la reorganización de las cadenas laterales (Figura 6.5).



**Figura 6.5.** Superposición de los esqueletos peptídicos para tres de los modelos que contienen el grupo carboxilato. Se muestran los modelos obtenido por homología (plata) y los optimizados con ONIOM (magenta).

En general, las distancias metal-ligando son similares a las encontradas en los modelos pequeños DFT, es decir, las distancias  $\text{Cu}^{2+}$ -O varían entre 1.9-2.1 Å y las distancias  $\text{Cu}^{2+}$ -N adquieren valores entre 2.0-2.2 Å. Sin embargo, los entornos de coordinación difieren dependiendo del modelo. Por ejemplo, en 17 de los 32 modelos más estables que contienen el grupo carboxilato en su esfera de coordinación, el  $\text{Cu}^{2+}$  está pentacoordinado con una estructura de pirámide de base cuadrada distorsionada, con el  $\text{COO}^-$  coordinando de forma bidentada; un resultado bastante similar al observado en el complejo  $\text{Zn}^{2+}$ -A $\beta$ (1-16)<sup>278</sup>, y al propuesto a partir de estudios EXAFS (*Extended X-Ray Absorption Fine Structure*) del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ (1-28).<sup>53</sup> En otros nueve modelos, la coordinación del  $\text{COO}^-$  es monodentada generando entornos plano-cuadrado distorsionados. En estos últimos casos, se observan puentes de hidrógeno estabilizantes entre el oxígeno más distante del grupo  $\text{COO}^-$  y los grupos azol de las histidinas o grupos NH del péptido, indicando que la coordinación mono o bidentada del grupo carboxilato está influenciada por las interacciones que pueda presentar con grupos cercanos. Un comportamiento similar fue observado por Rauk *et al.* en el sistema modelo  $(\text{H}_2\text{O})_3\text{Cu}^{2+}$ - $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , el cual muestra la formación de un puente de hidrógeno entre una molécula de agua coordinada y el oxígeno más distante del grupo  $\text{COO}^-$ .<sup>57</sup> Es interesante ver que en tres casos la relajación de la estructura del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ (1-16) conduce a entornos de coordinación tricoordinados del metal, en los cuales la interacción metal-carboxilato se pierde. Este comportamiento está relacionado con la excesiva tensión del esqueleto peptídico, producto de las restricciones impuestas durante el proceso de modelado por homología, y con los cambios en la estructura electrónica del metal durante el proceso de optimización ONIOM; estando estos dos fenómenos estrechamente relacionados. En estas configuraciones, el catión  $\text{Cu}^{2+}$  se reduce a  $\text{Cu}^{1+}$ , por lo que el valor de la densidad de espín en el cobre es cercano a cero y el análisis de población indica que el carácter radicalario se desplaza hacia el grupo carboxílico que inicialmente interactuaba con el catión metálico. Con respecto a las preferencias de coordinación para las histidinas ( $\delta$  o  $\epsilon$ ), no se observó ninguna tendencia clara.

Las energías relativas de los 32 modelos considerados para la coordinación del grupo carboxilato se detallan en la Tabla 6.2.

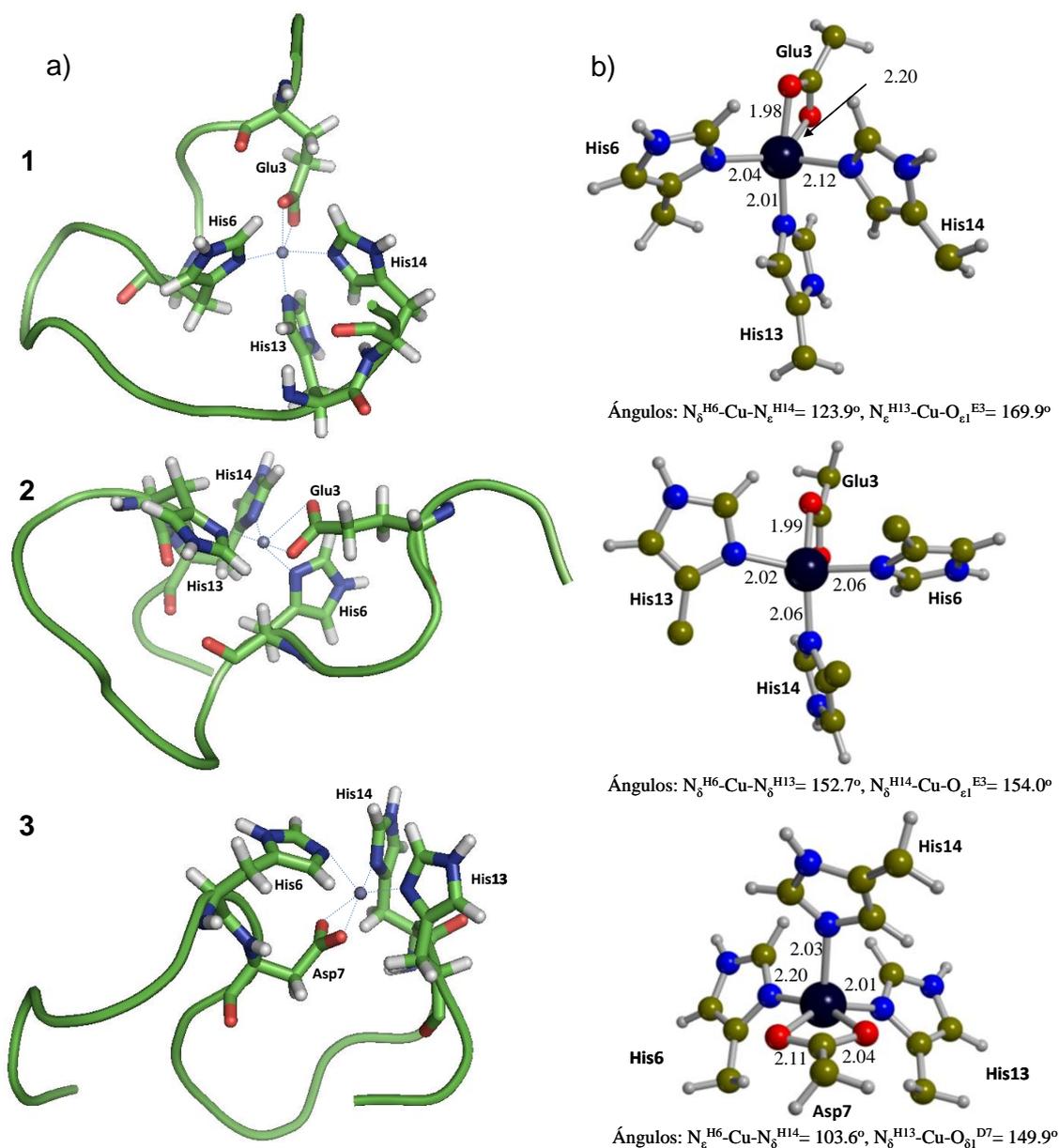
**Tabla 6.2.** Energías relativas (kcal mol<sup>-1</sup>) para los modelos más estables de cada subgrupo respecto al modelo más estable (1).

Esfera de Coordinación [H <sup>6</sup> , H <sup>13</sup> , H <sup>14</sup> , X]	<i>E<sub>rel</sub></i> (g) DFT/BP (BG)	<i>E<sub>rel</sub></i> (Sistema Modelo) ONIOM	<i>E<sub>rel</sub></i> (Amiloide) DFT/BP	Densidad de Espín (Cu)
[ε, ε, ε, D <sup>1</sup> ]	43.2	-2.5	21.5	0.736
[ε, ε, ε, E <sup>3</sup> ]	53.0	-5.3	64.4	0.780
[ε, ε, ε, D <sup>7</sup> ]	80.4	7.9	73.0	0.761
[ε, ε, ε, E <sup>11</sup> ]	69.1	10.2	62.1	0.785
[δ, ε, ε, D <sup>1</sup> ]	33.7	-1.3	62.6	0.789
<b>[δ, ε, ε, E<sup>3</sup>] (1)</b>	<b>0.0 (0.0)</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.781</b>
[δ, ε, ε, D <sup>7</sup> ]	71.8	43.4	-7.9	0.009
[δ, ε, ε, E <sup>11</sup> ]	111.4	45.2	33.6	0.000
[ε, δ, δ, D <sup>1</sup> ]	65.0	-2.5	45.7	0.810
[ε, δ, δ, E <sup>3</sup> ]	28.9	0.0	29.6	0.750
<b>[ε, δ, δ, D<sup>7</sup>] (3)</b>	<b>13.0 (4.2)</b>	<b>-2.3</b>	<b>23.9</b>	<b>0.786</b>
[ε, δ, δ, E <sup>11</sup> ]	70.5	3.8	63.3	0.802
[δ, δ, δ, D <sup>1</sup> ]	55.6	-2.0	52.5	0.784
<b>[δ, δ, δ, E<sup>3</sup>] (2)</b>	<b>14.0(2.6)</b>	<b>-8.2</b>	<b>10.3</b>	<b>0.739</b>
[δ, δ, δ, D <sup>7</sup> ]	62.9	2.3	68.8	0.732
[δ, δ, δ, E <sup>11</sup> ]	48.5	13.8	42.5	0.774
[ε, δ, ε, D <sup>1</sup> ]	120.4	47.4	59.9	0.843
[ε, δ, ε, E <sup>3</sup> ]	52.0	-3.1	44.4	0.840
[ε, δ, ε, D <sup>7</sup> ]	48.4	-3.0	50.5	0.798
[ε, δ, ε, E <sup>11</sup> ]	126.2	41.0	52.4	0.742
[δ, δ, ε, D <sup>1</sup> ]	85.6	49.8	18.3	0.000
[δ, δ, ε, E <sup>3</sup> ]	32.1	-9.7	50.4	0.807
[δ, δ, ε, D <sup>7</sup> ]	47.8	-0.5	44.5	0.714
[δ, δ, ε, E <sup>11</sup> ]	32.6	1.7	32.1	0.790
[ε, ε, δ, D <sup>1</sup> ]	61.9	-5.3	75.4	0.765
[ε, ε, δ, E <sup>3</sup> ]	54.9	-5.1	55.3	0.809
[ε, ε, δ, D <sup>7</sup> ]	62.2	-2.3	61.7	0.781
[ε, ε, δ, E <sup>11</sup> ]	55.7	-1.0	55.9	0.743
[δ, ε, δ, D <sup>1</sup> ]	67.2	2.2	42.0	0.745
[δ, ε, δ, E <sup>3</sup> ]	62.0	-6.9	107.5	0.755
[δ, ε, δ, D <sup>7</sup> ]	148.4	15.2	59.1	0.748
[δ, ε, δ, E <sup>11</sup> ]	40.7	5.5	49.1	0.782

Entre estos 32 modelos las estructuras con energías más bajas obtenidas después de los cálculos puntuales BH&HLYP/BP sobre las geometrías optimizadas con el método ONIOM tienen las siguiente esferas de coordinación: [N<sub>δ</sub><sup>H6</sup>, N<sub>ε</sub><sup>H13</sup>, N<sub>ε</sub><sup>H11</sup>, O<sup>E3</sup>] (1), [N<sub>δ</sub><sup>H6</sup>, N<sub>δ</sub><sup>H13</sup>, N<sub>δ</sub><sup>H14</sup>, O<sup>E3</sup>] (2) y [N<sub>ε</sub><sup>H6</sup>, N<sub>δ</sub><sup>H13</sup>, N<sub>δ</sub><sup>H14</sup>, O<sup>D7</sup>] (3), siendo las energías relativas al nivel BH&HLYP/BG de 0, 2.6 y 4.2 kcal mol<sup>-1</sup> respectivamente. La inclusión de

efectos térmicos calculados al nivel ONIOM (BH&HLYP/BP:UFF) conduce a valores de energía libre relativas de 0, 1.4 y 2.1 kcal mol<sup>-1</sup>, respectivamente; es decir, no modifica significativamente estos valores.

Si se considera inicialmente la energía obtenida a nivel DFT para la parte del sistema modelo en los cálculos ONIOM, es decir, aquellos átomos incluidos en la partición QM, para los modelos **1**, **2** y **3** se observa que la coordinación preferente es la que presenta el modelo **2**, siendo las coordinaciones en los modelos **3** y **1** menos estables por ~6 y ~8 kcal mol<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabla 6.2). De esta manera, el orden energético de los sistemas modelos es **2** < **3** < **1**. Sin embargo, los cálculos a nivel BH&HLYP/BP del péptido  $\text{A}\beta(1-16)$  neutro libre con la misma geometría que tiene en los complejos **1**, **2** y **3**, muestran que el orden energético para el amiloide en estos tres modelos es **1** < **2** < **3**. En este sentido, se debe notar que el análisis de estas estructuras revela diferentes contactos de enlaces de hidrógeno entre los grupos amidas y carbonilos del esqueleto peptídico, así como entre las cadenas laterales de diferentes residuos, que da cuenta de la estabilidad relativa del péptido en los distintos complejos. En el modelo **1** se forman siete enlaces de hidrógeno de los cuales tres son interacciones  $\text{NH}\cdots\text{CO}$  del esqueleto peptídico, mientras que en el modelo **2** se forman diez puentes de hidrógenos en total en los que dos son  $\text{NH}\cdots\text{CO}$  y, por último, en el modelo **3** se establecen ocho puentes de hidrógeno en los que uno de ellos es del tipo  $\text{NH}\cdots\text{CO}$ . De esta manera, la estabilidad relativa final es el resultado de una estrecha sinergia entre las dos partes del complejo. Las estructuras de los tres modelos más estables se muestran en la Figura 6.6 junto con sus principales parámetros geométricos.

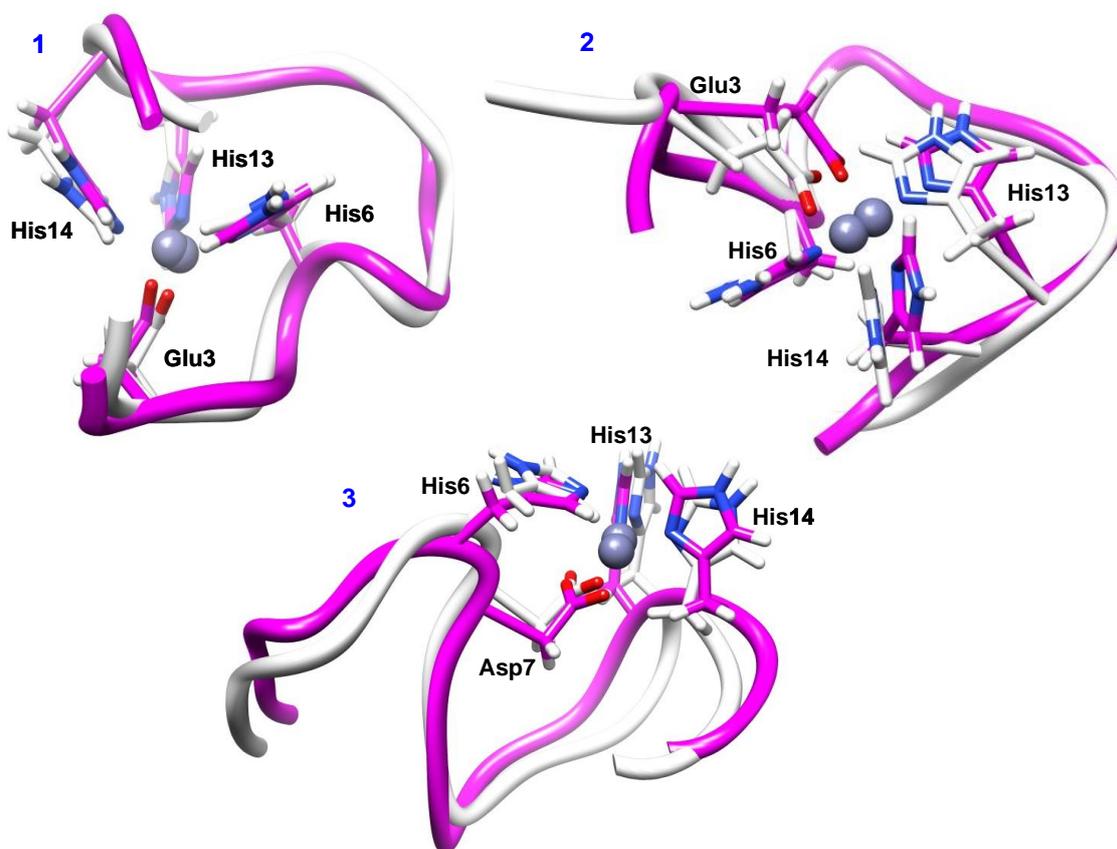


**Figura 6.6.** a) Modelos más estables conteniendo el grupo  $COO^{-}$  del Glu3 (1 y 2) y del Asp7 (3) como cuarto ligando. b) Esfera de coordinación del cobre en dichos modelos. Todas las distancias están dadas en Å y los ángulos en grados.

En el modelo **1**, el  $Cu^{2+}$  está pentacoordinado, con el grupo carboxilato del Glu3 interaccionando con el metal de un modo bidentado. La geometría del centro de coordinación corresponde a una bipirámide-trigonal distorsionada con el  $O_1$  y el  $N_{\epsilon}^{H13}$

en las posiciones axiales. La interacción con el O<sub>2</sub> es más débil, siendo la distancia Cu-O<sub>2</sub> alrededor de 0.2 Å mayor que la Cu-O<sub>1</sub>. En el modelo **2**, el grupo carboxilato corresponde también al Glu3, pero su coordinación se realiza de forma monodentada, siendo la distancia entre el O<sub>2</sub> y el Cu<sup>2+</sup> de 2.40 Å, y de esta manera, la geometría resultante en la esfera de coordinación del metal corresponde a una configuración plano-cuadrada distorsionada. Por último, en el modelo **3**, la interacción con el grupo carboxilato es bidentada pero esta vez involucrando a la cadena carboxílica del Asp7. En este caso la geometría del sitio de coordinación se asemeja más a una estructura de pirámide de base cuadrada con la His6 en la posición apical. Por ello, la distancia Cu-N<sup>H6</sup> es alrededor de 0.2 Å mayor que las correspondientes distancias Cu-N<sup>H13</sup> y Cu-N<sup>H14</sup>.

Con el fin de confirmar la fiabilidad de las optimizaciones ONIOM de estas estructuras, realizamos optimizaciones completas, a partir de las geometrías ONIOM, al nivel BH&HLYP/BP, y se observaron, en términos generales, pocos cambios en el esqueleto peptídico. Los cambios más notables corresponden a la reorganización de algunas cadenas laterales diferentes a las que participan en la esfera de coordinación. Asimismo, las energías de las estructuras optimizadas al nivel QM muestran la misma tendencia que la encontrada usando las geometrías ONIOM. El modelo **1** continúa siendo la estructura más estable que los modelos **2** y **3** por 0.63 y 2.26 kcal mol<sup>-1</sup>, respectivamente. Los cambios debidos a la optimización QM en el esqueleto peptídico y en la esfera de coordinación se ilustran en la Figura 6.7.



**Figura 6.7.** Superposición de las estructuras optimizadas al nivel ONIOM (plata) con las optimizadas al nivel QM (magenta) de los modelos más estables conteniendo el grupo  $\text{COO}^-$  como cuarto ligando.

**Modelos con los grupos  $\text{CO}_{\text{Ala2}}$  o N-terminal como Cuarto Ligando.** Tal y como mencionamos en el Capítulo 1, la coordinación de los grupos carbonilos de la cadena principal ha sido propuesta como posible ligando para el  $\text{Cu}^{2+}$ . Sin embargo, no era claro cual de los 16 grupos presentes en la región de afinidad por el cobre tendría preferencia. Recientemente Drew *et al.*,<sup>55</sup> encontraron en un estudio de EPR en el cual marcaban isotópicamente el carbono carbonilo de la Ala2 y el nitrógeno amida del Glu3 que, a valores de pH ligeramente superiores al fisiológico el grupo CO de la Ala2 y las tres histidinas coordinan con el cobre formando una estructura plano-cuadrada. De igual forma, la coordinación del grupo N-terminal ha sido ampliamente propuesta, tanto en estudios experimentales como teóricos.<sup>49,54,59</sup> Por ello, hemos construido también modelos en los cuales estos dos grupos están formando parte de la esfera de

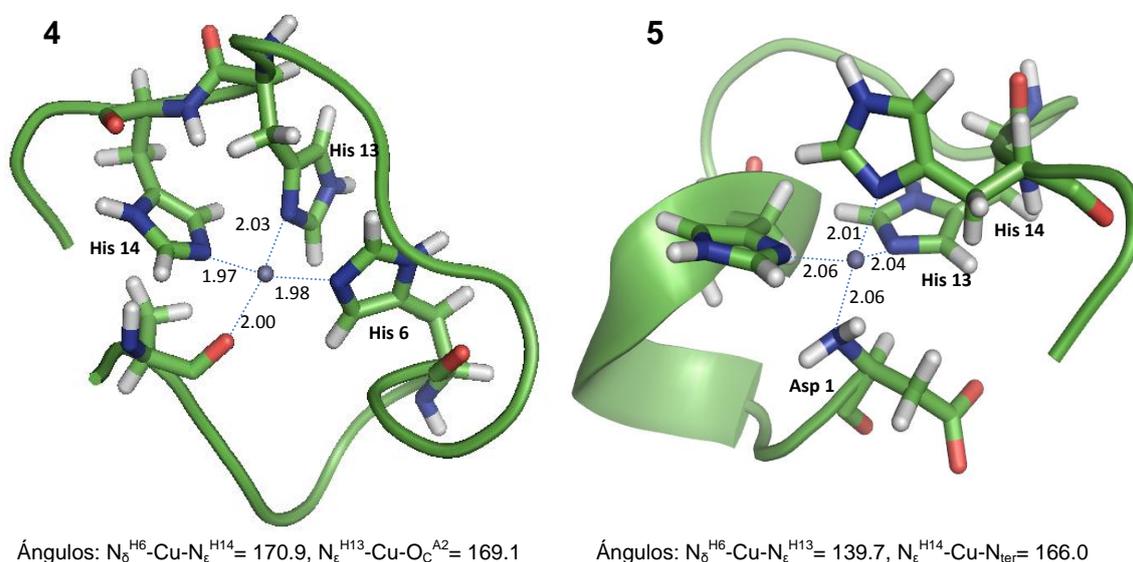
coordinación del metal, de manera análoga al procedimiento descrito en la sección anterior, partiendo de los complejos  $[\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{NH}_2\text{CHO})]^{2+}$  y  $[\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{CH}_3\text{NH}_2)]^{2+}$  obtenidos en el capítulo 4, y considerando las 8 posibles combinaciones de coordinación para las histidinas. Los modelos se evaluaron energéticamente y geoméricamente y se seleccionaron los complejos más estables en cada caso. Las estructuras de estos modelos se muestran en las Figuras A6.9 y A6.10 del Apéndice y las energías relativas a los modelos más estables de los dos subgrupos en la Tabla 6.3.

**Tabla 6.3.** Energías relativas ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) para los modelos más estables de cada subgrupo respecto al complejo más estable (4 y 5).

Esfera de Coordinación [H <sup>6</sup> , H <sup>13</sup> , H <sup>14</sup> , X]	$E_{rel}$ (g) DFT/BP	$\Delta E_{rel}$ (Sistema Modelo) ONIOM	$\Delta E_{rel}$ (Amiloide) DFT/BP	Densidad de Espín (Cu)
<b>X = CO<sub>Ala2</sub></b>				
[ $\epsilon$ , $\epsilon$ , $\epsilon$ ]	36.0	0.3	19.6	0.745
[ $\delta$ , $\epsilon$ , $\epsilon$ ]	91.8	3.0	103.1	0.798
[ $\epsilon$ , $\delta$ , $\delta$ ]	52.5	10.0	47.7	0.804
[ $\delta$ , $\delta$ , $\delta$ ]	33.7	7.9	17.8	0.780
<b>[<math>\epsilon</math>, <math>\delta</math>, <math>\epsilon</math>] (4)</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.733</b>
[ $\delta$ , $\delta$ , $\epsilon$ ]	93.7	10.9	75.5	0.000
[ $\epsilon$ , $\epsilon$ , $\delta$ ]	50.1	2.2	51.7	0.764
[ $\delta$ , $\epsilon$ , $\delta$ ]	106.8	6.1	61.8	0.004
<b>X = N-terminal</b>				
[ $\epsilon$ , $\epsilon$ , $\epsilon$ ]	39.7	-8.7	31.1	0.753
[ $\delta$ , $\epsilon$ , $\epsilon$ ]	55.4	-10.5	74.9	0.747
[ $\epsilon$ , $\delta$ , $\delta$ ]	16.5	-4.5	11.7	0.694
[ $\delta$ , $\delta$ , $\delta$ ]	103.1	-10.7	90.5	0.715
[ $\epsilon$ , $\delta$ , $\epsilon$ ]	56.0	-4.3	24.1	0.000
[ $\delta$ , $\delta$ , $\epsilon$ ]	13.4	-12.0	32.6	0.722
[ $\epsilon$ , $\epsilon$ , $\delta$ ]	46.1	-5.9	72.8	0.733
<b>[<math>\delta</math>, <math>\epsilon</math>, <math>\delta</math>] (5)</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.739</b>

Los modelos que contienen el grupo CO<sub>Ala2</sub> como cuarto ligando en la esfera de coordinación muestran geometrías tetracoordinadas con una disposición plano-cuadrada distorsionada, presentando la misma esfera de coordinación que los modelos obtenidos mediante modelado por homología. Las distancias Cu-O y Cu-N<sub>His</sub> son similares, o ligeramente más cortas, que las obtenidas en los tres modelos más estables conteniendo

el grupo carboxilato (Figura 6.5). Sin embargo, la conformación que adquiere el péptido A $\beta$ (1-16) en estas configuraciones es menos estable que las adoptadas en los modelos **1**, **2** y **3**, debido principalmente a la ausencia de contactos estabilizantes NH $\cdots$ CO. El modelo más estable, tanto desde el punto de vista de la esfera de coordinación como de la estabilidad de la cadena peptídica, después de realizar cálculos puntuales de energía al nivel BH&HLYP/BP, presenta la esfera de coordinación: [O<sub>c</sub><sup>A2</sup>, N <sub>$\epsilon$</sub> <sup>H6</sup>, N <sub>$\delta$</sub> <sup>H13</sup>, N <sub>$\epsilon$</sub> <sup>H14</sup>] (**4**). Este modelo se muestra en la Figura 6.8 junto con sus principales parámetros geométricos.



**Figura 6.8.** Modelos más estables conteniendo el CO de la Ala2 (**4**), y el grupo N-terminal (**5**) como cuarto ligando. Todas las distancias están dadas en Å y los ángulos en grados.

En cuanto a los modelos que contienen el grupo N-terminal, los complejos presentan, en general, estructuras plano-cuadradas distorsionadas en el que la coordinación obtenida del modelado por homología se mantiene en todos los casos considerados. Las distancias Cu-N<sub>His</sub> varían entre 1.99 y 2.08 Å, mientras que las distancias Cu-N<sub>ter</sub> son ligeramente mayores, variando entre 2.03 y 2.09 Å. Después de realizar los cálculos puntuales de energía al nivel BH&HLYP/BP, tanto para el complejo con cobre como para el A $\beta$ (1-16), encontramos que el modelo más estable es el que presenta la esfera de coordinación [N<sub>ter</sub><sup>D1</sup>, N <sub>$\delta$</sub> <sup>H6</sup>, N <sub>$\epsilon$</sub> <sup>H13</sup>, N <sub>$\delta$</sub> <sup>H14</sup>]. Es interesante

notar que la energía relativa de la esfera de coordinación de este complejo es la mayor dentro de los elementos de este subgrupo, sin embargo, la cadena peptídica es la más estable dentro de los modelos evaluados, lo cual pone de manifiesto nuevamente la importancia de la cadena peptídica en la estabilización global del complejo.

**Comparación Energética entre los Modelos Propuestos.** La comparación directa entre los modelos más estables que incluyen el grupo carboxilato en la esfera de coordinación (**1**, **2** y **3**), y los modelos más estable que contiene el grupo carbonilo de la Ala2 (**4**) y el grupo N-terminal (**5**), no es posible en fase gas debido a que sus cargas globales son diferentes (+1 en los primeros y +2 en los dos últimos). Cabe recordar que en los modelos **1**, **2** y **3** el glutamato está coordinado al catión metálico, mientras que en los modelos **4** y **5** este grupo está expuesto al solvente y por tanto se ha considerado protonado. Para superar esta limitación, y para poder obtener una estimación de la estabilidad relativa entre estos tres tipos de coordinación, realizamos cálculos puntuales de energía en fase acuosa utilizando el modelo del continuo polarizable en los complejos **1**, **4** y **5**, usando el glutamato 3 desprotonado en estos dos últimos modelos, con tal de mantener las mismas cargas totales (modelos **4\*** y **5\***).

Por otro lado, las correcciones térmicas fueron estimadas a partir de cálculos de frecuencia en fase gas de los complejos **4** y **5**, usando el procedimiento ONIOM (BH&HLYP/BP:UFF). Por razones de consistencia, estos cálculos incluían en la partición QM tanto la Ala2, como la cadena lateral del Glu3 y el grupo N-terminal, además de las tres cadenas laterales de las histidinas. Para estimar las correcciones de los complejos desprotonados **4\*** y **5\*** eliminamos las contribuciones asociadas al átomo de hidrógeno enlazado al grupo carboxílico del Glu3. Los resultados obtenidos se muestran de forma detallada en la Tabla 6.4.

Los resultados de estas estimaciones muestran que la energía de solvatación es significativamente más estabilizante en los modelos **4\*** y **5\*** que en el modelo **1**, lo que resulta lógico considerando que en los modelos **4\*** y **5\*** hay un grupo carboxilato adicional expuesto al solvente, lo que favorece la solvatación de estos complejos. Como resultado, las energías de Gibbs relativas en solución indican que el modelo **4\*** es más estable por  $12.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ , respecto al modelo **1**, y por  $79.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ , respecto al

modelo **5\***, lo cual sugiere que los efectos de solvatación podrían contrarrestar la preferencia del cobre para coordinar al glutamato en lugar del grupo carbonilo y el grupo N-terminal en fase gas. De esta manera, el orden de preferencia para el cuarto ligando en la esfera de coordinación es:  $\text{CO}_{\text{Ala2}} > \text{COO}^- > \text{N}_{\text{ter}}$ . Estos resultados están en concordancia con los obtenidos recientemente por métodos experimentales usando CW-EPR (*continuous wave electron paramagnetic resonance*) y HYSCORE (*hyperfine sublevel correlation spectroscopy*), en combinación con el uso de marcadores isotópicos ( $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$ ), que permitieron identificar sin ambigüedades al oxígeno carbonilo de la Ala2 como oxígeno candidato a ocupar la cuarta posición junto con tres histidinas adicionales.<sup>55</sup>

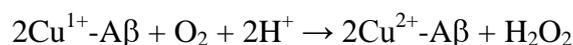
**Tabla 6.4.** Comparación de energías en fase acuosa entre los modelos **1**, **4** y **5**.

Modelo	$E_{(g)}$ (Hartree)	$H_{298K}$ (Hartree)	$G_{298K}$ (Hartree)	$\Delta G^*_{\text{solv}}$ kcal mol <sup>-1</sup>	$\Delta G^*_{\text{sol}}$ kcal mol <sup>-1</sup>
<b>1</b>	-7087.765446	-7085.300760	-7085.608254	-44.1	<b>12.1</b>
<b>4*</b>	-7087.629027	-7085.153515	-7085.460247	-149.1	<b>0.00</b>
<b>5*</b>	-7087.616599	-7085.144959	-7085.445810	-78.6	<b>79.5</b>

**Potencial Redox de los Complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ (1-16)/  $\text{Cu}^{1+}$ -A $\beta$ (1-16).** Como hemos mencionado previamente, una de las principales características neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer es el alto nivel de estrés oxidativo observado en el cerebro, que se manifiesta principalmente por la extensiva oxidación de proteínas y ADN, niveles inusuales de los metales cobre, hierro y zinc; y por la disminución en la concentración de ácidos grasos poliinsaturados relacionados con el incremento en la peroxidación lipídica. Tal y como mencionamos en el Capítulo 1, la principal hipótesis apunta a que este daño oxidativo es debido a la producción excesiva de peróxido de hidrógeno, lo cual desencadena una serie de ciclos catalíticos que derivan finalmente en la producción de especies radicalarias de oxígeno. En esta producción de peróxido se postula que están implicados los complejos que forma el A $\beta$  con los iones metálicos que presentan actividad redox.

Con el propósito de entender los potenciales de reducción, en el contexto de la biología de la enfermedad de Alzheimer, es necesario analizar el mecanismo de producción de peróxido de hidrógeno propuesto para los sistemas cobre-A $\beta$ , el cual fue descrito en el Capítulo 1 (Figura 1.3). El primer paso de esta serie de reacciones es la reducción del metal en el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ . Inicialmente se propuso que esta reducción se realizaba por el mismo A $\beta$ , mediante la oxidación de alguna de sus cadenas laterales. Para este respecto se propusieron la Tyr10 y la Met35. Sin embargo, la Tyr10 fue descartada debido a su alto potencial de reducción en el A $\beta$  (0.95 V),<sup>279</sup> esto significa que para que el  $\text{Cu}^{2+}$  pueda reducirse, la Tyr10 debe oxidarse, con lo cual el potencial de reducción del cobre debe ser mayor que 0.95 V. El valor experimental para las especies monoméricas de  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ (1-16)/  $\text{Cu}^{1+}$ -A $\beta$ (1-16) más aceptado es de 0.28 V,<sup>279</sup> lo cual descarta la reducción de este complejo por la Tyr10. Por su parte la metionina fue descartada por dos evidencias claras; en primer lugar, el alto valor encontrado en el potencial de reducción (1.5 V)<sup>280</sup> implica que el cobre debe tener un potencial de reducción mayor para facilitar su oxidación. En segundo lugar, en experimentos de voltametría cíclica realizados usando complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ (1-16),  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ (1-28) y  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ (1-42), se determinaron valores bastante cercanos en sus potenciales de reducción, lo cual excluye a la Met35 como agente reductor.<sup>279</sup> De esta manera, la reducción del complejo cobre-A $\beta$  debe llevarse a cabo por agentes reductores externos, por lo que es necesario que este potencial sea mayor que el de las especies reductoras más abundantes en el medio cerebral.

Una vez que el cobre se ha reducido, la producción de peróxido de hidrógeno se lleva a cabo mediante la reacción de este complejo con el oxígeno disuelto y los protones del medio. Esta reacción además da como resultado el complejo oxidado, el cual podría ser reducido nuevamente por un agente reductor externo generando un ciclo catalítico que derivaría en una producción excesiva de peróxido de hidrógeno. La reacción general de este proceso es la siguiente:



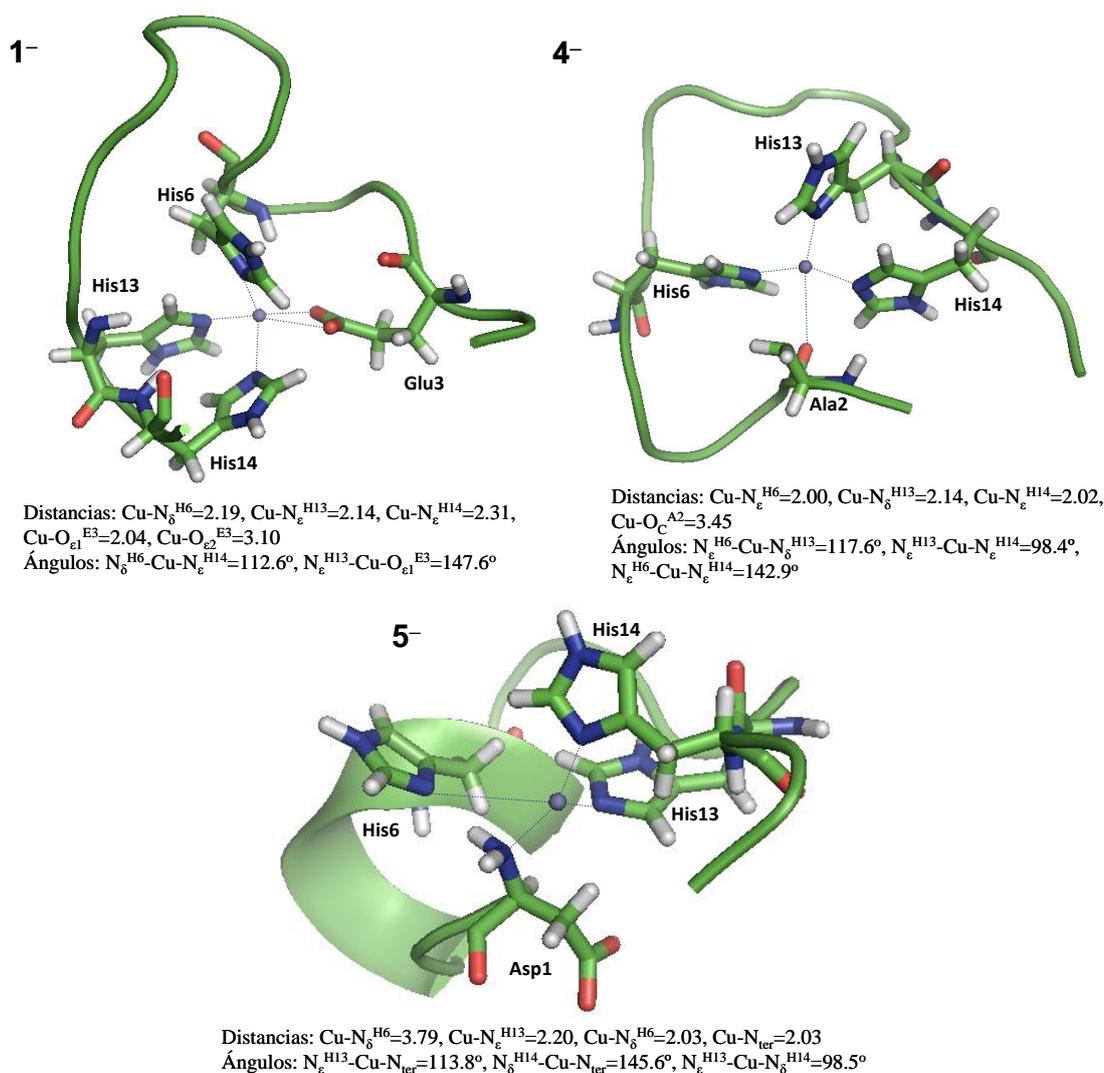
El potencial de reducción estándar para el par  $O_2/H_2O_2$  es de 0.30 V,<sup>281</sup> lo que significa que para que esta reacción esté favorecida, el potencial de reducción para el par “Cu<sup>2+</sup>”/“Cu<sup>1+</sup>” debe ser menor que este valor.

Para estudiar la actividad redox de nuestros complejos más estables, consideramos la reducción del complejo de Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>1+</sup>, y optimizamos la estructura completa al nivel ONIOM (BH&HLYP/BP:UFF). Consideramos que la reducción se lleva a cabo por agentes reductores externos, ya que en las optimizaciones realizadas en los complejos Cu<sup>2+</sup>-Aβ(1-16) no observamos ninguna reducción del centro metálico en los complejos más estables, ni oxidaciones en la cadena peptídica. Las estructuras de los complejos reducidos se muestran en la Figura 6.9.

Las estructuras optimizadas ONIOM muestran que para todos los casos las distancias de enlace son mayores que las obtenidas en los modelos Cu<sup>2+</sup>-Aβ(1-16). El complejo **1<sup>-</sup>** presenta una estructura tetraédrica, característica en complejos de Cu<sup>1+</sup>, manteniendo la misma esfera de coordinación que el complejo de Cu<sup>2+</sup>, pero en este caso el grupo carboxilato del Glu3 coordina de forma monodentada al átomo de cobre. Por su parte, en los complejos **4<sup>-</sup>** y **5<sup>-</sup>** la geometría del centro metálico es trigonal plana distorsionada, producto de la descoordinación de uno de los ligandos que inicialmente coordinaban al cobre en el complejo de Cu<sup>2+</sup>. En el modelo **4<sup>-</sup>** la optimización ONIOM genera la descoordinación del grupo CO<sub>Ala2</sub>, mientras que en el modelo **5<sup>-</sup>** se descoordina la His6. Sobre estas geometrías optimizadas, realizamos cálculos de frecuencias y de energías libres de solvatación al mismo nivel de cálculo que para los sistemas de Cu<sup>2+</sup>, con el propósito de obtener el cambio de energía libre de reacción en solución acuosa del par “Cu<sup>2+</sup>”/“Cu<sup>1+</sup>”. Esta energía de reacción nos permitió obtener el valor del potencial de reducción estándar ( $E^\circ$ ) vs el electrodo estándar de hidrógeno (EEH), mediante un procedimiento análogo al descrito en el Capítulo 4 para el par “Fe<sup>3+</sup>”/“Fe<sup>2+</sup>”.

Para tener en cuenta el error asociado al cálculo del potencial de reducción de nuestros sistemas, al presente nivel del cálculo, tomamos como modelo de referencia la reducción del Cu<sup>2+</sup> en agua, cuyo valor experimental es 0.16 V.<sup>282</sup> Para modelar los complejos de cobre en agua, consideramos los complejos tetracoordinados, y obtuvimos un valor del potencial de reducción estándar de 0.47 V. Asumiendo que el error de esta

estimación se mantiene constante al considerar los sistemas  $\text{Cu}^{2+/1+}$ - $\text{A}\beta(1-16)$ , añadimos esta corrección a los valores de energías libre en solución calculadas para estos sistemas, obteniendo un valor del potencial de reducción corregido ( $E^{\circ}_{\text{corr}}$ ).



**Figura 6.9.** Modelos reducidos conteniendo el grupo  $\text{COO}^-$  del Glu3 (**1<sup>-</sup>**), el  $\text{CO}_{\text{Ala2}}$  (**4<sup>-</sup>**) o el grupo N-terminal (**5<sup>-</sup>**).

Los potenciales de reducción calculados muestran una disminución generalizada en los diferentes sistemas metálicos considerados respecto al potencial redox del cobre acuoso, sin embargo esta disminución es significativamente diferente en los tres modelos, lo cual se traduce en diferencias importantes desde un punto de vista

biológico. Estos valores se presentan de manera desglosada en la Tabla 6.5 y se contextualizan en el ambiente biológico en la Tabla 6.6, en la que se muestran valores de potenciales de reducción para especies relevantes en la biología de la enfermedad de Alzheimer que podrían actuar como agentes reductores naturales.

**Tabla 6.5.** Energías de reacción ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) y potenciales de reducción estándar (V) para los modelos 1, 4, 5 y sus respectivos pares reducidos  $1^-$ ,  $4^-$ ,  $5^-$ .

Modelo	$\Delta H_{298,(\text{g})}$	$T\Delta S^{o \rightarrow *}$	$\Delta G_{298,(\text{g})}$	$\Delta \Delta G^*_{\text{solv}}$	$\Delta G^*_{\text{sol}}$	$E^o$	$E^o_{\text{corr}}$
“Cu <sup>2+</sup> ”/“Cu <sup>1+</sup> ”	-265.55	5.02	-270.57	159.85	-110.72	0.47	0.16
1→1 <sup>-</sup>	-121.04	2.25	-123.30	32.82	-90.48	-0.41	-0.72
4→4 <sup>-</sup>	-181.08	6.48	-187.55	78.58	-108.97	0.39	0.08
5→5 <sup>-</sup>	-174.85	7.90	-182.76	81.43	-101.33	0.06	-0.25

**Tabla 6.6.** Potenciales de reducción estándar para los modelos más estables y especies redox de relevancia biológica

Sistema	$E^o$ (V vs. EEH)	Referencia
Met35 (A $\beta$ )	1.50	280
Tyr10 (A $\beta$ )	0.95	279
Epinefrina	0.37	283
Dopamina	0.37	284
O <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.30	281
Citocromo a	0.29	283
Cu <sup>2+</sup> -A $\beta$ (1-16)/Cu <sup>1+</sup> -A $\beta$ (1-16)	0.28	279
Citocromo c	0.25	283
Cu <sup>2+</sup> /Cu <sup>1+</sup>	0.16	282
4/4 <sup>-</sup>	0.08	Este trabajo
Ácido ascórbico	0.05	285
Citocromo b	0.04	283
Fumarato/succinato	0.03	281
Mioglobina	0.01	283
Crotonil-CoA/Butiril-CoA	-0.02	281
FMN/FMNH <sub>2</sub>	-0.12	283
Oxaloacetato/malato	-0.17	281
Piruvato/lactato	-0.19	281
Glutación	-0.23	283
Vitamina B <sub>12</sub>	-0.24	283
5/5 <sup>-</sup>	-0.25	Este trabajo
NAD <sup>+</sup> /NADH	-0.32	283
FAD/FADH <sub>2</sub>	-0.33	283
1/1 <sup>-</sup>	-0.72	Este trabajo

La primera conclusión que podemos obtener de los resultados encontrados, es que para los tres modelos, el potencial de reducción estándar calculado es menor que 0.30 V, lo que significa que la reacción de producción de peróxido de hidrógeno descrita previamente estaría termodinámicamente favorecida. De igual manera, los valores encontrados muestran que el proceso de reducción del metal no estaría facilitado por los aminoácidos oxidables presentes en el  $\text{A}\beta$ , con lo cual sería necesaria la intervención de agentes reductores externos.

Para el modelo **4** esta reducción estaría favorecida por muchas de las especies mostradas en la Tabla 6.5, que se encuentran presentes en el medio extracelular, intracelular, o en las mitocondrias participando en la cadena respiratoria asociada al proceso de generación de energía en las neuronas; mientras que para el modelo **5** esta reducción estaría permitida por los pares  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  y  $\text{FAD}/\text{FADH}_2$  mitocondriales. De manera particular, para el modelo **1**, los agentes reductores típicamente presentes en el cerebro no provocarían la reducción de este sistema, lo que descartaría a este modelo como posible participante en las reacciones comúnmente asociadas a la enfermedad de Alzheimer.

Estas evidencias computacionales reafirman al modelo **4** como propuesta de coordinación más probable para el sistema  $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{A}\beta(1-16)$  en solución, y resalta de manera particular la importancia de la coordinación del metal en las propiedades moleculares de los complejos y en su posible participación en las reacciones de oxidación-reducción que tienen lugar en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

### 6.3. CONCLUSIONES

En este capítulo combinamos técnicas de modelado por homología con aproximaciones cuánticas para construir modelos tridimensionales para los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{A}\beta(1-16)$ , partiendo de la hipótesis generalizada de que las tres histidinas están presentes en la esfera de coordinación. Consideramos los modelos que contienen las posibles combinaciones de coordinación de las histidinas 6, 13 y 14, así como los diferentes posibles candidatos que contienen oxígeno como cuarto ligando (Asp1, Glu3,

Asp7, Glu11 y CO<sub>Ala2</sub>), o el grupo N-terminal. Dentro de los 32 modelos que contienen el grupo COO<sup>-</sup>, las estructuras con las energías más bajas corresponden a los modelos [O<sup>E3</sup>, N<sub>δ</sub><sup>H6</sup>, N<sub>ε</sub><sup>H13</sup>, N<sub>ε</sub><sup>H14</sup>] (**1**), [O<sup>E3</sup>, N<sub>δ</sub><sup>H6</sup>, N<sub>δ</sub><sup>H13</sup>, N<sub>δ</sub><sup>H14</sup>] (**2**) y [O<sup>D7</sup>, N<sub>ε</sub><sup>H6</sup>, N<sub>δ</sub><sup>H13</sup>, N<sub>δ</sub><sup>H14</sup>] (**3**), mientras que los modelos más estables que contienen el grupo CO de la Ala2 en la esfera de coordinación y el grupo N-terminal, son el [O<sub>c</sub><sup>A2</sup>, N<sub>ε</sub><sup>H6</sup>, N<sub>δ</sub><sup>H13</sup>, N<sub>ε</sub><sup>H14</sup>] (**4**) y el [N<sub>ter</sub><sup>D1</sup>, N<sub>δ</sub><sup>H6</sup>, N<sub>ε</sub><sup>H13</sup>, N<sub>δ</sub><sup>H14</sup>] (**5**), respectivamente. Una estimación de la estabilidad relativa entre los complejos **1**, **4** y **5**, indican que la preferencia por la coordinación por el primero de ellos puede ser debida principalmente a efectos del solvente, lo cual sugiere que este sería el modo de coordinación más probable en solución acuosa.

Estos modelos ofrecen un marco valioso para la comprensión de los factores que dirigen la interacción entre los cationes de cobre y el Aβ a un nivel molecular, lo cual puede proporcionar información en profundidad para el diseño de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, así como para entender el mecanismo de formación de ROS. Además, nuestros resultados resaltan la relación sinérgica entre los fragmentos peptídicos y metálicos en la definición de la geometría general del complejo, e ilustran que la estabilidad final de los complejos resulta de un balance entre la coordinación del sitio metálico y el plegamiento del amiloide debido a dicha coordinación. Esta sinergia puede dar lugar a diferentes coordinaciones del metal del tipo 3N1O o 4N, que podrían tener un papel relevante en condiciones fisiológicas en los procesos relacionados con el desarrollo de la enfermedad. Finalmente, debe notarse que la aproximación computacional integrada usada en el presente estudio, combinando aproximaciones químico-cuánticas y técnicas de modelado por homología, ha permitido profundizar en un fenómeno fundamental que requiere tanto una exploración conformacional, como la modelización de los efectos electrónicos sutiles. Este estudio ilustra de forma novedosa el potencial de estas aproximaciones en la descodificación de los principales eventos moleculares que involucran procesos de unión a metales.

# 7

## CONCLUSIONES Y OBSERVACIONES GENERALES

En esta tesis doctoral se ha llevado a cabo un estudio teórico sobre la estructura electrónica y molecular de complejos de  $\text{Fe}^{2+/3+}$  y  $\text{Cu}^{1+/2+}$  relevantes en la enfermedad de Alzheimer. Las conclusiones han sido presentadas de forma detallada al final de cada capítulo de resultados. Así pues, en este capítulo se presentarán únicamente las conclusiones más generales sobre los sistemas estudiados y su relación con la bioquímica de la enfermedad de Alzheimer. Asimismo, se realizarán algunas observaciones sobre los aspectos metodológicos considerados en el presente estudio.

En primer lugar podemos destacar que el estudio de la coordinación de los cationes  $\text{Fe}^{2+/3+}$  usando sistemas modelo del péptido A $\beta$  indican que la coordinación simultánea del fragmento His13-His14 y el grupo fenolato de la tirosina 10 es plausible desde un punto de vista termodinámico. Los espectros Raman calculados para los sistemas más estables de  $\text{Fe}^{3+}$  muestran que éstos están en concordancia con los obtenidos experimentalmente, lo cual confirma la coordinación de la tirosina 10, a la vez que no descarta la coordinación de las histidinas, tal y como se había sugerido experimentalmente. Además, los potenciales de reducción calculados para estos sistemas muestran que la coordinación del A $\beta$  al  $\text{Fe}^{3+}$  disminuye el potencial de

reducción del hierro, lo que facilitaría la generación catalítica de peróxido de hidrógeno y la formación de especies radicalarias de oxígeno mediante reacciones tipo Fenton.

Por otra parte, los cálculos de las energías libres de reacción de la sustitución de una molécula de agua del complejo  $[\text{Cu}^{2+}(\text{Im})_3(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  por modelos de ligandos con afinidad por el cobre presentes en el A $\beta$  ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{CH}_3\text{NH}_3^+$ , PhOH o  $\text{CHONH}_2$ ), muestran que los ligandos más probable para ocupar la cuarta posición en la esfera de coordinación son el grupo carboxilo y el grupo N-terminal. Asimismo, el cálculo del  $\text{p}K_a$  de distintos complejos  $\text{Cu}^{2+}(\text{ImH})_m(\text{H}_2\text{O})_{4-m}$  ( $m = 1-3$ ) muestran que la coordinación del cobre genera una disminución en el valor del segundo  $\text{p}K_a$  del anillo imidazólico de entre 2 y 7 unidades, lo que podría estabilizar la forma doblemente desprotonada de este grupo a valores de pH cercanos al fisiológico, dependiendo del entorno químico.

Finalmente, el estudio de sistemas  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ (1-16) muestra que cuando se considera el péptido completo la coordinación del grupo CO de la alanina 2 es más favorable que la coordinación del grupo carboxilato o el grupo N-terminal, siendo este fenómeno debido principalmente a efectos del solvente. Esto estaría de acuerdo con el estudio recientemente publicado por Drew *et al.* mediante técnicas de EPR, en el que se identifica sin ambigüedades al CO de la alanina 2 como cuarto ligando en la esfera de coordinación del  $\text{Cu}^{2+}$ . Por otra parte, la evaluación de estos modelos nos ha permitido determinar que la preferencia por una coordinación u otra es producto de un balance entre la estabilidad del centro metálico y la estabilidad que adquiere la cadena peptídica al asumir esta coordinación. De igual forma, el cálculo del potencial de reducción estándar para los complejos más estables de los tres tipos de coordinación, muestra que el valor encontrado en el modelo que contiene el grupo CO de la alanina 2 en la esfera de coordinación está en buen acuerdo con el obtenido experimentalmente, y permite explicar las reacciones de oxidación-reducción que tienen lugar en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Todos estos resultados confirman la fiabilidad del protocolo diseñado para la construcción de estos modelos.

Desde un punto de vista metodológico, podemos afirmar que el uso de sistemas modelo para el estudio de complejos de metales con péptidos es útil para estudiar las esferas de coordinación de estos sistemas y para explicar algunas propiedades

moleculares de estos complejos, como los potenciales de reducción, los espectros Raman y el  $pK_a$ . El cálculo de estas propiedades requiere un análisis detallado del centro de coordinación del metal y a menudo es un reto, ya que pequeñas modificaciones en la esfera de coordinación puede generar cambios sustanciales en los valores de dichas propiedades. Un caso especial es el de la determinación del  $pK_a$  de los complejos metálicos, ya que variaciones de tan sólo  $\sim 1.3 \text{ kcal mol}^{-1}$  generan un cambio de 1 unidad de  $pK_a$ , lo que está cerca del límite de la exactitud química que brindan los métodos de cálculo de los que se dispone actualmente. Este hecho se agudiza aún más si consideramos que el cálculo de esta propiedad requiere tratar especies iónicas para los cuales los métodos de solvente continuo han mostrado ciertas deficiencias al sobreestabilizar las especies cargadas negativamente. Sin embargo, estas variaciones se mantienen aproximadamente constantes en sistemas químicamente similares, por lo que estos cálculos nos permiten obtener tendencias generales que podrían explicar fenómenos químicos que ocurren en solución acuosa, pero siguen siendo altamente dependientes del microentorno que genera el sistema peptídico.

Las limitaciones derivadas del uso de sistemas modelo pueden superarse mediante la consideración de sistemas más realistas, ya que éstos permiten describir los modos de coordinación, pero considerando, además, los efectos de la cadena peptídica, lo cual permite estimar valores de las propiedades moleculares del sistema completo. Este hecho se ha visto claramente reflejado en el caso del sistema  $\text{Cu}^{2+}$ -A $\beta$ (1-16), en el que la influencia del entorno peptídico resultó ser de alta relevancia para definir la estabilidad global del complejo. La metodología propuesta para construir los modelos tridimensionales de estos complejos constituye una estrategia novedosa que ha resultado ser muy útil para interpretar la información experimental.

Desde el punto de vista de la bioquímica de la enfermedad de Alzheimer, observamos que las propiedades moleculares calculadas de los complejos de  $\text{Cu}^{1+/2+}$  y  $\text{Fe}^{2+/3+}$  con el A $\beta$ , están directamente relacionadas con las dos principales marcas neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer (a saber, la formación de placas cerebrales y la producción de especies radicalarias de oxígeno). En este respecto, los resultados muestran claramente que los metales considerados en esta tesis tienen un papel relevante en la química redox que se lleva a cabo en el medio cerebral, y que

podrían desencadenar procesos tóxicos a nivel celular. La enorme cantidad de información disponible actualmente sobre la química de la enfermedad de Alzheimer da cuenta de la relevancia y complejidad que ésta conlleva, siendo además altamente sensible a los cambios en las condiciones cerebrales. En este sentido, cabría pensar que los dos procesos biológicos de mayor relevancia en el desarrollo de esta enfermedad se deban a dos eventos moleculares distintos que implican modos de coordinación diferentes entre los metales y el amiloide, o una interconversión entre ellos. En este sentido, la química computacional tiene mucho que aportar detallando los eventos moleculares que ocurren y proporcionando información respecto al comportamiento electrónico de estas especies. Esta tesis pretende ser una contribución a este propósito.

## REFERENCIAS

- (1) Berchtold, N. C.; Cotman, C. W. *Neurobiology of Aging* **1998**, *19*, 173-189.
- (2) Halpert, B. P. *Minn. Med.* **1983**, *66*, 421-424.
- (3) Jameson, T. *Essays on the Changes of the Human Body and its Different Ages*; J. G. Bernard: London, **1811**.
- (4) McGrew, R. E. *Encyclopedia of Medical History Roderick*; E. McGrew: USA, **1985**.
- (5) Torack, R. *The early history of senile dementia*; The Free Press: New York, **1983**.
- (6) Mahendra, B. *Dementia, a Survey of the Syndrome of Dementia.*; MTP Press Limited: Lancaster, England, **1987**.
- (7) Hunter, R. M., I. *Three Hundred Years of Psychiatry (1535–1860): A history presented in selected English texts*; Carlisle Publishing: New York, **1982**.
- (8) Bielschowsky, M. *Neurol. Centralbl* **1903**, *22*, 997–1006.
- (9) Goedert, M.; Spillantini, M. G. *Science* **2006**, *314*, 777-781.
- (10) *Alzheimer's Association, Alzheimer's Disease Facts and Figures*; Alzheimer's & Dementia: USA, **2010**.
- (11) Fillit, H. M. R., Lorenzo M. *J. Mol. Neurosci.* **2002**, *19*, 96.
- (12) Leslie, R. A. *Neurosciences* **2002**, *25*, 232-233.
- (13) Torreilles, F.; Touchon, J. *Prog. neurobiol.* **2002**, *66*, 191-203.
- (14) Bush, A. I. *Neurosciences* **2003**, *26*, 207-214.
- (15) Braak, H.; Braak, E. *Acta neuropathologica* **1991**, *82*, 239-259.
- (16) Arriagada, P. V.; Growdon, J. H.; Hedley-Whyte, E. T.; Hyman, B. T. *Neurology* **1992**, *42*, 631-639.
- (17) De Ferrari, G. V.; Inestrosa, N. C. *Brain res. rev.* **2000**, *33*, 1-12.
- (18) Alonso, A. D.; Grundke-Iqbal, I.; Barra, H. S.; Iqbal, K. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 298-303.
- (19) Gupta, V. B.; Anitha, S.; Hegde, M. L.; Zecca, L.; Garruto, R. M.; Ravid, R.; Shankar, S. K.; Stein, R.; Shanmugavelu, P.; Rao, K. S. J. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2005**, *62*, 143-158.
- (20) Brandt, R. *Cell & Tissue Research* **2001**, *305*, 255-265.
- (21) Hardy, J.; Selkoe, D. J. *Science* **2002**, *297*, 353-356.
- (22) Martin, G. M. *Exp. Geront.* **2000**, *35*, 439-443.
- (23) Kang, J.; Lemaire, H. G.; Unterbeck, A.; Salbaum, J. M.; Masters, C. L.; Grzeschik, K. H.; Multhaup, G.; Beyreuther, K.; Moeller-Hill, B. *Nature* **1987**, *325*, 733-736.
- (24) White, A. R.; Reyes, R.; Mercer, J. F. B.; Camakaris, J.; Zheng, H.; Bush, A. I.; Multhaup, G.; Beyreuther, K.; Masters, C. L.; Cappai, R. *Brain Res.* **1999**, *842*, 439-444.

- (25) Sandbrink, R.; Masters, C. L.; Beyreuther, K. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 14227-14234.
- (26) Gaggelli, E.; Kozlowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1995-2044.
- (27) Donnelly, P. S.; Xiao, Z.; Wedd, A. G. *Current Opinion in Chemical Biology* **2007**, *11*, 128-133.
- (28) Suzuki, N.; Cheung, T. T.; Cai, X.-D.; Odaka, A.; Otvos, L., Jr.; Eckman, C.; Golde, T. E.; Younkin, S. G. *Science* **1994**, *264*, 1336-40.
- (29) Atwood, C. S.; Moir, R. D.; Huang, X.; Scarpa, R. C.; Bacarra, N. M. E.; Romano, D. M.; Hartshorn, M. A.; Tanzi, R. E.; Bush, A. I. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 12817-12826.
- (30) Bush, A. I.; Pettingell, W. H.; Multhaup, G.; Paradis, M. d.; Vonsattel, J.-P.; Gusella, J. F.; Beyreuther, K.; Masters, C. L.; Tanzi, R. E. *Science* **1994**, *265*, 1464-7.
- (31) Barnham, K. J.; Masters, C. L.; Bush, A. I. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 205-214.
- (32) Opazo, C.; Huang, X.; Cherny, R. A.; Moir, R. D.; Roher, A. E.; White, A. R.; Cappai, R.; Masters, C. L.; Tanzi, R. E.; Inestrosa, N. C.; Bush, A. I. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40302-40308.
- (33) Huang, X.; Cuajungco, M. P.; Atwood, C. S.; Hartshorn, M. A.; Tyndall, J. D. A.; Hanson, G. R.; Stokes, K. C.; Leopold, M.; Multhaup, G.; Goldstein, L. E.; Scarpa, R. C.; Saunders, A. J.; Lim, J.; Moir, R. D.; Glahe, C.; Bowden, E. F.; Masters, C. L.; Fairlie, D. P.; Tanzi, R. E.; Bush, A. I. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 37111-37116.
- (34) Barnham, K. J.; Haeffner, F.; Ciccotosto, G. D.; Curtain, C. C.; Tew, D.; Mavros, C.; Beyreuther, K.; Carrington, D.; Masters, C. L.; Cherny, R. A.; Cappai, R.; Bush, A. I. *FASEB J.* **2004**, *18*, 1427-1429, 10.1096/fj.04-1890fje.
- (35) Dong, J.; Atwood, C. S.; Anderson, V. E.; Siedlak, S. L.; Smith, M. A.; Perry, G.; Carey, P. R. *Biochemistry* **2003**, *42*, 2768-2773.
- (36) Rottkamp, C. A.; Raina, A. K.; Zhu, X.; Gaier, E.; Bush, A. I.; Atwood, C. S.; Chevion, M.; Perry, G.; Smith, M. A. *Free Radical Biology & Medicine* **2001**, *30*, 447-450.
- (37) Behl, C.; Davis, J. B.; Lesley, R.; Schubert, D. *Cell* **1994**, *77*, 817-827.
- (38) Smith, M. A.; Perry, G.; Richey, P. L.; Sayre, L. M.; Anderson, V. E.; Beal, M. F.; Kowall, N. *Nature* **1996**, *382*, 120-121.
- (39) Nunomura, A.; Perry, G.; Pappolla, M. A.; Wade, R.; Hirai, K.; Chiba, S.; Smith, M. A. *Journal of Neuroscience* **1999**, *19*, 1959-1964.
- (40) Liu, G.; Men, P.; Perry, G.; Smith, M. A. *Free Radicals and Antioxidant Protocols, Second Edition*, 123-144.
- (41) Folk, D. S.; Franz, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4994-4995.
- (42) Rodriguez-Rodriguez, C.; de Groot, N. S.; Rimola, A.; Alvarez-Larena, A.; Lloveras, V.; Vidal-Gancedo, J.; Ventura, S.; Vendrell, J.; Sodupe, M.; Gonzalez-Duarte, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1436-1451.
- (43) Scott, L. E.; Orvig, C. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4885-4910.
- (44) Hindo, S. S.; Mancino, A. M.; Braymer, J. J.; Liu, Y. H.; Vivekanandan, S.; Ramamoorthy, A.; Lim, M. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16663-16665.

- 
- (45) Wu, W. H.; Lei, P.; Liu, Q.; Hu, J.; Gunn, A. P.; Chen, M. S.; Rui, Y. F.; Su, X. Y.; Xie, Z. P.; Zhao, Y. F.; Bush, A. I.; Li, Y. M. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 31657-31664.
- (46) Hureau, C.; Saaki, I.; Gras, E.; Faller, P. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 950 - 953.
- (47) Rodríguez-Rodríguez, C.; Rimola, A.; Alí-Torres, J.; Sodupe, M.; Gonzalez-Duarte, P. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **2011**, *25*, 21-30.
- (48) Curtain, C. C.; Ali, F.; Volitakis, I.; Cherny, R. A.; Norton, R. S.; Beyreuther, K.; Barrow, C. J.; Masters, C. L.; Bush, A. I.; Barnham, K. J. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20466-20473.
- (49) Syme, C. D.; Nadal, R. C.; Rigby, S. E. J.; Viles, J. H. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 18169-18177.
- (50) Karr, J. W.; Akintoye, H.; Kaupp, L. J.; Szalai, V. A. *Biochemistry* **2005**, *44*, 5478-5487.
- (51) Guilloreau, L.; Damian, L.; Coppel, Y.; Mazarguil, H.; Winterhalter, M.; Faller, P. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 1024-1038.
- (52) Streltsov, V. *Eur. Biophys. J. Biophys.* **2008**, *37*, 257-263.
- (53) Streltsov, V. A.; Titmuss, S. J.; Epa, V. C.; Barnham, K. J.; Masters, C. L.; Varghese, J. N. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 3447-3456.
- (54) Drew, S. C.; Noble, C. J.; Masters, C. L.; Hanson, G. R.; Barnham, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1195-1207.
- (55) Drew, S. C.; Masters, C. L.; Barnham, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8760-8761.
- (56) Hureau, C.; Coppel, Y.; Dorlet, P.; Solari, P. L.; Sayen, S.; Guillon, E.; Sabater, L.; Faller, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9522-9525.
- (57) Rickard, G. A.; Gomez-Balderas, R.; Brunelle, P.; Raffa, D. F.; Rauk, A. *Journal of Physical Chemistry A* **2005**, *109*, 8361-8370.
- (58) Hewitt, N.; Rauk, A. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 1202-1209.
- (59) Mantri, Y.; Fioroni, M.; Baik, M. H. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 1197-1204.
- (60) Raffa, D. F.; Rauk, A. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 3789-3799.
- (61) Minicozzi, V.; Morante, S.; Rossi, G. C.; Stellato, F.; Christian, N.; Jansen, K. *Int. J. Quantum Chem.* **2008**, *108*, 1992-2015.
- (62) Ali-Torres, J.; Rodriguez-Santiago, L.; Sodupe, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 7852-7861.
- (63) Barnham, K. J.; Haeffner, F.; Ciccotosto, G. D.; Curtain, C. C.; Tew, D.; Mavros, C.; Beyreuther, K.; Carrington, D.; Masters, C. L.; Cherny, R. A.; Cappai, R.; Bush, A. I. *FASEB J.* **2004**, *18*, 1427-1429.
- (64) Parthasarathy, S.; Long, F.; Miller, Y.; Xiao, Y.; McElheny, D.; Thurber, K.; Ma, B.; Nussinov, R.; Ishii, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3390-3400.
- (65) Gomez-Balderas, R.; Raffa, D. F.; Rickard, G. A.; Brunelle, P.; Rauk, A. *Journal of Physical Chemistry A* **2005**, *109*, 5498-5508.
- (66) Pushie, M. J.; Rauk, A. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8*, 53-65.
- (67) Franzini, E.; De Gioia, L.; Fantucci, P.; Zampella, G.; Bonacic-Koutecky, V. *Inorg. Chem. Commun.* **2003**, *6*, 650-653.
- (68) Cox, D. L.; Pan, J. P.; Singh, R. R. P. *Biophys. J.* **2006**, *91*, L11-L13.
- (69) Carloni, P.; Blochl, P. E.; Parrinello, M. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 1338-1348.

- (70) Youdim, M. B. H.; Benschachar, D.; Riederer, P. *European Neurology* **1991**, *31*, 34-40.
- (71) Youdim, M. B. H. *Nutrition* **2000**, *16*, 504-508.
- (72) Lovell, M. A.; Robertson, J. D.; Teesdale, W. J.; Campbell, J. L.; Markesbery, W. R. *J. Neurol. Sci.* **1998**, *158*, 47-52.
- (73) Miura, T.; Suzuki, K.; Takeuchi, H. *J. Mol. Struct.* **2001**, *598*, 79-84.
- (74) Miura, T.; Suzuki, K.; Kohata, N.; Takeuchi, H. *Biochemistry* **2000**, *39*, 7024-7031.
- (75) Nakamura, M.; Shishido, N.; Nunomura, A.; Smith, M. A.; Perry, G.; Hayashi, Y.; Nakayama, K.; Hayashi, T. *Biochemistry* **2007**, *46*, 12737-12743.
- (76) Wondimagegn, T.; Rauk, A. *Journal of Physical Chemistry B*, *115*, 569-579.
- (77) Pramanik, D.; Dey, S. G. *Journal of the American Chemical Society*, *133*, 81-87.
- (78) Atamna, H.; Frey, W. H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 11153-11158.
- (79) Jiang, D. L.; Li, X. J.; Williams, R.; Patel, S.; Men, L. J.; Wang, Y. S.; Zhou, F. M. *Biochemistry* **2009**, *48*, 7939-7947.
- (80) Hartree, D. R. *Proc. Cambridge Philos. Soc.* **1928**, *24*, 89-110.
- (81) Roothaan, C. C. J. *Rev. Mod. Phys.* **1951**, *23*, 69-89.
- (82) Hall, G. G. *Proc. R. Soc. Lon. Ser-A* **1951**, *205*, 541-552.
- (83) Jensen, F. *Introduction to computational chemistry*; 1st ed.; John Wiley & Sons: Chichester, England, **2004**.
- (84) Moller, C.; Plesset, M. S. *Phys. Rev.* **1934**, *46*, 618-622.
- (85) Krishnan, R.; Pople, J. A. *Int. J. Quantum Chem.* **1978**, *14*, 91-100.
- (86) Hoffmann, M. R.; Schaefer, H. F., III *Adv. Quantum Chem.* **1986**, *18*, 207-79.
- (87) Raghavachari, K.; Trucks, G. W.; Pople, J. A.; Head-Gordon, M. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *157*, 479-83.
- (88) Raghavachari, K.; Anderson, J. B. *J. Phys. Chem. A* **1996**, *100*, 12960-12973.
- (89) Freed, K. F. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1971**, *22*, 313-346.
- (90) Bartlett, R. J. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1981**, *32*, 359-401.
- (91) Scuseria, G. E.; Schaefer, H. F. *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 3700-3703.
- (92) Raghavachari, K.; Trucks, G. W.; Pople, J. A.; Headgordon, M. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *157*, 479-483.
- (93) Parr, R. G. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1983**, *34*, 631-56.
- (94) Parr, R. G.; Yang, W. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1995**, *46*, 701-728.
- (95) Ziegler, T. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 651-667.
- (96) Gonze, X. *Phys. Rev. A: At., Mol., Opt. Phys* **1995**, *52*, 1096-1114.
- (97) Kohn, W.; Becke, A. D.; Parr, R. G. *J. Phys. Chem. A* **1996**, *100*, 12974-12980.
- (98) Baerends, E. J.; Gritsenko, O. V. *J. Phys. Chem.* **1997**, *101*, 5383-5403.
- (99) Chermette, H. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *178-180*, 699-721.
- (100) Siegbahn, P. E. M.; Blomberg, M. R. A. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1999**, *50*, 221-249.
- (101) Geerlings, P.; De Proft, F.; Langenaeker, W. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1793-1873.
- (102) Burke, K.; Werschnik, J.; Gross, E. K. U. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 62206.
- (103) Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 10439-10452.
- (104) Kohn, W.; Sham, L. J. *Physical Review* **1965**, *140*, 1133-1138.
- (105) Dirac, P. A. M. *Proc. Cambridge Philos. Soc.* **1930**, *26*, 376.

- 
- (106) Fermi, E. *Atti Accad. Naz. Lincei, Cl. Sci. Fis., Mat. Nat., Rend.* **1927**, *6*, 602-607.
- (107) Thomas, L. H. *Proc. Cambridge Philos. Soc.* **1927**, *23*, 542-548.
- (108) Vosko, S. H.; Wilk, L.; Nusair, M. *Can. J. Phys.* **1980**, *58*, 1200-1211.
- (109) Slater, J. C. *Phys. Rev.* **1951**, *81*, 385-390.
- (110) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1986**, *84*, 4524-4529.
- (111) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 2155-2160.
- (112) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 9173-9177.
- (113) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652.
- (114) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1996**, *104*, 1040-1046.
- (115) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 8554-8560.
- (116) Becke, A. D. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098-3100.
- (117) Levy, M.; Perdew, J. P. *J. Chem. Phys.* **1986**, *84*, 4519-4523.
- (118) Adamo, C.; Barone, V. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 664-675.
- (119) Handy, N. C.; Cohen, A. J. *Mol. Phys.* **2001**, *99*, 403-412.
- (120) Xu, X.; Goddard, W. A., III *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 2673-2677.
- (121) Kurth, S.; Perdew, J. P.; Blaha, P. *Int. J. Quantum Chem.* **1999**, *75*, 889-909.
- (122) Wang, Y.; Perdew, J. P. *Phys. Rev. B* **1991**, *43*, 8911-8916.
- (123) Perdew, J. P.; Levy, M. *Phys. Rev. B: Condens. Matter* **1985**, *31*, 6264-6272.
- (124) Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3865-3868.
- (125) Adamo, C.; Barone, V. *J. Chem. Phys.* **2002**, *116*, 5933-5940.
- (126) Van Voorhis, T.; Scuseria, G. E. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 400-410.
- (127) Krieger, J. B.; Chen, J.; Iafrate, G. J.; Savin, A. *Electron Correl. Mater. Prop.* **1999**, 463-477.
- (128) Tao, J.; Perdew, J. P.; Staroverov, V. N.; Scuseria, G. E. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *91*, 146401/1-146401/4.
- (129) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 1372-1377.
- (130) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B: Condens. Matter and Mat. Phys.* **1988**, *37*, 785-789.
- (131) Georgieva, I.; Trendafilova, N.; Rodriguez-Santiago, L.; Sodupe, M. *Journal of Physical Chemistry A* **2005**, *109*, 5668-5676.
- (132) Poater, J.; Sola, M.; Rimola, A.; Rodriguez-Santiago, L.; Sodupe, M. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 6072-6078.
- (133) Rimola, A.; Constantino, E.; Rodriguez-Santiago, L.; Sodupe, M. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 3444-3453.
- (134) Rimola, A.; Rodriguez-Santiago, L.; Sodupe, M. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 24189-24199.
- (135) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-52.
- (136) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-9.
- (137) Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623-11627.
- (138) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Journal of Physical Chemistry A* **2004**, *108*, 6908-6918.
- (139) Raghavachari, K.; Trucks, G. W.; Pople, J. A.; Head-Gordon, M. *Chemical Physics Letters* **1989**, *157*, 479-83.
- (140) Orozco, M.; Luque, F. J. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4187-4225.

- (141) Miertus, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. *Chem. Phys.* **1981**, *55*, 117-129.
- (142) Klamt, A.; Schuurmann, G. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **1993**, 799-805.
- (143) Barone, V.; Cossi, M. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1995-2001.
- (144) Cancès, E.; Mennucci, B.; Tomasi, J. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3032-3041.
- (145) Mennucci, B.; Tomasi, J. *J. Chem. Phys.* **1997**, *106*, 5151-5158.
- (146) Cancès, E.; Mennucci, B. *J. Math. Chem.* **1998**, *23*, 309-326.
- (147) Frediani, L.; Cammi, R.; Corni, S.; Tomasi, J. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 3893-3907.
- (148) Gao, J. *Rev. Comput. Chem.* **1996**, *7*, 119-185.
- (149) Antes, I.; Thiel, W. *ACS Symp. Ser.* **1998**, *712*, 50-65.
- (150) Bentzien, J.; Florian, J.; Glennon, T. M.; Warshel, A. *ACS Symp. Ser.* **1998**, *712*, 16-34.
- (151) Merz, K. M., Jr. *ACS Symp. Ser.* **1998**, *712*, 2-15.
- (152) Mordasini, T.; Thiel, W. *Chimia* **1998**, *52*, 288-291.
- (153) Hillier, I. H. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **1999**, *463*, 45-52.
- (154) Lyne, P. D.; Hodoscek, M.; Karplus, M. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 3462-3471.
- (155) Woo, T. K.; Margl, P. M.; Deng, L.; Cavallo, L.; Ziegler, T. *Catal. Today* **1999**, *50*, 479-500.
- (156) Gao, J.; Truhlar Donald, G. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2002**, *53*, 467-505.
- (157) Morokuma, K. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. A* **2002**, *360*, 1149-1164.
- (158) Lin, H.; Truhlar, D. G. *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *117*, 185-199.
- (159) Svensson, M.; Humbel, S.; Froese, R. D. J.; Matsubara, T.; Sieber, S.; Morokuma, K. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 19357-19363.
- (160) Vreven, T.; Morokuma, K. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1419-1432.
- (161) Maseras, F.; Morokuma, K. *J. Comput. Chem.* **1995**, *16*, 1170-1179.
- (162) Kerdcharoen, T.; Morokuma, K. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *355*, 257-262.
- (163) Ferre, N.; Assfeld, X.; Rivail, J.-L. *J. Comput. Chem.* **2002**, *23*, 610-624.
- (164) Monard, G.; Loos, M.; Thery, V.; Baka, K.; Rivail, J.-L. *Int. J. Quantum Chem.* **1996**, *58*, 153-159.
- (165) Gao, J.; Amara, P.; Alhambra, C.; Field, M. J. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 4714-4721.
- (166) Amara, P.; Field, M. J.; Alhambra, C.; Gao, J. *Theor. Chem. Acc.* **2000**, *104*, 336-343.
- (167) <http://www.pdb.org/pdb/statistics/holdings.do>, **2011**.
- (168) Uniprot; Consortium *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, D142-148.
- (169) Bajorath, J.; Aruffo, A. *Bioconjug Chem* **1994**, *5*, 173-181.
- (170) Blundell, T. L.; Sibanda, B. L.; Sternberg, M. J.; Thornton, J. M. *Nature* **1987**, *326*, 347-352.
- (171) Johnson, M. S.; Srinivasan, N.; Sowdhamini, R.; Blundell, T. L. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1994**, *29*, 1-68.
- (172) Sali, A. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, *6*, 437-451.
- (173) Sanchez, R.; Sali, A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 206-214.
- (174) Chothia, C.; Lesk, A. M. *EMBO J.* **1986**, *5*, 823-826.

- 
- (175) Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 195-201.
- (176) Kiefer, F.; Arnold, K.; Kuenzli, M.; Bordoli, L.; Schwede, T. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D387-D392.
- (177) Peitsch, M. C. *Bio/Technology* **1995**, *13*, 658-660.
- (178) Sutcliffe, M. J.; Haneef, I.; Carney, D.; Blundell, T. L. *Protein Eng.* **1987**, *1*, 377-384.
- (179) Sutcliffe, M. J.; Hayes, F. R. F.; Blundell, T. L. *Protein Eng.* **1987**, *1*, 385-392.
- (180) Bates, P. A.; Kelley, L. A.; MacCallum, R. M.; Sternberg, M. J. *Proteins* **2001**, *Suppl 5*, 39-46.
- (181) Sali, A.; Blundell, T. L. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 779-815.
- (182) Havel, T. F.; Snow, M. E. *J. Mol. Biol.* **1991**, *217*, 1-7.
- (183) Sali, A.; Overington, J. P.; Johnson, M. S.; Blundell, T. L. *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15*, 235-240.
- (184) Snow, M. E. *Proteins* **1993**, *15*, 183-190.
- (185) Brocklehurst, S. M.; Perham, R. N. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 626-639.
- (186) Srinivasan, S.; March, C. J.; Sudarsanam, S. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 277-89.
- (187) Sali, A.; Overington, J. P. *Protein Sci* **1994**, *3*, 1582-1596.
- (188) Mackerell, A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Nguyen, D. T.; Ngo, T.; Prodhom, B.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J.; Stote, R.; Straub, J.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Karplus, M. *FASEB J.* **1992**, *6*, A143-A143.
- (189) Raffa, D. F.; Gomez-Balderas, R.; Brunelle, P.; Rickard, G. A.; Rauk, A. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 887-902.
- (190) Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. *Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 11623-7.
- (191) Scott, A. P.; Radom, L. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 16502-16513.
- (192) Guthrie, J. P. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 8495-8499.
- (193) Liao, M.-S.; Watts, J. D.; Huang, M.-J. *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1577-1592.
- (194) Wondimagegn, T.; Rauk, A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 569-579.
- (195) Barone, V.; Cossi, M.; Tomasi, J. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3210-3221.
- (196) Camaioni, D. M.; Schwerdtfeger, C. A. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 10795-10797.
- (197) Tissandier, M. D.; Cowen, K. A.; Feng, W. Y.; Gundlach, E.; Cohen, M. H.; Earhart, A. D.; Coe, J. V.; Tuttle, T. R., Jr. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 9308.
- (198) Ho, J.; Coote, M. *Theoretical Chemistry Accounts* **2010**, *125*, 3-21.
- (199) Tissandier, M. D.; Cowen, K. A.; Feng, W. Y.; Gundlach, E.; Cohen, M. H.; Earhart, A. D.; Coe, J. V.; Tuttle, T. R. *The Journal of Physical Chemistry A* **1998**, *102*, 7787-7794.
- (200) Bryantsev, V. S.; Diallo, M. S.; Goddard III, W. A. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112*, 9709-9719.
- (201) Pliego, J. R. *Chemical Physics Letters* **2003**, *367*, 145-149.
- (202) Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry*; John Wiley & Sons., **2002**.

- (203)  $99.9 \text{ kcal mol}^{-1}$  es el cambio de energía libre de la semirreacción,  $\frac{1}{2}\text{H}_{2(\text{g})} \rightarrow \text{H}_{(\text{aq})}^{+} + \text{e}^{-}$ . Esta puede ser obtenida sumando  $\Delta_{\text{f}}G^{\circ}_{(\text{g})}(\text{H}^{+}) = 362.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $\Delta G_{\text{solv}}(\text{H}^{+}) = -265.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ , y el factor de conversión del estado de referencia  $\text{H}_{(\text{aq})}^{+}$  a 1M,  $1.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Adicionalmente,  $\Delta_{\text{f}}G^{\circ}_{(\text{g})}(\text{H}^{+}) = 362.6 \text{ kcal mol}^{-1}$  se calcula como  $\Delta_{\text{f}}G^{\circ}_{(\text{g})}(\text{H}) = 48.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  más  $\Delta_{\text{f}}G^{\circ}_{(\text{g})}(\text{H}^{+} + \text{e}^{-}) = 314.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ .
- (204) Frisch, M. T., G.; Schlegel, H.; Scuseria, G.; Robb, M.; Cheeseman, J.; Montgomery, J.; Vreven, T.; Kudin, K.; Burant, J.; Millam, J.; Iyengar, S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J.; Hratchian, H.; Cross, J.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.; Yazyev, O.; Austin, A.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.; Ayala, P.; Morokuma, K.; Voth, G.; Salvador, P.; Dannenberg, J.; Zakrzewski, V.; Dapprich, S.; Daniels, A.; Strain, M.; Farkas, O.; Malick, D.; Rabuck, A.; Raghavachari, K.; Foresman, J.; Ortiz, J.; Cui, Q.; Baboul, A.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R.; Fox, D.; Keith, T.; Al-Laham, M.; Peng, C.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M.; Gonzalez, C.; Pople, J. In *Gaussian 03*; revision D.01 ed.; Wallingford, C., Ed., 2004.
- (205) Frisch, M. J. T., G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R. E.; Stratmann, O.; Yazyev, A. J.; Austin, R.; Cammi, C.; Pomelli, J. W.; Ochterski, R.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. In *Gaussian 09, revision A.02*; Gaussian, I., Ed. Wallingford, CT., 2009.
- (206) Benn, M. H.; Rauk, A.; Swaddle, T., To be published.
- (207) Hatcher, L. Q.; Hong, L.; Bush, W. D.; Carducci, T.; Simon, J. D. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 8160-8164.
- (208) Faller, P.; Hureau, C. *Dalton Trans.* **2009**, 1080-1094.
- (209) Atwood, C. S.; Scarpa, R. C.; Huang, X.; Moir, R. D.; Jones, W. D.; Fairlie, D. P.; Tanzi, R. E.; Bush, A. I. *J. Neurochem.* **2000**, *75*, 1219-1233.
- (210) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications.*; New York, **2001**.
- (211) Rauk, A. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2698-2715.
- (212) Shin, B. K.; Saxena, S. *Biochemistry* **2008**, *47*, 9117-9123.

- 
- (213) Hay, P. J. *J. Chem. Phys.* **1977**, *66*, 4377-4384.
- (214) Wachters, A. J. H. *J. Chem. Phys.* **1970**, *52*, 1033-6.
- (215) Wachters, A. J. H. *J. Chem. Phys.* **1970**, *52*, 1033-1037.
- (216) Calculated as the difference between  $\Delta fG(g)(H_2O)$  and  $\Delta fG(l)(H_2O)$ .
- (217) Weinhold, F.; Carpenter, J. E. *The Structure of Small Molecules and Ions*; Plenum: New York, **1988**.
- (218) Katz, A. K.; Shimoni-Livny, L.; Navon, O.; Navon, N.; Bock, C. W.; Glusker, J. P. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 1320-1338.
- (219) Karr, J. W.; Kaupp, L. J.; Szalai, V. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13534-13538.
- (220) Lippert, B. *Chem. Biodivers.* **2008**, *5*, 1455-1474.
- (221) Rios-Font, R.; Bertran, J.; Rodriguez-Santiago, L.; Sodupe, M. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 5767-5772.
- (222) Brandi-Blanco, P.; Miguel, P. J. S.; Muller, B.; Bardaji, E. G.; Willermann, M.; Lippert, B. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 5208-5215.
- (223) Martin, R. B.; Edsall, J. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 1107-1111.
- (224) Boggess, R. K.; Martin, R. B. *Inorganic Chemistry* **1974**, *13*, 1525-1527.
- (225) Sundberg, R. J.; Martin, R. B. *Chemical Reviews* **1974**, *74*, 471-517.
- (226) Martin, R. B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1974**, *71*, 4346-4347.
- (227) Hung, Y. H.; Bush, A. I.; Cherny, R. A. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 61-76.
- (228) Rauk, A. *Dalton Transactions* **2008**, 1273-1282.
- (229) Rauk, A. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2698-2715.
- (230) Babcock, G. T.; Wikstrom, M. *Nature* **1992**, *356*, 301-9.
- (231) Ferguson-Miller, S.; Babcock, G. T. *Chemical Reviews* **1996**, *96*, 2889-2907.
- (232) Gennis, R. B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 12747-9.
- (233) Michel, H.; Behr, J.; Harrenga, A.; Kannt, A. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 329-356.
- (234) Wikstrom, M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 480-488.
- (235) Wikstrom, M. K. F. *Nature* **1977**, *266*, 271-273.
- (236) Belevich, I.; Verkhovskiy, M. I.; Wikstroem, M. *Nature* **2006**, *440*, 829-832.
- (237) Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M. *Journal of Computational Chemistry* **2006**, *27*, 1373-1384.
- (238) Fadda, E.; Yu, C.-H.; Pomès, R. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2008**, *1777*, 277-284.
- (239) Fee, J. A.; Case, D. A.; Noodleman, L. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 15002-15021.
- (240) Hosler, J. P.; Ferguson-Miller, S.; Mills, D. A. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 165-187.
- (241) Kaila, V. R. I.; Johansson, M. P.; Sundholm, D.; Laakkonen, L.; Wikström, M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2009**, *1787*, 221-233.
- (242) Popovic, D. M.; Stuchebrukhov, A. A. *FEBS Lett.* **2004**, *566*, 126-130.
- (243) Popovic, D. M.; Stuchebrukhov, A. A. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 1858-1871.
- (244) Sharpe, M. A.; Ferguson-Miller, S. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2008**, *40*, 541-549.

- (245) Olsson, M. H. M.; Warshel, A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 6500-6505.
- (246) Popovic, D. M.; Stuchebrukhov, A. A. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2006**, *5*, 611-620.
- (247) Cleland, W. W.; Frey, P. A.; Gerlt, J. A. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 25529-25532.
- (248) Walba, H.; Isensee, R. W. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, *77*, 5488-5492.
- (249) Yagil, G. *Tetrahedron* **1967**, *23*, 2855-2861.
- (250) Quenneville, J.; Popovic, D. M.; Stuchebrukhov, A. A. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*, 18383-18389.
- (251) Ding, F.; Smith, J. M.; Wang, H. *Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74*, 2679-2691.
- (252) Fu, Y.; Liu, L.; Li, R.-Q.; Liu, R.; Guo, Q.-X. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *126*, 814-822.
- (253) Kelly, C. P.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *Journal of Physical Chemistry A* **2006**, *110*, 2493-2499.
- (254) Pliego, J. R., Jr.; Riveros, J. M. *Journal of Physical Chemistry A* **2002**, *106*, 7434-7439.
- (255) Wang, X.-x.; Fu, H.; Du, D.-m.; Zhou, Z.-y.; Zhang, A.-g.; Su, C.-f.; Ma, K.-s. *Chemical Physics Letters* **2008**, *460*, 339-342.
- (256) Pliego, J. R., Jr.; Riveros, J. M. *Journal of Physical Chemistry A* **2001**, *105*, 7241-7247.
- (257) Rios-Font, R.; Sodupe, M.; Rodriguez-Santiago, L.; Taylor, P. R. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 10857-10863.
- (258) Hay, P. J. *J. Chem. Phys.* **1977**, *66*, 4377-4384.
- (259) Raghavachari, K.; Trucks, G. W. *The Journal of Chemical Physics* **1989**, *91*, 1062-1065.
- (260) McQuarrie, D. *Statistical Mechanics*; Harper and Row: New York, **1986**.
- (261) Brown, T. N.; Mora-Diez, N. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 9270-9279.
- (262) Mujika, J. I. a.; Mercero, J. M.; Lopez, X. *The Journal of Physical Chemistry A* **2003**, *107*, 6099-6107.
- (263) Mujika, J. I.; Ugalde, J. M.; Lopez, X. *Theor. Chem. Acc.* **2011**, *128*, 477-484.
- (264) Reed, A. E.; Curtiss, L. A.; Weinhold, F. *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 899-926.
- (265) Lide, D. In *CRC Handbook of chemistry and physics.*; CRC, B. R., Ed., 2009.
- (266) Rios-Font, R.; Sodupe, M.; Rodriguez-Santiago, L.; Taylor, P. R. *The Journal of Physical Chemistry A* **2010**, *114*, 10857-10863.
- (267) Gergely, A.; Sovago, I. *Inorganica Chimica Acta* **1976**, *20*, 19-25.
- (268) Sovago, I.; Kiss, T.; Gergely, A. *Dalton Transactions* **1978**, 964-968.
- (269) Hou, L. M.; Zagorski, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9260-9261.
- (270) Marti-Renom, M. A.; Stuart, A. C.; Fiser, A.; Sanchez, R.; Melo, F.; Sali, A. *Annu. Rev. Bioph. Biom.* **2000**, *29*, 291-325.
- (271) Zirah, S.; Kozin, S. A.; Mazur, A. K.; Blond, A.; Cheminant, M.; Segalas-Milazzo, I.; Debey, P.; Rebuffat, S. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 2151-2161.

- 
- (272) Andrej Šali, B. W.; Madhusudhan, M. S.; Shen, M. Y.; MA, M.-R.; Narayanan Eswar, F. A.; Topf, M.; Oliva, B.; Fiser, A.; Roberto Sánchez, B. Y.; Badretdinov, A.; Francisco Melo, J. P. O.; Feyfant, E. *MODELLER A Program for Protein Structure Modeling 9v5* **2007**.
- (273) Kelley, L. A.; Gardner, S. P.; Sutcliffe, M. J. *Protein Eng.* **1996**, *9*, 1063-1065.
- (274) Shen, M. Y.; Sali, A. *Prot. Sci.* **2006**, *15*, 2507-2524.
- (275) Rappe, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard, W. A.; Skiff, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10024-10035.
- (276) Garcia, J. I.; Jimenez-Oses, G.; Martinez-Merino, V.; Mayoral, J. A.; Pires, E.; Villalba, I. *Chem.-Eur. J.* **2007**, *13*, 4064-4073.
- (277) Godfrey, E.; Porro, C. S.; de Visser, S. P. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 2464-2468.
- (278) Zirah, S.; Kozin, S. A.; Mazur, A. K.; Blond, A.; Cheminant, M.; Segalas-Milazzo, I.; Debey, P.; Rebuffat, S. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 2151-2161.
- (279) Jiang, D. L.; Men, L. J.; Wang, J. X.; Zhang, Y.; Chickenyen, S.; Wang, Y. S.; Zhou, F. M. *Biochemistry* **2007**, *46*, 9270-9282.
- (280) Sanauallah, G. S. W.; Glass, R. S. *J. Inorg. Biochem.* **1994**, *55*, 87-99.
- (281) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*: New York, **2004**.
- (282) Bard, A. J.; Parsons, R.; Jordan, J. *Standard Potentials in Aqueous Solutions*; Marcel Dekker: New York, **1985**.
- (283) Dryhurst, G.; Kadish, K. M.; Scheller, F.; Renneberg, R. *Biological electrochemistry*; Academic Press: New York and London, **1982**.
- (284) Tse, D. C.-S.; Kuwana, T. *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 1315.
- (285) Conway, B. E. *Electrochemical Data*: New York, **1969**.



# APÉNDICES

## APÉNDICE 1. Tablas suplementarias del Capítulo 4.

**Tabla A4.1.** Energías relativas de los estados de multiplicidad de espín ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) para los complejos estudiados de  $\text{Fe}^{2+/3+}$  al nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d). Las energías MP2/6-31+G(d) para algunos sistemas se muestran entre paréntesis.

Complejos de $\text{Fe}^{2+}$	Quintuplete	Triplete	Singlete
$[\text{Fe}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$	0.0	29.6	31.8
$[\text{Fe}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{Im})]^{2+}$	0.0	32.0	39.4
$[\text{Fe}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{PhO}^-)]^{1+}$	0.0	22.2	47.1
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$	0.0	11.4	24.6
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	0.0	21.9	45.1
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	0.0	33.4	61.9
$[\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{1+}$	0.0	28.2	36.0
$[\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+}$	0.0	27.4	31.1
$[\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{1+}$	0.0	18.8	40.8
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	0.0 (0.0)	16.0 (33.8)	19.4 (41.2)
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	0.0	15.1	32.8
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})]^{2+}$	0.0 (0.0)	15.3 (28.3)	42.9 (60.8)
$[\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+}$	0.0	8.2	14.8
$[\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{1+}$	0.0	18.5	29.9
$[\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})]^{1+}$	0.0 (0.0)	11.0 (27.2)	38.2 (40.4)
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+}$	0.0	32.1	38.4
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{1+}$	0.0	21.4	49.4
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)]^{1+}$	0.0	26.6	57.3
$[\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]$	0.0	17.5	31.3
$[\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]$	0.0	17.9	43.3
$[\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)]$	0.0	31.7	55.4
Complejos de $\text{Fe}^{3+}$	Sextuplete	Cuadruplete	Doblete
$[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$	0.0	31.3	30.0
$[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{Im})]^{3+}$	0.0	6.3	34.8
$[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{PhO}^-)]^{2+}$	0.0	2.1	33.5
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+}$	0.0	10.2	18.1
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$	0.0	12.7	35.6
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{3+}$	0.0	20.5	43.6
$[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$	0.0	16.4	27.4
$[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	0.0	6.5	18.0
$[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	0.0	19.5	45.1
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$	0.0	5.7	11.4
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{3+}$	0.0	7.6	23.2
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})]^{3+}$	0.0 (0.0)	13.6 (33.2)	28.4 (62.9)
$[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	0.0	0.9	6.4
$[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	0.0 (0.0)	0.9 (18.1)	11.8 (55.6)
$[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})]^{2+}$	0.0 (0.0)	9.3 (18.3)	16.8 (38.1)
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	0.0	26.1	48.7
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	0.0	9.1	27.0
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)]^{2+}$	0.0	4.1	34.0
$[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+}$	0.0	9.4	22.1
$[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{1+}$	0.0	22.2	37.6
$[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)]^{1+}$	0.0	18.2	39.7

**Tabla A4.2.** Energías de reacción (kcal mol<sup>-1</sup>) para los complejos de Fe<sup>2+</sup> al nivel de teoría “MP2/BG”.

Reacción	$\Delta H_{(g)}(0\text{ K})$	$\Delta H_{(g)}(298\text{ K})$	$T\Delta S$	$\Delta G_{(g)}$	$\Delta\Delta G_{sol}^*$	$\Delta G_{sol}^*$
<b>Coordinación Simple de un Ligando</b>						
$[\text{Fe}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{Im} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	-28.7	-27.7	-0.1	-27.6	23.7	-3.8
$[\text{Fe}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{PhOH} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_5]^{1+} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	147.6	149.1	3.1	146.0	-126.9	9.6
<b>Coordinación del Fragmento HisHis</b>						
$[\text{Fe}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{HisHis} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} + 3\text{H}_2\text{O}$	-52.1	-50.7	6.8	-57.4	45.5	-12.0
$[\text{Fe}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{HisHis} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{1+} + 3\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	151.0	153.5	12.1	141.4	-118.1	13.7
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{1+} + \text{H}^+$	203.1	204.2	5.4	198.8	-163.6	25.7
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	18.4	18.8	7.8	10.9	-6.2	4.8
$[\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+} + \text{H}_2\text{O}$	7.5	7.5	6.3	1.2	-7.8	-6.6
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+} + \text{H}^+$	192.1	192.9	3.9	189.1	-165.2	14.4
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	20.4	20.5	6.7	13.8	-4.9	8.8
$[\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{1+} + \text{H}_2\text{O}$	12.7	13.0	7.2	5.7	0.6	6.4
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{1+} + \text{H}^+$	184.4	185.4	4.4	181.0	-159.6	11.9
<b>Coordinación del Tercer Imidazol</b>						
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} + \text{Im} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	-22.9	-22.1	-1.9	-20.1	17.9	-2.2
$[\text{Fe}^{2+}(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{HisHis} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + 3\text{H}_2\text{O}$	-46.3	-45.0	5.0	-50.0	39.7	-10.3
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+} + \text{H}^+$	234.7	211.5	5.0	206.5	-175.4	21.6
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	16.4	16.8	8.2	8.7	-4.6	4.1
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{1+} + \text{H}^+$	199.3	199.9	4.4	195.5	-173.7	12.3
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	26.8	26.6	5.6	21.0	-4.6	16.4
$[\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})]^{1+} + \text{H}_2\text{O}$	185.5	187.5	8.4	179.1	-174.1	-4.5
<b>Coordinación del Fenol</b>						
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} + \text{PhOH} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	177.7	179.7	3.2	176.5	-154.7	12.2
$[\text{Fe}^{2+}(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_6]^{1+} + \text{HisHis} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+} + 3\text{H}_2\text{O}$	-22.0	-20.1	6.9	-27.0	17.7	-9.3
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2] + \text{H}^+$	275.5	276.4	6.3	270.1	-233.4	27.1
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{1+} + \text{H}_2\text{O}$	9.7	10.2	8.1	2.1	-6.4	-4.3
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})] + \text{H}^+$	260.7	261.8	5.0	256.8	-230.7	16.6
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)]^{1+} + \text{H}_2\text{O}$	14.7	15.4	9.0	6.5	-4.2	2.3
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)] + \text{H}^+$	269.0	270.4	4.7	265.6	-233.5	22.6

**Tabla A4.3.** Energías de reacción (kcal mol<sup>-1</sup>) para los complejos de Fe<sup>3+</sup> al nivel de teoría “MP2/BG”.

Reacción	$\Delta H_{(g)}(0\text{ K})$	$\Delta H_{(g)}(298\text{ K})$	$T\Delta S$	$\Delta G_{(g)}$	$\Delta\Delta G^*_{solv}$	$\Delta G^*_{sol}$
<b>Coordinación Sencilla de un Ligando</b>						
$[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+} + \text{Im} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+} + \text{H}_2\text{O}$	-46.3	-44.5	2.3	-46.8	89.1	42.3
$[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+} + \text{PhOH} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	9.5	13.7	11.6	2.1	26.0	18.6
<b>Coordinación del Fragmento HisHis</b>						
$[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+} + \text{HisHis} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+} + 3\text{H}_2\text{O}$	-125.2	-122.7	10.2	-132.9	130.5	-2.4
$[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+} + \text{HisHis} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} + 3\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	-10.7	-6.6	16.8	-23.4	42.8	9.8
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} + \text{H}^+$	114.5	116.1	6.6	109.5	-87.8	12.2
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+} + \text{H}_2\text{O}$	30.7	31.4	8.7	22.7	-6.1	16.6
$[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	19.2	19.7	8.0	11.7	-6.0	5.7
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + \text{H}^+$	103.0	104.4	5.9	98.5	-87.7	1.3
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{3+} + \text{H}_2\text{O}$	33.2	33.9	8.4	25.6	-7.4	18.1
$[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	20.4	21.1	8.1	13.0	-2.3	10.7
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{2+} + \text{H}^+$	90.2	91.5	5.6	85.9	-82.5	-6.1
<b>Coordinación del Tercer Imidazol</b>						
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+} + \text{Im} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+} + \text{H}_2\text{O}$	-43.1	-37.7	-1.6	-36.1	27.5	-8.6
$[\text{Fe}^{3+}(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+} + \text{HisHis} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+} + 3\text{H}_2\text{O}$	-117.5	-115.9	6.3	-122.2	69.0	-53.2
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + \text{H}^+$	151.5	137.2	5.0	132.2	-99.0	23.6
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{3+} + \text{H}_2\text{O}$	24.0	24.5	8.1	16.4	-2.8	13.6
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{2+} + \text{H}^+$	111.2	112.3	5.0	107.3	-98.4	-0.7
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})]^{3+} + \text{H}_2\text{O}$	29.0	29.7	8.5	21.2	-4.6	16.6
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})]^{2+} + \text{H}^+$	103.8	105.5	7.1	98.4	-100.3	-11.4
<b>Coordinación del Fenol</b>						
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+} + \text{PhOH} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	94.1	96.9	5.7	91.3	-69.0	12.7
$[\text{Fe}^{3+}(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{HisHis} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + 3\text{H}_2\text{O}$	-40.5	-39.5	4.3	-43.8	35.5	-8.3
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+} + \text{H}^+$	173.2	173.9	4.1	169.8	-168.3	-8.1
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	17.4	18.0	8.4	9.6	-3.0	6.7
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{1+} + \text{H}^+$	166.4	166.9	3.3	163.6	-168.7	-14.7
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	14.0	14.5	8.3	6.2	-2.9	3.3
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)]^{1+} + \text{H}^+$	157.3	158.3	4.0	154.3	-171.0	-26.3

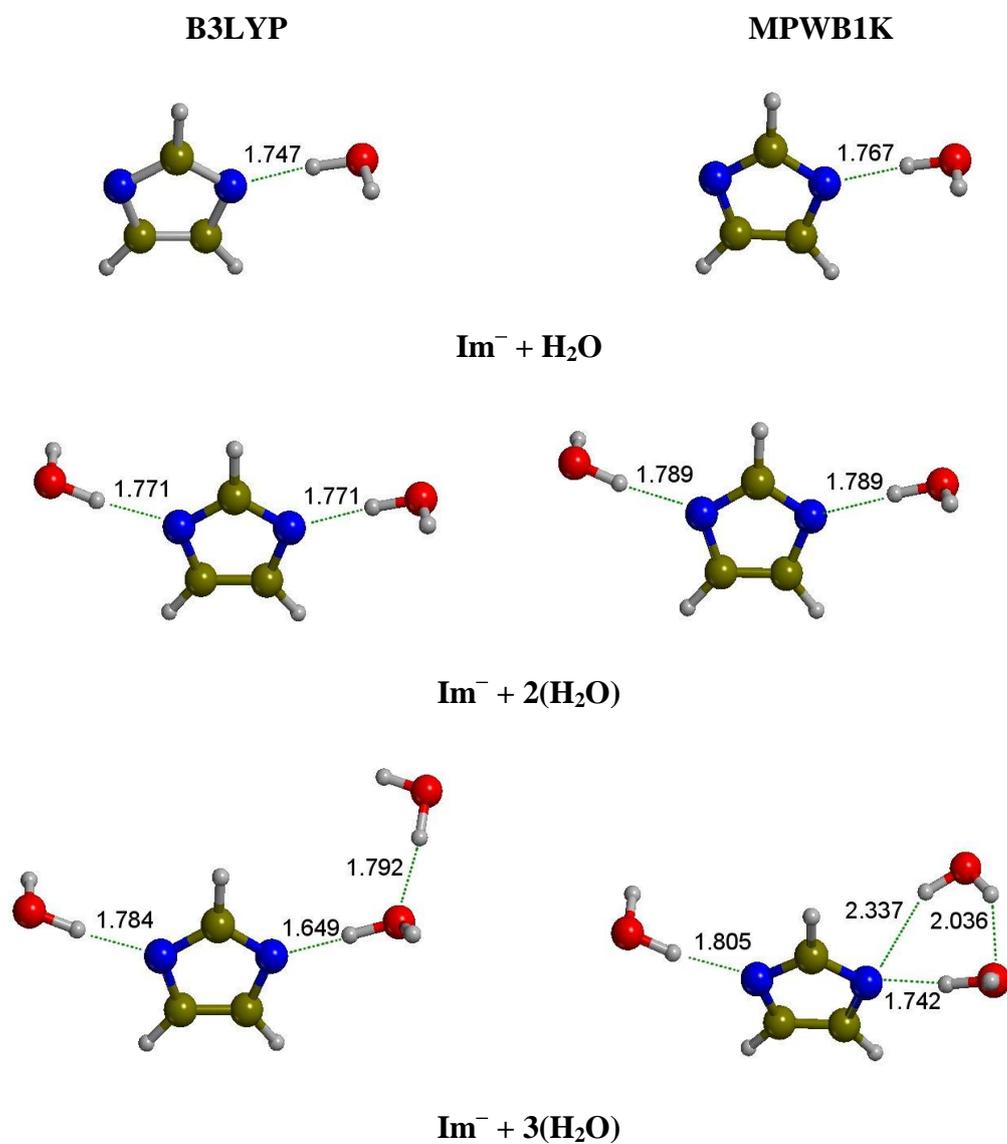
**Tabla A4.4.** Energías de reacción (kcal mol<sup>-1</sup>) para los complejos de Fe<sup>2+</sup> al nivel de teoría B3LYP/BG.

Reacción	$\Delta H_{(g)}(0\text{ K})$	$\Delta H_{(g)}(298\text{ K})$	$T\Delta S$	$\Delta G_{(g)}$	$\Delta\Delta G^*_{sol}$	$\Delta G^*_{sol}$
<b>Coordinación Sencilla de un Ligando</b>						
$[\text{Fe}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{Im} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	-26.9	-25.9	-0.1	-25.8	23.7	-2.0
$[\text{Fe}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{PhOH} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{PhO}^-(\text{H}_2\text{O})_5)]^{1+} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	148.7	150.2	3.1	147.2	-126.9	10.7
<b>Coordinación Del Fragmento HisHis</b>						
$[\text{Fe}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{HisHis} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} + 3\text{H}_2\text{O}$	-49.5	-48.0	6.8	-54.8	45.5	-9.3
$[\text{Fe}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{HisHis} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{1+} + 3\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	153.0	155.5	12.1	143.4	-118.1	15.8
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{1+} + \text{H}^+$	202.4	203.5	5.4	198.1	-163.6	25.0
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	11.1	11.5	7.8	3.7	-6.2	-2.5
$[\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+} + \text{H}_2\text{O}$	5.1	5.1	6.3	-1.2	-7.8	-9.0
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+} + \text{H}^+$	196.4	197.2	3.9	193.3	-165.2	18.6
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	13.0	13.1	6.7	6.4	-4.9	1.4
$[\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{1+} + \text{H}_2\text{O}$	6.7	7.0	7.2	-0.3	0.6	0.4
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{1+} + \text{H}^+$	190.0	191.0	4.4	186.6	-159.6	17.5
<b>Coordinación del Tercer Imidazol</b>						
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} + \text{Im} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	-17.1	-16.7	-1.9	-14.3	17.9	3.6
$[\text{Fe}^{2+}(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{HisHis} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + 3\text{H}_2\text{O}$	-39.7	-38.4	5.0	-43.3	39.7	-3.7
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+} + \text{H}^+$	238.4	214.9	5.0	209.9	-175.4	24.9
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	7.9	8.3	8.2	0.1	-4.6	-4.4
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{1+} + \text{H}^+$	204.7	205.4	4.4	201.0	-173.7	17.8
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	14.0	13.8	5.6	8.2	-4.6	3.6
$[\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})]^{1+} + \text{H}_2\text{O}$	191.8	193.8	8.4	185.4	-174.1	1.9
<b>Coordinación del Fenol</b>						
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} + \text{PhOH} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-(\text{H}_2\text{O})_2)]^{1+} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	185.0	187.0	3.2	183.8	-154.7	19.5
$[\text{Fe}^{2+}(\text{PhO}^-(\text{H}_2\text{O})_6)]^{1+} + \text{HisHis} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-(\text{H}_2\text{O})_2)]^{1+} + 3\text{H}_2\text{O}$	-13.1	-11.3	6.9	-18.1	17.7	-0.5
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-(\text{H}_2\text{O})_2)]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-(\text{H}_2\text{O})_2)] + \text{H}^+$	273.0	273.9	6.3	267.6	-233.4	24.6
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-(\text{H}_2\text{O})_2)]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-(\text{H}_2\text{O}))]^{1+} + \text{H}_2\text{O}$	2.3	2.7	8.1	-5.4	-6.4	-11.7
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-(\text{H}_2\text{O}))]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-(\text{H}_2\text{O}))] + \text{H}^+$	267.1	268.2	5.0	263.2	-230.7	22.9
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-(\text{H}_2\text{O}))]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)]^{1+} + \text{H}_2\text{O}$	7.0	7.7	9.0	-1.2	-4.2	-5.4
$[\text{Fe}^{2+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)] + \text{H}^+$	264.0	265.3	4.7	260.6	-233.5	17.6

**Tabla A4.5.** Energías de reacción (kcal mol<sup>-1</sup>) para los complejos de Fe<sup>3+</sup> al nivel de teoría B3LYP/BG.

Reacción	$\Delta H_{(g)}(0\text{ K})$	$\Delta H_{(g)}(298\text{ K})$	$T\Delta S$	$\Delta G_{(g)}$	$\Delta\Delta G_{sol}^*$	$\Delta G_{sol}^*$
<b>Coordinación Sencilla de un Ligando</b>						
$[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+} + \text{Im} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+} + \text{H}_2\text{O}$	-64.0	-62.2	2.3	-64.5	89.1	24.5
$[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+} + \text{PhOH} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	-16.1	-11.9	11.6	-23.5	26.0	-7.0
<b>Coordinación del Fragmento HisHis</b>						
$[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+} + \text{HisHis} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+} + 3\text{H}_2\text{O}$	-126.5	-123.9	10.2	-134.2	130.5	-3.6
$[\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+} + \text{HisHis} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} + 3\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	-22.3	-18.2	16.8	-35.1	42.8	-1.8
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} + \text{H}^+$	104.1	105.7	6.6	99.1	-87.8	1.8
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+} + \text{H}_2\text{O}$	20.9	21.6	8.7	12.9	-6.1	6.8
$[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	11.5	12.0	8.0	4.0	-6.0	-2.0
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + \text{H}^+$	94.6	96.1	5.9	90.2	-87.7	-7.0
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{3+} + \text{H}_2\text{O}$	22.4	23.1	8.4	14.7	-7.4	7.3
$[\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	14.8	15.4	8.1	7.3	-2.3	5.0
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{H}_2\text{O})]^{2+} + \text{H}^+$	87.0	88.4	5.6	82.8	-82.5	-9.3
<b>Coordinación del Tercer Imidazol</b>						
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+} + \text{Im} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+} + \text{H}_2\text{O}$	-34.1	-29.7	-1.6	-28.1	27.5	-0.5
$[\text{Fe}^{3+}(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+} + \text{HisHis} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+} + 3\text{H}_2\text{O}$	-93.1	-91.4	6.3	-97.7	69.0	-28.7
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + \text{H}^+$	138.0	125.1	5.0	120.1	-99.0	11.5
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{3+} + \text{H}_2\text{O}$	11.7	12.2	8.1	4.1	-2.8	1.3
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{1+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{2+} + \text{H}^+$	113.9	115.1	5.0	110.0	-98.4	2.1
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})(\text{H}_2\text{O})]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})]^{3+} + \text{H}_2\text{O}$	18.0	18.7	8.5	10.2	-4.6	5.6
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{Im})]^{3+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{Im})]^{2+} + \text{H}^+$	103.3	104.9	7.1	97.9	-100.3	-12.0
<b>Coordinación del Fenol</b>						
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+} + \text{PhOH} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	73.8	76.6	5.7	70.9	-69.0	-7.6
$[\text{Fe}^{3+}(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{HisHis} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + 3\text{H}_2\text{O}$	-36.5	-35.5	4.3	-39.8	35.5	-4.3
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]^{1+} + \text{H}^+$	201.9	202.5	4.1	198.5	-168.3	20.6
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	4.2	4.8	8.4	-3.5	-3.0	-6.5
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{1+} + \text{H}^+$	195.8	196.3	3.3	193.0	-168.7	14.8
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)(\text{H}_2\text{O})]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	9.4	9.9	8.3	1.6	-2.9	-1.3
$[\text{Fe}^{3+}(\text{O-HisHis})(\text{PhO}^-)]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{3+}(\text{N-HisHis})(\text{PhO}^-)]^{1+} + \text{H}^+$	189.0	189.9	4.0	185.9	-171.0	5.3

APÉNDICE 2. Figura suplementaria del Capítulo 5.



**Figura A5.1.** Estructuras optimizadas del imidazol desprotonado considerando moléculas de solvente explícitas. Distancias dadas en Å.

APÉNDICE 3. Tablas y Figuras suplementarias del Capítulo 6.

**Tabla A6.1.** Clusters más poblados para cada subgrupo de coordinación. Las energías mostradas corresponden a la de los modelos más representativos de cada cluster. Los modelos en negrita corresponden a los seleccionados en cada caso.

Esfera de Coordinación [H <sup>6</sup> , H <sup>13</sup> , H <sup>14</sup> , X]	Cluster (número de modelos)	Energía CHARMM (kcal mol <sup>-1</sup> )	Energía DOPE (kcal mol <sup>-1</sup> )
[ε, ε, ε, D <sup>1</sup> ]	1 (153)	754.9330	-357.0485
	2 (29)	635.0837	-366.6451
	3 (24)	538.4481	-340.8242
	4 (22)	552.3768	-418.1353
	<b>5 (14)</b>	<b>482.4857</b>	<b>-489.2567</b>
[ε, ε, ε, E <sup>3</sup> ]	1 (154)	435.6524	-338.5370
	2 (45)	710.2787	-301.2567
	3 (30)	514.2993	-311.3329
	<b>4 (28)</b>	<b>516.0174</b>	<b>-528.4094</b>
	5 (24)	614.1423	-325.8986
[ε, ε, ε, D <sup>7</sup> ]	<b>1 (231)</b>	<b>451.8546</b>	<b>-464.5303</b>
	2 (33)	515.3876	-381.9948
	3 (33)	569.1167	-272.1217
	4 (24)	502.5533	-354.2113
	5 (17)	437.7639	-451.6984
[ε, ε, ε, E <sup>11</sup> ]	<b>1 (182)</b>	<b>461.2274</b>	<b>-468.5833</b>
	2 (35)	728.1011	-429.8372
	3 (29)	1288.8455	-341.8864
	4 (22)	858.9812	-525.6674
	5 (20)	491.4437	-392.4917
[δ, ε, ε, D <sup>1</sup> ]	<b>1 (188)</b>	<b>494.4563</b>	<b>-443.6858</b>
	2 (36)	766.4915	-294.0873
	3 (31)	977.5298	-407.2299
	4 (15)	1010.3230	-321.9870
	5 (14)	984.8109	-420.6139
[δ, ε, ε, E <sup>3</sup> ]	1 (81)	539.5979	-322.0398
	<b>2 (60)</b>	<b>516.3870</b>	<b>-500.0585</b>
	3 (50)	584.1744	-360.3991
	4 (44)	467.2506	-335.5285
	5 (34)	649.6122	-166.0431
[δ, ε, ε, D <sup>7</sup> ]	1 (166)	778.3701	-422.6744
	2 (42)	511.0627	-377.1635
	3 (30)	916.7386	-374.6030
	<b>4 (17)</b>	<b>786.2537</b>	<b>-478.1519</b>
	5 (13)	545.0814	-332.1059
[δ, ε, ε, E <sup>11</sup> ]	1 (136)	610.9510	-349.9131

	<b>2 (88)</b>	<b>664.3250</b>	<b>-451.7478</b>
	3 (25)	790.2908	-405.3882
	4 (23)	1144.0060	-384.5941
	5 (20)	1334.9004	-295.2245
<b>[ε, δ, δ, D<sup>1</sup>]</b>			
	1 (180)	862.1345	-240.9407
	<b>2 (58)</b>	<b>583.3492</b>	<b>-424.9091</b>
	3 (57)	937.1693	-387.0849
	4 (20)	845.5134	-351.4879
	5 (18)	911.4500	-348.9633
<b>[ε, δ, δ, E<sup>3</sup>]</b>			
	1 (137)	526.5872	-190.7515
	2 (39)	590.3956	-125.9329
	3 (25)	637.6491	-134.4959
	<b>4 (21)</b>	<b>561.4025</b>	<b>-348.8378</b>
	5 (21)	1075.9639	-271.8836
<b>[ε, δ, δ, D<sup>7</sup>]</b>			
	1 (213)	389.8645	-286.3311
	2 (33)	472.6142	-270.1647
	<b>3 (31)</b>	<b>478.3798</b>	<b>-429.7787</b>
	4 (13)	582.9291	-233.2638
	5 (11)	429.9601	-371.0850
<b>[ε, δ, δ, E<sup>11</sup>]</b>			
	1 (149)	648.4022	-418.4364
	2 (68)	514.1150	-404.2955
	<b>3 (20)</b>	<b>451.6301</b>	<b>-428.8383</b>
	4 (17)	693.3903	-441.3803
	5 (13)	522.1005	-402.1893
<b>[δ, δ, δ, D<sup>1</sup>]</b>			
	1 (162)	894.7893	-261.5919
	<b>2 (23)</b>	<b>588.3260</b>	<b>-490.4191</b>
	3 (17)	684.0712	-453.0751
	4 (16)	560.1323	-332.5049
	5 (16)	784.0271	-446.1950
<b>[δ, δ, δ, E<sup>3</sup>]</b>			
	1 (130)	501.8360	-180.0261
	<b>2 (42)</b>	<b>663.0658</b>	<b>-305.5671</b>
	3 (33)	813.8475	-176.0080
	4 (24)	604.3059	-27.6457
	5 (18)	616.1568	-209.0352
<b>[δ, δ, δ, D<sup>7</sup>]</b>			
	1 (166)	525.6370	-202.4325
	2 (45)	624.0406	-383.2062
	3 (33)	482.6162	-213.2253
	4 (22)	618.9570	-296.3713
	<b>5 (14)</b>	<b>589.1013</b>	<b>-362.8890</b>
<b>[δ, δ, δ, E<sup>11</sup>]</b>			
	1 (117)	865.2435	-324.5564
	<b>2 (29)</b>	<b>586.9420</b>	<b>-436.1162</b>
	3 (28)	484.9834	-242.9658
	4 (19)	518.4591	-406.6774
	5 (19)	565.4562	-420.5145
<b>[ε, δ, ε, D<sup>1</sup>]</b>			
	<b>1 (114)</b>	<b>656.3710</b>	<b>-446.0092</b>
	2 (107)	955.8926	-253.1500

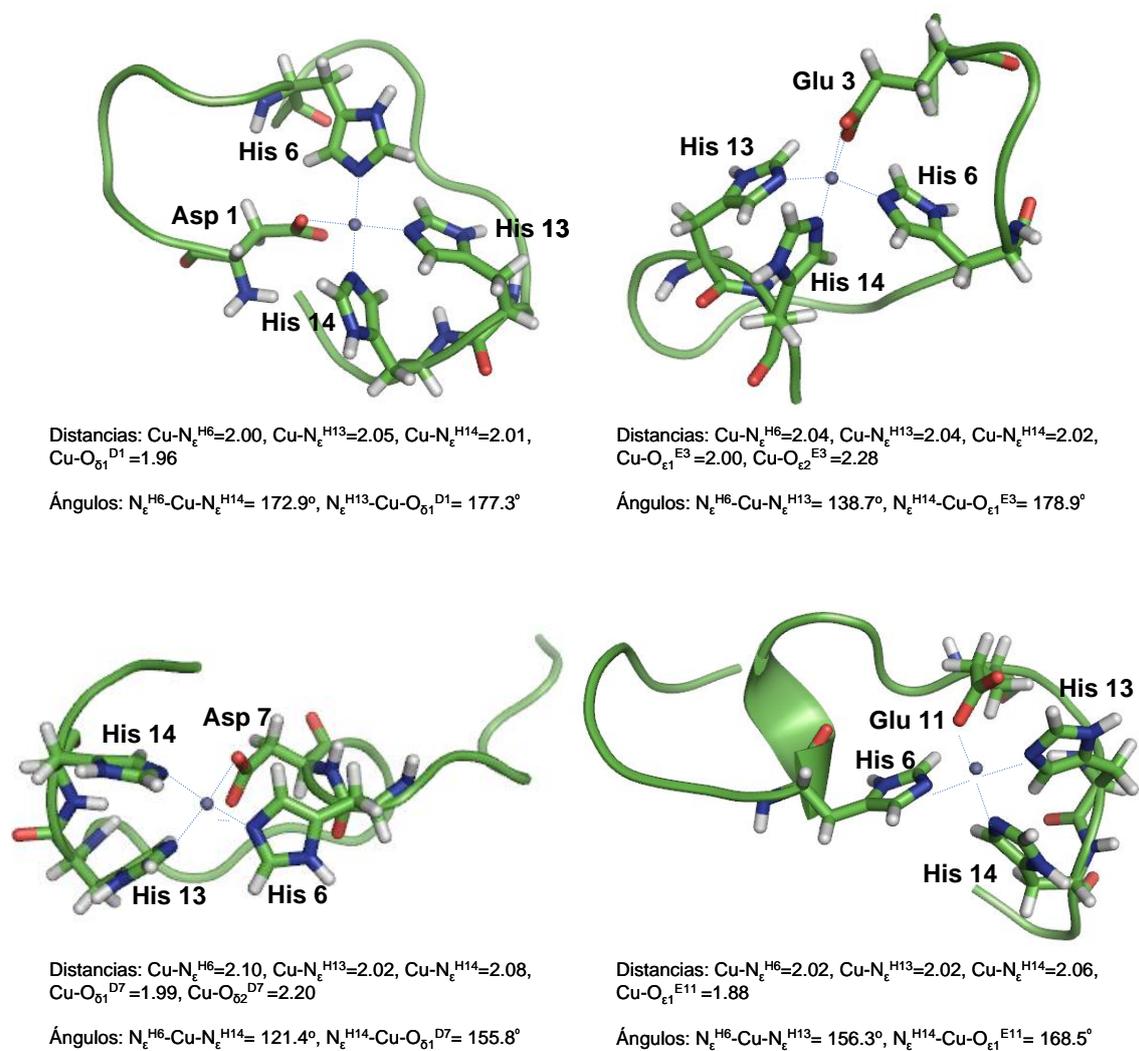
Apéndice 3

	3 (30)	511.8851	-347.3971
	4 (18)	797.3979	-193.3510
	5 (18)	1058.3293	-389.2559
<b>[ε, δ, ε, E<sup>3</sup>]</b>			
	1 (127)	947.0324	-170.1849
	2 (49)	561.1308	-268.6141
	3 (41)	546.1348	-145.7307
	4 (28)	522.4961	-313.1654
	<b>5 (19)</b>	<b>593.0487</b>	<b>-345.8442</b>
<b>[ε, δ, ε, D<sup>7</sup>]</b>			
	1 (210)	359.4844	-281.0420
	<b>2 (31)</b>	<b>480.2784</b>	<b>-362.3146</b>
	3 (25)	622.7541	-300.4193
	4 (20)	512.1188	-364.0454
	5 (10)	471.0349	-194.5606
<b>[ε, δ, ε, E<sup>11</sup>] 315</b>			
	1 (126)	526.4432	-338.1534
	2 (59)	449.7436	-352.3797
	3 (32)	780.0515	-359.6313
	4 (30)	717.3473	-388.4983
	<b>5 (14)</b>	<b>444.0090</b>	<b>-366.1431</b>
<b>[δ, δ, ε, D<sup>1</sup>]</b>			
	1(157)	458.5243	-367.5327
	<b>2(43)</b>	<b>583.3594</b>	<b>-451.7870</b>
	3(25)	722.8624	-358.4930
	4(23)	791.2496	-337.2227
	5(22)	494.0892	-430.8491
<b>[δ, δ, ε, E<sup>3</sup>]</b>			
	1 (132)	501.8805	-426.0193
	<b>2 (30)</b>	<b>480.6219</b>	<b>-492.6745</b>
	3 (23)	633.4377	-209.0930
	4 (20)	484.6887	-291.1127
	5 (17)	458.1570	-259.5197
<b>[δ, δ, ε, D<sup>7</sup>]</b>			
	1 (262)	843.0923	-344.4811
	2 (40)	462.7994	-304.5466
	<b>3 (27)</b>	<b>512.4344</b>	<b>-361.0333</b>
	4 (20)	789.8212	-406.3021
	5 (11)	441.1638	-332.1653
<b>[δ, δ, ε, E<sup>11</sup>]</b>			
	1 (155)	489.9121	-358.1509
	2 (66)	435.9528	-337.7750
	3 (39)	750.5533	-239.6004
	<b>4 (15)</b>	<b>662.8840</b>	<b>-445.4668</b>
	5 (14)	914.4984	-359.6347
<b>[ε, ε, δ, D<sup>1</sup>]</b>			
	<b>1 (117)</b>	<b>496.2599</b>	<b>-338.4460</b>
	2 (67)	955.9065	-326.1168
	3 (48)	997.6077	-403.0327
	4 (22)	471.0453	-257.3474
	5 (17)	575.8613	-250.3320
<b>[ε, ε, δ, E<sup>3</sup>]</b>			
	1 (133)	1108.9805	-300.8282
	<b>2 (28)</b>	<b>442.5391</b>	<b>-431.9704</b>
	3 (24)	583.7566	-289.1821

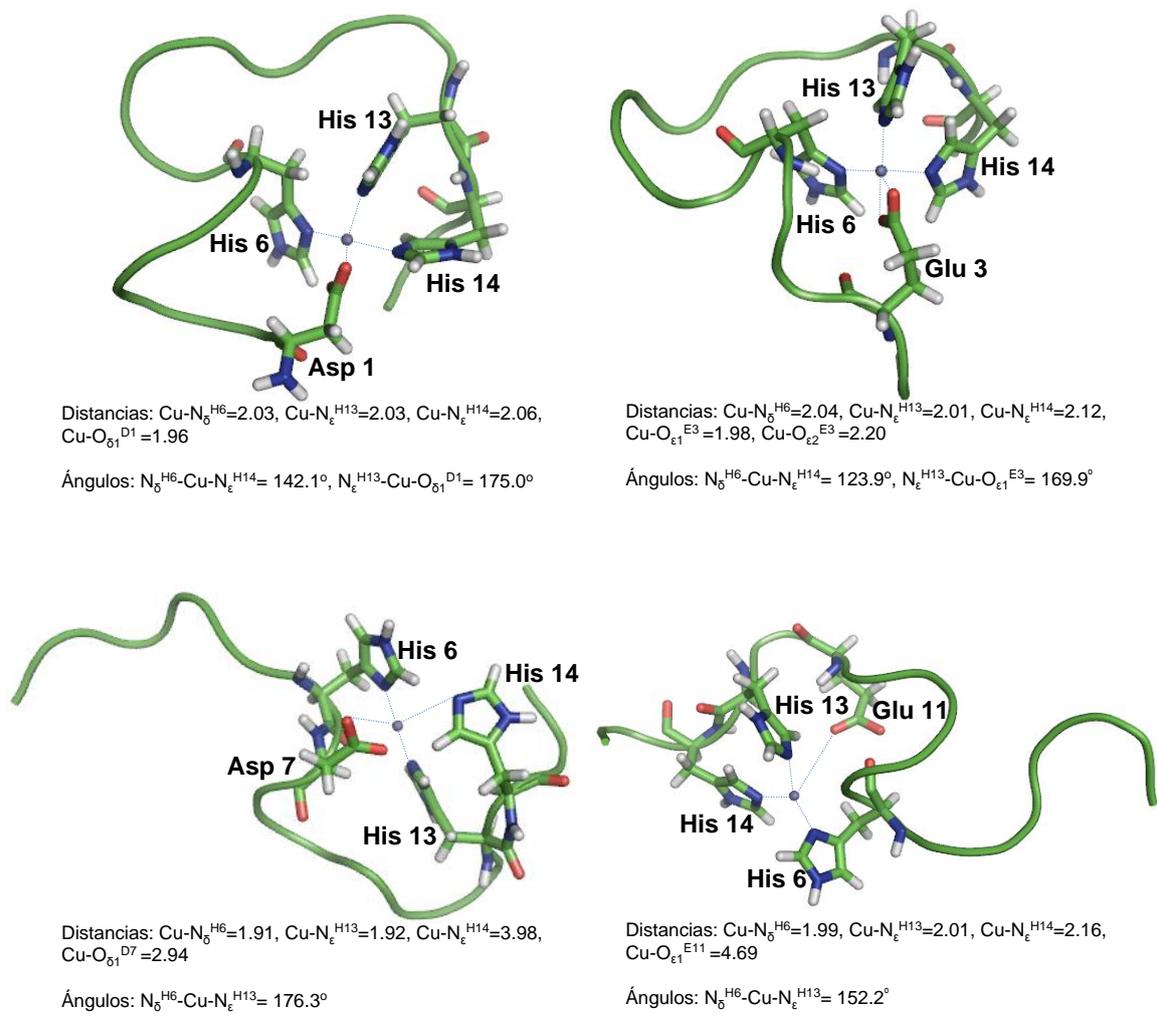
	4 (23)	520.7730	-289.3649
	5 (21)	679.2158	-373.1870
<b>[<math>\varepsilon, \varepsilon, \delta, D^7</math>]</b>			
	1 (243)	343.5018	-310.5172
	2 (28)	398.2479	-321.6072
	<b>3 (19)</b>	<b>438.9230</b>	<b>-455.8274</b>
	4 (15)	497.3331	-340.7051
	5 (10)	556.9860	-195.9987
<b>[<math>\varepsilon, \varepsilon, \delta, E^{11}</math>]</b>			
	1 (108)	531.0563	-232.0899
	2 (100)	545.4881	-343.5829
	<b>3 (33)</b>	<b>592.8683</b>	<b>-382.3076</b>
	4 (30)	853.2837	-173.8428
	5 (23)	884.5367	-251.0060
<b>[<math>\delta, \varepsilon, \delta, D^1</math>]</b>			
	<b>1 (120)</b>	<b>578.3466</b>	<b>-437.6575</b>
	2 (44)	546.0436	-395.0577
	3 (44)	792.2648	-401.6801
	4 (21)	584.6372	-387.5482
	5 (18)	544.4634	-351.9336
<b>[<math>\delta, \varepsilon, \delta, E^3</math>]</b>			
	1 (130)	471.7983	-255.4542
	2 (67)	834.8621	-192.4244
	3 (53)	604.6700	-282.0418
	<b>4 (52)</b>	<b>486.6539</b>	<b>-367.0310</b>
	5 (40)	502.7229	-323.9980
<b>[<math>\delta, \varepsilon, \delta, D^7</math>]</b>			
	<b>1 (168)</b>	<b>457.1187</b>	<b>-480.3176</b>
	2 (30)	416.5541	-272.2250
	3 (29)	390.3042	-279.2555
	4 (20)	432.6488	-317.6669
	5 (20)	754.9949	-252.8574
<b>[<math>\delta, \varepsilon, \delta, E^{11}</math>]</b>			
	1 (177)	433.1692	-397.2415
	2 (30)	963.8077	-379.4126
	<b>3 (17)</b>	<b>498.8076</b>	<b>-483.5315</b>
	4 (13)	538.9280	-409.6487
	5 (11)	446.1597	-346.4860
<b>Esfera de Coordinación</b>	<b>Cluster (número de modelos)</b>	<b>Energía CHARMM</b>	<b>Energía DOPE</b>
<b>[<math>H^6, H^{13}, H^{14}, X</math>]</b>		<b>(kcal mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>(kcal mol<sup>-1</sup>)</b>
<b>X = CO<sub>Ala2</sub></b>			
<b>[<math>\varepsilon, \varepsilon, \varepsilon</math>]</b>			
	1 (137)	630.3098	-237.7710
	2 (64)	945.7713	-362.2777
	3 (53)	622.9640	-291.9102
	<b>4 (31)</b>	<b>597.8201</b>	<b>-417.4179</b>
	5 (21)	638.5996	-295.2476
<b>[<math>\delta, \varepsilon, \varepsilon</math>]</b>			
	1 (124)	892.2059	-247.1228
	2 (68)	923.7748	-364.0522
	<b>3 (43)</b>	<b>887.5524</b>	<b>-382.7409</b>
	4 (37)	832.0474	-305.4641
	5 (8)	1008.6393	-212.8235
<b>[<math>\varepsilon, \delta, \delta</math>]</b>			

	1 (105)	761.7406	-206.8997
	<b>2 (76)</b>	<b>502.4281</b>	<b>-298.6663</b>
	3 (29)	1056.0511	-182.2751
	4 (29)	749.7006	-185.0503
	5 (27)	657.9557	-282.8314
<b>[δ, δ, δ]</b>			
	1 (65)	739.6678	-302.1040
	2 (56)	948.5482	-318.1190
	3 (51)	753.6068	-276.2810
	<b>4 (32)</b>	<b>612.6479</b>	<b>-329.7332</b>
	5 (29)	701.5447	-145.9635
<b>[ε, δ, ε]</b>			
	<b>1 (115)</b>	<b>612.5916</b>	<b>-407.7699</b>
	2 (53)	623.8571	-337.9369
	3 (49)	1034.0360	-325.3487
	4 (38)	667.8314	-258.0183
	5 (35)	669.2468	-201.1373
<b>[δ, δ, ε]</b>			
	<b>1 (46)</b>	<b>639.7668</b>	<b>-366.9327</b>
	2 (42)	722.1171	-353.9166
	3 (35)	652.7753	-191.4012
	4 (32)	679.0923	-361.4460
	5 (24)	787.0685	-264.8209
<b>[ε, ε, δ]</b>			
	1 (93)	737.8020	-311.9707
	2 (85)	660.8865	-223.4536
	3 (68)	817.4033	-221.1251
	<b>4 (66)</b>	<b>557.6252</b>	<b>-442.7588</b>
	5 (23)	665.0494	-326.2727
<b>[δ, ε, δ]</b>			
	1 (82)	714.4152	-148.5689
	2 (73)	941.5385	-189.4160
	3 (59)	811.6931	-238.0190
	<b>4 (45)</b>	<b>752.0236</b>	<b>-398.6586</b>
	5 (24)	754.4392	-280.5509
<b>X = N-terminal</b>			
<b>[ε, ε, ε]</b>			
	1 (107)	448.0361	-347.7276
	<b>2 (71)</b>	<b>580.7899</b>	<b>-430.8279</b>
	3 (64)	581.1392	-306.6876
	4 (48)	664.8328	-66.0594
	5 (48)	457.7197	-418.5286
<b>[δ, ε, ε]</b>			
	<b>1 (183)</b>	<b>481.1565</b>	<b>-377.3065</b>
	2 (51)	577.3309	-365.5589
	3 (36)	929.5601	-4.4818
	4 (19)	654.8150	-285.5556
	5 (13)	862.7867	-334.3246
<b>[ε, δ, δ]</b>			
	<b>1 (138)</b>	<b>482.9684</b>	<b>-336.4412</b>

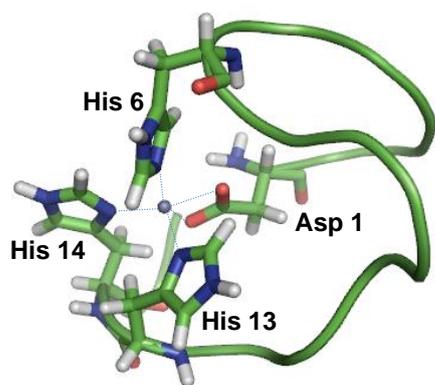
	2 (71)	487.2731	-279.7461
	3 (23)	538.9620	-383.2966
	4 (17)	628.9487	-319.2229
	5 (15)	570.9484	-249.0470
<b>[<math>\delta</math>, <math>\delta</math>, <math>\delta</math>]</b>	<b>1 (87)</b>	<b>519.4217</b>	<b>-366.0297</b>
	2 (64)	667.0569	-355.6982
	3 (56)	792.4630	-132.8393
	4 (26)	711.0021	-234.5972
	5 (19)	657.2949	-301.3434
<b>[<math>\varepsilon</math>, <math>\delta</math>, <math>\varepsilon</math>]</b>	1 (114)	711.7029	-48.9536
	2 (41)	764.9053	-318.4298
	<b>3 (39)</b>	<b>795.6536</b>	<b>-328.9328</b>
	4 (36)	748.3491	-228.2044
	5 (34)	667.5982	-299.7791
<b>[<math>\delta</math>, <math>\delta</math>, <math>\varepsilon</math>]</b>	1 (64)	705.5039	-244.6613
	<b>2 (54)</b>	<b>721.5234</b>	<b>-411.9340</b>
	3 (34)	608.6379	-266.7159
	4 (20)	684.5040	-331.3227
	5 (19)	706.0221	-206.9614
<b>[<math>\varepsilon</math>, <math>\varepsilon</math>, <math>\delta</math>]</b>	1 (199)	520.0953	-273.5654
	2 (53)	653.2207	-179.7140
	3 (28)	520.4034	-255.3364
	4 (25)	608.8390	-369.1086
	<b>5 (23)</b>	<b>596.5593</b>	<b>-350.4554</b>
<b>[<math>\delta</math>, <math>\varepsilon</math>, <math>\delta</math>]</b>	<b>1 (154)</b>	<b>540.1246</b>	<b>-395.4395</b>
	2 (40)	570.4215	-182.5621
	3 (33)	581.3674	-257.3067
	4 (24)	562.9060	-377.6217
	5 (16)	564.0473	-144.3546



**Figura A6.1.** Modelos conteniendo el grupo  $\text{COO}^-$  y las histidinas coordinadas a través de los  $\text{N}_\epsilon$ . Todas las distancias están en Å y los ángulos en grados.

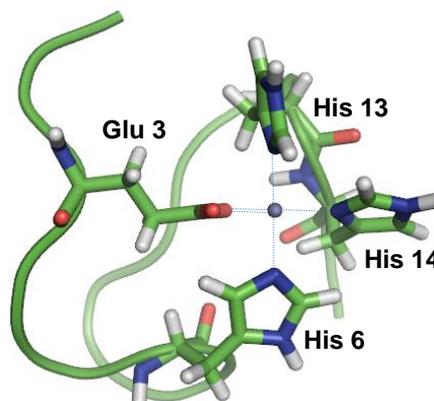


**Figura A6.2.** Modelos conteniendo el grupo COO<sup>-</sup>, la histidina 6 coordinada a través del N<sub>δ</sub> y las histidinas 13 y 14 a través del N<sub>ε</sub>. Todas las distancias están en Å y los ángulos en grados.



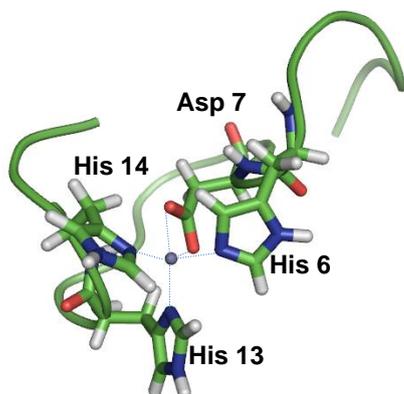
Distancias: Cu-N $_{\epsilon}^{H6}$ =2.04, Cu-N $_{\delta}^{H13}$ =2.20, Cu-N $_{\delta}^{H14}$ =2.06, Cu-O $_{\delta 1}^{D1}$ =2.02, Cu-O $_{\delta 2}^{D1}$ =2.11

Ángulos: N $_{\epsilon}^{H6}$ -Cu-N $_{\delta}^{H13}$ = 97.8°, N $_{\delta}^{H14}$ -Cu-O $_{\delta 1}^{D1}$ = 101.1°



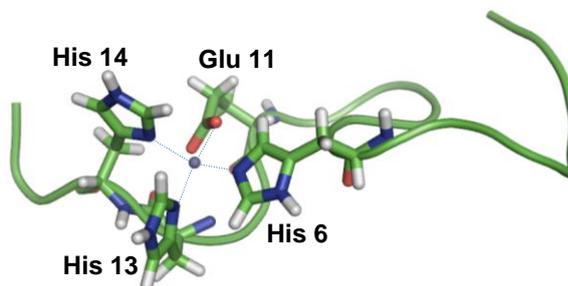
Distancias: Cu-N $_{\epsilon}^{H6}$ =2.06, Cu-N $_{\delta}^{H13}$ =2.05, Cu-N $_{\delta}^{H14}$ =2.06, Cu-O $_{\epsilon 1}^{E3}$ =1.97, Cu-O $_{\epsilon 2}^{E3}$ =2.44

Ángulos: N $_{\epsilon}^{H6}$ -Cu-N $_{\delta}^{H14}$ = 163.3°, N $_{\delta}^{H14}$ -Cu-O $_{\epsilon 1}^{D1}$ = 179.0°



Distancias: Cu-N $_{\epsilon}^{H6}$ =2.20, Cu-N $_{\delta}^{H13}$ =2.01, Cu-N $_{\delta}^{H14}$ =2.03, Cu-O $_{\delta 1}^{D7}$ =2.04, Cu-O $_{\delta 2}^{D7}$ =2.11

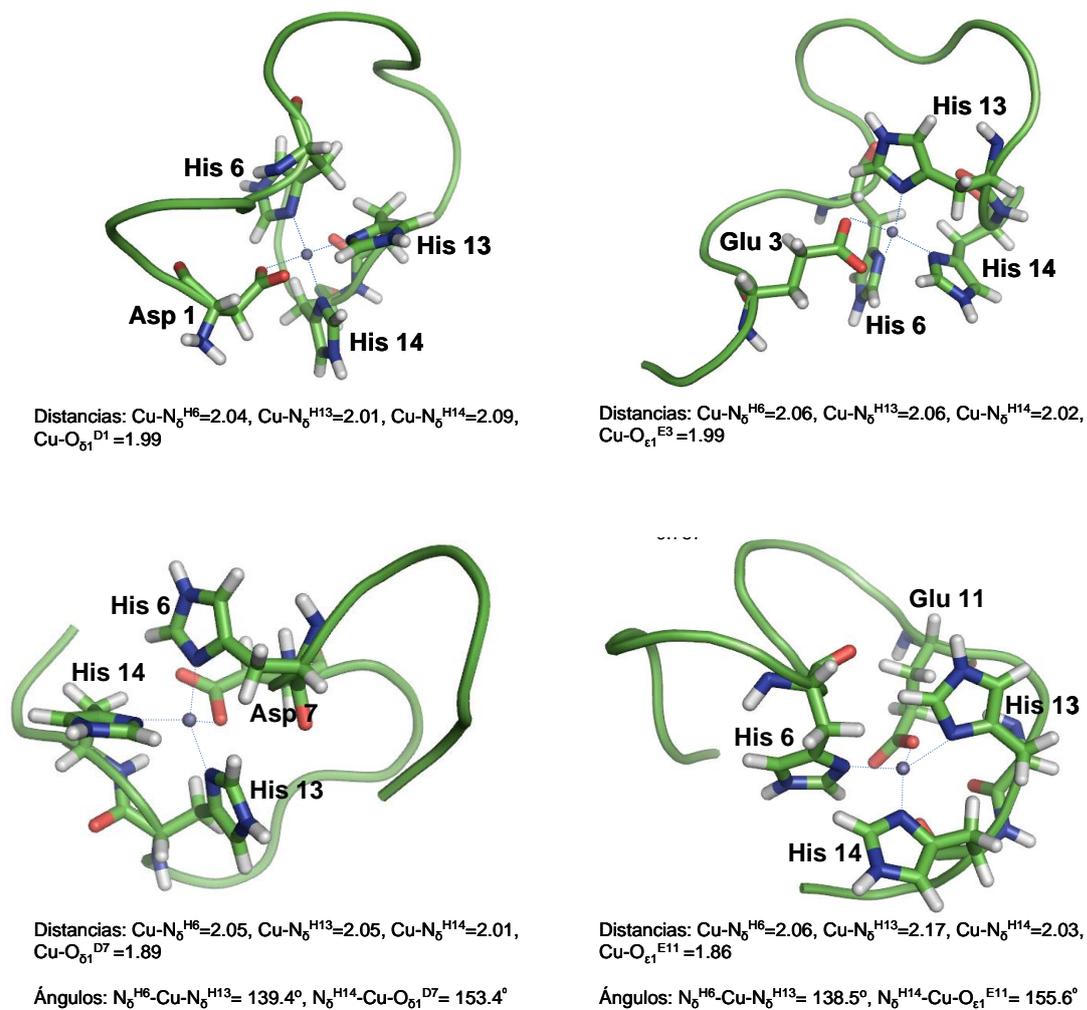
Ángulos: N $_{\epsilon}^{H6}$ -Cu-N $_{\delta}^{H14}$ = 103.6°, N $_{\delta}^{H13}$ -Cu-O $_{\delta 1}^{D7}$ = 149.9°



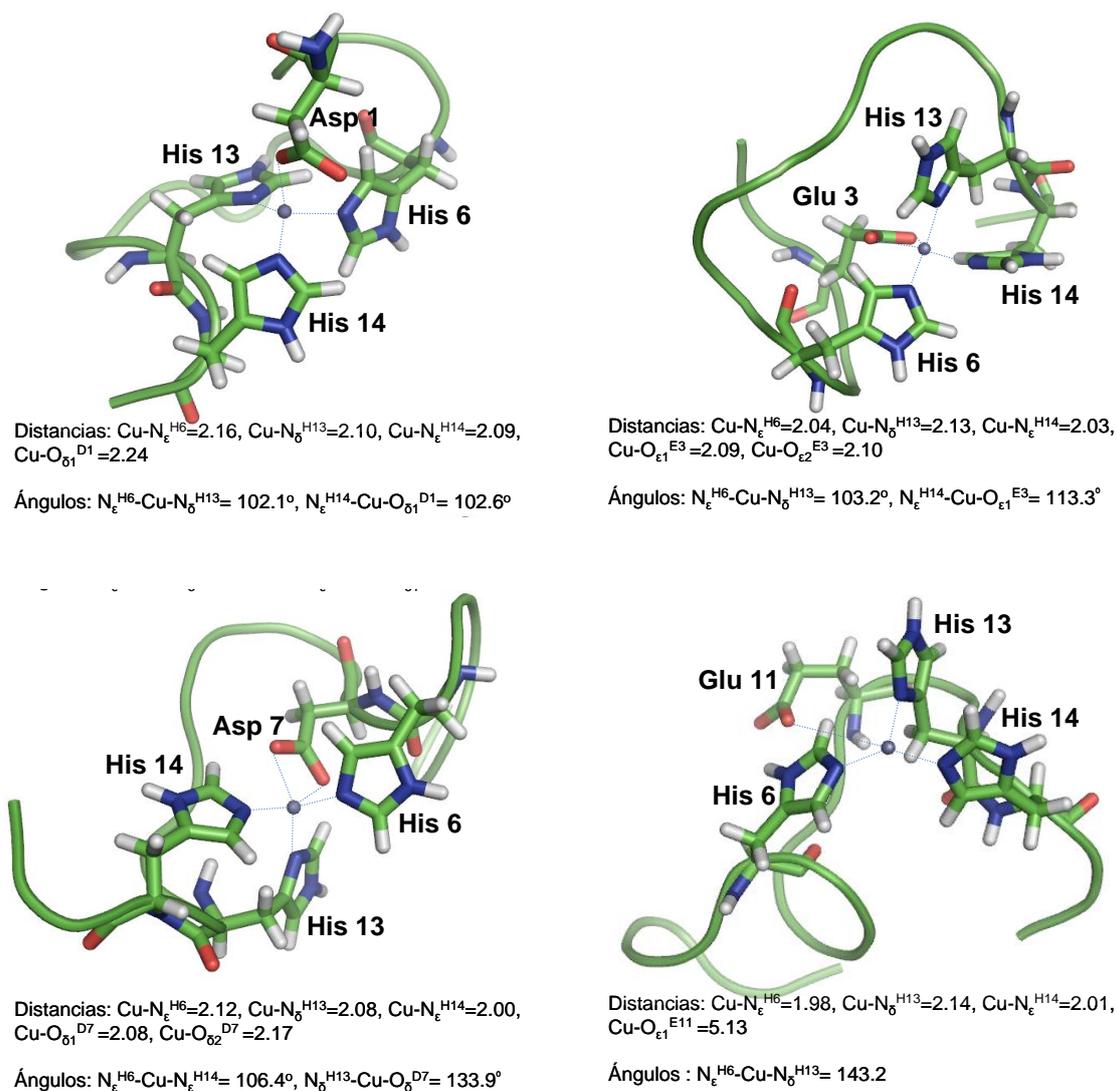
Distancias: Cu-N $_{\epsilon}^{H6}$ =2.05, Cu-N $_{\delta}^{H13}$ =2.06, Cu-N $_{\delta}^{H14}$ =2.10, Cu-O $_{\epsilon 1}^{E11}$ =1.96

Ángulos: N $_{\epsilon}^{H6}$ -Cu-N $_{\delta}^{H14}$ = 137.3°, N $_{\delta}^{H13}$ -Cu-O $_{\epsilon 1}^{E11}$ = 176.3°

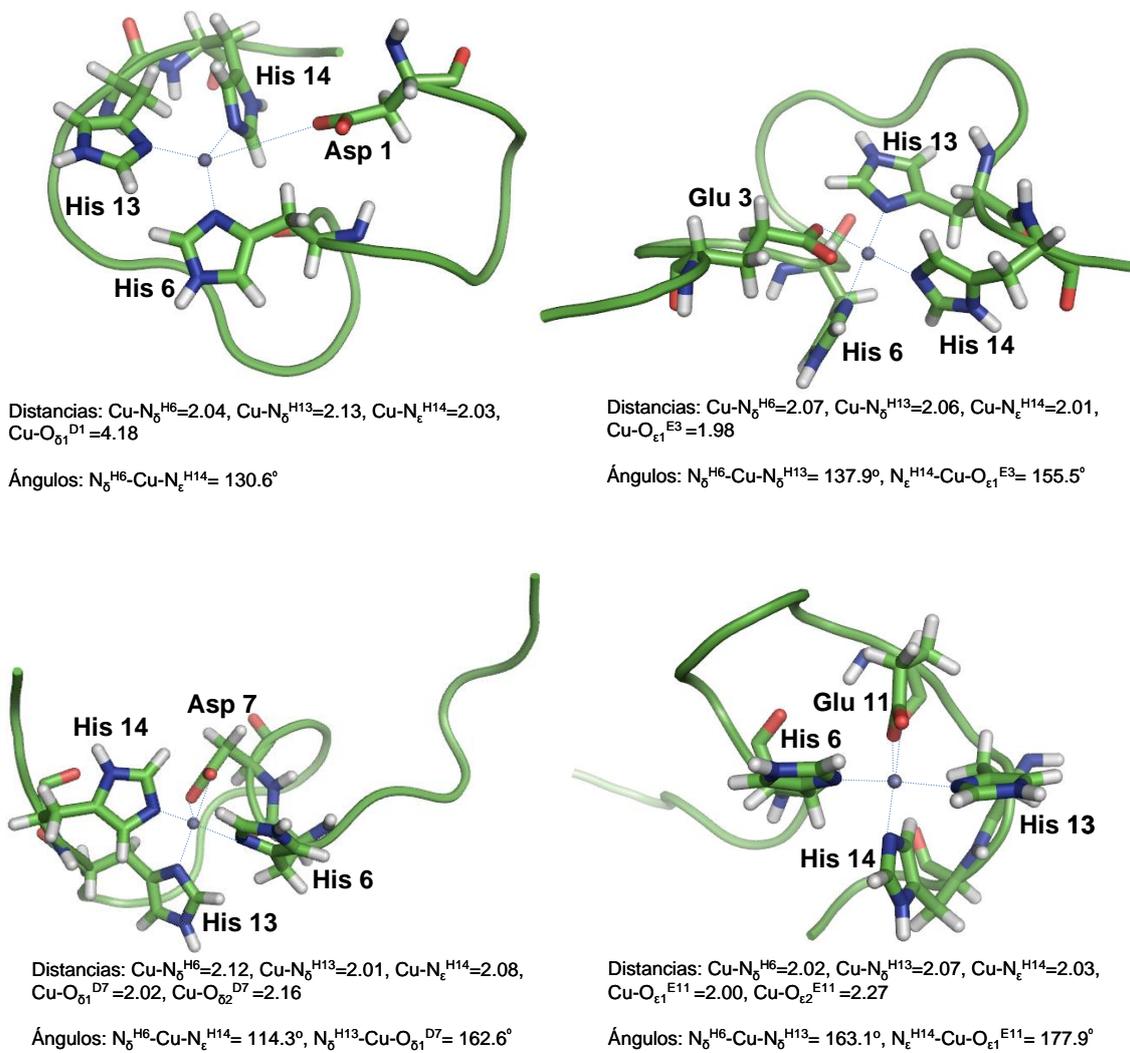
**Figura A6.3.** Modelos conteniendo el grupo COO $^{-}$ , la histidina 6 coordinada a través del N $_{\epsilon}$  y las histidinas 13 y 14 a través del N $_{\delta}$ . Todas las distancias están en Å y los ángulos en grados.



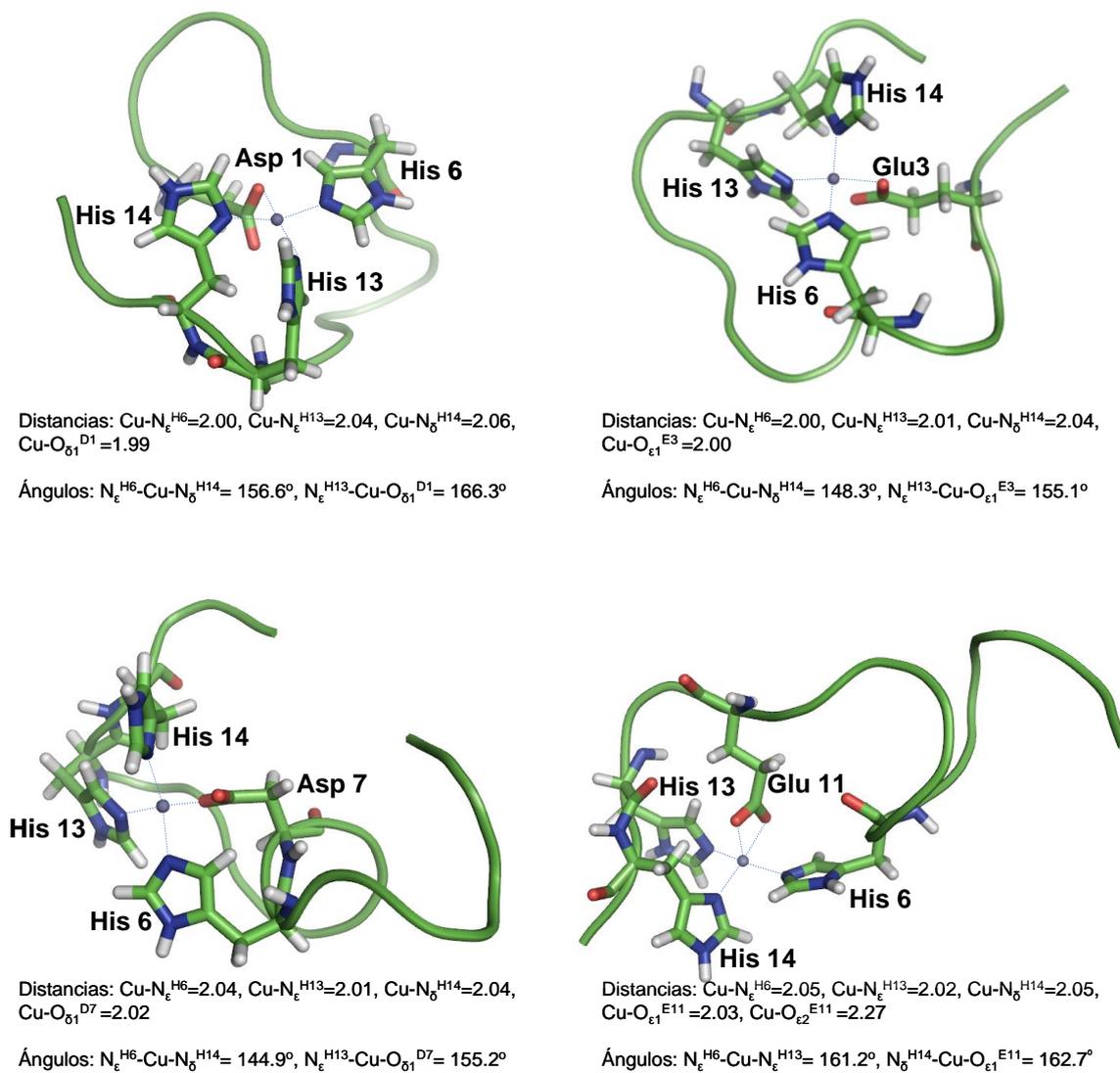
**Figura A6.4.** Modelos conteniendo el grupo COO<sup>-</sup> y las histidinas coordinadas a través del N<sub>δ</sub>. Todas las distancias están en Å y los ángulos en grados.



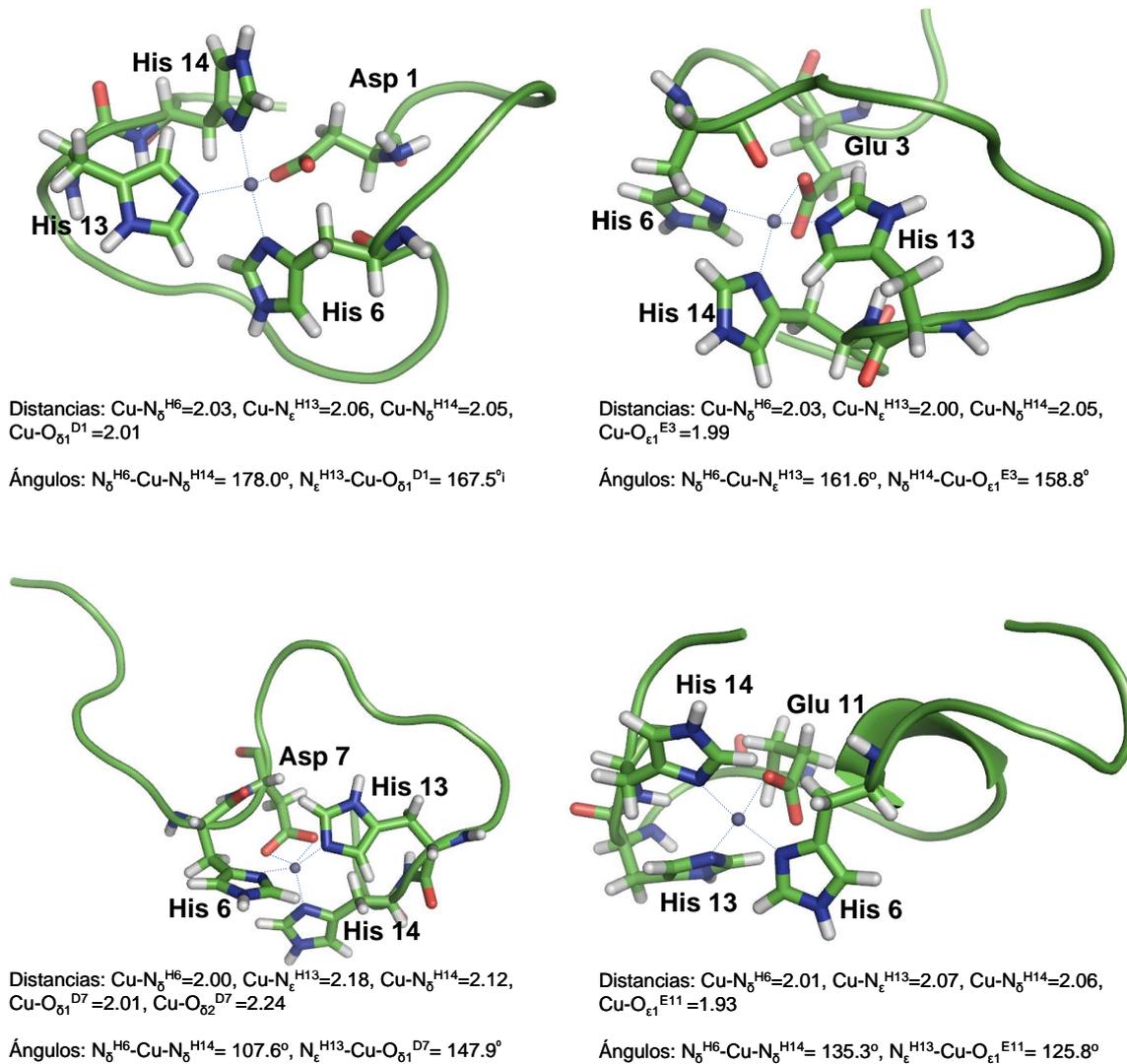
**Figura A6.5.** Modelos conteniendo el grupo COO<sup>-</sup>, las histidina 6 y 14 coordinadas a través del N<sub>ε</sub> y la histidina 13 a través del N<sub>δ</sub>. Todas las distancias están en Å y los ángulos en grados.



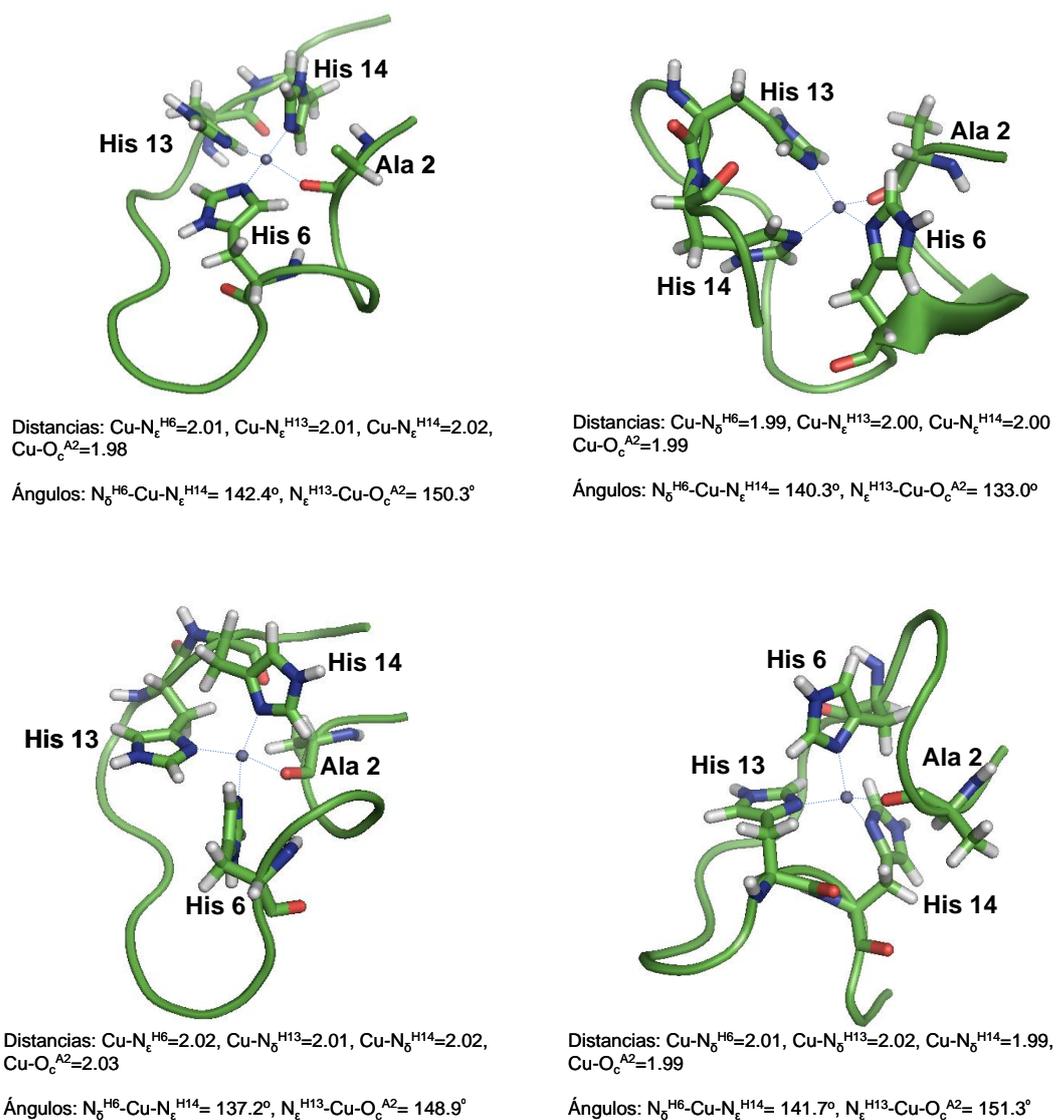
**Figura A6.6.** Modelos conteniendo el grupo COO<sup>-</sup>, las histidina 6 y 13 coordinadas a través del N<sub>δ</sub> y la histidina 14 a través del N<sub>ε</sub>. Todas las distancias están en Å y los ángulos en grados.



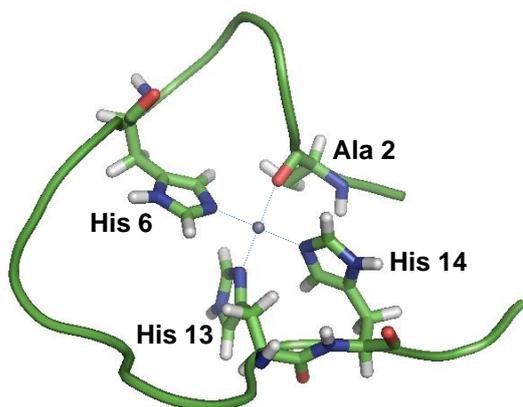
**Figura A6.7.** Modelos conteniendo el grupo COO<sup>-</sup>, las histidina 6 y 13 coordinadas a través del N<sub>ε</sub> y la histidina 14 a través del N<sub>δ</sub>. Todas las distancias están en Å y los ángulos en grados.



**Figura A6.8.** Modelos conteniendo el grupo  $\text{COO}^-$ , las histidina 6 y 14 coordinadas a través del  $\text{N}_\delta$  y la histidina 13 a través del  $\text{N}_\epsilon$ . Todas las distancias están en Å y los ángulos en grados.

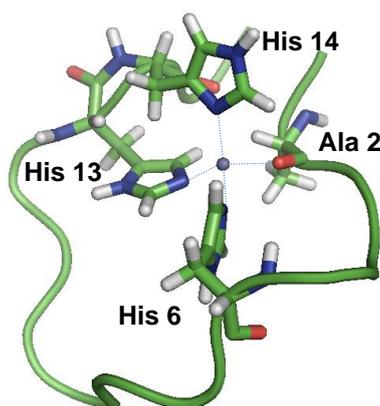


**Figura A6.9.** Modelos conteniendo el grupo  $\text{CO}_{\text{Ala2}}$ , y las histidinas coordinadas en todas sus posibles configuraciones. Todas las distancias están en Å y los ángulos en grados.



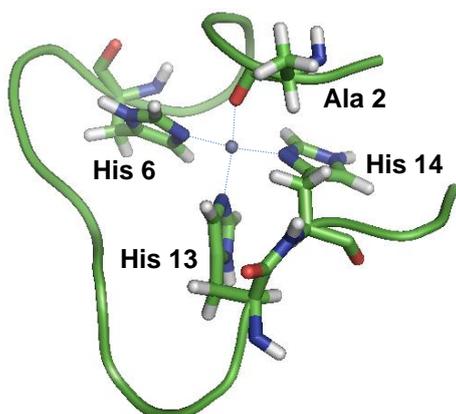
Distancias: Cu-N<sub>ε</sub><sup>H6</sup>=1.98, Cu-N<sub>δ</sub><sup>H13</sup>=2.03, Cu-N<sub>ε</sub><sup>H14</sup>=1.97, Cu-O<sub>c</sub><sup>A2</sup>=2.00

Ángulos: N<sub>δ</sub><sup>H6</sup>-Cu-N<sub>ε</sub><sup>H14</sup>= 170.9°, N<sub>ε</sub><sup>H13</sup>-Cu-O<sub>c</sub><sup>A2</sup>= 169.1°



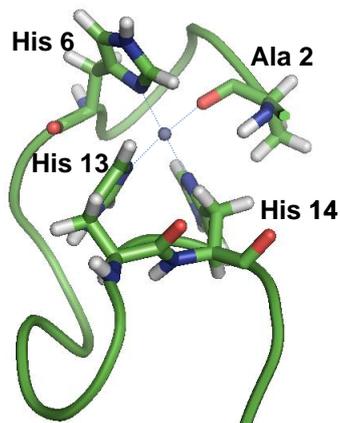
Distancias: Cu-N<sub>δ</sub><sup>H6</sup>=1.98, Cu-N<sub>δ</sub><sup>H13</sup>=2.00, Cu-N<sub>ε</sub><sup>H14</sup>=2.04, Cu-O<sub>c</sub><sup>A2</sup>=2.03

Ángulos: N<sub>δ</sub><sup>H6</sup>-Cu-N<sub>ε</sub><sup>H14</sup>= 140.5°, N<sub>ε</sub><sup>H13</sup>-Cu-O<sub>c</sub><sup>A2</sup>= 130.8°



Distancias: Cu-N<sub>ε</sub><sup>H6</sup>=1.97, Cu-N<sub>ε</sub><sup>H13</sup>=1.99, Cu-N<sub>δ</sub><sup>H14</sup>=2.00, Cu-O<sub>c</sub><sup>A2</sup>=2.01

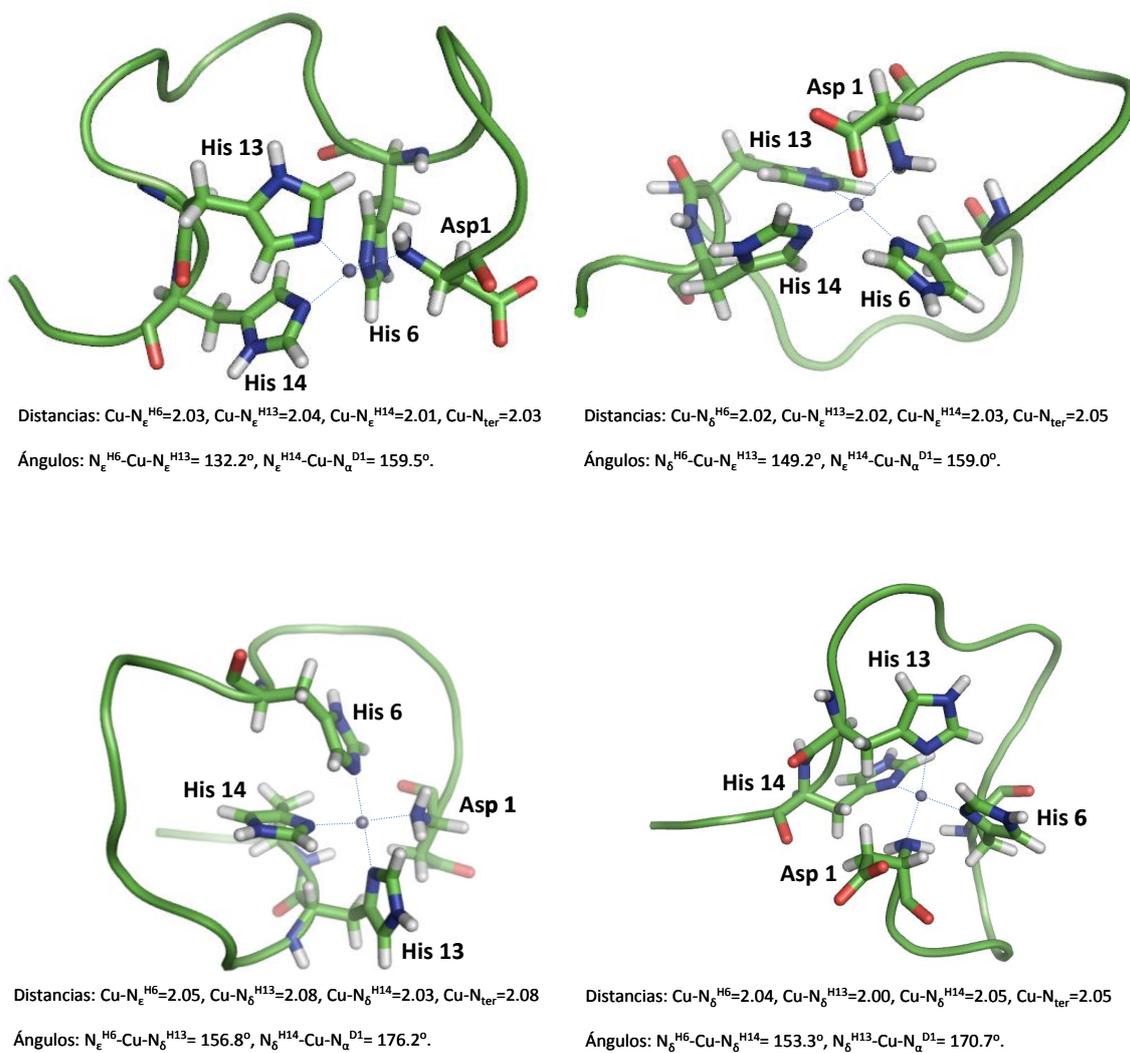
Ángulos: N<sub>δ</sub><sup>H6</sup>-Cu-N<sub>ε</sub><sup>H14</sup>= 150.3°, N<sub>ε</sub><sup>H13</sup>-Cu-O<sub>c</sub><sup>A2</sup>= 147.4°



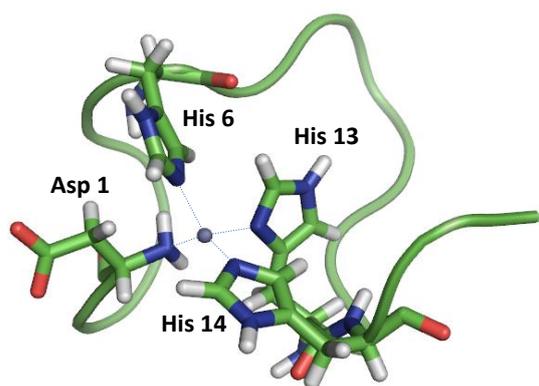
Distancias: Cu-N<sub>δ</sub><sup>H6</sup>=2.00, Cu-N<sub>ε</sub><sup>H13</sup>=1.99, Cu-N<sub>δ</sub><sup>H14</sup>=2.00, Cu-O<sub>c</sub><sup>A2</sup>=1.98

Ángulos: N<sub>δ</sub><sup>H6</sup>-Cu-N<sub>ε</sub><sup>H14</sup>= 179.2°, N<sub>ε</sub><sup>H13</sup>-Cu-O<sub>c</sub><sup>A2</sup>= 177.9°

**Figura A6.9.** Continuación.

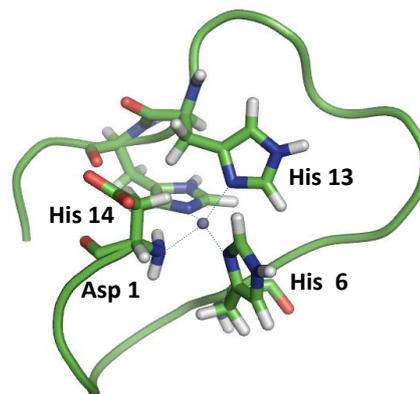


**Figura A6.10.** Modelos conteniendo el grupo N-terminal, y las histidinas coordinadas en todas sus posibles configuraciones. Todas las distancias están en Å y los ángulos en grados.



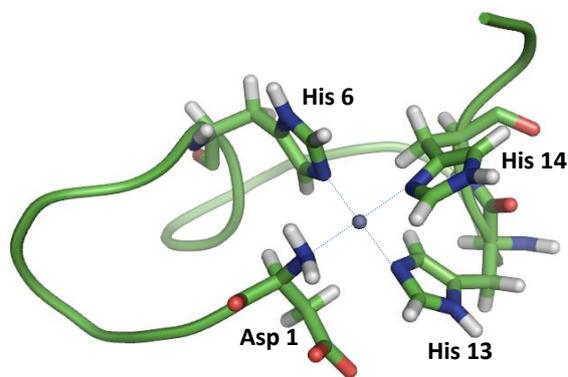
Distancias: Cu-N<sub>ε</sub><sup>H6</sup>=2.03, Cu-N<sub>δ</sub><sup>H13</sup>=2.08, Cu-N<sub>ε</sub><sup>H14</sup>=1.98, Cu-N<sub>ter</sub>=2.04

Ángulos: N<sub>ε</sub><sup>H6</sup>-Cu-N<sub>ε</sub><sup>H14</sup>= 113.8°, N<sub>δ</sub><sup>H13</sup>-Cu-N<sub>α</sub><sup>D1</sup>= 93.5°.



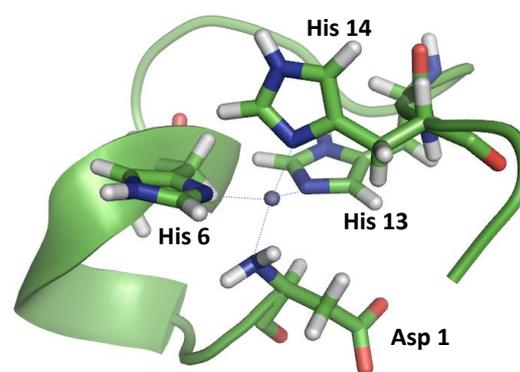
Distancias: Cu-N<sub>δ</sub><sup>H6</sup>=2.02, Cu-N<sub>δ</sub><sup>H13</sup>=2.04, Cu-N<sub>ε</sub><sup>H14</sup>=2.01, Cu-N<sub>ter</sub>=2.07

Ángulos: N<sub>δ</sub><sup>H6</sup>-Cu-N<sub>ε</sub><sup>H14</sup>= 155.6°, N<sub>δ</sub><sup>H13</sup>-Cu-N<sub>α</sub><sup>D1</sup>= 155.5°.



Distancias: Cu-N<sub>ε</sub><sup>H6</sup>=2.00, Cu-N<sub>ε</sub><sup>H13</sup>=1.99, Cu-N<sub>δ</sub><sup>H14</sup>=2.06, Cu-N<sub>ter</sub>=2.09

Ángulos: N<sub>ε</sub><sup>H6</sup>-Cu-N<sub>ε</sub><sup>H13</sup>= 151.4°, N<sub>δ</sub><sup>H14</sup>-Cu-N<sub>α</sub><sup>D1</sup>= 142.1°.



Distancias: Cu-N<sub>δ</sub><sup>H6</sup>=2.06, Cu-N<sub>ε</sub><sup>H13</sup>=2.04, Cu-N<sub>δ</sub><sup>H14</sup>=2.01, Cu-N<sub>ter</sub>=2.06

Ángulos: N<sub>δ</sub><sup>H6</sup>-Cu-N<sub>ε</sub><sup>H13</sup>= 139.7°, N<sub>δ</sub><sup>H14</sup>-Cu-N<sub>α</sub><sup>D1</sup>= 166.0°.

**Figura A6.10.** Continuación.