

## PRÁCTICO COMPUTACIONAL N° 6

### Propiedades moleculares que dependen de la densidad electrónica en moléculas y macromoléculas: trans-NMA, agua y proteínas como casos de estudio

#### Tareas a llevarse a cabo:

*Parte A: Estudio de las propiedades electrostáticas de pequeñas moléculas (trans-NMA y agua): cálculo y análisis del gap HOMO-LUMO, densidad electrónica, cargas atómicas y potencial molecular electrostático con métodos cuánticos semiempíricos.*

- Calcular la función de onda de las moléculas trans-NMA y agua con el método semiempírico PM3, determinando el gap HOMO-LUMO propio de *c/u* y cruzados como indicadores globales de reactividad propia y capacidad electro/nucleofílica de una especie frente a la otra.
- Visualizar los OM correspondientes para entender restricciones espaciales de la reacción química.
- Analizar la densidad electrónica 2D y 3D de ambas moléculas a nivel PM3.
- Visualizar el potencial electrostático de cada molécula (3D y mapeado) a nivel PM3 como forma de reconocer las regiones electro/nucleofílicas en cada molécula.
- Visualizar la distribución de carga en ambas moléculas.
- Emplear el potencial electrostático mapeado y las cargas atómicas para racionalizar la información obtenida en la Práctica N°5 sobre los complejos no covalentes más favorables que ambas moléculas pueden formar previo a su reacción química.

*Parte B: Estudio de las propiedades electrostáticas en regiones localizadas de macromoléculas (BPTI y Tripsina): cálculo y análisis del gap HOMO-LUMO, densidad electrónica, cargas atómicas y potencial molecular electrostático con métodos mixtos de frontera cuántico-clásica QM/MM.*

- Seleccionar un área de interés de la proteína BPTI a ser descripta cuánticamente (con un método semiempírico) en un cálculo de frontera clásico-cuántico
- Determinar la frontera clásico-cuántica para el cálculo mixto
- Calcular la función de onda para el fragmento cuántico elegido, representando clásicamente el resto del sistema
- Visualizar orbitales moleculares y obtener el gap HOMO-LUMO como indicador de eventual reactividad de los residuos involucrados.
- Visualizar la densidad de carga total de los residuos Lys 15 y Arg 1
- Visualizar el potencial electrostático de la proteína (3D y mapeado) de dichos residuos.
- Visualizar la distribución de carga en los residuos.

Hasta el momento hemos ido introduciendo en el desarrollo de este curso práctico la forma de calcular, visualizar e interpretar una serie de propiedades moleculares que pueden ser utilizadas para entender el comportamiento de las moléculas tanto frente a los fenómenos de reconocimiento molecular como frente a su tendencia a transformarse químicamente, sin considerar una reacción concreta.

Algunas de las propiedades ya vistas, tales como la estructura geométrica molecular (distancias, ángulos de enlace y ángulos diedros) y la energía relativa entre dos o más isómeros de una misma molécula pueden llegar ser calculadas indistintamente con cualquier tipo de método de modelado de moléculas entre los empleados en las Prácticas N° 3-5 (métodos cuánticos y clásicos). Otras propiedades que dependen de la distribución electrónica (los orbitales moleculares ya introducidos, analizando su forma y energía; el gap HOMO-LUMO que permite estimar la tendencia a reaccionar de una molécula) pueden ser únicamente calculadas usando métodos cuánticos, siendo los métodos *ab initio* y semiempíricos los que ya han sido abordados en este curso. Es por ello que al momento de elegir una estrategia de modelado para estudiar un problema concreto, uno de los primeros pasos es determinar cuáles son las propiedades moleculares de utilidad para buscar respuestas al problema, y a partir de ellas buscar un método apropiado para modelarlas.

Esta práctica se centra en el cálculo de propiedades moleculares que requieren del conocimiento de la distribución de los electrones en la molécula, empleando para ello métodos semiempíricos debido a la duración limitada en el tiempo de la práctica a realizar.

Dentro de las propiedades que aquí veremos como modelar, visualizar y analizar con estos métodos cuánticos, comenzaremos repasando el cálculo e interpretación como indicador de reactividad intrínseca y relativa del *gap HOMO-LUMO* para un par de moléculas en las que ambas pueden actuar como dadoras y/oceptoras de electrones y que ya han sido el sujeto de estudio de la primera parte de la Práctica N°5 (trans-NMA y agua) como ejemplo de interacciones no covalentes. En este caso la atención estará puesta a evaluar el papel de cada molécula en una posible reacción química entre ambas especies, anticipando qué molécula atacaría a la otra y sobre cuál región de la misma.

Trabajaremos también con la densidad electrónica tridimensional, definiendo a partir de la misma el volumen y la superficie molecular, dos elementos centrales en los fenómenos de reconocimiento molecular.

Complementaremos el estudio centrándonos en el cálculo del *potencial molecular electrostático* sobre dicha superficie molecular (que permite detectar zonas ávidas por electrones o por cargas positivas una vez calculado sobre cada punto de la superficie el efecto electrostático total creado por los núcleos y electrones de la molécula en su conjunto), permitiendo explicar a través del mismo la forma preferencial en que se reconocen y eventualmente reaccionan muchas moléculas.

Se completa este estudio con un indicador numérico arbitrario de riqueza o pobreza de electrones, las cargas atómicas, una propiedad que no es posible determinar experimentalmente (no es un observable físico), sino únicamente calculable a partir de modelos teóricos a partir de la partición arbitraria de la densidad electrónica entre los átomos que integran la molécula (procedimiento que recibe el nombre de *análisis poblacional*). Existen varias formas de definir las cargas atómicas según el tipo de esquema de análisis poblacional que utilicemos. En particular, el programa Hyperchem utiliza el método de Mulliken. Las cargas atómicas calculadas con este método sólo tienen un valor semi-cuantitativo siendo muy sensibles al conjunto de base empleado en el caso de cálculos *ab initio* o a la parametrización en el caso de métodos semiempíricos (donde por ejemplo es sabido que existe una falla general en la descripción de las cargas de los átomos de nitrógeno). A pesar de esto, las cargas atómicas derivadas del análisis poblacional de Mulliken, se calculan fácilmente, y son útiles para evaluar rápidamente tendencias en aproximación de orden cero, siempre que se tenga cuidado de no incluir en el análisis aquellos átomos que se sabe que son pobremente descriptos. En los últimos años se han desarrollado algunas parametrizaciones especiales de métodos semiempíricos orientadas a predecir cargas de alta calidad (ver mayor información en el material teórico del curso).

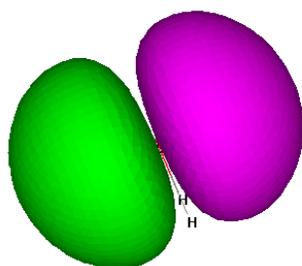
***Parte A: Estudio de las propiedades electrónicas de pequeñas moléculas (trans-NMA y agua): cálculo y análisis del gap HOMO-LUMO, la densidad electrónica, cargas atómicas y potencial molecular electrostático con métodos cuánticos semiempíricos (PM3).***

En esta primera parte trabajaremos con moléculas medianas, con el objeto de aprender a generar, visualizar, e interpretar propiedades moleculares que permiten anticipar en un proceso químico reactivo quien actúa como dador o aceptor de electrones (*gap HOMO-LUMO* cruzado), y desde qué región de su superficie se establece el proceso (potenciales electrostáticos mapeados sobre la superficie molecular), empleando para ello un método de cálculo cuántico de costo computacional contenido. También veremos como emplear los mismos potenciales electrostáticos mapeados sobre la superficie molecular para racionalizar y entender en mayor profundidad las causas de los patrones de interacciones débiles en los complejos NMA-agua estudiados en la Práctica N°5, que representan un paso previo a la posible reacción química.

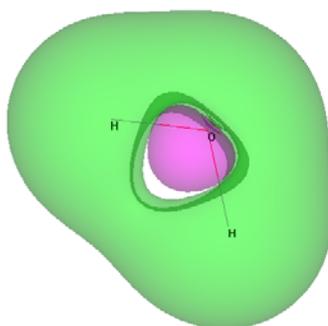
- **Cálculo del gap HOMO-LUMO en un par de moléculas e interpretación como indicador de reactividad intrínseca y relativa del agua y la NMA.**

Para esta parte del práctico utilizaremos las estructuras PM3 de las moléculas de agua y NMA optimizadas en la Práctica N°5.

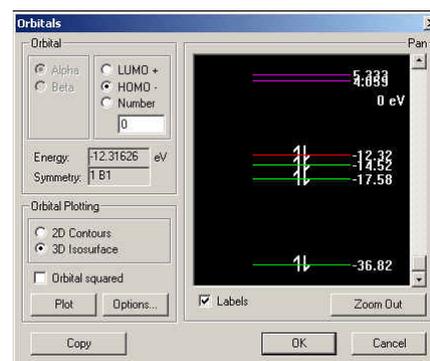
1. Con la herramienta de dibujo cree una molécula de agua y seleccione **Model Build** del menú **Build**. Abra un archivo log para el registro de la información correspondiente. Seleccione en el menú **Setup** el método semiempírico PM3 y proceda a realizar una optimización de geometría. (límite de convergencia SCF = 0.01 y un RMS de gradiente = 0.1). El cálculo debería converger de inmediato. Desde el menú **Compute** seleccione la opción **Orbitals**. Registre la energía de los orbitales HOMO y LUMO de la *agua* en el Diagrama 1, también calcule el gap de energía correspondiente.



HOMO agua

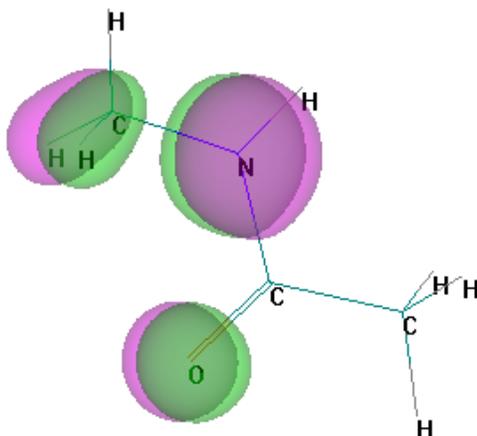


LUMO agua

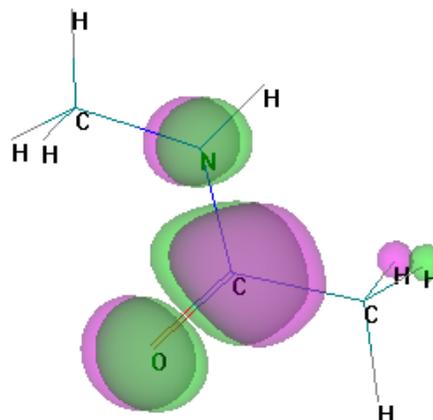


gap (ev)

2. Repita el procedimiento anterior esta vez para la molécula de *trans-NMA*.



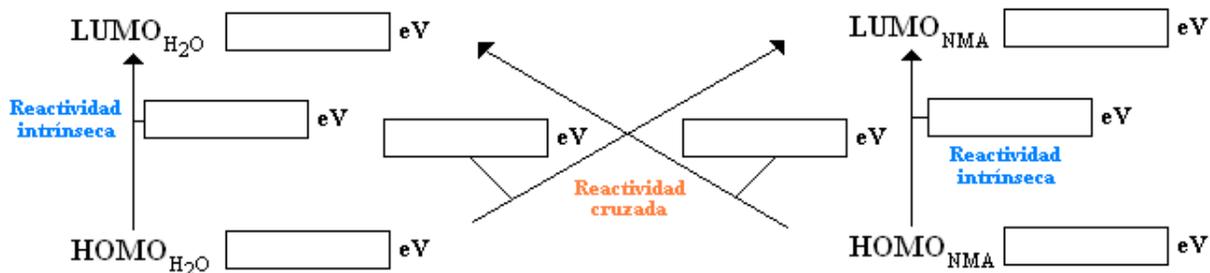
HOMO NMA



LUMO NMA

3. Compare ambos gaps de energía HOMO-LUMO. Discuta con el instructor del curso cuál de las dos moléculas tiene mayor tendencia a reaccionar, notando que esta estimación es una medida aproximada de la energía necesaria para excitar un electrón desde el HOMO hasta el LUMO de la molécula que se tiene en cuenta.

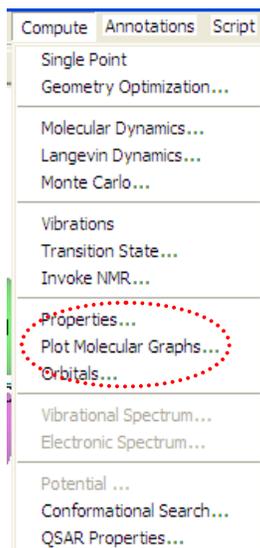
4. Considerando ahora una posible reacción entre ambas moléculas, con la ayuda del instructor defina si espera que el agua sea quien ataque cediendo electrones a la NMA (cálculo del salto HOMO-agua a LUMO-NMA) o viceversa (cálculo del salto HOMO-NMA a LUMO-agua). Complete el Diagrama 1.



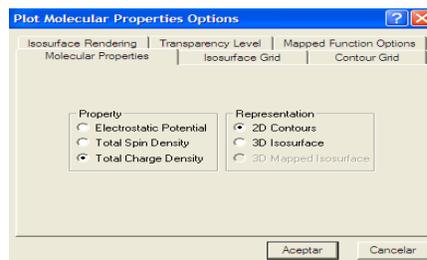
**Diagrama 1.** Índices de reactividad intrínseca y cruzada para las moléculas de NMA y H<sub>2</sub>O. El índice de reactividad intrínseca se calcula como la diferencia HOMO-LUMO para una molécula dada, mientras que la reactividad cruzada se calcula como  $HOMO_{(molécula1)} - LUMO_{(molécula2)}$ . La reactividad intrínseca nos indica que tan propensa es una molécula a reaccionar (**no confundir reactividad con estabilidad**) y los gaps cruzados sirven como indicadores de cuál de las moléculas en un par capaz de reaccionar entre sí podría ceder electrones y cuál recibirlos. Ambos índices son indicativos y brindan una aproximación de orden cero a la reactividad de las moléculas involucradas, que se completa con el estudio detallado de la reacción química y su mecanismo molecular (ver Práctico N°7)

5. ¿Esta información le permite anticipar en forma local desde qué cara y región de cada molécula estudiada esperaría se diera el proceso químico? ¿Cómo puede determinar esta característica del sistema reaccionante?

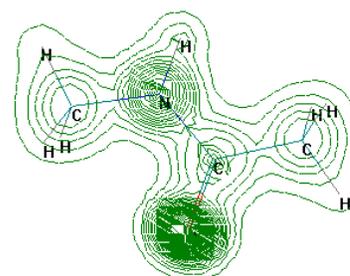
- **Analizar la densidad electrónica 2D y 3D de moléculas pequeñas a nivel PM3 y determinar la superficie molecular a partir de esta última.**



6. Proceda a generar y visualizar la densidad electrónica de la NMA. Para ello desde el menú Compute seleccione la opción Plot Molecular Graphs... Como resultado se desplegará el conjunto de opciones mostradas a la derecha para representar propiedades moleculares.

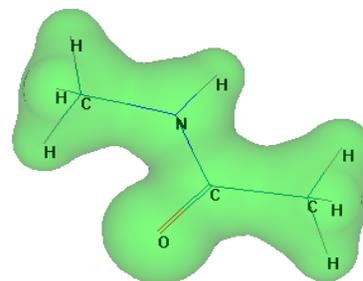


7. Seleccione en Property la opción Total Charge Density y en Representation active la opción 2D Contours. Esto le permitirá visualizar un corte bidimensional de la densidad electrónica de la molécula del estilo del mostrado en la figura aquí a la derecha.



*Note que la representación obtenida depende del plano de corte de la densidad total seleccionado. Esta propiedad se obtiene sumando sobre cada punto del plano la densidad electrónica aportada por el cuadrado del módulo de cada orbital molecular y debe ser recalculada cada vez que la molécula se rota, en tanto el plano elegido cambia. Claramente en la misma se evidencian zonas más ricas en electrones y otras más pobres.*

8. Repita ahora la generación de la densidad electrónica en 3D, activando esta vez la opción 3D Isosurface. Como resultado obtendrá ahora la representación tridimensional de la densidad electrónica total en el espacio mostrada a la derecha. Fijado el valor de la densidad electrónica en un valor de 0.01 por ejemplo, esto significa que el volumen generado contendrá el 99% de la densidad electrónica y será representativo de la superficie molecular.

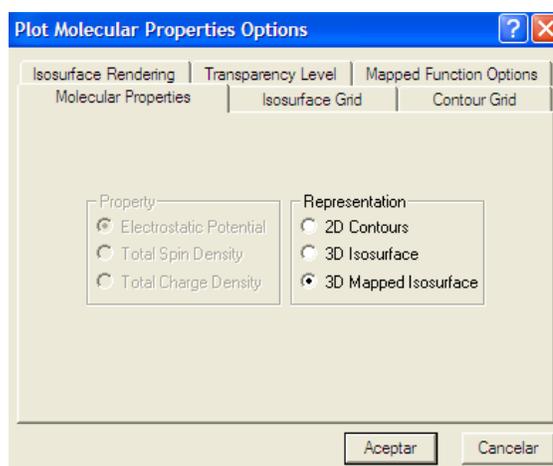


9. Repita ahora los pasos 6-8 para el caso de la molécula de agua empleando la densidad electrónica total generada a nivel PM3. Analice la posible complementariedad de las superficies de ambas moléculas.

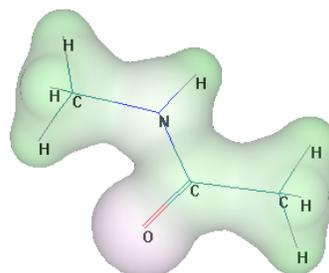
■ **Visualizar el potencial electrostático de cada molécula (3D y mapeado) a nivel PM3**

10. Vuelva a cargar la NMA y calcule su función de onda a nivel PM3.

11. En el menú Plot Molecular Properties Options seleccione ahora la propiedad Electrostatic Potential. Observe que como se muestra en la figura de aquí abajo, esto activa una tercera posibilidad para la representación. Las dos primeras de ellas se explorarán en la parte B del presente práctico, elija ahora la tercera, 3D Mapped Isosurface. Esto hace que el programa calcule el valor del *potencial electrostático molecular* sobre la superficie de la molécula en las zonas expuestas al contacto de la misma.

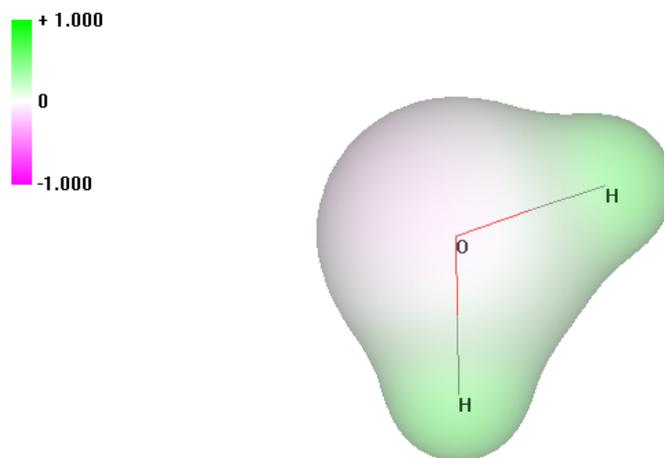


Como resultado obtendrá representaciones similares a la mostrada en la figura de aquí abajo para la NMA. Note que el potencial electrostático es el resultado de considerar el efecto generado en un punto del espacio tanto por la densidad electrónica negativa de la molécula como por los núcleos positivos (o bien los cores nucleares en el caso de usar métodos semiempíricos como el PM3). Por tanto esta propiedad es importante para determinar la nucleofilicidad o electrofilicidad de las distintas regiones de la superficie de la molécula.



Note que desde la solapa Mapped Function Options puede modificar el rango de valores de potencial molecular electrostático representados sobre la superficie para lograr acentuar los cambios de colores en la escala. Ensaye distintas representaciones cambiando los valores límite de mapeo.

12. Repita los pasos 10 y 11 para el caso de la molécula de agua. Como resultado debería obtener un potencial molecular electrostático mapeado similar al mostrado en la siguiente figura:

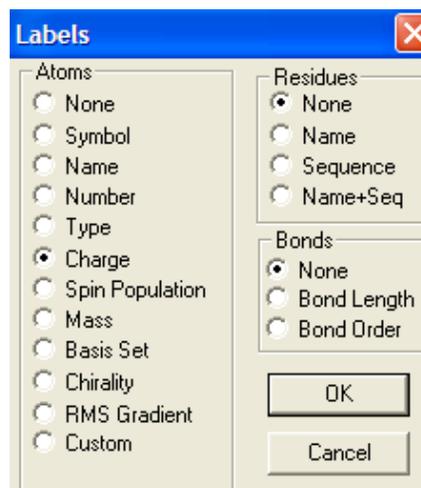


13. Compare ahora los potenciales electrostáticos moleculares (MEP) mapeados sobre la densidad electrónica de ambas moléculas. A partir de estas representaciones discuta con el instructor del curso cuáles serían las orientaciones relativas más favorables de ambas moléculas tanto para la formación de complejos NMA-agua no covalentes, como frente a la reacción química de adición nucleofílica que puede darse entre ellas una vez que las moléculas se hallan próximas entre sí. ¿Coincide esta observación con los resultados obtenidos en la Práctica N°5 en cuanto a la estabilidad relativa de los distintos complejos débiles estudiados?

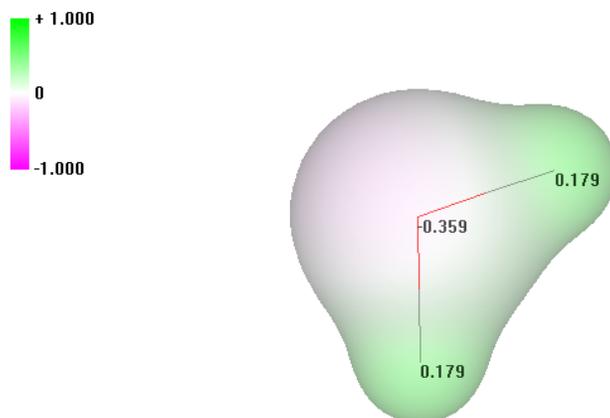
▪ **Visualizar las cargas atómicas de Mulliken en ambas moléculas**



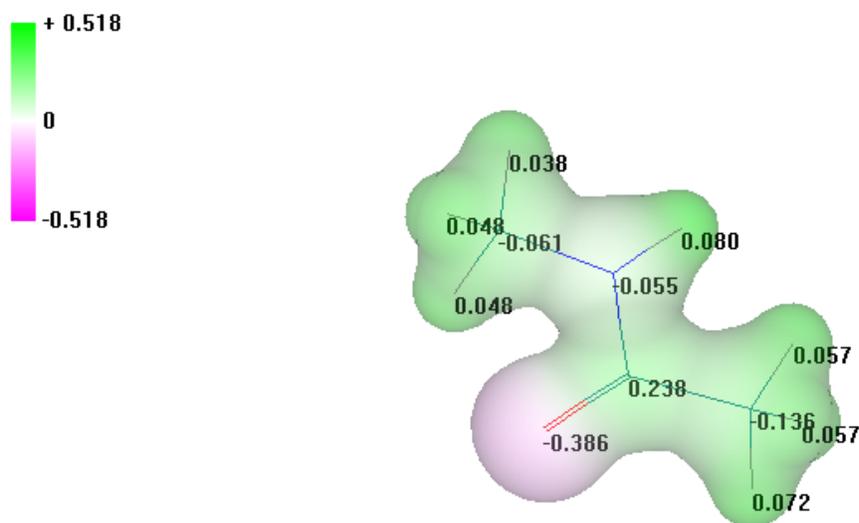
14. Teniendo en pantalla el MEP mapeado del agua, vaya al menú Display y seleccione la opción Labels. En la caja de diálogo que se despliega proceda a activar la opción Charge.



Esto le permitirá evidenciar las cargas atómicas de Mulliken evaluadas al nivel de cálculo PM3. Discuta con su instructor la consistencia entre los valores de las cargas obtenidas (propiedad no observable) respecto al Potencial Electrostático Molecular que generan. En este caso debería obtener una figura similar a la siguiente:



15. Repita el procedimiento del punto 14 para la molécula de NMA. Obtendrá una imagen similar a la de la figura:



- Emplear las propiedades anteriores para identificar que región de la NMA/agua actuaría como dadora de electrones en el proceso por una parte y para racionalizar la información obtenida en la Práctica N° 5 sobre los complejos más favorables entre ambas moléculas.

### **Parte B: Estudio de las propiedades electrostáticas de regiones de una proteína con métodos mixtos de frontera**

Cuando se trabaja con macromoléculas biológicas (por ej. proteínas y ácidos nucleicos) las estructuras presentan un nivel de complejidad mucho mayor que el observado en los sistemas relativamente simples y pequeños que hemos estudiado en forma detallada en las Prácticas N° 3-5 y en la parte A de la Práctica N° 6. En esta segunda parte de la práctica se obtendrá información estructural correspondiente a una proteína pequeña a partir de un archivo PDB. (Recuerde que en las Prácticas N° 1 y N° 2 ya se introdujeron formas de obtener y visualizar en el PC la estructura de macromoléculas usando bases de datos y archivos PDB). La misma será tomada como punto de partida para el cálculo de sus propiedades electrostáticas, aspecto que resulta fundamental para poder entender la actividad biológica de esta proteína. El cálculo de este tipo de propiedades hace imprescindible el empleo de métodos cuánticos, sin embargo, en la Práctica N° 4 se ha ya visto que el uso de los mismos se vuelve sumamente costoso a medida que las dimensiones del sistema molecular aumentan. Para resolver este problema, en la presente práctica se introduce el empleo de la estrategia conocida como métodos mixtos de frontera cuántica-clásica (QM/MM) en los simultáneamente en el mismo cálculo que se describe cuánticamente una región del sistema molecular que requiere detalle electrónico y el resto del sistema se describe clásicamente.

La proteína que utilizará en este estudio es el inhibidor de la tripsina pancreática bovina, más comúnmente conocida bajo la sigla BPTI, cuya estructura geométrica ya fuera analizada en la Práctica N° 2. Recuerde que la misma presenta una estructura primaria compuesta de una única cadena polipeptídica de 58 aminoácidos y una estructura secundaria que presenta  $\alpha$ -hélices y hojas plegadas  $\beta$ . Su estructura terciaria es estabilizada por medio de tres puentes disulfuro establecidos entre residuos cisteína del polipéptido. El conocimiento de la estructura tridimensional de las macromoléculas es uno de los aspectos importantes necesarios para entender su actividad biológica.

La acción inhibitoria de la BPTI tiene lugar a través de la interacción electrostática entre la cadena lateral del residuo **Lys 15** del inhibidor y la cadena lateral de un residuo ubicado en el sitio activo de la tripsina, dando lugar a la formación de un complejo inhibidor-enzima muy estable. Para entender el mecanismo de acción de este inhibidor, resulta necesario tener información detallada sobre la distribución de carga en este residuo en presencia del campo de los restantes núcleos y electrones de la BPTI.

Como ya hemos visto en la Práctica N° 4, con los recursos computacionales disponibles para el práctico y considerando las dimensiones de la molécula de la BPTI a estudiar, la Mecánica Molecular (el tipo de metodología de cálculo más ampliamente usada para el estudio de macromoléculas) sería por su rapidez el método a elegir si el factor tiempo de cálculo fuese el único determinante en la elección. Sin embargo, ya hemos discutido previamente que a diferencia de los métodos Mecánico-Cuánticos, la Mecánica Molecular (MM) no trata explícitamente a los electrones. Debido a esto, la MM no permite describir los procesos de formación y ruptura de enlaces, ni estudiar sistemas en los cuales la deslocalización electrónica o las interacciones entre orbitales moleculares juegan un rol preponderante en la determinación de la geometría o propiedades de la estructura molecular. Todo esto limita entonces considerablemente el tipo de propiedad que podemos estudiar con un método de MM.

Una solución que permite obtener resultados a un nivel de descripción de estructura electrónica con un costo computacional relativamente reducido, consiste en combinar en el mismo cálculo la rapidez de la MM y la descripción de la estructura electrónica obtenida con los métodos basados en la Mecánica Cuántica, aplicando lo que se llama un *cálculo de tipo mixto "clásico-cuántico" o técnica de frontera "clásica-cuántica"*. En este tipo de procedimiento una parte del sistema molecular es descrito cuánticamente (por ejemplo el sitio activo de una enzima) y el resto del sistema es representado mediante un campo de fuerza de MM (por ej., el resto de la estructura de la enzima que no forma parte de su sitio activo).

La implementación de estas técnicas de frontera propia del programa Hyperchem tiene limitaciones prácticas (asociadas únicamente al modo en que han sido programadas en este paquete y no a su concepción teórica propiamente dicha) en la forma en que se establece la frontera entre los métodos clásicos y cuánticos:

- a) en Hyperchem podemos combinar cálculos *ab initio* con un campo de fuerza Amber, pero la frontera entre las dos regiones debe establecerse entre moléculas no ligadas químicamente, no puede darse dentro de una misma molécula (esto implica que este tipo de combinación *ab initio*-MM sólo puede aplicarse a estudios que impliquen la consideración de un mínimo de dos moléculas, como por ejemplo los complejos entre *trans*-N-metilacetamida y agua que estudió en la práctica pasada).
- b) al combinar *métodos semiempíricos* con el campo de fuerza Amber en Hyperchem es posible establecer la frontera dentro de la misma molécula. Esto permite, por ejemplo, estudiar una porción de interés de una única molécula de proteína como una región cuanto-mecánica (y por lo tanto permite estudiar propiedades que dependen de la estructura electrónica) describiendo el efecto de las regiones restantes a través de su campo de fuerza.

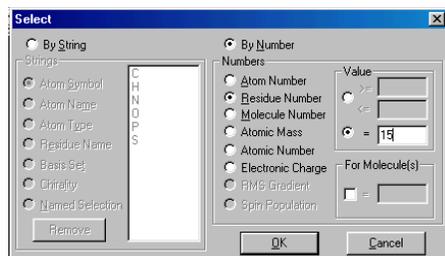
Aparte de la energía y la estructura de las moléculas, ya hemos comentado que la carga atómica en las moléculas es una propiedad molecular importante que no puede ser determinada experimentalmente y que requiere el tratamiento cuántico del sistema. Las cargas atómicas calculadas con este programa siguen el esquema de partición de Mulliken, el cuál sólo tienen un significado cualitativo, siendo muy sensibles al conjunto de base empleado en el caso de cálculos *ab initio* o a la parametrización usada en el caso de cálculos semiempíricos. A pesar de esto, las cargas atómicas derivadas del análisis poblacional de Mulliken, se calculan fácilmente, y son útiles para evaluar, por ejemplo, la contribución de tipo electrostático a la energía potencial del sistema en el contexto de un campo de fuerza. De esta forma, un cálculo semiempírico aplicado a una región de interés de una molécula, permite obtener información sobre el conjunto de cargas atómicas que pueden usarse posteriormente para mejorar las cargas usadas en un cálculo de Mecánica Molecular con el fin de estudiar la interacción de esa región con el resto de la molécula a través del cálculo de frontera.

En este práctico se llevará a cabo un cálculo mixto o de frontera sobre la proteína BPTI combinando un cálculo semiempírico ZINDO *single-point* sobre una región de interés en la misma y un tratamiento clásico para el resto de la molécula. Como resultado del cálculo *single-point* podremos obtener propiedades electrostáticas de la molécula, o de una selección de átomos de la molécula en este caso. Estas propiedades incluyen la energía potencial, las derivadas de la misma, el potencial electrostático, las energías de los orbitales moleculares, etc.

▪ **Elección del área de interés para el cálculo de frontera semiempírico/MM.**

Antes de proceder al cálculo de frontera, se debe especificar sobre que parte de la molécula se realizará el cálculo semiempírico; en este caso nos centraremos en primer lugar sobre el residuo de **Lys 15**.

16. Obtenga la estructura cristalográfica de la BPTI a partir del archivo PDB como ya realizó en la Práctica N°2. Recuerde eliminar las moléculas de agua presentes.
17. Elimine cualquier selección de átomos que haya realizado previamente. Seleccione el residuo Lys 15 mediante la opción Select del menú Select.



Presionando la barra espaciadora se puede centrar el residuo en pantalla de modo de facilitar su orientación para una mejor visualización del área de interés.

#### ▪ Determinación de la frontera clásico-cuántica

18. Determine correctamente la frontera entre la parte clásica y mecánico-cuántica del cálculo. Hyperchem trata a cada átomo seleccionado en forma estrictamente mecánico-cuántica, mientras que todo átomo que no esté seleccionado pero que esté enlazado a uno que sí lo está, es tratado como un átomo de frontera.

**Nota 1:** La frontera se ubica en la mitad del enlace entre un átomo seleccionado y uno no seleccionado, siendo ambos átomos incluidos en el cálculo mecánico-cuántico. Los átomos seleccionados se encuentran en su forma habitual, los átomos de frontera son por su parte sustituidos por pseudo-átomos de flúor, parametrizados de forma de presentar en la medida posible la misma electronegatividad y características que los verdaderos átomos de frontera poseen. Los demás átomos de la proteína descriptos clásicamente se representan en el contexto del campo de fuerza AMBER como cargas puntuales y así es como son vistos por los átomos que son tratados en forma mecánico-cuántica.

19. Es aconsejable que la frontera se establezca en uno o más enlaces simples entre dos átomos con hibridación  $sp^3$ . La opción *Extend to  $sp^3$*  del menú *Select* extiende la selección actual en todas las direcciones hasta que encuentra un enlace  $sp^3-sp^3$  o alcanza el final de la molécula.

**Nota 2:** Dado que Hyperchem considera a los átomos de N enlazados a tres átomos y a los átomos de C enlazados a cuatro átomos como  $sp^3$ , la frontera en una cadena peptídica puede darse en el enlace  $N-C_{\alpha}$ .

#### ▪ Cálculo de la función de onda de la región cuántica con el método ZINDO.

20. Determine si el sistema seleccionado presenta una carga formal neta, analizando si los átomos de nitrógeno se encuentran protonados. Para ello visualice los átomos de hidrógeno (*Show Hydrogens* en el menú *Display*) y los símbolos de los átomos. Observe que el átomo de nitrógeno de la cadena lateral de la Lys está enlazado a tres átomos de hidrógeno y uno de carbono, por lo que está protonado. Por lo tanto la parte de la molécula que se ha seleccionado para el cálculo mecánico-cuántico es un ión monovalente con una carga +1.
21. Una vez determinada la carga adecuada proceda a realizar un cálculo *single-point* eligiendo previamente el método semiempírico ZINDO. Utilice un límite de convergencia de  $1e-005$  para el cálculo SCF.

### ¡Atención!!!

**En este caso se escogió el método ZINDO a efectos que el alumnado tome contacto con otra opción entre los métodos semiempíricos disponibles con el Hyperchem. Esto no implica que sea el mejor para este u otros casos en los que se realice un cálculo de frontera, la elección depende del programa y la naturaleza química del sistema a estudiar.**

22. Tome nota del valor final de la energía obtenida con este cálculo.

- **Visualización de orbitales moleculares**

23. Aprovechando la obtención de la función de onda se puede analizar la reactividad global de los residuos involucrados en la región cuántica. Como se estudio en la Práctica N°3, la diferencia energética de los orbitales moleculares ( $\Delta E = \text{LUMO} - \text{HOMO}$ ) es un indicativo de la reactividad de las moléculas. Proceda a tomar nota del gap HOMO-LUMO registrándolo en la Tabla 1.

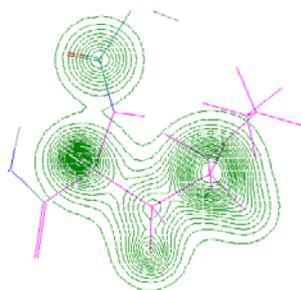
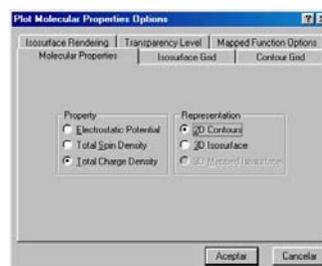
**Nota 3:** si bien esta información no es relevante para el reconocimiento BPTI-Tripsina, que es de naturaleza no covalente, un estudio de este tipo puede ser muy pertinente a la hora de caracterizar una reacción química entre un sustrato y una enzima.

- **Visualización de la densidad de carga total**

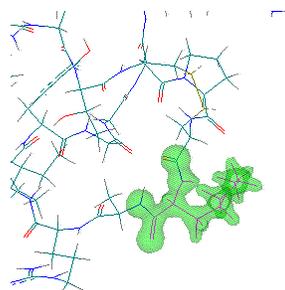
24. Elija la opción Plot Molecular Graph... en el menú Compute.

25. En la caja de diálogo desplegada seleccione la opción Total Charge Density y 2D Countour.

Esta combinación de opciones permite visualizar la densidad de carga electrónica total correspondiente a los electrones de valencia del residuo seleccionado. Note que si rota la molécula, deberá recalcular la densidad electrónica al cambiar el plano que define las 2D. En la página siguiente puede observar la representación correspondiente a un corte específico.



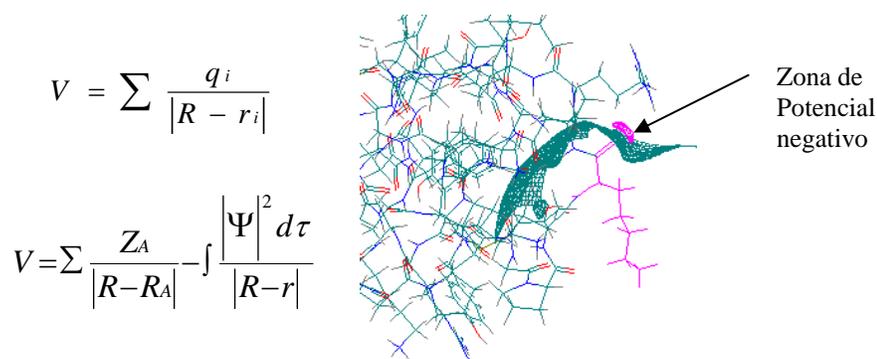
26. Repita la visualización de la densidad total electrónica con la opción 3D Isosurface. Podrá observar nuevamente que mientras que la representación en 2D requiere ser calculada cada vez que se rota la molécula, la representación en 3D se puede apreciar sin problemas desde varios puntos de observación. El análisis de esta propiedad permite establecer cuales zonas del sistema en estudio son más o menos ricas en electrones y la forma de la envolvente de la densidad electrónica. Proceda a capturar la imagen de la densidad electrónica en 3D.



▪ **Visualización del potencial electrostático molecular del residuo Lys 15**

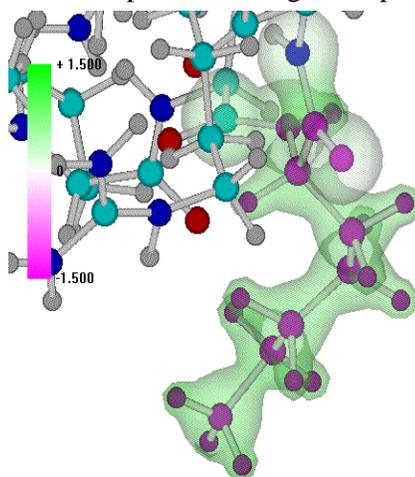
27. Active las opciones Electrostatic Potential y 3D isosurface de la caja de diálogo Plot Molecular Graph del menú Compute.

En pantalla se visualiza el potencial electrostático generado por las cargas nucleares puntuales y la distribución de carga electrónica total continua (ver ecuaciones abajo-izquierda).



El potencial electrostático describe la interacción de una carga positiva puntual de prueba en un punto del espacio con la distribución total de carga del sistema. Las líneas verdes representan curvas isopotenciales de valor positivo, mientras que las líneas violetas representan curvas isopotenciales negativas. El potencial electrostático es útil para encontrar sitios de interacción y reacción en una molécula: especies cargadas positivamente tenderán a aproximarse y eventualmente atacar químicamente allí donde el potencial electrostático sea fuertemente negativo (*ataque electrofílico*) mientras que especies cargadas negativamente lo harán allí donde el potencial sea fuertemente positivo (*ataque nucleofílico*). Proceda a capturar la imagen que permite visualizar el potencial electrostático. Con ayuda del instructor complete la figura que se muestra en la Tabla 1.

28. Active las opciones Electrostatic Potential y 3D Mapped isosurface. En este caso se representa el valor del potencial electrostático sobre la superficie que contiene el 99% de la densidad electrónica, permitiendo visualizar al mismo tiempo la superficie molecular y el valor del potencial sobre la misma. Capture una imagen del potencial electrostático mapeado.



- **Análisis comparativo de la densidad de carga total y potencial electrostático de los residuos Arg1 y Lys15.**

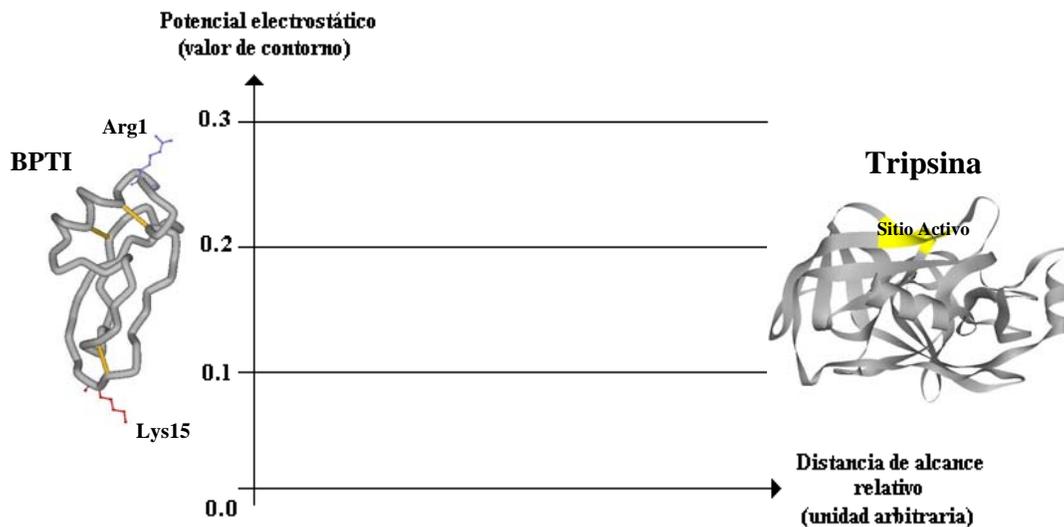
Repita los pasos 17-26 del cálculo de frontera, esta vez seleccionando el residuo de Arginina 1. Tenga en cuenta que este residuo cuenta con un átomo de carbono que está unido sólo a tres átomos (dos grupos  $\text{NH}_2$  y otro nitrógeno) por lo que corresponde a un grupo conjugado positivamente cargado. Por lo tanto la parte de la molécula que se ha seleccionado para el cálculo mecánico-cuántico es un ión divalente con una carga +2. Recuerde capturar las imágenes de densidad de carga, potencial molecular electrostático en 3D y mapeado sobre la superficie molecular definida a partir de la densidad electrónica total. Compare los resultados obtenidos con los correspondientes al tratamiento cuántico del residuo Lys 15.

**Tabla 1.** Comparación de algunas propiedades en los residuos **Lys15** y **Arg1** que juegan un rol importante en su interacción reactiva (covalente) y no reactiva (no covalente) frente a otras moléculas.

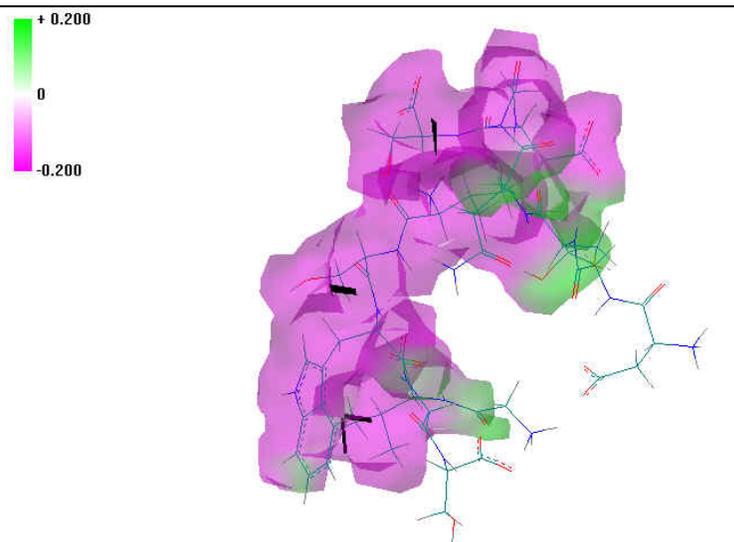
Índice de Reactividad Intrínseca (frente a la posibilidad de reaccionar químicamente).

	HOMO (eV)	LUMO (eV)	HOMO-LUMO
<b>Lys15</b>			
<b>Arg1</b>			

Potencial electrostático 3D. Representación cualitativa del alcance en la interacción.



- **Relacionando las conclusiones obtenidas en el análisis anterior con información proveniente de cálculos teóricos sobre algunos residuos del sitio activo.**



La figura que se muestra a la izquierda representa el potencial electrostático molecular mapeado sobre la superficie de algunos residuos del sitio activo de la *tripsina pancreática bovina* obtenido con un cálculo *single point* con el método ZINDO sobre una selección de residuos del sitio activo en la estructura cristalográfica correspondiente.

A partir de la información de esta figura y la recabada en este práctico (potenciales mapeados de los residuos del inhibidor de tal enzima) analice junto con el instructor el tipo de interacciones que se estarían dando al formarse el complejo enzima-inhibidor,

hallando evidencias para fundamentar porqué la **Lys 15** interacciona directamente con el sitio activo.

#### Cuestionario sobre la parte A.

1. ¿Cuál de las dos moléculas (NMA o agua) es más reactiva? ¿Por qué?

---



---



---



---

2. ¿Qué molécula estaría cediendo sus electrones en la interacción? ¿En base a qué propiedad lo define?

---



---



---



---

3. ¿Las predicciones anteriores tienen carácter indicativo (tendencias) o definitivo (hecho comprobado)? Justifique.

---



---



---



---



