

Estructura Electrónica y Dinámica Molecular de los Disacáridos Trehalosa, Maltosa y Sacarosa.

Un estudio del Mecanismo de Bioprotección

Tesis de doctorado

SILVANA CARINA PAMIES

Presentada ante la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata como requisito para la obtención del grado académico de

DOCTOR EN INGENIERIA

Dirección de Tesis:

Director: Dr. Eduardo A. Castro

Co-Directora: Dra. Gladis Laura Sosa

Jurado de Tesis:

Dra. Nora Beatriz Okulik

Dr. Reinaldo Pis Diez

Dr. Sebastián Antonio Andujar

Fecha de la defensa oral y pública: 9 de Agosto de 2022

Agradecimientos:

A los doctores Eduardo Castro y Laura Sosa por haberme permitido tener el honor de que sean mi director y codirectora de tesis respectivamente. Muy especialmente a Laura, por haberme invitado a ser miembro del Grupo Quitex e impulsarme a esta aventura que fue el doctorado, por todo el tiempo que invirtió en mi tesis quitándoselos a sus nietos que tanto adora y por sus palabras de aliento, junto a Nicolai, dudaba de mi trabajo hechos durante meses.

Al Dr. Nicolai Petelski por su enorme colaboración, sugiriendo y debatiendo ideas, cediendo su computadora para cálculos y dándole su toque artístico a los gráficos y a la hermosa portada de esta tesis. ¡Gracias Laura y Nico por confiar en mí más que yo misma!

A los demás integrantes del grupo Quitex, porque hemos formado un hermoso ambiente de trabajo.

A la Facultad Regional Resistencia de la Universidad Tecnológica Nacional, por permitirme crecer allí, desde que ingresé como una estudiante de ingeniería química hasta mi presente actual como docente e investigadora.

A mis padres y hermana por toda su ayuda ¡y porque sé que siempre puedo contar con ustedes!.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a las razones de mi vida, Iara y Thiago, por el amor y el orgullo que me dan, y por toda su comprensión con el tiempo que no les pude dedicar.

ÍNDICE

▪ Agradecimientos	II
▪ Índice	III
▪ Índice de figuras	V
▪ <i>Resumen:</i>	1
▪ <i>Capítulo I:</i>	4
1.1. Introducción	5
1.2. Modelos e Hipótesis	7
1.3. Referencias	10
▪ <i>Capítulo II: Teoría y Métodos</i>	14
2.1. Introducción	15
2.2. Métodos de Estructura Electrónica	15
2.3. Dinámica Molecular	21
2.3.1. Las ecuaciones de Dinámica Molecular	22
2.3.2. Los propagadores de Dinámica Molecular	28
2.3.3. Condiciones de la Dinámica	29
▪ Dinámica Molecular a temperatura constante	30
▪ Dinámica Molecular a presión constante	32
2.3.4. Condiciones periódicas de contorno	35
2.4. Propiedades accesibles a partir de la trayectoria de dinámica molecular.	
2.4.1. Función de Distribución Radial	37
2.4.2. Difusión	39
2.4.3. Enlace de Hidrógeno. Definición.	40
2.5. Topología de la Densidad de Carga electrónica	41
2.5.1. Propiedades topológicas de la distribución de la densidad de carga.....	42
2.5.2. Significado químico de los puntos críticos. Elementos de una estructura molecular	45
2.5.3. Definición del átomo topológico	48
2.5.4. Propiedades del Laplaciano de la Densidad de Carga.....	49
2.6. Análisis de los Orbitales naturales de Enlace, NBO.....	51

2.7. Referencias	51
▪ <i>Capítulo III: Caracterización estática y dinámica de los disacáridos trehalosa, sacarosa y maltosa</i>	56
3.1. Introducción	57
3.2. Metodología	58
3.3. Resultados	59
3.3.1. Cálculos de Estructura Electrónica (Mecánica Cuántica) en fase gaseosa.....	59
3.3.2. Dinámica Molecular.....	72
3.4. Conclusiones	83
3.5. Referencias	83
▪ <i>Capítulo IV: Dinámica Molecular de Azúcares Amorfos en presencia de Reactantes de Maillard</i>	89
4.1. Introducción	90
4.2. Metodología	91
4.3. Resultados	93
4.3.1. Características estructurales	93
4.3.2. Funciones de distribución radial	95
4.3.3. Dinámica conformacional	100
4.3.4. Dinámica Traslacional	102
4.3.5. Interacciones de enlaces de hidrógeno.....	108
▪ Análisis de Puentes intramoleculares	119
▪ Dinámica de los reactantes de Maillard	121
4.4. Conclusiones	124
4.5. Referencias	125
▪ <i>Capítulo V: Conclusiones</i>	129
▪ Índice de abreviaciones	132

RESUMEN

La preservación de biomateriales es un tema de vital importancia en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica. Durante el secado y almacenamiento de estos biomateriales ocurren reacciones de deterioro, como las de Maillard, que afectan a las propiedades organolépticas de los alimentos y a las propiedades funcionales de las proteínas. La estabilización a menudo se logra incorporando estos materiales a soluciones de azúcares amorfos. Profundizar en el conocimiento del mecanismo por el cual estos azúcares son capaces de estabilizar y proteger biomoléculas lábiles ha motivado el desarrollo de este trabajo de tesis. Para el logro de este objetivo, se utilizaron diferentes métodos teóricos.

En el **Capítulo I** se introducen brevemente los antecedentes históricos acerca del origen del interés por parte de la comunidad científica en los carbohidratos como agentes bioprotectores. Se presentan además a los disacáridos trehalosa, sacarosa y maltosa, los cuales serán el objeto de estudio de esta tesis, así como a los reactantes de Maillard modelados. También se presentan las hipótesis que intentan explicar el papel de estos azúcares en la preservación de materiales biológicos, ante situaciones de escasez de agua como la originada en la liofilización de alimentos. En este capítulo también se plantea el objetivo del trabajo de tesis y se realiza una breve descripción de los métodos teóricos usadas en la misma.

En el **Capítulo II** se introducen los fundamentos teóricos de las metodologías utilizadas. Se presenta un resumen de la teoría AIM y NBO y de la Densidad del Funcional, DFT. Además, se introduce a la Dinámica Molecular, las leyes en las que se fundamenta y los términos involucrados en sus campos de fuerza.

En el **Capítulo III** se realiza un estudio detallado de la estructura electrónica de los azúcares trehalosa, sacarosa y maltosa con métodos mecanocuánticos incluyendo los análisis QAIM y NBO. Luego, con métodos de simulación de dinámica molecular, se comparan las propiedades de los tres disacáridos en vacío y en solución acuosa diluida. Se realiza un estudio estructural de los azúcares y se compara con los resultados obtenidos por los métodos cuánticos. También se calculan interacciones del tipo puente de hidrógeno, inter e intramoleculares y ciertas propiedades de transporte. El análisis muestra la importancia de los puentes de Hidrógeno intramoleculares en la conformación de los disacáridos, especialmente uno en el caso de la trehalosa, el cual se considera influye en su mayor rigidez. También muestra la mayor labilidad de los enlaces establecidos entre trehalosa y el solvente.

En el **Capítulo IV**, se estudiaron sistemas cuaternarios compuestos por reactantes de Maillard (glucosa y lisina) embebidos en matrices altamente concentradas de los mismos azúcares. Por medio de Dinámica Molecular Se comparan cambios conformacionales, interacciones del tipo soluto-soluto, soluto-solvente, reactantes-soluto y otras, y propiedades tales como difusión. Los resultados muestran que en situaciones de escaso contenido de agua, la trehalosa muestra mayor rigidez conformacional que maltosa y sacarosa. Esta rigidez influye en las interacciones que ésta establece así como en la movilidad de los otros componentes de la matriz vítrea.

Finalmente, aunque cada capítulo cuenta con sus conclusiones particulares, en el **Capítulo V** se exponen las conclusiones generales de esta tesis. En forma sintética, el estudio realizado en esta tesis muestra la importancia de la dinámica de las interacciones de enlaces de hidrógeno y de la estructura conformacional de los azúcares en el mecanismo de bioprotección.

CAPÍTULO I

“Introducción”

1.1 Introducción

Las soluciones acuosas de carbohidratos son de gran interés para la comunidad científica desde hace varias décadas. El origen de este interés quizás pueda remontarse a la observación¹⁻⁴ de que ciertos organismos, llamados anhidrobióticos, cuando se someten a condiciones severas de deshidratación y altas temperaturas, luego de sintetizar una gran cantidad de sacáridos, entran en un estado de animación suspendida donde su crecimiento, reproducción y metabolismo cesan temporalmente pudiendo permanecer en este estado durante largos períodos de tiempo. Cuando las condiciones ambientales se vuelven favorables estos organismos recuperan su actividad metabólica normal. La síntesis de sacáridos ha sido identificada como un hecho clave de este fenómeno, llamado criptobiosis y ha conducido a un gran número de investigaciones⁵⁻⁹ sobre la capacidad de los sacáridos como agentes bioprotectores.

La bioprotección o preservación de materiales biológicos es un tema relevante por sus implicancias en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Uno de los procedimientos más efectivos de preservación, es someter a estos materiales a una operación de secado por congelamiento o liofilización. Esta operación consiste en desecar los productos mediante la sublimación del agua contenida en ellos. En primer lugar se congela el material y luego se remueve el hielo aplicando calor en condiciones de vacío, por lo que el hielo sublima sin pasar por la fase líquida. Sin embargo, durante el secado y posterior almacenamiento también pueden ocurrir reacciones de deterioro que afectan a las propiedades organolépticas de los alimentos y funcionales de las proteínas, y la estabilización a menudo se logra incorporando estos materiales a soluciones de carbohidratos antes del secado.

Durante el enfriamiento y posterior congelación de la solución de un biomaterial en presencia de carbohidratos, ocurren transformaciones que pueden describirse en una serie de etapas. Al bajar la temperatura, inicialmente se produce un sobre-enfriamiento que origina los núcleos de cristalización, luego la temperatura aumenta hasta la de equilibrio. A partir de ese momento comienzan a desprenderse los cristales de hielo puro, por lo que la solución se concentra hasta alcanzar la menor temperatura a la cual puede existir solución en equilibrio con hielo, denominada temperatura eutéctica. Por debajo de esta temperatura debería existir,

idealmente, equilibrio entre hielo y soluto. Sin embargo, las soluciones que contienen carbohidratos no cristalizan en este punto, sino que aumentan su viscosidad a medida que disminuye la temperatura y el agua se congela. Esta etapa finaliza cuando el sistema llega a un estado en el que su viscosidad aumenta significativamente en un pequeño rango de temperaturas dando lugar a un sólido amorfo y frágil. Así, un material amorfo, puede existir en el estado vítreo o en el estado líquido sobre-enfriado (gomoso o “*rubbery*”) dependiendo de la temperatura y del contenido de agua. El cambio entre estos dos estados se conoce como *transición vítrea* y la temperatura a la cual ocurre, *temperatura de transición vítrea* que se denota por (Tg). Estrictamente, sería más correcto utilizar el término “*intervalo de transición vítrea*”, pues no existe una temperatura definida exactamente; el valor determinado para cada sustancia depende del método utilizado. Los cambios se producen en un amplio rango de temperaturas (± 20 °C) a diferencia del estrecho rango de temperaturas que caracteriza los fenómenos de transiciones de fase de primer orden como las transiciones sólido/líquido/gas.

Entre los carbohidratos más utilizados como excipientes durante el secado de materiales incluyendo productos farmacéuticos se encuentran los disacáridos trehalosa, sacarosa y maltosa (Figura 1.1). Estos tres disacáridos poseen la misma fórmula molecular, $C_{12}O_{11}H_{22}$, pero diferentes estructuras y propiedades físicas. La trehalosa natural es la α,α -trehalosa (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido), y es la conformación de más baja energía entre tres posibles isómeros (α,α -, α,β -, β,β -). Se ha aislado en más de 80 especies, que incluyen plantas, algas, hongos, levaduras, bacterias, insectos, y otros invertebrados. Es un polvo blanco con un poder edulcorante 45% del de la sacarosa.

La trehalosa tiene una temperatura de transición vítrea extremadamente alta (se han reportado valores comprendidos entre 105° y 120°), comparada con la de la sacarosa (α -D-glucopiranosil- β -D-fructofuranósido; Tg= 65°C , $57\text{-}70^\circ\text{C}$) y la de la maltosa (4-O- α -D-glucopiranosil-D-glucopiranososa; Tg = $87\text{-}95^\circ$). Tanto la trehalosa como la sacarosa son azúcares no reductores dado que la unión glicosídica involucra a los grupos OH de los dos carbonos anoméricos. En cambio, la maltosa, es un azúcar reductor. En las reacciones de pardeamiento no enzimático, entre las cuales se incluyen las reacciones de Maillard, los grupos amino ($R\text{-NH}_2$) de los aminoácidos reaccionan con los grupos reductores carbonilo

de los azúcares y producen melanoidinas coloreadas que van desde amarillo claro hasta café o negras.

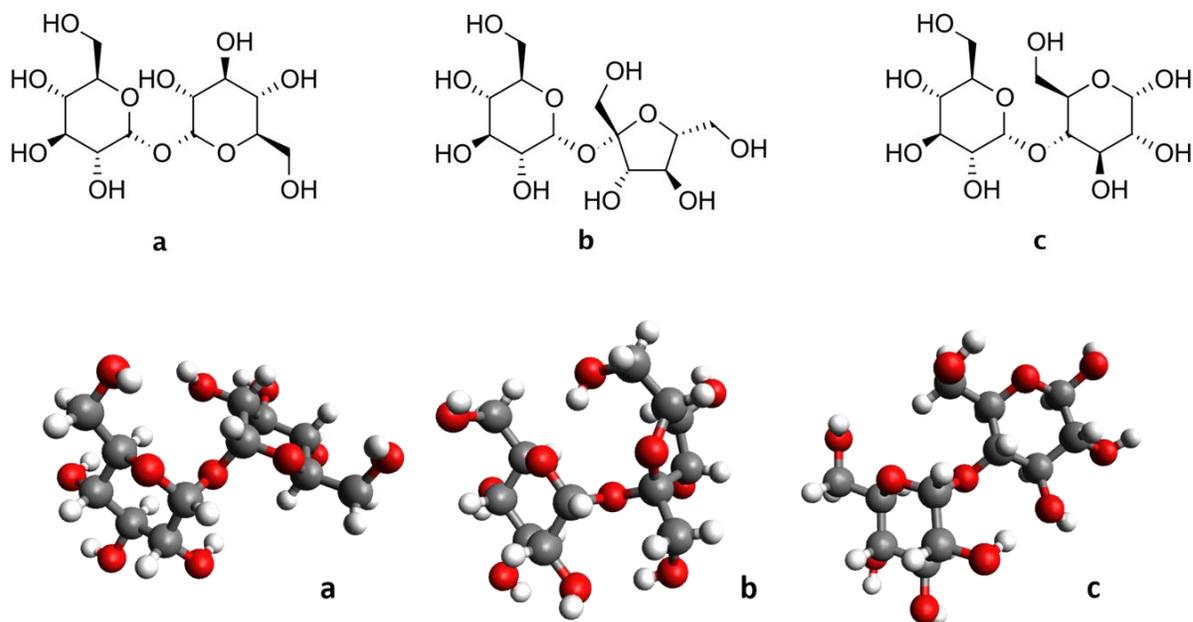


Figura 1.1: (a) Trehalosa (b) Sacarosa (c) Maltosa

1.2 Modelos e hipótesis

Si bien la eficacia de los azúcares como agentes bioprotectores está ampliamente documentada en la literatura,⁵⁻¹⁵ el mecanismo mediante el cual ejercen este papel continúa siendo el foco de numerosas investigaciones tanto teóricas como experimentales. En el curso de estas investigaciones han surgido diferentes modelos e hipótesis, a saber, los modelos de exclusión preferencial y de interacción preferencial¹⁶⁻¹⁹. En el modelo de exclusión preferencial, se sugiere que los azúcares están excluidos de la vecindad de la estructura biológica, preservando así, la esfera de hidratación y manteniendo el nivel necesario de hidratación durante condiciones de déficit de agua¹⁶. Mientras que en el modelo de interacción preferencial se han propuesto tres hipótesis para explicar la interacción directa de los azúcares con los dominios hidrofílicos de las estructuras biológicas, exhibiendo efectos protectores y estabilizadores²⁰, estas hipótesis son: i) La hipótesis de reemplazo de agua

“*waterreplacement*”¹⁷. ii) La hipótesis de agua atrapada, “*water-entrapment*”¹⁸ y iii) La hipótesis de *vitrificación*¹⁹.

La hipótesis de *reemplazo de agua*¹⁷, considera el hecho de que en el estado hidratado, el agua forma una red de enlaces de hidrógeno que regula y mantiene la arquitectura tridimensional necesaria para que las biomoléculas cumplan su rol biológico. Cuando el agua es removida, estas biomoléculas sufren reordenamientos estructurales que resultan en una pérdida de su funcionalidad. El alto contenido de grupos OH de los azúcares propicia la formación de enlaces de hidrógeno con las biomoléculas evitando así el efecto de la pérdida de agua²¹⁻²².

La hipótesis de agua atrapada¹⁸, postula que en el estado deshidratado los azúcares interactúan simultáneamente con el agua y las biomoléculas. El agua residual queda así, atrapada en la interfase azúcar-biomolécula causando un ligero incremento de hidratación en esta interfase^{18,23,24}.

Por otra parte, la hipótesis de *vitrificación*¹⁹ se basa en la capacidad de los azúcares para inducir un estado vítreo que interrumpe o disminuye la movilidad molecular confiriendo estabilidad a las biomoléculas^{19,25-27}.

Algunos autores^{22,26,28,29} han sugerido que los procesos de reemplazo de agua, atrapamiento de agua y vitrificación no son mutuamente excluyentes, sino que actúan en forma sinérgica en el mecanismo de preservación de las estructuras biológicas.

Otra cuestión que ha estimulado una gran actividad de investigación es el hecho de que los diferentes azúcares muestran diferentes capacidades bioprotectoras. Por ejemplo, ha sido demostrado³⁰ que tanto la trehalosa como la sacarosa, son capaces de proteger colonias de *Escherichia coli* DH5 α y *Bacillus thuringiensis* durante el secado y posterior rehidratación. Sin embargo, sólo la trehalosa muestra habilidad para proteger a las bacterias durante la exposición a la luz y al aire al 60% de humedad relativa (RH). Crowe y col.^{17,21,31-33} investigaron los efectos de los compuestos polihidroxilados, especialmente la trehalosa sobre los fosfolípidos en membranas y liposomas. Ellos demostraron que, independientemente de la naturaleza de estas biomoléculas, la estabilización con trehalosa permite a las membranas conservar sus propiedades de rendimiento (transporte de calcio, actividad ATPasa, etc.) y su contenido. Además, encontraron que la integridad estructural y la actividad de las membranas celulares y los liposomas se conservaban mejor en presencia de un 20% de trehalosa en peso,

que es similar a las concentraciones de trehalosa en nematodos anhidrobióticos. También ha sido demostrado que la trehalosa evita eficazmente las reacciones de Maillard. Los experimentos³⁴ que comparan el rendimiento de sacarosa y trehalosa en sistemas liofilizados a pH bajo muestran que las constantes de velocidad para la formación de color marrón o pardeamiento son 200 a 2000 veces mayores para sacarosa que para trehalosa.

Estas cuestiones han motivado el desarrollo de este trabajo de tesis, cuyo objetivo fundamental ha sido profundizar en el conocimiento del mecanismo de bioprotección de los azúcares, utilizando para ello herramientas teóricas. En primer lugar, se realiza un estudio detallado de la estructura electrónica de los disacáridos trehalosa, sacarosa y maltosa al nivel B3LYP/6-311++G** de teoría. Las propiedades topológicas de la densidad de carga electrónica se analizan en el marco de la teoría de Átomos en Moléculas (Atoms In Molecules, AIM) de Bader y col.³⁵ Mediante un análisis de los orbitales naturales de enlaces (Natural Bond Orbitales, NBO)³⁶ se evalúan las interacciones de transferencia de carga entre los orbitales dadores y aceptores y se exploran y cuantifican los efectos anoméricos y exo-anoméricos.

Con métodos de simulación de dinámica molecular, se comparan las propiedades de los tres disacáridos en vacío y en solución acuosa infinitamente diluída. Finalmente se realiza el estudio de sistemas cuaternarios compuestos por reactantes de Maillard (glucosa y lisina) (Figura 1.2) embebidos en matrices de diferentes concentraciones de azúcares amorfos (trehalosa, sacarosa y maltosa) y se calculan las propiedades de transporte de todos los componentes y las interacciones soluto-solvente y soluto-soluto.

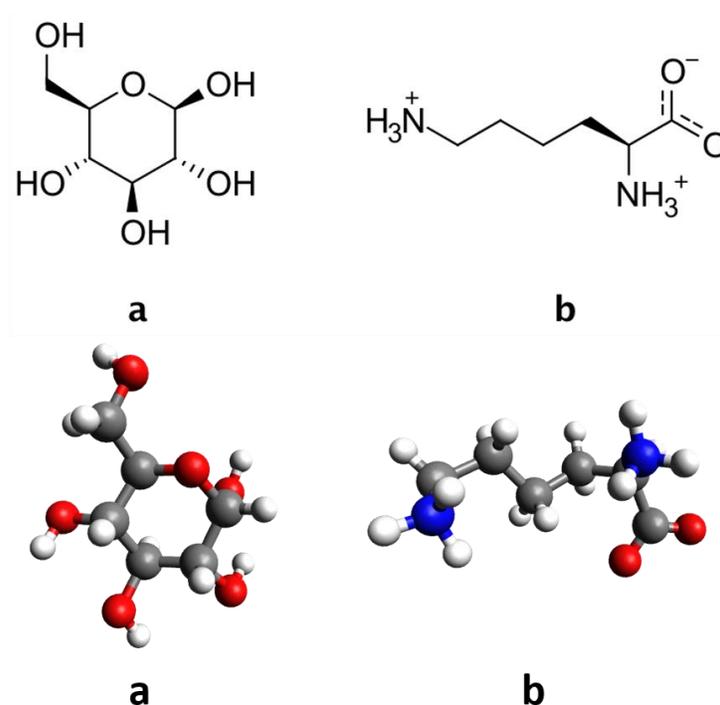


Figura 1.2: Reactantes de Maillard: (a) Glucosa (b) Lisina

1.3 Referencias

- (1) Clegg, J. S. The Control of Emergence and Metabolism by External Osmotic Pressure and the Role of Free Glycerol in Developing Cysts of *Artemia Salina*. *J. Exp. Biol.* **1964**, *41* (4), 879– 892.
- (2) Clegg, J. S. The Origin of Trehalose and Its Significance during the Formation of Encysted Dormant Embryos of *Artemia Salina*. *Comp. Biochem. Physiol.* **1965**, *14* (1), 135–143.
- (3) Westh, P.; Ramlov, H. Trehalose Accumulation in the Tardigrade *Adorybiotus Coronifer* during Anhydrobiosis. *J. Exp. Zool.* **1991**, *258*, 303–311.
- (4) Crowe, J.H. The Physiology of Cryptobiosis in Tardigrades. [Conference Paper]. *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia, Dott. Marco de Marchi Verbania Pallanza*. 1975.
- (5) Crowe, J.S., K.A.C. Madin, and S.H. Loomis (1977) Anhydrobiosis in Nematodes: Metabolism during resumption of activity. *J. Exp. Zool.*, *201* :57-64.

- (6) Clegg, J.S., P. Seitz, W. Seitz, and C.F. Hazelwood (1982) Cellular responses to extreme water loss: The waterreplacement hypothesis. *Cryobiology*, 19:306-316.
- (7) Clegg, J.S. (1986) The physical properties and metabolic status of *Artemia* cysts at low water contents: The “water replacement hypothesis,” In: *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*. C.A. Leopold, ed. Comstock, Ithaca, NY, pp. 169-187. Capítulo 20.
- (8) Carpenter, J.F., L.M. Crowe, and J.H. Crowe (1987) Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze-drying: Characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Biochim. Biophys. Acta*, 923: 109-115.
- (9) Carpenter, J.F., B. Martin, L.H. Loomis, and J.H. Crowe (1988) Long-term preservation of dried phosphofructokinase by sugars and sugar/zinc mixtures. *Cryobiology* 25: 372-376.
- (10) Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Wolkers, W. F.; Oliver, A. E.; Ma, X.; Auh, J.-H.; Tang, M.; Zhu, S.; Norris, J.; Tablin, F. Stabilization of Dry Mammalian Cells: Lessons from Nature. *Integr. Comp. Biol.* **2005**, 45, 810–820.
- (11) Holovati, J.; Gyongyossy-Issa, M.; Acker, J. Effects of Trehalose-Loaded Liposomes on Red Blood Cell Response to Freezing and Post-Thaw Membrane Quality. *Cryobiology* **2009**, 58, 75–83.
- (12) Leprince, O.; Buitinck, J. Introduction to Desiccation Biology: From Old to New Frontiers. *Planta* **2015**, 242, 369–378.
- (13) Rao, W.; Huang, H.; Wang, H.; Zhao, S.; Dumbleton, J.; Zhao, G.; He, X. Nanoparticle Mediated Intracellular Delivery Enables Cryopreservation of Human Adipose-Derived Stem Cells Using Trehalose as the Sole Cryoprotectant. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7, 5017–5028.
- (14) Ohtake, S.; Wang, Y. J. Trehalose: Current Use and Future Applications. *J. Pharm. Sci.* **2011**, 100, 2020–2053.
- (15) Cordone, L.; Cottone, G.; Cupane, A.; Emanuele, A.; Giuffrida, S.; Levantino, M. Proteins in Saccharides Matrices and the Trehalose Peculiarity: Biochemical and Biophysical Properties. *Curr. Org. Chem.* **2015**, 19, 1684–1706.

- (16) Arakawa, T.; Timasheff, S. N. The Stabilization of Proteins by Osmolytes. *Biophys. J.* **1985**, *47* (3), 411–414.
- (17) Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Chapman, D. Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms: The Role of Trehalose. *Science* (80-.). **1984**, *223* (4637), 701 – 703.
- (18) Belton, P. S.; Gil, A. M. IR and Raman Spectroscopic Studies of the Interaction of Trehalose with Hen Egg White Lysozyme. *Biopolymers* **1994**, *34* (7), 957–961.
- (19) Sun, W. Q.; Leopold, A. C. Glassy State and Seed Storage Stability: A Viability Equation Analysis. *Ann. Bot.* **1994**, *74* (6), 601-604.
- (20) Schobert, B. Is There an Osmotic Regulatory Mechanism in Algae and Higher Plants? *J. Theor. Biol.* **1977**, *68*, 17-26.
- (21) Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Carpenter, J. F.; Aurell Wistrom, C. Stabilization of Dry Phospholipid Bilayers and Proteins by Sugars. *Biochem. J.* **1987**, *242* (1), 1–10.
- (22) Carpenter, J. F., Prestrelski, S. J., Anchordoguy, T. J., and Arakawa, T. (1994) in Formulation and Delivery of Proteins and Peptides (Cleland, J. L., and Langer, R., Eds.), pp. 134–147, ACS Symposium Series 567, Washington, DC.
- (23) Lins, R. D.; Pereira, C. S.; Hünenberger, P. H. Trehalose–Protein Interaction in Aqueous Solution. *Proteins* **2004**, *55*, 177–186.
- (24) Cottone, G.; Ciccotti, G.; Cordone, L. Protein–trehalose–water structures in trehalose coated carboxy-myoglobin. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 9862–9866.
- (25) Sun, W. Q.; Leopold, A. C.; Crowe, L. M.; Crowe, J. H. Stability of Dry Liposomes in Sugar Glasses. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 1769–1776.
- (26) Sun, W. Q.; Leopold, A. C. Cytoplasmic Vitrification and Survival of Anhydrobiotic Organisms. *Comp. Biochem. Phys. A* **1997**, *117*, 327–333.
- (27) Williams, R. J.; Leopold, A. C. *Plant Physiol.* The Glassy State in Corn Embryos **1989**, *89*, 977–981.
- (28) Crowe, L. M. Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis *Comp. Biochem.*

- Phys. A* **2002**, *131*, 505-513.
- (29) Clegg, J. S. Cryptobiosis a peculiar state of biological organization. *Comp. Biochem. Phys. B* **2001**, *128*, 613–24.
- (30) Leslie, S.; Israeli, E.; Lighthart, B.; Crowe, J.; Crowe, L. Trehalose and Sucrose Protect Both Membranes and Proteins in Intact Bacteria during Drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 3592–3597.
- (31) Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Chapman, D. Infrared Spectroscopic Studies on Interactions of Water and Carbohydrates with a Biological Membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, *232* (1), 400–407.
- (32) Crowe, L. M.; Crowe, J. H.; Rudolph, A.; Womersley, C.; Appel, L. Preservation of Freeze-Dried Liposomes by Trehalose. *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *242* (1), 240–247.
- (33) Crowe, L. M.; Womersley, C.; Crowe, J. H.; Reid, D.; Appel, L.; Rudolph, A. Prevention of Fusion and Leakage in Freeze-Dried Liposomes by Carbohydrates. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1986**, *861*, 131–140.
- (34) O'Brien, J. Stability of Trehalose, Sucrose and Glucose to Nonenzymatic Browning in Model Systems. *Journal of Food Science.* **1996**, *61* (4), 679-682.
- (35) Bader, R. F. W. *Atoms in Molecules. A Quantum Theory*; Clarendon Press: Oxford, 1990.
- (36) Weinhold, F. Natural Bond Orbital Methods in: P.v.R. Schleyer. In *Encyclopedia of Computational Chemistry*; P. v.R. Schleyer, Allinger, N. L., Clark, T., Gasteiger, J., Kollman, P. A., III, H. F. S., Schreiner, P. R., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, UK, 1998; pp 1792–1811.

CAPÍTULO II

“Teoría y Métodos”

2.1 Introducción

A partir de la década del 50, el desarrollo de las computadoras permitió que una tercera metodología se sumara a la experimentación y la teoría en la investigación científica: *la simulación computacional*. Por lo tanto, la química computacional (QC) puede ser descripta como la rama de la química que permite simular numéricamente estructuras moleculares y reacciones químicas, basándose total o parcialmente en las leyes fundamentales de la mecánica cuántica y haciendo un uso intensivo de las computadoras. Algunos métodos pueden utilizarse no solo para modelar moléculas estables, sino también estados de transición o intermediarios de vida corta imposibles de observar experimentalmente. De manera que la química computacional resulta una herramienta muy útil como complemento de los estudios químicos experimentales. Además, ofrece información útil para racionalizar o interpretar tendencias y enunciar relaciones estructura-actividad, por lo que tiene un poderoso poder predictivo.

Actualmente, gracias al acelerado desarrollo de la tecnología, la simulación computacional se ha convertido en una herramienta esencial, tanto para experimentalistas como para teóricos.

La química computacional se divide en dos grandes métodos, basados en principios físicos diferentes.¹ Uno de ellos es la mecánica molecular que se basa en la mecánica clásica y por otro lado, están los métodos de estructura electrónica que se basan en la aplicación de la mecánica cuántica a los sistemas atómicos y moleculares.

A continuación se describen brevemente los métodos que han sido empleados en la realización de este trabajo de tesis.

2.2 Métodos de estructura electrónica

Los métodos de estructura electrónica (MEE) se dividen en tres grupos: *ab initio*, *funcional de la densidad* y *semiempíricos*, dependiendo de que usen sólo las constantes atómicas fundamentales (los dos primeros) o que empleen datos experimentales para parametrizar parte de los cálculos (semiempíricos). Todos los MEE se basan en el planteo y solución aproximada de la Ecuación de Schrödinger. Los métodos semiempíricos son de bajo costo computacional y dan una buena descripción cualitativa de los sistemas moleculares. Para los sistemas que están parametrizados pueden obtenerse resultados cuantitativos aceptables. Por otro lado, los métodos *ab initio* dan predicciones de alta

calidad y cuantitativas, aunque con un costo computacional superior. Los métodos de los funcionales de la densidad (DFT) son similares a los métodos ab initio en algunos aspectos. Los DFT incluyen efectos de la correlación electrónica y dan resultados comparables con los mejores métodos ab initio, con un costo computacional menor que estos.

Los modelos químicos se caracterizan por la combinación de un procedimiento teórico para la resolución aproximada de la ecuación de Schrödinger y un conjunto de bases. Este último está relacionado con los orbitales moleculares. Estos pueden expresarse como combinaciones lineales de un grupo de funciones pre-definidas de un electrón, conocidas como funciones base. Estas últimas están compuestas por combinaciones lineales de funciones gaussianas, llamadas primitivas.

El diseño de un conjunto base, se vuelve un arte en el tratamiento de la región del espacio de valencia, debido a que las funciones más susceptibles de ser alteradas por la formación de las moléculas son las que se extienden en esta región. Se debe tratar de no dañar la flexibilidad del conjunto base en esta crítica región y al mismo tiempo mantener el número total de funciones base, tan pequeño como sea posible.

Una manera de aumentar la flexibilidad del conjunto base consiste en desdoblar los orbitales atómicos de valencia. El resultado se conoce como **base de valencia desdoblada** (*split valence, SV*). Las bases de valencia desdoblada, **dobles** y **triple zeta** (**DZ** y **TZ**), contienen dos y tres funciones respectivamente, por cada orbital atómico de valencia

Conjuntos bases de valencia desdoblada, tal como, 6-31G ha sido definido para los elementos de la primera y segunda fila.² Este conjunto base difiere sólo en el número de primitivas utilizadas al expandir las funciones de la capa interna y en las primeras funciones de la capa de valencia (2s y 2p).

Conjuntos bases con funciones de polarización y funciones difusas. Un conjunto base de valencia desdoblada permite a los orbitales cambiar de tamaño, pero no de forma. Para describir las distorsiones que sufren los orbitales atómicos durante la formación de la molécula, deben adicionarse al conjunto, funciones base de alto momento angular. Estas funciones se denominan de **polarización** debido a que ellas permiten la polarización de los OAs. No hay reglas definitivas para la elección de funciones de polarización. Pople y col.,^{3,4} sugieren el uso de los conjuntos 6-31G* (tienen seis gaussianas extra del tipo d no contraídas sobre los átomos pesados) y 6-31G** (idem al anterior, más tres gaussianas del tipo p sobre cada átomo de hidrógeno).

En sistemas, donde los electrones están relativamente lejos de los núcleos como por ej., en moléculas con pares libre, en aniones, en sistemas en estados excitados, o en sistemas con bajos potenciales de ionización, es necesario aumentar las funciones de base con gaussianas que puedan describir a los orbitales expandidos por causa de la carga. Estas funciones (llamadas *funciones difusas*) que pertenecen a la capa de valencia son por lo general orbitales p con exponentes pequeños. Por ej., la base 6-31+G y 6-31++G poseen un conjunto extra de funciones difusas (s, p) sobre los elementos desde el Li al F y un conjunto extra de funciones s sobre el hidrógeno, respectivamente. El símbolo “+” se utiliza para indicar que la base incluye funciones difusas, por ej., la notación 6-31G++G** indica una base que contiene funciones de polarización y difusas tanto sobre los átomos pesados como sobre los de hidrógeno.

En este trabajo se utilizaron principalmente las bases 6-31G* y 6-311++G**. ²⁻⁵ El primer caso corresponde al grupo de bases 6-31G considerando orbitales d sobre los átomos que no son hidrógeno, resultando así grupos de bases polarizadas. En el caso de la base 6-311++G**, es triple Z e incluye funciones difusas sobre los átomos pesados y los hidrógenos (++) , tres funciones d y una f sobre los átomos pesados y tres funciones p y una d sobre los átomos de hidrógeno.

La **Teoría del Funcional Densidad (DFT**, por sus siglas en inglés), aplicada a sistemas electrónicos, es un procedimiento variacional alternativo a la solución de la ecuación de Schrödinger, donde el funcional de la energía electrónica es minimizado con respecto a la densidad electrónica. Los métodos tradicionales dentro de las teorías de la estructura electrónica de la materia, en particular la teoría de Hartree-Fock y los derivados de este formalismo, se basan en una función de onda multielectrónica. Si bien esta resolución de la ecuación de Schrödinger permite describir de forma exacta el comportamiento de los sistemas muy pequeños, su capacidad de predicción se ve limitada por el hecho de que sus ecuaciones son demasiado complejas de resolver numéricamente o menos aun analíticamente. La DFT reformula el problema para ser capaz de obtener, por ejemplo, la energía y la distribución electrónica del estado fundamental, trabajando con el funcional de la densidad electrónica en vez de la función de ondas. Una ventaja es que la densidad es una magnitud mucho más simple que la función de ondas y por lo tanto más fácil de calcular y en la práctica son accesibles sistemas mucho más complejos: la función de ondas de un sistema de N electrones depende de N variables, mientras que la densidad electrónica sólo depende de 3 variables. Una desventaja es que, salvo los casos

más simples, no se conoce de manera exacta el funcional que relaciona esta densidad con la energía del sistema. En la práctica, se usan funcionales que se han comprobado que dan buenos resultados. Originalmente, la DFT se desarrolló en el marco de la teoría cuántica no relativista (ecuación de Schrödinger independiente del tiempo) y de la aproximación de Born-Oppenheimer. La teoría fue extendida posteriormente al dominio de la mecánica cuántica dependiente del tiempo, y se habla de la TD-DFT o Teoría del Funcional de la Densidad Dependiente del Tiempo y del *dominio relativista*. Entre otras cosas, esto permite calcular estados excitados.

La base teórica para la DFT fue dada en 1964 por Hohenberg y Kohn,⁶ quienes mostraron que la energía es un funcional de la densidad y que además la densidad del sistema minimiza este funcional. Posteriormente, Kohn y Sham⁷ demostraron que a partir de la teoría del funcional de la densidad se puede escribir una ecuación para orbitales de una partícula, de los cuales se obtiene la densidad.

- *Los Teoremas de Hohenberg y Kohn*

En la mecánica cuántica estándar, los observables son calculados a partir de la función de onda de muchos cuerpos. El método de la DFT fue sometido a un tratamiento riguroso por Hohenberg y Kohn, quienes demostraron que, para el estado fundamental, existe una relación uno a uno entre la densidad electrónica y el potencial externo, $V(r)$. Esto quiere decir que la densidad electrónica en el estado fundamental contiene la información de un sistema electrónico.

En particular, Hohenberg y Kohn mostraron que la energía es un funcional de la densidad a través de la relación:

$$E[\rho] = F[\rho] + \int dr \rho(r)v(r) \quad (1)$$

Donde $F[\rho]$ representa al funcional universal que contiene a la energía cinética, $T[\rho]$, y la interacción electrón-electrón, $V_{ee}[\rho]$.

Con un segundo teorema los mismos autores demostraron que la densidad electrónica del estado fundamental es aquella que minimiza al funcional de energía $E[\rho]$. Desde el punto de vista numérico, la función de onda es un objeto muy complejo de manipular, pues para N partículas es una función de N variables, mientras que la densidad, independientemente del número de partículas, es siempre una función de 3 variables, por lo tanto más fácil de manejar. El problema, es que no se conoce la forma exacta del funcional $F[\rho]$.

- *El Modelo de Kohn y Sham*

Kohn y Sham presentaron una forma de aproximar al funcional universal. Para lograr este propósito, Kohn y Sham recurrieron a un sistema ficticio, el cual está constituido por un sistema de electrones no interactuantes. Esto significa que tal sistema puede estar representado por un determinante (determinante de Slater) cuyos elementos son funciones que representan a cada uno de los electrones del sistema (orbitales). Con este punto de partida la energía cinética corresponde a una suma de energías cinéticas individuales:

$$T_s = \sum_{i=1}^N \int d\mathbf{r} \phi_i^*(\mathbf{r}) \left(-\frac{1}{2} \nabla^2 \right) \phi_i(\mathbf{r}) \quad (2)$$

y la densidad electrónica a la suma de densidades orbitales

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{i=1}^N \rho_i(\mathbf{r}) = \sum_{i=1}^N \phi_i^*(\mathbf{r}) \phi_i(\mathbf{r}) \quad (3)$$

Un elemento adicional en el modelo de Kohn y Sham es la aproximación a la interacción electrón-electrón ya que proponen como parte principal de ésta a la interacción coulombica

$$J[\rho] = \frac{1}{2} \iint d\mathbf{r} d\mathbf{r}' \frac{\rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|} \quad (4)$$

y con esto el funcional universal es escrito como

$$F[\rho] = T[\rho] + V_{ee}[\rho] = T_s[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (5)$$

donde es claro que el funcional de intercambio y correlación, $E_{xc}[\rho]$, se define como

$$E_{xc}[\rho] = T[\rho] - T_s[\rho] + V_{ee}[\rho] - J[\rho] \quad (6)$$

Los orbitales de Kohn y Sham son aquellos que satisfagan las ecuaciones integro-diferenciales de Kohn y Sham

$$\left(-\frac{1}{2} \nabla^2 + v_{eff}(\mathbf{r}) \right) \phi_i(\mathbf{r}) = \varepsilon_i \phi_i(\mathbf{r}) \quad (7)$$

y que generarán la energía del estado basal. El potencial de Kohn—Sham $v_{eff}(\mathbf{r})$ incluye las interacciones coulombianas (electrón- electrón y núcleo-electrón) y de intercambio y correlación.

Aunque las ecuaciones de Kohn-Sham se resuelven iterativamente y son muy similares al método de Hartree-Fock, el significado físico de ambos métodos es diferente ya que tienen asociados potenciales efectivos diferentes.

Intercambio y correlación

Aun cuando el planteamiento de Kohn y Sham es exacto, hasta el momento el funcional de intercambio y correlación, es desconocido y por lo tanto son necesarias aproximaciones a este funcional. La clasificación a estas aproximaciones se puede encontrar en la escalera de Jacob definida por John. P. Perdew.⁸

La primera aproximación para este funcional se conoce como Aproximación de Densidad Local (LDA)⁹ y consiste en suponer que en cada punto, la energía de intercambio y correlación depende sólo de la densidad en ese punto. Este valor se considera como el que tendría un gas de electrones libres de esa densidad. Si bien es una aproximación bastante fuerte, se obtienen resultados sorprendentemente precisos para algunas propiedades, y es en parte a eso que se debe el éxito de esta teoría.

Existen aproximaciones más sofisticadas para el funcional de intercambio y correlación, estas se conocen como Aproximaciones de Gradiente Generalizado (GGA),¹⁰ estas son semilocales, ya que consideran en cada punto el valor de la densidad y sus gradientes. Un ejemplo representativo de esta aproximación es el funcional reportado por Perdew, Burke y Ernzerhof,¹¹ el cual ha motivado a varias revisiones y mejoras. Para algunas propiedades estas aproximaciones dan mejores resultados que LDA, en particular para geometrías moleculares y energías del estado fundamental, aunque para otras no representan una mejora sustancial. Aún con esta aproximación, no se conoce la forma funcional para las energías de intercambio (también llamado interacción de canje y correlación electrónicas. Estas corresponden a la interacción cuántica entre electrones, la primera debido al principio de exclusión de Pauli entre electrones del mismo espín y el segundo debido a la parte cuántica de la repulsión coulombiana. Una solución a este problema es el desarrollo de métodos híbridos como el B3LYP,¹² (Becke, de tres parámetros, Lee-Yang-Parr), el funcional de intercambio y correlación es:

$$E_{xc}^{B3LYP} = E_{xc}^{LDA} + a_0(E_x^{HF} - E_x^{LDA}) + a_x(E_x^{GGA} - E_x^{LDA}) + a_c(E_c^{GGA} - E_c^{LDA}) \quad (8)$$

Donde $a_0 = 0,20$, $a_x = 0,72$ y $a_c = 0,81$. E_x^{GGA} y E_c^{GGA} son aproximaciones del gradiente generalizado, y E_c^{LDA} es la aproximación local de la densidad (VWN) al funcional de correlación.

Los tres parámetros que definen B3LYP se han adoptado sin modificación de ajuste original de Becke de la B3PW91 análogo funcional a un conjunto de energías de atomización, los potenciales de ionización, afinidades de protones, y el total de energía atómica.

Una serie de funcionales más sofisticados puede obtenerse al suponer que la energía de intercambio y correlación depende explícitamente de los orbitales de Kohn-Sham. El más común de estos funcionales es el de Intercambio Exacto, que incluye de manera completa la energía de intercambio electrónico y que puede derivarse desde primeros principios. El problema de este tipo de funcionales es que computacionalmente son más costosos de tratar.

2.3 Dinámica Molecular

Las simulaciones de Dinámica Molecular (DM) estiman el movimiento de moléculas individuales en modelos de sólidos, líquidos y gases. La idea central aquí es la de movimiento, el cual describe cómo las posiciones, velocidades y orientaciones cambian con el tiempo.¹³ Es un método determinista ya que el estado del sistema en un tiempo posterior se puede predecir a partir de su estado actual.

Actualmente las técnicas de simulación de Dinámica Molecular son ampliamente usadas en conjunto con procedimientos experimentales como cristalografía de rayos X y determinación de estructuras por RMN.

El principio en el que se basa la DM consiste en la generación de trayectorias para un colectivo finito de partículas integrando numéricamente las ecuaciones clásicas de movimiento. Este enfoque tiene su justificación en dos hechos remarcables: (i) la aproximación de Born-Oppenheimer, que permite separar el movimiento de los núcleos y el de los electrones, y (ii) la longitud de onda de de Broglie es mucho más corta que las distancias intermoleculares típicas en la mayor parte de los casos. Con ello los efectos cuánticos se pueden despreciar con bastante seguridad.

Una de las hipótesis básicas de la termodinámica estadística es la hipótesis *ergódica*, que afirma que el promedio temporal es equivalente al promedio realizado sobre un colectivo de sistemas idénticos, que estando en el mismo estado macroscópico se encuentran en distintos estados microscópicos. Las simulaciones de DM son empleadas comúnmente para calcular las propiedades de equilibrio y de transporte de un sistema, en

forma de promedios temporales, coincidentes con los promedios estadísticos para sistemas *ergódicos*:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \bar{\mathcal{A}}_t = \langle \mathcal{A} \rangle \quad (9)$$

donde \mathcal{A} representa cualquier propiedad observable, $\bar{\mathcal{A}}_t$ es su promedio temporal y $\langle \mathcal{A} \rangle$, su promedio estadístico.

2.3.1 Las Ecuaciones de la Dinámica Molecular

En la DM clásica,¹⁴⁻¹⁶ la trayectoria de las distintas componentes del sistema se genera por integración de las ecuaciones de Newton del movimiento, que, para cada partícula i , se escriben:

$$\begin{cases} m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \mathbf{f}_i(t) \\ \mathbf{f}_i(t) = - \frac{\partial V(\mathbf{r}^N)}{\partial \mathbf{r}_i(t)} \end{cases} \quad (10)$$

Donde m es la masa de la partícula, \mathbf{f} es la fuerza aplicada sobre la partícula, t es el tiempo. $V(\mathbf{r}^N)$ es la función de energía potencial del sistema de N partículas, que depende solamente de las coordenadas cartesianas \mathbf{r}_i . Esta función constituye un aspecto fundamental de todos los cálculos de mecánica molecular porque debe reproducir las interacciones intra e intermoleculares del sistema lo más fielmente posible. La energía Potencial de un sistema de átomos se describe mediante un conjunto de funciones y parámetros que constituyen los llamados campos de fuerzas. No solo establecen la forma de los distintos términos de la fórmula de energía potencial sino que también definen los valores de las variables usadas en el potencial. Estas variables surgen de una combinación de resultados de simulaciones cuánticas y de observaciones experimentales. Algunos de los campos de fuerza más utilizados en DM son: AMBER, CHARMM, GROMOS, OPLS, GAFF, etc.

La ecuación matemática de la energía potencial varía entre los distintos campos de fuerza, aunque de manera general contienen términos de interacciones enlazantes y términos de interacciones no-enlazantes.

- Interacciones Enlazantes:

Los términos de enlace son referidos a los átomos unidos en la estructura química por un máximo de tres enlaces covalentes, y describen en esencia las diferentes distorsiones geométricas que la molécula puede sufrir entre sus átomos enlazados.

En función del número de enlaces covalentes que separan dos átomos, se distinguen tres tipos de interacciones: las que implican átomos separados por un enlace (términos 1-2, de enlace o de *stretching*), por dos enlaces (términos 1-3 o de *bending*), y por tres enlaces (términos 1-4 o de *torsión*).

La energía de *stretching* es la asociada a la distancia internuclear entre dos átomos A y B. La relación energía-distancia entre dos átomos enlazados obedece una curva como la de la figura 2.1.

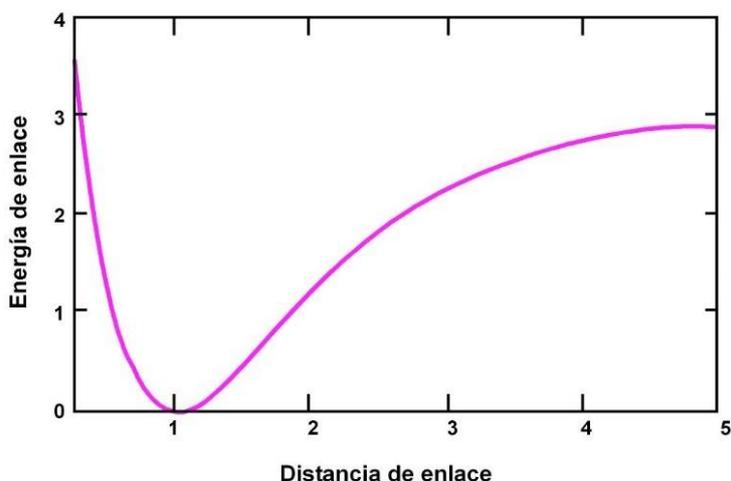


Figura 2.1. Evolución de la energía a medida que se modifica la distancia interatómica.

Para describir dicha curva de energía, especialmente en la zona de equilibrio, se emplea la ley de Hooke:

$$E_{stretching} = \frac{k}{2} \cdot (r - r_0)^2 \quad (11)$$

Los parámetros k (constante de fuerza) y r_0 (distancia de equilibrio), se obtienen a partir de datos experimentales, tales como estructuras obtenidas por cristalografía de rayos X para las distancias de equilibrio, y frecuencia de vibración de enlaces obtenidas por espectroscopia sobre compuestos modelos para las constantes de fuerza. Actualmente

se tiende a suplementar este trabajo de parametrización por el ajuste de datos procedentes de cálculo *ab initio* de alto nivel.

Para la modelización del *bending*, energía asociada a la variación del ángulo entre tres átomos enlazados A, B y C, se suele emplear un formulismo armónico análogo al utilizado en el *stretching*,

$$E_{bending} = \frac{k_{\theta}}{2} \cdot (\theta - \theta_0)^2 \quad (12)$$

donde los parámetros implicados θ_0 y k_{θ} designan al ángulo de equilibrio y la constante de fuerza asociada a la distorsión de los ángulos, respectivamente.

La energía *de torsión* o de un diedro está asociada a la rotación a través del enlace B-C, para un conjunto de 4 átomos enlazados consecutivamente A-B-C-D. Las torsiones son los grados de libertad internos que presentan mayor variabilidad, siendo responsables de la flexibilidad de las moléculas. En el campo de fuerza AMBER,^{17,18} la variación de energía asociada a la rotación de un diedro está representado por una expansión en serie de Fourier:

$$E_{torsión} = \sum_{tor} \sum_n \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \quad (13)$$

donde $V_n/2$ indica la barrera energética, n es la multiplicidad (el número de mínimos que presenta la función entre 0° y 360°), ω es el valor del diedro y γ representa el ángulo de fase.

La determinación de los parámetros de torsión se realiza mediante el ajuste de la energía cuántica a lo largo de la rotación completa del enlace.

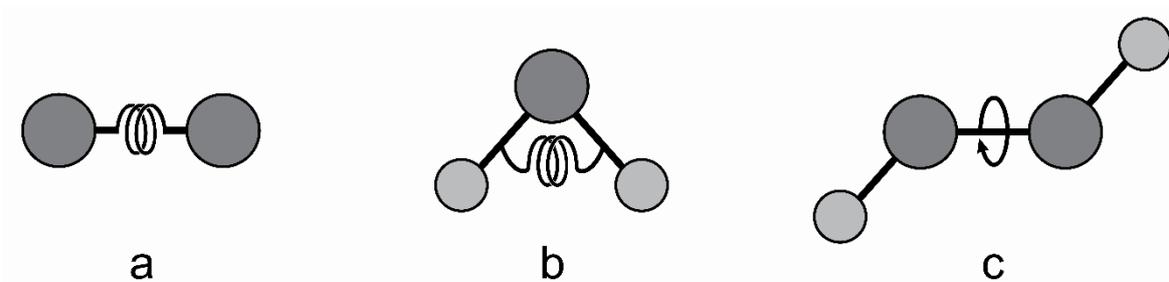


Figura 2.2. Ilustración de los términos incluidos en la función de energía potencial empírica. *a*, *b* y *c* corresponden a los términos intramoleculares: interacciones de enlace, de ángulo y de torsión respectivamente.

- Interacciones entre átomos no enlazados:

Intervienen átomos no unidos de manera directa por enlaces. Este tipo de interacciones dependen únicamente de la distancia entre las partículas implicadas y su naturaleza. La energía asociada a ellas suele expresarse analíticamente como una relación de proporcionalidad inversa con la distancia. Comprende dos términos: el término electrostático y el término de van der Waals.

La energía electrostática es la energía asociada a la repulsión o atracción electrostática entre átomos que no están directamente enlazados.

La mayoría de las estrategias para modelar la interacción entre la carga de dos moléculas se basan en discretizar dichas distribuciones en cargas atómicas puntuales, cuya interacción obedece la ley de Coulomb.

$$E_{ele} = \sum_{i=1}^{N_A} \sum_{j=1}^{N_B} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (14)$$

donde N_A y N_B representan el número de cargas distribuidas sobre las moléculas A y B, q es la magnitud de la carga puntual, r_{ij} la distancia entre dos cargas concretas y ϵ_0 la constante dieléctrica. Para derivar las cargas atómicas AMBER considera una distribución de puntos sobre superficies de van der Waals de tamaño creciente¹⁹. El método RESP (*Restrained ElectroStatic Potential*)²⁰ ajusta el potencial electrostático calculado mecanocuánticamente sobre las superficies moleculares usando un modelo de carga puntual centrado en el átomo. Se introducen restricciones hiperbólicas para evitar la localización de cargas elevadas sobre átomos pesados y así disminuir la dependencia conformacional del conjunto de cargas.

Las interacciones de Van der Waals tienen en cuenta la energía asociada a la repulsión o atracción entre átomos que no están directamente enlazados, sin tener en cuenta la atracción electrostática. La energía asociada a esta interacción entre dos átomos se representa en la figura 2.3. En la misma se aprecia que la energía de interacción presenta un mínimo (ϵ) a una distancia característica (σ). Aumentar esta distancia anula la interacción de forma asintótica y disminuirla lleva a un aumento de la energía a medida que los radios atómicos se solapan.

Las fuerzas de van der Waals tienen una componente atractiva a distancias medias y otra repulsiva a cortas distancias.

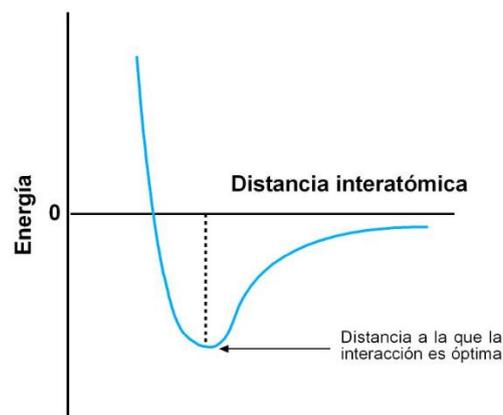


Figura 2.1. Energía asociada a la interacción de Van der Waals

Una función popular que obedece estos requerimientos generales es el potencial de Lennard Jones, donde la parte atractiva es función de la sexta potencia de la distancia interatómica, mientras que el término repulsivo es típicamente considerado función de la doceava potencia.

$$E_{vdW} = \frac{A}{(r_{ij})^{12}} - \frac{B}{(r_{ij})^6} \quad (15)$$

La forma usualmente empleada en la obtención de los parámetros de van der Waals es la reproducción de datos experimentales estructurales.

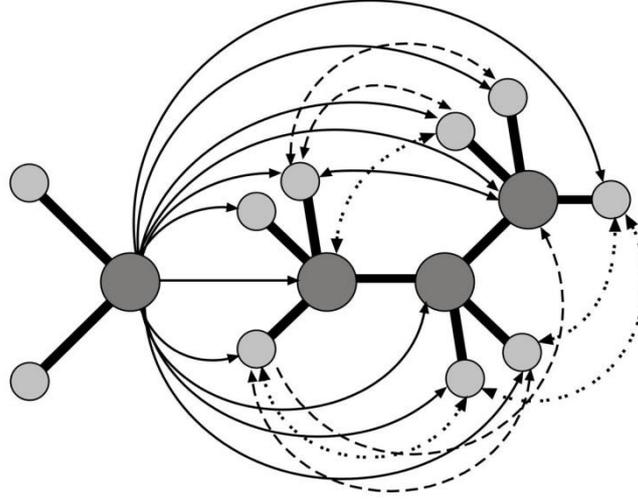


Figura 2.2. Ilustración de los términos que caracterizan las interacciones de Coulomb y de van der Waals de los átomos que no están conectadas químicamente: Interacciones intermoleculares (trazo continuo), interacciones intramoleculares “1-4” (líneas punteadas), e interacciones intramoleculares $> 1-4$ (trazo discontinuo).

Una de las formas más minimalistas de la expresión de la función de energía potencial es la del campo de fuerzas de AMBER.^{17,18}

$$\begin{aligned}
 V(r) = & \sum_{\text{enlaces}} k_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{valencia}} k_\theta (\theta - \theta_0) + \sum_{\text{torsiones}} \sum_n \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)]^2 \\
 & + \sum_{\text{torsiones}} \sum_n \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \\
 & + \frac{1}{k_{vdW}^{1-4}} \sum_{\substack{i < j \\ \{i,j\} \in 1-4}} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{1}{k_{Coulomb}^{1-4}} \sum_{\substack{i < j \\ \{i,j\} \in 1-4}} \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_0 \epsilon_i r_{ij}} \\
 & + \sum_{\substack{i < j \\ \{i,j\} > 1-4}} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\substack{i < j \\ \{i,j\} > 1-4}} \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_0 \epsilon_1 r_{ij}} \quad (16)
 \end{aligned}$$

en la cual, k_r y r_0 representan, respectivamente, la constante de fuerza del enlace químico y su longitud de equilibrio, k_θ y θ_0 , la constante de fuerza asociada a la distorsión de los

ángulos y su valor de equilibrio, y $\frac{V_n}{2}$, n , ϕ y γ , la barrera torsional, periodicidad (el número de mínimos que presenta la función entre 0° y 360°), el valor del diedro y su fase. ϵ_0 y ϵ_1 son, respectivamente, las permitividades dieléctricas del vacío y relativa, q_i es la carga parcial llevada por el átomo i . R_{ij}^* y ϵ_{ij} corresponden a los parámetros de Van der Waals para el par de átomos $\{i, j\}$ obtenidos a partir de las reglas de combinación de Lorentz-Berthelot:

$$\begin{cases} \epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j} \\ R_{ij}^* = R_i^* + R_j^* \end{cases} \quad (17)$$

2.3.2 Los propagadores de dinámica molecular

Dado que la fuerza entre dos átomos o moléculas cambia continuamente con su separación, las ecuaciones de Newton del movimiento (10) se resuelven mediante un método de diferencias finitas. Las integrales se descomponen como una suma de pequeños intervalos de tiempo δt , comúnmente llamados pasos (time steps). En cada intervalo se calcula la fuerza total aplicada sobre una partícula como la suma vectorial de sus interacciones con otras partículas. Luego esta fuerza se combina con las posiciones y velocidades actuales para generar el nuevo estado en el tiempo $t + \delta t$.

La suposición preferencial en esta estimación es que la fuerza permanece constante durante cada paso de tiempo, por lo que la selección de este intervalo resulta crucial para obtener una correcta simulación. Es usual considerar como límite superior de estos intervalos de tiempo, o pasos, a aquel que permite simular bien el movimiento más rápido del sistema (vibración de un enlace de un átomo de hidrógeno, del orden de 10 fs). El paso típico es de 1 fs, al menos un orden de magnitud más pequeño que dicho movimiento. Una posible solución para incrementar este valor es eliminar del sistema aquellos grados de libertad de mayor frecuencia como lo son los estiramientos de enlace, ya que su efecto sobre el comportamiento del sistema es mínimo. Para ello, se “congelan” estas frecuencias imponiendo restricciones sobre estos enlaces (algoritmo SHAKE ²¹), permitiendo trabajar con pasos de tiempo de 2 fs. Algunos de los métodos de diferencia finita más conocidos para resolver estas integrales son los de Verlet y *Leap-frog*.

En el algoritmo de Verlet²² las posiciones y aceleraciones al tiempo t y las posiciones del paso previo $\{ r_i(t), r_i(t-\delta t), a_i(t) \}$ son usadas para calcular la nueva posición de las partículas en el tiempo $t+\delta t$ a través de un desarrollo de Taylor, conduciendo a:

$$r_i(t+\delta t) = 2r_i(t) - r_i(t-\delta t) + a_i(t) \delta t^2 \quad (18)$$

donde $a_i(t) = \ddot{r}_i(t) = d^2r_i(t)/dt^2 = f_i(t)/m_i$ es la aceleración de la partícula i .

Las velocidades, $v_i(t) = \dot{r}_i(t) = dr_i(t)/dt$ no aparecen explícitamente en este esquema. Aunque no sean necesarias para describir la trayectoria, su evaluación es un paso obligatorio para calcular la energía cinética, $\mathfrak{T}(P)$, que depende solo de las variables de impulsión, P , y por consecuencia la energía total del sistema \mathcal{E} . Una forma de calcular la velocidad es:

$$v_i(t) = \frac{r_i(t+\delta t) - r_i(t-\delta t)}{2\delta t} \quad (19)$$

El algoritmo *Leap-frog*,²³ derivado del precedente, utiliza el triplete $\{ r_i(t), v_i(t-\delta t/2), a_i(t) \}$.

$$\begin{cases} r_i(t+\delta t) = r_i(t) + v_i\left(t + \frac{\delta t}{2}\right) \delta t \\ v_i\left(t + \frac{\delta t}{2}\right) = v_i\left(t - \frac{\delta t}{2}\right) + a_i(t) \delta t \end{cases} \quad (20)$$

El primer paso es realmente el cálculo de $v_i(t+\delta t/2)$, con el cual $v_i(t)$, necesaria para el cálculo del término cinético, $\mathfrak{T}(P)$, se deduce según:

$$v_i(t) = \frac{v_i\left(t + \frac{\delta t}{2}\right) + v_i\left(t - \frac{\delta t}{2}\right)}{2} \quad (21)$$

2.3.3 Condiciones de la Dinámica

De acuerdo con la hipótesis ergódica, las simulaciones calculan las propiedades macroscópicas como promedio de un conjunto de microestados denominado colectivo o conjunto, en inglés, “*ensemble*”. Durante la integración simultánea de las ecuaciones de Newton del movimiento, la energía total del sistema tiene que ser conservada.

Manteniendo el volumen a un valor constante, la simulación generará un ensamble estadístico microcanónico (*ensemble NVE*), esto es, en condiciones de número constante de partículas (N), volumen (V) y energía (E), llamado a menudo simulación de DM newtoniana. Sin embargo, esta situación simplística no siempre es satisfactoria. Puede ser deseable entonces realizar simulaciones estadísticas, en las cuales la temperatura o la presión sean cantidades independientes en lugar de propiedades derivadas. La simulación también puede ser realizada en el colectivo canónico (*ensemble NVT*), o también en el colectivo isotérmico-isobárico (*ensemble NPT*).

- Dinámica Molecular a temperatura constante

Se han propuesto numerosos esquemas para realizar simulaciones de DM a temperatura constante, aunque quizás la más sencilla consiste en actualizar periódicamente las velocidades de los átomos del sistema con un factor de escalamiento λ . Este factor λ está dado por $\sqrt{T/T_{\mathfrak{S}}}$ donde $T_{\mathfrak{S}}$ es la temperatura cinética instantánea ($2\mathfrak{S}(P)/3 N k_B$) y T , la temperatura objetivo. Sin embargo, la aplicación de este factor correctivo no proporciona una DM newtoniana. La mecánica newtoniana implica que la energía y el momento se conserven. La dinámica molecular con temperatura cinética constante necesita resolver las ecuaciones del movimiento constreñidas¹⁵:

$$\begin{cases} \dot{r}_i = \frac{P_i}{m_i} \\ \dot{P}_i = f_i - \xi(r; P)P \end{cases} \quad (22)$$

en las cuales $\xi(r, P)$ se puede relacionar con un término de fricción que garantiza $\dot{T}_{\mathfrak{S}} = 0$.

Esta restricción es elegida de tal manera que la perturbación de la trayectoria newtoniana sea mínima:

$$\xi(r; P) = \frac{\sum_i P_i \cdot f_i}{\sum_i |P_i|^2} \quad (23)$$

En un segundo enfoque, llamado acoplamiento débil o *weak coupling*,²⁴ la temperatura del sistema se controla acoplando el sistema a un baño de calor externo que se encuentra a la temperatura deseada. En este termostato el baño actúa como un

reservorio de energía térmica que suministra o quita calor según sea necesario para lograr la temperatura deseada. Las velocidades son actualizadas en cada paso de tiempo donde el grado de cambio es proporcional a la diferencia entre la temperatura cinética instantánea $T_{\mathfrak{S}}(t)$ y la temperatura en el baño externo, temperatura de referencia deseada, T , según:

$$\frac{dT_{\mathfrak{S}}(t)}{dt} = \frac{T - T_{\mathfrak{S}}(t)}{\tau_T} \quad (24)$$

donde τ_T es la constante de amortiguamiento o tiempo de relajación asociado a las fluctuaciones de T , la cual determina el nivel de control que el termostato impone en la simulación. Si τ_T es un valor grande, el acoplamiento será débil y la temperatura fluctuará considerablemente durante el transcurso de la simulación. Si τ_T es pequeño, el acoplamiento será fuerte y las fluctuaciones térmicas pequeñas. La energía cinética es modificada por una cantidad $\Delta \mathfrak{S}$, definida como:

$$\Delta \mathfrak{S} = \frac{1}{2}(\chi^2 - 1)N k_B T_{\mathfrak{S}}(t) \quad (25)$$

Durante un paso de tiempo δt , reactualizando las velocidades por un factor χ :

$$\chi = \left[1 + \frac{\delta t}{\tau_T} \left(\frac{T}{T_{\mathfrak{S}}} - 1 \right) \right]^{1/2} \quad (26)$$

Este acoplamiento aperiódico a una reserva de calor no lleva a respuestas oscilantes a los cambios de temperatura. No obstante, no proporciona la distribución canónica correcta.

El último enfoque, más riguroso, considera al baño externo como una parte integral del sistema introduciendo un grado adicional de libertad, s . Así, se puede escribir la velocidad de la partícula i como $v_i = s \dot{r}_i = P_i / m_i s$. Los términos de energía potencial, V_s y cinética se relacionan con el termostato del sistema como sigue:

$$\begin{cases} V_s = (f+1)k_B T \ln s \\ \mathfrak{S}_s = \frac{1}{2} \mathcal{G} \dot{s}^2 \end{cases} \quad (27)$$

donde f representa los grados de libertad en el sistema, $3N - 3$ si la impulsión total, P , es constante. \mathcal{G} es el parámetro de inercia termal, que regula las fluctuaciones de la

temperatura, y se lo conoce generalmente como la “masa” virtual del grado de libertad extra, s .

Dicho enfoque se conoce como el lagrangiano extendido, dado que puede expresarse como $L_s(r;P) = \mathfrak{I}(P) + \mathfrak{I}_s(P) - V(r) - V_s(r)$. Las ecuaciones del movimiento se pueden restablecer según:

$$\begin{cases} \ddot{r}_i = \frac{f_i}{m_i s^2} - 2 \frac{\dot{s} \dot{r}}{s} \\ \mathcal{G} \ddot{s} = \sum_i m_i \dot{r}_i^2 s - \frac{(f+1) k_B T}{s} \end{cases} \quad (28)$$

Este formalismo, ideado por Nosé,²⁵ ha sido revisado por Hoover,^{26,27} suprimiendo el tiempo dependiente del parámetro s . En las ecuaciones constreñidas del movimiento (22), el término de fricción es ahora proporcionado por una ecuación diferencial de primer orden:

$$\dot{\xi} = \frac{f}{\mathcal{G}} k_B (\dot{T}_{\mathfrak{I}} - T) \quad (29)$$

La cantidad conservada es la del hamiltoniano total, es decir, el del sistema químico más el termostato, $H_s(r;P) = \mathfrak{I}(P) + \mathfrak{I}_s(P) + V(r) + V_s(r)$

- Dinámica molecular a presión constante

En muchas ocasiones es deseable generar trayectorias en un ensamble termodinámico isobárico-isotérmico, (NPT) de manera de replicar las condiciones de presión y temperatura constante en la que se realizan muchas mediciones experimentales.

Un aspecto a destacar es que la presión a menudo fluctúa más que otras cantidades como la temperatura en un ensamble NVT o la energía en uno NVE. Esto se debe al hecho de que la presión se relaciona con el término del virial, que es producto de las posiciones de las partículas en el sistema y la derivada de la función de energía potencial. Estas fluctuaciones se observan en los valores instantáneos de la presión durante la simulación, sin embargo el valor promedio de la presión debería ser aproximado al valor deseado.

Como para mantener la temperatura en un valor constante, el formalismo del lagrangiano extendido se puede aplicar a la presión. Inicialmente imaginado por Andersen²⁸, este enfoque implica que el sistema esté acoplado a una variable externa, V caracterizando al volumen de la caja de simulación. Este acoplamiento simboliza la

acción que un pistón ejercería sobre el sistema, al cual está asociado un término potencial y uno cinético:

$$\begin{cases} \mathcal{V}_v = \frac{1}{2} m_p V^2 \\ \mathfrak{V}_v = PV \end{cases} \quad (30)$$

Donde m_p se puede ver como la masa del pistón y P representa la presión deseada. Actualizando las variables de posición, r , y de velocidad, \mathbf{v} , bajo la forma $s = r/V^{1/3}$ y $\dot{s} = \mathbf{v}/V^{1/3}$, las energías potencial y cinéticas pueden reescribirse como $\mathcal{V}(r) \equiv \mathcal{V}(V^{1/3}s)$ y $\mathfrak{V}(\mathbf{P}) = \frac{1}{2} m V^{2/3} \sum_i \dot{s}_i^2$. A partir del lagrangiano $L_s(r; \mathbf{P}) = \mathfrak{V}(\mathbf{P}) + \mathfrak{V}_s(\mathbf{P}) - \mathcal{V}(r) - \mathcal{V}_s(r)$, se pueden establecer las ecuaciones del movimiento:

$$\begin{cases} \ddot{s}_i = \frac{f_i}{m_i V^{1/3}} - \frac{2}{3} \frac{\dot{s}_i \dot{V}}{V} \\ \ddot{V} = \frac{P_p - P}{m_p} \end{cases} \quad (31)$$

Donde la fuerza, f_i , y la presión instantánea, P_p , derivada del virial, $P_p = \frac{1}{V} (N k_B T - \frac{1}{2} \sum_i r_i \cdot f_i)$, están evaluadas a partir de coordenadas cartesianas. Aquí la cantidad conservada es el hamiltoniano del sistema extendido, $H_s(r; \mathbf{P}) = \mathfrak{V}(\mathbf{P}) + \mathfrak{V}_s(\mathbf{P}) + \mathcal{V}(r) + \mathcal{V}_s(r)$, o sea su entalpía, a la cual se añade la contribución cinética de $1/2 k_B T$ que viene de las fluctuaciones del volumen de la caja de simulación. Hay que destacar que, formalmente, este algoritmo genera una distribución isobárica-isoentálpica, (NPH). Su acoplamiento a un termostato, como el gobernado por la ecuación (28), proporciona la verdadera distribución isobárica-isotérmica.

Se ha observado que el esquema precedente podría llevar a oscilaciones de P_p , en función de la masa del pistón, m_p . Una alternativa que suprime este efecto indeseable amortigua el grado de libertad del pistón a través de una ecuación de Langevin. Rescribiendo la ecuación (31):

$$\begin{cases} \ddot{s}_i = \frac{f_i}{m_i V^{1/3}} - \frac{2 \dot{s}_i \dot{V}}{3 V} \\ \ddot{V} = \frac{P_p - P}{m_p} - \gamma \dot{V} + R(t) \end{cases}, \quad (32)$$

donde γ es la frecuencia de colisión y $R(t)$, una fuerza aleatoria tomada de una distribución gaussiana de promedio cero y de variancia $\langle R(0) R(t) \rangle = 2 \gamma k_B T \kappa(t) / m_p$. Es interesante notar que $R(t)$ satisface la relación de fluctuación-disipación, es decir,

$$\langle R(t_1) R(t_2) \rangle = \frac{1}{m_p} 2 \gamma k_B T \kappa(t_1 - t_2), \text{ en la cual } \kappa(t) \text{ representa el factor de amortización.}$$

Otro enfoque, propuesto por Berendsen y col.,²⁴ es una extensión a las simulaciones con presión constante del algoritmo de acoplamiento débil descrito anteriormente. En el mismo, la presión se mantiene constante acoplando el sistema a un reservorio de presión constante en forma análoga a la manera en la que se mantiene la temperatura en el termostato de Berendsen. Las ecuaciones del movimiento están modificadas en respuesta a la relajación de la presión instantánea, $P_p(t)$, hacia su valor de referencia, P , según:

$$\frac{dP_p(t)}{dt} = \frac{P - P_p(t)}{\tau_p} \quad (33)$$

Donde τ_p es el tiempo de relajación asociado a las fluctuaciones de la presión. Reactualizando las coordenadas atómicas del sistema y el tamaño de la caja por un factor ζ , el volumen total viene modificado por $\Delta V = (\zeta^3 - 1)V$, llevando naturalmente a una variación de la presión que puede expresarse como:

$$\Delta P = \frac{\Delta V}{\beta_\zeta V} \quad (34)$$

En el cual β_ζ representa la compresibilidad isothermal. Solucionando las ecuaciones (33) y (34) para un valor dado de ζ , se obtiene:

$$\zeta = \left[1 - \beta_\zeta \delta t \frac{P - P_p(t)}{\tau_p} \right]^{1/3} \quad (35)$$

Por razones similares al caso de temperatura constante, este algoritmo no proporciona un ensamble termodinámico bien definido.

2.3.4 Condiciones periódicas de contorno

Para poder correlacionar las propiedades de un sistema microscópico a las que describen la fase macroscópica, es importante que los efectos de frontera sean eliminados. En la práctica, se usan las condiciones periódicas de contorno (del inglés *Periodic Boundary Conditions*, PBC), que consisten en replicar el ensamble finito de partículas confinadas en la caja de simulación, a menudo paralelepípeda, según las tres direcciones del espacio cartesiano, de manera de simular un sistema infinito. Si una molécula abandona la caja central por la pared derecha, su imagen ingresará por la pared izquierda desde la caja vecina.

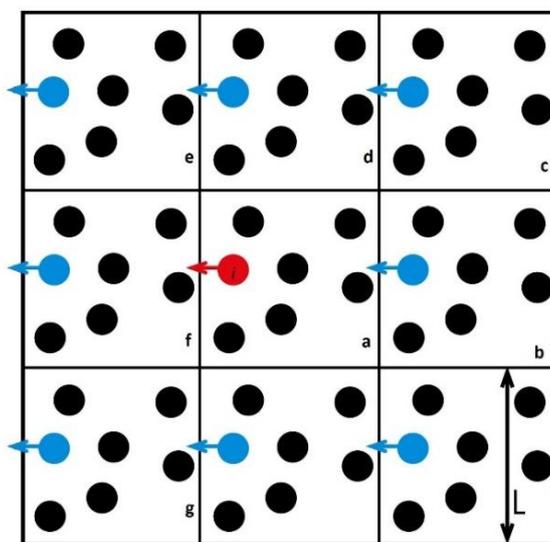


Figura 2.3. Vista bidimensional de la caja de simulación replicada en las tres dimensiones del espacio cartesiano. Al emplear condiciones periódicas de contorno (PBC), cuando una molécula *i* se vaya de la caja central *a*, sus imágenes en las cajas fantasmas vecinas se mueven de una manera similar.

Se ha observado una reproducción fiel y precisa de cantidades termodinámicas a partir de estos modelos de tamaño reducido, lo que justifica la utilización de este enfoque. Una de las restricciones que presenta, es que no se pueden capturar fluctuaciones y correlaciones espaciales que ocurran a una distancia mayor a la mitad de la caja. Otro problema surge del cálculo de las interacciones intermoleculares, ya que no es posible

hacer el cálculo directo de las interacciones de una partícula con el resto de las mismas, ubicadas tanto en la caja central como en las cajas vecinas.

Debido a la naturaleza pseudo-infinita del sistema así generado, se hace necesaria la necesidad de aproximaciones para tratar interacciones intermoleculares. En particular, la aproximación de la “imagen minimal” supone que cada partícula i de la caja central interactúe con la imagen más cercana de todas las otras partículas j . Además, la introducción de una esfera de corte, o cut-off, puede usarse para ignorar interacciones más lejos que una distancia arbitraria. Esta distancia se considera igual o menor que la mitad de la dimensión más pequeña de la caja de simulación.

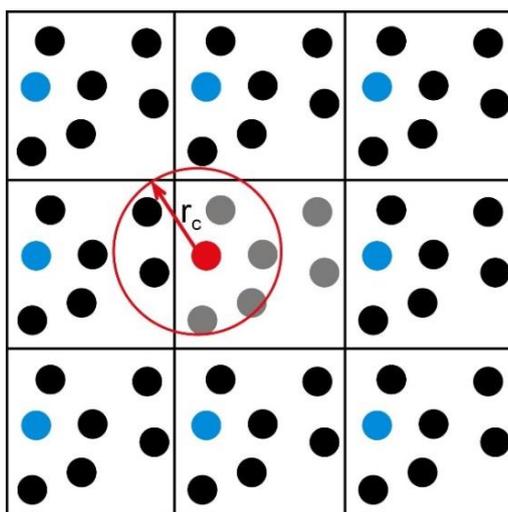


Figura 2.4. Uso de una esfera de corte de radio r_c para limitar el cálculo de las interacciones de la partícula i con sus vecinos.

Tal vez el enfoque más riguroso es el propuesto por Ewald. La idea central del método, conocido como *sumas de Ewald*, consiste en sustituir el sumatorio de todas las interacciones electrostáticas del sistema por una suma de dos términos evaluados, respectivamente, en los espacios directo y recíproco, $E_{ele} = Ee_{dir} + Ee_{rec}$.

El término Ee_{dir} considera las interacciones de corto alcance, calculadas mediante un potencial coulombico modificado. Las cargas originales se representan en el ambiente directo mediante una serie de funciones gaussianas, mientras que estas funciones son contrarrestadas en el ambiente recíproco mediante una serie de distribuciones gaussianas de signo opuesto. El método *particle mesh Ewald* (PME) optimiza el cálculo del espacio recíproco transformando las cargas puntuales a un modelo de cargas distribuidas en

mallas tridimensionales mediante una interpolación *B-spline*, lo que permite emplear transformadas de Fourier en la resolución de E_{rec} , aumentando la velocidad de cálculo.

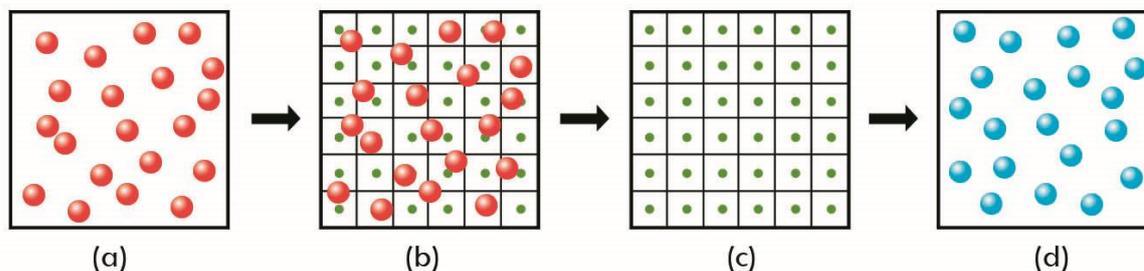


Figura 2.7. Un esquema *particle-mesh* sobre una red bidimensional. **(a)** Un sistema de partículas cargadas. **(b)** Las cargas están interpoladas sobre la rejilla bidimensional. **(c)** Utilizando una transformada de Fourier rápida (FFT), el potencial y las fuerzas están evaluadas en cada punto de la rejilla. **(d)** Las fuerzas están interpoladas hacia las partículas, cuyas posiciones están actualizadas.

2.4 Propiedades accesibles a partir de la trayectoria de dinámica molecular.

2.4.1 Función de Distribución Radial

Entre las propiedades estáticas que pueden extraerse de las trayectorias generadas en el curso de una simulación de dinámica molecular, son particularmente interesantes las propiedades estructurales ya que muestran el orden local en el sistema molecular. La Función de Distribución Radial (RDF, del inglés *Radial Distribution Function*), $g(r)$, mide cómo los átomos se organizan uno en torno a otros (estructura local). Específicamente, $g(r)$ indica la probabilidad de encontrar un par de átomos separados por una distancia r , respecto a la probabilidad esperada para una distribución totalmente aleatoria, con la misma densidad.

Algunas de sus propiedades son:

- $g(r)$ puede pensarse como el factor que multiplica a la densidad macroscópica ρ para obtener una *densidad local* $\rho(r) = \rho g(r)$, suponiendo una partícula cualquiera ubicada en el origen.
- $g(r) \rightarrow 0$ cuando $r \rightarrow 0$ y $g(r) \rightarrow 1$ cuando $r \rightarrow \infty$

En estudios de simulación computacional, $g(r)$ sirve como un indicador de la naturaleza de la fase asumida por el sistema simulado. Para átomos congelados en los sitios de una estructura de un cristal, la función toma la forma de picos elevados coincidentes con la separación de dichos átomos (Figura 2.8).

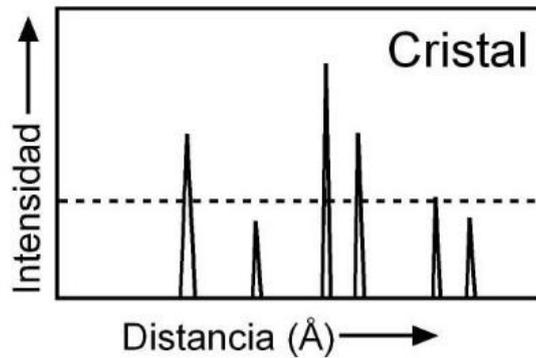


Figura 2.8: Función de distribución radial característica de un sólido cristalino.

El orden de la red cristalina se manifiesta en la regularidad de aparición de los picos en la función de distribución radial. En los gases, los átomos están muy dispersos y en constante movimiento dentro de un determinado volumen, por lo cual la probabilidad de encontrar a un átomo a una distancia r es constante para todo el volumen (Figura 2.9).

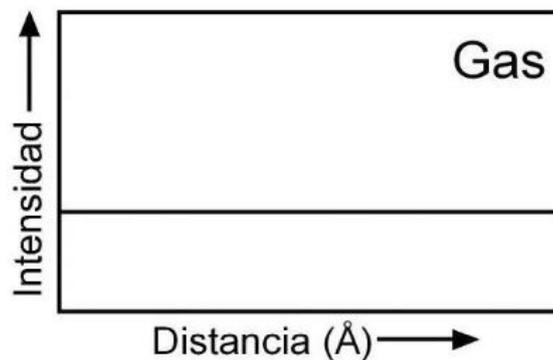


Figura 2.9: Función de distribución radial característica de un gas.

Para líquidos y sólidos amorfos el comportamiento de $g(r)$ es intermedio entre el de cristal y gas: los líquidos exhiben un orden de corto alcance, similar al de los cristales, pero un desorden de largo alcance, tal como en los gases. Se presentan picos suavizados que se aplanan conforme aumenta la distancia (Figura 2.10). En el caso de una sustancia

parcialmente cristalizada, Figura 2.10 (a), $g(r)$ puede contener picos secundarios no encontrados para un fluido. Tales picos adicionales son causados por remanentes de la estructura cristalina.

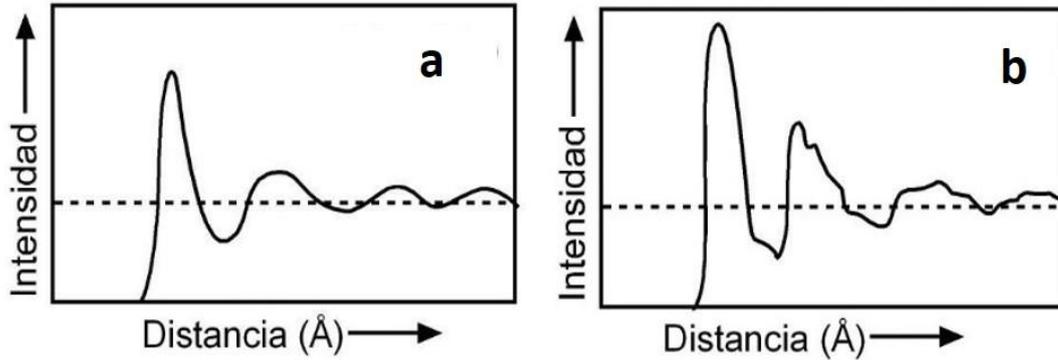


Figura 2.10: Función de distribución radial característica de (a) un líquido (b) un vidrio.

A partir de la estructura provista por $g(r)$ podemos definir capas de coordinación. El número de primeros vecinos a una distancia menor o igual que R respecto de una partícula central puede obtenerse a partir de la integral:

$$n(R) = 4\pi\rho \int_0^R r^2 g(r) dr \quad (36)$$

En el caso de fluidos moleculares, es posible definir ρ como el número de moléculas por unidad de volumen. Cada molécula tendrá sitios (átomos) del tipo α , β , γ , etc. Así, puede definirse $g_{\alpha\beta}(r)$, entre sitios α , β , ... pertenecientes a moléculas distintas. De tal manera que $\rho_\alpha g_{\alpha\beta}$ representará la densidad de sitios α a una distancia r respecto de un sitio de tipo β en el origen, perteneciente a otra molécula.

2.4.2 Difusión

En las simulaciones de DM, el coeficiente de difusión D asociado a la relación de Einstein

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \langle |r_i(0) - r_i(t)|^2 \rangle = 6Dt \quad (37)$$

puede ser obtenido a partir de la pendiente de un gráfico del desplazamiento cuadrático medio $\langle |r_i(0) - r_i(t)|^2 \rangle$, versus el tiempo, para tiempos suficientemente largos. Si el fluido no llegara a ser isótropo, entonces sería necesario trabajar con las mismas expresiones pero separadamente para cada dirección (x, y ó z).

2.4.3 Enlace de Hidrógeno. Definición.

Una de las definiciones más apropiadas de Puente o Enlace de Hidrógeno (EH), dado el estado actual del conocimiento sobre ellos, es la siguiente reformulación de la definición original propuesta por Pimentel y McClellan: “una interacción molecular de tipo X-H···Y es un EH cuando (1) existe evidencia de un enlace y (2) este enlace involucra al átomo de H unido covalentemente a X”. La IUPAC define a los enlaces de este tipo como “una forma de asociación entre un átomo electronegativo y un átomo de hidrógeno unido a un segundo átomo relativamente electronegativo. Es mejor considerada como una interacción electrostática, fortalecida por el pequeño tamaño del hidrógeno, lo cual permite la proximidad de los dipolos o cargas interactuantes. Ambos átomos electronegativos son usualmente (pero no necesariamente) de la primera fila de la tabla periódica, es decir, N, O ó F. Los puentes de hidrógeno pueden ser intermoleculares o intramoleculares.”²⁹

La idea de la importancia de estos enlaces en las estructuras biológicas es casi paralela a su descripción histórica. Actualmente, el puente de hidrógeno es considerado como un elemento clave para entender la estructura de macromoléculas y más aún, como un componente de mecanismos catalíticos de enzimas.

Hoy en día el enlace de hidrógeno (EH) se entiende como un fenómeno muy amplio, con energías que abarcan desde las 0,2 kcal/mol hasta el límite covalente de 40 kcal/mol. Los EHs pueden ser encontrados en estado sólido, líquido o fase gaseosa y comúnmente se representan como X-H···Y. De acuerdo a la naturaleza de X e Y, los EHs se pueden clasificar en “EHs convencionales” y “EHs no convencionales”. En los “EHs convencionales” o “EHs clásicos”, X e Y son átomos con electronegatividades mayores al H, que poseen pares electrónicos libres (por ejemplo O, N, F, Cl, etc). El grupo X-H es el “dador de protón”, e Y es el “aceptor de protón”. Aparte de estos “EHs clásicos” se describen varios tipos de “EHs no convencionales”³⁰ entre los que figuran aquellos en los cuales el dador de protón X-H es no convencional (por ejemplo, C-H···O).^{31,32} Existe una

gran cantidad de evidencia experimental que sugiere que los EHs $C\alpha-H\cdots O$, contribuyen significativamente a estabilizar estructuras secundarias en proteínas, tanto α hélices como láminas β plegadas, como así también otros motivos.³³ En una clasificación de los EHs en base a su fortaleza, los llamados convencionales corresponden a moderados y fuertes mientras que los no convencionales son generalmente EHs débiles.

En esta tesis, al aplicar la metodología DM se utilizó un criterio de tipo geométrico para determinar la existencia de un EH; dos moléculas se consideran unidas por un EH si su posición relativa es tal que la distancia entre el átomo dador y el aceptor, $dX-Y$, es menor a 3,5 Å y el ángulo $X-H\cdots Y$ es mayor a 120°.

Los EHs, también han sido analizados en esta tesis mediante el estudio de la distribución de la densidad de carga electrónica de un sistema basado en la Teoría Cuántica de átomos en Moléculas (QTAIM) desarrollado por Bader.³⁴ A continuación se da una breve descripción de esta teoría.

2.5 Topología de la Densidad de carga electrónica

La *Teoría de Átomos en Moléculas* (Atoms in Molecules, AIM) desarrollada por Bader y col.³⁴, se fundamenta en los rigurosos principios de la mecánica cuántica y hereda de ésta, su poder predictivo. Proporciona el sustento teórico de la hipótesis de estructura molecular que reconoce a la molécula como a un conjunto de átomos unidos por una red de enlaces.

AIM es una teoría interpretativa que ayuda a recobrar conceptos químicos a través de un estudio topológico y riguroso de la densidad electrónica. La teoría no es dependiente de ningún método de cálculo ni experimental, y como punto de partida sólo necesita la densidad electrónica del sistema, que puede obtenerse por cálculos químico cuánticos o por técnicas experimentales. A través de los años la teoría AIM ha evolucionado hacia un programa que establece un puente entre las modernas funciones de onda *ab initio* y el conocimiento químico.

En esta teoría, la definición del átomo topológico se basa en la estructura física que exhibe la distribución de carga electrónica, la cual es una manifestación de las fuerzas que actúan dentro del sistema. Las propiedades atómicas se describen por las mismas ecuaciones de movimiento y teoremas asociados a la mecánica cuántica que se aplican al sistema como un todo.

El estudio de las propiedades topológicas de la densidad de carga $\rho(\mathbf{r})$ se ve facilitado a través del estudio del campo del vector gradiente asociado³⁵⁻³⁷. Las propiedades de este campo proporcionan una definición de los elementos de estructura molecular, de estabilidad estructural y permiten delinear los mecanismos de los cambios estructurales.³⁸

La teoría de estructura molecular identifica el conjunto de interacciones interatómicas presentes en una molécula. Estas interacciones atómicas pueden caracterizarse mediante el estudio de las propiedades del campo escalar derivado de la densidad de carga, su distribución Laplaciana $\nabla^2 \rho(\mathbf{r})$. De acuerdo con Morse y Feshbach³⁹, el Laplaciano es una propiedad extremadamente importante de un campo escalar, ya que permite determinar en forma directa las regiones en donde el campo está concentrado. Además, el estudio del Laplaciano de la densidad de carga es de particular importancia ya que es el lazo de unión entre la forma de $\rho(\mathbf{r})$ y sus propiedades mecánicas.

La mecánica de la densidad de carga está determinada por el tensor cuántico de estrés,^{40,41} una cantidad introducida en la mecánica cuántica por Pauli,⁴² quien demostró que como una consecuencia de las propiedades del tensor de estrés, el signo del laplaciano de $\rho(\mathbf{r})$ determina las magnitudes relativas de los valores locales de las densidades de energías cinética y potencial. Obteniendo un mapa de aquellas regiones en donde el $\nabla^2 \rho(\mathbf{r}) < 0$, las regiones donde la carga electrónica está concentrada, se obtiene un mapa de las regiones donde la densidad de energía potencial contribuye en forma predominante en la disminución de la energía del sistema.

El signo del Laplaciano está determinado por el signo y la magnitud relativa de las tres curvaturas locales de $\rho(\mathbf{r})$, autovalores de la matriz hessiana de $\rho(\mathbf{r})$. Así, existe una íntima unión entre las propiedades topológicas de $\rho(\mathbf{r})$ y su Laplaciano, y a través de las propiedades del Laplaciano se puede establecer una relación entre la forma de la distribución de carga y la mecánica que la gobierna.

2.5.1 Propiedades topológicas de la distribución de la densidad de carga.

La densidad $\rho(\mathbf{r})$ es una descripción de la distribución de carga de un electrón promediada sobre el movimiento de los electrones restantes.

En la teoría de *Átomos en Moléculas*, las propiedades de un sistema se describen sobre la base de una función de distribución en el espacio real, la densidad de carga, y mediante ellas, una base para la definición de estructura en ese espacio.³⁴

Las propiedades topológicas de una distribución de carga electrónica asociada con una configuración nuclear \mathbf{X} , se resumen por el número y tipo de puntos críticos de $\rho(\mathbf{r})$, puntos donde el vector gradiente asociado $\nabla\rho(\mathbf{r})$ se anula⁴³, $\nabla\rho(\mathbf{r})$ se define como:

$$\nabla\rho(\mathbf{r}) = \mathbf{i} \frac{\partial\rho}{\partial x} + \mathbf{j} \frac{\partial\rho}{\partial y} + \mathbf{k} \frac{\partial\rho}{\partial z} \quad (38)$$

donde el vector cero significa que cada derivada individual en el operador gradiente, ∇ , es cero y no sólo sus sumas. El máximo en la posición del núcleo constituye un tipo de punto crítico llamado *punto crítico nuclear* (PCN).

Los puntos críticos se clasifican de acuerdo a su rango (w) y signatura (σ) y se simbolizan por (w, σ) . El rango w de un punto crítico en \mathbf{r}_c (donde \mathbf{r}_c representa al vector posición del punto crítico), es igual al número de autovalores no nulos de la matriz Hessiana Λ :

$$\Lambda_{ij} = \left[\frac{\partial^2 \rho}{\partial \mathbf{r}_i \partial \mathbf{r}_j} \right]_{\mathbf{r}=\mathbf{r}_c} \quad (39)$$

La signatura σ es la suma algebraica de los signos de los autovalores.

Los puntos críticos (w, σ) con $w < 3$, puntos críticos degenerados, son matemáticamente inestables en el sentido de que ante cualquier perturbación pequeña, como la causada por un desplazamiento de los núcleos, el punto crítico desaparece o se bifurca en un número de puntos críticos estables. La presencia de tales puntos críticos indica un cambio en la topología de la densidad electrónica y por lo tanto, un cambio en la estructura molecular. Por esta razón los puntos críticos con $w < 3$ raramente son encontrados en distribuciones de carga en el equilibrio.

Aquellos puntos críticos con rango $w = 3$, son puntos críticos no degenerados y se encuentran en $\rho(\mathbf{r})$ para todos los \mathbf{X} que pertenecen a un subconjunto denso del espacio de configuración nuclear. Los elementos de una estructura se definen en términos de las propiedades de estos puntos críticos³⁴.

Existen cuatro tipos diferentes de puntos críticos de rango tres: (3, -3), (3, -1), (3, +3) y (3, +1). Los términos autovalores o curvaturas, y autovectores o trayectorias de gradiente se utilizan indistintamente.

- **Punto crítico (3, -3):** Las tres curvaturas son negativas y $\rho(\mathbf{r})$ es un máximo local en \mathbf{r}_c , coincide habitualmente con la posición del núcleo, se denomina atractor nuclear.

- **Punto crítico (3, -1):** Dos curvaturas son negativas y $\rho(\mathbf{r})$ es un máximo en \mathbf{r}_c en el plano definido por los autovectores correspondientes pero es un mínimo en \mathbf{r}_c a lo largo del tercer eje perpendicular a este plano (es mínimo en la dirección de la línea que une los núcleos atómicos entre los que se encuentra y máximo en las dos direcciones perpendiculares a esta). Es un punto de silla y se identifica con un punto de enlace.

- **Punto crítico (3, +3):** Las tres curvaturas son positivas y $\rho(\mathbf{r})$ es un mínimo local en \mathbf{r}_c , sus autovalores definen un volumen de líneas de gradiente que nacen desde este punto. Está asociado a la idea estructural de caja.

- **Punto crítico (3, +1):** Dos curvaturas son positivas. $\rho(\mathbf{r})$ es un mínimo en \mathbf{r}_c en el plano definido por los autovectores correspondientes y es un máximo en \mathbf{r}_c a lo largo del tercer eje perpendicular a este plano. La presencia de este punto crítico se asocia con el concepto estructural de anillo.

En la figura 2.11 se muestra como ejemplo, la distribución espacial de la densidad electrónica en el plano conteniendo los núcleos de bromo de una molécula de Br_2 . La densidad electrónica es un máximo en la posición de los núcleos y decae rápidamente a medida que nos alejamos de esas posiciones.

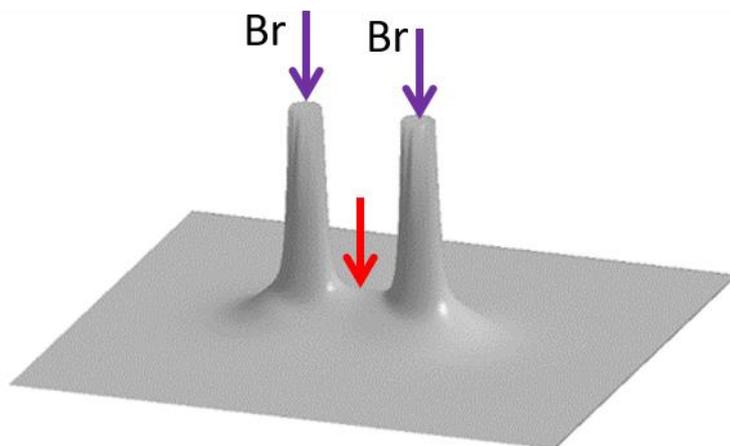


Figura 2.11. Mapa de relieve para una molécula de Br_2 . Las flechas violeta señalan los PC (3, -3) correspondientes a los átomos de Bromo y la flecha roja señala el PC (3, -1).

La función $\nabla\rho(\mathbf{r})$ define un campo de trayectorias o vectores dirigidos en cada punto, a lo largo del gradiente de la densidad de carga. Los vectores o trayectorias de gradiente se originan en puntos críticos con curvatura positiva, y terminan en puntos críticos con curvatura negativa.

Cuando los tres autovalores tienen el mismo signo, +3, o -3, es posible construir un conjunto infinito de tres trayectorias de gradiente mutuamente ortogonales que se originan o terminan respectivamente, en el punto crítico. Así, un punto crítico (3, +3) es un mínimo en la densidad de carga. Esta aumenta a medida que nos movemos en cualquier dirección alejándonos del punto crítico. Un punto crítico (3, -3) es un máximo en $\nabla\rho(\mathbf{r})$. La densidad de carga disminuye a medida que nos movemos en cualquier dirección alejándonos del punto crítico. El conjunto de trayectorias de gradiente que terminan en un punto crítico en $\rho(\mathbf{r})$ definen un espacio de volumen en un sistema molecular.

Dos autovalores del mismo signo, signatura +1 ó -1, generan infinitos conjuntos de pares de trayectorias mutuamente ortogonales que se originan o terminan, respectivamente en el punto crítico y definen una superficie perpendicular al eje definido por la trayectoria de gradiente asociada al autovalor de distinto signo. Si el autovalor de distinto signo es positivo, punto crítico (3, -1), se originan dos trayectorias de gradiente de sentidos opuestos que definen un eje único en el espacio a lo largo del cual $\rho(\mathbf{r})$ aumenta a medida que nos alejamos del punto crítico. Si el autovalor de distinto signo es negativo, punto crítico (3, +1), $\rho(\mathbf{r})$ disminuye a lo largo del eje definido por este autovalor, a medida que nos alejamos del punto crítico.

2.5.2 Significado químico de los puntos críticos. Elementos de una estructura molecular

Existe una región abierta del espacio que rodea a un punto crítico (3, -3) tal que todas las trayectorias de gradiente que se originan en este espacio, terminan sobre el punto crítico. Así, un punto crítico (3, -3) se comporta como un atractor del campo del vector gradiente $\nabla\rho$. La mayor región del espacio en la que se verifique esta observación y que además resulte invariante al flujo de $\nabla\rho$ se denomina *cuenca* del atractor.

Como en general, los máximos de la distribución de carga coinciden con las posiciones nucleares,⁴⁴ los núcleos actúan como atractores de la misma. El resultado de esta identificación es tal que el espacio de una distribución de carga molecular es particionado en regiones disjuntas -las cuencas- cada una de las cuales contiene un punto

atractor o núcleo. Un átomo (libre ó unido) se define entonces como la unión del atractor y su cuenca asociada. Para un átomo aislado, la cuenca cubre enteramente el espacio tridimensional, \mathbb{R}^3 . Para un átomo en una molécula, la cuenca es un subconjunto abierto de \mathbb{R}^3 y los átomos vecinos están separados por superficies interatómicas. La existencia de una superficie interatómica indica la presencia de un punto crítico (3, -1) entre dos núcleos vecinos.

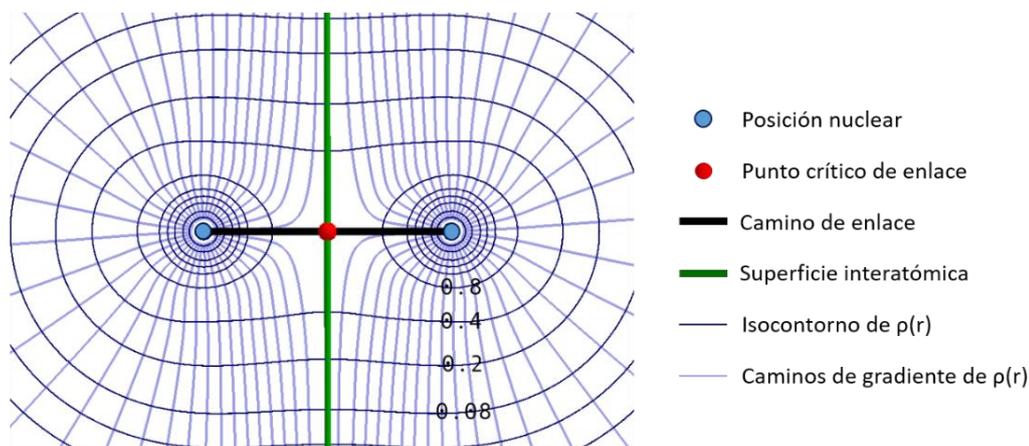


Figura 2.12. Mapa del campo vector gradiente de la densidad electrónica para el plano que contiene los núcleos de bromo de la molécula de Br_2 , superpuesto con un mapa de contorno de la densidad.

Debido a las propiedades topológicas de un punto crítico (3, -1), estas superficies interatómicas, $S(\mathbf{r})$, tienen un carácter único: son las únicas superficies continuas y cerradas que satisfacen la condición de flujo cero^{45,46}:

$$\nabla\rho(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{n}(\mathbf{r}) = 0 \quad \forall \mathbf{r} \in S(\mathbf{r}) \quad (40)$$

donde \mathbf{r} es el vector posición y $\mathbf{n}(\mathbf{r})$ es el vector normal a la superficie S en \mathbf{r} . Esta condición equivale a decir que todas las trayectorias generadas en las cercanías de un dado núcleo, terminan sobre este núcleo y ninguna atraviesa la cuenca de un átomo vecino. (ver Figura 2.12).

Los pares de caminos de gradiente que se originan en cada punto crítico (3, -1) terminan sobre los núcleos vecinos definiendo una línea a lo largo de la cual, la densidad de carga es máxima con respecto a cualquier línea vecina, esta línea es llamada *línea de interacción atómica*.

Ha sido demostrado,⁴⁷ que la acumulación de carga a lo largo de esta línea de interacción, es una condición necesaria para asegurar la unión entre dos átomos. También es una condición suficiente cuando las fuerzas entre los núcleos están balanceadas y el sistema posee una energía mínima a la separación internuclear de equilibrio. En este caso la línea de máxima densidad de carga entre los núcleos es llamada *línea de enlace* o *camino de enlace*, CE y el punto crítico (3, -1) es llamado *punto crítico de enlace*, PCE. La red de caminos de enlaces que unen a núcleos vecinos se denomina *grafo molecular*. Ha sido observado que los grafos moleculares que se obtienen de esta forma, coinciden con los que se obtendrían uniendo aquellos pares de átomos que en base a argumentos químicos se consideran enlazados.

El número de caminos de enlaces es igual al número de uniones químicas y no al número supuesto de enlaces por pares de electrones cuando esta descripción asigna enlaces múltiples a pares de átomos enlazados. Como ha sido señalado por Coulson⁴⁸, la densidad de un orbital π no está separada espacialmente de la de un orbital σ . Así, todos los enlaces, incluyendo los enlaces múltiples son topológicamente equivalentes y exhiben un único punto crítico (3, -1) con un máximo de ρ en \mathbf{r}_c , sobre la superficie atómica.

Una propiedad importante de un enlace es su elipticidad que se define como:

$$\varepsilon = \frac{\lambda_1}{\lambda_2} - 1 \quad (41)$$

donde λ_1 y λ_2 son las dos curvaturas negativas de un punto crítico (3, -1). En un enlace con simetría cilíndrica, estas dos curvaturas son de igual magnitud y la elipticidad es cero. Sin embargo, cuando la carga electrónica está acumulada en un determinado plano, a lo largo del camino de enlace (como por ejemplo, en un enlace π), la velocidad de disminución de ρ a lo largo del eje que yace en este plano es menor que a lo largo de un eje perpendicular al mismo y la magnitud de la correspondiente curvatura de ρ es menor. La elipticidad en este caso es mayor que cero.

Los otros dos puntos críticos de rango tres, aparecen como consecuencia de arreglos geométricos particulares de los caminos de enlaces y definen los dos elementos restantes de una estructura molecular -*anillos* y *cajas*.

Los puntos críticos (3, +1) se localizan en el centro de los anillos formados por tres o más núcleos. El eje único, a lo largo del cual $\rho(\mathbf{r})$ disminuye si nos alejamos del punto crítico es perpendicular al plano del anillo y constituye la línea de frontera a lo largo de

la cual, se interceptan las superficies de los fragmentos atómicos que forman el anillo. La superficie asociada a este punto, es el plano del anillo.

Cuando los caminos de enlaces se ordenan de manera tal que encierran el interior de una molécula con superficies de anillos, un punto crítico (3, +3) es encontrado en el interior de la caja resultante. La densidad de carga es un mínimo local en un punto crítico de caja.

El número y tipo de puntos críticos que pueden coexistir en un sistema con un número finito de núcleos, está gobernado por la relación de Poincaré-Hopf. Teniendo en cuenta la asociación dada anteriormente de cada tipo de punto crítico con un elemento de estructura molecular, esta relación establece que:

$$n - b + r - c = 1 \quad (42)$$

donde n es el número de núcleos, b es el número de caminos de enlaces (o líneas de interacciones atómicas), r es el número de anillos y c es el número de cajas. La serie de números (n, b, r, c) es llamada *conjunto característico* de la molécula.

2.5.3 Definición del átomo topológico

La definición topológica de un átomo como la unión de un atractor y su cuenca,^{35,36} es equivalente a la ecuación:

$$\nabla\rho(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{n}(\mathbf{r}) = 0 \quad \forall \mathbf{r} \in S(\Omega; \mathbf{r}). \quad (43)$$

Recordemos que las cuencas de átomos vecinos están separadas por superficies interatómicas y sus núcleos están unidos a través de líneas de interacción atómicas a lo largo de las cuales, la densidad de carga es máxima con respecto a cualquier línea vecina. La red de líneas de interacción define la estructura de un sistema. En general, una dada estructura persiste sobre una región abierta del espacio de configuraciones nucleares⁴⁹.

Incorporada en la definición de estructura, está la idea de relacionar las propiedades de una molécula con un conjunto de interacciones de a pares que dominan y caracterizan la mecánica que gobierna a dicha estructura. Las interacciones pueden ser atractivas o repulsivas y la definición de estructura en términos de las interacciones atómicas dominantes es esencial para comprender una u otra situación.

Ha sido demostrado⁴⁷, que las interacciones atómicas determinadas por esta definición de estructura molecular caen en dos amplias clases generales, cada una caracterizada por un conjunto particular de propiedades mecánicas.

Las interacciones entre átomos de capa cerrada, como las que se encuentran en los estados repulsivos de los gases nobles, en enlaces iónicos, en enlaces de hidrógeno y en moléculas de Van der Waals están gobernadas por una contracción de la densidad de carga hacia cada uno de los núcleos intervinientes. La mecánica de tales interacciones está dominada por un valor relativamente grande de la energía cinética, particularmente por la componente paralela a la línea de interacción que une a los núcleos. En las interacciones de capa cerrada, las regiones de baja energía potencial están localizadas separadamente dentro de la frontera de cada uno de los átomos o moléculas que intervienen en la interacción.

Las interacciones de carga compartida como en los enlaces covalentes ó polares, están gobernadas por una contracción de la densidad de carga hacia la línea de interacción que une a los núcleos. La mecánica de tales interacciones está gobernada por un valor relativamente grande de la energía potencial en la región internuclear. Esta región de baja energía potencial es contigua sobre las cuencas de ambos átomos. Estas son clasificaciones límites, pero existen interacciones con propiedades intermedias entre estos límites.

2.5.4 Propiedades del Laplaciano de la densidad de carga

En una dimensión, la curvatura de $\rho(\mathbf{r})$ es una medida de la diferencia entre su valor promedio en puntos vecinos a r y su valor en r . El análogo tridimensional de la densidad de carga es su Laplaciano $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$. Un valor negativo para el Laplaciano en algún punto significa que la carga electrónica tiende a concentrarse en este punto. Además de cuantificar en sentido absoluto las regiones en donde la carga está concentrada y reducida, el Laplaciano de la densidad de carga juega un importante papel teórico en el estudio de la densidad de carga: determina la densidad lagrangiana monopartícula de un sistema mecanocuántico.

Si bien, la integración sobre todo el espacio del Laplaciano de cualquier función de buen comportamiento da cero, en el caso de la función $\rho(\mathbf{r})$ este hecho tiene una importante implicación física: la integral de acción y el Lagrangiano se anulan para un

sistema cuántico aislado. La misma propiedad de ρ es observada para ciertos subsistemas (átomos) de un sistema aislado, y debido a esta propiedad común, se aplica un único principio de acción estacionaria a toda la molécula y a los átomos dentro de ella.

El Laplaciano de $\rho(\mathbf{r})$ determina a través de las magnitudes relativas de sus tres curvaturas, el desequilibrio en las contribuciones de las energías cinética y potencial al virial de un sistema $-L(r) = V(r) + 2G(r)$, donde $L(r)$ es la densidad lagrangiana, $G(r)$ la densidad de energía cinética y $V(r)$ es la densidad de energía potencial electrónica. Esta propiedad de relacionar las regiones de concentración y de reducción de carga con regiones en donde dominan la disminución de energía potencial y aumento de la energía cinética respectivamente, constituye la base para la clasificación de las interacciones atómicas.

- *Clasificación de las interacciones atómicas.*

El valor del Laplaciano de $\rho(\mathbf{r})$ en \mathbf{r}_c es negativo para interacciones que usualmente se describen como covalentes o polares. La distribución de carga en estas interacciones, está dominada por las curvaturas negativas de $\rho(\mathbf{r})$. La carga electrónica está concentrada en la región internuclear como resultado de la contracción perpendicular de $\rho(\mathbf{r})$ hacia la línea de interacción o camino de enlace. Esta concentración de carga se refleja en un valor relativamente grande de $\rho(\mathbf{r})$, y en una relación $|\lambda_1|/\lambda_3$ mayor que la unidad. La región del espacio en el cual el Laplaciano es negativo, contiene al punto crítico y es contigua sobre las regiones de valencia de ambos átomos. Ellos comparten la densidad electrónica de valencia conduciendo a una única región de energía potencial relativamente baja que se extiende sobre la cuenca de ambos átomos.

El segundo tipo límite de interacción atómica es el que se observa entre sistemas de capa cerrada. Estas interacciones están dominadas por el principio de exclusión de Pauli. La densidad de carga electrónica, $\rho(\mathbf{r})$, toma valores relativamente bajos, la relación $|\lambda_1|/\lambda_3$ es menor que la unidad y el valor de $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$ es positivo. El signo del Laplaciano en estos casos, está determinado por la curvatura positiva de $\rho(\mathbf{r})$ a lo largo de la línea de interacción, mientras que el principio de exclusión conduce a una reducción de carga en la superficie interatómica. Estas interacciones están dominadas por la contracción de carga desde la superficie interatómica hacia cada uno de los núcleos. El

Laplaciano de $\rho(\mathbf{r})$ es positivo sobre toda la región de interacción y la contribución de la energía cinética en esta región es mayor que la contribución de la energía potencial.

2.6 *Análisis de los orbitales naturales de enlace, NBO*

El análisis de población electrónica conocido como Orbitales Naturales de Enlace (*Natural Bond Orbitals, NBO*)⁵⁰⁻⁵² se originó como una técnica para el estudio de efectos como la hibridización, enlaces covalentes e iónicos, en funciones de onda poliatómicas. Es una técnica que permite obtener orbitales localizados a partir de funciones de onda ab-initio. Tales orbitales pueden ser identificados con los enlaces, pares libres y antienlaces que forman parte del lenguaje habitual de la química.

En este análisis el conjunto base de orbitales atómicos se transforma via orbitales atómicos naturales (NAO) y orbitales naturales híbridos (NHO)⁵³, en orbitales naturales de enlace (NBO). Estos NBO corresponden a la representación de Lewis comúnmente utilizada, en la cual tanto los enlaces como los pares libres están localizados en átomos específicos. Por ejemplo, dentro del paradigma NBO, un enlace del tipo σ localizado entre los átomos A y B, está formado por los orbitales naturales híbridos (NHO) centrados en los átomos A y B, h_A y h_B , (obtenidos a partir de un conjunto de orbitales atómicos naturales optimizados):

$$\sigma_{AB} = C_A h_A + C_B h_B \quad (44)$$

2.7 *Referencias:*

- (1) Foresman, J. B.; Frisch, A. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*, 2nd ed.; Gaussian, I., Ed.; Pittsburgh, PA. USA, 1996.
- (2) Ditchfield, R.; Hehre, W. J.; Pople, J. A. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. *J. Chem. Phys.* **1971**, *54* (2), 724–728.
- (3) Hehre, W. J.; Ditchfield, R.; Pople, J. A. Self—Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian—Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. *J. Chem. Phys.* **1972**, *56* (5), 2257–2261.

- (4) Hariharan, P. C.; Pople, J. A. Accuracy of AH_n Equilibrium Geometries by Single Determinant Molecular Orbital Theory. *Mol. Phys.* **1974**, *27* (1), 209–214.
- (5) Hariharan, P. C.; Pople, J. . The Influence of Polarization Functions on Molecular Orbital Hydrogenation Energies. *Theor. Chim. Acta* **1973**, *28* (3), 213–222.
- (6) Hohenberg, P.; Kohn, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* **1964**, *136* (3B), B864–B871.
- (7) Kohn, W.; Sham, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev.* **1965**, *140* (4A), A1133–A1138.
- (8) Perdew, J. P.; Chevary, J. A.; Vosko, S. H.; Jackson, K. A.; Pederson, M. R.; Singh, D. J.; Fiolhais, C. Atoms, Molecules, Solids, and Surfaces: Applications of the Generalized Gradient Approximation for Exchange and Correlation. *Phys. Rev. B* **1992**, *46* (11), 6671–6687.
- (9) Becke, A. D. Density-Functional Exchange-Energy Approximation with Correct Asymptotic Behavior. *Phys. Rev. A* **1988**, *38* (6), 3098–3100.
- (10) Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (7), 5648.
- (11) Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple [Phys. Rev. Lett. *77*, 3865 (1996)]. *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *78* (7), 1396.
- (12) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37* (2), 785–789.
- (13) Haile, J. M. *Molecular Dynamics Simulation : Elementary Methods*; Wiley, 1997.
- (14) Frenkel, D.; Smit, B. *Understanding Molecular Simulation : From Algorithms to Applications*.
- (15) Allen, M. P.; Tildesley, D. J. *Computer Simulation of Liquids*; Clarendon Press: Oxford, 1989.
- (16) van Gusteren, W. F.; Berendsen, H. J. C. Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications and Perspectives in Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 992–1023.
- (17) Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (19), 5179–5197.

- (18) Kollman, P.; Dixon, R.; Cornell, W.; Fox, T.; Chipot, C.; Pohorille, A. The Development/Application of a ‘Minimalist’ Organic/Biochemical Molecular Mechanic Force Field Using a Combination of Ab Initio Calculations and Experimental Data. In *Computer Simulation of Biomolecular Systems*; Springer Netherlands: Dordrecht, 1997; pp 83–96.
- (19) Singh, U. C.; Kollman, P. A. An Approach to Computing Electrostatic Charges for Molecules. *J. Comput. Chem.* **1984**, *5* (2), 129–145.
- (20) Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W.; Kollman, P. A. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97* (40), 10269–10280.
- (21) Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. . Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23* (3), 327–341.
- (22) Verlet, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Phys. Rev. Rev* **1967**, *159* (1), 98–103.
- (23) Hockney, R. W.; Eastwood, J. W. *Computer Simulation Using Particles*; Mc Graw Hill: New York, 1981.
- (24) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81* (8), 3684.
- (25) Nosé, S. A Molecular Dynamics Method for Simulations in the Canonical Ensemble. *Mol. Phys.* **1984**, *52* (2), 255–268.
- (26) Hoover, W. G. Nonequilibrium Molecular Dynamics. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1983**, *34* (1), 103–127.
- (27) Hoover. Canonical Dynamics: Equilibrium Phase-Space Distributions. *Phys. Rev. A, Gen. Phys.* **1985**, *31* (3), 1695–1697.
- (28) Andersen, H. C. Molecular Dynamics Simulations at Constant Pressure and/or Temperature. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72* (4), 2384–2393. <https://doi.org/10.1063/1.439486>.
- (29) <http://goldbook.iupac.org>.
- (30) Buemi, G. *Hydrogen Bonding—New Insights*; Grabowski, S., Ed.; Springer, 2006; Vol. 3.
- (31) Scheiner, S.; Gu, Y.; Kar, T. Evaluation of the H-Bonding Properties of CH \cdots O Interactions Based upon NMR Spectra. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2000**, *500* (1–

- 3), 441–452.
- (32) Gu, Y.; Kar, T.; Scheiner, S. Fundamental Properties of the CH \cdots O Interaction: Is It a True Hydrogen Bond? *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (40), 9411–9422.
- (33) Scheiner, S. Hydrogen Bonding—New Insights; Grabowski, S., Ed.; Springer, 2006; Vol. 3.
- (34) Bader, R. F. W. *Atoms in Molecules. A Quantum Theory*; Clarendon Press: Oxford, 1990.
- (35) Bader, R. F. W.; Runtz, G. R. Virial Partitioning of Polyatomic Systems. *Mol. Phys.* **1975**, *30* (1), 117–128.
- (36) Runtz, G. R.; Bader, R. F. W.; Messer, R. R. Definition of Bond Paths and Bond Directions in Terms of the Molecular Charge Distribution. *Can. J. Chem.* **1977**, *55* (16), 3040–3045.
- (37) Bader, R. F. W.; Nguyen-Dang, T. T.; Tal, Y. Quantum Topology of Molecular Charge Distributions. II. Molecular Structure and Its Change. *J. Chem. Phys.* **1979**, *70* (9), 4316–4329.
- (38) Nguyen-Dang, T. T.; Bader, R. F. W. A Theory of Molecular Structure. *Physica* **1982**, *114*, 68–73.
- (39) Morse, P.; Feshbach, H. *Methods of Theoretical Physics*; McGraw-Hill: New York, 1953.
- (40) Bader, R. F. W.; Nguyen-Dang, T. T. Quantum Theory of Atoms in Molecules—Dalton Revisited. *Adv. Quantum Chem.* **1981**, *14*, 63–124. [https://doi.org/10.1016/S0065-3276\(08\)60326-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3276(08)60326-3).
- (41) Bader, R. F. W. Quantum Topology of Molecular Charge Distributions. III. The Mechanics of an Atom in a Molecule. *J. Chem. Phys.* **1980**, *73* (6), 2871–2883.
- (42) Pauli, W. *General Principles of Mechanics*; Springer: Berlin, 1980.
- (43) Collard, K.; Hall, G. G. Orthogonal Trajectories of the Electron Density. *Int. J. Quantum Chem.* **1977**, *12* (4), 623–637.
- (44) Bader, R. F. W.; Stephens, M. E. Spatial Localization of the Electronic Pair and Number Distributions in Molecules. *J. Am. Chem. Soc.*
- (45) Eckart, C. The Penetration of a Potential Barrier by Electrons. *Phys. Rev.* **1930**, *35* (11), 1303–1309.
- (46) Mezey, P.G. Potential Energy Hypersurfaces. Elsevier Science Pub. Co. Inc., New York, NY 1987.
- (47) Bader, R. F. W.; Essén, H. The Characterization of Atomic Interactions. *J. Chem.*

- Phys.* **1984**, *80* (5), 1943–1960.
- (48) Coulson, C. A.; March, N. H.; Altmann, S. Pi-Electrons and Sigma-Electrons. *Proc. Nat. Acad. SC* **1952**, *38*, 372.
- (49) Bader, R. F. W.; Tang, T. H.; Tal, Y.; Biegler-Koenig, F. W. Molecular Structure and Its Change: Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104* (4), 940–945.
- (50) Weinhold, F. Natural Bond Orbital Methods in: P.v.R. Schleyer. In *Encyclopedia of Computational Chemistry*; P. v.R. Schleyer, Allinger, N. L., Clark, T., Gasteiger, J., Kollman, P. A., III, H. F. S., Schreiner, P. R., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, UK, 1998; pp 1792–1811.
- (51) Weinhold, F. Nature of H-Bonding in Clusters, Liquids, and Enzymes: An Ab Initio, Natural Bond Orbital Perspective. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1997**, *398–399*, 181–197.
- (52) Reed, A. E.; Curtiss, L. A.; Weinhold, F. Intermolecular Interactions from a Natural Bond Orbital, Donor-Acceptor Viewpoint. *Chem. Rev.* **1988**, *88* (6), 899–926.
- (53) Foster, J. P.; Weinhold, F. Natural Hybrid Orbitals. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (24), 7211–7218.

CAPÍTULO III

*“Caracterización estática y dinámica de los
disacáridos Trehalosa, Sacarosa y
Maltosa”*

3.1 Introducción

En general, las células no pueden sobrevivir en condiciones deshidratadas, básicamente, porque en estas condiciones, las membranas celulares son incapaces de proteger y preservar el contenido celular y de controlar las actividades de transporte y permeabilidad. Sin embargo, como se ha mencionado en el capítulo I, ciertos organismos, incluyendo insectos del desierto, embriones de camarón salmuera, levaduras, esporas de algunos hongos, nematodos, larvas y bacterias pueden sobrevivir en condiciones anhidrobióticas durante prolongados períodos de tiempo. La característica común de estos organismos es la acumulación de altas concentraciones de óligo- o disacáridos,¹⁻³ especialmente trehalosa y sacarosa frente al estrés hídrico. La habilidad para sobrevivir a la desecación ha sido atribuida al hecho de que los sacáridos permiten mantener la fluidez de la membrana celular y por lo tanto su funcionalidad y ha promovido el estudio de los disacáridos como agentes bioprotectores.⁴⁻¹⁰

La trehalosa ocurre naturalmente en la forma α -D-glucopiranosil-(1,1)- α -D-glucopiranosido. Esta forma, es la conformación de menor energía entre los tres isómeros posibles de la trehalosa (α,α -; α,β -; β,β -). Se trata además de un azúcar no reductor, dado que la unión glicosídica involucra a los grupos OH de los dos carbonos anoméricos. Desde un punto de vista termodinámico y cinético, la trehalosa es el disacárido natural más estable. La energía del enlace glicosídico es baja, comparada con las de otros disacáridos, menor que -4,2 kJ/mol (el de la sacarosa es de +113 kJ/Mol)¹¹. También ha sido demostrado que la trehalosa es capaz de actuar como protector frente al estrés físico provocado por la desecación, cambios osmóticos, frío, calor y presencia de metales pesados¹²⁻¹⁴. En ausencia de agua, mantiene a los lípidos en fase fluida evitando la separación de fase, ruptura y disgregación de las membranas¹⁵. Evita eficazmente las reacciones de Maillard¹⁶ que se producen entre un azúcar reductor y el grupo amino de los aminoácidos. Estas propiedades de la trehalosa encuentran numerosas aplicaciones en la industria medicinal, alimentaria, cosmética y farmacéutica¹⁷⁻¹⁹.

Sin embargo, el mecanismo mediante el cual la trehalosa y los azúcares en general, ejercen un papel protector, no es totalmente comprendido y sigue siendo objeto de una intensa actividad científica²⁰⁻²⁷.

Con el propósito de contribuir al entendimiento de este mecanismo, en este trabajo se realiza un estudio comparativo (estático y dinámico) de los disacáridos trehalosa (anhidra y dihidratada), maltosa (4-O- α -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosido), y sacarosa (α -D-glucopiranosil- β -D-fructofuranósido). La estructura electrónica de los azúcares se analiza en el marco de la Teoría QTAIM²⁸. Luego, mediante un análisis de los Orbitales Naturales de Enlaces (NBO)²⁹ se evaluaron las interacciones hiperconjugativas de transferencia de carga (IHTC) entre los orbitales dadores y aceptores y se examinaron y cuantificaron los efectos anoméricos y exo-anoméricos. Finalmente, simulaciones mediante dinámica molecular en vacío y en soluciones acuosas infinitamente diluidas fueron empleadas para examinar el efecto del solvente y las características de hidratación de los tres azúcares. En el análisis de las interacciones de enlaces de hidrógeno (EHs) se ha prestado especial atención a los EH del tipo C–H \cdots O. El estudio de estos EHs, debido a su mayor labilidad (esto es, menor requerimiento energético para su formación y/o ruptura), mayor flexibilidad angular (dado que ellos son menos direccionales) y la posibilidad de que las moléculas de agua se involucren para formar EHs bifuncionales, puede dar una idea más acabada de lo que ocurre en el proceso de interés.

3.2 Metodología

Las estructuras iniciales de los disacáridos fueron obtenidas de una base de datos cristalográfica³⁰⁻³³. En el caso de la trehalosa, fueron analizadas las dos formas cristalinas reportadas en la literatura así como la forma anhidra obtenida por remoción de las moléculas de agua. Las geometrías fueron optimizadas sin ninguna restricción usando el funcional de intercambio de tres parámetros de Becke, el funcional de gradiente corregido de Lee, Yang y Parr (funcional B3LYP)^{34,35} y el conjunto base 6-311++G**. La naturaleza de mínima energía de las estructuras optimizadas fue verificada usando el análisis de frecuencias vibracionales. Todos estos cálculos de estructura electrónica fueron realizados con el paquete de programas Gaussian 03³⁶.

Luego, las estructuras optimizadas fueron usadas para realizar un análisis NBO con el programa NBO 3.1³⁷ implementado en Gaussian 03. Los cálculos QTAIM fueron llevados a cabo utilizando funciones de onda generadas al nivel B3LYP/6-311++G** con los programas AIMALL³⁸ y MULTIWFN³⁹.

Protocolo de simulación

La estructura optimizada de cada disacárido fue solvatada con 1500 moléculas de agua TIP3P⁴⁰ en una caja octaédrica. Las cargas puntuales sobre los núcleos atómicos fueron ajustadas con el método RESP⁴¹ usando Gaussian 03 al nivel HF/6-31G* de teoría. Las simulaciones de DM fueron realizadas con el paquete de software AMBER 11⁴² usando los campos de fuerza GAFF y ff99SB. Las simulaciones fueron precedidas por dos etapas de minimización energética usando los métodos de Pendiente Pronunciada (Steepest Descent) y Gradiente Conjugado. La primera etapa fue realizada usando restricciones de fuerzas armónicas sobre los átomos del azúcar y la segunda etapa, sin restricciones. Los sistemas resultantes de mínima energía potencial fueron sometidos a 500 ps de DM bajo condiciones de volumen constante hasta 300 K con restricciones de movimiento sobre los mismos átomos que en el primer paso de la minimización. Luego el sistema fue equilibrado en un ensamble NPT a 300 K y 1 atm sin ninguna restricción sobre los átomos durante 10 ns. La temperatura y presión constante fueron satisfechas mediante el algoritmo de acoplamiento de Langevin⁴³, y todas las distancias de enlaces que involucran átomos de hidrógeno fueron restringidas con el algoritmo SHAKE⁴⁴. Las interacciones electrostáticas de largo alcance fueron calculadas usando el método particle mesh Ewald (PME)⁴⁵, mientras que las interacciones de van der Waals (vdW) fueron calculadas usando el potencial 6-12 de Lennard-Jones. La distancia de corte para las interacciones no enlazantes de van der Waals fue fijada en 10 Å. Las ecuaciones de movimiento fueron integradas con un tamaño de paso de 2 fs. Las corridas de recolección de datos ó etapa de producción fueron realizadas en un ensamble NVT durante 25 ns. Finalmente, con el propósito de analizar la influencia del solvente sobre las geometrías y los EHs de los tres disacáridos se realizaron 25 ns de corridas de DM en vacío.

3.3 Resultados

3.3.1 Cálculos de Estructura Electrónica (Mecánica Cuántica) en fase gaseosa

La Figura 3.1 muestra una representación esquemática de la trehalosa anhidra (a), sacarosa (b) y maltosa (c) y la Figura 3.2 muestra las dos formas cristalinas de trehalosa dihidrato (Figuras 3.2a,b). También están indicados los ángulos diedros que definen la

flexibilidad conformacional alrededor del enlace glicosídico, Φ , Ψ , y aquellos que definen la conformación de los grupos hidroximetilos, ω , ω' y χ .

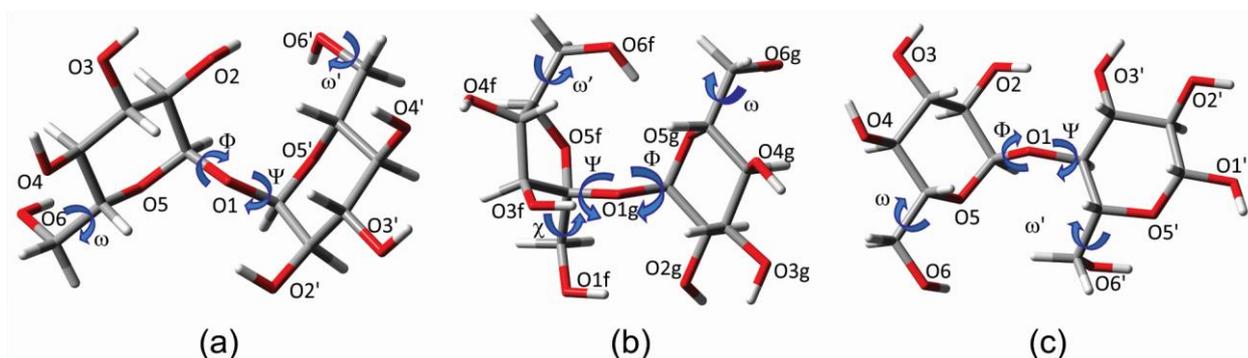


Figura 3.1. Estructuras moleculares de: (a) trehalosa, (b) sacarosa y (c) maltosa. Se indica la numeración de los átomos de oxígeno. Los ángulos de torsión son definidos como: $\Phi = \text{O5-C1-O1-C1}'$ y $\Psi = \text{C1-O1-C1}'\text{-O5}'$; $\Phi = \text{O5g-C1g-O1g-C2f}$ y $\Psi = \text{C1g-O1g-C2f-O5f}$; $\Phi = \text{O5-C1-O1-C4}'$ y $\Psi = \text{C1-O1-C4}'\text{-C5}'$ en trehalosa, sacarosa y maltosa respectivamente. La conformación de los grupos hidroximetilos es definida por los ángulos de torsión $\omega = \text{O5-C5-C6-O6}$ y $\omega' = \text{O5}'\text{-C5}'\text{-C6}'\text{-O6}'$ en trehalosa y maltosa y $\omega_g = \text{O5g-C5g-C6g-O6g}$ y $\omega_f = \text{O5f-C5f-C6f-O6f}$ y $\chi_f = \text{O1f-C1f-C2f-O5f}$ en sacarosa.

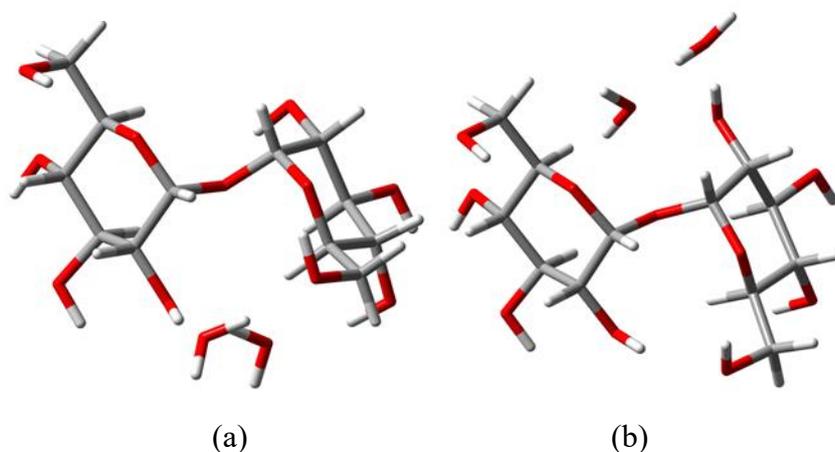


Figura 3.2. Estructuras moleculares de: (a) trehalosa dihidrato-1 y (b) trehalosa dihidrato-2.

Los parámetros geométricos seleccionados, calculados al nivel B3LYP/6-311++G** están dados en la tabla 3.1. Los valores experimentales obtenidos por difracción de rayos-X sobre las estructuras cristalinas son dados entre paréntesis. Comparando los valores calculados con los experimentales, se observa que la geometría adoptada por la sacarosa, maltosa y el dihidrato-1 de la trehalosa en fase gaseosa es similar a la que exhiben en el cristal. Por ejemplo, la geometría de mínima energía de la sacarosa adopta valores de ángulos de torsión $\Phi/\Psi \approx 107,3^\circ/-46,1^\circ$, los cuales difieren muy poco de aquellos encontrados en el cristal ($+108,3^\circ$ y $-44,7^\circ$, respectivamente). En contraste, en la trehalosa anhidra y en la trehalosa dihidrato-2 (Fig. 3.2b), Φ se desvía alrededor de 30 grados del valor en los respectivos cristales. Particularmente en el caso de la forma anhidra, Φ y Ψ difieren significativamente de los valores reportados para el cristal de $\Phi/\Psi = 70,1^\circ/55,1^\circ$ ⁴⁶ y $\Phi/\Psi = 60,8^\circ/60,1^\circ$ ⁴⁷ y de otro valor informado en la literatura⁴⁸ como el de una estructura de mínima energía de $\Phi/\Psi = 72,6^\circ/72,6^\circ$. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la estructura anhidra analizada aquí ha sido obtenida por remoción de las moléculas de agua de la estructura hidratada. Por otra parte, la conformación de mínima energía reportada por Nunes y col.⁴⁸ también fue tomada como la estructura inicial para una posterior minimización energética. Sin embargo, esta estructura ha convergido hacia otro conformero ($\Phi/\Psi \approx 74,1^\circ/80,0^\circ$) que es 1,4 kcal/mol menos estable que aquella obtenida en nuestro análisis.

Con respecto a los ángulos ω , ω' y χ , se observa que los valores calculados y experimentales difieren significativamente en el caso de las formas anhidras y dihidratadas de la trehalosa. Sin embargo, estos diedros adoptan una geometría similar a la del cristal en la maltosa y sacarosa.

Si observamos al ángulo θ , se encuentra que las mayores diferencias con respecto al valor en los respectivos cristales corresponden a la sacarosa y maltosa, y también debería ser notado su relativamente gran desviación con respecto al valor estándar (tetraédrico), $109,5^\circ$.

Tabla 3.1: Parámetros geométricos calculados al nivel B3LYP/6-311++G**. Las distancias están dadas en angstroms y los ángulos en grados. Los valores entre paréntesis corresponden a las estructuras obtenidas por difracción de rayos-X. Los ángulos torsionales están definidos en la Figura 3.1.

	Trehalosa Anhidra ¹	Trehalosa dihidrato-1 ²	Trehalosa dihidrato-2 ³	Sacarosa ⁴	β -Maltosa ⁵
d(C1-O1)/	1,4237	1,4154	1,4404	1,4129	1,4237
d(C1g-O1)	(1,4278)	(1,4156)	(1,4165)	(1,4286)	(1,4144)
d(C1'-O1)/	1,4210	1,4229	1,4640	1,4492	1,3951
d(C2f-O1)/	(1,4237)	(1,4271)	(1,4197)	(1,4357)	(1,3898)
d(C1'-O1')					
d(O5-C1)/	1,4061	1,4101	1,4582	1,4160	1,4087
d(O5g-C1g)	(1,4004)	(1,4224)	(1,4230)	(1,4147)	(1,4036)
d(O5'-C1')/	1,4122	1,4150	1,4449	1,4083	1,4204
d(O5f-C2f)	(1,4047)	(1,4079)	(1,4076)	(1,4093)	(1,4182)
d(O5-C5)/	1,4491	1,4453	1,5089	1,4518	1,4459
d(O5g-C5g)	(1,4447)	(1,4289)	(1,4378)	(1,4452)	(1,4338)
d(O5'-C5')/	1,4457	1,4429	1,4862	1,4572	1,4380
d(O5f-C5f)	(1,4590)	(1,4258)	(1,4235)	(1,4545)	(1,4230)
O5-C1-O1/	111,55	112,1	110,7	111,4	111,3
O5g-C1g-O1	(111,42)	(112,1)	(111,9)	(110,1)	(110,7)
O5'-C1'-O1/	110,81	111,5	108,7	111,4	108,9
O5f-C2f-O1	(112,24)	(111,3)	(111,3)	(110,9)	(108,1)
Φ	99,9	80,5	106,3	107,3	113,4
	(70,1)	(74,9)	(75,0)	(108,3)	(121,7)
Ψ	69,8	68,9	64,5	-46,1	-109,0
	(55,1)	(61,9)	(61,8)	(-44,7)	(-107,8)
ω	-57,7	-58,2	-58,5	-60,5	59,0
	(-61,0)	(-75,7)	(-75,3)	(-56,5)	(59,2)
ω^g/ω_f	60,6	58,9	58,1	-64,2	-61,7
	(-63,4)	(70,0)	(69,9)	(-70,1)	(-62,4)
χ_f				175,1	
				(171,1)	
* θ	114,3	115,4	114,8	118,3	119,3
	(113,0)	(115,8)	(115,7)	(113,4)	(117,9)

* θ es el ángulo del enlace glicosídico.

¹Código de la base de datos CSD: 1504389, Ref. 46.

²Código de la base de datos CSD: TREHAL01, Ref. 30.

³Código de la base de datos CSD: TREHAL03, de Ref. 31.

⁴Código de la base de datos CSD: SUCROS01, de Ref. 32.

⁵Código de la base de datos CSD: MALTOS11, de Ref. 33.

- *Análisis Topológico (QTAIM)*

En la Figura 3.3 se muestran los grafos moleculares de la trehalosa anhidra, trehalosas dihidratadas, maltosa y sacarosa. En la tabla 2 se listan los parámetros topológicos calculados en los puntos críticos de enlaces, PCEs. Los parámetros reportados son: la densidad electrónica, $\rho(\mathbf{r}_c)$, el Laplaciano de la densidad electrónica, $\nabla^2\rho(\mathbf{r}_c)$, la elipticidad, $(\varepsilon = \lambda_1/\lambda_2 - 1)$ y la energía cinética, $G(\mathbf{r}_c)$, energía potencial, $V(\mathbf{r}_c)$, y energía total, $H(\mathbf{r}_c) = G(\mathbf{r}_c) + V(\mathbf{r}_c)$. Dado que en la literatura está bien establecido que existe una correlación lineal entre el valor de densidad electrónica en el PCE y la fortaleza de la interacción,^{49,50} este criterio es usado para comparar la fortaleza de diferentes EHs en la discusión que sigue.

En todos los disacáridos el análisis QTAIM revela la existencia de PCEs indicando la formación de enlaces intramoleculares del tipo O–H···O y C–H···O. Estos EHs conducen a la formación de anillos extra en la estructura de los disacáridos. La densidad electrónica $\rho(\mathbf{r}_c)$ varía entre 0,0038 y 0,0372 ua, los cuales se comparan bien con los valores reportados para diferentes interacciones de enlaces de hidrógeno, donde esta cantidad se encontró que varía desde 0,002 a 0,034.⁵¹ En forma similar, el Laplaciano, $\nabla^2\rho(\mathbf{r}_c)$, varía desde 0,0138 a 0,1290 ua, y esto también se compara satisfactoriamente con resultados previamente reportados que varían de 0,016 a 0,139 ua.⁵¹

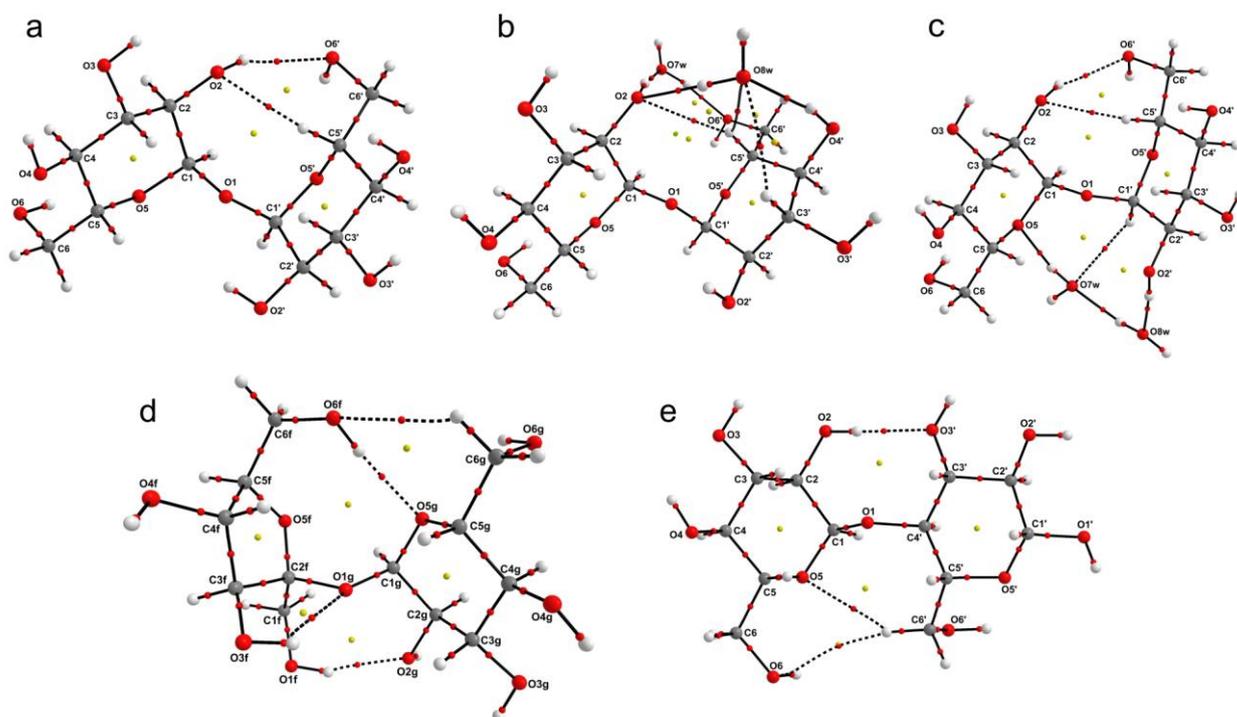


Figura 3.3. Grafos moleculares de: (a) trehalosa anhidra; (b) trehalosa dihidrato-1; (c) trehalosa dihidrato-2; (d) sacarosa; (e) maltosa. Los pequeños pequeños puntos rojos indican punto crítico de enlace (PCE); amarillo, punto crítico de anillo (PCA); verde, punto crítico de caja (PCC).

En el caso de la trehalosa anhidra, se forma un puente bifuncional intramolecular. El átomo de O2 exhibe un comportamiento dual, actuando como dador de protones al O6' y como aceptor de protones del C5'. Este EH bifuncional conduce a la formación de anillos de 6 y 8 miembros (involucrando al oxígeno glicosídico) cerrados por EHs. En la trehalosa dihidrato-1, una molécula de agua se inserta entre los O2 y O6' y forma un EH bifuncional intermolecular, donde el O7w actúa como aceptor de protones del O2 y como donante de protones al O6': O2–H···(O7w–H)···O6'. Los valores más elevados de densidad son observados en estos PCEs ($\rho(\mathbf{r}_c) = 0,0372$ ua y $\rho(\mathbf{r}_c) = 0,0351$ ua, respectivamente); más aún, la densidad de energía potencial es de mayor magnitud que la densidad de energía cinética llevando a valores negativos de la densidad de energía total, e indicando la mayor fortaleza de estos EHs. El O8w de la otra molécula de agua está tetra-coordinado y forma una red de EHs interconectados, O8w–H···O2, C5'–H···O8w, C3'–H···O8w y O4'–H···O8w. Además, el EH intramolecular, C5'–H···O2 encontrado en la forma anhidra también ocurre en este hidrato, aunque la densidad está repartida entre los EHs C5'–H···O8w ($\rho(\mathbf{r}_c) = 0,0066$ ua) y C5'–H···O2 ($\rho(\mathbf{r}_c) = 0,0068$ ua).

En la trehalosa dihidrato-2, las dos moléculas de agua están unidas entre sí por el enlace de hidrógeno $O7w \cdots H-O8w$, y forma simultáneamente los EHs, $C1'-H \cdots O7w-H \cdots O5$ y $O2'-H \cdots O8w$ con la molécula de trehalosa. Nuevamente, el EH intramolecular $C5'-H \cdots O2$, encontrado en las formas anhidra y en el dihidrato-1, también ocurre en este hidrato, así como lo hace el EH $O2-H \cdots O6'$, aunque en el dihidrato-1 una molécula de agua está actuando como un puente entre el $O2$ y el $O6'$. Es importante también señalar que el oxígeno glicosídico no está involucrado en EHs en ninguna de las formas de la trehalosa.

La sacarosa es el único caso en el que el oxígeno exocíclico participa en un EH, y también es el disacárido con el mayor número de EHs intramoleculares. Estos EHs originan la formación de cuatro anillos y sus puntos críticos de anillo, PCA, asociados (Figura 3.3d). Uno es un EH bifuncional, $C6g-H \cdots O6f-H \cdots O5g$, en el cual el $O6f$ actúa como dador de protones para el $O5g$ y como un aceptor para el $C6g$.

Los otros dos EHs, a pesar de ser del tipo $O-H \cdots O$, tiene valores de densidad relativamente bajos: 0,022 ua y 0,0195 ua para los EHs $O1f-H \cdots O2g$ y $O3f-H \cdots O1g$ respectivamente. Es importante notar que los EHs $O6f-H \cdots O5g$ y $O1f-H \cdots O2g$ son los mismos que los observados en la sacarosa cristalina³² aunque el análisis QTAIM revela una estructura de EHs intramoleculares más compleja. Algo similar ocurre en la maltosa. La β -maltosa cristalina³³ forma un EH intramolecular $O2-H \cdots O3'$, mientras que los cálculos realizados en fase gaseosa revelan un EH relativamente fuerte $O2-H \cdots O3'$ ($\rho(r_c) = 0,0231$ ua) y un EH bifurcado, $O5 \cdots H(-C6') \cdots O6$. El EH bifurcado consiste en dos EHs no convencionales del tipo $C-H \cdots O$, uno involucrando al oxígeno endocíclico, $C6'-H \cdots O5$ ($\rho(r_c) = 0,0081$ ua) y otro que es extremadamente débil, $C6'-H \cdots O6$, como se ve reflejado en un valor muy bajo de densidad ($\rho(r_c) = 0,0038$ ua), un alto valor de elipticidad ($\varepsilon = 7.63$) y una corta distancia entre el PCE y el PCA próximo a él (Figura 3.3e). Estas características han sido asociadas por Bader²⁸ con un enlace que está próximo a un proceso de destrucción o formación (punto catástrofe).

Tabla 3.2. Parámetros topológicos calculados en los PCEs C–H···O y O–H···O para todos los disacáridos^{a,b}.

	$\rho(\mathbf{r}_c)$	$\nabla^2\rho(\mathbf{r}_c)$	ε	$G(\mathbf{r}_c)$	$V(\mathbf{r}_c)$	$H(\mathbf{r}_c)$
Trehalosa Anhidra						
C5'–H···O2	0,0132	0,0427	0,1307	0,0094	-0,0081	0,0013
O2–H···O6'	0,0153	0,0489	0,0717	0,0109	-0,0096	0,0013
Trehalosa Dihidrato-1						
C5'–H···O8w	0,0066	0,0236	0,7825	0,0050	-0,0042	0,0009
C5'–H···O2	0,0068	0,0202	0,0244	0,0045	-0,0040	0,0005
C3'–H···O8w	0,0069	0,0226	0,4086	0,0049	-0,0042	0,0007
O4'–H···O8w	0,0253	0,0926	0,0986	0,0212	-0,0192	0,0020
O8w–H···O2	0,0296	0,1062	0,0590	0,0252	-0,0239	0,0013
O7w–H···O6'	0,0351	0,1167	0,0355	0,0294	-0,0297	-0,0003
O2–H···O7w	0,0372	0,1290	0,0540	0,0328	-0,0333	-0,0005
Trehalosa Dihidrato-2						
C1'–H···O7w	0,0050	0,0178	0,1443	0,0038	-0,0031	0,0007
C5'–H···O2	0,0126	0,0406	0,1272	0,0089	-0,0077	0,0012
O2–H···O6'	0,0158	0,0507	0,0661	0,0113	-0,0099	0,0014
O2'–H···O8w	0,0297	0,1101	0,0601	0,0260	-0,0245	0,0015
O7w–H···O5	0,0303	0,1052	0,0513	0,0254	-0,0244	0,0009
O8w–H···O7w	0,0308	0,1116	0,0814	0,0266	-0,0253	0,0013
Sacarosa						
C6g–H···O6f	0,0069	0,0255	0,2845	0,0054	-0,0044	0,0010
O3f–H···O1g	0,0195	0,0847	0,6381	0,0187	-0,0162	0,0025
O6f–H···O5g	0,0209	0,0738	0,0697	0,0166	-0,0148	0,0018
O1f–H···O2g	0,0220	0,0797	0,0538	0,0180	-0,0161	0,0019
Maltosa						
O2–H···O3'	0,0231	0,0871	0,0883	0,0195	-0,0172	0,0023
C6'–H···O5	0,0081	0,0246	0,1657	0,0055	-0,0048	0,0007
C6'–H···O6	0,0038	0,0138	7,6333	0,0027	-0,0020	0,0007

^a Todas las cantidades están expresadas en unidades atómicas.

^b Los símbolos están explicados en el texto.

- *Análisis NBO*

La Tabla 3.3 muestra los resultados del análisis NBO relacionados con la formación de EHs, En la misma se muestran los números de ocupación para los antienlaces $\sigma(\text{O}-\text{H})^*$, $\sigma(\text{C}-\text{H})^*$, números de ocupación para los pares solitarios de oxígeno, n_{lp} y las energías de perturbación de segundo orden $E^{(2)}$ (donante \rightarrow aceptor) que involucran a estos orbitales.

Puede ser observado que las interacciones hiperconjugativas de transferencia de carga (IHTC) relacionadas con la formación de los EHs $\text{C}-\text{H}\cdots\text{O}$ son más pequeñas (en algunos casos despreciables) que las correspondientes a los EHs $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$, indicando que las IHTC no juegan un rol importante en la formación de estos EHs débiles, $\text{C}-\text{H}\cdots\text{O}$.

En línea con el análisis QTAIM, en el dihidrato-1 de la trehalosa, dos fuertes IHTC son observadas, ambas involucrando moléculas de agua que se unen al O2 y O6' ($lp(\text{O}7\text{w})\rightarrow\sigma^*(\text{O}2-\text{H}) = 16,62 \text{ kcal/}$ y $lp(\text{O}6')\rightarrow\sigma^*(\text{O}7\text{w}-\text{H}) = 12,64 \text{ kcal/mol}$). Similarmente, en el dihidrato-2 de la trehalosa, las HICT más fuertes son las relacionadas a los EHs intermoleculares con el agua ($lp(\text{O}8\text{w})\rightarrow\sigma^*(\text{O}2'-\text{H}) = 10,98 \text{ kcal/mol}$ y $lp(\text{O}7\text{w})\rightarrow\sigma^*(\text{O}8\text{w}-\text{H}) = 11,37 \text{ kcal/mol}$).

En la sacarosa, estas IHTC son de menor importancia que en los dihidratos de trehalosa, aunque más fuertes que en la trehalosa anhidra. Finalmente, en la maltosa, la única IHTC observada se relaciona con el EH $\text{O}2-\text{H}\cdots\text{O}3'$, ($lp(\text{O}3')\rightarrow\sigma^*(\text{O}2-\text{H}) = 4,85 \text{ kcal/mol}$).

Tabla 3.3. Análisis NBO: números de ocupación para los antienlaces σ_{O-H}^* / σ_{C-H}^* y pares solitarios n_{lp} , y las energías de perturbación de segundo orden E^2 (donante \rightarrow aceptor).

	E^2 (lpO \rightarrow σ^*)	n_{lp}	σ^*
Trehalosa Anhidra			
lp(O6') \rightarrow σ^* (O2-H)	2,70	1,9544	0,0164
lp(O2) \rightarrow σ^* (C5'-H)	1,04	1,9502	0,0374
Trehalosa Dihidrato-1			
lp(O2) \rightarrow σ^* (C5'-H)	0,66	1,9470	0,0369
lp(O2) \rightarrow σ^* (O8w-H)	5,32		0,0243
lp(O6') \rightarrow σ^* (O7w-H)	12,64	1,9421	0,0329
lp(O8w) \rightarrow σ^* (C3'-H)	0,23		0,0387
lp(O8w) \rightarrow σ^* (C5'-H)	0,28	1,9782	0,0369
lp(O8w) \rightarrow σ^* (O4'-H)	8,61		0,0249
lp(O7w) \rightarrow σ^* (O2-H)	16,62	1,9627	0,0382
Trehalosa Dihidrato-2			
lp(O7w) \rightarrow σ^* (C1'-H)	0,35	1,9943	0,0313
lp(O2) \rightarrow σ^* (C5'-H)	0,90	1,9498	0,0373
lp(O6') \rightarrow σ^* (O2-H)	2,99	1,9539	0,0175
lp(O8w) \rightarrow σ^* (O2'-H)	10,98	1,9750	0,0260
lp(O5) \rightarrow σ^* (O7w-H)	4,84	1,9140	0,0270
lp(O7w) \rightarrow σ^* (O8w-H)	11,37	1,9726	0,0243
Sacarosa			
lp(O6f) \rightarrow σ^* (O6g-H)	–	1,9505	0,0239
lp(O5g) \rightarrow σ^* (O6f-H)	2,780	1,9079	0,0235
lp(O2g) \rightarrow σ^* (O1f-H)	3,230	1,9535	0,0196
lp(O1g) \rightarrow σ^* (O3f-H)	1,260	1,8981	0,0127
Maltosa			
lp(O3') \rightarrow σ^* (O2-H)	4,85	1,9539	0,0262
lp(O5) \rightarrow σ^* (C6'-H)	–	1,9063	0,0207
lp(O6) \rightarrow σ^* (C6'-H)	–	1,9540	0,0207

Efectos anomérico y exa-anomérico mediante el análisis NBO. El efecto anomérico fue inicialmente definido⁵² como la preferencia de un sustituyente electronegativo en el carbono anomérico en un carbohidrato, de estar en la posición axial de preferencia a la posición ecuatorial en contraste a lo que se esperaría basado en interacciones estéricas. Este efecto es considerado ahora como un caso especial de una preferencia general (efecto anomérico generalizado) por las conformaciones synclinal (*gauche*) alrededor del enlace C–Y en los sistemas X–C–Y–C en los cuales X and Y son heteroátomos con pares electrónicos no enlazados. De acuerdo al modelo estereoelectrónico, esta preferencia tiene su origen en una interacción estabilizante (deslocalización hiperconjugativa) entre un par de electrones no enlazados en el heteroátomo (el oxígeno endocíclico en el anillo de un azúcar) y el orbital antienlazante, σ^* , para el enlace (exocíclico) C–X, el cual es posible sólo en la posición axial. La deslocalización se espera que resulte en un alargamiento del enlace exocíclico C–O, un concomitante acortamiento del enlace endocíclico C–O y una apertura del ángulo O–C–O con respecto al valor estándar (tetrahédrico) debido a la reducción y enriquecimiento del carácter-p de los enlaces endocíclicos y exocíclicos, respectivamente.

En alquil glucopiranosidos el efecto anomérico opera en dos sitios, a lo largo del enlace endocíclico C1–O (efecto endo-anomérico) y a lo largo del enlace exocíclico C1–O (efecto exo-anomérico). En la tabla 3.4 se muestran las interacciones hiperconjugativas de transferencia de carga (IHTC) relacionada con estos efectos en los tres disacáridos. Puede verse que en la trehalosa anhidra, tal cual lo esperado, las IHTC $lp(O1) \rightarrow \sigma^*(C1-O5)$ y $lp(O1) \rightarrow \sigma^*(C1'-O5')$ relacionadas al efecto exo-anomérico, son casi de la misma magnitud y las dos IHTC, $lp(O5) \rightarrow \sigma^*(C1-O1)$ y $lp(O5') \rightarrow \sigma^*(C1'-O1)$ relacionadas al efecto endo-anomérico difieren relativamente poco, 1,6 kcal/mol. El efecto exo-anomérico total (25 kcal/mol) es virtualmente neutralizado por el efecto endo-anomérico total (25,6 kcal/mol). Como resultado, las distancias de enlace C1–O1/C1'–O1 son similares a las distancias de enlaces C1–O5/C1'–O5' (ver tabla 3.1).

Lo mismo ocurre en el dihidrato-1 de la trehalosa, mientras que en el dihidrato-2 el efecto exo-anomérico es 7 kcal/mol mayor que el efecto endo-anomérico, y las distancias de enlaces C1–O1 y C1'–O1 son más cortas que C1–O5 y C1'–O5' respectivamente. Estos resultados también muestran que la estabilización debido a la deslocalización de carga electrónica en el dihidrato-1 es más alta que en el dihidrato-2 y está en línea con las energías hartree fock (HF) de estos hidratos.

En la sacarosa, el efecto endo-anomérico total es 8 kcal/mol más grande que el efecto exo-anomérico total. El efecto exo-anomérico hacia el anillo de fructosa es alrededor de 5 Kcal/mol más bajo que hacia el anillo de glucosa, mientras que la energía correspondiente a la IHTC, $lp(O5f) \rightarrow \sigma^*(C2f-O1g)$ es la más alta de todas (16,27 kcal/mol). Así, puede ser visto en la tabla 3.1, que en el anillo de fructosa el enlace O5f-C2f es más corto que el enlace O1-C2f, mientras que en el anillo de glucosa las diferencias en las distancias de enlace O1-C1 y O5-C1 concuerdan bien con lo esperado para el efecto exo-anomérico.

La maltosa también exhibe dos efectos exo-anoméricos, uno involucrando al oxígeno exocíclico, $lp(O1) \rightarrow \sigma^*(C1-O5)$ y otro involucrando al oxígeno O1', $lp(O1') \rightarrow \sigma^*(C1'-O5')$. Por otro lado, como era de esperar considerando que el enlace glicosídico es $\alpha(1 \rightarrow 4)$, la maltosa exhibe un único efecto endo-anomérico, $lp(O5) \rightarrow \sigma^*(C1-O1)$, 1,8 Kcal mayor que el correspondiente efecto exo-anomérico. Esta IHTC causa un acortamiento del enlace O5-C1 y un alargamiento del enlace C1-O1 (ver tabla 3.1).

Tabla 3.4. Análisis NBO: números de ocupación de los antienlaces σ_{C-H}^* y los pares solitarios η_{lp} , y las energías de perturbación de segundo orden E^2 (donante \rightarrow aceptor).

	E^2 (lpO \rightarrow σ^*)	n_{lp}	σ^*
Trehalosa Anhidra			
lp(O1) \rightarrow σ^* (C1'-O5')	12,31	1,8894	0,0556
lp(O1) \rightarrow σ^* (C1-O5)	12,24		0,0523
lp(O5) \rightarrow σ^* (C1-O1)	13,61	1,9047	0,0657
lp(O5') \rightarrow σ^* (C1'-O1)	11,99	1,9085	0,0616
Trehalosa Dihidrato-1			
lp(O1) \rightarrow σ^* (C1'-O5')	13,09	1,8877	0,0548
lp(O1) \rightarrow σ^* (C1-O5)	11,95		0,0546
lp(O5) \rightarrow σ^* (C1-O1)	12,84	1,9065	0,0630
lp(O5') \rightarrow σ^* (C1'-O1)	11,69	1,9098	0,0616
Trehalosa Dihidrato-2			
lp(O1) \rightarrow σ^* (C1'-O5')	14,60		0,0645
lp(O1) \rightarrow σ^* (C1-O5)	12,35	1,8780	0,0557
lp(O5) \rightarrow σ^* (C1-O1)	8,51	1,9140	0,0541
lp(O5') \rightarrow σ^* (C1'-O1)	11,67	1,9104	0,0610
Sacarosa			
lp(O1g) \rightarrow σ^* (C1g-O5g)	12,10		0,0570
lp(O1g) \rightarrow σ^* (C2f-O5f)	6,83	1,8981	0,0533
lp(O5f) \rightarrow σ^* (C2f-O1g)	16,27	1,8923	0,0923
lp(O5g) \rightarrow σ^* (C1g-O1g)	11,19	1,9079	0,0611
Maltosa			
lp(O1) \rightarrow σ^* (C1-O5)	10,95	1,9027	0,0534
lp(O1') \rightarrow σ^* (C1'-O5')	13,44	1,9314	0,0593
lp(O5) \rightarrow σ^* (C1-O1)	12,76	1,9063	0,0628

3.3.2 *Dinámica Molecular.*

Análisis Estructural

La movilidad conformacional de los tres disacáridos en solución fue estudiada observando la variación en el tiempo de los principales ángulos de torsión, Φ , Ψ , ω , ω' y χ_f , descritos en la Figura 3,1. Los gráficos de las trayectorias y análisis estadísticos se muestran en las Figuras 3.4a-i y en la tabla 5, respectivamente.

Puede observarse que en la trehalosa, consistente con la alta simetría de la molécula, los dihedros Φ y Ψ en promedio son prácticamente idénticos (Figura 3.4a), como así también, ω y ω' (Figuras, 3.4 d, g). Los valores de estos ángulos de torsión están en buen acuerdo con los datos experimentales y validan el campo de fuerza y la metodología de simulación empleados. El alto porcentaje de ocupación y la desviación estándar relativamente baja observada en los ángulos de torsión Φ y Ψ , muestran la rigidez de la trehalosa alrededor del enlace glicosídico. Esta rigidez también es observada en la dinámica en vacío (Figura 3.4 a) en la que estos ángulos toman valores cercanos a aquellos encontrados en solución.

En la sacarosa, sin embargo, se observan importantes fluctuaciones, adoptando, Φ y Ψ valores diferentes a aquellos reportados en el cristal ($\Phi = 108,3^\circ$ y $\Psi = -44,7^\circ$). El ángulo diedro Φ aumenta hasta un valor promedio de 117° mientras que Ψ adopta un valor positivo de $20,9^\circ$, Ψ también adopta un valor muy cercano al del cristal ($-43,6^\circ$) en varias instancias a lo largo de la trayectoria, con un porcentaje de ocupación del 12,4%.

Este resultado indica que la sacarosa es menos rígida que la trehalosa y es consistente con lo observado por Choi et al.⁵³ quienes, cuando compararon las funciones de correlación temporal sobre los movimientos recolectados de diferentes azúcares, encontraron que la dinámica en solución acuosa, ocurre más lentamente en la trehalosa que en otros azúcares. En contraste, los valores de Φ en la dinámica en vacío son similares a lo observado en el cristal ($115,8^\circ$ y una ocupación de 80,9%) mientras que Ψ exhibe mucha más movilidad. La maltosa muestra un comportamiento similar al de la trehalosa, con altos porcentajes de ocupación de los dihedros Φ y Ψ (95,1% and 95,8% respectivamente) pero adoptando una conformación completamente diferente a la observada en el cristal. El ángulo diedro Φ ($57,8^\circ$) adopta una conformación gauche, mientras que en la estructura cristalina es de $121,7^\circ$ ³³. Además, el diedro Ψ adopta una

conformación anticlinal positiva ($126,4^\circ$), mientras que en la estructura cristalina, tiene un valor de $-107,7^\circ$. Analizando las trayectorias de los diedros Φ y Ψ , puede observarse que la maltosa adopta la estructura del cristal en dos pequeños períodos del tiempo de simulación. Los valores promedio son $116,4^\circ$ (ocupación 3,3%) y -125° (ocupación 2,6%) respectivamente, Esta situación, como se verá luego, ocurre cuando se forma el EH O2–H··O3'. En contraste con los ángulos diedros Φ y Ψ , como puede verse en las figuras 3.4d-i, ω y ω' no son afectados por el solvente.

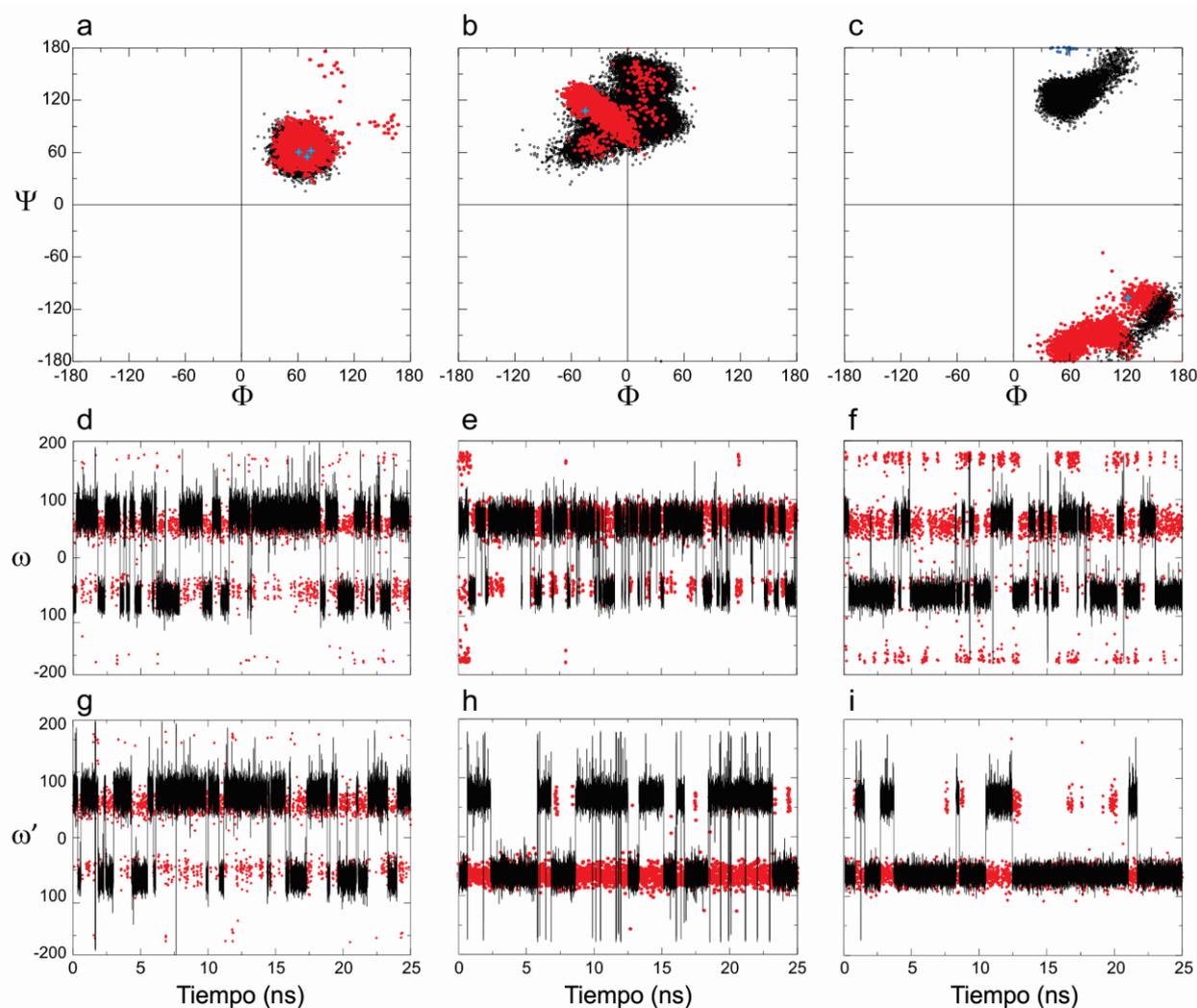


Figura 3.4: Variación de los ángulos diedros a lo largo de las trayectorias de DM: Ψ vs, Φ en vacío (rojo) y en solución (negro) de: (a) Trehalosa, (b) Sacarosa y (c) Maltosa. Los pequeños símbolos en azul, (estrellas) indican los valores de estos ángulos en las estructuras cristalinas. Ángulo ω de: (d) trehalosa, (e) sacarosa y (f) maltosa; y ángulo ω' de (g) trehalosa; (h) sacarosa; (i) maltosa.

Tabla 3.5. Estadística de los valores geométricos calculados a lo largo de 25 ns de DM, DE (σ) representa a la desviación estándar.

Ángulo	Estadística	Trehalosa	Sacarosa	Maltosa
Φ	Promedio	62,0	117,0	57,8
	% ocupación	99,5	65,6	95,1
	DE (σ)	10,2	19,1	10,0
Ψ	Promedio	62,1	20,9	126,4
	% ocupación	99,4	65,5	95,8
	DE (σ)	10,3	12,7	8,0
ω	Promedio	65,8	63,5	-63,2
	% ocupación	65,2	71,8	64,6
	DE (σ)	11,5	12,7	10,6
ω'	Promedio	65,8	67,9	-63,7
	% ocupación	66,2	50,6	81,5
	DE (σ)	11,8	11,4	9,7
χ^f	Promedio		58,,7	
	% ocupación		99,4	
	DE (σ)		11,,	
θ	Promedio	115,3	119,7	118,1
	DE (σ)	3,5	3,2	3,3

Resumiendo, comparando los resultados de la DM en solución y en vacío se observa que el solvente prácticamente no perturba a la estructura de la trehalosa y por el contrario, las estructuras de la maltosa y sacarosa son afectadas significativamente.

Funciones de Distribución Radial

Con el propósito de obtener el grado de solvatación de los disacáridos en solución acuosa infinitamente diluída, se calcularon las funciones de distribución radial (*radial distribution functions*, RDFs) entre los átomos de oxígeno de los azúcares y de las moléculas de agua. Además, se obtuvieron los números de coordinación derivados de las RDFs, tomando un radio de coordinación de 3,45 Å. La figura 5, muestra las RDFs de los átomos de oxígeno más relevantes, O1, O5, O5', O6 y O6'. En la Tabla 3.6 se listan los números de hidratación.

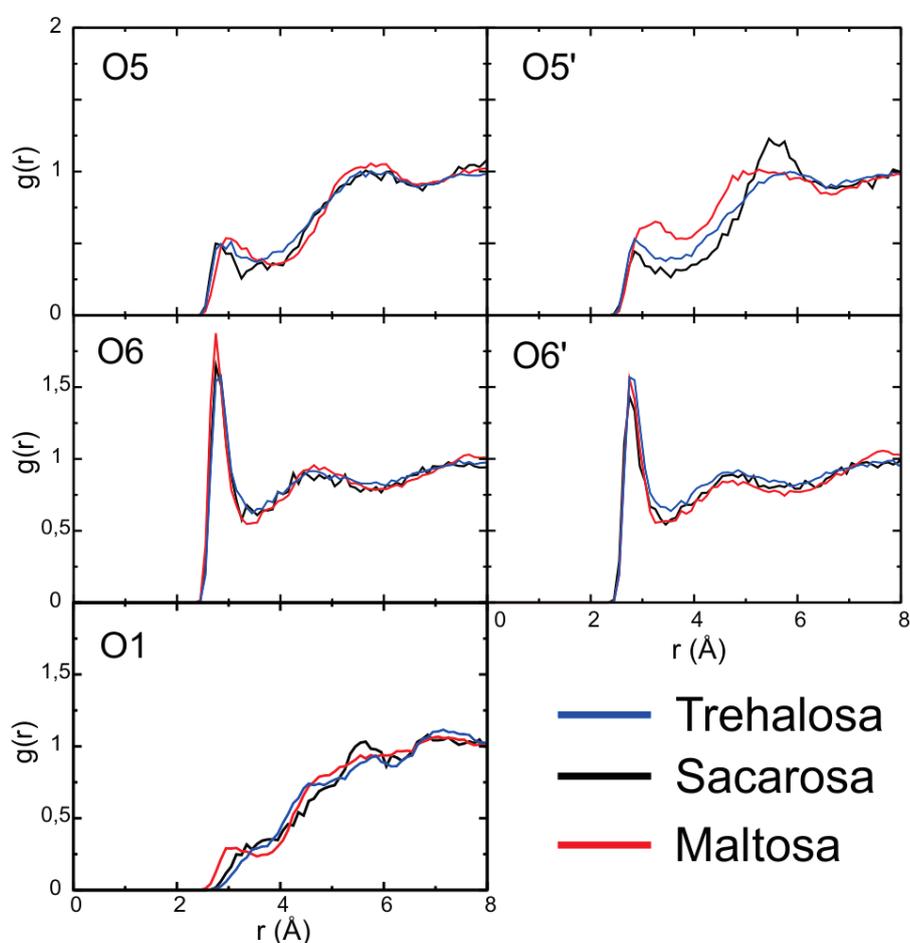


Figura 3.5. Comparación de las funciones de distribución radial de los oxígenos del agua alrededor de cinco átomos diferentes de oxígeno de los disacáridos.

Los átomos de oxígeno, O6 y O6' exhiben una hidratación típica con pequeñas diferencias entre los tres disacáridos. Las RDFs alrededor de los oxígenos muestran un pico agudo bien definido centrado en 2,8 Å con densidades de picos que oscilan entre 1,5 y 1,8, y un mínimo a 3,45 Å. De acuerdo a los resultados de la Tabla 3.6, la trehalosa posee un número de coordinación ligeramente mayor que la sacarosa y maltosa sobre estos átomos de oxígeno. Con respecto a los oxígenos endocíclicos, como puede inferirse del pequeño pico de la primera capa de hidratación, están pobremente hidratados, siendo la maltosa la de mayor número de hidratación, de prácticamente dos moléculas de agua contra una en la trehalosa y sacarosa.

Tabla 3.6. Número de moléculas de agua alrededor de los oxígenos del azúcar en la primera capa de hidratación, obtenidos por integración de la función de distribución radial de pares: Oxígeno del azúcar- Oxígeno del agua 3,45 Å.

Trehalosa		Sacarosa		Maltosa	
Oxígeno	Número	Oxígeno	Número	Oxígeno	Número
1	0,46	1g	0,62	1	0,82
2	3,08	2g	2,87	2	3,42
3	3,27	3g	3,51	3	3,46
4	3,02	4g	3,06	4	3,07
5	1,47	5g	1,29	5	1,52
6	3,38	6g	3,30	6	3,35
2'	3,07	1f	2,99	1'	3,69
3'	3,28	3f	2,26	2'	3,49
4'	3,01	4f	2,93	3'	2,85
5'	1,47	5f	1,17	5'	1,90
6'	3,38	6f	3,04	6'	3,04
TOTAL	28,89	TOTAL	27,04	TOTAL	30,61

Con respecto al oxígeno glicosídico, una hidratación prácticamente nula es observada en la trehalosa y sacarosa, mientras que en la maltosa, probablemente debido a que posee una estructura más abierta, presenta un valor cercano a uno. Comparando el número total de moléculas de agua en la primera capa de hidratación informados en la tabla 3.6, puede verse que el grado de hidratación crece en el orden, sacarosa < trehalosa < maltosa, aunque las diferencias son más bien pequeñas. En la literatura se encuentra un amplio rango de valores, tanto experimentales como teóricos para este parámetro.⁵³⁻⁵⁵ Los valores dados aquí, están en buen acuerdo con los calculados por Engelsen et al.⁵⁶ Sin embargo, cómo ha sido señalado por estos autores, las simulaciones no son capaces de contrastar los números de hidratación de la trehalosa y sacarosa.

EHS Intermoleculares

Las interacciones azúcar-agua han sido ampliamente estudiadas, incluyendo diferentes técnicas experimentales, simulaciones de DM y sobre un amplio rango de concentraciones y temperaturas.^{26,55-61} Sin embargo, en estos estudios, poca o ninguna atención se ha dado a los EHs del tipo C-H...O, a pesar de que cómo ha sido establecido, estos EHs son de gran importancia en los sistemas biológicos en los cuales los azúcares ejercen un papel protector. En este trabajo, en adición a los EHs convencionales O-H...O, también fueron examinados los EHs del tipo C-H...O. Ambos tipos de EHs fueron evaluados usando un criterio geométrico, el cual se basa en la distancia entre el átomo dador y el oxígeno aceptor, y el ángulo formado por el átomo dador, el hidrógeno y el oxígeno aceptor. La distancia cutoff entre los átomos dador y aceptor fue fijada en 3,4 Å y el ángulo de corte fue fijado en 120°. La tabla 3.7 muestra los números de EHs, y las figuras 3.6 y 3.7 muestra el tiempo de vida promedio y el porcentaje de ocupación de los EHs, O-H...O y C-H...O respectivamente. Comparando los resultados obtenidos para los tres disacáridos, puede verse en la tabla 3.7, que la trehalosa forma el mayor número de EHs con el agua, aunque con los menores porcentajes de ocupación y tiempo de vida media. Estos hechos indican que la trehalosa forma los EHs más débiles.

El segundo número más pequeño de EHs intermoleculares pero con el más alto porcentaje de ocupación es encontrado para la maltosa. La sacarosa forma el menor

número de EHS, con una ocupación similar a la de la trehalosa y un tiempo de vida medio similar a la de la maltosa.

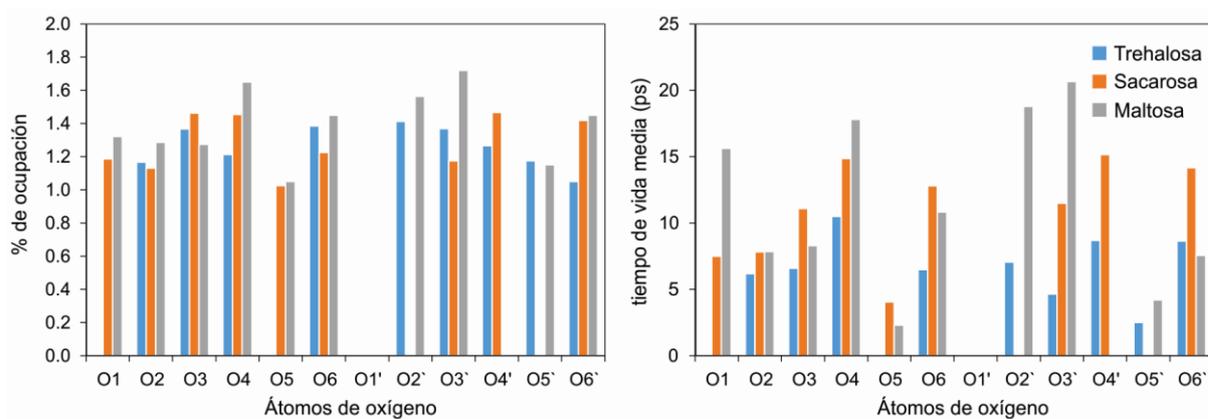


Figura 3.6. Tiempo de vida media y porcentaje de ocupación de los EHS, O-H...O para cada átomo de oxígeno.

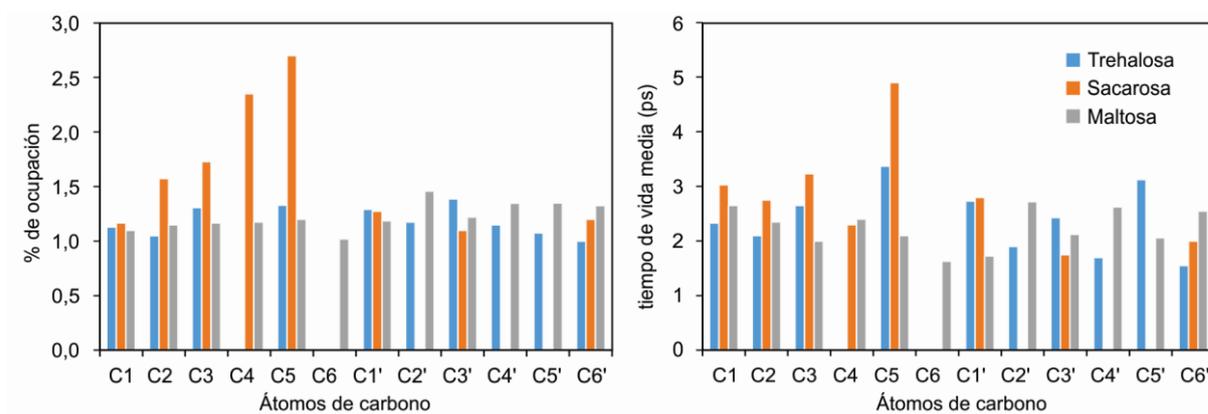


Figura 3.7. Tiempo de vida media y porcentaje de ocupación de los EHS, C-H...O para cada átomo de carbono.

Tabla 3.7. Número promediado en el tiempo de los EHs intermoleculares entre las moléculas de agua y las de disacárido.

Disacárido	O–H···O	C–H···O	Número Total
Trehalosa	17,36	12,44	29,80
Maltosa	16,51	10,40	26,91
Sacarosa	13,64	9,82	23,46

EHs Intramoleculares

Como fue discutido en la sección 3,1, en fase gaseosa la trehalosa forma un EH intramolecular bifuncional del tipo C–H···O. Por ello, se considera importante explorar este tipo de EH en solución acuosa. Las distancias entre los átomos de oxígeno de los disacáridos que podrían estar involucrados en un EH intramolecular, particularmente aquellos encontrados en fase gaseosa, fueron monitoreados y graficados en función del tiempo de simulación. Los resultados se muestran en la figura 3.8. En adición, un análisis más riguroso se ha realizado en términos de la teoría QTAIM. Para cada sistema o caja de simulación, se extrajo la estructura de menor energía potencial hallada en la etapa de producción y todas las moléculas de agua encontradas en un radio mayor que 5 Å fueron removidas. Con cada una de estas estructuras, fue generada una función de onda al nivel B3LYP/6-31G* con Gaussian 03³⁶. La densidad de carga electrónica fue analizada con el programa Multiwfn³⁹, y los grafos moleculares se muestran en la figura 3.9.

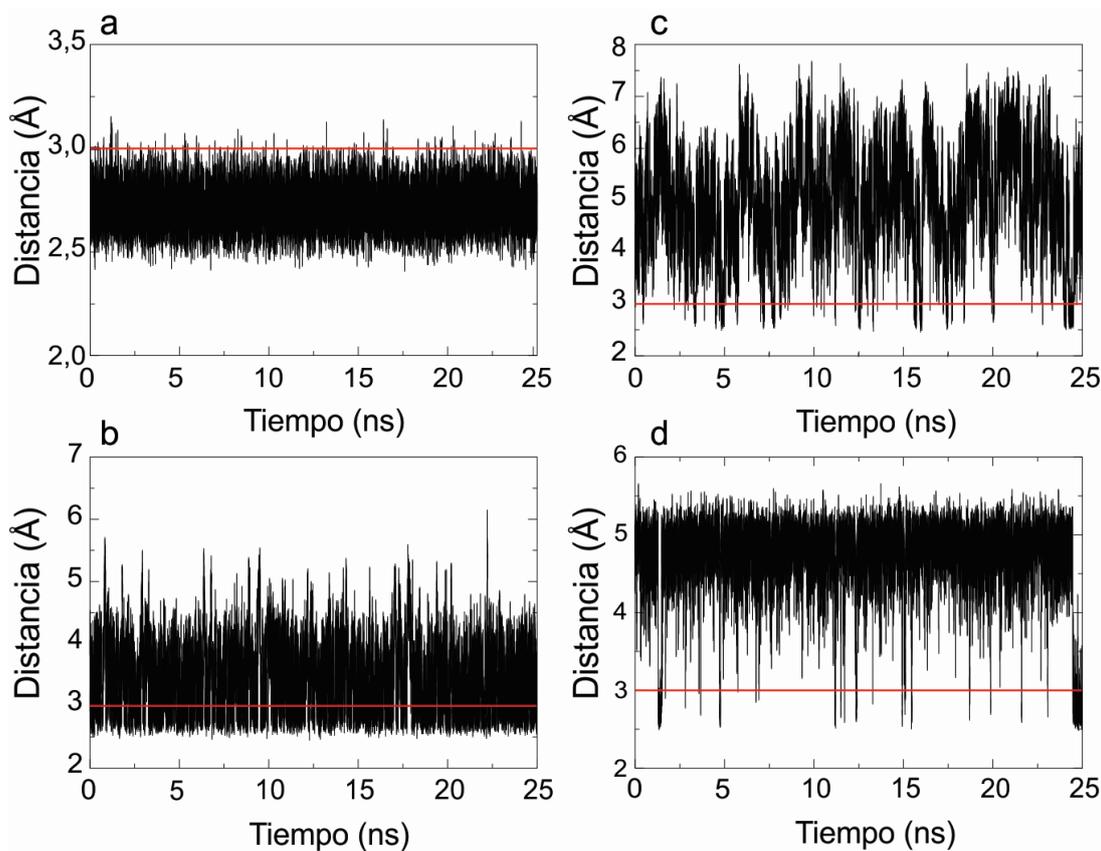


Figura 3.8. Trayectorias de las distancias O/C...O correspondientes a los EHs intramoleculares, en sacarosa: (a) O1g...O3f, (b) O1f...O2g y (c) O5g...O6f, en maltosa: (d) O2...O3'.

Cuando se consideran las distancias entre los átomos de oxígeno O2/O2' y O6'/O6 dentro de una molécula de trehalosa, puede observarse que no se alcanza un valor consistente con un EH en ningún punto de la simulación, Conrad et al.⁶² han sugerido que la trehalosa tiene tendencia a formar EHs entre los hidroxilos O2/O6 y O6'/O2', especialmente en soluciones acuosas concentradas (mayores al 50%). En este estudio, como resultado de la alta dilución, se observa una gran movilidad de los grupos oxhidrilos, lo cual evita la formación de EHs estables entre estos átomos. Desde el análisis topológico puede verse que dos moléculas de agua ocupan posiciones casi idénticas a las que ocupan en el dihidrato. Una molécula conecta a los átomos O2 y O4' (Fig. 3.9a, ver también Fig. 3.2 como referencia en el estudio estático) a través de un puente de hidrógeno: O2...H-Ow-H...O4'. Mientras que en la estructura cristalina el O4' actúa como un dador de protones: O2...H-Ow...H-O4'. La segunda molécula de agua adopta la misma posición que la encontrada en el dihidrato-2. Esto es, la molécula de agua forma un EH bifuncional actuando como un dador de protones en un EH convencional Ow-H...O y simultáneamente como un aceptor de protones en un EH C-H...Ow: O5...H-

Ow...H-C1'. En adición, esta molécula de agua también está involucrada en EH bifurcado como un doble dador de protones a los oxígenos O5 y O6. Esta correspondencia entre el estudio estático y dinámico soportaría la hipótesis de “atrapamiento de agua”, que establece que los azúcares concentran agua residual cerca de las bioestructuras, preservando en mayor extensión su solvatación y sus propiedades nativas⁶³⁻⁶⁵.

Por otra parte, el EH intramolecular C5'-H...O2 que fue encontrado en fase gaseosa, también se encuentra en la solución diluída (ver Fig. 3.9a), sin embargo, el valor de la densidad en el PCE es ligeramente menor ($\rho(\mathbf{r}_c) = 0,0049$ au) que el valor obtenido por cálculo DFT para las formas dihidratos (dihidrato-1, $\rho(\mathbf{r}_c) = 0,0068$ au y dihidrato-2 $\rho(\mathbf{r}_c) = 0,0126$ au) y anhidras de la trehalosa ($\rho(\mathbf{r}_c) = 0,0132$ au). Es importante resaltar que ningún estudio previo ha reportado este EH intramolecular en soluciones acuosas de trehalosa, y en nuestra opinión, este enlace es muy importante porque actuaría como mediador del plegamiento de la trehalosa frente a la escasez de agua.

Las figuras 3.8a-c muestran el seguimiento de las distancias O1g...O3f, O1f...O2g y O5g...O6f, respectivamente, de los átomos de oxígeno dentro de una molécula de sacarosa. La traza asociada con la interacción entre el O3f y el O1g, fluctúa alrededor de una distancia más corta que 3 Å a lo largo de la simulación. Aún, cuando esto podría indicar la ocurrencia de un EH, mediante el análisis QTAIM no se encuentra un PCE entre estos átomos (ver grafo molecular de la fig 3.9b), indicando que no se forma un EH, por lo que la distancia interatómica O3f y O1g es más bien fijada por la geometría de la molécula. La distancia O1f...O2g también alcanza valores menores que 3 Å a lo largo de toda la simulación, aunque esta fluctúa entre 3 y 4 Å. Esto es consistente con la formación del EH O2g-H...O1f (Ver Figura 3,9b). La interacción entre estos dos átomos de oxígeno también se encuentra en la estructura cristalina pero en dirección inversa, como ha sido demostrado previamente por Immel and Lichtenhaler⁶⁶. Sin embargo, ellos encontraron que una molécula de agua interrumpe este EH al formar un puente de agua. Los resultados de la DM en vacío proporcionan evidencia de la ocurrencia del mismo EH intramolecular, siendo la ocupancia para los EHs O2g-H...O1f y O1f-H...O2g alrededor del 76% y 13%, respectivamente. Con respecto a la distancia O5g...O6f; en la figura 3.8c, puede observarse que aunque esta alcanza un valor consistente con la formación de un EH en varias instancias de la simulación, las grandes fluctuaciones indican que este EH no es estable. Estos resultados son consistentes con la movilidad alrededor del enlace glicosídico observada para la sacarosa que previene la formación de un EH estable por

largo tiempo. En el grafo molecular de la Fig. 3.9b, como consecuencia de los cambios alrededor del enlace glicosídico pueden observarse varias interacciones. En contraste a resultados reportados previamente⁶⁶ que establecen que todos los EHs intramoleculares se desintegran en solución, en este estudio ($\Phi = 104,3^\circ$ anticlinal positivo y $\Psi = -0,7^\circ$) se observan los siguientes EHs con sus correspondientes valores de $\rho(\mathbf{r}_c)$: O2g–H···O1f (0,02804 au), C1g–H···O5f (0,021608 au), C4f–H···O5g (0,008722 au), C6f–H···O5g (0,007836 au) y C6f–H···H–C1g (0,007112 au). Estos resultados muestran la potencialidad de la metodología QTAIM para establecer si ocurre o no una interacción de EH.

Finalmente, en la Fig. 3.8d, se muestra la trayectoria de la distancia O2···O3', dentro de una molécula de maltosa y en la Fig. 3.9c, se muestra el grafo molecular de la maltosa en solución. En la Figura 3.8d, se puede ver que el EH O2–H···O3' se forma solo en algunas instancias de la trayectoria, las cuales corresponden a una transición de la estructura cercana a la del cristal. Sin embargo, esta conformación no es la preferida en solución acuosa diluída. En el grafo molecular de la Fig. 3.9c, que corresponde a la estructura más estable, se observan dos EHs intramoleculares: C1–H···O3' ($\rho(\mathbf{r}_c) = 0,01217$ au) y C5–H···O6' ($\rho(\mathbf{r}_c) = 0,006759$). Los valores de $\rho(\mathbf{r}_c)$ en los correspondientes PCEs son consistentes con este tipo de EHs y muestran nuevamente la importancia de los EHs del tipo C–H···O dado que la maltosa prefiere esta configuración antes que la que adopta en el cristal en el cual ocurren interacciones de EHs más fuertes.

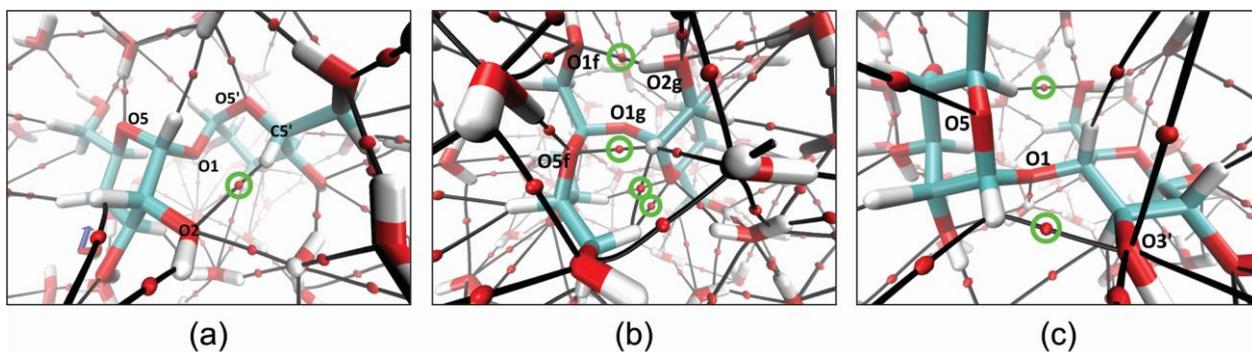


Figura 3.9. Grafos moleculares obtenidos de la etapa de producción de la DM. Los círculos verdes indican los EHs intramoleculares en: (a) trehalosa, (b) sacarosa y (c) maltosa.

3.4 Conclusiones

La trehalosa, sacarosa y maltosa han sido estudiadas comparativamente en fase gaseosa y en solución acuosa infinitamente diluida mediante cálculos de estructura electrónica y simulaciones de dinámica molecular. Un detallado análisis de las interacciones de enlaces de hidrógeno ha sido realizado usando la Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas (QTAIM) sobre funciones de onda obtenidas al nivel B3LYP/6-311++G**. Mediante el uso de esta técnica en fase gaseosa, ha sido demostrado que la sacarosa forma más EHs intramoleculares que la trehalosa y maltosa. En la trehalosa anhidra y dihidrato se ha encontrado un único EH interno del tipo, C–H···O. Esto soporta la hipótesis de Conrad y de Pablo⁶², quienes han sugerido que la trehalosa tiende a plegarse sobre sí misma cuando las moléculas de agua se vuelven escasas. Aquí, se considera que este EH, C–H···O, actúa como regulador de este plegamiento. En ausencia de agua, la trehalosa se pliega y adopta una conformación tipo concha de almeja como la que se observa en el cristal.

A partir de los resultados de la simulación mediante DM, se ha visto que la trehalosa en solución acuosa tiene una mayor rigidez conformacional que la sacarosa y la maltosa en lo que respecta al enlace glicosídico. Además, este enlace está protegido por un EH bifuncional interno.

También ha sido observado que la trehalosa forma más EHs con el agua, tanto los del tipo O–H···O como los del tipo C–H···O. Mientras que los datos de ocupación y tiempo de vida media indican que estos enlaces son más lábiles, esto es, se forman y rompen más fácilmente que en los otros azúcares. Nosotros pensamos que este rápido intercambio de EHs con las moléculas de agua que rodean a la trehalosa evita que las moléculas de agua alcancen el grado de coordinación típico del hielo, esto es cuatro EHs por cada molécula de agua, retardando así la formación de hielo.

3.5 Referencias

- (1) Westh, P.; Ramlov, H. Trehalose Accumulation in the Tardigrade *Adorybiotus Coronifer* during Anhydrobiosis. *J. Exp. Zool.* **1991**, *258*, 303–311.
- (2) Adams, R. P.; Kendall, E.; Kartha, K. K. Comparison of Free Sugars in Growing and Desiccated Plants of *Selaginella Lepidophylla*. *Biochem. Syst. Ecol.* **1990**.
- (3) Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Jackson, S. A. Preservation of Structural and Functional Activity in Lyophilized Sarcoplasmic Reticulum. *Arch. Biochem.*

- Biophys.* **1983**, *220* (2), 477–484.
- (4) Lee, S. L.; Hafeman, A. E.; Debenedetti, P. G.; Pethica, B. A.; Moore, D. J. Solid-State Stabilization of R-Chymotrypsin and Catalase with Carbohydrates. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, *45*, 5134–5147.
 - (5) Nakagaki, M.; Nagase, H.; Ueda, H. Stabilization of the Lamellar Structure of Phosphatidylcholine by Complex-Formation with Trehalose. *J. Membr. Sci.* **1992**, *73*, 173–180.
 - (6) Xie, G.; Timasheff, S. N. The Thermodynamic Mechanism of Protein Stabilization by Trehalose. *Biophys. Chem.* **1997**, *64* (1–3), 25–43.
 - (7) Robinson, C. H. Cold Adaptation in Arctic and Antarctic Fungi. *New Phytol.* **2001**, *151* (2), 341–353.
 - (8) Wang, G. M.; Haymet, A. D. J. Trehalose and Other Sugar Solutions at Low Temperature: Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC). *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (27), 5341–5347.
 - (9) Green, J. L.; Angell, C. A. Phase Relations and Vitrification in Saccharide-Water Solutions and the Trehalose Anomaly. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93* (8), 2880–2882.
 - (10) Carpenter, J. F.; Crowe, J. H. An Infrared Spectroscopic Study of the Interactions of Carbohydrates with Dried Proteins. *Biochemistry* **1989**, *28* (9), 3916–3922.
 - (11) Roser, B. Trehalose a New Approach to Premium Dried Foods. *Trends Food Sci. Technol.* **1991**, *2* (7), 166–169.
 - (12) Magazù, S.; Villari, V.; Faraone, A.; Maisano, G.; Heenan, R. K.; King, S. α,α -Trehalose-Water Solutions VI. A View of the Structural and Dynamical Properties of O β G Micelles in the Presence of Trehalose. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106* (27), 6954–6960.
 - (13) Debenedetti, P. G. *Metastable Liquids: Concepts and Principles*; Princeton University Press: Princeton, New Jersey, 1996.
 - (14) Debenedetti, P. G.; Stanley, H. E. Supercooled and Glassy Water. *Phys. Today* **2003**, *56* (6), 40–46.
 - (15) Pal, S. K.; Peon, J.; Zewail, A. H. Biological Water at the Protein Surface: Dynamical Solvation Probed Directly with Femtosecond Resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (4), 1763–1768.
 - (16) Maillard, L. C. Action Des Acides Amines Sur Les Sucres: Formation Des Melanoidines Par Voie Methodique. *comptes rendus Acad. Sci. paris* **1912**, *154*, 66–68.

- (17) Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Oliver, A. E.; Tsvetkova, N.; Wolkers, W.; Tablin, F. The Trehalose Myth Revisited: Introduction to a Symposium on Stabilization of Cells in the Dry State. *Cryobiology* **2001**, *43*, 89.
- (18) Wang, W. Instability, Stabilization and Formulation of Liquid Protein Pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* **1999**, *185*, 129.
- (19) Haydon, C. SPC, Soap, Perfum. *Cosmet.* **2000**, *73*, 39.
- (20) Villarreal, M. A.; Díaz, S. B.; Disalvo, E. A.; Montich, G. G. Molecular Dynamics Simulation Study of the Interaction of Trehalose with Lipid Membranes. *Langmuir* **2004**, *20* (18), 7844–7851.
- (21) Pereira, C. S.; Hünenberger, P. H. Interaction of the Sugars Trehalose, Maltose and Glucose with a Phospholipid Bilayer: A Comparative Molecular Dynamics Study. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (31), 15572–15581.
- (22) Francia, F.; Dezi, M.; Mallardi, A.; Palazzo, G.; Cordone, L.; Venturoli, G. Protein-Matrix Coupling/Uncoupling in “Dry” Systems of Photosynthetic Reaction Center Embedded in Trehalose/Sucrose: The Origin of Trehalose Peculiarity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (31), 10240–10246.
- (23) Curtis, J. E.; Dirama, T. E.; Carri, G. A.; Tobias, D. J. Inertial Suppression of Protein Dynamics in a Binary Glycerol-Trehalose Glass. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (46), 22953–22956.
- (24) Bellavia, G.; Giuffrida, S.; Cottone, G.; Cupane, A.; Cordone, L. Protein Thermal Denaturation and Matrix Glass Transition in Different Protein-Trehalose-Water Systems. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (19), 6340–6346.
- (25) Buera, P.; Schebor, C.; Elizalde, B. Effects of Carbohydrate Crystallization on Stability of Dehydrated Foods and Ingredient Formulations. *J. Food Eng.* **2005**, *67* (1–2), 157–165.
- (26) Lerbret, A.; Affouard, F.; Hédoux, A.; Krenzlin, S.; Siepmann, J.; Bellissent-Funel, M.-C.; Descamps, M. How Strongly Does Trehalose Interact with Lysozyme in the Solid State? Insights from Molecular Dynamics Simulation and Inelastic Neutron Scattering. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (36), 11103–11116.
- (27) Olsson, C.; Jansson, H.; Swenson, J. The Role of Trehalose for the Stabilization of Proteins. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120* (20), 4723–4731.
- (28) Bader, R. F. W. *Atoms in Molecules. A Quantum Theory*; Clarendon Press: Oxford, 1990.
- (29) Weinhold, F. Natural Bond Orbital Methods in: P.v.R. Schleyer. In *Encyclopedia*

- of Computational Chemistry*; P. v.R. Schleyer, Allinger, N. L., Clark, T., Gasteiger, J., Kollman, P. A., III, H. F. S., Schreiner, P. R., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, UK, 1998; pp 1792–1811.
- (30) Brown, G. M.; Rohrer, D. C.; Berking, B.; Beevers, C. A.; Gould, R. O.; Simpson, R. The Crystal Structure of α,α -Trehalose Dihydrate from Three Independent X-Ray Determinations*. *Acta Cryst* **1972**, *28* (11), 3145.
- (31) Taga, T.; Senma, M.; Osaki, K. The Crystal and Molecular Structure of Trehalose Dihydrate. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* **1972**, *28* (11), 3258–3263.
- (32) Brown, G. M.; Levy, H. A. Further Refinement of the Structure of Sucrose Based on Neutron-Diffraction Data. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* **1973**, *29* (4), 790–797.
- (33) Gres, S. M. E.; Jeffrey, G. A. A Neutron Diffraction Refinement of the Crystal Structure of β -Maltose Monohydrate. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* **1977**, *33* (8), 2490–2495.
- (34) Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (7), 5648.
- (35) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37* (2), 785–789.
- (36) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B. Gaussian 03, Revision D.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.
- (37) Glendening, E. D.; Reed, A. E.; Carpenter, J. E.; Weinhold, F. NBO Versión 3.1.
- (38) AIMAll (Version 19.06.03), Todd A. Keith, TK Gristmill Software, Overland Park KS, USA, 2012 (aim.tkgristmill.com)
- (39) Lu, T.; Chen, F. Multiwfn: A Multifunctional Wavefunction Analyzer. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33* (5), 580–592.
- (40) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926.
- (41) Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W.; Kollman, P. A. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97* (40), 10269–10280.
- (42) Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham III, T. E.; Simmerling, C. L.; Wang, J.;

- Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; et al. AMBER 11. University of California, San Francisco. 2010.
- (43) Izaguirre, J. A.; Catarello, D. P.; Wozniak, J. M.; Skeel, R. D. Langevin Stabilization of Molecular Dynamics. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114* (5), 2090.
- (44) Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. . Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23* (3), 327–341.
- (45) Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G. A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103* (19), 8577.
- (46) Nagase, H.; Ogawa, N.; Endo, T.; Shiro, M.; Ueda, H.; Sakurai, M. Crystal Structure of an Anhydrous Form of Trehalose: Structure of Water Channels of Trehalose Polymorphism. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 9105–9011.
- (47) Jeffrey, G. A.; Nanni, R. The Crystal Structure of Anhydrous α - α Trehalose at -150°. *Carbohydr. Res.* **1985**, *137*, 21–30.
- (48) Nunes, S. C. C.; Jesus, A. J. L.; Moreno, M. J.; Eusébio, M. E. S. Conformational Preferences of α , α -trehalose in Gas Phase and Aqueous Solution. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345* (14), 2048–2059.
- (49) Boyd, R. J.; Choi, S. C. Hydrogen Bonding between Nitriles and Hydrogen Halides and the Topological Properties of Molecular Charge Distributions. *Chem. Phys. Lett.* **1986**, *129* (1), 62–65.
- (50) Carroll, M. T.; Bader, R. F. W. An Analysis of the Hydrogen Bond in BASE-HF Complexes Using the Theory of Atoms in Molecules. *Mol. Phys.* **1988**, *65* (3), 695–722.
- (51) Popelier, P. L. A. Characterization of a Dihydrogen Bond on the Basis of the Electron Density. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102* (10), 1873–1878.
- (52) Tvaroška, I.; Bleha, T. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry Volume 47*; Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry; Elsevier, 1989; Vol. 47.
- (53) Choi, Y.; Cho, K. W.; Jeong, K.; Jung, S. Molecular Dynamics Simulations of Trehalose as a ‘Dynamic Reducer’ for Solvent Water Molecules in the Hydration Shell. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341* (8), 1020–1028.
- (54) Bonanno, G.; Noto, R.; Fornili, S. L. Water Interaction with α , α -Trehalose: Molecular Dynamics Simulation. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1998**, *94* (18), 2755–2762.

- (55) Branca, C.; Magazù, S.; Maisano, G.; Migliardo, F.; Migliardo, P.; Romeo, G. α,α -Trehalose/Water Solutions. 5. Hydration and Viscosity in Dilute and Semidilute Disaccharide Solutions. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (41), 10140–10145.
- (56) Engelsens, S. B.; Monteiro, C.; Hervé de Penhoat, C.; Pérez, S. The Diluted Aqueous Solvation of Carbohydrates as Inferred from Molecular Dynamics Simulations and NMR Spectroscopy. *Biophys. Chem.* **2001**, *93* (2–3), 103–127.
- (57) Engelsens, S. B.; Pérez, S. Unique Similarity of the Asymmetric Trehalose Solid-State Hydration and the Diluted Aqueous-Solution Hydration. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (39), 9301–9311.
- (58) Bordat, P.; Lerbret, A.; Demaret, J.-P.; Affouard, F.; Descamps, M. Comparative Study of Trehalose, Sucrose and Maltose in Water Solutions by Molecular Modelling. *Europhys. Lett.* **2004**, *65* (1), 41–47.
- (59) Pomata, M. H. H.; Sonoda, M. T.; Skaf, M. S.; Elola, M. D. Anomalous Dynamics of Hydration Water in Carbohydrate Solutions. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (39), 12999–13006.
- (60) Winther, L. R.; Qvist, J.; Halle, B. Hydration and Mobility of Trehalose in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (30), 9196–9207.
- (61) Pagnotta, S. E.; McLain, S. E.; Soper, A. K.; Bruni, F.; Ricci, M. A. Water and Trehalose: How Much Do They Interact with Each Other? *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (14), 4904–4908.
- (62) Conrad, P. B.; De Pablo, J. J. Computer Simulation of the Cryoprotectant Disaccharide α,α -Trehalose in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 4049–4055.
- (63) Belton, P. S.; Gil, A. M. IR and Raman-Spectroscopic Studies of the Interaction of Trehalose with Hen Egg-White Lysozyme. *Biopolymers* **1994**, *34*, 957–961.
- (64) Cottone, G.; Ciccotti, G.; Cordone, L. Protein-Trehalose-Water Structures in Trehalose Coated Carboxy-Myoglobin. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 9862–9866.
- (65) Lins, R.; Pereira, C.; Hünenberger, P. Trehalose-Protein Interaction in Aqueous Solution. *Proteins* **2004**, *55*, 177–186.
- (66) Immel, S.; Lichtenthaler, F. W. Molecular Modeling of Saccharides, 7. The Conformation of Sucrose in Water: A Molecular Dynamics Approach. *Liebigs Ann.* **1995**, *1995* (11), 1925–1937.

CAPÍTULO IV

*“Dinámica Molecular de Azúcares Amorfos
en presencia de Reactantes de Maillard”*

4.1 Introducción

En general, los sólidos en los alimentos y materiales biológicos se encuentran en un estado amorfo metaestable sensible a los cambios de temperatura y al contenido de agua. Esta matriz amorfa puede existir como un vidrio muy viscoso o como una estructura amorfa líquida-gomosa, ocurriendo el cambio a la llamada temperatura de transición vítrea (T_g). Por debajo de T_g , debido a la alta viscosidad del sistema, disminuye la movilidad molecular y con ello la velocidad de las reacciones de deterioro. Sin embargo, existen evidencias de que las reacciones de pardeamiento no enzimático (non-enzymatic browning reaction, NBR) entre las cuales se incluyen las reacciones de Maillard¹, ocurren aún por debajo de T_g . Las reacciones de Maillard se inician con la condensación entre el grupo carbonilo de un azúcar reductor y un grupo amino de un aminoácido. Estas reacciones conllevan una disminución de la digestibilidad del alimento y de la biodisponibilidad de los aminoácidos que intervienen en las reacciones de condensación. Los alimentos lácteos son particularmente sensibles a ésta reacción por su alto contenido en lactosa y lisina y pueden propiciar la reacción incluso en condiciones de refrigeración². Ha sido demostrado que la pérdida de lisina libre en los alimentos provoca una reducción de la retención de nitrógeno y pérdida de peso. Por ello, las reacciones de Maillard representan uno de los factores más importantes en el control de la calidad y el valor nutricional de los alimentos.

Los azúcares amorfos son muy utilizados como excipientes en formulaciones alimentarias, cosméticas y farmacéuticas. Su habilidad para preservar la integridad estructural y funcional de las biomoléculas frente a condiciones adversas, tales como la desecación, calor y almacenamiento prolongado ha quedado establecida en numerosos trabajos. Sin embargo, el mecanismo por el cual estos azúcares ejercen su rol protector continúa siendo un área de activa investigación. En el curso de estas investigaciones han surgido los diferentes modelos e hipótesis que han sido descritos en el capítulo 1.

En este capítulo se analizan comparativamente, con métodos de simulación de dinámica molecular, mezclas formadas por un disacárido (trehalosa, sacarosa y maltosa), reactantes de Maillard (glucosa y lisina) y agua.

4.2 Metodología

Las corridas de dinámica molecular se realizaron con el paquete de programas AMBER 11. Los sistemas formados por el carbohidrato, los reactantes de Maillard y agua se modelaron utilizando conjuntamente el campo de fuerzas GAFF (General Amber Force Field) y FF99SB. Las estructuras de los disacáridos, en sus estados cristalinos tomadas de una base de datos cristalográficos (ver referencias 30-33 del capítulo III) y las de glucosa y lisina fueron optimizadas y sus potenciales electrostáticos en las superficies atómicas fueron calculados usando Gaussian 03 (HF/ 6-31G*),³ con el método de cargas RESP⁴ (Restrained Electro Static Potential fit). Las simulaciones fueron realizadas en un ambiente de solvente explícito utilizando el modelo de agua TIP3P.⁵

Para el armado de las configuraciones iniciales de las cajas de simulación según la concentración deseada se utilizó el programa PACKMOL.⁶ Como la estructura de la lisina fue considerada en su estado de ionización más estable a pH neutro, (carga +1), de manera de neutralizar las cargas, se agregaron contraiones. Específicamente, diferentes cantidades de iones Cl⁻ fueron situados aleatoriamente en la caja de simulación.

Las simulaciones de dinámica molecular fueron precedidas por dos etapas de minimización energética a fin de lograr una buena distribución de las moléculas y evitar “pozos de aire”. En cada una de estas etapas se usó el método de Pendiente Pronunciada (*Steepest Descent*) seguido por el método de Gradiente Conjugado. *-El método de Pendiente Pronunciada es muy robusto y garantiza la aproximación al mínimo buscado. Sin embargo, el grado de convergencia decrece a medida que la energía se aproxima al mínimo, haciendo de este algoritmo muy lento. Por ello, una vez llegado a las proximidades del mínimo se prefiere el método de Gradiente Conjugado que converge a la solución más rápidamente-*.

La primera etapa se realizó aplicando restricciones de fuerza armónica sobre los átomos de los solutos y la segunda etapa sin restricciones. Los sistemas resultantes de mínima energía potencial fueron sometidos a una corrida de DM por 50 ps bajo condiciones de volumen constante, hasta alcanzar una temperatura de 300 K con restricciones de movimiento sobre las moléculas de soluto, como en la primera etapa de minimización. Posteriormente, el sistema fue equilibrado en el ensamble NPT a la misma temperatura de 300 K y una presión de 1 atm, y sin restricciones sobre las moléculas.

La temperatura fue mantenida constante en 300 K utilizando el algoritmo de acoplamiento de Langevin⁷ y todas las longitudes de enlace involucrando átomos de hidrógeno se restringieron con el algoritmo Shake⁸. Las interacciones de largo alcance fueron calculadas usando el método Particle–mesh Ewald (PME),⁹ mientras que las interacciones de van der Waals fueron estimadas con el potencial 6-12 de Lennard-Jones. El cutoff para las interacciones de van der Waals no enlazantes fue establecido en 10 Å. Las ecuaciones de movimiento fueron resueltas usando un paso de simulación de 2 fs. Los sistemas se consideraron equilibrados como para obtener promedios estadísticos cuando los desvíos estándar de los valores de densidad fueron menores al 1%. Los tiempos de equilibrio estuvieron comprendidos entre 10 y 35 ns según aumentaba la concentración de los sistemas. La etapa de producción posterior se continuó en el ensamble NVE, usando un acoplamiento débil de temperatura¹⁰ con una constante de tiempo de 10 ps. El paso de integración se mantuvo en 2 fs y las coordenadas de la trayectoria fueron grabadas cada 1 ps para su análisis.

Preparación de los sistemas:

Las cajas de simulación fueron creadas colocando las moléculas optimizadas de glucosa (G), lisina (L) y un disacárido (trehalosa (T), maltosa (M) o sacarosa (S)), junto con moléculas de agua (A) de manera de obtener mezclas al 50% p/p y 80% p/p de disacárido/(disacárido + agua) .

Además, un sistema con mínimo contenido de humedad, fue construido con el objetivo de simular las condiciones experimentales alcanzadas por Kawai y col.¹¹, quienes modelaron matrices alimentarias preparando muestras liofilizadas acuosas de glucosa: lisina: un formador de matriz vítrea (trehalosa, maltosa y PVP de diferentes masas molares) en una relación 1:1:98 (% p/p, en base seca), para estudiar el efecto de la transición vítrea sobre las reacciones NBR. En este caso para la simulación de DM se ubicaron en la caja las estructuras de glucosa, lisina y el disacárido en una proporción en peso 1:1:98. Luego se agregaron moléculas de agua dando como resultado cajas de simulación con un contenido final de solvente del 0,5% en peso. El número de cada tipo de molécula en las diferentes cajas de simulación se detalla en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Composición de las mezclas cuaternarias. θ_D es el porcentaje en peso de disacáridos (trehalosa, maltosa o sacarosa), θ_{St} es el porcentaje en peso de todos los solutos (disacáridos y reactantes) y θ_A el porcentaje en peso del agua contenida en los sistemas simulados. N_D , N_A , N_G , N_L corresponden al número de moléculas de disacárido, agua, glucosa y lisina respectivamente.

θ_D	θ_{St}	θ_A	N_D	N_A	N_G	N_L
50	51,5	48,5	108	2046	6	8
80	80,6	19,4	108	510	3	4
98	99,5	0,5	144	15	3	4

4.3 Resultados

Para confirmar el estado de equilibrio de las mezclas, y para validar el protocolo de simulación utilizado, se comparó la densidad de algunos de los sistemas con datos encontrados en la literatura. El valor de densidad obtenido para la mezcla más concentrada de trehalosa a 300 K es 1,420 g/cm³. Para trehalosa pura ha sido reportado un valor teórico obtenido por simulación de 1,47 g/cm³ ^{12,13} y un valor experimental de 1,53 g/cm³ ¹⁴. Teniendo en cuenta que el agregado de diluyentes disminuiría el valor de la densidad, nuestros valores correspondientes a los sistemas de mayor concentración estarían en buena concordancia con los citados. La densidad obtenida de la simulación para el sistema al 50% p/p de sacarosa (48,5% p/p de disacárido) fue 1,242 g/cm³, comparable con el dato experimental de 1,231 g/cm³ para una solución al 50% p/p de sacarosa.

4.3.1 Características Estructurales

En la Figura 4.1 (a-c) (d-f) se muestran instantáneas de las configuraciones equilibradas a 300 K de las mezclas al 50% p/p y al 80% p/p de trehalosa, maltosa y sacarosa. La figura 4.2 muestra las representaciones periódicas sobre dos ejes de los sistemas al 50% p/p. Las instantáneas correspondientes a las mezclas al 98% p/p se omiten dado que por el gran número de moléculas de disacáridos no se pueden apreciar diferencias entre los distintos sistemas.

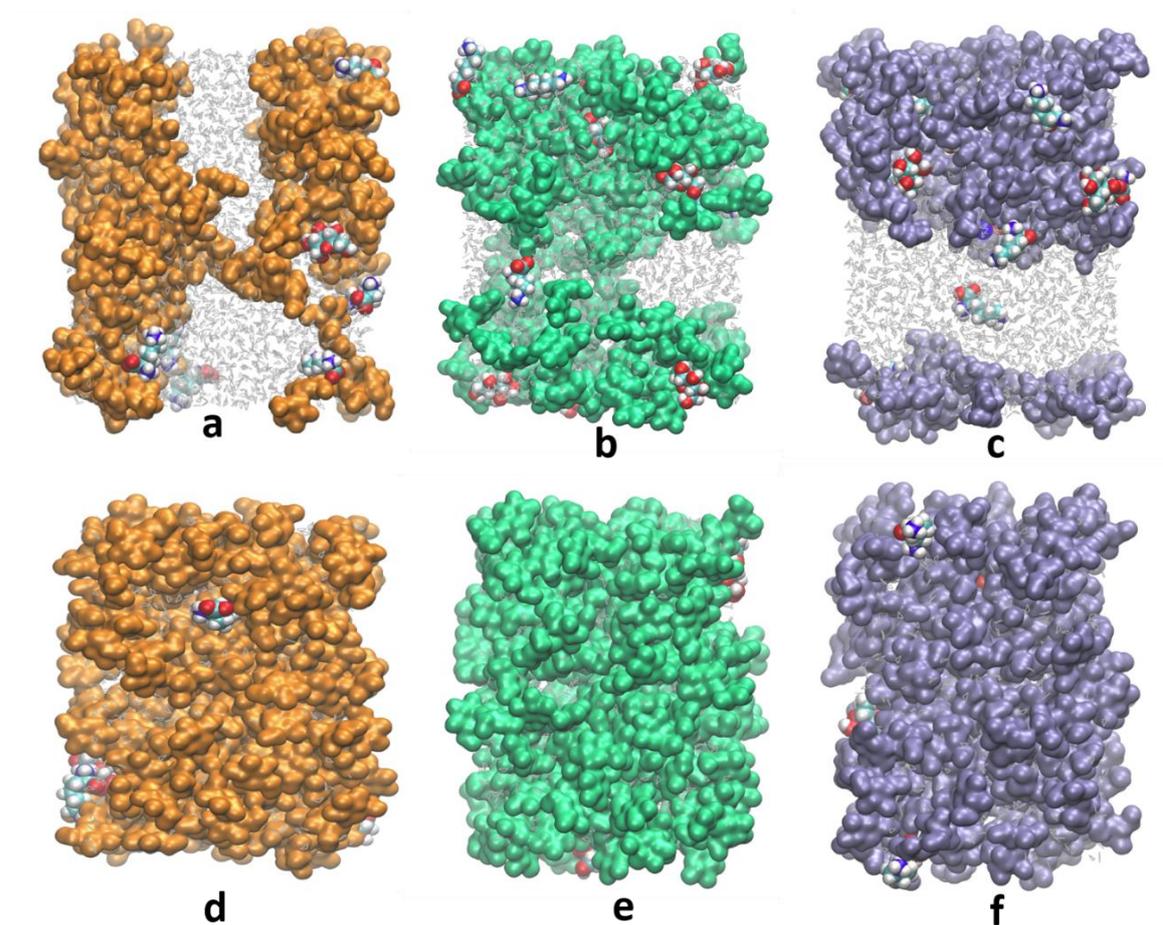


Figura 4.1: Instantáneas de las configuraciones finales, de equilibrio, de los sistemas al 50%: **a)** trehalosa **b)** maltosa **c)** sacarosa, y al 80%: **d)** trehalosa **e)** maltosa **f)** sacarosa. Las moléculas de disacárido están representadas como isosuperficie, los reactantes glucosa y lisina como superficie de vdW y las moléculas de agua en modelos de líneas.

En estas figuras, puede observarse claramente, que la distribución de moléculas en las mezclas al 50% p/p de disacárido es bastante heterogénea, y diferente en los tres sistemas. En la mezcla de maltosa, (fig. 4.1 b) hay pequeñas zonas o bolsillos de agua atrapadas por conglomerados de disacárido. Estos bolsillos de agua son de mayor tamaño en la mezcla de trehalosa, (fig. 4.1 a), mientras que en la sacarosa, (fig. 4.1 c) hay una marcada separación entre los conglomerados de disacárido y las de agua dando lugar a verdaderos canales de agua entre las moléculas de disacárido.

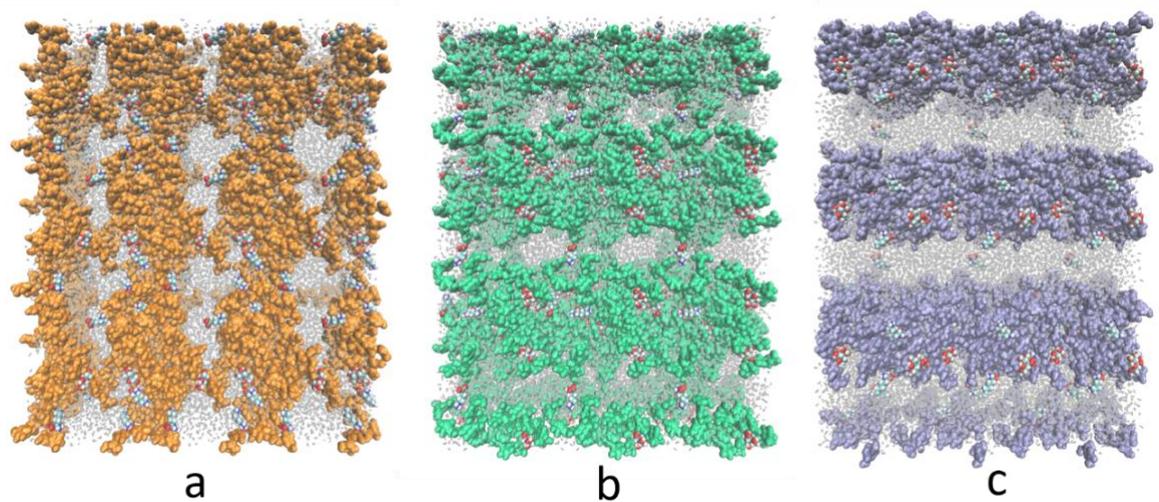


Figura 4.2: Instantáneas de las configuraciones finales de los sistemas al 50%. Se representa la caja de simulación y sus imágenes de acuerdo a las Condiciones Periódicas de Contorno: a) trehalosa b) maltosa c) sacarosa.

En las mezclas al 80% (Fig. 4.1, c-f) los agregados o clusters de disacáridos se unen entre sí, aumentando de tamaño hasta formar sistemas completamente percolados, esto es, los agregados de disacárido están conectados con sus imágenes periódicas en las tres dimensiones. Estos resultados son consistentes con simulaciones previas de dinámica molecular de soluciones acuosas de carbohidratos que exhiben un umbral de concentración, más allá de la cual se produce la percolación total del azúcar¹⁵⁻¹⁷, y como se verá posteriormente esto tiene implicancias en las interacciones de enlaces de hidrógeno (EHs) que se establecen entre los distintos componentes de las mezclas.

4.3.2 Funciones de distribución radial

Información más detallada acerca de la manera en que se asocian las moléculas en un sistema, puede ser obtenida analizando las funciones de distribución radial $g(r)$ (ó RDF por sus siglas en inglés, *Radial Distribution Functions*). En general, esta función para dos átomos i y j , da la densidad local de un tipo de átomo j a una dada distancia del átomo i , normalizada mediante la densidad en el seno de la solución.

Las figuras 4.3, 4.4 y 4.5 muestran las curvas para los oxígenos del agua en torno a los átomos de oxígeno O1, O3, O5, O5', O6, O6' (O6f) de los disacáridos, para todas

las concentraciones analizadas (ver en la Figura 3.1 la numeración de los átomos de oxígeno).

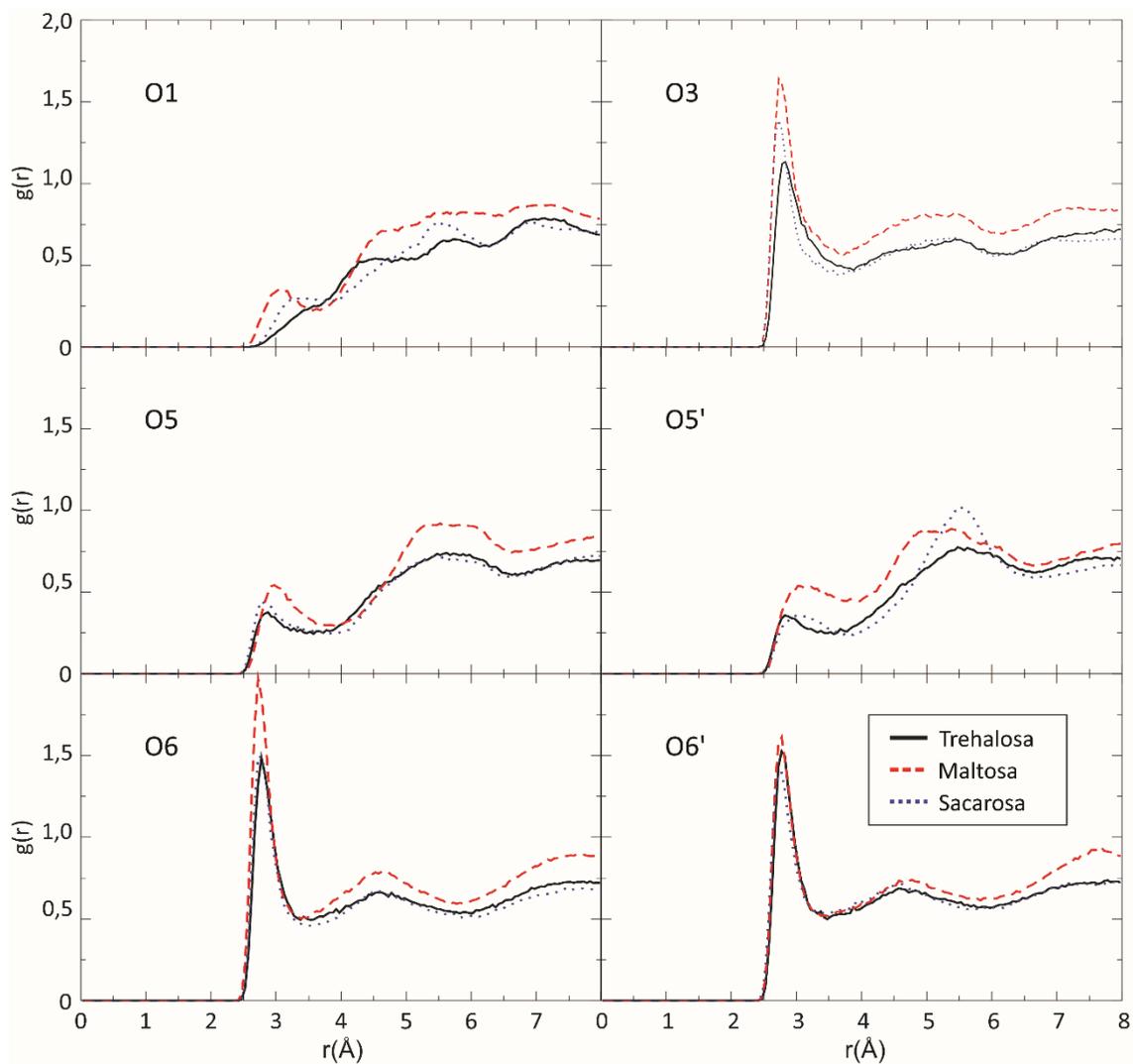


Figura 4.3: Función de distribución radial de los oxígenos del agua alrededor de los oxígenos O1, O3, O5, O5', O6, O6' (O6f) de los disacáridos (ver en la Figura 3.1 la numeración de los átomos de oxígeno) para las mezclas de concentración al 50% p/p del disacárido.

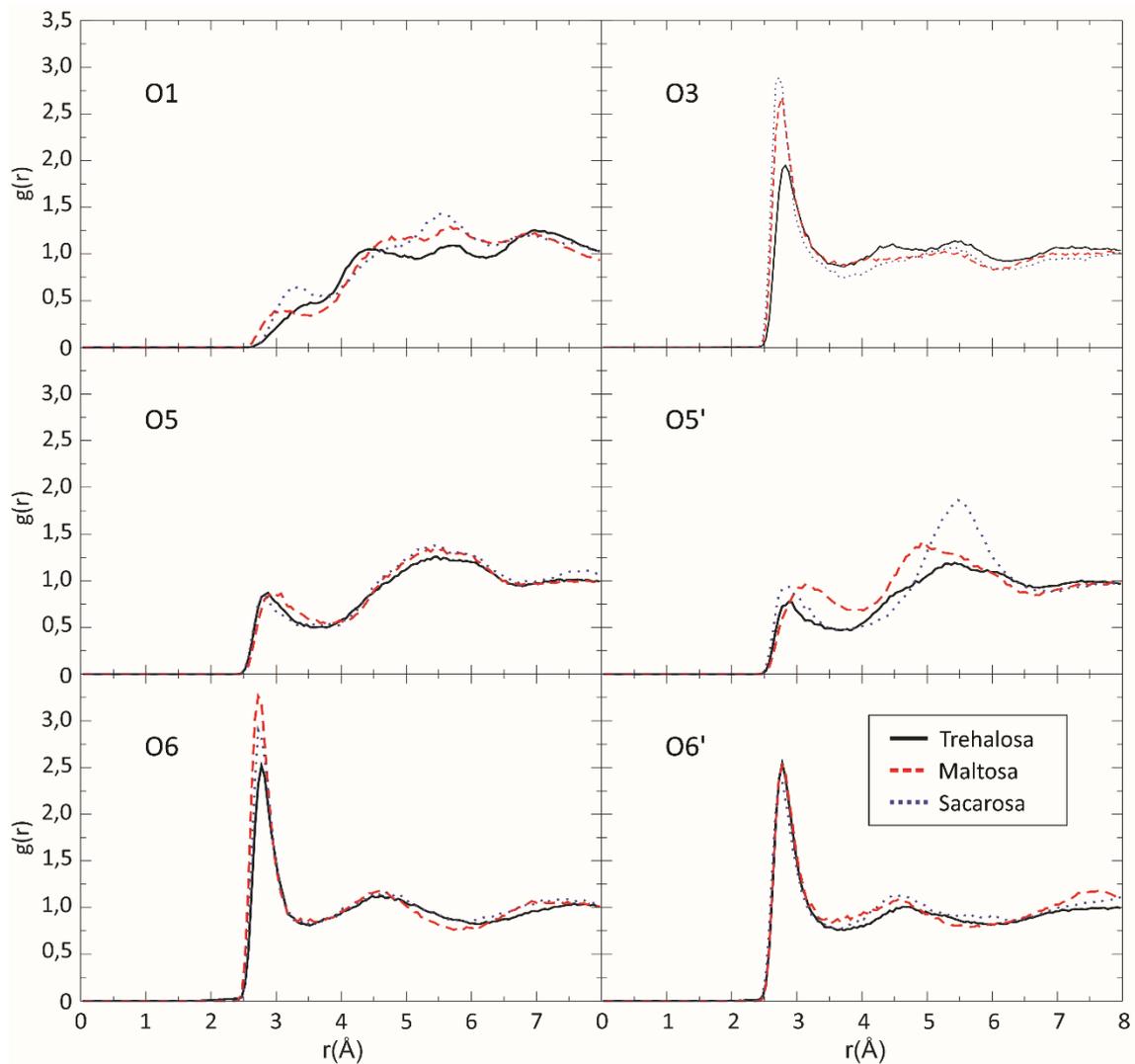


Figura 4.4: Función de distribución radial de los oxígenos del agua alrededor de los oxígenos O1, O3, O5, O5', O6, O6' (O6f) de los disacáridos (ver en la Figura 3.1 la numeración de los átomos de oxígeno) para las mezclas de concentración al 80% p/p del disacárido.

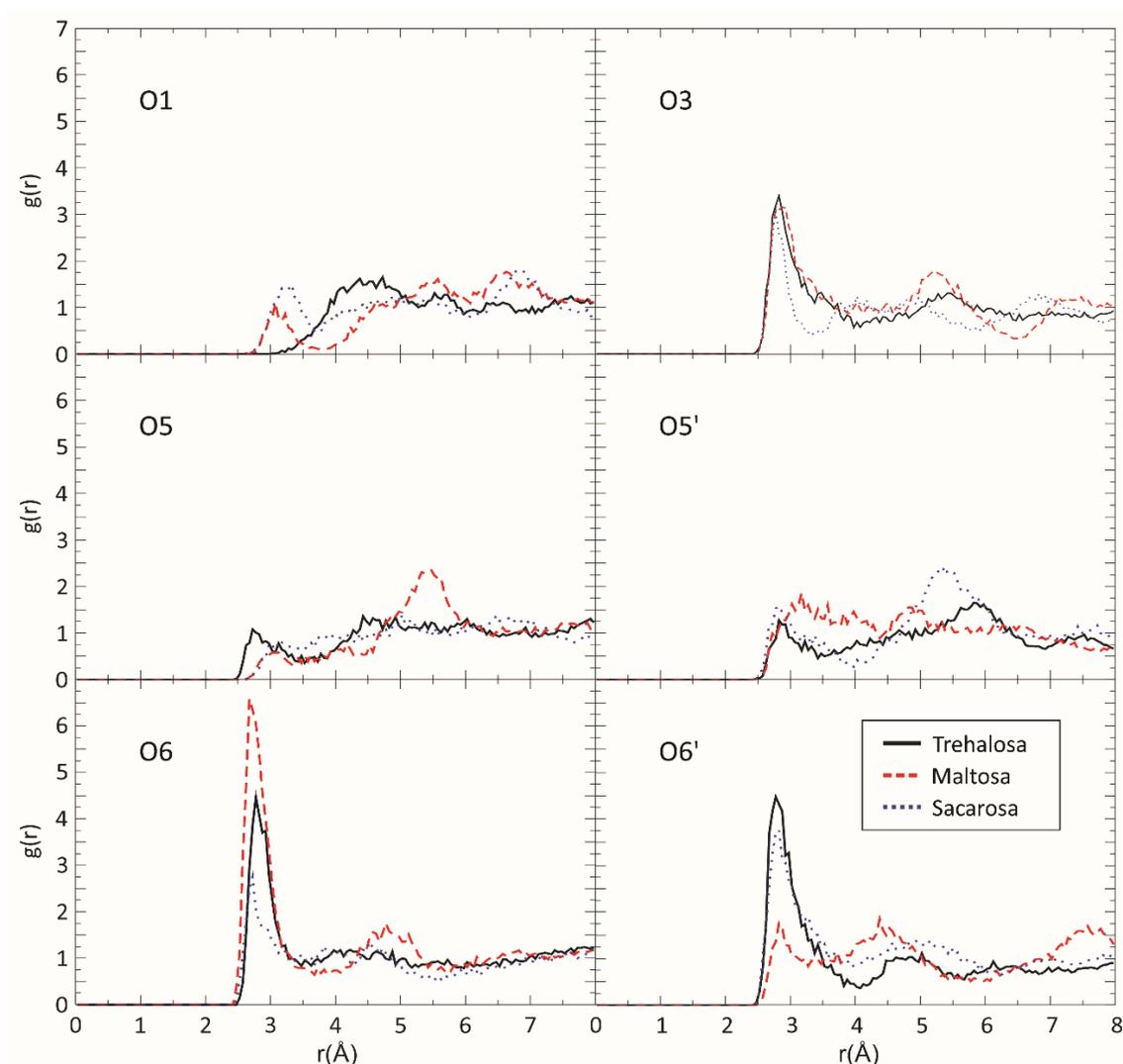


Figura 4.5: Función de distribución radial de los oxígenos del agua alrededor de los oxígenos O1, O3, O5, O5', O6, O6' (O6f) de los disacáridos (ver en la Figura 3.1 la numeración de los átomos de oxígeno) para las mezclas de concentración al 98% p/p del disacárido.

Considerando una misma concentración, las curvas RDF de los oxígenos del agua en torno a los oxígenos hidroxílicos analizados de los azúcares, esto es, O3, O6 y O6' (O6f), presentan los mismos patrones en sus formas, de pico-valle-pico, con ligeras diferencias en la posición y altura correspondiente al primer pico. Las curvas alcanzan un máximo de densidad a los 2,7- 2,8 Å aproximadamente, distancia que es característica entre el O dador y el O aceptor en los enlaces de hidrógeno (EHs). Un primer mínimo se observa en torno a los 3,4-3,55 Å indicando el final de la primera esfera de hidratación, por lo que se ha considerado un valor de 3,5 Å como valor umbral de distancia para evaluar los EHs. Las gráficas muestran también que este mínimo, así como los picos

sucesivos, se hacen más pronunciados al aumentar la concentración de las mezclas, denotando un mayor orden estructural de las moléculas de agua en torno a estos oxígenos. Esto resulta lógico si se piensa que la mayor cantidad de moléculas de azúcar disminuye la movilidad de todo el sistema, incluso de las moléculas de agua, permitiendo que las esferas de hidratación estén más definidas.

La figura 4.3 muestra que a una concentración del 50% p/p, el primer pico alcanza una mayor altura en el caso de los O hidroxílicos de la maltosa, indicando una mayor probabilidad de que estos oxígenos formen EHs comparados con los de trehalosa y sacarosa. En las matrices más concentradas sin embargo, esta mayor probabilidad que exhibe la maltosa depende del oxígeno considerado. Es importante destacar que en el caso de la trehalosa las curvas de $g(r)$, para las concentraciones del 50 y 80% p/p, (figuras 4.4 y 4.5) muestran que la altura del primer pico es inferior a la que alcanzan los otros dos disacáridos. Es decir, la densidad de moléculas de agua, y por ende la probabilidad de la formación de EHs trehalosa-agua es menor que en el caso de maltosa o sacarosa.

Respecto a los oxígenos endocíclicos, O5 y O5' en las tres concentraciones analizadas las curvas de $g(r)$, muestran que la altura del primer máximo es considerablemente menor que la de los oxígenos hidroxílicos, lo cual es razonable si se tiene en cuenta que el agua está impedida estéricamente para hidratar completamente estos oxígenos y formar EHs. No obstante, la mayor diferencia en el patrón de hidratación de los azúcares se observa en las curvas para el oxígeno glicosídico, O1. Tanto la maltosa como la sacarosa exhiben un pico pequeño y poco pronunciado. Al igual que en los oxígenos acetálicos, el O1 de estos azúcares está escasamente hidratado debido a efectos estéricos. Sin embargo, en las curvas pertenecientes a la trehalosa este pico directamente está ausente, lo que puede atribuirse, a la estructura más cerrada, “tipo ostra” de la trehalosa, que impide el acercamiento de las moléculas de agua al oxígeno glicosídico.

En la figura 4.6, se muestran las $g(r)$ oxígeno-oxígeno del agua (O_A-O_A) para los diferentes disacáridos y para las concentraciones de 50% y 80% p/p. Las curvas para una concentración al 98% p/p no se muestran ya que exhiben mucho ruido debido a la poca cantidad de moléculas de agua en las mezclas. Al examinar las gráficas, se observa que las diferencias en las curvas de los tres disacáridos, para una misma concentración, son mínimas. Presentan un único primer pico bien definido en torno a los 3 Å, asociado a los EHs, pero con densidades máximas ligeramente diferentes según sea el disacárido, sobre

todo en las matrices al 80% p/p. Estos picos están seguidos de una zona de valle, sin picos posteriores, indicando una total desestructura de las moléculas de agua (pérdida de las interacciones de largo alcance), a partir de la segunda esfera de hidratación. Roberts y Debenedetti¹⁵ observaron, para soluciones acuosas de monosacáridos, que a partir de una concentración del 60% p/p las moléculas de agua comenzaban a mostrar un nuevo esquema de organización o estructura. En este trabajo, las incipientes ondulaciones que se observan en la figura 4.6 (b) muestran que en presencia de disacáridos, esta reestructuración de las moléculas de agua sólo es ligeramente apreciable en los sistemas al 80% p/p.

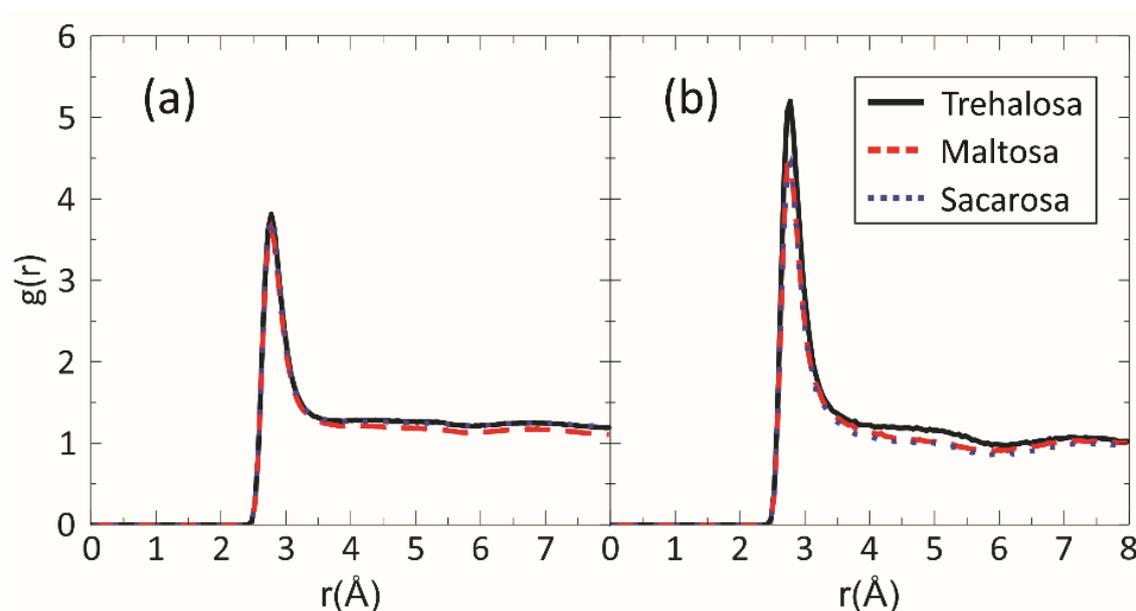


Figura 4.6: Función de distribución radial de los oxígenos del agua alrededor de los oxígenos del agua ($O_A - O_A$) para cada disacárido a una concentración de: a) $\theta_D = 50\%$ p/p y b) $\theta_D = 80\%$ p/p.

4.3.3 Dinámica conformacional

La estructura conformacional de los disacáridos puede ser descrita por medio de los dos ángulos diedros que involucran al oxígeno glicosídico, Φ y Ψ (ver descripción en la figura 3.1)

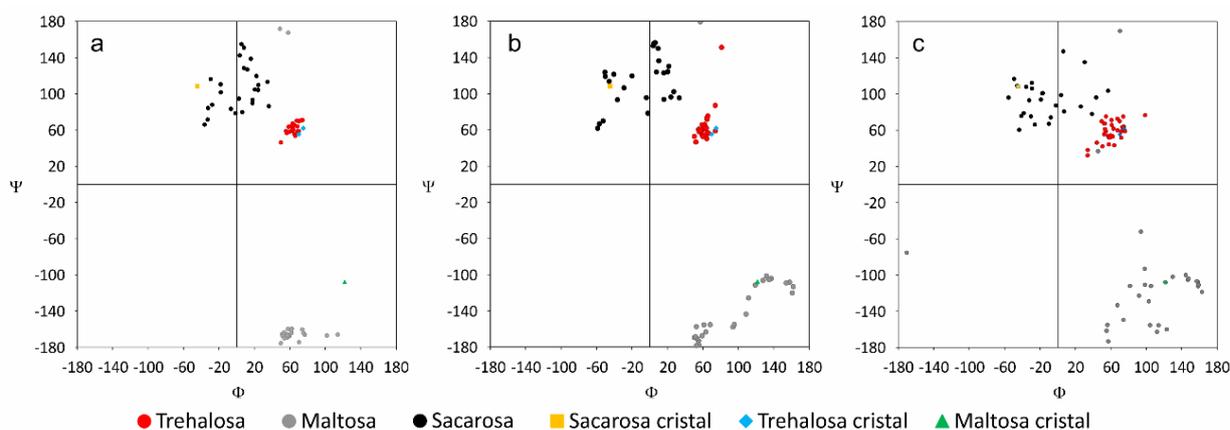


Figura 4.7: Valor promedio de los ángulos diedros ϕ y ψ a lo largo de las trayectorias de DM para θ_D de **a)** 50% p/p; **b)** 80% p/p, **c)** 98% p/p.

En la figura 4.7 se representan los valores promedios adoptados por ϕ y ψ de un cierto número de moléculas de disacárido elegidas en forma aleatoria y evaluados durante 1 ns y en la tabla 4.2 se presenta el valor medio de estos diedros así como su desvío estándar. Para todas las concentraciones estudiadas, las gráficas muestran que la trehalosa presenta una dispersión de datos notablemente menor a los de maltosa y sacarosa. Por ejemplo, para $\theta_D = 50\%$ p/p, los valores medios de los ángulos ϕ y ψ adoptados por las moléculas consideradas de trehalosa son $63,1^\circ$ y $61,1^\circ$ respectivamente, con una fluctuación entre 5° y 6° en ambos. En las matrices más concentradas de trehalosa, los valores de los diedros se mantienen próximos a los observados en la mezcla al 50% aunque la fluctuación registra un ligero incremento hasta los $12,8^\circ$ como valor más elevado. Es importante notar que estos valores son muy próximos a los adoptados por las formas hidratadas de la trehalosa en el cristal, así como a los obtenidos mediante cálculos en fase gaseosa (ver sección 3.3.1) y también para una solución infinitamente diluida ($62,0^\circ$; $62,1^\circ$). Para la concentración al 50% p/p, la maltosa adopta valores medios de $63,9^\circ$ para ϕ y $-163,9^\circ$ para ψ , pero con una fluctuación de $16,5^\circ$ y 8° respectivamente. Para esta misma concentración, puede verse en la figura 4.7 (a) que la sacarosa es la que muestra mayores variaciones, con valores medios de $\phi = 107,6^\circ$ y $\psi = 1,9^\circ$ y desvíos entre 27° y 25° respectivamente. En el caso de los dos sistemas más concentrados de estos dos azúcares, las dispersiones en los valores aumentan considerablemente. Además, maltosa y sacarosa, no solo muestran mayor variación que la trehalosa en los diedros ϕ y ψ (tabla 4.2) sino que también se apartan de los valores de estos ángulos en el cristal. Esto revela una mayor rigidez de la trehalosa respecto a los otros azúcares, en contra de lo expresado

por otros autores.¹⁸ Sin embargo, está en línea con lo encontrado en nuestro trabajo previo de soluciones infinitamente diluidas de estos tres disacáridos¹⁹ y con el estudio de Liu y col, de soluciones más concentradas de trehalosa y sacarosa²⁰, quienes postularon que la rigidez de la trehalosa hace que se refuerce la estructura local en torno a ella como una cerca que contribuye a ejercer un efecto volumétrico que protege a las membranas celulares durante la liofilización.

Tabla 4.2: Valores promedios de los ángulos Φ y Ψ .

	$\theta_D= 50\%$		$\theta_D= 80\%$		$\theta_D= 98\%$		cristal	
D	ϕ	ψ	ϕ	ψ	ϕ	ψ	ϕ	ψ
T	63,1°	61,1°	61,6°	61,0°	61,2°	59,4°	74,9° ^a	61,9° ^a
	± 5,7°	± 5,5°	± 5,8°	± 8,8°	± 12,8°	± 11,3°	75° ^b	61,8° ^b
M	63,9°	-163,9°	95,2°	-143,2°	112,3°	-125,3°	121,7°	-107,8°
	± 16,5°	± 8,0°	± 41,4°	± 28,7°	± 35,4°	± 31,4°		
S	107,6°	1,9°	112,4°	-9,8°	97,1°	-8,4°	108,3°	-44,7°
	± 27,5°	± 25,8°	± 27,2°	± 30,7°	± 21,9°	± 31,4°		

^aTrehalosa dihidrato-1

^bTrehalosa dihidrato-2

4.3.4 Dinámica Traslacional

Las propiedades de transporte, particularmente los coeficientes de difusión traslacional, D , brindan una medida directa de la movilidad molecular. Este es un factor que ha sido considerado muy importante por varios autores en la preservación de materiales biológicos en matrices de disacáridos. De acuerdo con la hipótesis de la vitrificación, el efecto protector de los azúcares se debe fundamentalmente, a que sumado a altos valores de T_g , forman un estado vítreo amorfo en el que se ve reducida la movilidad molecular y con ello la velocidad de las reacciones de deterioro. Entre las reacciones de deterioro más estudiadas se encuentran las reacciones de Maillard o de

pardeamiento no enzimático (NBR) que ocurren durante el almacenamiento prolongado de materiales biológicos. Kawai y col.²¹, por ejemplo, estudiaron el efecto de la transición vítrea sobre la velocidad de las reacciones NBR de glucosa y lisina (reactantes de Maillard) en varias matrices formadas por trehalosa, maltosa y polivinilpirrolidonas de diferentes masas molares. El estudio mostró que las NBR en matrices poliméricas eran más rápidas que en matrices de disacáridos a pesar de que las Tgs de las matrices poliméricas eran más altas que las de los disacáridos, por lo que los autores concluyeron que la velocidad de las NBR en una matriz vítrea no puede ser entendida sólo por el valor de Tg de la matriz, sino que debían ser consideradas también las interacciones directas de EHs entre los reactantes y los azúcares. Estas interacciones suponen, se ven favorecidas cuando disminuye la movilidad molecular inducida por el estado vítreo, ya que permite el contacto directo entre los reactantes y los azúcares.

En este apartado se comparan los coeficientes de difusión de los disacáridos que componen la matriz vítrea (D_D), del agua (D_A) y de las moléculas de reactantes de Maillard inmersas en las matrices, esto es, glucosa (D_G) y lisina (D_L)

Como ha sido mencionado en el capítulo II, la movilidad molecular puede describirse en términos de la evolución temporal del desplazamiento cuadrático medio (MSD) de sus centros de masa, como se expresa en la siguiente ecuación:

$$MSD = \left\langle |r_i(0) - r_i(t)|^2 \right\rangle,$$

luego los coeficientes de Difusión ser calculados a partir de la relación de Einstein midiendo las pendientes de las gráficas de MSD vs. tiempo y promediando sobre todas las moléculas.

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \left\langle |r_i(0) - r_i(t)|^2 \right\rangle = 6Dt$$

Este promedio sobre todo el conjunto de moléculas mejora significativamente las estadísticas. El inconveniente de este procedimiento es que cuando se consideran sólo unas pocas moléculas inmersas en una caja con un gran número de moléculas de otro tipo, se requieren tiempos más largos de simulación para obtener datos confiables. Esta sería la situación de un soluto en un sistema muy diluido, o en este trabajo, el de las moléculas de reactantes de Maillard o bien las escasas moléculas de agua en los sistemas al 98% p/p. Por otra parte, ha sido postulado^{13,15,22} que al aumentar el tamaño de los agregados de azúcares las moléculas de agua quedan confinadas en ciertos espacios o “bolsones de agua” durante un cierto tiempo antes de saltar a otro. En estas situaciones, los coeficientes

de difusión varían de una cavidad a otra y la dependencia del tiempo del MSD solo será lineal luego de tiempos suficientemente largos como para que las moléculas de agua hayan recorrido estos espacios en su totalidad. A manera de tratar de minimizar estas posibles fuentes de error se utilizó el procedimiento propuesto por Wang y Hou²³. El mismo consiste en realizar un ajuste de mínimos cuadrados del MSD obtenido como promedio de múltiples corridas de DM simultáneas. Para cada sistema, se realizaron 15 corridas diferentes de DM de 2,5 ns, partiendo de las mismas coordenadas iniciales en cada caja. Las diferentes trayectorias fueron logradas usando diferentes números (semillas) aleatorios para generar las velocidades iniciales. (En figuras suplementarias se muestran ejemplos de estas curvas de MSD)

Para el caso particular de la trehalosa a la concentración al 50% p/p, se creó además otro sistema utilizando el modelo de agua SPC/E, debido a que estudios comparativos han mostrado que este modelo conduce a mayores concordancias con resultados experimentales de Coeficientes de Difusión, que el modelo TIP3P.²⁴⁻²⁶ Efectivamente, los resultados obtenidos de la simulación se aproximan en mayor grado a valores experimentales que los coeficientes del modelo TIP3P que acusaba valores significativamente más altos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los datos de los coeficientes reportados en la literatura corresponden a una mezcla binaria de trehalosa y agua, por lo que esta diferencia puede deberse a la presencia de los reactantes glucosa y lisina. Además, los coeficientes de difusión de la lisina determinados con el modelo de agua SPC/E eran superiores por un factor de 10 a los obtenidos con el modelo TIP3P. Esto puede deberse a que la lisina es una molécula cargada y el modelo SPC/E considera a la molécula como un cuerpo rígido que contiene tres sitios de interacción coulómicos (O, H, H) y un único sitio Lennard-Jones (O), por lo que las atracciones electroestáticas presentes pueden influir sobre estos coeficientes. Debido a ello, los datos reportados en las tablas corresponden al modelo TIP3P.

Los coeficientes de difusión de los disacáridos y agua, se muestran en la tabla 4.3. En el caso de los disacáridos, se observa que el coeficiente de difusión disminuye al ir decreciendo el contenido de agua de las mezclas. Esta tendencia puede atribuirse al mayor desarrollo de la red de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de azúcar que conduce a aumentar la percolación del sistema disminuyendo la movilidad molecular.

Tabla 4.3: coeficientes de difusión de las moléculas de disacáridos, D_D , y de las moléculas de agua, D_A , para las distintas mezclas. Las unidades de D están expresadas como $10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. Entre paréntesis se indica el valor de R^2 .

Disacárido	$\theta_D= 50 \%$		$\theta_D= 80 \%$		$\theta_D= 98 \%$	
	D_D	D_A	D_D	D_A	D_D	D_A
T	2,32 (0,997)	187,00 (0,998)	0,17 (0,933)	13,88 (0,99)	0,016 (0,897)	0,422 (0,844)
M	2,283 (0,998)	137,50 (0,998)	0,100 (0,95)	5,88 (0,985)	0,019 (0,96)	0,230 (0,94)
S	2,98 (0,991)	150,67 (0,999)	0,133 (0,967)	5,20 (0,992)	0,020 (0,924)	0,263 (0,875)

En los sistemas al 50% p/p se encontró que los coeficientes disminuyen en el orden $D_S > D_T > D_M$. Pero en las mezclas al 80% p/p el orden entre trehalosa y sacarosa se invierte, siendo $D_T > D_S > D_M$, mientras que en las mezclas al 98% p/p estos coeficientes son prácticamente iguales. Si bien no se han encontrado datos experimentales con la misma composición y concentraciones que los sistemas simulados en este trabajo, los valores obtenidos están en buen acuerdo con otros estudios de mezclas binarias disacárido-agua de concentraciones aproximadas. Para trehalosa, el coeficiente determinado en este trabajo para la caja de menor concentración está en línea con el valor publicado de $2,34 * 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ obtenido por RMN de una mezcla trehalosa-agua al 55% p/p a 303 K. También es acorde con $11,7 * 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ obtenido por simulación de DM para un sistema al 45,6% a 310K. Asimismo, el coeficiente aquí calculado para sacarosa al 50% p/p, D_S , está próximo al valor del coeficiente experimental publicado de $3,8 * 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ para una mezcla al 55% p/p a 303 K. En los sistemas más concentrados, los resultados obtenidos en este trabajo también guardan relación con otros publicados. Por ejemplo, para sacarosa al 80% p/p el coeficiente está en buen acuerdo con el coeficiente determinado experimentalmente por Ekdawi-Sever y col.²⁴, $0,151 * 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ para un sistema al 74% p/p a 303 K, y para el caso de las cajas de máxima concentración, el coeficiente de trehalosa es del mismo orden de magnitud que el

publicado para una mezcla con 0,02 g H₂O/g materia sólida. Con respecto al agua, los MSD calculados también están en línea con datos publicados para sistemas concentrados de trehalosa-agua y trehalosa-lisozima-agua²⁷, validando así, el protocolo de simulación utilizado en este trabajo.

En la tabla 4.3, puede verse que el coeficiente de difusión del agua, D_A , también disminuye considerablemente al aumentar la concentración de las mezclas. Además, al cambiar la concentración del 50% al 80% p/p, se encuentra que tanto D_D como D_A varían en la misma proporción, aunque el valor depende del tipo de disacárido. En las cajas con trehalosa tanto D_D como D_A disminuyen 13 veces su valor, mientras que en las mezclas con sacarosa y maltosa disminuyen más de 20 veces. Para la concentración al 98% p/p, sin embargo, el descenso en el valor de D_A es más acentuada que para los D_D , particularmente en la matriz de trehalosa. Estos resultados están en línea con el observado efecto retardador de los azúcares en la dinámica del agua en el que la disminución del D_A (coeficiente de difusión calculado del agua pura a 298 K $\approx 300 * 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$)^{20,27} es atribuido a la red de EHs que se establecen entre las moléculas de agua y las de disacárido^{20,28}

Vale la pena también notar que para todas las concentraciones estudiadas, el agua difunde más rápidamente en presencia de trehalosa que en la de maltosa o sacarosa y esta diferencia es mayor entre las mezclas al 80% p/p.

Con respecto a la movilidad de los reactantes de Maillard (glucosa y lisina), los datos de la tabla 4.4, así como la figura 4.8 muestran que los coeficientes de difusión son del mismo orden de magnitud que el de los disacáridos y que disminuyen en la misma proporción al aumentar la concentración de la mezcla. Para una concentración al 50% p/p, estos reactivos presentan una difusión traslacional bastante mayor en las matrices con sacarosa que en la de maltosa y trehalosa. Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta la heterogeneidad que presenta la mezcla de sacarosa (ver figura 4.1) y considerando que tanto la glucosa como la lisina tendrán amplia posibilidad de desplazarse más rápidamente en los grandes “bolsones” de agua que se forman en esta matriz. Considerando un promedio entre D_G y D_L , a esta concentración, la movilidad en los sistemas con trehalosa sería intermedia a la de los otros dos disacáridos. Sin embargo, en las mezclas más concentradas, los coeficientes de difusión de estos reactantes son más altos cuando se encuentran sumergidos en las matrices de trehalosa.

Podemos suponer que esta mayor movilidad está relacionada con el D_A más elevado del agua en la matriz de trehalosa, y también con los tiempos de vida media y ocupación de sus EHs.

Tabla 3.4: coeficientes de difusión de los reactantes de Maillard; glucosa, D_G , y lisina, D_L . Las unidades de D están expresadas como $10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. Entre paréntesis se indica el valor de R^2 .

Disacárido	$\theta_D = 50 \%$		$\theta_D = 80 \%$		$\theta_D = 98 \%$	
	D_G	D_L	D_G	D_L	D_G	D_L
T	1,943 (0,938)	5,464 (0,957)	0,182 (0,956)	0,200 (0,804)	0,019 (0,600)	0,049 (0,708)
M	2,483 (0,949)	2,783 (0,985)	0,097 (0,859)	0,137 (0,893)	0,019 (0,867)	0,032 (0,841)
S	5,543 (0,979)	5,723 (0,996)	0,078 (0,932)	0,154 (0,938)	0,011 (0,728)	0,022 (0,825)

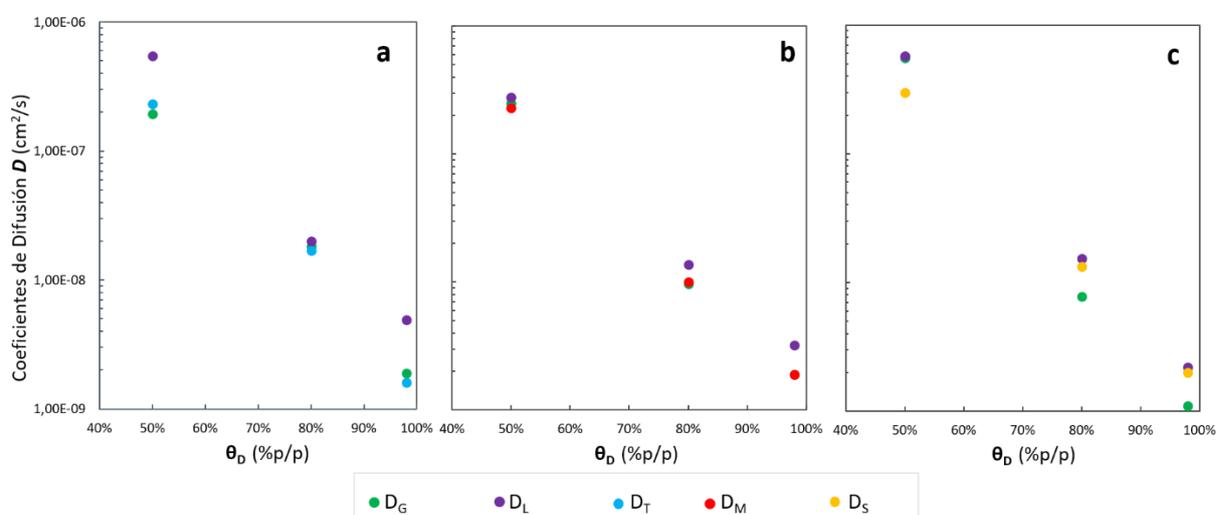


Figura 4.8: Coeficientes de Difusión D en función de θ_D : **a)** sistemas con trehalosa, **b)** sistemas con maltosa, **c)** sistemas con sacarosa

4.3.5 Interacciones de enlaces de hidrógeno

Como se ha visto a lo largo de este trabajo de tesis, el seguimiento y la comprensión de las interacciones del tipo enlace de hidrógeno (EH) que ocurren entre los diferentes componentes de las mezclas es fundamental para dilucidar el mecanismo de bioprotección de los azúcares. En este apartado se exponen los resultados del seguimiento de los EHs inter- e intramoleculares, del tipo O-H...O y C-H...O, los cuales fueron evaluados usando los mismos criterios geométricos que se utilizaron en el capítulo III, esto es: dos moléculas se consideran unidas por un EH si su posición relativa es tal que la distancia Oxígeno dador-Oxígeno aceptor, dO-O, es menor que 3,5 Å y el ángulo O-H...O es mayor que 120°²⁹. A fin de lograr una mejor comprensión de la red de enlaces en cada una de las matrices estudiadas, se determinó el número promedio de EHs intermoleculares $\langle E \rangle$ por molécula de disacárido (o reactante según el caso), para los distintos pares enlazados tales como, disacárido-agua (D-A), disacárido-disacárido (D-D), reactantes-agua (R-A), etc.

Por otra parte, a los efectos de determinar la fortaleza y duración de los enlaces, también fueron evaluados la ocupación (η) y tiempo de vida media (τ_{EH}). Recordemos que la ocupación, η , se define como el porcentaje del tiempo considerado en el que un determinado puente está presente, independientemente de las veces en que dicho enlace se rompa y se vuelva a formar y el tiempo de vida media, τ_{EH} , es el tiempo promedio durante el cual un determinado enlace está presente. Con el fin de remover los efectos estadísticos de aquellos puentes que se forman y rompen muy rápidamente, los resultados fueron obtenidos luego de aplicar cutoffs (valor límite) a la ocupación. Explícitamente, sólo se consideraron la η y τ_{EH} de aquellos EHs presentes más del 3% del tiempo de corrida analizado.

La tabla 4.3 reporta el número promedio de enlaces disacárido-agua por unidad de molécula de disacárido $\langle EH_{D-A} \rangle$ (dado por EH_{D-A}/N_D , esto es, la cantidad de enlaces de hidrógeno EH_{D-A} y EH_{A-D} dividido por el total de moléculas de disacárido). Algunos autores denominan a este parámetro “número de hidratación”^{18,27}, sin embargo, en este trabajo serán nombrados como EHs, ya que en la literatura también se hace referencia al número de hidratación como el total de moléculas de agua en la primera esfera de solvatación. En la tabla 4.5, también se reportan los enlaces disacárido-disacárido por unidad de molécula de azúcar $\langle EH_{D-D} \rangle$ (dado por $EH_{D-D} * 2/N_D$) es decir, la cantidad

de interacciones puente de hidrógeno D-D, multiplicado por dos, y dividido por el total de moléculas de disacárido, dado que por cada enlace establecido debe considerarse uno para cada azúcar.

Tabla 4.5: Número promedio de enlaces establecidos disacárido-agua $\langle EH_{D-A} \rangle$ y disacárido-disacárido $\langle EH_{D-D} \rangle$, por molécula de disacárido.

	$\langle EH_{D-A} \rangle$			$\langle EH_{D-D} \rangle$		
	O-H...O	C-H...O	Total	O-H...O	C-H...O	Total
$\theta_D = 50\%$						
T	7,8	1,4	9,2	5,3	3,0	8,3
M	10,1	1,7	11,8	4,9	2,4	7,3
S	7,8	1,4	9,2	4,4	2,4	6,8
$\theta_D = 80\%$						
T	6,6	1,2	7,8	6,4	3,4	9,8
M	7,1	1,3	8,4	5,9	2,9	8,8
S	7,1	1,4	8,5	4,8	2,9	7,7
${}^a\theta_D = 98\%$						
T	1,3 (20,02%)	1,15 (4,7%)	2,5	10	5,2	15,2
M	1,3 (25,5%)	1,0 (3,24%)	2,3	9,3	5,0	14,3
S	1,3 (22,34%)	1,2 (4,4%)	2,5	8,6	4,5	13,1

^a Los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje de moléculas de disacárido que presentaron algún enlace con el agua. Los EH_{D-A} para $\theta_D = 98\%$ fueron calculados dividiéndolos por el número de moléculas de disacáridos con EHs y no sobre el total de éstas moléculas en la caja de simulación.

La tabla 4.5 y la figura 4.9 muestran que al aumentar la concentración de las mezclas, disminuye la cantidad de enlaces con el agua y al mismo tiempo aumenta la de enlaces entre moléculas de disacáridos.

En los sistemas al 50%, la maltosa establece un promedio de casi 3 enlaces más con el agua que la sacarosa y trehalosa. Esta diferencia se debe fundamentalmente a EHS del tipo O-H...O. Además, este resultado es consistente con la distribución homogénea de las moléculas de maltosa en la caja de simulación (ver fig. 4.1) y con su estructura conformacional más abierta que permite un mayor acercamiento de las moléculas de agua a los grupos hidroxilos del azúcar.

La trehalosa presenta en todos los casos, similar o una cantidad ligeramente menor de EHS_{D-A} que la sacarosa o la maltosa. Estos resultados reportados para la trehalosa están en razonable acuerdo con los obtenidos por otros autores, por ejemplo, Weng y col.²⁷ obtuvieron un número de EH_{T-A} de 7,2 en una mezcla binaria T-A, de concentración $\theta_T = 79,6\%$ y una temperatura de 310 K. Similarmente, Lerbret y col.²⁸ reportaron un número de 6,2 para una mezcla T-A de $\theta_T = 87\%$ p/p a 300 K. En las mezclas más concentradas (98% p/p), el número de EHS_{D-A}, es prácticamente el mismo para los tres disacáridos, aunque el porcentaje de moléculas que forman enlaces con el agua es ligeramente menor para trehalosa.

Analizando particularmente los EHS_{D-A} del tipo C-H...O, se observa que ningún disacárido supera los 2 enlaces en ninguna de las concentraciones simuladas, por lo que su influencia, si bien contribuye a aumentar la complejidad de la red de enlaces, no resulta significativa en cantidad.

También es interesante analizar los EH_{T-A} discriminadamente por grupo hidroxilo, ver figura 4.10. Cuando la presencia de agua es mínima, existe una clara preferencia por la formación de EHs con los O2 y O6', indicando que en estas condiciones las moléculas de agua tienden a adoptar las mismas posiciones que en los cristales de dihidrato de la trehalosa, esto es, ante la escasez de agua, la molécula tiende a adoptar la estructura cristalina, como fue observado también al analizar la dinámica conformacional de este disacárido.

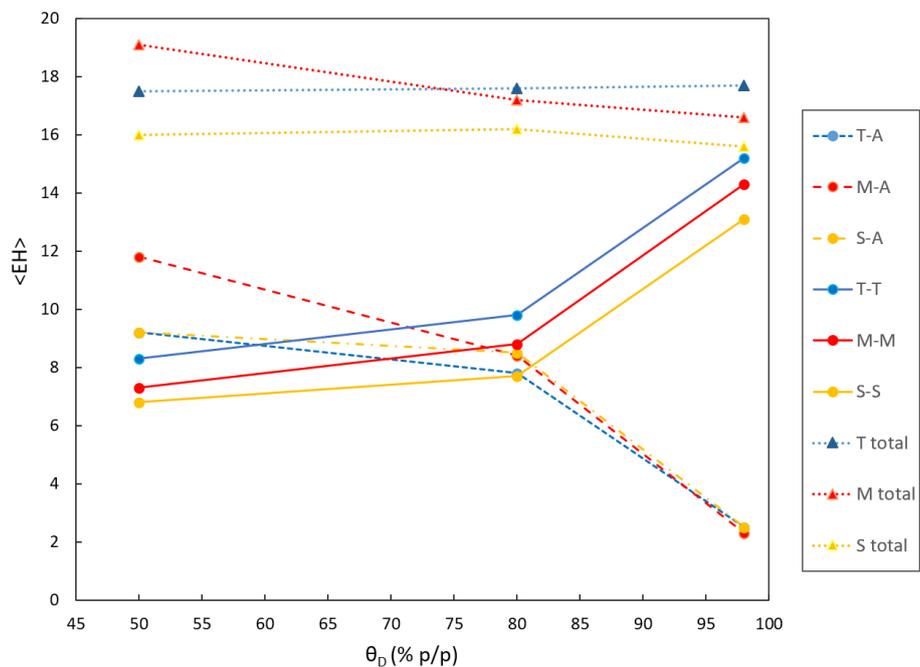


Figura 4.9: Número promedio de Enlaces de hidrógeno $\langle EH \rangle$ por unidad de disacárido, establecidos entre disacárido-agua (D-A), disacárido-disacárido (D-D) y total de enlaces (E_{tot}), en función de θ_D

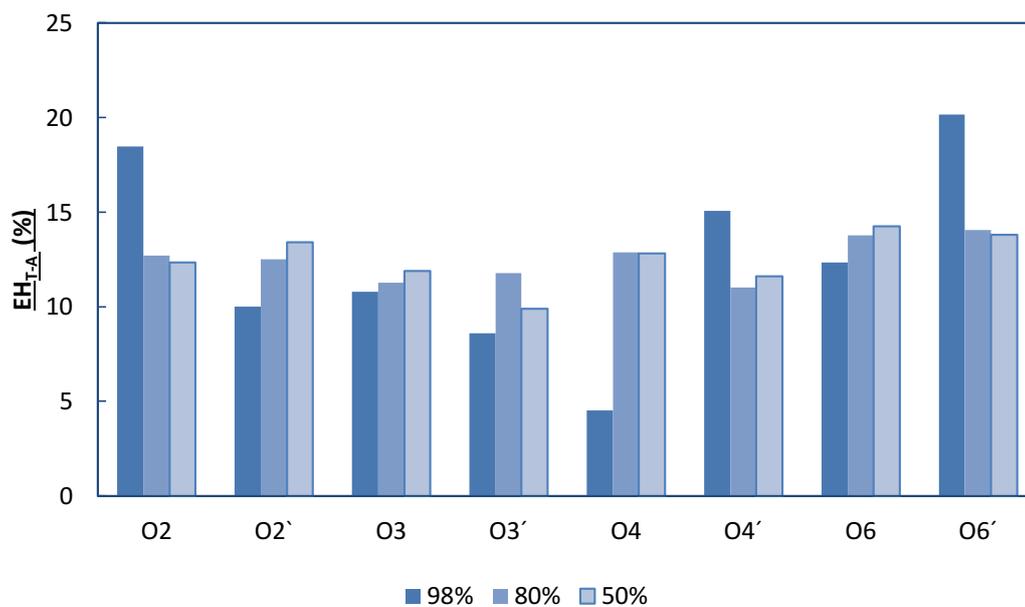


Figura 4.10: Porcentaje de participación de cada átomo de oxígeno en los enlaces E_{T-A}

Cuando se examinan los $\text{EH}_{\text{D-D}}$, se observa que para todas las concentraciones el número de EHs que se establecen entre moléculas de trehalosa es superior al que ocurre con moléculas de maltosa y sacarosa. Si bien, estos resultados están en buen acuerdo con los obtenidos por Lerbret y col.²⁸, son aproximadamente la mitad de los valores reportados por Weng y col.¹⁶, de $\text{EH}_{\text{T-T}}$ en mezclas binarias concentradas de trehalosa-agua. En nuestra opinión, la diferencia se debe a que el cálculo realizado por estos últimos autores no contempla el hecho de que al establecerse un enlace entre un par de moléculas de azúcar, el mismo debe ser contado para ambas moléculas, de donde surge el factor de 2 en la fórmula utilizada acá para el cálculo de los $\text{EH}_{\text{D-D}}$.

Con respecto a la sacarosa, se observa que es la que menos EHs forma con moléculas de su mismo tipo, $\text{EH}_{\text{S-S}}$. Este resultado es razonable si se tiene en cuenta que las moléculas de sacarosa se encuentran preferentemente aisladas o formando pequeños agregados inconexos, como puede apreciarse en la Figura 4.1 en la que se observa la heterogeneidad de la matriz vítrea de sacarosa que es atravesada por verdaderos “canales” de agua, mientras que las matrices de trehalosa o maltosa presentan “bolsillos” de agua de mayor o menor tamaño.

La figura 4.9 muestra también los EH_{Tot} , esto es $\text{EH}_{\text{D-A}}$ más $\text{EH}_{\text{D-D}}$, que forman trehalosa, maltosa y sacarosa en función de la concentración de disacárido. A diferencia de lo que ocurre con maltosa y sacarosa, la cantidad de EH_{T} que forma la trehalosa se mantiene prácticamente invariable al aumentar la concentración, mientras que en maltosa y sacarosa hay una ligera disminución, lo cual es razonable si se tiene en cuenta la manera en que se agrupan las moléculas de trehalosa hasta que se produce la percolación del azúcar. Además puede verse claramente que al disminuir el contenido de agua, la trehalosa reemplaza los $\text{EH}_{\text{T-A}}$ por $\text{EH}_{\text{T-T}}$, aumentando el número de conexiones en la matriz de azúcar. Por otra parte, dado que los tres disacáridos presentan la misma cantidad de grupos oxhidrilos disponibles para formar EHs, la diferencia en la cantidad de EH_{T} entre los azúcares, así como su variación con el contenido de agua de la mezcla, puede estar relacionado con diferencias en el número de EHs intramoleculares. Este aspecto será examinado posteriormente.

En las Figuras 4.11 y 4.12 se muestran las gráficas de la distribución de frecuencias de los tiempos de vida promedios, τ_{EH} , y de ocupación, η , de los $\text{EH}_{\text{D-A}}$ y $\text{EH}_{\text{D-D}}$. Dado que estos datos no se ajustan a una distribución normal, no resulta

conveniente describir estas variables mediante el uso de la Media aritmética y del desvío estándar ya que se podrían realizar inferencias falsas. Es más razonable utilizar la Mediana y el Rango intercuartílico, medidas que están más próximas a la descripción propiamente dicha de las variables y no tienen connotaciones inferenciales como sí lo tienen la Media y la Desviación estándar. En las tablas 4.5 y 4.6 se informan la mediana (percentil 50), primer (percentil 25) y tercer cuartil (percentil 75) para η y τ_{EH} para ambos tipos de EHs analizados.

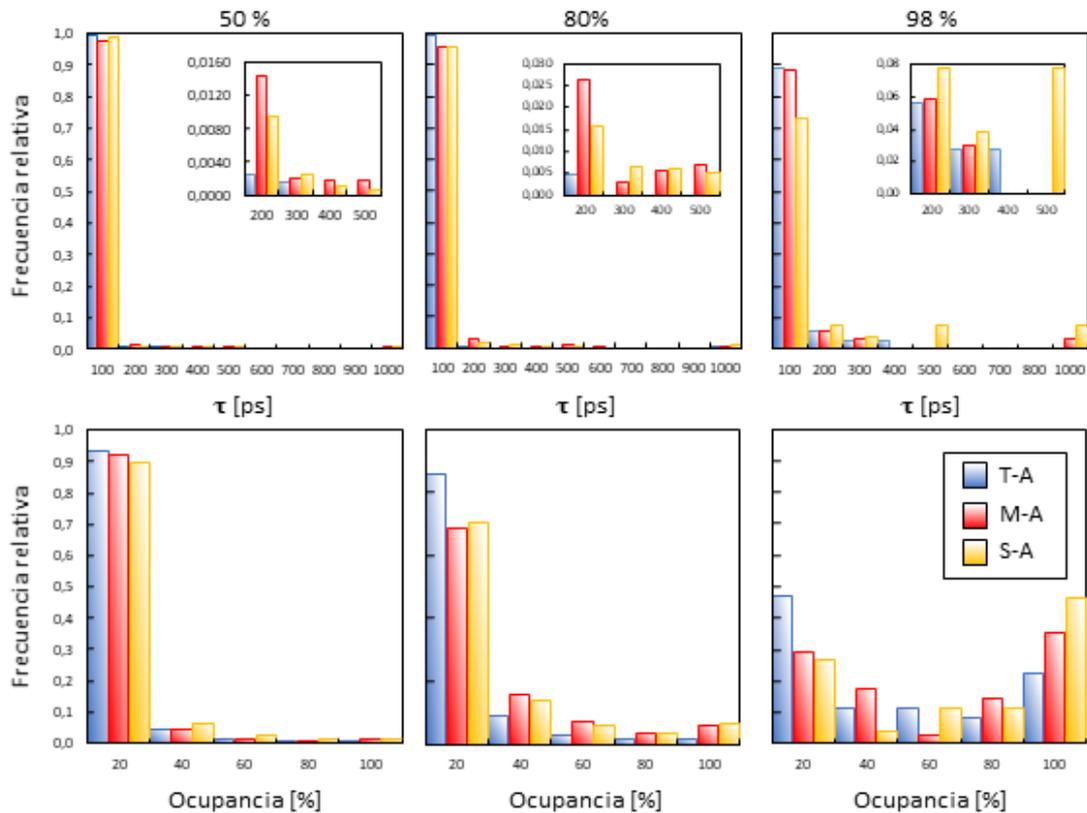


Figura 4.11: Distribución de frecuencias de los tiempos de vida media τ_{EH} y ocupancia (η) de los EH_{D-A} del tipo $O-H\cdots O$.

En los tres azúcares, y para todas las concentraciones, predominan aquellos enlaces EH_{D-A} con tiempos de vida media inferiores a los 100 ps y con frecuencias superiores al 70 %. Más precisamente, la mayor proporción de ellos está en el rango de tiempos de vida inferiores a 20 ps (datos no mostrados en la gráfica). La misma tendencia se observa en los datos de ocupancia, ya que las mayores frecuencias corresponden a los puentes con más bajo η , inferiores al 20% del tiempo de análisis. Una excepción son los sistemas de $\theta_D = 98\%$, en el que se observan valores similares de frecuencias entre los EH_{D-A} con ocupancias bajas y aquellos con ocupancias superiores al 80%.

Los histogramas reflejan además la influencia de la concentración de los sistemas sobre las características dinámicas de los $\text{EH}_{\text{D-A}}$. Al aumentar la concentración de disacárido se produce una ligera disminución en las frecuencias de aquellos puentes de bajos τ_{HB} y η para favorecer los de valores más elevados. Esto resulta evidente también al observar en la tabla 4.5 que los valores del tercer cuartil correspondientes a los τ_{HB} se incrementan considerablemente con la concentración del disacárido (esto es, existe un 25% de los $\text{EH}_{\text{D-A}}$ con tiempos de vida superiores a ese valor). Lo mismo ocurre con las ocupancias. Estos resultados también son acordes a datos publicados respecto a tiempos de correlación de estos enlaces, en los que se ha observado un aumento de los tiempos de vida al disminuir el contenido de agua del sistema. Vale la pena notar que la trehalosa, es el azúcar que muestra las frecuencias más altas de aquellos puentes de escaso tiempo de duración pero las frecuencias más bajas en los enlaces de tiempos de vida largos. Las gráficas muestran que es notablemente baja, prácticamente nula, la ocurrencia de $\text{EH}_{\text{T-A}}$ con tiempos de vida superiores a 300 ps. También es el disacárido con más bajas frecuencias en los EHs con ocupancias superiores al 80%. Estas características de la trehalosa se ven reflejada también en la tabla 4.5, donde se puede observar que los valores de cuartiles y promedios correspondientes a τ_{HB} y η para los $\text{EH}_{\text{T-A}}$ son considerablemente menores que los de maltosa y sacarosa. Tiempos de vida media y ocupancias altas dan indicios de una red de enlaces de hidrógeno más estable. Tiempos de vida media cortos y bajas ocupancias son indicadores de una mayor cantidad de ruptura y formación de los EHs junto con una remoción de las moléculas de agua. Podemos por lo tanto inferir que los EHs establecidos por la trehalosa con el agua son más lábiles que los establecidos por los otros dos disacáridos. Esto puede atribuirse a que la mayor rigidez estructural de la trehalosa impide en gran medida la variación de los parámetros geométricos como distancias y ángulos necesaria para mantener intactos los EHs.

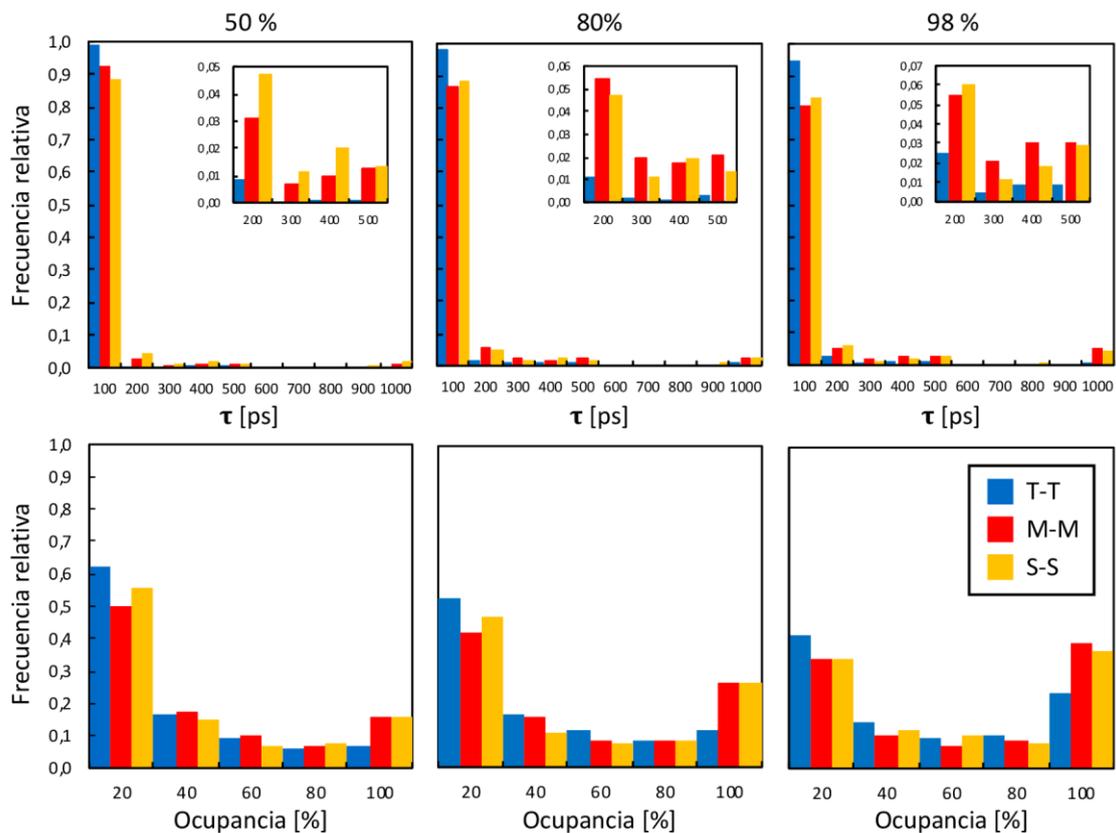


Figura 4.12: Distribución de frecuencias de los tiempos de vida media (τ_{EH}) y ocupancia (η) de los EH_{D-D} del tipo $O-H\cdots O$.

Respecto a los enlaces EH_{D-D} , los histogramas de la figura 4.10 presentan las mismas características dinámicas que los EH_{D-A} , con mayores frecuencias en aquellos enlaces con bajos τ_{HB} . Los histogramas de ocupación, η_{DD} tienen las mismas características generales mencionadas para τ_{HB} , excepto en las matrices más concentradas, donde la distribución de frecuencias entre EHs con ocupaciones bajas y altas es más simétrica. Al aumentar la concentración ocurre una redistribución de las frecuencias, esto es, hay un desplazamiento de las poblaciones hacia los EHs de más duración en tiempo de vida y ocupación. Al disminuir el contenido de agua, se eleva el número de EHs entre las propias moléculas de azúcar, la red de enlaces se hace más entramada disminuyendo la movilidad de todo el sistema y la posibilidad de intercambio entra las moléculas enlazadas. También en este tipo de enlace la trehalosa muestra diferencias con respecto a la maltosa y sacarosa. Exhibe mayor frecuencia que los otros disacáridos de los puentes de vida media inferiores a 100 ps, y por el contrario, baja existencia de EHs con tiempo altos. Esto se

refleja además en valores de cuartiles y promedios de τ_{HB} , que son menores para la trehalosa que para los otros azúcares, a una dada concentración.

La tabla 4.6 muestra el análisis estadístico de la dinámica de los puentes del tipo C-H \cdots O. Considerando una misma concentración, no se observan diferencias apreciables en los τ_{HB} y η entre los tres disacáridos. La diferencia más notoria se da a una concentración del 98%, donde el porcentaje de ocupancia de los enlaces trehalosa-agua es considerablemente mayor a los de maltosa y sacarosa con agua. Esto puede deberse a que la trehalosa en su estado puro cristalino, tiene mayor afinidad por el agua, como se refleja en el hecho de que cristaliza en forma de un dihidrato

Tabla 4.4. Mediana de los tiempos de vida media (τ_{EH}) y ocupancia (η) de los EH del tipo O-H...O formados por trehalosa (T), maltosa (M), sacarosa (S) con agua (A). Entre paréntesis se indican el primer y tercer cuartil.

Disacárido	<EH _{D-A} >		<EH _{D-D} >	
	τ_{HB} (ps)	η (%)	τ_{HB} (ps)	η (%)
$\theta_D = 50\%$				
T	6,2 (3,9 - 10,7)	5 (3,8 - 8,3)	3,4 (2 - 7,1)	13,3 (6 - 34,2)
promedio	10,0	8,5	8,7	24,7
M	10,8 (6,2 - 20)	5,3 (3,9 - 8,5)	5,7 (2,3 - 18,1)	20 (7,1 - 53,1)
promedio	20,1	9,3	32,5	33,6
S	10 (5,5 - 19,9)	5,8 (4 - 10,9)	5,0 (2,2 - 16,2)	16,5 (6,2 - 59,9)
promedio	18,1	10,6	31,5	32,3
$\theta_D = 80\%$				
T	4,9 (3,1 - 8,6)	6,8 (4,5 - 13)	3,1 (1,7 - 8,3)	17,8 (7 - 48,4)
promedio	8,9	12,3	15,5	31,4
M	7,6 (3,8 - 18,1)	11,1 (5,5 - 25,4)	4,3 (1,6 - 24,5)	29,2 (8,8 - 83,0)
promedio	25,5	21,1	61,5	43,4
S	6,5 (3 - 14,4)	10,2 (5,5 - 24,0)	4,5 (1,7 - 19,1)	25,9 (7,5 - 81,9)
promedio	25,6	20,9	56,6	41,7
$\theta_D = 98\%$				
T	3,6 (1,5 - 16,2)	30,4 (7,9 - 65,6)	2,8 (1,4 - 10,3)	30,1 (8,9 - 78,4)
promedio	31,6	38,9	23,9	42,3
M	5,0 (3,1 - 21,7)	55,6 (15,4 - 94,8)	4,2 (1,4 - 42,4)	54,7 (11,1 - 96,6)
promedio	60,3	53,1	99,8	53,4
S	7,2 (3,2 - 156,3)	75,4 (15,5 - 99,4)	4,5 (1,5 - 41,0)	47,7 (12,4 - 95,2)
promedio	145,3	61,3	89,9	51,9

Tabla 4.5. Mediana de los tiempos de vida media (τ_{EH}) y ocupancia (η) de los EH del tipo C-H...O formados por trehalosa (T), maltosa (M), sacarosa (S) y agua (A). Entre paréntesis se indican el primer y tercer cuartil.

Disacárido	<EH _{D-A} >		<EH _{D-D} >	
	τ_{HB} (ps)	η (%)	τ_{HB} (ps)	η (%)
$\theta_D = 50\%$				
T	1,4 (1,2 - 1,6)	5,1 (3,9 - 8,2)	1,4 (1,2 - 1,6)	10,2 (5,3 - 21,1)
promedio	1,5	7,4	1,5	15,7
M	1,4 (1,2 - 1,6)	5,2 (3,8 - 8,4)	1,4 (1,2 - 1,7)	10,5 (5,6 - 21,7)
promedio	1,5	8,0	1,6	16,1
S	1,4 (1,2 - 1,5)	5,3 (3,9 - 8,4)	1,4 (1,2 - 1,6)	8,9 (5,1 - 18,7)
promedio	1,4	7,6	1,5	14,5
$\theta_D = 80\%$				
T	1,3 (1,2 - 1,6)	5,4 (3,9 - 8,8)	1,3 (1,2 - 1,6)	12,6 (6,6 - 24,6)
promedio	1,4	8,0	1,5	18,0
M	1,3 (1,2 - 1,5)	6,4 (4,4 - 12,0)	1,3 (1,2 - 1,6)	13,4 (6,8 - 28,4)
promedio	1,4	10,3	1,6	20,4
S	1,3 (1,2 - 1,5)	6,4 (4,2 - 11,5)	1,3 (1,2 - 1,6)	13,0 (6,2 - 27,5)
promedio	1,4	10,3	1,5	19,3
$\theta_D = 98\%$				
T	1,3 (1,1 - 1,4)	13,8 (7,8 - 26,6)	1,3 (1,1 - 1,8)	16,3 (6,8 - 36,1)
promedio	1,4	20,9	1,7	24,0
M	1,1 (1,1 - 1,3)	7,4 (5,1 - 18,4)	1,3 (1,1 - 1,8)	18,4 (7,8 - 41,0)
promedio	1,3	12,4	1,7	27,1
S	1,1 (1,1 - 1,5)	8 (5,5 - 27,5)	1,3 (1,1 - 1,6)	15,0 (6,2 - 31,9)
promedio	1,4	16,9	1,7	22,7

Análisis de Puentes intramoleculares:

Para este análisis se realizó el seguimiento de los EHs intra que fueron encontrados en fase gaseosa y en las soluciones acuosas infinitamente diluidas de disacáridos. En el caso de la trehalosa, se analizó la ocurrencia de los puentes intra $O2-H\cdots O6'$, $C5-H\cdots O6'$, $O2'-H\cdots O6$ y $C5'-H\cdots O6$. Se encontró que en el sistema menos concentrado el primero de ellos aparece en menos del 1% de las moléculas de la caja y llegando apenas al 5% a la mayor concentración. Estos resultados están en línea con los obtenidos para soluciones infinitamente diluidas aunque contradice lo expuesto por Conrad y Col., quienes reportaron que este EH se forma recién a una concentración superior al 50% de disacárido, imposibilitando que estos oxígenos puedan formar EHs intermoleculares. Sin embargo, como puede verse en la Figura 4.10, en la mezcla al 98% p/p de trehalosa, los oxígenos más involucrados en la formación de enlaces con el agua (EHs inter) son el O2 y el O6.

En el capítulo 3 se destacó particularmente la existencia del EH $C5-H\cdots O6'$ que no había sido encontrado en trabajos previos, pero que podría ser importante para fijar la estructura de la trehalosa en condiciones de escasez de agua. En este estudio de DM se encontró que a una concentración del 50%, aproximadamente el 9% de ellas forma este enlace $C5-H\cdots O6'$ con una ocupación media de 3,5 %. Para las mezclas al 80% y 98% p/p, la cantidad de moléculas que presentaban este último enlace aumentó a 11% y 27% respectivamente, como así también la ocupancia, reforzando así la hipótesis previa.

Con respecto a la maltosa, el análisis reveló que a una concentración del 50% p/p las moléculas forman los EHs intramoleculares hallados en solución diluida, $C1-H\cdots O3'$ y $C5-H\cdots O6'$, en un 91% y 68% respectivamente, aunque estos porcentajes disminuyen marcadamente al aumentar la concentración. Por ejemplo, el EH $C5-H\cdots O6'$ se encontró en solo el 9% del total de las moléculas de maltosa del sistema al 98% p/p. Por el contrario, la cantidad de moléculas que presentaron el EH intra $O2-H\cdots O3'$ hallado en el cristal, pero no en solución diluida, aumenta con la concentración del sistema. La misma tendencia se observa en los valores de η indicando que este enlace se forma preferentemente ante la escasez de agua.

Para la sacarosa, al igual que lo informado en el análisis QTAIM de soluciones diluidas se halló una cantidad de enlaces intramoleculares bastante superior al que ocurre en los otros dos disacáridos, lo que explica la menor cantidad de puentes intermoleculares

totales formados por este azúcar. Además, esto contradice otros estudios que plantean la desaparición de los EHs intra del cristal al estar en solución. En la mezcla al 50% p/p, el 63 % de las moléculas forman el enlace $O2g-H\cdots O1f$, también hallado en la solución muy diluída, este porcentaje desciende hasta 2,5 veces en la mezcla más concentrada. Sin embargo, a todas las concentraciones, es mayor el porcentaje de moléculas que forman este enlace con el $O1f$ como dador de protones (forma hallada en el cristal), esto es $O1f-H\cdots O2g$. Estos porcentajes indican que, en una misma molécula, ambos puentes pueden coexistir, (EH bifurcado) y que la forma hallada preponderante depende de la concentración del sistema. El EH, que tiene al $O2g$ como dador de protones, ocurre en el 63% de las moléculas, mientras aquellos en los que el $O2g$ actúa como aceptor de protones se observa en el 80% de las moléculas, indicando que se produce la alternancia entre uno y otro. Los demás EHs encontrados son del tipo $C-H\cdots O$, tales como $C4f-H\cdots O5g$ y $C6f-H\cdots O5g$, sin embargo, la proporción de moléculas que lo forman es relativamente baja. Al aumentar la concentración al 80% p/p, se encontró que los puentes $O3f-H\cdots O1g$, $O1f-H\cdots O2g$ y sus formas dador/aceptor intercambiadas, están presentes en una menor cantidad de moléculas, no obstante, el porcentaje de ocupación de dicho enlace se incrementa hasta un valor de alrededor del 50% para todos los EHs mencionados. Respecto al último EH intra mencionado, sólo el 33% de las moléculas que lo presentan han formado también el puente inverso durante el tiempo de análisis. Por otra parte, se ha encontrado un incremento en la cantidad de moléculas que forman el EH $O5g\cdots H-O6f$, con una ocupación promedio de 69%. Estos resultados indican que para la concentración al 80% p/p, las moléculas de sacarosa tienen más oxhidrilos disponibles para formar enlaces con el agua o con otra molécula de la caja y también dan cuenta del mayor número de EH_{D-A} de la sacarosa con respecto a la trehalosa, por otra parte el hecho de que forme menos EH_{S-S} a pesar de la mayor disponibilidad de OH, indica la preferencia a unirse al agua antes que a otra molécula de sacarosa. Con respecto a los EH del tipo $C-H\cdots O$, se ha encontrado que la cantidad de moléculas que forman el EH, $O5g\cdots HC6f$ se incrementa ligeramente.

Estos resultados nos permiten concluir que la menor cantidad de EHs intermoleculares, S-A y S-S que presenta la sacarosa se debe a que al formar un mayor número de EHs intramoleculares quedan disponibles menos OH para formar EHs intermoleculares.

Dinámica de los reactantes de Maillard

El análisis de las interacciones establecidas por la glucosa y lisina entre sí, es un factor importante a tener en cuenta. Como se mencionara anteriormente, los grupos reductores de los azúcares, tales como la glucosa, pueden reaccionar con el grupo amino de proteínas para formar glucosil aminos N-sustituídas, lo que constituye el primer paso de la serie de reacciones de Maillard. Dado que la metodología de dinámica molecular usada no permite determinar la existencia de una reacción química, se realizó el seguimiento de los EHs establecidos entre las moléculas de glucosa y lisina. El hecho de que existan estas interacciones, aumentaría la probabilidad de que se produzca una reacción entre ambas sustancias. Para el análisis de las interacciones entre reactantes de Maillard fueron considerados los EHs O-H...O y N-H...O. La tabla 4.7 reporta el número promedio de enlaces Glucosa-Lisina por unidad de molécula de reactante $\langle EH_{G-L} \rangle$ (dado por $2 * EH_{G-L} / N_R$, esto es, la cantidad de enlaces de hidrógeno EH_{G-L} y EH_{L-G} , multiplicado por dos y dividido por el total de moléculas de glucosa y lisina, los reactantes de Maillard). También se informa el número promedio de enlaces Reactantes-Disacárido por unidad de Reactante $\langle EH_{G/L-D} \rangle$ (calculado según $EH_{G/L-D} / N_R$). Las tablas 4.8 y 4.9 muestran las estadísticas correspondientes a los tiempos de vida y porcentaje de ocupación de estos enlaces. Dada la poca cantidad de moléculas de reactantes contenidas en cada caja de simulación, y a efectos de hacer más significativo el cálculo estadístico, el tiempo de evaluación considerado fue de 2 ns. Además, debido a que se duplicó el tiempo de análisis respecto al usado con los disacáridos, se utilizó un cutoff de 1,5 para la ocupación.

Los datos de la tabla 4.7 muestran que para una concentración al 50% p/p de disacáridos, prácticamente no se forman EHs entre glucosa y lisina. Mientras que para una concentración al 80% p/p de trehalosa se observa la ocurrencia de un único EH por molécula de reactante. Más interesante resulta, observar lo que ocurre en las matrices de los dos disacáridos habitualmente usados en la preservación de biomateriales, trehalosa y sacarosa, se encontró que, en las mezclas al 98% p/p de disacárido, esto es, con un contenido de agua al 0,5% p/p -valor habitual en productos desecados o liofilizados- sólo en la matriz de sacarosa se encontraron EHs entre los reactantes. De acuerdo a la hipótesis planteada previamente, la ausencia de EH_{G-L} en la matriz de trehalosa indicaría que la

posibilidad de que ocurran las indeseadas reacciones de pardeamiento no enzimático se ven reducidas, mostrando la mejor capacidad bioprotectora de la trehalosa.

Con respecto a los EHs entre disacáridos y reactantes, se ha encontrado que para una concentración al 50% p/p la trehalosa y maltosa forman casi el mismo número de enlaces y apenas uno más que la sacarosa. El tiempo de vida y porcentaje de ocupación (ver tabla 4.8) es también mucho menor para la sacarosa. Para las mezclas al 80% p/p, la trehalosa y maltosa forman casi el mismo número de enlaces y uno menos que la sacarosa, mientras que el tiempo de vida y porcentaje de ocupación es mucho menor en el caso de la trehalosa, indicando que a esta concentración la trehalosa forma enlaces menos duraderos. Finalmente, podemos ver que la mayor diferencia en el número de enlaces se encuentra para una concentración al 98% p/p, en la que se forman 4, 7 y 5 EHs con trehalosa, maltosa y sacarosa, respectivamente. Los tiempos de vida media y los porcentajes de ocupación de estos enlaces aumentan en el orden trehalosa < sacarosa < maltosa (ver tabla 4.8), indicando que la trehalosa, también a esta concentración, forma menor número de enlaces y menos duraderos con los reactantes glucosa y lisina.

Tabla 4.7: Número promedio de EH establecidos entre los reactantes glucosa-lisina $\langle EH_{G-L} \rangle$ y disacárido-reactantes (glucosa/lisina) $\langle EH_{G/L-D} \rangle$, por molécula de reactante.

	$\langle EH_{G-L} \rangle$	$\langle EH_{G/L-D} \rangle$
$\theta_D = 50 \%$		
T	0,2	4,0
M	0,2	3,8
S	0,3	3,4
$\theta_D = 80 \%$		
T	0,9	2,7
M	0	3,5
S	0	3,7
$\theta_D = 98 \%$		
T	–	4,5
M	–	7,3
S	0,9	5,5

Tabla 4.8. Mediana de los tiempos de vida media (τ_{EH}) y ocupancia (η) de los EH del tipo O-H...O y N-H...O formados por los reactantes glucosa (G) y lisina (L) con los correspondientes disacáridos (D). Entre paréntesis se indican el primer y tercer cuartil.

$\langle \text{EH}_{G/L-D} \rangle$		
Disacárido	τ_{HB} (ps)	η (%)
$\theta_D = 50\%$		
T	5,9 (2,6 – 14,3)	14,5 (5,6 – 48,0)
promedio	45,3	32,3
M	5,7 (2,8 – 16,1)	23,8 (5,9 – 58,0)
promedio	61,4	35,1
S	4,5 (2,3 – 10,4)	13,1 (4,6 – 54,7)
promedio	24,2	31,1
$\theta_D = 80\%$		
T	2,8 (1,7 - 6,8)	16,7 (8,1 – 51,7)
promedio	7,7	31,6
M	2,8 (1,5 – 20,4)	34,8 (7,6 – 92,9)
promedio	57,3	47,9
S	2,2 (1,5 – 33,5)	38,7 (11,0 – 93,7)
promedio	104,0	50,5
$\theta_D = 98\%$		
T	2,5 (1,5 – 8,0)	11,9 (4,7 – 33,4)
promedio	40,9	25,1
M	4,2 (1,5 – 77,4)	65,6 (23,7 – 98,6)
promedio	186,3	62,2
S	5,7 (1,5 – 79,7)	50,7 (16,8 – 96,7)
promedio	139,2	57,3

4.4 Conclusiones

En este capítulo, se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular de soluciones acuosas de diferentes concentraciones de trehalosa, sacarosa y maltosa en presencia de reactantes de Maillard, glucosa y lisina. De los resultados obtenidos podemos resumir las siguientes conclusiones.

- ✓ Mediante el seguimiento de los ángulos diedros del enlace interglucosídico, hemos podido ver que la trehalosa es la que presenta una mayor rigidez conformacional.
- ✓ Para todas las concentraciones estudiadas, el coeficiente de difusión de los disacáridos son mucho menores que el del agua.
- ✓ El agua difunde más rápido en la matriz de trehalosa para todas las concentraciones.
- ✓ La cantidad de enlaces de hidrógeno entre disacáridos es siempre menor para la sacarosa. Esto se debe a que la sacarosa es la que presenta un mayor número de enlaces de hidrogeno intramoleculares y así, tiene menos oxhidrilos disponible para formar puentes intermoleculares.
- ✓ En las mezclas más concentradas, la trehalosa evita, de manera más eficiente el contacto entre los reactantes de Maillard reduciendo la posibilidad de ocurrencia de las indeseadas reacciones de pardeamiento no enzimático.
- ✓ Finalmente podemos concluir que la rigidez estructural que exhibe la trehalosa influye fuertemente, tanto en la movilidad traslacional como en las interacciones de enlaces de hidrogeno que la misma establece. Si bien la cantidad de enlaces que esta forma con el agua no difieren significativamente con la de la sacarosa y maltosa, el notablemente menor tiempo de vida media y de porcentaje de ocupación indican que los enlaces se rompen y forman continuamente. Este continuo intercambio de moléculas de agua alrededor de la molécula de trehalosa se ve favorecido además por la mayor movilidad de agua en su matriz. Así, la rigidez que exhibe la trehalosa, al parecer impide que las moléculas de agua se reorganicen para mantener el índice de coordinación tetraédrico necesario para la formación de hielo y explicaría el mecanismo molecular que hace de la trehalosa un mejor agente bioprotector.

4.5 Referencias:

- (1) Maillard, L. C. Action Des Acides Amines Sur Les Sucres: Formation Des Melanoidines Par Voie Methodique. *comptes rendus Acad. Sci. paris* **1912**, *154*, 66–68.
- (2) Van Lancker, F.; Adams, A. N.; De Kimpe, N. Formation of Pyrazines in Maillard Model Systems of Lysine-Containing Dipeptides. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (4), 2470–2478.
- (3) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B. Gaussian 03, Revision D.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.
- (4) Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W.; Kollman, P. A. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97* (40), 10269–10280.
- (5) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926.
- (6) Martínez, L.; Andrade, R.; Birgin, E. G.; Martínez, J. M. Packmol: A Package for Building Initial Configurations for Molecular Dynamics Simulations. **2009**.
- (7) Izaguirre, J. A.; Catarello, D. P.; Wozniak, J. M.; Skeel, R. D. Langevin Stabilization of Molecular Dynamics. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114* (5), 2090.
- (8) Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. . Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23* (3), 327–341.
- (9) Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G. A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103* (19), 8577.
- (10) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81* (8), 3684.
- (11) KAWAI, K.; HAGIWARA, T.; TAKAI, R.; SUZUKI, T. Maillard Reaction Rate in Various Glassy Matrices. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68* (11), 2285–

- 2288.
- (12) Dirama, T. E.; Carri, G. A.; Sokolov, A. P. Role of Hydrogen Bonds in the Fast Dynamics of Binary Glasses of Trehalose and Glycerol: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122* (11), 114505.
 - (13) Conrad, P. B.; de Pablo, J. J. Computer Simulation of the Cryoprotectant Disaccharide α,α -Trehalose in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103* (20), 4049–4055.
 - (14) Zhang, J.; Zograf, G. Water Vapor Absorption into Amorphous Sucrose-Poly(Vinyl Pyrrolidone) and Trehalose-Poly(Vinyl Pyrrolidone) Mixtures. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90* (9), 1375–1385.
 - (15) Roberts, C. J.; Debenedetti, P. G. Structure and Dynamics in Concentrated, Amorphous Carbohydrate–Water Systems by Molecular Dynamics Simulation. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (34), 7308–7318.
 - (16) Sonoda, M. T.; Skaf, M. S. Carbohydrate Clustering in Aqueous Solutions and the Dynamics of Confined Water. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (41), 11948–11956.
 - (17) Magno, A.; Gallo, P. Understanding the Mechanisms of Bioprotection: A Comparative Study of Aqueous Solutions of Trehalose and Maltose upon Supercooling. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2* (9), 977–982.
 - (18) Lerbret, A.; Bordat, P.; Affouard, F.; Descamps, M.; Migliardo, F. How Homogeneous Are the Trehalose, Maltose, and Sucrose Water Solutions? An Insight from Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (21), 11046–11057.
 - (19) Pamies, S.; Petelski, A.; Castro, E.; Sosa, G. Static and Dynamic Study of Disaccharides Trehalose, Maltose and Sucrose. *Struct. Chem.* **2016**.
 - (20) Liu, J.; Chen, C.; Li, W. Protective Mechanisms of α,α -Trehalose Revealed by Molecular Dynamics Simulations. *Mol. Simul.* **2018**, *44* (2), 100–109.
 - (21) Kawai, K.; Hagiwara, T.; Takai, R.; Suzuki, T. The Rate of Non-Enzymatic Browning Reaction in Model Freeze–Dried Food System in the Glassy State. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2005**, *6* (3), 346–350.

- (22) Branca, C.; Magaz , S.; Maisano, G.; Migliardo, P. Anomalous Cryoprotective Effectiveness of Trehalose: Raman Scattering Evidences. *J. Chem. Phys.* **1999**, *111* (1), 281.
- (23) Wang, J.; Hou, T. Application of Molecular Dynamics Simulations in Molecular Property Prediction II: Diffusion Coefficient. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32* (16), 3505–3519.
- (24) Ekdawi-Sever, N.; de Pablo, J. J.; Feick, E.; von Meerwall, E. Diffusion of Sucrose and α,α -Trehalose in Aqueous Solutions. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107* (6), 936–943.
- (25) Nandi, P. K.; English, N. J. Role of Hydration Layer in Dynamical Transition in Proteins: Insights from Translational Self-Diffusivity. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120* (47), 12031–12039.
- (26) Tarek, M.; Tobias, D. The Dynamics of Protein Hydration Water: A Quantitative Comparison of Molecular Dynamics Simulations and Neutron-Scattering Experiments. *Biophys. J.* **2001**, *79*, 3244–3257.
- (27) Weng, L.; Elliot, G. D. Dynamic and Thermodynamic Characteristics Associated with the Glass Transition of Amorphous Trehalose-Water Mixtures. *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP* **2014**, *16* 23, 11555–11565.
- (28) Lerbret, A.; Affouard, F.; Hédoux, A.; Krenzlin, S.; Siepmann, J.; Bellissent-Funel, M.-C.; Descamps, M. How Strongly Does Trehalose Interact with Lysozyme in the Solid State? Insights from Molecular Dynamics Simulation and Inelastic Neutron Scattering. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (36), 11103–11116.
- (29) Liu, Q.; Schmidt, R. K.; Teo, B.; Karplus, P. A.; Brady, J. W. Molecular Dynamics Studies of the Hydration of α,α -Trehalose. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**,

Figuras anexas:

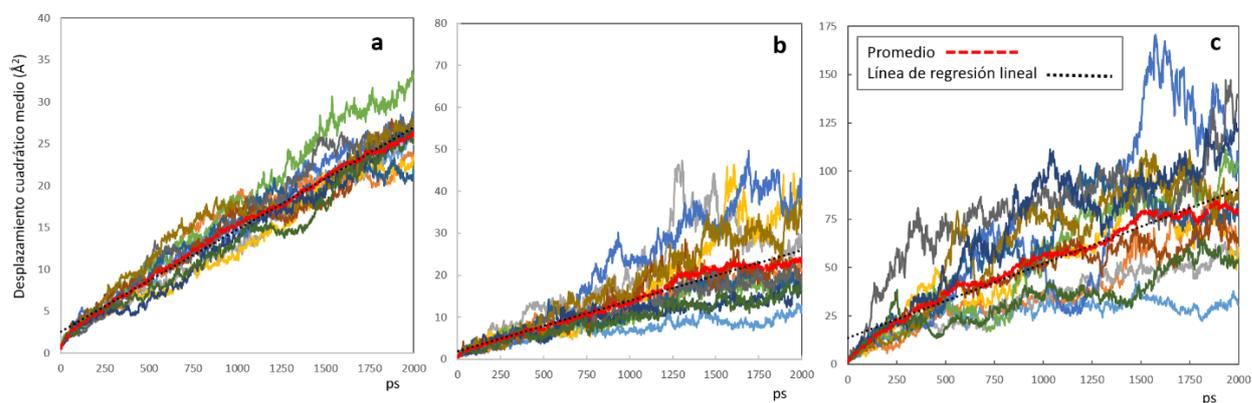


Figura 4.13: Curvas de desplazamiento cuadrático medio en sistemas con trehalosa 50% p/p: (a) trehalosa (b) glucosa y (c) lisina

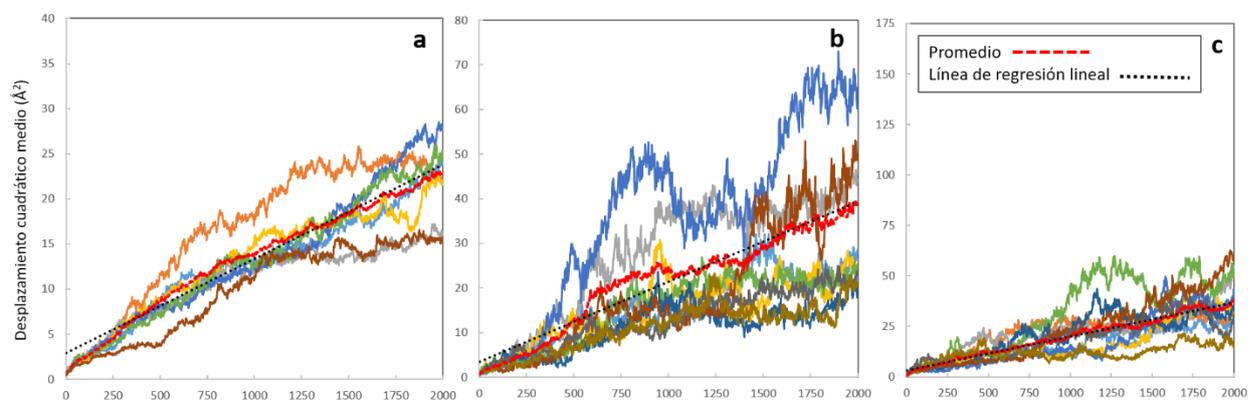


Figura 4.14: Curvas de desplazamiento cuadrático medio en sistemas con maltosa 50% p/p: (a) maltosa (b) glucosa y (c) lisina

CAPÍTULO V

“Conclusiones”

En este trabajo, los disacáridos trehalosa, sacarosa y maltosa han sido estudiados comparativamente mediante cálculos de estructura electrónica y dinámica molecular. El objetivo ha sido tratar de explicar el mecanismo de bioprotección de los azúcares y los factores que determinan la capacidad superior de la trehalosa como agente de bioprotección.

En fase gaseosa, y en soluciones acuosas diluidas se realizó un detallado análisis de las interacciones de enlaces de hidrógeno usando la Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas (QTAIM) sobre funciones de onda obtenidas al nivel B3LYP/6-311++G**. En fase gaseosa también se estudiaron las dos formas di-hidratadas más comunes de la trehalosa y la forma anhidra obtenida por remoción de las moléculas de agua. Las interacciones de transferencia de carga involucradas en los EHs y los efectos anoméricos (exo- y endo-anoméricos) fueron examinados mediante un análisis de los orbitales naturales de enlace (NBO).

El método de simulación de dinámica molecular fue aplicado en vacío, en soluciones acuosas infinitamente diluidas y en mezclas con diferentes concentraciones de disacáridos en presencia de los más simples reactantes de Maillard, glucosa y lisina.

De los resultados obtenidos se pudieron extraer las siguientes conclusiones.

- El oxígeno glicosídico no está involucrado en EHs en ninguna de las formas de la trehalosa. Este enlace además está protegido por un EH intramolecular bifuncional, el que concluimos, actúa como mediador del plegamiento de la trehalosa en condiciones de escasez de agua.
- La sacarosa es el único caso en el que el oxígeno exocíclico participa en un EH, y también es el disacárido que forma un mayor número de EHs intramoleculares dejando menos grupos oxhidrilos disponibles para formar EHs intermoleculares.
- En soluciones acuosas diluidas la trehalosa forma un mayor número de EHs con el agua, que la sacarosa y maltosa, pero estos enlaces son de muy corta duración.
- Una hidratación prácticamente nula es observada en torno al oxígeno glicosídico de la trehalosa y sacarosa, mientras que, en la maltosa, probablemente debido a que posee una estructura más abierta, presenta un valor cercano a uno. Esto favorecería la ruptura del enlace glicosídico y sumado al hecho de que la maltosa es un azúcar reductor, explica el hecho de que sea el menos eficiente como agente bioprotector.
- A partir del estudio de dinámica molecular, tanto en solución diluida como en las mezclas concentradas se ha visto que la trehalosa tiene mayor rigidez conformacional

alrededor del enlace glicosídico. Esta mayor estabilidad del ángulo formado por el enlace glicosídico, aún al disminuir el contenido de agua, sería otra de las causas del mayor efecto bioprotector de la trehalosa respecto a los demás disacáridos. Si bien no se ha simulado en esta tesis, este también sería el mecanismo de protección de las proteínas impidiendo que las mismas se desnaturalicen al ser sometidas a deshidratación. Las moléculas de trehalosa unidas mediante EHs, debido a su rigidez conformacional, actuarían como un “marco o cubierta” del entorno de estas proteínas, en línea con la conocida hipótesis de “*reemplazo de agua*”.

- La cantidad de EHs totales de trehalosa permanece constante en las mezclas de diferentes concentraciones. A medida que disminuye el contenido de agua, la trehalosa reemplaza los $\text{EH}_{\text{T-A}}$ por $\text{EH}_{\text{T-T}}$, manteniendo así no solo el número de enlaces por oxhidrilo, sino también la estructura de la matriz vítrea.

- También encontramos que la trehalosa, cualquiera sea la concentración de la mezcla forma enlaces más lábiles con el agua. Esto es, los enlaces se forman y rompen más rápidamente que en los otros azúcares. Podemos concluir que este rápido intercambio de moléculas de agua en su entorno evita que las mismas alcancen el grado de coordinación típico del hielo, es decir cuatro HBs por cada molécula de agua retardando la formación y crecimiento de estos cristales. Esto es la trehalosa tiene mayor efecto desestructurante.

- En el sistema de máxima concentración de trehalosa, no se encontraron interacciones de EHs entre glucosa y lisina en todo el tiempo de análisis, lo que nos lleva a concluir que la trehalosa, evita que los reactantes se aproximen y así dar inicio a las reacciones de pardeamiento.

Estas observaciones nos permiten concluir que la trehalosa presenta características únicas que la diferencian de maltosa y sacarosa a pesar de compartir la misma fórmula molecular. La mayor habilidad bioprotectora de la trehalosa no puede ser explicada por un único factor, sino que es el resultado de varios factores actuando sinérgicamente y fundamentalmente debido a la dinámica que la misma induce sobre la matriz en la que está presente. Así, la capacidad superior para proteger estructuras biológicas de la trehalosa está dada por una alta temperatura de transición vítrea. Su tendencia a formar cristales dihidratados, que impide, además, que esta temperatura se modifique significativamente al agregar pequeñas cantidades de agua a su matriz. La mayor rigidez conformacional, por otra parte, modula su comportamiento dinámico, el del agua y el de otros componentes presentes en su matriz.

ÍNDICE DE ABREVIACIONES

Tg: temperatura de transición vítrea

QC: Química computacional

MEE: métodos de estructura electrónica

DFT: métodos de los funcionales de la densidad

OAs: orbitales atómicos

DZ: doble zeta

TZ: triple zeta

PBC: Condiciones periódicas de contorno (*Periodic Boundary Conditions*)

DM: Dinámica molecular

NVE: ensamble microcanónico (número de partículas, volumen y energía constante)

NVT: ensamble canónico (número de partículas, volumen y temperatura constante)

NPT: ensamble isotérmico-isobárico (número de partículas, presión y temperatura constante)

AIM: Teoría de Átomos en Moléculas (*Atoms in Molecules*)

NAO: orbitales atómicos naturales.

NHO: orbitales naturales híbridos.

NBO: orbitales naturales de enlace.

IHTC: interacciones hiperconjugativas de transferencia de carga)

NBR: non-enzymatic browning reaction

G: glucosa.

L: lisina

T: trehalosa

M: maltosa

S: sacarosa

A: agua

O: oxígenos

O_A: oxígenos del agua

E_Hs: Enlaces de hidrógeno

D: coeficiente de difusión traslacional

D_D: coeficiente de difusión traslacional del disacárido

D_T: coeficiente de difusión traslacional del trehalosa

D_M: coeficiente de difusión traslacional de maltosa

D_S: coeficiente de difusión traslacional de sacarosa

D_A: coeficiente de difusión traslacional del agua

D_G: coeficiente de difusión traslacional de glucosa

D_L: coeficiente de difusión traslacional de lisina

MSD: desplazamiento cuadrático medio

<E>: número promedio de enlaces de hidrógeno intermoleculares

<E_{H_{D-A}}>: número promedio de enlaces de hidrógeno intermoleculares disacárido-agua y viceversa

PCEs: Puntos críticos de enlace

$\rho(\mathbf{r}_c)$: densidad electrónica

$\nabla^2\rho(\mathbf{r}_c)$: Laplaciano de la densidad electrónica

ε : elipticidad

$G(\mathbf{r}_c)$: energía cinética

$V(\mathbf{r}_c)$: energía potencial

$H(\mathbf{r}_c)$: energía total

E^2 : energía de perturbación de segundo orden

IHTC: interacciones hiperconjugativas de transferencia de carga IHTC

DE (σ): Desviación estándar

RDFs: funciones de distribución radial.