



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Estudio exploratorio a nivel DFT del mecanismo de formación del
producto de oxidación *Sp* vía interacción con el radical NO_2^\bullet

TITULACIÓN POR TESIS Y EXAMEN PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN QUÍMICA

PRESENTA:

CINTHYA SUSANA OLMEDO MARTÍNEZ

ASESOR: Doctora Esther Agacino Valdés

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**COPIA AUTORIZADA DE LOS VOTOS
APROBATORIOS**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a la comunidad de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado las herramientas necesarias para forjar mi futuro, por todas las oportunidades que me fueron proporcionadas al momento de volverme universitaria y por acogerme en sus instalaciones en las cuales tuve la oportunidad de descubrir y desarrollar mis habilidades.

A mi profesora y asesora de tesis la Dra. Esther Agacino Valdés por la paciencia y amabilidad con la que me recibió, por su gran orientación durante el desarrollo de este proyecto, por su comprensión y su ánimo a lo largo de todo este largo proceso, por las oportunidades que abrió en mi camino y por inspirarme a alcanzar el éxito.

A mis padres por ser mis primeros maestros de vida, mis mentores y modelos a seguir, por confiar en mis decisiones, por brindarme en los buenos y malos momentos su apoyo incondicional para realizar mis sueños y sin los que no podría haber logrado todo lo que logré hasta ahora.

A mi familia que siempre me inspiró a lograr mis metas personales por medio de sus consejos y experiencias de vida y con los que cuento para cualquier situación.

A mi abuela que, aunque no esté físicamente presente en mi recibimiento, la mantengo en mi corazón, me sonrío y seguramente está orgullosa de mí.

Y finalmente quiero también agradecer a mis amigos quienes me otorgaron su apoyo y no me permitieron que me rindiera ante los obstáculos, quienes me escucharon y aconsejaron en momentos de duda y con los que puedo compartir mis éxitos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES	9
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS E HIPÓTESIS	13
2.1 OBJETIVO GENERAL	13
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	13
2.3 HIPÓTESIS	13
CAPÍTULO 3: MARCO TEÓRICO	14
3.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS	14
3.1.1 ESTRUCTURA E IMPORTANCIA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS ADN Y ARN	14
3.1.2 DAÑO AL ADN	18
3.2 ASPECTOS FÍSICOQUÍMICOS	20
3.2.1 TERMODINÁMICA QUÍMICA	22
3.2.2 CINÉTICA QUÍMICA	25
3.3 QUÍMICA TEÓRICA Y COMPUTACIONAL	28
3.3.1 ECUACIÓN DE SCHRÖDINGER PARA MOLÉCULAS	29
3.3.2 MÉTODO VARIACIONAL PARA RESOLVER LA ECUACIÓN DE SCHRÖDINGER	30
3.3.3 ECUACIONES DE (HARTREE – FOCK) – Roothaan	31
3.3.4 TEORÍA DE FUNCIONALES DE LA DENSIDAD	33
3.3.5 FUNCIONES BASE	37
CAPÍTULO 4: MÉTODO Y METODOLOGÍA	40
4.1 DESCRIPCIÓN DE LAS CONDICIONES DE CÁLCULO	40
4.1.1 LA SUPERCOMPUTADORA MIZTLI	40
4.1.2 SOFTWARES EMPLEADOS: GAUSSIAN 09 Y EL GAUSSIAN VIEW	40
4.2 DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS REALIZADAS EN FASE GAS Y CON EFECTO DE SOLVENTE	41
CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
5.1 ASPECTOS GENERALES DEL MECANISMO	45
5.2 DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS	48
5.3 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	55
CONCLUSIONES	68
REFERENCIAS	69

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ΔE : Energía de reacción	G09 : <i>Gaussian 09</i>
ΔG : Energía de Gibbs de reacción	GGA : Generalized Gradient Approximation, por sus siglas en inglés
ΔG_{ji} : Energía de Gibbs total	Gh : Guanidinohidantoína
ΔG_{evol} : Energía de Gibbs de evolución	GTOs : Gaussian Type Orbitals, por sus siglas en inglés
ΔG^\ddagger : Energía de Gibbs de activación	HF : Hartree-Fock
ΔH : Entalpía de reacción	IR : Infrarrojo
ΔS : Entropía de reacción	Iz : Imidazolona
8-oxoG : 8-oxo-7,8-dihidroguanina o 8-oxoguanina	KS : Método de Kohn – Sham
8-oxodG : 8-oxo-guanosina	OA : Orbitales atómicos
8-oxoG^{+•}/ G^{•+} : Cation radical de 8-oxoguanina	OM : Orbitales moleculares
A : Adenina	PCM : Modelo del continuo polarizable
ADN : Ácido desoxirribonucleico	POG : Productos de oxidación de la guanina
ARN : Ácido ribonucleico	Rf : Riboflavina
BN : Bases nitrogenadas	Rf^{•-} : Anión radical de riboflavina
C : Citocina	RMN : Resonancia Magnética Nuclear
CI1 – CI7 : Compuestos intermediarios del 1 al 7	RNS : Especies reactivas de nitrógeno
CL : Combinaciones lineales	ROS : Especies reactivas del oxígeno
CP : Compuesto producto (Sp)	SCF : Self Consistent Fields, por sus siglas en inglés
CR : Compuesto reactivo (8-oxoG)	SEP : superficie de energía potencial
DFT : Density Functional Theory, por sus siglas en inglés	SOD : Superóxidodismutasa
EE : Exact Exchange, por sus siglas en inglés	Sp : 2-imino-5,5'-espirodihidantoína o Spiroiminodihidantoína
ET : Estado de Transición	STOs : Slater Type Orbitals, por sus siglas en inglés
FGC : Funciones gaussianas contraídas	SV : Split Valence, por sus siglas en inglés
FGP : Funciones gaussianas primitivas	T : Timina
G : Guanina	TET : Teoría del Estado de Transición

RESUMEN

En las últimas décadas, han surgido esfuerzos para conocer los posibles mecanismos de formación de los productos provenientes de la oxidación de la Guanina (G) e identificar aquellos radicales libres y especies reactivas que los originan, ya que son responsables de gran parte de las lesiones del ADN y en particular de las transversiones. Entre los productos de oxidación responsables de una de las transversiones más frecuentes, G:C→C:G se encuentra la Spiroiminodihidantoína (Sp), de la cual existen dos conformaciones Sp (R) y Sp (S).

En el presente trabajo, se presenta un estudio teórico sistemático y detallado del mecanismo de reacción para la formación del Sp (R) y Sp (S), utilizando el radical NO_2^{\bullet} como precursor, a partir de la propuesta cualitativa existente en la literatura, con el objetivo de evaluar su viabilidad energética. Para ello se modelaron y optimizaron las geometrías de los intermediarios, estados de transición y productos para así obtener un diagrama en términos de la energía de Gibbs de evolución y activación, el cual permitió realizar un análisis termodinámico y cinético de cada paso del mecanismo y establecer su pertinencia.

Los cálculos se realizaron con el paquete computacional *Gaussian 09* y el visualizador *Gaussian View*, utilizando el formalismo de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT). Dichos cálculos se llevaron a cabo primeramente en fase gas y posteriormente con efecto de solvente, siendo éste último el más importante por ser las condiciones que más se acercan al medio en el cual se desarrolla este proceso; los cálculos con efecto de solvente se realizaron con la combinación M052X/6-311++G (d,p) de funcional y base.

Se encontró que los dos primeros pasos del mecanismo de reacción propuesto son muy endotérmicos, demostrándose que esto puede superarse por la presencia de una especie fotosensibilizadora como la Riboflavina (*Rf*) que luego de absorber radiación Ultravioleta, puede transferirla a la 8-oxoG, facilitando la oxidación y desprotonación inicial. Los pasos 3, 4 y 6 resultaron ligeramente endergónicos, mientras que los pasos 5, 7 y 8 son exergónicos. La mayor barrera de activación se encuentra en el paso 6 y éste debe esperarse que sea el paso lento, seguido del paso 8 con una barrera algo menor. Se demostró que el mecanismo de reacción estudiado puede ser favorable para formar el producto de oxidación final Sp y además que el efecto del solvente es un elemento esencial en el análisis de los mecanismos de reacción que ocurren en solución.

INTRODUCCIÓN

Los adelantos científicos y tecnológicos de esta era, están dando respuesta a retos y preguntas planteadas desde finales del siglo XX; dentro de estos retos, se encuentra el impacto de los radicales libres en el estrés oxidativo y en el daño al ADN. Sin embargo, aún hace falta un largo proceso de investigación y de trayectoria tecnológica para llegar al momento en que pueda diagnosticarse el estrés oxidativo (Acosta, Quintana, Macías y Alonso, 2006) y poder aplicar tratamientos terapéuticos y de medicina preventiva.

Es por ello que, en los últimos años, viene desarrollándose cada vez mayor interés por los problemas relacionados con el estrés oxidativo, los radicales libres, las especies reactivas del oxígeno y los antioxidantes; lo anterior enfocado desde el punto de vista de la bioquímica, la biología y la medicina. Aunque las ciencias médicas están dando un paso de avance significativo en el conocimiento de muy variadas enfermedades, en su fisiopatología, su tratamiento y más importante aún en su prevención (Venereo, 2002), la biología molecular está jugando un papel cada vez más importante.

Actualmente la investigación básica sobre la reparación del daño en el ADN ha estado acumulando conocimientos que podrían ser aplicados a futuro en el diseño de nuevos medicamentos dirigidos a resolver la causa de la enfermedad y no los síntomas de ésta. Como parte de estas investigaciones, ya es conocido que el envejecimiento y muchas enfermedades como el cáncer, son causadas por la presencia de radicales libres (Bunker, 1992) como los aniones superóxidos, y radicales derivados de los óxidos de nitrógeno, entre otros, los cuales son responsables del daño oxidativo al ADN. Estos radicales libres, tienen como fuente, el entorno ambiental entre cuyos factores se encuentran, el humo del cigarrillo, una mala alimentación o estar expuesto a radiaciones ionizantes.

Se sabe también que la fidelidad de la replicación del ADN llevada a cabo por las ADN-polimerasas y sus funciones acompañantes de corrección, es esencial para la transmisión exacta de la información genética durante la división celular. Sin embargo, en ocasiones se producen errores en la polimerización que, si no se corrigen, pueden alterar la secuencia genética. Aún cuando el ADN dañado pueda repararse, la restauración puede ser imperfecta y generar una mutación, es decir, una alteración de la información genética que puede ser hereditaria (Voet, Voet y Pratt, 2007).

Aunque nuestro organismo posee mecanismos químicos para contrarrestar la presencia de los radicales libres, cuando la producción de los mismos es excesiva, se produce un desequilibrio entre las reacciones de oxidación y de reducción, generándose el llamado *estrés oxidativo*. Uno de los efectos del *estrés oxidativo*, es la oxidación de algunas bases nitrogenadas presentes en el ADN,

siendo una de las más susceptibles a estos cambios químicos la Guanina (G), debido a su alto potencial de oxidación (Steenken y Jovanovic, 1997) y su baja energía de ionización (Pacheco, Gaitán y Agacino, 2012). Así, la presencia del principal producto de oxidación de la Guanina, la 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG) o de otros productos de oxidación como la 2-imino-5,5'-espirodihidantoina (Sp) en el ADN, puede provocar errores en el apareamiento de las bases nitrogenadas. Aunque las enzimas ADN-polimerasas tienen como función la reparación de estos errores, en ocasiones algunos no se corrigen adecuadamente, y ello puede producir mutaciones.

Numerosos estudios muestran, que después de la replicación de un ADN previamente oxidado *in vitro* en células, o después de la exposición de células a especies oxidantes, la frecuencia de estas mutaciones aumenta, produciendo inserciones erróneas de bases nitrogenadas (*transversiones*), donde una base nitrogenada tipo purina se sustituye por una base nitrogenada tipo pirimidina o viceversa; las transversiones más frecuentes son: GC → AT, GC → TA y GC → CG (Akasaka y Yamamoto, 1994).

El proceso de oxidación de G, produce la salida de un electrón, generándose un agujero electrónico, con la formación de un catión radical (G^{•+}); este agujero puede migrar hasta que sea atrapado por otro electrón (Meggers, Michel y Giese, 1998; Nuñez, Hall y Barton, 1999). El producto inmediato de la oxidación de la G, la 8-oxoG es más fácilmente oxidable, al presentar un potencial de reducción (Steenken, Jovanovic, Bietti y Bernhard, 2000) y una energía de ionización (Pacheco et al., 2012) aún más bajo que el de la G, por lo que la formación del catión radical de 8-oxoG^{•+}, puede ser más probable; el producto de oxidación Sp, presenta el potencial de ionización más alto respecto a los otros productos de oxidación y las 4 bases nitrogenadas, por lo que una vez insertado en el ADN, existe una gran probabilidad de que pueda inducir mutaciones y se ha relacionado con la transversión G:C → T:A.

En las últimas décadas, han surgido esfuerzos por conocer los posibles mecanismos de formación de los productos de oxidación de G e identificar aquellos radicales libres y especies reactivas que los originan. Essigmann y Neeley (2006) han recolectado y resumido las principales propuestas acerca de estos mecanismos; sin embargo, el trabajo mencionado no reporta un estudio sistemático de los mecanismos de reacción sugeridos, por lo que en este trabajo nos proponemos realizar un estudio exploratorio de uno de los mecanismos mencionados, para la formación del producto de oxidación Sp a partir del radical NO₂[•] y evaluar su viabilidad energética. El estudio del mecanismo de formación de Sp por la vía del radical NO₂[•], aún no ha sido estudiado por métodos de la química teórica y computacional.

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES

El genoma de todos los organismos vivos está constantemente dañándose por agentes endógenos y exógenos que modifican la integridad química del ADN y cambian la información genética. Independientemente de los eficientes mecanismos de reparación que existen en los organismos vivos, algunas lesiones escapan a estos y la lesión puede replicarse. Las lesiones del ADN pueden definirse como "una alteración química esencialmente sobre las bases nitrogenadas (BN)", aunque otras partes del nucleótido también podrían experimentar modificaciones (Pageás y Fuchs, 2002). Estas lesiones pueden ser inducidas por agentes endógenos como los radicales libres y exógenos como radiaciones ionizantes, entre las que se encuentran la radiación UV y los rayos X. Estos agentes pueden causar la oxidación de las bases nitrogenadas, provocando errores en la información genética del ADN, de lo cual se pueden derivar diversas formas de cáncer o desórdenes neurológicos, así como el envejecimiento y muerte celular (Sayre, Perry y Smith, 2008). Debido a que el potencial de reducción de la guanina es el más bajo de las cuatro bases nitrogenadas (Steenken y Jovanovic, 1997), se deduce que es la base más fácilmente oxidable y puede formar diversos productos de oxidación (Foksinski, Rozalski, Guz, Ruzkowska, Sztukowska, Piwowarski, Klungland y Olinski, 2004).

El principal producto de oxidación de la G es la 8-oxoguanina (8-oxoG), siendo ésta especie la causante de la gran mayoría de las alteraciones químicas del ADN (Ohno, Miura, Furuichi, Tominaga, Tsuchimoto, Sakumi y Nakabeppu, 2006), ya que puede aparearse con la adenina (A) y la citosina (C) durante la replicación del ADN y causar las transversiones G:C→T:A, A:T→C:G, G:C→C:G y A:T→T:A (Shibutani, Takeshita y Grollman, 1991). Ha sido reportado que existen varios miles de residuos de 8-oxoG en regiones genómicas, como por ejemplo los telómeros.

Recientemente se ha encontrado que la 8-oxoG es más fácilmente oxidable que la guanina, generando a su vez, otros productos de oxidación (Steenken et al., 2000). Los productos de oxidación de la guanina y la 8-oxoG, como la Imidazolona (Iz), guanidinohidantoína (Gh) y Spiroiminodihidantoína (Sp), pueden ser responsables de la transición G:C→C:G (Kino y Sugiyama, 2005). Una lesión de particular interés es la producida por el producto de oxidación Sp, el cual es altamente mutagénico (Korniyushyna, Berges, Muller y Burrows, 2002), produciendo las transversiones G:C→C:G y G:C→T:A y generando una desestabilización termodinámica en el ADN que hace muy difícil su reparación (Chinyengetere y Jamieson, 2008).

La Figura 1.1 muestra algunos de los productos de oxidación que han sido identificados, además de la Guanina y la 8-oxoG. Nótese además al producto Sp en sus dos estereoisómeros Sp (R) y Sp (S).

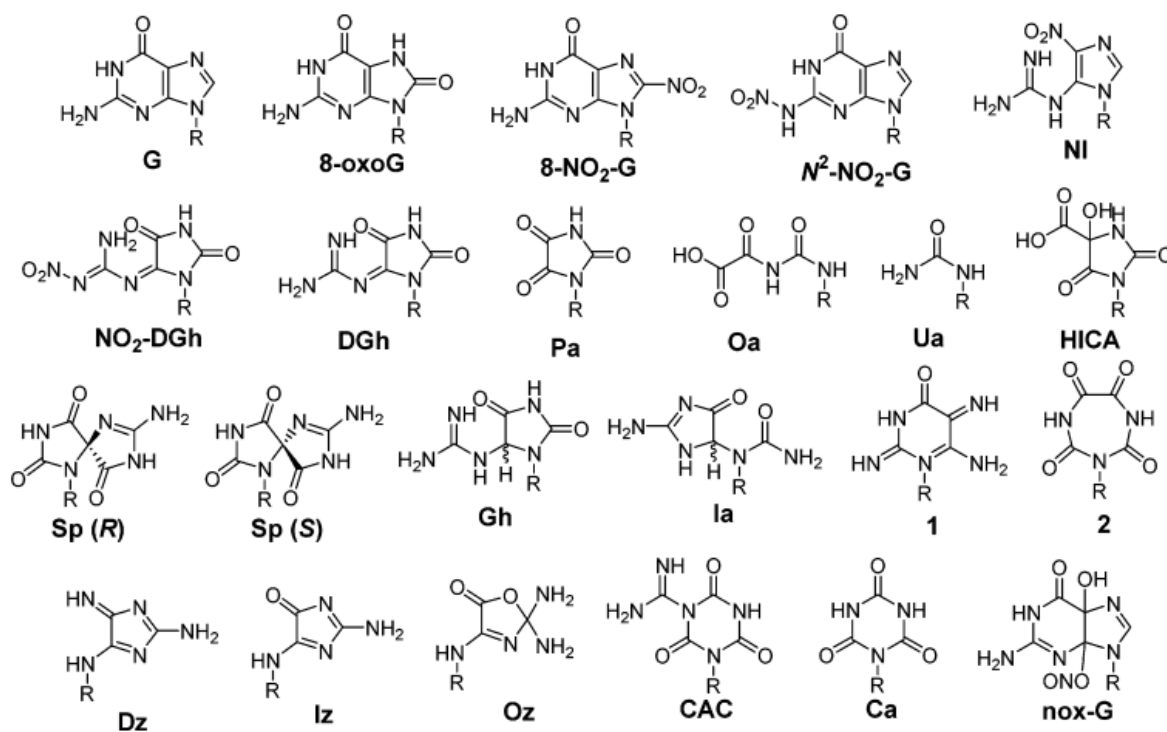


Figura 1.1 Algunos productos de oxidación de la Guanina y la 8-oxoG

(tomado de W. L. Neeley, J. M. Essigmann (2006) Mechanisms of Formation, Genotoxicity, and Mutation of Guanine Oxidation Products, *Chem. Res. Toxicol.*, 19(4): 491-505)

Ha sido encontrado tanto experimental como teóricamente, que el producto de oxidación Sp se forma a partir de la reacción de la 8-oxoG con varios ROS (Jia, Shafirovich, Shapiro, Geacintov y Broyde, 2005; Fleming, Muller, Dlouhy y Burrows, 2012) a pH neutro o ligeramente mayor (Gremaud, Martin y Sugden, 2010; Luo, Muller, Rachlin y Burrows, 2001).

Jia et al (2005) han estudiado la estructura de Sp por métodos teóricos utilizando la combinación de funcional y base B3LYP/6-31G, y encontraron que ésta presenta dos estereoisómeros R y S.

Con el objetivo de esclarecer cuáles son los intermediarios generados en el organismo durante la formación de estos productos de oxidación y poder evaluar su grado de toxicidad; diversos grupos en el mundo se han dado a la tarea de estudiar los mecanismos de su formación. Por ejemplo, Munk, Burrows y Schlegel (2008), realizaron el estudio teórico del mecanismo de formación de Sp a partir de la reacción entre 8-oxoG y el radical OH[•] utilizando el formalismo de la Teoría de Funcionales de

la Densidad (DFT). Por otra parte, también ha sido estudiada la formación de Sp con la participación de $\text{CO}_3^{\cdot-}$, el cual oxida inicialmente la G a 8-oxoG (Joffe, Geacintov y Shafirovich, 2003). Sin embargo, Crean, Nicholas y Shafirovich, (2005) en un estudio experimental han propuesto otro camino, en el cual el $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ataca al C8 del radical guanil, que fue previamente desprotonado en la posición correspondiente al N7; este mecanismo, fue posteriormente estudiado teóricamente por Yadav y Mishra (2012 y 2014) utilizando el formalismo de DFT; para la optimización de geometría se empleó la combinación de funcional y base B3LYP/6-31G (d,p) y con el objetivo de refinar el cálculo de la energía se utilizaron posteriormente las combinaciones M06-2X y WB97XD con la base doble zeta AUG-cc-pVDZ. Realizaron los cálculos con efecto de solvente, mediante el modelo del continuo polarizable (PCM) y además fueron calculadas las barreras de activación para cada paso del mecanismo. Encontraron que la oxidación de la 8-oxoG (con pérdida de $1e^-$), ocurre por la intervención del anión radical carbonato, como fue observado experimentalmente; en el estudio también se demostró que ésta reacción está catalizada por moléculas de agua, específicamente durante la etapa de desprotonación y que el ataque del radical se produce por el C5 del radical guanil (Yadav y Mishra, 2012).

Suzuki (2009) reportó la formación de los dos diastereoisómeros de Sp, por una vía experimental, en la cual trabajando a $\text{pH} = 7.4$, fue bombeado óxido nítrico (NO) a temperatura ambiente y bajo condiciones aeróbicas; de ésta forma fue sugerido que la 8-oxoG insertada en el ADN, puede reaccionar con el NO en presencia de una molécula de oxígeno para formar Sp.

El NO es sintetizado en varios tipos de células por una enzima y participa en varias funciones biológicas, como por ejemplo la vasodilatación, neurotransmisión e inflamación (Marletta, 1993; Bredt y Snyder, 1994). Aunque es un radical, su reactividad es relativamente baja, pero en presencia de $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede convertirse en el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) y reaccionar con grupos amino de varias moléculas biológicas (Ischiropoulos, Zhu, Chen, Tsai, Martin, Smith y Beckman, 1992; Suzuki, Mower, Friesen, Gilibert, Sawa y Ohshima, 2004). El NO, también puede convertirse en peroxinitrito (ONOO^{\cdot}) que en solución neutra, va a existir como una mezcla de peroxinitrito (ONOO^{\cdot}) y ácido peroxinitroso (ONOOH); ésta última especie es altamente reactiva y fácilmente causa la oxidación y nitración de varias moléculas biológicas. En ésta dirección, ya desde 1999 se sabía que el ONOOH puede también reaccionar con la 8-oxoG y dar varios productos de oxidación (Niles, Burney, Singh, Wishnok y Tannenbaum, 1999; Niles, Wishnok y Tannenbaum, 2006).

Otro mecanismo planteado por Misiaszek, Crean, Geacintov y Shafirovich, (2005), propone la formación de Sp, con participación de NO_2^{\cdot} y se ha calculado que la constante de velocidad es de 4.3

$\times 10^8 M^{-1}$ a $pH = 7.5$ en moléculas de ADN de cadena simple y de doble hélice. Gracias a estos trabajos, se tiene la certeza de que no hay un estudio teórico de ésta reacción que haya sido reportado, por lo que éste fue el planteamiento esencial del trabajo de tesis aquí propuesto. En la Figura 1.2 se muestra el mecanismo de formación de Sp que fue objeto de estudio para este proyecto (la especie inicial y final se encuentran señalizadas).

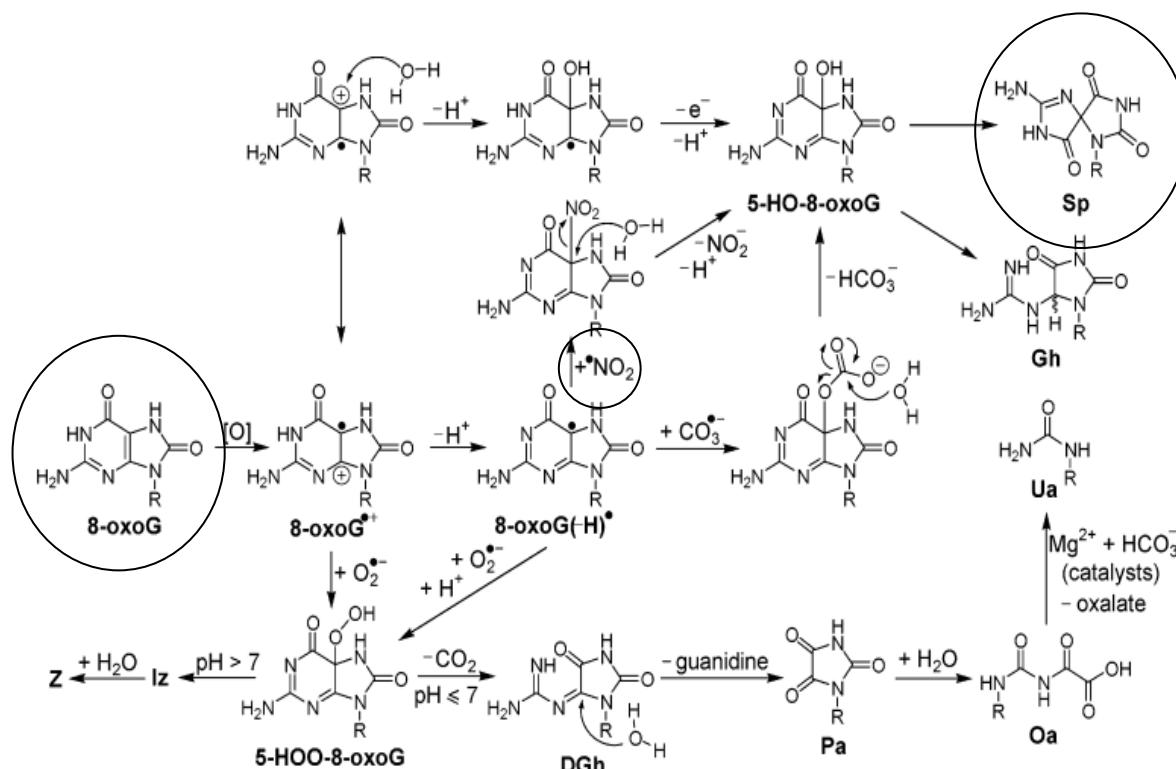


Figura 1.2 Mecanismo de formación de Sp que será estudiado, partiendo de 8-oxoG por la vía del $NO_2\cdot$ (tomado de W. L. Neeley, J. M. Essigmann (2006) Mechanisms of Formation, Genotoxicity, and Mutation of Guanine Oxidation Products, *Chem. Res. Toxicol.*, 19(4): 491-505)

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo General

Determinar los estados energéticos más probables de los intermediarios, estados de transición y productos involucrados en el mecanismo general de reacción propuesto en la literatura, que conlleva a la formación del producto de oxidación Sp (R) y su conformero Sp (S), a través de cálculos químico-cuánticos tanto en fase gas como con efecto de solvente (agua), con el fin de evaluar su viabilidad energética.

2.2 Objetivos Particulares

- *Modelar y optimizar* reactivos, intermediarios y productos propuestos de un mecanismo de reacción ya establecido con el fin de estimar sus energías de unión, distancias y ángulos de enlace, distribución de la carga, geometría y sus propiedades termodinámicas (energías de Gibbs), los cuales nos ayudarán a caracterizar y explicar su factibilidad tanto en fase gas como con el efecto de un solvente.
- *Modelar y optimizar* los posibles estados de transición presentes en todo el mecanismo propuesto, tanto en fase gas como con efecto de solvente para entender la viabilidad energética del mecanismo de reacción planteado, mediante el cálculo de las energías de Gibbs de evolución y de activación.
- *Proponer* una vía más completa y detallada del mecanismo de reacción mencionado, para la formación del producto de oxidación estudiado Sp (R) y Sp (S), a partir de la 8-oxoG, considerando el efecto de solvente, con el fin de ayudar en futuras investigaciones relacionadas con el tema.

2.3 Hipótesis

El mecanismo de reacción estudiado con efecto de un solvente debe esperarse que sea más favorecido termodinámica y cinéticamente, en comparación a un estudio en fase gaseosa por estar en condiciones más cercanas a las reales; por tanto, los estudios químico-cuánticos con efecto del solvente, nos ayudarán a determinar y comprobar de manera más específica y precisa, el comportamiento de dichas especies en un medio acuoso y evaluar la viabilidad energética del mecanismo de formación de los productos de oxidación Sp (R) y Sp (S) planteado en la literatura.

CAPÍTULO 3: MARCO TEÓRICO

3.1 Aspectos Biológicos

El descubrimiento de la naturaleza química y la estructura tridimensional de la biomolécula portadora del material genético, el ácido desoxirribonucleico (ADN), se encuentra entre los grandes descubrimientos de la biología del siglo XX. Ésta molécula contiene las instrucciones genéticas que hacen de cada especie algo único, las cuales pasan de los organismos adultos a sus descendientes durante la reproducción, lográndose así la perpetuación de una especie biológica.

La corrección y efectividad en el almacenaje, la expresión y la reproducción del mensaje genético contenido en el ADN, define a las especies individuales, las distingue de las demás y asegura su continuidad a lo largo de generaciones sucesivas.

3.1.1 Estructura e importancia de los ácidos nucleicos ADN y ARN

El ADN es un biopolímero formado por monómeros llamados nucleótidos, los cuales están formados por un glúcido, la desoxirribosa, una base nitrogenada (Adenina, Timina, Citosina y Guanina) y un grupo fosfato. Los dos primeros forman una subunidad llamada nucleósido.

Lo que distingue a un nucleótido de otro es la base nitrogenada (BN), y por ello la secuencia del ADN se especifica nombrando solo la secuencia de sus bases. La disposición secuencial de estas cuatro bases a lo largo de la cadena es la que codifica la información genética; por ejemplo, una secuencia de ADN puede ser *ATGCTAGATCGC...*

En los organismos vivos, el ADN se presenta como una doble cadena de nucleótidos, en la que las dos hebras están unidas entre sí por puentes de hidrógeno. La Figura 3.1 muestra la estructura molecular resultante. De la figura anterior se pueden observar varias características de la geometría molecular que deben ser resaltadas:

- En los nucleótidos, cada BN se une a una molécula de ribosa por un enlace N-glicosídico y los nucleótidos se unen entre sí a través de los grupos fosfato.
- Las bases nitrogenadas que se aparean son Adenina-Timina (A-T) y Citosina-Guanina (C-G); es decir, una base de tipo purina (2 anillos) con una base de tipo pirimidínica (un anillo).

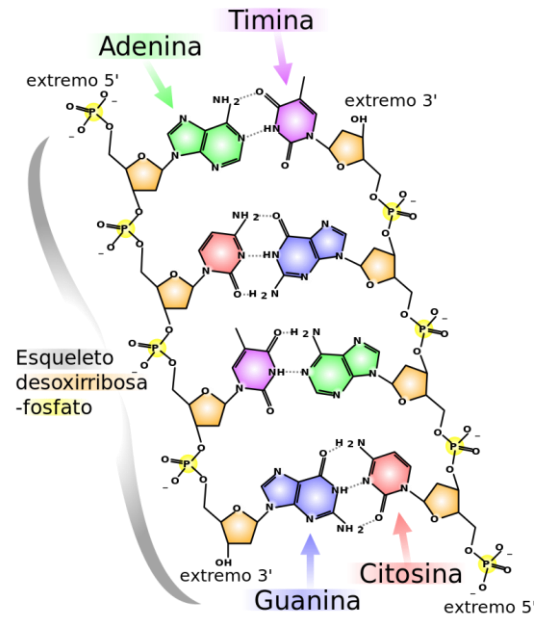


Figura 3.1 Estructura Molecular del ADN.

(Tomado de https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_desoxirribonucleico)

(Consultado el 20/02/2017)

Como resultado de este apareamiento, las dos cadenas de ADN se enrollan sobre sí mismas formando una especie de escalera de caracol, denominada doble hélice. La figura 3.2 muestra (i) la forma en que se pliegan las dos cadenas para obtener la estructura 3D de doble hélice y (ii) las subunidades nucleótido y nucleósido.

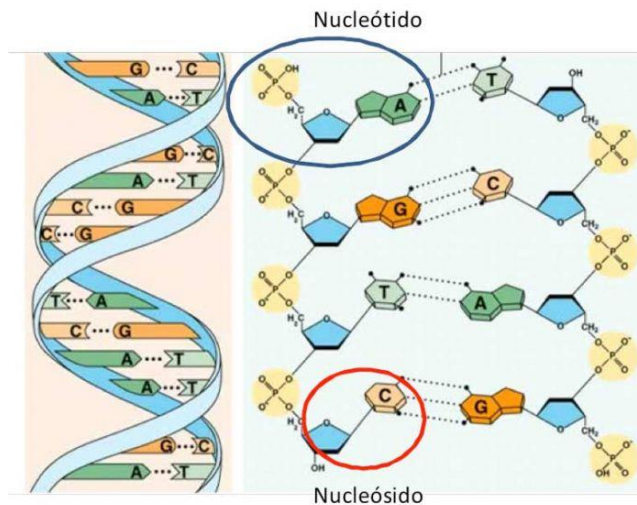


Figura 3.2 Estructura 3D de doble hélice del ADN

(Tomado de <http://biotecnologiasi.tumblr.com/post/117882807550/gen%C3%A9tica-comemos-genes>)

(Consultado el 20/02/2017)

Otro tipo de ácido nucleico es el ácido ribonucleico (ARN), el cual también está formado por una secuencia de nucleótidos. La diferencia con el ADN está en las subunidades del nucleótido; mientras que el ADN tiene como glúcido la desoxirribosa, el ARN tiene a la ribosa; por otra parte, una de las cuatro bases nitrogenadas es diferente; en lugar de la timina, se encuentra presente la base uracilo. Ésta biomolécula es lineal y monocatenario (de una sola cadena), aunque en el genoma de algunos virus ha sido detectada una doble hebra. Es la molécula que dirige las etapas intermedias de la síntesis proteica. Como el ADN no puede actuar solo, se vale del ARN para transferir esta información vital durante la síntesis de proteínas. Existen varios tipos de ARN, algunos ejemplos son:

- ARN mensajero (ARNm): Transmite la información del ADN a los ribosomas, el lugar donde se realiza la síntesis de las proteínas. Ésta información corresponde a la secuencia de aminoácidos que tendrá la proteína que se sintetizará. El proceso se denomina transcripción.
- ARN de transferencia (ARNt): Transfiere un aminoácido específico al polipéptido en crecimiento; se unen a lugares específicos del ribosoma durante la traducción de la información.
- ARN ribosómico (ARNr): son el componente catalítico de los ribosomas; se encargan de crear los enlaces peptídicos entre los aminoácidos del polipéptido en formación durante la síntesis de las proteínas.

Como puede observarse, mientras el ADN selecciona, almacena y guarda el código genético, el ARN transmite ese código genético almacenado por el ADN, y lo convierte en información química para llevar a cabo la síntesis de las proteínas en las mitocondrias.

La síntesis de las proteínas es un proceso bioquímico esencial, pues las proteínas son los principales componentes de las células y tienen funciones vitales como se muestra a continuación:

- Función defensiva; crean los anticuerpos y dirigen la acción contra agentes extraños o infecciones.
- Función reguladora; regulan la división celular y la expresión de ciertos genes; están presentes en compuestos como la hemoglobina, las hormonas, los jugos digestivos, las enzimas y las vitaminas que intervienen en las reacciones químicas que suceden en el organismo, así como en las histonas que forman parte de los cromosomas que regulan la expresión genética.
- Función amortiguadora; Mantiene el pH y el equilibrio osmótico.
- Función estructural; son responsables de la contracción de los músculos y forman tejidos de sostén y relleno que confieren elasticidad y resistencia a los órganos; por ejemplo el colágeno

forma el tejido conjuntivo fibroso y la reticulina y elastina forman el tejido conjuntivo elástico.

- Función de transporte; la hemoglobina y la mioglobina son proteínas transportadoras del oxígeno en la sangre en los organismos vertebrados y en los músculos respectivamente, los citocromos que transportan electrones y las lipoproteínas que transportan lípidos por la sangre.

La estructura de todas las proteínas y en último término, de todas las biomoléculas y de cada uno de los componentes celulares, es producto de la información programada en la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos de la célula. Si la síntesis de las proteínas se realiza adecuadamente, en gran parte se debe a la transcripción adecuada de la información genética del ADN al ARN; es decir, que no existan errores en la secuencia de las BN presentes y por tanto en la secuencia de las subunidades de nucleótidos.

Las BN pirimidinas y purinas son compuestos aromáticos y bases débiles, de ahí su denominación de “bases”. Su aromaticidad tiene efectos importantes sobre la estructura plana y las propiedades electrónicas de los ácidos nucleicos. Las bases púricas y pirimídicas son hidrofóbicas y relativamente insolubles en agua al pH celular que es cercano a la neutralidad. A pH ácido o alcalino las bases aumentan su carga y adquieren solubilidad en agua. Las interacciones hidrofóbicas entre estas bases favorecen un fenómeno de apilamiento, que les permite acomodarse con los planos de los anillos en paralelo. El apilamiento resulta de una combinación de interacciones de Van der Waals que ayudan a minimizar el contacto con el agua y es de gran importancia en la estabilización de la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos (Nelson y Cox, 2009). Los grupos funcionales de las pirimidinas son los grupos carbonilo, los grupos amino exocíclicos y la presencia de átomos de nitrógeno en el (los) anillo(s). Como se puede apreciar en la figura 3.1, en el apareamiento de las BN, a través de la formación de enlaces de hidrógeno, participan los grupos amino y carbonilo.

Los nucleótidos, además de ser los depositarios moleculares de la información genética, desempeñan una alta variedad de funciones en el metabolismo celular, constituyendo la moneda energética en las transacciones metabólicas, estableciendo los nexos químicos en los sistemas celulares y son también componentes estructurales de una serie de cofactores enzimáticos e intermedios metabólicos. De ésta forma, la capacidad de los nucleótidos de almacenar y transmitir información genética sobre la naturaleza química de una generación a la siguiente es el requisito básico para la vida.

Finalmente es importante hablar de la estructura 3D de doble hélice del ADN. El modelo de estructura en doble hélice fue propuesto por James Watson y Francis Crick (1953) y en el mismo quedó al descubierto la complementariedad en el apareamiento de las bases y la importancia de la secuencia de bases como portadora de información genética. Como se puede apreciar en las figuras 3.1 y 3.2, la doble hélice se forma a partir por dos tipos de fuerzas: los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases complementarias y las interacciones de apilamiento entre las bases; ambas interacciones, son responsables de la estabilidad de la doble hélice. Precisamente, la capacidad de las células vivas para preservar su material genético y duplicarlo para su transmisión a la generación siguiente es el resultado de la complementariedad estructural entre las dos mitades de la molécula de ADN.

3.1.2 Daño al ADN

El almacenamiento de la información a largo plazo sin que ocurran alteraciones es tan importante para la célula, que incluso reacciones muy lentas que alteren la estructura del ADN, pueden tener significado fisiológico. Procesos tales como la carcinogénesis y el envejecimiento pueden estar íntimamente ligados a la lenta acumulación de alteraciones irreversibles en el ADN.

Existen mecanismos para la reparación del ADN, pero en algunos casos ésta no es posible y puede transferirse el error a la generación siguiente. Dentro de las lesiones que en ocasiones no son reparadas tenemos algunos cambios en la secuencia de las BN en el ADN; si éste error se replica y transmite a las generaciones futuras se hace permanente. Las alteraciones en la estructura del ADN que dan lugar a cambios permanentes en la información genética codificada por la molécula se denominan mutaciones. Por otra parte, la reparación incorrecta de una lesión en una de las cadenas del ADN puede tener el mismo efecto ya que puede generar errores de apareamiento entre las BN.

El ADN puede resultar dañado por diversos procesos; algunos de esos son espontáneos, como por ejemplo la respuesta del organismo al ataque de virus y bacterias y ciertas reacciones metabólicas y otros catalizados por agentes externos como radiaciones ionizantes, el humo del cigarro, la presencia de gases contaminantes en el ambiente y por una mala alimentación.

Los radicales libres son especies muy reactivas (átomos o moléculas con electrones desapareados), ávidas de obtener electrones para saturar su valencia o formar enlaces que le den mayor estabilidad (Bunker, 1992). Estas especies dañan a otras biomoléculas de su entorno, las cuales quedarían en forma radical y desencadenarían reacciones no deseadas a nivel celular y tisular, con la consiguiente alteración de su función (Delanty y Dichter, 1998). Particularmente, ciertos radicales libres tienen la

capacidad de dañar la desoxirribosa (Breen y Murphy, 1995), la cual al oxidarse puede inducir el rompimiento del enlace entre el azúcar y el grupo fosfato del siguiente nucleótido, mecanismo mediante el cual se producen rompimientos de cadena sencilla. Los radicales libres pueden modificar también algunas bases nitrogenadas del ADN, aspecto del cual hablaremos en la siguiente sección.

El aumento de la concentración de radicales libres en nuestro cuerpo por factores externos producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias oxidantes (mayormente radicales libres) y los mecanismos antioxidantes. Lo anterior origina alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano o grupo celular especializado (Venereo, 2002; Ames, Shigenaga y Hagen, 1993). Este desequilibrio producido, como ya se señaló, por un aumento de la concentración de especies oxidantes en el organismo se denomina *estrés oxidativo*.

Dentro de los radicales libres más importantes se encuentran las llamadas especies reactivas del oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS), aunque también pueden encontrarse fragmentos radicálicos conteniendo de halógenos (Br_2^{\cdot} y R-Br^{\cdot}). Entre las ROS y RNS tenemos:

- ROS: Ozono (O_3), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), anión Oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), radical alcóxido (RO^{\cdot}) y radical superóxido (O_2^{\cdot}).
- RNS: radical del monóxido de nitrógeno (NO^{\cdot}), radical del dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot}) y el radical Peroxinitrito (ONOO^{\cdot}).

3.1.2.1 Daño al ADN por la oxidación de la Guanina

Dentro de las nucleobases presentes en el ADN, la Guanina es la más susceptible a la oxidación por presentar el potencial de reducción más bajo (1.29 V/NHE) y el menor potencial de ionización ($\text{PI} = 8.28 \text{ eV}$) de todas las BN (Steenken y Jovanovic, 1997). El proceso de oxidación de la Guanina, produce la salida de un electrón generando un agujero electrónico y la formación de un catión radical ($\text{G}^{\cdot+}$) (Cerón, Requena, Perpète, Michaux y Jacquemin, 2010). Sin embargo, el producto inmediato de oxidación de la G, la 8-oxoG es aún más fácilmente oxidable, debido a su potencial de reducción y su energía de ionización más baja que la G, con un valor calculado de 0.74 V/NHE (Steenken et al., 2000) y 7.87 eV (Pacheco et al., 2012) respectivamente, por lo que la formación del radical (8-oxoG $^{\cdot+}$) resulta ser muy probable.

Por otra parte, ha sido demostrado que ni la G ni la 8-oxoG inducen directamente la transversión G:C \rightarrow C:G, por lo que se ha sugerido que otros productos de oxidación de la Guanina (POG) pueden estar causando ésta alteración. Estos POG pueden formarse directamente de la G o a través de la 8-

oxoG como intermediario (Bjelland y Seeberg, 2003). Particularmente, POG, 2-imino-5,5'-spirodihidantoina (Sp) el cual ha sido detectado en presencia de oxígeno singulete (Joffe et al., 2003) o del radical aniónico carbonato (Essigmann y Neeley, 2006), ha sido relacionado con ésta transversión. En el caso señalado, el POG Sp en sus dos formas conformacionales, Sp (R) y Sp (S) son los productos de oxidación que presentan la mayor estabilidad debido a que tienen el potencial de ionización más alto (9.51 eV y 9.54 eV) no sólo respecto a otros POG, sino también a las cuatro bases nitrogenadas; éstas especies al ser muy resistentes en diferentes condiciones de oxidación y ser por tanto más estables, son las de mayor permanencia en el ADN una vez que se inserta en él. Lo anterior lleva a considerar que una vez insertadas en el ADN, existe una gran probabilidad de que puedan generar diversos tipos de transversiones. Por ello, los mecanismos de formación de estos POG, como ya se describió, están siendo objeto de muchos estudios.

3.2 Aspectos Físicoquímicos

Un sistema químico puede estudiarse desde un punto de vista microscópico y macroscópico. El punto de vista microscópico explica los fenómenos a nivel atómico-molecular, donde el movimiento de los electrones juega un papel importante; estos fenómenos, en el área de la química llevan a comprender los enlaces entre los átomos para formar las moléculas, la energía de las moléculas y las interacciones entre ellas y cómo esas interacciones pueden producir las reacciones químicas. El punto de vista macroscópico considera ensambles de muchas moléculas y átomos a gran escala, esto es, sistemas que se cuantifican a nivel de moles de sustancia sin utilizar explícitamente el concepto de molécula; en este segundo caso, el estado de los sistemas se caracterizan por parámetros como la presión, el volumen y la temperatura, entre otros, por lo que estudia los cambios de calor y trabajo que se producen en los sistemas, la espontaneidad de las reacciones químicas y su tendencia a alcanzar un estado de equilibrio, así como su velocidad y energética. Ambos enfoques nos llevan a las dos ramas más importantes en el estudio de las reacciones químicas:

- La Termodinámica Química, expresada matemáticamente por la ecuación de Gibbs-Helmholtz: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, donde aparecen la energía de Gibbs, la entalpía y la entropía de la reacción.
- La Cinética Química, expresada matemáticamente por la ecuación de Arrhenius: $k = A \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right)$ y donde aparecen tres parámetros importantes: la constante de rapidez de una reacción, la temperatura y la energía de activación.

Por otra parte, ciertas las propiedades macroscópicas de la termodinámica y la cinética química pueden también determinarse a partir de parámetros microscópicos relacionados con el movimiento y la geometría de las moléculas; estos parámetros pueden expresarse a nivel de la mecánica clásica, por la posición y la velocidad, los cuales determinan el número de grados de libertad traslacionales, rotacionales y vibracionales de las moléculas o a nivel de la química cuántica, por el estudio de los enlaces y del movimiento de los electrones, caracterizados estos últimos por los 4 números cuánticos. En ambos casos, la probabilidad pasa a ser un parámetro importante para describir tanto el movimiento de un mol de átomos o moléculas, como el de los electrones que constituyen a estos átomos y moléculas; en un sistema, estas partículas (electrones, átomos y moléculas) están en constante movimiento y su trayectoria no está predeterminada, por lo que el sistema va pasando por muchos microestados.

Lo anterior nos lleva a la conclusión de que hay una conexión entre el estado a nivel macroscópico y el estado a nivel microscópico. Cuando medimos una propiedad macroscópica como la presión o la temperatura, lo que estamos obteniendo es el promedio temporal de muchos microestados por los que pasó el sistema durante el tiempo que duró la medición. Lo anterior implica que el estudio de las reacciones químicas no es trivial, implica un punto de vista termodinámico y un punto de vista cinético, pero en ambos existe una base atómico-molecular.

Como ya hemos visto, el ADN y el ARN portan la información necesaria (secuencia de bases nitrogenadas) para efectuar la síntesis de las proteínas y éstas, en dependencia de la información que contienen (tipo y secuencia de aminoácidos) aseguran las funciones vitales del organismo. Por tanto, el funcionamiento de los seres vivos tiene una base química, un fundamento basado en la geometría molecular, y ésta base molecular requiere de una base física, es decir, del estudio de las formas más elementales de movimiento (clásico o cuántico).

Las proteínas son macromoléculas que además de usar energía química para formar los enlaces covalentes entre estas subunidades, las células deben invertir energía para ordenar las subunidades en su secuencia correcta. Es extremadamente improbable que los aminoácidos de una mezcla se condensen espontáneamente para formar un sólo tipo de proteína de secuencia única. Ello implicaría un aumento del orden en una población de moléculas, lo que contrastaría con la segunda ley de la termodinámica según la cual la tendencia de cualquier proceso natural es la de incrementar el desorden del universo.

3.2.1 Termodinámica Química

La primera ley de la termodinámica nos dice que la energía ni se crea ni se destruye, solo se transforma. Por tanto, en un sistema, la energía se conserva. Quiere decir que cualquier cambio en la energía interna de un sistema está dado por el calor evolucionado y el trabajo realizado. Particularmente en sistemas como las reacciones químicas, que transcurren casi siempre a temperatura y presión constante, el calor absorbido (reacciones endotérmicas) o desprendido (reacciones exotérmicas) se mide por la entalpía de la reacción (ΔH).

La segunda Ley de la termodinámica tiene que ver con la irreversibilidad de los procesos espontáneos que ocurren en la naturaleza y derivado de esto a la eficiencia posible, de las máquinas térmicas. Por ejemplo, si se acerca un objeto caliente a uno frío, el calor pasa del caliente al frío y nunca al revés; pero una vez igualadas las temperaturas, se alcanza el equilibrio térmico. En términos del funcionamiento de las máquinas térmica, es imposible extraer una cantidad de calor (Q_C) de un foco caliente, y usarla toda ella para producir trabajo, pues alguna cantidad de calor (Q_f) debe ser expulsada a un foco frío, como se muestra en la Figura 3.3; para el funcionamiento inverso (refrigerador) se requeriría trabajo de una fuente externa a la máquina.

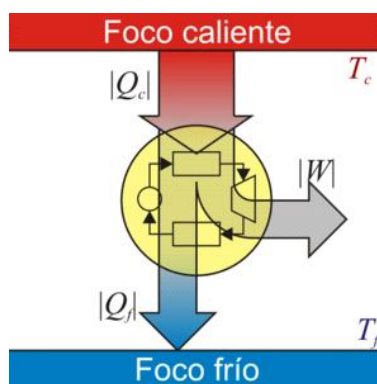


Figura 3.3 Funcionamiento de una máquina térmica realizando un ciclo de operaciones.

(Tomado de <http://laplace.us.es/wiki/index.php?title=Entropia>)

(Consultado el 20/02/2017)

En este contexto, se establece la desigualdad de Clausius, la cual nos informa, con base en el cociente Q/T , si el ciclo de operaciones que realiza la máquina es reversible (cero), irreversible (negativo) o

imposible (positivo), dejando al descubierto que este cociente, para el caso reversible, se comporta como una función de estado, la cual fue llamada entropía:

$$\oint \frac{dQ_R}{T} = 0 \quad (1)$$

Se postula entonces que, en general, en un sistema aislado ($\partial Q=0$), la entropía aumenta en los procesos irreversibles, los cuales van hacia el equilibrio; una vez alcanzado el equilibrio, la entropía permanece constante: $\Delta S_{sist} \geq 0$.

Si definimos el “universo” como el conjunto del sistema más el de los alrededores, con el que puede intercambiar calor o trabajo, podemos tratar al universo como un sistema aislado, con lo que obtenemos el *principio del aumento de entropía*:

$$\Delta S_{universo} = \Delta S_{sist} + \Delta S_{alrededores} \geq 0 \quad (2)$$

"En todo proceso real la entropía aumenta (si el proceso es irreversible) o permanece constante (si es reversible), pero nunca disminuye, a menos que esta disminución sea compensada por un aumento de entropía en los alrededores"

$$\Delta S_u \begin{cases} > 0 & \text{proceso irreversible} \\ = 0 & \text{proceso reversible} \\ < 0 & \text{proceso imposible} \end{cases}$$

Por tanto, la entropía puede considerarse como una medida de lo próximo o no que se halla un sistema del equilibrio que es un estado de mayor estabilidad, de mayor probabilidad, donde la energía está más ampliamente distribuida entre mayor cantidad de estados disponibles, que es a lo que se denomina desorden (espacial y temporal).

En el nivel biológico también se cumplen leyes de la termodinámica. Un organismo vivo es un sistema abierto que intercambia materia y energía con los alrededores; los sistemas vivos realmente no se encuentran nunca en equilibrio con su entorno y las constantes transferencias entre el sistema y los alrededores explican cómo los organismos pueden crear orden en su interior al tiempo que operan dentro de la segunda ley de la termodinámica. De acuerdo con la ecuación (2), ΔS_{sist} (ΔS del organismo) puede ser positivo, negativo o cero. Cualquier disminución de ΔS_{sist} debe, según la segunda ley, ser compensada por un incremento de ΔS_{ent} de magnitud igual o mayor que la disminución ΔS_{sist} . El estado de un organismo vivo plenamente desarrollado se mantiene aproximadamente igual de un día a otro. El organismo no se encuentra en un estado de equilibrio, pero sí cercano a un estado estacionario. Los procesos internos de reacciones químicas son

irreversibles, por tanto $\Delta S_{sistema} > 0$ en el organismo, es decir, que $\Delta S_{alrededores}$ debe ser negativo para compensar el del sistema.

La mayor parte de las reacciones químicas se desarrollan a T y P constante; bajo estas condiciones, donde el número de moles de las especies presentes puede variar a medida que los reactivos se transforman en producto, los criterios de equilibrio y sentido de las reacciones se determinan mediante la energía libre parcial molar o potencial químico (μ) para la variación del número de moles de la especie manteniendo constante los moles del resto de las especies:

$$\mu = \left(\frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T,P,n_j} \quad (3)$$

G es la energía libre de Gibbs y disminuye en los procesos reversibles hasta alcanzar un valor mínimo cuando el proceso alcanza el equilibrio; esto se representa matemáticamente como:

$$\Delta G_{T,P} \leq 0 \quad (4)$$

La energía libre de Gibbs (G), se define como H-TS, de manera que en un proceso a temperatura constante, considerando que H y S son funciones de estado y T un parámetro de estado se cumple que:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (5)$$

que es la ecuación de Gibbs-Helmholtz.

En el caso de una reacción química, la ecuación (5) nos dice que la espontaneidad de estos procesos es el resultado del balance entre un factor energético y un factor entrópico. Ambos términos se deben combinar para dar un valor negativo de la energía libre de Gibbs.

Esta ecuación es importante en el estudio de los mecanismos de reacción para el análisis de cada uno de los pasos elementales.

En los sistemas biológicos, pueden existir reacciones químicas termodinámicamente desfavorables, llamadas endergónicas; en este caso se producen acoplamientos con otros procesos exergónicos, de modo que el proceso global sea exergónico. Mediante esta estrategia, la célula puede asegurar el desarrollo de todos los procesos bioquímicos necesarios.

3.2.2 Cinética Química

La mayoría de las reacciones químicas transcurren a través de varios pasos, en lo que se denomina el mecanismo de las reacciones químicas y a cada paso se le llama reacción elemental. Por tanto, en un mecanismo de reacción, al existir varios pasos elementales, además de las especies reactivas y las especies producto aparecen especies intermediarias. Cada uno de los pasos elementales de un mecanismo de reacción se desarrolla a una determinada rapidez y todos determinan aditivamente, la rapidez global de la reacción. En caso de que un paso sea mucho más lento que el resto, la velocidad global dependerá esencialmente del paso lento. El número de moléculas que reacciona en una etapa elemental se denomina molecularidad y la mayoría de las reacciones elementales son unimoleculares o bimoleculares, siendo las reacciones trimoleculares muy poco frecuentes debido a la baja probabilidad de una colisión entre tres cuerpos.

Se ha encontrado que a nivel macroscópico, la rapidez es directamente proporcional al producto de las concentraciones de los reactivos elevados a los coeficientes estequiométricos (los cuales no son representados para un paso elemental porque equivalen a 1). De esta manera se sabe que para una reacción: $aA + bB \rightarrow yY + zZ$, la rapidez se expresa como:

$$r = kc(A)^a c(B)^b \quad (6)$$

Los coeficientes a y b son los órdenes parciales y su suma nos da el orden total del paso en cuestión; la constante k es la constante específica de rapidez de la reacción y caracteriza su cinética, pues no depende de las concentraciones, ya que se define para concentraciones unitarias. Sin embargo, al tratarse de reacciones elementales, a y b equivalen a 1 por lo que la rapidez se expresa como:

$$r = k c(A) c(B)$$

La rapidez de las reacciones químicas se determina como la variación de la concentración en el tiempo, y puede expresarse con respecto a cada una de las especies reactivo o producto; la equivalencia entre ellas se da a través de los correspondientes coeficientes estequiométricos:

$$\frac{1}{a} \left(- \frac{dc(A)}{dt} \right) = \frac{1}{b} \left(- \frac{dc(B)}{dt} \right) = \frac{1}{y} \left(\frac{dc(Y)}{dt} \right) = \frac{1}{z} \left(- \frac{dc(Z)}{dt} \right) \quad (7)$$

El efecto de la temperatura T sobre la constante de rapidez se expresa mediante la ecuación de Arrhenius, que ya mencionamos y repetimos de nuevo:

$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

Donde R es la constante de los gases; E_a es la energía de activación, y A es el factor preexponencial.

Para explicar la rapidez de las reacciones químicas a nivel molecular, se presentó por H. Eyring en 1935, la teoría del Estado de Transición (TET), donde se establece que en un proceso elemental, para que los reactivos formen los productos, deben vencer una barrera de energía a la cual se asocia un Estado de Transición (ET); la energía del ET es la energía de la barrera, llamada energía de activación E_a . A una misma temperatura, los procesos con menor barrera de activación tendrán mayor rapidez porque una mayor cantidad de especies reactivas podrá rebasar la barrera.

Las energías de activación se pueden encontrar con los métodos de la química cuántica, ya que estos métodos permiten calcular las energías potenciales totales, no solo de las especies reactivas, sino del correspondiente estado de transición. De ésta forma: $E_a = E_{ET} - \sum_{i=1} E_R$

Donde E_{ET} es la energía del estado de transición y $\sum E_R$ es la suma de las energías de las especies reactivas. Con estos datos, se puede construir una superficie de energía potencial en la cual puede seguirse la variación de la energía potencial del sistema en función de las ciertas distancias de enlace a través de las cuales se romperán algunos enlaces y se formarán otros. Haciendo un corte a través de estas distancias que dan la coordenada de reacción se obtiene el perfil energético de la reacción. En la Figura 3.4 se muestran estos perfiles, para una reacción endotérmica y para una reacción exotérmica. Nótese en estos perfiles la presencia de la barrera de energía de activación y cómo los estados de reactivos y productos dan el valor de la entalpía.

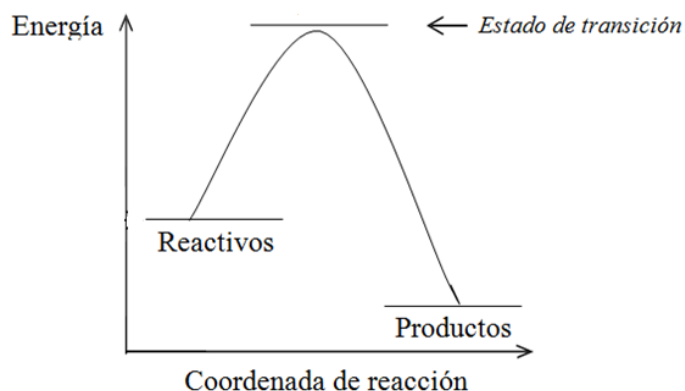


Figura 3.4 Perfil de Energía potencial, obtenida por TET y cálculos químico cuánticos para un paso elemental exotérmico.

La ecuación fundamental de la TET, considera que los reactivos se encuentran en equilibrio con el ET, como se muestra: $aA + bB \leftrightarrow (A-B)^\ddagger \rightarrow yY + zZ$, $(A-B)^\ddagger$ representa al ET.

Para obtener que:

$$k = \frac{k_B T}{h} K^\ddagger \quad (8)$$

k_B es la constante de Boltzmann, h es la constante de Planck, T la temperatura y K^\ddagger es la constante de equilibrio entre el estado de transición y los reactivos, formulada en términos de las correspondientes funciones de partición y considerando la ausencia de la función de partición vibracional asociada a la coordenada de reacción.

Considerando la termodinámica que está en un equilibrio: $\Delta G^\circ = -RT \ln K$, tendremos:

$$k = \kappa \frac{k_B T}{h} K^\ddagger = \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta^\ddagger G^\circ / RT} = \kappa e^{-\Delta^\ddagger S^\circ / R} e^{-\Delta^\ddagger H^\circ / RT} \quad (9)$$

Donde los términos ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger , son los correspondientes parámetros termodinámicos asociados a la formación del estado de transición. Si se recuerda a la ecuación de Gibbs-Helmholtz, se puede concluir que el ΔG^\ddagger , da una descripción más completa de la barrera de energía de activación y de la pertinencia cinética del paso elemental.

Finalmente es importante señalar que de acuerdo con la mecánica cuántica, en cualquier barrera de energía de valor finito, hay una posibilidad de que las partículas puedan escapar por efecto túnel a través de la misma. Con respecto a la TET, existe la probabilidad de que ciertas moléculas de reactivo pasen a producto aún cuando no formen el ET; con la suficiente energía, las moléculas de los reactivos pueden interactuar y atravesar la barrera de energía de activación. Sin embargo, este efecto debe ser insignificante para reacciones con energías de activación grandes, pero puede ser importante para reacciones con barreras relativamente bajas, ya que la probabilidad de efecto túnel aumenta cuanto menor es la altura de la barrera. Este factor puede ser calculado e introducido en la ecuación como factor de corrección y está representado por la letra griega κ , en la ecuación (9).

3.3 Química Teórica y Computacional

El importante progreso de la química cuántica en años recientes ha hecho de los cálculos mecánico-cuánticos una herramienta muy valiosa para ayudar a responder a una amplia variedad de preguntas de interés químico, cuya influencia se encuentra manifiesta en todas las ramas de la química.

El objeto de estudio de la Química Teórica y Computacional son las interacciones, colisiones y reacciones entre átomos, moléculas, moléculas y superficies, moléculas y radiación, así como la relación entre la estructura electrónica y la geometría, con las propiedades, reactividades y actividades catalíticas y biológicas de las sustancias. Sus bases se encuentran en la mecánica cuántica y la

mecánica estadística, y su formalismo ha sido desarrollado y traducido a algoritmos susceptibles de programarse; por ello la química teórica es proveedora de métodos computacionales basados en modelos teóricos combinados con interfaces gráficas.

La Química Teórica permite calcular propiedades moleculares como:

- a) Geometría de especies estables y estados de transición.
- b) Energías totales y electrónicas.
- c) Momento dipolar y polarizabilidad.
- d) Propiedades espectroscópicas, como por ejemplo, constantes de acoplamiento en RMN, frecuencias vibracionales en IR y λ_{\max} en UV-visible.
- e) Magnitudes Termodinámicas como ΔG , ΔH y ΔS .
- f) Parámetros cinéticos como por ejemplo, la constante específica de rapidez de las reacciones.

En la actualidad, es necesaria la vinculación de la química experimental y la química teórica, ya que ambas son complementarias, pues cada una permite obtener resultados que serían imposibles de obtener sin la otra.

3.3.1. Ecuación de Schrödinger para moléculas

La mecánica cuántica presenta un formalismo que permite determinar la estructura electrónica de átomos y moléculas, a través de 5 postulados. Este formalismo está basado en la ecuación de Schrödinger:

$$\hat{\mathcal{H}}\Psi = E\Psi \quad (10)$$

La mecánica cuántica describe el estado de un sistema dependiente de las coordenadas y el tiempo, utilizando la función de onda $\Psi(x, y, z, t)$, una función que da toda la información sobre el estado del sistema; sin embargo, para el estudio de propiedades y reactividades en química, el tiempo no es una variable a considerar, debido a que solo interesan los estados fundamentales y excitados, pero no el proceso de pasar de uno a otro; por ello, tanto la función de onda como la ecuación de Schrödinger, son utilizadas en su forma independiente del tiempo. Con los límites apropiados, la ecuación de Schrödinger queda de la siguiente forma:

$$\hat{\mathcal{H}}\psi(r_1, r_2, \dots, r_N) = E\psi(r_1, r_2, \dots, r_N) \quad (11)$$

El operador energía, $\hat{\mathcal{H}}$, llamado operador Hamiltoniano, es de particular importancia en la ecuación (11), pues está formado por los términos de energía cinética de los electrones y el núcleo y la energía potencial, estos últimos, para describir las interacciones electrón-electrón y electrón-núcleo.

El Hamiltoniano para un sistema de M núcleos y N electrones en unidades atómicas, se escribe de la forma siguiente forma:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2}\sum_{\alpha=1}^M \nabla_{\alpha}^2 - \frac{1}{2}\sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \sum_{\alpha=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_{\alpha}}{r_{i\alpha}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{\alpha=1}^M \sum_{\beta>\alpha}^M \frac{Z_{\alpha}Z_{\beta}}{r_{\alpha\beta}} \quad (12A)$$

Donde ∇_{α}^2 es el laplaciano ($\nabla^2 = \partial^2/\partial x^2 + \partial^2/\partial y^2 + \partial^2/\partial z^2$) respecto a las coordenadas del α -ésimo núcleo y ∇_i^2 opera respecto a las coordenadas del i -ésimo electrón.

- $r_{i\alpha}$ es la distancia entre el i -ésimo electrón y el α -ésimo núcleo y r_{ij} es la distancia entre los electrones i -ésimo y j -ésimo.

- $r_{\alpha\beta}$ es la distancia entre los núcleos α -ésimo y β -ésimo, cuyas cargas nucleares son Z_{α} y Z_{β} respectivamente; en los dos últimos términos, las sumas corren sobre todos los pares no repetidos.

Además, se puede demostrar que el primer término ($-\frac{1}{2}\sum_{\alpha=1}^M \nabla_{\alpha}^2$) es despreciable frente al segundo ($-\frac{1}{2}\sum_{i=1}^N \nabla_i^2$) y que el último por ser de naturaleza clásica ($\sum_{\alpha=1}^M \sum_{\beta>\alpha}^M \frac{Z_{\alpha}Z_{\beta}}{r_{\alpha\beta}}$), puede ser evaluado de forma independiente, considerando además que los cálculos moleculares se realizan para posiciones fijas de los núcleos. Por tanto, el operador hamiltoniano electrónico quedaría:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2}\sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \sum_{\alpha=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_{\alpha}}{r_{i\alpha}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (12B)$$

A partir del hamiltoniano (12B) se obtiene la energía electrónica $E_{el}(\mathbf{R})$ y añadiendo la energía de interacción núcleo – núcleo V_{NN} se obtiene la energía potencial del sistema, $U(\mathbf{R})$:

$$U(\mathbf{R}) = E_{el}(\mathbf{R}) + V_{NN} \quad (13)$$

La presencia de términos bielectrónicos en la expresión del hamiltoniano, no hace posible resolver la ecuación de Schrödinger de manera exacta, por lo que es necesario usar aproximaciones.

La resolución de la ecuación de Schrödinger puede efectuarse mediante el Método Variacional, el cual a su vez se basa en la existencia del Principio Variacional.

3.3.2 Método Variacional para resolver la ecuación de Schrödinger

El método Variacional se desarrolla a partir del Teorema Variacional, el cual enuncia que: *Dado un sistema mecánico – cuántico cuyo operador \hat{H} es independiente del tiempo, y cuyo valor propio de la energía más bajo es E_0 , si Ψ es cualquier función dependiente de las coordenadas del sistema, normalizada, bien comportada y que satisface las condiciones límite del sistema (función de prueba), entonces:*

$$\int \Psi^* \hat{H} \Psi dV \geq E_o \quad (14)$$

Donde E_o es la energía exacta del sistema en el estado fundamental. La integral se extiende en todo el espacio atómico o molecular. De acuerdo con el teorema Variacional, si disponemos de una función de prueba con parámetros ajustables, cuyos valores deben hacer mínima la energía, podremos encontrar, mediante un proceso iterativo de minimización, un valor de energía y función muy cercanos al valor exacto.

Considerando la función de prueba Ψ expandida como combinación lineal de las funciones ϕ_i :

$$\Psi = \sum_i C_i \phi_i \quad (15)$$

Sustituyendo en el primer miembro de (14) y trabajando con la igualdad, tendremos que:

$$E(\Psi) = \sum_{i,j} C_i^* C_j \int \phi_i^* \hat{H} \phi_j dV_o \quad (16)$$

Considerando que las funciones ϕ_i son funciones ortonormales y propias del operador \hat{H} se obtiene:

$$E(\Psi) = \sum_{i,j} C_i^* C_j E_o \int \phi_i^* \phi_j dV$$

$$E(\Psi) = \sum_{i,j} C_i^* C_j E_o \delta_{ij}, \quad \text{pero } i = j \text{ y } \delta_{ij} = 1$$

Y de acuerdo a la ecuación (14), se llega a:

$$E(\Psi) \geq E_o \quad (17)$$

La ecuación (17) nos dice que la energía obtenida a partir de cualquier función de onda aproximada siempre será mayor que E_o . Por tanto, cualquier variación de la función de prueba respecto a los parámetros C_j , darán un valor de energía más bajo, y por tanto, más próximo al valor exacto. Este procedimiento sistemático de hacer estas variaciones sucesivas que permitan obtener las soluciones de E_i y Ψ mejoradas fue introducido por Hartree en 1928 conocido como el método del campo autoconsistente (SCF: Self Consistent Fields, por sus siglas en inglés).

3.3.3 Ecuaciones de (Hartree – Fock) –Roothaan

Las ecuaciones de Hartree-Fock son un procedimiento sistemático que permite encontrar las mejores formas posibles para los OM de una molécula. En este método, la función de onda molecular se

escribe como un producto antisimétrico de funciones espín orbital, llamado determinante de Slater, $D(1,2,3,\dots,N)$.

El operador es definido como la suma de un operador unielectrónico con sus términos energía cinética y de interacción electrón-núcleo y un operador bielectrónico, correspondiente a las interacciones electrón - electrón.

Aplicando el teorema variacional, tendríamos la integral variacional que puede ser desdoblada en una suma de integrales mono y bi-electrónicas (Parr, 1963); estas últimas son llamadas integrales de Coulomb (J_{ij}) e integrales de intercambio (K_{ij}). Al considerar el Principio de Exclusión de Pauli, las sumas sobre i y j se extienden sobre los $n/2$ orbitales espaciales. Finalmente, representando estas integrales como operadores, obtenemos el operador unielectrónico de Hartree-Fock (HF):

$$\hat{F}(1) = \hat{h}_i(1) + \sum_{j=1}^{n/2} \left[2\hat{J}_j(1) - \hat{K}_j(1) \right] \quad (18)$$

$$\hat{J}_j(1) = \int |\phi_j(2)|^2 \frac{1}{r_{12}} dv_2 \quad \text{y} \quad \hat{K}_j(1) = \phi_j(1) \int \frac{\phi_j(2)}{r_{12}} dv_2$$

El operador de Coulomb $\hat{J}_j(1)$ es la energía potencial de interacción entre el electrón 1 y una nube de electrones con densidad electrónica $|\phi_j(2)|^2$; el factor 2 en la ecuación (18) aparece debido a que hay 2 electrones en cada orbital. El operador $\hat{K}_j(1)$ se deriva de la propiedad de los electrones de intercambiar sus posiciones.

Así, considerando que $\hat{F}(1)\phi_i(1) = \varepsilon_i\phi_i(1)$ y que $\phi_i(1)$ es función propia del operador \hat{F} , y que:

$$\varepsilon_i = \int \phi_i^* \hat{F}(1)\phi_i(1) dv_1 \quad (19)$$

En 1951, Roothaan propuso expandir los OM como combinación lineal de una serie de funciones base atómicas (χ_i); si b es suficientemente grande y las funciones se eligen bien:

$$\phi_i = \sum_{s=1}^b c_{si} \chi_s \quad (20)$$

Donde las letras r,s,t, \dots designan a las funciones base (OA) y las letras i,j,k, \dots a los OM.

Cuya integración da:

$$\sum_{s=1}^b c_{si} (\hat{F}_{rs} - \varepsilon_i S_{rs}) = 0$$

$$F_{rs} = \langle \chi_r | \hat{F} | \chi_s \rangle$$

$$S_{rs} = \langle \chi_r | \chi_s \rangle$$

Las ecuaciones anteriores, forman una serie de ecuaciones lineales y homogéneas, cuyas raíces dan los valores de energía que puede ser obtenida por una vía matricial mediante un cálculo SCF:

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

Las funciones de onda de (Hartree-Fock-Roothaan) juegan un papel muy importante en la química cuántica de las moléculas y aunque constituyen una mejora, es todavía una aproximación a la verdadera función de onda. Esta función asigna cada par de electrones a su propio orbital y los cálculos se realizan considerando las repulsiones interelectrónicas de una manera promediada. Sin embargo, los electrones no están exactamente moviéndose dentro de una distribución estadística de carga, sino que interaccionan uno con otro instantáneamente, acomodan constantemente sus posiciones para minimizar la energía del sistema (correlación electrónica) e intercambian sus posiciones; este efecto no tiene análogo clásico y debe ser descrito dentro del Hamiltoniano, por lo que se requiere de otros métodos más allá de (Hartree-Fock-Roothaan) que se conocen como post-Hartree-Fock. Sin embargo, estos métodos son muy demandantes en memoria y tiempo de cómputo, por lo que, cuando se requiere el estudio de sistema con muchos electrones no resultan adecuados.

3.3.4 Teoría de Funcionales de la Densidad

Esta teoría del funcional de la densidad (DFT: Density Functional Theory, por sus siglas en inglés) es una alternativa apropiada para el tratamiento de los sistemas atómicos o moleculares.

El método del DFT no intenta calcular la función de onda molecular, sino parte de la densidad de probabilidad electrónica molecular, $\rho(x, y, z)$, para calcular la energía electrónica molecular.

3.3.4.1 Primer Teorema de Hohenberg- Kohn

La DFT se encuentra basada en el teorema establecido por Hohenberg y Kohn (1964), probando que para moléculas con un estado basal no degenerado, la energía molecular de ese estado fundamental, la función de onda y todas las demás propiedades electrónicas, son un funcional de la densidad electrónica $\rho_0(x, y, z)$ de ese estado fundamental. Así, la energía electrónica del estado fundamental E_0 es un funcional de ρ_0 que se representa como: $E_0 = E_0[\rho_0]$.

El término interacción electrón - núcleo es el *potencial externo* (actuando sobre el electrón i), y el hamiltoniano entonces puede reescribirse como:

$$\hat{\mathcal{H}} = -\frac{1}{2}\sum_{i=1}^n \nabla_i^2 + \sum_{i=1}^n v(\mathbf{r}_i) + \sum_j \sum_{i>j} \frac{1}{r_{ij}} \quad (21)$$

$$v(\mathbf{r}_i) = -\sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{r_{i\alpha}}$$

Por tanto, para sistemas con un estado basal no degenerado, la densidad electrónica en el estado fundamental $\rho_0(\mathbf{r})$ está determinada por el potencial externo y el número de electrones. Por tanto, la función de onda y la energía, están determinadas por la densidad electrónica del estado fundamental. De esta forma, la formulación se realiza en términos de funcionales y no de un hamiltoniano:

$$E_0 = E[\rho_0] = \bar{T}[\rho_0] + \bar{V}_{ee}[\rho_0] + \int \rho_{pr} v(r) dr \quad (22)$$

Sin embargo, los funcionales de la energía cinética y electrón-electrón, $\bar{T}[\rho_0]$ y $\bar{V}_{ee}[\rho_0]$ son desconocidos e independientes del potencial externo, por lo que debe encontrarse, en primer lugar un procedimiento para encontrar su forma explícita y poderlos evaluar; y en segundo lugar un algoritmo para determinar la energía a partir de la ecuación (22).

3.3.4.2 Segundo Teorema Variacional de Hohenberg- Kohn

En un segundo teorema, Hohenberg- Kohn demostraron que la verdadera densidad electrónica del estado fundamental, minimiza el funcional energía, de la misma forma en que, como ya se explicó en la sección 3.3.4.1, la función de onda minimiza la integral variacional; de ésta forma se disponía del algoritmo variacional para encontrar el valor de la energía.

Dado el funcional variacional de la energía y una densidad electrónica de prueba ρ_{pr} :

$$E_{var}[\rho_{pr}] = \bar{T}[\rho_{pr}] + \bar{V}_{ee}[\rho_{pr}] + \int \rho_{pr} v(r) dr$$

Entonces:

$$E_{var}[\rho_{pr}] \geq E_{var}[\rho_0] = E_0 \quad (23)$$

3.3.4.3 El método de Kohn-Sham

Kohn y Sham (1965) idearon un método práctico para obtener ρ_0 y para obtener E_0 a partir de ρ_0 , considerando la existencia de un funcional desconocido que debía aproximarse.

El método de Kohn – Sham (KS) utiliza un sistema de referencia ficticio de n electrones no interactuantes que experimentan la misma energía potencial $v_s(r_i)$ y cuya densidad electrónica en el estado fundamental $\rho_s(\mathbf{r})$, es igual a la exacta, $\rho_o(\mathbf{r})$. Entonces,

$$\Delta\bar{T}[\rho] = \bar{T}[\rho] - \bar{T}_s[\rho] \text{ y } \Delta\bar{V}_{ee}[\rho] = \bar{V}_{ee}[\rho] - \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2$$

se define el funcional de la energía de intercambio y correlación como: $E_{ic} = \Delta\bar{T}[\rho] + \Delta\bar{V}_{ee}[\rho]$ por lo que finalmente el funcional de la energía queda como:

$$E_o = E[\rho] = \bar{T}_s[\rho] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 + \int \rho v(r) dr + E_{ic} \quad (24)$$

Los tres primeros términos son fáciles de evaluar y el último aunque es pequeño, no es fácil de evaluar. Por tanto, para obtener un cálculo DFT-KS preciso, debe obtenerse E_{ic} con una buena aproximación, con la problemática de que contiene los siguientes componentes de la energía que son de naturaleza no clásica:

- Energía cinética de correlación
- Energía de Intercambio
- Energía de correlación electrónica
- Corrección de autointeracción que elimina un término de interacción consigo mismo (SIC)

3.3.4.4 La aproximación densidad local (LDA) y de densidad de espín local (LSDA)

Hohenberg y Kohn mostraron que al variar la densidad electrónica de forma lenta, considerando un modelo de gas de electrones homogéneo, $E_{ci}[\rho]$ es dada con precisión por la expresión:

$$E_{ci}^{LDA}[\rho] = \int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon_{ci}(\rho) d\mathbf{r} \quad (25)$$

Donde $d\mathbf{r} \equiv dx dy dz$, y $\varepsilon_{ci}(\rho)$ es la energía de intercambio y correlación por electrón en un gas de electrones homogéneo con la densidad electrónica ρ . Derivando el funcional energía de obtiene el potencial de intercambio y correlación v_{ci} en la aproximación densidad local.

$$v_{ci}^{LDA} = \frac{\delta E_{ci}^{LDA}}{\delta \rho} = \varepsilon_{ci}(\rho(\mathbf{r})) + \rho(\mathbf{r}) \frac{\partial \varepsilon_{ci}(\rho)}{\partial \rho} \quad (26)$$

Puede demostrarse que E_{ci} puede ser escrito como la suma de las partes de intercambio y de correlación:

$$\varepsilon_{ci}(\rho) = \varepsilon_i(\rho) + \varepsilon_c(\rho) \quad (27)$$

La aproximación LDA da buenos resultados cuando la densidad del sistema varía de modo extremadamente lento con la posición y para sistemas cerrados. Uno de los potenciales LDA más utilizados ha sido el de Vosko, Wilk y Nussair (VWN) propuesto en 1980.

Cuando la capa es abierta, es decir, tiene electrones no apareados, LDA da pobres resultados por lo que es necesario considerar otras aproximaciones.

Para considerar los espines se asignan orbitales diferentes para electrones con diferentes espines, lo cual mejora las propiedades calculadas para estos sistemas. Para ello se tratan separadamente las densidades electrónicas de los electrones con espines α y β , por tanto, el funcional de la energía depende de ambas densidades electrónicas:

$$E_{ci}^{LSDA}[\rho^\alpha, \rho^\beta] = \int \rho(r) \varepsilon_{ci} \rho^\alpha \rho^\beta dr \quad (28)$$

A pesar de que ρ en una molécula no es una función de la posición que varíe suavemente, el LSDA trabaja bien para calcular geometrías de equilibrio molecular, frecuencias vibracionales y momentos dipolares, incluso de compuestos de los metales de transición. Sin embargo no es suficiente en el cálculo de energías de atomización por lo que se requiere de funcionales mejorados.

3.3.4.5 Funcionales no locales

Un paso más allá de LDA fue considerar la no localidad de la densidad electrónica y suponer que ésta ya no es constante ni varía muy lentamente.

Estratégicamente se optó por desdoblar el funcional E_{ci} en una parte de intercambio y la otra de correlación, los cuales se modelarían separadamente; de manera que:

$$E_{ci} = E_i + E_c \quad (29)$$

Funcionales de Gradiente Generalizado

La corrección a la variación de la densidad electrónica obtenida LDA y LSDA, para sistemas donde ρ no varía suavemente con la posición es mediante funcionales donde se introduce el gradiente de la densidad: los primeros intentos que toman en cuenta la no localidad del funcional fue mediante un desarrollo en serie de la energía de intercambio y correlación, utilizando obviamente la densidad electrónica como la variable básica. A ésta forma de aproximación se le llamó “de gradiente generalizado” (GGA: Generalized Gradient Aproximation, por sus siglas en inglés):

$$E_{ci}^{GGA}[\rho^\alpha, \rho^\beta] = \int f(\rho^\alpha(r), \rho^\beta(r), \nabla \rho^\alpha(r), \nabla \rho^\beta(r)) dr \quad (30)$$

Donde f es una función de las densidades de espín y de gradiente.

Uno de los principales obstáculos de estos funcionales fue la falta de convergencia y el uso de parámetros empíricos. Entre los funcionales GGA de intercambio tenemos el funcional de Perdew y Wang de 1986, designado como PW86, el funcional de Becke de 1988, denotado como B88, y el funcional de Perdew y Wang 1991 (PW91). Ninguno de ellos tiene parámetros empíricos, lo cual los hace confiables.

Dentro de los funcionales GGA de correlación se tiene al funcional de Lee – Yang – Parr (LYP), el funcional de correlación de Perdew – Wang 1991 (PW91), y el funcional de correlación de Becke llamado (B96). El funcional de Perdew, Burke y Ernzerhof (PBE) que también ha sido desarrollado como funcional de intercambio y correlación ha mostrado buen desempeño en la predicción de propiedades físicas y químicas de átomos, moléculas y sólidos.

Cualquier funcional de intercambio se puede combinar con cualquier funcional de correlación. Así la notación BLYP denota un cálculo efectuado con el funcional de intercambio de Becke 1988 (B) y el funcional de correlación de Lee-Yang-Parr (LYP).

Estos funcionales no sólo dan buenas geometrías de equilibrio, frecuencias vibracionales y momentos dipolares, sino también energías de atomización molecular precisas.

Funcionales meta-GGA

Estos funcionales incluyen la segunda derivada del laplaciano de la densidad electrónica (∇^2) que representa la densidad de la energía cinética; este es un avance en la descripción del funcional de intercambio y correlación pues incluye además de la densidad electrónica y el laplaciano como en los funcionales de tipo GGA, la segunda derivada del laplaciano. Dentro de ésta categoría se encuentra el funcional diseñado por Tao, Perdew, Staroverov y Scuseria (TPSS). Otra variante de estos funcionales ha sido la de incorporar un término de intercambio exacto (EE: Exact Exchange, por sus siglas en inglés) o intercambiar mezclas de términos LDA, GGA y EE. A estos se les conoce como híbridos. Un ejemplo muy popular por los buenos resultados que da es el funcional de B3LYP donde aparece integrada la parte de intercambio y de correlación. En este funcional, hay tres parámetros que han sido ajustados empíricamente a partir de energías de atomización y potenciales de ionización, razón por la que ha sido tan controversial a pesar del buen desempeño que tiene.

Entre los funcionales meta-GGA se encuentra el grupo de funcionales diseñado por Donald Truhlar, llamados funcionales de Truhlar y tienen también parámetros de ajuste. Todos ellos comienzan con la letra M (Minnesota), haciendo alusión al lugar donde opera el grupo. Ejemplos de estos funcionales son el funcional M06-L de tipo GGA y los funcionales M05, M05-2X, M06 y M06-2X, todos funcionales híbridos de tipo meta-GGA. Particularmente en este trabajo se trabajó la parte con efecto de solvente con el funcional M05-2X (Zhao, Schultz y Truhlar, 2006) el cual presenta un 56% de intercambio, pues los resultados indican una clara tendencia a mejorar la geometría, simetría y energía de estabilización respecto de los resultados de tipo MP2, cuando el porcentaje de intercambio en el funcional aumenta (Kozuch y Martin, 2013; Galvan, Agacino, Franco y Gomez, 2017). Además, varios estudios han evaluado su buen desempeño (Hohenstein, Chill y Sherrill, 2008; Zhang, Ma y Wang, 2012).

3.3.5 Funciones base

El éxito de los cálculos en los métodos mecano-cuánticos depende también de la adecuada elección de la función base (χ), que expresan a los OM como combinación lineal de una base de orbitales atómicos como se formuló en la ecuación (15). Los criterios de selección de esta base dependen del sistema molecular, el nivel de la teoría a emplear y el problema a resolver.

Inicialmente, las funciones base tomadas como orbitales atómicos para generar los OM utilizaban los orbitales de tipo Slater (STO); estos orbitales se centraban en la parte radial, tomando la parte angular de las soluciones de armónicos esféricos obtenidas en el tratamiento mecánicocuántico del átomo de hidrógeno. Pero en moléculas poliatómicas, la presencia de más de dos átomos causa problemas en la evaluación de las integrales necesarias, debido al tiempo consumido, elevando el costo de cómputo. Para 1950, Boys propuso usar funciones tipo gaussiana en los orbitales atómicos en lugar de los STO originalmente propuestos por Slater, ya así optimizar el tiempo de evaluación de las integrales moleculares. En las gaussianas, a diferencia de las funciones de Slater, el término exponencial contiene a r^2 : $R_{n,l} = N r^{n-1} e^{-\zeta r^2}$ siendo ζ un exponente que caracteriza al orbital y que fue definido inicialmente por Slater.

Una gaussiana cartesiana centrada en el átomo b se define como: $g_{ijk} = N x_b^i y_b^j z_b^k e^{-\zeta r}$. Así, los coeficientes i, j, k y ζ pueden ser ajustados, lo cual le da mucha plasticidad a la función; por otra parte, mediante combinaciones lineales (CL) de ciertas funciones gaussianas, llamadas *primitivas* (FGP),

pueden obtenerse otras funciones gaussianas llamadas *contraídas* (FGC), cuyas CL predicen mejor los nodos de la función. También existen funciones difusas donde el exponente ζ es pequeño.

Hehre, Stewart y Pople (1969) fueron los primeros en estimar coeficientes y exponentes óptimos para reproducir STOs (Slater Type Orbitals) con GTOs (Gaussian Type Orbitals) contraídas para un gran número de átomos de la Tabla Periódica. Los trabajos posteriores fueron generando funciones más óptimas cada vez, pero también más extensas.

Surgieron primeramente las funciones de base mínima, las cuales utilizan sólo las funciones imprescindibles para representar todos los electrones del sistema, observándose una función contraída por cada orbital. Por ejemplo, la función STO-3G, emplea una FGC para la capa interna o core y otra FGC para la capa de valencia, pero cada FGC se obtiene de la CL-3FGP. Las limitaciones que se fueron encontrando para las bases mínimas se trataron de resolver considerando más de una FGC por orbital, surgiendo las funciones *doble zeta* y *triple zeta* en la cual se utilizan 2 y 3 FGC por cada orbital atómico.

Otra alternativa para mejorar las funciones fue aumentar el número de éstas utilizadas para describir a los electrones de valencia y mantener una función para la capa interna. Esta propuesta se fundamenta considerando que los electrones de la capa interna influyen muy pocos en las propiedades de las moléculas y los orbitales varían muy poco de una molécula a otra. A éstas funciones se les llamó de *valencia desdoblada* (SV: Split Valence, por sus siglas en inglés). Otras dos características de éstas funciones SV son: (i) los exponentes orbitales y coeficientes de contracción se obtienen variacionalmente de las energías de HF; y (ii) las FGP utilizadas para una función base, ya no se utilizan para otras funciones con el mismo momento angular (ℓ).

Entre estas bases podemos señalar:

- 6-311G: Cada electrón de la capa interna se define por una FGC, obtenida por la CL-6FGP y cada electrón de la capa de valencia se describe una función interna formada por la CL-3FGP y dos formadas por 1FGP.
- 6-31G*: A la base 6-31G seis funciones de polarización gaussianas cartesianas tipo *d* a cada uno de los átomos desde el Li⁺ hasta el Ca²⁺, y diez funciones de polarización gaussianas cartesianas tipo *f* para cada uno de los átomos desde el Sc hasta el Zn. La base 6-31 G** añade a la serie 6-31G* una serie de tres funciones de polarización gaussianas tipo *p* para cada átomo de hidrógeno y de helio.

- 6-311+G* y 6-311++G**: Para los átomos diferentes del Hidrógeno, si a la función 6-311G* se le añade un conjunto de funciones difusas (s, p_x, p_y, p_z), obtenemos la función 6-311+G*; si a ésta última se le añaden gaussianas difusas para los átomos de Hidrógeno, obtenemos la función 6-311++G**. Estas funciones difusas tienen un exponente orbital (ζ) muy pequeño; se recomienda para calcular aniones, moléculas que heteroátomos con pares libres y enlaces de hidrógeno, donde se presenta una densidad electrónica importante a grandes distancias del núcleo.

En esta investigación, se trabajó con la función 6-311++G**, ya que las moléculas forman anillos y sistemas π que contienen átomos con pares libres, presentándose estructuras de ión-radical o ión, enlaces de hidrógeno y desprotonaciones, por lo que no solo los heteroátomos (N, O) del período 2, sino también los átomos de hidrógeno, deben ser exactamente descritos.

CAPÍTULO 4: MÉTODO Y METODOLOGÍA

El presente capítulo pretende describir el procedimiento que se llevó a cabo durante el proyecto que sustenta esta tesis. Los cálculos realizados en dicho procedimiento, se llevaron a cabo en dos fases: fase gas y con efecto de solvente. En cada fase, se realizaron cuatro etapas principalmente conforme se fue desarrollando el proyecto, las cuales se describirán a detalle más adelante. De igual manera, se describen las condiciones de cálculo empleadas.

4.1 DESCRIPCIÓN DE LAS CONDICIONES DE CÁLCULO

4.1.1 La Supercomputadora MIZTLI

Los cálculos se realizaron por medio de la supercomputadora denominada *Miztli*; éste es un cluster de tipo HP Cluster Platform 3000SL.

Los parámetros relacionados con el tipo de cálculo, la cantidad de procesadores y memoria a utilizar y la geometría del sistema a calcular, se suben en forma de un archivo llamado *archivo de entrada* o *archivo input*, los cuales son interpretados como coordenadas cartesianas o coordenadas internas (distancias de enlace, ángulos de enlace, ángulos diedros, etc.) obtenidas ya sea de una base de datos en la que se encuentra la propia molécula o una molécula parecida; o haciendo uso de tablas de parámetros geométricos.

4.1.2 Softwares empleados: Gaussian 09 y el Gaussian View

El *Gaussian 09* (G09) es el software donde van a optimizarse las geometrías de las biomoléculas en estudio y a calcularse los parámetros de carga y de energía, a través del *archivo de entrada* ya mencionado, en el cual están definidos los detalles del cálculo a realizar y la geometría del sistema a calcular. Como el formalismo químico cuántico empleado es el de la Teoría de Funcionales de la Densidad, el cual se encuentra implementado en el G09, el *archivo de entrada* al definir el nivel de teoría, debe hacer referencia al funcional de intercambio y correlación a utilizar, así como a la serie base y otros detalles que refinarán el cálculo. Los cálculos se realizaron en dos etapas:

- En la primera etapa se trabajó en fase gas utilizando el funcional MPWB95 (Zhao, Schultz y Truhlar, 2004), en combinación con la base 6-311++G (d,p) (ver capítulo 3). El objetivo en ésta etapa fue obtener las geometrías de equilibrio en una primera fase de optimización y evaluar el desempeño del funcional durante los cálculos realizados.
- En la segunda etapa se realizaron los cálculos con efecto de solvente.

Debido a problemas para obtener adecuadamente las barreras de activación y con la convergencia de algunos estados de transición observados, se decidió cambiar el funcional, seleccionando el meta-híbrido M05-2X (Zhao et al., 2006), el cual tuvo mejor desempeño. Este es un funcional de alto desempeño, con un 56% de intercambio HF y recomendado para cálculos termodinámicos y cinéticos e interacciones no covalentes, lo cual podría ser útil en el estudio de estados de transición. La base utilizada, 6-311++G (d,p) se mantuvo sin cambios.

Existe otro paquete, el *Gaussian View*, en el cual pueden visualizarse las geometrías inicial y final de la molécula y otros resultados de los cálculos como mapeo de orbitales y cargas, potencial electrostático, etc. El *Gaussian View*, permite obtener datos específicos de la geometría molecular como distancias y ángulos de enlace, entre otros.

4.2 DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS REALIZADAS EN FASE GAS Y CON EFECTO DE SOLVENTE

Tanto para los cálculos en fase gas, como los cálculos con efecto de solvente, se trabajó a través de cinco etapas básicas:

- Modelado molecular
- Optimización de geometrías de estados de mínima energía (reactivos y productos de cada etapa elemental del mecanismo y posibles intermediarios).
- Búsqueda y optimización de los Estados de Transición, para cada etapa elemental.
- Cálculos de magnitudes termodinámicas y cargas.

A continuación se describirá a detalle cada etapa, recalcando siempre la importancia de cada una, para el desarrollo de la investigación y el correcto análisis de los resultados.

Etapa 1: Modelado molecular (Visualización en Gaussian View)

Tomando como referencia el mecanismo de reacción propuesto en el artículo de Essigmann y Neeley (2006), se obtuvieron las geometrías iniciales de las moléculas propuestas a partir de las coordenadas cartesianas o coordenadas internas de cada una de ellas utilizando el software anteriormente descrito, Gaussian View, permitiéndonos generar un archivo de entrada para cada molécula modelada en cada paso propuesto del mecanismo de reacción.

Etapa 2: Optimización de geometrías de estados de mínima energía (Cálculos con G09)

Una vez que se obtuvo la geometría inicial de cada molécula y su correspondiente archivo de entrada, se sube a la plataforma *Unix-Linux* para efectuar el cálculo de energía en la Supercomputadora MIZTLI. Es muy importante definir en el archivo de entrada la ruta, que incluye como ya se señaló, funcional, base y tipo de cálculo. Es importante mencionar que el tipo de cálculo incluye el medio en el que se están optimizando las geometrías.

El cálculo de la energía, puede realizarse para una geometría en particular que no necesariamente es la más probable; este cálculo se llama “de un solo punto de energía”. Cuando se tiene una geometría aproximada, el cálculo recomendado, es aquel en el cual el programa busca la geometría que corresponde con la menor energía; este cálculo se llama “optimización de geometría” y nos da la geometría más probable para la molécula, o geometría de equilibrio; este fue el tipo de cálculo de energía realizado en este trabajo de tesis para todas las moléculas consideradas como mínimos de energía (reactivos y productos de cada etapa elemental del mecanismo y posibles intermediarios). Cuando se realiza una optimización de geometría, la molécula se va moviendo a lo largo de una superficie de energía potencial (SEP) en función de la geometría que va adquiriendo, pudiendo arribar a diversos puntos críticos como se observa en la Figura 4.1:

- Mínimo global
- Mínimo local
- Punto de silla

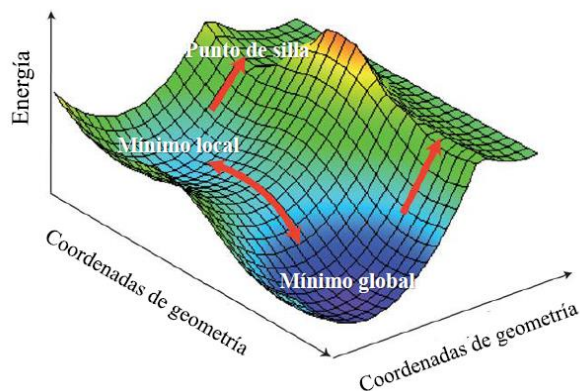


Figura 4.1 Superficie de Energía Potencial. (Tomado y adecuado de http://www.nature.com/nchem/journal/v4/n3/fig_tab/nchem.1244_F2.html)
(Consultado el 27/02/2017)

En nuestro caso estamos buscando el mínimo global, que como ya se mencionó, corresponde a la energía más baja y nos indica la conformación más probable. Solo existe un mínimo global para cada molécula y para comprobar que en efecto estamos en ese punto, se realiza un cálculo de modos de frecuencia vibracionales, el cual debe dar positivo para todas las frecuencias calculadas. Finalmente, se verificaron los archivos de salida procurando que los cálculos realizados hayan convergido totalmente y terminado correctamente.

Etapas 3: Determinación de Estados de Transición (Cálculos de Frecuencias)

Para cada paso elemental del mecanismo en estudio, fue establecida la geometría aproximada del estado de transición y optimizada. En este caso, nos interesa arribar al punto de silla de menor energía, que es el punto crítico característico de este tipo de especie. Para este punto debemos obtener en el cálculo de frecuencias una sola frecuencia negativa o imaginaria. Esto fue realizado y confirmado para cada uno de los estados de transición modelados.

Recordemos que el *estado de transición* es una configuración intermedia entre los reactivos y los productos de un paso elemental, y corresponde a un máximo de energía a lo largo de la coordenada de reacción.

En la figura 4.2, se muestra el perfil de energía de una reacción elemental; nótese que el punto de silla tiene la característica de que conecta a dos valles (reactivos y productos). La coordenada de reacción

es una magnitud geométrica que cambia a lo largo de la conversión de reactivos a productos (para más detalles, consultar capítulo 3).

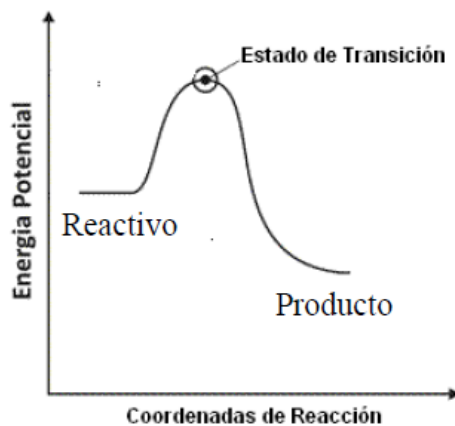


Figura 4.2 Perfil de Energía potencial.

Etapas 4: Cálculo de Magnitudes Termodinámicas y cargas

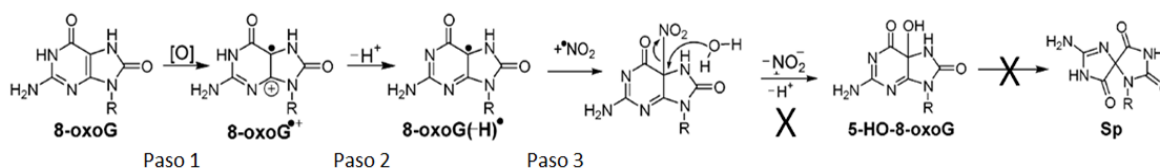
Para cada una de las especies optimizadas se calcularon las correspondientes magnitudes termodinámicas y las cargas atómicas de Hirshfeld, para así poder evaluar la viabilidad energética del mecanismo en estudio y explicar la distribución de la densidad electrónica y su reactividad respectivamente.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Aspectos generales del mecanismo

A continuación se presentan los resultados de los cálculos realizados en el estudio del mecanismo de formación del producto de oxidación de la Guanina 2-imino-5,5'-espirodihidantoina (Sp), por la vía del radical NO_2^\bullet , para evaluar su pertinencia cinética y termodinámica. Recordemos que se ha tomado como referencia inicial, uno de los mecanismos sugeridos por Essigmann y Neeley (2006) en la revisión bibliográfica por él realizada.

Como se puede observar en el **esquema 1**, el mecanismo parte de la 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG), por lo que ésta será la molécula de partida para nuestro estudio y le llamaremos compuesto reactivo (CR). Como ya se ha señalado anteriormente, la 8-oxoG se obtiene de la oxidación de la Guanina, el cual es un proceso muy favorecido, ya que presenta una energía de ionización y un potencial de reducción mucho más bajo que la Guanina (Saito, Nakamura, Nakatani, Yoshioka, Yamaguchi y Sugiyama, 1998; Cadet, Douki y Ravanat, 2006); si además consideramos que la presencia en organismos vivos de la 8-oxoG ya ha sido demostrada experimentalmente (Saito et al., 1998), tenemos dos razones para considerar perfectamente válido que ésta especie sea el punto de partida para el estudio de éste mecanismo, como han propuesto Essigmann y Neeley (2006).



Esquema 1: Mecanismo Propuesto

El mecanismo anterior propuesto por Essigmann y Neeley (2006), presenta un primer paso de oxidación, en el que se forma la 8-oxoG⁺, un catión-radical con características de ácido de Lewis, lo que va a propiciar una posterior desprotonación para formar la 8-oxoG(-H)[•]; se ha propuesto que uno de los caminos para formar el producto Sp es a través de la interacción con el radical NO_2^\bullet , que junto a una molécula de agua, propicia la posterior salida como HNO_2 , quedando entonces el OH^- del agua adicionado para formar la 5-HO-8-oxoG, que puede llevar a formar el POG Sp.

En nuestro trabajo, nos dimos a la tarea de calcular las especies sugeridas y encontrar los posibles estados de transición. Como resultado de este trabajo, después del paso 3, aparecieron 5 pasos elementales más, en lugar de los dos que presentamos en el esquema 1, razón por la que hemos marcado con una cruz los pasos 4 y 5. En el **esquema 2** se presenta nuestra propuesta de mecanismo.

Ye, Muller, Luo, Mayne, Shallop, Jones y Burrows (2003) han estudiado la oxidación de la Guanina y la 8-oxoG (Hickerson, Prat, Muller, Foote y Burrows, 1999; Hickerson, Chepanoske, Williams, David y Burrows, 1999), así como ciertos productos POG importantes como los productos Sp y Gh (Luo, Muller, Rachlin y Burrows, 2000; Ye, Muller y Burrows, 2006) por la vía experimental y teórica; posteriormente, Munk et al. (2008) exploraron algunos caminos para la transformación de la 8-oxoG en Sp; en este sentido han planteado 3 posibles caminos:

(A/B) Oxidación y desprotonación de la 8oxoG para formar la 8-oxoG^{OXID} y posterior hidrólisis con una molécula de H₂O interactuando con una molécula de 8oxoG^{OXID}. Los caminos (A) y (B) solo se diferencian en el paso en que se produce la hidrólisis.

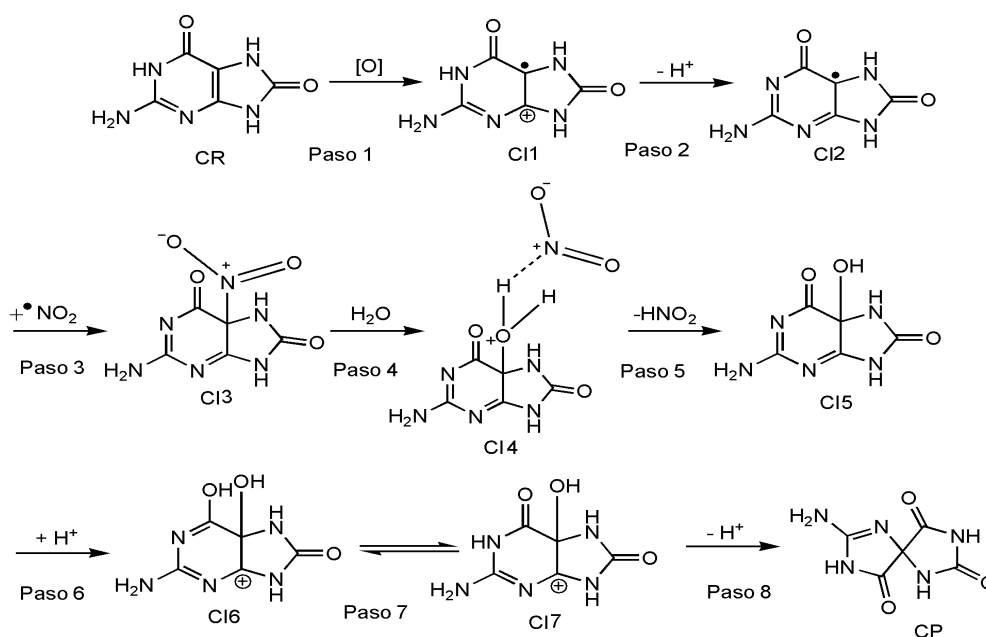
(C) Oxidación, seguida de la adición de un grupo OH^{*} y posterior desprotonación.

En otra dirección, Yadav y Mishra (2014) han planteado la formación de Sp también a través de la oxidación de la 8-oxoG mediado por el anión carbonato radical, en presencia de una molécula de H₂O y la posterior salida del ácido carbónico con la formación del 5-HO-8-oxoG.

Analizando los trabajos de Munk, Burrows y Schlegel y los trabajos de Yadav y Mishra, hemos podido fundamentar el mecanismo de formación de Sp mediado por el radical NO₂^{*}, sugerido en el trabajo de Essigmann y *co.*, el cual hemos evaluado y estudiado de forma sistemática en ésta tesis. De ésta forma podemos afirmar en primer lugar, que aunque, como ya se ha señalado, Sp puede formarse a través de varios caminos, todos los mecanismos llevan a la formación del producto 5-HO-8-oxoG (esquema 1) el cual se convierte en el intermediario más importante. Por tanto, el mecanismo tiene una *primera parte* en la que se forma este intermediario y una *segunda parte* en la que el intermediario señalado forma Sp, existiendo en cada parte varios pasos elementales y otros intermediarios. Los elementos más importantes relacionados con la formación de 5-HO-8-oxoG son los siguientes:

- Se requieren pasos de oxidación y desprotonación que facilitarán la entrada de un oxidante radicalico.

- Adición nucleofílica por parte del radical NO_2^\bullet sobre el carbono C5 de la especie 8-oxoG(-H) $^\bullet$ (CI2, en el esquema 2), seguido de la entrada de una molécula de agua, la cual en este caso facilitará la salida del HNO_2 y la formación finalmente de 5-HO-8-oxoG (CI5 en el esquema 2). La presencia del agua en el mecanismo ha sido confirmada por estudios isotópicos, encontrándose en el producto Sp, ^{18}O , proveniente de H_2O^{18} (Luo et al., 2000).
- La presencia del agua es importante, no solo como solvente sino como catalizador (paso 4 en el esquema 2). De ahí que en los cálculos ha sido necesario considerar el efecto del solvente y la presencia en el paso 4, de una molécula de agua que favorecerá la salida del HNO_2 .



Esquema 2: Mecanismo Propuesto

En la segunda parte del mecanismo (5-HO-8-oxoG \rightarrow Sp), puede observarse que después de la salida de la molécula de HNO_2 , el cual está parcialmente dissociado, se plantea una protonación del grupo carbonilo, lo cual lleva a la formación de un equilibrio tautomérico o ceto-enólico; posteriormente, tras una desprotonación de la forma *ceto*, se produce la ruptura del enlace C6-C5, lo que lleva finalmente a la formación de la especie Sp que es el producto final (CP).

5.2 Descripción de los Resultados

Las **Tablas 1 y 2**, muestran las energías de Gibbs correspondientes a los estados estacionarios encontrados en fase gas y con efecto de solvente.

Tabla 1. Energías de Gibbs ($\Delta G (10^{-3}) / \text{Kcal mol}^{-1}$) de la molécula de partida (CR), de los intermediarios (CI1 a CI7) y del producto (CP).

Compuestos	Fase Gas	Efecto Solvente
CR	-387.680962	-387.727362
CI1 (paso 1)	-387.513740	-387.597504
CI2 (paso 2)	-387.290143	-387.327333
CI3 (paso 3)	-516.038191	-516.050378
CI4 (paso 4)	-563.996506	-564.021080
CI5 (paso 5)	-434.876439	-434.923168
CI6 (paso 6)	-435.090899	-435.181965
CI7 (paso 7)	-435.097246	-435.191835
CP (paso 8)	-434.893382	-434.942156

Particularmente, la **Tabla 1** corresponde al compuesto reactivo (CR), los compuestos intermediarios (CI) y el compuesto producto final (CP), todos correspondientes a mínimos de energía y frecuencias positivas, mientras que la **Tabla 2** corresponde a los estados de transición (ET) los cuales presentan una frecuencia imaginaria (negativa). Nótese que el número a continuación de las siglas identifica el paso en que se está formando la especie.

Tabla 2. Energías de Gibbs ($\Delta G (10^{-3})/\text{Kcal mol}^{-1}$) de los Estados de Transición (ET).

Compuestos	Fase Gas	Compuestos	Efecto Solvente
ET3 (paso 3)	-516.033349	ET3 (paso 3)	-516.047256
ET4 (paso 4)	-563.966919	ET4 (paso 4)	-564.019932
ET5 (paso 5)	-563.995956	ET5 (paso 5)	-564.019810
ET6 (paso 6)	-435.060455	ET6 (paso 6)	-435.143845
ET8 (paso 8)	-435.074511	ET8 (paso 8)	-435.153190

Como se puede observar, los pasos 1, 2 y 7 no produjeron estados de transición, tanto en fase gas como en solución.

La **Tabla 3** presenta las energías de Gibbs tanto de los precursores como de las moléculas o átomos perdidos a lo largo del mecanismo en solución (H^+ , NO_2^* , HNO_2 y H_2O). Por otra parte, la **Tabla 4** presenta los resultados de ΔG y ΔE en Kcal mol⁻¹ para la Riboflavina (*Rf*) neutra y como anión radical (*Rf*^{•-}) en solución. La razón por la que se presenta la *Rf* es que, como se explicará más adelante, la propuesta para el paso 1 es de una oxidación fotoquímica, en la cual la *Rf* cataliza la fotooxidación de la 8-oxoG. Nótese que el proceso de reducción de la *Rf* es energética y termodinámicamente posible.

Tabla 3. Energías de Gibbs (ΔG (10⁻³) / Kcal mol⁻¹) para los precursores en solución.

H^+	NO_2^*	HNO_2	H_2O
-264.61 ^(a)	-128.73352	-129.11821	-47.971258

(a) Obtenido del experimento en kcal mol⁻¹, pues los métodos computacionales reproducen pobremente estas energías para los protones; este valor ha sido utilizado por diversos autores.

Tabla 4. Energías de Gibbs (ΔG (10⁻³) / Kcal mol⁻¹) y Energías Totales (ΔE (10⁻³) /kcal mol⁻¹) para Riboflavina neutra y como radical aniónico en solución.

	ΔG_i / Kcal/mol	E_T / Kcal/mol
Riboflavina neutra	-834.5941517	-834.784931
Riboflavina anión radical	-834.6779215	-834.866356
	$\Delta G(Rf/Rf^{\bullet-})$ / Kcal/mol	$\Delta E(Rf/Rf^{\bullet-})$ / Kcal/mol
Proceso $Rf \rightarrow Rf^{\bullet-}$	-0.0837698	-0.081425

Nótese que en los pasos estudiados, los complejos intermedios no experimentaron pérdida o ganancia de moléculas o átomos, salvo los procesos ya mencionados de protonación, desprotonación e hidrólisis; en general podemos decir que la 8-oxoG fue transformando su estructura mediante rompimiento y formación de enlaces. Esto se explicará más detalladamente en la sección de análisis.

Las **Tablas 5 y 6** muestran el comportamiento termodinámico y cinético de los diferentes pasos del mecanismo en fase gas y con efecto de solvente respectivamente. A continuación, describimos los parámetros en estas tablas y su forma de cálculo; los subíndices *j* e *i* corresponden a las especies finales (*productos* en un paso elemental) e iniciales (*reactivos* en un paso elemental) respectivamente. Se nombran así, para no confundirlos con los reactivos (CR) y productos (CP) principales de la reacción.

Los parámetros son:

- $\Delta G_{ji} = \Delta G_j - \Delta G_i$, donde ΔG_j y ΔG_i son la suma de las energías de Gibbs de las especies finales e iniciales respectivamente; ΔG_{ji} informa sobre la espontaneidad del paso elemental.
- $\Delta G^{\ddagger}_{activación} = \Delta G_{ET} - \Delta G_i$, donde ΔG_{ET} es la energía de Gibbs del estado de transición y ΔG_i la suma de las energías de Gibbs de las especies iniciales del paso elemental; $\Delta G^{\ddagger}_{activación}$ brinda información acerca de qué tan favorable es la formación del estado de transición.

Recordemos que: $\Delta G^{\ddagger} = \Delta H^{\ddagger} - T\Delta S^{\ddagger}$, lo que implica el balance entre un efecto energético (barrera de Energía de activación) y un efecto entrópico (estructural).

- $\Delta G^{\ddagger}_{evolución} = \Delta G_j - \Delta G_{ET}$, donde ΔG_{ET} es la energía de Gibbs del estado de transición y ΔG_j la suma de las energías de Gibbs de las especies finales del paso elemental y mide qué tan favorable es la transición hacia las especies finales, una vez alcanzado el estado de transición.

Tabla 5. Comportamiento termodinámico y cinético en términos de Energías de Gibbs (kcal mol⁻¹) y de Entalpías (kcal mol⁻¹) en fase gas.

Parámetros	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5	Paso 6	Paso 7	Paso 8
ΔG_{ji}	+167.22	+270.97	-7.27	+5.54	-3.77	-208.18	-6.35	+197.58
$\Delta G^{\ddagger}_{activación}$	---	---	-2.43*	+35.13	+0.55	-177.74*	---	+22.73*
$\Delta G^{\ddagger}_{evolución}$	---	---	-4.84	-29.59	-4.32	-30.44	---	+174.85

(*)El valor de la Energía de Gibbs de activación ($\Delta G^{\ddagger}_{activación}$) no se relaciona con una barrera de activación entre las especies iniciales y finales, ya que tiene un valor negativo.

Como se puede observar en la tabla 5, hubo problemas en algunos pasos para obtener barreras de activación (barreras negativas), a pesar de que los ET convergían con una frecuencia negativa; por ello, se decidió para los cálculos en solución, como ya se había mencionado anteriormente, cambiar al funcional meta-híbrido M05-2X (Zhao et al., 2006). Considerando además que este mecanismo de reacción se desarrolla en medio acuoso, el análisis del mismo en la siguiente sección solo incluirá los resultados con efecto de solvente, los cuales se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Comportamiento termodinámico y cinético en términos de Energías de Gibbs (kcal mol⁻¹) y de Entalpías (kcal mol⁻¹) con efecto de solvente.

Parámetros	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5	Paso 6	Paso 7	Paso 8
ΔG_{ji}	+129.86	+96.58	+11.81	+1.05	-21.64	+5.81	-9.87	-14.93
$\Delta G^{\ddagger}_{activación}$	---	---	+14.93	+2.20	+1.27	+43.93	---	+34.14
$\Delta G^{\ddagger}_{evolución}$	---	---	-3.12	-1.15	-22.91	-38.12	---	-49.07

Los resultados presentados en la tabla 6, permiten realizar de forma superficial algunos comentarios:

- Los pasos 1 y 2 son los que presentan los valores mayores de ΔG_{ji} y son por tanto endergónicos; para estos pasos, se está proponiendo la obtención de energía de forma fotoquímica a través de la *Rf*. Estos pasos, junto con el paso 7 no presentaron barreras de energía de activación.
- Los pasos 3, 4 y 6, aunque son endergónicos, presentan valores muy bajos de ΔG_{ji} ; en cambio, los pasos 5, 7 y 8 resultaron exergónicos.
- Los pasos 3, 4 y 5 presentan barreras muy bajas de activación, por lo cual, junto con el paso 7 que no presenta barrera, son muy favorecidos cinéticamente.
- Los pasos 6 y 8, presentan las mayores barreras de activación y por tanto, debemos esperar que sean los pasos más lentos del mecanismo.

Por otra parte, la **Figura 1** muestra la correspondiente numeración para la 8-oxoG, los intermediarios y el producto Sp optimizados y la **Figura 2** muestra la correspondiente numeración para los cinco estados de transición encontrados, una vez optimizados. Esta numeración permitirá entender el análisis de los resultados y la tabla de cargas atómicas.

La **Figura 3** por su parte, muestra el diagrama termodinámico del mecanismo, donde han sido marcados los $\Delta G^{\ddagger}_{activación}$ y $\Delta G^{\ddagger}_{evolución}$ de cada paso.

Finalmente, la **Tabla 7**, presenta la evolución de las cargas atómicas de Hirshfeld de la 8-oxoG (CR), de los intermediarios (CI1 a CI7) y la del compuesto producto Sp (CP) en las posiciones más relevantes.

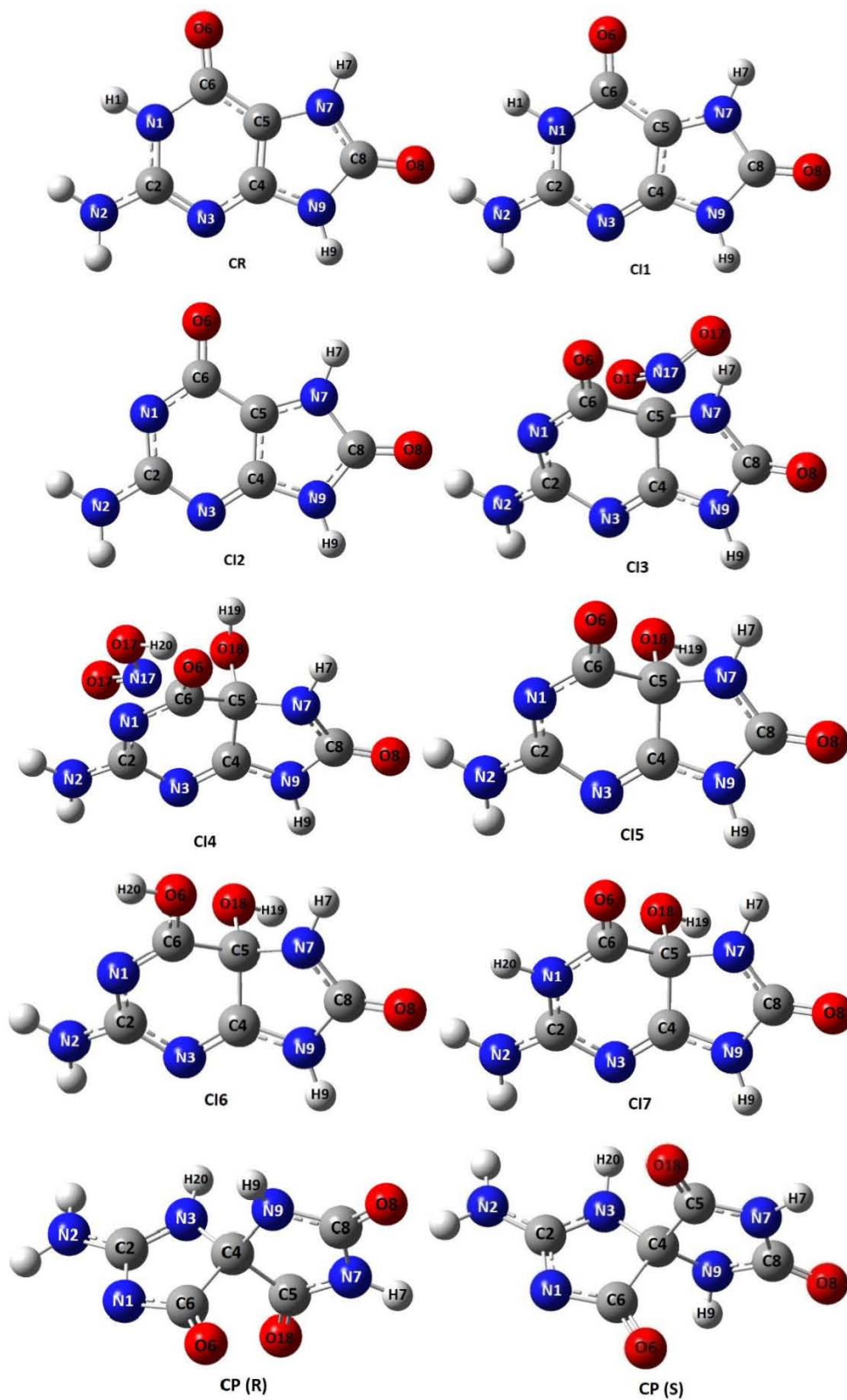


Figura 1. Geometría optimizada y numeración de los átomos desde (CR) el reactivo inicial (8oxoG) a (CP) el producto final (Sp).

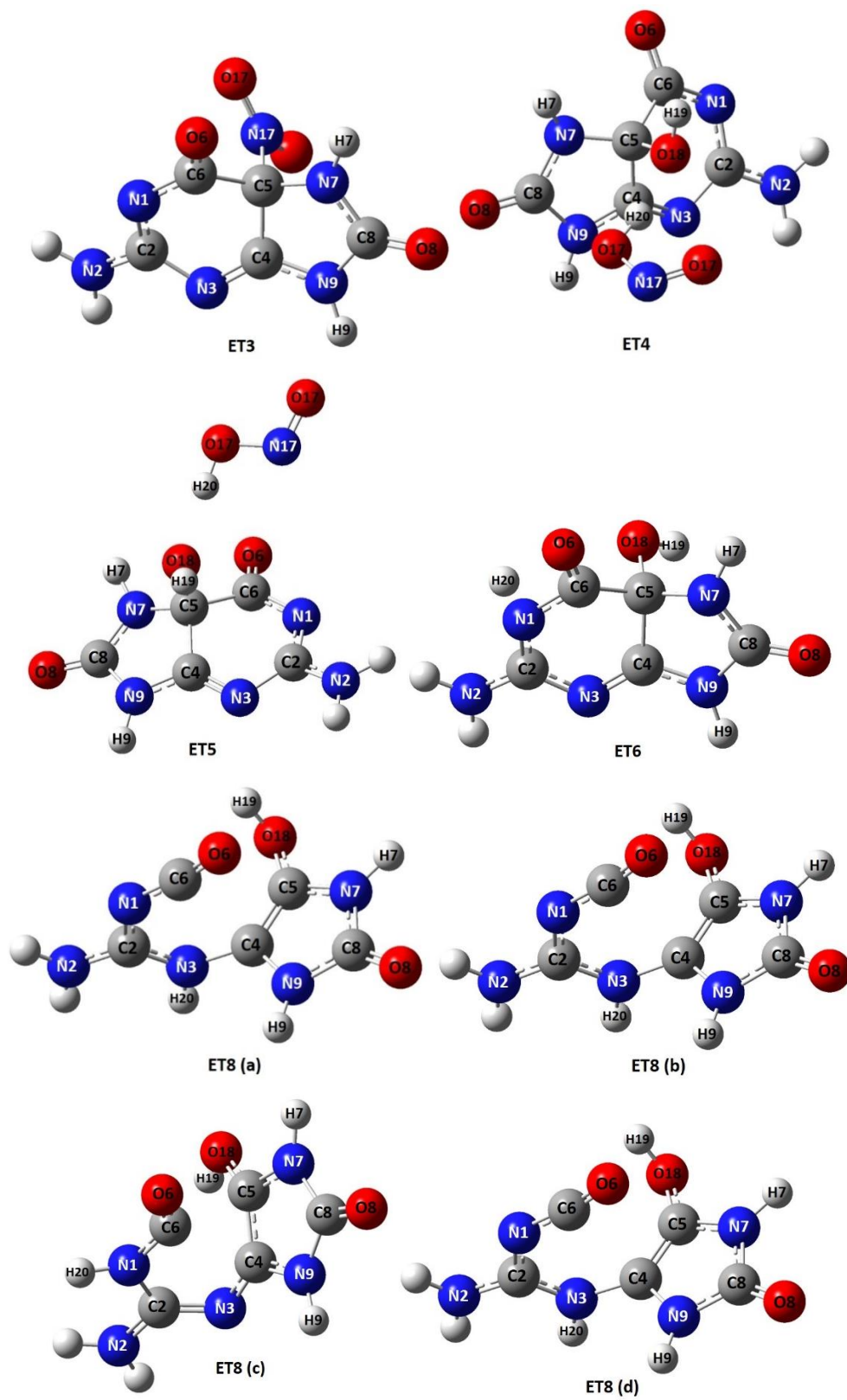


Figura 2. Geometría optimizada y numeración de los átomos de los Estados de Transición encontrados.

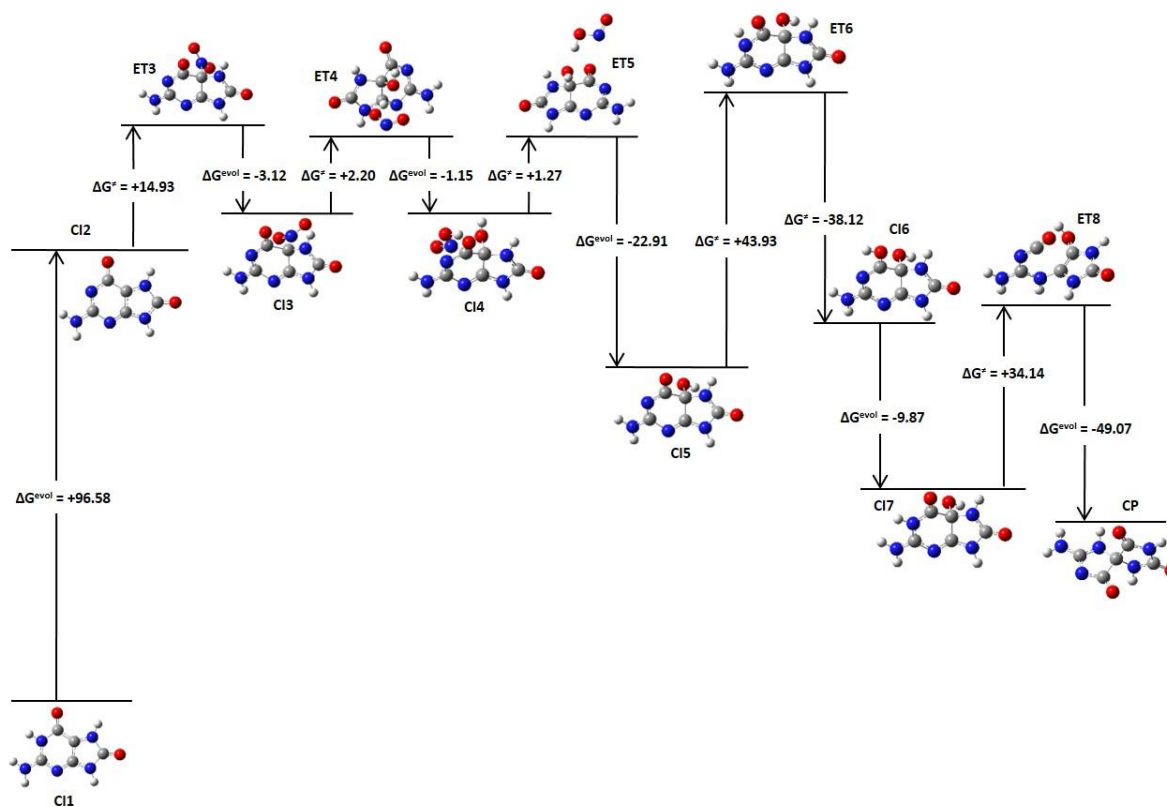


Figura 3. Diagrama de energía para el mecanismo considerando el efecto de solvente.

Tabla 7. Cargas de Hirshfeld para las posiciones más relevantes de la 8-oxoG (CR, C1 a C7).

Átomos	CR	CI1	CI2	CI3	CI4	CI5	CI6	CI7	CP
N1	-0.07	-0.05	-0.29	-0.28	-0.29	-0.29	-0.21	-0.06	-0.08
C2	0.19	0.24	0.18	0.20	0.20	0.20	0.23	0.25	0.18
N3	-0.26	-0.21	-0.23	-0.22	-0.23	-0.23	-0.22	-0.21	-0.31
C4	0.10	0.16	0.13	0.16	0.16	0.16	0.18	0.19	0.09
C5	-0.02	0.10	0.08	0.11	0.13	0.12	0.14	0.14	0.21
C6	0.16	0.22	0.15	0.17	0.17	0.15	0.22	0.23	0.20
O6	-0.43	-0.32	-0.42	-0.37	-0.38	-0.40	-0.13	-0.29	-0.35
N7	-0.09	-0.02	-0.04	-0.10	-0.11	-0.11	-0.10	-0.10	-0.08
H7	0.18	0.22	0.20	0.19	0.18	0.18	0.19	0.20	0.20
C8	0.21	0.28	0.25	0.26	0.25	0.24	0.27	0.27	0.24
O8	-0.44	-0.32	-0.36	-0.35	-0.37	-0.38	-0.33	-0.33	-0.39
N9	-0.08	-0.04	-0.06	-0.06	-0.07	-0.06	-0.04	-0.04	-0.11
N17 (NO ₂)	---	---	---	0.24	0.13	---	---	---	---
O18 (H ₂ O)	---	---	---	---	-0.19	-0.25	-0.23	-0.23	-0.35

Como puede observarse en la tabla 7, los átomos más susceptibles a cambiar la carga son en primer lugar el carbono 5 (C5), el cual se desactiva durante todo el mecanismo ($\Delta q = 0.23e$) por ser la posición sobre la cual se produce la oxidación y el posterior ataque del NO_2^{\cdot} , en segundo lugar está el N1 ($\Delta q = 0.22e$), al cual aumenta su carga negativa como resultado de la desprotonación que ocurre en el paso 2, pero al final restaura de nuevo su carga. También el carbono C4 ($\Delta q = 0.10e$), por estar unido a C5 y finalmente los oxígenos O6 ($\Delta q = 0.30e$), O18 ($\Delta q = 0.16e$) y O8 ($\Delta q = 0.12e$), ya que su elevada electronegatividad los hace muy sensibles a los cambios de geometría.

5.3 Análisis de los resultados

En esta sección se presenta el análisis de los resultados para el mecanismo de reacción propuesto considerando el efecto del solvente.

Puesto que este proceso se propone que puede ocurrir en el organismo humano, estas biomoléculas no se encuentran en estado gaseoso sino en medio acuoso; por otra parte, Luo et al. (2001) han encontrado que un pH entre 6.0 y 7.0 son condiciones óptimas que favorecen la formación del producto *Sp*, sobre otros productos de oxidación como Gh e Iz. Éstas y otras razones antes mencionadas en la Metodología, sabemos que los cálculos más importantes involucran el efecto del solvente, por lo que el análisis sólo se ha centrado en el mecanismo en medio acuoso que sería el más cercano a las condiciones ya señaladas.

A simple vista, los resultados de los compuestos estudiados presentan dos etapas energéticas principales en las que su energía de Gibbs estándar ΔG° , se modifica significativamente por las transformaciones estructurales que cada compuesto intermediario presenta a lo largo de todo el proceso.

A continuación se hará un breve análisis de cada paso elemental:

Paso 1: Oxidación fotoquímica de la 8-oxoG (CR) para formar la 8-oxoG⁺

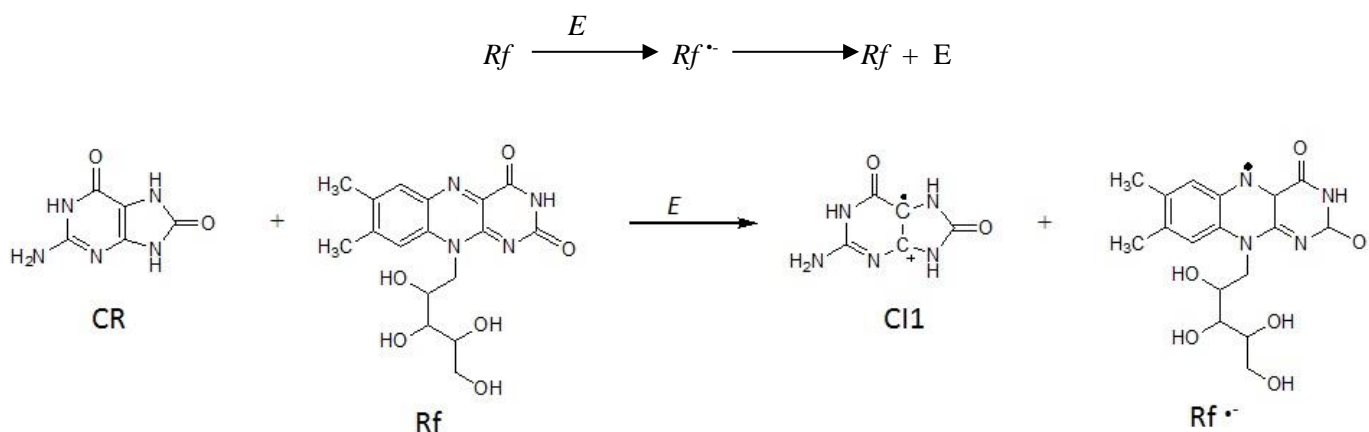
Como ya se señaló anteriormente, la 8-oxoG es el principal producto en la oxidación de la Guanina en las células por ser muy susceptible al ataque de especies oxidantes, entre ellas especies radicales presentes en el organismo humano como el oxígeno singulete (Duarte, Gasparutto, Yamaguchi, Ravanat, Martínez, Medeiros, Di Mascio y Cadet, 2000) y el peroxinitrito (Niles et al., 1999); sin embargo, otra fuente también reportada ha sido mediante procesos fotoquímicos; en ésta dirección,

Adam, Saha-Möller y Schönberger (1996), han reportado la fotooxidación de la 8-oxoG, mediante sustancias fotosensibilizadoras, entre las cuales se señala a la *Rf*.

Otro antecedente experimental importante es el trabajo de Kasai, Yamaizumi, Berger y Cadet (1992), en el cual identifican a la *Rf* como un fotosensibilizador endógeno celular que fotoinduce eficientemente la formación de la 8-oxodG (8-oxo-guanosina) a través de un mecanismo que no incluye la participación de especies reactivas de oxígeno. Estos autores encontraron que la producción de 8-oxodG se incrementó con el aumento del tiempo de exposición a la luz visible, sólo con la presencia de la *Rf* y en un medio acuoso libre de oxígeno o de oxígeno singulete; por otra parte, sugieren que en este caso se produciría además la transferencia del electrón de la 8-oxoG hacia la *Rf* (Cadet, Decarroz, Wang y Midden, 1983).

Considerando los antecedentes ya explicados, la 8-oxoG podría ser susceptible a una oxidación mediada únicamente por la *Rf* como especie fotosensibilizadora como se muestra en el **esquema 3**. Por tanto, la *Rf* podría interactuar con un fotón de radiación electromagnética para así excitarse, y posteriormente regresaría al estado base, cediendo ésta energía de excitación a la 8-oxoG, para así hacer posible un proceso de oxidación-reducción en el que la 8-oxoG se oxida y simultáneamente la *Rf* toma el electrón que cede la 8-oxoG y se reduce.

De esta forma, en este paso de oxidación-reducción con la presencia de la *Rf* tendríamos:



Esquema 3: Reacción de oxidación fotoquímica de *Rf* con 8-oxoG (CR)

Para verificar lo anterior, calculamos por una vía simple la energía de excitación; para ello se consideraron dos posibilidades: la longitud de onda máxima de la *Rf* en su espectro UV-visible la cual es de 445 nm (Shah, Patel, Patel, Solanki y Jivani, 2012) y la longitud de onda utilizada por W. Luo

y *col.* que es de 360 nm y corresponde en el espectro UV-visible de la *Rf*, al segundo máximo de absorción en importancia. Así, las energías asociadas a estas longitudes de onda deben inducir las dos transiciones más probables de la *Rf*, y pueden obtenerse de la ecuación de Planck:

$$E(445 \text{ nm}) = \frac{hc}{\lambda} = \frac{(6.6261 \times 10^{-34} \text{ Js})(2.9979 \times 10^8 \text{ ms}^{-1})}{445 \times 10^{-9} \text{ m}} = 4.4639 \times 10^{-19} \text{ J} = 64.25 \text{ kcal mol}^{-1}$$

$$E(360 \text{ nm}) = \frac{hc}{\lambda} = \frac{(6.6261 \times 10^{-34} \text{ Js})(2.9979 \times 10^8 \text{ ms}^{-1})}{360 \times 10^{-9} \text{ m}} = 5.5179 \times 10^{-19} \text{ J} = 230.87 \text{ kcal mol}^{-1}$$

La tabla 8 muestra las energías totales de las especies involucradas en el paso 1.

Tabla 8. Energías Totales (10^{-3}) para CR, *Rf*, CI1, y *Rf*^{*} en solución.

	E_T / Kcal/mol
CR	-387.843563
CI1	-387.714328
<i>Rf</i>	-834.784931
<i>Rf</i> [*]	-834.866356

Considerando que ésta reacción se desarrolla en solución y que como puede observarse del esquema 3, las especies CR/CI1 y *Rf*/*Rf*^{*} tienen prácticamente el mismo volumen molecular, podemos señalar que el cambio de volumen durante la reacción es prácticamente despreciable y podríamos trabajar con las energías totales ($\Delta H = \Delta U + p\Delta V$, a presión constante); la diferencia en las energías totales de las especies involucradas en el paso 1, según el esquema 5 sería:

$$\Delta E = E_T(\text{CI-1}) + E_T(\text{Rf}) - E_T(\text{CR}) - E_T(\text{Rf}^*) = 38.21 \text{ kcal mol}^{-1}$$

De ésta forma, al considerar el efecto del solvente que es el entorno más cercano a la realidad, la energía requerida (ΔE) fue de solo 38.21 kcal mol⁻¹, lo cual nos dice que en una primera aproximación, únicamente con la energía asociada a la $\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ nm}$, se puede lograr el paso 1 y, por tanto, la correspondiente energía liberada por la *Rf* al pasar al estado base, es suficiente para producir la oxidación de la 8-oxoG. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, aunque el paso 1 como se aprecia en la Tabla 5 es endergónico, puede producirse precisamente por tener acoplado a él un proceso fotoquímico donde la *Rf* actuaría como especie fotosensibilizadora. Por estas razones, este paso no se muestra en el diagrama de la Figura 3.

El otro aspecto corresponde a las posiciones más probables para la oxidación; en este sentido, considerando que la formación de Sp, implica la ruptura del enlace C5-C6 (esquema 2) y que en la tabla 7, para la 8-oxoG, es decir, el compuesto reactivo (CR), el único carbono con carga negativa y por tanto, con más probabilidades de perder un electrón, es el carbono C5 (-0.02), debemos esperar que la oxidación se produzca por este carbono; ésta posición también ha sido sugerida por Yadav y Mishra (2014) y también por Munk et al. (2008) para la formación de Sp a partir del anión radical carbonato.

Como puede verse en la tabla 7, después de la salida del electrón (CR → CI1), todas las posiciones han quedado desactivadas; todos los átomos de carbono aumentaron su carga positiva y particularmente la carga del C5 ha pasado de -0.02 a +0.10. Los átomos de nitrógeno y de oxígeno disminuyeron su carga negativa y como era de esperarse, los carbonos unidos a estos heteroátomos (nitrógeno y oxígeno) que en CR fueron los de mayor carga positiva, en CI1 continúan siendo los más desactivados; en este caso tenemos en el anillo hexagonal, al C2 cuya carga positiva aumentó de +0.19 a +0.24e, y en el anillo pentagonal al C8 con un cambio en la carga positiva de +0.21e a +0.28e. Al ser C5 el carbono de menor carga positiva ($Q_H = 0.10$) y por tanto de mayor densidad electrónica, podremos considerar que la mayor probabilidad para el electrón desapareado sobre un carbono es en ésta posición. Adicionalmente, en CR las distancias de enlace en ambos anillos estuvieron en el rango entre 1.30 -1.40 Å. Sin embargo, después de la oxidación, en la especie CI2 dos enlaces aumentaron su distancia por encima de 1.40 Å, convirtiéndose en los más débiles de los anillos y más susceptibles a participar en el mecanismo; estos fueron los enlaces C4-C5 ($r_e = 1.426$ Å) y C5-C6 ($r_e = 1.439$ Å).

Paso 2. Desprotonación de la 8-oxoG⁺(CI1) para formar la 8-oxoG(-H)[•] (CI2)

Como puede observarse en la tabla 6, el paso 2 también es igualmente endergónico, con lo cual se propone que no solo el paso 1, sino también el paso 2, al no tener ambos un estado de transición asociado, sean secuencialmente muy rápidos y ambos acoplados al proceso fotoquímico que involucra a la *Rf*comofotosensibilizador.

Considerando que el proceso se realiza a temperatura y presión constante:

$\Delta G_{evol} = \Delta H - T\Delta S = \Delta E + p\Delta V - T\Delta S$; pero debido a que el proceso corresponde a una desprotonación en fase condensada, el cambio en el volumen molar y el cambio entrópico entre reactivos y productos puede ser despreciado, por lo que en una primera aproximación, podríamos decir que: $\Delta G_{evol} \approx \Delta E$. Por tanto, las diferencias en las energías totales de las especies involucradas en el paso 2, es decir, los complejos intermediarios CI-1 y CI-2, serán aproximadamente iguales a 96.58Kcal/mol, energía que

es mucho menor que aquella asociada a la transición que origina la banda de $\lambda_{\text{max}} = 360 \text{ nm}$, que es de $230.87 \text{ kcal mol}^{-1}$. Por tanto, existe energía suficiente para que se realice el paso 2 y muy probablemente, el resto de los pasos endergónicos con sus respectivas barreras de activación.

Es importante apuntar que después de la oxidación fotoquímica del paso 1, hemos obtenido un ácido de Lewis (CI-1); sin embargo, mientras que el pK de la 8-oxoG (CR) como nucleósido es de 8.6, el compuesto intermediario 8-oxoG⁺ (CI-1) presenta un pK de 6.63, por lo que este último es un ácido más fuerte y su desprotonación, cediendo iones H⁺ al medio es un proceso muy favorecido, habiéndose reportado que transcurre con una extensión de un 80% a pH neutro (Shafirovich, Cadet, Gasparutto, Dourandin, Huang y Geacintov, 2001).

El cálculo de las cargas de Hirshfeld en CI-1, mostró que la salida del protón del N1 es la más probable, pues de los nitrógenos de los anillos con enlace N-H (N1, N7 y N9), N1 presenta la mayor carga negativa ($Q_{\text{H}} = -0.05$), por lo que al mostrar la mayor electronegatividad, dejará salir fácilmente al protón H⁺. De esta forma N1 aumenta su carga negativa en 0.24 unidades, para llegar a -0.29. Con la salida del protón, el nitrógeno N1 tiene disponible un par de electrones para formar un enlace con el C2 con un mayor carácter de doble enlace; esto se puede confirmar con las distancias de enlace; mientras que la mayoría de los enlaces de la molécula solo cambiaron sus distancias en un rango entre 0.02-0.008 Å, los enlaces que se encuentran alrededor del N1 cambiaron entre 0.03-0.04 Å. Los enlaces N1-C6 y N1-C2 disminuyeron sus distancias en 0.04 y 0.03 Å respectivamente; es decir, aumentaron su orden de enlace, obteniéndose distancias finales de 1.352 Å y 1.334 Å, mientras que el enlace vecino C2-N3 aumentó su distancia en 0.031, para una distancia final de 1.382 Å.

Simultáneamente con los cambios en las distancias de enlace, aumentó la densidad electrónica π en los anillos; en CI2, los átomos de carbono han disminuido su carga positiva, es decir, están menos desactivados y los átomos de nitrógeno y oxígeno han aumentado su carga negativa. Se mantiene que los átomos de carbono C2 ($Q_{\text{H}} = +0.18e$) y C8 ($Q_{\text{H}} = +0.25e$) son los más desactivados por las razones ya señaladas, mientras que el C5 se mantiene como el menos desactivado ($Q_{\text{H}} = +0.08e$) y a efectos del mecanismo, la región de mayor probabilidad para el electrón desapareado sigue estando en este carbono (C5). Los átomos de nitrógeno del anillo hexagonal, N1 y N3, presentan la mayor carga negativa con -0.29e y -0.23e respectivamente.

Por su parte, la regeneración del fotocatalizador *Rf* neutro según ha sido reportado (Armitage, 1998), se produce por la transferencia electrónica de la *Rf*^{•+} al O₂ para formar la especie O₂^{•-}.

Paso 3. Adición de NO₂[•] a la 8-oxoG(-H)[•] para formar la 8-oxoG(-H)-NO₂ (CI3)

En este paso se produce el ataque del radical NO₂[•] a la posición C5, donde existe la mayor probabilidad de encontrar al electrón desapareado.

El NO₂[•] pertenece al grupo de óxidos de nitrógeno que contaminan el ambiente y que las personas pueden incorporar a su organismo, al respirarlos en el aire. Las personas más expuestas son aquellas que viven cerca de fuentes de combustión, como por ejemplo, plantas de energía donde se quema carbón o de áreas donde hay intenso uso de vehículos motorizados. El monóxido de nitrógeno y el dióxido de nitrógeno también están presentes en el humo de tabaco, por lo que los fumadores pueden también estar expuestos a los óxidos de nitrógeno. Por otra parte, la enzima Cu, Zn-superóxidodismutasa (Cu, Zn-SOD), cataliza la dismutación del anión radical superóxido (O₂^{•-}) presente de forma espontánea, en un proceso muy rápido ($k \approx 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7), para producir oxígeno (O₂) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂); por ello, ésta enzima es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno. Sin embargo, SOD reacciona aún más rápido con algunos blancos, como el radical NO[•], para formar peroxinitritos (ONOO^{•-}) y derivados. Una vez revisado la relevancia del NO[•], analicemos cómo se produce su interacción con CI2 para formar CI3.

El acercamiento del radical NO₂[•] el cual fue previamente optimizado, al complejo intermediario radical CI2 podría pensarse que debía ser muy favorecido ya que se están recombinando dos centros radicálicos; sin embargo como puede apreciarse en el Figura 4, hay una pérdida importante de la planaridad, tanto en el ET como en la especie final CI3, por lo que el proceso es ligeramente endergónico ($\Delta G_{ji} = 11.81 \text{ kcal mol}^{-1}$), con una barrera de activación es de $14.93 \text{ kcal mol}^{-1}$, como puede observarse de la tabla 6.

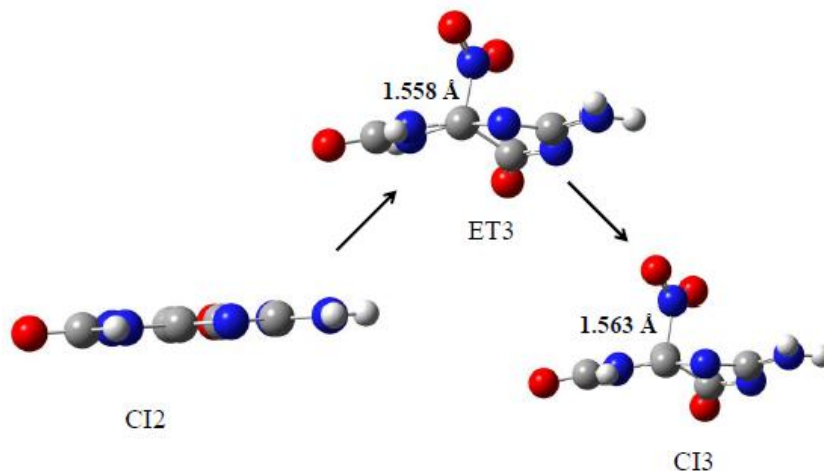


Figura 4: Pérdida de la planaridad por la entrada del NO_2

De la Figura 4, también puede observarse que al pasar de ET3 a CI3 la distancia C5-N (del NO_2) aumentó ligeramente y la estructura aparece menos distorsionada lo que se puede relacionar con un valor de $-3.12 \text{ kcal mol}^{-1}$ para la energía libre de evolución. Por ejemplo, el ángulo diedro D(N9-C4-C5-N7) que puede dar una medida de la no planaridad, en ET3 es de 34.89° , mientras que el mismo ángulo diedro para CI3 ha disminuido en 3.43° , para un valor de 31.46° . Por otra parte, en ambas estructuras ET3 y CI3, el ángulo $\angle \text{ONO}$ (del NO_2) se mantiene aproximadamente 7.7° grados más pequeño del valor reportado experimentalmente para el NO_2 libre, que está en 134.3° , debido al efecto estérico existente. Por su parte, las distancias de enlace se mantienen muy cercanas, en 1.20 y 1.19 \AA respectivamente, siendo el valor reportado de 1.197 \AA . Como se puede observar en la Figura 4, en ambas estructuras (ET3 y CI3) el NO_2 se ha situado perpendicular a los anillos, aunque en CI3 los oxígenos han rotado para minimizar aún más las posibles repulsiones estéricas y la no planaridad de la estructura.

Con respecto a las cargas, la entrada del NO_2 , desactiva ligeramente al anillo hexagonal; es decir, los átomos de carbono C2, C4, C5 y C6 aumentan ligeramente su carga positiva, particularmente los átomos de carbono C4 y C5, además del átomo de oxígeno O6 el cual ha disminuido significativamente su carga negativa, respecto de CI2, aunque los nitrógenos se mantienen casi con la misma carga. El anillo pentagonal que mantuvo su planaridad, recibió carga negativa a través del N7 y también recibieron carga los oxígenos del NO_2 , quedando el nitrógeno N17 del NO_2 , muy desactivado, con una carga de $+0.24$.

Paso 4. Acomplejamiento de CI3 con H₂O

Después del ataque nucleofílico ocurrido en el paso 3, donde el NO₂[•] se ha quedado enlazado al C5 de la 8-oxoG(-H) (CI2) para formar el intermediario CI3, se propone por W. L. Essigmann y *co.* la entrada de una molécula de agua a ésta posición; es entonces cuando uno de los oxígenos del -NO₂ se enlaza a uno de los hidrogenos del H₂O, produciéndose el estado de transición ET4, en el cual el NO₂ cede la posición 5 al OH del agua. Como resultado de los cálculos realizados, se obtuvo un intermediario (CI4) en el cual el agua aún no ha cedido totalmente el protón H⁺ al -NO₂, como se puede ver en la Figura 5.

Este intermediario CI4 corresponde a un mínimo de energía con frecuencias únicamente positivas, y es muy estable; además, la pequeña barrera de activación de solo +2.20 kcal mol⁻¹ (véase Figura 3 y Tabla 6) y la ΔG_{ji} del paso de solo +1.05 kcal mol⁻¹, confirma que la adición del agua a la 8-oxoG(-H)-NO₂ (CI3) es un paso elemental muy favorecido; en ET4 están interaccionando simultáneamente tres moléculas (NO₂, H₂O y CI3); uno de los hidrógenos del agua, aunque ya está formando el HNO₂, se mantiene ligado por una parte, al -OH del agua y por la otra, al otro oxígeno del -NO₂, por respectivos enlaces de hidrógeno con distancias de 1.82 Å y 2.16 Å; el HNO₂ por su parte, se mantiene en una conformación tipo *cis*. Como ya fue señalado, la reacción es ligeramente endergónica y por otra parte las energías libres de Gibbs relativas entre ellas, nos dicen que especialmente las especies ET4 y CI4 son muy parecidas estructuralmente. La Figura 5 permite entender que en este paso elemental lo que ocurre es un cambio del HNO₂ de la forma *cis* a la forma *trans*, donde ya uno de los enlaces de hidrogeno se ha roto; como es conocido el HNO₂ en fase gas, puede adquirir una conformación *cis* y una conformación *trans*, siendo ésta última la más estable (Cotton y Wilkinson, 2006). Ambas conformaciones se muestran en la figura 6, para su comparación con la estructura del HNO₂ en ET4 y CI4.

Con respecto a las cargas de Hirshfeld, de nuevo el C5 apenas cambia su carga y así ocurre con el resto de los átomos; por tanto este paso es fundamentalmente, como ya se mencionó, un cambio de conformación *cis*→*trans* del ácido nitroso, previo a su salida.

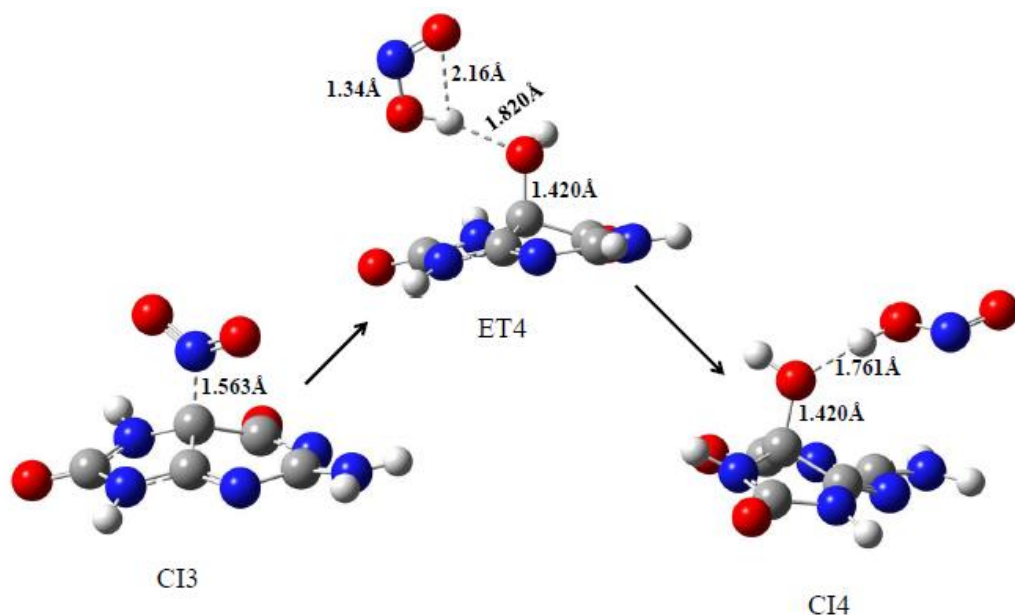


Figura 5. Formación del ET4 y posicionamiento del HNO₂ para su salida

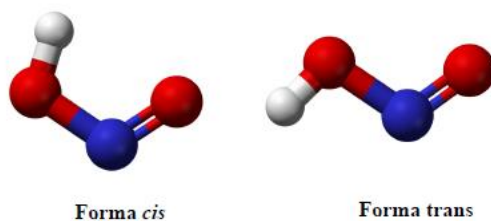


Figura 6. Conformaciones *cis/trans* del HNO₂ optimizada en fase gas

Paso 5. Pérdida de HNO₂

En este paso se produce la salida del HNO₂, formándose la especie 5-HO-8-oxoG (CI5), que como ya fue señalado, es el intermediario que lleva directo a *Sp*. Nótese que en este paso, la $\Delta G_{evolucion}$ es muy negativa (-22.91 kcal mol⁻¹), lo que confirma la presencia de este intermediario CI5.

Se sabe también que CI5 depende de las condiciones de pH para formar otros productos que también son dañinos al ADN. Algunos de estos productos son *Gh* e *HICA*.

Como puede observarse de la tabla 6, este es un paso exergónico y por tanto muy favorecido, con una barrera apenas detectable de solo 1.27 kcal mol⁻¹, lo cual permite afirmar que es un paso muy rápido. Finalmente debemos señalar que de acuerdo a la Tabla 7 (ver pág. 54), en este paso los oxígenos de

los grupos carbonilo, han adquirido una importante carga negativa de -0.40e y -0.38e para O6 y O8 respectivamente y simultáneamente los carbonos C6 y C8 han disminuido su carga positiva.

Paso 6. Protonación de 5-HO-8-oxoG para formar CI6

En el intermediario 5-HO-8-oxoG los oxígenos O6 y O8 de los grupos carbonilos están presentando las mayores cargas negativas con valores de -0.40e y -0.38e, seguidos de los átomos de nitrógeno N1 y N3 con cargas de -0.29e y -0.23e. La elevada carga negativa del oxígeno O6 ($Q_H = -0.40e$) aumenta la probabilidad de que éste sea el sitio de protonación, formándose el intermediario CI6, lo cual genera una carga positiva en la molécula, que aunque puede estar ligeramente deslocalizada entre los dos anillos pues todos los átomos se han desactivado, la zona más desactivada corresponde a los átomos C6 y N1 que cambiaron su carga en 0.07e; esto se debe a que son los átomos más cercanos al O6 el cual al protonarse disminuye su carga negativa a -0.13e; ésta mayor desactivación localizada entre los enlaces O6-C6 y C6-N1 contribuye a que este paso sea ligeramente endergónico (+5.81 kcal mol⁻¹). En este paso es importante señalar que el Estado de Transición (ET6) formado en este paso presenta la barrera de activación más elevada encontrada durante todo el proceso, siendo esta energía de activación de +43.93 kcal mol⁻¹. Por tanto identificamos este paso, como el paso lento del mecanismo y probablemente muy dependiente del pH; es decir que un pH ácido en el medio podría favorecer la protonación y bajar la barrera de activación. Desde el punto de vista computacional, será necesario estudiar si la inclusión de moléculas de agua explícitas podría contribuir a bajar ésta barrera de activación; esto queda como una recomendación a futuro.

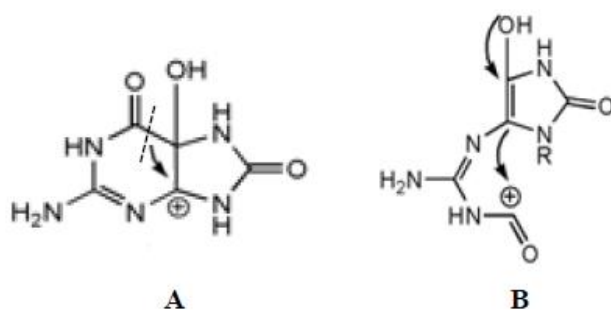
Paso 7. Equilibrio ceto-enólico (CI6-CI7)

La protonación de CI5 en el paso anterior para formar CI6, lleva a este paso 7 en el cual estamos planteando un equilibrio ceto-enólico; CI6 (forma enólica) pasa a CI7 (forma ceto) por la transferencia del protón en O6 al nitrógeno N1, el cuál presenta, en primer lugar, una de las mayores cargas negativas ($Q_H = -0.21e$), respecto de los demás átomos de nitrógeno de la molécula N3, N7 y N9 ($Q_H = -0.22e, -0.10, -0.04e$ respectivamente); y en segundo lugar porque se encuentra cercano al grupo carbonilo del carbono C6. El nitrógeno N1 con carga de -0.21e en CI6 (forma enólica), disminuiría su carga negativa a -0.06e en CI7 (forma ceto). Como puede observarse de la tabla 7, al pasar de CI6 a CI7, excepto los átomos ya señalados (O6 y N1), el resto de los átomos de nitrógeno mantienen prácticamente su carga, contribuyendo así a estabilizar la distribución de la carga del anillo hexagonal. Por tanto, este equilibrio no requiere de mucha energía para poder realizarse, pues sólo se lleva a cabo una transferencia protónica de la forma ceto a la forma enólica y viceversa, conocido

como tautomería ceto – enólica; estos equilibrios son característicos de todos los compuestos carbonílicos que puedan tener disponibilidad para un hidrógeno en alfa al grupo carbonilo. De ésta manera, las formas *ceto* y *enólica* no son sino isómeros en equilibrio, producidos por la migración reversible del hidrógeno en alfa al oxígeno del grupo carbonilo. Como puede observarse de la Tabla 6, este es un paso exergónico sin barrera de energía de activación, con lo cual debe esperarse que la forma *ceto* prevalezca sobre la forma enólica en el equilibrio.

Paso 8. Ruptura del anillo de 6 miembros y formación del producto Sp (S)

Finalmente, en este último paso se propone la desprotonación de CI7 desde la forma ceto, para formar el estado de transición que debe originar el producto *Sp* (CP). Para ello, se plantea como último paso del mecanismo que podría explicar la formación del producto, la apertura del anillo por el enlace C6-C5 como se muestra en el esquema 4, con migración del par de electrones hacia el enlace C5-C4, para neutralizar la carga positiva (estructura A) y luego de una rotación del grupo carbonilo del C6 utilizando como eje de rotación el enlace N3-C4, se produce la desprotonación del OH del carbono C6 y el ataque al grupo acilo deficiente de carga (B).



Esquema 4. Formación del estado de transición en el paso 8

En nuestra propuesta, la energía de Gibbs total calculada es de $-14.93 \text{ kcal mol}^{-1}$, por lo que es un paso exergónico y por tanto espontáneo; lo anterior significa que la transición a *Sp* desde la forma *ceto* está altamente favorecida. Como puede observarse de la tabla 6 y la figura 3, se ha producido una barrera de activación de $+34.14 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Durante el análisis de este paso, se compararon las energías totales obtenidas durante la optimización de los productos *Sp* en sus dos configuraciones (R y S), encontrándose que el producto *Sp* (S), tiende a tener mayor estabilidad, lo que lo hace más probable como compuesto producto (CP).

Antes de continuar, es importante señalar que, Munk et al. (2008) han analizado varios posibles caminos para la conversión de 5-HO-8-oxoG a *Sp* y todos estos caminos proponen la ruptura del anillo hexagonal en el enlace C5-C6 y la migración del grupo acilo al carbono C4; por ello es que realizamos ésta propuesta en el paso 8. A continuación se describen los caminos propuestos por estos autores y las barreras calculadas, a modo de antecedente de nuestra propuesta. Es importante señalar, que estas barreras no pueden ser comparadas con las del presente trabajo, ya que han sido calculadas por diferencias de energías totales entre el estado de transición y el intermediario; por tanto, no consideran posibles efectos estéricos de naturaleza entrópica. Sin embargo, en este trabajo al calcular las energías libres de activación ($\Delta G_{\text{activación}}$), sí se está considerando este efecto. Nótese que en todos ellos están presentes procesos de protonación, desprotonación o ruptura de anillo, solo que cambia el orden, dependiendo de la especie de partida y en ningún caso están planteando la existencia del equilibrio ceto-enólico, que en nuestra opinión es de alta probabilidad al ser exergónico y sin barrera de activación y está en nuestra propuesta.

En un primer camino, estos autores plantean la desprotonación en el OH del carbono C5 para formar el correspondiente anión, posteriormente la mencionada ruptura de anillo y migración del grupo acilo al C4 y finalmente una protonación del anión *Sp* en el nitrógeno N3 para producir el producto *Sp*; la primera etapa es endotérmica, con una barrera de 7 kcal mol⁻¹, la segunda es exotérmica con una barrera de 9.9 kcal mol⁻¹ y finalmente la tercera etapa es exotérmica, con una barrera de 0.4 kcal mol⁻¹. Señalan los autores, que este mecanismo podría ser válido en caso de un medio básico y que las dos siguientes propuestas se podrían presentar en un medio neutro.

En un segundo camino se plantea primeramente la ruptura del anillo y reordenamiento, para formar un intermediario de tipo enol-isocianato con el posterior cierre del anillo y transferencia protónica (OH del C6 al N3) para formar *Sp*; la primera etapa es endotérmica, con una barrera de 19.1 kcal mol⁻¹ y la segunda etapa es exotérmica, con una barrera de 1.7 kcal mol⁻¹ (asistida por dos moléculas de agua catalítica).

Y finalmente un tercer camino donde se produce en una primera etapa una transferencia protónica al nitrógeno 1 y en una segunda etapa, la ruptura del anillo con migración del grupo acilo y posible

transferencia protónica hacia el nitrógeno N3; esto último, solo en los dos primeros intermediarios descritos a continuación, pues el tercero ya estaría protonado en N3. En la primera etapa fueron analizadas tres posibles estructuras resultantes de la transferencia protónica: (a) al N1; (b) al carbonilo del C6 y (c) al N3, obteniéndose en los tres casos procesos endotérmicos, con barreras de 28 kcal mol⁻¹ (con una molécula de agua catalítica), 24 kcal mol⁻¹ y 38 kcal mol⁻¹. En la segunda etapa, los resultados fueron, partiendo de (a), (b) y (c) todos exotérmicos, con barreras de 10.4 kcal mol⁻¹, 21.8 kcal mol⁻¹ y 12.2 kcal mol⁻¹.

Como se puede apreciar en las anteriores propuestas, se plantean tres etapas que incluyen protonación/desprotonación o transferencia protónica además de la ruptura del anillo en C5-C6 y migración del grupo acilo, cada una de las etapas con su correspondiente barrera de activación.

CONCLUSIONES

Consideramos que, en este trabajo, se han cumplido los objetivos propuestos al inicio, pues se está proponiendo el mecanismo de formación de Sp, por una vía alternativa a la estudiada por otros autores, con intervención del oxidante NO₂.

Para ello se determinaron las geometrías más estables del compuesto de partida 8-oxoG (CR), y de los compuestos intermediarios involucrados en el mecanismo de reacción que se propuso, (CI1 a CI7), así como para el propio producto final Sp (CP), a través de cálculos teóricos utilizando la Teoría de Funcionales de la Densidad como formalismo de la Química Cuántica. De igual manera, se modelaron y optimizaron cinco estados de transición encontrados durante el análisis realizado, lo que permitió reportar las energías de Gibbs de activación y de evolución, confirmar la existencia de las correspondientes barreras de activación e identificar el paso lento del mecanismo. Las energías de Gibbs totales (ΔG_{ji}), de cada paso permitieron determinar qué tan favorecido serían estos desde el punto de vista termodinámico. Todo lo anterior, permitió realizar un análisis termodinámico y cinético de cada paso del mecanismo y establecer su pertinencia.

Aunque los cálculos se realizaron en fase gas y con efecto de solvente, el análisis del mecanismo solo fue realizado para los cálculos con efecto de solvente, en este caso el agua, por ser las condiciones que más se acercan al medio en el cual estas reacciones pudieran ocurrir.

El análisis de los resultados nos permite concluir que, en los primeros dos pasos del mecanismo de reacción propuesto, los procesos son muy endotérmicos, aspecto que puede superarse por la presencia de una especie fotosensibilizadora como la *Rf* que luego de absorber radiación Ultravioleta, puede transferirle la 8-oxoG, facilitándola oxidación y desprotonación inicial. Los pasos 3, 4 y 6 son ligeramente endergónicos y los pasos 5, 7 y 8 exergónicos. Las barreras de activación son pequeñas en los pasos 3, 4 y 5 con valores de 14.92 kcal mol⁻¹, 2.20 kcal mol⁻¹ y 1.27 kcal mol⁻¹ y el paso 7 no presentó barrera por ser un equilibrio tautomérico. Sin embargo, la mayor barrera de activación se encuentra en el paso 6 y este debe esperarse que sea el paso lento, seguido del paso 8 con una barrera algo menor.

Finalmente se demostró, que el efecto de solvente es un elemento esencial en el análisis de los mecanismos de reacción que ocurren en solución. La relevancia del estudio realizado radica en que permitirá realizar una contribución más, a los esfuerzos realizados por entender cuáles son los caminos posibles en la formación del producto de oxidación Sp y qué oxidantes nucleófilos pueden participar en su formación. Como ya hemos señalado, este es uno de los principales productos de oxidación que intervienen en las transversiones, uno de las formas de daño al ADN.

REFERENCIAS

- Acosta Valdés, M. A., Quintana Torres, J. L., Macías Llanes, M. E., & Alonso Rodríguez, D. (2006). Retos tecnológicos para un diagnóstico actual por el laboratorio: Estrés oxidativo en Pediatría. *Revista Humanidades Médicas*, 6 (3). Obtenido de <http://www.bvs.sld.cu/revistas/revistahm/numeros/2006/n18/body/hmc030306.htm>
- Adam, W., Saha-Möller, C. R., & Schönberger, A. (1996). Photooxidation of 8-Oxo-7,8-dihydro-2 ϕ -deoxyguanosine by Thermally Generated Triplet-Excited Ketones from 3-(Hydroxymethyl)-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetane and Comparison with Type I and Type II Photosensitizers. *J. Am. Chem. Soc.*, 118 (39), 9233-9238.
- Akasaka, S., & Yamamoto, K. (1994). Hydrogen peroxide induces G:C to TA and G:C to C:G transversions in the supF gene of Escherichia coli. *Mol. Gen. Genet.*, 243 (5), 500-505.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90 (17), 7915-7922.
- Armitage, B. (1998). Photocleavage of Nucleic Acids. *Chem. Rev.*, 98 (3), 1171-1200.
- Bjelland, S., & Seeberg, E. (2003). Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat. Res.*, 531 (1-2), 37-80.
- Bredt, D. S., & Snyder, S. H. (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.*, 63, 175-195.
- Breen, A. P., & Murphy, J. A. (1995). Reactions of oxyl radicals with ADN. *Free Rad Biol. & Med.*, 18 (6), 1033-1077.
- Bunker, V. W. (1992). Free radicals, antioxidants and ageing. *Med Lab Sci.*, 49 (4), 299-312.
- Cadet, J., Decarroz, C., Wang, S. Y., & Midden, W. R. (1983). Mechanism and products of photosensitized degradation of nucleic acids and related model compounds. *Isr. J. Chem.*, 23 (4), 420-429.
- Cadet, J., Douki, T., & Ravanat, J.-L. (2006). One-electron oxidation of DNA and inflammation processes. *Nature Chemical Biology*, 2 (7), 348-349.
- Cerón-Carrasco, J. P., Requena, A., Perpète, E. A., Michaux, C., & Jacquemin, D. (2010). Theoretical Study of the Tautomerism in the One-Electron Oxidized Guanine-Cytosine Base Pair. *J. Phys. Chem. B.*, 114 (42), 13439-13445.
- Chinyenetere, F., & Jamieson, E. R. (2008). Impact of the Oxidized Guanine Lesion Spiroiminodihydantoin on the Conformation and Thermodynamic Stability of a 15-mer DNA Duplex. *Biochemistry*, 47 (8), 2584-2591.
- Cotton, F. A., & Wilkinson, G. (2006). *Química Inorgánica Avanzada*. (4a ed.). New York, U. S. A.: Limusa-Wiley.
- Crean, C., Geacintov, N. E., & Shafirovich, V. (2005). Oxidation of guanine and 8-oxo-7,8-dihydroguanine by carbonate radical anions: Insight from oxygen-18 labeling experiments. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44 (32), 5057-5060.

- Delanty, N., & Dichter, M. A. (1998). Oxidative injury in the nervous system. *Acta. Neurol. Scand*, 98 (3), 145-153.
- Duarte, V., Gasparutto, D., Yamaguchi, L. F., Ravanat, J. L., Martínez, G. R., Medeiros, M. H., . . . Cadet, J. (2000). Oxaluric Acid as the Major Product of Singlet Oxygen-Mediated Oxidation of 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 122 (51), 12622-12628.
- Essigmann, J. M., & Neeley, W. L. (2006). Mechanisms of Formation, Genotoxicity, and Mutation of Guanine Oxidation Products. *Chemical Research in Toxicology*, 19 (4), 491-505.
- Ferrier, D. R. (2014). *Lippincott's Illustrated Reviews: Bioquímica*. (6a ed.). Barcelona, España: Wolters Kluwer Health.
- Fleming, A. M., Muller, J. G., Dlouhy, A. C., & Burrows, C. J. (2012). Structural context effects in the oxidation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine to hydantoin products: electrostatics, base stacking, and base pairing. *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (36), 15091-15102.
- Foksinski, M., Rozalski, R., Guz, J., Ruzzkowska, B., Sztukowska, P., Piwowarski, M., . . . Olinski, R. (2004). Urinary excretion of DNA repair products correlates with metabolic rates as well as with maximum life spans of different mammalian species. *Free Radical Biol. Med.*, 37 (9), 1449-1454.
- Galvan-Garcia, E. A., Agacino-Valdes, E., Franco-Perez, M., & Gomez-Balderas, R. (2017). [Cu(H₂O)_n]²⁺ (n = 1–6) complexes in solution phase: a DFT hierarchical study. *Theor. Chem. Acc.*, 136, 29.
- Gremaud, J. N., Martin, B. D., & Sugden, K. D. (2010). Influence of substrate complexity on the diastereoselective formation of spiroiminodihydantoin and guanidinohydantoin from chromate oxidation. *Chem. Res. Toxicol.*, 23 (2), 379-385.
- Hehre, W. J., Stewart, R. F., & Pople, J. A. (1969). Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. I. Use of Gaussian Expansions of Slater-Type Atomic Orbitals. *The J. of Chem. Phys.*, 51 (6), 2657-2664.
- Hickerson, R. P., Chepanoske, C. L., Williams, S. D., David, S. S., & Burrows, C. J. (1999). Mechanism-based DNA-protein cross-linking of MutY via oxidation of 8-oxoguanosine. *J. Am. Chem. Soc.*, 121 (42), 9901-9902.
- Hickerson, R. P., Prat, F., Muller, J. G., Foote, C. S., & Burrows, C. J. (1999). Sequence and stacking dependence of 8-oxoguanine oxidation: Comparison of one-electron vs. singlet oxygen mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.*, 121 (40), 9423-9428.
- Hohenberg, P., & Kohn, W. W. (1964). Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.*, 136 (3B), B864-B871.
- Hohenstein, E. G., Chill, S. T., & Sherrill, D. (2008). Assessment of the Performance of the M05–2X and M06–2X Exchange-Correlation Functionals for Noncovalent Interactions in Biomolecules. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4 (12), 1996–2000.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J. C., Smith, C. D., & Beckman, J. S. (1992). Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 298 (2), 431-437.

- Jia, L., Shafirovich, V., Shapiro, R., Geacintov, N. E., & Broyde, S. (2005). Spiroiminodihydantoin lesions derived from guanineoxidation: Structures, energetics, and functional implications. *Biochemistry*, *44* (16), 6043-6051.
- Joffe, A., Geacintov, N. E., & Shafirovich, V. (2003). DNA lesions derived from the site selective oxidation of Guanine by carbonate radical anions. *J. Chem. Reserch Tox.*, *16* (12), 1528-1538.
- Kasai, H., Yamaizumi, Z., Berger, M., & Cadet, J. (1992). Photosensitized formation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in DNA by riboflavin: a nonsinglet oxygen-mediated reaction. *Am. Chem. Soc.*, *114* (24), 9692-9694.
- Kino, K., & Sugiyama, H. (2005). UVR-induced G–C to C–G transversions from oxidative DNA damage. *Mutation Research.*, *571* (1-2), 33–42.
- Kohn, W., & Sham, L. J. (1965). Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev.*, *140* (4A), A1133-A1138.
- Kornyushyna, O., Berges, A. M., Muller, J. G., & Burrows, C. J. (2002). In vitro nucleotide misinsertion opposite the oxidized guanosine lesions spiroiminodihydantoin and guanidinohydantoin and DNA synthesis past the lesions using Escherichia coli DNA polymerase I (Klenow fragment). *Biochemistry*, *41* (51), 15304-15314.
- Kozuch, S., & Martin, J. M. (2013). Halogen Bonds: Benchmarks and Theoretical Analysis. *J. Chem. Theory Comput.*, *9* (4), 1918–1931.
- Laidler, K. J., & Meisser, J. H. (1997). *Fisicoquímica* (1a ed.). Boston, U. S. A.: Continental.
- Leach, A. R. (2001). *Section 2.6 “Basis Set” in Molecular Modelling; principles and Applications*. (2a ed.). London, England: Pearson Education.
- Lee, Y. A., Yan, B. H., Kim, S. K., Margolin, Y., Dedon, P. C., Geacintov, N. E., & Shafirovich, V. (2007). Mechanisms of oxidation of guanine in DNA by carbonate radical anion, a decomposition product of nitrosoperoxycarbonate. *J. Chem. Eur.*, *13* (16), 4571-4581.
- Levine, I. N. (2001). *Química Cuántica* (5a ed.). Madrid, España: Prentice Hall.
- Luo, W. C., Muller, J. G., Rachlin, E. M., & Burrows, C. J. (2001). Characterization of hydantoin products from one-electron oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine in a nucleoside model. *Chem. Res. Toxicol.*, *14* (7), 927-938.
- Luo, W., Muller, J. G., & Burrows, C. J. (2001). The pH-Dependent Role of Superoxide in Riboflavin-Catalyzed Photooxidation of 8-Oxo-7,8-dihydroguanosine. *Org. Lett.*, *3* (18), 2801-2804.
- Luo, W., Muller, J., Rachlin, E., & Burrows, C. J. (2000). Characterization of spiroiminodihydantoin as a product of of One-Electron Oxidation of 8-Oxo-7,8-dihydroguanosine. *Org. Lett.*, *2* (5), 613-616.
- Malacarne, M. F. (s.f.). *GENÉTICA: ¿COMEMOS GENES?* Recuperado el 20 de Noviembre de 2017, de Biotecnología si: <http://biotecnologiasi.tumblr.com/post/117882807550/gen%C3%A9tica-comemos-genes>

- Maquinas térmicas*. (9 de Mayo de 2010). Recuperado el 20 de Enero de 2017, de Wiki Departamento de Física Aplicada: <http://laplace.us.es/wiki/index.php?title=Entropia>
- Marletta, M. A. (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.*, 268 (17), 12231-12234.
- Meggers, E., Michel-Beyerle, M. E., & Giese, B. (1998). Sequence dependent long-range hole transport in DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (49), 12950-12955.
- MÉXICO, U. N. (26 de 12 de 2014). *Supercómputo en la UNAM*. Recuperado el 10 de 01 de 2015, de DGIC: <http://www.super.unam.mx/index.php/home/acerca-de>
- Misiaszek, R., Crean, C., Geacintov, N. E., & Shafirovich, V. (2005). Combination of nitrogen dioxide radicals with 8-oxo-7,8-dihydroguanine and guanine radicals in DNA: Oxidation and nitration end products. *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (7), 2191-2200.
- Munk, B. H., Burrows, C. J., & Schlegel, H. B. (2008). An Exploration of Mechanisms for the Transformation of 8-Oxoguanine to Guanidinohydantoin and Spiroiminodihydantoin by Density Functional Theory. *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (15), 5245–5256.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2009). *Lehninger: Principios de Bioquímica* (5a ed.). Barcelona, España: Omega.
- Niles, J. C., Burney, S., Singh, S. P., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1999). Peroxynitrite reaction products of 3',5'-di-O-acetyl-8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96 (21), 11729-11734.
- Niles, J. C., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (2006). Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide*, 14 (2), 109-121.
- Nuñez, M. E., Hall, D. B., & Barton, J. K. (1999). Long-range oxidative damage to DNA: Effects of distance and sequence. *Chem. Biol.*, 6 (2), 85-97.
- Ohno, M., Miura, T., Furuichi, M., Tominaga, Y., Tsuchimoto, D., Sakumi, K., & Nakabeppu, Y. (2006). A genome-wide distribution of 8-oxoguanine correlates with the preferred regions for recombination and single nucleotide polymorphism in the human genome. *Genome Res.*, 16 (5), 567-575.
- Pacheco-Ortín, S., Gaitán-Lozano, R., & Agacino-Valdés, E. (2012). Possible DNA damage by oxidation products of Guanine: A density Functional and Electron Propagator Theoretical Study. *Int. J. of Quantum Chem.*, 112 (16), 2840-2847.
- Pageás, V., & Fuchs, R. P. (2002). How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene*, 21 (58), 8957–8966.
- Parr, R. G., & Benjamin, W. A. (1963). *Quantum Theory of Molecular Electronic Structure*. Toledo, U. S. A.: New York.
- Saito, I., Nakamura, T., Nakatani, K., Yoshioka, Y., Yamaguchi, K., & Sugiyama, H. (1998). Mapping of the Hot Spots for DNA Damage by One-Electron Oxidation: Efficacy of GG Doublets and GGG Triplets as a Trap in Long-Range Hole Migration. *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (48), 12686–12687.

- Sayre, L. M., Perry, G., & Smith, M. A. (Enero de 2008). Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, 21 (1), 172-188.
- SEP. (29 de Enero de 2012). Recuperado el 27 de Enero de 2017, de Nature chemistry web: http://www.nature.com/nchem/journal/v4/n3/fig_tab/nchem.1244_F2.html
- Shafirovich, V., Cadet, J., Gasparutto, D., Dourandin, A., Huang, W., & Geacintov, N. E. (2001). Direct spectroscopic observation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine radicals in double-stranded DNA generated by one-electron oxidation at a distance by 2-aminopurine radicals. *J. Phys. Chem.*, 105 (2), 586-592.
- Shah, H., Patel, S., Patel, B., Solanki, N., & Jivani, N. P. (2012). Development and validation of uv-visible spectrometric method for estimation of water soluble vitamin riboflavin. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3 (9), 3462–3466.
- Shibutani, S., Takeshita, M., & Grollman, A. P. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, 349 (6308), 431–434.
- Steenken, S., & Jovanovic, S. V. (1997). How easily oxidizable is DNA? One-Electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (3), 617–618.
- Steenken, S., Jovanovic, S. V., Bietti, M., & Bernhard, K. (2000). The trap depth (in DNA) of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as derived from electron-transfer equilibria in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 122 (10), 2373-2374.
- Suzuki, T. (2009). Formation of spiroiminodihydantoin nucleoside from 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by nitric oxide under aerobic conditions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19 (17), 4944–4947.
- Suzuki, T., Mower, H. F., Friesen, M. D., Gilbert, I., Sawa, T., & Ohshima, H. (2004). Nitration and nitrosation of N-acetyl-L-tryptophan and tryptophan residues in proteins by various reactive nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.*, 37 (5), 671-681.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med. Milit.*, 31 (2), 126-133.
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2007). *Fundamentos de Bioquímica*. (2a ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Watson, J., & Crick, F. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171 (4356), 737-738.
- Yadav, A., & Mishra, P. C. (2012). Carbonate radical anion as an efficient reactive oxygen species: Its reaction with guanyl radical and formation of 8-oxoguanine. *Chemical Physics*, 405, 76–88.
- Yadav, A., & Mishra, P. C. (2012). Quantum Theoretical Study of Mechanism of the Reaction Between Guanine Radical Cation and Carbonate Radical Anion: Formation of 8-Oxoguanine. *Int. Journal of Quantum Chemistry*, 112 (8), 2000–2008.

- Yadav, A., & Mishra, P. C. (2014). Formation of spiroiminodihydantoin due to the reaction between 8-oxoguanine and carbonate radical anion: A quantum computational Study. *Chem. Phys. Lett.*, 592, 232-237.
- Ye, Y., Muller, J. G., & Burrows, C. J. (2006). Synthesis and Characterization of the Oxidized dGTP Lesions Spiroiminodihydantoin-2'-deoxynucleoside-5'-triphosphate and Guanidinohydantoin-2'-deoxynucleoside-5'-triphosphate. *J. Org. Chem.*, 71 (5), 2181-2184.
- Ye, Y., Muller, J. G., Luo, W., Mayne, C. L., Shallop, A. J., Jones, R. A., & Burrows, C. J. (2003). Formation of ¹³C-, ¹⁵N- and ¹⁸O-labeled guanidinohydantoin from guanosine oxidation with singlet oxygen. Implications for structure and mechanism. *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (46), 13926-13927.
- Zhang, Y., Ma, N., & Wang, W. (2012). Assessment of the performance of the M05-class and M06-class functionals for the structure and geometry of the hydrogen-bonded and halogen-bonded complexes. *J. Theoretical and Computational Chemistry.*, 11 (6), 1165-1173.
- Zhao, Y., & Truhlar, G. D. (2004). Hybrid Meta Density Functional Theory Methods for Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, and Noncovalent Interactions: The MPW1B95 and MPWB1K Models and Comparative Assessments for Hydrogen Bonding and van der Waals Interactions. *J. Phys. Chem. A.*, 108 (33), 6908-6918.
- Zhao, Y., Schultz, N. E., & Truhlar, D. G. (2006). Design of Density Functionals by Combining the Method of Constraint Satisfaction with Parametrization for Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, and Noncovalent Interactions". *Journal of Chemical Theory and Computation.*, 2 (2), 364-382.