



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y
CENTRO DE QUÍMICA-INSTITUTO DE CIENCIAS
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN MOLECULAR DE
DONADORES DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) Y DONADORES DE
NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS CON EL CNBD DEL CANAL HCN

Tesis que para obtener el título de:
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Presenta:
VIOLETA RANGEL GALVÁN

Directores de Tesis:

Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante

Dra. María Eugenia Castro Sánchez

Octubre 2020



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por el Dr. José Manuel Pérez Aguilar, Dra. Norma Angélica Caballero Concha, Dr. Enrique González Vergara, Dr. Tomás Guerrero Briseño y el Dr. Sergio Durand Niconoff, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Estudio de la Interacción Molecular de Donadores de Óxido Nítrico (NO) y Donadores de Nucleótidos Cíclicos con el CNBD del Canal HCN”**, que presenta la alumna **M.C. Violeta Rangel Galván** para obtener el grado de Doctorado en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los veintinueve días del mes de septiembre del año dos mil veinte.

ATENTAMENTE

Dr. José Manuel Pérez Aguilar

Dra. Norma Angélica Caballero Concha

Dr. Enrique González Vergara

Dr. Tomás Guerrero Briseño

Dr. Sergio Durand Niconoff

Agradezco al CONACyT por la beca de doctorado otorgada (286497).



Agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) por el apoyo
brindado a través de los proyectos 100517029-VIEP2018, 100256733-VIEP 2018 y
100256733-2019



Agradezco al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS-BUAP) por
los recursos computacionales otorgados para realizar este trabajo.



Agradezco al Cuerpo Académico BUAP-CA-263
“Investigación Experimental-Computacional de Nuevos Materiales
y Sistemas Biomoleculares” (PRODEP-SEP).



Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por haberme aceptado para ser parte de ella y abierto las puertas para poder estudiar mi carrera, así como a todos los docentes del Posgrado de Ciencias Químicas que me brindaron su apoyo y sugerencias durante mi estancia en el doctorado.

Agradezco al Dr. Francisco Javier Meléndez por haberme brindado su conocimiento científico y sus aportaciones que ayudaron a la realización del artículo, así como a todos los integrantes del Laboratorio de Química Teórica de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP por sus sugerencias y consejos.

Agradezco a la Dra. María Eugenia Castro Sánchez por haberme brindado su conocimiento científico, su capacidad y su experiencia para guiarme durante la publicación del artículo y la escritura de la tesis.

Agradezco al Comité Tutorial y a la Comisión Revisora conformada por Dr. José Manuel Pérez Aguilar, Dr. Enrique González Vergara, Dr. José Alejandro Rangel Huerta, Dra. Norma Angélica Caballero Concha, Dr. Tomás Guerrero Briseño y Dr. Sergio Durand Niconoff por sus observaciones y comentarios a mi trabajo de tesis.

Agradezco a mi familia, a mi padre y a mi hermana por su apoyo y sus aportaciones científicas durante mi estancia en este posgrado.

Artículo

Rangel-Galván, V., Castro, M. E., Perez-Aguilar, J. M., Caballero, N. A., Meléndez, F. J. **2019**. Effect of the alkyl substituent in NONOates derivatives on the reaction mechanism of NO liberation. *Theoretical Chemistry Accounts*, 138(5), 66. (Ver apéndice).

Theoretical Chemistry Accounts (2019) 138:66
<https://doi.org/10.1007/s00214-019-2453-y>

Effect of the alkyl substituent in NONOates derivatives on the reaction mechanism of NO liberation

Violeta Rangel-Galván¹ · María Eugenia Castro² · Jose Manuel Perez-Aguilar¹ · Norma A. Caballero³ · Francisco Javier Meléndez¹

Received: 22 February 2019 / Accepted: 20 April 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Nitric oxide (NO) is a small biological molecule dealing with several physiological processes. NO can be obtained from different donor compounds. In this work, an analysis of the reaction mechanism for the liberation of NO from a series of NONOates: 1,1-dimethyl-3-oxotriazan-2-olate ($(\text{CH}_3)_2\text{N}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ (**1**), 1,1-diethyl-3-oxotriazan-2-olate ($(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2\text{N}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ (**2**), 1,1-dipropyl-3-oxotriazan-2-olate ($(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2\text{N}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ (**3**), 1,1-dibutyl-3-oxotriazan-2-olate ($(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2\text{N}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ (**4**) and 1,1-dipentyl-3-oxotriazan-2-olate ($(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2\text{N}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ (**5**) is carried out. M06L/6-311++G(d,p) density functional theory calculations were performed for obtaining the geometries and energies of the involved species in the mechanism. Mechanism is proposed by protonation of **1–5**, and then, their protonated tautomers are involved to obtain the intermediaries and transitions states. Tautomerization energies are found to be between 2.23 and 21.44 kcal mol⁻¹ with respect to the lowest energy tautomer **H1** in all NONOates structures. Finally, as products, the corresponding secondary amine and two molecules of NO are obtained. Geometry optimizations were carried out in aqueous solution using SMD. Current ΔG values take into account the thermochemical contributions of enthalpy and entropy at 298.15 K. The effect of substituent size on the dissociation energy barrier was analyzed finding similar values for dissociation of **1–5** NONOates. The NONOate **1** with smallest substituent has the lowest dissociation barrier of 4.78 kcal mol⁻¹ and leads to most energetically stable products. As alkyl substituent is increased in size, the value of dissociation barrier is increased in 1.5–2.0 kcal mol⁻¹ for **2–5** NONOates. Relative pK_a values and natural bond orbitals, NBO, are estimated using for the tautomers **H5** where the protonation site has the most acid behavior causing the NO generation.

Durante la realización de esta tesis se participó en los siguientes congresos y foros académicos:

XXII Simposio Interno de Posgrado en Ciencias Químicas. Participación en la modalidad de cartel con el trabajo titulado *Cálculo de Optimización de Geometría y Estudio Teórico de los espectros RMN para los donadores de Óxido Nítrico SIN-1 y SNAP-1* llevado a cabo del 6-10 noviembre 2017, Puebla, Pue.

XVI Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica. Participación en la modalidad de cartel con el trabajo titulado *Cálculo de Optimización de Geometría y Estudio Teórico de los espectros RMN para los donadores de Óxido Nítrico y para los donadores de Nucleótidos Cíclicos* llevado a cabo del 15-17 noviembre 2017, Puebla, Pue.

XXIII Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas. Participación en la modalidad oral con el trabajo titulado *Estudio de la Interacción Molecular de Donadores de Óxido Nítrico (NO) y donadores de Nucleótidos cíclicos con el CNBD del canal HCN2* llevado a cabo del 15-19 octubre 2018, Puebla, Pue.

XVII Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica. Participación en modalidad de cartel con el trabajo titulado *Estudio de Interacción molecular de donadores de Óxido Nítrico (NO) y donadores de Nucleótidos Cíclicos con el CNBD del canal HCN* llevado a cabo del 22-24 de noviembre de 2018, Monterrey, N.L.

11th Congress on Electronic Estructure: Principles and Applications, ESPA 2018. Participación en la modalidad de cartel con el trabajo titulado *Reaction mechanism for obtaining NO from NONOates derivatives* llevado a cabo del 17-19 de julio de 2018, Toledo, España.

XXIV Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas. Participación en la modalidad oral con el trabajo titulado *Estudio de la Interacción Molecular de Donadores de Óxido Nítrico (NO) y donadores de Nucleótidos cíclicos con el CNBD del canal HCN2* llevado a cabo del 11-15 noviembre 2019, Puebla, Pue.

XVIII Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica. Participación en la modalidad de cartel con el trabajo titulado *Estudio conformacional del canal HCN con Simulaciones de Dinámica Molecular* llevado a cabo del 24-26 de octubre de 2019, Toluca, Estado de México.

Resumen

Los canales HCN (Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channels) son proteínas de membrana responsables de la actividad eléctrica de las células excitables. Además, son activados por hiperpolarización y regulados por unión a nucleótidos cíclicos y óxido nítrico (NO). Para estudiar el mecanismo de descomposición del NO es necesario contar con compuestos que liberen NO a los sistemas biológicos. Las sales de diazeniumdiolato (NONOatos) constituyen una clase versátil de donadores de NO y debido a que este mecanismo sigue siendo de interés, en esta tesis se describe el mecanismo de liberación del NO a partir de NONOatos mediante un enfoque teórico basado en la teoría del funcional de la densidad (DFT), para después evaluar los sitios de interacción de los ligantes con el dominio de unión a nucleótido cíclico (CNBD) del canal HCN mediante simulaciones de dinámica molecular. Nuestra propuesta de mecanismo de liberación de NO surge del estudio de protonación en los NONOatos (1-5). Se evaluó el papel del tamaño del sustituyente dialquilamino en la estructura de los NONOatos (1-5) y se observó que los tautómeros protonados (H1-H5) están involucrados en la generación de los productos. Se propuso que el tautómero 1-5-H5, protonado en el nitrógeno del amino del grupo diolato, genera el estado de transición para llevar a cabo el mecanismo de liberación de NO. Los resultados muestran que el valor de energía libre de hidratación del tautómero H5 para todos los NONOatos es el reactivo más lábil y que 1-5-H5 presenta la barrera energética más pequeña para la disociación exotérmica, generando una amina secundaria y dos moléculas de NO. Por otro lado, se investigaron las interacciones y consecuencias conformacionales de los nucleótidos cíclicos, cAMP y cGMP, en el dominio C-terminal (CNBD) de los canales HCN mediante simulaciones de dinámica molecular. El CNBD del canal HCN1 se estudió en tres condiciones: CNBD (apoproteína), CNBD/cAMP y CNBD/cGMP, en la ausencia del dominio transmembranal. Los resultados de las simulaciones sugieren que el movimiento de la apoproteína está caracterizado por fluctuaciones significativas localizadas en la apertura del bolsillo de unión de nucleótidos cíclicos. En presencia de cualquiera de los ligantes dichas fluctuaciones se reducen significativamente, lo cual es consistente con observaciones reportadas en la literatura.

Summary

The Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channels (HCN) basically are proteins embedded in the membrane responsible for the electric activity of excitable cells. They are activated by membrane hyperpolarization and regulated by the binding to cyclic nucleotides and nitric oxide (NO). In order to carry out the interaction mechanism between HCN channels and the ligands, it is necessary to have compounds that can supply concentrations of NO to biological systems. The diazeniumdiolate salts (NONOates) constitute a versatile class of NO donor. In this work, the mechanism of NO release from NONOate is described, using DFT theoretical calculations. The interaction sites of the ligands with the Cyclic Nucleotide Binding Domain (CNBD) of the HCN channel using molecular dynamics simulations were also studied. Our mechanism proposal starts from the protonation of the NONOate (1-5). The possible protonated tautomers (H1-H5) from (1-5) are involved in the generation of the products. The 1-5-H5 tautomer (compound with the smallest size of dialkylamine substituent), which contains the proton on amino nitrogen, was proposed to be the appropriate transition state structure to carry out the NO release mechanism. The results show that the free energy of hydration value of the protonated tautomer H5 for all NONOates is the most labile reagent for releasing of NO. The 1-H5 tautomer presents the smallest energy barrier for exothermic dissociation generating a secondary amine and two NO molecules. On the other hand, the interactions and conformational consequences of the cyclic nucleotides, cAMP and cGMP, in the C-terminal domain (CNBD) of the HCN channels were investigated by molecular dynamics simulations. The CNBD of the HCN1 channel was studied in three conditions: CNBD (apoprotein), CNBD/cAMP, and CNBD/cGMP in the absence of the TM domain. The results of the simulations suggest that the movement of the apoprotein is characterized by significant localized fluctuations in the entrance of the cyclic nucleotide binding. In the presence of any of the ligands, those fluctuations are significantly reduced, which is consistent with observations reported in the literature.

Índice

Capítulo I. Introducción	1
Capítulo II. Antecedentes	6
2.1 Canales HCN	6
2.2 Ligantes Naturales del canal HCN	8
2.3 Óxido Nítrico (NO) como ligante natural del canal HCN	10
2.4 Compuestos diazeniumdiolatos como donadores de NO	11
2.5 Mecanismo de liberación de NO	12
2.6 Vía de señalización NO/cGMP y S-nitrosilación	14
Capítulo III. Fundamentos Teóricos	17
3.1 Teoría del Funcional de la Densidad	17
3.2 Funciones de Base	20
3.3 Efectos del disolvente	22
3.4 Mecanismos de reacción	25
3.5 Cálculos de pK_a	27
3.6 Análisis de Orbitales Naturales de Enlace (NBO)	31
3.7 Simulación de Dinámica Molecular	34
Capítulo IV. Metodología	38
Capítulo V. Resultados y discusión	40
5.1 Estructura molecular de los tautómeros	40
5.2 Mecanismos de reacción	48
5.3 Cálculo de pK_a	55

5.4 Análisis de NBO	58
5.5 Simulaciones de Dinámica Molecular	61
Capítulo VI. Conclusiones	64
Bibliografía	66
Apéndice	71

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
AMBER	Modelo Asistido de Construcción con Energía de Refinamiento (<i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i>)
ARN	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
ASP	Aspartato (<i>Aspartate</i>)
B3LYP	Becke 3-parámetros Lee-Yang-Parr (<i>Becke 3-parameter, Lee-Yang-Parr</i>)
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclico (<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>)
CBS-QB3	Método de Conjunto Base Completo (<i>Complete Basis Set Method</i>)
cGMP	Guanosina Monofosfato Cíclico (<i>Cyclic Guanosine Monophosphate</i>)
CGTF	Función de tipo Gaussiana Contraída (<i>Contracted Gaussian-like Function</i>)
CHARMM	Mecánica Macromolecular de Química en Harvard (<i>Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics</i>)
CNBD	Dominio de Unión a Nucleótidos Cíclicos (<i>Cyclic Nucleotide Binding Domain</i>)
CNG	Canal Iónico activado por Nucleótido Cíclico (<i>Cyclic nucleotide-gated ion channel</i>)
COSMO	Modelo de apantallamiento tipo conductor (<i>Conductor-like Screening Model</i>)
DEA/NO	Dietilamina NONOato (<i>Diethylamine NONOate</i>)

DFT	Teoría del Funcional de la Densidad (<i>Density Functional Theory</i>)
DZ	Base Doble Zeta (<i>Double Zeta Basis Set</i>)
DZP	Base Doble Zeta Polarizada (<i>Double Zeta basis plus Polarization Set</i>)
eNOS	Óxido Nítrico endotelial (<i>Endotelial Nitric Oxide</i>)
GTF	Funciones tipo Gaussiana (<i>Gaussian Type Function</i>)
HCN	Canales activados por Hiperpolarización y unión a Nucleótidos Cíclicos (<i>Hyperpolarization-Activated cyclic Nucleotide-gated Channels</i>)
HMN	Núcleo Motor Hipogloso (<i>Hypoglossal Motor Nucleus</i>)
IEF-PCM	Formalismo de la Ecuación Integral del Modelo del Continuo Polarizable (<i>Integral Equation Formalism of Polarizable Continuum Model</i>)
iNOS	Óxido Nítrico Inducible (<i>Inducible Nitric Oxide</i>)
I _H	Corriente activada por Hiperpolarización (<i>Hyperpolarization-activated current</i>)
IRC	Coordenada de Reacción Intrínseca (<i>Intrinsic Reaction Coordinate</i>)
K _V	Canal de Potasio activado por Voltaje (<i>Potassium voltage-gated channel</i>)
LMO	Orbitales Moleculares Localizados (<i>Localized Molecular Orbitals</i>)
M06L	Funcional Local de Minnesota 06 (<i>Minnesota Local Functional 06</i>)

MD	Dinamica Molecular (<i>Molecular Dynamics</i>)
MNC	Neuronas Magno Celulares (<i>Magnocellular Neurosecretory Cells</i>)
NAOs	Orbitales Atómicos Naturales (<i>Natural Atomic Orbitals</i>)
NBO	Orbitales Naturales de Enlace (<i>Natural Bond Orbitals</i>)
NMDA	Acido <i>N</i> -metil-D-Aspártico (<i>N-Methyl-D-Aspartate</i>)
nNOS	Óxido Nítrico Neuronal (<i>Neuronal Nitric Oxide</i>)
NO	Óxido Nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
NOS	Sintasa de Óxido Nítrico (<i>Nitric Oxide Synthase</i>)
NHOs	Orbitales Naturales Híbridos (<i>Natural Hybrid Orbitals</i>)
NPE	Ecuación de Poisson no homogénea (<i>Inhomogeneous Poisson equation</i>)
OA	Orbital Atómico (<i>Atomic Orbital</i>)
OM	Orbital Molecular (<i>Molecular Orbital</i>)
PBC	Sitio de Unión a Fosfato (<i>Phosphate-Binding-Cassette</i>)
PBE	Funcional de Perdew, Burke y Ernzerhof (<i>Perdew, Burke and Ernzerhof functional</i>)
PCM	Modelo del Continuo Polarizable (<i>Polarizable Continuum Model</i>)

PDB	Banco de datos de Proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidronio en disolución (<i>Negative logarithm of the concentration of hydronium ions in solution</i>)
pK _a	Constante de disociación ácida (<i>Acid Dissociation Constant</i>)
PTM	Modificación Postraducciona (<i>Post-translational Modification</i>)
SAS	Solvente Accesible (<i>Affordable Solvent</i>)
SER	Serina (<i>Serine</i>)
SMD	Método de Solvatación basado en la Densidad (<i>Universal Solvation Model Based on Electron Density</i>)
SNC	Sistema Nervioso Central (<i>Central Nervous System</i>)
SOC	Complejo Olivar Superior (<i>Superior Olivary Complex</i>)
SV	Conjunto base de valencia desdoblada (<i>Valence Basis Set</i>)
TASK	Canales de Potasio Sensibles a la Acidez (<i>K⁺ Channels acid-sensitive related-TWIK</i>)
TS	Estado de Transición (<i>Transition State</i>)
UV	Ultra-Violeta (<i>UltraViolet radiation</i>)
VDZ	Conjunto base Doble Zeta (<i>Double Zeta Valence Basis Set</i>)

VMD	Dinámica Molecular Visual (<i>Visual Molecular Dynamics</i>)
VTZ	Conjunto base Triple Zeta (<i>Triple Zeta Valence Basis Set</i>)

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura general de los canales activados por 7
hiperpolarización y por unión a nucleótidos cíclicos (HCN), estos
canales están modulados por la unión a nucleótidos cíclicos (cAMP y
cGMP) y NO que se puede unir al CNBD mediante la vía NO/cGMP o
directamente por la S-nitrosilación, además estos canales se encuentran
en su forma heterotetramérica in vivo. Figura modificada de [6].

Figura 2. Propiedades de la corriente I_H . (A) Registros 9
electrofisiológicos de la corriente I_H , se observa las isoformas mHCN1,
mHCN2 y hHCN4. Cada familia de corriente de entrada dependiente del
tiempo es generada por pasos hiperpolarizantes de -40 a -140 mV desde
un potencial de sostenimiento de -30 mV. (B) La aplicación del cAMP
en el lado citoplasmático de la membrana causa un desplazamiento
mucho mayor en la curva de activación del HCN2 comparado con
HCN1; (C) Representación esquemática de la estructura de las cuatro
isoformas del canal HCN. Figura tomada de [5].

Figura 3. Ciclo termodinámico. Esquema modificado de [40]. 29

Figura 4. Estructuras moleculares de los NONOatos 1-5 calculados en 41
el nivel de teoría M06L/6-31++G (d, p) usando el método de solvatación
SMD en solución acuosa.

Figura 5. Estructuras moleculares de los NONOatos y sus tautómeros 42
protonados H1-H5.

Figura 6. Esquema general del mecanismo de reacción para la 49
liberación de NO a partir de los NONOatos 1-5.

Figura 7. Esquema general de los perfiles energéticos de los tautómeros 52
1-5-H5 para la liberación de NO calculado en el nivel de teoría M06L/6-
311++G(d,p). Reac se refiere a reactivo, TS es el estado de transición,

Int es un intermediario y Prod se refiere al producto.

Figura 8. Perfiles energéticos para la descomposición de los tautómeros 53
(a) 1-H5, (b) 2-H5, (c) 3-H5, (d) 4-H5 y (e) 5-H5 para la formación de la
amina secundaria correspondiente y la liberación del dímero de NO
calculados en el nivel de teoría M06L/6-311++G (d, p).

Figura 9. Esquema de la formación de las especies no protonadas a 56
partir de los NONOatos 1-5-H5.

Figura 10. Gráficos moleculares NBO de los tautómeros 1-5-H5 60
calculados al nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p) en solución acuosa
con el método de solvatación SMD.

Figura 11. A) Unidad de simulación del CNBD del canal HCN, B) 61
CNBDs de los canales HCN en condición de apoproteína (sin unión a
ligante) y holoproteína (con unión al ligante). Solo se presente la cadena
A del homotetrámero de CNBD estudiado. En el recuadro se muestran
algunas de las distancias analizadas y asociadas con la apertura al sitio
de enlace a nucleótidos cíclicos.

Figura 12. Gráficos del comportamiento de la cadena A del CNBD del 63
canal HCN en tres condiciones: apoproteína y holoproteína (cAMP y
cGMP).

Lista de Tablas

Tabla 1. Longitudes de enlace seleccionadas (en Å) de los NONOatos 1-5 y sus tautómeros protonados H1-H5 calculados en el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p) en fase acuosa con el método de solvatación SMD. La convención numérica es la de la Figura 1. 43

Tabla 2. Ángulos de valencia y ángulos diedros seleccionados (en grados) de los NONOatos 1-5 y sus tautómeros protonados H1-H5 calculados en el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p) en fase acuosa con el método de solvatación SMD. La convención numérica es la de la Figura 1. 45

Tabla 3. Energías relativas (en kcal mol⁻¹) de los NONOatos 1-5 y sus tautómeros protonados H1-H5 calculadas en el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p) en fase gas y en fase acuosa con el método de solvatación SMD. 47

Tabla 4. Energías libres ΔG (en kcal mol⁻¹) de las especies involucradas en el mecanismo de reacción de liberación del NO de los tautómeros 1-5-H5 calculados en el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p) con el método de solvatación SMD en agua. 51

Tabla 5. Energías libres relativas en fase gas (G_g^0) (en Hartrees) y energías libres de solvatación (ΔG_s^0) en kcal mol⁻¹ para los tautómeros 1-5-H5 y las especies no protonadas 1-5 involucrados en el mecanismo de liberación de NO calculados en el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p). 56

Tabla 6. Energías libres de solvatación $\Delta\Delta G_{sol}^0$ (kcal mol⁻¹) y valores teóricos de pK_a de los tautómeros 1-5-H5 involucrados en el mecanismo de reacción de liberación de NO calculados en el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p). 58

Tabla 7. Orbitales Naturales de Enlace (NBO) de los NONOatos 1-5 y 58 sus tautómeros protonados H1-H5 calculados en el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p) en agua con el método de solvatación SMD.

Capítulo I. Introducción

La corriente iónica activada por hiperpolarización (I_H) es transportada por los canales activados por hiperpolarización y por unión a nucleótidos cíclicos (HCN). Los canales HCN pertenecen a la familia de canales de potasio dependiente de voltaje K_V y a la superfamilia de los canales catiónicos que incluyen a los canales activados por unión a nucleótido cíclico (CNG) [1]. Estos canales son débilmente selectivos para iones K^+ con respecto a iones Na^+ , lo que genera una proporción de permeabilidad (P_{K^+}/P_{Na^+}) de 3-5 y son todavía menos permeables a iones Ca^{2+} . Esta selectividad débil que expresan, entre los iones K^+ y Na^+ , es una característica importante de los canales HCN debido a que les permite conducir una corriente despolarizante de entrada de Na^+ a potenciales hiperpolarizantes donde son funcionalmente activos [1, 2].

El descubrimiento de la corriente I_H en las células del nodo sinusal y en neuronas del sistema nervioso, a finales de 1970 y a principios de 1980, respectivamente, ha provocado un continuo interés en fisiólogos e investigadores que trabajan en disciplinas del área biomédica [2, 3]. La I_H está involucrada en la actividad rítmica de los circuitos neuronales entre otros procesos fisiológicos importantes. Por ejemplo, se ha visto que juega un papel importante en el inicio y en la regulación del latido del corazón (conocida como corriente marcapasos), está involucrada en el control de la actividad rítmica de los circuitos neuronales (en tejidos neuronales como el tálamo) y contribuye a otros varios procesos neuronales, incluyendo la determinación del potencial de membrana en reposo, la integración dendrítica y el procesamiento temporal de las señales visuales en la retina [3].

La activación de la I_H se ve facilitada por la unión del cAMP (Adenosín 3',5'-Monofosfato Cíclico) al CNBD del canal HCN, la cual induce un desplazamiento de la dependencia de voltaje hacia voltajes más positivos y actúa de manera independiente a la proteína quinasa A (la cual a su vez activa la fosforilación) [2, 3]. Con base en la literatura [4] el canal HCN normalmente está en su configuración inhibida pero la unión con el ligante cAMP cambia esta inhibición a una configuración abierta en la que la probabilidad de apertura aumenta considerablemente [5]. El ligante cGMP (Guanosina 3',5'-Monofosfato Cíclico) es un agonista completo del canal HCN, debido a que a concentraciones saturadas, el desplazamiento de la

diferencia de potencial es del mismo orden que en el cAMP. Sin embargo, se ha mostrado que el cGMP tiene una potencia 10 veces menor que el cAMP en la I_H de los canales HCN [5, 6]. La literatura nos indica que los ligantes naturales de los canales HCN como el cAMP y el cGMP al unirse al CNBD de los canales HCN aceleran la apertura del canal y la diferencia de potencial de activación se desplaza hacia valores más positivos, es decir que, a un valor de diferencia de potencial dado, el flujo de la corriente I_H es significativamente mayor con la unión de cAMP y cGMP al CNBD de los canales HCN que en la configuración de apoproteína [4-6].

Por otro lado, el Óxido Nítrico (NO) es un gas mensajero que actúa como ligante natural modulando la excitabilidad eléctrica de la I_H en los canales HCN en sistemas neuronales mediante la vía de señalización NO-cGMP y de manera directa mediante la modificación postraduccional S-nitrosilación [7]. Este NO mensajero es un modulador que actúa directamente en muchos tipos de neuronas del sistema nervioso central (SNC) de mamíferos y de manera independiente de las entradas sinápticas, debido a su simplicidad química es capaz de transferir señales gracias a los rápidos cambios en su concentración local. Sin embargo, esta información en forma de señal y la manera en la que el NO genera cambios en la excitabilidad neuronal son de vida media corta y localizada, debido a que el NO se degrada espontáneamente por una reacción que involucra al O_2 y al grupo hemo de las proteínas. El incremento de concentración local de NO puede trasladarse rápidamente como señal intercelular debido a que el electrón desapareado del NO se une a los metales de transición con alta afinidad química. En efecto, la interacción con el grupo hemo activa el guanilato ciclasa y esto incrementa la síntesis de cGMP intracelular [7, 8]. El NO está involucrado en un gran número de funciones fisiológicas en sistemas biológicos, por ejemplo, a nivel neuronal está involucrado en diferentes procesos relacionados con la sinapsis, neuroplasticidad y comunicación neurovascular [7].

Así, la función de los canales HCN está modulada por la unión con sus ligantes naturales endógenos cAMP, cGMP y NO. Por lo que es importante estudiar mecanismos moleculares de liberación de NO a partir de compuestos donadores, para posteriormente, identificar posibles diferencias entre la interacción del CNBD con el cAMP y cGMP.

Los compuestos aminoNONOatos son moléculas fisiológicamente relevantes como compuestos donadores de NO debido a que su descomposición no es catalizada por tiores o tejidos biológicos, a menos que sean diseñados específicamente para esto, además la tasa de liberación es predecible y controlable en condiciones experimentales. Es por eso, que en este trabajo de tesis se presenta, por una parte, el estudio teórico de un mecanismo de reacción de liberación de NO a partir del compuesto diazeniumdiolato, donador de NO, usando una metodología basada en la teoría del funcional de la densidad (DFT), proponiendo un mecanismo de reacción de liberación del NO; mientras que en la segunda parte, se estudia la interacción de los nucleótidos cíclicos cAMP y cGMP con el CNBD de los canales HCN en tres condiciones fisiológicas relevantes: CNBD (apoproteína), CNBD/cAMP y CNBD/cGMP, utilizando simulaciones de Dinámica Molecular y considerando la región C-terminal del canal HCN en solución acuosa. Se han considerado también cambios conformacionales con y sin unión al ligante.

Este trabajo de tesis se divide en 6 capítulos:

El capítulo I es una introducción a la fisiología general del canal HCN en interacción con sus ligantes naturales, cAMP, cGMP y NO. En este capítulo, se detalla la estructura general de la tesis. Además, se plantea la hipótesis de este trabajo de tesis, así como el objetivo general y los objetivos particulares de las diferentes etapas establecidas en la tesis.

El capítulo II, Antecedentes, presenta los detalles estructurales y fisiológicos del canal HCN y sus ligantes. Se dan a conocer los procesos químicos en los cuales el NO se une al canal HCN: la vía de señalización NO/cGMP y la S-nitrosilación. Se consideran las propiedades de los donadores de NO a nivel molecular. Se describe el mecanismo de reacción de liberación de un compuesto donador de NO conocido como sal dietilamonio.

En el capítulo III se revisan los fundamentos teóricos, tanto de la parte del mecanismo de liberación de NO, como de la simulación de dinámica molecular.

En el capítulo IV se describen los métodos computacionales utilizados, así como las técnicas para llevar a cabo el trabajo de tesis.

En el capítulo V se presentan los resultados obtenidos y se discuten las principales aportaciones sobre el mecanismo de liberación de NO y el perfil energético de la sal dietilamonio donador de NO y los resultados de las simulaciones de dinámica molecular.

En el capítulo VI se presentan las conclusiones de la tesis. Por último, se enlistan las referencias utilizadas.

Hipótesis

Es posible desarrollar una metodología teórica para estudiar el mecanismo de liberación de NO a partir de donadores aminoNONOatos fisiológicamente relevantes mediante cálculos basados en la metodología DFT, para posteriormente evaluar los cambios conformacionales propios del CNBD del canal HCN en presencia y ausencia de sus ligantes naturales en un ambiente fisiológico utilizando la técnica de simulaciones de dinámica molecular.

Objetivo general

Describir el mecanismo de liberación del NO a partir de compuestos aminoNONOatos usando cálculos basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT) y posteriormente evaluar, mediante cálculos de simulaciones de dinámica molecular, las conformaciones exploradas CNBD del canal HCN en ausencia y en presencia de nucleótidos cíclicos.

Objetivos Particulares

1. Realizar la caracterización estructural y energética de una serie de compuestos aminoNONOatos y sus tautómeros usando el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p).
2. Calcular el mecanismo de reacción usando cálculos de coordenadas de reacción intrínseca (IRC) para la liberación de NO a partir de los compuestos donadores aminoNONOatos usando el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p).

3. Evaluar cambios conformacionales del CNBD del canal HCN y cómo dicho dominio es modificado en presencia de nucleótidos cíclicos mediante cálculo de simulaciones atomísticas de dinámica molecular.

Capítulo II. Antecedentes

2.1 Canales HCN

La superfamilia K_V es el subgrupo más grande de canales de potasio, estos canales son capaces de activarse mediante cambios en el potencial de membrana, todos los miembros de esta familia comparten dominios transmembrana que forman el poro del canal capaz de conducir iones de potasio, sodio e incluso calcio. Algunos miembros relevantes de la familia K_V son los canales activados por unión a nucleótido cíclico (CNG) y los canales activados por hiperpolarización y por unión a nucleótidos cíclicos (HCN) [9].

Los canales HCN son parte de la superfamilia de canales de potasio voltaje dependiente K_V . Se han encontrado cuatro subunidades homólogas del canal HCN (HCN1-HCN4). Los genes homólogos del canal HCN se han clonado a partir de invertebrados y mamíferos. Sin embargo, estos canales no se han encontrado en *c. elegans*, levaduras ni en organismos procariotas [1-3]. Los canales HCN funcionales se ensamblan en configuraciones homoméricas y heteroméricas en condiciones fisiológicas y en tejidos normales de los mamíferos. El ensamblaje heteromérico incrementa la diversidad de los canales HCN facilitando su adaptación a múltiples funciones en el sistema nervioso. Las neuronas piramidales, hipocampales y neocorticales son el blanco preferente de los canales HCN, los cuales se expresan principalmente en las dendritas distales para controlar la excitabilidad y regular la conectividad funcional de las redes neuronales [3].

Cada subunidad homóloga del canal HCN consta de seis segmentos transmembranales (S1-S6) incluyendo una región amino N-terminal y una región carboxilo terminal C-terminal (situados en el centro del esquema de la Figura 1). La región C-terminal contiene un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD). La región C-linker de cada subunidad está compuesta por seis α -hélices (hélices $\alpha A'$ - $\alpha F'$ dibujadas en rojo oscuro, ver Figura 1) las cuales se conectan directamente al CNBD del segmento transmembranal S6. Los CNBDs constan de cuatro α -hélices (αA - αC y una hélice corta de casete de unión a fosfato (PBC dibujado en rojo claro) y un rollo β (en azul), ver Figura 1. El bolsillo de unión a nucleótido cíclico está formado por partes del rollo β , hélice PBC y hélice αC [4]. El rollo β consta de ocho hebras β antiparalelas

dirigidas por un haz helicoidal de cuatro α -hélices y está rodeado por el N-terminal del α -hélice de A, un α -hélice interna corta que está localizada entre las hebras β 6 y 7 designadas como el casete de unión a fosfato (PBC) y dos α hélices B y C (α B y α C) localizados en el C-terminal. Además, el rollo β forma un bolsillo de unión a nucleótidos cíclicos y contiene varios residuos que forman interacciones electrostáticas y de enlace de hidrógeno específicas con nucleótidos cíclicos.

El nucleótido cíclico se une dentro de una cavidad formada por partes del rollo- β , hélice PBC y hélice α C. Se tiene información de que la molécula de cAMP se une en la conformación *anti* debido a que el motivo de la fosforibosa interacciona con partes del rollo- β y la hélice PBC a través de interacciones electrostáticas y de enlaces de hidrógeno.

Tras la unión del nucleótido cíclico, las hélices B y C parecen girar como una sola unidad articulada cerca del N-terminal de la hélice B, hacia el rollo β permitiendo que la hélice C interactúe con el resto de la base y por lo tanto cubra el bolsillo de unión [4, 6].

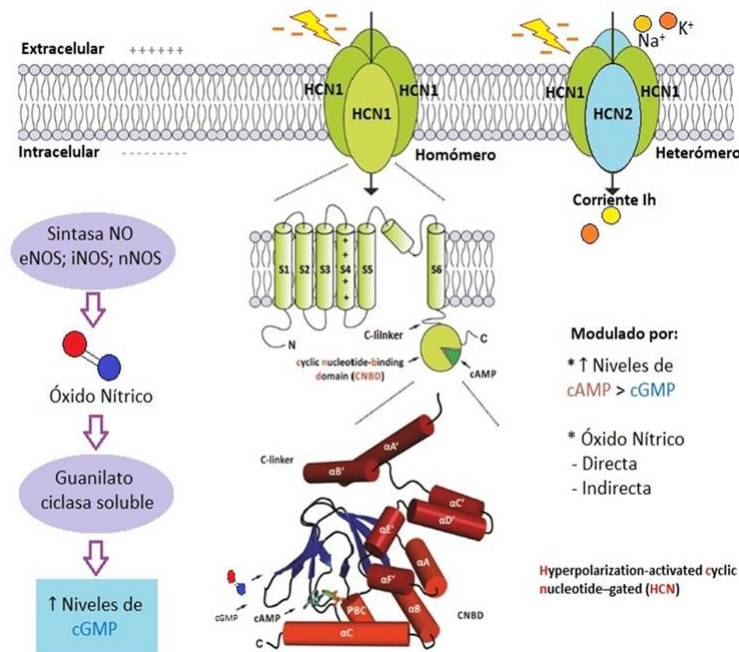


Figura 1. Estructura general de los canales activados por hiperpolarización y por unión a nucleótidos cíclicos (HCN), estos canales están modulados por la unión a nucleótidos cíclicos (cAMP y cGMP) y NO que se puede unir al CNBD mediante la vía NO/cGMP o directamente por la S-nitrosilación, además estos canales se encuentran en su forma heterotetramérica in vivo. Figura modificada de [6].

2.2 Ligantes Naturales del canal HCN

Como se mencionó anteriormente, los canales HCN son principalmente activados por hiperpolarización del potencial de membrana y están regulados por nucleótidos cíclicos, los cuales interactúan con un sitio específico, el CNBD, localizado en la porción C-terminal intracelular del canal HCN. El cAMP acelera la apertura del canal y recorre la curva de activación hacia potenciales más positivos.

Se ha mostrado mediante técnicas de parche perforado (Patch clamp) que los canales HCN se activan de manera dependiente del tiempo y de la diferencia de potencial generando una corriente interna que no se inactiva, impulsada por sus gradientes electroquímicos de Na^+ y K^+ que fluyen a través de los canales HCN en su configuración abierta siempre que el paso de hiperpolarización se mantenga (ver Figura 2A). El desplazamiento $V_{1/2}$ (voltaje medio de activación o inactivación) varía entre 10 y 25 mV para las subunidades HCN2 y HCN4 y solo 2-6 mV para la subunidad HCN1 (ver Figura 2B). La potencia del cAMP (EC_{50} la concentración del ligando que produce la mitad del desplazamiento máximo voltaje) está en el intervalo de 0.06-1.53 μM . Según un modelo actualmente aceptado [4], el canal normalmente se inhibe y la unión del cAMP elimina esta inhibición, induciendo cambios conformacionales y aumentando la probabilidad de apertura del poro del canal. Los estudios realizados en el dominio C-terminal aislado (C-linker + CNBD) del canal HCN2 mostraron que la unión del cAMP al canal HCN, cambia la proporción que existe entre las configuraciones monoméricas y tetraméricas, favoreciendo a estas últimas [5, 6]. Por lo tanto, el efecto del cAMP sobre la tetramerización en la región intracelular aislada consiste en generar cambios conformacionales en el canal HCN, estos cambios se propagan desde el CNBD a través del c-linker hasta el segmento S6 [2-6]. Cabe notar que la subunidad HCN3 no se activa por cAMP más bien la curva de activación se desplaza ligeramente hacia voltajes más negativos. La falta de sensibilidad del HCN3 al ligante cAMP, a pesar de la presencia de un CNBD funcional en la región intracelular, se explica por presencia de una secuencia C-terminal más corta que las del resto de las otras subunidades, lo cual altera la auto inhibición normal del canal, esto nos muestra que las subunidades HCN1-4 poseen diferentes propiedades de cinética y dependencia de voltaje aunque la estructura de las cuatro isoformas sea muy similar entre ellas (ver Figura 2C) [5]. Además del cAMP, otro ligante de canal, el cGMP es un agonista completo de los

canales HCN, es decir, a concentraciones saturadas el desplazamiento de voltaje en $V_{1/2}$ está en el mismo intervalo que el cAMP. Sin embargo, el cGMP muestra una potencia de modulación de 10 veces menor sobre los canales HCN.

El cAMP y cGMP se unen al CNBD de manera similar, sólo difieren en la orientación del anillo de purina [4-6]. Por lo tanto, la unión de nucleótidos cíclicos, tal como el cAMP y el cGMP al CNBD del canal HCN, acelera la apertura del canal y el voltaje de activación cambia hacia valores más positivos, por lo que a un voltaje dado la corriente que fluye a través de los canales es mayor en presencia que en ausencia de estos ligantes [4-6].

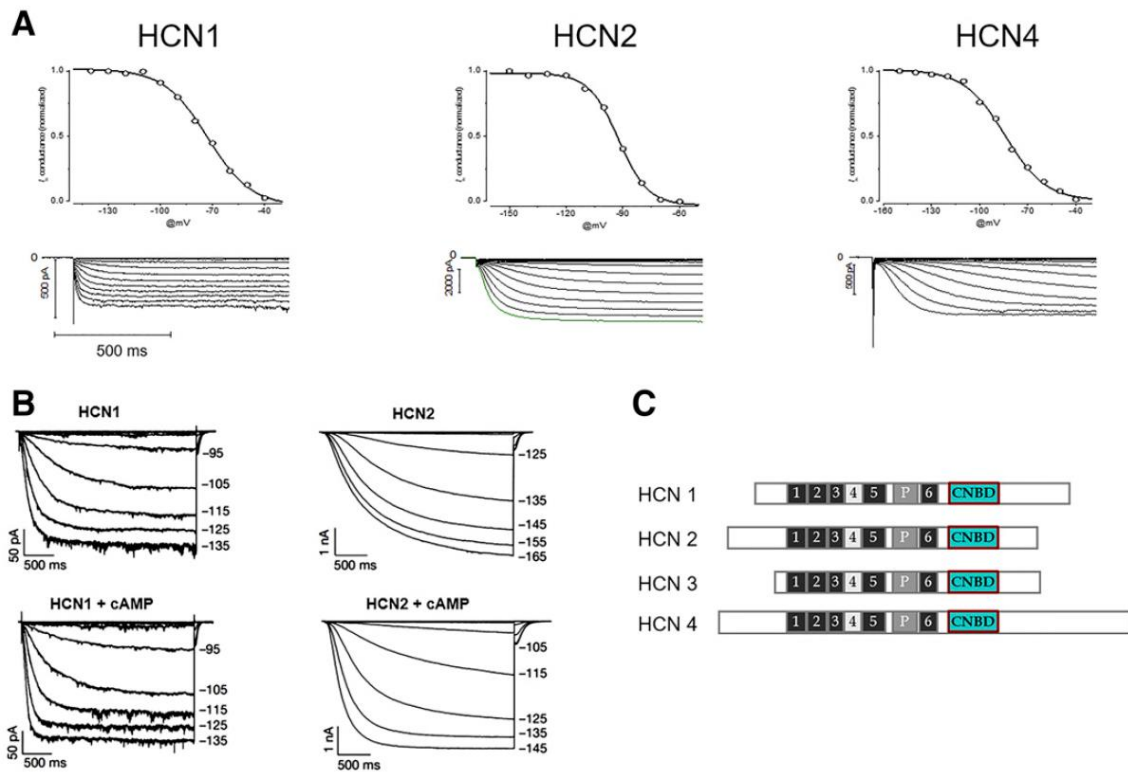


Figura 2. Propiedades de la corriente I_H . (A) Registros electrofisiológicos de la corriente I_H , se observa las isoformas mHCN1, mHCN2 y hHCN4. Cada familia de corriente de entrada dependiente del tiempo es generada por pasos hiperpolarizantes de -40 a -140 mV desde un potencial de sostenimiento de -30 mV. (B) La aplicación del cAMP en el lado citoplasmático de la membrana causa un desplazamiento mucho mayor en la curva de activación del HCN2 comparado con HCN1; (C) Representación esquemática de la estructura de las cuatro isoformas del canal HCN. Figura tomada de [5].

2.3 Óxido Nítrico (NO) como ligante natural del canal HCN

El Óxido Nítrico (NO) es posiblemente la molécula biológica mensajera más pequeña y por su simplicidad química puede transmitir información debido a cambios en su concentración local. El coeficiente de difusión del NO en agua es más alto que el coeficiente de difusión del O₂, del CO₂ y del CO a temperatura fisiológica de 37°C.

Sin embargo, la información en forma de señal es de vida media corta y localizada debido a que el NO se degrada espontáneamente por una reacción que involucra al O₂ y al grupo hemo de las proteínas. Muchos estudios han establecido que el NO es un agente importante biorregulador en una gran variedad de procesos fisiológicos, desde la vasodilatación y la agregación plaquetaria hasta la neurotransmisión en el sistema nervioso de mamíferos [8].

Por otro lado, se ha propuesto que el NO actúa como ligante del canal HCN a través de la vía de señalización NO-cGMP y de manera directa mediante la vía alternativa de S-nitrosilación [7, 8]. Como ejemplos relevantes en los que se ha comprobado esta hipótesis se puede mencionar el trabajo de Da Silva *et al.* [10] en el que se estudiaron células neurosecretoras magnocelulares de rata (MNCs). Se observó experimentalmente que el bloqueo del NO en los canales HCN cambia la frecuencia de disparo, el potencial de reposo de membrana y la liberación de péptidos en el medio. Además, comprobaron que el NO modula la actividad intrínseca de estos canales mediante un mecanismo independiente de la vía de señalización NO-cGMP, es decir, mediante la modificación postraducciona de S-nitrosilación. En el trabajo de Wenker *et al.* [7] se demostró mediante técnicas de registro de voltaje, en los núcleos motores hipoglosales de rata (HMN), que *in vitro* el NO funciona como un transmisor excitatorio y que *in vivo* estimula la actividad del músculo geniogloso y que esta sensibilidad del NO en las HMNs implica un proceso de inhibición dependiente del cGMP de la corriente iónica tipo TASK y la activación de la I_H mediante la S-nitrosilación. El grupo de investigación de Neitz [11] inhibió experimentalmente la vía de señalización NO-cGMP, lo que redujo significativamente la liberación del glutamato en neuronas hipocámpales de rata y después de bloquear el canal HCN se inhibió significativamente la liberación del glutamato en el medio.

Por último, se ha observado que el NO ejerce una modulación específica en las subunidades HCN1 y HCN2 de los canales HCN en el complejo olivar superior (SOC) de rata, lo que

experimentalmente genera un desplazamiento despolarizante en el voltaje medio de activación ($V_{1/2}$) de la corriente I_H en la subunidad HCN2 de manera dependiente del cGMP y una inhibición selectiva de la I_H en la subunidad HCN1 [12]. A partir de la revisión de estos trabajos podemos concluir que el NO actúa como ligante natural activando la vía de señalización NO/cGMP y también mediante la modificación postraducciona S-nitrosilación en los canales HCN en diferentes sistemas fisiológicos en mamíferos.

2.4 Compuestos diazeniumdiolatos como donadores de NO

Las sales de diazeniumdiolato son aductos de NO con aminas secundarias, que se descomponen en NO en medios acuosos y por lo tanto constituyen una clase versátil de compuestos donadores de NO para propósitos de investigación farmacológica.

Los diazeniumdiolatos se disocian espontáneamente a velocidades que varían ampliamente dependiendo tanto de su estructura como del pH del medio. Si bien la mayoría de las aplicaciones de los diazeniumdiolatos son a pH fisiológico, la manera en que sus tasas de disociación o descomposición dependen del pH de la disolución es de considerable interés, tanto por razones prácticas, relacionadas con su estabilidad durante la preparación y el almacenamiento, como por la información importante del mecanismo de liberación que puede proporcionar. Dicha información es relevante por sus múltiples aplicaciones farmacológicas y para su empleo en estudios que exploran la bioquímica del NO. La aplicación selectiva *in vivo* de los diazeniumdiolatos en regiones de pH reducido (por ejemplo, en algunas clases de tumores) podría requerir del conocimiento de perfiles pH/tasa de descomposición [11, 12].

Los diazeniumdiolatos también conocidos como NONOatos han sido estudiados por muchos años. El primero de esta clase fue descrito como un aducto de la dietilamina y NO (conocido como dietilamina NONOato o DEA/NO) sintetizado por primera vez en 1960 [8, 13]. Sin embargo, los diazeniumdiolatos solo retomaron atención en el contexto del NO en 1990 cuando sus propiedades donadoras fueron consideradas nuevamente dentro de estudios biológicos. Estos compuestos consisten en un enlace entre el grupo diolato $[N(O)NO]^-$ y un aducto de nucleófilo (una amina primaria, secundaria o poliamina) mediante un átomo de

nitrógeno. Los NONOatos se descomponen espontáneamente en disolución, dependiendo del pH y la temperatura, para generar dos equivalentes molares de NO.

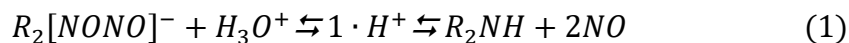
La tasa de descomposición depende de la estructura del nucleófilo. Una característica atractiva de esta clase de compuestos es que su descomposición no es catalizada por tiores o tejidos biológicos, a menos que específicamente se diseñen para eso, además la liberación de NO sigue una cinética de primer orden y por lo tanto la tasa de liberación de NO se puede predecir exactamente. Subsecuentemente, la actividad biológica tal como vasodilatación, inhibición de agregación de plaquetas e inhibición de coagulación sanguínea se relacionan con la cantidad de NO generado *in vitro*. La modificación de la estructura del aducto del nucleófilo para proteger el oxígeno terminal del diolato puede estabilizar la droga en disolución y potencialmente generar una liberación selectiva de NO en diferentes órganos, tejidos vasculares o tipos celulares y neuronales específicos [14].

2.5 Mecanismos de liberación de NO

Las sales diazeniumdiolatos $X-[N(O)NO]^-$ donde $X = RRN$, conocidas como NONOatos, son una clase de compuestos que generan NO en disoluciones neutras o ácidas. La síntesis de estos compuestos es relativamente simple y conocida desde 1960. Experimentalmente, se sabe que los diazeniumdiolatos en disoluciones básicas son neutralizados o acidificados para descomponerse en amina y NO. Keefer *et al.* [15] evaluaron las dependencias de sustitución de grupos en la descomposición de los diazeniumdiolatos. Para ello disminuyeron experimentalmente los valores de pH de la disolución obteniendo un incremento en la tasa de descomposición de estos compuestos. Al considerar la sal dietilamina se obtuvo un pK_a de 4.5 ± 0.2 , además se observó un cambio en la absorción UV del grupo funcional conforme el pH de la solución iba disminuyendo. La protonación en estos compuestos causa un desplazamiento hipsocrómico en el máximo de absorción UV, además de la protonación, la alquilación del O_2 también produce el desplazamiento característico al rojo. Los autores además determinaron posibles intermediarios a lo largo del camino de reacción y sugirieron que la protonación en el nitrógeno de la amina a pH fisiológico es el mecanismo más probable para la descomposición. Sin embargo, el mecanismo molecular completo que involucra a las

estructuras de transición para la liberación de NO desde los donadores NONOatos no es completamente conocido.

Con base en estudios experimentales, Davies *et al.* [16] propusieron el mecanismo mostrado en la ecuación (1), donde la protonación del nitrógeno de la amina a pH fisiológico conduce a la siguiente descomposición, donde el compuesto diazeniumdiolato está protonado sólo una vez:



Desde el punto de vista teórico, los métodos *ab initio* y los cálculos DFT se han usado para explorar la descomposición de los NONOatos para la liberación de NO. Hall *et al.* [17] propusieron un mecanismo de reacción para la liberación de NO usando los niveles de teoría HF/6-31G(d) y MP2/6-31G(d). Estos autores consideran los sitios de protonación del oxígeno y mostraron que el oxígeno terminal se puede protonar más fácilmente que cualquiera de los otros átomos del grupo diolato. Sin embargo, este mecanismo utiliza catálisis ácida y específica para la liberación del NO y además requiere de una segunda protonación del nitrógeno del grupo amino para la liberación de NO a partir del dímero de NO.

Posteriormente, Dutton *et al.* [18] exploraron el mecanismo para la liberación del NO a partir de los diazeniumdiolatos dialquilamino usando los niveles de teoría B3LYP/6-311+G (d) y CBS-QB3. Dichos autores obtuvieron las geometrías optimizadas y las propiedades termodinámicas (entalpías y energías de Gibbs) usando el modelo PCM de solvatación acuosa. Los valores relativos de pK_a fueron obtenidos para las especies protonadas de los diazeniumdiolatos usando la relación con el parámetro ΔG_{aq} en donde $pK_a = \frac{\Delta G_{aq}}{RT \ln 10}$. La medida del pK_a de 4.5 para el diazeniumdiolato dietilamino (DEA/NO) fue usado para el tautómero menos ácido. La estimación de pK_a y un análisis de orbitales naturales de enlace (NBO) mostraron que los oxígenos en el grupo $[N(O)NO]^-$ son los sitios más básicos en el diazeniumdiolato dimetilamino, mientras que la protonación en los nitrógenos del amino conduce a una disociación espontánea en la amina y el dímero del NO. En un estudio posterior, Dutton *et al.* [19], estudiaron el compuesto de isopropilamina diazeniumdiolato (IPA/NO) y se sugirió un mecanismo donde se produce HNO a partir del grupo $[N(O)NO]^-$.

La protonación del oxígeno terminal resultó ser el sitio más básico. Sin embargo, la liberación de NO se obtiene después de una segunda protonación.

En un estudio posterior, Shaikh *et al.* [20] reportaron un mecanismo de liberación de NO que considera la tautomerización dependiente de pH de los diazeniumdiolatos. Obtuvieron como productos dos moléculas de amina y una molécula de NO. Estos autores concluyeron que el paso determinante es la escisión del enlace simple N-N. Reportaron un perfil de energía calculado para la liberación de NO a partir del DEA/NO usando el nivel de teoría B3LYP/6-31+G (d) en medio acuoso con el modelo de solvatación COSMO. El mecanismo fue propuesto como una tautomerización dependiente de pH de los NONOatos protonados con un pK_a de 4.6 para el DEA/NO y de -2.7 para su tautómero protonado en el nitrógeno de la amina. Se reportaron además los parámetros cinéticos para describir la dependencia del pH de los NONOatos. Las constantes de velocidad de reacción, las constantes de disociación ácida calculadas con los grupos funcionales monoprotonados y diprotonados, el pK_a , la entalpía de activación y la entropía, observadas experimentalmente, sustentaron el mecanismo propuesto para la descomposición de los amino NONOatos.

2.6 Vía de señalización NO/cGMP y S-nitrosilación

La investigación de la señalización del NO en el sistema nervioso continúa siendo un tema de gran interés. El NO se descubrió como molécula señal en el cerebro hace 20 años, cuando hacía falta encontrar un neurotransmisor que fuera generado en respuesta a la activación del receptor NMDA neuronal y que además causara la generación del cGMP en otras células. Desde entonces, el NO ha estado implicado en muchas funciones neuronales diferentes.

En los órganos periféricos incluidos los del tracto digestivo, respiratorio y urogenital, el NO desempeña una función similar a un neurotransmisor, siendo liberado de los nervios nitrérgicos para mediar la relajación del músculo liso. En el sistema nervioso central de los vertebrados, el NO está asociado con muchos comportamientos diferentes, incluidos el aprendizaje y la formación de la memoria, alimentación, sueño y comportamiento reproductivo masculino y femenino, así como en la función sensorial y motora. Algunas de estas funciones se han conservado a través de millones de años de evolución [21]. Se sabe

mucho sobre el mecanismo de síntesis de NO a partir de estudios bioquímicos de las enzimas sintasa NO (NOS) purificadas, las cuales son proteínas complejas que se encuentran constitutivamente en dos isoformas: neuronal (nNOS) y endotelial (eNOS). El tercer tipo es el inducible (iNOS) que rara vez está presente normalmente, pero se puede expresar en numerosos tipos de células (macrófagos y microglía en el SNC) y solo cuando se someten a un desafío inmunológico. Las tres isoformas generan NO a partir de L-arginina, pero tienen distintas características funcionales y estructurales [22]. La vía de señalización del NO comienza cuando Ca^{2+} se une a la molécula de calmodulina formando el complejo Ca^{2+} /calmodulina. Este complejo es importante para que las enzimas eNOS y nNOS liberen NO a partir de L-arginina y oxígeno. El NO liberado por NOS actúa directamente en el CNBD de los HCN o bien actúa indirectamente activando el guanilato ciclasa soluble (GCs) aumentando la concentración de cGMP, el cual se une al CNBD del canal HCN [8, 22].

El NO también modula la señalización y el entorno redox a través de la S-nitrosilación una modificación postraducciona (PTM) de las cisteínas que modifica la localización, la actividad y las interacciones de las proteínas [22]. Esta modificación postraslacional reversible regula la función de varios canales, incluidos los receptores NMDA conocidos como NMDA-R, canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}), canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} y canales activados por nucleótidos cíclicos (CNG) [7]. Las cisteínas son diferentes a otros aminoácidos comunes en las proteínas, debido a que es uno de los residuos menos abundante en los sistemas biológicos y solo se han observado experimentalmente en sitios funcionales de las proteínas. Este residuo redox es químicamente reactivo, tiene una alta afinidad por los metales y es particularmente sensible al entorno local [23]. Sin embargo, aunque numerosos informes han documentado que la S-nitrosilación de los residuos de cisteína por el NO altera las actividades en una amplia variedad de proteínas, hay poca información sobre las consecuencias estructurales de esta modificación reversible para las proteínas. Entre la literatura reportada, el estudio de Chan *et al.* [24] describe la estructura cristalina de S-nitrosil-hemoglobina a una resolución de 1.8 Å, confirmando experimentalmente la reacción de NO con la cisteína Cys93β, la cual genera un cambio en la estructura terciaria de los dipéptidos del COOH terminal de las subunidades β de la hemoglobina. En otro trabajo de investigación [25], se realizaron análisis estructurales utilizando proteínas de hígado de ratón S-nitrosiladas *in vivo*, revelando algunas características

únicas entre los residuos de cisteína de las proteínas que sufren el proceso de S-nitrosilación. Estas proteínas se localizan específicamente en áreas accesibles a la superficie celular y se rodean de aminoácidos cargados lo que permite el movimiento de las α -hélice generado por el potencial electrostático inducido por la S-nitrosilación en residuos de cisteína.

Capítulo III. Fundamentos Teóricos

3.1 Teoría del Funcional de la Densidad (DFT)

Para describir a un sistema molecular de N electrones, la función de onda necesita $3N$ coordenadas espaciales y N coordenadas de spin. El Hamiltoniano solo depende de las coordenadas espaciales de uno y dos electrones, así que solamente se necesitan 6 coordenadas espaciales para obtener la energía molecular, por lo tanto, la función de onda de una molécula polieletrónica contiene información adicional de la necesaria y no tiene un significado físico directo. Lo anterior ha llevado a la búsqueda de funciones que con menos variables que las que requiere la función de onda se pueda calcular la energía y otras propiedades moleculares.

En 1964 Hohenberg y Koh [26] establecieron que la densidad total de los electrones, ρ , determina de forma completa y exacta todas las propiedades del estado fundamental de un sistema de N electrones. Por lo tanto ρ puede usarse como variable fundamental en la teoría de estructura electrónica.

Para un sistema de N electrones interactuando con un potencial externo v_{ext} el Hamiltoniano se expresa mediante la ecuación:

$$H = -\frac{1}{2} \sum_i \nabla_i^2 + \sum_i v_{ext}(r_i) + \frac{1}{2} \sum_{j \neq i} \sum_i \frac{1}{|r_j - r_i|} \quad (1)$$

Existe una función de onda de estado fundamental único ψ_0 y una densidad asociada ρ , entonces la relación de v_{ext} a ρ es uno a uno y de tipo reversible. Debido a que ρ determina únicamente a un v_{ext} , el cual tiene un único ψ_0 , en principio sabríamos todo sobre un sistema, sin embargo, se necesita de un principio variacional.

Considerando al primer y al último término en el Hamiltoniano de la ecuación (1) y además los términos que no involucran al potencial externo, podemos concluir que existe un funcional de interacción de la densidad para la energía cinética más la energía total:

$$F(\rho) = T(\rho) + V_{ee}(\rho) \quad (2)$$

Desde el principio variacional de la teoría de función de onda se puede probar que:

$$F(\rho') + \int v_{ext} \rho' \geq F(\rho) + \int v_{ext} \rho = E_0, \quad (3)$$

donde ρ' no es el ρ correspondiente a v_{ext} sino algún otro potencial externo y E_0 es la energía del estado basal exacto. Esto da como resultado el principio variacional de la densidad de Hohenberg-Kohn.

Es razonable también aproximar $V_{ee}(\rho)$ de la ecuación (3) para la autoenergía clásica de Coulomb como:

$$J(\rho) = \frac{1}{2} \int \frac{\rho(1)\rho(2)}{r_{12}} d1d2 \quad (4)$$

Por otro lado, Kohn y Sham llamaron energía de correlación-intercambio E_{XC} al término:

$$F(\rho) = T_0(\rho) + J(\rho) + E_{XC}(\rho)$$

$$E_{XC}(\rho) = T(\rho) + V_{ee}(\rho) - T_0(\rho) - J(\rho) \quad (5)$$

donde T_0 , es también un funcional de la densidad, y, por lo tanto, también lo es E_{XC} . Además, E_{XC} se compone de la energía cinética y potencial. La energía total del funcional de Kohn-Sham está dada por:

$$E(\rho) = T_0(\rho) + \int v_{ext} \rho + J(\rho) + E_{XC}(\rho) \quad (6)$$

Lo interesante de esta descomposición es que T_0 y J están dados por expresiones exactas y que el funcional desconocido E_{XC} es relativamente pequeño con respecto a la energía total.

La minimización variacional de la ecuación (6) con respecto a los orbitales ψ_1 produce la ecuación del orbital de Kohn-Sham:

$$-\frac{1}{2} \nabla^2 \psi_i + v_{KS} \psi_i = \varepsilon_i \psi_i \quad (7)$$

donde el potencial efectivo de Kohn-Sham v_{KS} está dado por:

$$v_{KS} = v_{ext} + v_{el} + \frac{\delta E_{XC}}{\delta \rho} \quad (8)$$

y $\frac{\delta E_{XC}}{\delta \rho}$ es la derivada del funcional de E_{XC} con respecto a ρ .

A este nivel la teoría está completa debido a que los electrones en los átomos y moléculas pueden verse como partículas independientes moviéndose en el potencial efectivo v_{KS} . La teoría DFT de Kohn-Sham es una teoría de partículas independientes. Sin embargo, ofrece en principio la densidad electrónica y la energía exactas a través de la ecuación (6) para cualquier sistema electrónico correlacionado e interactivo. Esto hace que todos los términos dependan del funcional $E_{XC}(\rho)$, el cual no se conoce y se utilizan diferentes aproximaciones para calcularlo [27].

Con el paso de los años se han realizado muchos progresos en cuanto a la generación de nuevos funcionales. Algunos de los funcionales DFT actuales más utilizados son los funcionales M06, desarrollados por Truhlar y Zhao para distintos tipos funcionales complementarios en los metales de transición y no metales. Estos funcionales se utilizan en estudios de termoquímica, cinética química, interacciones no covalentes, estados excitados y compuestos de transición [28]. Existen hasta la fecha cuatro funcionales que pertenecen a la familia M06. Entre los más relevantes destacan los funcionales M06, M06-2X, M06-HF y M06-L. Los tres primeros son funcionales híbridos meta-GGA mientras que M06-L es un funcional puro y se define como un funcional que usa una combinación lineal de los funcionales de intercambio M05 y VSXC [28, 29]. La forma del funcional M06 es básicamente la misma que la del funcional M06-L, el funcional de intercambio M06 está dado por la expresión:

$$E_X^{M06} = \sum_{\sigma} \int dr [F_{X\sigma}^{PBE}(\rho_{\sigma}, \nabla \rho_{\sigma}) f(w_{\sigma}) + \varepsilon_{X\sigma}^{LSDA} h_X(x_{\sigma}, z_{\sigma})] \quad (9)$$

donde $h_X(x_{\sigma}, z_{\sigma})$ está definido como:

$$h_X(x_{\sigma}, z_{\sigma}) = \left(\frac{d_0}{\gamma(x_{\sigma}, z_{\sigma})} + \frac{d_1 x_{\sigma}^2 + d_2 z_{\sigma}}{\gamma_{\sigma}^2(x_{\sigma}, z_{\sigma})} + \frac{d_3 x_{\sigma}^4 + d_4 x_{\sigma}^2 z_{\sigma} + d_5 z_{\sigma}^2}{\gamma_{\sigma}^3(x_{\sigma}, z_{\sigma})} \right) \quad (10)$$

El término $F_{X\sigma}^{PBE}(\rho_{\sigma}, \nabla \rho_{\sigma})$ es la densidad de energía de intercambio del funcional PBE, una versión modificada del funcional de intercambio B86, $\varepsilon_{X\sigma}^{LSDA}$ es la aproximación de densidad

de *spin* local para el intercambio:

$$\varepsilon_{X\sigma}^{LSDA} = -\frac{3}{2} \left(\frac{3}{4\pi} \right)^{\frac{1}{3}} \rho_{\sigma}^{\frac{4}{3}} \quad (11)$$

y $f(w_{\sigma})$ es el factor de la densidad de energía cinética de *spin*:

$$f(w_{\sigma}) = \sum_{i=0}^m a_i w_{\sigma}^i \quad (12)$$

donde la variable w_{σ} es una función de t_{σ} y t_{σ} es una función del spin de la densidad de energía cinética τ_{σ} y la densidad de *spin* ρ_{σ}

$$w_{\sigma} = \frac{(t_{\sigma} - 1)}{(t_{\sigma} + 1)} \quad (13)$$

$$t_{\sigma} = \frac{\tau_{\sigma}^{LSDA}}{\tau_{\sigma}} \quad (14)$$

donde

$$\tau_{\sigma}^{LSDA} \equiv \frac{3}{10} (6\pi^2)^{\frac{2}{3}} \rho_{\sigma}^{\frac{5}{3}} \quad (15)$$

En este trabajo se utiliza el funcional M06-L [30], el cual resultó adecuado para hacer los cálculos de las estructuras de estado de transición en los mecanismos de reacción.

3.2 Funciones de base

Las funciones de base X_r se usan para expresar los orbitales moleculares (OM) φ_i con la expresión:

$$\varphi_i = \sum_r C_{ri} X_r \quad (16)$$

donde φ_i representa los orbitales espaciales en forma de combinaciones lineales de una serie de funciones base X_r y C_{ri} representa los parámetros variacionales.

Para el caso de moléculas diatómicas, las funciones de base se expresan como orbitales atómicos, donde cada OM se puede representar como una combinación lineal de uno a más orbitales tipo Slater (STO). Un STO centrado sobre el átomo a tiene la forma

$$Nr_a^{n-1}e^{-\zeta r_a}Y_l^m(\theta_a, \varphi_a) \quad (17)$$

donde N es una constante de normalización, Y es una función armónica esférica y ζ es un parámetro que se determina por las reglas de Slater de forma variacional. Para acelerar la evaluación de las integrales moleculares, Boys *et al.* en 1950 [31], propusieron usar los orbitales atómicos en forma de funciones tipo gaussiana (GTF). Una función gaussiana cartesiana centrada en el átomo b se define por la expresión:

$$g_{ijk} = Nx_b^i y_b^j z_b^k e^{-\alpha r_b^2} \quad (18)$$

donde i, j y k son enteros no negativos, α es un exponente orbital positivo y x_b, y_b y z_b son coordenadas cartesianas con el origen en el núcleo b . La constante de normalización gaussiana cartesiana está dada por

$$N = \left(\frac{2\alpha}{\pi}\right)^{\frac{3}{4}} \left[\frac{(8\alpha)^{i+j+k} i! j! k!}{(2i)! (2j)! (2k)!} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (19)$$

Cuando $i + j + k = 0$, la GTF se denomina gaussiana de tipo s , $i + j + k = 1$ representa la gaussiana de tipo p , $i + j + k = 2$, representa una gaussiana de tipo d y así sucesivamente.

Una base mínima consta de un STO para cada OA de capa interna o *core* con su respectiva capa de valencia en cada átomo, una base doble zeta (DZ) se obtiene reemplazando cada STO de una base mínima por dos funciones tipo STO los cuales solo difieren en sus exponentes orbitales ζ . Por su parte una base de valencia desdoblada (SV) usa dos o más funciones STO para cada orbital atómico OA de valencia, pero solamente un STO por cada OA de capa interna, finalmente una base SV se considera una función mínima para los OA de capa interna. La serie de valencia desdoblada se denomina doble zeta de valencia (VDZ) y triple zeta de valencia (VTZ) de acuerdo con el número de funciones tipo STO empleados para cada OA de valencia. Los OA se distorsionan en su forma y tienen sus centros de carga desplazados (polarización) como consecuencia de la formación de la molécula. Para permitir esta

polarización, se añaden funciones STO a las funciones de base cuyos números cuánticos son mayores que el l máximo de la capa de valencia del estado fundamental del átomo y de esta manera obtenemos una base polarizada. Por otro lado, en lugar de usar las funciones gaussianas individuales como funciones de base, es frecuente considerar cada función de base como una combinación lineal normalizada de unas cuantas gaussianas de acuerdo con la expresión:

$$X_r = \sum_u d_{ur} g_u \quad (20)$$

donde g_u son las gaussianas cartesianas normalizadas centradas en el mismo átomo y con los mismos valores de las coordenadas i, j, k , pero con diferentes exponentes orbital positivo α , los coeficientes de contracción d_{ur} son constantes que se mantienen fijas durante el cálculo, X_r se conoce como función tipo gaussiana contraída (CGTF) y g_u representan las gaussianas primitivas.

Pople *et al.* [32] diseñaron conjuntos de funciones base cuyos principios están basados en el hecho de que los electrones internos (de *core*) tienen poca influencia en los aspectos químicos comparados con los electrones de valencia y debido a esto se mantiene una representación mínima para los electrones internos. De estas funciones podemos mencionar como ejemplos las bases 3-21G y 6-31G en las cuales los electrones internos han empleado una CGTF contraída con N funciones GTF's primitivas y la capa de valencia se representa con dos funciones de base contraídas, la primera con 2 o 3 primitivas, respectivamente, y la segunda con 1 función GTF primitiva. Las bases extendidas se logran añadiendo funciones p y d en el caso en el que se desee agregar funciones de polarización y ++ cuando se añaden funciones difusas. En esta tesis se utiliza la función base 6-311++G (d, p) [33].

3.3 Efecto del disolvente

De manera experimental se sabe que la solvatación es un proceso que conduce a la disolución de un soluto en algún tipo de disolvente. La disolución requiere que se rompan las interacciones responsables de mantener al soluto en su forma sólida, de modo que la densidad de carga de la molécula de un soluto interacciona de manera continua con el disolvente. En el

método de solvatación implícita, un medio continuo describe implícitamente la presencia del disolvente caracterizado por su constante dieléctrica y por la tensión superficial. Este método consiste, de manera general, en introducir el soluto en una cavidad rodeada por el medio continuo y a continuación calcular la interacción que existe entre el medio continuo con el soluto.

Se han desarrollado varios enfoques teóricos en un intento de crear protocolos de simulación capaces de predecir la solubilidad de diferentes compuestos y en varios disolventes, por ejemplo, el método de solvatación implícito basado en la densidad, SMD [34]. Este método de solvatación incluye a la densidad electrónica completa del soluto, sin cargas atómicas parciales, además considera un continuo en donde el disolvente no está representado explícitamente, sino que usa un medio dieléctrico con tensión superficial en la interfaz soluto-disolvente. El modelo de solvatación SMD tiene carácter general debido a su aplicabilidad a cualquier soluto con carga o sin carga y en cualquier medio de disolvente con algunas características conocidas, por ejemplo, la constante dieléctrica, el índice de refracción y los parámetros de acidez-basicidad. Este método de solvatación ha sido parametrizado con el modelo del continuo polarizable usando el formalismo de la ecuación integral (IEF-PCM) para condiciones en medios electrostáticos [34].

El modelo SMD separa la energía libre de solvatación en dos componentes principales: el primer componente es el aumento de la contribución electrostática y surge desde el tratamiento del campo de reacción auto consistente que involucra la solución de la ecuación de Poisson no homogénea para la energía electrostática en términos del modelo continuo polarizable. El segundo componente es conocido como el término de estructura-disolvente-dispersión-cavidad y corresponde a la contribución que surge desde las interacciones de corto alcance entre las moléculas del soluto y el disolvente en la primera capa de solvatación. Esta contribución es una suma de términos que son proporcionales (con constantes proporcionalmente dependientes de la geometría llamados tensiones superficiales atómicas) a las áreas de superficie accesibles al solvente de átomos individuales del soluto. La energía libre estándar de solvatación, que es la energía libre de estado estándar de transferencia de la fase gas a la fase condensada, se expresa con sus diferentes contribuciones como:

$$\Delta G_S^0 = \Delta G_{ENP} + G_{CDS} + \Delta G_{conc}^0 \quad (21)$$

G_{ENP} denota la energía libre de los componentes de polarización, nuclear y electrónico. El componente de la relajación nuclear del término G_{ENP} es igual a la diferencia de la energía total en fase gas, calculada en la estructura en equilibrio en la fase gas y la energía total en fase gas en la estructura de equilibrio en fase líquida.

Si se asume la misma geometría en fase gas y en fase líquida, entonces el término ΔG_{ENP} se convierte en un solo término de polarización electrónica. El término G_{CDS} está normalmente asociado con el cambio de energía libre correspondiente a la cavidad del disolvente, así como con cambios en la energía de dispersión y los posibles cambios en la estructura local del disolvente. El último término de la ecuación (21) determina el cambio de concentración entre el estado estándar en la fase gas y el estado estándar en la fase líquida. Considerando que la misma concentración (1 mol/L) se usa en ambos casos, la fase en disolución y la fase gaseosa, se tiene que ΔG_{conc}^0 es cero. Si en lugar de esto se usa un estado estándar fase gas de 1 atm entonces ΔG_{conc}^0 resulta ser de 1.89 kcal/mol. La contribución ΔG_{EP}^0 a la energía libre de solvatación total se calcula a partir del campo de reacción autoconsistente [34, 35]. En la teoría electrostática del medio dieléctrico, el medio está asociado con una permitividad relativa ϵ , una constante escalar para un ambiente homogéneo e isotrópico, en donde las cargas de enlace no aparecen explícitamente y la densidad de carga por unidad de volumen, de objetos tratados explícitamente, es llamada densidad de carga libre ρ_f . En un medio homogéneo isotrópico lineal, el potencial escalar ϕ satisface la ecuación de Poisson,

$$\epsilon \nabla^2 \Phi = -4\pi \rho_f \quad (22)$$

Para un medio no homogéneo isotrópico lineal, la ecuación anterior es reemplazada por,

$$\nabla \cdot (\epsilon \nabla \Phi) = -4\pi \rho_f \quad (23)$$

La cual es llamada ecuación de Poisson no homogénea (NPE), ρ_f denota la densidad de carga del soluto. Se puede resolver la ecuación NPE acoplada a la descripción cuántica del soluto para obtener el potencial eléctrico usando el continuo dieléctrico polarizado y la polarización del soluto.

Este potencial conocido como campo de reacción ϕ es igual al potencial total Φ menos el potencial electrostático $\Phi^{(0)}$ de la molécula en fase gas. A partir del campo de reacción se

puede calcular el cambio de energía libre correspondiente al proceso de solvatación. Si se aproxima al soluto como rígido, la contribución electrostática a la energía libre de solvatación está dada por:

$$\Delta G_{EP} = \left\langle \Psi \left| H^0 - \frac{e}{2} \phi \right| \Psi \right\rangle + \frac{e}{2} \sum_k Z_k \phi_k - \langle \Psi^0 | H^0 | \Psi^0 \rangle \quad (24)$$

donde e es la unidad atómica de carga, ϕ_k es el campo de reacción evaluado en el átomo k , Z_k es el número atómico del átomo k , H^0 y Ψ^0 se refieren al Hamiltoniano y la función de onda de la representación electrónica de los solutos en la fase gas y Ψ a la función de onda electrónica del soluto polarizado en solución.

Una clave importante en todos los modelos de solvatación implícita es el límite entre la cavidad del soluto y el continuo del disolvente. En el modelo SMD, el límite se utiliza para encerrar una superposición de esferas centradas en los núcleos con radios ρ_k llamados radios intrínsecos de Coulomb, en donde los valores dependen solo de los números atómicos de los átomos. Este límite forma una superficie denominada de solvente accesible (SAS). La cavidad puede expresarse de manera discreta y por lo tanto el campo de reacción en una posición arbitraria $\mathbf{r}$ dentro de la cavidad se puede aproximar por la ecuación:

$$\phi(\mathbf{r}) = \sum_m \frac{q_m}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}_m|} \quad (25)$$

donde $\mathbf{r}_m$ es la posición de un elemento m del área superficial en la interfaz disolvente-soluto y q_m es la superficie de carga aparente del elemento m . La discretización del área superficial límite se puede lograr de formas diferentes, por ejemplo, usando un método de construcción de superficies [35], como está implementado en el programa Gaussian.

3.4 Mecanismos de reacción

Un mecanismo de reacción es la secuencia de pasos elementales que explican la formación del producto de una reacción química. El mecanismo de reacción es una propuesta de la ruta o el camino que se sigue en una reacción química cuando la ecuación química balanceada solo especifica el origen y destino.

Las especies químicas llamadas intermediarios aparecen en el mecanismo de reacción en una secuencia de pasos elementales, pero no en la ecuación global balanceada. Un intermediario siempre se forma en un paso elemental inicial y se consume en algún paso posterior [36]. Es decir, un intermediario es una especie de baja estabilidad que aparece y posteriormente desaparece como parte de un mecanismo de reacción. Una forma en la que se estudian los mecanismos de reacción en química computacional es mediante cálculos de coordenadas internas de reacción (IRC).

Los cálculos IRC comienzan con una geometría inicial dada, la cual sigue un camino en ambas direcciones, la dirección hacia el producto se refiere al movimiento a lo largo del vector de transición que corresponde a un incremento de las coordenadas internas, mientras que la dirección hacia el reactivo indica el movimiento a lo largo del vector de transición que corresponde a una disminución de las coordenadas internas. El paso más importante para que un cálculo teórico de tipo IRC produzca un resultado comparable con la reacción química global experimental es encontrar una estructura de estado de transición (TS) adecuada [36, 37]. Una estructura de estado transición para una reacción química es un punto estacionario en una superficie de energía potencial molecular que corresponde a un máximo local a lo largo de una sola dirección y al mismo tiempo corresponde a un mínimo local en todas las demás direcciones ortogonales. Esta dirección única es denominada vector de transición y corresponde al vector propio asociado con el valor propio negativo de la matriz constante de fuerza. En principio, el vector orientación de la transición no se conoce *a priori* y por lo tanto debe determinarse en el curso de una optimización de la estructura de estado transición.

El algoritmo de minimización, que utiliza el programa Gaussian para realizar un cálculo IRC, tiene como objetivo conseguir la convergencia en estructuras de estado de transición forzando a la matriz de segunda derivada a tener un único valor propio negativo. Si ciertas condiciones iniciales se cumplen, la optimización se acerca a la estructura de transición de la misma manera que avanza al mínimo. La geometría inicial debe elegirse dentro de la región cuadrática de la estructura de transición, es decir, la región donde la matriz constante de fuerza contiene un valor propio negativo. Esto se logra calculando explícitamente tanto la diagonal de la matriz constante de fuerza, como los valores fuera de la diagonal para las coordenadas

internas. Se obtienen estos resultados mediante el uso de la técnica de diferencias finitas implementada en la minimización del programa [37].

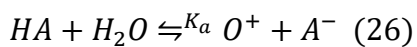
La convergencia en el punto de silla es similar a la convergencia para la minimización. El algoritmo que usa el programa Gaussian para encontrar un TS se basa en consideraciones sobre la función E , dependiente de n , variables x_i y los gradientes de n -dimensiones de la función $g_i = dE/dx_i$.

Este algoritmo genera una serie de pasos para llegar a un punto estacionario E , por ejemplo, un punto donde $g = 0$. Asumiendo que se realizaron p pasos, en el paso $p + 1$ tenemos valores para la función E^a , su gradiente, y la función g^a en los puntos $m + 1$ ($0 \leq a \leq m \leq p$). Permitiendo que esta información se organice de manera que x^0 sea el punto actual y x^1 el punto anterior más reciente a x^0 , y así sucesivamente, se logra obtener el valor más lejano x^m de los pasos anteriores.

Del paso anterior también se tiene una matriz $F_{n \times n}$ que es una aproximación de la matriz de segunda derivada verdadera, es decir, $F_{ij} = \frac{d^2E}{dx_i dx_j}$ que representa un solo paso de optimización el cual puede ser dividido en tres partes: (a) obteniendo correcciones de la matriz de segunda derivada aproximada, (b) buscando un mínimo a lo largo de una línea entre el punto actual y el punto anterior y (c) estimando la localización del punto estacionario en el espacio n -dimensional usando el gradiente y la matriz de segunda derivada aproximada. En el comienzo del proceso de optimización una estimación adecuada de la matriz de segunda derivada es requerida.

3.5 Cálculo de pK_a

Las propiedades de las reacciones ácido-base son muy importantes dentro del estudio de las propiedades químicas de los sistemas moleculares. Primero, se necesita entender la definición de fuerza de un ácido para poder comprender la constante de acidez, a su vez, esta se utiliza para la definición del pH y finalmente del pK_a . La fuerza de un ácido de Bronsted-Lowry se enuncia de acuerdo con la definición de Arrhenius, es decir, por medio del grado de ionización del ácido en el agua. La reacción general es la siguiente,



Por definición:

$$K_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} \quad (27)$$

donde K_a es la constante de disociación ácida y su valor indica la fuerza relativa del ácido. La reacción de un ácido con su disolvente (por ejemplo, agua) es conocida como reacción de disociación, los ácidos se dividen en dos categorías de acuerdo con su capacidad de donar protones. Por lo que, a mayor fuerza del ácido, mayor es su capacidad de transferir protones a las moléculas del disolvente y a menor fuerza del ácido menor es su capacidad de transferir sus protones a las moléculas del solvente. El compuesto yoduro de hidrógeno (HI) es considerado un ácido fuerte con un valor de pK_a de -10.4, mientras que el ácido acético (CH_3COOH) es considerado un ácido relativamente fuerte con un valor de pK_a de 4.7. En general, la mayoría de los ácidos orgánicos son débiles (HPO_4 , HCO_3 y H_2O) o relativamente fuertes como en el caso del ácido carboxílico ($-COOH$) y no se disocian completamente en agua [36, 38].

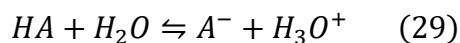
Por la naturaleza numérica de las constantes de equilibrio lo más conveniente es expresarlas en escala logarítmica. El pK_a de un ácido se define de la misma manera que el pH de una disolución, es decir, como el negativo del logaritmo base 10 de K_a :

$$pK_a = -\log_{10} K_a \quad (28)$$

Los ácidos fuertes generalmente toman valores desde cero hasta valores negativos (HCl pK_a de -11), los compuestos relativamente ácidos suelen tener valores de pK_a entre 1 y 5 ($C_6H_5N^+H_3$ pK_a de 4.6) y los ácidos débiles por lo general tienen valores de pK_a mayores que 5 (H_2CO_3 pK_a de 6.4) cuando se disocian en agua [36,38]. Uno de los problemas recientes y más importantes que tiene la química teórica, es hacer corresponder los valores experimentales de pK_a con los valores teóricos. Sin embargo, se tienen muchos avances con respecto a este problema. En el trabajo de Jorgensen et al. [39], los pK_a de ácidos muy débiles calculados en compuestos como: CH_3-CN , CH_3NH_2 y CH_3CH_3 se calcularon utilizando potenciales intermoleculares capaces de reproducir la interacción ion-agua. Los estudios teóricos

posteriores adoptaron principalmente modelos continuos para representar el disolvente e incluir su efecto en el cálculo. A pesar de muchos años de investigación, los modelos que se han usado para representar el efecto del disolvente en el cálculo del pK_a de manera teórica han generado datos que difieren significativamente con los datos experimentales. Debido a esto, se ha concluido que no es posible predecir valores de pK_a confiables a menos que las energías libres de solvatación correspondientes (ΔG_{sol}^*) se calculen con precisión.

Basados en el trabajo de Pliego *et al.* 2002 [40], en esta tesis se realizaron cálculos para obtener el pK_a de los NONOatos protonados H5, que son los que conducen a la liberación de NO. La reacción de transferencia de protón utilizada es la siguiente:



con HA representa al NONOato protonado y A^- al NONOato no protonado. Por definición el valor del pK_a en términos de ΔG_a , está dado por la expresión:

$$pK_a = \frac{\Delta G_a}{1.364} - \log[H_2O] \quad (30)$$

Se utiliza el término ΔG_{sol}° que se refiere a la diferencia de energía libre de las especies en solución. El siguiente diagrama corresponde al ciclo termodinámico modificado del reportado por Pliego *et al.* [40]:

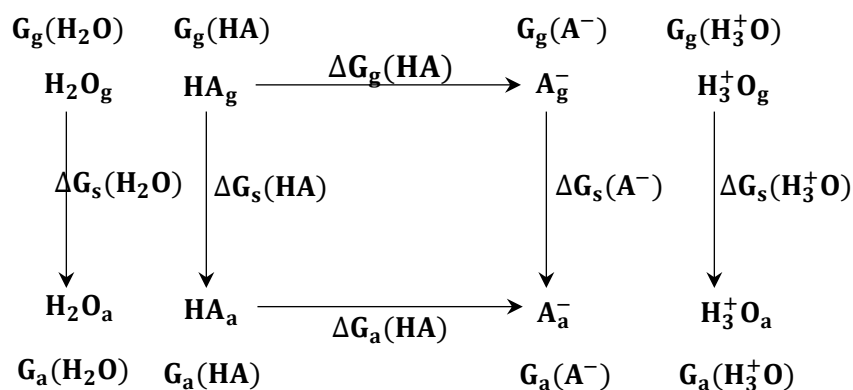


Figura 3. Ciclo termodinámico. Esquema modificado de [40].

Siguiendo las rutas de este ciclo se obtiene,

$$\Delta G_a(HA) = \Delta G_g(HA) + \Delta G_s(A^-) + \Delta G_s(H_3O^+) - \Delta G_s(HA) - \Delta G_s(H_2O) \quad (31)$$

Considerando las definiciones:

$$\Delta \Delta G_a(HA) = \Delta G_a(HA) - \Delta G_g(HA)$$

$$\Delta G_g(HA) = G_a(A^-) + G_g(H_3O^+) - G_g(HA) - G_g(H_2O) \quad (32)$$

$$\Delta G_a(HA) = G_a(A^-) + G_a(H_3O^+) - G_a(HA) - G_a(H_2O)$$

y que:

$$\Delta G_s(A^-) = G_a(A^-) - G_g(A^-) \quad (33)$$

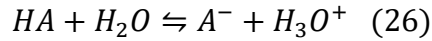
$$\Delta G_s(HA) = G_a(HA) - G_g(HA)$$

Además, con base en la literatura:

$$\Delta G_s(H_3O^+) = -110.2 \frac{kcal}{mol} \quad (34)$$

$$\Delta G_s(H_2O) = -5.40 \frac{kcal}{mol} \quad (35)$$

La deducción de Pliego *et al.* [40] comienza con la reacción (26):



donde la constante de disociación ácida se expresa como:

$$K_a = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[HA][H_2O]} \quad (36)$$

donde

$$K_a[H_2O] = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[HA]} = e^{-\frac{\Delta G_{sol}^\circ}{RT}} \quad (37)$$

tomando logaritmo en ambos miembros de la ecuación (37):

$$\log K_a[H_2O] = -\frac{\Delta G_{sol}^\circ}{RT} \quad (38)$$

$$2.303 \log K_a[H_2O] = -\frac{\Delta G_{sol}^\circ}{RT} \quad RT = 0.5925 \text{ kcal/mol}$$

$$\log K_a + \log[H_2O] = -\Delta G_{sol}^\circ / 2.303 RT$$

$$\log K_a = -\frac{\Delta G_{sol}^\circ}{(2.303)(0.5925)} - \log[H_2O] \quad (39)$$

Multiplicando la expresión por -1 se obtiene la expresión final para el cálculo del pK_a:

$$-\log K_a = \frac{\Delta G_{sol}^\circ}{1.364} + \log[H_2O] \quad (40)$$

$$pK_a = \frac{\Delta G_{sol}^\circ}{1.364} + \log[H_2O] \quad (41)$$

Usando la ecuación (41) se puede determinar el pK_a y por tanto estimar el grado de acidez de los tautómeros 1-5-H5 de los compuestos donadores de NO.

3.6 Análisis de Orbitales Naturales de Enlace (NBO)

El análisis de orbitales naturales de enlace (NBO) se originó como una técnica para estudiar los efectos de hibridación y covalencia en las funciones de onda poliatómicas, con base en los vectores propios del bloque local de la matriz densidad de una partícula. Los orbitales NBO fueron concebidos como imágenes de enlaces localizados y pares solitarios de electrones siendo las unidades básicas de la estructura molecular [41]. El orbital NBO para un enlace localizado σ entre los átomos A y B está formado de orbitales híbridos ortonormales dirigidos h_A, h_B , conocidos como orbitales híbridos naturales (NHOs). El valor σ_{AB} está dado por la expresión:

$$\sigma_{AB} = C_A h_A + C_B h_B \quad (42)$$

Los orbitales híbridos naturales a su vez se componen de un conjunto de orbitales atómicos de capa de valencia efectiva (NAOs) optimizados para la función de onda elegida.

Una característica distintiva de tales funciones localizadas naturales es el requisito simultáneo de ortonormalidad y ocupación máxima que lleva a expresiones compactas para las propiedades atómicas y de enlace.

Las funciones de onda *ab initio* transformadas a NBO están en buen acuerdo con el concepto de estructura de Lewis y con la imagen básica de hibridación y polarización de enlaces de Pauling-Slater-Coulson. Los orbitales NBO σ_{AB} están bien adaptados para describir los efectos covalentes en las moléculas.

Sin embargo, la transformación general de los NBOs también lleva a orbitales que no están ocupados en la estructura formal de Lewis y puede ser usado para describir efectos no covalentes, como los orbitales de antienlace (σ_{AB}^*):

$$\sigma_{AB}^* = C_B h_A - C_A h_B \quad (43)$$

Estos orbitales surgen del mismo conjunto de orbitales híbridos de capa de valencia atómica que se unen para formar las funciones de enlace σ_{AB} como se observa en la ecuación (42). Los orbitales de antienlace σ_{AB}^* representan la capacidad de la capa de valencia no utilizada que abarca porciones del espacio de valencia atómica formalmente insaturadas por la formación de enlaces covalentes. La energía asociada con los orbitales de antienlace puede ser calculada numéricamente evaluando estos orbitales del conjunto de base y calculando nuevamente el tiempo necesario para determinar la variación asociada con la reducción de la energía. En este sentido, se puede obtener una descomposición de la energía total E en componentes asociadas con las contribuciones covalentes ($E_{\sigma\sigma} = E_{Lewis}$) y no covalentes ($E_{\sigma\sigma^*} = E_{no\ Lewis}$).

$$(E_{\sigma\sigma} + E_{\sigma\sigma^*}) \quad (44)$$

La descomposición NBO se ha obtenido para un gran número de especies moleculares de capa cerrada y capa abierta. En las ecuaciones (43) y (44) los símbolos σ y σ^* se utilizan en un sentido genérico para los orbitales llenos y no llenos de la estructura de Lewis formal, aunque los primeros orbitales pueden ser orbitales centrales (c), pares solitarios (n), enlaces tipo σ o π , etc., y los últimos pueden ser de antienlace σ o π (σ^* , π^*), orbitales de capa de valencia extra de Rydberg (r), etc., según el caso específico.

En la descomposición del NBO las contribuciones no covalentes $E_{\sigma\sigma^*}$ tienen valores típicamente mucho menores al 1% de la contribución $E_{\sigma\sigma}$ lo que refleja el dominio del componente de enlace tipo Lewis.

La interacción entre un orbital lleno σ de la estructura formal tipo Lewis con uno de los orbitales de antienlace no lleno σ^* genera una reducción de energía de segundo orden $\Delta E_{\sigma\sigma^*}^{(2)}$:

$$\Delta E_{\sigma\sigma^*}^{(2)} = -2 \frac{\langle \sigma | \hat{F} | \sigma^* \rangle^2}{\epsilon_{\sigma^*} - \epsilon_{\sigma}} \quad (45)$$

donde $\hat{F}$ es el operador de Fock y $\epsilon_{\sigma^*}, \epsilon_{\sigma}$ son orbitales de energía NBO. Las fuerzas de los elementos de la matriz de Fock perturbativo están relacionadas con las formas de los orbitales de enlace y antienlace a través de la contraparte NBO en la aproximación de Mulliken. Esto permite que las reducciones de energía no covalentes se describan en términos del principio de superposición máxima generalizado entre orbitales de enlace y antienlace. Se puede interpretar que los orbitales de antienlace se han transformado a MOs canónicos ocupados de tipo orbitales moleculares localizados (LMO). Los $LMO\phi_{AB}^{LMO}$ asociados con un enlace A-B se pueden escribir en forma de NBO como:

$$\phi_{AB}^{LMO} \cong \sigma_{AB} + \lambda_{\sigma^*CD} + \dots \quad (46)$$

donde la pequeña contribución del antienlace σ^*_{CD} representa la deslocalización irreducible de σ_{AB} a partir de una forma localizada idealizada, esto debido a las interacciones hiper conjugativas no covalentes. Solo en el límite idealizado de una estructura de Lewis estrictamente localizada los orbitales de antienlace se ubican completamente en el espacio virtual MO. Debido a los efectos de deslocalización no covalente, las ecuaciones (45) y (46) están asociadas con las interacciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$ entre los orbitales llenos (donadores) y no llenos (aceptores). Es natural describirlos como tipo donador-aceptor, transferencia de carga, o generalizados ácido-base tipo Lewis. La carga transferida está dada por la expresión:

$$q \cong 2|\lambda|^2 \cong \frac{|\Delta E_{\sigma\sigma^*}^{(2)}|}{\epsilon_{\sigma^*}} - \epsilon_{\sigma} \quad (47)$$

Las estructuras naturales de Lewis representan a más del 99% de la densidad total de electrones e incluyen la porción predominante de intercambio y los efectos multipolares electrostáticos asociados con las distribuciones de carga de monómero [41].

3.7 Simulación de Dinámica Molecular

La técnica de simulaciones de dinámica molecular (MD) es una herramienta computacional poderosa en biofísica, útil para investigar a nivel molecular sistemas biológicamente relevantes que se utiliza como complemento de muchas técnicas experimentales estructurales tales como cristalografía de rayos X, microscopía crioelectrónica y resonancia magnética nuclear. Las técnicas computacionales como las simulaciones MD permiten realizar estudios detallados con una resolución espacial y temporal que provee información complementaria a la obtenida a partir de técnicas experimentales. Dicha técnica computacional se basan principalmente en la solución numérica de las ecuaciones clásicas de movimiento.

Debido a que existen serias desventajas en los estudios experimentales como por ejemplo en la cristalografía de rayos X, una técnica que nos permite estudiar las propiedades físicas y estructurales de las moléculas mediante la visualización de una única estructura molecular que nos impide estudiar el movimiento de una proteína o la unión de una proteína con su ligante, se hace cada vez más necesario el empleo de herramientas computacionales como por ejemplo la simulación de dinámica molecular y el modelado de mecánica molecular que complementan los resultados obtenidos con técnicas experimentales. El modelado de mecánica molecular utiliza cálculos que no tratan explícitamente a los electrones en un sistema molecular y considera a la energía en su estado basal como una función de las coordenadas de los núcleos atómicos.

La dinámica molecular por otro lado permite analizar la evolución de un sistema biológico mediante la resolución de las ecuaciones del movimiento de Newton. Un requerimiento crítico para usar simulaciones moleculares de cualquier tipo que incluya a la solubilidad como parámetro de estudio es que las fuerzas inter e intramoleculares en un sistema particular de interés pueda ser modelado por un campo de fuerza que proporciona la física fundamental del sistema.

Dentro de un campo de fuerza particular, los átomos y las moléculas interactúan principalmente entre sí a través de las fuerzas electrostáticas y de van der Waals. El campo de fuerza determina los valores predeterminados para longitudes de enlace, parámetros de van der Waals, cargas parciales y define las interacciones físicas entre átomos y moléculas [35]. Cada

uno de los campos de fuerza conocidos aprovechan la naturaleza polimérica de las proteínas y otras estructuras como el ADN, ARN y carbohidratos, para lo cual se requieren parámetros utilizados que describen un conjunto relativamente limitado de bloques de construcción, como los residuos de aminoácidos, así como el elemento de enlace común, es decir, el esqueleto peptídico. Sin embargo, la inclusión de moléculas pequeñas es significativamente desafiante debido a que ha impedido en gran medida la aplicación de tecnologías MD en el descubrimiento de nuevos fármacos. El campo de fuerza CHARMM para los biopolímeros es un campo de fuerza utilizado típicamente para simulaciones de este tipo, la función de la energía potencial CHARMM define la forma funcional para calcular cada contribución energética. Recientemente, versiones generales de los campos de fuerza de biopolímeros populares, como los campos de fuerzas CHARMM y AMBER, se han desarrollado específicamente para simular moléculas pequeñas parecidas a medicamentos. Se ha procurado mantener la compatibilidad con las versiones de biopolímeros existentes.

El campo de fuerza CHARMM para proteínas y ligantes además utiliza un campo de fuerza para describir la energía potencial del sistema molecular. En particular, en el estudio de biomoléculas, uno de los campos de fuerza para describir a proteínas es el campo de fuerza CHARMM [42]. La forma funcional para la energía potencial de este campo de fuerza es expresada en la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned}
 V = & \sum_{\text{enlaces}} k_b(b - b_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{ángulos}} k_\theta(\theta - \theta_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{diédros}} k_\phi[1 + \cos(n\phi - \delta)] \\
 & + \sum_{\text{fuera plano}} k_\omega(\omega - \omega_0)^2 + \sum_{\text{Urey-Bradley}} k_u(u - u_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{no enlace}} \epsilon \left[\left(\frac{R_{\text{min}_{ij}}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{\text{min}_{ij}}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad (48)
 \end{aligned}$$

El primer término corresponde a la interacción debida al enlace entre dos átomos en particular en el sistema molecular. Dicho término contiene una constante de fuerza k_b y un término cuadrático que contiene al término $b - b_0$ (donde b_0 es la distancia de equilibrio). El segundo término corresponde a la interacción correspondiente al ángulo formado por tres átomos enlazados. En dicho término tenemos una constante de fuerza k_θ y un término cuadrático para el término $\theta - \theta_0$. De manera equivalente a la distancia de equilibrio, θ_0 se refiere al ángulo de equilibrio y el término representa la desviación de dicho ángulo. k_ϕ es la constante de fuerza correspondiente a los distintos ángulos dihedros. El término n describe la multiplicidad de la función. ϕ se refiere al ángulo dihedro generado entre los átomos. El siguiente término, denominado fuera-del-plano, está compuesto por la constante de fuerza k_ϖ mientras que $\varpi - \varpi_0$ es el ángulo fuera del plano. El siguiente término denominado de Urey-Bradley, contiene a la constante de fuerza k_u y donde u denota la distancia entre los átomos en el potencial armónico. Los términos i, j indican a pares de átomos que interaccionan sin estar enlazados, es decir, términos de no enlace. Están compuestos por un término de tipo coulombico para la parte electrostática y por el potencial de Lennard-Jones para las interacciones de tipo van der Waals (aquí el término $R_{min_{ij}}$ indica la separación entre los dos átomos) [43].

Cada uno de los campos de fuerza conocidos aprovechan la naturaleza polimérica de las proteínas y otras estructuras como el ADN, ARN y carbohidratos, para lo cual se requieren parámetros utilizados que describen un conjunto relativamente limitado de bloques de construcción, como los residuos de aminoácidos, así como el elemento de enlace común, es decir, el esqueleto peptídico. Sin embargo, la inclusión de moléculas pequeñas es significativamente desafiante debido a que ha impedido en gran medida la aplicación de tecnologías MD en el descubrimiento de nuevos fármacos.

Recientemente, versiones generales de los campos de fuerza de biopolímeros populares, como los campos de fuerzas CHARMM y AMBER, se han desarrollado específicamente para simular moléculas pequeñas parecidas a medicamentos. Se ha procurado mantener la compatibilidad con las versiones de biopolímeros existentes.

Aunque estos campos de fuerza generalizados proporcionan buena cobertura para elementos comunes de muchas moléculas pequeñas y biológicamente relevantes, no proporcionan un solo conjunto de parámetros para realizar una cobertura adecuada. Para abordar estas limitaciones, en los conjuntos de parámetros disponibles, la tarea de parametrizar nuevos grupos funcionales y nuevos vínculos entre grupos existentes se ha convertido en una tarea cada vez más importante en el desarrollo de los campos de fuerza y en las simulaciones biomoleculares en términos generales [44].

Capítulo IV. Metodología

La metodología se llevó a cabo de la siguiente manera:

Cálculos de estructura electrónica

Se realizaron cálculos de optimización para obtener estructuras de mínima energía sobre la superficie de energía potencial. Los cálculos de optimización de geometría de las especies involucradas, en el mecanismo de reacción, es decir, reactivos, intermediarios, estados de transición y productos de los cinco compuestos NONOatos (1-5) y sus tautómeros protonados (1-5-H1-H5), se llevaron a cabo en el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p) [30, 33]. Sobre las geometrías optimizadas se realizaron cálculos de frecuencias para asegurar estructuras de mínima energía o TS sobre la superficie de potencial. Los cálculos se realizaron en fase gas y en disolución acuosa usando el modelo de solvatación de densidad (SMD) [34].

Mecanismos de reacción

Del análisis estructural y energético de los tautómeros de las especies protonadas se dedujo a partir de los valores de ΔG_{hid} que el tautómero H5 está directamente involucrado en la reacción de descomposición de los amino NONOatos. Se propuso un estado de transición para el tautómero H5 de cada amino NONOato (1-5) y de esta manera se determinó el camino de reacción completo. Para el cálculo de la energía de Gibbs se consideró la energía electrónica y las correcciones termoquímicas de la entalpía y la entropía a una temperatura de 298.15 K usando la siguiente ecuación:

$$G = E + H - TS \quad (49)$$

La energía libre de hidratación se calculó usando la expresión:

$$\Delta G_{hid} = G_s - G_g \quad (50)$$

donde *s* indica la fase en disolución y *g* indica la fase gas. El término ΔG_{hid} mide la interacción energética entre el soluto y el disolvente. ΔG_{tau} representa las energías de Gibbs para el proceso de tautomerización calculada en todos los tautómeros. ΔG_{dis} se refiere a la energía libre necesaria para que ocurra la disociación y la correspondiente liberación de NO.

Finalmente, se construyó un perfil energético para visualizar la descomposición del NO y las principales especies involucradas en el mecanismo de reacción.

Cálculo de pK_a

Los valores de pK_a se calcularon usando la ecuación (41) (ver sección 4.5):

$$pK_a = \frac{\Delta G_{sol}^{\circ}}{1.364} + \log[H_2O] \quad (41)$$

donde ΔG_{sol}° es la diferencia de energía libre entre las especies en solución acuosa. Las energías libres de solvatación de las especies neutras, sus correspondientes especies conjugadas y las moléculas de agua fueron calculadas usando el método de solvatación SMD. Los cálculos de pK_a se realizaron para los compuestos NONOatos y sus tautómeros protonados correspondientes (5-H5) propuestos en este trabajo.

Análisis de NBO

El análisis de los orbitales naturales de enlace NBO se realizó con el fin de determinar las propiedades electrostáticas y de enlace de los tautómeros protonados 5-H5 calculados al nivel de teoría M06L/6-311++G (d,p) y con el método de solvatación SMD en solución acuosa.

Todos los cálculos de estructura electrónica se realizaron con el programa Gaussian16 [45] y se visualizaron con el programa GaussianView 6.0 [46].

Simulaciones de Dinámica Molecular

Finalmente, para los cálculos de simulación de dinámica molecular (MD) se utilizó el programa NAMD [47] y para el análisis de los resultados el programa VMD [48]. Se consideró la estructura molecular de región C-terminal del canal HCN en un ambiente acuoso en solución con cloruro de sodio a una concentración de 0.15 M y se establecieron cambios conformacionales del C-terminal en ausencia y presencia del ligante (cAMP y cGMP) con el CNBD del canal HCN. Para la preparación del sistema se utilizaron de 3 estructuras: hHCN1 (apo-proteína), hHCN1 (cAMP) y hHCN1 (cGMP). Para cada una de estas estructuras se consideraron sólo los aminoácidos del C-terminal (Ser402-Asp608) para las 4 cadenas del canal HCN. Para las estructuras descritas se consideró un pH de 7. La principal dificultad que

se tiene en la metodología utilizada para la parte de simulación de la S-nitrosilación es que esta modificación postraducciona no se encuentra parametrizada en el programa VMD.

Con la finalidad de poder estudiar en un futuro la modificación postraslacional a residuos de cisteína debida al NO (S-nitrosilación), nos dimos a la tarea de desarrollar los parámetros de este grupo compatibles con el campo de fuerza CHARMM [42]. Para esto se construyó una molécula nitrosilada a partir de una base molecular existente conocida, en este caso se reemplazó un átomo hidrógeno con NO para obtener la molécula deseada. Una vez obtenida la molécula deseada se actualizaron las propiedades atómicas de la molécula, se optimizaron las cargas atómicas parciales, se fijaron las cargas de los hidrógenos para los campos de fuerza compactos de CHARMM [42], y se calcularon en un paso posterior las cargas resultantes.

De esta manera se construyó un archivo de parámetros iniciales con información molecular necesaria para calcular la energía potencial del sistema. Con base en esta información, se optimizó la geometría de la molécula para obtener la configuración de más baja energía calculada a nivel de teoría HF/6-31+G(d) con el programa Gaussian16 [45] y finalmente se optimizaron los parámetros correspondientes a los ángulos de valencia y ángulos diedros de la molécula generada.

Capítulo V. Resultados y discusión

5.1 Estructura molecular de los tautómeros

La Figura 4 muestra las estructuras moleculares para las geometrías optimizadas de los NONOatos 1-5 en el nivel de teoría M06L/6-311++G (d, p) en fase acuosa con el método de solvatación SMD. Las estructuras 1-5 son estructuras aniónicas con configuración Z para el grupo $[N(O)NO]^-$. La preferencia por la configuración Z de los dialquilamino diazeniumdiolatos fue previamente estudiada [17-20] y confirma nuestros resultados.

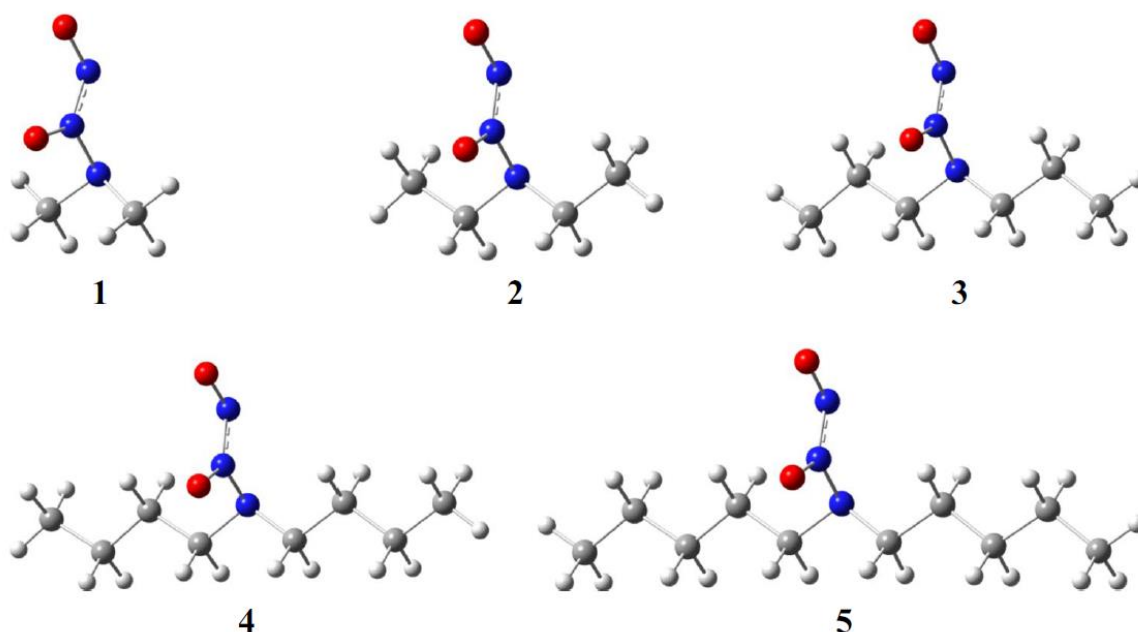
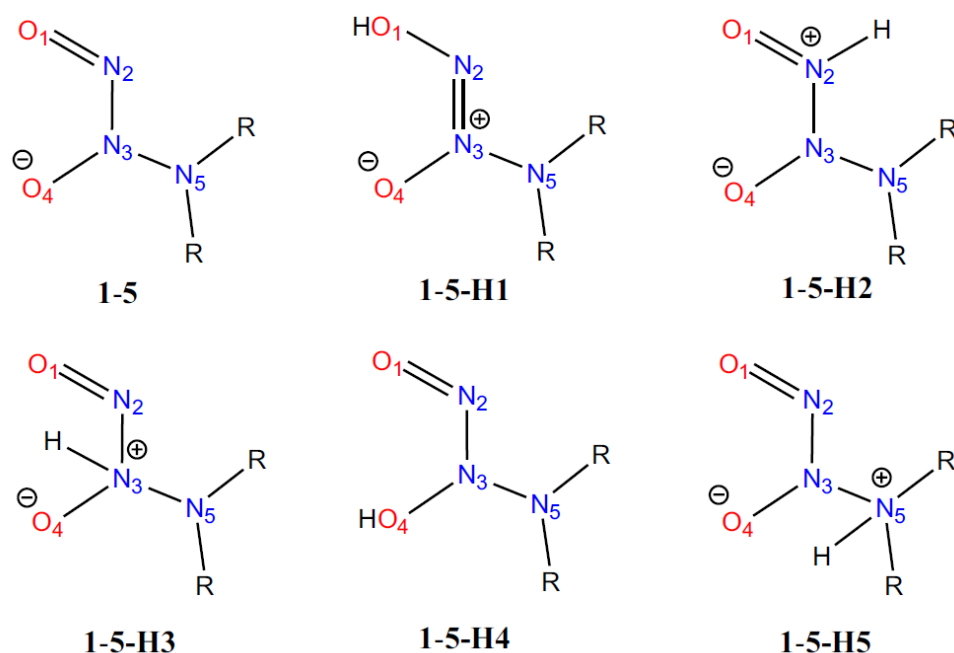


Figura 4. Estructuras moleculares de los NONOatos 1-5 calculados en el nivel de teoría M06L/6-31++G (d, p) usando el método de solvatación SMD en solución acuosa.

A partir de las estructuras 1-5 se generaron los tautómeros de los compuestos protonados de los NONOatos en los cinco posibles sitios de protonación del grupo $[N(O)NO]^-$ como se observa en la Figura 5. La protonación en los átomos de oxígeno del grupo $[N(O)NO]^-$ generó a los tautómeros H1 y H4, mientras que la protonación en los átomos de nitrógeno produce los tautómeros H2 y H3, finalmente la protonación en el nitrógeno del grupo amino genera el tautómero H5, el cual se usa para el mecanismo de liberación del NO.



R= -CH₃ (1); -CH₂CH₃ (2); -(CH₂)₂-CH₃ (3); -(CH₂)₃-CH₃ (4); -(CH₂)₄-CH₃ (5)

Figura 5. Estructuras moleculares de los NONOatos y sus tautómeros protonados H1-H5.

La Tabla 1 resume las longitudes de enlace seleccionadas de los NONOatos 1-5 y sus tautómeros protonados H1-H5. Se puede observar que la distancia O1-N2 se incrementa en el tautómero H1 respecto a las especies no protonadas, mientras que en los tautómeros H2-H5 disminuye. Para la distancia N2-N3, se observa un incremento significativo en el tautómero H3 (1.96-1.99 Å) mientras que en el resto de los tautómeros protonados (H1, H2, H4 y H5) se mantiene con un valor de 1.28-1.31 Å, el cual es un valor cercano a los NONOatos no protonados 1-5. También para la distancia N3-O4 se observa un incremento para el tautómero H4 (1.39 Å) respecto a los NONOatos no protonados, mientras que los demás tautómeros mantienen su valor (1.25-1.29 Å). Para la distancia N3-N5 se observa un ligero incremento de 1.40-1.45 Å para los tautómeros protonados H1, H2, H3 y H5, excepto para H4. Es relevante observar que la distancia N3-N5 es menor para el NONOato 1 (1.29 Å) y su tautómero H1 (1.39 Å) con respecto al resto de los NONOatos no protonados 2-5 (aproximadamente de 1.45 Å) y sus tautómeros H2-H5 (aproximadamente de 1.43 Å). La longitud de enlace N3-N5 fue previamente reportada con un valor de 1.491 Å calculada en el nivel de teoría B3LYP/6-

311+G (d) [18] para el tautómero 1-H5 y 1.51 Å en el nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d) [20] para 2-H5. Ambos valores están en acuerdo con nuestros resultados. En general, los valores de las longitudes de enlace que se presentan en la Tabla 1, conservan sus valores aun cuando el sustituyente dialquilamino se incrementa para los NONOatos 1-5.

Tabla 1. Longitudes de enlace seleccionadas (en Å) de los NONOatos 1-5 y sus tautómeros protonados H1-H5 calculados en el nivel de teoría M06L/6-311++G(d p) en fase acuosa con el método de solvatación SMD. La convención numérica es la de la Figura 1.

	1	2	3	4	5
O1-N2					
Tautómeros no protonados	1.285	1.285	1.285	1.285	1.285
H1	1.368	1.355	1.355	1.355	1.355
H2	1.250	1.250	1.250	1.250	1.250
H3	1.139	1.141	1.141	1.141	1.241
H4	1.252	1.252	1.252	1.253	1.253
H5	1.267	1.266	1.266	1.266	1.266
N2-N3					
Tautómeros no protonados	1.305	1.306	1.306	1.306	1.306
H1	1.290	1.281	1.281	1.281	1.281
H2	1.305	1.306	1.306	1.306	1.306
H3	1.999	1.960	1.961	1.960	1.958
H4	1.301	1.302	1.302	1.302	1.302
H5	1.315	1.316	1.316	1.316	1.316
N3-O4					
Tautómeros no protonados	1.290	1.290	1.290	1.290	1.290
H1	1.260	1.259	1.259	1.259	1.259
H2	1.245	1.246	1.246	1.245	1.245
H3	1.269	1.284	1.284	1.284	1.284
H4	1.395	1.395	1.395	1.395	1.395
H5	1.259	1.261	1.261	1.261	1.261

N3-N5					
Tautómeros no protonados	1.290	1.431	1.432	1.433	1.432
H1	1.396	1.433	1.433	1.433	1.433
H2	1.436	1.432	1.434	1.434	1.434
H3	1.454	1.447	1.447	1.448	1.448
H4	1.368	1.365	1.366	1.366	1.366
H5	1.492	1.481	1.484	1.483	1.483

La Tabla 2 muestra los ángulos de valencia y los ángulos diedros seleccionados de los NONOatos 1-5 y sus tautómeros protonados H1-H5. Con respecto a los ángulos de valencia se puede observar que el ángulo O1-N2-N3 es muy similar en los tautómeros H1, H4 y H5, con un valor alrededor de 113.22°, mientras que en H3 disminuye en 10°. Para H2 se observa un incremento de 10° en el tautómero H2 de todos los NONOatos. El ángulo N2-N3-O4 disminuyó en el tautómero H3 en todos los NONOatos aproximadamente 20°, mientras que en el tautómero H5 se incrementó con un valor alrededor de 131.60°. Para el ángulo N5-N3-O4 los valores se mantuvieron alrededor de 120° en las especies no protonadas. Para los ángulos O1-N2-N3, N2-N3-O4 y N5-N3-O4 se obtuvieron valores similares reportados en la literatura para los NONOatos 1 y 2 [18, 20], podemos mencionar que nuestros resultados son correctos. El ángulo diedro O1-N2-N3-O4 mostró una clara preferencia por la conformación Z en el grupo $[N(O)NO]^-$ en todos los NONOatos 1-5. Únicamente el tautómero H3 mostró ligeras desviaciones. Para el ángulo O1-N2-N3-O4, el tautómero H3 sufre una desviación significativa en la conformación del sustituyente dialquilamino con respecto al grupo $[N(O)NO]^-$, mientras que el resto de los tautómeros mantuvieron a los átomos del grupo $[N(O)NO]^-$ coplanares (180°) con respecto al nitrógeno de la amina del sustituyente dialquilamino, como se puede ver en la Tabla 2.

Tabla 2. *Ángulos de valencia y ángulos diedros seleccionados (en grados) de los NONOatos 1-5 y sus tautómeros protonados H1-H5 calculados en el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p) en fase acuosa con el método de solvatación SMD. La convención numérica es la de la Figura 1.*

	1	2	3	4	5
O1-N2-N3					
Tautómeros no protonados	113.72	113.60	113.67	113.64	113.66
H1	109.72	110.34	110.35	110.35	110.36
H2	122.93	123.00	122.90	123.00	123.00
H3	98.83	101.79	101.76	101.80	101.88
H4	113.26	113.22	113.22	113.20	113.21
H5	113.20	113.06	113.08	113.10	113.10
N2-N3-O4					
Tautómeros no protonados	126.29	126.01	126.09	126.08	126.08
H1	123.92	124.56	124.55	124.53	124.53
H2	122.41	122.28	122.32	122.34	122.33
H3	101.74	104.81	104.84	104.89	104.98
H4	119.97	119.77	119.77	119.75	119.76
H5	132.14	131.56	131.64	131.68	131.67
N5-N3-O4					
Tautómeros no protonados	120.35	120.33	120.33	120.28	120.32
H1	118.72	122.31	122.33	122.34	122.35
H2	124.83	124.92	124.92	124.92	124.92
H3	117.02	120.99	120.99	120.96	120.93
H4	118.39	118.39	118.41	118.41	118.42
H5	117.57	117.51	117.50	117.48	117.48
O1-N2-N3-O4					
Tautómeros no protonados	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
H1	2.83	0.08	0.00	0.00	0.01
H2	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00
H3	1.11	5.22	-5.02	-4.69	4.63
H4	0.31	0.14	0.39	0.47	0.38
H5	-0.23	0.01	0.00	0.002	0.00

O1-N2-N3-N5					
Tautómeros no protonados	-179.99	179.83	179.99	179.98	-179.99
H1	-172.81	-179.73	179.98	179.99	-179.95
H2	-179.85	-179.99	179.99	179.98	-179.99
H3	-119.94	135.96	-135.73	-135.35	135.23
H4	179.54	179.60	178.71	178.45	178.71
H5	-179.66	-179.98	179.99	179.96	179.99

Las energías relativas calculadas de los diferentes NONOatos 1-5 y sus tautómeros protonados H1-H5 en fase gas y en disolución acuosa con el método de solvatación SMD se resumen en la Tabla 3. En fase gas las estructuras optimizadas de los NONOatos no protonados tienen energías electrónicas relativas de $\Delta E_g = 68.0\text{-}71.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ y las energías libres relativas $\Delta G_g = 64.0\text{-}66.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ son más altas que aquellas calculadas con el método de solvatación SMD en agua, ver Tabla 3. Sin embargo, los tautómeros H1-H5 tienen energías relativas de $\Delta E_g = 4.3\text{-}25.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ y $\Delta G_g = 4.0\text{-}23.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ con respecto a las energías optimizadas en SMD en agua. En general, las energías libres de tautomerización son endergónicas en agua. La optimización en fase acuosa nos indica que el tautómero protonado H1 es el tautómero energéticamente más favorable, seguido por los tautómeros H4 $\Delta G_{SMD} = 2.23\text{-}3.54 \text{ kcal mol}^{-1}$ y H5 $\Delta G_{SMD} = 5.56\text{-}6.54 \text{ kcal mol}^{-1}$ para los cinco NONOatos.

En disolución acuosa, se observa una considerable estabilización energética por efecto del disolvente considerando las contribuciones termodinámicas de la entalpía y la entropía a una temperatura de 298.15 K, un bar de presión y concentración 1 M. Las energías libres relativas siguen la siguiente tendencia $H1 < H4 < H2 < H3 < H5$ en fase gas y $H1 < H4 < H5 < H2 < H3$ en disolución acuosa usando el método SMD. Esta tendencia en energías libres es similar a la reportada previamente para el compuesto dimetilamino diazeniumdiolato [18] usando el nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d) con el método de solvatación COSMO. La gran estabilización del tautómero H5 en los cinco NONOatos con solvatación SMD se pueden atribuir a la disposición para la disociación espontánea en fase gas observada en amino diazeniumdiolatos protonados, esto fue obtenido en un estudio previo usando el funcional B3LYP [20]. En este trabajo, usando el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p), aunque la optimización en fase gas no

condujo a la disociación del dímero NO, se observó un aumento en la longitud de enlace N3-N5 (1.528, 1.534, 1.530, 1.554 y 1.557 Å) respecto a las distancias correspondientes en fase acuosa (1.492, 1.481, 1.484, 1.483 y 1.483 Å), ver Tabla 1. Los valores de las energías libres de hidratación fueron calculados con la ecuación $\Delta G_{hid} = G_s - G_g$ donde *s* indica la fase en disolución y *g* indica la fase gas. Los valores de ΔG_{hid} en la Tabla 3 muestran los valores negativos más altos para las especies no protonadas seguidas del valor del tautómero H5. La ΔG_{hid} se puede usar como una medida de interacción entre el soluto y el disolvente. En este caso, los valores negativos de ΔG_{hid} del tautómero H5 corresponden a una fuerte interacción del compuesto con las moléculas de agua, por lo que H5 se propone como el reactivo más lábil para la liberación de NO.

Tabla 3. Energías relativas (en kcal mol^{-1}) de los NONOatos 1-5 y sus tautómeros protonados H1-H5 calculadas en el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p) en fase gas y en fase acuosa con el método de solvatación SMD.

NONOato1						
Energías Relativas (kcal mol^{-1})						
	1	1H1	1H2	1H3	1H4	1H5
ΔE_{gas}	356.89	0.00	16.59	22.85	6.38	28.60
ΔG_{gas}	347.23	0.00	15.97	20.22	4.89	27.00
ΔE_{sol}	291.42	0.00	11.20	21.18	6.08	10.11
ΔG_{hid}	-64.19	0.00	-5.15	-0.84	-1.34	-17.55
ΔG_{sol}	283.04	0.00	10.81	19.37	3.54	9.45
NONOato2						
Energías Relativas (kcal mol^{-1})						
	2	2H1	2H2	2H3	2H4	2H5
ΔE_{gas}	353.148	0.00	13.48	24.84	3.64	26.02
ΔG_{gas}	343.85	0.00	13.33	22.63	2.27	25.26
ΔE_{sol}	288.99	0.00	8.34	21.37	3.29	5.62
ΔG_{hid}	-62.82	0.00	-4.95	-2.27	-0.04	-19.69
ΔG_{sol}	281.02	0.00	8.37	20.35	2.23	5.56

NONOato3						
Energías Relativas (kcal mol ⁻¹)						
	3	3H1	3H2	3H3	3H4	3H5
ΔE_{gas}	352.6860	0.00	13.46	24.40	3.72	23.67
ΔG_{gas}	343.0428	0.00	13.15	21.90	2.08	22.58
ΔE_{sol}	289.0547	0.00	8.33	21.36	3.34	5.67
ΔG_{hid}	-61.7073	0.00	-4.43	-1.16	0.39	-16.53
ΔG_{sol}	281.3354	0.00	8.71	20.73	2.47	6.04

NONOato4						
Energías Relativas (kcal mol ⁻¹)						
	4	4H1	4H2	4H3	4H4	4H5
ΔE_{gas}	352.47	0.00	13.41	24.46	3.72	23.70
ΔG_{gas}	342.67	0.00	13.04	22.14	2.13	21.83
ΔE_{sol}	289.10	0.00	8.32	21.27	3.34	5.63
ΔG_{hid}	-61.26	0.00	-4.17	-1.02	0.69	-15.61
ΔG_{sol}	281.41	0.00	8.87	21.11	2.82	6.22

NONOato5						
Energías Relativas (kcal mol ⁻¹)						
	5	5H1	5H2	5H3	5H4	5H5
ΔE_{gas}	352.27	0.00	13.42	24.47	3.71	24.36
ΔG_{gas}	342.29	0.00	12.92	21.98	2.14	22.68
ΔE_{sol}	289.14	0.00	8.33	21.27	3.34	5.62
ΔG_{hid}	-60.50	0.00	-3.95	-0.54	0.42	-16.77
ΔG_{sol}	281.79	0.00	8.97	21.44	2.57	5.91

5.2 Mecanismos de reacción

Los compuestos donadores de NO derivados de los dialquilamina diazeniumdiolatos son compuestos utilizados como tratamiento para diferentes trastornos neuropáticos y cardíacos, una de sus características farmacológicas importantes es la de cubrir un intervalo amplio de tiempo de liberación en condiciones fisiológicas. Los tiempos medios de liberación dependen en general de la naturaleza química de los diferentes sustituyentes unidos al grupo [N(O)NO]⁻ y de las condiciones fisiológicas del medio. Debido a que el tautómero 1-H5 genera la barrera

energética y energía libre de disociación ΔG_{dis} más pequeñas, en comparación con el resto de los tautómeros, se puede asegurar que este compuesto tiene una mayor probabilidad de liberar los productos correspondientes. El mecanismo de reacción general se presenta en la Figura 6.

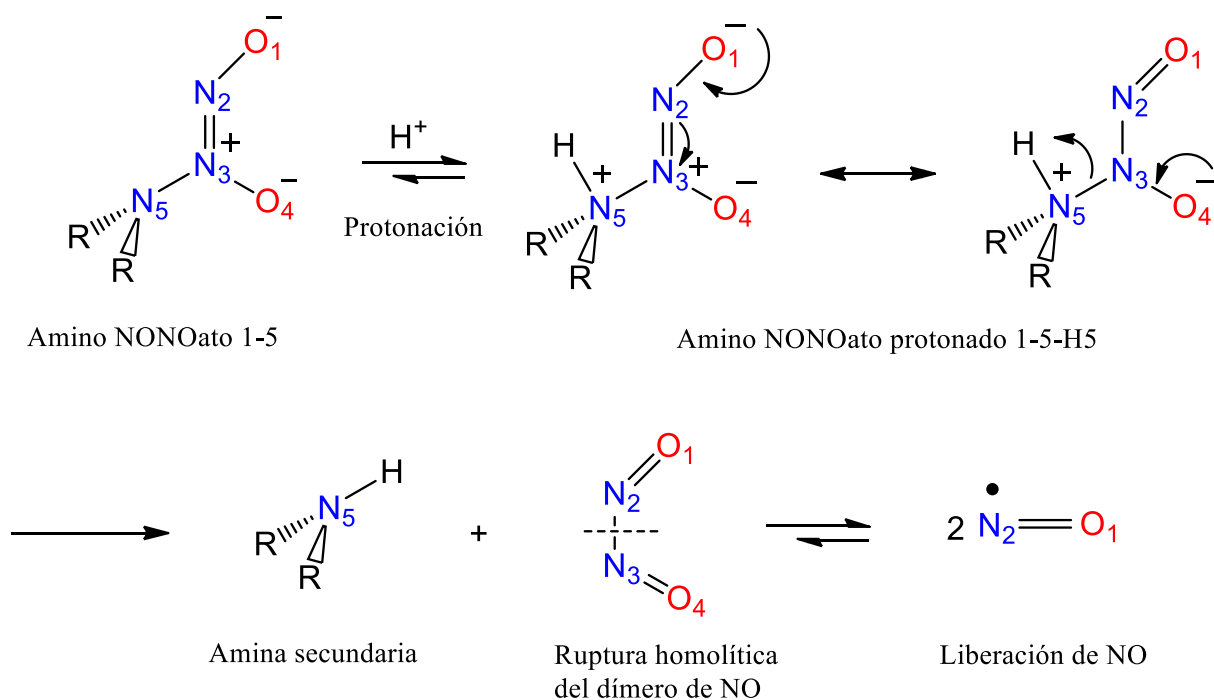


Figura 6. Esquema general del mecanismo de reacción para la liberación de NO a partir de los NONOatos 1-5.

En fase gas los cálculos de optimización de las estructuras de mínima energía de los tautómeros protonados H1-H5 de los NONOatos 1-5 no condujeron a su disociación espontánea, sin embargo, los estados de transición (TS) e intermediarios (Int) en el camino de reacción se disocian en la amina secundaria y un dímero de NO obtenidos como productos.

Para obtener la energía libre en disolución, ΔG_{SMD} , se tomaron en cuenta todas las contribuciones termodinámicas para llevar a cabo los cálculos en fase gas a partir de las geometrías optimizadas en el nivel de teoría M06L/6-311++G (d, p) con SMD en agua usando cálculos puntuales. A través de cálculos de frecuencias se verificó la presencia de un solo modo vibracional imaginario en cada estado de transición calculados en el mismo nivel de teoría con SMD.

La Tabla 4 muestra las energías libres relativas para las especies involucradas en el mecanismo de reacción de liberación de NO a partir del tautómero H5 de cada NONOato (1-5-H5) en fase acuosa. Las barreras de disociación para los tautómeros 1-5-H5 vía el TS 1-5-H5 se encontraron dentro del intervalo 4.8-6.7 kcal mol⁻¹. Se observó un ligero incremento en la ΔG_{dis} cuando aumenta el tamaño del sustituyente dialquilamino.

El comportamiento general de los perfiles de energía para la descomposición de los tautómeros 1-5-H5 se observa en la Figura 7. El tautómero 1-H5 generó la barrera energética más pequeña para la ruptura de la distancia N3-N5 como coordenada de reacción en la disociación exotérmica de los productos, obteniendo los productos energéticamente más estables, la amina 1 y dos moléculas de NO. Para los tautómeros 1-4-H5, las barreras energéticas cambian ligeramente cuando el sustituyente dialquilamino incrementa su tamaño. Las barreras energéticas para la descomposición del TS de 1-4-H5 difieren en 1.5 kcal mol⁻¹. Estos resultados nos indican que los tautómeros H1-H5 poseen un perfil energético similar y se podría esperar un proceso de descomposición a velocidades de reacción similares aun cuando se incremente el tamaño del sustituyente dialquilamino.

Tabla 4. Energías libres ΔG (en kcal mol⁻¹) de las especies involucradas en el mecanismo de reacción de liberación del NO de los tautómeros 1-5-H5 calculados en el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p) con el método de solvatación SMD en agua.

NONOato	ΔG_{dis}	ΔG_{hid}
1-H5	0.00	0.00
TS1-H5	4.78	17.66
Int1-H5	-4.01	26.77
Amina 1 + 2NO	-6.33	28.47
2-H5	0.00	0.00
TS2-H5	6.29	18.28
Int2-H5	-0.90	26.63
Amina 2 + 2NO	-3.29	27.38
3-H5	0.00	0.00
TS3-H5	6.20	18.12
Int3-H5	-1.18	26.36
Amina 3 + 2NO	-3.45	27.11
4-H5	0.00	0.00
TS4-H5	6.31	18.88
Int4-H5	-1.23	26.24
Amina 4 + 2NO	-3.19	27.31
5-H5	0.00	0.00
TS5-H5	6.72	19.31
Int5-H5	-0.94	26.54
Amina5 + 2NO	-3.35	27.43

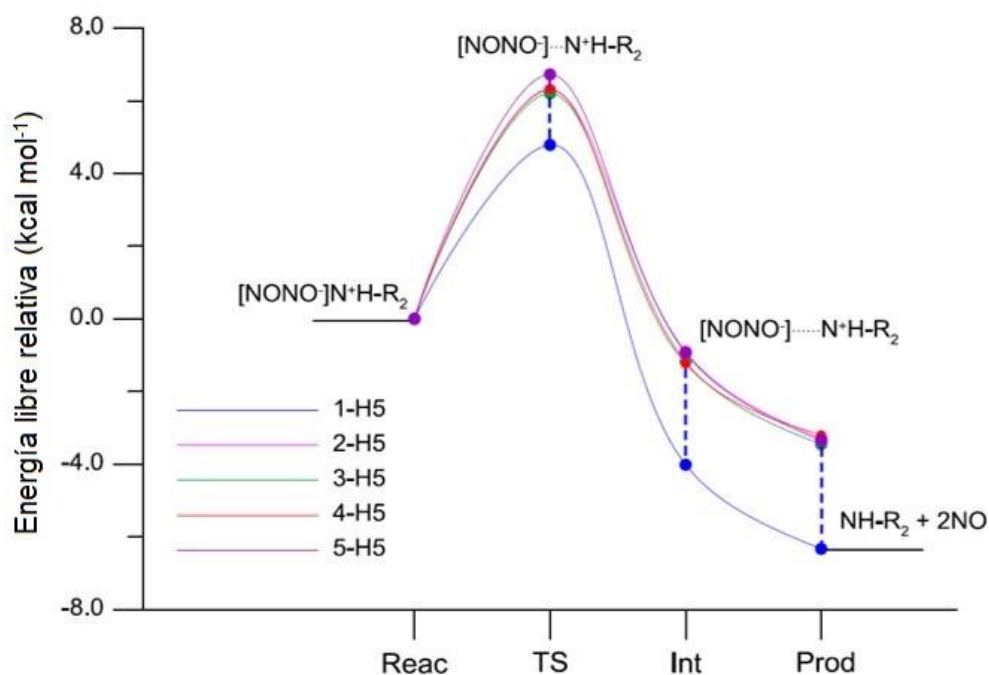
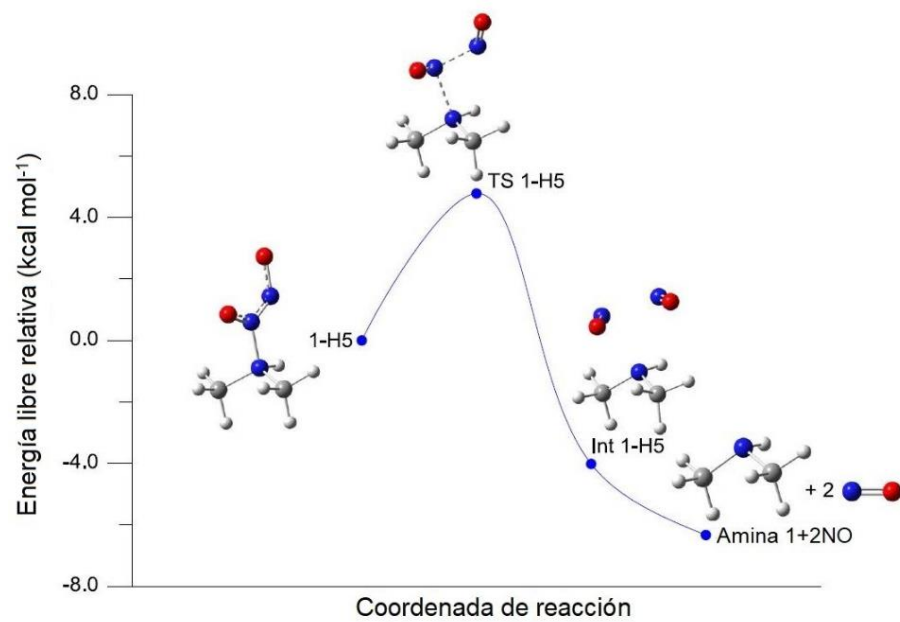


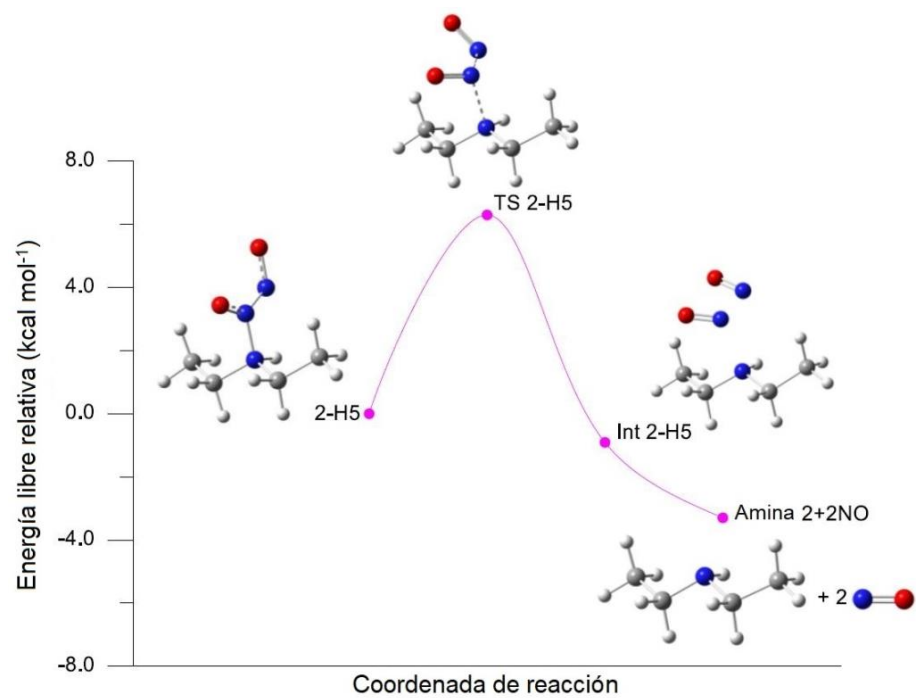
Figura 7. Esquema general de los perfiles energéticos de los tautómeros 1-5-H5 para la liberación de NO calculado en el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p). Reac se refiere a reactivo, TS es el estado de transición, Int es un intermediario y Prod se refiere al producto.

El estado de transición hallado para la descomposición del tautómero H5 del DEA/NO ha sido reportado en la literatura [20] con un valor de $17.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ que es significativamente más alto respecto a $6.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ que se obtuvo en esta tesis. Sin embargo, la estructura para TS2-H5 es similar en geometría con un valor para el enlace N3-N5 de $1.89 \text{ \AA}$ y $\nu(\text{N3-N5 stretching}) = 146i \text{ cm}^{-1}$ comparado con nuestro valor obtenido de $\text{N3-N5} = 1.882 \text{ \AA}$ y $\nu(\text{N3-N5 stretching}) = 286i \text{ cm}^{-1}$. Estas diferencias en los resultados se pueden atribuir a las diferentes metodologías usadas en los trabajos reportados. Los valores para las barreras de disociación son consistentes para todos los NONOatos calculados. Los perfiles energéticos para la descomposición de los tautómeros 1-5-H5 para la formación de sus aminas secundarias correspondientes y la liberación de NO se muestran en la Figura 8.

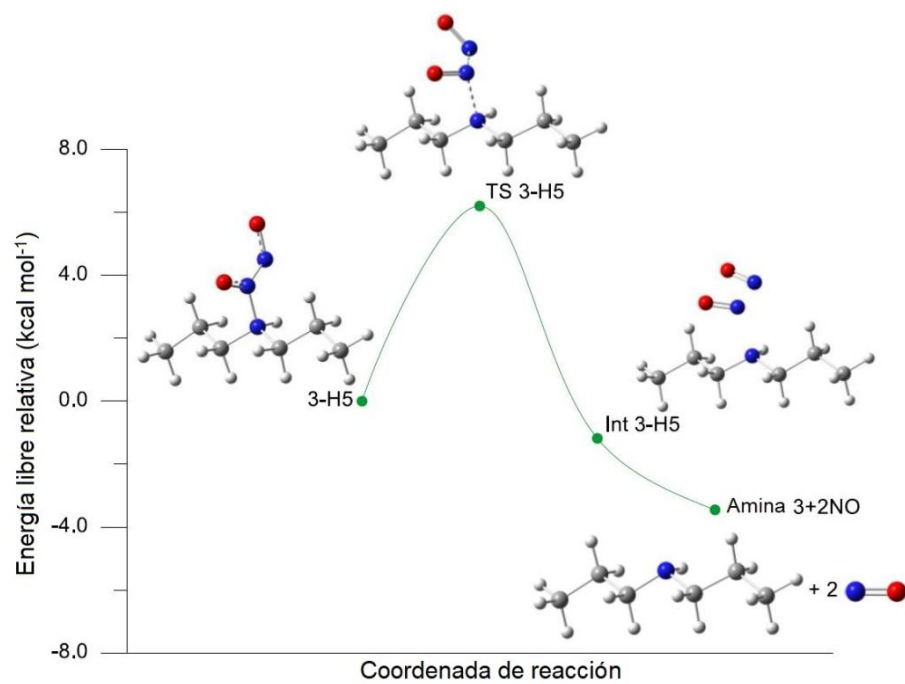
(a)



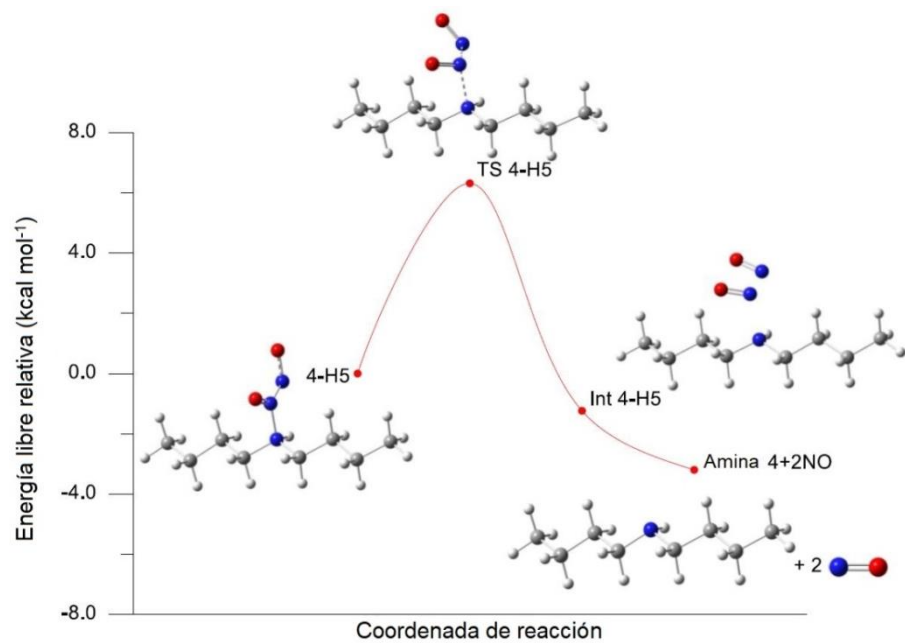
(b)



(c)



(d)



(e)

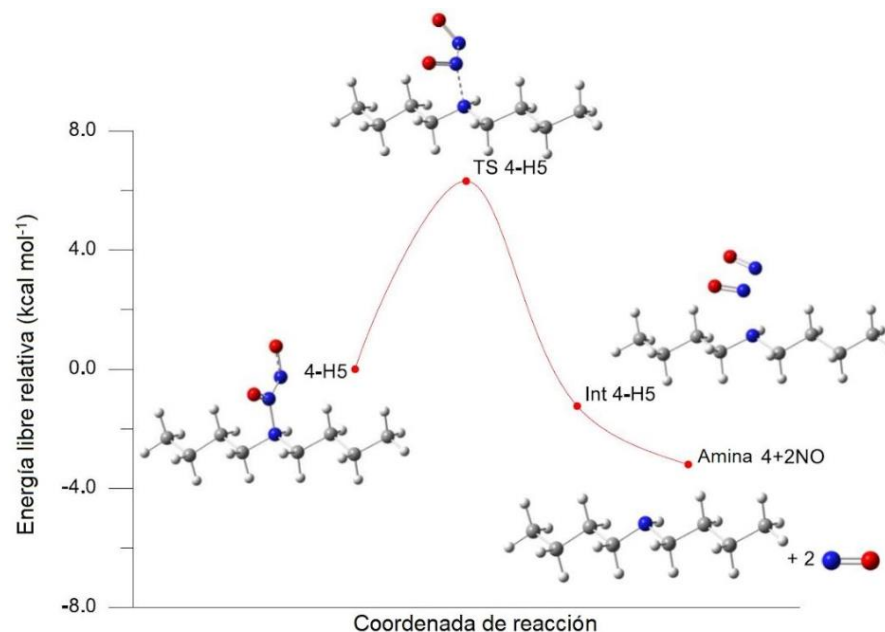
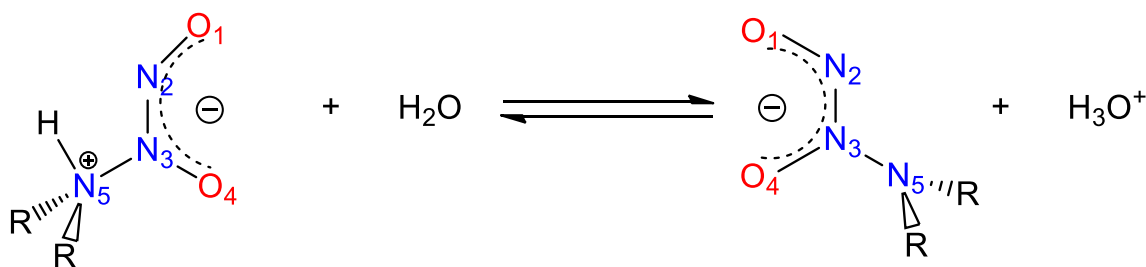


Figura 8. Perfiles energéticos para la descomposición de los tautómeros (a) 1-H5, (b) 2-H5, (c) 3-H5, (d) 4-H5 y (e) 5-H5 para la formación de la amina secundaria correspondiente y la liberación del dímero de NO calculados en el nivel de teoría M06L/6-311++G (d, p).

5.3 Cálculo de pK_a

Como se ha mencionado en las secciones anteriores, las especies tautoméricas 1-5-H participan directamente en la descomposición de los NONOatos. Por lo tanto, los valores de estimados de pK_a se calcularon para los tautómeros H5 y sus correspondientes especies no protonadas 1-5. La pérdida del protón de los NONOatos 1-5-H5 produce cinco especies diferentes no protonadas de acuerdo con el siguiente esquema:



R= -CH₃ (1); -CH₂CH₃ (2); -(CH₂)₂-CH₃ (3); -(CH₂)₃-CH₃ (4); -(CH₂)₄-CH₃ (5)

Figura 9. Esquema de la formación de especies no protonadas a partir de los NONOatos 1-5-H5.

La Tabla 5 resume los valores de las energías libres relativas en fase gas y en disolución para los tautómeros 1-5-H5 y sus especies no protonadas. Los resultados muestran el tautómero 5-H5 con el sustituyente dialquilamino más grande, es más estable que el tautómero 1-H5 por -314.3 Hartrees. Para los NONOatos no protonados, el NONOato 5 es 3.20 kcal mol⁻¹ más estable que el NONOato 1.

Tabla 5. Energías libres relativas en fase gas (G_g^0) (en Hartrees) y energías libres de solvatación (ΔG_s^0) en kcal mol⁻¹ para los tautómeros 1-5-H5 y las especies no protonadas 1-5 involucrados en el mecanismo de liberación de NO calculados en el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p).

NONOato	ΔG_{gas}^0	ΔG_{sol}^0	NONOato	ΔG_{gas}^0	ΔG_{sol}^0
1-H5	0.00	-32.08	1	0.00	-69.53
2-H5	-78.59	-31.97	2	-78.59	-68.73
3-H5	-157.18	-31.48	3	-157.18	-67.60
4-H5	-235.76	-31.00	4	-235.76	-67.02
5-H5	-314.34	-30.58	5	-314.34	-66.33

Los valores teóricos de pK_a fueron obtenidos con el objetivo de conseguir indicios sobre las condiciones fisiológicas adecuadas para la pérdida del protón cuando se lleva a cabo la liberación del grupo [N(O)NO]⁻. Los valores de pK_a estimados fueron calculados basados en las relaciones termodinámicas propuestas por Pliego y Riveros [40] y siguiendo la teoría ácido-base de acuerdo con la Figura 8. La ecuación usada para estimar el valor de pK_a es:

$$pK_a = \frac{\Delta G_{sol}^0}{1.364} - \log[H_2O]$$

donde ΔG_{sol}^0 es la diferencia de energía libre entre las especies en solución acuosa, la cual está relacionada con la ecuación $\Delta\Delta G_{sol}^0 = \Delta G_{solA}^0 + \Delta G_{solH_3O^+}^0 - \Delta G_{solHA}^0 - \Delta G_{solH_2O}^0$. Las energías libres de solvatación de las especies neutras, sus correspondientes especies conjugadas, así como de las moléculas de agua fueron calculadas usando el modelo de solvatación SMD. Para la minimización del error de cálculo en el pK_a se usó el valor experimental para la energía libre de solvatación del ion H_3O^+ de $-110.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ sugerido por Pliego y Riveros en la literatura [40]. La Tabla 6 muestra los valores de pK_a calculados de los NONOatos 1-5-H5. La deprotonación del grupo funcional -NH está asociada con los valores de pK_a en forma ascendente. Es decir, se observa que conforme el sustituyente alquilo se va incrementando en tamaño, el valor del pK_a cambia de valores negativos a positivos. Además, también es importante observar que la deprotonación en el átomo N5 está favorecida en disolución acuosa conforme se incrementa el tamaño del sustituyente dialquilamino.

Las estimaciones teóricas previas de pK_a se llevaron a cabo usando la relación $pK_a = -0.74(\Delta\Delta G_{aq}) + 4.5$ para el dimetilamino diazeniumdiolato *N*-protonado con $pK_a = -8.9$ relativo al valor de 4.5 del tautómero menos ácido del DEA/NO reportado en la literatura. En este caso, los autores usaron un pK_a experimental de 4.5 para el DEA/NO, el cual no corresponde al sitio reactivo que conduce a la descomposición. Sin embargo, indicaron que las vidas medias más grandes para la producción de NO podrían surgir por la disminución del pK_a del nitrógeno amino cuando son protonados los sitios básicos en los sustituyentes [18]. Usando la misma aproximación, el valor de pK_a para DEA/NO fue estimado teóricamente como 4.6 y para el tautómero DEA/NO *N*-protonado fue estimado como -2.7 [20]. También el pK_a predicho para IPA/NO fue de 4.0 [19] usando el método de Pliego y Riveros [40].

Tabla 6. Energías libres de solvatación $\Delta\Delta G_{sol}^{\circ}$ (kcal mol⁻¹) y valores teóricos de pK_a de los tautómeros 1-5-H5 involucrados en el mecanismo de reacción de liberación de NO calculados en el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p).

NONOato	$\Delta\Delta G_{sol}^{\circ}$ (kcal mol ⁻¹)	pK_a
1-H5 → 1	-177.65	-6.2
2-H5 → 2	-171.96	-1.8
3-H5 → 3	-168.32	0.5
4-H5 → 4	-164.22	3.4
5-H5 → 5	-160.65	5.6

6.4 Análisis de NBO

El análisis NBO fue realizado en los tautómeros 1-5-H5 para la determinar las propiedades electrostáticas y de enlace de estas especies protonadas. La Tabla 7 contiene las cargas atómicas parciales de los átomos del grupo [N(O)NO]⁻ a partir del análisis NBO. En general, se obtuvieron valores muy similares en las cargas atómicas de los NONOatos y no hubo diferencia significativa cuando se incrementó el tamaño de los sustituyentes alquilo. Las cargas atómicas parciales se reportaron previamente en la literatura [18] para el grupo [N(O)NO]⁻ usando análisis NBO en compuestos DEA/NO con valores muy similares (-0.60, 0.00, 0.26, -0.68 y -0.37) a los datos que hemos obtenido (-0.68, 0.02, 0.267, -0.681 y -0.36) para el NONOato protonado 1.

Tabla 7. Orbitales Naturales de Enlace (NBO) de los NONOatos 1-5 y sus tautómeros protonados H1-H5 calculados en el nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p) en agua con el método de solvatación SMD.

	1	2	3	4	5
O1					
Tautómeros no protonados	-0.682	-0.679	-0.679	-0.679	-0.679
H1	-0.545	-0.519	-0.519	-0.519	-0.519
H2	-0.528	-0.524	-0.525	-0.525	-0.525
H3	-0.130	-0.140	-0.140	-0.140	-0.141
H4	-0.539	-0.537	-0.538	-0.538	-0.538
H5	-0.607	-0.602	-0.602	-0.602	-0.602

N2					
Tautómeros no protonados	0.027	0.030	0.030	0.030	0.030
H1	-0.003	0.066	0.066	0.066	0.066
H2	0.118	0.118	0.118	0.118	0.118
H3	0.274	0.282	0.282	0.282	0.282
H4	0.162	0.164	0.164	0.165	0.165
H5	0.040	0.039	0.039	0.039	0.039
N3					
Tautómeros no protonados	0.267	0.260	0.260	0.261	0.261
H1	0.372	0.345	0.346	0.346	0.346
H2	0.357	0.350	0.350	0.351	0.351
H3	0.036	0.028	0.030	0.030	0.031
H4	0.232	0.227	0.227	0.228	0.228
H5	0.270	0.263	0.263	0.264	0.264
O4					
Tautómeros no protonados	-0.681	-0.684	-0.683	-0.683	-0.683
H1	-0.556	-0.544	-0.543	-0.543	-0.543
H2	-0.508	-0.510	-0.509	-0.509	-0.509
H3	-0.599	-0.629	-0.628	-0.629	-0.629
H4	-0.551	-0.553	-0.553	-0.553	-0.553
H5	-0.581	-0.590	-0.588	-0.588	-0.588
N5					
Tautómeros no protonados	-0.362	-0.376	-0.371	-0.369	-0.369
H1	-0.278	-0.351	-0.346	-0.345	-0.344
H2	-0.352	-0.370	-0.365	-0.363	-0.363
H3	-0.371	-0.374	-0.369	-0.368	-0.368
H4	-0.308	-0.330	-0.320	-0.323	-0.322
H5	-0.265	-0.275	-0.271	-0.269	-0.269
C(-R)					
Tautómeros no protonados	-0.360	-0.166	-0.162	-0.160	-0.159
H1	-0.369	-0.169	-0.166	-0.163	-0.162
H2	-0.363	-0.167	-0.164	-0.161	-0.160
H3	-0.375	-0.177	-0.173	-0.170	-0.169
H4	-0.357	-0.161	-0.155	-0.155	-1.154
H5	-0.349	-0.152	-0.147	-0.147	-0.147

La Figura 10 muestra los gráficos moleculares NBO de las especies 1-5-H5. Como se puede observar no presentan cambios significativos con el incremento de los sustituyentes alquilo. Esto significa que la carga neta se preserva en el grupo $[N(O)NO]^-$. De acuerdo con la distribución de carga de los tautómeros 1-5-H5 analizados en la Tabla 7 y Figura 10, el momento dipolar (MD) fue calculado para correlacionar la distribución de carga en los NONOatos no protonados y los tautómeros protonados.

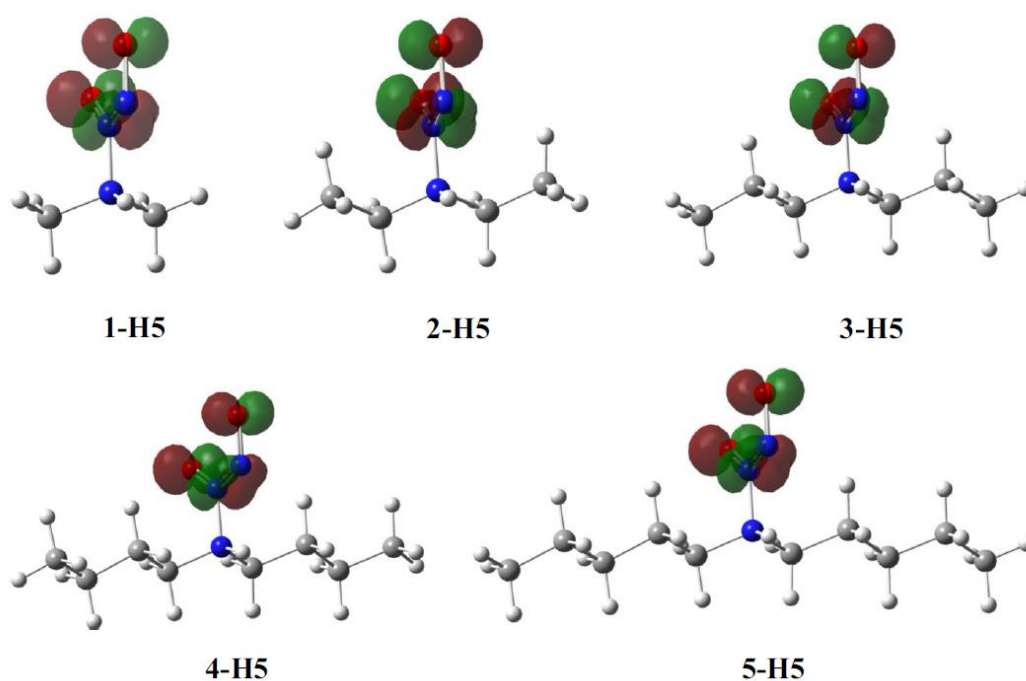


Figura 10. Gráficos moleculares NBO de los tautómeros 1-5-H5 calculados al nivel de teoría M06L/6-311++G(d,p) en solución acuosa con el método de solvatación SMD.

La Tabla 8 muestra que los valores de MD para los tautómeros 1-5-H5 son considerablemente mayores que los otros tautómeros con valores alrededor de 14.4 Debyes. Estos valores son similares a los obtenidos para las especies no protonadas 1-5. Esto puede indicar que la carga y el tamaño del sustituyente juega un papel importante en el valor del MD. El MD es significativamente mayor en un intervalo de 11.1-14.7 Debyes para las especies no protonadas y 3.6-14.5 Debyes en los tautómeros protonados cuando el tamaño del sustituyente

dialquilamino se incrementa. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 10 la distribución de carga no varía, y como consecuencia, la dirección del MD tampoco varía cuando el sustituyente se incrementa en tamaño.

6.5 Simulaciones de Dinámica Molecular

En la Figura 11 se muestra la unidad de simulación que corresponde a una caja de $20 \text{ \AA}^3$, la cual contiene al segmento S402-D608 del CNBD del hHCN1 humano, las moléculas de agua y los iones que simulan el ambiente fisiológico intracelular. Dichos componentes suman un total de $\sim 136,000$ átomos.

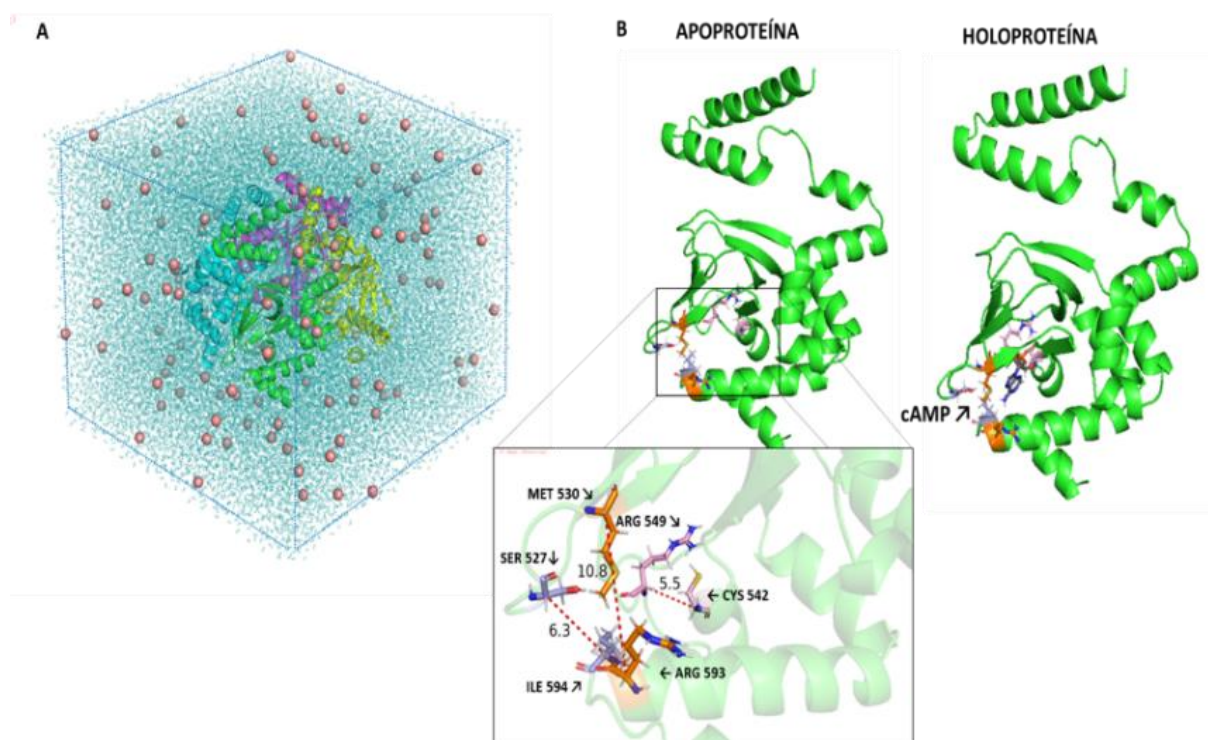


Figura 11. A) Unidad de simulación del CNBD del canal HCN, B) CNBDs de los canales HCN en condición de apoproteína (sin unión a ligante) y holoproteína (con unión al ligante). Solo se presente la cadena A del homotetrámero de CNBD estudiado. En el recuadro se muestran algunas de las distancias analizadas y asociadas con la apertura al sitio de enlace a nucleótidos cíclicos.

Las simulaciones se realizaron utilizando el programa NAMD usando un tamaño de paso de 2.0 fs. Se realizaron 250,000,000 pasos los cuales son correspondientes a un tiempo de simulación de 500 ns. Las simulaciones se realizaron en dos condiciones diferentes: apoproteína y holoproteína (cAMP y cGMP), y los datos fueron almacenados cada 10,000 pasos de simulación. Posteriormente, y como parte del análisis de las trayectorias generadas por las simulaciones, se identificaron distancias entre pares de átomos localizados en la entrada al sitio de enlace a ligantes. Dicha distancias fueron asociadas a los cambios conformacionales del CNBD, particularmente a aquellos cambios en la apertura de la cavidad que forma el bolsillo de enlace. En la Figura 12 se muestran algunas de las gráficas de distancias (eje y en Å) *versus* tiempo (eje x en ns). Como podemos observar, existe una mayor fluctuación en el movimiento asociado a la apertura del CNBD del canal hHCN1 en ausencia de ligante (apoproteína) mientras que se observa una mayor rigidez (menores fluctuaciones) en condición de holoproteína. Este comportamiento es más evidente para las distancias: Met530 (CA)-Arg593(CA) y Ser527(CA)-Ile594(CA). De manera adicional, las gráficas muestran la distribución de los valores de las mismas distancias, donde es más evidente que en presencia de los ligantes, los valores de distancias exploran un rango mayor de valores relativo al sistema apo.

Los resultados sugieren que el CNBD del canal hHCN1 experimenta movimientos caracterizados como fluctuaciones importantes en la entrada al sitio de enlace y que dichas fluctuaciones se reducen significativamente en presencia de cualquiera de los ligantes cAMP o cGMP lo cual es consistente con la literatura [49].

Por otro lado, aunque se ha observado que el movimiento de la apoproteína está caracterizado por fluctuaciones significativas localizadas en la apertura del bolsillo de unión del ligante (cAMP o cGMP) nuestro estudio actual no ha encontrado (si existen) diferencias conformacionales que sean específicas del ligante.

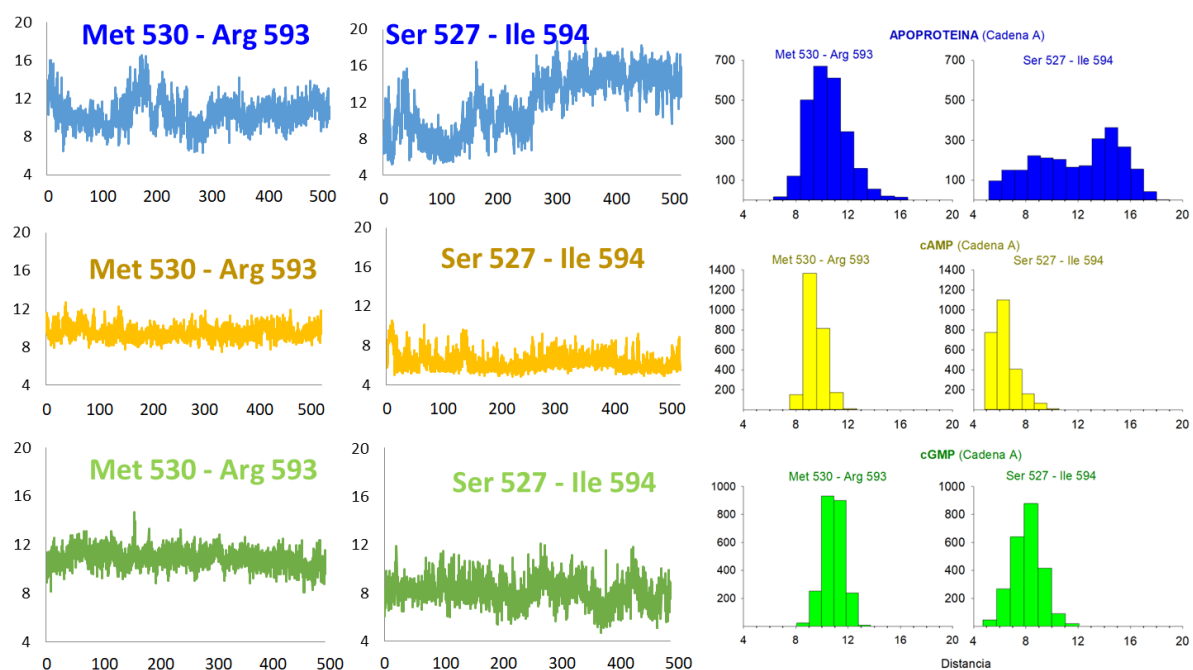


Figura 12. Gráficos del comportamiento de la cadena A del CNBD del canal HCN en tres condiciones: apoproteína y holoproteína (cAMP y cGMP).

Capítulo VI. Conclusiones

Los cálculos teóricos para la generación de NO a partir de la descomposición de compuestos diazeniumdiolatos se llevó a cabo usando el nivel de teoría M06L/6-311++G (d, p). Los compuestos en estudio se seleccionaron para evaluar el efecto del tamaño del sustituyente dialquilamino. Todos los tautómeros posibles de los compuestos se generaron por protonación. La estabilidad relativa de los tautómeros varía en fase gas y en disolución acuosa. El tautómero protonado H1 tiene la menor energía libre ΔG tanto en fase gas como en fase acuosa. Cuando es comparado con el resto de los tautómeros protonados el valor ΔG nos indica que, además de H5, todos los tautómeros protonados serían capaces de liberar el dímero de NO. Sin embargo, sus energías libres de disociación ΔG_{dis} son significativamente mayores a la correspondiente al tautómero protonado H5.

Los resultados muestran que el valor de energía libre de hidratación ΔG_{hid} de los tautómeros protonados H5 corresponden a una interacción fuerte de solvatación con el agua. Lo que permite la liberación del NO en los compuestos NONOatos de la familia diazeniumdiolatos dialquilaminos. Por lo tanto, se sugiere que la descomposición de los NONOatos para generar NO indica con el incremento en tamaño del sustituyente dialquilamino ocurre vía la protonación sobre el nitrógeno amino. Esto significa que los tautómeros protonados H5, asignados a la protonación sobre el nitrógeno amino, provocan la disociación exotérmica de los NONOatos produciendo la liberación de una amina secundaria y un dímero de NO. El análisis del mecanismo de descomposición de los NONOatos para generar NO indica que el tautómero H5 del NONOato 1 está ligeramente favorecido con la menor energía libre de disociación, sin embargo, no se observaron cambios significativos en los perfiles energéticos con el incremento de la cadena del sustituyente dialquilamino. Algunos estudios previos realizados sobre los compuestos dimetilamina diazeniumdiolato y dietilamino diazeniumdiolato (DEA/NO), reportaron resultados estructurales y del mecanismo de liberación de NO comparables con nuestros resultados.

Los valores de pK_a y NBO dieron indicios del comportamiento ácido y de las densidades de las cargas atómicas del tautómero protonado H5 de los NONOatos 1-5, involucrados directamente en el mecanismo de liberación de NO. En este contexto, es importante conocer

los detalles del mecanismo de reacción por el cual los dialquilamino NONOatos se descomponen para producir NO, ya que se ha demostrado que es una molécula señal de gran importancia para inmunología, neurobiología y cardiología. Sin embargo, son necesarias algunas mejoras para la optimización de las estructuras de estado de transición en fase gas, las cuales conducen a los productos, sugiriendo que estas estructuras se encuentran en mínimos poco profundos sobre la superficie de energía potencial con barreras de energía de descomposición pequeñas.

Los resultados obtenidos en este trabajo son valiosos para el diseño de otros compuestos donadores de la familia de los NONOatos. Una perspectiva de este trabajo es estudiar NONOatos con estructuras zwitteriónicas con aminos terminales protonados. Para ello se sugiere una investigación detallada del enlace de hidrógeno intramolecular de los diferentes tautómeros protonados como una interacción estabilizadora en solución acuosa.

Respecto al estudio de diferentes conformaciones de CNBD del canal HCN interaccionando con cAMP y cGMP a través de simulaciones de dinámica molecular para modelar el mecanismo molecular en un ambiente cercano a las condiciones del medio fisiológico se realizaron avances importantes. Considerando 500 nanosegundos de simulación de la dinámica molecular del homotetrámero del dominio C-terminal (CNBD) del canal hHCN1 humano, se puede observar que el movimiento de la apoproteína está caracterizado por fluctuaciones significativas localizadas en la apertura del bolsillo de unión del ligante. Dichas fluctuaciones se reducen significativamente en presencia de cualquiera de los ligantes, cAMP o cGMP, lo cual es consistente con observaciones previas. Como perspectivas de este trabajo se pretende identificar la existencia de diferencias conformacionales que sean específicas del ligante y posibles consecuencias estructurales para conferirles una capacidad diferenciada al modular el CNBD y, en consecuencia, la función del hHCN1. Además, estamos trabajando en la parametrización de la S-nitrosilación mencionada en la metodología de este trabajo de tesis, para identificar posibles diferencias conformacionales del CNBD del canal HCN con el ligante NO y de esta manera comparar lo observado previamente en su comportamiento con ligantes cAMP y cGMP además del ligante NO mediante simulaciones de dinámica molecular en condiciones fisiológicas relevantes.

Bibliografía

- [1] Wilson, G.; W, Garthwaite, J. Hyperpolarization-activated ion channels as targets for nitric oxide signalling in deep cerebellar nuclei. *Eur. J. Neurosci.* **2010**, 31(11), 1935-1945.
- [2] Zachary, M.; J, Zagotta, W. J. Structural insights into the mechanisms of CNBD channel function. *Gen. Physiol.* **2018**, 150 (2), 225-244.
- [3] Biel, M.; Wahl, S. C.; Michalakakis, S.; Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol. Rev.* **2009**, 89(3), 847-885.
- [4] Lee, H. C.; MacKinnon, R. Structures of the human HCN1 hyperpolarization-activated channel. *Cell.* **2017**, 168(1-2), 111-120.
- [5] Sartiani, L.; Mannaioni, G.; Masi, A.; Romanelli, M. N.; Cerbai, E. The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels: from biophysics to pharmacology of a unique family of ion channels. *Pharmacol. Rev.* **2017**, 69(4), 354-395.
- [6] Schunke, S.; Stoldt M. Structural snapshot of cyclic nucleotide binding domains from cyclic nucleotide-sensitive ion channels. *Biol. Chem.* **2013**, 394 (11), 1439-1451.
- [7] Wenker, C. I.; Benoit, P. J.; Chen, X.; Liu, H.; Horner, L. R.; Mulkey, K. D. Nitric oxide activates hypoglossal motoneurons by cGMP-dependent inhibition of TASK channels and cGMP-independent activation of HCN channels. *J. Neurophysiol.* **2012**, 107(5), 1489-1499.
- [8] Griffiths, C.; Wykes, V.; Bellamy, C. T.; Garthwaite, J. A new and simple method for delivering clamped nitric oxide concentrations in the physiological range: application to activation of guanylyl cyclase-coupled nitric oxide receptors. *J. Mol. Pharmacol.* **2003**, 64 (6), 1349-1356.
- [9] Fernández del Valle Fernández, A. Expresión de los canales de potasio HERG1 y KV 3.4 en lesiones potencialmente cancerizables y en carcinoma epidermoide de cavidad oral. Utilidad como marcador de transformación maligna y progresión de la enfermedad. **2016**, Universidad de Oviedo, España. Tesis Doctoral.
- [10] da Silva, M.P.; de Almeida Moraes, D. J.; de Souza Mecawi, A.; Rodrigues, J.A.; Varanda, W.A. Nitric oxide modulates HCN channels in magnocellular neurons of the supraoptic nucleus of rats by an s-nitrosylation-dependent mechanism. *J. Neurosci.* **2016**, 36(44), 11320-11330.
- [11] Neitz, A.; Mergia, E.; Eysel, U. T.; Koesling, D.; Mittmann, T. Presynaptic nitric oxide/cGMP facilitates glutamate release via hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **2011**, 33 (9), 1611-1621.

- [12] Kopp-Scheinpflug, C.; Pigott, B. M.; Forsythe, I. D. Nitric oxide selectively suppresses IH currents mediated by HCN1-containing channels. *J. Physiol.* **2015**, 593(7), 1685-1700.
- [13] Hrabie, J. A.; Klose, J. R.; Wink, D. A.; Keefer, L. K. New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *J. Org. Chem.* **1993**, 58(6), 1472-1476.
- [14] Miller, M. R.; Megson, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, 151(3), 305-321.
- [15] Hrabie, J. A.; Keefer, L. K. Chemistry of the nitric oxide-releasing diazeniumdiolate (“nitrosohydroxylamine”) functional group and its oxygen-substituted derivatives. *Chem. Revs.* **2002**, 102(4), 1135-1154.
- [16] Davies, K. M.; Wink, D. A.; Saavedra, J. E.; Keefer, L. K. Chemistry of the diazeniumdiolates-Kinetics and mechanism of dissociation to nitric oxide in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123(23), 5473-5481.
- [17] Taylor, D. K.; Bytheway, I.; Barton, D. H.; Bayse, C. A.; Hall, M. B. Toward the generation of NO in biological systems theoretical studies of the N2O2 grouping. *J. Org. Chem.* **1995**, 60(2), 435-444.
- [18] Dutton, A. S.; Fukuto, J. M.; Houk, K. N. The mechanism of NO formation from the decomposition of dialkylamino diazeniumdiolates: density functional theory and CBS-QB3 predictions. *Inorg. Chem.* **2004**, 43(3), 1039-1045.
- [19] Dutton, A. S.; Suhrada, C. P.; Miranda, K. M.; Wink, D. A.; Fukuto, J. M.; Houk, K. N. Mechanism of pH-dependent decomposition of monoalkylamine diazeniumdiolates to form HNO and NO, deduced from the model compound methylamine diazeniumdiolates, density functional theory, and CBS-QB3 calculations. *Inorg. Chem.* **2006**, 45(6), 2448-2456.
- [20] Shaikh, N.; Valiev, M.; Lyman, S. V. J. Decomposition of amino diazeniumdiolates (NONOates): Molecular mechanisms. *Inorg. Biochem.* **2014**, 141, 28-35.
- [21] Garthwaite, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur. J. Neurosci.* **2008**, 27(11), 2783-2802.
- [22] Beuve, A.; Wu, C.; Cui, C.; Liu, T.; Jain, M. R.; Huang, C.; Li, H. Identification of novel S-nitrosation sites in soluble guanylyl cyclase, the nitric oxide receptor. *J. Proteomics.* **2016**, 138, 40-47.
- [23] Marino, S. M.; Gladyshev, V. N. Analysis and functional prediction of reactive cysteine residues. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287(7), 4419-4425.

- [24] Chan, N. L.; Rogers, P. H.; Arnone, A. Crystal structure of the S-nitroso form of liganded human hemoglobin. *Biochem.* **1998**, 37(47), 16459-16464.
- [25] Gould, N.; Doulias, P. T.; Tenopoulou, M.; Raju, K.; Ischiropoulos, H. Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288(37), 26473-26479.
- [26] Hohenberg, P.; Kohn, W. Inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev.* **1964**, 136(3B), B864.
- [27] Becke, A. D. Perspective: Fifty years of density-functional theory in chemical physics. *J. Chem. Phys.* **2014**, 140(18), 18A301.
- [28] Zhao, Y.; Truhlar, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, 120(1-3), 215-241.
- [29] Zhao, Y.; Schultz, N. E.; Truhlar, D. G. Exchange-correlation functional with broad accuracy for metallic and nonmetallic compounds, kinetics, and noncovalent interactions. *J. Chem. Phys.* **2005**, 123.161103
- [30] Zhao, Y.; Truhlar, D. G. A new local density functional for main-group thermochemistry, transition metal bonding, thermochemical kinetics, and noncovalent interactions. *J. Chem. Phys.* **2006**, 125(19), 194101.
- [31] Boys, S. F. Electronic wave functions-I. A general method of calculation for the stationary states of any molecular system *P. Roy. Soc. A-Math Phys.* **1950**, 200 (1063), 542-554.
- [32] Pople, J. A.; Head-Gordon, M.; Fox, D. J.; Raghavachari, K.; Curtiss, L. A. Gaussian-1 theory: A general procedure for prediction of molecular energies. *J. Chem. Phys.* **1989**, 90(10), 5622-5629.
- [33] Raghavachar, K.; Binkley, J. S.; Seeger, R.; Pople, J. A. Self-consistent molecular orbital methods. Basis set for correlated wave function. *J. Chem. Phys.* **1980**, 72: 650-654.
- [34] Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J. Phys. Chem.* **2009**, 113(18), 6378-6396.

- [35] Hossain, S.; Kabedev, A.; Parrow, A.; Bergström, C.; Larsson, P. Molecular simulation as a computational pharmaceuticals tool to predict drug solubility, solubilization processes and partitioning. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, 46-55.
- [36] Harvey, D. Modern analytical chemistry. McGraw-Hill Companies, Inc. **2000**, Boston, USA.
- [37] Schlegel, H. B. Optimization of equilibrium geometries and transition structures. *J. Comput. Chem.* **1982**, B, 3(2), 214-218.
- [38] Carey, F. A. Química orgánica. **2006**. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Virginia, USA.
- [39] Jorgensen, W. L.; Briggs, J. M. A priori pKa calculations and the hydration of organic anions. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111(12), 4190-4197.
- [40] Pliego, J. R.; Riveros, J. M. Theoretical Calculation of pKa Using the Cluster–Continuum Model. *J. Phys. Chem.* **2002**, A, 106(32), 7434-7439.
- [41] Reed, A. E.; Curtiss, L. A.; Weinhold, F. Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint. *Chem. Rev.* **1988**, 88(6), 899-926.
- [42] Momany, F. A.; Rone, R. Validation of the general-purpose QUANTA® 3.2/CHARMM® force field. *J. Comput. Chem.* **1992**, 13(7), 888-900.
- [43] Horňák, V.; Dvorský, R.; Šturdík, E. Receptor-ligand interaction and molecular modelling. *Gen. Physiol. Biophys.* **1999**, 18, 231-248.
- [44] Mayne, C. G.; Muller, M.; Tajkhorshid, E. Parameterizing small molecules using the force field toolkit (fftk). **2015**, University of Illinois at Urbana-Champaign. Illinois, USA.
- [45] Gaussian 16, Revision C.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J. J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T. A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam,

J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2016**.

[46] GaussView, Version 6, Dennington, Roy; Keith, Todd A.; Millam, John M. Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, **2016**.

[47] Phillips, J. C.; Hardy, D. J., Maia, J. D., Stone, J. E., Ribeiro, J. V., Bernardi, R. C., Buch., Fiorin, G., Henin, J., Jiang, W., McGreevy, R. Melo, R. C. M.; Radak, K, B.; Skeel, D. R.; Singharoy, A.; Wang, Y.; Roux, B.; Aksimentiev, A.; Luthey-Schulten, Z.; Kale, V. R.; Schulten, K.; Chipot, C.; Tajkhorshid, E. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *Int. J. Chem. Phys.* 2020, 153(4), 044130.

[48] Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, 14(1), 33-38.

[49] Berrera, M.; Pantano, S.; Carloni, P. cAMP Modulation of the cytoplasmic domain in the HCN2 channel investigated by molecular simulations. *Biophys. J.* **2006**, 90(10), 3428-3433.



Effect of the alkyl substituent in NONOates derivatives on the reaction mechanism of NO liberation

Violeta Rangel-Galván¹ · María Eugenia Castro² · Jose Manuel Perez-Aguilar¹ · Norma A. Caballero³ · Francisco Javier Meléndez¹Received: 22 February 2019 / Accepted: 20 April 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Nitric oxide (NO) is a small biological molecule dealing with several physiological processes. NO can be obtained from different donor compounds. In this work, an analysis of the reaction mechanism for the liberation of NO from a series of NONOates: 1,1-dimethyl-3-oxotriazan-2-olate ($(\text{CH}_3)_2\text{N}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ (**1**), 1,1-diethyl-3-oxotriazan-2-olate ($(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2\text{N}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ (**2**), 1,1-dipropyl-3-oxotriazan-2-olate ($(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2\text{N}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ (**3**), 1,1-dibutyl-3-oxotriazan-2-olate ($(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2\text{N}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ (**4**) and 1,1-dipentyl-3-oxotriazan-2-olate ($(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2\text{N}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ (**5**) is carried out. M06L/6-311++G(d,p) density functional theory calculations were performed for obtaining the geometries and energies of the involved species in the mechanism. Mechanism is proposed by protonation of **1–5**, and then, their protonated tautomers are involved to obtain the intermediaries and transitions states. Tautomerization energies are found to be between 2.23 and 21.44 kcal mol⁻¹ with respect to the lowest energy tautomer **H1** in all NONOates structures. Finally, as products, the corresponding secondary amine and two molecules of NO are obtained. Geometry optimizations were carried out in aqueous solution using SMD. Current ΔG values take into account the thermochemical contributions of enthalpy and entropy at 298.15 K. The effect of substituent size on the dissociation energy barrier was analyzed finding similar values for dissociation of **1–5** NONOates. The NONOate **1** with smallest substituent has the lowest dissociation barrier of 4.78 kcal mol⁻¹ and leads to most energetically stable products. As alkyl substituent is increased in size, the value of dissociation barrier is increased in 1.5–2.0 kcal mol⁻¹ for 2–5 NONOates. Relative pK_a values and natural bond orbitals, NBO, are estimated using for the tautomers **H5** where the protonation site has the most acid behavior causing the NO generation.

Keywords NONOate derivatives · DFT methods · Tautomers · Energy profile · Dissociation energy · Relative pK_a

1 Introduction

Nitric oxide (NO) is a small biological molecule involved in a great number of physiological functions. NO carries out its biological functions through chemical reactions with a specific number of biomolecules; therefore, it is important to study in detail the molecular liberation mechanisms of NO

Published as part of the special collection of articles derived from the 11th Congress on Electronic Structure: Principles and Applications (ESPA-2018).

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00214-019-2453-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ María Eugenia Castro
mareug.castro@correo.buap.mx

✉ Francisco Javier Meléndez
francisco.melendez@correo.buap.mx

¹ Lab. de Química Teórica, Centro de Investigación, Depto. de Físicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Edif. FCQ10, 22 Sur y San Claudio, Ciudad Universitaria, Col. San Manuel, C.P. 72570, Puebla, Puebla, Mexico

² Centro de Química, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Complejo de Ciencias, ICUP, Edif. IC8, 22 Sur y San Claudio, Ciudad Universitaria, 72570 Puebla, Mexico

³ Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Edif. BIO1, 22 Sur y San Claudio, Ciudad Universitaria, 72570 Puebla, Mexico

from donor compounds. In recent studies, it is shown that NO influences over wound repairing by regulating inflammation, cell proliferation, matrix deposition, angiogenesis, and remodeling processes [1]. It has also been studied that nitrite enzymatically reacts with deoxyhemoglobin to generate NO in the red blood cells, which acts as an endocrine carrier of NO in the circulation under low-oxygen condition. This process is involved in the inhibition of development of cancer [2]. Additionally, NO is part of the vascular inflammatory treating and heart failure [3], among other important physiological functions. In the brain, NO acts as interneuronal messenger and is involved in many neuronal functions related to disorders including epilepsy, schizophrenia, drug addiction, anxiety, major depression [4].

The amine-based *N*-diazoniumdiolates are extensively used as NO donors, and their biological and pharmaceutical roles have been widely studied as useful pharmaceutical tools due to their wide experimental half-lives [5]. These compounds have a general structure $X-[N(O)NO]$, with amino moieties like $X=RRN$ (called NONOates) being extensively studied because of their ability to release NO in neutral media at biological level [6]. Experimentally, it is known that diazeniumdiolate in basic solutions is neutralized or acidified for giving decomposition to the amine and NO. Experimentally, Keefer et al. [7] evaluated the substitution dependency on the decomposition of diazeniumdiolates. They determined possible intermediates along the path, suggesting the protonation on the amine nitrogen at physiological pH as the most probable mechanism for decomposition and measured pK_a values for dialkylamino diazeniumdiolates [7, 8]. However, the complete molecular mechanisms for NO liberation from NONOates donors are not fully known.

From theoretical point of view, *ab initio* methods [9] and density functional theory calculations have been used to explore the NONOates decomposition for NO liberation [10–12]. Hall et al. [9] proposed a reaction mechanism for NO liberation using HF/6-31G(d) and MP2/6-31G(d) theory levels, where the protonation sites were the oxygen atoms at $[N(O)NO]^-$ moiety of substituted diazeniumdiolates. However, in this proposal a second protonation on the amino nitrogen was necessary for NO release from protonated NO dimer. Later, Dutton et al. explored the mechanism for NO liberation from dialkylamino diazeniumdiolates using B3LYP/6-311+G(d) and CBS-QB3 theory levels. They obtained optimized geometries and thermodynamic properties (i.e., enthalpies and free energies for 298 K) using PCM model for aqueous solvation. Relative pK_a values were obtained for protonated species of diazeniumdiolates using their relation with ΔG_{aq} parameter. The measured pK_a of 4.5 for diethylamino diazeniumdiolate (DEA/NO) was used for the least acidic tautomer, and then, the other tautomers were relative to it. pK_a estimation and NBO analysis showed the oxygen in $[N(O)NO]^-$ moiety are the most basic sites

on dimethylamino diazeniumdiolate, while the protonation on the amino nitrogen leads to spontaneous dissociation to the amine and the NO dimer [10]. In a subsequent work, isopropylamino diazeniumdiolate (IPA/NO) was studied for its pH-dependent decomposition. Authors predicted the production NO at lower pH upon protonation of the amine nitrogen from fragmentation of the amide/NO adduct using B3LYP/6-311+G(d) and CBS-QB3 theory levels with PCM and CPCM solvation models. This mechanism involved the HNO production from protonation of the terminal oxygen at the $[N(O)NO]^-$ group, the most basic site, and NO results from double protonation process [11]. Dealing with decomposition molecular mechanisms of NONOates, Shaikh et al. reported a study about spectroscopic, kinetic, and computational approaches of the NO liberation from amino diazeniumdiolates. A computed energy profile for the NO liberation from DEA/NO using B3LYP/6-31+G(d) theory level was presented in aqueous environment evaluated with COSMO model. Also, the mechanism was proposed as pH-dependent via tautomerization of protonated NONOates, with pK_a predicted to be 4.6 for DEA/NO and -2.7 for protonated tautomer on amine nitrogen, obtaining the amine and NO as products. Authors reported kinetic parameters for decomposition of amino NONOates for supporting the proposed mechanism, concluding that the rate determining step involves the cleavage N–N single bond for liberation of NO dimer [12].

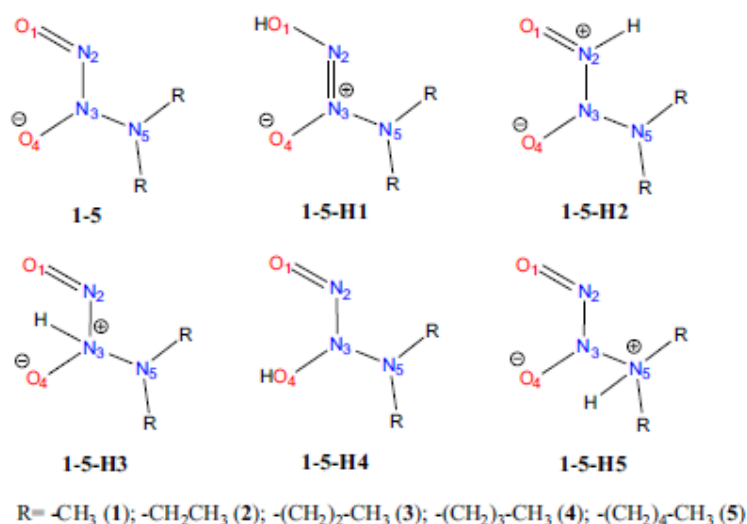
In the present work, the effect of the dialkyl substituent in NONOates on the reaction mechanism of NO liberation is evaluated by M06L/6-311++G(d,p) theory level. Complete energy profiles, NBO analysis, and predicted pK_a values are presented for giving insights of reactive sites involved in the NO liberation mechanism.

2 Methodology

2.1 Computational chemistry

Calculations were carried out by density functional theory with M06L functional [13] and 6-311++G(d,p) [14] basis set. All possible protonated tautomers were obtained for NONOates 1–5, see Fig. 1. **H5** is directly involved in the reaction path. Geometry optimization of reactants, intermediates, transition states, and products was obtained in aqueous solution using solvation model density (SMD) [15]. Harmonic vibrational frequency calculations were computed using the same level of theory for all the stationary points to ensure their assignment of local minima and transition states. Analysis of natural bond orbital, NBO [16], was carried out on the NONOates 1–5 and their protonated tautomers at the same theory level using SMD in aqueous solution. pK_a values were estimated using the Pliego and Riveros

Fig. 1 Structures of NONOates **1–5** and their protonated tautomers **H1–H5**



methodology [17] for the tautomers **1–5–H5**. All electronic structure calculations were performed using Gaussian16 program [18].

3 Results and discussion

3.1 Tautomers

Figure 2 presents the molecular structures for the optimized geometries of NONOates **1–5**. Non-protonated structures **1–5** are anionic structures with Z position for [N(O)NO][−] moiety. The strong preference for the Z isomers of the dialkylamino diazeniumdiolate species has already been

studied in previous theoretical studies [9–12]. Five tautomers were generated in the five possible protonation sites indicated in Fig. 1. Protonation on oxygen atoms in [N(O)NO][−] moiety generates the tautomers **H1** and **H4**, while protonation on the nitrogen atoms produces the tautomers **H2** and **H3**. Protonation on the amino nitrogen generates the tautomer **H5**, which is used for NO liberation mechanism.

Table 1 summarizes the selected bond lengths for NONOates **1–5** and their protonated tautomers **H1–H5** in M06L/6-311++G(d,p) theory level in aqueous solvation with SMD. It can be observed the O1–N2 is increased from non-protonated NONOates to their corresponding tautomer **H1** while for **H2–H5** tautomers decreases. For N2–N3, a significant increase is observed for tautomer

Fig. 2 Molecular structures for NONOates **1–5** calculated at M06L/6-311++G(d,p) level of theory with SMD in water

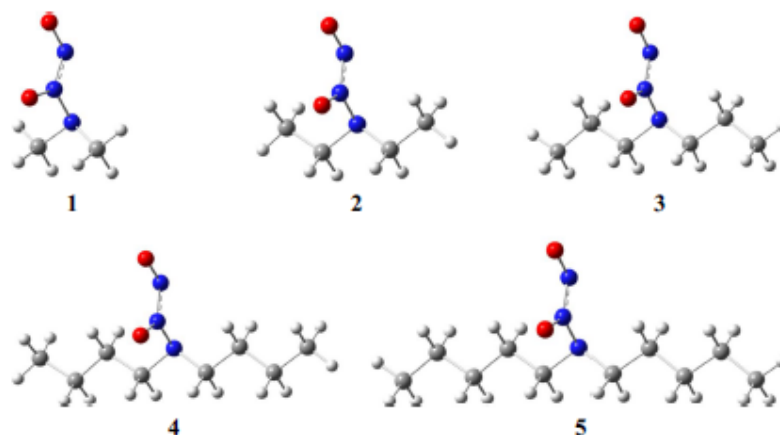


Table 1 Selected bond lengths (in Å) of NONOates **1–5** and their protonated tautomers **H1–H5** calculated at M06L/6-311++G(d,p) level of theory with SMD in water

	1	2	3	4	5
O1–N2					
Non-protonated	1.285	1.285	1.285	1.285	1.285
H1	1.368	1.355	1.355	1.355	1.355
H2	1.250	1.250	1.250	1.250	1.250
H3	1.139	1.141	1.141	1.141	1.241
H4	1.252	1.252	1.252	1.253	1.253
H5	1.267	1.266	1.266	1.266	1.266
N2–N3					
Non-protonated	1.305	1.306	1.306	1.306	1.306
H1	1.290	1.281	1.281	1.281	1.281
H2	1.305	1.306	1.306	1.306	1.306
H3	1.999	1.960	1.961	1.960	1.958
H4	1.301	1.302	1.302	1.302	1.302
H5	1.315	1.316	1.316	1.316	1.316
N3–O4					
Non-protonated	1.290	1.290	1.290	1.290	1.290
H1	1.260	1.259	1.259	1.259	1.259
H2	1.245	1.246	1.246	1.245	1.245
H3	1.269	1.284	1.284	1.284	1.284
H4	1.395	1.395	1.395	1.395	1.395
H5	1.259	1.261	1.261	1.261	1.261
N3–N5					
Non-protonated	1.290	1.431	1.432	1.433	1.432
H1	1.396	1.433	1.433	1.433	1.433
H2	1.436	1.432	1.434	1.434	1.434
H3	1.454	1.447	1.447	1.448	1.448
H4	1.368	1.365	1.366	1.366	1.366
H5	1.492	1.481	1.484	1.483	1.483

Numerical convention is used as Fig. 1

H3 (1.96–1.99 Å) while the rest of tautomers keep up a value about 1.28–1.31 Å close to that in non-protonated NONOates. Also, N3–O4 is only increased for tautomer **H4** (1.39 Å) from non-protonated NONOates, while the others maintain a value close to non-protonated NONOates (1.25–1.29 Å). For N3–N5, a slight increase is observed for protonated tautomers from non-protonated specie except for tautomer **H4**. In this case, it is relevant to underline that for non-protonated NONOate **1** and its tautomer **H1**, the distance N3–N5 is smaller than the rest of NONOates **2–5**. Bond length N3–N5 was previously reported as 1.491 Å at B3LYP/6-311+G(d) [10] for tautomer **1-H5** and 1.51 Å and B3LYP/6-31+G(d) [12] for **2-H5**, and both values are in agreement with our results. In general, according to Table 1, it can be observed that the values of bond lengths are kept up as the dialkylamino substituent is increased for NONOates **1–5**.

Table 2 Selected angles (in °) of NONOates **1–5** and their protonated tautomers **H1–H5** calculated at M06L/6-311++G(d,p) level of theory with SMD in water

	1	2	3	4	5
O1–N2–N3					
Non-protonated	113.72	113.60	113.67	113.64	113.66
H1	109.72	110.34	110.35	110.33	110.36
H2	122.93	123.00	122.99	123.00	123.00
H3	98.83	101.79	101.76	101.80	101.88
H4	113.26	113.22	113.22	113.20	113.21
H5	113.20	113.06	113.08	113.10	113.10
N2–N3–O4					
Non-protonated	126.29	126.01	126.09	126.08	126.08
H1	123.92	124.56	124.55	124.53	124.53
H2	122.41	122.28	122.32	122.34	122.33
H3	101.74	104.81	104.84	104.89	104.98
H4	119.97	119.77	119.77	119.75	119.76
H5	132.14	131.56	131.64	131.68	131.67
N5–N3–O4					
Non-protonated	120.35	120.33	120.33	120.28	120.32
H1	118.72	122.31	122.33	122.34	122.35
H2	124.83	124.92	124.92	124.92	124.92
H3	117.02	120.99	120.99	120.96	120.93
H4	118.39	118.39	118.41	118.41	118.42
H5	117.57	117.51	117.50	117.48	117.48
O1–N2–N3–O4					
Non-protonated	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00
H1	2.83	0.08	0.00	0.00	0.01
H2	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00
H3	1.11	5.22	−5.02	−4.69	4.63
H4	0.31	0.14	0.39	0.47	0.38
H5	−0.23	0.01	0.00	0.02	0.00
O1–N2–N3–N5					
Non-protonated	−179.99	179.83	179.99	179.98	−179.99
H1	−172.81	−179.73	179.98	179.99	−179.95
H2	−179.85	−179.99	179.99	179.98	−179.99
H3	−119.94	135.96	−135.73	−135.35	135.23
H4	179.54	179.60	178.71	178.45	178.71
H5	−179.66	−179.98	179.99	179.96	179.99

Numerical convention is used as Fig. 1

With respect to bond angles, in Table 2, the value of angle O1–N2–N3 was kept up for tautomers **H1**, **H4**, and **H5**, while for **H3** decreased in about 10°. Also, an increase about 10° was observed for **H2** in all NONOates. On the other hand, for N2–N3–O4 a decrease is observed for **H3**,

while an increase is found for **H5**. For N5–N3–O4, values are kept up around the value of 120° of non-protonated species. Similar values for angles O1–N2–N3, N2–N3–O4, and N5–N3–O4 were reported by tautomers of NONOate **1** and **2** in references [10, 12], respectively.

For dihedral angle O1–N2–N3–O4, it is observed that all tautomers for NONOates **1–5** prefer the Z conformation for [N(O)NO][−] group. Only, slight deviations are observed for tautomer **H3**. For O1–N2–N3–N5, the tautomer **H3** suffers significant deviation for the conformation of dialkylamino substituent with respect to [N(O)NO][−] group, while the rest of the tautomers maintain the atoms of the [N(O)NO][−] group coplanar with amine nitrogen of the dialkylamino substituent (values in reality of 180°), see Table 2. Details of optimized structures are given in the SM in Table S1.

The optimized non-protonated NONOates in gas phase are predicted to be relative electronic energies $\Delta E_g = 68.0\text{--}71.0$ kcal mol^{−1} and relative free energies $\Delta G_g = 64.0\text{--}66.0$ kcal mol^{−1} higher than those calculated with SMD solvation in water (as present in Fig. 2). However, the tautomers **H1–H5** have only $\Delta E_g = 4.3\text{--}25.0$ kcal mol^{−1} and $\Delta G_g = 4.0\text{--}23.0$ kcal mol^{−1} with respect to optimized geometries in SMD. Relative free energies in gas phase and aqueous solvation free energies are shown in Table 3. Detailed values for energies are summarized in Table S2. In general, the tautomerization free energies are endergonic in water. Optimization in water predicts tautomer **H1** is the most energetically favorable, closely followed by tautomers **H4** and **H5** for the five NONOates. Considerable stabilization is observed when the aqueous solvent effect is taken into account including the thermochemical contributions of enthalpy and entropy at 298.15 K for change of standard state at 1 bar pressure and 1 M concentration. The relative free energies follow the trend **H1** < **H4** < **H2** < **H3** < **H5** in gas phase and **H1** < **H4** < **H5** < **H2** < **H3** in aqueous solution using SMD. This last trend is similar to that reported previously for dimethylamino diazeniumdiolate in Ref. [10] using CBS-QB3 with PCM model and for DEA/NO reported in Ref. [12] using B3LYP/6-31+G(d) with COSMO model for solvation. The great stabilization of **H5** tautomer in the five NONOates with SMD solvation could be attributed to the disposition for the spontaneous dissociation in gas phase observed in protonated amino diazeniumdiolates as it was obtained in previous study using B3LYP functional [10]. In our case, using M06L/6-311++G(d,p) theory level, although the fully optimization in gas phase does not lead to the dissociation of NO dimer, a lengthening of the bond distance N3–N5 (1.528, 1.534, 1.530, 1.554, and 1.517 Å) is observed with respect to their corresponding bond lengths in solution phase (1.492, 1.481, 1.484, 1.483, and 1.483 Å), see Table 3. Values of hydration free energies, calculated as $\Delta G_{\text{hyd}} = G_s - G_g$, where s indicates solution phase and g indicates gas phase, show higher negative values for

Table 3 Calculated ΔG (in kcal mol^{−1}) of NONOates **1–5** and their protonated tautomers **H1–H5** at M06L/6-311++G(d,p) level of theory in gas phase and SMD in water

NONOate	ΔG_{gas}	ΔG_{SMD}	ΔG_{hyd}
1	347.23	283.04	−64.19
1-H1	0.00	0.00	0.00
1-H2	15.97	10.81	−5.15
1-H3	20.22	19.37	−0.84
1-H4	4.89	3.54	−1.34
1-H5	27.00	9.45	−17.55
2	343.85	281.02	−62.82
2-H1	0.00	0.00	0.00
2-H2	13.33	8.37	−4.95
2-H3	22.63	20.35	−2.27
2-H4	2.27	2.23	−0.04
2-H5	25.26	5.56	−19.69
3	343.04	281.33	−61.70
3-H1	0.00	0.00	0.00
3-H2	13.15	8.71	−4.43
3-H3	21.90	20.73	−1.16
3-H4	2.08	2.47	0.39
3-H5	22.58	6.04	−16.53
4	342.67	281.41	−61.26
4-H1	0.00	0.00	0.00
4-H2	13.04	8.87	−4.17
4-H3	22.14	21.11	−1.02
4-H4	2.13	2.82	0.69
4-H5	21.83	6.22	−15.61
5	342.29	281.79	−60.50
5-H1	0.00	0.00	0.00
5-H2	12.92	8.97	−3.95
5-H3	21.98	21.44	−0.54
5-H4	2.14	2.57	0.42
5-H5	22.68	5.91	−16.77

non-protonated species, followed by tautomers **H5**. ΔG_{hyd} can be used as a measurement of the interaction between the solute with the solvent. In this case, negative values of ΔG_{hyd} correspond to a strong interaction between the compound with the water molecules for tautomer **H5**, which is proposed as the more labile reactant for liberation NO mechanism.

3.2 Reaction mechanisms

Upon optimization in gas phase of minima structures of tautomers **H1–H5** of NONOates **1–5**, spontaneous dissociation does not occur; however, transition states (TS) and intermediary structures (Int) in the path are directly dissociated to the amine and the NO dimer. In order to obtain the ΔG_{SMD} , all necessary thermodynamic contributions were taken into

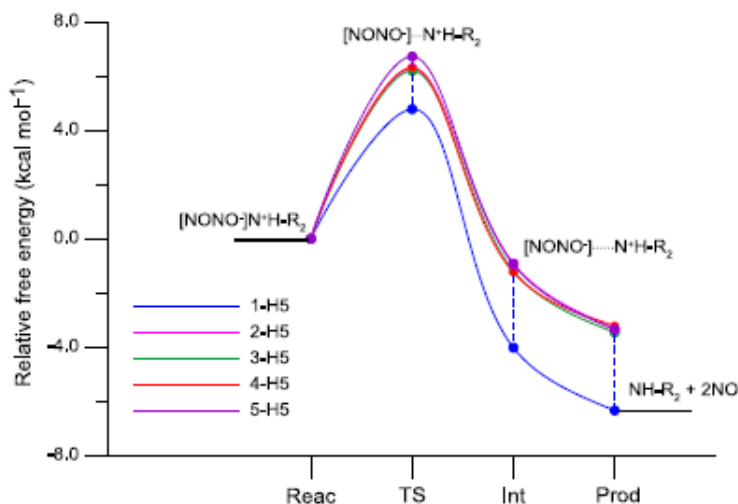
account to perform calculations in gas phase from fully optimized geometries at M06L/6-311++G(d,p) theory level with SMD in water as single-point calculations. The presence of single imaginary vibrational mode in each transition state structure was verified through frequency calculations at same level of theory with SMD. Table 4 collects the relative

Table 4 Free energy values, ΔG (in kcal mol⁻¹) of species involved in the reaction mechanism of liberation of NO from tautomers 1–5-H5 calculated at M06L/6-311++G(d,p) level of theory with SMD in water

NONOate	ΔG_{dis}	ΔG_{hyd}
1-H5	0.00	0.00
TS1-H5	4.78	17.66
Int1-H5	-4.01	26.77
Amine1 + 2NO	-6.33	28.47
2-H5	0.00	0.00
TS2-H5	6.29	18.28
Int2-H5	-0.90	26.63
Amine2 + 2NO	-3.29	27.38
3-H5	0.00	0.00
TS3-H5	6.20	18.12
Int3-H5	-1.18	26.36
Amine3 + 2NO	-3.45	27.11
4-H5	0.00	0.00
TS4-H5	6.31	18.88
Int4-H5	-1.23	26.24
Amine4 + 2NO	-3.19	27.31
5-H5	0.00	0.00
TS5-H5	6.72	19.31
Int5-H5	-0.94	26.54
Amine5 + 2NO	-3.35	27.43

free energies for the species involved in the reaction mechanism of NO liberation from tautomers H5 of each NONOate in aqueous solvation. Dissociation barriers for tautomers H5 via TS 1–5-H5 are found at 4.8–6.7 kcal mol⁻¹. A slight increase in the ΔG_{dis} for dissociation is observed when dialkylamino substituent is increased in size. The general behavior of energy profiles for decomposition of tautomers 1–5-H5 can be observed in Fig. 3. Tautomer 1-H5 was predicted to provide the smallest barrier to N3–N5 cleavage as reaction coordinate in the exothermic dissociation to the products, obtaining the most energetically stable products as amine 1 and two NO molecules. For tautomers 1–4-H5, when dialkylamino substituent is increased, the energy barrier is slightly affected. The energy barriers for decomposition of TS 1–5-H5 of tautomers H1–H4 differ by only 1.5 kcal mol⁻¹. These results indicate that tautomers H1–H5 possess similar energetic profiles and would be expected to decompose at similar rates even though the alkyl substituent is increased. The transition states found for the decomposition of tautomer H5 of DEA/NO has been reported as 17.8 kcal mol⁻¹ in Ref. [12], which value is very higher compared to our value of 6.29 kcal mol⁻¹. However, the structure for TS2-H5 is found to be similar geometry with a value for N3–N5 of 1.89 Å and $\nu(\text{N3–N5 stretching}) = 1461$, cm⁻¹ [12] in comparison with our value of N3–N5 = 1.882 Å and $\nu(\text{N3–N5 stretching}) = 2861$, cm⁻¹. It can be attributed to the different methodologies used. Details of optimized structures and computed energies of species involved in decomposition mechanism are given in Tables S1 and S2. The values for dissociation barriers are consistent for all NONOates calculated. The energy profiles illustrating the decomposition of tautomers 1-H5 and 5-H5 for the formation of their corresponding secondary amines 1 and 5 and

Fig. 3 General scheme of energy profiles for decomposition of tautomers 1–5-H5 for the liberation of NO calculated at M06L/6-311++G(d,p) level of theory. Reac refers reactant, TS is transition state, Int is intermediary, and Prod refers product



liberation of NO are shown in Fig. 4. The energy profiles for tautomers **2–4-H5** are illustrated in Fig. S1.

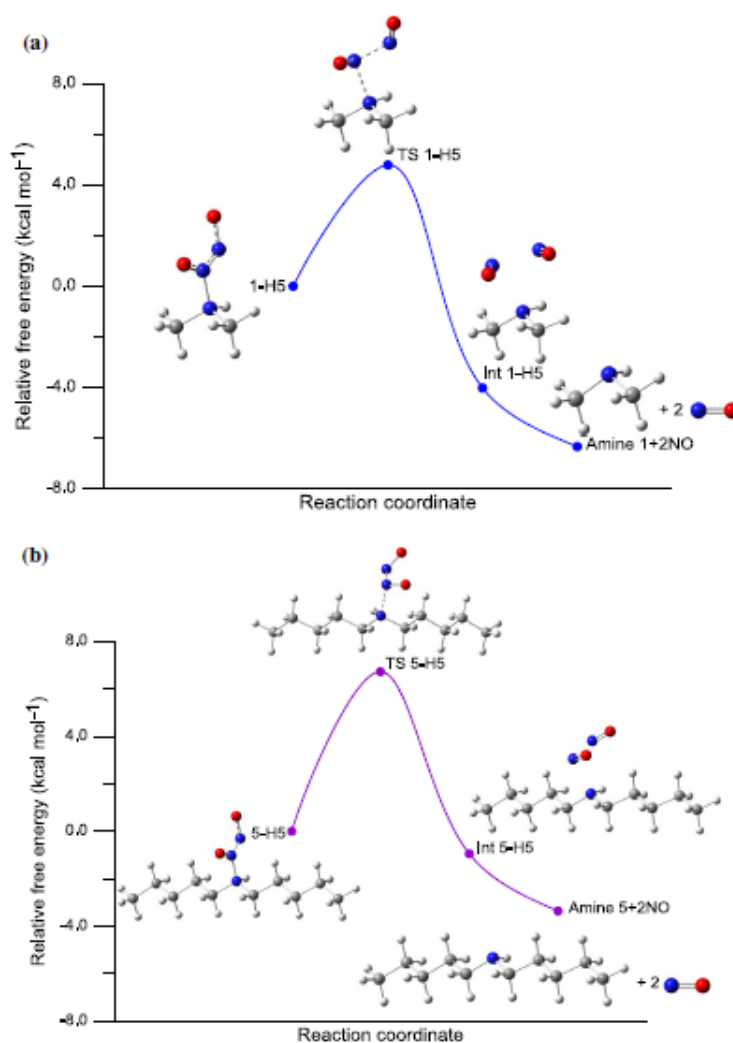
3.3 pK_a calculations and NBO analysis

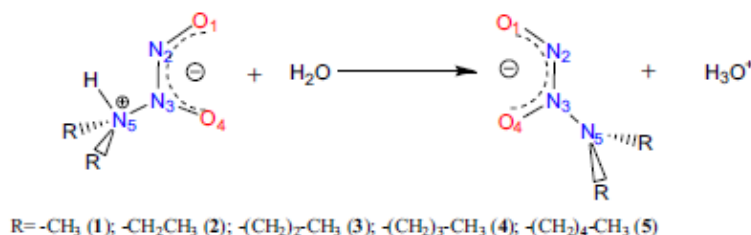
As it has been mentioned, the tautomeric species **1–5-H5** are the direct participants in NONOates decomposition. Therefore, estimated pK_a values were calculated from tautomers **H5** and their corresponding non-protonated species **1–5**. The loss of proton from NONOates **1–5-H5** produces to five different non-protonated species according to the following Scheme 1.

Table 5 summarizes the values of relative free energies in gas phase and the solvation free energies for tautomers **1–5-H5** and their non-protonated species **1–5** using M06L/6-311++G(d,p) level of theory. The results show that tautomer **5-H5** with the largest substituent is more stable than tautomer **1-H5** at -314.3 Hartrees. For non-protonated NONOates, **5** is $3.20 \text{ kcal mol}^{-1}$ more stable than **1**.

The theoretical pK_a values were obtained with the objective to get insights about adequate physiological conditions to proton loss when the liberation of $[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ groups is carried out. Estimated pK_a values were found based on the thermodynamic relations proposed by Pliego and Riveros

Fig. 4 Energy profile illustrating the decomposition of tautomer **a 1-H5** and **b 5-H5** for the formation the corresponding secondary amine and liberation of NO calculated at M06L/6-311++G(d,p) level of theory



Scheme 1 Formation of non-protonated species from NONOates **1–5-H5****Table 5** Relative free energy values in gas phase (G°_g) (in Hartrees) and solvation free energy values (ΔG°_s) (in kcal mol⁻¹) for tautomers **1–5-H5** and non-protonated species **1–5** involved in the reaction mechanism of liberation of NO calculated at M06L/6-311++G(d,p) level of theory

NONOate	G°_g	ΔG°_s	NONOate	G°_g	ΔG°_s
1-H5	0.00	-32.08	1	0.00	-69.53
2-H5	-78.59	-31.97	2	-78.59	-68.73
3-H5	-157.18	-31.48	3	-157.18	-67.60
4-H5	-235.76	-31.00	4	-235.76	-67.02
5-H5	-314.34	-30.58	5	-314.34	-66.33

Table 6 Solvation free energy ($\Delta\Delta G^\circ_s$) (in kcal mol⁻¹) and theoretical pK_a of tautomers **1–5-H5** involved in the reaction mechanism of NO liberation calculated at M06L/6-311++G(d,p) level of theory

NONOate	$\Delta\Delta G^\circ_s$ (kcal mol ⁻¹)	pK_a
1-H5 → 1	-177.65	-6.2
2-H5 → 2	-171.96	-1.8
3-H5 → 3	-168.32	0.5
4-H5 → 4	-164.22	3.4
5-H5 → 5	-160.65	5.6

[17] and following the acid–base theory according to Scheme 1. The equation used for estimating pK_a value is:

$$pK_a = \frac{\Delta G^\circ_{sol}}{1.364} - \log [H_2O]$$

where ΔG°_{sol} is the difference of free energy between the species in aqueous solution, which is related to equation $\Delta\Delta G^\circ_{sol} = \Delta G^\circ_{solA^-} + \Delta G^\circ_{solH_3O^+} - \Delta G^\circ_{solHA} - \Delta G^\circ_{solH_2O}$. The solvation free energies of neutral species and their corresponding conjugated species as well as the water molecules were calculated using SMD model. For minimizing the calculation error in the computed pK_a , the experimental value of the free energy solvation for ion H_3O^+ of -110.2 kcal mol⁻¹ was used, as it was suggested by Pliego and Riveros [17].

Table 6 shows the calculated pK_a of NONOates **1–5-H5**. Deprotonation of -NH group is associated with the pK_a values in ascending order. It means as the alkyl substituent is increased, a change in the pK_a value is observed from negative to positive values. Also, it is important to observe that deprotonation of N5 atom is favored in aqueous solution when the alkyl substituent is increased.

Previous theoretical pK_a estimations have been carried out using the relation $pK_a = -0.74(\Delta\Delta G^\circ_{aq}) + 4.5$ for *N*-protonated dimethylamino diazeniumdiolate with $pK_a = -8.9$ relative to 4.5 of the least acidic tautomer of DEA/NO. In this case, authors used the experimental pK_a of 4.5 of the DEA/NO, which is not that of the reactive site leading to

decomposition. However, in their study these authors indicated that longer half-lives for NO production could arise by lowering pK_a of the amino nitrogen when the basic sites in the substituents are protonated [10]. Using the same approach, the pK_a value for DEA/NO was theoretically estimated as 4.6 and the *N*-protonated DEA/NO tautomer was estimated as -2.7 [12]. The pK_a predicted for IPA/NO was of 4.0 [11] using the method of Pliego and Riveros [13].

The natural bond orbital, NBO, analysis was realized on the tautomers **1–5-H5** for determining the electrostatic and bonding properties of these protonated species. Partial atomic charges of the atoms of [N(O)NO]⁺ moiety from NBO analysis are summarized in Table 7. In general, similar values of atomic charges are obtained for the NONOates when the substituent is increased.

Partial atomic charges were previously reported [10] for [N(O)NO]⁺ group using NBO analysis obtaining similar values (-0.60, 0.00, 0.26, -0.68, and -0.37) to the reported in Table 5 (-0.68, 0.02, 0.267, -0.681, and -0.36) for non-protonated NONOate **1**.

Figure 5 illustrates the NBO molecular graphs, as it can be observed no significant change is obtained with the increases in substituent. It means net charge is preserved in [N(O)NO]⁺ group.

According to the charge distribution of the tautomers **1–5-H5** analyzed in Table 7 and Fig. 5, dipole moment (DM) was calculated to correlate the charge distribution in the non-protonated NONOates and protonated tautomers. Table 8 shows that DM values for tautomers **1–5-H5** are considerably larger than the other tautomers with values

Table 7 Natural bond orbitals (NBO) of NONOates **1–5** and their protonated tautomers **H1–H5** calculated at M06L/6-311++G(d,p) level of theory in SMD in water

	1	2	3	4	5
O1					
Non-protonated	−0.682	−0.679	−0.679	−0.679	−0.679
H1	−0.545	−0.519	−0.519	−0.519	−0.519
H2	−0.528	−0.524	−0.525	−0.525	−0.525
H3	−0.130	−0.140	−0.140	−0.140	−0.141
H4	−0.539	−0.537	−0.538	−0.538	−0.538
H5	−0.607	−0.602	−0.602	−0.602	−0.602
N2					
Non-protonated	0.027	0.030	0.030	0.030	0.030
H1	−0.003	0.066	0.066	0.066	0.066
H2	0.118	0.118	0.118	0.118	0.118
H3	0.274	0.282	0.282	0.282	0.282
H4	0.162	0.164	0.164	0.165	0.165
H5	0.040	0.039	0.039	0.039	0.039
N3					
Non-protonated	0.267	0.260	0.260	0.261	0.261
H1	0.372	0.345	0.346	0.346	0.346
H2	0.357	0.350	0.350	0.351	0.351
H3	0.036	0.028	0.030	0.030	0.031
H4	0.232	0.227	0.227	0.228	0.228
H5	0.270	0.263	0.263	0.264	0.264
O4					
Non-protonated	−0.681	−0.684	−0.683	−0.683	−0.683
H1	−0.556	−0.544	−0.543	−0.543	−0.543
H2	−0.508	−0.510	−0.509	−0.509	−0.509
H3	−0.599	−0.629	−0.628	−0.629	−0.629
H4	−0.551	−0.553	−0.553	−0.553	−0.553
H5	−0.581	−0.590	−0.588	−0.588	−0.588
N5					
Non-protonated	−0.362	−0.376	−0.371	−0.369	−0.369
H1	−0.278	−0.351	−0.346	−0.345	−0.344
H2	−0.352	−0.370	−0.365	−0.363	−0.363
H3	−0.371	−0.374	−0.369	−0.368	−0.368
H4	−0.308	−0.330	−0.320	−0.323	−0.322
H5	−0.265	−0.275	−0.271	−0.269	−0.269
C(−R)					
Non-protonated	−0.360	−0.166	−0.162	−0.160	−0.159
H1	−0.369	−0.169	−0.166	−0.163	−0.162
H2	−0.363	−0.167	−0.164	−0.161	−0.160
H3	−0.375	−0.177	−0.173	−0.170	−0.169
	−0.366	−0.169	−0.166	−0.163	−0.163
H4	−0.357	−0.161	−0.158	−0.155	−0.154
H5	−0.349	−0.152	−0.151	−0.147	−0.147

around 14.4 Debyes being similar to non-protonated species. It could indicate that charge and the substituent size play an important role in the DM value. DM is significantly

increased when the size of dialkyl substituent increases of 11.1–14.7 Debyes in non-protonated species and 3.6–14.5 in the protonated tautomers. However, as it can be observed in Fig. 5 the charge distribution does not vary and, as a consequence, the DM direction either when substituent is increased.

Our calculations suggest a mechanism of decomposition via the direct protonation of the amine nitrogen as in early experimental [8] and theoretical [10–12] studies has suggested. Our calculations indicate slight variation in the dissociation barrier through the protonation of the amino nitrogen, tautomer **H5**, leading to decomposition for dialkylamino diazeniumdiolates when the dialkylamino substituent increases its size. Although NONOates can be protonated in five possible protonation sites, the NO liberation only occurs favorably and directly from tautomer **H5**. NONOates with substituents that contain terminal amines are currently being studied in more detail in order to study the effect of substituents with different chemical properties and size.

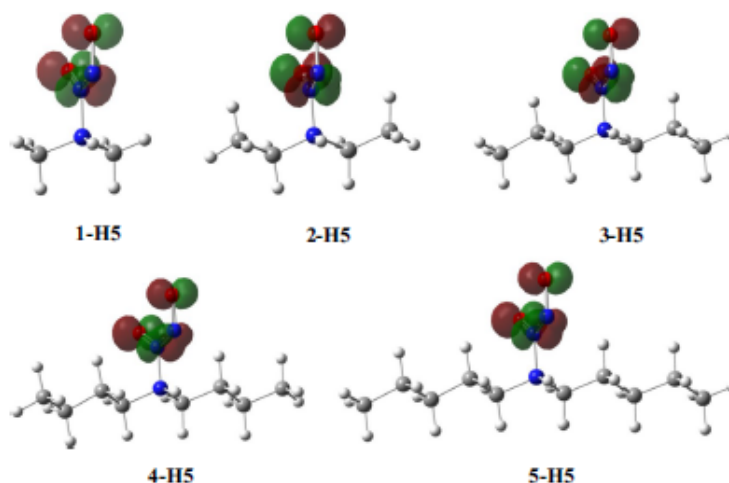
4 Conclusions

The theoretical studies for NO generation from diazeniumdiolate decomposition was performed using M06L/6-311++G(d,p) density functional theory calculations. The dialkylamino species were selected for increasing the substituent size, and all possible tautomers were generated by protonation. The relative stability of the tautomers varies in the gas phase and in aqueous solution.

The results suggest that the decomposition of dialkylamino diazeniumdiolates for NO generation with alkyl substituents increasing its size occurs via protonation on the amino nitrogen. It means the tautomers **H5**, assigned to the protonation on the amino nitrogen, provoke the exothermic dissociation of NONOates to corresponding secondary amine and NO dimer. The analysis of the mechanism of decomposition of NONOates to generate NO indicates that tautomer **H5** of NONOate **1** is slightly favored with the smallest free energy dissociation; however, no significant changes are found with the increase in the dialkylamino substituent chain. Previous studies were performed on dimethylamino diazeniumdiolate and diethylamino diazeniumdiolate (DEA/NO), which are in agreement with our structural and mechanistic results. The pK_a and NBO values provide insight into acid behavior and the atomic charge densities for tautomer **H5** of NONOates **1–5**.

In this context, it is important to know the mechanistic details by which dialkylamine NONOates are decomposed to produce NO, because it has demonstrated to be a signaling molecule of great importance for immunology, neurobiology, and cardiology. Improvements are necessary to

Fig. 5 NBO molecular graphs of tautomers **1–5**–**H5** calculated at M06L/6-311++G(d,p) level of theory in SMD in water



optimize the transition structures in gas phase which led to the products, suggesting these structures lay in shallow minima on the PES with small decomposition barriers. It should be attempted for dealing with other further strategies for calculation. The results obtained in this work should be of value for the design of other NONOates donors of NO. NONOates with zwitterionic structures with protonated terminal amines are currently being studied in more detail. We suggest further investigation about the intramolecular hydrogen bond of the different protonated tautomers as a stabilizing interaction in the aqueous solvation. Also, an important perspective of our research group is the study of different conformations of CNBD of HCN channel interacting with NO through dynamic molecular simulations for modeling the molecular mechanism close to the physiological medium conditions.

5 Supplementary material

Cartesian coordinates and energies of the different compounds optimized at the M06L/6-311++G(d,p) level of theory and energy profile for decomposition of tautomers H5.

Acknowledgements VRG thanks CONACYT-México for financial support (PhD fellowship No. 286497). Authors thank the Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS-BUAP) of the CONACYT network of national laboratories, for the computer resources and support provided. Authors thank to VIEP-BUAP for the financial support, project: 100256733-VIEP2019, as well as the PRODEP Academic Group BUAP-CA-263 (SEP, Mexico).

References

1. Vimalraj S, Pichu S, Pankajam T, Dharanibalan K, Djonov V, Chatterjee S (2019) Nitric oxide regulates intussusceptive-like angiogenesis in wound repair in chicken embryo and transgenic zebrafish models. *Nitric Oxide* 82:48–58
2. Oronsky B, Oronsky N, Cabrales P (2018) Platelet inhibitory effects of the Phase 3 anticancer and normal tissue cytoprotective agent, RRx-001. *J Cell Mol Med* 22(10):5076–5082
3. Mughal A, Sun C, O'Rourke ST (2018) Activation of large conductance, calcium-activated potassium channels by nitric oxide mediates apelin-induced relaxation of isolated rat coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 366(2):265–273
4. Sanna MD, Monti M, Casella L, Roggeri R, Galeotti N, Morbidelli L (2015) Neuronal effects of a nickel-piperazine/NO donor complex in rodents. *Pharmacol Res* 99:162–173
5. Puglisi MP, Bradaric MJ, Pontikis J, Cabai J, Weyna T, Tednes P, Schretzman R, Rickert K, Cao Z, Andrei D (2018) Novel primary amine diazeniumdiolates—chemical and biological characterization. *Drug Dev Res* 79(3):136–143

Table 8 Dipole moment DM (in Debyes) of NONOates **1–5** and their protonated tautomers **H1–H5** calculated at M06L/6-311++G(d,p) level of theory in SMD in water

NONOate	1	2	3	4	5
Non-protonated	11.141	12.119	13.421	13.931	14.652
H1	4.744	3.775	3.643	3.817	3.631
H2	7.981	8.081	8.014	8.110	8.005
H3	5.567	4.052	4.042	4.059	4.045
H4	5.716	5.781	5.647	5.825	5.636
H5	14.401	14.448	14.372	14.488	14.346

6. Fitzhugh AL, Keefer LK (2000) Diazeniumdiolates: pro- and antioxidant applications of the “NONOates”. *Free Radic Biol Med* 28(10):1463–1469
7. Habrie JA, Klose JR, Wink DA, Keefer LK (1993) New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *J Org Chem* 58:1472–1476
8. Davies KM, Wink DA, Saavedra JE, Keefer LK (2001) Chemistry of the diazeniumdiolates 2. Kinetics and mechanism of dissociation to nitric oxide in aqueous solution. *J Am Chem Soc* 123:5473–5481
9. Taylor DK, Bytheway I, Barton DHR, Bayse CA, Hall MB (1995) Toward the generation of NO in biological systems. Theoretical studies of the N_2O_2 grouping. *J Org Chem* 60:435–444
10. Dutton AS, Fukuto JM, Houk KN (2004) The mechanism of NO formation from the decomposition of dialkylamino diazeniumdiolates: density functional theory and CBS-QB3 predictions. *Inorg Chem* 43(3):1039–1045
11. Dutton AS, Suhrada CP, Miranda KM, Wink DA, Fukuto JM, Houk KN (2006) Mechanism of pH-dependent decomposition of monoalkylamine diazeniumdiolates to form HNO and NO, deduced from the model compound methylamine diazeniumdiolate, density functional theory, and CBS-QB3 calculations. *Inorg Chem* 45(6):2448–2456
12. Shaikh N, Valiev M, Lyman SV (2014) Decomposition of amino diazeniumdiolates (NONOates): molecular mechanisms. *J Inorg Biochem* 141:28–35
13. Zhao Y, Truhlar DG (2008) The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, non-covalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor Chem Acc* 120(1–3):215–241
14. Raghavachari K, Binkley JS, Seeger R, Pople JA (1980) Self-consistent molecular orbital methods. 20. Basis set for correlated wave-functions. *J Chem Phys* 72:650–654
15. Marenich AV, Cramer CJ, Truhlar DG (2009) Universal solvation model based on solute electron density and a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J Phys Chem B* 113:6378–6396
16. Reed AE, Curtiss LA, Weinhold F (1998) Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint. *Chem Rev* 88:899–926
17. Pliego JR Jr, Riveros JM (2002) Theoretical calculation of pK_a using the cluster-continuum model. *J Phys Chem A* 106:7434–7439
18. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Petersson GA, Nakatsuji H, Li X, Caricato M, Marenich AV, Bloino J, Janesko BG, Gomperts R, Mennucci B, Hratchian HP, Ortiz JV, Izmaylov AF, Sonnenberg JL, Williams-Young D, Ding F, Lipparini F, Egidi F, Goings J, Peng B, Petrone A, Henderson T, Ranasinghe D, Zakrzewski VG, Gao J, Rega N, Zheng G, Liang W, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Throssell K, Montgomery JA Jr, Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark MJ, Heyd JJ, Brothers EN, Kudin KN, Staroverov VN, Keith TA, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell AP, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Millam JM, Klene M, Adamo C, Cammi R, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Farkas O, Foresman JB, Fox DJ (2016) Gaussian 16, Revision B.01. Gaussian, Inc., Wallingford

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.