



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ciencias Químicas y Centro de Química-Instituto de Ciencias
Posgrado en Ciencias Químicas

**Descripción Teórico-Molecular de la Interacción de Distintos Bloqueadores con los
Canales de Calcio Tipo T**

Tesis presentada para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias Químicas
En el área de Fisicoquímica

Presenta:

M.C. Maricruz Rangel Galván

Directores de tesis:

Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante (Facultad de Ciencias Químicas)
Dra. Norma Angélica Caballero Concha (Facultad de Ciencias Biológicas)

Septiembre 2021

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por la beca de doctorado otorgada con número: 291236.



Al proyecto de vicerrectoría de investigación y estudios de posgrado 100256733-VIEP 2019 (BUAP) y al cuerpo académico BUAP-CA-263 (PRODEP-SEP) por el apoyo económico otorgado.



También se agradece al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS-BUAP) y al Laboratorio de Supercómputo y Visualización en Paralelo de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa por los recursos computacionales.



Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por permitirme estudiar el posgrado en ciencias químicas y a todos los profesores que en el transcurso del doctorado me compartieron su conocimiento para mi formación académica.

Agradezco al Dr. Francisco Javier Meléndez por permitirme trabajar en el Laboratorio de Química Teórica de la Facultad de Ciencias Químicas, por el apoyo otorgado y haberme brindado las herramientas necesarias para desarrollar los proyectos requeridos. También a todos los integrantes del laboratorio de química teórica por sus sugerencias y consejos.

Agradezco a la Dra. Norma Angélica Caballero Concha, a la Dra. María Eugenia Castro Sánchez y al Dr. José Manuel Pérez Aguilar por su asesoría en la realización del proyecto de doctorado, por haberme brindado su apoyo en la realización de la publicación del artículo y la escritura de la tesis, así como compartir su capacidad, experiencia y conocimiento científico que sirvieron de guía a lo largo de este posgrado.

Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional durante mis estudios de posgrado.

Oficio de aprobación de la comisión revisora de tesis para la impresión



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. María Eugenia Castro Sánchez, Dr. José Manuel Pérez Aguilar, Dr. Joel Ireta Moreno, Dr. Ulises Meza Villanueva, y el Dr. Ramsés Elías Ramírez Gutiérrez, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Descripción Teórico-Molecular de la Interacción de Distintos Bloqueadores con los Canales de Calcio Tipo T”**, que presenta la alumna **M.C. Maricruz Rangel Galván** para obtener el grado de Doctora en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los quince días del mes de septiembre del año dos mil veintiuno.

ATENTAMENTE

Dra. María Eugenia Castro Sánchez

Dr. José Manuel Pérez Aguilar

Dr. Joel Ireta Moreno

Dr. Ulises Meza Villanueva

Dr. Ramsés Elías Ramírez Gutiérrez

Publicación derivada de la tesis:

Rangel-Galván, M., Rangel, A., Romero-Méndez, C., Dávila, E. M., Castro, M. E., Caballero, N. A., Bustamante, M. F. J., Sanchez-Gaytan, B. L., Meza, U., Perez-Aguilar, J. M. (2021). Inhibitory Mechanism of the Isoflavone Derivative Genistein in the Human Cav3.3 Channel. *ACS Chemical Neuroscience*, 12(4), 651-659.

ACS Chemical
Neuroscience

pubs.acs.org/chemneuro

Research Article

Inhibitory Mechanism of the Isoflavone Derivative Genistein in the Human Cav3.3 Channel

Maricruz Rangel-Galván, Azahel Rangel, Catalina Romero-Méndez, Eliud Morales Dávila, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, Francisco J. Meléndez Bustamante, Brenda L. Sanchez-Gaytan, Ulises Meza,* and Jose Manuel Perez-Aguilar*

Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acscemneuro.0c00684>

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Regulation of cellular excitability and oscillatory behavior of resting membrane potential in nerve cells are largely mediated by the low-voltage activated T-type calcium channels. This calcium channel family is constituted by three isoforms, namely, Cav3.1, Cav3.2, and Cav3.3, that are largely distributed in the nervous system and other parts of the body. Dysfunction of T-type calcium channels is associated with a wide range of pathophysiologies including epilepsy, neuropathic pain, cardiac problems, and major depressive disorders. Due to their pharmacological relevance, finding molecular agents able to modulate the channel's function may provide therapeutic means to ameliorate their related disorders. Here we used



electrophysiological experiments to show that genistein, a canonical tyrosine kinase inhibitor, reduces the activity of the human Cav3.3 channel in a concentration-dependent manner. The inhibitory effect of genistein is independent of tyrosine kinase modulation and does not affect the voltage-dependent gating of the channel. Subsequently, we used computational methods to identify plausible molecular poses for the interaction of genistein and the Cav3.3 channel. Starting from different molecular poses, we carried out all-atom molecular dynamics (MD) simulations to identify the interacting determinants for the Cav3.3/genistein complex formation. Our extensive (microsecond-length) simulations suggest specific binding interactions that seem to stabilize the protein/inhibitor complex. Furthermore, our results from the unbiased MD simulations are in good agreement with the recently solved cryoelectron microscopy structure of the Cav3.1/Z944 complex in terms of both the location of the ligand binding site and the role of several equivalent amino acid residues. Proposed interacting complex loci were subsequently tested and corroborated by electrophysiological experiments using another naturally occurring isoflavone derivative, daidzein. Thus, by using a combination of *in vitro* and *in silico* techniques, we have identified interacting determinants relevant to the Cav3.3/genistein complex formation and propose that genistein directly blocks the function of the human Cav3.3 channel as a result of such interaction. Specifically, we proposed that a combination of polar interactions involving the three hydroxyl groups of genistein and an aromatic interaction with the fused rings are the main binding interactions in the complex formation. Our results pave the way for the rational development of improved and novel low-voltage activated T-type calcium channel inhibitors.

KEYWORDS: T-type calcium channels, MD simulations, isoflavone derivative, channel blockers, LVA channels, channel inhibition

El proyecto tuvo participación en los siguientes congresos, simposios y foros académicos:

- XXII Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas. Participación póster. Descripción teórico-molecular de la interacción de distintos bloqueadores tipo “LVA” con el canal de calcio tipo T. El cuál se llevó a cabo el 6-10 de noviembre de 2017.
- XVI Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica. Participación póster. Caracterización molecular de los endocannabinoides como bloqueadores de los canales de calcio tipo T. El cuál se llevó a cabo el 15-17 de noviembre de 2017.
- XXIII Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas. Participación oral. Descripción teórico-molecular de la interacción de distintos bloqueadores tipo “LVA” con el canal de calcio tipo T. El cuál se llevó a cabo el 15-19 de octubre de 2018.
- XVII Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica. Participación póster. Descripción teórico-molecular de los bloqueadores del canal de calcio tipo T: Amilorida y Etosuximida. El cuál se llevó a cabo el 22-24 de noviembre de 2018.
- XVIII Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica. Participación póster. Descripción molecular de la interacción de bloqueadores tipo cannabinoide en los Ca_v3 . El cuál se llevó a cabo el 24-26 de octubre de 2019.
- XXIV Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas. Participación oral. Descripción teórico-molecular de la interacción de distintos bloqueadores tipo “LVA” con el canal de calcio tipo T. El cuál se llevó a cabo el 11-15 de noviembre de 2019.
- Conferencia LatinXChem en la plataforma de Twitter. Participación póster. Estudio de la interacción de moléculas con actividad cannabinoide con los Ca_v3 . El cual se llevó a cabo el 7 de septiembre de 2020.

- XXV Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas. Participación oral en línea. Descripción teórico-molecular de la interacción de distintos bloqueadores tipo “LVA” con el canal de calcio tipo T. El cuál se llevó a cabo el 9-13 de noviembre de 2020.

Resumen

Los canales de calcio tipo T son proteínas transmembranales de importancia biológica por su participación en la excitabilidad de las neuronas. La sobreexcitación de estas proteínas puede manifestarse en enfermedades tálamo-corticales, padecimientos de dolor neuropático o neurogénico, depresión, enfermedades cardíacas y trastornos neurológicos como la epilepsia. Dentro de las moléculas que modulan la función de estos canales iónicos, las moléculas bloqueadoras son de importancia farmacológica para desarrollar nuevos tratamientos o conocer el mecanismo de acción celular de otros bloqueadores existentes. En este proyecto de tesis se realiza un análisis desde el enfoque de la química teórica para caracterizar a las moléculas bloqueadoras con actividad cannabinoide, así como un análisis desde el enfoque del acoplamiento molecular (*Molecular Docking*) y simulaciones de dinámica molecular para evaluar la interacción de las moléculas bloqueadoras con el canal de calcio tipo T en particular el subtipo $Ca_v3.2$. Adicionalmente se evalúa la interacción de la molécula genisteína en interacción con el subtipo $Ca_v3.3$. El análisis cuántico involucra la caracterización espectroscópica IR y de NMR de H^1 y C^{13} , ya sea para establecer el nivel de teoría adecuado o para establecer las estructuras moleculares de estudio. Un análisis de las propiedades electrónicas (orbitales moleculares frontera, OMF, y potencial electrostático molecular, MEP) y de reactividad química global y local nos permite evaluar características importantes de los ligantes usando métodos DFT. El análisis de acoplamiento molecular ayuda a establecer los posibles sitios de interacción de las moléculas bloqueadoras con el canal de calcio tipo T y el estudio de dinámica molecular permite evaluar la estabilidad de estos sitios de interacción. Durante el planteamiento del proyecto no se contaba con una estructura de rayos X para el canal de calcio tipo T por ello se realizó un trabajo de modelado por homología tomando como base la estructura del canal de calcio tipo L. Una vez obtenido el modelo del canal de calcio tipo T ($Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$) se comprueba la participación del segmento 6 en diferentes dominios del canal de calcio tipo T.

Summary

T-type calcium channels are transmembrane proteins of biological importance due to their participation in the neuron excitability. Overexcitation of these proteins may participate in thalamic-cortical diseases, neuropathic or neurogenic pain disorders, depression, heart disease, and neurological disorders such as epilepsy. Among the molecules that modulate these ion channels, the blocking molecules are of pharmacological importance to develop new treatments or to know the cellular action mechanism of the actual blockers. In this thesis project, an analysis is carried out from the theoretical chemistry approach to characterize the blocking molecules with cannabinoide activity, as well as an analysis from the approach of molecular Docking and molecular dynamics simulation to evaluate the interaction of the blocking molecules with the channel T-type calcium channels, $Ca_v3.2$ subunit in particular. Additionally, the interaction of the genistein molecule in complex with the $Ca_v3.3$ subtype is evaluated. Quantum analysis involves IR and NMR spectroscopic characterization either to establish the appropriate level of theory or to establish the molecular structures of study. An analysis of electronic structure (MEP, OMF) and global and local reactivity (Fukui indices) allows us to evaluate important characteristics of the ligand. DFT methods allow a good prediction of the characteristics of the blocking molecules. The molecular docking analysis helps us to establish the possible sites of interaction of the blocking molecules with the T-type calcium channel and the study of molecular dynamics will allow us to evaluate the stability of these sites of interaction. During the project planneation, there was no X-ray structure for the T-type calcium channel, for that reason homology modeling work was carried out based on the L-type calcium channel structure. Once the model of the T-type calcium channel is obtained ($Ca_v3.2$ and $Ca_v3.3$), it is conformed the participation of segment 6 in different domains of the T-type calcium channel.

ÍNDICE

Capítulo I. Introducción.....	1
CapítuloII. Antecedentes	5
2.1 Estructura, función y canalopatías de los Ca_v3	5
2.2 Estudios experimentales y teóricos de los Ca_v	7
2.3 Bloqueadores de los Ca_v3	9
2.4 Estudios espectroscópicos experimentales y teóricos de los Ca_v3	11
Capitulo III. Fundamentos teóricos	14
3.1 Teoría de los funcionales de la densidad	14
3.2 Funciones de base	19
3.3 Espectroscopia IR y RMN.....	21
3.4 Orbitales moleculares (OM) y Mapa de potencial electrostático (MEP)	25
3.5 Orbitales de enlace natural (NBO)	29
3.6 Descriptores de reactividad global	30
3.7 Descriptores de reactividad local.....	31
3.8 Teoría de átomos en moléculas (QTAIM).....	33
3.9 Modelado por homología.....	36
3.10 Acoplamiento molecular	37
3.11 Simulaciones de Dinámica Molecular	39
Capítulo IV. Metodología.....	43
4.1 Cálculos de estructura molecular.....	44
4.2 Cálculos de espectroscopia IR y RMN.....	45
4.3 Orbitales Moleculares Frontera, Mapa de Potencial Electrostático Molecular y Orbitales de Enlace Natural	47
4.4 Análisis de reactividad química.....	47
4.5 Análisis QTAIM.....	47
4.6 Modelado por homología.....	48
4.7 Cálculos de Acoplamiento Molecular	49
4.8 Simulaciones de Dinámica Molecular	49
Capítulo V. Discusión de resultados	50
5.1 Estructura molecular y análisis de poblaciones	50

5.2 Espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C	60
5.3 Espectroscopía de IR	66
5.4 Análisis de orbitales moleculares frontera (FMO) y mapas de potencial electrostático molecular (MEP)	72
5.5 Análisis de orbitales de enlace natural (NBO)	80
5.6 Descriptores de reactividad global	83
5.7 Descriptores de reactividad local.....	85
5.8 Análisis de la teoría cuántica de átomos en moléculas (QTAIM).....	90
5.9 Acoplamiento Molecular	92
5.10 Simulaciones de Dinámica molecular	96
Capítulo VI. Conclusiones.....	98
Referencias	102
Anexos.....	113

Lista de Abreviaturas

Δ^9 -THC	Delta-9-tetrahydrocannabinol	Delta-9-tetrahidrocannabinol
2-AG	2-Arachidonoylglycerol	2-araquidonilglicerol
AIL	Atomic Interaction Line	Líneas de interacción atómica
AIM	Atoms in Molecules	Átomos en moléculas
Alquilo-F	Final Alkyl	Alquilo final
Alquilo-I	Initial alkyl	Alquilo inicial
Alquilo-M	Medium Alkyl	Alquilo medio
ANP	Atrial Natriuretic Peptide	Péptido natriurético atrial
AO/OA	Atomic Orbitals	Orbitales atómicos
ASD	Atomic Spin Density	Densidad de spin atómica
BCP	Bond Critical Point	Punto crítico de enlace
BTZ	Benzothiazepines	Benzotiazepinas
CB1/CB2	Cannabinoid receptor type 1 and 2	Receptor cannabinoide de tipo 1 y 2
CGTF	Contract Gaussian Type Functions	Función tipo gaussiana contraída
CHCl ₃ / CDCl ₃	Chloroform / Deuteriochloroform	Cloroformo/ Cloroformo deutereado
CM/SA	Conformational Memory/ Simulated Annealing	Memorias conformacionales /Simulación calentado recocido
DFT	Density Functional Theory	Teoría del funcional de la densidad
DHD	Dihydropyridines	Dihidropiridinas
DI	Delocalization Index	Índice de deslocalización
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimetil sulfoxido
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine	Dipalmitoilfosfatidilcolina
EC ₅₀	Half maximal effective concentration	Concentración efectiva máxima 50%
E _{closed}	Extended closed ring conformer	Confórmero extendido con anillo cerrado
E _{HOMO}	HOMO energy	Energía HOMO
E _{LUMO}	LUMO energy	Energía LUMO
ELF	Electron Localization Function	Funciones de localización de electrón
E _{open}	Extended open ring conformer	Confórmero extendido con anillo abierto
FAAH	Fatty acid amide hydrolase	Hidrolasa de amidas de ácidos grasos
FABP5	Fatty Acid Binding Protein	Proteína de unión de ácidos grasos

FDA	Food and Drug Administration	Administración de medicamentos y alimentos
FMO	Frontier Molecular Orbital	Orbitales moleculares frontera
GGA	Generalized Gradient Approximation	Aproximación de gradiente generalizado
GIAO	Gauge-Independent Atomic Orbital	Orbital atómico independiente tipo Gauge
GRD	Dorsal Root Ganglion	Ganglio de la raíz dorsal
Grupo EA	Ethanolamine group	Grupo etanolamida
GTF	Gaussian Type Functions	Funciones tipo gaussiana
H _{closed}	Hairpin closed ring conformer	Confórmero en forma de horquilla con anillo cerrado
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital	Orbital molecular más alto ocupado
H _{open}	Hairpin open ring conformer	Confórmero en forma de horquilla con anillo abierto
HVA	High Voltage Activated	Activados a altos voltajes
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration	Concentración inhibitoria media máxima
IR	Infrared Resonance	Resonancia infrarroja
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Unión internacional de química pura y aplicada
LDA	Local Density Approximation	Método de aproximación densidad local
logED50	Decadic logarithm of the ED50	Logaritmo base diez del ED50 (50% dosis efectiva)
LSDA	Local Spin Density Approximation	Método de aproximación densidad de spin local
LTS	Low Threshold Spikes	Espigas de bajo umbral
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital	Orbital molecular más bajo ocupado
LVA	Low Voltage Activated	Activados a bajos voltajes
MC	Monte Carlo simulations	Simulaciones de Monte Carlo
MD	Molecular Dynamic Simulations	Simulaciones de dinámica molecular
MEP	Map of Potential Energy	Mapa de energía potencial
MO/OM	Molecular Orbitals	Orbitales moleculares

NAMD	Not (just) Another Molecular Dynamics program	No solo otro programa de dinámica molecular
NAO	Natural Atomic Orbitals	Orbitales atómicos naturales
NBO	Natural Bond Orbital	Orbitales de enlace natural
NHO	Natural Hybrid Orbitals	Orbitales híbridos naturales
NLMO	Natural SemiLocalized Molecular Orbitals	Orbitales moleculares semi-localizados
NMP	Neuro-Molecular Production	Producción Neuro-molecular
PAA	Phenylalkylamines	Fenilalquilaminas
PD	Pore Domain	Dominio poro
PDB	Protein Data Bank	Banco de datos de proteínas
PED	Potential Energy Distribution	Distribución de la energía potencial
PES	Potential Energy Surface	Superficie de energía potencial
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship	Relación cuantitativa estructura-actividad
QTAIM	Quantum Theory of Atoms in Molecules	Teoría cuántica de átomos en moléculas
RCP	Ring Critical Point	Punto crítico de anillo
REDOR	Rotational Echo Double Resonance	Resonancia doble-eco rotacional
REM	Rapid Eye Movement	Movimiento rápido de ojos
RMN	Nuclear Magnetic Resonance	Resonancia magnética nuclear
SCF	Self-Consistent Field	Método del campo autoconsistente
SMD	Solvation Density Method	Métodos de densidad de solvatación
STO	Slater-type orbitals	Orbitales tipo Slater
SV	Split Salence	Valencia desdoblada
TM	Transmembrane	Transmembranal
U _{closed}	U-shape closed ring conformer	Confórmero en forma de U con anillo cerrado
U _{open}	U-shape open ring conformer	Confórmero en forma de U con anillo abierto
UV	Ultraviolet radiation	Radiación ultravioleta
VMD	Visual Molecular Dynamics	Visualizador de dinámica molecular
VSD	Voltage Sensor Domain	Dominio sensor de voltaje
WHO/OMS	World Health Organization	Organización mundial de la salud

Lista de gráficas y figuras

- Figura 1.** Estructura de los canales de calcio tipo T. Se ilustra el influjo de iones de calcio por estos canales. Se componen de 4 dominios (D1-D4) y cada uno de ellos contiene 6 segmentos transmembranales (S1-S6).....6
- Figura 2.** Estadística de muertes por enfermedades cardíacas. En a), gráfico de barras que muestra las principales causas de muerte en 2016. Las barras azules, rojas y verdes indican las enfermedades no transmisibles, las enfermedades transmisibles y las lesiones, respectivamente, modificada de (www.who.int). En b), mapa del número anual de muertes de enfermedades cardíacas establecido por cada 100, 000 habitantes en 2017. Tomada de IHME, GBD (Global Burden Disease) OurWorldInData.org/causesof-death.CC.....7
- Figura 3.** Estructura de rayos X de los canales Ca_v3 . En a), el canal $Ca_v3.1$ a una resolución de 23 Å, el canal tiene una altura de 11.5 nm y se divide en dos regiones denominadas M y C, la flecha indica el carboxilo terminal. En b), la estructura del canal $Ca_v3.1$ a una resolución de 3.3 Å, en azul marino se observan los dos iones de calcio dentro del poro y en magenta el bloqueador Z944.....8
- Figura 4.** Estructura de (1) mibefradil ($C_{29}H_{35}FN_3O_3$), su metabolito (2) dm-mibefradil ($C_{26}H_{33}FN_3O$) y su derivado (3) NNC 55-0396 ($C_{30}H_{40}FN_3O$).....9
- Figura 5.** Estructura bidimensional de las moléculas orgánicas bloqueadoras de los Ca_v3 . Etosuximida (1), ácido valproico (2), amilorida (4), y zonizamida (6) son las estructuras más pequeñas. TTA-A2 (9), TTA-P2 (10) y Z944 (5) bloquean a los Ca_v3 en un rango nanomolar. El bloqueador Z944 y ACT-709478 (7) se encuentran en fase II para su uso clínico. Nimodipina (8) es un bloqueador inespecífico que también bloquea a los canales de calcio HVA. NMP-7 (3) y anandamida (11) adicionalmente son agonistas de los receptores CB1/CB2. Finalmente, genisteína (12) es una isoflavona con mayor afinidad al $Ca_v3.3$10
- Figura 6.** Modelo del eteno de acuerdo a la teoría QTAIM. En a) la estructura tridimensional del eteno obtenida en el programa GaussView; en b) el mapa del campo del vector gradiente de la densidad electrónica; en c) el mapa del campo del vector gradiente de la densidad electrónica con trayectorias; en d) mapa de relieve de la distribución espacial de la densidad electrónica; en e) el mapa de contorno del eteno y en f) el mapa de contorno del eteno con trayectorias.....35
- Figura 7.** Esquema de la metodología general del proyecto. Se divide en dos secciones, los bloqueadores de canales LVA y el canal de calcio tipo T. Como primer paso en ambas secciones es la búsqueda de las estructuras en bases de datos, posteriormente se hacen los cálculos necesarios que ayuden a describir la interacción.....43

Figura 8. En a) diagrama de la estructura del canal $Ca_v3.2$, donde se representa en código de color los cuatro dominios transmembranales: el Dominio I (DI) en azul, el Dominio II (DII) en verde, el Dominio III (DIII) en beige, y el Dominio IV (DIV) en rojo. Cada dominio contiene seis segmentos transmembranales (S1-S6). Los segmentos S1-S4 forman el Dominio sensor de voltaje (VSD) y los segmentos S5-S6 junto con el segmento P (P1 y P2) forman el dominio del poro (PD). En b) vista lateral del canal $Ca_v3.2$ humano generado por modelado por homología, donde se indica la porción extracelular (EC), transmembranal (TM) e intracelular (IC). En c) vista extracelular del canal $Ca_v3.2$ humano. En d) diagrama de la vista extracelular de la distribución especial de los segmentos transmembranales del canal $Ca_v3.2$ humano.....48

Figura 9. Estructuras optimizadas de los compuestos NMP: a) NMP-4, b) NMP-7, y c) NMP-181 calculadas en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....50

Figura 10. Estructuras optimizadas de anandamida en el a) confórmero extendido con anillo cerrado, E_{closed} , b) confórmero extendido con anillo abierto, E_{open} , c) confórmero de U con anillo cerrado, U_{closed} , d) confórmero de U con anillo abierto, U_{open} , e) confórmero de horquilla con anillo cerrado, H_{closed} y f) confórmero de horquilla con anillo abierto, H_{open} , calculadas en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo, y las estructuras de horquilla de rayos-X con enlaces dobles g) alternados, H_{4azp} , y h) todos *trans*, H_{4azr} [70].....53

Figura 11. Regiones de la estructura de anandamida con código de color rojo (Grupo EA), amarillo (Alquilo D), azul (Alquilo-M) y verde (Alquilo-F).....54

Figura 12. Curvas de energía potencial los confórmeros extendidos, en forma de U y de horquilla durante la formación del anillo de 7 átomos en el grupo etanolamida calculado en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo. Los puntos negros sobre la curva indican la conformación con el anillo cerrado y los puntos grises las conformaciones con el anillo abierto. Los puntos azules indican los tres mínimos sobre la curva de energía potencial para las conformaciones de anillo abierto de los confórmeros E_{open} , U_{open} y H_{open} . Los puntos verdes indican los tres mínimos sobre la curva de energía potencial de las conformaciones con anillo cerrado, E_{closed} , U_{closed} , y H_{closed} . La formación del anillo en el grupo etanolamida ocurre en dos pasos: (1) formación del anillo (a–c)) y (2) formación del puente de hidrógeno (d–e)).....57

Figura 13. Gráficos de correlación de los valores δ (ppm) calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ con respecto los valores δ experimentales para el RMN de a) 1H y b) ^{13}C para los compuestos NMP en cloroformo.....63

Figura 14. Gráficos de correlación de δ (ppm) calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ con los δ experimentales para el RMN de a) 1H y b) ^{13}C para el confórmero E_{closed} de anandamida en cloroformo y DMSO.....65

Figura 15. Espectro teórico de IR de NMP-4 calculado en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....	68
Figura 16. Espectro teórico de IR de NMP-7 calculado en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....	69
Figura 17. Espectro teórico de IR de NMP-181 calculado en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....	69
Figura 18. Espectro teórico de IR de anandamida E_{closed} calculado en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....	71
Figura 19. Orbitales moleculares frontera (HOMO y LUMO) y valores ΔE_{gap} (en eV) para los compuestos a) NMP-4, b) NMP-7, y c) NMP-181 calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....	74
Figura 20. Orbitales moleculares frontera (HOMO y LUMO) y valores de ΔE_{gap} para los conformeros a) E_{closed} , b) U_{closed} , y c) H_{closed} de anandamida calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....	76
Figura 21. Correlación entre E_{LUMO} (eV) y el parámetro $\log IC_{50}$ (IC_{50} valores están en μM .) para los compuestos NMP y los conformeros de anandamida considerando en a) E_{closed} , b) U_{closed} y c) H_{closed} calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....	77
Figura 22. Mapa de potencial electrostático para los compuestos a) NMP-4, b) NMP-7 y c) NMP-181 compounds en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....	78
Figura 23. Mapa de potencial electrostático para los conformeros de anandamida a) E_{closed} , b) U_{closed} y c) H_{closed} en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....	79
Figura 24. Funciones de Fukui f^+ y f^- para los compuestos NMP: a) NMP-4, b) NMP-7 y c) NMP-181 calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....	87
Figura 25. Funciones de Fukui f^+ y f^- para los conformeros de anandamida: a) E_{closed} , b) U_{closed} y c) H_{closed} calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....	89
Figura 26. Grafos moleculares de los conformeros de anandamida: a) E_{closed} , b) U_{closed} y c) H_{closed} calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....	92

Figura 27. Residuos importantes de interacción de los compuestos NMP y el canal $Ca_v3.2$: a) sitio S6DII y el compuesto NMP-4, b) sitio S6DIII y el compuesto NMP-7 y c) sitio S6DI y el compuesto NMP-181. Para una ubicación mejor de los sitios ver el diagrama de la figura 8 d).....93

Figura 28. Residuos importantes de interacción de los confómeros de anandamida y el canal $Ca_v3.2$: a) Sitio S5DIV y los confómeros de anandamida U_{closed} y U_{open} formando dos puentes de hidrógeno con los residuos L806 y R807, U_{closed} adicionalmente forma un puente de hidrógeno con D767, b) sitio S6DIII y los confómeros de anandamida H_{closed} y H_{open} con interacciones π con el residuo F943 principalmente y c) Sitio del Poro con el compuesto NMP-181 y el confómero de anandamida U_{open} . Para una ubicación mejor de los sitios ver el diagrama de la figura 8 d).....95

Figura 29. a) Trazo representativo del bloqueo de genisteína (50 μ M) en los $Ca_v3.3$. b) Estructura de genisteína y daidzeína.....96

Figura 30. a) y b) Aminoácidos importantes de interacción de genisteína en el bolsillo de unión de $Ca_v3.3$. c) Gráficos de las distancias de los aminoácidos importantes de interacción.....97

Lista de tablas:

Tabla 1. Bloqueadores del canal de calcio tipo T con valores de afinidad e información espectroscópica experimental o teórica.....	13
Tabla 2. Grados de libertad de moléculas poliatómicas.....	22
Tabla 3. Los puntos críticos de acuerdo al rango y la firma.....	34
Tabla 4. Parámetros utilizados para la búsqueda de confórmeros de la anandamida.....	45
Tabla 5. Energías electrónicas totales (u.a.) (arriba) y energías relativas (kcal mol ⁻¹) (abajo) para los compuestos NMP calculadas en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ.....	51
Tabla 6. Distancia de enlace (Å), ángulos de valencia y ángulos diedros (grados) seleccionados de los compuestos NMP calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....	51
Tabla 7. Energías electrónicas totales, E _{tot} (u.a.), energías electrónicas relativas, ΔE _{rel} (kcal mol ⁻¹), energías libres relativas, ΔG _{rel} (kcal mol ⁻¹), y porcentajes de población para las estructuras de mínima energía calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ.....	54
Tabla 8. Distancia de enlace (Å), ángulos de valencia y ángulos diedros (grados) seleccionados para anandamida calculadas en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....	55
Tabla 9. Valores δ (ppm) de RMN de ¹ H experimentales y calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo para los compuestos NMP.....	62
Tabla 10. Valores δ (ppm) de RMN de ¹³ C experimentales y calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo para los compuestos NMP.....	62
Tabla 11. Valores δ (ppm) de RMN de ¹ H experimentales y calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo y DMSO para el confórmero E _{closed} de anandamida.....	64
Tabla 12. Valores δ (ppm) de RMN de ¹³ C experimentales y calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo y DMSO para el confórmero E _{closed} de anandamida.....	65
Tabla 13. Frecuencias teóricas IR (en cm ⁻¹), intensidad (Int, en km mol ⁻¹), frecuencia escalada (Freq esc, en cm ⁻¹) y PED (≥10%) en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ para los compuestos NMP usando el factor de	

escala de 1.014 en cloroformo. Se representa el modo vibracional *stretching* (ν), el modo vibracional *bending* en el plano (β) y el modo vibracional torsional (τ).....67

Tabla 14. Frecuencias teóricas IR (en cm^{-1}), intensidad (Int, en km mol^{-1}), frecuencia escalada (Freq esc, en cm^{-1}) y PED ($\geq 10\%$) en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ para el conformero E_{closed} de anandamida usando el factor de escala de 1.014 en cloroformo. Se asignan los modos vibracionales de *stretching* (ν), *bending* en el plano (β) y torsión (τ).....71

Tabla 15. Energías HOMO y LUMO, E_{HOMO} y E_{LUMO} , y energía, ΔE_{gap} (eV), para los compuestos NMP obtenidos en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....72

Tabla 16. Porcentaje de contribución de orbitales moleculares de los compuestos NMP calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....73

Tabla 17. Energías HOMO y LUMO, E_{HOMO} y E_{LUMO} , y energía gap, ΔE_{gap} (eV), para los conformeros de anandamida E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} obtenidos en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....74

Tabla 18. Porcentajes de contribución de orbitales moleculares de los conformeros E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} de anandamida calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo para las regiones de anandamida mostradas en la Figura 11.....75

Tabla 19. Análisis NBO (donador→aceptor) para los compuestos NMP calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo. La numeración de los átomos corresponde a la figura 9.....81

Tabla 20. Análisis NBO (donador→aceptor) para los conformeros de anandamida E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo. La numeración corresponde a los átomos de la Figura 10.....82

Tabla 21. Descriptores de reactividad global (eV) para los compuestos NMP calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....84

Tabla 22. Descriptores de reactividad global (eV) para los conformeros de anandamida E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....84

Tabla 23. Funciones de Fukui, $f^+(r)$ y $f^-(r)$, descriptor dual, $f^{(2)}(r)$, y funciones de Parr, $P^-(r)$ y $P^+(r)$, para los compuestos NMP calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....86

Tabla 24. Funciones de Fukui, $f^+(r)$ y $f^-(r)$, descriptor dual, $f^{(2)}(r)$, y las funciones de Parr, $P^-(r)$ y $P^+(r)$, para los conformeros de anandamida E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.....	88
Tabla 25. Parámetros topológicos (u.a.), EH...Y (kcal/mol) y distancias interatómicas (D_{inter} , Å) de los conformeros E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} de anandamida.....	91
Tabla 26. Energías de interacción ΔG (kcal/mol) para los compuestos NMP y los conformeros U y H de anandamida con el canal Ca _v 3.2.....	95

Capítulo I. Introducción

Los canales de calcio tipo T son proteínas transmembranales de importancia biológica por su participación en la excitabilidad y la determinación de las oscilaciones del potencial de membrana en las células. La sobreexcitación de estas proteínas puede participar en enfermedades tálamo-corticales, padecimientos de dolor neuropático, depresión, enfermedades cardíacas y trastornos neurológicos como la epilepsia [1, 2]. En el contexto de los padecimientos de dolor y comportamientos depresivos los canales de calcio tipo T participan junto con los receptores cannabinoides (CB1/CB2). Para estos canales, específicamente la subunidad $Ca_v3.2$, es la que se expresa en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD) para enviar las señales del dolor fisiológico (nociceptivo) y del dolor patológico (neuropático) al cerebro [3], y es en la hipófisis lateral donde recientemente se ha visto su participación en la depresión [4]. Por otro lado, los receptores cannabinoides, junto con los ligantes y las enzimas de degradación, son conocidos por participar en el tratamiento del dolor [5]. Los receptores cannabinoides fueron las primeras proteínas donde se conocieron las moléculas ligantes antes que los receptores. El metabolito secundario derivado de la marihuana (Δ^9 -THC) puede unirse a estos receptores y se encontró que los ligantes naturales son la anandamida y 2-AG (2-Araquidonilglicerol) [6]. Además, se ha observado que el mal funcionamiento de estos receptores participa en la regulación en el cambio de humor, los desórdenes de depresión mayor y los comportamientos suicidas [7]. De esta manera, la acción de moléculas que puedan actuar tanto en los canales de calcio tipo T como en los receptores cannabinoides, son importantes en el tratamiento de padecimientos del dolor neuropático y de depresión. Se ha observado que los compuestos derivados del carbazol NMP (Neuro-Molecular Production) [8–10], así como el endocannabinoide anandamida [11, 12] actúan en ambas proteínas.

Los compuestos NMP son moléculas sintetizadas mientras que la anandamida es un neurotransmisor derivado del ácido araquidónico y substratos de etanolamida [13]. Una de las diferencias más notables entre los compuestos NMP y la anandamida es la flexibilidad de su estructura, ya que los compuestos NMP tienen un grupo carbazol que limita su movimiento, mientras que la anandamida posee 16 ángulos de torsión generando un gran número de conformeros. Sin embargo, al actuar sobre las mismas proteínas receptoras y bajo la hipótesis de que puedan actuar en un mismo bolsillo de unión, en este trabajo se caracterizan ambos tipos de ligantes (compuestos NMP y anandamida) a través de sus

propiedades electrónicas y de reactividad. Adicionalmente, en el contexto de enfermedades neuronales, el subtipo $Ca_v3.3$ muestra una distribución más restringida, en comparación con los otros subtipos ($Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$), ubicándose principalmente en el sistema nervioso central lo que hace que sea un blanco terapéutico importante para enfermedades como epilepsia y esquizofrenia [14]. Se utiliza a genistéina, isoflavona derivada de la planta de soya, como compuesto bloqueador del canal $Ca_v3.3$.

La caracterización abarca tres enfoques de estudio al problema ligante-receptor: el químico cuántico, el de acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular. El sistema de estudio consiste en el canal de calcio tipo T (receptor) en interacción con moléculas bloqueadoras de éste (ligantes), los compuestos NMP (NMP-4, NMP-7 y NMP-1810), la anandamida y genistéina. Los compuestos NMP y anandamida se detallan más adelante en cuanto a su función biológica, su farmacología y su estructura. Como primera parte del proyecto se realiza una caracterización estructural y espectroscópica (RMN de H^1 y C^{13} e IR) de los compuestos NMP y anandamida mediante cálculos basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT). En un segundo paso se realizan los cálculos de estructura electrónica, de orbitales frontera y orbitales NBO, así como de reactividad global y local. También, se incluyen cálculos basados en la teoría de átomos en moléculas (QTAIM) para describir las propiedades de enlace de los ligantes en función de la densidad electrónica. En un tercer paso se aborda el estudio de acoplamiento molecular de las moléculas bloqueadoras (compuestos NMP y anandamida) con los canales de calcio tipo T ($Ca_v3.2$) y finalmente, en un cuarto paso, desde un enfoque de dinámica molecular se evalúa la estabilidad del complejo genistéina/ $Ca_v3.3$. A continuación, se explica el contenido de cada capítulo en la tesis:

En este capítulo (Capítulo I), como ya se mencionó anteriormente, se da una introducción al problema ligante-receptor que es el que se abordará a detalle en el proyecto de tesis, siendo el canal de calcio tipo T el receptor y las distintas moléculas orgánicas bloqueadoras del canal los ligantes. Además, se describen los antecedentes fisiológicos y teóricos tanto del canal de calcio tipo T como de las moléculas bloqueadoras del canal. Se establece también la hipótesis del trabajo, así como los objetivos generales y particulares.

En el Capítulo II se exponen los fundamentos teóricos requeridos para realizar este trabajo de tesis. En el Capítulo III se establece la metodología del trabajo, dando cuenta de las herramientas computacionales que se utilizarán para resolver el problema ligante-receptor.

En el Capítulo IV se desarrolla la discusión de los resultados, donde se explica para cada molécula bloqueadora con actividad cannabinoide los resultados de los cálculos de estructura electrónica y de espectroscopia, así como el análisis de las propiedades electrónicas, de reactividad química y sus propiedades de enlace. Posteriormente se muestran los resultados para la obtención de la estructura molecular del canal de calcio tipo T tras el modelado por homología y en consecuencia se aborda la interacción ligante-receptor con acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular. En el Capítulo V se encuentran las conclusiones del proyecto.

Planteamiento del problema

Se conoce que los canales de calcio tipo T (o LVA) participan en diferentes canalopatías, dentro de las que se encuentran los comportamientos depresivos, padecimientos de dolor neuropático y enfermedades neuronales. Dentro de las moléculas orgánicas que regulan a los canales de calcio tipo T se encuentran moléculas bloqueadoras con actividad cannabinoide (compuestos NMP y anandamida), las cuales son de interés debido a que modulan tanto a los canales de calcio tipo T ($Ca_v3.2$) como a los receptores cannabinoides, ambos involucrados en el padecimiento del dolor y de la depresión. También es de interés el estudio de bloqueadores (genistéina) que sean selectivos a subtipos de los canales de calcio tipo T con una distribución más restringida al sistema nervioso central ($Ca_v3.3$) involucrados en enfermedades neuronales como la epilepsia. El mecanismo de acción de los bloqueadores es de gran importancia para explicar la función biológica de estos compuestos. Para estudiar y elucidar dicho mecanismo se requiere conocer a gran detalle la interacción receptor-ligante. En este estudio se propone dar solución al problema abordándolo desde dos enfoques teóricos, el de la química cuántica enfocada en los ligantes y el de la mecánica molecular para analizar la interacción de éstos con la proteína receptora. Los resultados obtenidos contribuirán a entender a nivel molecular los mecanismos de acción de los fármacos en las terapias implementadas.

Hipótesis

Mediante herramientas de la química computacional se identificarán los posibles puntos de interacción de las moléculas orgánicas bloqueadoras tipo LVA sobre los canales de calcio tipo T. Los puntos de interacción se localizarán posiblemente en las zonas que participan en la fase de inactivación del canal de calcio tipo T (S6/DIII).

Objetivos

Objetivo general

Estudiar la interacción molecular que tienen los distintos bloqueadores sobre el canal de calcio tipo T mediante métodos de la química computacional utilizando diferentes metodologías para analizar las propiedades de los ligantes y obtener las energías de interacción con el canal de calcio tipo T. Además, se implementarán varios tipos de simulaciones moleculares para tener una base cuantitativa del proceso de interacción de los bloqueadores con el canal iónico de interés.

Objetivos particulares

- Realizar cálculos de estructura electrónica de las moléculas orgánicas bloqueadoras de canales LVA para analizar sus propiedades electrónicas y de reactividad química.
- Efectuar cálculos de espectroscopia molecular (IR y RMN de H^1 y C^{13}) de las moléculas orgánicas bloqueadoras de los canales LVA.
- Realizar un análisis de Átomos en Moléculas (AIM) para evaluar las principales interacciones no covalentes de las moléculas orgánicas bloqueadoras de los canales LVA.
- Determinar la interacción de los bloqueadores de los canales LVA con el sitio de unión mediante la técnica de acoplamiento molecular.
- Determinar la estabilidad de los sitios propuestos de interacción de los bloqueadores de los canales LVA con el sitio de unión mediante técnicas de simulación de dinámica molecular.

Capítulo II. Antecedentes

2.1 Estructura, función y canalopatías de los Ca_v3

Los canales de calcio tipo T son proteínas transmembranales que permiten el influjo de iones de calcio a la célula. Pertenecen a la superfamilia de canales iónicos junto con los canales de sodio y potasio activados por voltaje. Los canales de calcio se dividen en dos grupos de acuerdo a su umbral de activación: a) los canales de calcio activados a bajos voltajes LVA (por sus siglas en inglés *Low Voltage Activated*) y b) los canales de calcio activados a altos voltajes HVA (por sus siglas en inglés *High Voltage Activated*). Los canales de calcio tipo T se pueden nombrar también como Ca_v3 , en esta nomenclatura se coloca Ca por el ion calcio que permea, la “v” porque se activan por estimulación de voltaje y el número tres porque es el grupo al que pertenecen [15]. En este trabajo utilizaremos las distintas nomenclaturas de estos canales iónicos, esto es: canales de calcio tipo T, LVA o Ca_v3 .

Estructuralmente los canales de calcio tipo T se dividen en 4 dominios, a su vez cada dominio se compone de seis segmentos transmembranales. Los segmentos S5 y S6 de cada dominio se ubican en la parte central y son las unidades formadoras del poro. En medio de cada segmento S5 y S6 se ubica el segmento P que contiene los aminoácidos EEDD (E para ácido glutámico y D para ácido aspártico) que forman el filtro de selectividad del Ca_v3 . En una parte más externa, rodeando el poro central, se ubican los segmentos S1-S4. El segmento S4 contiene aminoácidos con carga positiva, como R y K (R para arginina y K para lisina), lo que le confiere sensibilidad a la polarización de la membrana plasmática y es denominado sensor de voltaje (Figura 1). El segmento S4 está asociado al segmento S6 que participa en el mecanismo de compuerta de canal [15]. Las asas intracelulares tienen sitios de unión con segundos mensajeros o ligandos endógenos como las proteínas cinasas, el zinc y agentes oxidantes que modulan la cinética de los Ca_v3 [16]. Hasta la fecha no se han descrito subunidades accesorias necesarias para el funcionamiento de los Ca_v3 por lo que estos canales se forman sólo con la subunidad $\alpha 1$ [17]. Los Ca_v3 se dividen en tres subtipos: $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$. Cada uno de ellos presenta características particulares de cinética de canal y de distribución en el organismo [18]. Los Ca_v3 se ubican principalmente en el sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico, el sistema endócrino y el sistema cardiovascular [19]. Estos canales se abren a despolarizaciones pequeñas de membrana, producen una corriente de calcio pequeña a un voltaje cercano al

potencial de membrana de reposo conocido como corriente de ventana y su cinética es rápida con una conductancia pequeña comparada con la de los canales de calcio HVA.

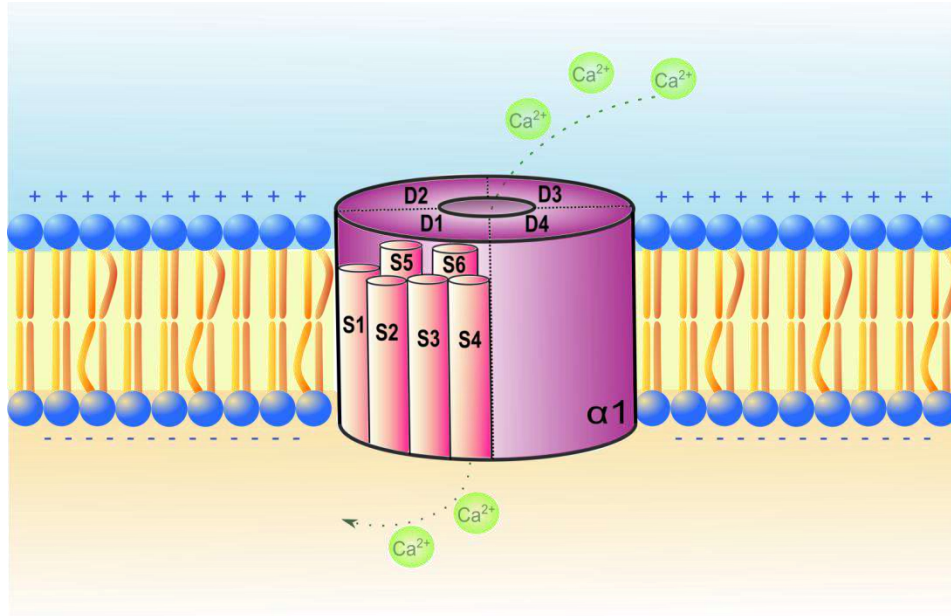


Figura 1. Estructura de los canales de calcio tipo T. Se ilustra el influjo de iones de calcio por estos canales. Se componen de 4 dominios (D1-D4) y cada uno de ellos contiene 6 segmentos transmembranales (S1-S6).

Las características biofísicas de los Ca_v3 favorecen su papel como reguladores de la excitabilidad celular y del comportamiento oscilatorio del potencial de membrana [20]. Por ello es que entre las funciones en que estos canales participan están la generación de potenciales de acción de bajo umbral LTS (por sus siglas en inglés *Low Threshold Spikes*) este tipo de disparo de potenciales de acción son importantes en la fase REM (por sus siglas en inglés *Rapid Eye Movement*) del sueño y en otras regiones del cerebro como en el núcleo del tálamo. Los Ca_v3 tienen una función marcapasos en el corazón, así como la de promover la secreción del péptido natriurético atrial ANP (por sus siglas en inglés *Atrial Natriuretic Peptide*). Además, participa en la contracción del músculo liso, la proliferación celular y la reacción acrosómica en la reproducción [1].

Las patofisiologías donde se ven involucrados son la epilepsia, el dolor neurogénico [1], en problemas cardíacos [2] y también en la depresión [4]. Dentro de estas enfermedades, las que tienen una mayor incidencia en la población mundial son las enfermedades cardíacas y los trastornos neurológicos (Figura 2). De acuerdo con la OMS (Organización Mundial de la Salud) en 2017 se registró un 31% de muertes en el mundo por enfermedades

cardiovasculares [21]. En México los decesos por cardiopatías representan un 65% de la población [22, 23].

Por otro lado, los trastornos neurológicos, la epilepsia y la depresión afectan el 1% y 4.4% respectivamente de la población mundial [24, 25]. En México los pacientes con epilepsia son alrededor de 1.2% de personas [22] mientras que la depresión afecta a un 4.1% [25]. En las canalopatías de mayor incidencia en la población mundial antes mencionadas se observa un aumento anormal en la actividad de los canales de calcio tipo T. Es por ello que moléculas bloqueadoras son de interés para tratamientos que se utilicen para combatir dichas enfermedades.

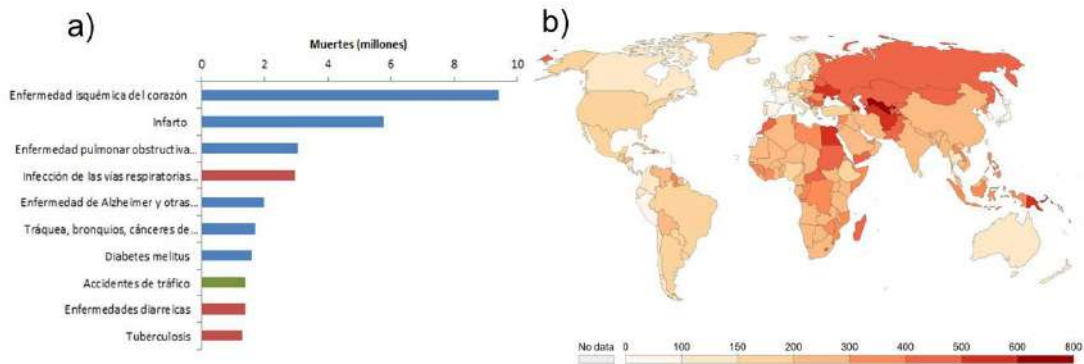


Figura 2. Estadística de muertes por enfermedades cardíacas. En a), gráfico de barras que muestra las principales causas de muerte en 2016. Las barras azules, rojas y verdes indican las enfermedades no transmisibles, las enfermedades transmisibles y las lesiones, respectivamente, modificada de (www.who.int). En b), mapa del número anual de muertes debido a enfermedades cardíacas establecido por cada 100,000 habitantes en 2017. Tomada de IHME, GBD (Global Burden Disease) OurWorldInData.org/causes-of-death.CC.33

2.2 Estudios experimentales y teóricos de los Ca_v

El estudio experimental más reciente es el realizado por Zhao y colaboradores, quienes resolvieron la estructura del canal $Ca_v3.1$ por microscopía crioelectrónica a una resolución de 3.1 y 3.3 Å en conjunto con el bloqueador Z944. Este bloqueador se ubica en el bolsillo de unión ubicado entre los dominios DII y DIII [26]. Cabe mencionar que en un estudio anterior se había resuelto la estructura del $Ca_v3.1$ a 23 Å de resolución y se pudo determinar que el $Ca_v3.1$ tiene un peso de ~320 kDa y una dimensión de ~115 x 85 x 95 Å. El $Ca_v3.1$ se puede dividir en dos regiones denominadas M y C, la primera ubicada en la parte apical y la segunda en la base, además de que la región del carboxilo terminal forma

una “cola” que se piensa puede tener la función de *pescar* proteínas regulatorias [27]. En la Figura 3 se muestra la estructura del $Ca_v3.1$ a dos resoluciones 23 Å y 3.1 Å. Con la misma técnica experimental de microscopía crio-electrónica se resolvió la estructura del canal de calcio tipo L ($Ca_v1.1$) a 3.9 Å [28], que después se refinó debido a que zonas del canal eran imprecisas de acuerdo a una métrica construida a partir de la sumatoria del área de contacto de aminoácidos pertenecientes al dominio sensor de voltaje, una región muy conservada en los canales iónicos [29].

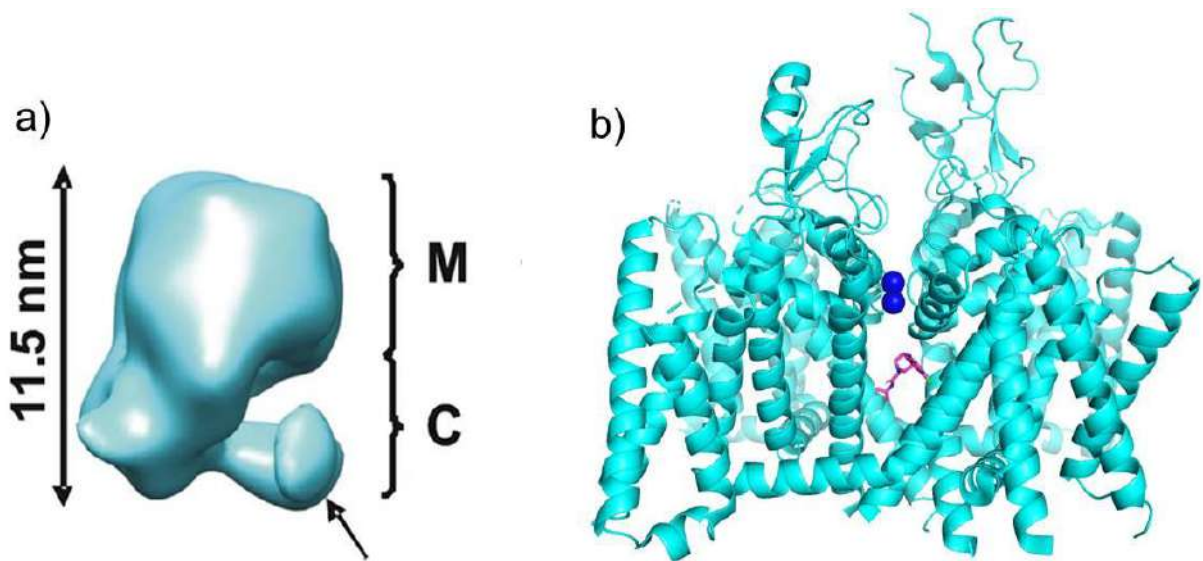


Figura 3. Estructura de rayos X de los canales Ca_v3 . En a), el canal $Ca_v3.1$ a una resolución de 23 Å, el canal tiene una altura de 11.5 nm y se divide en dos regiones denominadas M y C, la flecha indica el carboxilo terminal. En b), la estructura del canal $Ca_v3.1$ a una resolución de 3.3 Å, en azul marino se observan los dos iones de calcio dentro del poro y en magenta el bloqueador Z944.

Estudios de mutación en los canales de calcio tipo L han descrito un bolsillo de unión para los bloqueadores dihidropiridinas (DHD), fenilalquilaminas (PAA) y las benzodiazepinas (BTZ). Este sitio de unión contiene aminoácidos necesarios para unir a las moléculas bloqueadoras antes mencionadas en sitios localizados en el S5-DIII, el S6-DIII y el S6-DIV [30–32]. Otro estudio mutacional complementado con un estudio teórico de acoplamiento molecular sugiere un conjunto de residuos ubicados en el segmento S6 de DI importantes para la unión de mibefradil al canal de sodio Nav1.5 [33]. Estudios de acoplamiento molecular ayudaron a elucidar la interacción de DHP con el canal de calcio tipo T [34]. Además, se ha observado que el DIII de los Ca_v es un sitio preferente de unión para la protoxina (ProTx-II) [35].

2.3 Bloqueadores de los Ca_v3

Las moléculas bloqueadoras de los canales de calcio tipo T pueden dividirse en tres grupos: 1) iones inorgánicos, 2) moléculas orgánicas y 3) toxinas. El ión divalente usualmente utilizado para disecar a la corriente de calcio tipo T ha sido el ion níquel (Ni²⁺). Los tres subtipos tienen distintas afinidades siendo el Ca_v3.2 el más susceptible a bloquearse a una concentración IC₅₀=13 μM comparado con un IC₅₀=250 μM y IC₅₀=216 μM para bloquear a Ca_v3.1 y Ca_v3.3, respectivamente [36]. Otros iones inorgánicos como zinc (Zn²⁺) [37], cadmio (Cd²⁺), itrio (Y³⁺), lantano (La³⁺), cerio (Ce³⁺), neodimio (Nd³⁺), gadolinio (Gd³⁺), holmio (Ho³⁺), erbio (Er³⁺) e iterbio (Yb³⁺) bloquean también a los Ca_v3. Para los iones trivalentes la potencia de bloqueo IC₅₀ se presenta de acuerdo a la siguiente secuencia: Ho³⁺ (0.107 μM) < Y³⁺ (0.117 μM) < Yb³⁺ (0.124 μM) < Er³⁺ (0.153 μM) < Gd³⁺ (0.267 μM) < Nd³⁺ (0.429 μM) < Ce³⁺ (0.728 μM) < La³⁺ (1.015 μM) [38].

Dentro de los bloqueadores correspondientes a moléculas orgánicas, mibefradil fue el primer bloqueador de los canales Ca_v3 sintetizado para el tratamiento de hipertensión y angina de pecho aprobado por la FDA en 1997 [39], sin embargo, debido a que presentaba efectos secundarios cardiovasculares desfavorables salió del mercado. Se ha reportado también que mibefradil es capaz de bloquear a canales de calcio HVA, a los canales de sodio (Na_v1.5) [33] y a canales de potasio (K_v) [40]. Se han sintetizado derivados de mibefradil con el fin de evitar los efectos secundarios desfavorables, uno de estos derivados es el bloqueador NNC-550396. El NNC-550396 inhibe ambos canales de calcio HVA y LVA, pero tiene una mayor afinidad por estos últimos con un IC₅₀ de ~7 μM. Se atribuye el efecto de mibefradil para bloquear a los canales de calcio HVA por medio del metabolito dm-mibefradil. El NNC-550396 se construye reemplazando la cadena de acetato de metoxi de mibefradil por el ciclopropano-carboxilato [41] (ver Figura 4).

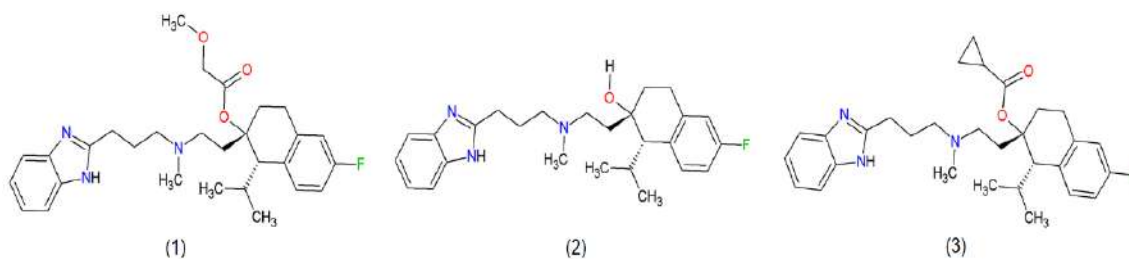


Figura 4. Estructura de (1) mibefradil (C₂₉H₃₅FN₃O₃), su metabolito (2) dm-mibefradil (C₂₆H₃₃FN₃O) y su derivado (3) NNC 55-0396 (C₃₀H₄₀FN₃O).

Existen otros bloqueadores pequeños como etosuximida y amilorida, ambos bloqueadores inespecíficos presentan un valor de $IC_{50} \sim 2.5 \text{ mM}$ y $IC_{50} = 62 \text{ }\mu\text{M}$ para $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$, respectivamente [42, 43]. Recientemente se han sintetizado los bloqueadores TTA-A2 [44], TTA-P2 [45] y Z944 [46] que tienen una potencia de bloqueo en un rango nanomolar. Se ha reportado que los bloqueadores aprobados para su uso clínico son etosuximida, ácido valproico, zonizamida, nimodipina, mientras que los bloqueadores que se encuentran en fase II son el Z944 y el ACT-709478 [17]. El fármaco Z944 adicionalmente ha ayudado a resolver la estructura del $Ca_v3.1$ experimentalmente [26] (Figura 5).

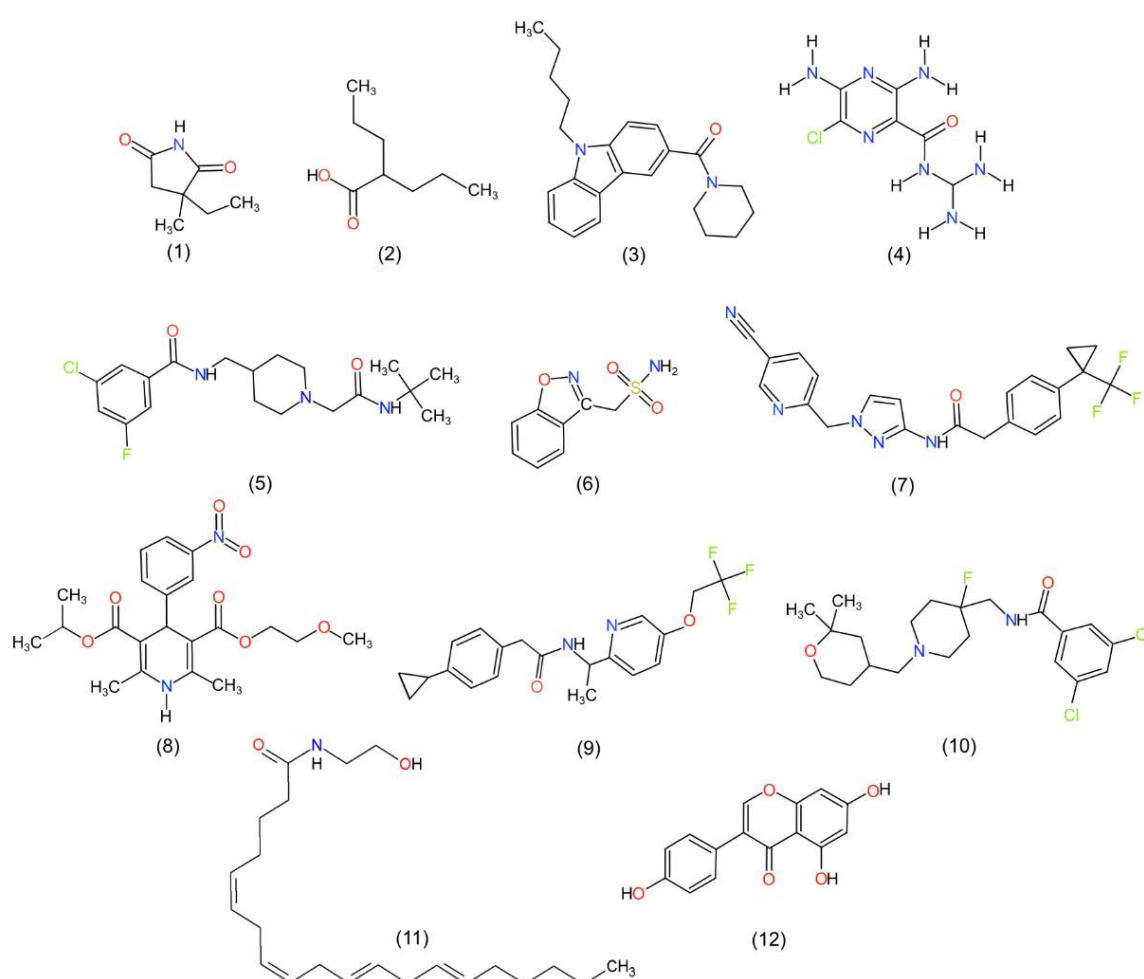


Figura 5. Estructura bidimensional de las moléculas orgánicas bloqueadoras de los Ca_v3 . Etosuximida (1), ácido valproico (2), amilorida (4), y zonizamida (6) son las estructuras más pequeñas. TTA-A2 (9), TTA-P2 (10) y Z944 (5) bloquean a los Ca_v3 en un rango nanomolar. El bloqueador Z944 y ACT-709478 (7) se encuentran en fase II para su uso clínico. Nimodipina (8) es un bloqueador inespecífico que también bloquea a los canales de calcio HVA. NMP-7 (3) y anandamida (11) adicionalmente son agonistas de los receptores CB1/CB2. Finalmente, genisteína (12) es una isoflavona con mayor afinidad al $Ca_v3.3$.

El bloqueador endógeno anandamida, además de bloquear a los canales de calcio tipo T [47], es ligante natural de los receptores CB1/CB2 [48] y este efecto dual es importante como terapia en el contexto de la fisiología del dolor. El endocannabonoide anandamida tiene una mayor afinidad por el subtipo $Ca_v3.2$, como muestra su IC_{50} de $4.15 \mu M$ para el canal $Ca_v3.1$, 330 nM para el canal $Ca_v3.2$ y $1.10 \mu M$ para el canal $Ca_v3.3$. Con este enfoque de efecto dual sobre los canales de calcio tipo T y sobre los receptores cannabinoides (CB1/CB2) se han sintetizado los compuestos NMP (por sus siglas en inglés *Neuro Molecular Production*) [9, 10]. De esta manera los compuestos NMP-7 y NMP-181 son agonistas del receptor CB2, mientras que NMP-4 es un agonista parcial del receptor CB1 y un agonista inverso del receptor CB2. Además, los compuestos NMP-7, NMP-4 y NMP-181 presentan un bloqueo de canales LVA con un IC_{50} de $1.84 \mu M$, $2.47 \mu M$ y $4.5 \mu M$, respectivamente [8–10].

Finalmente entre las moléculas bloqueadoras pertenecientes al grupo de las toxinas se ha observado que la toxina denominada kurtoxina, proveniente del escorpión *Parabuthus transvaalicus*, es capaz de bloquear a los Ca_v3 [49]. Una toxina muy similar proveniente también del escorpión pero de la especie *Parabuthus granulatus*, llamadas toxinas tipo kurtoxina I y II, pueden inhibir a los Ca_v3 así como los Ca_v1 [50]. La protoxina ProTx-II aislada de la tarántula *Thrixopelma pruriens* bloquea tanto a los canales $Ca_v3.1$ como a los Na_v [35].

2.4 Estudios espectroscópicos experimentales y teóricos de los Ca_v3

Para el bloqueador etosuximida se ha realizado un estudio espectroscópico teórico-experimental que incluye un análisis IR, UV, Raman, RMN (1H y ^{13}C), así como un análisis de confórmeros, NBO y de interacción de dímeros, todos ellos usando la metodología DFT [51]. Adicionalmente se ha encontrado que existe una correlación del parámetro EC_{50} (concentración efectiva máxima al 50%) con la energía del orbital LUMO para etosuximida junto con otros fármacos antiepilépticos como fenitoína, fenbarbital y carbamazepina [52]. Por otro lado, la molécula amilorida cuenta con estructura de rayos X [53] y se ha realizado un análisis de solvatación, confórmeros y MEP con métodos DFT y de simulación de dinámica molecular [54, 55]. Para el endocannabinoide anandamida, al contar con una estructura muy flexible se han realizado distintos trabajos explorando el espacio conformacional de esta molécula, junto con estudios espectroscópicos para modelar la estructura. Debido a que es una molécula que se considerará en estudios

posteriores de caracterización en este trabajo de tesis se profundizará en los estudios que se han realizado sobre ella. La anandamida presenta cuatro dobles enlaces en su cadena alquilo los cuales podrían tomar la configuración, todos-*cis*, *cis-trans-cis-trans* o todos-*trans*. Se ha observado que la anandamida, en su forma natural, tiene la configuración todos-*cis* como lo indica su nombre IUPAC [5,8,11,14-eicosatetraenamide,(N-2-hydroxyethyl)-(all-Z)] [56]. Estudios experimentales electrofisiológicos de la anandamida demuestran que esta región de dobles enlaces *cis*, junto con el grupo hidroxilo son importantes para la interacción con los canales de calcio tipo T [57]. Se han realizados estudios comparativos aplicando el método QSAR (por sus siglas en inglés *Quantitative Structure Activity Relationship*) de la anandamida con el compuesto trans- Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) y sus derivados [58, 59].

Otros estudios relacionados con la anandamida involucran la exploración de sus conformeros. Aplicando la metodología de memorias conformacionales y de calentado recocado CM/SA (por sus siglas en inglés *Conformational Memory/ Simulated Annealing*) se demuestra que en un ambiente no polar el conformero más poblado es el extendido seguido de la forma de U, mientras que en un ambiente polar es el híbrido de forma extendida/forma de U el más poblado seguido de la forma U simétrica [60, 61]. Además, de acuerdo con cálculos de dinámica molecular, la anandamida en un ambiente tipo membrana lipídica, el conformero extendido seguido del conformero de U son los más poblados [62]. Un modelo adicional, utilizando la misma metodología, muestra que existe una transición del conformero extendido al conformero de horquilla cuando la anandamida pasa de la membrana lipídica al receptor CB1 [63]. Existen otros trabajos que abordan este mismo fin pero apoyados en evidencia espectroscópica experimental. Por ejemplo, el trabajo de Chen *et. al.*, quienes realizan primero un estudio de espectroscopia RMN de H^1 y C^{13} bidimensional de alta resolución para establecer restricciones en los cálculos de simulación de dinámica molecular. Dando como resultados que el conformero pseudo-hélice seguido del conformero de U son los más probables de interacción con los receptores CB1/CB2 [64]. Un estudio de espectroscopia RMN de H^1 y C^{13} en combinación con simulaciones de Monte Carlo (MC), establecen que la anandamida prefiere la forma extendida con sus enlaces dobles *cis* en la cadena alquilo formando un anillo de siete átomos en el grupo etanolamida [65]. Usando la técnica NMR-REDOR (por sus siglas en inglés *Rotational Echo Double Resonance*) para la anandamida en un ambiente tipo

membrana DPPC (por sus siglas en inglés *Dipalmitoyl-Phosphatidyl-Choline*) se sugiere que la anandamida extendida se orienta como los fosfolípidos interactuando con su parte polar hacia el exterior y su parte no polar hacia los grupos alquilo [66]. Se ha observado a través de simulaciones de dinámica molecular que la flexibilidad de la anandamida es necesaria para el reconocimiento de ésta con la enzima FAAH, identificando tres grupos de conformeros de acuerdo a su linealidad en formas extendidas, formas de gancho y formas curvadas [67]. Sobre la interacción se sabe que el aminoácido F3.25 es importante en la interacción de la anandamida con el receptor CB1 [68]. Además un estudio de acoplamiento molecular sobre la estructura cristalina del receptor CB1 muestra el conformero de horquilla como una estructura importante en la interacción [69]. La estructura de rayos X del transportador de la anandamida FABP5 muestra una conformación en horquilla para la anandamida. Los dobles enlaces se muestran alternados (*cis-trans-cis-trans*) para la proteína en ratón y todos-*trans* en la proteína de humano [70]. Evaluando la actividad de la anandamida todo-*trans* y todos-*cis* se ha observado que ambos son buenos sustratos en interacción con FAAH [71]. Se ha observado que tanto la proteína FAAH como la FABP5 pueden hidrolizar a la anandamida [72], o que podría indicar que las formas alternadas y todos-*trans* podrían ser estructuras en proceso de metabolización que difieren de la anandamida en su forma natural con sus dobles enlaces-*cis*. Finalmente los compuestos NMP también cuentan con información de RMN de H¹ y C¹³ [9, 10]. La Tabla 1 muestra los trabajos espectroscópicos realizados experimentalmente y teóricamente sobre las moléculas bloqueadoras antes mencionadas.

Tabla 1. Bloqueadores del canal de calcio tipo T con valores de afinidad e información espectroscópica experimental o teórica.

Bloqueadores	Estudios experimentales	Estudios teóricos
Etosuximida	IR, UV, Raman, RMN (H ¹ y C ¹³) [51]	IR, UV, Raman, RMN (H ¹ y C ¹³) [51], NBO [73]
Amilorida	Rayos-X [53], IR, RMN (C ¹³ y N ¹⁵) [74]	MEP, Solvatación y Tautómeros [54]
Anandamida	Rayos-X [70], RMN (H ¹ y C ¹³) [57, 65]	Conformeros [60, 62, 64, 65, 75]
NMP	RMN (H ¹ y C ¹³) [8–10]	

Capítulo III. Fundamentos teóricos

3.1 Teoría del funcional de la densidad

Un sistema molecular de N electrones se puede modelar usando cálculos de la química cuántica computacional. La energía y otras propiedades observables del sistema molecular se obtienen al resolver la ecuación de Schrödinger:

$$\hat{H}\varphi_N = E\varphi_N \quad (1)$$

La ecuación (1) representa la ecuación de Schrödinger en su forma general, donde \hat{H} es el operador hamiltoniano, φ_N es la función de onda para N electrones y E es la energía del sistema. La función de onda o función de estado φ está en función de las coordenadas del sistema y del tiempo. Sin embargo, es la función $|\varphi(x, t)|^2 dx$ con significado físico, esto es, indica la densidad de probabilidad de encontrar a una partícula en el tiempo t en la posición x . El hamiltoniano, a su vez se define como la suma del operador de energía cinética \hat{T} más el operador de la energía potencial \hat{V} como se muestra en la ecuación (2):

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{V} = \frac{\hbar^2}{2m} \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) + V(x, y, z) \quad (2)$$

La forma analítica de los operadores de energía cinética y potencial corresponden a un sistema tridimensional. En la ecuación (2) m es la masa y \hbar se define como $\hbar \equiv h/2\pi$ siendo h la constante de Planck. Las ecuaciones (3) y (4) indican la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo e independiente del tiempo, respectivamente, donde $i = \sqrt{-1}$:

$$H\varphi = i\hbar \cdot \frac{\partial}{\partial t} \varphi \quad (3)$$

$$\frac{\hbar^2}{2m} \cdot \frac{d^2}{dx^2} \varphi(x) + \{E - \hat{V}(x)\} \varphi(x) = 0 \quad (4)$$

Los métodos de estructura electrónica tratan a un sistema molecular con N electrones y los efectos de éstos sobre los demás electrones del sistema. El modelo de moléculas polielectrónicas considera los parámetros de distancia de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros para definir la conformación molecular, en comparación con las moléculas diatómicas que sólo se definen por su distancia internuclear. Por ello, en un sistema polielectrónico los cálculos requieren un mayor costo computacional.

Las tres principales aproximaciones que se utilizan para calcular las propiedades de estructura electrónica son los métodos semi-empíricos, los métodos *ab initio*, y los métodos basados en la teoría del funcional de la densidad, que se describen brevemente a continuación.

Los métodos semi-empíricos utilizan un hamiltoniano simple considerando parámetros obtenidos de datos experimentales para realizar los cálculos. Los métodos *ab initio* (de primeros principios) utilizan un hamiltoniano verdadero considerando las constantes físicas necesarias y fundamentales para los cálculos. Finalmente, los métodos basados en la teoría del funcional de la densidad no calculan la función de onda molecular sino la densidad de probabilidad electrónica molecular para calcular la energía molecular y las propiedades del sistema. Esta última teoría se detalla a continuación debido a que se utiliza en el proyecto de tesis [76].

La teoría del funcional de la densidad DFT (por sus siglas en inglés *Density Functional Theory*) fue desarrollado en 1964 por Hohenberg y Kohn [77]. Se desarrolla considerando la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo (ecuación 4) y la aproximación de Born-Oppenheimer. La aproximación de Born-Oppenheimer considera a los núcleos como partículas fijas que generan el potencial externo V en donde los electrones se mueven. La teoría DFT proporciona soluciones aproximadas en términos de la densidad de probabilidad electrónica basadas en la existencia del funcional de energía $E_0(\rho(\vec{r}))$ con valor mínimo de energía en el estado fundamental $E_0(\rho_0(\vec{r}))$. La densidad de probabilidad electrónica del estado fundamental es una función que depende solamente de tres variables $\rho_0 = (x, y, z)$. El método Kohn-Sham es la base para determinar $\rho(\vec{r})$. Utiliza el principio variacional para expresar φ_N como un determinante de Slater $\varphi_N = [\varphi_1 \ \varphi_2 \ \varphi_3 \ \dots \ \varphi_N]$ donde φ_i satisface la ecuación de Schrodinger de una partícula con potencial efectivo (V_{eff}) asociado a N partículas no-interactuantes. La densidad se obtiene como:

$$\rho(\vec{r}) = \sum_{i=1}^N |\varphi_i|^2 \quad (5)$$

Considerando la aproximación de Born-Oppenheimer se establece que la función de onda electrónica del estado fundamental de una molécula de N electrones es una función propia del hamiltoniano puramente electrónico que se muestra en la ecuación (6):

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 + \sum_{i=1}^n v(r_i) + \sum_j \sum_{i>j} \frac{1}{r_{ij}} \quad (6)$$

$$v(r_i) = -\sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{r_{i\alpha}} \quad (7)$$

en donde $v(r_i)$ se define como el potencial externo y es como su nombre lo dice la energía potencial de la interacción entre el electrón i y los núcleos. El hamiltoniano puramente electrónico se define como la suma de la energía cinética electrónica T , atracciones electrón-núcleo V_{Ne} y repulsiones electrón-electrón V_{ee} . Tomando el promedio del hamiltoniano electrónico en el estado fundamental y siendo cada uno de estos promedios un funcional de ρ_0 se puede escribir la ecuación (8) de la siguiente manera:

$$E_0 = E_v[\rho_0] = \bar{T}[\rho_0] + \bar{V}_{Ne}[\rho_0] + \bar{V}_{ee}[\rho_0] \quad (8)$$

En la ecuación (8), $\bar{V}_{Ne}[\rho_0]$ se conoce y se define como $\int \rho_0(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r}$, mientras que los términos $\bar{T}[\rho_0]$ y $\bar{V}_{ee}[\rho_0]$ no se conocen de manera explícita, por lo que la ecuación (8) se puede reescribir como sigue:

$$E_0 = E_v[\rho_0] = \int \rho_0(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r} + \bar{T}[\rho_0] + \bar{V}_{ee}[\rho_0] = \int \rho_0(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r} + \bar{F}[\rho_0] \quad (9)$$

en donde el funcional $\bar{F}[\rho_0] = \bar{T}[\rho_0] + \bar{V}_{ee}[\rho_0]$ es independiente del potencial externo y no permite de manera práctica calcular E_0 a partir de ρ_0 debido a que $\bar{F}[\rho_0]$ es desconocido. Para ello es necesario aplicar el teorema variacional de Hohenberg-Kohn y el método de Kohn-Sham. El teorema variacional de Hohenberg-Kohn dice que para toda función de densidad de prueba $\rho_{pr}(r)$ que satisface $\int \rho_{pr}(r) = n$ y $\rho_{pr}(r) \geq 0$ para todo r , es válida la siguiente desigualdad:

$$\bar{T}[\rho_{pr}] + \bar{V}_{ee}[\rho_{pr}] + \int \rho_{pr}v(r) dr \geq E_v[\rho_0] \quad (10)$$

Lo que prueba que no cualquier densidad electrónica de prueba puede dar una energía del estado fundamental menor a la verdadera densidad electrónica del estado fundamental $E_v[\rho_{pr}] \geq E_v[\rho_0]$.

El método Kohn-Sham proporciona un método práctico para obtener ρ_0 y E_0 a partir de ρ_0 , sin embargo, como existe un funcional desconocido se obtienen resultados aproximados. Considera un sistema de referencia ficticio (s) denominado *sistema no-interactuante* de N electrones que experimentan la energía potencial $v_s = (r_i)$, que hace que la densidad de probabilidad electrónica del estado fundamental del sistema de referencia sea igual a la

densidad electrónica del estado fundamental exacta $\rho_s(r) = \rho_0(r)$. Los electrones no interactúan entre sí en el sistema de referencia y su hamiltoniano se define como:

$$\hat{H}_s = \sum_{i=1}^n \left[-\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_s(r_i) \right] \equiv \sum_{i=1}^n \hat{h}_i^{KS} \quad (11)$$

en donde \hat{h}_i^{KS} es el hamiltoniano de un electrón de Kohn-Sham y se define como $\hat{h}_i^{KS} = -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_s(r_i)$. Kohn y Sham reescriben la ecuación (9) al definir $\Delta\bar{T}[\rho_0]$ como la diferencia de la energía cinética electrónica media del estado fundamental de la molécula y el estado de referencia de electrones no interactuantes con densidad electrónica igual a la de la molécula como se observa en la ecuación (12). El promedio de la repulsión electrón-electrón de la densidad electrónica en estado fundamental $\bar{V}_{ee}[\rho_0]$ se define en la ecuación (13) y ambos parámetros se consideran para obtener la ecuación (14):

$$\Delta\bar{T}[\rho_0] \equiv \bar{T}[\rho_0] - \bar{T}_s[\rho_0] \quad (12)$$

$$\Delta\bar{V}_{ee}[\rho_0] \equiv \bar{V}_{ee}[\rho_0] - \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 \quad (13)$$

$$E_v[\rho_0] = \int \rho(r)v(r)dr + \bar{T}_s[\rho_0] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 + \Delta\bar{T}[\rho_0] + \Delta\bar{V}_{ee}[\rho_0] \quad (14)$$

En la ecuación (13) r_{12} es la distancia entre dos puntos, la cantidad $\frac{1}{2} \iint \rho(r_1)\rho(r_2)r_{12}^{-1} dr_1 dr_2$ es la expresión clásica de la energía de repulsión electrostática inter-electrónica cuando los electrones están dispersos en una distribución continua de carga con densidad electrónica ρ . Los funcionales $\Delta\bar{T}$ y $\Delta\bar{V}_{ee}$ son desconocidos y la suma de ellos se define como el funcional de la energía de correlación de intercambio $E_{ci}[\rho_0]$ como lo muestra la ecuación (15):

$$E_{ci}[\rho_0] \equiv \Delta\bar{T}[\rho_0] + \Delta\bar{V}_{ee}[\rho_0] \quad (15)$$

Sustituyendo la ecuación (15) en la ecuación (14) se tiene:

$$E_0 = E_v[\rho_0] = \int \rho(r)v(r)dr + \bar{T}_s[\rho_0] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 + E_{ci}[\rho_0] \quad (16)$$

El potencial de correlación de intercambio se obtiene de la derivada de la energía de correlación e intercambio como se muestra en la ecuación (17):

$$v_{ci}(r) \equiv \frac{\delta E_{ci}[\rho(r)]}{\delta \rho(r)} \quad (17)$$

Se utilizan diferentes aproximaciones para obtener el término de correlación e intercambio E_{ci} , dentro de las que se incluyen el método de aproximación densidad local LDA (por sus siglas en inglés *Local Density Approximation*), el método de aproximación densidad de spin local LSDA (por sus siglas en inglés *Local Spin Density Approximation*) y la aproximación de gradiente generalizado GGA (por sus siglas en inglés *Generalized Gradient Approximation*). En este trabajo utilizamos los métodos DFT: BLYP, B3LYP, M06-2X, PBE0 y BP86 y se describe abajo la aproximación que utilizan para determinar el término E_{ci} [76].

Los métodos BLYP y B3LYP son funcionales híbridos, desarrollados por Becke, Lee, Yang y Parr. Para BLYP la energía de intercambio es una combinación del funcional de intercambio de Becke [78] con el funcional de correlación por Lee, Yang y Parr [79]. Mientras que el funcional B3LYP combina la energía de intercambio con la energía exacta de Hartree-Fock (HF) como se muestra en la ecuación (18):

$$E_{xc}^{B3LYP} = (1 - a_0)E_x^{LSDA} + a_0E_x^{HF} + a_x\Delta E_x^{B88} + a_cE_c^{LYP} + (1 - a_c)E_c^{VWN} \quad (18)$$

donde E_x^{LSDA} , es el funcional de intercambio con la aproximación LSDA (local spin density approximation), E_x^{HF} es el funcional de intercambio HF, ΔE_x^{B88} es la corrección de gradiente de Becke al funcional de intercambio, E_c^{LYP} es el funcional de correlación de Lee, Yang y Parr, E_c^{VWN} es la aproximación de densidad local de VWN (Vosko, Wilk y Nusair) al funcional de correlación y las 3 constantes $a_0 = 0.2$, $a_x = 0.72$ y $a_c = 0.81$ [80].

M06-2X es un funcional de correlación-intercambio meta-GGA híbrido, desarrollado en la universidad de Minnesota, que depende de tres variables: densidad de spin (ρ_σ), gradiente de densidad de spin reducido χ_σ y la densidad de energía cinética de spin τ_σ . Utiliza una doble cantidad de intercambio no-localizado (2X) y está parametrizado para moléculas que no contienen metales. Se recomienda para estudios termoquímicos, de cinética y para interacciones no-covalentes [81].

PBE0 es un funcional de la densidad que no contiene parámetros empíricos, adquiere su nombre por sus autores Perdew, Burke y Ernzerhof. Este funcional combina la energía de intercambio PBE con la energía de intercambio HF de acuerdo a la ecuación (19):

$$E_{xc}^{PBE0} = E_{xc}^{PBE} + \frac{1}{4}(E_x^{HF} - E_x^{PBE}) \quad (19)$$

El funcional PBE0 aporta una buena exactitud para estructuras moleculares y propiedades de las moléculas de toda la tabla periódica con una conexión directa con las propiedades físicas [82].

Finalmente, el funcional BP86 es de tipo GGA que incorpora la dependencia de la densidad electrónica y su gradiente [83]. Se compone del funcional de intercambio de Becke [78] y del funcional de correlación de Perdew [84]. Este funcional da buenos resultados en moléculas que presenten puentes de hidrógeno intramoleculares en su estructura [85].

3.2 Funciones de base

Las funciones de base X_r se utilizan para representar a los Orbitales Moleculares (OM) ϕ_i . Cada OM ϕ_i se representa como una combinación lineal ecuación (20) de uno o más orbitales tipo Slater (STO), que tiene la forma como se muestra en la ecuación (21) para moléculas lineales y como en la ecuación (22) para moléculas no lineales:

$$\phi_i = \sum_i C_{ri} X_{ri} \quad (20)$$

$$\chi(r_a, \theta_a, \phi_a) = N r_a^{n-1} e^{-\zeta r_a} Y_l^m(\theta_a, \phi_a) \quad (21)$$

$$\chi(r_a, \theta_a, \phi_a) = N r_a^{n-1} e^{-\zeta r_a} \frac{(Y_l^{m*} \pm Y_l^m)}{2^{1/2}}(\theta_a, \phi_a) \quad (22)$$

en donde Y_l^m es un armónico esférico y N es la constante de normalización. Cada OM se describe por una combinación lineal de diferentes funciones de base χ .

La evaluación de las funciones de base de moléculas poliatómicas causa dificultades en la resolución de las integrales necesarias, consumiendo mucho tiempo computacional. Para acelerar dicha evaluación se utilizan las funciones tipo gaussiana GTF (por sus siglas en inglés *Gaussian Type Functions*) como muestra la ecuación (23), la cuales consideran una constante de normalización gaussiana cartesiana como muestra la ecuación (24). Las funciones gaussianas se usan como una combinación lineal normalizada de funciones gaussianas individuales como se muestra en la ecuación (25):

$$g_{ijk} = N x_b^i y_b^j z_b^k e^{-\alpha r_b^2} \quad (23)$$

$$N = \left(\frac{2\alpha}{\pi}\right)^{3/4} \left[\frac{(8\alpha)^{i+j+k} i! j! k!}{(2i)!(2j)!(2k)!}\right]^{1/2} \quad (24)$$

$$X_r = \sum_u d_{ur} g_u \quad (25)$$

En la ecuación (23) i, j, 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 . En la ecuación (24) cuando $i + j + k = 0$ la GTF se denomina gaussiana de tipo s ; cuando $i + j + k = 1$ la gaussiana es de tipo p , que contiene el factor x_b, y_b o z_b . Cuando $i + j + k = 2$ la gaussiana es de tipo d , que contiene los factores $x_b^2, y_b^2, z_b^2, x_b y_b, x_b z_b$ y $y_b z_b$. En la ecuación (25) X_r se denomina función tipo gaussiana contraída CGTF (por sus siglas en inglés *Contract Gaussian Type Functions*), las g_u (gaussianas primitivas) son las gaussianas cartesianas normalizadas centradas en el mismo átomo y con los mismos valores i, j, k que las otras, pero diferentes a α . Los coeficientes de contracción d_{ur} son constantes que se mantienen fijas durante el cálculo.

La forma en que las funciones de base pueden modificarse es incrementando el número de funciones para representar un orbital atómico, esto se conoce como conjuntos de base de valencia desdoblada SV (por sus siglas en inglés *Split Valence*) [76]. Por ejemplo, el conjunto de base doble zeta (Dunning) [86] utiliza combinaciones lineales de dos diferentes tamaños para cada orbital molecular y en el caso del conjunto de base 6-311G (Pople) [87], se utilizan 3 distintos tamaños de funciones contraídas para representar un orbital.

Los conjuntos de base polarizados permiten modificar la forma del orbital, esto es que ayudan a describir distorsiones de la nube electrónica en un ambiente molecular. Añaden 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. Esto es “d” para los átomos de litio al flúor, “f” para metales de transición y funciones “p” para los átomos de hidrógeno. Un ejemplo común es una base doble zeta más polarización denotada como DZ + P o DZP. Las funciones difusas son necesarias para cálculos que consideran aniones debido a que los orbitales de estos sistemas tienen una tendencia a la expansión, se denotan con un signo de más (+) o “aug” para las bases de Pople y Dunning, respectivamente.

En este trabajo de tesis se utilizaron los siguientes conjuntos de funciones base: de Pople (6-31+G(d,p), 6-311G(d,p), 6-311+G(d,p), 6-311++G(d,p)) [87], de Aldrich (TZV) [88] y de Dunning (cc-pVDZ, aug-cc-pVDZ, cc-pVTZ, aug-cc-pVTZ, cc-pVQT) [86].

3.3 Espectroscopia IR y RMN

Espectroscopia IR

La espectroscopia infrarroja (IR) es la técnica basada en el estudio de las vibraciones de los átomos en una molécula que ocurre cuando la radiación infrarroja interactúa con la molécula. La radiación infrarroja cubre el intervalo de 12000cm^{-1} a 10cm^{-1} y se divide en IR lejano (200cm^{-1} - 10cm^{-1}), IR medio (4000cm^{-1} - 200cm^{-1}) e IR cercano (12000cm^{-1} - 4000cm^{-1}). El espectro infrarrojo se construye con la fracción de radiación incidente absorbida a una energía en particular de la muestra. Una molécula puede tener regiones infrarrojas activas o inactivas de acuerdo a las reglas de selección. Para que una molécula pueda mostrar absorciones en el infrarrojo debe poseer un momento dipolar eléctrico que cambie durante las vibraciones. De esta forma una molécula diatómica heteronuclear es activa al infrarrojo porque el momento dipolar de la molécula cambia cuando el enlace de unión se expande y se contrae, al contrario de una molécula diatómica homonuclear, cuyo momento dipolar es cero durante la vibración [89].

Los niveles de energía vibracional E_v de una molécula diatómica consideran la aproximación del oscilador armónico y está determinado por la ecuación (26):

$$E_v = h\nu \left(v + \frac{1}{2} \right) \quad (26)$$

en donde la frecuencia vibracional clásica es $\nu = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{k}{\mu} \right)^{1/2}$ y puede tomar los números cuánticos vibracionales $\nu = 0, 1, 2, \dots, n$, también puede modificarse para que utilice directamente los valores de los números de onda para las frecuencias vibracionales de enlace como $\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \left(\frac{k}{\mu} \right)^{1/2}$ donde c es la velocidad de la luz. Siendo μ la masa reducida definida como $\mu = m_1 m_2 / m_1 + m_2$ y k la constante de fuerza. La constante de fuerza es una medida de la fuerza del resorte en el modelo masa-resorte de la frecuencia vibracional. La fuerza del resorte en un enlace representa el balance de las repulsiones nucleares, las repulsiones electrónicas y las atracciones electrón-núcleo [90].

Los tipos de vibración que tiene una molécula se denominan modos vibracionales. Una molécula diatómica tiene 3 grados de libertad traslacionales, 2 grados de libertad rotacionales y un modo vibracional que corresponde al estiramiento y compresión del

enlace de unión. Una molécula poliatómica lineal con N número de átomos tiene $3N - 5$ modos vibracionales mientras que una molécula poliatómica no-lineal tiene $3N - 6$ modos vibracionales o grados de libertad vibracionales. Las moléculas poliatómicas en total tienen $3N$ grados de libertad como lo muestra la Tabla 2. Los modos vibracionales son de: estiramiento simétrico o asimétrico o *stretching* (ν), flexiones en el plano simétricas o asimétricas o *bending* (β), flexiones tipo *scissoring* (σ) o tijereteo y *rocking* (ρ) o balanceo y flexiones simétricas y asimétricas fuera del plano conocidas como *wagging* (ω) o aleteo y *twisting* (τ) o torsión [89].

Tabla 2. Grados de libertad de moléculas poliatómicas.

Grados de libertad	Lineal	No-lineal
Traslacional	3	3
Rotacional	2	3
Vibracional	$3N - 5$	$3N - 6$
Total	$3N$	$3N$

El momento de transición entre dos estados de vibración superior e inferior está dado por la ecuación (27):

$$\mu_{nm} = \int \psi_n^* \mu \psi_m d\tau \quad (27)$$

en donde ψ_n y ψ_m son las funciones de onda de los estados de vibración superior e inferior respectivamente y μ es el momento dipolar eléctrico. Cuando el movimiento rotacional es puro, μ es constante, para una molécula diatómica homonuclear μ es igual a cero, para una molécula diatómica heteronuclear $\mu \neq 0$ y varía en x . El momento dipolar μ cambia por la variación de la longitud del enlace y se expresa como una serie de expansión de Taylor como se representa en la ecuación (28):

$$\mu(r) = \mu_0 + \left(\frac{d\mu}{dr}\right)_0 q + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2\mu}{dr^2}\right)_0 q^2 + \dots \quad (28)$$

donde μ_0 es el momento del dipolo eléctrico permanente y $q = r - r_e$ siendo r_e la distancia en equilibrio. Si sustituimos la ecuación (28) en la ecuación (27) y consideramos los primeros términos tenemos la ecuación (29):

$$\mu_{nm} = \int \psi_n^* \left[\mu_0 + \left(\frac{d\mu}{dr}\right)_0 q \right] \psi_m d\tau = \int \psi_n^* \left(\frac{d\mu}{dr}\right)_0 q \psi_m d\tau \quad (29)$$

La regla de selección para un oscilador armónico simple es $\Delta\nu = \pm 1$. La relación de población entre el nivel ν , N_ν y la población total N está dada por la ecuación (30):

$$\frac{N_\nu}{N} = \frac{e^{-E_\nu/kT}}{\sum_i^N e^{-E_i/kT}} = \frac{e^{-E_\nu/kT}}{Z_{vib}} \quad (30)$$

en donde Z_{vib} es la función de partición de vibración. Es importante señalar que las reglas de selección indican solamente si una transición puede ocurrir, pero no da información de la intensidad de ésta [90, 91].

Espectroscopia RMN

Por otro lado, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica que proporciona información de la estructura de una molécula. Históricamente se utilizaba para visualizar a los protones y por ello se asume que la resonancia magnética nuclear puede ser sinónimo de resonancia magnética de protón a menos que se especifique el núcleo que se está estudiando. Un núcleo con un número de masa o número atómico impar tiene un espín nuclear y puede ser detectado por un espectrómetro de RMN. Las propiedades básicas de un protón son su masa, carga y espín o momento angular intrínseco. El movimiento de giro de un protón genera un campo magnético parecido al de un imán de barra o de una corriente circular [92]. El campo magnético de una corriente circular es equivalente al de un dipolo magnético de momento μ_I definido en la ecuación (31):

$$\mu_I = g_N \frac{e}{2M_p} h \sqrt{I(I+1)} \quad (31)$$

en donde g_N es el factor g nuclear, M_p es la masa del protón, e es la carga electrónica y $\sqrt{I(I+1)}h$ es la longitud o magnitud del vector momento angular de espín. El dipolo magnético nuclear precesa alrededor del eje del campo cuando está sometido el protón en un campo magnético uniforme de fuerza H . Este movimiento de precesión es similar al del movimiento de un trompo sometido a la fuerza de gravedad. La frecuencia de precesión angular llamada frecuencia de Larmor está dada por ω y la relación giromagnética está definida por γ en las ecuaciones (32) y (33):

$$\omega = \gamma H \quad (32)$$

$$\gamma = \frac{\text{momento magnético}}{\text{momento angular}} = \frac{\mu_I}{\sqrt{I(I+1)}h} \quad (33)$$

En ausencia del campo magnético externo, los momentos magnéticos de los protones se orientan al azar. Sin embargo, en presencia de campo magnético externo cada momento magnético de protón se alinea con el campo magnético externo o en contra de éste. El estado de menor energía es el que se alinea con el campo magnético externo. La energía E debida a esta interacción magnética viene dada por la ecuación (34):

$$E = \mu_I H \cos \theta \quad (34)$$

en donde θ es el ángulo entre el eje del dipolo y la dirección del campo, toma valores cuantizados en el espacio. Para un protón de espín $I = \frac{1}{2}$ sólo hay dos valores posibles de θ . La proyección del vector del momento angular de espín sobre el eje de cuantización es igual a $\frac{1}{2}\hbar$ y $-\frac{1}{2}\hbar$, que puede escribirse también como $M_I \hbar$ donde M_I es el número cuántico de espín magnético y toma valores de $\pm \frac{1}{2}$. Siendo μ_H el componente de μ_I en la dirección del campo, definiendo las ecuaciones (35), ecuación (36) y ecuación (37):

$$\cos \theta = \frac{\mu_H}{\mu_I} \quad (35)$$

$$E = -\mu_H \cdot H \quad (36)$$

$$\mu_H = g_N \beta_N M_I \quad (37)$$

En la ecuación (37), β_N es el magnetón nuclear y se define como $\beta_N = (e/2M_p c)\hbar$. Si sustituimos la ecuación (37) en la ecuación (36) se obtiene la ecuación (38):

$$E = -g_N \beta_N H M_I \quad (38)$$

Cuando el espín es de $\frac{1}{2}$, $M_I = \pm \frac{1}{2}$ y tiene un nivel de energía inferior de $-\frac{1}{2} g_N \beta_N H$, correspondiente al alineamiento con el campo externo y un nivel de energía superior de $\frac{1}{2} g_N \beta_N H$, correspondiente al alineamiento en contra del campo externo.

Cuando la radiación electromagnética de una frecuencia ν satisface la condición de resonancia de la ecuación (39) pueden ocurrir transiciones entre los niveles Zeeman. Para un sistema compuesto por un conjunto de protones no interactuantes, la relación de población de protones entre el estado $M_I = -\frac{1}{2}$, $n_{-\frac{1}{2}}$ y el estado $M_I = \frac{1}{2}$, $n_{\frac{1}{2}}$ está dada por la expresión de Boltzmann de la ecuación (40):

$$\Delta E = h\nu = g_N \beta_N H \quad (39)$$

$$\frac{n_{-\frac{1}{2}}}{n_{+\frac{1}{2}}} = e^{-g_N \beta_N H / kT} \quad (40)$$

El espín nuclear I para cualquier núcleo puede ser cero, un número semientero o un entero. Este número está determinado por el número másico A y el número atómico Z del núcleo. Las siguientes reglas se utilizan para determinar el valor de I : a) si A es impar y Z es par o impar, I es semientero, b) si A y Z son pares, I es cero y c) si A es par y Z es impar, I es entero. En los sistemas biológicos se trabajan comúnmente con el núcleo de H^1 y C^{13} porque son los elementos más comunes, sin embargo es posible realizar un estudio de RMN de núcleos con espín no nulo como el de N^{15} , F^{19} y P^{31} , entre otros elementos [91].

3.4 Orbitales moleculares (OM) y Mapa de potencial electrostático (MEP)

Orbitales moleculares, OM

Los orbitales moleculares (OM/ ϕ_i) se expresan como combinaciones lineales de funciones de base (χ_s). Para representar de manera exacta un OM se debe tomar una serie completa de funciones de base, lo que llevaría a contar con un número infinito de éstas, sin embargo, en la práctica se utiliza un número finito (b) de funciones de base. Haciendo una buena elección de las funciones de base y considerando un número suficientemente grande podemos obtener un error despreciable. Además, los coeficientes asociados (c_{si}) se obtienen mediante la resolución de las ecuaciones de Roothaan propuesto en 1951 como se muestra en la ecuación (41):

$$\phi_i = \sum_{s=1}^b c_{si} \chi_s \quad (41)$$

Se piensa que la hibridación se da solamente en presencia de algunas geometrías moleculares, pero cálculos de SCF (por sus siglas en inglés, *Self-Consistent Field*) demuestran que todos los OM tienen hibridación en alguna medida. De esta forma, cualquier OM σ de una molécula diatómica es una combinación lineal de orbitales atómicos (OA) $1s, 2s, 2p_0, 3s, 3p_0, \dots$ de los átomos separados. Para saber que OA contribuye a un OM dado se considera que sólo los OA tipo σ ($s, p\sigma, d\sigma, \dots$) contribuyen a los OM tipo σ , solamente los OA tipo π ($p\pi, d\pi, \dots$) contribuyen a los OM tipo π y así sucesivamente. Además, de que solamente los OA de energía similar contribuyen sustancialmente a un OM dado.

Tanto los OM de moléculas diatómicas homonucleares como los de moléculas diatómicas heteronucleares se aproximan mediante combinaciones lineales de orbitales atómicos. Sin embargo, para los OM de moléculas diatómicas heteronucleares, en una aproximación simple, se toma cada OM de valencia como combinación lineal de dos OA, ϕ_a y ϕ_b , uno sobre cada átomo, de manera que a partir de los dos OA se puedan formar dos OM como se muestra en la ecuación (42):

$$c_1\phi_a + c_2\phi_b \text{ y } c'_1\phi_a + c'_2\phi_b \quad (42)$$

La falta de simetría de las moléculas diatómicas heteronucleares hace que se obtengan coeficientes con valores diferentes. Los coeficientes c_1 y c_2 son positivos de manera que aportan carga entre los núcleos en el OM enlazante heteronuclear. Mientras que los c'_1 y c'_2 tienen cargas opuestas causando una disminución de la carga para el OM antienlazante heteronuclear. Los coeficientes se obtienen al resolver una ecuación que considera al hamiltoniano efectivo monoeléctrico. Como resultado se forma un OM enlazante y antienlazante a partir de los OA para los casos homonuclear y heteronuclear.

En el caso de moléculas poliatómicas se considera el hamiltoniano no relativista puramente electrónico definido de acuerdo a la ecuación (43):

$$\hat{H}_{el} = -\frac{1}{2}\sum_i \nabla_i^2 - \sum_i \sum_\alpha \frac{Z_\alpha}{r_{i\alpha}} + \sum_i \sum_{j>i} \frac{1}{r_{ij}} \quad (43)$$

Si no se toman en consideración las repulsiones electrón-electrón, la función de onda de orden cero es el producto de funciones espaciales de un electrón (orbitales moleculares). Para moléculas poliatómicas, los OM pueden clasificarse con base en las especies de simetría de los grupos puntuales moleculares. Dentro de las propiedades de un OM, se pueden mencionar que: a) cada OM mantiene dos electrones de espín opuesto, b) cuando los OM tienen la misma energía forman una capa y c) la especificación del número de electrones de cada capa forma la configuración electrónica molecular [76].

La teoría de los orbitales moleculares frontera FMO (por sus siglas en inglés *Frontier Molecular Orbital*) predice la reactividad relativa basada en las propiedades de estructura electrónica de los sistemas. Se formula en términos de la teoría de perturbaciones de segundo orden de acuerdo a la ecuación (44):

$$\Delta E = -\sum_{A,B}^{\text{átomos}} (\rho_A + \rho_B) \langle \chi_A | \mathbf{V} | \chi_B \rangle \langle \chi_A | \chi_B \rangle + \sum_{A,B}^{\text{átomos}} \frac{Q_A Q_B}{R_{AB}} +$$

$$[\sum_{i \in A}^{OM\ oc} \sum_{a \in B}^{OM\ vir} + \sum_{i \in B}^{OM\ oc} \sum_{a \in A}^{OM\ vir}] \frac{2 (\sum_{\alpha}^{OA} c_{i\alpha} c_{a\alpha} \langle \chi_{i\alpha} | \mathbf{V} | \chi_{a\alpha} \rangle)^2}{\varepsilon_i - \varepsilon_a} \quad (44)$$

El primer término de la ecuación representa la repulsión entre orbitales moleculares ocupados conocido como repulsión eléctrica; el segundo término representa las interacciones atractivas o repulsivas entre regiones cargadas de las moléculas; y el tercer término corresponde a una interacción estabilizante ($\varepsilon_i - \varepsilon_a < 0$) debida a la combinación de orbitales ocupados de una molécula con orbitales vacíos de la otra. Los parámetros A y B representan los átomos en cada una de las moléculas que interactúan; \mathbf{V} es un operador que contiene a su vez todos los operadores de energía potencial de las moléculas que participan en la reacción; $\langle \chi_A | \mathbf{V} | \chi_B \rangle$ es la integral de resonancia entre dos orbitales atómicos, uno de cada molécula; ρ_A y ρ_B representan la densidad electrónica de los átomos A y B, respectivamente; Q_A y Q_B es la carga neta del átomo A y el átomo B, respectivamente; $c_{i\alpha}/c_{a\alpha}$ y $\varepsilon_i/\varepsilon_a$ corresponden a los coeficientes y las energías de los OM involucrados. Finalmente, la suma corresponde a todos los orbitales ocupados o no. Si las moléculas involucradas son muy polares, la reacción se considera controlada por la carga, mientras que si dichas moléculas son no polares el tercer término domina y la reacción se considera controlada por los orbitales. Se observa en el tercer término que la mayor contribución a la doble suma sobre pares de orbitales se produce cuando el denominador tiene un valor pequeño que corresponde al orbital molecular más alto ocupado HOMO (por sus siglas en inglés *Highest Occupied Molecular Orbital*) y al orbital molecular más bajo desocupado LUMO (por sus siglas en inglés *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). Las propiedades químicas de una molécula son controladas por los orbitales de valencia. De esta manera, los ataques nucleofílicos son controlados por el orbital HOMO y los ataques electrofílicos son controlados por el orbital LUMO. La reacción de un nucleófilo implica la adición de electrones a un electrófilo. La reacción se produce entre el orbital HOMO del nucleófilo con el orbital LUMO del electrófilo. De manera similar, la reacción de un electrófilo implica la toma de electrones de un nucleófilo [93]. La diferencia de las energías de los orbitales HOMO y LUMO define a la energía gap y se representa en la ecuación (45):

$$\Delta E = (E_{LUMO} - E_{HOMO}) \quad (45)$$

Esta diferencia es un indicador de estabilidad cinética y termodinámica de un sistema molecular, un gap grande HOMO-LUMO implica una estabilidad cinética alta y una baja reactividad.

Potencial electrostático molecular, MEP

El potencial eléctrico ϕ en un punto P del espacio, se define como el trabajo ω necesario para desplazar una carga de prueba infinitesimal Q_t desde el infinito a P como se denota en la ecuación (46):

$$\phi_P \equiv \frac{\omega_{\infty \rightarrow P}}{Q_t} \quad (46)$$

El potencial eléctrico del espacio alrededor de un punto de carga Q se obtiene de acuerdo a la ecuación (47) y si se consideran varias cargas puntuales cada una de ellas contribuyen en ϕ como se representa en la ecuación (48):

$$\phi_P = \frac{Q}{4\pi\epsilon_0 d} \quad (47)$$

$$\phi_1 = \sum_i \frac{Q_i}{4\pi\epsilon_0 r_{1i}} \quad (48)$$

en donde ϵ_0 es la permitividad o constante eléctrica, d es la distancia entre el punto P y la carga y r_{1i} es la distancia entre el punto 1 y el punto $i = 1,2,3 \dots n$. Un sistema molecular se compone de un conjunto de cargas nucleares y electrónicas puntuales. Sin embargo, es posible modelar a los electrones como una nube de carga, de esta manera la probabilidad de encontrar un electrón en un volumen determinado está dada por ρ , que se define como la densidad de probabilidad electrónica. La suma de las contribuciones de la carga electrónica molecular y de los núcleos α establece el potencial eléctrico molecular como:

$$\phi(x_1, y_1, z_1) = \sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}e}{4\pi\epsilon_0 r_{1\alpha}} - e \iiint \frac{\rho(x_2, y_2, z_2)}{4\pi\epsilon_0 r_{12}} dx_2 dy_2 dz_2 \quad (49)$$

en donde r_{12} es la distancia entre los puntos 1 y 2 y la integración se extiende por todo el espacio. Se denomina a ϕ como potencial electrostático molecular o MEP (por sus siglas en inglés *Molecular Electrostatic Potential*) y se representa comúnmente como un mapa de contorno alrededor del sistema molecular. Tiene unidades SI de voltios, sin embargo, al multiplicarse por la carga del electrón e se convierten en julios y considerando la constante de Avogadro se transforma en julios por mol. El MEP en un punto P es la energía de

interacción eléctrica molar entre la molécula y la carga de prueba de magnitud e situada en el punto P si se considera que la molécula no está polarizada por la carga de prueba. El MEP en $\phi(x, y, z)$ indica la energía de interacción entre una carga de prueba no polarizada ubicada en (x, y, z) y la distribución en la molécula de las cargas nucleares y las cargas electrónicas [76].

3.5 Orbitales de enlace natural (NBO)

El concepto de orbitales de enlace natural fue descrito por Löwdin, quien denotó a un conjunto único de funciones electrónicas ortonormales $\theta_i(\vec{r})$ que son intrínsecas a las funciones de onda de un sistema de N electrones $\psi(1, 2, \dots, N)$. Las θ_i pueden considerarse *eigen*-orbitales de ψ para describir la densidad electrónica $\rho(\vec{r})$ de ψ . Los orbitales naturales, por la adaptación de simetría, tienen un efecto de deslocalización que no tiene un significado físico, lo que limita su uso en describir orbitales para fines pedagógicos. Para eliminar los efectos asociados a la adaptación de simetría, se formula un criterio de localización para los orbitales que tienen el carácter de ocupación máxima (natural) en regiones localizadas de 1-centro (par solitario) o 2-centros (enlace). La ocupación máxima, de acuerdo al principio de exclusión de Pauli, es limitada a un par de electrones. De esta forma las ocupaciones suficientemente cercanas a 2.00 pueden servir como orbitales naturales “verdaderos” y pueden acoplarse al diagrama de estructura tipo Lewis. El análisis de orbitales de enlace natural se construye como una secuencia de conjunto de orbitales localizados naturales que incluye a los orbitales atómicos naturales (NAO), orbitales híbridos naturales (NHO), los conjuntos de orbitales moleculares semi-localizados (NLMO), orbitales atómicos (AO) y los orbitales moleculares canónicos (MO). De acuerdo con un orbital de enlace simple cada enlace NBO σ_{AB} puede escribirse en términos de dos orbitales híbridos de valencia (NHOs) h_A, h_B sobre los átomos A y B con los correspondientes coeficientes de polarización c_A, c_B como se muestra en la ecuación (50):

$$\sigma_{AB} = c_B h_A - c_A h_B \quad (50)$$

El cual puede variar desde un enlace covalente ($c_A = c_B$) a un enlace iónico ($c_A \gg c_B$). Cada enlace de valencia NBO debe tener su correspondiente *anti*-enlace de valencia NBO como lo muestra la ecuación (51):

$$\sigma_{AB}^* = c_A h_A + c_B h_B \quad (51)$$

El orbital NBO donador tipo “Lewis” se complementa por el orbital NBO aceptor tipo “no-Lewis” el cual está formalmente vacío dentro del esquema idealizado de las estructuras de Lewis. La energía de estabilización debida a las interacciones donador–aceptor $\sigma \rightarrow \sigma^*$ se puede estimar por la teoría de perturbación de segundo orden. Para cada donador NBO (i) y aceptor NBO (j), la energía de estabilización $E^{(2)}$ asociada con la deslocalización electrónica entre donador y aceptor se calcula de acuerdo con la ecuación (52):

$$E^{(2)} = q_i \frac{(F_{i,j})^2}{\varepsilon_j - \varepsilon_i} \quad (52)$$

en donde q_i es el orbital ocupado, ε_i e ε_j son los elementos de la diagonal y $F_{i,j}$ son los elementos fuera de la diagonal de la matriz de Fock. En general un estudio NBO nos permite obtener ocupaciones, orden y tipo de enlace y cargas asociadas con cargas atómicas [94].

3.6 Descriptores de reactividad global

Para determinar la reactividad de las moléculas bloqueadoras de canal se utilizan los descriptores de reactividad global obtenidos con base en las definiciones de potencial de ionización y afinidad electrónica. Los índices que se consideran en este trabajo incluyen al potencial químico (μ), la electronegatividad (χ), la dureza (η), la blandura (S) y el índice de electrofilicidad (ω).

El potencial químico (μ) se define como los cambios de energía del sistema con respecto al número de electrones N sujeto a un potencial externo fijo como lo describe la ecuación (53). Está asociado con la facilidad que tiene un sistema en su estado fundamental para intercambiar densidad electrónica con el ambiente. En términos del potencial de ionización $I = -E_{HOMO}$ y la afinidad electrónica $A = -E_{LUMO}$ es posible denotar al potencial químico de acuerdo a la ecuación (54) y la ecuación (55):

$$\mu = \left(\frac{\partial E}{\partial N} \right)_{v(r)} \quad (53)$$

$$\mu \approx -\frac{(I+A)}{2} \quad (54)$$

$$\mu \approx \frac{(E_{HOMO} + E_{LUMO})}{2} \quad (55)$$

La electronegatividad (χ) se define como la resistencia que tiene un sistema en estado base de perder densidad electrónica, es el negativo del potencial químico como se muestra en la ecuación (56):

$$\chi = -\mu \approx \frac{(I+A)}{2} \quad (56)$$

La dureza (η) se define como el cambio en el potencial químico electrónico μ de un sistema respecto a un número de electrones que se encuentran a un potencial externo fijo como se ve en la ecuación (57). Denotando la dureza en términos de I y A se construyen la ecuación (58) y la ecuación (59):

$$\eta = \left(\frac{\partial \mu}{\partial N} \right)_{v(r)} = \left(\frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right)_{v(r)} \quad (57)$$

$$\eta \approx \frac{(I-A)}{2} \quad (58)$$

$$\eta \approx \frac{(E_{LUMO} - E_{HOMO})}{2} \quad (59)$$

La blandura (S) se define como el inverso de la dureza y está determinado por la ecuación (60):

$$S = \frac{1}{\eta} \quad (60)$$

Finalmente, el índice de electrofilicidad (ω) es una medida de la energía de estabilización cuando un sistema en su estado fundamental adquiere una cantidad de densidad electrónica del ambiente, como lo expresa la ecuación (61) [95]:

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (61)$$

3.7 Descriptores de reactividad local

En esta sección se explican los fundamentos teóricos de dos descriptores de reactividad local utilizados en este proyecto, que son las funciones de Fukui y las funciones de Parr. La función de Fukui se define como la derivada del potencial químico (μ) con respecto al potencial externo ($v(r)$), producido por el núcleo, a un número constante de electrones (N) como se muestra en la ecuación (62):

$$f(\vec{r}) = \left(\frac{\delta \mu}{\delta v(\vec{r})} \right)_N \quad (62)$$

Se obtiene el potencial químico μ^- y μ^+ , que corresponden a una pérdida o ganancia de carga en la molécula, respectivamente. Las funciones de Fukui se definen de acuerdo con las ecuaciones (63)–(66):

$$f_k^- = q_k(N) - q_k(N - 1) \quad (63)$$

$$f_k^+ = q_k(N + 1) - q_k(N) \quad (64)$$

$$f_k^{(0)} = \frac{1}{2}(f_k^+ + f_k^-) \quad (65)$$

$$f_k^{(2)} = f_k^+ - f_k^- \quad (66)$$

en donde q_k es la población electrónica del k -ésimo átomo de la molécula con $N-1$, N y $N+1$ electrones. De esta manera la ecuación (63) corresponde a la capacidad de una molécula a donar un electrón mientras que la ecuación (64) corresponde a la capacidad de aceptar un electrón. En otras palabras f_k^- corresponde a un ataque electrofílico, f_k^+ a un ataque nucleofílico y $f_k^{(0)}$ es el promedio de las otras dos derivadas mostrando áreas más susceptibles a ataques por un radical [96]. La ecuación (66) corresponde al descriptor dual, el cual está definido como la diferencia entre las funciones de Fukui nucleofílica y electrofílica, lo cual hace posible caracterizar ambos comportamientos [97]. Cabe mencionar que la función de Fukui se definió por Parr y Yang en 1984 y que los valores mayores de f_k^- y f_k^+ corresponde a una mayor reactividad en los sitios correspondientes [98].

Por otro lado, las funciones de Parr son propuestas por Domingo en 2014 [99], las cuales se definen mediante las ecuaciones (67) y (68) para ataque electrofílico y ataque nucleofílico, respectivamente:

$$P^-(\mathbf{r}) = \rho_s^{rc}(\mathbf{r}) \quad (67)$$

$$P^+(\mathbf{r}) = \rho_s^{ra}(\mathbf{r}) \quad (68)$$

en donde el término $\rho_s^{rc}(\mathbf{r})$ corresponde a la densidad de spin atómica o ASD (por sus siglas en inglés *Atomic Spin Density*) del átomo \mathbf{r} del catión de una molécula en particular, mientras que $\rho_s^{ra}(\mathbf{r})$ es el ASD del átomo \mathbf{r} del anión. Cada ASD localizado en diferentes átomos de la especie catiónica y de la especie aniónica de una molécula proporciona las funciones de Parr nucleofílicas P_k^- y electrofílicas P_k^+ locales de la molécula neutra. Cabe mencionar que las funciones de Parr se encuentran en el contexto del análisis topológico de

las funciones de localización de electrón ELF (por sus siglas en inglés *Electron Localization Function*) que caracterizan el mecanismo molecular de reacciones orgánicas que involucran la participación de enlaces dobles C=C en un ambiente polar, no-polar e iónico [95].

3.8 Teoría de átomos en moléculas (QTAIM)

La Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas QTAIM (por sus siglas en inglés *Quantum Theory of Atoms in Molecules*) es una teoría interpretativa que explica la química de manera alternativa utilizando una descripción mecano-cuántica a través de la densidad de carga electrónica, denotada matemáticamente como $\rho(r)$. Donde $\rho(r)$ es la densidad de probabilidad de encontrar cualquiera de los N electrones en un volumen diferencial y que es lo mismo que densidad de carga (cantidad de carga por unidad de volumen). De esta forma ρ se define como densidad de carga electrónica y es un observable físico.

Para poder definir los conceptos de átomo, enlace y tipo de enlace se utilizan los conceptos de gradiente y laplaciano de ρ . El origen de la densidad puede ser empírico o teórico y define dos fundamentos en química: el átomo y el enlace.

Dada una función escalar tridimensional $f(x, y, z)$ se define el gradiente como un campo vectorial obtenido como:

$$\nabla f = \frac{\partial f}{\partial x} \vec{i} + \frac{\partial f}{\partial y} \vec{j} + \frac{\partial f}{\partial z} \vec{k} \quad (69)$$

La densidad de carga electrónica ρ es una entidad tridimensional sobre la cual se identifican distintos puntos críticos que tienen un significado físico. Un punto crítico en la densidad electrónica es un punto en el espacio en el cual la primera derivada de la densidad es nula. La caracterización topológica de ρ se realiza identificando la naturaleza y posición de sus puntos críticos por medio de la condición de punto crítico:

$$\nabla \rho = i \frac{d\rho}{dx} + j \frac{d\rho}{dy} + k \frac{d\rho}{dz} = \vec{0} \quad (70)$$

En la ecuación (70) el vector cero $\vec{0}$ significa que cada derivada individual en el operador gradiente es igual a cero. Es posible identificar mínimos locales, máximos locales o puntos de silla al considerar las segundas derivadas de $\rho(r)$, los cuales se colocan en la matriz

hessiana. La ecuación (71) contiene los valores propios del hessiano de $\rho(r)$ en los puntos críticos $H(\rho)$:

$$H(\rho) = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 \rho}{\partial x \partial x} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial x \partial y} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial x \partial z} \\ \frac{\partial^2 \rho}{\partial y \partial x} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial y \partial y} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial y \partial z} \\ \frac{\partial^2 \rho}{\partial z \partial x} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial z \partial y} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial z \partial z} \end{pmatrix} \quad (71)$$

El hessiano transformado en su forma diagonal se escribe en la ecuación (72):

$$\Lambda = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 \rho}{\partial x'^2} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{\partial^2 \rho}{\partial y'^2} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{\partial^2 \rho}{\partial z'^2} \end{pmatrix}_{r'=r_c} = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3 \end{pmatrix} \quad (72)$$

En la ecuación (72) λ_1, λ_2 y λ_3 son las curvaturas de la densidad con respecto a los tres ejes principales x', y', z' . El laplaciano de una función tridimensional, en este caso ρ es una función escalar definida como la suma de los elementos diagonales del hessiano de ρ :

$$\nabla^2 \rho(r) = \frac{\partial^2 \rho(r)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \rho(r)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \rho(r)}{\partial z^2} \quad (73)$$

El laplaciano de forma directa indica donde la función considerada está localmente concentrada o dispersa: a) si $\nabla^2 \rho > 0$ entonces la función ρ está localmente dispersa y b) si $\nabla^2 \rho < 0$ entonces la función ρ está localmente concentrada.

El número de valores propios distintos de cero es el rango del punto crítico y su firma es la suma de los signos de los valores propios -1 para negativo y +1 para uno positivo. De esta manera cada punto crítico se caracteriza por su (rango, firma). En la Tabla 3 se muestran los distintos tipos de puntos críticos.

Tabla 3. Los puntos críticos de acuerdo al rango y la firma.

(3,-3)	Tres valores propios negativos. Se tiene un máximo en ρ
(3,+3)	Tres valores propios positivos. Se tiene un mínimo en ρ
(3,-1)	Dos valores propios negativos. Se tiene un punto de silla en ρ
(3,+1)	Dos valores propios positivos. Se tiene un punto de silla en ρ

Los núcleos se comportan como puntos críticos (3,-3). Se define una trayectoria o camino gradiente como la trayectoria trazada por el vector $\nabla\rho$. Las propiedades de la trayectoria que ayudan a definir un átomo son:

- a) Por definición, el gradiente en un punto es tangente a la trayectoria que pasa por ese punto.
- b) Por cualquier punto donde el gradiente distinto a cero ($\nabla\rho\neq 0$) pasa sólo una trayectoria.
- c) Por lo anterior, las trayectorias no se cruzan excepto donde el gradiente es igual a cero ($\nabla\rho=0$).
- d) Las trayectorias tienen un principio y un fin, para el gradiente ($\nabla\rho$) en sentido de las trayectorias es infinito hacia los núcleos, de modo que muchas trayectorias acaban en los núcleos y se dice que son atractores nucleares.

En una molécula, los núcleos actúan como puntos atractores inmersos en una nube de carga negativa ($\rho(r)$). La densidad electrónica es un observable físico y determina la apariencia y forma de la materia. Sin embargo, no se considera la densidad en sí misma sino el campo que se obtiene al seguir las trayectorias trazadas por los vectores del gradiente (ver Figura 6).

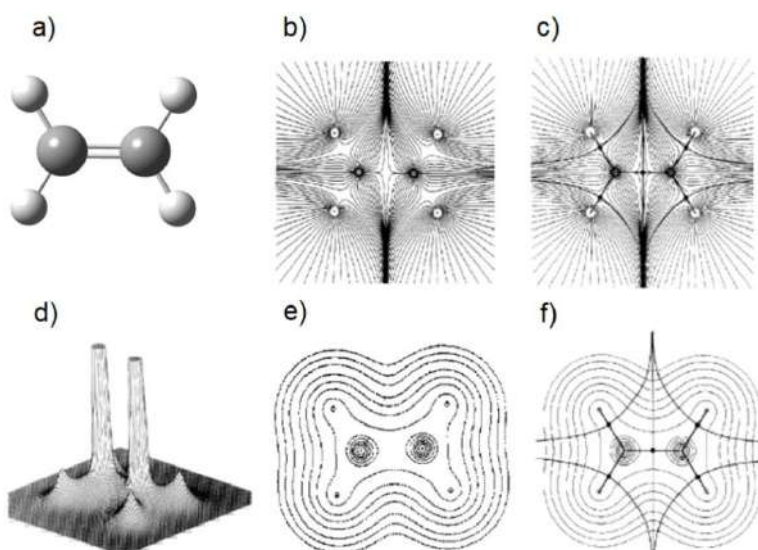


Figura 6. Modelo del eteno de acuerdo a la teoría QTAIM. En a) la estructura tridimensional del eteno obtenida en el programa GaussView; en b) el mapa del campo del vector gradiente de la densidad electrónica; en c) el mapa del campo del vector gradiente de la densidad electrónica con trayectorias; en d)

mapa de relieve de la distribución espacial de la densidad electrónica; en e) el mapa de contorno del eteno y en f) el mapa de contorno del eteno con trayectorias.

Desde el punto de vista topológico, un átomo en una molécula se define como un atractor nuclear y su cuenca. Esto es, la zona delimitada por superficies de flujo cero denominadas superficies interatómicas ($\nabla \rho \cdot n = 0$). Entre cada par de átomos enlazados aparece un punto crítico de enlace BCP (por sus siglas en inglés *Bond Critical Point*), el cual se encuentra contenido en la superficie de separación interatómica (la de flujo cero) entre dos átomos próximos. El BCP define una línea a través del espacio en la cual la densidad electrónica es máxima (ρ_b). El valor de ρ_b está relacionado con el concepto de orden de enlace, valores mayores corresponden a enlaces más fuertes. Las trayectorias que se originan en BCP y terminan en los núcleos enlazados definen las líneas de interacción atómica AIL (por sus siglas en inglés *Atomic Interaction Line*), donde ρ es máxima comparada con cualquier trayectoria vecina, de esta manera se definen los enlaces químicos [100].

Otros parámetros topológicos incluyen los cálculos de la energía cinética Lagrangiana G , densidad de energía potencial V , la energía cinética hamiltoniana H y la energía de interacción $E_{H...Y}$, estos dos últimos parámetros se obtienen a partir de las ecuaciones (74) y (75).

$$H(r) = G(r) - V(r) \quad (74)$$

$$E_{H...Y} = \frac{1}{2}V(r) \quad (75)$$

3.9 Modelado por homología

Los fundamentos en los que se basan los estudios de modelado por homología son los siguientes: a) la estructura tridimensional de una proteína está asociada con la función fisiológica que realiza en el organismo. Esto quiere decir que las proteínas que realizan la misma función o pertenecen a una familia evolutiva similar tienen una estructura similar; b) la conformación estructural de una proteína se conserva en mayor medida que los aminoácidos de su secuencia. Lo que implica que cambios pequeños o medianos en su secuencia primaria resultará generalmente en cambios pequeños en la estructura tridimensional; c) Los sitios funcionales mantienen un plegado estructural idéntico de manera que serán similares en proteínas que comparten una función o una familia

evolutiva. A falta de información experimental de la estructura tridimensional de una proteína se realiza un modelo comparativo con estructuras moleculares conocidas. La estructura que se predice se denomina “problema” y se construye a partir de una estructura denominada “plantilla”.

En general, los pasos a seguir para realizar un modelado por homología son: a) en primer lugar se identifica la proteína que servirá como plantilla la cual contará con una estructura conocida; b) se realiza un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la secuencia problema y la secuencia plantilla; c) se identifican regiones estructurales conservadas y se predicen regiones variables estructurales, incluyendo las regiones pertenecientes al amino y carboxilo terminal que no estén definidas; d) se construye el modelo estructural para la proteína problema; e) se refina y optimiza la estructura que se predice y f) finalmente se valida el modelo proteico.

Debido a que en este proyecto de tesis utilizamos el programa *Modeller* para realizar el estudio de modelado por homología detallamos el procedimiento que utiliza. El programa *Modeller* realiza un modelado por satisfacción de restricciones espaciales. Las restricciones consideran las distancias y los ángulos diedros de la secuencia “problema” extraídos de la estructura “plantilla” homóloga. A su vez considera las restricciones estereoquímicas obtenidas de los campos de fuerza (CHARMM-22) con base en la mecánica molecular. También considera preferencias estadísticas de los ángulos diedros y las distancias interatómicas de no-enlace obtenidas de un conjunto representativo de proteínas conocidas. Finalmente considera restricciones definidas por el usuario que pueden tomarse de estructuras espectroscópicas, información de espectroscopia RMN, entre otras. Las restricciones espaciales se expresan en términos de funciones de densidad de probabilidad pdfs (por sus siglas en inglés *probability density functions*) las cuales se combinan dentro de una función objetivo para optimizarse por medio de una combinación del método de gradiente conjugado y de cálculos de dinámica molecular con simulado recocido. Finalmente, el programa *Modeller* calcula automáticamente un modelo que excluye solamente a los átomos de hidrógeno [101].

3.10 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular (*molecular docking*) es una técnica computacional que ayuda a predecir la interacción no-covalente receptor (macromolécula)-ligante (molécula pequeña).

Las predicciones son importantes para el desarrollo de nuevos fármacos. El acoplamiento molecular utiliza un algoritmo de búsqueda para generar un número de configuraciones que el ligante puede tomar en el receptor. Algunos algoritmos conocidos que se usan incluyen algoritmos de empalme y métodos estocásticos como el algoritmo genético y el algoritmo de Monte Carlo. Adicionalmente, se establece una función de puntaje que permite establecer las mejores poses durante la interacción ligante-receptor. El acoplamiento molecular puede realizarse considerando al receptor y/o el ligante rígidos o flexibles. En general, el proceso del acoplamiento molecular incluye los siguientes pasos:

- a) La preparación de la proteína: se busca en bases de datos como PDB (por sus siglas en inglés *Protein Data Bank*) la estructura de la proteína en estudio. Se eliminan las moléculas de agua que no sean importantes para la interacción, se agregan los aminoácidos faltantes, se estabilizan las cargas, se agregan cadenas laterales de residuos aminoacídicos, etc.
- b) La preparación del ligante: se busca la estructura tridimensional del ligante en bases de datos cristalográficas, información de RMN, PubChem o ZINC, o se obtiene de un cálculo de estructura electrónica.
- c) La predicción del sitio activo: se realiza el cálculo de acoplamiento molecular para obtener el sitio de interacción ligante-receptor y las mejores poses del ligante durante la interacción [102].

En este trabajo de tesis se utilizó el programa *Autodock Vina* que utiliza el algoritmo genético como algoritmo de muestreo y el parámetro de energía libre de Gibbs ΔG como función de puntaje (ecuación 76). El algoritmo genético contiene los siguientes pasos:

- a) Los grados de libertad del ligante se codifican como cadenas binarias llamadas genes
- b) Los genes forman cromosomas, los cuales representan al ligante
- c) Los operadores genéticos que modifican a los cromosomas pueden ser: mutación, entrecruzamiento, selección y reemplazo.
- d) Los cromosomas evolucionan con iteraciones llamadas generaciones
- e) Se genera una población inicial que contiene un conjunto de cromosomas con diversidad estructural

f) El algoritmo genético se detiene cuando se alcanza la solución óptima

La ecuación (76) muestra la energía libre de unión $\Delta G_{unión}$ como la suma de la energía libre del disolvente ΔG_{solv} , la energía libre del conformero ΔG_{conf} , la energía libre de interacción ΔG_{inter} , la energía libre de rotación ΔG_{rot} , la energía libre del complejo ΔG_{comp} y la energía libre de vibración ΔG_{vib} :

$$\Delta G_{unión} = \Delta G_{solv} + \Delta G_{conf} + \Delta G_{inter} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{comp} + \Delta G_{vib} \quad (76)$$

En particular, la función de puntaje contiene una forma funcional general de la parte dependiente de la conformación como se muestra en la ecuación (77):

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij}) \quad (77)$$

En la ecuación (77) la suma es sobre todos los pares de átomos que se mueven relativos entre sí y se incluyen de uno a cuatro interacciones. A cada átomo i se le asigna un tipo de átomo t_i y un conjunto simétrico de funciones de interacción dadas por $f_{t_i t_j}$ de la distancia interatómica r_{ij} . La sumatoria puede verse como la suma de las contribuciones intermoleculares (c_{inter}) e intramoleculares (c_{intra}): $c = c_{inter} + c_{intra}$. El algoritmo de optimización descrito previamente intenta encontrar un mínimo global para c en términos de los valores de energía libre obtenidas para cada una de las conformaciones [103].

3.11 Simulaciones de Dinámica Molecular

Las simulaciones de dinámica molecular MD (por sus siglas en inglés *Molecular Dynamic Simulations*) utilizan los principios de la mecánica molecular para modelar un sistema molecular. En un cálculo de mecánica molecular se establecen las coordenadas atómicas iniciales y los tipos de átomos. Los tipos de átomos se asignan dependiendo del número atómico del átomo y del entorno molecular, esto es, los átomos vecinos o grupos funcionales a los que está unido el átomo de estudio. Considera los parámetros de constante de fuerza de tensión y de flexión de enlace, así como las interacciones de los átomos no enlazados, todos ellos contribuyen a la energía potencial del sistema como muestra la ecuación (78):

$$V = V_{ten} + V_{flex} + V_{ffp} + V_{tor} + V_{cruz} + V_{vdW} + V_{el} \quad (78)$$

en donde la energía potencial de la mecánica molecular llamada también energía estérica V es la suma de la energía potencial del estiramiento del enlace V_{ten} , la flexión del ángulo de enlace V_{flex} , la flexión fuera del plano V_{ffp} , la rotación interna o torsión en torno a los enlaces V_{tor} , la interacción de los movimientos previos que forman un término cruzado V_{cruz} , las atracciones y repulsiones de van der Waals entre átomos no ligados V_{vdW} y las interacciones electrostáticas V_{el} . El conjunto de parámetros de la energía estérica con sus expresiones explícitas define un campo de fuerza. A continuación, se detallan las expresiones explícitas de la ecuación (78).

La energía potencial de tensión V_{ten} se define como la suma de las energías potenciales para la tensión de cada enlace de la molécula extendido a todos los pares de átomos enlazados (1,2) entre sí, como muestra la ecuación (79):

$$V_{ten} = \sum_{1,2} V_{ten,ij} \quad (79)$$

$$V_{ten,ij} = \frac{1}{2} k_{IJ} (I_{ij} - I_{IJ}^0)^2 \quad (80)$$

Se utiliza para $V_{ten,ij}$ la aproximación del oscilador armónico como se muestra en la ecuación (80), en donde I_{ij} es la longitud de enlace, I_{IJ}^0 es la longitud de referencia, I y J son los tipos de átomos de los átomos i y j , respectivamente.

La energía potencial de flexión del enlace V_{flex} se define como la suma de las energías potenciales para la flexión de cada ángulo de enlace de la molécula, como en la ecuación (81):

$$V_{flex} = \sum V_{flex,ijk} \quad (81)$$

$$V_{flex,ijk} = \frac{1}{2} k_{IJK} (\theta_{ijk} - \theta_{IJK}^0)^2 \quad (82)$$

En la ecuación (82) $V_{flex,ijk}$ se toma como una ecuación cuadrática, en donde θ_{IJK}^0 es el valor de referencia para el ángulo de enlace IJK .

La energía del potencial de flexión fuera de plano V_{ffp} se utiliza para forzar la planaridad de grupos funcionales localizados dentro del plano y permite que las frecuencias vibracionales se reproduzcan mejor. Se define de acuerdo a la ecuación (83) en donde x representa la media de los ángulos fuera del plano para cada átomo que participa en el ángulo estudiado.

$$V_{ffp} = \frac{1}{2} k_{ffp} x_{ffp}^2 \quad (83)$$

La energía potencial de torsión V_{tor} se define como la suma de todos los pares de átomos 1,4 de un ángulo diedro determinado y se expresa como en la ecuación (84):

$$V_{tor,ijkl} = \frac{1}{2} V_n [1 + \cos (n\phi - \phi_0)] \quad (84)$$

en donde ϕ es el ángulo diedro $D(ijkl)$, n da el número de mínimos contenidos en 360° del potencial de torsión y ϕ_0 determina las posiciones de los mínimos.

El potencial de los términos cruzados V_{cruz} contiene las interacciones entre los movimientos de tensión, flexión y torsión. Se construyen los términos tensión-flexión y tensión-tensión para dos enlaces al mismo átomo y los términos tensión-torsión, flexión-torsión y flexión-flexión para dos ángulos con un átomo central común. La ecuación (85) muestra la forma de uno de los términos más comunes tensión-flexión:

$$V_{cruz} = \frac{1}{2} k_{12} (\Delta l_1 + \Delta l_2) \Delta \theta \quad (85)$$

en donde $\Delta l_1, \Delta l_2$ y $\Delta \theta$ son las desviaciones de las longitudes de enlace y el ángulo de enlace respecto a los valores de referencia.

El potencial de las atracciones y repulsiones de van der Waals entre átomos no ligados V_{vdW} se define como la suma de todas las interacciones posibles entre pares de átomos como muestra la ecuación (86). En mecánica molecular los átomos 1,2 son átomos ligados entre sí, los átomos 1,3 están separados por dos enlaces, los átomos 1,4 están separados por tres enlaces y así sucesivamente:

$$V_{vdW} = \sum_{1,>4} V_{vdW,ij} \quad (86)$$

$$V_{vdW,ij} = \varepsilon_{IJ} \left[\left(\frac{R_{IJ}^*}{R_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{IJ}^*}{R_{ij}} \right)^6 \right] = 4 \varepsilon_{IJ} \left[\left(\frac{\sigma_{IJ}}{R_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{IJ}}{R_{ij}} \right)^6 \right] \quad (87)$$

En la ecuación (86) los pares de átomos i y j incluyen todas las interacciones posibles de pares de átomos 1,4, 1,5 o mayor, cada término de van der Waals de un par $V_{vdW,ij}$ es la suma de una atracción por las fuerzas de dispersión de London y un término de repulsión por la repulsión de Pauli. En la ecuación (87) R_{ij} es la distancia de los átomos i y j , ε_{IJ} es el parámetro de profundidad de pozo donde el valor de $V_{vdW,ij}$ se encuentra en el mínimo

de la curva de interacción, R_{IJ}^* da el valor de R_{ij} en el mínimo de $V_{vdW,ij}$ y σ_{IJ} es la distancia en donde $V_{vdW,ij} = 0$.

El potencial de interacción electrostática V_{el} se define como la suma de interacciones electrostáticas de todos los pares de átomos excepto para los pares 1,2 y 1,3 como se muestra en la ecuación (88):

$$V_{el} = \sum_{1, \geq 4} V_{el,ij} \quad (88)$$

$$V_{el,ij} = \frac{Q_i Q_j}{\epsilon_r R_{ij}} \quad (89)$$

En la ecuación (88) los átomos i y j incluyen todas las interacciones posibles de pares de átomos 1,4, 1,5 o mayor. En la ecuación (89) $V_{el,ij}$ se calcula asignando cargas atómicas parciales Q_i a cada átomo usando la energía potencial coulombiana y ϵ_r es la constante dieléctrica del disolvente [76].

Capítulo IV. Metodología

La metodología general utilizada en la tesis se resume en el esquema de la Figura 7. En donde se observa que por un lado se estudiaron las moléculas bloqueadoras de canales LVA con cálculos de estructura electrónica y de espectroscopia molecular desde el enfoque de la química cuántica. Por otro lado, se estableció la estructura de la proteína receptora, el canal de calcio tipo T, con un estudio de modelado por homología. Finalmente, se abordó el estudio de la interacción usando las técnicas de acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular.

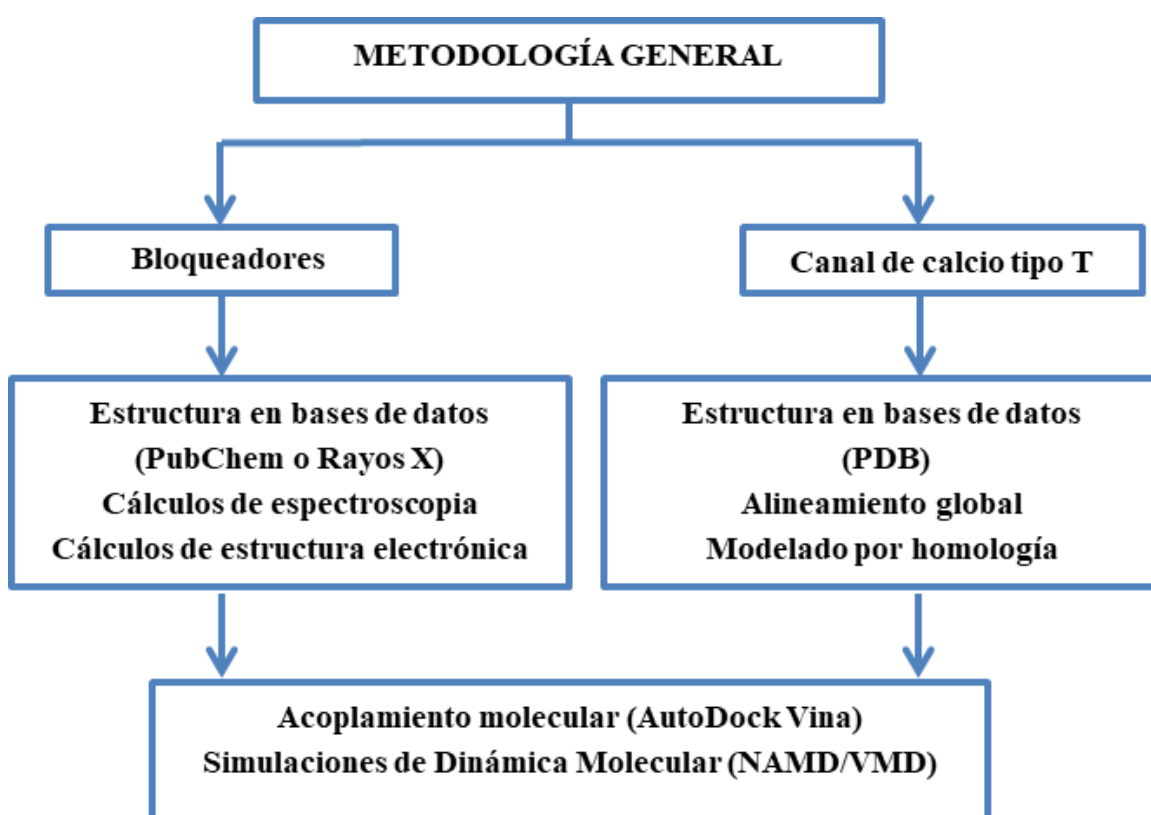


Figura 7. Esquema de la metodología general del proyecto. Se divide en dos secciones, los bloqueadores de canales LVA y el canal de calcio tipo T. Como primer paso en ambas secciones es la obtención de las estructuras en bases de datos, posteriormente se hacen los cálculos necesarios que ayuden a describir la interacción.

Los cálculos se realizaron con la infraestructura de *hardware* y *software* del Laboratorio de Química Teórica (LabQT) de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP, el Laboratorio Nacional del Sureste de México (LNS-BUAP) y de la Universidad Autónoma

Metropolitana (UAM-Izt.) a través de una colaboración con el LabQT. En las siguientes secciones se detalla la metodología utilizada en este proyecto de tesis.

4.1 Cálculos de estructura molecular

Los bloqueadores de los canales de calcio tipo T que se utilizaron son los compuestos NMP-4, NMP-7, NMP-181 y la anandamida. Las estructuras moleculares de los bloqueadores antes mencionados se optimizaron utilizando el funcional BP86 [78] y el conjunto de base cc-pVTZ [86] en fase gas, cloroformo (disolvente no-polar) y agua (disolvente polar) utilizando PCM como modelo de solvatación [104]. Los disolventes se eligieron para simular un ambiente no polar de la membrana celular y un ambiente polar acuoso [60, 75]. Las estructuras iniciales de los compuestos NMP-7 (ID: 46871949) y NMP-181 (ID: 56652052) se tomaron de la base de datos PubChem, mientras que el compuesto NMP-4 se construyó a partir de NMP-7. Los compuestos NMP poseen una estructura de mínima energía sobre la superficie de energía potencial PES (por sus siglas en inglés *Potential Energy Surface*).

Para el caso de la molécula de anandamida, la estructura de rayos X del conformero de horquilla e información experimental de RMN de H^1 y C^{13} para el conformero extendido se encuentran reportados en la literatura [64, 65, 70, 105]. Se tomaron como estructuras iniciales para la búsqueda conformacional los conformeros de horquilla de la anandamida de la estructura de rayos X correspondiente a los códigos 4azp (cadena alquilo con enlaces dobles alteranados *cis-trans-cis-trans*) y 4azr (cadena alquilo con enlaces dobles todos-*trans*) [70]. Se utilizó el método de búsqueda MM+ [106] con los parámetros descritos en la Tabla 4, usando el *software* HyperChemTM Professional [107]. De estos resultados se consideró un conjunto de 18 conformeros con energías relativas menores a 20 kcal mol⁻¹.

Por otro lado, debido a la flexibilidad conformacional de la anandamida es posible la formación del anillo de 7-átomos del grupo etanolamida en algunos conformeros. Por tanto, se encuentran seis estructuras de mínima energía para anandamida: el conformero extendido con anillo cerrado (E_{closed}), el conformero extendido con anillo abierto (E_{open}), el conformero en forma de U con anillo cerrado (U_{closed}), el conformero en forma de U con anillo abierto (U_{open}), el conformero en forma de horquilla con anillo cerrado (H_{closed}) y el conformero en forma de horquilla con anillo abierto (H_{open}). Los conformeros de mínima energía se confirmaron llevando a cabo cálculos de frecuencias vibracionales. También se

realizaron cálculos de *scan* de la energía potencial con el fin de investigar la formación del anillo de 7-átomos en el grupo etanolamida estabilizado por puente de hidrógeno. De esta manera se obtuvieron las barreras conformacionales de la formación del anillo para los conformeros extendido, en forma de U y de horquilla.

Tabla 4. Parámetros utilizados para la búsqueda de conformeros de la anandamida.

Parámetros	Valores
Torsiones escogidas	23 Ángulos
Anillos definidos	0 Anillos
Intervalos establecidos	1 a 20 Número de variaciones simultáneas ±0° a ±180° Intervalo de variación de torsión acíclica
Método de búsqueda	MM+
Opciones de prueba para la búsqueda	Energía duplicada de 0.05 kcal mol ⁻¹ RMS error con 0.25 Å
Opciones de optimización	RMS Gradiente 0.02 kcal mol ⁻¹ Ciclos Máximos 2000 Periodo de actualización de pantalla 20
Límites para la búsqueda	Detener la búsqueda después de: 200000 interacciones o: 2000 optimizaciones Número máximo de conformaciones mantenidas: 2000

Para las conformaciones de anandamida, se obtuvieron las poblaciones conformacionales usando la distribución de probabilidad de Boltzman en equilibrio termodinámico, con la ecuación (90).

$$N_i/N_{total} = e^{-G_i/RT} / \sum_{k=1}^M e^{-G_k/RT} \quad (90)$$

en donde N_i es la probabilidad de encontrar el conformero i del total de conformeros considerados N_{total} , G_i es la energía libre del conformero i , R es la constante universal de los gases, T es la temperatura del sistema a 298.5 K, M es el número de todos los conformeros accesible y la sumatoria representa la función de partición canónica [108].

4.2 Cálculos de espectroscopia IR y RMN

Los cálculos de espectroscopia de RMN de H¹ y C¹³ para las moléculas bloqueadoras tipo cannabinoide se realizaron para validar un solo nivel de teoría aplicado para todas las estructuras consideradas. Se utilizó el método GIAO [109] a partir de las estructuras optimizadas. Se utilizó el funcional BP86, el conjunto de base de Aldrich TZV [110] y el conjunto de funciones de base de Dunning [86]: cc-pVXZ y aug-cc-PVXZ donde X=D

(doble), T (triple) y Q (cuádruple), utilizando TMS (tetrametilsilano) como compuesto de referencia.

El análisis de los desplazamientos químicos de RMN se realizó mediante la comparación de los datos teóricos con los experimentales utilizando el coeficiente de correlación R^2 . Este coeficiente indica el grado de ajuste de la recta de regresión al comparar los valores teóricos con los experimentales. Se define de acuerdo a la ecuación (91):

$$R^2 = \left(\frac{n(\sum xy) - (\sum x \sum y)}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2][n \sum y^2 - (\sum y)^2]}} \right)^2 \quad (91)$$

en donde x y y son dos variables aleatorias. El coeficiente R^2 es una cantidad adimensional que sólo toma valores en $[0,1]$, cuando existe un ajuste bueno R^2 toma valores cercanos a uno en caso contrario toma valores cercanos a cero.

Los datos experimentales se reprodujeron usando los conjuntos de base TZV, cc-pVDZ, aug-cc-pVDZ y cc-pVTZ, con una R^2 de 0.920-0.9958 para RMN de H^1 y 0.9973-0.9992 para RMN de C^{13} . Los resultados de los cálculos de espectroscopia RMN se ajustaron a los reportados en la literatura [9, 10, 64, 65, 105]. Por ello se validó y se eligió el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ para realizar los cálculos de estructura electrónica y de espectroscopia molecular de los compuestos NMP y la anandamida. Adicionalmente, fue reportado en la literatura que el método BP86 es adecuado para describir de la geometría y estabilidad de formación del puente de hidrógeno intramolecular en el confórmero E_{closed} de la anandamida [85].

Para el análisis de los cálculos de los espectros de IR se utilizó el programa VEDA [111], para determinar los porcentajes de los modos vibracionales. Cada frecuencia se muestra en términos de la distribución de energía potencial 10% PED (por sus siglas en inglés *Potential Energy Distribution*). El factor de escala que se utilizó es 1.014 [112]. Todos cálculos de estructura electrónica y de espectroscopia molecular se realizaron con el programa Gaussian09/ Gaussian16 [113, 114] y los resultados se visualizaron con el programa Gaussian View [115].

4.3 Orbitales Moleculares Frontera, Mapa de Potencial Electrostático Molecular y Orbitales de Enlace Natural

Los Orbitales Moleculares Frontera, los mapas de Potencial Electrostático Molecular y el análisis NBO se realizaron a partir de las estructuras moleculares optimizadas en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ. El análisis de Orbitales de Enlace Natural NBO (por sus siglas en inglés *Natural Bond Orbitals*) incluye la obtención de la energía estabilizante $E^{(2)}$ en términos de la ecuación (52), ver Sección 3.5. Se utilizó el programa GaussSum [116] para calcular el porcentaje de la contribución de los orbitales.

4.4 Análisis de reactividad química

Los descriptores de reactividad global: potencial químico (μ), electronegatividad (χ), dureza (η), blandura (s) e índices de electrofilicidad (ω), se obtuvieron con base en la teoría conceptual de DFT [95], usando las ecuaciones (54)–(61), ver Sección 3.6. Los descriptores de reactividad local los índices de Fukui $f(r)$ para ataque electrofílico $f^-(r)$, nucleofílico $f^+(r)$ y el descriptor dual $f^{(2)}(r)$ se obtuvieron a partir de las cargas de Hirshfeld. El análisis de las cargas de Hirshfeld se realizó con el programa Multiwfn [117]. Las funciones de Fukui se obtuvieron a partir de las ecuaciones de (63)–(66) [96]. Las funciones de Parr para el ataque electrofílico $P^-(r)$ y nucleofílico $P^+(r)$ se obtuvieron mediante las ecuaciones (67) y (68), ver Sección 3.7.

4.5 Análisis QTAIM

Se calcularon los parámetros topológicos como la densidad electrónica $\rho(r)$, el gradiente $\nabla\rho(r)$, el Laplaciano $\nabla^2\rho(r)$, la energía cinética Lagrangiana G , la energía cinética Hamiltoniana H , la densidad de energía potencial V , la energía de interacción $E_{H\dots Y}$, la distancia interatómica D_{inter} y los índices de deslocalización DI , con el fin de caracterizar los puentes de hidrógeno y otras interacciones intramoleculares en las moléculas de estudio. En este sentido, el estudio se enfocó en la caracterización del puente de hidrógeno intramolecular de la molécula anandamida localizado en el grupo etanolamida. Se aplica la teoría QTAIM utilizando el programa AIMAll (Versión 17.11.14) [118]. Estas propiedades topológicas se calcularon usando las ecuaciones (74)–(75), ver Sección 3.8.

4.6 Modelado por homología

Se construyó la estructura del subtipo $Ca_v3.2$ utilizando como plantilla al canal de calcio tipo L ($Ca_v1.1$) [29]. Inicialmente se realizó un alineamiento global de las secuencias primarias de estos canales, obtenidos de *UNIPROT* con los códigos O95180 y P07293 para $Ca_v3.2$ y $Ca_v1.1$, respectivamente, con el programa *Clustal-Omega* [119]. Se consideró principalmente la región de hélices transmembranales del F80 al A1874 de los canales iónicos descartando la región del carboxilo terminal y asas intracelulares. Los cálculos de homología estructural se realizaron con el programa *Modeller* (9v10) [120]. Finalmente se realizó una validación del modelo con estudios mutagénicos [121–123]. En la Figura 8 se muestra el modelo obtenido para cálculos posteriores de acoplamiento molecular y también cálculos de dinámica molecular.

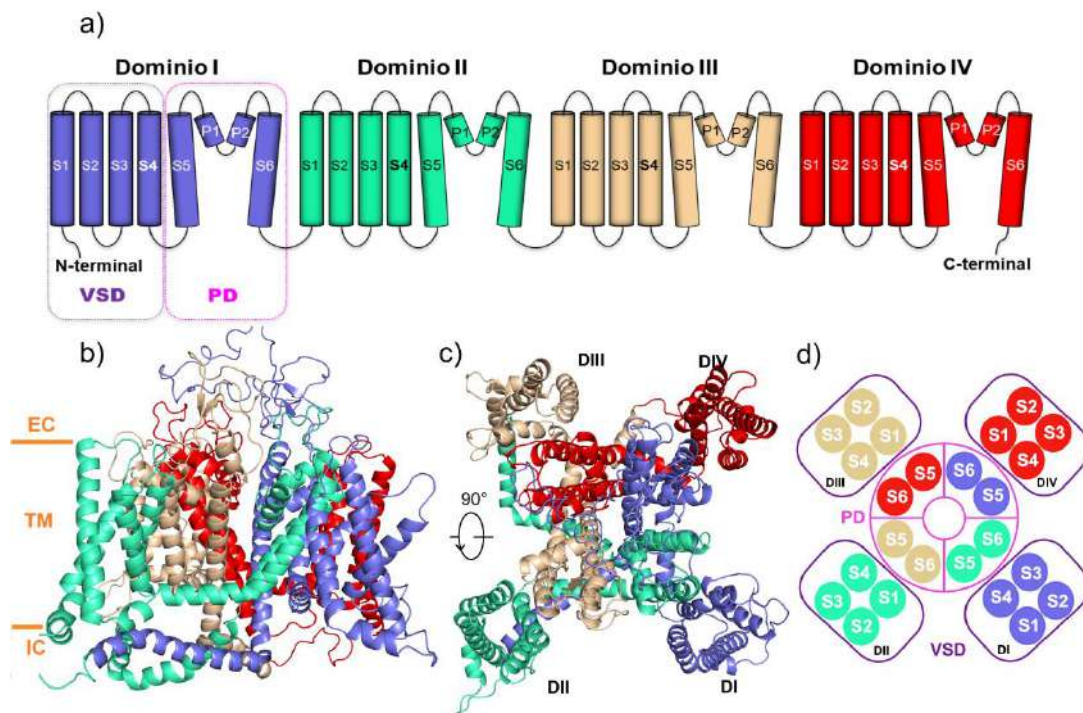


Figura 8. En a) diagrama de la estructura del canal $Ca_v3.2$, donde se representa en código de color los cuatro dominios transmembranales: el Dominio I (DI) en azul, el Dominio II (DII) en verde, el Dominio III (DIII) en beige, y el Dominio IV (DIV) en rojo. Cada dominio contiene seis segmentos transmembranales (S1-S6). Los segmentos S1-S4 forman el Dominio sensor de voltaje (VSD) y los segmentos S5-S6 junto con el segmento P (P1 y P2) forman el dominio del poro (PD). En b) vista lateral del canal $Ca_v3.2$ humano generado por modelado por homología, donde se indica la porción extracelular (EC), transmembranal (TM) e intracelular (IC). En c) vista extracelular del canal $Ca_v3.2$ humano. En d) diagrama de la vista extracelular de la distribución especial de los segmentos transmembranales del canal $Ca_v3.2$ humano.

4.7 Cálculos de Acoplamiento Molecular

Se realizaron los cálculos de Acoplamiento Molecular para el $Ca_v3.2$ y las moléculas bloqueadoras anandamida y los compuestos NMP. Se realizó un estudio de docking ciego (*Blind Docking*) rígido con el programa *AutoDockVina* (versión 1.1.2) [103]. *AutoDockVina* utiliza un algoritmo genético como método de búsqueda y un parámetro de energía libre ($-\Delta G$) como función de puntaje, ver ecuación (76) en la Sección 3.9. El espacio de búsqueda se delimitó por una caja de $90 \text{ \AA} \times 110 \text{ \AA} \times 110 \text{ \AA}$ que abarcó a toda la proteína receptora. La búsqueda consideró dos valores de exhaustividad 8 y 80, también 10 como el número máximo de poses. Los conformeros de la anandamida H_{closed} , H_{open} , U_{closed} y U_{open} y los compuestos NMP se consideraron como ligantes a partir de las estructuras optimizadas con el método BP86/cc-pVTZ en cloroformo. Las cargas Gasteiger y los átomos de hidrógeno para el ligante y el receptor se adicionaron con el programa *AutoDockTools* [124] generando archivos PDBQT para realizar los cálculos de acoplamiento molecular. Las interacciones se visualizaron con el programa *Pymol* v2.0 [125].

4.8 Simulaciones de Dinámica Molecular

El modelo $Ca_v3.2$ se estudió en complejo con el ligante Genisteína en un ambiente de tipo fisiológico. La estructura inicial de esta molécula se tomó de la base de datos PubChem con código-ID: 5280961. La membrana celular se modeló considerando el lípido POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina) en donde se inserta el $Ca_v3.2$. El medio intracelular y extracelular se modeló como una disolución iónica que contiene NaCl a una concentración de 0.15 M. La protonación del $Ca_v3.2$ se estableció a un pH=7.0. Para realizar los cálculos de simulación de dinámica molecular se utilizó el programa NAMD2.12 [126] el cual utiliza un campo de fuerza CHARMM36 [127].

Capítulo V. Discusión de resultados

5.1 Estructura molecular y análisis de poblaciones

Compuestos NMP

En la Figura 9 se muestran las estructuras optimizadas de los compuestos NMP: NMP-4, NMP-7 y NMP-181 calculadas en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo. Los compuestos NMP comparten similitudes estructurales tales como el anillo carbazol, el grupo pentilo y el grupo carbonilo. En los compuestos NMP-4 y NMP-7 un anillo de piperidina está unido al grupo carbonilo (C2=O1), mientras que en el compuesto NMP-181 un grupo éster, con un grupo amino terminal, está unido al grupo carbonilo (C2=O1). Además, el compuesto NMP-4 tiene un grupo metoxi unido al anillo carbazol (en el C20), tal como se muestra en la Figura 9.

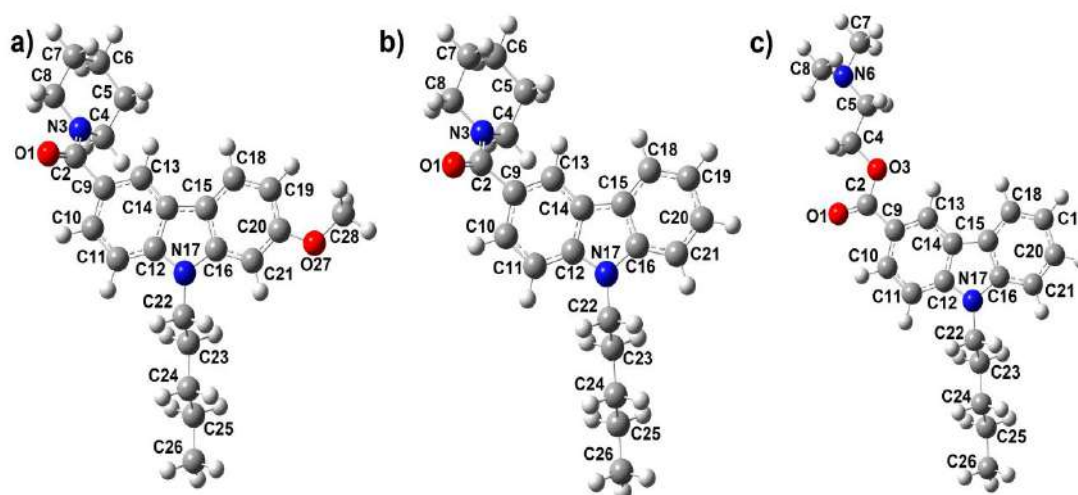


Figura 9. Estructuras optimizadas de los compuestos NMP: a) NMP-4, b) NMP-7 y c) NMP-181 calculadas en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

La Tabla 5 muestra las energías electrónicas para los compuestos NMP en fase gas, cloroformo y agua. Los tres compuestos NMP son energéticamente más estables en agua que en el disolvente cloroformo y en fase gas. Se observa una diferencia de energía de las estructuras en agua de 2.91, 2.62 y 2.25 kcal mol⁻¹ respecto al disolvente cloroformo y de 8.97, 7.98 y 7.02 kcal mol⁻¹ respecto a la fase gas para NMP-4, NMP-7 y NMP-181, respectivamente. Se presentan los resultados en cloroformo debido a que simulan las condiciones de un ambiente no polar como el que se encuentra en los bolsillos de unión de los receptores CB1/CB2 y los canales de calcio tipo T. La Tabla 6 muestra las distancias de

enlace, ángulos de valencia y ángulos diedros de los compuestos NMP obtenidos en el nivel de teoría B98/cc-pVTZ en cloroformo. La numeración en todos los casos corresponde a la Figura 9.

Tabla 5. Energías electrónicas totales (u.a.) (arriba) y energías relativas (kcal mol⁻¹) (abajo) para los compuestos NMP calculadas en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ.

Compuesto	Gas	CHCl ₃	Agua
NMP-4	-1193.004	-1193.013	-1193.018
	8.979	2.917	0.000
NMP-7	-1078.438	-1078.446	-1078.450
	7.986	2.626	0.000
NMP-181	-1115.557	-1115.565	-1115.568
	7.023	2.254	0.000

Tabla 6. Distancias de enlace (Å), ángulos de valencia y ángulos diedros (grados) seleccionados de los compuestos NMP calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

Parámetros	NMP-4	NMP-7	NMP-181
O1-C2	1.244	1.244	1.226
N3-C2	1.376	1.375	—
O3-C2	—	—	1.364
N3-C4	1.469	1.469	—
O3-C4	—	—	1.452
N17-C22	1.459	1.459	1.460
O1-C2-N3	121.90	121.79	—
O1-C2-O3	—	—	122.64
C2-N3-C4	119.20	119.18	—
C2-O3-C4	—	—	115.49
O1-C2-C9	119.63	119.32	124.82
C2-C9-C10	117.87	117.42	117.55
C22-C23-C24	112.47	112.21	112.06
C28-O27-C20	117.92	—	—
C6-C7-C8	111.46	111.38	—
O3-C4-C5	—	—	106.69
O1-C2-N3-C4	-159.80	-161.14	—
O1-C2-O3-C4	—	—	0.05
C5-C4-N3-C2	-138.17	-135.70	—
C5-C4-O3-C2	—	—	174.13
C9-C2-N3-C4	22.16	20.78	—
C9-C2-O3-C4	—	—	-179.78
C23-C24-C25-C26	179.58	179.74	-179.49
C19-C20-O27-C28	0.13	—	—
C6-C7-C8-N3	54.44	54.53	—
O3-C4-C5-N6	—	—	178.63

Las distancias de enlace y los ángulos de valencia no presentan cambios significativos en los tres compuestos. Las diferencias más significativas se encuentran en los ángulos diedros que involucran al grupo piperidina unido al grupo carbazol para NMP-4 y NMP-7, y los ángulos diedros de los grupos éster y del grupo amino en NMP-181. Para NMP-4 y NMP-7 los ángulos diedros que involucran a la piperidina como O1-C2-N3-C4 tienen valores de -159.8 y -161.14°; C5-C4-N3-C2 de -138.17 y -135.70°; y C9-C2-N3-C4 de 22.16 y 20.78°, respectivamente. En ambos compuestos se observa que se conserva la posición de la piperidina. Para NMP-181 los ángulos diedros: O1-C2-O3-C4, C5-C4-O3-C2 y C9-C2-O3-C4 tienen valores de 0.0, 174.1 y -179.8°, e indican la posición del grupo éster y del grupo amino terminal.

En general, se observa que los compuestos NMP semi-rígidos mantienen una conformación similar en los grupos funcionales que comparten (grupo carbazol, grupo pentilo y grupo carbonilo); y los cambios en su estructura se deben a la piperidina en NMP-4 y NMP-7, y los grupos éster y amino en NMP-181.

Anandamida

La molécula anandamida presenta un amplio espacio conformacional, el cual incluye 16 ángulos de torsión. De acuerdo con la variedad de posibles estructuras, después de realizar una búsqueda conformacional usando el método MM+ [105] se consideraron 6 conformeros de mínima energía. En la Figura 10 se muestran las estructuras optimizadas de los 6 conformeros de mínima energía de anandamida: conformero extendido con el anillo de etanolamida cerrado E_{closed} y abierto E_{open} (Figuras 10a) y 10b)), conformero en forma de U con el anillo cerrado U_{closed} y abierto U_{open} (Figuras 10c) y 10d)), y conformeros con forma de horquilla con el anillo cerrado H_{closed} y abierto H_{open} (Figuras 10e) y 10f)) , así como las estructuras de rayos-X con forma de horquilla con enlaces dobles alternados $H_{4\text{azp}}$ (Figura 10g)) y enlaces dobles todos *trans* $H_{4\text{azr}}$ (Figura 10h)), con código PDB: 4azp y 4azr, respectivamente [70].

La Tabla 7 muestra las energías electrónicas totales, las energías electrónicas relativas, las energías libres relativas y los porcentajes de población de los conformeros de anandamida en las tres fases. En general, se observa que los 6 conformeros de mínima energía son más estables en disolución acuosa que en cloroformo con una diferencia de energía de 2.01-3.92 kcal mol⁻¹ y 8.79-10.86 respecto a la fase gas. El conformero E_{closed} es

energéticamente más estable y también es el conformero más poblado en las tres fases: gas, cloroformo y agua. Se puede observar que los conformeros con anillo de etanolamida cerrado son más estables que sus estructuras correspondientes con anillo abierto. Para el conformero extendido con anillo abierto, E_{open} , el valor de energía relativa es $2.15 \text{ kcal mol}^{-1}$ respecto a E_{closed} , para el conformero de U con anillo abierto, U_{open} , dicho valor es de $1.97 \text{ kcal mol}^{-1}$ respecto a U_{closed} , mientras que, para el conformero de horquilla con anillo cerrado, H_{closed} , la energía relativa es $3.90 \text{ kcal mol}^{-1}$ respecto a H_{open} en cloroformo.

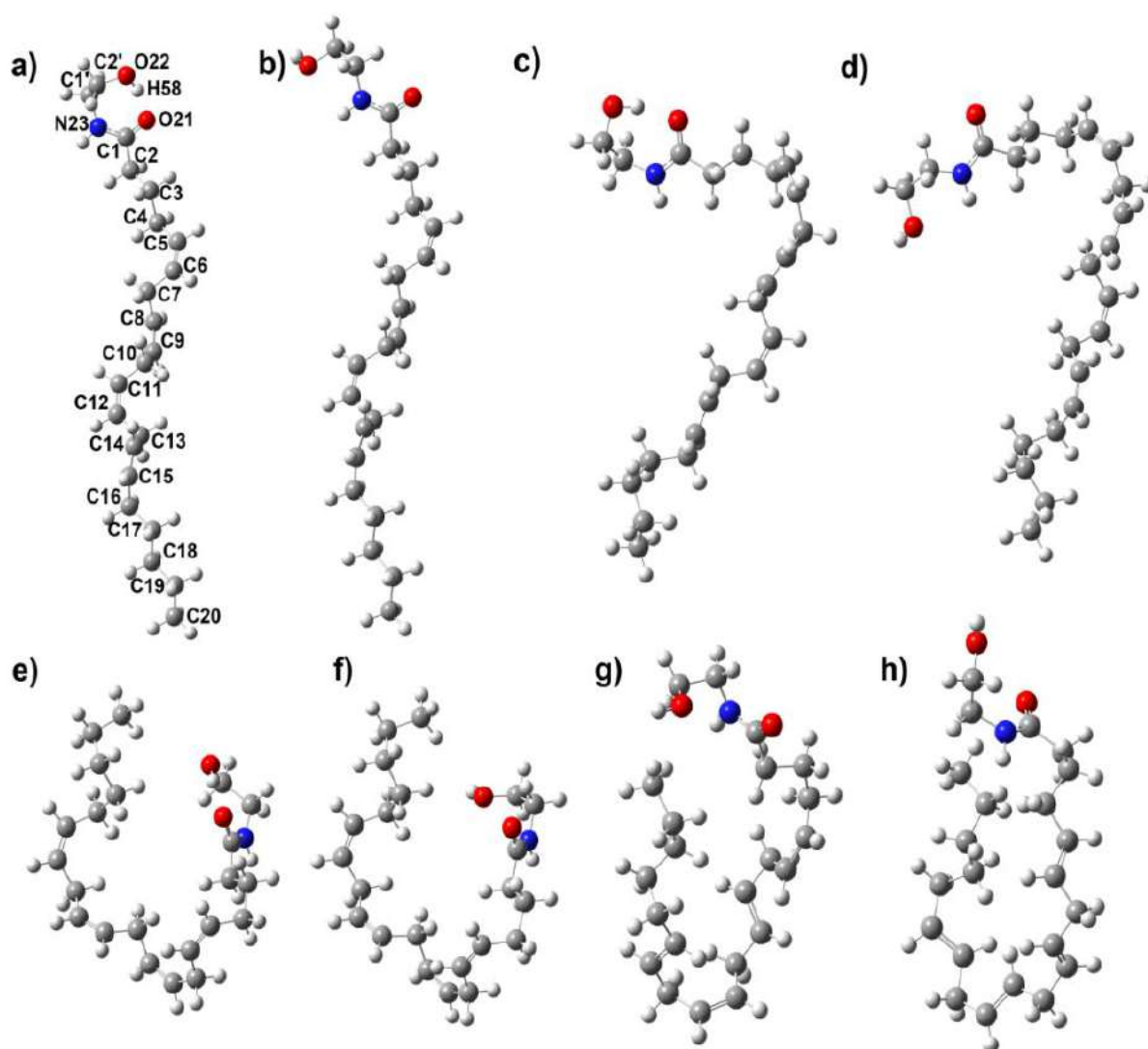


Figura 10. Estructuras optimizadas de anandamida en el a) conformero extendido con anillo cerrado, E_{closed} , b) conformero extendido con anillo abierto, E_{open} , c) conformero de U con anillo cerrado, U_{closed} , d) conformero de U con anillo abierto, U_{open} , e) conformero de horquilla con anillo cerrado, H_{closed} y f) conformero de horquilla con anillo abierto, H_{open} , calculadas en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo, y las estructuras de horquilla de rayos-X con enlaces dobles g) alternados, H_{4azp} , y h) todos *trans*, H_{4azr} [70].

Tabla 7. Energías electrónicas totales, E_{tot} (u.a.), energías electrónicas relativas, ΔE_{rel} (kcal mol⁻¹), energías libres relativas, ΔG_{rel} (kcal mol⁻¹) y porcentajes de población para las estructuras de mínima energía calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ.

	E_{closed}	E_{open}	U_{closed}	U_{open}	H_{closed}	H_{open}
Gas						
E_{tot} (u.a.)	-1066.114	-1066.111	-1066.108	-1066.106	-1066.105	-1066.098
ΔE_{rel} (kcal mol ⁻¹)	0.00	1.71	3.24	4.87	5.31	9.97
ΔG_{rel} (kcal mol ⁻¹)	0.00	0.45	3.84	6.04	8.78	11.06
Poblaciones (%)	68.03	31.86	0.10	2.56×10^{-3}	2.54×10^{-5}	5.40×10^{-7}
CHCl ₃						
E_{tot} (u.a.)	-1066.124	-1066.121	-1066.119	-1066.116	-1066.115	-1066.109
ΔE_{rel} (kcal mol ⁻¹)	0.00	2.15	3.54	5.51	5.91	9.81
ΔG_{rel} (kcal mol ⁻¹)	0.00	1.09	4.47	6.52	9.04	12.27
Poblaciones (%)	86.18	13.77	0.05	1.46×10^{-3}	2.05×10^{-5}	8.83×10^{-8}
Agua						
E_{tot} (u.a.)	-1066.128	-1066.126	-1066.124	-1066.120	-1066.120	-1066.115
ΔE_{rel} (kcal mol ⁻¹)	0.00	1.22	2.05	4.73	4.51	7.90
ΔG_{rel} (kcal mol ⁻¹)	0.00	1.73	3.89	6.19	8.78	10.74
Poblaciones (%)	94.71	5.16	0.13	2.76×10^{-3}	3.52×10^{-5}	1.29×10^{-6}

Para discutir la estructura de la molécula anandamida se dividió en cuatro regiones como se muestra en la Figura 11: grupo etanolamida, grupo alquilo inicial (Alquilo-I), grupo alquilo medio (Alquilo-M), y el grupo alquilo final (Alquilo-F). El grupo Alquilo-I abarca del C2 a C4; el grupo Alquilo-M incluye la región de enlaces dobles del C5 al C15 y el grupo Alquilo-F del C16 al C20 de acuerdo a la numeración de la Figura 10.

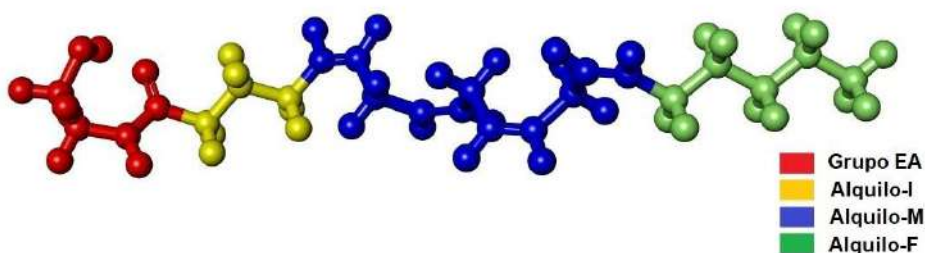


Figura 11. Regiones de la estructura de anandamida con código de color rojo (Grupo EA), amarillo (Alquilo I), azul (Alquilo-M) y verde (Alquilo-F).

La Tabla 8 muestra las distancias de enlace, los ángulos de valencia y los ángulos diedros representativos para la estructura de anandamida en el disolvente cloroformo. La numeración corresponde a la Figura 10.

Tabla 8. Distancias de enlace (Å), ángulos de valencia y ángulos diedros (grados) seleccionados para anandamida calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

Parámetros	E _{closed}	E _{open}	U _{closed}	U _{open}	H _{closed}	H _{open}	H _{4azp}	H _{4azr}
O21...H58	1.758	—	1.756	—	1.757	—	—	—
O21...H58–O22	162.54	—	162.39	—	162.93	—	—	—
O22–C2'–C1'	113.41	107.38	113.44	107.34	113.39	108.94	105.91	110.49
C2'–C1'–N23	115.09	111.51	115.17	111.29	114.97	113.03	106.72	110.71
C1'–N23–C1	124.76	123.71	124.92	123.80	124.69	123.69	123.23	124.19
C1'–C2'–O22–H58	-39.05	-170.19	-39.63	-170.13	-36.73	-176.82	176.48	-180.00
O22–C2'–C1'–N23	79.52	61.16	79.75	60.89	78.76	65.17	80.34	102.79
C2'–C1'–N23–C1	-65.70	127.05	-64.35	132.69	-66.33	-123.89	-115.57	-102.33
C4–C3–C2	112.49	112.62	113.00	113.24	112.59	113.04	107.13	111.56
O21–C1–N23–C1'	7.55	2.16	6.22	-0.93	6.14	-4.10	2.70	1.20
C3–C2–C1–O21	51.78	52.47	-53.15	-43.96	-57.26	-48.09	-60.61	161.02
C5–C4–C3–C2	176.73	176.79	-65.42	-66.00	-68.74	-67.74	-67.42	101.87
C6–C7–C8	111.43	111.48	111.97	111.94	119.32	119.25	108.64	109.64
C9–C8–C7	127.85	127.84	127.91	127.88	132.31	132.14	115.54	114.93
C7–C6–C5–C4	1.38	1.42	0.28	0.26	2.19	2.32	0.60	179.66
C8–C7–C6–C5	115.24	116.01	-128.08	-126.99	-127.82	-130.01	-167.84	-123.70
C9–C8–C7–C6	114.99	115.33	129.76	129.67	12.07	15.00	-58.43	128.68
C10–C9–C8–C7	1.45	1.50	0.96	0.86	-1.13	-0.98	-179.23	179.48
C11–C10–C9–C8	117.05	116.71	113.01	112.26	-114.57	-115.92	-127.25	84.21
C15–C14–C13–C12	115.61	116.29	-115.97	-117.79	122.17	121.09	28.62	-136.38
C18–C17–C16	113.23	113.28	115.67	115.66	115.63	115.58	111.68	112.55
C19–C18–C17	113.55	113.53	115.70	115.72	115.72	115.61	110.14	107.90
C20–C19–C18	113.23	113.23	114.26	114.23	114.16	114.19	110.69	112.08
C16–C15–C14–C13	1.42	1.57	-0.92	-1.00	-0.28	-0.86	179.36	179.29
C17–C16–C15–C14	118.59	118.98	-112.68	-112.55	-115.80	-121.37	-69.92	-46.75
C18–C17–C16–C15	176.73	176.84	-61.09	-60.27	-60.33	-64.94	-92.41	-113.82
C19–C18–C17–C16	179.81	179.96	-61.72	-61.56	-61.96	-63.47	-81.35	-117.59
C20–C19–C18–C17	179.96	-179.95	-63.22	-62.96	-64.94	-64.29	-98.91	107.36

Se discuten a continuación las principales características de la estructura de la molécula anandamida:

Grupo etanolamida. El puente de hidrógeno O21...H58 formado en los conformeros con anillo cerrado E_{closed}, U_{closed} y H_{closed} es de 1.76 Å. El ángulo de valencia O21...H58–O22 está en el intervalo de 162.4–162.9° correspondiente a los conformeros de anillo cerrado. Este puente de hidrógeno intramolecular forma el anillo de 7-átomos de los conformeros con anillo cerrado de anandamida. Comparando con los valores típicos de un puente de hidrógeno fuerte de tipo O–H...O de 2.4–2.55 Å [128] y ángulo de valencia cercano a 180°, preferentemente por encima de 110° [129], se puede concluir que se trata de un puente de hidrógeno fuerte. El puente de hidrógeno O21...H58–O22 estabiliza las estructuras de los

conformeros E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} con la formación del anillo de 7-átomos con una energía de $\approx 2\text{--}4 \text{ kcal mol}^{-1}$ (ver Tabla 7). La formación de este anillo en diferentes conformeros de anandamida se ha reportado previamente en la literatura [64, 65]. De acuerdo a estudios de acoplamiento molecular, la formación del anillo de 7-átomos en el grupo etanolamida del conformero de horquilla (que se corresponde al conformero H_{closed} en este trabajo) permite al grupo hidroxilo, que es hidrofílico, permanecer en un bolsillo de unión hidrofóbico del receptor CB1, formando puentes de hidrógeno con otros residuos del bolsillo [68]. Esto puede aplicarse para el receptor CB2 y el canal de calcio tipo T cuyos bolsillos de unión podrían localizarse en las hélices transmembranales de ambas proteínas.

La Figura 12 muestra las curvas de energía potencial para los conformeros E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} durante la formación del anillo de 7 átomos, el cual ocurre en dos pasos. En el primer paso se forma el anillo por rotación del ángulo diedro $C2'-C1'-N23-C1$. El grupo etanolamida en el conformero extendido presenta tres estructuras de mínima energía en 60 , 180 y 280° con energías relativas de 16.18, 0.0 y $26.19 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente, en cloroformo (Figura 12a)). El conformero E_{open} se encuentra en el valor de 180° mientras que el conformero E_{closed} se localiza en 280° en el primer paso de la formación del anillo. En la Figura 12b), el conformero en forma de U tiene dos estructuras de mínima energía: U_{open} en 127° y U_{closed} en 287° con energías relativas de 0.0 y $89.64 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente. Para el conformero H_{open} se encuentran dos conformaciones mínimas: H_{open} en 236° y H_{closed} en 6° con energías relativas de 0.0 y $41.50 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente, como se muestra en la Figura 12c).

El segundo paso consiste en la torsión del H58 a través del ángulo diedro $C1'-C2'-O22-H58$ para formar el puente de hidrógeno en los conformeros E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} , como se muestra en las Figuras 12d)–12f). Las estructuras de mínima energía en la curva de energía potencial se localizan en 17 , 5 y 273° , respectivamente.

Finalmente, los ángulos diedros de las estructuras optimizadas son $C2'-C1'-N23-C1$ en -64.4 – -66.33° y $C1'-C2'-O22-H58$ en -36.7 – -39.6° para los conformeros E_{closed} , U_{closed} , y H_{closed} , ver Tabla 8. Estos valores indican una mejor posición del H58 para la formación del anillo de 7 átomos por medio del puente de hidrógeno en comparación con los conformeros con anillo abierto. Distintos conformeros de mínima energía de anandamida

han sido reportados, entre ellos los conforméromos de forma extendida, en forma de U y en forma de horquilla con el anillo abierto [60–62] o cerrado [64, 65].

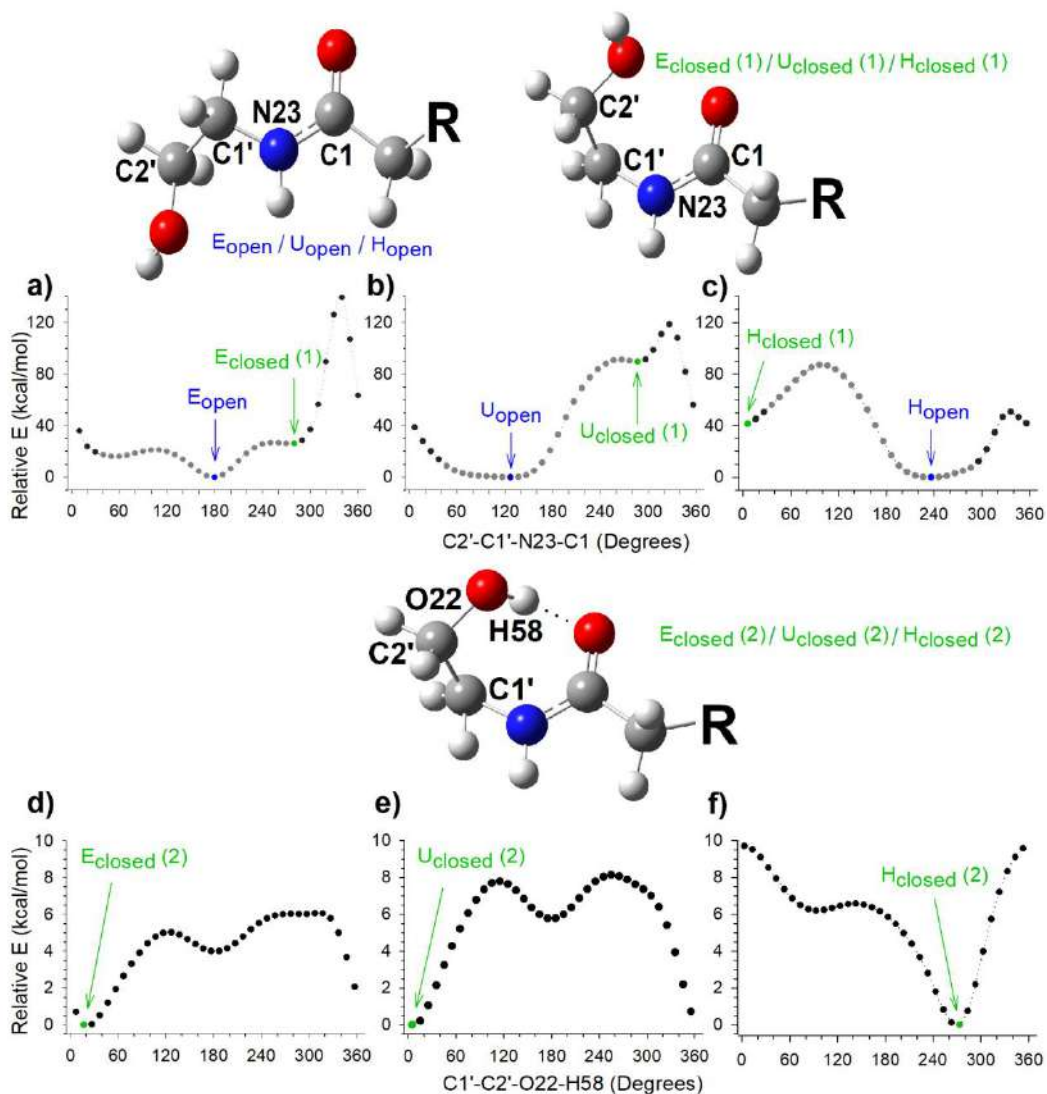


Figura 12. Curvas de energía potencial de los conforméromos extendidos, en forma de U y de horquilla durante la formación del anillo de 7 átomos en el grupo etanolamida, calculadas en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo. Los puntos negros sobre la curva indican la conformación con el anillo cerrado y los puntos grises las conformaciones con el anillo abierto. Los puntos azules indican los tres mínimos sobre la curva de energía potencial para las conformaciones de anillo abierto de los conforméromos E_{open} , U_{open} y H_{open} . Los puntos verdes indican los tres mínimos sobre la curva de energía potencial de las conformaciones con anillo cerrado, E_{closed} , U_{closed} , y H_{closed} . La formación del anillo en el grupo etanolamida ocurre en dos pasos: (1) formación del anillo (a–c) y (2) formación del puente de hidrógeno (d–e)).

Grupo alquilo inicial (Alquilo-I). Esta región se define porque no contiene dobles enlaces, es pequeña y no es flexible como el resto de la cadena alquilo. El ángulo de valencia C4-

C3-C2 no presenta cambios significativos en los diferentes conformeros. Los ángulos diedros C3-C2-C1-O21 y C5-C4-C3-C2 cambian significativamente para los conformeros extendidos (E_{closed} y E_{open}) respecto al conformero en forma de U y horquilla (U_{closed} , U_{open} , H_{closed} y H_{open}), como se muestra en la Tabla 8.

Grupo alquilo medio (Alquilo-M). Esta es la región de los enlaces dobles. Existen cuatro enlaces dobles ubicados en los átomos C5=C6, C8=C9, C11=C12 y C14=C15. Los ángulos de valencia C6-C7-C8 y C9-C8-C7 con valores de 111 y 127.9° para los conformeros extendidos y en forma de U (E_{closed} , E_{open} , U_{closed} y U_{open}) cambian sus valores a 119.3 y 132° para los conformeros de horquilla (H_{closed} y H_{open}). Los ángulos diedros localizados en esta región de enlaces dobles muestran cambios significativos, debido a la flexibilidad conformacional, principalmente en los ángulos diedros que contienen un carbón alílico como C8-C7-C6-C5, C9-C8-C7-C6, C11-C10-C9-C8 y C15-C14-C13-C12. Estos parámetros dan una mayor curvatura en el conformero en forma de U respecto al conformero de H, lo que diferencia a ambos conformeros.

Grupo alquilo final (Alquilo-F). En la región final del grupo alquilo los ángulos de valencia mantienen sus valores. Los cambios más significativos se observan en los ángulos diedros C17-C16-C15-C14, C18-C17-C16-C15, C19-C18-C17-C16 y C20-C19-C18-C17 los cuales varían del conformero extendido (E_{closed} y E_{open}) respecto a los conformeros en forma de U y de horquilla (U_{closed} , U_{open} , H_{closed} y H_{open}), ver Tabla 8. La comparación entre las estructuras de horquilla calculadas (H_{closed} y H_{open}) y las de rayos X ($H_{4\text{azp}}$ y $H_{4\text{azr}}$) indican algunas diferencias en los ángulos diedros en el grupo etanolamida y el grupo alquilo final. Estas diferencias se deben a que ambas estructuras de rayos X, $H_{4\text{azp}}$ y $H_{4\text{azr}}$, tienen el grupo etanolamida con el anillo abierto y la región de enlaces dobles en una forma alternada *cis-trans-cis-trans* y todos- *trans*, respectivamente, mientras que las estructuras calculadas en este trabajo tienen una configuración de enlaces dobles todos- *cis*. Sin embargo, las distancias de enlace y los ángulos de valencia concuerdan entre las estructuras calculadas y los datos de rayos X.

El análisis de población de los conformeros de anandamida da como resultado que el porcentaje de población más alto es para el conformero E_{closed} con 86.18%, seguido por E_{open} con 13.77%, mientras que el conformero U_{closed} tiene un valor de 0.05%, en cloroformo. Los otros conformeros tienen valores insignificantes de población. Los valores

de energía libre relativa, ΔG_{rel} (kcal mol^{-1}) y los porcentajes de población se muestran en la Tabla 7 para las tres fases.

Algunos resultados acerca de poblaciones de conformeros de anandamida, aplicando el método de memorias conformacionales (CM), muestran que el conformero extendido está poblado un 28% seguido del conformero en forma de U con un 23% en cloroformo. En agua, un conformero híbrido -extendido/forma de U es el más poblado con un 73% y el conformero en forma de U simétrico con 17% [60]. En otro estudio, basado en CM se indicó que el conformero en forma de U fue el más poblado con 49% seguido del conformero extendido con 29% en cloroformo [61]. A partir de simulaciones de dinámica molecular se encuentra que el conformero extendido está poblado en 43.4% y el conformero en forma de U en 20.7% en un ambiente que simula la bicapa lipídica [62]. Cabe mencionar que en todos estos trabajos el grupo etanolamida de la anandamida tiene el anillo de siete átomos abierto.

En un estudio basado en RMN-2D de alta resolución y simulaciones de dinámica molecular se encuentra que una conformación extendida de pseudo-hélice está poblada en 36% mientras que el conformero de U en 17% calculado en un ambiente tipo membrana [64]. En un estudio similar basado en un análisis experimental RMN y simulaciones de Monte Carlo se encuentra que el conformero extendido es predominante y el conformero de U se encuentra en un 20% en un sistema en condiciones de vacío [65]. Estos trabajos basados en RMN experimental muestran que el grupo etanolamida puede permanecer de manera estable con el anillo cerrado en disolución. Se puede concluir de estos trabajos que los conformeros extendido y en forma de U presentan porcentajes significativos dentro de la gran diversidad de conformeros que tiene la estructura de anandamida.

En la mayor parte de los estudios se observa que el conformero que domina las poblaciones es el conformero extendido, dicho resultado está de acuerdo con nuestro análisis conformacional que dice que el conformero E_{closed} es el más estable (mínima energía) y el más poblado. De acuerdo con los valores de ΔE_{rel} y ΔG_{rel} se encuentra la siguiente tendencia de acuerdo con la estabilidad energética y los porcentajes de población: $E_{\text{closed}} > E_{\text{open}} > U_{\text{closed}} > U_{\text{open}} > H_{\text{closed}} > H_{\text{open}}$. Es importante mencionar, que en los trabajos reportados no se especifican coordenadas estructurales específicas sino un promedio de las formas de los conformeros que se clasifican en familias conformacionales llamadas

“clusters” debido a la variabilidad que existe en la estructura de anandamida y su amplio espacio conformacional [60–62, 64].

A pesar del hecho que los conformeros en forma de U y de horquilla en nuestros estudios no son los conformeros de mínima energía ni los más poblados, ambos son relevantes biológicamente al parecerse a la estructura de rayos X [70] y a la estructura en forma de U de Z944 en el bolsillo de unión del canal de calcio tipo T [26], respectivamente. Por otro lado, el anillo de 7 átomos en el grupo etanolamida en su forma cerrada es más probable que permita la interacción de la anandamida en un ambiente hidrofóbico de acuerdo a estudios previos de acoplamiento molecular con el receptor CB1 [68]. Además, de que la evidencia experimental usando espectroscopia RMN confirma que el puente de hidrógeno intramolecular en el grupo etanolamida es estable en disolución [65]. Por otro lado, basados en la hipótesis de que la anandamida tiene un bolsillo de unión en las hélices transmembranales, donde existe un ambiente no-polar, se resaltan los resultados en cloroformo porque es el que simula dicho ambiente. Por esta razón, los conformeros E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} se eligieron para el análisis de las propiedades electrónicas, de reactividad y para realizar los cálculos de acoplamiento molecular en el disolvente cloroformo.

5.2 Espectroscopia de RMN de ^1H y ^{13}C

Se calcularon los desplazamientos químicos (δ) de RMN de ^1H y ^{13}C para los compuestos NMP y el conformero extendido de anandamida con el anillo de etanolamida cerrado (E_{closed}), para comparar con los valores experimentales reportados en la literatura [9, 10, 64, 65] y para validar el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ que se utilizó en este trabajo. Los cálculos de RMN de ^1H y ^{13}C se realizaron con el funcional BP86 y con una serie de conjuntos de base: TZV, cc-pVDZ, cc-pVTZ, aug-cc-pVDZ, aug-cc-pVTZ y cc-pVQZ. Los δ calculados reproducen los δ experimentales con una R^2 de 0.9736-0.9951 para ^1H y de 0.9957-0.9983 para ^{13}C en los compuestos NMP en cloroformo. Para el conformero E_{closed} de anandamida se obtiene una R^2 de 0.9357-0.9440 para ^1H y 0.9978-0.9992 para ^{13}C con el disolvente DMSO. De los niveles de teoría calculados, se eligió el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ de acuerdo con los resultados obtenidos y tomando en cuenta la relación entre la obtención de resultados precisos y los recursos computacionales utilizados. Los resultados de los cálculos de RMN considerando todos los conjuntos de base antes mencionadas se pueden consultar en las tablas del Anexo A1-A2 para los compuestos NMP y en las tablas A3-A4 para la anandamida (conformero E_{closed}).

Compuestos NMP

La Tabla 9 y Tabla 10 muestran los valores δ de RMN de ^1H y ^{13}C , respectivamente, obtenidos para los compuestos NMP en cloroformo comparados con los valores experimentales reportados. Para el RMN de ^1H , se observan valores similares de δ para los hidrógenos H_{ring} del grupo carbazol de NMP-7 y NMP-181 de 7.51–9.00 ppm, mientras que para NMP-4 los valores disminuyen en 6.98–8.18 ppm debido a la presencia del grupo metoxi. Los valores δ para $\text{H}_{\text{R-CH}_2\text{-N}}$, H_{CH_2} y H_{CH_3} del grupo pentilo son de 4.24–4.43, 1.40–1.87 y 0.93–1.22 ppm, respectivamente, para los tres compuestos NMP. El grupo metoxi en NMP-4 muestra un δ en $\text{H}_{\text{CH}_3\text{O}}$ de 3.89–4.11 ppm y los grupos amino y éster en NMP-181 para $\text{H}_{\text{CH}_3\text{-N}}$ y $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-O}}$ tienen valores de δ de 1.73–2.83 y 4.15–4.71 ppm, respectivamente, ver Tabla 9.

Para el RMN de ^{13}C , los valores de δ para C_{ring} del grupo carbazol en los compuestos NMP son de 121.0–131.1 ppm. En el grupo pentilo, los valores de δ para $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-N}}$, $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-C}}$ y $\text{C}_{\text{CH}_3\text{-C}}$ son de 47.4–62.8, 29.4–35.3 y 16.5–16.6 ppm, respectivamente. Los valores δ para $\text{C}_{\text{C-OCH}_3}$ del grupo metoxi en NMP-4 es 164.4 ppm. Los valores δ para $\text{C}_{\text{CH}_3\text{-N}}$ y $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-O}}$ de los grupos amino y éster en NMP-181 son 47.0–51.7 y 69.0 ppm, ver Tabla 10. Todos los valores δ calculados están en concordancia con los valores experimentales reportados, la principal diferencia de los datos calculados para RMN de ^1H y ^{13}C es de 1.49 y 14.73 ppm, respectivamente, en cloroformo [9, 10]. Algunas de las principales diferencias de los desplazamientos calculados respecto a los datos experimentales [9, 10] fueron los H o C que se encuentran cerca de átomos con mayor electronegatividad (N u O) y por ello se encuentran más desapantallados y susceptibles a interacción con el disolvente.

Diversos factores pueden estar involucrados además de la electronegatividad, como la geometría molecular, el efecto inductivo, la deslocalización electrónica, etc. [76]. Por ejemplo, en los compuestos NMP-4 y NMP-7 los protones unidos al carbono C8 cercano al oxígeno carbonilo tiene una diferencia de 1.32 ppm, mientras en NMP-181 el protón unido en C10 y C8 tiene una diferencia de 0.63 ppm. También, los carbonos C20, C9, C4 tienen una diferencia de 4.97, 4.01 y 10.88 ppm para NMP-4, NMP-7 y NMP-181, respectivamente, en cloroformo (ver la Figura 9 para la numeración). La Figura 13 presenta los gráficos de correlación de los valores δ calculados con el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ respecto a los valores δ experimentales para los compuestos NMP. La

Figura 13a) y 13b) muestra los valores de R^2 de 0.9740–0.9928 y R^2 de 0.9732–0.9977 para el RMN de ^1H y ^{13}C , respectivamente, en cloroformo.

Tabla 9. Valores δ (ppm) de RMN de ^1H experimentales y calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo para los compuestos NMP.

	Grupos	Exp. [9, 10]	CHCl_3
NMP-4	H_{ring}	6.86-8.07	6.98-8.18
	$\text{H}_{\text{CH}_3\text{-O}}$	3.93	3.89-4.11
	$\text{H}_{\text{R-CH}_2\text{-N}}$	4.22	4.24-4.37
	$\text{H}_{\text{R-CH}_2\text{-N}^*}$	3.71	2.55-4.97
	$\text{H}_{\text{R-CH}_2\text{-R}'^{**}}$	1.62-1.69	1.50-1.99
	H_{CH_2}	1.35-1.85	1.40-1.76
	H_{CH_3}	0.88	0.94-1.21
	R^2		0.9740
NMP-7	H_{ring}	7.23-8.19	7.51-8.33
	$\text{H}_{\text{R-CH}_2\text{-N}}$	4.25	4.42-4.43
	$\text{H}_{\text{R-CH}_2\text{-N}^*}$	3.73	2.60-5.05
	$\text{H}_{\text{R-CH}_2\text{-R}'^{**}}$	1.61-1.67	1.60-2.07
	H_{CH_2}	1.32-1.83	1.40-1.83
	H_{CH_3}	0.85	0.94-1.22
	R^2		0.9769
NMP-181	H_{ring}	7.23-8.81	7.56-9.00
	$\text{H}_{\text{CH}_2\text{-O}}$	4.48	4.15-4.71
	$\text{H}_{\text{R-CH}_2\text{-N}}$	4.21	4.42-4.43
	$\text{H}_{\text{CH}_2\text{-N}}$	2.76	2.52-3.17
	$\text{H}_{\text{CH}_3\text{-N}}$	2.36	1.73-2.83
	H_{CH_2}	1.26-1.81	1.44-1.87
	H_{CH_3}	0.84	0.93-1.21
R^2		0.9928	

*cicloalcano; ** cíclico

Tabla 10. Valores δ (ppm) de RMN de ^{13}C experimentales y calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo para los compuestos NMP.

	Grupos	Exp. [10,11]	CHCl_3	
NMP-4	$\text{C}_{\text{C=O}}$	171.7	174.2	
	$\text{C}_{\text{C-OCH}_3}$	159.5	164.4	
	$\text{C}_{\text{C=N-R}}$	141.3-142.4	143.8-144.8	
	C_{ring}	119-127	121.0-131.0	
	$\text{C}_{\text{CH}_2\text{ring}}$	93.6 -121.4	96.9-128.3	
	$\text{C}_{\text{CH}_3\text{-O}}$		58.5	
	$\text{C}_{\text{CH}_2\text{-C}^*}$	24.9-28.6	29.4-31.1	
	$\text{C}_{\text{CH}_2\text{-N}^*}$	43.3-55.8	47.3-54.7	
	$\text{C}_{\text{CH}_2\text{-N}}$		47.4	
	$\text{C}_{\text{CH}_2\text{-C}}$	22.6 - 29.5	29.4-34.9	
	$\text{C}_{\text{CH}_3\text{-C}}$	14.11	16.5	
	R^2		0.9977	
		$\text{C}_{\text{C=O}}$	171.5	173.2
		$\text{C}_{\text{C=N-R}}$	140.9-141.0	143.0-143.5

NMP-7	C _{ring}	125.1-126.7	124.1-131.1
	C _{H2ring}	108.4-122.4	110.0-130.4
	C _{CH2-C} *	29.4	30.0-31.0
	C _{CH2-N} *		47.4-54.0
	C _{CH2-N}	43.2	48.1
	C _{CH2-C}	22.5-28.7	29.5-35.1
	C _{CH3-C}	14.0	16.6
	R²		0.9799
NMP-181	C _{C=O}	167.5	171.3
	C _{C=N-R}	141.0-143.1	143.8-145.0
	C _{ring}	120.7-122.6	123.6-126.5
	C _{H2ring}	108.2-127.4	109.7-130.2
	C _{CH2-O}	58.1	69.0
	C _{CH3-N}	46.04	47.0-51.7
	C _{CH2-N}	43.3-62.9	48.5-62.8
	C _{CH2-C}	22.5-29.4	29.5-35.3
	C _{CH3-C}	14.0	16.6
	R²		0.9732

*cicloalcano

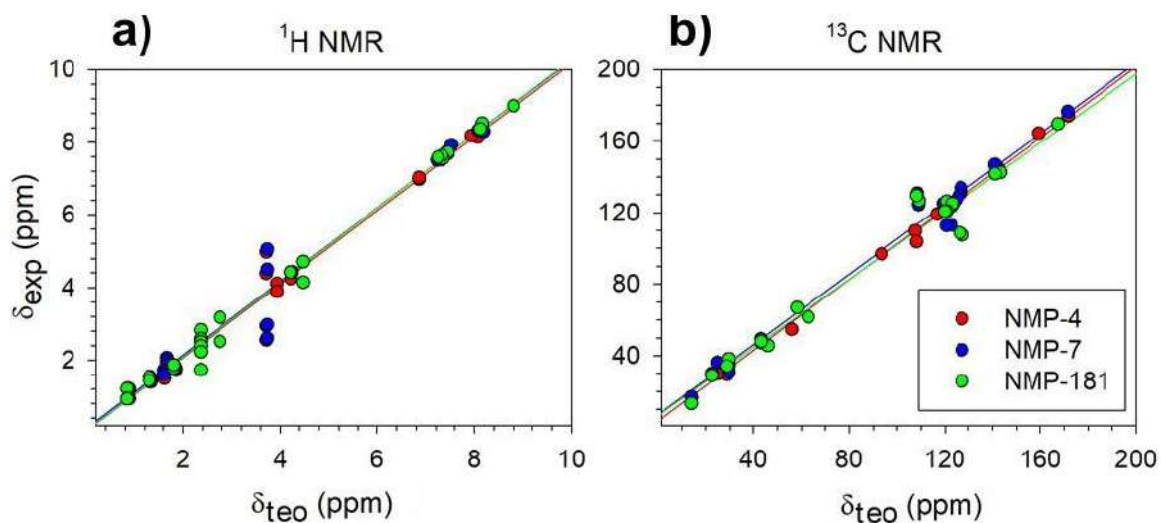


Figura 13. Gráficos de correlación de los valores δ (ppm) calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ con respecto los valores δ experimentales para el RMN de a) ^1H y b) ^{13}C para los compuestos NMP en cloroformo.

Anandamida

Las Tablas 11 y 12 muestran los valores δ de RMN de ^1H y ^{13}C , respectivamente, para el confórmero E_{closed} de anandamida en cloroformo y DMSO. Experimentalmente las asignaciones de los δ para RMN de ^1H y ^{13}C fueron realizadas mediante técnicas basadas en correlaciones δ 2D ^1H - ^1H homonucleares y ^1H - ^{13}C heteronucleares [64]. Los autores

analizaron el confórmero E_{closed} de anandamida e indicaron que el protón hidroxilo no se identificó debido al uso de CDCl_3 produciendo un intercambio protón/deuterio que no permitía la formación del puente de hidrógeno intramolecular. Sin embargo, indicaron que la posición de los átomos de oxígeno en el grupo etanolamida se localizan en el mismo lado de la molécula sugiriendo la formación del puente de hidrógeno. En otro estudio, se reportaron los datos de δ para RMN de ^1H y ^{13}C para el confórmero E_{closed} de anandamida en el disolvente DMSO [65].

En este trabajo se calculan los δ para RMN de ^1H y ^{13}C para la estructura del confórmero E_{closed} para validar nuestra metodología computacional en CHCl_3 y DMSO. La Tabla 11 muestra el δ de RMN de ^1H de H_{OH} , $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-O}}$, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-N}}$ y H_{NH} para el grupo etanolamida con valores de 6.20, 3.77–3.88, 3.10–3.67 y 6.13 ppm, respectivamente, en cloroformo. También el δ de H_{CH} , H_{CH_2} y H_{CH_3} para la cadena alquilo fueron calculados con valores de 5.42–5.90, 1.17–3.29 y 0.83–1.15 ppm, respectivamente. Usando DMSO como disolvente se observa una mejor aproximación al valor experimental de δ de H_{OH} obteniendo un valor de 5.70 ppm. De esta manera, los desplazamientos químicos calculados y experimentales del protón del grupo hidroxilo (H_{OH}) difieren en 1.50 y 1 ppm en cloroformo y DMSO, respectivamente. Para el protón de la amida (H_{NH}) se puede observar una diferencia de 1.67 y 1.57 ppm en los disolventes cloroformo y DMSO, respectivamente, estos valores representan la mayor diferencia entre los datos calculados y los valores experimentales reportados en la literatura. El resto de los valores de δ se mantienen muy similares en ambos disolventes, sin embargo, mejora el valor de R^2 en DMSO pasando de 0.9320 a 0.9440, ver Tabla 11.

Tabla 11. Valores δ (ppm) de RMN de ^1H experimentales y calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo y DMSO para el confórmero E_{closed} de anandamida.

Grupos	Exp. [64]	Exp. [65]	CHCl_3	DMSO
H_{OH}		4.70	6.20	5.70
$\text{H}_{\text{CH}_2\text{-O}}$	3.72	3.45	3.77-3.88	3.82-3.89
$\text{H}_{\text{CH}_2\text{-N}}$	3.42	3.10-3.40	3.10-3.67	3.24-3.54
H_{NH}	5.95	7.80	6.13	6.23
H_{CH}	5.35-5.4	5.35	5.42-5.90	5.42-5.91
H_{CH_2}	1.28-2.84	1.25-2.80	1.17-3.29	1.14-3.30
H_{CH_3}	0.89	0.85	0.83-1.15	0.82-1.14
R^2			0.9320	0.9440

Para la RMN de ^{13}C en cloroformo los δ de $\text{C}_{\text{C-OH}}$, $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-N}}$ y $\text{C}_{\text{C=O}}$ en el grupo etanolamida toman valores de 71.77, 52.21 y 178.22 ppm, respectivamente, como se muestra en la Tabla 12. Los δ de $\text{C}_{\text{CH-C}}$, $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-C}}$ y $\text{C}_{\text{CH}_3\text{-C}}$ para la cadena alquilo tiene valores de 132.25–136.34, 29.81–41.80 y 16.57 ppm, respectivamente. La mayor diferencia entre los datos calculados y los experimentales es en $\text{C}_{\text{C-OH}}$ y $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-N}}$ con una diferencia de 10.95 y 9.96 ppm en cloroformo, y de 10.80 y 10.77 ppm en DMSO, respectivamente, ver Tabla 12. La Figura 14a) muestra los gráficos de correlación entre los δ calculados y experimentales con valores de R^2 de 0.9320–0.9440 para el conformero E_{closed} de anandamida para el RMN de ^1H y en la Figura 14b) con valores de R^2 de 0.9987–0.9988 para el RMN de ^{13}C , en los disolventes cloroformo y DMSO.

Tabla 12. Valores δ (ppm) de RMN de ^{13}C experimentales y calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo y DMSO para el conformero E_{closed} de anandamida.

Grupos	Exp. [64]	Exp. [65]	CHCl_3	DMSO
$\text{C}_{\text{C-OH}}$	62.5	60.81	71.77	71.61
$\text{C}_{\text{CH}_2\text{-N}}$	42.4	42.25	52.21	53.03
$\text{C}_{\text{C=O}}$	174.2	172.00	178.22	178.02
$\text{C}_{\text{CH-C}}$	127.5-130.5	128.0-130.0	132.25-136.34	132.31-136.80
$\text{C}_{\text{CH}_2\text{-C}}$	22.5-35.9	22.85-35.66	29.81-41.80	29.84-41.62
$\text{C}_{\text{CH}_3\text{-C}}$	14.1	14.79	16.57	16.53
R^2			0.9988	0.9987

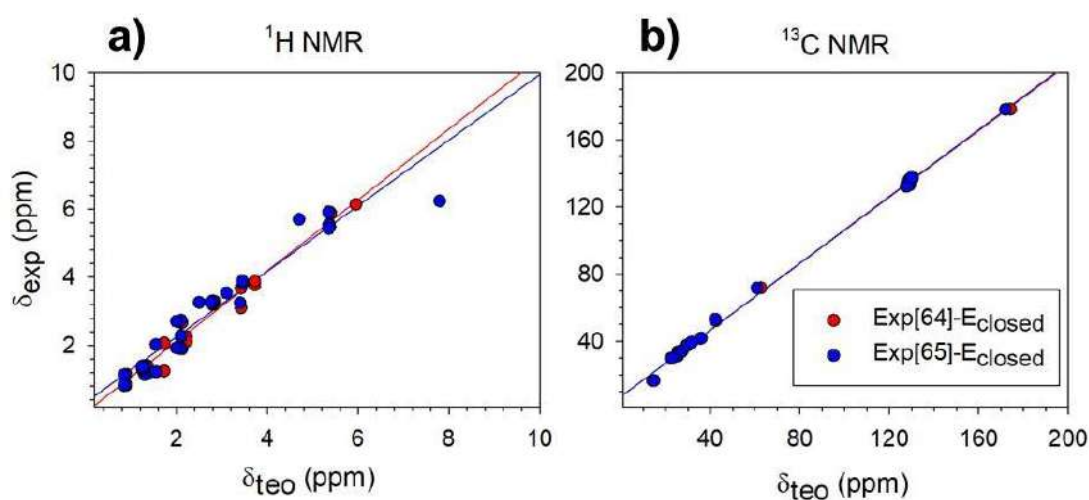


Figura 14. Gráficos de correlación de δ (ppm) calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ con los δ experimentales para el RMN de a) ^1H y b) ^{13}C para el conformero E_{closed} de anandamida en cloroformo y DMSO.

En general, el efecto del disolvente se observa en un desplazamiento hacia campos bajos no mayor a 0.8 and 5 ppm para RMN de ^1H y ^{13}C , respectivamente para los compuestos NMP y el conformero E_{closed} de la anandamida a medida que la polaridad del disolvente incrementa. En ambos casos, para los compuestos NMP y anandamida, los resultados se obtienen de manera satisfactoria validando el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ, el cual se usó para calcular la espectroscopia IR y analizar las propiedades electrónicas y de reactividad química de los compuestos NMP y los diferentes conformeros de anandamida.

5.3 Espectroscopia de IR

La caracterización IR se llevó a cabo con el mismo nivel de teoría, BP86/cc-pVTZ, para los compuestos NMP y el conformero E_{closed} de anandamida. Las Tablas 13 y 14 muestran las frecuencias representativas, intensidades y frecuencias escaladas con un factor de 1.014, así como el Potencial de Distribución Energética ($\text{PED} \geq 10\%$).

Compuestos NMP

La Tabla 13 muestra las bandas características IR de los compuestos NMP en cloroformo. La vibración más intensa se asigna al *stretching* del grupo C=O, está localizada en 1623.2, 1619.5 y 1692.1 cm^{-1} para NMP-4, NMP-7 y NMP-181, respectivamente. Este último valor se modifica por el grupo éster en NMP-181 causando que la banda de absorción se incremente a una frecuencia mayor. El valor reportado para el *stretching* C=O del grupo amida es en el intervalo de 1680-1630 cm^{-1} [130] y para la vibración *stretching* C=O del grupo éster es de 1730-1715 cm^{-1} [131].

La vibración *stretching* simétrica y asimétrica C-H en el grupo pentilo se localiza en 3054.3 y 2980.5 cm^{-1} , 3055.7 y 2980.9 cm^{-1} , 3055.6 y 2981 cm^{-1} para NMP-4, NMP-7 y NMP-181, respectivamente. Estos valores son similares a los valores 2926 y 2853 cm^{-1} reportados para las frecuencias asimétricas y simétricas del grupo metileno, respectivamente [132]. La vibración simétrica *stretching* C-H del grupo metilo se localiza en 2992 cm^{-1} para NMP-7 que se asemeja al valor 2872 cm^{-1} reportado para este grupo [132]. Los *stretching* C-H asimétrico y simétrico en el grupo piperidina son de 3039.3 y 2991.0 cm^{-1} para NMP-4 y de 3039.3 y 2989.0 cm^{-1} para NMP-7. El valor reportado en la literatura para el *stretching* C-H asimétrico es de 3000-2800 cm^{-1} y para el *stretching* C-H simétrico es de 2870-2850 cm^{-1} [131]. Adicionalmente, el *stretching* N-C en el grupo amida es de 1416.5 cm^{-1} y para el nitrógeno pirrol en el grupo carbazol es de 1349.9 cm^{-1}

para NMP-7. El valor reportado para estos grupos son de 1400 cm⁻¹ y 1342-1266 cm⁻¹, respectivamente [132].

El *stretching* C=C en el grupo carbazol se localiza en 1635.0, 1629.5 y 1629.4 cm⁻¹ para NMP-4, NMP-7 y NMP-181, respectivamente. Estos valores concuerdan con el valor de 1625 cm⁻¹ para anillos aromáticos. En NMP-4 la banda se desplaza a frecuencias mayores por la presencia del grupo metoxi [131]. El *stretching* C-H en el grupo carbazol se localiza en 3162.3 y 3163.6 cm⁻¹ en NMP-7 y NMP-181, respectivamente. El valor reportado para la vibración *stretching* C-H de los alquenos está usualmente por encima de 3000 cm⁻¹, en el intervalo de 3050-3000 cm⁻¹ [131]. Para NMP-4, la presencia del grupo metoxi, observado en las bandas 3106.0 y 2976.5 cm⁻¹ corresponde al *stretching* asimétrico y simétrico del grupo CH₃, respectivamente, y es cercano a la banda reportada en 2830-2815 cm⁻¹ [131]. El *stretching* C-O-C se localiza en 1239.0 cm⁻¹, el intervalo reportado para el grupo éter es de 1300-1000 cm⁻¹ [130]. También, la vibración en 585 cm⁻¹ del *bending* O-C-C está dentro del intervalo 580-505 cm⁻¹ para los compuestos aromáticos con grupo metoxi [131].

Para el compuesto NMP-181 la vibración *stretching* C-H asimétrico y simétrico del grupo amino se encuentra en la banda localizada en 3079.3 cm⁻¹ y 2876.6 cm⁻¹, respectivamente, que corresponde al valor reportado en la literatura para el grupo -N(CH₃)₂ en 2820 y 2770 cm⁻¹ [131]. También, la vibración *stretching* C-N del grupo amino de 1263.7 cm⁻¹ es cercano al valor de 1270 cm⁻¹ reportado para la amina dimetil terciaria [131]. La vibración *stretching* C-O-C del grupo éster aparece en 1207.1 y 1088.5 cm⁻¹ y con el intervalo reportado de 1210-1173 cm⁻¹ [132]. Las Tablas A5-A7 muestran la caracterización IR completa de los compuestos NMP en cloroformo.

Tabla 13. Frecuencias teóricas IR (en cm⁻¹), intensidad (Int, en km mol⁻¹), frecuencia escalada (Freq esc, en cm⁻¹) y PED (≥10%) en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ para los compuestos NMP usando el factor de escala de 1.014 en cloroformo. Se representa el modo vibracional *stretching* (ν), el modo vibracional *bending* en el plano (β) y el modo vibracional torsional (τ).

	Freq	Int	Freq esc	PED (≥ 10%)
NMP-4	3063.1	6.07	3106.0	vCH(91)
	3012.2	22.23	3054.3	vCH(86)
	2997.4	22.19	3039.3	vCH(91)
	2949.7	9.33	2991.0	vCH(90)
	2939.3	9.79	2980.5	vCH(86)
	2935.4	24.78	2976.5	vCH(91)
	1612.4	55.73	1635.0	vCC(50)
	1600.8	88.20	1623.2	vOC(77)
	1221.9	29.54	1239.0	vOC(13)

	577.0	12.69	585.0	β OCC(13)
NMP-7	3118.7	7.41	3162.3	ν CH(93)
	3013.5	25.38	3055.7	ν CH(93)
	2997.3	23.28	3039.3	ν CH(83)
	2951.5	10.61	2992.8	ν CH(90)
	2947.7	10.72	2989.0	ν CH(88)
	2939.8	10.99	2980.9	ν CH(86)
	1607.0	17.17	1629.5	ν CC(33)
	1597.2	100.00	1619.5	ν OC(75)
	1396.9	98.81	1416.5	ν NC(29)+ β HNCN(32)
	1331.3	37.90	1349.9	ν NC(26)
NMP-181	3119.9	4.91	3163.6	ν CH(93)
	3036.8	6.81	3079.3	ν CH(94)
	3013.4	12.14	3055.6	ν CH(75)
	2939.9	7.52	2981.0	ν CH(87)
	2836.9	49.51	2876.6	ν CH(98)
	1668.8	100.00	1692.1	ν OC(85)
	1606.9	14.75	1629.4	ν CC(39)
	1246.3	4.43	1263.7	ν NC(15) + τ HNCN(31)
	1190.5	80.04	1207.1	ν OC(11)+ ν CC(12)+ β CC(12)
	1073.5	47.18	1088.5	ν OC(24)

Las Figuras 15-17 muestran los espectros IR teóricos con la asignación de las bandas más características para los compuestos NMP en cloroformo.

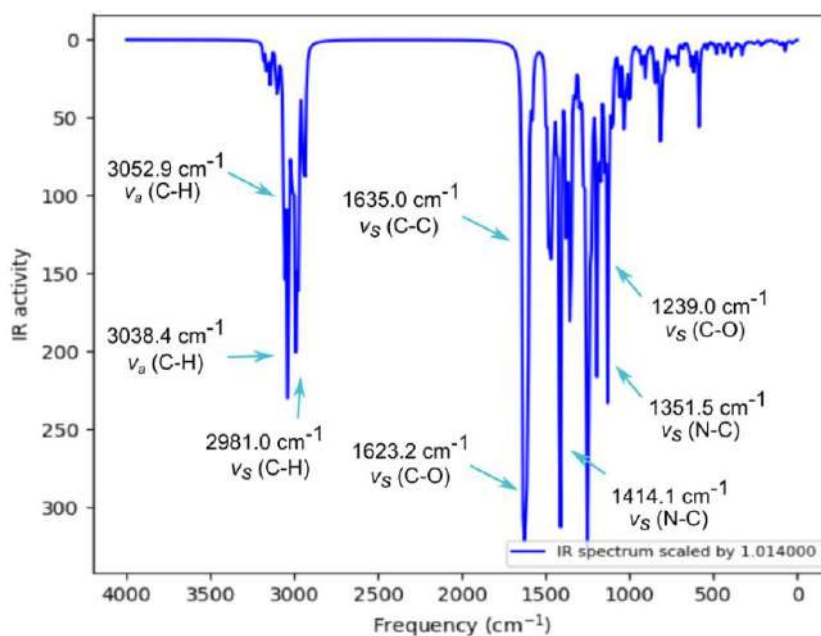


Figura 15. Espectro teórico de IR de NMP-4 calculado en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

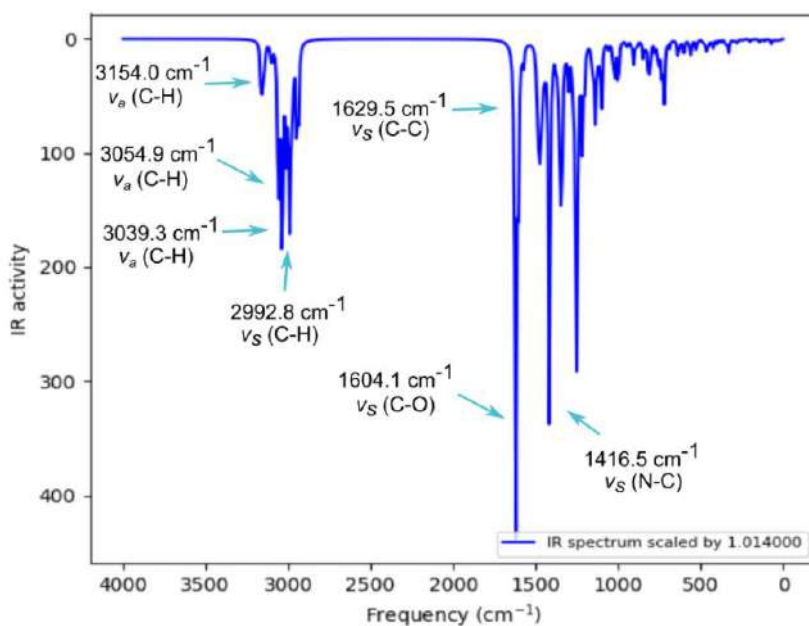


Figura 16. Espectro teórico de IR de NMP-7 calculado en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

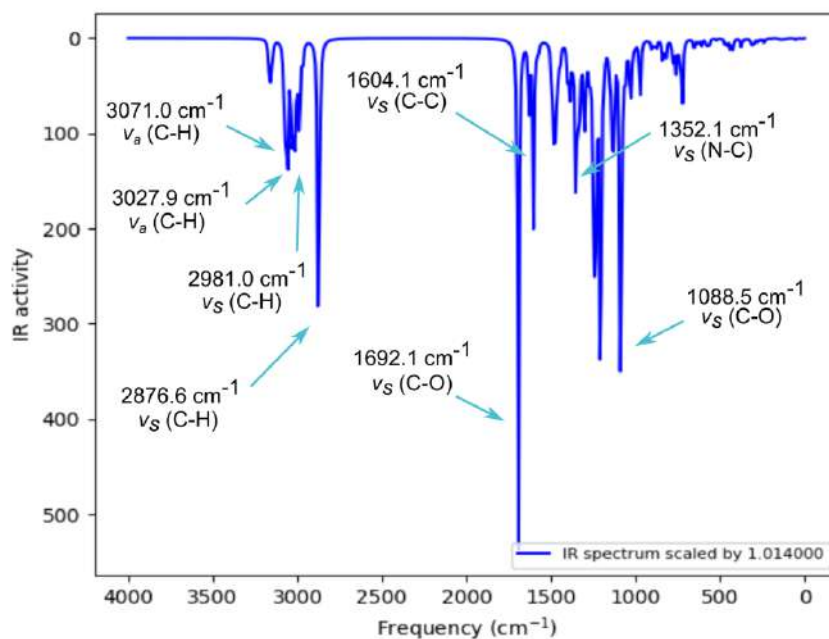


Figura 17. Espectro teórico de IR de NMP-181 calculado en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

Anandamida

La Tabla 14 muestra las bandas IR características para el conformero E_{closed} de anandamida en cloroformo. Los resultados muestran una vibración *stretching* pura N-H en el grupo

etanolamida en 3585.3 cm^{-1} , mientras que los valores reportados están en el intervalo de $3500\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ [132]. Otra vibración *stretching* O-H pura aparece en 3345.2 cm^{-1} , el grupo hidroxilo que forma un puente de hidrógeno muestra una banda en el intervalo de $3550\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ [132]. La vibración *bending* O-H se localiza en 1484.0 cm^{-1} similar al intervalo reportado de $1420\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$ [132]. También, la vibración *stretching* del grupo hidroxilo C-O es en 1082.3 cm^{-1} se encuentra dentro del intervalo de $1090\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. La vibración de torsión O-H se localiza en 685.7 cm^{-1} y está dentro del intervalo reportado de $769\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ [132]. La vibración *stretching* C=O se localiza en 1647.9 cm^{-1} y se ubica dentro del intervalo reportado para la banda *stretching* del grupo amida de $1680\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ [130]. La vibración de *stretching* N-C del grupo amida se localiza en 1517.3 cm^{-1} de acuerdo al valor reportado de 1400 cm^{-1} [132].

La vibración de *stretching* C-H asimétrico y simétrico presentes en la región Alquilo-I (ver Figura 11) está localizado a 3053.5 y 2990.4 cm^{-1} , con valores similares a los reportados en 2926 y 2853 cm^{-1} para el grupo metileno asimétrico y simétrico, respectivamente [132]. La vibración *stretching* C-H para el grupo Alquilo-M se localiza en el intervalo de $3105.4\text{-}3072.2\text{ cm}^{-1}$, similar al intervalo de $3050\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ reportado [131]. También, la vibración *stretching* C=C en la región Alquilo-M (ver Figura 11) está localizado 1686.9 cm^{-1} , similar al valor de los alcanos no-cíclicos en $1670\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ [130]. La vibración asimétrica y simétrica *stretching* C-H para los carbonos alílicos en la región de Alquilo-M se localizan en 3024.0 y 2992.2 cm^{-1} .

Las vibraciones de *stretching* asimétrico y simétrico C-H del grupo metilo y metileno en la región Alquilo-F (ver Figura 11) se localizan en 3015.4 y 2978.9 cm^{-1} , y 3059.3 y 2989.9 cm^{-1} , respectivamente. Los valores reportados para la vibración de *stretching* asimétrico y simétrico C-H en el grupo metileno son de $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ y $2870\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ [131] y para el grupo metilo es de 2962 y 2872 cm^{-1} [132]. La Tabla A10 muestra la caracterización IR completa de anandamida en cloroformo.

Tabla 14. Frecuencias teóricas IR (en cm^{-1}), intensidad (Int, en km mol^{-1}), frecuencia escalada (Freq esc, en cm^{-1}) y PED ($\geq 10\%$) en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ para el conformero E_{closed} de anandamida usando el factor de escala de 1.014 en cloroformo. Se asignan los modos vibracionales de *stretching* (ν), *bending* en el plano (β) y torsión (τ).

Freq	Int	F esc	PED ($\geq 10\%$)
3535.8	5.20	3585.3	$\nu\text{NH}(100)$
3299.1	100.00	3345.2	$\nu\text{OH}(99)$
3062.5	4.97	3105.4	$\nu\text{CH}(87)$
3029.8	2.70	3072.2	$\nu\text{CH}(97)$
3017.0	7.27	3059.3	$\nu\text{CH}(99)$
3011.4	7.40	3053.5	$\nu\text{CH}(82)$
2982.3	3.73	3024.0	$\nu\text{CH}(73)$
2973.7	6.90	3015.4	$\nu\text{CH}(89)$
2950.9	0.91	2992.2	$\nu\text{CH}(100)$
2949.1	0.39	2990.4	$\nu\text{CH}(99)$
2948.6	7.29	2989.9	$\nu\text{CH}(94)$
2937.8	15.27	2978.9	$\nu\text{CH}(94)$
1663.7	0.01	1686.9	$\nu\text{CC}(71)$
1625.1	36.01	1647.9	$\nu\text{OC}(73)$
1496.3	34.10	1517.3	$\nu\text{NC}(27)+\beta\text{HNC}(48)$
1463.5	18.02	1484.0	$\beta\text{HOC}(81)+\beta\text{HCO}(10)$
1067.4	2.91	1082.3	$\nu\text{OC}(26)$
676.2	11.51	685.7	$\tau\text{HOCC}(84)$

En la Figura 18 se muestra el espectro teórico IR de anandamida en cloroformo para el conformero E_{closed} , donde se asignan las bandas representativas descritas anteriormente.

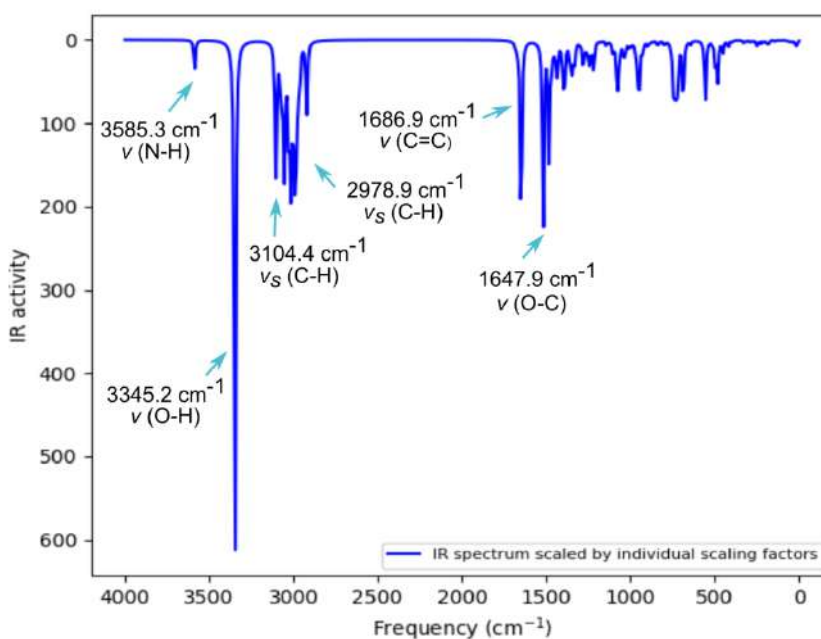


Figura 18. Espectro teórico de IR de anandamida E_{closed} calculado en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

5.4 Análisis de orbitales moleculares frontera (FMO) y mapas de potencial electrostático molecular (MEP)

Orbitales Moleculares Frontera (FMO)

Los Orbitales Moleculares Frontera (FMO) son relevantes para predecir la reactividad relativa basada en las propiedades de estructura electrónica de un sistema molecular. Las propiedades químicas de una molécula están controladas por los orbitales de valencia. De esta manera, los ataques nucleofílicos están relacionados con los orbitales HOMO y los ataques electrofílicos con los orbitales LUMO. La diferencia de energía HOMO-LUMO (ΔE_{gap}) es considerada como una medida de la estabilidad de la estructura molecular [93]. La Tabla 15 contiene las energías de HOMO y LUMO, E_{HOMO} y E_{LUMO} , y las energías gap, ΔE_{gap} , para los compuestos NMP y los conformeros de la anandamida, E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} en cloroformo.

Compuestos NMP

La ΔE_{gap} para los compuestos NMP es ~ 3.0 eV en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ. El compuesto NMP-4 tiene un valor de energía gap ligeramente mayor que NMP-7 y NMP-181.

Tabla 15. Energías HOMO y LUMO, E_{HOMO} y E_{LUMO} , y energía gap, ΔE_{gap} (eV), para los compuestos NMP obtenidas en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

Compuestos	E_{HOMO}	E_{LUMO}	ΔE_{gap}
NMP-4	-5.024	-1.855	3.169
NMP-7	-5.137	-1.996	3.142
NMP-181	-5.125	-2.122	3.002

La Tabla 16 muestra el porcentaje de la contribución del grupo funcional de los orbitales moleculares LUMO+3 a HOMO-3 para los compuestos NMP en cloroformo. El grupo carbazol de los compuestos NMP-4, NMP-7 y NMP-181 contribuye casi completamente con valores del 95, 97 y 76% al orbital LUMO, respectivamente. Las diferencias observadas son del 2% para NMP-4 y de 21% para NMP-181 respecto a NMP-7, debido al grupo metoxi unido al compuesto NMP-4 y al grupo éster del compuesto NMP-181. El grupo carbazol también contribuye considerablemente al orbital HOMO con 80 y 86% para los compuestos NMP-4 y NMP-7, respectivamente, mientras que en NMP-181 el grupo amino tiene la mayor contribución con 97%. El grupo carbonilo contribuye en un 8 y 7%

en el orbital HOMO para el compuesto NMP-4 y NMP-7, respectivamente, mientras que en el orbital LUMO su participación es sólo del 1% para ambos compuestos. En el compuesto NMP-181 se observa una participación del grupo éster sobre el orbital LUMO de 23% y sobre el orbital HOMO del 2%. El grupo pentilo tiene porcentajes de contribución muy bajos en los orbitales analizados, ver Tabla 16.

Tabla 16. Porcentaje de contribución de orbitales moleculares de los compuestos NMP calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

	MO	eV	Carbazol	Pentilo	Carbonilo	Piperidina	Metoxi	
NMP-4	106	L+3	-0.16	82	4	7	4	3
	105	L+2	-0.79	85	2	9	3	1
	104	L+1	-1.49	70	0	22	8	0
	103	LUMO	-1.85	95	1	1	1	3
	102	HOMO	-5.02	80	3	8	1	9
	101	H-1	-5.19	89	3	0	0	8
	100	H-2	-5.57	6	0	46	47	1
	99	H-3	-5.86	18	0	50	30	2
	MO	eV	Carbazol	Pentilo	Carbonilo	Piperidina		
NMP-7	98	L+3	-0.37	92	2	3	2	
	97	L+2	-0.82	88	2	7	3	
	96	L+1	-1.55	70	1	22	8	
	95	LUMO	-2.00	97	1	1	1	
	94	HOMO	-5.14	86	5	7	2	
	93	H-1	-5.5	65	0	27	8	
	92	H-2	-5.64	26	0	23	51	
	91	H-3	-5.94	30	0	50	19	
	MO	eV	Carbazol	Pentilo	Ester	Amino		
NMP-181	99	L+3	-0.43	95	3	2	0	
	98	L+2	-0.92	94	2	4	0	
	97	L+1	-1.99	83	1	16	0	
	96	LUMO	-2.12	76	0	23	0	
	95	HOMO	-5.12	0	0	2	97	
	94	H-1	-5.29	90	6	4	0	
	93	H-2	-5.69	98	0	1	0	
	92	H-3	-6.43	9	0	90	1	

La Figura 19 muestra las isosuperficies de los FMO en cloroformo usando un isovalor de 0.02 a.u. Se observa una importante contribución del orbital LUMO para los átomos de C del grupo carbazol y una menor contribución de los átomos de O en el grupo carbonilos de NMP-4 y NMP-7 y en el grupo éster de NMP-181. En los compuestos NMP-4 y NMP-7, las principales contribuciones del orbital HOMO se localizan en los átomos C y N del grupo carbazol y contribuciones menores en los átomos C22 y C23 del grupo pentilo,

mientras que para el compuesto NMP-181 la mayor contribución del orbital HOMO se localiza en los átomos del grupo amino de piperidina.

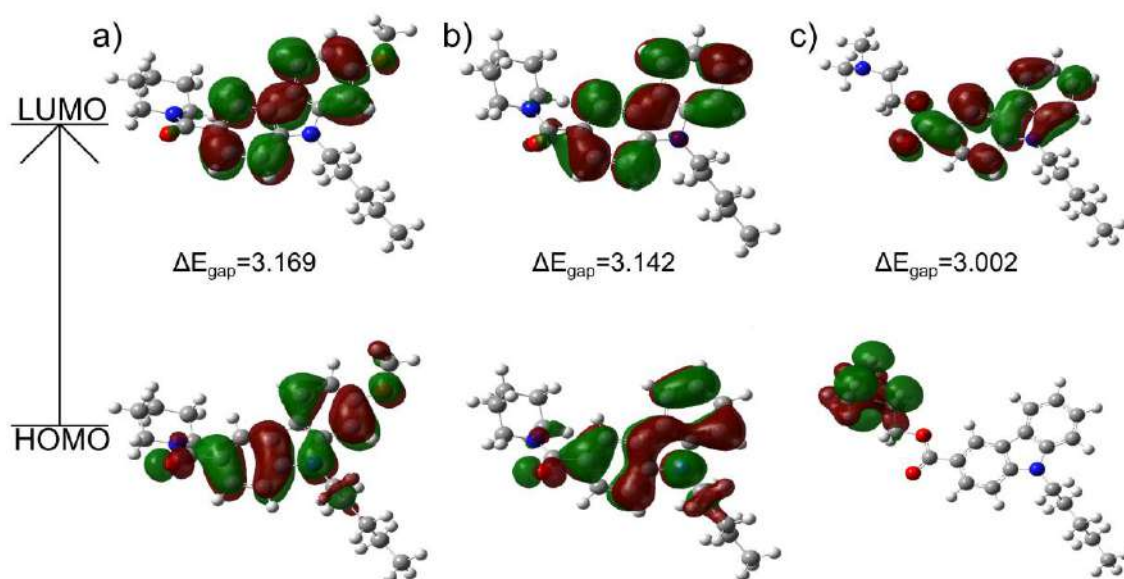


Figura 19. Orbitales moleculares frontera (HOMO y LUMO) y valores ΔE_{gap} (en eV) para los compuestos a) NMP-4, b) NMP-7, y c) NMP-181 calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

Anandamida

El valor de ΔE_{gap} de anandamida es de $\sim 4\text{-}5$ eV para los tres conformeros de anillo cerrado. Para los conformeros de anandamida el valor ΔE_{gap} incrementa ligeramente conforme la cadena alquilo se va cerrando para formar el conformero en forma de horquilla ($E_{\text{closed}} < U_{\text{closed}} < H_{\text{closed}}$).

Tabla 17. Energías HOMO y LUMO, E_{HOMO} y E_{LUMO} , y energía gap, ΔE_{gap} (eV), para los conformeros de anandamida E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} obtenidos en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

Compuestos	E_{HOMO}	E_{LUMO}	ΔE_{gap}
E_{closed}	-5.752	-1.322	4.430
U_{closed}	-5.874	-1.241	4.633
H_{closed}	-5.846	-1.087	4.760

Para determinar el porcentaje de contribución de los orbitales moleculares en las estructuras de anandamida se usaron las regiones de la Figura 11: grupo etanolamida (EA), Alquilo-I, Alquilo-M y Alquilo-F. La Tabla 18 muestra los porcentajes de contribución de estas regiones de los orbitales LUMO+3 a HOMO-3 para los conformeros E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} de anandamida en cloroformo. El orbital LUMO se distribuye principalmente $\sim 90\%$

en la región Alquilo-M de los conformeros E_{closed} y U_{closed} , mientras que para H_{closed} el orbital LUMO se localiza en un 65% en la región Alquilo-M y 28% en el grupo etanolamida. El orbital HOMO, se localiza en un 94% en la región Alquilo-M de E_{closed} . Para U_{closed} las mayores contribuciones del orbital HOMO son aportadas por el grupo etanolamida con 67% y 30% de la región Alquilo-M, mientras que para H_{closed} el orbital HOMO se encuentra en un 97% sobre la región Alquilo-M.

Tabla 18. Porcentajes de contribución de orbitales moleculares de los conformeros E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} de anandamida calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo para las regiones de anandamida mostradas en la Figura 11.

	MO	eV	Etanolamida	Alquilo-I	Alquilo-M	Alquilo-F	
E_{closed}	100	L+3	-0.23	3	2	92	3
	99	L+2	-0.72	22	3	73	3
	98	L+1	-1	58	10	31	1
	97	LUMO	-1.32	5	3	91	1
	96	HOMO	-5.75	0	2	94	4
	95	H-1	-5.89	99	1	0	0
	94	H-2	-6.01	2	5	88	6
	93	H-3	-6.21	58	6	35	2
	MO	eV	Etanolamida	Alquilo-I	Alquilo-M	Alquilo-F	
U_{closed}	100	L+3	-0.42	9	6	82	3
	99	L+2	-0.76	24	4	68	4
	98	L+1	-1.01	53	10	35	1
	97	LUMO	-1.24	2	1	94	2
	96	HOMO	-5.87	67	1	30	2
	95	H-1	-5.88	30	0	66	4
	94	H-2	-6.03	1	1	93	5
	93	H-3	-6.07	7	10	83	0
	MO	eV	Etanolamida	Alquilo-I	Alquilo-M	Alquilo-F	
H_{closed}	100	L+3	-0.53	1	1	88	9
	99	L+2	-0.67	27	8	65	0
	98	L+1	-1.02	32	6	61	2
	97	LUMO	-1.09	28	7	65	1
	96	HOMO	-5.85	0	0	97	2
	95	H-1	-5.9	24	6	69	1
	94	H-2	-5.93	3	0	87	9
	93	H-3	-5.96	72	1	26	2

La Figura 20 muestra las isosuperficies con un isovalor de 0.02 a.u. de los FMO en cloroformo. Se observan las contribuciones más significativas del orbital LUMO en los átomos de la región Alquilo-M para los conformeros E_{closed} , U_{closed} , y H_{closed} , y en menor contribución del grupo etanolamida para E_{closed} y U_{closed} comparado con H_{closed} . Por otro

lado, los átomos ubicados en la región Alquilo-M contribuyen principalmente al orbital HOMO, y algunas contribuciones menores están localizadas sobre las regiones Alquilo-I y Alquilo-F para E_{closed} , U_{closed} , y H_{closed} . Una contribución considerable se observa en el grupo etanolamida en el conformero U_{closed} .

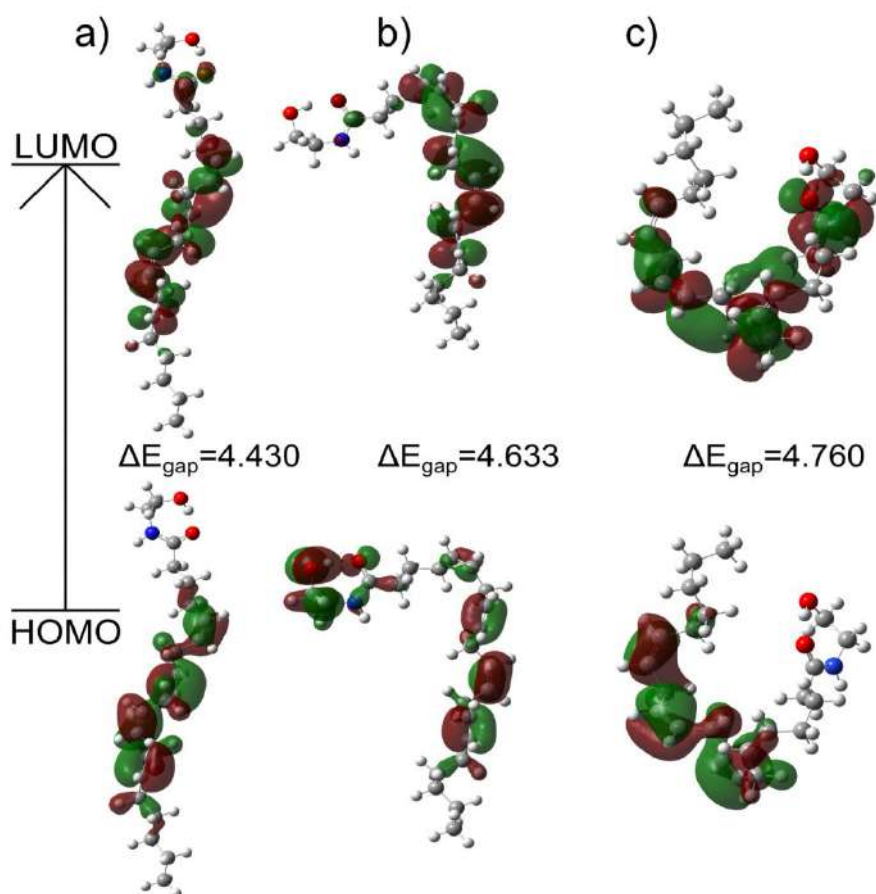


Figura 20. Orbitales moleculares frontera (HOMO y LUMO) y valores de ΔE_{gap} para los conformeros a) E_{closed} , b) U_{closed} , y c) H_{closed} de anandamida calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

Las propiedades electrónicas, como las energías FOM pueden estar relacionadas con medidas experimentales que determinan la actividad biológica. Por ejemplo, para etosuximida, otro tipo de bloqueador de los canales de calcio tipo T, los valores de su energía E_{LUMO} esta correlacionada con medidas de actividad anticonvulsiva determinada por el parámetro logED50 (50% dosis efectiva). Este estudio ha reportado una correlación con una $R^2=0.975$ obtenida en el nivel de teoría HF/6-311+G(d,p) en cloroformo [73].

Para los compuestos NMP y los conformeros E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} de anandamida, se obtiene la correlación entre E_{LUMO} en cloroformo (ver Tabla 9) con respecto a los valores

de IC_{50} (concentración inhibitoria máxima al 50%) de la actividad bloqueadora de los canales de calcio tipo T reportada para los compuestos NMP [9, 10] y la estructura de anandamida [47]. Debido a que los valores IC_{50} experimentales de anandamida no especifican el conformero de estudio, para el análisis se consideran a los conformeros E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} .

La Figura 21 resume los resultados de la correlación entre la energía LUMO con el parámetro $\log IC_{50}$ obteniendo una R^2 de 0.994 usando E_{LUMO} para E_{closed} , una R^2 de 0.992 usando E_{LUMO} para U_{closed} y una R^2 de 0.986 usando E_{LUMO} para H_{closed} . Los resultados muestran que la correlación que involucra el conformero E_{closed} da los mejores resultados, como se ve en la Figura 21a). La energía E_{LUMO} con respecto al $\log IC_{50}$ sigue una tendencia de: E_{closed} (-1.322) > NMP-7 (-1.855) > NMP-4 (-1.996) > NMP-181 (-2.122), el cual corresponde a los valores de IC_{50} : $0.330 \mu M < 1.84 \mu M < 2.47 \mu M < 4.5 \mu M$, respectivamente.

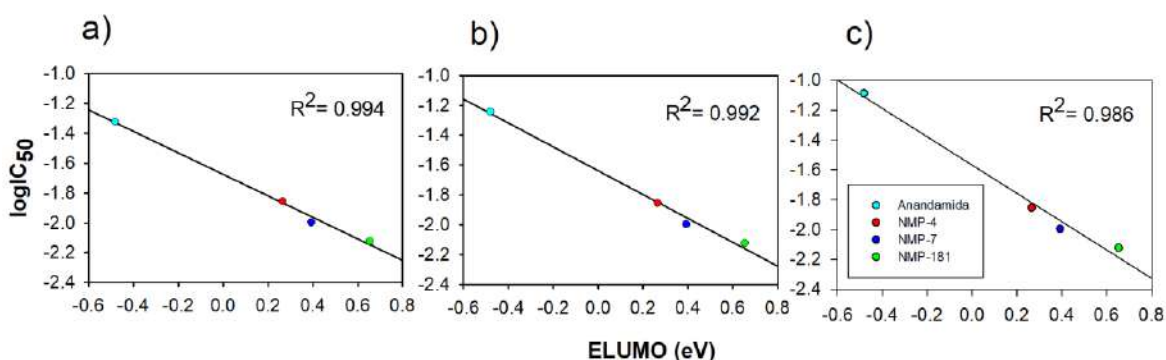


Figura 21. Correlación entre E_{LUMO} (eV) y el parámetro $\log IC_{50}$ (IC_{50} valores están en μM .) para los compuestos NMP y los conformeros de anandamida considerando en a) E_{closed} , b) U_{closed} y c) H_{closed} calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

En conclusión, una contribución de los orbitales LUMO está localizado en un ~90% sobre el grupo carbazol de los compuestos NMP y un 65% sobre los conformeros de anandamida (E_{closed} , U_{closed} y H_{closed}) en la región del Alquilo-M. Debido a una mayor contribución de los orbitales LUMO en estas regiones (con presencia de orbitales π), se puede concluir que estas regiones moleculares poseen una mayor participación durante la interacción ligante-receptor tanto para los receptores CB1/CB2 como para los canales de calcio tipo T. Los estudios de acoplamiento molecular para el complejo receptor CB1/anandamida muestran que el enlace tipo $C-H \cdots \pi$ es un tipo importante de interacción no covalente [68, 69].

Mapa de Potencial Electrostático (MEP)

Por otro lado, el Mapa de Potencial Electrostático (MEP) es útil para determinar las diferentes regiones nucleofílicas y electrofílicas en un sistema molecular.

Compuestos NMP

La Figura 22 muestra los mapas MEP en un intervalo de -3.0×10^{-2} y 3.0×10^{-2} e u.a.⁻³ para los compuestos NMP obtenidos en el nivel de teoría de BP86/cc-pVTZ en cloroformo, usando un isovalor de 0.004 a.u. La mayor densidad de carga electrónica (región roja) se localiza alrededor del O1 en el grupo carbonil que se expande hacia el grupo carbazol en los tres compuestos NMP, adicionalmente en el N6 de la amina de NMP-181 se concentra una región de mayor carga de densidad electrónica, ver Figura 9 para la numeración. La región deficiente de densidad de carga electrónica (región azul) se localiza en la región donde el grupo pentilo se une al N17 del grupo carbazol en los tres compuestos NMP. También en el compuesto NMP-4 la región deficiente de densidad de carga electrónica se observa alrededor de los átomos de H sobre el grupo metoxi. Adicionalmente, una región de mayor densidad electrónica en el compuesto NMP-4 se extiende longitudinalmente casi 10.14 Å alcanzando el oxígeno del grupo metoxi. En el caso del compuesto NMP-7, esta región mide 8.77 Å en la ausencia del grupo metoxi, y de 8.94 Å para NMP-181, similar al compuesto NMP-7. Sin embargo, una región se localiza sobre el átomo N6 del grupo amino a una distancia de 5.05 Å (medida desde el átomo O1 del grupo carbonil al N6 del grupo amino).

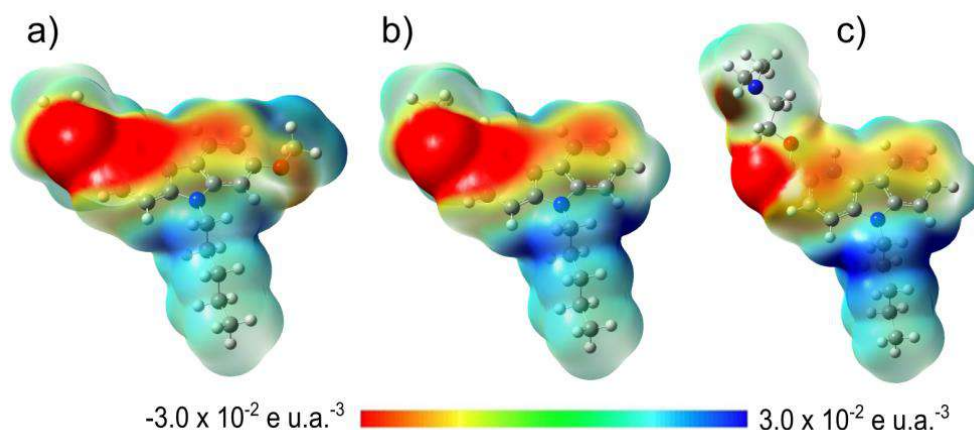


Figura 22. Mapa de potencial electrostático para los compuestos a) NMP-4, b) NMP-7 y c) NMP-181 calculado en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

Anandamida

En la Figura 23 el mapa MEP para los conformeros de anandamida E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} se representan en un intervalo de -3.0×10^{-2} y 3.0×10^{-2} e u.a.⁻³ con isovalor de 0.004 a.u. La región de mayor densidad de carga electrónica (región roja) se localiza sobre los átomos O21 y O22 del grupo etanolamida para los tres conformeros. Adicionalmente, en H_{closed} se observa densidad de carga electrónica en la región del Alquilo-M principalmente en C11=C12 y C14=C15, ver Figura 10 para la numeración. En esta región también se observan valores intermedios de densidad de carga electrónica (zonas en amarillo) para C5=C6 y C8=C9, para E_{closed} y U_{closed} . La región con deficiencia de densidad de carga electrónica (región azul) se localiza sobre el N23-H en el grupo etanolamida EA.

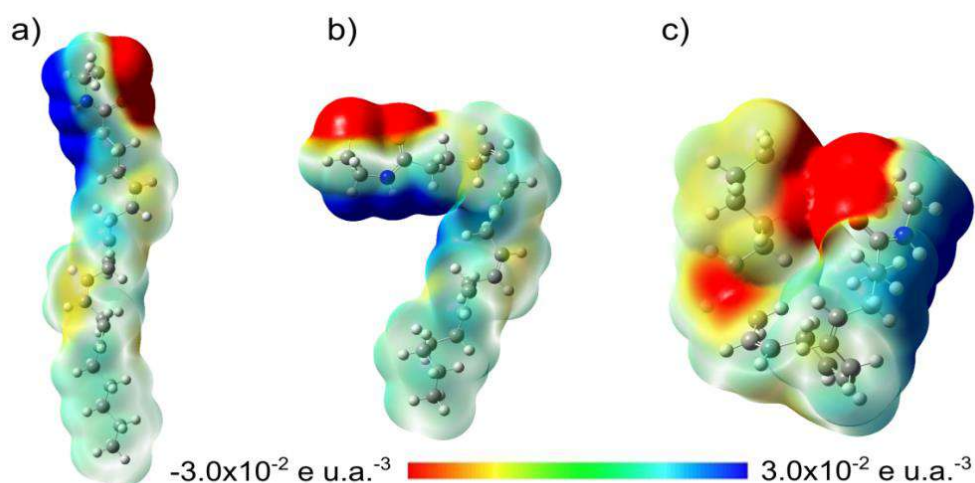


Figura 23. Mapa de potencial electrostático para los conformeros de anandamida a) E_{closed} , b) U_{closed} y c) H_{closed} calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

Una distribución similar de densidad de carga electrónica se observa para los conformeros E_{open} , U_{open} y H_{open} , sin embargo, se observa claramente una deficiencia de densidad de carga electrónica en la región de O22-H en la ausencia de la formación de puente de hidrógeno sobre el grupo etanolamida, ver Figura 10. La región Alquilo-M con valores intermedios de densidad de carga electrónica (región amarilla) para E_{closed} y U_{closed} , y regiones de densidad de carga electrónica intermedia y alta para H_{closed} (región roja y amarilla) se extiende a 10.98, 10.52 y 7.92 Å (medida desde los átomos C5 a C15), estos valores en promedio son similares a los obtenidos para los compuestos NMP. Se puede proponer una similitud funcional del reconocimiento electrostático ligante-receptor y el

acoplamiento del bolsillo de unión para los compuestos NMP y la anandamida con los receptores CB1/CB2 y el canal de calcio tipo T [133].

5.5 Análisis de orbitales de enlace natural (NBO)

El análisis NBO es un método que permite estudiar enlaces intra e intermoleculares así como la transferencia de carga de interacciones intermoleculares entre los orbitales del sistema molecular [134]. Establece bases para estudiar la estabilidad molecular por deslocalización de densidad electrónica, sistemas conjugados, hiperconjugación, etc [94]. Los cálculos de los orbitales de enlace natural (NBO) para los compuestos NMP y las estructuras de anandamida con anillo cerrado, también se realizaron para definir una medida de estabilidad a través de la energía de estabilización, el parámetro E(2). Entre mayor es el valor E(2) es más intensa la interacción entre donadores de electrones y aceptores de electrones. La deslocalización de densidad electrónica entre orbitales NBO tipo Lewis ocupados (donador) y orbitales NBO no-Lewis desocupados (aceptor) corresponde a una interacción donador-aceptor estabilizadora [135].

Compuestos NMP

El compuesto NMP-7 tiene tres aceptores de puentes de hidrógeno (O1, N3 y N17) mientras que los compuestos NMP-4 (O1, N3, N17 y O27) y NMP-181 (O1, O3, N17 y N6) tienen cuatro de ellos. Debido a la ausencia de donadores de puentes de hidrógeno, en todos los compuestos NMP, la estabilidad de la estructura molecular no puede ser establecida por la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares. En este caso, el análisis NBO es útil para determinar interacciones relevantes entre los orbitales NBO tipo Lewis (donador) y orbitales NBO no-Lewis (aceptor), y también para definir la deslocalización de densidad electrónica. La Tabla 19 enlista las energías de estabilización E(2) mayores representativas de los donadores y aceptores de los compuestos NMP calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo. Los orbitales de enlace (donador) y antienlace (aceptor), $\pi \rightarrow \pi^*$, se establecen en los compuestos NMP en los carbonos del anillo carbazol en un intervalo de $\sim 11-24$ kcal mol⁻¹. Se observa que los orbitales de enlace (donador) y antienlace (aceptor), $\pi(\text{C9-C13}) \rightarrow \pi^*(\text{O1-C2})$, tienen una mayor energía de estabilización en el grupo éster del compuesto NMP-181 que en los grupos amida de los compuestos NMP-4 y NMP-7.

Los átomos electronegativos O y N interactúan, a través de sus pares libres (LP), con los orbitales de antienlace π de los átomos de carbono vecinos, $LP \rightarrow \pi^*$, con valores de energía de estabilización de $\sim 16-40$ kcal mol⁻¹ y con el orbital de antienlace σ del compuesto NMP-181, $LP(N6) \rightarrow \sigma^*(C8-H53)$, con energía $E(2)$ de 7 kcal mol⁻¹. Finalmente, la energía de interacción antienlace/antienlace, $\pi^* \rightarrow \pi^*$, corresponde al intervalo de valores de $E(2)$ de $\sim 23-84$ kcal mol⁻¹ en cloroformo. La deslocalización electrónica se observa sobre los enlaces conjugados del anillo de carbazol, y se extiende hacia la región de los pares libres de electrones (LP) de los orbitales p de los átomos vecinos electronegativos hacia el grupo carbazol. Específicamente, en NMP-4 y NMP-7, la deslocalización electrónica se extiende al grupo amida (átomos O1 y N3) y al grupo carbazol (N17); adicionalmente, sobre el grupo metoxi (átomo O27) en NMP-4. En NMP-181, la deslocalización electrónica se observa en el grupo éster (O1 y O3) y el grupo carbazol (N17). En este caso, en NMP-181, la amina terciaria (N6) contribuye en menor medida a la deslocalización, y se observa una interacción de hiperconjugación. Los resultados presentados indican que la estabilidad de estructuras de mínima energía para los compuestos NMP se establece principalmente por el efecto de deslocalización electrónica, en donde los valores mayores de $E(2)$ se localizan sobre los átomos electronegativos y el grupo carbazol.

Tabla 19. Análisis NBO (donador→aceptor) para los compuestos NMP calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo. La numeración de los átomos corresponde a la Figura 9.

	Donador NBO (i)	Aceptor NBO (j)	$E(2)^a$ (kcal mol ⁻¹)	$E(j)-E(i)^b$ (a.u.)	$F(i,j)^c$ (a.u.)
NMP-4	π (C ₉ -C ₁₃)	π^* (O ₁ -C ₂)	11.10	0.29	0.051
	π (C ₉ -C ₁₃)	π^* (C ₁₀ -C ₁₁)	15.70	0.23	0.054
	π (C ₁₀ -C ₁₁)	π^* (C ₉ -C ₁₃)	13.00	0.23	0.050
	LP (O ₁)	π^* (C ₂ -N ₃)	20.28	0.59	0.099
	LP (O ₁)	π^* (C ₂ -C ₉)	16.61	0.55	0.087
	LP (N ₃)	π^* (O ₁ -C ₂)	25.75	0.28	0.077
	LP (N ₁₇)	π^* (C ₁₆ -C ₂₁)	38.69	0.22	0.084
	LP (O ₂₇)	π^* (C ₂₀ -C ₁₉)	27.36	0.26	0.081
	π^* (C ₉ -C ₁₃)	π^* (O ₁ -C ₂)	23.28	0.06	0.056
	π^* (O ₁ -C ₂)	π^* (O ₁ -C ₂)	23.91	0.36	0.190
NMP-7	π (C ₉ -C ₁₃)	π^* (O ₁ -C ₂)	11.61	0.29	0.052
	π (C ₉ -C ₁₃)	π^* (C ₁₀ -C ₁₁)	15.81	0.23	0.054
	π (C ₁₀ -C ₁₁)	π^* (C ₉ -C ₁₃)	12.73	0.23	0.050
	π (C ₁₅ -C ₁₈)	π^* (C ₁₆ -C ₂₁)	16.02	0.22	0.054
	LP (O ₁)	π^* (C ₂ -N ₃)	20.24	0.59	0.099
	LP (O ₁)	π^* (C ₂ -C ₉)	16.59	0.55	0.087
	LP (N ₃)	π^* (O ₁ -C ₂)	26.51	0.28	0.078
	π^* (O ₁ -C ₂)	π^* (O ₁ -C ₂)	24.22	0.36	0.190
	π^* (C ₁₂ -N ₁₇)	π^* (C ₁₀ -C ₁₁)	83.57	0.05	0.077
	π^* (C ₉ -C ₁₃)	π^* (O ₁ -C ₂)	23.42	0.06	0.058
π (C ₉ -C ₁₃)	π^* (O ₁ -C ₂)	23.59	0.2	0.061	

NMP-181	π (C ₉ -C ₁₃)	π^* (C ₁₀ -C ₁₁)	16.61	0.23	0.055
	π (C ₁₀ -C ₁₁)	π^* (C ₉ -C ₁₃)	11.98	0.23	0.048
	π (C ₁₄ -C ₁₂)	π^* (C ₁₅ -C ₁₆)	16.23	0.22	0.054
	LP (O ₁)	π^* (C ₂ -O ₃)	28.07	0.51	0.108
	LP (O ₁)	π^* (C ₂ -C ₉)	16.45	0.58	0.089
	LP (O ₃)	π^* (O ₁ -C ₂)	40.21	0.25	0.091
	LP (N ₁₇)	π^* (C ₁₄ -C ₁₂)	33.81	0.22	0.079
	LP (N ₆)	σ^* (C ₈ -H ₅₃)	6.99	0.55	0.056
	π^* (O ₁ -C ₂)	π^* (C ₉ -C ₁₃)	62.65	0.03	0.065

^a E(2) es la energía estabilizadora de las interacciones de enlace

^b E(j)-E(i) es la diferencia de energía entre los orbitales NBO donador (i) y aceptor (j)

^c F(i,j) son los elementos de la matriz de Fock entre los orbitales NBO donador (i) y aceptor (j)

Anandamida

Los conformeros de anandamida E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} tienen un aceptor de puente de hidrógeno (O21) y dos donadores de puente de hidrógeno (O22 y N23). La estabilidad del anillo de siete átomos en el grupo etanolamida surge de la formación de un puente de hidrógeno intramolecular O21...H58-O22. La Tabla 20 enlista las energías mayores E(2) de los conformeros de anandamida E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo. La región de los orbitales de enlace (donadores) y orbitales antienlace (aceptores), $\sigma \rightarrow \sigma^*$, se localiza en la región de Alquilo-M (ver Figura 11) con una energía de estabilización E(2) de 7.3-8.2 kcal mol⁻¹. Se observa también, en el grupo etanolamida, que el par de electrones libres y el orbital de antienlace, LP(O₂₁) $\rightarrow \sigma^*$, se deslocaliza por hiperconjugación sobre los enlaces C1-C2, C1-N23 y O22-H58, con valores de energía de estabilización E(2) en el intervalo de 11.8-18.1 kcal mol⁻¹. La interacción entre el par de electrones libres y el orbital de antienlace, correspondiente a LP(O₂₂) $\rightarrow \sigma^*$ y LP(N₂₃) $\rightarrow \sigma^*$, se deslocaliza por hiperconjugación sobre los enlaces C2'-H54 y C1'-H56, con un intervalo de energía E(2) de 8.6-8.8 kcal mol⁻¹ y 4.9-5 kcal mol⁻¹, respectivamente. Finalmente, los valores mayores de E(2) corresponden a la interacción de LP(N₂₃) $\rightarrow \pi^*$ (C₁-O₂₁), en el grupo amida en el grupo etanolamida, con valores de 33.9, 59.6 y 56.3 kcal mol⁻¹ para E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} , respectivamente.

Tabla 20. Análisis NBO (donador→aceptor) para los conformeros de anandamida E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo. La numeración corresponde a los átomos de la Figura 10.

	Donador NBO (i)	Aceptor NBO (j)	E(2) ^a (kcal mol ⁻¹)	E(j)-E(i) ^b a.u.	F(i,j) ^c a.u.
E_{closed}	σ (C ₅ -H ₃₂)	σ^* (C ₆ -C ₇)	7.40	0.78	0.068
	σ (C ₆ -H ₃₃)	σ^* (C ₄ -C ₅)	7.33	0.79	0.069
	σ (C ₉ -H ₃₆)	σ^* (C ₇ -C ₈)	7.37	0.78	0.068
	σ (C ₁₄ -H ₆₂)	σ^* (C ₁₅ -C ₁₆)	7.27	0.80	0.068
	LP (O ₂₁)	σ^* (C ₁ -C ₂)	18.06	0.52	0.090

	LP (O ₂₁)	σ^* (C ₁ -N ₂₃)	15.97	0.63	0.092
	LP (O ₂₁)	σ^* (O ₂₂ -H ₅₈)	11.86	0.62	0.078
	LP (O ₂₂)	σ^* (C ₂ -H ₅₄)	8.56	0.53	0.061
	LP (N ₂₃)	π^* (C ₁ -O ₂₁)	33.89	0.29	0.089
	LP (N ₂₃)	σ^* (C ₁ -H ₅₆)	4.90	0.55	0.051
U _{closed}	σ (C ₅ -H ₃₂)	σ^* (C ₆ -C ₇)	7.48	0.78	0.068
	σ (C ₆ -H ₃₃)	σ^* (C ₄ -C ₅)	7.44	0.79	0.069
	σ (C ₉ -H ₃₆)	σ^* (C ₇ -C ₈)	7.42	0.78	0.068
	σ (C ₁₄ -H ₆₂)	σ^* (C ₁₅ -C ₁₆)	7.34	0.79	0.068
	LP (O ₂₁)	σ^* (C ₁ -C ₂)	17.94	0.54	0.090
	LP (O ₂₁)	σ^* (C ₁ -N ₂₃)	15.92	0.63	0.091
	LP (O ₂₁)	σ^* (O ₂₂ -H ₅₈)	11.98	0.62	0.079
	LP (O ₂₂)	σ^* (C ₂ -H ₅₄)	8.63	0.53	0.061
	LP (N ₂₃)	π^* (C ₁ -O ₂₁)	59.61	0.21	0.099
	LP (N ₂₃)	σ^* (C ₁ -H ₅₆)	5.01	0.55	0.051
	H _{closed}	σ (C ₅ -H ₃₂)	σ^* (C ₆ -C ₇)	7.61	0.79
σ (C ₆ -H ₃₃)		σ^* (C ₄ -C ₅)	7.36	0.79	0.068
σ (C ₈ -H ₆₀)		σ^* (C ₉ -C ₁₀)	8.18	0.78	0.071
σ (C ₉ -H ₃₆)		σ^* (C ₇ -C ₈)	8.17	0.78	0.071
σ (C ₁₄ -H ₆₂)		σ^* (C ₁₅ -C ₁₆)	7.40	0.80	0.069
LP (O ₂₁)		σ^* (C ₁ -C ₂)	17.84	0.54	0.090
LP (O ₂₁)		σ^* (C ₁ -N ₂₃)	15.98	0.63	0.092
LP (O ₂₁)		σ^* (O ₂₂ -H ₅₈)	11.76	0.62	0.078
LP (O ₂₂)		σ^* (C ₂ -H ₅₄)	8.82	0.53	0.061
LP (N ₂₃)		π^* (C ₁ -O ₂₁)	56.34	0.21	0.098

^a E(2) es la energía estabilizadora de las interacciones de enlace

^b E(j)-E(i) es la diferencia de energía entre los orbitales NBO donador (i) y aceptor (j)

^c F(i,j) son los elementos de la matriz de Fock entre los orbitales NBO donador (i) y aceptor (j)

5.6 Descriptores de reactividad global

Se evalúan los descriptores de reactividad global de los compuestos NMP y los conformeros de anandamida E_{closed}, U_{closed} y H_{closed}: potencial químico (μ), electronegatividad (χ), dureza (η), blandura (s), índice de electrofilicidad (ω) de acuerdo a la teoría DFT conceptual [95]. La Tablas 21 y 22 resume los descriptores de reactividad global de los compuestos NMP y de los conformeros de anandamida E_{closed}, U_{closed} y H_{closed}. Los valores de las energías HOMO y LUMO se reportan en la Tablas 15 y 17, respectivamente.

Compuestos NMP

En la Tabla 21 se observa que los valores de los descriptores de reactividad global en los compuestos NMP son similares y no existen cambios significativos. El grupo metoxi del compuesto NMP-4 disminuye ligeramente la electronegatividad e incrementa el potencial químico un 3.7% mientras que el grupo amino y el grupo ester de NMP-181 tiene un cambio inverso sobre estos parámetros en un 1.57% respecto al compuesto NMP-7. El valor de dureza es mayor para NMP-4, seguido de NMP-7 y de NMP-181 con valores de

3.17 > 3.14 > 3.00 eV, respectivamente, por lo que se observa que NMP-181 disminuye la dureza un 4.6%, mientras que el compuesto NMP-4 incrementa un 0.86%, ambos respecto al compuesto NMP-7. La blandura, es similar en los tres compuestos NMP con valores de 0.3 eV. El compuesto NMP-181 tiene un mayor comportamiento como electrófilo seguido de NMP-7 y de NMP-4. Se observa que la presencia del grupo metoxi del compuesto NMP-4 disminuye el índice de electrofilicidad, mientras que el grupo amino y el grupo éster de NMP-181 lo incrementa en un ~ 8%, ambos con respecto NMP-7, el cual no contiene estos grupos funcionales, ver Figura 9.

Tabla 21. Descriptores de reactividad global (eV) para los compuestos NMP calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

	NMP-4	NMP-7	NMP-181
μ	-3.44	-3.57	-3.62
χ	3.44	3.57	3.62
η	3.17	3.14	3.00
s	0.32	0.32	0.33
ω	1.87	2.02	2.19

Anandamida

Por otro lado, en la Tabla 22 para los confórmeros de anandamida E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} se observa que no hay cambios significativos cuando anandamida cambia su conformación, esto es la curvatura de su cadena alquilo (Alquilo-I y Alquilo-M de la Figura 11). Algunas pequeñas diferencias se observan en la dureza, blandura y el índice de electrofilicidad. La dureza incrementa un 4.5 y 7.4 % para los confórmeros U_{closed} y H_{closed} respectivamente, respecto al confórmero E_{closed} . La blandura es de 0.2 eV para los tres confórmeros. Finalmente, el confórmero más electrofílico es E_{closed} seguido de U_{closed} y de H_{closed} con valores de 1.41 > 1.37 > 1.26 eV, respectivamente. Se observa un decremento en el índice de electrofilicidad de 3.3 y 10.6 % para los confórmeros U_{closed} y H_{closed} , respectivamente, respecto al confórmero de anandamida E_{closed} .

Tabla 22. Descriptores de reactividad global (eV) para los confórmeros de anandamida E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

	E_{closed}	U_{closed}	H_{closed}
μ	-3.54	-3.56	-3.47
χ	3.54	3.56	3.47
η	4.43	4.63	4.76
s	0.23	0.22	0.21
ω	1.41	1.37	1.26

Los descriptores de reactividad global que cambian más cuando se compara anandamida y los compuestos NMP (como referencia se usan los compuestos NMP-7 y H_{closed}) es la dureza sobre un 51% de 4.76 en H_{closed} y 3.14 en NMP-7 en cloroformo. Anandamida tiene una mayor resistencia a cambiar su distribución electrónica comparada con los compuestos NMP. Cabe mencionar que se han observado cambios significativos en el índice de dureza cuando se modela un proceso de interacción ligante-receptor [136]. El índice de electrofilicidad es otro descriptor desigual; de hecho, un valor mayor corresponde con los compuestos NMP con respecto a la anandamida, con una diferencia de 37.6%. El índice de electrofilicidad esta correlacionado con propiedades de afinidad de receptor y actividad biológica [137].

5.7 Descriptores de reactividad local

Las Tablas 23 y 24 muestran las funciones de Fukui condensadas $f^+(r)$ y $f^-(r)$, el descriptor dual, $f^{(2)}(r)$ y las funciones de Parr, $P^-(r)$ y $P^+(r)$, para los compuestos NMP y los conformeros de anandamida E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} , respectivamente.

Compuestos NMP

La Tabla 23 muestra los valores de la función de Fukui para los compuestos NMP en los intervalos de $f^+ = 0.025-0.072$ y $f^- = 0.011-0.070$ para NMP-4, $f^+ = 0.031-0.072$ y $f^- = 0.012-0.074$ para NMP-7, y $f^+ = 0.014-0.086$ y $f^- = 0.002-0.10$ para NMP-181, en cloroformo. Los valores de las funciones de Fukui para los grupos funcionales relevantes en los compuestos NMP son de $f^+ = 0.048$ en el grupo metoxi O27 (NMP-4) y $f^+ = 0.086$ en el grupo amino N6 (NMP-181). Los valores máximos indican la zona más probable de ataque nucleofílico y electrofílico. Los sitios más probables de sufrir un ataque nucleofílico son el C21, N17 y N6 para los compuestos NMP-4, NMP-7 y NMP-181, respectivamente, mientras que los átomos mas propensos para sufrir un ataque electrofílico son C20 para NMP-7 y C13 para NMP-4 y NMP-181. Las funciones de Parr coinciden con los índices de Fukui para los sitios más probables para ataques nucleofílicos en los compuestos NMP. Sin embargo, para los ataques electrofílicos indican que el C13 es el sitio más probable para los tres compuestos NMP considerados.

Tabla 23. Funciones de Fukui, $f^+(r)$ y $f^-(r)$, descriptor dual, $f^{(2)}(r)$, y funciones de Parr, $P^-(r)$ y $P^+(r)$, para los compuestos NMP calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

		$f^+(r)$	$f^-(r)$	$f^{(2)}(r)$	$P^+(r)$	$P^-(r)$
NMP-4	O1	0.063	0.023	0.040	0.104	0.003
	C9	0.049	0.029	0.020	0.107	0.017
	C10	0.041	0.063	-0.022	0.034	0.097
	C11	0.037	0.064	-0.026	0.033	0.089
	C13	0.025	0.070	-0.045	-0.006	0.157
	C14	0.043	0.044	-0.002	0.084	0.088
	N17	0.050	0.011	0.038	0.129	0.001
	C20	0.040	0.053	-0.013	0.055	0.095
	C21	0.072	0.052	0.020	0.146	0.055
	O27	0.048	0.027	0.021	0.079	0.022
NMP-7	O1	0.060	0.025	0.035	0.089	0.006
	C9	0.054	0.031	0.022	0.117	0.020
	C10	0.031	0.061	-0.030	-0.007	0.092
	C11	0.049	0.064	-0.015	0.074	0.088
	C13	0.035	0.073	-0.037	0.029	0.167
	N17	0.072	0.012	0.060	0.205	0.003
	C18	0.046	0.067	-0.022	0.045	0.121
	C19	0.062	0.041	0.021	0.093	0.009
	C20	0.036	0.074	-0.038	-0.002	0.122
	C21	0.055	0.059	-0.004	0.095	0.072
NMP-181	O1	0.028	0.061	-0.033	0.018	0.059
	C2	0.014	0.048	-0.034	0.006	0.077
	N6	0.086	0.002	0.085	0.204	0.000
	C11	0.039	0.057	-0.018	0.066	0.061
	C13	0.024	0.100	-0.076	0.015	0.248
	N17	0.054	0.014	0.041	0.157	0.003
	C18	0.033	0.051	-0.018	0.028	0.078
	C19	0.050	0.036	0.014	0.084	0.008
	C20	0.027	0.064	-0.037	-0.004	0.097
	C21	0.042	0.044	-0.002	0.074	0.040

La Figura 24 presenta las isosuperficies de las funciones de Fukui con el mejor valor para f^+ y f^- para los compuestos NMP, usando un isovalor de 0.002 u.a. En esta figura se observa que la posición de la isosuperficie para f^+ se localiza principalmente en el nitrógeno del carbazol en los compuestos NMP, en el oxígeno del carbonilo para NMP-4 y NMP-7, en el grupo metoxi en NMP-4 y en el nitrógeno de la amida en NMP-181. Para f^- la distribución se localiza sobre los carbonos del carbazol en los compuestos NMP y el oxígeno del carbonilo en NMP-181.

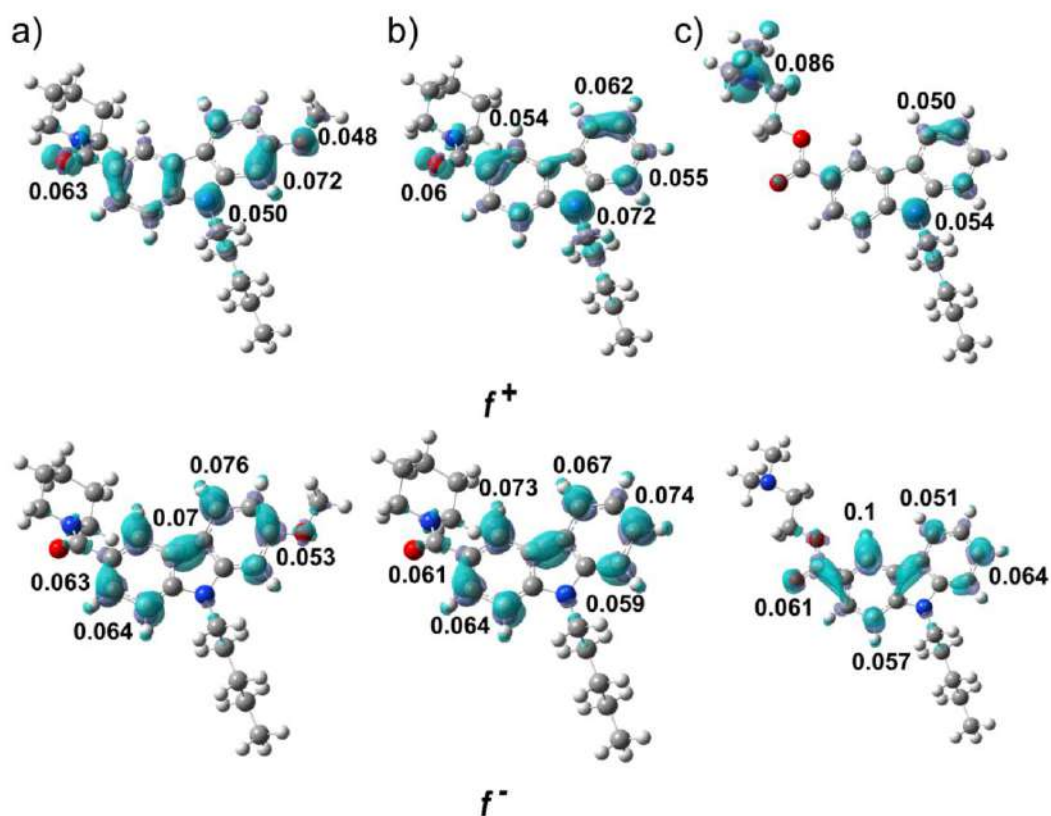


Figura 24. Funciones de Fukui f^+ y f^- para los compuestos NMP: a) NMP-4, b) NMP-7 y c) NMP-181 calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

Anandamida

Para los conformeros de anandamida E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} los valores en cloroformo de las funciones de Fukui se encuentran en los intervalos $f^+ = 0.007-0.071$ y $f^- = 0.007-0.053$ para E_{closed} , $f^+ = 0.012-0.080$ y $f^- = 0.008-0.057$ para U_{closed} , y $f^+ = 0.005-0.081$ y $f^- = 0.009-0.052$ para H_{closed} , como se muestra en la Tabla 24. Los valores más relevantes son el átomo O22 para ataques nucleofílicos y para ataques electrofílicos C12 para todos los conformeros y adicionalmente C8 para E_{closed} y C1 para H_{closed} . Los valores mayores de las funciones de Parr indican que de igual forma el O22 es el sitio más probable para un ataque nucleofílico y que el C1 para el conformero E_{closed} y H_{closed} y el C11 para U_{closed} son los sitios más probables para un ataque electrofílico.

Tabla 24. Funciones de Fukui, $f^+(r)$ y $f^-(r)$, descriptor dual, $f^{(2)}(r)$, y las funciones de Parr, $P^-(r)$ y $P^+(r)$, para los conformeros de anandamida E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

		$f^+(r)$	$f^-(r)$	$f^{(2)}(r)$	$P^+(r)$	$P^-(r)$
E_{closed}	C1	0.007	0.041	-0.034	0.002	0.088
	C5	0.046	0.047	0.000	0.075	0.071
	C6	0.038	0.042	-0.004	0.063	0.070
	C8	0.046	0.053	-0.007	0.074	0.084
	C9	0.043	0.052	-0.008	0.069	0.084
	C11	0.045	0.048	-0.003	0.072	0.080
	C12	0.047	0.053	-0.006	0.074	0.083
	C14	0.048	0.029	0.018	0.084	0.049
	C15	0.056	0.039	0.017	0.091	0.060
	O22	0.071	0.007	0.064	0.117	0.001
U_{closed}	C1	0.012	0.039	-0.027	0.007	0.084
	C5	0.038	0.039	-0.001	0.061	0.057
	C6	0.039	0.037	0.002	0.070	0.068
	C8	0.034	0.048	-0.014	0.052	0.077
	C9	0.030	0.044	-0.015	0.048	0.068
	C11	0.050	0.055	-0.005	0.082	0.092
	C12	0.049	0.057	-0.008	0.081	0.089
	C14	0.047	0.036	0.011	0.087	0.063
	C15	0.053	0.044	0.009	0.084	0.067
	O22	0.080	0.008	0.072	0.127	0.001
H_{closed}	C1	0.013	0.052	-0.039	0.006	0.114
	C5	0.048	0.034	0.014	0.059	0.040
	C6	0.044	0.034	0.010	0.058	0.077
	C8	0.039	0.049	-0.010	0.083	0.076
	C9	0.028	0.043	-0.015	0.082	0.071
	C11	0.063	0.047	0.017	0.046	0.077
	C12	0.075	0.052	0.023	0.044	0.082
	C14	0.005	0.027	-0.022	0.101	0.043
	C15	0.013	0.035	-0.022	0.089	0.053
	O22	0.081	0.009	0.072	0.114	0.001

La Figura 25 presenta las isosuperficies para las funciones de Fukui con valores mayores de f^+ y f^- para los conformeros de E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} , usando un isovalor de 0.002 u.a. En esta figura se observa para todos los conformeros que la distribución f^+ se localiza en el oxígeno del grupo hidroxilo y en los carbonos vinílicos sobre la región Alquilo-M (ver Figura 11), mientras que la distribución f^- está localizada sobre el carbón carbonilo y también en los carbonos vinílicos en el grupo Alquilo-M. Este hallazgo está en concordancia con los valores experimentales, los cuales muestran que la existencia de la región de enlaces dobles de anandamida es un factor esencial para el mecanismo de bloqueo de los canales de calcio tipo T [138].

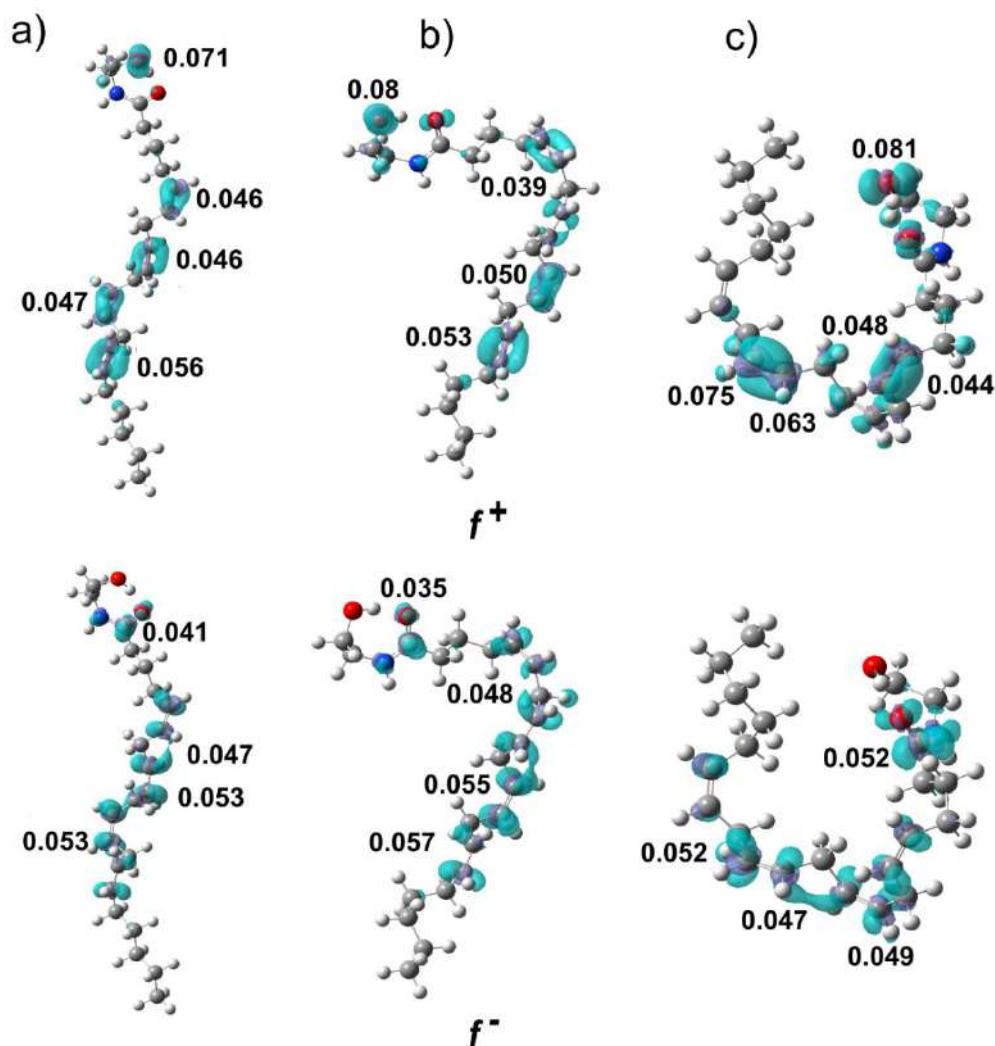


Figura 25. Funciones de Fukui f^+ y f^- para los conformeros de anandamida: a) E_{closed} , b) U_{closed} y c) H_{closed} calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

En resumen, el grupo carbazol es una región importante de acumulación de densidad electrónica para los compuestos NMP, en la misma forma que la región Alquilo-M lo es para anandamida. Las distancias calculadas a lo largo de estas regiones son de 6.6 Å en C9-C20 para NMP-7 y 7.9 Å en C5-C15 para el conformero H_{closed} de anandamida. Se puede proponer una similitud funcional de reconocimiento electrostático y acoplamiento del bolsillo de unión para los compuestos NMP y anandamida con los receptores CB1/CB2 y el canal de calcio tipo T [133].

5.8 Análisis de la teoría cuántica de átomos en moléculas (QTAIM)

El análisis QTAIM se enfoca en caracterizar el puente de hidrógeno intramolecular de los conformeros de anillo cerrado de anandamida E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} . Esta interacción de puente de hidrógeno genera una estructura de anillo de siete átomos en el grupo etanolamina. La estabilidad de las estructuras de anillo cerrado de anandamida por el efecto de la formación del puente de hidrógeno y el anillo en el grupo etanolamida se analizan mediante la energía de interacción en cada conformación de anandamida de anillo cerrado a partir de la densidad electrónica obtenida en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

La Tabla 25 muestra los valores de la densidad electrónica $\rho(r)$, el gradiente $\nabla\rho(r)$, el Laplaciano $\nabla^2\rho(r)$, la energía cinética Lagrangiana G , la energía cinética Hamiltoniana H , la densidad de energía potencial V , la energía de interacción $E_{H\dots Y}$, la distancia interatómica D_{inter} y los índices de deslocalización DI de los principales puntos críticos de enlace (BPC) de los conformeros E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} de anandamida. La numeración corresponde a la Figura 26.

De los resultados se observa una interacción no covalente correspondiente al puente de hidrógeno en el grupo etanolamina O21...H58-O22 con $\rho(r) = 0.043$ y $\nabla^2\rho(r) = \sim 0.096$ u.a. para los conformeros E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} . Estos parámetros de densidad electrónica concuerdan con los reportados en la literatura de 0.002-0.035 y 0.024-0.139 u.a., respectivamente [139]. Por otro lado, el signo de $H(r)$ indica, en los tres conformeros, que la acumulación de carga en el puente de hidrógeno es un enlace estabilizador ($H(r) < 0$) [140]. Adicionalmente, los DI indican un intervalo de 0.1106-0.1110 u.a. para el puente de hidrógeno intramolecular O21...H58-O22 en los tres conformeros, indicando que es una interacción < 1.0 correspondiente a un enlace no-covalente, mientras que los DI para el BCP entre H58-O22 tienen valores de 0.5371-0.5402 u.a., indicando que este enlace tiene una fuerza menor a un enlace sencillo (valor cercano a 1.0 u.a.), ya que el átomo de H58 también está contribuyendo a la formación del puente de hidrógeno con el átomo O21. La energía de interacción del puente de hidrógeno intramolecular O21...H58-O22 corresponde a 12.33-12.46 kcal/mol y forma un RCP con una $\rho(r) = 0.0115$ -0.0116 u.a. para los tres conformeros, siendo ligeramente mayor la $E_{H\dots Y}$ en el conformero U_{closed} , indicando que este puente de hidrógeno tiene un efecto estabilizador mayor que en los otros dos

conformers con anillo cerrado. El valor de la $\rho(r)$ en el RCP de etanolamida indica que la formación del anillo estabiliza en el mismo orden a las estructuras en los tres conformers de anillo cerrado.

Las interacciones no-covalentes H...H en la región Alquilo-M con valor de $\rho(r)$ en el intervalo de 0.011-0.020 u.a. generan la formación de 4 estructuras de anillo con $\rho(r)$ en los RCP de 0.010-0.015 u.a. para los tres conformers. Las energías de interacción entre H...H son muy pequeñas indicando interacciones débiles con valores de DI de de 0.03 u.a. aproximadamente. Solamente en el conformer H_{closed} se observa la interacción no-covalente $C_6-H_{37}C_{10}$ dando valores de $\rho(r)$ en el BCP y RCP de 0.0135 y 0.0092 u.a. respectivamente, y un valor de DI de 0.045 u.a. Adicionalmente, el conformer H_{closed} forma una estructura de anillo adicional por las interacciones entre $C_{17}H_{45}-O_{24}$ y $C_{20}H_{53}-O_{24}$ con valor de $\rho(r) = 0.0013$ u.a. en el RCP. Por otro lado, del análisis de los DI entre los átomos $C_5=C_6$, $C_8=C_9$, $C_{11}=C_{12}$ y $C_{14}=C_{15}$ en la zona Alquilo-M son de 1.77 u.a., corroborando la formación de dobles enlaces *cis* en los tres conformers.

Tabla 25. Parámetros topológicos (u.a.), $E_{H...Y}$ (kcal/mol) y distancias interatómicas (D_{inter} , Å) de los conformers E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} de anandamida.

BCP	$\rho(r)$	$\nabla\rho$	$\nabla^2\rho$	G (r)	V (r)	H (r)	$E_{H...Y}$	D_{inter}	DI	RCP
E_{closed}										
$O_{22}H_{58}-O_{21}$	0.0430	6.65×10^{-14}	0.0959	0.0317	-0.0393	-0.0076	12.33	1.75846	0.1106	0.0115
$C_4H_{31}-H_{35}C_7$	0.0118	9.82×10^{-15}	0.038	0.0079	-0.0063	0.0016	1.98	2.06071	0.0284	0.0113
$C_7H_{34}-H_{37}C_{10}$	0.0120	5.73×10^{-18}	0.0386	0.0081	-0.0065	0.0016	2.04	2.04591	0.0289	0.0115
$C_{10}H_{38}-H_{42}C_{13}$	0.0121	4.37×10^{-13}	0.0386	0.0081	-0.0065	0.0016	2.04	2.04497	0.0289	0.0115
$C_{13}H_{41}-H_{44}C_{16}$	0.0118	2.80×10^{-17}	0.0380	0.0079	-0.0063	0.0016	1.98	2.06096	0.0284	0.0113
U_{closed}										
$O_{22}H_{58}-O_{21}$	0.0433	9.12×10^{-17}	0.0961	0.0319	-0.0397	-0.0078	12.46	1.75571	0.1110	0.0115
$C_4H_{31}-H_{35}C_7$	0.0112	2.80×10^{-17}	0.0367	0.0076	-0.006	0.0016	1.88	2.08868	0.0263	0.0100
$C_7H_{35}-H_{37}C_{10}$	0.0116	2.42×10^{-17}	0.0378	0.0079	-0.0063	0.0016	1.98	2.06339	0.0273	0.0112
$C_{10}H_{38}-H_{42}C_{13}$	0.0121	6.50×10^{-12}	0.0384	0.0080	-0.0065	0.0015	2.04	2.04242	0.0294	0.0115
$C_{13}H_{41}-H_{44}C_{16}$	0.0119	3.46×10^{-17}	0.0387	0.0081	-0.0065	0.0016	2.04	2.05663	0.0284	0.0115
H_{closed}										
$O_{22}H_{58}-O_{21}$	0.0431	2.60×10^{-17}	0.0953	0.0317	-0.0395	-0.0078	12.39	1.75686	0.1109	0.0116
$C_4H_{31}-H_{35}C_7$	0.0120	4.68×10^{-16}	0.0382	0.008	-0.0064	0.0016	2.01	2.04967	0.0290	0.0114
$C_6-H_{38}C_{10}$	0.0135	1.89×10^{-17}	0.0395	0.0087	-0.0075	0.0012	2.35	2.2993	0.0449	0.0092
$C_{10}H_{37}-H_{42}C_{13}$	0.0115	5.02×10^{-15}	0.0374	0.0078	-0.0062	0.0016	1.95	2.07088	0.0270	0.0110
$C_{13}H_{42}-H_{44}C_{16}$	0.0114	6.07×10^{-15}	0.0372	0.0077	-0.0061	0.0016	1.91	2.07819	0.0269	0.0110
$C_{17}H_{45}-O_{22}$	0.0016	8.89×10^{-18}	0.0050	0.0009	-0.0006	0.0003	0.19	3.40010	0.0100	0.0013
$C_{20}H_{53}-O_{22}$	0.0015	7.44×10^{-18}	0.0050	0.0009	-0.0006	0.0003	0.19	3.43546	0.0095	0.0013

En la Figura 26 muestra los grafos moleculares de los conformeros E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} . Los puntos verdes representan los puntos críticos de enlace (BCP) y los puntos rojos representan los puntos críticos de anillo (RCP).

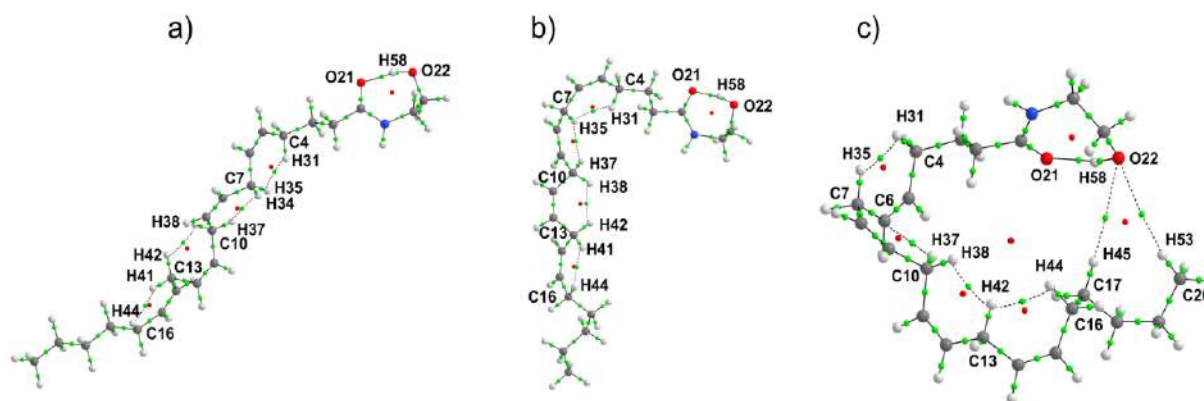


Figura 26. Grafos moleculares de los conformeros de anandamida: a) E_{closed} , b) U_{closed} y c) H_{closed} calculados en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ en cloroformo.

5.9 Acoplamiento Molecular

Los resultados de los cálculos de acoplamiento molecular muestran distintos sitios posibles de interacción para los compuestos NMP y los conformeros de anandamida en el canal $Ca_v3.2$. Se consideraron los sitios localizados en la región transmembranal, los cuales interactúan de manera preferencial con los segmentos S5 y S6 (DI-DIV) del canal $Ca_v3.2$. Los cinco sitios de interacción propuestos se nombran como S6DII (Figura 27a)), S6DIII (Figura 27b)), S6DI (Figura 27c)), S5DIV (Figura 28a)) y Poro (Figura 28b)). Se eligieron estos sitios por tener energías menores de interacción además de ser sitios comunes en las moléculas bloqueadoras. Las Figuras 27 y 28 muestran los residuos de interacción importantes en el bolsillo de unión para los conformeros representativos de los compuestos NMP y anandamida con el canal $Ca_v3.2$. Se observa que los aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos se encuentran en gran medida en estas regiones.

Compuestos NMP

En la pose S6DII (Figura 27a)), los residuos F158, F161 y V610 interactúan con el grupo carbazol de NMP-4 con interacciones π - π *stacking* para los residuos de fenilalanina y de tipo π -alquilo para valina. Además, los residuos F292, I295 y C157 interactúan con el grupo piperidina del compuesto NMP-4 con interacciones de tipo π -alquilo para los residuos de fenilalanina y de tipo alquilo-alquilo para los residuos de isoleucina y cisteína.

En la pose S6DIII (Figura 27b)), los residuos F943 y L939 estabilizan el grupo pentilo de NMP-7 por interacciones alquilo. El residuo L938 interacciona de forma π -alquilo con el anillo de piperidina. También, los residuos T586 y S942 interaccionan de forma π - σ y π -donador de puente de hidrógeno, respectivamente, con el grupo carbazol.

Finalmente, para la pose S6DI (Figura 27c)), se observa que el bolsillo de unión esta conformado principalmente por residuos aromáticos de fenilalanina. El grupo carbazol del compuesto NMP-181 interactúa con la A711 y F1193 con interacciones de tipo π -alquilo y π - π *stacking*, respectivamente, y con los residuos F316 y F1197 con interacciones de tipo π - π *stacking* en forma de T. Se ha observado en los canales $Ca_v1.1$ que el S6DIII es importante en la interacción con dihidropiridinas [32]. Además, en la estructura del $Ca_v3.1$, obtenida por microscopia crioelectrónica, se observa que moléculas de fosfolípidos y colesterol se localizan en sitios similares al S6DI [26].

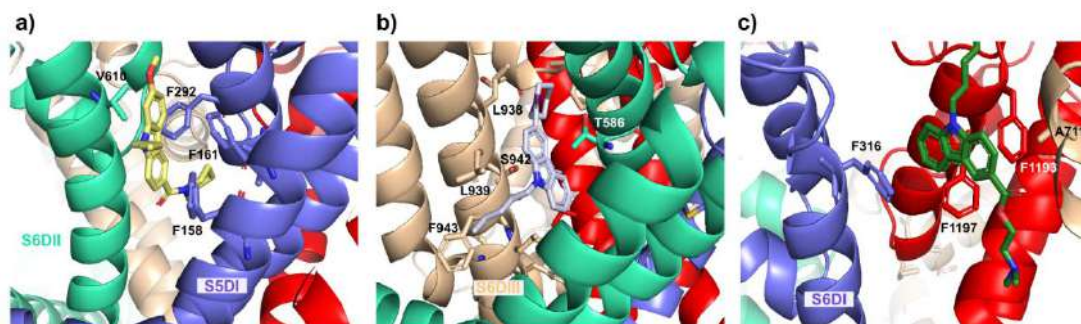


Figura 27. Residuos importantes de interacción de los compuestos NMP y el canal $Ca_v3.2$: a) sitio S6DII y el compuesto NMP-4, b) sitio S6DIII y el compuesto NMP-7 y c) sitio S6DI y el compuesto NMP-181. Para una ubicación mejor de los sitios ver el diagrama de la figura 8 d).

Anandamida

Debido a la naturaleza flexible de anandamida se observa que en interacción con el $Ca_v3.2$ tiende a formar conforméromos plegados. En efecto, información de rayos X de anandamida en interacción con su transportador proteico (FABP5) muestra un conforméromo en horquilla [70] y el fármaco Z944 se acomoda en forma de U en el bolsillo de unión del canal de calcio tipo T [26]. Por ello, se analizaron los conforméromos U_{closed} y H_{closed} en interacción con el $Ca_v3.2$. Además, se incluyen los conforméromos U_{open} y H_{open} para comprobar si existe alguna ventaja en la energía de interacción de los conforméromos con el anillo cerrado en comparación con los conforméromos correspondientes de anillo abierto de anandamida con el $Ca_v3.2$.

En el sitio S5DIV (Figura 28a)), tanto el confórmero de anandamida U_{closed} y U_{open} colocan su cabeza polar dentro del segmento S4DIII donde se localizan los residuos polares formando un puente de hidrógeno con L806 y R807, ambos residuos ubicados a una distancia de 2.6 Å, también se observa una interacción desfavorable aceptor-aceptor con D767. El confórmero U_{closed} forma un puente de hidrógeno adicional con D767, sin embargo, esta interacción no representa una ventaja siendo la energía de interacción de -9.2 kcal/mol para ambos confórmeros. La porción no polar de ambos confórmeros de anandamida (U_{closed} y U_{open}) se coloca en el segmento S5DIV donde se localizan residuos hidrofóbicos formando interacciones de tipo alquilo-alquilo con L815, L1151, L1154 y V1249. La información de rayos-X de los canales TRPV5, los cuales pertenecen a la familia evolutiva de los canales de calcio tipo T, en unión con Econazol muestra un sitio que se corresponde al S5DIV del $Ca_v3.2$ [141]. En la pose S6DIII (Figura 28 b)), la F943 interacciona de tipo π - σ con la región Alquilo-M de los confórmeros H_{closed} y H_{open} .

Finalmente, se puede observar que en el sitio del Poro (Figura 28 c)), una región hidrofóbica se forma con los residuos V1251, V1254, M948, F949, V945, L946, I331 y M330 donde la cola no polar del confórmero de anandamida U_{open} y el grupo pentil del compuesto NMP-181 se localiza formando interacciones de tipo alquilo-alquilo, mientras que S900 y T568 forman un enlace de hidrógeno-carbono con la cabeza polar del confórmero de anandamida U_{open} y el grupo amino NMP-181, respectivamente. Cabe mencionar que el confórmero U_{closed} se acomodó con NMP-181 en el grupo alquilo final pero en el grupo etanolamida se orientó hacia el segmento P del DI, de manera que no permitió una comparación con el compuesto NMP-181.

Se observa una equivalencia de grupos funcionales de ambos ligantes cuando interactúan con el canal $Ca_v3.2$. La pose más probable de las estudiadas es la localizada en la región del Poro, debido a que registros electrofisiológicos experimentales muestran un bloqueo del canal $Ca_v3.2$ por anandamida y los compuestos NMP modifican la fase de inactivación del canal [9, 47, 142]. Se encuentra también que los residuos MFV del sitio S6-DIII contribuyen a la fase de inactivación del Ca_v3 [143]. En el $Ca_v3.2$ los residuos M948 y F949 participan en el bolsillo de unión hidrofóbico del sitio del Poro. También, un estudio reciente que resolvió por microscopía electrónica al $Ca_v3.1$ en unión al bloqueador Z944 en este sitio teniendo residuos hidrofóbicos de interacción en común y al residuo T921 para

estabilizar al ligante, equivalente al T586 del Ca_v3.2 que estabiliza al compuesto NMP-181 [26].

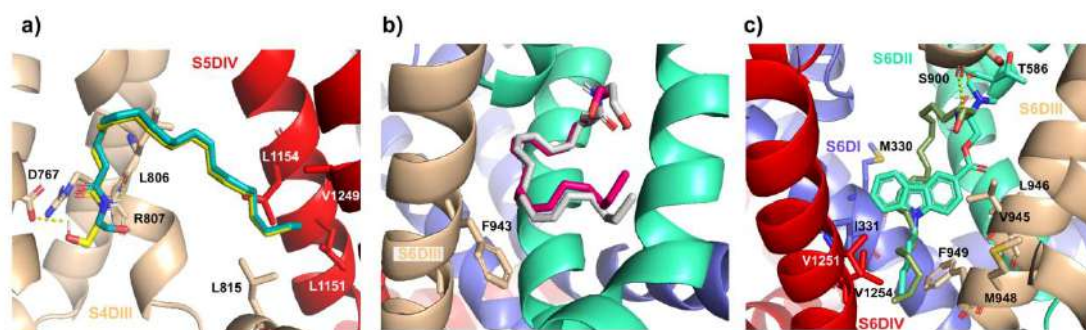


Figura 28. Residuos importantes de interacción de los conformeros de anandamida y el canal Ca_v3.2: a) Sitio S5DIV y los conformeros de anandamida U_{closed} y U_{open} formando dos puentes de hidrógeno con los residuos L806 y R807, U_{closed} adicionalmente forma un puente de hidrógeno con D767, b) sitio S6DIII y los conformeros de anandamida H_{closed} y H_{open} con interacciones π con el residuo F943 principalmente y c) Sitio del Poro con el compuesto NMP-181 y el conformero de anandamida U_{open}. Para una ubicación mejor de los sitios ver el diagrama de la figura 8 d).

Los valores de energía menor y común de los diferentes sitios se resumen en la Tabla 26 para los los compuestos NMP-4, NMP-7 y NMP-181 y los conformeros de anandamida U_{closed}, U_{open}, H_{closed} y H_{open}. Se observa que los valores de energía de interacción obtenidos son del orden de 10 kcal/mol siendo el compuesto NMP-7 el que tiene las energías mínimas de interacción. Además, se observa que en los conformeros de anandamida no existe una diferencia significativa en la energía de interacción considerando el anillo de 7-átomos del grupo etanolamida abierto o cerrado, sin embargo, hay una mejor energía de interacción para el conformero de U (U_{closed}/U_{open}) con respecto a los conformeros de horquilla (H_{closed}/H_{open}). Es oportuno mencionar que estudios posteriores de simulación de dinámica molecular se recomiendan para evaluar la estabilidad de los sitios de interacción y de las poses propuestas para los ligantes considerados. Además de estudios de mutagénesis para poder verificar los residuos de interacción propuestos.

Tabla 26. Energías de interacción ΔG (kcal/mol) para los compuestos NMP y los conformeros U y H de anandamida con el canal Ca_v3.2.

	NMP-4	NMP-7	NMP-181	U _{closed}	U _{open}	H _{closed}	H _{open}
S6DI	-9.1	-10.0	-9.6	-9.2	-8.8	-8.9	-8.3
S6DII	-9.5	-10.0	-9.1	-9.8	-9.8	-9.4	-9.4
S6DIII	-9.5	-10.1	-9.2	-8.8	-9.2	-8.6	-8.6
S5DIV	-7.9	-8.1	-8.2	-9.2	-9.2	-8.4	-8.6
Poro	-9.4	-9.1	-8.2	-8.7	-8.3	-8.4	-8.2

5.10 Simulaciones de Dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron con genisteína, un bloqueador del canal de calcio tipo T con preferencia al subtipo $Ca_v3.3$ (Figura 29a). La genisteína es un metabolito secundario de la planta de soya, perteneciente a la familia de las isoflavonas (compuestos fenólicos con actividad biológica), su estructura se muestra en la Figura 29b).

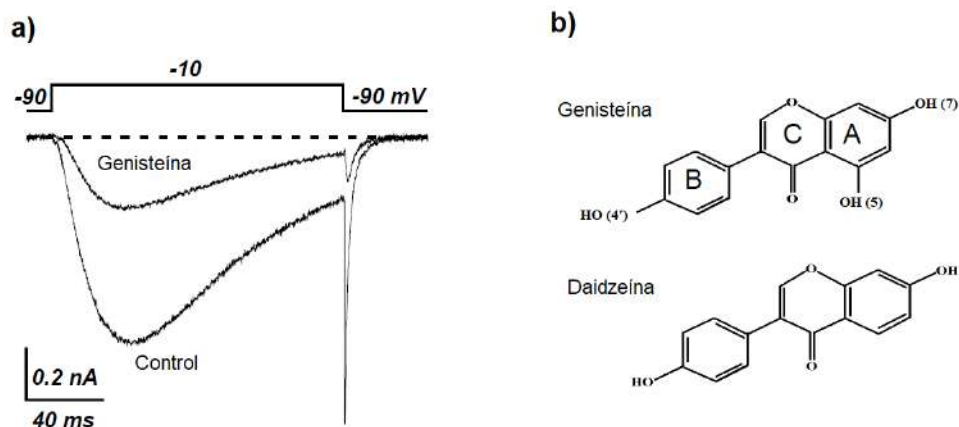


Figura 29. a) Trazo representativo del bloqueo de genisteína ($50 \mu\text{M}$) en los $Ca_v3.3$. b) Estructura de genisteína y daidzeína.

La estructura del $Ca_v3.3$ se obtiene por modelado por homología como se explica en la sección 4.6 de la Metodología. Tras realizar un estudio de acoplamiento molecular se obtuvieron 9 poses de las cuales se escogieron 3 poses finales para las simulaciones de dinámica molecular denominadas PDII y PDIII; PDIII y PDIV; y PDI y PDIV. Las condiciones de simulación consideran un ambiente fisiológico, esto es que el $Ca_v3.3$ esta insertada en una membrana plasmática (POPC) bañada de solución extracelular e intracelular.

Después de 1000 ns (500, 000, 000 pasos) de simulación se observa que las poses PDIII y PDIV; y PDI y PDIV convergen a un mismo sitio. Los principales aminoácidos de interacción son la F1426 que estabilizan el anillo A y C de la genisteína, los aminoácidos S1419, K1379 interactúan con el anillo B, L1721 forma un puente de hidrógeno con el OH (7) y Q1718 forma un puente de hidrógeno con el OH (5), como se muestra en la Figura 30 [144].

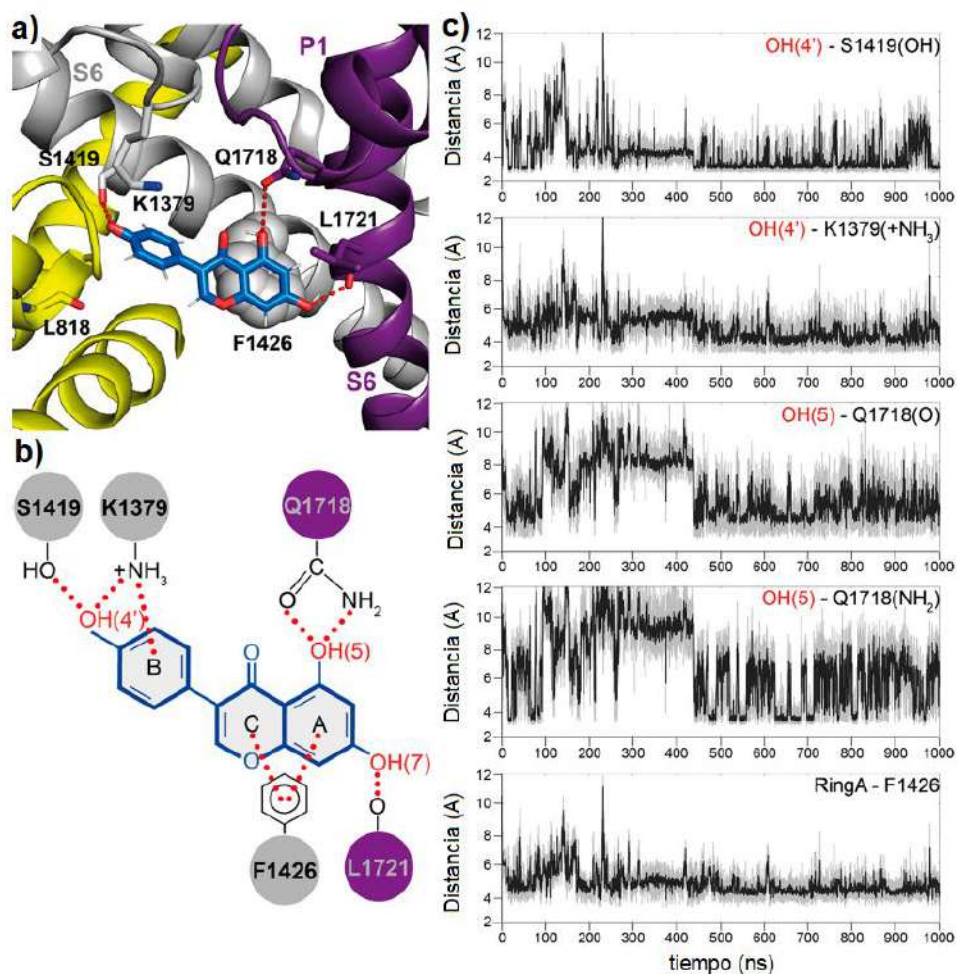


Figura 30. a) y b) Aminoácidos importantes de interacción de genisteína en el bolsillo de unión de $Ca_v3.3$. c) Gráficos de las distancias de los aminoácidos importantes de interacción.

Los resultados obtenidos se comparan con experimentos electrofisiológicos usando una molécula estructuralmente similar a genisteína llamada daidzeína que carece del OH(5) (ver Figura 30b)) y que su capacidad de bloqueo se ve disminuido por lo mismo, comprobando la hipótesis teórica. Una segunda comparación de los resultados se realiza con un trabajo reciente, el cual por medio de espectroscopía electrónica resuelven la estructura del $Ca_v3.1$ -Z944 coincidiendo en el sitio propuesto para genisteína [26].

Capítulo VI. Conclusiones

Los estudios de espectroscopia RMN de ^1H y ^{13}C validaron el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ como método confiable para obtener las estructuras optimizadas de los compuestos NMP y anandamida. Además, que permite predecir parámetros químicos que caracterizan la reactividad química y la estabilidad estructural de las moléculas bloqueadoras de los canales de calcio tipo T antes mencionados.

Las estructuras de los compuestos NMP se obtuvieron como estructuras únicas de mínima energía sobre la superficie de energía potencial. La conformación de mínima energía es similar en los tres compuestos NMP y al ser compuestos derivados del carbazol mantienen una estructura semi-rígida. Los conformeros de anandamida E_{closed} , E_{open} , U_{closed} , U_{open} , H_{closed} y H_{open} , fueron elegidos a través de análisis conformacional usando el método MM+. Se han analizado previamente conformeros similares lo que permite comparar los resultados encontrados con los reportados en la literatura con respecto a la interacción con los receptores cannabinoides y con estudios conformacionales de anandamida. Dentro de estos conformeros, el conformero E_{closed} es el más estable de acuerdo al análisis poblacional, sin embargo, los conformeros en forma de U y H son biológicamente relevantes de acuerdo a estudios experimentales y teóricos de interacción ligante-receptor.

Los análisis de FMO establecen un ΔE_{gap} para los compuestos NMP del orden de 3.0 eV, siendo el compuesto NMP-4 el más estable cinéticamente y menos reactivo de acuerdo a este parámetro. Para los conformeros de anandamida el ΔE_{gap} está en el intervalo de 4-5 eV siendo H_{closed} el conformero más estable cinéticamente y con más baja reactividad. También, el grupo carbazol de los compuestos NMP contribuye en mayor medida (76-97%) al orbital LUMO mientras que para los conformeros de anandamida el grupo Alquilo-M es el que principalmente contribuye en un 90% para E_{closed} y U_{closed} y un 65% para H_{closed} . En cuanto al orbital HOMO, para NMP-4 y NMP-7, el grupo carbazol también contribuye notablemente en un 80 y 86% respectivamente, para NMP-181 el grupo amino representa un 97%. En los conformeros de anandamida el orbital HOMO se localiza en E_{closed} y H_{closed} en un 94 y 97% sobre la región Alquilo-M, mientras que para U_{closed} lo hace un 67%. Además, en este análisis se obtuvo una correlación de la energía E_{LUMO} con respecto al $\log\text{IC}_{50}$ (valores de afinidad para $\text{Ca}_v3.2$) con una R^2 de 0.994 considerando al conformero E_{closed} y los compuestos NMP.

El MEP obtenido es similar entre los compuestos NMP con una región de mayor densidad electrónica en el grupo carbonilo extendiéndose al grupo carbazol y adicionalmente sobre el grupo metoxi de NMP-4 y el grupo amida en NMP-181. Se observa también, una región deficiente de densidad electrónica en el grupo pentilo. Para los conformeros de anandamida se obtiene una distribución de densidad de carga electrónica similar, con una región de mayor densidad electrónica en el grupo -OH y una región deficiente de densidad electrónica localizada en el grupo -NH del anillo de etanolamida. Para E_{closed} y U_{closed} el grupo Alquilo-M representa valores intermedios de densidad electrónica en C5=C6 y C8=C9 mientras que para H_{closed} aparece una región mayor densidad de carga electrónica en C11=C12 y C14=C15.

El análisis NBO define mayores energías de estabilización $E(2)$ entre orbitales NBO tipo Lewis ocupados (donador) y orbitales NBO no-Lewis desocupados (aceptor). Para los compuestos NMP la deslocalización se da por la conjugación de interacciones de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, $LP \rightarrow \pi^*$ y $\pi^* \rightarrow \pi^*$ localizadas en el grupo carbonilo y el grupo carbazol. Mientras que para anandamida se observa una deslocalización electrónica por efecto de hiperconjugación en el grupo Alquilo-M de orbitales $\sigma \rightarrow \sigma^*$ y $LP \rightarrow \sigma^*$. Solamente se observa una interacción de tipo $LP \rightarrow \pi^*$ en la amida del grupo etanolamida.

La descripción de reactividad global arroja valores similares para los compuestos NMP y para los conformeros E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} de anandamida en el potencial químico, la electrofilicidad, la dureza, la blandura y el índice de electrofilicidad. Cabe mencionar algunos cambios no significativos entre estas moléculas. En la electronegatividad se observa una disminución y un aumento en NMP-4 debida al grupo metoxi y en NMP-181 debido al grupo amino y éster en un 3.7% y 1.57%, respectivamente, ambos con respecto a NMP-7. En cuanto a la dureza, entre los compuestos NMP, se obtiene un valor de NMP-4 (3.17 eV) > NMP-7 (3.14 eV) > NMP-181 (3.00 eV). Para anandamida la dureza en U_{closed} y H_{closed} es 4.5 y 7.4 % mayor respectivamente al valor de E_{closed} . El índice de electrofilicidad toma valores en E_{closed} (1.41 eV) > U_{closed} (1.37 eV) > H_{closed} (1.26 eV).

Los descriptores de reactividad local (funciones de Fukui y funciones de Parr) indican para los compuestos NMP que los sitios más probables de sufrir un ataque nucleofílico son los átomos C21, N17 y N6 para NMP-4, NMP-7 y NMP-181, respectivamente. Los primeros dos átomos (C21 y N17) se ubican en el grupo carbazol y el N6 en el grupo amida. De acuerdo con la función de Fukui, los átomos mas propensos para sufrir un ataque

electrofílico son C20 para NMP-7 y C13 para NMP-4 y NMP-181. A este respecto, la función de Parr indica al C13 como el más probable para los compuestos NMP. En cuanto a los conformeros considerados de anandamida, las funciones de Fukui y las funciones de Parr coinciden en que el átomo O22 es el sitio más probable para ataques nucleofílicos. Para ataques electrofílicos los índices de Fukui indican al C12 para todos los conformeros y adicionalmente C8 para E_{closed} y C1 para H_{closed} . Las funciones de Parr establecen que los sitios más probables para un ataque electrofílico son el C1 para E_{closed} y H_{closed} y el C11 para U_{closed} .

En resumen de lo anterior se puede decir que los análisis FMO, NBO y de reactividad local, como los índices de Fukui y las funciones de Parr, establecen que el grupo funcional carbazol para los compuestos NMP y la región de dobles enlaces de anandamida (región Alquilo-M) son importantes en la reactividad de estos compuestos. En efecto, son los más probables para recibir un ataque nucleofílico y electrofílico y podrían ser sitios importantes que participen en la interacción ligante-receptor.

El análisis QTAIM del puente de hidrógeno intramolecular que estabiliza el anillo de siete átomos en el grupo etanolamida de anandamida permite predecir la energía de interacción en un intervalo de 12.33-12.46 kcal/mol para los conformeros E_{closed} , U_{closed} y H_{closed} , siendo ligeramente más favorecida la formación del enlace de hidrógeno en el conformero U_{closed} . Además, el índice de deslocalización (DI) en el puente de hidrógeno da valores menores a 1.0 u.a. (valor correspondiente a un enlace sencillo) indicando la presencia de una interacción débil, de igual forma el valor entre H58-O22 se encuentra en el intervalo de 0.5371-0.5402 u.a. Se describen las interacciones no-covalentes de tipo $H\cdots H$ en la región Alquilo-M con valores de DI de 0.03 u.a. El DI también describe las interacciones en los enlaces dobles de la región Alquilo-M con valor de 1.77 u.a. que es cercano a 2 (valor correspondiente a un enlace doble).

El estudio de acoplamiento molecular ayuda a determinar aminoácidos importantes de interacción, siendo el sitio del Poro un probable bolsillo de unión en los canales de calcio tipo T importante en los compuestos NMP y anandamida en interacción con $Ca_v3.2$. Como compuestos representativos de este sitio el conformero U_{open} de anandamida, con su grupo alquilo final (no polar) y etanolamida (polar) y el compuesto NMP-181, con el grupo pentilo (no polar) y en el grupo amino (polar), permitió realizar una comparación en el bolsillo de unión. Esta comparación indicó la presencia de una región hidrofóbica

constituida por los residuos V1251, V1254, M948, F949, V945, L946, I331 y M330 donde se localiza la parte no polar de ambas moléculas formando interacciones de tipo alquilo-alquilo. Mientras que la parte polar de anandamida U_{open} y el grupo amino NMP-181 interaccionan con los residuos S900 y T568, respectivamente, formando un enlace de hidrógeno-carbono con estos aminoácidos.

Finalmente, la molécula genisteína interactúa en un bolsillo de unión en los canales de calcio tipo T ($Ca_v3.3$) similar al encontrado en la literatura para el complejo $Ca_v3.1$ -Z944 de acuerdo a las simulaciones de dinámica molecular y los estudios electrofisiológicos realizados para fundamentar dicha hipótesis. El estudio de interacción de genisteína con $Ca_v3.3$ ayudó a reforzar al sitio del Poro como un posible sitio de interacción de los compuestos NMP y anandamida con los canales de calcio tipo T, debido a que en todos ellos se observa una preferencia por la fase de inactivación del canal.

Referencias

1. Perez-Reyes E (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol. Rev.* 83:117–161
2. Yunker AMR, McEnery MW (2003) Low-Voltage-Activated (“T-Type”) Calcium Channels in Review. *J Bioenerg Biomembr* 35:533–575
3. Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V (2013) Neuropathic pain: Role for presynaptic T-type channels in nociceptive signaling. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 465:921–927
4. Yang Y, Cui Y, Sang K, Dong Y, Ni Z, Ma S, Hu H (2018) Ketamine blocks bursting in the lateral habenula to rapidly relieve depression. *Nature* 554:317–322
5. Wu J (2019) Cannabis, cannabinoid receptors, and endocannabinoid system: yesterday, today, and tomorrow. *Acta Pharmacol Sin* 40:297–299
6. Pacher P, Bátkai S, Kunos G (2006) The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 58:389–462
7. Colino L, Herranz-Herrer J, Gil-Benito E, Ponte-Lopez T, del Sol-Calderon P, Rodrigo-Yanguas M, Gil-Ligero M, Sánchez-López AJ, de Leon J, Blasco-Fontecilla H (2018) Cannabinoid Receptors, Mental Pain and Suicidal Behavior: a Systematic Review. *Curr Psychiatry Rep* 20:1–9
8. Berger ND, Gadotti VM, Petrov RR, Chapman K, Diaz P, Zamponi GW (2014) NMP-7 inhibits chronic inflammatory and neuropathic pain via block of Cav3.2T-type calcium channels and activation of CB2 receptors. *Mol Pain* 10:1–9
9. You H, Gadotti VM, Petrov RR, Zamponi GW, Diaz P (2011) Functional characterization and analgesic effects of mixed cannabinoid receptor/T-type channel ligands. *Mol Pain* 7:1–12
10. Gadotti VM, You H, Petrov RR, Berger ND, Diaz P, Zamponi GW (2013) Analgesic Effect of a Mixed T-Type Channel Inhibitor/CB2 Receptor Agonist. *Mol Pain* 9:1–11
11. Van Der Stelt M, Di Marzo V (2005) Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 77:111–122
12. Oz M (2006) Receptor-independent actions of cannabinoids on cell membranes: Focus on endocannabinoids. *Pharmacol Ther* 111:114–144
13. Devane WA, Axelrod J (1994) Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous ligand for the cannabinoid receptor, by brain membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6698–6701
14. Talley EM, Cribbs LL, Lee JH, Daud a, Perez-Reyes E, Bayliss D a (1999) Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci* 19:1895–911
15. Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP, Perez-Reyes E (2003) International Union of

- Pharmacology. XL. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Calcium Channels. *Pharmacol Rev* 55:579–581
16. Zhang Y, Jiang X, Snutch TP, Tao J (2013) Modulation of low-voltage-activated T-type Ca²⁺ channels. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1828:1550–1559
 17. Weiss N, Zamponi GW (2019) T-type calcium channels: From molecule to therapeutic opportunities. *Int J Biochem Cell Biol* 108:34–39
 18. Catterall WA, Perez-reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005) International Union of Pharmacology . XLVIII . Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev* 57:411–425
 19. Catterall WA (2011) Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:1–24
 20. Iftinca MC, Zamponi GW (2009) Regulation of neuronal T-type calcium channels. *Trends Pharmacol Sci* 30:32–40
 21. (2017) World Health Organization. Cardiovascular Disease Report. <http://www.who.int/>
 22. (2015) Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Encuesta Intercensal. <http://www.inegi.org.mx>
 23. (2010) Instituto Nacional de la Salud Pública (INSP).
 24. (2018) World Health Organization. Epilepsy Disease Report. <http://www.inegi.org.mx>
 25. (2017) Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: World Health Organization (WHO)
 26. Zhao Y, Huang G, Wu Q, Wu K, Li R, Lei J, Pan X, Yan N (2019) Cryo-EM structures of apo and antagonist-bound human Cav3.1. *Nature* 1–1
 27. Walsh CP, Davies A, Butcher AJ, Dolphin AC, Kitmitto A (2009) Three-dimensional structure of Cav3.1. Comparison with the cardiac L-type voltage-gated calcium channel monomer architecture. *J Biol Chem* 284:22310–22321
 28. Wu J, Yan Z, Li Z, Qian X, Lu S, Dong M, Zhou Q, Yan N (2016) Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature* 537:191–196
 29. Martinez-Ortiz W, Cardozo TJ (2018) An Improved Method for Modeling Voltage-Gated Ion Channels at Atomic Accuracy Applied to Human Cav Channels. *Cell Rep* 23:1399–1408
 30. Schuster A, Lacinová L, Klugbauer N, Ito H, Birnbaumer L, Hofmann F (1996) The IVS6 segment of the L-type calcium channel is critical for the action of dihydropyridines and phenylalkylamines. *EMBO J* 15:2365–2370
 31. Peterson BZ, Tanada TN, Catterall WA (1996) Molecular determinants of high affinity dihydropyridine binding in L-type calcium channels. *J Biol Chem* 271:5293–5296

32. Mitterdorfer J, Grabner M, Kraus RL, Hering S, Prinz H, Glossmann H, Striessnig J (1998) Molecular basis of drug interaction with L-type Ca²⁺ channels. *J Bioenerg Biomembr* 30:319–334
33. McNulty MM, Kyle JW, Lipkind GM, Hanck DA (2006) An Inner Pore Residue (Asn406) in the Nav1.5 Channel Controls Slow Inactivation and Enhances Mibefradil Block to T-Type Ca²⁺ Channel Levels. *Mol Pharmacol* 70:1514–1523
34. Liu X, Yu H, Zhao X, Huang XR (2015) Molecular simulations study of novel 1,4-dihydropyridines derivatives with a high selectivity for Cav3.1 calcium channel. *Protein Sci* 24:1737–1747
35. Salari A, Vega BS, Milescu LS, Milescu M (2016) Molecular interactions between tarantula toxins and low-voltage-activated calcium channels. *Sci Rep* 6:1–12
36. Lee JH, Gomora JC, Cribbs LL, Perez-Reyes E (1999) Nickel block of three cloned T-type calcium channels: Low concentrations selectively block α 1H. *Biophys J* 77:3034–3042
37. Kang HW, Vitko I, Lee SS, Perez-Reyes E, Lee JH (2010) Structural determinants of the high affinity extracellular zinc binding site on Cav3.2 T-type calcium channels. *J Biol Chem* 285:3271–3281
38. Mlinar B, Enyeart JJ (1993) Block of current through T-type calcium channels by trivalent metal cations and nickel in neural rat and human cells. *J Physiol* 469:639–652
39. Cramer Y, Foricher J, Hengartner U, Jenny C-J, Kienzle F, Ramuz H, Schlageter M, Schmid R, Wang S (1997) Asymmetric Hydrogenation vs. Resolution in the Synthesis of POSICOR®, a New Type of Calcium Antagonist. *Chim* 51 6:303–305
40. Hong DH, Yang D, Choi IW, Son YK, Jung WK, Kim DJ, Han J, Na SH, Park WS (2012) The T-type Ca²⁺ channel inhibitor mibefradil inhibits voltage-dependent K⁺ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. *J Pharmacol Sci* 120:196–205
41. Li M, Hansen JB, Huang L, Keyser BM, Taylor JT (2005) Towards selective antagonists of T-type calcium channels: Design, characterization and potential applications of NNC 55-0396. *Cardiovasc Drug Rev* 23:173–196
42. Gomora JC, Daud AN, Weiergräber M, Perez-Reyes E (2001) Block of cloned human T-type calcium channels by succinimide antiepileptic drugs. *Mol Pharmacol* 60:1121–1132
43. Lopez-Charcas O, Rivera M, Gomora JC (2012) Block of human Ca_v3 channels by the diuretic amiloride. *Mol Pharmacol* 82:658–667
44. Kraus RL, Li Y, Gregan Y, Gotter AL, Uebele VN, Fox S V., Doran SM, Barrow JC, Yang ZQ, Reger TS, Koblan KS, Renger JJ (2010) In vitro characterization of T-type calcium channel antagonist TTA-A2 and in vivo effects on arousal in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 335:409–417
45. Choe WJ, Messinger RB, Leach E, Eckle VS, Obradovic A, Salajegheh R, Jevtovic-

- Todorovic V, Todorovic SM (2011) TTA-P2 is a potent and selective blocker of T-type calcium channels in rat sensory neurons and a novel antinociceptive agent. *Mol Pharmacol* 80:900–910
46. Tringham E, Powell KL, Cain SM, Kuplast K, Mezeyova J, Weerapura M, Eduljee C, Jiang X, Smith P, Morrison JL, Jones NC, Braine E, Rind G, Fee-Maki M, Parker D, Pajouhesh H, Parmar M, O'Brien TJ, Snutch TP (2012) T-type calcium channel blockers that attenuate thalamic burst firing and suppress absence seizures. *Sci Transl Med* 4:1–13
 47. Chemin J, Monteil A, Perez-Reyes E, Nargeot J, Lory P (2001) Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J* 20:7033–7040
 48. Lin S, Khanolkar AD, Fan P, Goutopoulos A, Qin C, Papahadjis D, Makriyannis A (1998) Novel Analogues of Arachidonylethanolamide (Anandamide): Affinities for the CB1 and CB2 Cannabinoid Receptors and Metabolic Stability. *J Med Chem* 41:5353–5361
 49. Lee CW, Bae C, Lee J, Ryu JH, Kim HH, Kohno T, Swartz KJ, Kim J Il (2012) Solution structure of kurtoxin: A gating modifier selective for Cav3 voltage-gated Ca²⁺ channels. *Biochemistry* 51:1862–1873
 50. Olamendi-Portugal T, Inés García B, López-González I, Van der Walt J, Dyason K, Ulens C, Tytgat J, Felix R, Darszon A, Possani LD (2002) Two new scorpion toxins that target voltage-gated Ca²⁺ and Na⁺ channels. *Biochem Biophys Res Commun* 299:562–568
 51. Vijaya Chamundeeswari SP, James Jebaseelan Samuel E, Sundaraganesan N (2011) Quantum mechanical and spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, ¹³C, ¹H and UV) investigations of antiepileptic drug Ethosuximide. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 83:478–489
 52. Serdaroglu G, Ortiz J V. (2017) Ab Initio Calculations on some Antiepileptic Drugs such as Phenytoin, Phenbarbital, Ethosuximide and Carbamazepine. *Struct Chem* 28:957–964
 53. Ton CQ, Bolte M (2010) Amiloride hydrochloride methanol disolvate. *Acta Crystallogr Sect E Struct Reports Online* 66:567–571
 54. Buono RA, Venanzi CA, Venanzi TJ, Zauhar RJ, Luzhkov VB (1994) Molecular Dynamics and Static Solvation Studies of Amiloride. *J Am Chem Soc* 116:1502–1513
 55. Venanzi CA, Plant C, Venanzig TJ (1992) Molecular Recognition of Amiloride Analogs: A Molecular Electrostatic Potential Analysis. 1. Pyrazine Ring Modifications. *J Med Chem* 35:1643–1649
 56. Devane WA, Hanuš L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* (80-) 258:1946–1949
 57. Chemin J, Nargeot J, Lory P (2007) Chemical determinants involved in

- anandamide-induced inhibition of T-type calcium channels. *J Biol Chem* 282:2314–2323
58. Thomas BF, Adams IB, Mascarella SW, Martin BR, Razdan RK (1996) Structure-activity analysis of anandamide analogs: Relationship to a cannabinoid pharmacophore. *J Med Chem* 39:471–479
 59. Tong W, Collantes ER, Welsh WJ, Berglund BA, Hewlett AC (1998) Derivation of a pharmacophore model for anandamide using constrained conformational searching and comparative molecular field analysis. *J Med Chem* 41:4207–4215
 60. Barnett-Norris J, Guarnieri F, Hurst DP, Reggio PH (1998) Exploration of biologically relevant conformations of anandamide, 2- arachidonylglycerol, and their analogues using conformational memories. *J Med Chem* 41:4861–4872
 61. Barnett-Norris J, Hurst DP, Lynch DL, Guarnieri F, Makriyannis A, Reggio PH (2002) Conformational memories and the endocannabinoid binding site at the cannabinoid CB1 receptor. *J Med Chem* 45:3649–3659
 62. Lynch DL, Reggio PH (2005) Molecular dynamics simulations of the endocannabinoid N- arachidonylethanolamine (anandamide) in a phospholipid bilayer: Probing structure and dynamics. *J Med Chem* 48:4824–4833
 63. Lynch DL, Reggio PH (2006) Cannabinoid CB1 receptor recognition of endocannabinoids via the lipid bilayer: Molecular dynamics simulations of CB1 transmembrane helix 6 and anandamide in a phospholipid bilayer. *J Comput Aided Mol Des* 20:495–509
 64. Chen JZ, Han XW, Xie XQ (2005) Preferred conformations of endogenous cannabinoid ligand anandamide. *Life Sci* 76:2053–2069
 65. Bonechi C, Brizzi A, Brizzi V, Francioli M, Donati A, Rossi C (2001) Conformational analysis of N-arachidonylethanolamide (anandamide) using nuclear magnetic resonance and theoretical calculations. *Magn Reson Chem* 39:432–437
 66. Tian X, Guo J, Yao F, Yang DP, Makriyannis A (2005) The conformation, location, and dynamic properties of the endocannabinoid ligand anandamide in a membrane bilayer. *J Biol Chem* 280:29788–29795
 67. Palermo G, Campomanes P, Neri M, Piomelli D, Cavalli A, Rothlisberger U, De Vivo M (2013) Wagging the tail: Essential role of substrate flexibility in FAAH catalysis. *J Chem Theory Comput* 9:1202–1213
 68. McAllister SD, Rizvi G, Anavi-Goffer S, Hurst DP, Barnett-Norris J, Lynch DL, Reggio PH, Abood ME (2003) An Aromatic Microdomain at the Cannabinoid CB1 Receptor Constitutes an Agonist/Inverse Agonist Binding Region. *J Med Chem* 46:5139–5152
 69. Hua T, Vemuri K, Pu M, Qu L, Han GW, Wu Y, Zhao S, Shui W, Li S, Korde A, Laprairie RB, Stahl EL, Ho JH, Zvonok N, Zhou H, Kufareva I, Wu B, Zhao Q, Hanson MA, Bohn LM, Makriyannis A, Stevens RC, Liu ZJ (2016) Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB 1. *Cell* 167:750–762

70. Sanson B, Wang T, Sun J, Wang L, Kaczocha M, Ojima I, Deutsch D, Li H (2014) Crystallographic study of FABP5 as an intracellular endocannabinoid transporter. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 70:290–298
71. Ferreri C, Anagnostopoulos D, Lykakis IN, Chatgililoglu C, Siafaka-Kapadai A (2008) Synthesis of all-trans anandamide: A substrate for fatty acid amide hydrolase with dual effects on rabbit platelet activation. *Bioorganic Med Chem* 16:8359–8365
72. Yu S, Levi L, Casadesus G, Kunos G, Noy N (2014) Fatty acid-binding protein 5 (FABP5) regulates cognitive function both by decreasing anandamide levels and by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ) in the brain. *J Biol Chem* 289:12748–12758
73. Serdaroğlu G, Ortiz J V. (2017) Ab Initio Calculations on some Antiepileptic Drugs such as Phenytoin, Phenobarbital, Ethosuximide and Carbamazepine. *Struct Chem* 28:957–964
74. Skawinski WJ, Ofsievich A, Venanzi CA (2002) ¹H and ¹³C NMR structural studies of amiloride in cryosolvents. *Struct Chem* 13:73–80
75. Barnett-Norris J, Hurst DP, Buehner K, Ballesteros JA, Guarnieri F, Reggio PH (2002) Agonist alkyl tail interaction with cannabinoid CB1 receptor V6.43/I6.46 groove induces a helix 6 active conformation. *Int J Quantum Chem* 88:76–86
76. Levine IN (2001) *Química Cuántica*, 5ta ed. Pearson Educación, S.A. Prentice Hall, Madrid, España
77. Hohenberg P, Kohn W (1964) Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Rev* 136:864–871
78. Becke AD (1988) Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys Rev A* 38:3098–3100
79. Lee C, Yang W, Parr RG (1988) Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B* 37:785–790
80. Stephens PJ, Devlin FJ, Chabalowski CF, Frisch MJ (1994) Ab Initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *J Phys Chem* 98:11623–11627
81. Zhao Y, Truhlar DG (2008) 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 function. *Theor Chem Acc* 120:215–241
82. Adamo C, Barone V (1999) Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. *J Chem Phys* 110:6158–6170
83. Orto M, Pantazis DA, Neese F (2009) Density functional theory. *Photosynth Res* 102:443–453
84. Perdew JP, Ernzerhof M, Burke K, Perdew JP, Ernzerhof M, Burke K (2010) Rationale for mixing exact exchange with density functional approximations.

9982:9982–9985

85. Van der Wijst T, Guerra CF, Swart M, Bickelhaupt FM (2006) Performance of various density functionals for the hydrogen bonds in DNA base pairs. *Chem Phys Lett* 426:415–421
86. Dunning TH (1989) Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *J Chem Phys* 90:1007–1023
87. Gordon MS, Binkley JS, Pople JA, Pietro WJ, Hehre WJ (1982) Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. 22. Small Split-Valence Basis Sets for Second-Row Elements. *J Am Chem Soc* 104:2797–2803
88. Weigend F, Ahlrichs R (2005) Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Phys Chem Chem Phys* 7:3297–3305
89. Stuart B (2004) *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, 1st ed. John Wiley & Sons, Ltd, Great Britain, UK
90. Hollas MJ (2004) *Modern Spectroscopy*, 4th ed. John Wiley & Sons, Ltd, Wiltshire, England
91. Chang R (1977) *Principios básicos de espectroscopía*, 1st ed. AC, Editorial, Madrid, España
92. Wade Jr. LG (2012) *Química orgánica*, 7a ed. Pearson Educación de México S.A. de C.V, Distrito Federal, México
93. Jensen F (2007) *Introduction to Computational Chemistry*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Ltd, Odense, Denmark
94. Weinhold F, Landis CR (2001) Natural Bond Orbitals and Extensions of Localized Bonding Concepts. *Chem Educ Res Pr* 2:91–104
95. Domingo LR, Ríos-Gutiérrez M, Pérez P (2016) Applications of the conceptual density functional theory indices to organic chemistry reactivity. *Molecules* 21:1–22
96. Faver J, Merz Jr. KM (2010) Utility of the Hard/Soft Acid-Base Principle via the Fukui Function in Biological Systems. *J Chem Theory Comput* 6:548–559
97. Morell C, Grand A, Toro-Labbé A (2005) New dual descriptor for chemical reactivity. *J Phys Chem A* 109:205–212
98. Liu S Bin (2009) Conceptual density functional theory and some recent developments. *Wuli Huaxue Xuebao/ Acta Phys - Chim Sin* 25:590–600
99. Domingo LR (2014) A new C-C bond formation model based on the quantum chemical topology of electron density. *RSC Adv* 4:32415–32428
100. Matta CF, Boyd RJ (2007) *An Introduction to the Quantum Theory of Atoms in Molecules: From Solid State to DNA and Drug Design*, 1st ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Bonn, Germany

101. Jalily Hasani H, Barakat K (2017) Homology modeling: An overview of fundamentals and tools. *Int Rev Model Simulations* 10:129–145
102. Chaudhary KK, Mishra N (2016) A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery. *JSM Chem* 4:1029
103. Trott, O., Olson AJ (2010) Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking. *J Comput Chem* 31:455–461
104. Tomasi J, Mennucci B, Cammi R (2005) Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem Rev* 105:2999–3093
105. Wyffels L, De Bruyne S, Blanckaert P, Lambert DM, De Vos F (2009) Radiosynthesis, in vitro and in vivo evaluation of ¹²³I-labeled anandamide analogues for mapping brain FAAH. *Bioorganic Med Chem* 17:49–56
106. Lii J-H, Gallion S, Bender C, Wikström H, Allinger NL, Flurchick KM, Teeter MM (1989) Molecular mechanics (MM2) calculations on peptides and on the protein Crambin using the CYBER 205. *J Comput Chem* 10:503–513
107. HyperChem(TM) Professional, Hypercube, Inc. version 8.0, (2011) Gainesville, Florida, USA.
108. Ott JB, Boerio-Goates J (2000) *Chemical Thermodynamics: Advanced Applications*, 1st ed. Academic Press, Utah, U.S.A.
109. Wolinski K, Hinton JF, Pulay P (1990) Efficient Implementation of the Gauge-Independent Atomic Orbital Method for NMR Chemical Shift Calculations. *J Am Chem Soc* 112:8251–8260
110. Schäfer A, Horn H, Ahlrichs R (1992) Fully optimized contracted Gaussian basis sets for atoms Li to Kr. *J Chem Phys* 97:2571–2577
111. Jamróz MH (2013) Vibrational energy distribution analysis (VEDA): Scopes and limitations. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 114:220–230
112. Alecu IM, Zheng J, Zhao Y, Truhlar DG (2010) Computational thermochemistry: Scale factor databases and scale factors for vibrational frequencies obtained from electronic model chemistries. *J Chem Theory Comput* 6:2872–2887
113. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman, J. R. Scalmani G, Barone V, Petersson GA, Nakatsuji H, Li X, Caricato M, Marenich A V., Bloino J, Janesko BG, Gomperts R, Mennucci B, Hratchian HP, 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 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 JAJ, 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

114. Frisch \mathcal{AE} , Plata RE, Singleton DA (2009) Gaussian 09W Reference. *J Am Chem Soc* 137:3811–3826
115. Dennington R, Tood A. K, Jhon M. M (2016) GaussView (Version 6), Semichem Inc. Shawnee Mission, KS
116. O’boyle NM, Tenderholt AL, Langner KM (2008) cclib: A library for package-independent computational chemistry algorithms. *J Comput Chem* 29:839–845
117. Lu T, Chen F (2012) Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. *J Comput Chem* 33:580–592
118. Tood A. K (2017) AIMAll (Version 17.11.14), TK Gristmill Software, Overland Park KS, USA (aim.tkgristmill.com)
119. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7:1–6
120. Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234:779–815
121. Khosravani H, Altier C, Simms B, Hamming KS, Snutchll TP, Mezeyova J, McRory JE, Zamponi GW (2004) Gating Effects of Mutations in the Cav3.2 T-type Calcium Channel Associated with Childhood Absence Epilepsy. *J Biol Chem* 279:9681–9684
122. Peloquin JB, Khosravani H, Barr W, Bladen C, Evans R, Mezeyova J, Parker D, Snutch TP, McRory JE, Zamponi GW (2006) Functional analysis of Cav3.2 T-type calcium channel mutations linked to childhood absence epilepsy. *Epilepsia* 47:655–658
123. Arias-Olguín II, Vitko I, Fortuna M, Baumgart JP, Sokolova S, Shumilin IA, Van Deusen A, Soriano-García M, Gomora JC, Perez-Reyes E (2008) Characterization of the gating brake in the I-II loop of Cav3.2 T-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 283:8136–8144
124. Sanner MF (1999) Python: A programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* 17:57–61
125. Schrödinger L (2017) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0
126. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel RD, Kalé L, Schulten K (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26:1781–1802
127. Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, Ran T, Feig M, De Groot BL, Grubmüller H, MacKerell AD (2016) CHARMM36m: An improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat Methods* 14:71–73
128. Nagy PI (2011) Competing Intramolecular vs. Intermolecular Hydrogen Bonds in Solution. OPEN ACCESS *Int J Mol Sci* 15:15

129. Grabowski SJ (2006) Theoretical studies of strong hydrogen bonds. *Annu Reports Prog Chem - Sect C* 102:131–165
130. Pavia D, Lampman G, Kriz G (2001) *Introduction to spectroscopy: A guide for students of Organic Chemistry*, 3rd ed. Washington, US
131. Socrates G (2004) *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*, 3rd ed. Middlesex, UK
132. Silverstein R, Webster F (2005) *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7th ed. John Wiley and Sons Inc., New York, US
133. Gómez-Jeria JS (2014) A quantum-chemical analysis of the relationships between hCB2 cannabinoid receptor binding affinity and electronic structure in a family of 4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide derivatives. *Der Pharm Lett* 6:95–104
134. Glendening ED, Landis CR, Weinhold F (2012) Natural bond orbital methods. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2:1–42
135. Gangadharana RP, Krishnanb SS (2014) Natural Bond Orbital (NBO) population analysis of 1-azanaphthalene-8-ol. *Acta Phys Pol A* 125:18–22
136. Aliste MP (2000) Theoretical study of dopamine. Application of the HSAB principle to the study of drug-receptor interactions. *J Mol Struct THEOCHEM* 507:1–10
137. Parthasarathi R, Subramanian V, Roy DR, Chattaraj PK (2004) Electrophilicity index as a possible descriptor of biological activity. *Bioorganic Med Chem* 12:5533–5543
138. Chemin J, Cazade M, Lory P (2014) Modulation of T-type calcium channels by bioactive lipids. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 466:689–700
139. Popelier PLA (2000) *Atoms in Molecules: An Introduction*. Prentice Hall PTR
140. Cremer D, Kraka E (1984) Chemical Bonds without Bonding Electron Density — Does the Difference Electron-Density Analysis Suffice for a Description of the Chemical Bond? *Angew Chemie Int Ed English* 23:627–628
141. Hughes TET, Pumroy RA, Yazici AT, Kasimova MA, Fluck EC, Huynh KW, Samanta A, Molugu SK, Zhou ZH, Carnevale V, Rohacs T, Moiseenkova-Bell VY (2018) Structural insights on TRPV5 gating by endogenous modulators. *Nat Commun* 9:1–11
142. Gadotti VM, You H, Petrov RR, Berger ND, Diaz P, Zamponi GW (2013) Analgesic effect of a mixed T-type channel inhibitor/CB2 receptor agonist. *Mol Pain* 9:1–11
143. Marksteiner R, Schurr P, Berjukow S, Margreiter E, Perez-Reyes E, Hering S (2001) Inactivation determinants in segment IIIS6 of CaV3.1. *J Physiol* 537:27–34
144. Rangel-Galván M, Rangel A, Romero-Méndez C, Dávila EM, Castro ME, Caballero NA, Meléndez Bustamante FJ, Sanchez-Gaytan BL, Meza U, Perez-Aguilar JM

(2021) Inhibitory Mechanism of the Isoflavone Derivative Genistein in the Human CaV3.3 Channel. ACS Chem Neurosci.
<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.0c00684>

Inhibitory Mechanism of the Isoflavone Derivative Genistein in the Human Ca_v3.3 Channel

Maricruz Rangel-Galván, Azahel Rangel, Catalina Romero-Méndez, Eliud Morales Dávila, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, Francisco J. Meléndez Bustamante, Brenda L. Sanchez-Gaytan, Ulises Meza,* and Jose Manuel Perez-Aguilar*

Cite This: *ACS Chem. Neurosci.* 2021, 12, 651–659

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Regulation of cellular excitability and oscillatory behavior of resting membrane potential in nerve cells are largely mediated by the low-voltage activated T-type calcium channels. This calcium channel family is constituted by three isoforms, namely, Ca_v3.1, Ca_v3.2, and Ca_v3.3, that are largely distributed in the nervous system and other parts of the body. Dysfunction of T-type calcium channels is associated with a wide range of pathophysiologies including epilepsy, neuropathic pain, cardiac problems, and major depressive disorders. Due to their pharmacological relevance, finding molecular agents able to modulate the channel's function may provide therapeutic means to ameliorate their related disorders. Here we used electrophysiological experiments to show that genistein, a canonical tyrosine kinase inhibitor, reduces the activity of the human Ca_v3.3 channel in a concentration-dependent manner. The inhibitory effect of genistein is independent of tyrosine kinase modulation and does not affect the voltage-dependent gating of the channel. Subsequently, we used computational methods to identify plausible molecular poses for the interaction of genistein and the Ca_v3.3 channel. Starting from different molecular poses, we carried out all-atom molecular dynamics (MD) simulations to identify the interacting determinants for the Ca_v3.3/genistein complex formation. Our extensive (microsecond-length) simulations suggest specific binding interactions that seem to stabilize the protein/inhibitor complex. Furthermore, our results from the unbiased MD simulations are in good agreement with the recently solved cryoelectron microscopy structure of the Ca_v3.1/Z944 complex in terms of both the location of the ligand binding site and the role of several equivalent amino acid residues. Proposed interacting complex loci were subsequently tested and corroborated by electrophysiological experiments using another naturally occurring isoflavone derivative, daidzein. Thus, by using a combination of *in vitro* and *in silico* techniques, we have identified interacting determinants relevant to the Ca_v3.3/genistein complex formation and propose that genistein directly blocks the function of the human Ca_v3.3 channel as a result of such interaction. Specifically, we proposed that a combination of polar interactions involving the three hydroxyl groups of genistein and an aromatic interaction with the fused rings are the main binding interactions in the complex formation. Our results pave the way for the rational development of improved and novel low-voltage activated T-type calcium channel inhibitors.

KEYWORDS: T-type calcium channels, MD simulations, isoflavone derivative, channel blockers, LVA channels, channel inhibition



INTRODUCTION

Neuronal calcium-dependent cellular processes occurring at or near resting membrane potential are largely modulated by the T-type calcium channels.^{1,2} The low-voltage activated calcium channel family includes three isoforms, namely, Ca_v3.1, Ca_v3.2, and Ca_v3.3, which together regulate the cellular excitability and oscillatory behavior of the resting membrane potential in nerve cells.^{3–5}

Dysregulation of T-type channel function is related to different pathophysiologies, including thalamocortical dysrhythmias associated with disorders such as epilepsy, neurological problems, and neurogenic pain.⁶ Moreover, the low-voltage activated calcium channels are implicated in neuropathic pain and heart problems,^{6,7} and their participation in major

depressive disorder (depression) was recently reported.⁸ In particular, Ca_v3.1 is involved in spinocerebellar ataxia, cerebellar atrophy, and epilepsy; Ca_v3.2 is linked to autism, epilepsy, heart failure, and neuropathic pain, and Ca_v3.3 is implicated in epilepsy and schizophrenia.^{5–7,9}

Received: October 22, 2020

Accepted: January 19, 2021

Published: January 28, 2021



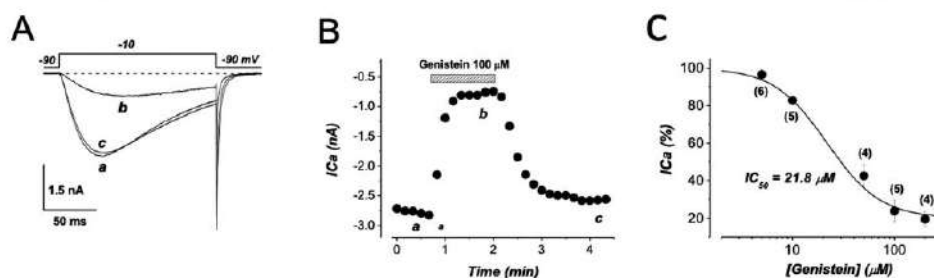


Figure 1. The activity of $Ca_v3.3$ channels is inhibited by genistein. (A) Representative traces of whole-cell $Ca_v3.3$ currents recorded in the absence (a), in the presence (b), or after washout (c) of genistein (100 μM). Currents were evoked by voltage steps from -90 to -10 mV at 0.1 Hz. (B) Time course of the inhibitory effect of genistein on $Ca_v3.3$ currents. The peak current amplitude was plotted as a function of time. The application of genistein is indicated by a horizontal bar. Same cell as in part A. (C) The dose–response relationship for the inhibition of $Ca_v3.3$ current by genistein. The curve was constructed from the response of distinct cells exposed to different concentrations of genistein; just one concentration on each recorded cell was added. Symbols represent mean \pm SEM of 4–6 cells. The solid line corresponds to the fit of the average data to the Hill equation (eq 3). The values for IC_{50} and Hill coefficient were 21.8 μM and 1.6, respectively.

In contrast to the high-voltage activated calcium channels (Ca_v1 and Ca_v2 families), where the proper function of the channels requires the involvement of the main (α_1) and auxiliary (α_2 , β , and γ) subunits, the current understanding of the Ca_v3 channels supports the role of solely the main subunit (α_{1G} , α_{1H} , and α_{1I}). That is, even though the role of auxiliary subunits in the function of the T-type channels under physiological conditions is still unknown, the α_1 subunit seems to be sufficient for the proper function of these channels.⁹ The α_1 subunit comprises the prototypical four homologous domains (DI–DIV), each including the voltage-sensing domain helices (namely, S1–S4) as well as the pore-forming helices (namely, S5–S6). Each of the voltage-sensing domains bears positively charged residues at helix S4, while the extracellular loop connecting the two pore-forming helices, S5 and S6, contains four acidic residues (EEDD motif) that form the calcium selectivity filter (see Figure S1).

Based on their physiological relevance, the T-type calcium channels have been, for several years, considered attractive pharmacological targets for the treatment of diverse neurological disorders.³ Nonetheless, progress has been hampered not only by the lack of structural information (before November 2019) but also by the high homology with other voltage-gated calcium (and sodium) channels, particularly at the extracellular region, which makes the development of specific pharmacologically relevant blockers a challenging endeavor.³ Another reason for the slow progress in this regard is that the expression of the T-type calcium channels is not restricted to the nervous system, because they are also present in different types of cells including endocrine, cardiovascular, immune, and spermatogenic cells.^{4,7}

Among the low-threshold calcium currents, those mediated by $Ca_v3.3$ are unique, because they exhibit the largest conductance, the slowest activation and inactivation kinetics, the fastest deactivation, the fastest recovery from inactivation, and, frequently, the most depolarized voltage-activation.¹⁰ Additionally, the $Ca_v3.3$ channel displays a more restricted tissue distribution than the other two members of the Ca_v3 family, particularly at the central nervous system, including the thalamic reticular nucleus, the lateral habenula, the cerebral cortex, and the hippocampus.⁶ This characteristic distribution may facilitate the targeting of specific signaling pathways where $Ca_v3.3$ is involved, avoiding the disruption of other cellular and physiological functions.^{3–5}

Due to the possible pharmacological relevance of generating potential blockers of $Ca_v3.3$, we have been investigating putative ligands with different physicochemical properties for their capacity to inhibit the channel's function. Herein, we report that the plant-derived natural product genistein, a well-known tyrosine kinase inhibitor (TKI), reduces the activity of the human $Ca_v3.3$ channel in a concentration-dependent manner. This inhibitory effect of genistein is independent of tyrosine kinase modulation and does not affect the voltage-dependent gating of the channel. Genistein has also shown an inhibitory effect on rodent $Ca_v3.1$ and $Ca_v3.2$ channels,^{11,12} but in contrast to our present results, no modulation was previously reported on $Ca_v3.3$.¹¹

Our extensive computational studies proposed specific polar interacting loci that were further experimentally corroborated, using the inactive TKI analog daidzein. Thus, by using a combination of *in vitro* and *in silico* approaches, we have identified particular interactions relevant to the $Ca_v3.3$ /genistein complex formation. Our study delineates the main complex molecular interactions and provides relevant information for the other members of the T-type calcium channel family, thus, paving the way for the rational design of selective Ca_v3 blockers.

RESULTS AND DISCUSSION

Genistein Inhibits the Activity of the Human $Ca_v3.3$ Channel. Isoflavones are a class of flavonoids, plant-derived natural products containing phenolic groups, present in legumes and commonly named phytoestrogens because of their estrogen-like activity. In the soybean plant, one of the major isoflavones is genistein, a nonsteroidal phytoestrogen that exhibits diverse therapeutic properties including anti-inflammatory, antioxidative, and antineoplastic.^{13,14} Genistein, a polyphenolic molecule characterized by the 3-phenylchromen-4-one backbone (two benzene rings, A and B, connected by a heterocyclic pyran ring, C), is mainly known by its activity as tyrosine kinase and topoisomerase-II inhibitor as well as an estrogen receptor functional modulator.¹³

While investigating the function of the $Ca_v3.3$ channels, we found that administration of a saturating concentration of genistein (100 μM) significantly inhibits the activity of the human $Ca_v3.3$ channels expressed in HEK293 cells ($76.2 \pm 5.7\%$, $n = 5$, $p < 0.05$, paired Student's *t*-test). Effects of genistein

on murine $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.2$ were reported previously, albeit no inhibition on $\text{Ca}_v3.3$ was observed despite the high degree of sequence similarity among all these channels.¹¹ Although our contrasting results for the $\text{Ca}_v3.3$ channel might be attributed to different organisms, that is, human *versus* mouse, the reasons for this discrepancy are not evident due to the high homology between both T-type channels.¹

This inhibitory effect of genistein on human $\text{Ca}_v3.3$ channels was observed all along with the genistein application and was fully relieved after washout (Figure 1A,B). Moreover, the inhibitory effect of genistein on human $\text{Ca}_v3.3$ channels implied a dose-dependent process (Figure 1C), where the corresponding IC_{50} and Hill coefficient values were $21.8 \mu\text{M}$ and 1.6, respectively. Significant inhibition of the $\text{Ca}_v3.3$ channel by genistein was observed from $10 \mu\text{M}$ and reached a maximal effect value for concentrations $\geq 100 \mu\text{M}$. Importantly, the inhibitory effect of genistein was not affected by the previous application (>15 min) of sodium orthovanadate ($100 \mu\text{M}$), a known inhibitor of tyrosine phosphatases (Figure S2).¹⁵ This observation supports that inhibition of $\text{Ca}_v3.3$ by genistein is independent of tyrosine kinase modulation. Furthermore, the inhibitory effect of genistein on $\text{Ca}_v3.3$ channels did not modify the normalized current–voltage (I – V), conductance–voltage (G – V), or voltage-dependent steady-state inactivation relationships (Figure S3 and Table S1). The $V_{1/2}$ values for the G – V relationship in the absence and presence of genistein ($25 \mu\text{M}$, a concentration close to the IC_{50} value) were -43.5 ± 2.0 mV ($n = 6$) and -44.2 ± 3.6 mV ($n = 6$), respectively ($p > 0.05$, paired Student's t -test). Similar results were also observed when the normalized voltage-dependent steady-state inactivation relationships were compared. The values of $V_{1/2}$ for maximal steady-state inactivation were -63.4 ± 2.0 mV ($n = 6$) and -66.5 ± 6.0 mV ($n = 6$) before and after application of genistein, respectively ($p > 0.05$, paired Student's t -test).

Altogether, these data indicate that the robust concentration-dependent inhibition of $\text{Ca}_v3.3$ currents by genistein is independent of tyrosine kinase modulation and does not implicate any significant change in their voltage-dependent gating properties. Moreover, our results suggest that the inhibitory mechanism involves the direct interaction or blocking of $\text{Ca}_v3.3$ channels by genistein, which has also been proposed to explain the inhibitory effect of genistein on the spermatogenic T-type currents¹¹ and $\text{Ca}_v3.1$ channels.^{11,12}

Homology Modeling of the Human $\text{Ca}_v3.3$. To investigate the binding determinants of the human $\text{Ca}_v3.3$ channel and genistein and due to the lack of availability of experimental structural information for this protein, we generated models of the channel by using the homology modeling computational technique. Briefly, we utilized the revised structure of the α_1 subunit of the rabbit $\text{Ca}_v1.1$ channel ($\text{Ca}_v1.1$; 6BYO).¹⁶ Then, we obtained the primary sequence of the α_1 subunits for the two proteins, human $\text{Ca}_v3.3$ (α_{11}) and rabbit $\text{Ca}_v1.1$ (α_{15}), from UniProt (with codes Q9P0X4 and P07293, respectively). A sequence alignment was performed using Blastp with subsequent manual corrections. The final sequence alignment is presented in Figure S4. Then, we used Modeller 9v10 to generate 100 structures of the $\text{Ca}_v3.3$ channel based on the sequence alignment obtained previously and selected a representative structure based on several considerations, including Modeller's scoring function. The structure of the human $\text{Ca}_v3.3$ (α_{11}), comprising residues F60 to A1744, is depicted in Figure S1B.

Atomistic Molecular Dynamics Simulations of the Apo $\text{Ca}_v3.3$ Channel. We performed unbiased simulations of the apo $\text{Ca}_v3.3$ channel embedded in a hydrated POPC membrane (see Methods and Figure S5A). Because we were more interested in the transmembrane domain, we followed the structural changes in this region. Based on the calculated RMSD values, we estimated that, at around 70 ns, we obtained a structurally equilibrated TM domain structure (see Figure S5B). We selected a representative structure at this stage to carry out docking calculations of genistein.

Molecular Docking Calculations of Genistein. To search for possible binding sites of genistein in the $\text{Ca}_v3.3$ channel, we carried out molecular docking calculations. We utilized AutoDockVina to identify possible molecular poses (see Methods).¹⁷ The overall docking results based on energetic considerations indicated nine distinct possible molecular poses; however, those located at the extracellular and intracellular loops were not considered any further (see red ligands in Figure S6A). From the remaining five poses, only the three poses located in the pore-forming domains (PDs), close to the helical segment perpendicular to the pore axis that connects the S4 and S5 helices, were further considered (see blue ligands in Figure S6A). The first molecular pose is allocated at the interfacial protein region formed by PDII and PDIII. The second is placed at the protein–protein interface formed by PDIII and PDIV, and the third pose is located at the interfacial region formed by PDI and PDIV (Figure S6A). Two of these three poses seem to agree with available information for related channels. That is, the first and second molecular poses are both in the vicinity of a triad of hydrophobic residues in the S6-DIII, considered relevant in the stabilization of the inactivated state and known as the IFV-inactivation motif, first identified in the $\text{Ca}_v2.1$ channel (M947, F1426, and V949) and subsequently found in the closely related rat $\text{Ca}_v3.1$ channel (M1510, F1511, and V1512).¹⁸ On this basis, the first two genistein poses, DII-DIII and DIII-DIV, were further refined using the Rosetta Ligand Docking Protocol.¹⁹ The pose located at the DII-DIII interface places the genistein structure in a perpendicular orientation to the channel's pore axis with the OH(4') hydroxyl group in ring B pointing outward (Figure S6B). The pose in the DIII-DIV region presents the genistein structure in a more parallel orientation to the channel's pore axis with the OH(4') hydroxyl group in ring B pointing toward the intracellular side (Figure S6C). These two selected molecular poses were further investigated by unbiased molecular dynamics (MD) simulations.

Interestingly, even though the observed acceleration of current inactivation for $\text{Ca}_v3.1$ ¹² and the hyperpolarization of steady-state inactivation for spermatogenic T-type channels (i.e., $\text{Ca}_v3.1$ and/or $\text{Ca}_v3.2$)¹¹ induced by genistein suggest a preferred binding to the inactivated state of Ca_v3 channels, our present data do not support this statement for the $\text{Ca}_v3.3$ channels, as we did not see any change on the voltage-dependent steady-state inactivation parameters (Table S1). These observations suggest subtle mechanistic differences associated with the interaction of genistein with the distinct Ca_v3 channels that should be further evaluated.

Unbiased Atomistic Molecular Dynamics Simulations of the Complex $\text{Ca}_v3.3$ /Genistein and Molecular Binding Insights. To have a detailed understanding of the protein complex interactions, we carried out microsecond-length molecular dynamics (MD) simulations starting from two different binding poses for genistein, DII-DIII and DIII-DIV (Figure S6B,C); for details about the simulation protocols, see

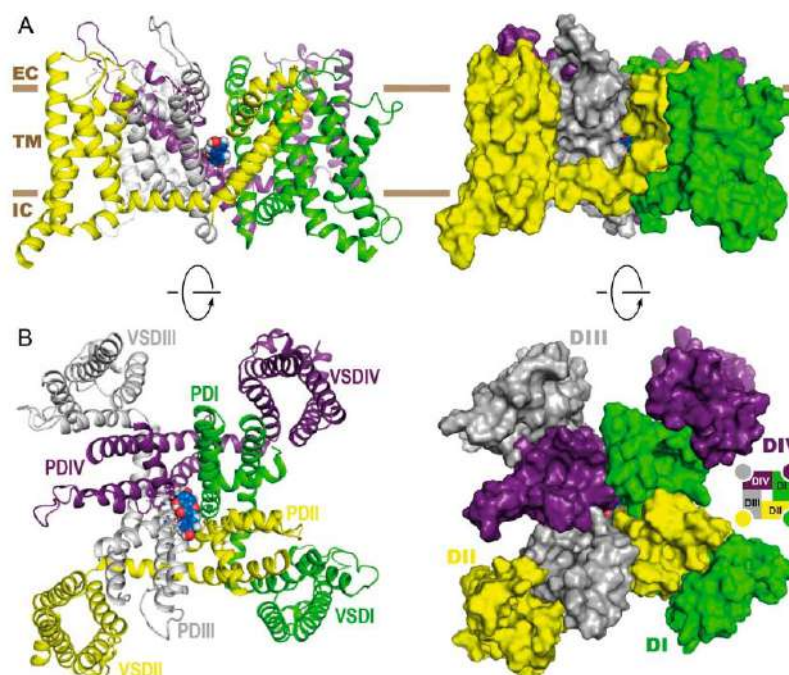


Figure 2. Representative $\text{Ca}_v3.3$ /Genistein complex structure from the final stage of the MD simulations. (A) Lateral and (B) extracellular views of a representative structure of the $\text{Ca}_v3.3$ /genistein complex after the 1 μs length MD simulation (started from the pose located at the DII–DIII region). The structure of the human $\text{Ca}_v3.3$ channel consists of the segment F60–A1744. The domains are colored as DI in green, DII in yellow, DIII in gray, and DIV in purple. Both the voltage-sensing domains (VSDs) and pore-forming domains (PDs) are indicated in part B.

the Methods section. Briefly, the human $\text{Ca}_v3.3$ channel (F60 to A1744) was embedded in a hydrated lipid bilayer, and atomistic unbiased MD simulations were carried out using the program NAMD2.12 and with the CHARMM36 and CgenFF force fields.^{21–23} The system with genistein in the DII–DIII binding pose was simulated by 1000.0 ns, while the system with the DIII–DIV was simulated by 500.0 ns (Figure 2 and Figure S7, respectively). The total size of the simulated systems is around 200 000 atoms.

Molecular Details of the $\text{Ca}_v3.3$ /Genistein(DII–DIII) Structure from the MD Simulations. *Interaction of the Genistein OH(4′) Hydroxyl Group.* Our simulations indicate that this hydroxyl group establishes polar interactions mainly with the side chain of S1419 in the S6–DIII helix (Figure 3A). Once stably formed (around 440 ns), the OH(4′)–S1419 interaction is maintained for the rest of the simulation. Some fluctuations for a short time are observed (930–970 ns) where the hydroxyl group interacts with the backbone oxygen from L818 in P2–DII located in the vicinity of S1419 (Figure 3B). After this short period, the interaction with S1419 is formed again and maintained for the rest of the trajectory. Additionally, the presence of the positively charged amino side chain of K1379 strongly favors this particular molecular pose of genistein, especially around the OH(4′) hydroxyl and ring B moiety (Figure 3A,B). The OH(4′)–K1379 interaction is formed around 440 ns and maintained for the rest of the simulation. Time evolution plots of the distance between the oxygen atom

from the OH(4′) hydroxyl group of genistein with the oxygen atom from the S1419 side chain and with the nitrogen atom from the K1379 side chain are shown in Figure 3B, which indicate the stability and relevance of these two interacting polar loci, S1419 and K1379, in the stabilization of the ligand binding (Figure 3C).

Interaction of the Genistein OH(5) and OH(7) Hydroxyl Groups. Our results show that around the same time of the OH(4′)–S1419 and OH(4′)–K1379 interactions (440 ns), the OH(5) hydroxyl group in ring A formed a stable interaction with the amide side chain of Q1718. Interestingly, previous to the formation of this interaction, the OH(7) hydroxyl group, also located in ring A, is placed in the vicinity of the L1721 backbone from the S6–DIV helix. The presence of this group causes a structural helical deformation; that is, by losing the helical backbone hydrogen bond pattern between L1721 and V1725 (i to $i + 4$ pattern), the amide side chain of residue Q1718 is repositioned to form the aforementioned polar interactions with the OH(5) hydroxyl group from genistein (Figure 3A,C).

Interaction of Genistein Aromatic Rings. The aromatic character of genistein is reflected in three rings, denominated A, B, and C, forming its core structure (see Figure 3C). Our results indicate that rings B, the ring bearing the OH(4′) hydroxyl group, established cation– π interactions with the positively charged amino side chain of K1379, located at DIII. During the simulations, we observed that the interaction is often mediated by a water bridge. The fused rings, A and C, interact with the side

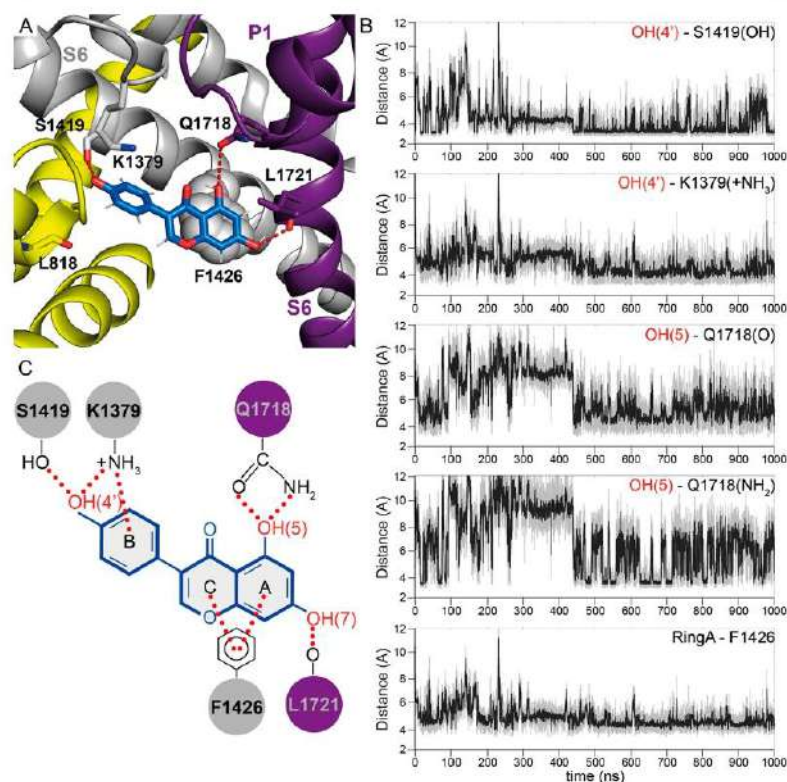


Figure 3. Structure of the binding site for the $\text{Ca}_v3.3/\text{Genistein}$ complex. (A) From our extensive unbiased MD simulation, we identified specific polar interactions (dashed red lines) involving the hydroxyl groups from genistein (blue) and residues mainly located at the S6-DIV (purple) and the S6-DIII (gray) helices. That is, we found a polar interaction involving the OH(4') hydroxyl group in ring B and the side chain of S1419 in the S6-DIII helix. Also relevant for this ligand moiety is the interaction between OH(4') and the positively charged side chain of K1379. Moreover, our results suggest a cation- π interaction between this side chain and the aromatic ring B that contributes to the stability of the genistein molecular pose. Additionally, a dual polar interaction involving the OH(5) and OH(7) hydroxyl groups in ring A emerged as one of the main driving forces for the complex formation. The interaction between the genistein OH(7) group and the backbone oxygen atom of L1721 induces a kink in the S6-DIV helix that positions the side chain of Q1718 in an adequate place to interact with the OH(5) group. Furthermore, an aromatic interaction between rings A and C from genistein and the side chain of F1426, located at helix S6-DIII, stabilized the complex formation. (B) Plots of the time evolution of several atom-atom distances associated with relevant interactions. We observed that, at around 440 ns, the main identified interactions are formed and maintained for the rest of the microsecond-long simulation. (C) Scheme with the proposed binding site for the $\text{Ca}_v3.3/\text{genistein}$ complex.

chain of F1426, located at helix S6-DIII, via π - π stacking interactions, see Figure 3A,B.

Collectively, the interactions mediated by these four ligand moieties (OH(5), OH(7), and OH(4') hydroxyl groups, and aromatic rings) seem to strongly stabilize the molecular pose of genistein in the specific binding site of $\text{Ca}_v3.3$.

Results of the $\text{Ca}_v3.3/\text{Genistein}(\text{DII-DIV})$ Structure from the MD Simulations. Even though the genistein starting molecular poses in DII-DIII and DIII-DIV are clearly distinct (Figure S6), after one microsecond simulation time for the former and half microsecond simulation time for the later, we observed that the ligand position in the two trajectories converged to the same binding pose in $\text{Ca}_v3.3$, which provide confidence of the molecular mechanism already proposed for genistein (Figure S7 and Figure 3). We traced the time evolution of the same interactions identified in the DII-DIII simulation

(Figure 3), i.e., the interaction between the hydroxyl group OH(4') and S1419 and K1379, the hydroxyl group OH(5) and Q1718, and Ring A and the aromatic side chain of F1426. As indicated in Figure S7, the interactions are also observed within the 500 ns long trajectory.

Comparison with the Structures of $\text{Ca}_v3.1/\text{Z944}$ and $\text{Ca}_v3.3/\text{Genistein}$. While the simulations were running, the structure of the closely related $\text{Ca}_v3.1$ was solved by cryo-electron microscopy (cryo-EM) in complex with the Z944 antagonist.²³ The $\text{Ca}_v3.1/\text{Z944}$ structure offers a unique opportunity to evaluate our results regarding the $\text{Ca}_v3.3/\text{genistein}$ complex. The structural comparison of the binding sites shows not only that both ligands are positioned in equivalent places blocking the pore but also that they share similar interactions with equivalent residues (see Figure S8A).

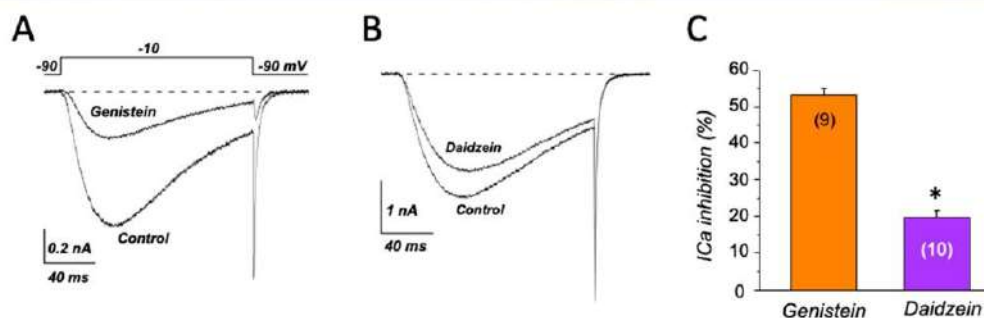


Figure 4. Inhibition of $\text{Ca}_v3.3$ channels by genistein versus daidzein. Representative traces of $\text{Ca}_v3.3$ inhibition currents by the administration of $50 \mu\text{M}$ of either genistein (A) or daidzein (B). Recordings were obtained from two different cells. Currents were evoked by voltage steps from -90 to -10 mV at 0.1 Hz . (C) Comparison of $\text{Ca}_v3.3$ channel inhibition by genistein and daidzein. Data are presented as mean \pm SEM. Significant difference by one-tailed, unpaired Student's *t*-test, is indicated (*, $P < 0.05$).

Interestingly, the aromatic residue F1509 in the $\text{Ca}_v3.1$ channel is part of the denominated intracellular gate, which constitutes one of the two narrowest pore regions in the cryo-EM structure;²³ in the human $\text{Ca}_v3.3$, the equivalent residue is F1426. From our simulations, we observed a conformational shift of the phenylalanine side chain so as to favor the aforementioned π - π stacking interactions with the fused rings A and C from genistein; that is, the aromatic character of genistein causes the repositioning of the side chain of F1426 closer to the pore axis, suggesting a further restriction of the intracellular gate (see Figure S8A).

Moreover, from the main $\text{Ca}_v3.3$ residues participating in the interaction with genistein, only one position is different in the human $\text{Ca}_v3.1$; that is, residue S1419 in the S6-DIII helix establishes polar side-chain interactions with the oxygen atom from the OH(4') hydroxyl group of genistein.

Interestingly, the equivalent position in the human $\text{Ca}_v3.1$ channel bears an alanine residue (A1502), which may prevent any polar interaction of this isoform with genistein (see Figures S8A and S7B). The nature of this particular position may be exploited to tailor ligand selectivity toward a particular channel subtype.

Comparison of the Inhibition of Genistein versus Daidzein on the Human $\text{Ca}_v3.3$ Activity. To test our findings of the relevance of the hydroxyl groups from the ring A in the binding of genistein to the $\text{Ca}_v3.3$ channel, we utilized another naturally occurring isoflavone derivative, daidzein, which shared all the chemical features of genistein except for the absence of the OH(5) hydroxyl group. From our computational results, we observed that this hydroxyl group forms polar interactions with Q1718 and proposed that this is important for the binding of genistein to the $\text{Ca}_v3.3$ channel. Hence, we suggested that in the absence of this polar group, the ligand (namely daidzein) should induce similar inhibitory effects but to a lesser extent. Figure 4 shows that even though daidzein was also able to inhibit the $\text{Ca}_v3.3$ current ($19.9 \pm 1.7\%$, $n = 10$), this effect was significantly smaller than the effect induced by genistein ($53.2 \pm 1.9\%$, $n = 9$, $p < 0.05$, unpaired Student's *t*-test). No other significant differences between the inhibitory action of genistein and daidzein were observed. These results highlighted the functional relevance of the OH(5) group in the inhibitory action of genistein on the $\text{Ca}_v3.3$ channels and substantiate the findings from our MD simulations.

When comparing the structure of the $\text{Ca}_v3.1$ /Z944 complex with the results from the MD simulation of $\text{Ca}_v3.3$ /genistein, we observed that a specific interacting locus in the S6-DIII helix that drives the genistein binding (S1419) exhibits a difference in the physicochemical character of its side chain relative to $\text{Ca}_v3.1$ (hydroxyl versus methyl groups; see Figure S8A,B). From this observation, we speculate that genistein should interact with the $\text{Ca}_v3.1$ channel via the same binding site, where the polar interaction with the OH(5) and OH(7) hydroxyl groups and aromatic interaction with the different rings should be conserved (unpublished preliminary results are in good agreement with this proposition). It remains to be confirmed the suggestion that the affinity of genistein for $\text{Ca}_v3.1$, relative to $\text{Ca}_v3.3$, is modified by the absence of a polar side chain at position A1502. Our present experimental data indicate an IC_{50} value of $21.6 \mu\text{M}$ for human $\text{Ca}_v3.3$, whereas IC_{50} values between 20 and $50 \mu\text{M}$ have been reported for murine $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.2$ channels.^{11,12}

In summary, we report the concentration-dependent inhibitory properties of genistein on the human $\text{Ca}_v3.3$ channels. Our recording data support an inhibitory action of genistein independent of tyrosine kinase modulation and without affecting the voltage-dependent gating of the channels. Furthermore, by using computational methods we proposed a specific interacting binding mechanism between the human $\text{Ca}_v3.3$ channel and genistein. Taken together, we propose the detailed mechanistic binding determinants by which genistein directly inhibits the human $\text{Ca}_v3.3$ channel function. In particular, we propose the role of the hydroxyl groups present in the ligand as well as that of the amino acid residues in the human $\text{Ca}_v3.3$ channel as critical factors for the genistein/ $\text{Ca}_v3.3$ complex formation. Specifically, polar interactions are established by the OH(5) group with the side chain of Q1718, the OH(7), and the backbone of L1721 and between the OH(4') group and the side chains of S1419 and K1379. Lastly, aromatic interactions between the fused ring A and C are formed with the side chain of F1426 (Figure 3).

Our study also identifies conformational differences regarding the interaction of calcium channels and genistein. That is, both $\text{Ca}_v3.1$ and $\text{Ca}_v3.2$ channels are suggested to bind genistein preferentially to the inactivated state of the Ca_v3 channels.^{11,12} Nevertheless, our present data do not support such a statement for the case of the $\text{Ca}_v3.3$ channels, because no change on the voltage-dependent steady-state inactivation is observed (Table S1). To which extent the observed ligand binding features are

different among the Ca_v3 calcium channel family remains to be further investigated, because slight differences in the channel-blocker binding mode could provide important guidelines for the design of isoform-specific inhibitory ligands. Thus, our results not only provide a specific interacting molecular inhibitory mechanism but also pave the way to develop new ligand blockers with improved properties.

CONCLUSIONS

The concentration-dependent capacity of the phytoestrogen compound genistein to inhibit the function of the human $\text{Ca}_v3.3$ was unveiled by electrophysiological measurements. Interestingly, by starting only from the primary sequence and using computational methods, we were able to identify a particular molecular pose that resembles that of the $\text{Ca}_v3.1/\text{Z944}$ complex which was obtained by cryo-EM techniques (PDB accession code 6KZP).²³ Finally, we proposed the interacting determinant driving the binding of genistein and the $\text{Ca}_v3.3$ channel.

METHODS

Cell Culture and Transfection. Human embryonic kidney (HEK) 293 cells (American Type Culture Collection) were maintained at 37 °C in a humidified air atmosphere containing 5% CO_2 . The culture medium contained 90% Dulbecco's modified Eagle's Medium (GIBCO-Invitrogen), 10% fetal bovine serum (GIBCO-Invitrogen), 100 U/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. Once a week, cells of low passage number (<20) were replated at low density (~20–30% coverage) on 35 mm culture dishes (BD Falcon) and transfected within 3–5 days using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as described previously.²⁴ The transfection mixture included expression plasmids encoding $\text{Ca}_v3.3$ calcium channel α subunit (at 1.0 $\mu\text{g}/\text{dish}$) and the enhanced green fluorescent protein (EGFP; 0.1 $\mu\text{g}/\text{dish}$). The day following transfection, cells were trypsinized and replated onto 12 mm round glass coverslips. Electrophysiological recordings were performed 24–36 h later. Successfully transfected cells (i.e., EGFP-positive) were visually identified by their green fluorescence under ultraviolet (UV) illumination. Exclusively isolated green cells were used for patch-clamp recording.

Expression Plasmids. The α_1 subunit of human $\text{Ca}_v3.3$ (α_{11}) (GenBank Accession No. AF393329) was in pcDNA3.1 (Invitrogen) and generously provided by Dr. J. C. Gomora. Jellyfish enhanced green fluorescent protein (U55763) was in pEGFP (Clontech) and generously provided by Dr. B.A. Adams.

Voltage-Clamp Recordings. Large-bore patch pipettes were pulled from 100 μL borosilicate glass micropipettes (World Precision Instruments) on a Sutter P97 puller (Sutter Instruments) and filled with an intracellular solution containing (in mM) 155 CsCl, 10 Cs₂-EGTA, 4 Mg-ATP, 0.32 Li-GTP, and 10 HEPES, with pH adjusted to 7.4 with CsOH. Aliquots of pipet solution were stored at –70 °C, kept on ice after thawing, and filtered at 0.22 μm immediately prior to use. Filled pipettes had dc resistances of 1.2–1.5 M Ω . The bath solution contained (in mM) 170 NaCl, 10 CaCl_2 , 2 KCl, and 10 HEPES, with pH adjusted to 7.4 with NaOH. After forming a G Ω seal in the cell-attached configuration, residual pipet capacitance was compensated using the negative capacitance compensation circuit of the Axopatch-200B patch-clamp amplifier (Molecular Devices). No corrections were made for liquid junction potentials. Ca^{2+} currents were recorded in the whole-cell, ruptured-patch mode. The steady holding potential in all the experiments was –90 mV. Test depolarizations were delivered at 0.1 Hz. Macroscopic Ca^{2+} currents were filtered at 5 kHz and sampled at 10 kHz using a Digidata 1200 analog-to-digital board (Molecular Devices) installed in a personal computer. The pCLAMP software programs Clampex and Clampfit (Molecular Devices, v.9.2) were used for data acquisition and analysis, respectively. Figures, data fits, and statistical comparisons were performed using the software program Origin (version 8.0, Microcal Software, Inc.). Cell capacitance (C_m) was determined by integration of a transient from –80 mV to –70 mV. The

mean value of C_m was 19.2 ± 0.7 pF ($n = 105$ cells). The time constant for decay of the whole-cell capacity transient (τ_m) was reduced as much as possible using the analogic compensation circuit of the amplifier; thus, the mean values of τ_m and R_s were 53.8 ± 2.1 μs and 3.0 ± 0.1 M Ω , respectively. After the electronic compensation of τ_m and R_s , the mean maximum voltage error was 2.9 ± 0.3 mV. The Ca^{2+} currents were corrected for linear capacitance and leakage currents using $-P/4$ subtraction. All experiments were performed at room temperature (20–23 °C). Conductance–voltage (G – V) relationships were obtained from each cell by the chord conductance method. Normalized G values were subsequently fit with the equation

$$G = 1/(1 + \exp[-(V_{1/2} - V)/k]) \quad (1)$$

where G is the normalized conductance, $V_{1/2}$ is the half-maximal activation potential, and k is the slope factor. Normalized steady-state inactivation relationships were constructed from currents evoked by a 100 ms test pulse to –20 mV just after 10 ms membrane repolarization to holding potential at –90 mV, following a 2 s prepulse potential from –100 to 0 mV. Normalized peak Ca^{2+} currents were plotted as a function of the prepulse voltage for each cell and fit with the equation

$$I = 1/(1 + \exp[V - V_{1/2}/k]) \quad (2)$$

where V is the conditioning potential, $V_{1/2}$ is the voltage at which half of the channels are inactivated, and k is the slope factor. Dose–response relationships were fit to the Hill equation

$$I_{Ca}(\% \text{ inhibition}) = D/[1 + ([\text{genistein}]/IC_{50})^h] \quad (3)$$

where D represents the maximal percent of current inhibition, IC_{50} is the genistein concentration producing half-maximal of current inhibition, and h is the Hill coefficient.

Reagents. Both genistein and daidzein (Sigma-Aldrich) were dissolved in DMSO to make a 50 mM stock solution, aliquoted, and stored at –20 °C. Genistein and daidzein stock solutions were diluted with the extracellular solution immediately before recording to reach their final concentration. The final concentration of DMSO was always $\leq 0.4\%$, which did not affect the basal properties of the $\text{Ca}_v3.3$ channel (data not shown). Sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich) was diluted in water to make a 100 mM stock solution, aliquoted, and stored at –20 °C before use.

Data Analysis. Electrophysiological results are reported as mean \pm SEM. Means were compared using one-tailed paired or unpaired Student's t -test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Structure of the Human $\text{Ca}_v3.3$ Channel. Models for the human $\text{Ca}_v3.3$ calcium channel were generated by homology modeling using the revised structure of the α_1 subunit of the rabbit $\text{Ca}_v1.1$ channel ($\text{Ca}_v1.1$; 6BYO).¹⁶ First, the amino acid sequences for the template (α_{1c}) and target (α_{11}) were obtained from Uniprot with the accession codes: P07293 and Q9P0X4, respectively.²⁵ Next, the sequence alignment between the α_1 subunits of $\text{Ca}_v1.1$ and the $\text{Ca}_v3.3$ was generated by BLASTp, and manual adjustments were included accordingly.²⁶ Based on the available structural information, we decided to model all the residues from F60 to A1744 except for two long intracellular loops; the first segment connects domains I and II (DI and DII) and precedes the S1-DII helix while the second segment connects the domains II and III (DII and DIII) and precedes the S1-DIII helix (see Figure S1). Models of the human $\text{Ca}_v3.3$ calcium channel were constructed by comparative modeling using Modeler 9v10.²⁷ A representative model was selected according to Modeler's scoring function and was further considered (Figure S1B,C).

Molecular Docking Calculations of Genistein in the Human $\text{Ca}_v3.3$ Channel. The molecular docking calculations of the genistein compound and the human $\text{Ca}_v3.3$ and genistein were performed using AutoDockVina.¹⁷ The structure of genistein was obtained from the PubChem database (ID 5280961), while the structure of the human $\text{Ca}_v3.3$ calcium channel was generated via comparative modeling, as described in the previous section. During the calculations, a semirigid docking protocol was performed for the protein ($\text{Ca}_v3.3$) and ligand (genistein). The systems were prepared with Autodock tools, and Gasteiger charges were assigned for genistein. The ligand–receptor

predictions were made by blind docking with a grid dimension space delimited by a $90 \text{ \AA} \times 110 \text{ \AA} \times 110 \text{ \AA}$ box that encloses the entire molecular system. AutoDockVina uses a genetic algorithm as a searching method and estimates a binding free energy parameter commonly used as a scoring function. During the search, we considered the default exhaustiveness values of 8.¹⁷ Resulting structures with the lowest energies and different poses were clustered to have a diverse output. Finally, selected positions (namely DII–DIII and DIII–DIV) were refined using the Rosetta Ligand Docking Protocol.¹⁹

Atomistic Molecular Dynamics Simulations of the $\text{Ca}_v3.3$ /Genistein Complex. The model of the human $\text{Ca}_v3.3$ calcium channel in complex with genistein was embedded in a symmetric 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) lipid membrane. The protein–membrane system was hydrated with TIP3P water molecules, and sodium and chloride ions were included so as to obtain an electrically neutral system with a salt concentration of 0.15 M. The protonation states of the amino acids in the $\text{Ca}_v3.3$ channel were selected as the most probable at neutral pH (pH = 7.0). The system, comprising ~200 K atoms, was investigated by unbiased microsecond-length MD simulations using the program NAMD2.12.²⁰ The force fields utilized for the protein and genistein were the CHARMM36 force field with CMAP corrections^{21,28} and the cGenFF (CHARMM general force field),²⁴ respectively. Langevin dynamics and the hybrid Nosé–Hoover Langevin piston were used to maintaining constant temperature (310 K) and pressure (1 atm), respectively.²⁹ Electrostatics were fully evaluated using PME techniques with grid spacing smaller than 1.0 Å in each dimension and a fourth-order interpolation.³⁰ The bond lengths associated with hydrogen atoms were constrained to their equilibrium values using the SHAKE algorithm.³¹ The MD simulations were performed using a 2.0 fs time step. We have used similar setup protocols in other membrane proteins.^{2,33}

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acschemneuro.0c00684>.

Information of structure of $\text{Ca}_v3.3$ channel, traces of whole-cell $\text{Ca}_v3.3$ currents, representative currents for the inhibitory effect of genistein on the voltage-dependence of activation of $\text{Ca}_v3.3$, sequence alignments for the construction of the homology model, atomistic simulated systems, molecular docking results, results from MD simulations, comparison of the binding site for the $\text{Ca}_v3.1/\text{Z944}$ and $\text{Ca}_v3.3/\text{genistein}$ complexes, and activation and steady-state inactivation parameters of $\text{Ca}_v3.3$ channels (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Jose Manuel Perez-Aguilar – School of Chemical Sciences, Meritorious Autonomous University of Puebla (BUAP), University City, Puebla 72570, Mexico; orcid.org/0000-0002-9893-5992; Email: jmanuel.perez@correo.buap.mx

Ulises Meza – Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis, Potosí 78210, México; Email: umeza@uaslp.mx

Authors

Maricruz Rangel-Galván – School of Chemical Sciences, Meritorious Autonomous University of Puebla (BUAP), University City, Puebla 72570, Mexico

Azahel Rangel – Coordinación Académica Región Altiplano, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis, Potosí 78700, México

Catalina Romero-Méndez – Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis, Potosí 78210, México

Eliud Morales Dávila – School of Chemical Sciences, Meritorious Autonomous University of Puebla (BUAP), University City, Puebla 72570, Mexico

María Eugenia Castro – Chemistry Center, Science Institute, Meritorious Autonomous University of Puebla (BUAP), University City, Puebla 72570, Mexico

Norma A. Caballero – School of Biological Sciences, Meritorious Autonomous University of Puebla (BUAP), University City, Puebla 72570, Mexico

Francisco J. Meléndez Bustamante – School of Chemical Sciences, Meritorious Autonomous University of Puebla (BUAP), University City, Puebla 72570, Mexico

Brenda L. Sanchez-Gaytan – Chemistry Center, Science Institute, Meritorious Autonomous University of Puebla (BUAP), University City, Puebla 72570, Mexico

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acschemneuro.0c00684>

Author Contributions

J.M.P.-A. and U.M. conceived the concept and designed the study. M.R.G. and E.M.D. carried out the comparative modeling and molecular dynamics simulations. A.R., C.R.M., and U.M. carried out the recording and analysis of the electrophysiological experiments. M.E.C., N.A.C., and F.J.M. helped with data analysis and model construction. J.M.P.-A., B.L.S.-G., and M.R.G. prepared the computational part of the manuscript, and F.J.M. and B.L.S.-G. contributed to the improvement of the manuscript. All authors participated in the overall discussion of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

J.M.P.-A. acknowledges the computing time granted by the LANCAD on the supercomputer xihcoad at CGSTIC CINVESTAV, members of the CONACyT network of national laboratories. This work was supported by funding from PRODEP to J.M.P.-A. J.M.P.-A., M.E.C., N.A.C., and F.J.M. thank the Laboratorio Nacional de Supercomputo del Sureste de México (LNS-BUAP) of the CONACyT network of national laboratories for the computer resources and support provided. The work was supported by the PRODEP Academic Group BUAP-CA-263 (SEP, México). M.R.G. and E.M.D. thank CONACyT-México for financial support (Ph.D. fellowship Nos. 286497 and 758730, respectively). B.L.S.-G. acknowledges the funding support by PRODEP. This work was also supported by funding from CONACyT (IFC-2016-1955) to U.M.

■ REFERENCES

- (1) Perez-Reyes, E.; Cribbs, L. L.; Daud, A.; Lacerda, A. E.; Barclay, J.; Williamson, M. P.; Fox, M.; Rees, M.; and Lee, J. H. (1998) Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391 (6670), 896–900.
- (2) Clapham, D. E. (2007) Calcium signaling. *Cell* 131 (6), 1047–58.
- (3) Weiss, N., and Zamponi, G. W. (2019) T-Type Channel Druggability at a Crossroads. *ACS Chem. Neurosci.* 10 (3), 1124–1126.
- (4) Chemin, J.; Monteil, A.; Perez-Reyes, E.; Bourinet, E.; Nargeot, J., and Lory, P. (2002) Specific contribution of human T-type calcium channel isoforms ($\alpha 1G$, $\alpha 1H$ and $\alpha 1I$) to neuronal excitability. *J. Physiol.* 540 (Pt 1), 3–14.

- (5) Weiss, N., and Zamponi, G. W. (2019) T-type calcium channels: From molecule to therapeutic opportunities. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 108, 34–39.
- (6) Perez-Reyes, E. (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol. Rev.* 83 (1), 117–61.
- (7) Yunker, A. M., and McEnery, M. W. (2003) Low-voltage-activated ("T-Type") calcium channels in review. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35 (6), 533–75.
- (8) Yang, Y., Cui, Y., Sang, K., Dong, Y., Ni, Z., Ma, S., and Hu, H. (2018) Ketamine blocks bursting in the lateral habenula to rapidly relieve depression. *Nature* 554 (7692), 317–322.
- (9) Dolphin, A. C. (2016) Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. *J. Physiol.* 594 (19), 5369–90.
- (10) Astori, S., Wimmer, R. D., Prosser, H. M., Corti, C., Corsi, M., Liaudet, N., Volterra, A., Franken, P., Adelman, J. P., and Luthi, A. (2011) The $Ca_v3.3$ calcium channel is the major sleep spindle pacemaker in thalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (33), 13823–8.
- (11) Tao, J., Zhang, Y., Li, S., Sun, W., and Soong, T. W. (2009) Tyrosine kinase-independent inhibition by genistein on spermatogenic T-type calcium channels attenuates mouse sperm motility and acrosome reaction. *Cell Calcium* 45 (2), 133–43.
- (12) Kurejová, M., and Lacinová, L. (2006) Effect of protein tyrosine kinase inhibitors on the current through the $Ca_v3.1$ channel. *Arch. Biochem. Biophys.* 446 (1), 20.
- (13) Russo, M., Russo, G. L., Daglia, M., Kasi, P. D., Ravi, S., Nabavi, S. F., and Nabavi, S. M. (2016) Understanding genistein in cancer: The "good" and the "bad" effects: A review. *Food Chem.* 196, 589–600.
- (14) Mukund, V., Mukund, D., Sharma, V., Mannarapu, M., and Alam, A. (2017) Genistein: Its role in metabolic diseases and cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 119, 13–22.
- (15) Gordon, J. A. (1991) Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol.* 201 (477), 82.
- (16) Martinez-Ortiz, W., and Cardozo, T. J. (2018) An Improved Method for Modeling Voltage-Gated Ion Channels at Atomic Accuracy Applied to Human Cav Channels. *Cell Rep.* 23 (5), 1399–1408.
- (17) Trott, O., and Olson, A. J. (2009) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31 (2), 455–61.
- (18) Marksteiner, R., Schurr, P., Berjukow, S., Margreiter, E., Perez-Reyes, E., and Hering, S. (2001) Inactivation determinants in segment IIIIS6 of $Ca(v)3.1$. *J. Physiol.* 537 (Pt 1), 27–34.
- (19) DeLuca, S., Khar, K., and Meiler, J. (2015) Fully Flexible Docking of Medium Sized Ligand Libraries with RosettaLigand. *PLoS One* 10 (7), e0132508.
- (20) Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L., and Schulten, K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26 (16), 1781–802.
- (21) Huang, J., Rauscher, S., Nawrocki, G., Ran, T., Feig, M., de Groot, B. L., Grubmüller, H., and Mackerell, A. D., Jr. (2017) CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat. Methods* 14 (1), 71–73.
- (22) Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I., and Mackerell, A. D., Jr. (2009) CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J. Comput. Chem.* 31 (4), 671–90.
- (23) Zhao, Y., Huang, G., Wu, Q., Wu, K., Li, R., Lei, J., Pan, X., and Yan, N. (2019) Cryo-EM structures of apo and antagonist-bound human Cav3.1. *Nature* 576 (7787), 492–497.
- (24) Licon, Y., Leandro, D., Romero-Mendez, C., Rodriguez-Menchaca, A. A., Sanchez-Armass, S., and Meza, U. (2015) Inhibition of $Ca_v2.3$ channels by NK1 receptors is sensitive to membrane cholesterol but insensitive to caveolin-1. *Pfluegers Arch.* 467 (8), 1699–709.
- (25) TheUniProtConsortium (2019) UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 47 (D1), D506–D515.
- (26) Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 (3), 403–10.
- (27) Sali, A., and Blundell, T. L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234 (3), 779–815.
- (28) Mackerell, A. D., Jr., Feig, M., and Brooks, C. L., 3rd (2004) Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* 25 (11), 1400–15.
- (29) Feller, S. E., Zhang, Y. H., Pastor, R. W., and Brooks, B. R. (1995) Constant-Pressure Molecular-Dynamics Simulation - the Langevin Piston Method. *J. Chem. Phys.* 103 (11), 4613–4621.
- (30) Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993) Particle Mesh Ewald - an NLog(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* 98 (12), 10089–10092.
- (31) Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., and Berendsen, H. J. C. (1977) Numerical-Integration of Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints - Molecular-Dynamics of N-Alkanes. *J. Comput. Phys.* 23 (3), 327–341.
- (32) Perez-Aguilar, J. M., Shan, J., LeVine, M. V., Khelashvili, G., and Weinstein, H. (2014) A functional selectivity mechanism at the serotonin-2A GPCR involves ligand-dependent conformations of intracellular loop 2. *J. Am. Chem. Soc.* 136 (45), 16044–54.
- (33) Perez-Aguilar, J. M., Kang, S. G., Zhang, L., and Zhou, R. (2019) Modeling and Structural Characterization of the Sweet Taste Receptor Heterodimer. *ACS Chem. Neurosci.* 10 (11), 4579–4592.

CONTENIDO

Tabla A1. Valores δ (ppm) de RMN de ^1H experimentales y calculados en el método BP86 y las funciones base TZV, cc-pVDZ, cc-pVTZ, aug-cc-pVDZ, aug-cc-pVTZ en cloroformo para los compuestos NMP.

Tabla A2 Valores δ (ppm) de RMN de ^{13}C experimentales y calculados en el método BP86 y las funciones base TZV, cc-pVDZ, cc-pVTZ, aug-cc-pVDZ, aug-cc-pVTZ y cc-pVQZ en cloroformo para los compuestos NMP.

Tabla A3 Valores δ (ppm) de RMN de ^1H experimentales y calculados con el método BP86 y las funciones bases TZV, cc-pVDZ, cc-pVTZ, aug-cc-pVDZ, aug-cc-pVTZ y cc-pVQZ en cloroformo y DMSO para el conformero E_{closed} de anandamida.

Tabla A4 Valores δ (ppm) de RMN de ^{13}C experimentales y calculados con el método BP86 y las funciones base TZV, cc-pVDZ, cc-pVTZ, aug-cc-pVDZ, aug-cc-pVTZ y cc-pVQZ en cloroformo y DMSO para el conformero E_{closed} de anandamida.

Tabla A5 Frecuencias teóricas IR (en cm^{-1}), intensidad (Int, en km mol^{-1}), frecuencia escalada (Freq esc, en cm^{-1}) y PED ($\geq 10\%$) en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ para NMP-4 usando el factor de escala de 1.014 en cloroformo. Se representa el modo vibracional *stretching* (ν), el modo vibracional *bending* en el plano (β) y el modo vibracional torsional (τ).

Tabla A6 Frecuencias teóricas IR (en cm^{-1}), intensidad (Int, en km mol^{-1}), frecuencia escalada (Freq esc, en cm^{-1}) y PED ($\geq 10\%$) en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ para NMP-7 usando el factor de escala de 1.014 en cloroformo. Se representa el modo vibracional *stretching* (ν), el modo vibracional *bending* en el plano (β) y el modo vibracional torsional (τ).

Tabla A7 Frecuencias teóricas IR (en cm^{-1}), intensidad (Int, en km mol^{-1}), frecuencia escalada (Freq esc, en cm^{-1}) y PED ($\geq 10\%$) en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ para NMP-181 usando el factor de escala de 1.014 en cloroformo. Se representa el modo vibracional *stretching* (ν), el modo vibracional *bending* en el plano (β) y el modo vibracional torsional (τ).

Tabla A8 Frecuencias teóricas IR (en cm^{-1}), intensidad (Int, en km mol^{-1}), frecuencia escalada (Freq esc, en cm^{-1}) y PED ($\geq 10\%$) en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ para anandamida usando el factor de escala de 1.014 en cloroformo. Se representa el modo vibracional *stretching* (ν), el modo vibracional *bending* en el plano (β) y el modo vibracional torsional (τ).

Tabla A1. Valores δ (ppm) de RMN de ^1H experimentales y calculados en el método BP86 y las funciones base TZV, cc-pVDZ, cc-pVTZ, aug-cc-pVDZ, aug-cc-pVTZ en cloroformo para los compuestos NMP.

	Grupos	Exp. [10,11]	TZV	cc-pVDZ	cc-pVTZ	aug-cc-pVDZ	aug-cc-pVTZ	cc-pVQZ
NMP-4	H _{ring}	6.86-8.07	6.49-7.70	6.55-7.85	6.98-8.18	7.02-8.27	7.08-8.24	7.06-8.21
	H _{CH3-O}	3.93	3.99-4.23	3.71-4.01	3.89-4.11	4.03-4.25	3.97-4.18	3.90-4.12
	H _{R-CH2-N}	4.22	4.10-4.20	3.99-4.09	4.24-4.37	4.30-4.46	4.24-4.51	4.30-4.40
	H _{R-CH2-N*}	3.71	2.77-4.67	2.48-4.66	2.55-4.97	2.78-5.01	2.71-4.98	2.57-5.00
	H _{R-CH2-R' **}	1.62-1.69	1.68-2.09	1.39-1.86	1.50-1.99	1.56-2.12	1.57-2.03	1.51-2.00
	H _{CH2}	1.35-1.85	1.52-1.99	1.32-1.60	1.40-1.76	1.45-1.81	1.44-1.88	1.40-1.79
	H _{CH3}	0.88	1.08-1.27	0.91-1.13	0.94-1.21	0.98-1.31	0.91-1.22	0.94-1.20
	R²		0.9816	0.9764	0.9740	0.9763	0.9769	0.9736
NMP-7	H _{ring}	7.23-8.19	7.08-7.82	7.22-8.03	7.51-8.33	7.59-8.55	7.53-8.38	7.54-8.38
	H _{R-CH2-N}	4.25	4.23-4.24	4.15	4.42-4.43	4.51-4.54	4.44-4.53	4.47
	H _{R-CH2-N*}	3.73	2.93-4.78	2.54-4.74	2.60-5.05	2.65-5.14	2.57-5.10	2.64-5.06
	H _{R-CH2-R' **}	1.61-1.67	1.80-2.13	1.48-1.91	1.60-2.07	1.72-2.24	1.66-2.16	1.60-2.06
	H _{CH2}	1.32-1.83	1.53-2.03	1.32-1.66	1.40-1.83	1.45-1.87	1.45-1.80	1.40-1.87
	H _{CH3}	0.85	1.05-1.25	0.90-1.13	0.94-1.22	1.00-1.38	0.96-1.32	0.92-1.20
	R²		0.9850	0.9801	0.9769	0.9766	0.9749	0.9777
	NMP-181	H _{ring}	7.23-8.81	7.06-8.61	7.29-8.60	7.56-9.00	7.63-9.18	7.69-9.17
H _{CH2-O}		4.48	4.39-4.67	4.01-4.52	4.15-4.71	4.23-4.77	4.18-4.77	4.16-4.73
H _{R-CH2-N}		4.21	4.21-4.24	4.13-4.14	4.42-4.43	4.49	4.48-4.51	4.47-4.49
H _{CH2-N}		2.76	2.79-3.31	2.40-2.96	2.52-3.17	2.63-3.27	2.62-3.26	2.55-3.20
H _{CH3-N}		2.36	2.00-2.92	1.67-2.61	1.73-2.83	1.84-2.97	1.76-2.92	1.75-2.85
H _{CH2}		1.26-1.81	1.59-2.11	1.35-1.70	1.44-1.87	1.52-1.98	1.47-1.87	1.43-1.90
H _{CH3}		0.84	1.05-1.24	0.89-1.13	0.93-1.21	0.99-1.35	0.99-1.28	0.92-1.20
R²			0.9951	0.9939	0.9928	0.9926	0.9920	0.9929

*cicloalcano ** cíclico

Tabla A2 Valores δ (ppm) de RMN de ^{13}C experimentales y calculados en el método BP86 y las funciones base TZV, cc-pVDZ, cc-pVTZ, aug-cc-pVDZ, aug-cc-pVTZ y cc-pVQZ en cloroformo para los compuestos NMP.

	Grupos	Exp. [10,11]	TZV	cc-pVDZ	cc-pVTZ	aug-cc-pVDZ	aug-cc-pVTZ	cc-pVQZ
NMP-4	C _{C=O}	171.7	177.3	165.1	174.2	168.8	172.1	177.7
	C _{C-OCH₃}	159.5	165.1	156.2	164.4	154.6	161.7	167.9
	C _{C=N-R}	141.3-142.4	143.9-144.9	137.4-138.3	143.8-144.8	136.5-138.2	144.0-144.9	147.2-148.4
	C _{ring}	119-127	122.1-132.7	115.3-126.6	121.0-131.0	113.4-124.2	118.9-129.3	123.9-134.3
	C _{CH₂ring}	93.6 -121.4	99.5-129.4	93.3-122.8	96.9-128.3	91.3-119.7	95.1-126.3	99.5-131.3
	C _{CH₃-O}		58.3	55.8	58.5	54.5	56.1	60.1
	C _{CH₂-C*}	24.9-28.6	30.7-31.7	29.5-30.4	29.4-31.1	25.3-28.4	22.2-32.5	30.7-31.8
	C _{CH₂-N*}	43.3-55.8	47.5-54.1	46.4-52.3	47.3-54.7	43.9-50.8	46.3-57.7	48.7-55.5
	C _{CH₂-N}		47.3	46.4	47.4	44.2	42.0	49.2
	C _{CH₂-C}	22.6 - 29.5	29.5-36.0	29.5-35.2	29.4-34.9	27.8-30.8	29.3-30.8	30.2-36.3
	C _{CH₃-C}	14.11	17.3	17.5	16.5	13.5	14.2	17.1
R²		0.9971	0.9977	0.9977	0.9967	0.9972	0.9975	
NMP-7	C _{C=O}	171.5	175.7	164.0	173.2	167.9	170.1	176.5
	C _{C=N-R}	140.9-141.0	144.0-144.1	136.8-137.2	143.0-143.5	135.7-136.4	140.6-141.8	146.5-147.0
	C _{ring}	125.1-126.7	126.5-131.1	119.2-126.2	124.1-131.1	114.9-123.4	121.4-132.6	127.6-133.9
	C _{H₂ring}	108.4-122.4	111.1-131.0	106.2-124.7	110.0-130.4	103.7-121.8	107.8-129.4	112.8-133.3
	C _{CH₂-C*}	29.4	30.7-32.0	29.6-30.5	30.0-31.0	27.1-28.7	26.9-31.4	30.8-31.9
	C _{CH₂-N*}		47.3-54.8	46.8-52.9	47.4-54.0	44.5-51.8	44.3-49.3	48.9-56.2
	C _{CH₂-N}	43.2	47.3	46.5	48.1	44.9	46.9	49.3
	C _{CH₂-C}	22.5-28.7	29.5-36.2	29.3-35.3	29.5-35.1	27.2-31.6	29.5-38.8	30.1-36.3
	C _{CH₃-C}	14.0	17.4	17.5	16.6	13.5	13.3	17.0
	R²		0.9983	0.9978	0.9799	0.9968	0.9957	0.9981
	NMP-181	C _{C=O}	167.5	174.5	162.5	171.3	165.8	169.7
C _{C=N-R}		141.0-143.1	144.7-145.5	137.6-138.5	143.8-145.0	135.4-139.3	141.7-142.6	147.4-148.3
C _{ring}		120.7-122.6	125.3-128.5	120.0-121.3	123.6-126.5	117.6-119.2	123.5-126.4	127.0-130.2
C _{H₂ring}		108.2-127.4	110.5-129.9	106.2-124.7	109.7-130.2	103.5-122.4	107.5-129.6	112.5-133.4
C _{CH₂-O}		58.1	68.4	67.0	69.0	64.5	66.9	71.1
C _{CH₃-N}		46.04	46.7-51.3	45.7-50.3	47.0-51.7	42.3-47.5	45.7-52.1	48.0-52.7
C _{CH₂-N}		43.3-62.9	47.3-62.4	46.6-61.3	48.5-62.8	45.3-58.4	47.9-61.6	49.5-64.2
C _{CH₂-C}		22.5-29.4	29.6-35.6	29.4-35.2	29.5-35.3	27.1-32.6	29.0-38.2	30.1-36.1
C _{CH₃-C}		14.0	17.3	17.5	16.6	13.5	13.2	17.0
R²			0.9970	0.9974	0.9732	0.9958	0.9960	0.9971

*cicloalcano ** cíclico

Tabla A3 Valores δ (ppm) de RMN de ^1H experimentales y calculados con el método BP86 y las funciones bases TZV, cc-pVDZ, cc-pVTZ, aug-cc-pVDZ, aug-cc-pVTZ y cc-pVQZ en cloroformo y DMSO para el conformero E_{closed} de anandamida.

CHCl_3								
Grupos	Exp. [64]	Exp. [65]	TZV	cc-pVDZ	cc-pVTZ	aug-cc-pVDZ	aug-cc-pVTZ	cc-pVQZ
H_{OH}		4.70	5.13	5.19	6.20	6.15	6.56	6.51
$\text{H}_{\text{CH}_2\text{-O}}$	3.72	3.45	3.94-3.95	3.66-3.82	3.77-3.88	3.87-4.02	3.77-3.98	3.78-3.86
$\text{H}_{\text{CH}_2\text{-N}}$	3.42	3.10-3.40	3.15-3.72	2.84-3.49	3.10-3.67	3.23-3.81	3.15-3.66	3.14-3.71
H_{NH}	5.95	7.80	5.59	5.55	6.13	6.25	6.40	6.29
H_{CH}	5.35-5.4	5.35	5.48-5.90	5.24-5.67	5.42-5.90	5.53-6.05	5.50-6.10	5.46-5.93
H_{CH_2}	1.28-2.84	1.25-2.80	1.42-3.15	1.09-3.16	1.17-3.29	1.07-3.33	1.12-3.35	1.19-3.31
H_{CH_3}	0.89	0.85	0.95-1.21	0.82-1.09	0.83-1.15	0.88-1.27	0.83-1.16	0.81-1.14
R^2			0.9338	0.9293	0.9320	0.9350	0.9313	0.9302
DMSO								
Grupos	Exp. [64]	Exp. [65]	TZV	cc-pVDZ	cc-pVTZ	aug-cc-pVDZ	aug-cc-pVTZ	cc-pVQZ
H_{OH}		4.70	4.69	4.68	5.70	5.68	6.07	6.01
$\text{H}_{\text{CH}_2\text{-O}}$	3.72	3.45	3.97-4.02	3.71-3.81	3.82-3.89	3.91-4.04	3.81-4.01	3.84-3.87
$\text{H}_{\text{CH}_2\text{-N}}$	3.42	3.10-3.40	3.34-3.62	2.98-3.38	3.24-3.54	3.37-3.66	3.33-3.52	3.29-3.57
H_{NH}	5.95	7.80	5.74	5.64	6.23	6.31	6.48	6.40
H_{CH}	5.35-5.4	5.35	5.49-5.90	5.24-5.67	5.42-5.91	5.54-6.06	5.50-6.11	5.46-5.95
H_{CH_2}	1.28-2.84	1.25-2.80	1.40-3.17	1.07-3.17	1.14-3.30	1.00-3.36	1.07-3.36	1.17-3.33
H_{CH_3}	0.89	0.85	0.94-1.19	0.81-1.08	0.82-1.14	0.87-1.27	0.83-1.15	0.80-1.12
R^2			0.9403	0.9357	0.9440	0.9432	0.9440	0.9437

Tabla A4 Valores δ (ppm) de RMN de ^{13}C experimentales y calculados con el método BP86 y las funciones base TZV, cc-pVDZ, cc-pVTZ, aug-cc-pVDZ, aug-cc-pVTZ y cc-pVQZ en cloroformo y DMSO para el conformero E_{closed} de anandamida.

CHCl_3								
Grupos	Exp. [64]	Exp. [65]	TZV	cc-pVDZ	cc-pVTZ	aug-cc-pVDZ	aug-cc-pVTZ	cc-pVQZ
$\text{C}_{\text{C-OH}}$	62.5	60.81	70.46	67.09	71.77	66.04	71.82	73.23
$\text{C}_{\text{CH}_2\text{-N}}$	42.4	42.25	51.59	50.84	52.21	48.57	50.81	53.67
$\text{C}_{\text{C=O}}$	174.2	172.00	181.26	167.90	178.22	172.64	177.52	182.36
$\text{C}_{\text{CH-C}}$	127.5-130.5	128.0-130.0	133.48-138.13	126.01-130.62	132.25-136.34	125.92-129.77	132.01-137.12	135.43-140.80
$\text{C}_{\text{CH}_2\text{-C}}$	22.5-35.9	22.85-35.66	30.03-43.15	29.55-41.01	29.81-41.80	27.72-38.34	29.49-38.82	30.43-42.87
$\text{C}_{\text{CH}_3\text{-C}}$	14.1	14.79	17.40	17.56	16.57	13.16	13.47	17.20
R^2			0.9992	0.9991	0.9988	0.9983	0.9978	0.9989
DMSO								
Grupos	Exp. [64]	Exp. [65]	TZV	cc-pVDZ	cc-pVTZ	aug-cc-pVDZ	aug-cc-pVTZ	cc-pVQZ
$\text{C}_{\text{C-OH}}$	62.5	60.81	70.40	66.96	71.61	65.90	71.81	73.07
$\text{C}_{\text{CH}_2\text{-N}}$	42.4	42.25	52.33	51.35	53.03	49.49	52.06	54.45
$\text{C}_{\text{C=O}}$	174.2	172.00	180.99	167.48	178.02	172.48	177.74	182.13
$\text{C}_{\text{CH-C}}$	127.5-130.5	128.0-130.0	133.60-138.52	126.01-130.83	132.31-136.80	126.00-130.02	131.98-136.85	135.53-141.13
$\text{C}_{\text{CH}_2\text{-C}}$	22.5-35.9	22.85-35.66	30.18-43.06	29.56-40.82	29.84-41.62	27.65-38.03	29.21-38.45	30.47-42.75
$\text{C}_{\text{CH}_3\text{-C}}$	14.1	14.79	17.43	17.52	16.53	13.00	13.32	17.14
R^2			0.9992	0.9990	0.9987	0.9983	0.9978	0.9988

Tabla A5 Frecuencias teóricas IR (en cm^{-1}), intensidad (Int, en km mol^{-1}), frecuencia escalada (Freq esc, en cm^{-1}) y PED ($\geq 10\%$) en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ para NMP-4 usando el factor de escala de 1.014 en cloroformo. Se representa el modo vibracional *stretching* (ν), el modo vibracional *bending* en el plano (β) y el modo vibracional torsional (τ).

Freq	Int	F esc	PED ($\geq 10\%$)	Freq	Int	F esc	PED ($\geq 10\%$)	Freq	Int	F esc	PED ($\geq 10\%$)
3137.9	2.42	3181.8	$\nu\text{CH}(96)$	1559.6	8.30	1581.4	$\nu\text{CC}(28) + \beta\text{CCC}(11)$	1300.4	0.74	1318.6	$\tau\text{HCCC}(42)$
3120.2	1.91	3163.9	$\nu\text{CH}(98)$	1552.7	1.80	1574.4	$\nu\text{CC}(37)$	1289.0	0.39	1307.1	$\beta\text{HCC}(64) + \tau\text{HCCC}(12)$
3118.9	3.48	3162.6	$\nu\text{CH}(98)$	1476.2	10.35	1496.8	$\nu\text{CC}(20) + \beta\text{HCC}(11)$	1281.2	0.25	1299.1	$\beta\text{HCC}(44)$
3103.9	1.18	3147.4	$\nu\text{CH}(99)$	1461.0	4.79	1481.4	$\beta\text{HCH}(74)$	1277.6	8.53	1295.5	$\beta\text{HCC}(16)$
3097.8	4.85	3141.2	$\nu\text{CH}(97)$	1460.2	22.35	1480.7	$\beta\text{HCC}(10)$	1258.3	8.98	1275.9	$\beta\text{HCC}(28)$
3095.4	0.91	3138.7	$\nu\text{CH}(99)$	1455.1	7.09	1475.5	$\beta\text{HCH}(29)$	1256.9	5.17	1274.5	$\beta\text{HCN}(25) + \beta\text{HCC}(12) + \tau\text{HCNC}(14) + \tau\text{HCCC}(15)$
3063.1	6.07	3106.0	$\nu\text{CH}(91)$	1450.5	7.34	1470.8	$\beta\text{HCH}(26)$	1244.1	13.03	1261.5	$\beta\text{HCC}(28) + \tau\text{HCCN}(11)$
3056.3	3.13	3099.1	$\nu\text{CH}(98)$	1449.5	2.77	1469.8	$\beta\text{HCH}(36)$	1235.6	74.87	1252.9	$\beta\text{HCC}(10) + \beta\text{HCN}(15)$
3050.8	2.73	3093.5	$\nu\text{CH}(97)$	1445.9	14.16	1466.2	$\beta\text{HCH}(37)$	1227.3	0.77	1244.5	$\tau\text{HCCC}(56)$
3019.9	11.96	3062.1	$\nu\text{CH}(99)$	1444.6	1.73	1464.8	$\beta\text{HCH}(77) + \tau\text{HCCC}(15)$	1225.5	18.11	1242.7	$\beta\text{HCC}(11)$
3012.2	22.23	3054.3	$\nu\text{CH}(86)$	1440.1	3.55	1460.2	$\beta\text{HCH}(49)$	1221.9	29.54	1239.0	$\nu\text{OC}(13)$
3010.8	4.30	3052.9	$\nu\text{CH}(77)$	1439.2	2.88	1459.3	$\beta\text{HCH}(34)$	1208.7	21.05	1225.6	$\beta\text{HCN}(12)$
2997.4	22.19	3039.3	$\nu\text{CH}(91)$	1435.3	5.59	1455.4	$\beta\text{HCH}(67)$	1193.8	2.04	1210.5	
2996.4	9.84	3038.4	$\nu\text{CH}(99)$	1434.6	2.36	1454.6	$\beta\text{HCH}(79) + \tau\text{HCOC}(16)$	1177.3	46.86	1193.8	$\beta\text{HCC}(10)$
2994.7	10.30	3036.6	$\nu\text{CH}(100)$	1432.4	1.06	1452.5	$\beta\text{HCH}(62)$	1157.2	22.46	1173.4	$\beta\text{HCH}(11) + \tau\text{HCOC}(38)$
2990.4	16.84	3032.3	$\nu\text{CH}(85)$	1430.9	1.75	1450.9	$\beta\text{HCH}(89)$	1142.0	1.06	1158.0	$\beta\text{HCC}(10) + \tau\text{CCCN}(10)$
2984.7	8.92	3026.5	$\nu\text{CH}(76)$	1429.1	0.18	1449.1	$\beta\text{HCH}(87)$	1138.8	0.48	1154.7	$\beta\text{HCN}(12) + \beta\text{HCC}(17)$
2970.1	3.80	3011.7	$\nu\text{CH}(69)$	1425.2	0.76	1445.1	$\beta\text{HCH}(87)$	1132.0	13.91	1147.8	$\nu\text{CC}(16) + \beta\text{HCC}(34)$
2967.9	18.55	3009.5	$\nu\text{CH}(92)$	1422.1	0.92	1442.0	$\nu\text{CC}(15) + \beta\text{HCH}(37)$	1127.8	0.22	1143.5	$\beta\text{HCH}(29) + \tau\text{HCOC}(70)$
2951.0	11.06	2992.3	$\nu\text{CH}(88)$	1416.1	8.46	1435.9	$\nu\text{CC}(23) + \beta\text{HCH}(10)$	1120.1	2.18	1135.8	$\nu\text{CC}(10) + \beta\text{HCC}(40)$
2950.6	13.19	2991.9	$\nu\text{CH}(99)$	1394.6	100.00	1414.1	$\nu\text{NC}(29) + \beta\text{HCN}(31)$	1112.9	56.23	1128.5	$\beta\text{HCC}(27)$
2949.7	9.33	2991.0	$\nu\text{CH}(90)$	1368.5	0.60	1387.7	$\nu\text{CC}(11) + \beta\text{HCC}(12)$	1102.8	1.61	1118.2	$\nu\text{NC}(15) + \nu\text{CC}(21) + \beta\text{HCC}(10) + \beta\text{CCC}(10) + \tau\text{HCCC}(24)$
2948.9	7.50	2990.2	$\nu\text{CH}(84)$	1361.1	0.85	1380.2	$\beta\text{HCH}(85)$	1099.5	0.61	1114.8	
2946.4	0.61	2987.7	$\nu\text{CH}(90)$	1359.2	22.24	1378.2	$\nu\text{CC}(29)$	1086.8	15.27	1102.0	$\tau\text{CCCN}(10)$
2939.3	9.79	2980.5	$\nu\text{CH}(86)$	1348.5	10.18	1367.3	$\tau\text{HCNC}(12)$	1049.0	0.23	1063.7	$\nu\text{CC}(26)$
2935.4	24.78	2976.5	$\nu\text{CH}(91)$	1346.6	2.56	1365.4	$\tau\text{HCNC}(31)$	1045.5	7.69	1060.1	$\nu\text{NC}(19) + \nu\text{OC}(17)$
2933.8	7.90	2974.9	$\nu\text{CH}(84)$	1342.8	1.04	1361.6	$\tau\text{HCCC}(52)$	1039.6	0.35	1054.1	$\nu\text{CC}(85)$
2925.2	4.12	2966.1	$\nu\text{CH}(89)$	1332.8	49.68	1351.5	$\nu\text{NC}(26)$	1020.4	11.07	1034.7	$\nu\text{OC}(30) + \beta\text{HCC}(15)$
2904.8	21.25	2945.5	$\nu\text{CH}(96)$	1330.4	2.04	1349.0	$\beta\text{HCC}(10) + \tau\text{HCNC}(23)$	1009.0	6.28	1023.1	$\nu\text{NC}(12) + \tau\text{HCCC}(10) + \nu\text{CC}(16) + \tau\text{HCCN}(10)$
2892.5	16.12	2933.0	$\nu\text{CH}(97)$	1328.6	3.11	1347.2	$\tau\text{HCCC}(24) + \tau\text{HCCN}(15)$	1007.6	0.54	1021.7	$\nu\text{CC}(75)$
1612.4	55.73	1635.0	$\nu\text{CC}(50)$	1325.3	0.45	1343.9	$\beta\text{HCC}(33) + \tau\text{HCCC}(32)$	1000.7	2.66	1014.7	$\beta\text{CCC}(23)$
1600.8	88.20	1623.2	$\nu\text{OC}(77)$	1307.2	5.85	1325.5	$\beta\text{HCC}(34) + \tau\text{HCNC}(11) + \tau\text{HCCC}(17)$	986.5	0.65	1000.3	$\nu\text{CC}(63)$
1585.6	74.11	1607.8	$\nu\text{CC}(33)$	1306.5	0.09	1324.8	$\tau\text{HCCN}(10)$	984.0	11.71	997.8	$\beta\text{CCN}(17)$

(Continúa en la siguiente página)

(Continuación)

NMP4							
Freq	Int	F. esc	PED ($\geq 10\%$)	Freq	Int	F. esc	PED ($\geq 10\%$)
962.3	0.30	975.7	β HCC(30)+ τ HCCC(10)	344.7	0.41	349.6	γ CCCC(22)
936.9	1.29	950.0	τ HCNC(21)	337.9	0.35	342.7	β CCC(35)
920.2	0.14	933.1	τ HCCC(44) + τ HCCN(27)+ τ CCCC(13)	322.3	2.41	326.8	β CNC(11)
914.0	3.90	926.8	ν OC(11)	306.3	0.53	310.6	
906.5	0.03	919.2	τ HCCC(71)+ τ CCCC(18)	282.9	0.32	286.9	β COC(11)
905.5	0.32	918.1	ν CC(32)	273.0	0.10	276.9	β COC(12) + β CNC(26)
892.5	5.12	905.0	τ HCCC(62)	261.0	0.30	264.6	
878.3	0.31	890.6	ν CC(32) + τ HCCC(22)	249.0	0.60	252.5	τ CNC(12)
873.1	0.61	885.3	τ HCCC(14)	241.7	0.03	245.1	τ HCCC(77)
839.5	3.37	851.2		235.9	0.03	239.2	τ HCOC(14)
832.6	5.81	844.2	τ HCCC(21)	214.2	0.76	217.2	τ CCCN(17)+ ν OCCC(12)
819.7	0.47	831.2		205.3	0.34	208.1	β OCC(20) + β COC(10)
804.6	11.74	815.9	τ HCCC(26)+ τ HCCN(10)	191.8	0.41	194.5	β CNC(11)
803.1	4.74	814.4	τ HCCC(26)	170.6	0.17	172.9	γ CCCC(12)
795.8	3.54	807.0	τ HCCC(17)+ τ HCCN(35)	139.1	0.05	141.0	τ CCCN(16)+ τ CCCC(37)
789.5	0.69	800.5	ν NC(12)+ τ HCCC(17)	134.2	0.31	136.1	β CCC(30)
780.0	3.92	791.0	τ HCCC(41)	125.1	0.07	126.8	β NCC(11)+ τ CCCC(11) + τ CNCC(14)
752.9	0.81	763.4	τ CCCC(11)+ ν ONCC(13)	106.7	0.59	108.2	
749.2	1.73	759.7		96.9	0.58	98.2	τ CCCC(11) + τ COCC(21)
738.4	1.75	748.7		95.3	0.09	96.7	τ CCCC(64)
728.8	1.19	739.0	τ HCCC(11)	71.0	1.60	72.0	τ COCC(21)+ γ CCCN(23)
722.9	1.12	733.0	ν CC(10) + β CCC(15)	64.8	0.01	65.7	
713.7	1.28	723.6	β HCC(11) + τ HCCC(46)	64.0	0.04	64.9	τ CNCC(42)+ τ COCC(10)+ τ CCNC(13)+ τ CCCN(49)+ τ CCCC(26)
705.0	3.43	714.9	ν ONCC(23)	50.2	0.08	50.9	γ CCCN(26) + γ CCCC(17)
674.9	1.39	684.3	ν NC(14)	44.2	0.10	44.8	β CCC(22)+ γ CCCN(28)
636.0	1.16	644.9		31.1	0.40	31.5	τ NCCC(34)
624.0	3.20	632.7	τ HCCC(19)+ ν OCCC(28)	21.4	0.29	21.7	
609.8	1.12	618.3		15.5	0.06	15.7	
606.6	3.56	615.1	β OCC(11) + β CCN(10)				
577.0	12.69	585.0	β OCC(13)				
553.0	0.52	560.8	β CCC(11) + β CCN(14)				
527.7	1.40	535.1	β NCC(10)				
496.2	0.39	503.2	β COC(17)				
476.7	2.38	483.3	β OCC(12)				
455.6	0.41	462.0	β CCN(11)				
443.4	0.31	449.7	β CCN(26) + τ CCCC(15)				
434.2	1.32	440.2	τ CCCC(15)				
426.9	1.28	432.9	τ HCCC(11)+ γ CNCC(21)				τ CCCC(30)+
393.6	0.63	399.1	β CNC(14)				
385.5	2.30	390.9					
367.8	1.50	373.0	τ CCCC(11)				

Tabla A6 Frecuencias teóricas IR (en cm^{-1}), intensidad (Int, en km mol^{-1}), frecuencia escalada (Freq esc, en cm^{-1}) y PED ($\geq 10\%$) en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ para NMP-7 usando el factor de escala de 1.014 en cloroformo. Se representa el modo vibracional *stretching* (ν), el modo vibracional *bending* en el plano (β) y el modo vibracional torsional (τ).

Freq	Int	F esc	PED ($\geq 10\%$)	Freq	Int	F esc	PED ($\geq 10\%$)	Freq	Int	F esc	PED ($\geq 10\%$)
3121.8	3.71	3165.5	$\nu\text{CH}(99)$	1472.2	8.84	1492.8	$\nu\text{CC}(13) + \beta\text{HCC}(21)$	1254.2	4.11	1271.8	$\beta\text{HCN}(25) + \beta\text{HCC}(17)$ $\tau\text{HCNC}(15)$
3118.7	7.41	3162.3	$\nu\text{CH}(93)$	1460.6	14.93	1481.0	$\nu\text{CC}(15)$	1243.0	21.35	1260.4	$\beta\text{HCC}(25) + \tau\text{HCCN}(15)$
3110.5	8.81	3154.0	$\nu\text{CH}(98)$	1458.6	6.39	1479.0	$\beta\text{HCH}(73)$	1234.7	64.11	1252.0	$\beta\text{HCN}(13)$
3107.3	0.94	3150.8	$\nu\text{CH}(100)$	1452.9	8.98	1473.2	$\beta\text{HCH}(27)$	1228.1	3.66	1245.3	$\tau\text{HCCC}(20)$
3099.2	2.41	3142.6	$\nu\text{CH}(98)$	1451.0	6.22	1471.3	$\beta\text{HCH}(50)$	1226.8	10.57	1244.0	
3096.5	2.18	3139.8	$\nu\text{CH}(98)$	1446.5	5.82	1466.7	$\beta\text{HCH}(13)$	1215.1	1.23	1232.1	
3091.6	0.13	3134.9	$\nu\text{CH}(96)$	1444.5	2.25	1464.8	$\beta\text{HCH}(75) + \tau\text{HCCC}(14)$	1202.2	21.07	1219.0	$\beta\text{HCN}(10)$
3061.2	3.32	3104.0	$\nu\text{CH}(98)$	1439.8	2.26	1460.0	$\beta\text{HCH}(42)$	1188.3	11.01	1204.9	$\beta\text{HCC}(30)$
3052.2	2.81	3094.9	$\nu\text{CH}(97)$	1438.6	2.14	1458.7	$\beta\text{HCH}(46)$	1145.5	2.47	1161.5	$\beta\text{HCC}(47)$
3020.5	12.50	3062.8	$\nu\text{CH}(99)$	1437.6	3.81	1457.8	$\beta\text{HCH}(62)$	1139.0	0.22	1155.0	$\beta\text{HCC}(15)$
3013.5	25.38	3055.7	$\nu\text{CH}(93)$	1430.7	0.22	1450.8	$\beta\text{HCH}(71)$	1136.1	0.79	1152.0	
3012.7	2.68	3054.9	$\nu\text{CH}(76)$	1429.2	2.50	1449.2	$\beta\text{HCH}(91)$	1135.1	4.89	1151.0	$\nu\text{CC}(12) + \beta\text{HCC}(28)$
2997.3	23.28	3039.3	$\nu\text{CH}(83)$	1426.4	0.05	1446.3	$\beta\text{HCH}(90)$	1123.3	16.09	1139.1	$\beta\text{HCC}(20)$
2994.5	10.74	3036.4	$\nu\text{CH}(90)$	1423.3	1.19	1443.2	$\beta\text{HCH}(81)$	1111.5	4.94	1127.1	$\nu\text{CC}(21) + \beta\text{HCC}(13)$
2990.1	17.43	3032.0	$\nu\text{CH}(95)$	1421.7	1.24	1441.6	$\nu\text{CC}(32)$	1100.6	1.62	1116.0	$\nu\text{NC}(17) + \tau\text{HCCC}(11)$
2987.1	7.63	3028.9	$\nu\text{CH}(71)$	1396.9	98.81	1416.5	$\nu\text{NC}(29) + \beta\text{HCN}(32)$	1099.3	0.74	1114.6	$\nu\text{CC}(14) + \tau\text{HCCC}(24)$
2971.1	5.25	3012.7	$\nu\text{CH}(70)$	1377.7	1.62	1397.0	$\beta\text{HCC}(11)$	1085.0	16.00	1100.2	$\tau\text{CCCN}(10)$
2970.0	19.92	3011.5	$\nu\text{CH}(90)$	1360.1	0.76	1379.1	$\beta\text{HCH}(83)$	1048.4	0.25	1063.1	$\nu\text{CC}(27)$
2951.6	5.70	2992.9	$\nu\text{CH}(84)$	1357.1	2.28	1376.1	$\nu\text{CC}(32)$	1045.8	1.65	1060.4	$\nu\text{NC}(19)$
2951.5	10.61	2992.8	$\nu\text{CH}(90)$	1350.8	0.79	1369.7	$\beta\text{HCH}(12) + \tau\text{HCNC}(27)$	1037.2	0.20	1051.7	$\nu\text{CC}(86)$
2951.2	15.27	2992.5	$\nu\text{CH}(96)$	1344.7	5.40	1363.6	$\tau\text{HCNC}(36)$	1016.6	3.39	1030.9	$\nu\text{CC}(22) + \beta\text{HCC}(24)$
2947.7	10.72	2989.0	$\nu\text{CH}(88)$	1343.4	0.31	1362.2	$\tau\text{HCCC}(50)$	1006.9	7.15	1021.0	$\nu\text{NC}(11) + \nu\text{CC}(21) +$ $\tau\text{HCCC}(11)$
2947.6	0.58	2988.9	$\nu\text{CH}(91)$	1331.3	37.90	1349.9	$\nu\text{NC}(26)$	1006.2	0.63	1020.3	$\nu\text{CC}(80)$
2939.8	10.99	2980.9	$\nu\text{CH}(86)$	1329.0	1.02	1347.6	$\beta\text{HCC}(14) + \tau\text{HCCN}(30)$	1003.2	1.15	1017.3	$\nu\text{CC}(14) + \beta\text{CCCN}(29)$
2934.1	7.78	2975.2	$\nu\text{CH}(84)$	1328.2	0.41	1346.8	$\tau\text{HCCC}(29) + \tau\text{HCNC}(10)$	987.1	0.90	1001.0	$\nu\text{CC}(64)$
2925.8	3.87	2966.8	$\nu\text{CH}(89)$	1321.9	3.58	1340.4	$\beta\text{HCC}(39)$	984.6	10.72	998.3	$\beta\text{CCN}(16)$
2906.6	22.11	2947.3	$\nu\text{CH}(96)$	1319.5	17.00	1337.9	$\beta\text{HCC}(12)$	956.2	0.02	969.6	$\beta\text{HCC}(33) + \tau\text{HCCC}(11)$
2895.0	16.44	2935.6	$\nu\text{CH}(96)$	1305.1	0.07	1323.4	$\tau\text{HCNC}(21) + \tau\text{HCCC}(27) + \tau$ $\text{HCCN}(14)$	943.7	0.01	956.9	$\tau\text{HCCC}(75)$
1607.0	17.17	1629.5	$\nu\text{CC}(33)$	1300.5	1.09	1318.7	$\tau\text{HCCC}(26)$	935.3	1.49	948.4	$\beta\text{HCC}(14)$
1597.2	100.00	1619.5	$\nu\text{OC}(75)$	1290.4	2.00	1308.5	$\beta\text{HCC}(35)$	925.6	0.36	938.5	$\tau\text{HCCC}(52) + \tau\text{HCCN}(37)$
1581.9	30.23	1604.1	$\nu\text{CC}(55)$	1288.1	0.29	1306.1	$\beta\text{HCC}(44) + \tau\text{HCCC}(20)$	909.1	0.27	921.9	$\tau\text{HCCC}(87)$
1562.8	0.25	1584.7	$\nu\text{CC}(45)$	1280.9	7.93	1298.8	$\beta\text{HCC}(27)$	904.8	0.92	917.5	$\nu\text{NC}(10) + \nu\text{CC}(30)$
1551.4	5.00	1573.1	$\nu\text{CC}(33) +$ $\beta\text{CCCN}(11)$	1260.2	4.57	1277.8	$\beta\text{HCC}(29)$	892.6	5.09	905.1	$\tau\text{HCCC}(61)$

(Continua en la siguiente página)

(Continuación)

NMP-7							
878.3	0.36	890.6	vCC(34)+ tHCCC(23)	237.3	0.05	240.6	tHCCC(70)
873.7	1.20	885.9		197.9	0.56	200.6	tCCCN(13)
866.9	0.20	879.0		178.2	0.12	180.6	tCCCC(19)
836.4	4.05	848.1	vCC(17)+βHCC(11)+ tHCCC(25)	142.0	0.60	144.0	
828.9	0.04	840.5	tHCCC(80)	133.0	0.05	134.9	tCCCN(19)+ tCCCC(37)
822.1	0.92	833.6	vCC(14)	129.4	0.12	131.2	βCCC(27)+tCCCC(11)
808.6	1.40	819.9		116.2	0.07	117.9	βCCC(11)+tCNCC(14)
802.3	8.20	813.5	tHCCC(16)+tHCCN(36)	109.6	0.41	111.2	γCNCC(11)+ γNCCC(20)
793.5	3.50	804.6		92.2	0.01	93.5	tCCCC(68)
787.9	0.37	798.9	vNC(17)+tHCCN(15)	72.0	1.08	73.0	tNCCC(13)+ tCCNC(34)
765.5	2.18	776.2	tCCCC(10)+tCCNC(11)+tCNCC(15)	55.5	0.18	56.3	tCCCC(16)+tCNCC(13)+γCCCN(12)+γCCCC(19)
746.1	6.13	756.6	tCCCC(14)+γONCC(14)	46.3	0.20	46.9	βNCC(11)+βCCC(20)+tNCCC(16)+tCNCC(22)
733.9	0.14	744.2	tHCCC(29)	34.5	0.22	35.0	
729.0	4.97	739.2	tHCCC(27)+γONCC(10)	31.0	0.09	31.5	
723.0	4.39	733.1		21.8	0.20	22.1	tCCNC(36)+tCCCN(16)
711.4	10.87	721.3	γONCC(27)	19.4	0.11	19.7	tNCCC(18)+tCCNC(16)+tCCCN(12)+γCCCN(20)
708.8	2.26	718.7	βHCC(11)+tHCCC(52)				
680.1	1.54	689.6	vNC(18)				
629.9	4.22	638.7	βOCC(11)				
618.0	0.54	626.6	βCCC(27)				
601.3	0.65	609.7	βCCC(11)				
594.9	3.00	603.2	βCCC(10)				
563.9	0.83	571.8	tCNCC(23)				
551.6	3.57	559.3					
519.8	2.43	527.1	βNCC(10)				
477.7	0.77	484.4	βCCC(12)				
460.6	2.59	467.1	vNC(10)+βCCC(12)+βCNC(10)				
448.9	1.43	455.2	βCCC(27)+βCCN(14)				
441.2	0.23	447.4	γCCCC(17)+γCNCC(16)+γNCCC(11)				
432.8	0.18	438.9					
420.0	1.92	425.9	tCCCC(20)+γCCCC(23)				
395.7	0.91	401.2	tHCNC(26)				
372.9	0.62	378.2	βCNC(11)+tCCCN(10)				
343.3	1.34	348.1	βOCC(12)+βCCC(35)				
325.4	2.99	330.0	βCNC(19)+βCCC(10)				
303.0	0.15	307.2					
299.1	0.15	303.3	βCNC(21)				
288.9	0.38	292.9	γNCCC(11)				
273.7	1.00	277.6	βCCC(10)				
251.2	0.15	254.7	γCCCN(18)				
242.0	0.23	245.4	βCCC(10)+βCNC(10)				

Tabla A7 Frecuencias teóricas IR (en cm^{-1}), intensidad (Int, en km mol^{-1}), frecuencia escalada (Freq esc, en cm^{-1}) y PED ($\geq 10\%$) en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ para NMP-181 usando el factor de escala de 1.014 en cloroformo. Se representa el modo vibracional *stretching* (ν), el modo vibracional *bending* en el plano (β) y el modo vibracional torsional (τ).

Freq	Int	F esc	PED ($\geq 10\%$)	Freq	Int	Freq esc	PED ($\geq 10\%$)	Freq	Int	F esc	PED ($\geq 10\%$)
3127.0	0.41	3170.8	$\nu\text{CH}(99)$	1462.1	0.74	1482.6	$\beta\text{HCH}(56)$	1227.5	13.71	1244.6	$\tau\text{HCCC}(26)$
3125.9	1.73	3169.7	$\nu\text{CH}(92)$	1460.8	3.37	1481.3	$\beta\text{HCH}(76)$	1223.3	7.22	1240.4	$\beta\text{HCO}(17) + \beta\text{HCC}(12)$
3119.9	4.91	3163.6	$\nu\text{CH}(93)$	1459.1	18.72	1479.5	$\nu\text{CC}(11) + \beta\text{HCH}(12)$	1216.2	29.05	1233.2	$\beta\text{HCC}(17)$
3112.0	6.25	3155.5	$\nu\text{CH}(99)$	1453.5	2.94	1473.8	$\beta\text{HCH}(71)$	1190.5	80.04	1207.1	$\nu\text{OC}(11) + \nu\text{CC}(12) + \beta\text{CCC}(12)$
3110.2	1.13	3153.7	$\nu\text{CH}(99)$	1453.0	2.05	1473.4	$\beta\text{HCH}(51)$	1188.7	5.29	1205.4	$\beta\text{HCC}(20)$
3100.8	1.52	3144.3	$\nu\text{CH}(99)$	1448.1	4.05	1468.4	$\beta\text{HCH}(15)$	1170.1	3.10	1186.5	$\beta\text{HCO}(35) + \tau\text{HCNC}(11)$
3093.2	0.06	3136.5	$\nu\text{CH}(95)$	1445.0	1.56	1465.3	$\beta\text{HCH}(77) + \tau\text{HCCC}(14)$	1142.3	0.20	1158.3	$\beta\text{HCC}(65)$
3036.8	6.81	3079.3	$\nu\text{CH}(94)$	1444.4	0.73	1464.6	$\beta\text{HCH}(68)$	1136.6	3.31	1152.5	$\tau\text{HCNC}(39)$
3028.6	8.98	3071.0	$\nu\text{CH}(96)$	1440.4	1.89	1460.5	$\beta\text{HCH}(42)$	1132.6	3.90	1148.4	$\beta\text{HCC}(15)$
3024.9	5.18	3067.2	$\nu\text{CH}(84)$	1440.0	1.55	1460.2	$\beta\text{HCH}(49)$	1118.9	27.43	1134.6	$\beta\text{HCC}(41)$
3020.6	9.39	3062.9	$\nu\text{CH}(99)$	1434.8	1.03	1454.9	$\beta\text{HCH}(60)$	1109.1	8.24	1124.6	$\nu\text{CC}(10) + \beta\text{HCC}(25)$
3013.4	12.14	3055.6	$\nu\text{CH}(75)$	1433.2	0.37	1453.3	$\beta\text{HCH}(65)$	1099.1	0.16	1114.5	$\nu\text{CC}(14) + \beta\text{CCC}(10) + \tau\text{HCCC}(24)$
3012.0	8.41	3054.2	$\nu\text{CH}(85)$	1428.7	0.04	1448.7	$\beta\text{HCH}(78)$	1077.4	19.26	1092.5	
2994.2	7.19	3036.1	$\nu\text{CH}(92)$	1425.9	1.44	1445.9	$\beta\text{HCH}(28)$	1073.5	47.18	1088.5	$\nu\text{OC}(24)$
2987.5	4.79	3029.3	$\nu\text{CH}(86)$	1425.7	2.74	1445.6	$\beta\text{HCH}(24)$	1065.7	21.93	1080.6	$\nu\text{CC}(15) + \beta\text{HCN}(12) + \tau\text{HCNC}(10)$
2986.1	6.40	3027.9	$\nu\text{CH}(73)$	1412.7	0.23	1432.5	$\beta\text{HCH}(65)$	1049.7	1.12	1064.4	$\nu\text{CC}(25) + \beta\text{HCN}(11)$
2983.6	8.32	3025.4	$\nu\text{CH}(97)$	1385.1	1.13	1404.5	$\beta\text{HCH}(80)$	1045.3	5.46	1060.0	$\nu\text{NC}(19) + \beta\text{CCC}(10)$
2977.0	4.95	3018.7	$\nu\text{CH}(97)$	1381.8	5.87	1401.1		1039.7	0.42	1054.2	$\nu\text{CC}(84)$
2970.8	4.29	3012.3	$\nu\text{CH}(66)$	1369.7	10.42	1388.9	$\tau\text{HCOC}(26) + \tau\text{HCNC}(24)$	1021.6	2.25	1035.9	$\nu\text{NC}(21) + \tau\text{HCNC}(24)$
2969.9	13.50	3011.4	$\nu\text{CH}(92)$	1362.6	1.70	1381.7	$\nu\text{CC}(24)$	1014.6	3.43	1028.8	$\nu\text{CC}(21) + \beta\text{HCC}(26)$
2950.7	10.96	2992.0	$\nu\text{CH}(81)$	1360.5	0.31	1379.6	$\beta\text{HCH}(87)$	1014.2	8.36	1028.4	$\nu\text{NC}(55) + \tau\text{HCNC}(14)$
2950.7	4.79	2992.0	$\nu\text{CH}(95)$	1350.6	2.73	1369.5	$\beta\text{HCH}(13) + \tau\text{HCNC}(30)$	1006.7	0.45	1020.8	$\nu\text{CC}(83)$
2946.3	0.60	2987.5	$\nu\text{CH}(94)$	1341.8	0.30	1360.6	$\tau\text{HCCC}(55)$	1001.3	1.65	1015.4	$\nu\text{CC}(26) + \beta\text{CCC}(33)$
2939.9	7.52	2981.0	$\nu\text{CH}(87)$	1333.4	34.37	1352.1	$\nu\text{NC}(13) + \beta\text{HCC}(12)$	987.7	0.70	1001.5	$\nu\text{CC}(63)$
2924.7	3.29	2965.6	$\nu\text{CH}(90)$	1317.8	13.39	1336.2	$\nu\text{NC}(10)$	959.5	10.34	972.9	$\nu\text{OC}(51)$
2836.9	49.51	2876.6	$\nu\text{CH}(98)$	1310.5	7.55	1328.8	$\tau\text{HCOC}(24) + \tau\text{HCNC}(29)$	957.0	2.81	970.3	$\nu\text{OC}(12) + \beta\text{HCC}(26)$
2829.1	10.49	2868.7	$\nu\text{CH}(98)$	1298.7	0.99	1316.9	$\tau\text{HCNC}(13) + \tau\text{HCCC}(42)$	946.4	0.01	959.6	$\tau\text{HCCC}(76)$
2826.7	11.66	2866.3	$\nu\text{CH}(94)$	1288.3	3.21	1306.3	$\beta\text{HCC}(30)$	943.3	0.05	956.5	$\tau\text{HCCN}(32) + \tau\text{HCCC}(57)$
1668.8	100.00	1692.1	$\nu\text{OC}(85)$	1287.6	4.63	1305.7	$\beta\text{HCC}(54)$	910.7	0.21	923.4	$\tau\text{HCCC}(81)$
1606.9	14.75	1629.4	$\nu\text{CC}(39)$	1280.7	12.75	1298.6	$\beta\text{HCC}(31)$	892.0	1.81	904.5	$\tau\text{HCCC}(84)$
1582.0	36.67	1604.1	$\nu\text{CC}(39)$	1271.4	1.75	1289.2	$\beta\text{HCO}(16) + \beta\text{HCN}(50)$	880.1	1.04	892.4	$\nu\text{CC}(12)$
1564.7	0.55	1586.6	$\nu\text{CC}(43)$	1258.4	5.10	1276.0	$\beta\text{HCC}(32)$	875.3	0.11	887.6	$\nu\text{CC}(13)$
1553.4	2.33	1575.2	$\nu\text{CC}(19)$	1246.3	4.43	1263.7	$\nu\text{NC}(15) + \tau\text{HCNC}(31)$	864.5	2.08	876.6	
1473.9	10.41	1494.5	$\nu\text{CC}(13)$	1229.4	31.97	1246.6	$\tau\text{HCCC}(13)$	830.0	0.02	841.6	$\tau\text{HCCC}(83)$

(Continua en la siguiente página)

(Continuación)

NMP-181							
Freq	Int	Freq esc	PED ($\geq 10\%$)	Freq	Int	F esc	PED ($\geq 10\%$)
827.7	4.62	839.3	vNC(63)	130.1	0.18	131.9	β CCC(14) + τ CCCC(10)
810.6	2.86	822.0	τ HCCN(50) + τ HCCC(16) + γ OCOC(11)	120.3	0.06	122.0	β CCC(13) + τ CNCC(11)
806.7	1.70	818.0	τ HCCC(11)	115.4	0.17	117.0	τ CNCN(12) + τ OCCC(10) + τ CNCC(10) + γ NCCCC(14)
782.6	0.09	793.5	τ HCOC(41) + τ HCNC(36)	102.5	0.09	104.0	τ CNCC(22) + τ COCC(11)
769.2	2.62	779.9	β OCO(23)	86.0	0.01	87.2	τ CCCC(78)
764.2	2.34	774.9	τ CNCN(17) + γ CNCC(13) + γ CCCC(14)	70.9	0.05	71.8	τ CCCN(11) + τ CCCC(21) + τ CNCC(10) + γ CCCC(17)
750.0	6.27	760.5	τ CCCC(35) + γ OCOC(23)	54.5	0.30	55.3	τ OCCC(44) + τ CCOC(25)
735.3	0.07	745.6	τ HCCC(31)	49.6	0.01	50.3	τ CNCN(15) + τ CCCN(46) + τ CCCC(21)
731.8	1.65	742.0	τ HCCC(32) + γ OCOC(19)	36.4	0.08	36.9	β OCC(19) + β CCC(15) + β CCO(16) + β CO(20)
725.4	2.37	735.6	vCC(12) + β CCC(13)	34.7	0.01	35.2	τ NCCO(20) + γ CCCN(40)
713.6	12.52	723.6	τ HCCC(21) + τ CNCN(11) + γ OCOC(18)	25.6	0.02	26.0	τ CNCC(17) + τ NCCO(32) + τ COCC(15)
711.3	1.41	721.3	β HCC(11) + τ HCCC(51)	13.7	0.07	13.9	τ OCCC(13) + τ CCOC(13) + τ CNCN(31) + τ CCCN(19)
644.4	2.63	653.4	β CCN(15) + β OCO(11) + β CNC(10)	9.6	0.07	9.7	τ OCCC(20) + τ CCOC(18) + γ CCCN(17)
620.5	1.15	629.2	β CCN(10) + β CCC(14)				
599.4	1.42	607.8	β CCN(10) + β CCC(15) + β CNC(10)				
576.2	0.07	584.3	τ CCCN(13) + τ CCCC(27)				
571.5	1.31	579.5	τ CNCC(14)				
557.2	1.83	565.0	τ CNCN(10) + τ CNCC(17)				
513.7	0.33	520.9	β OCC(22) + β NCC(14)				
464.8	1.12	471.3	vNC(11) + vCC(10) + β CCC(14)				
451.9	1.16	458.2	β CCN(18) + β CCC(34)				
436.1	0.02	442.2	τ CCCC(12) + γ CNCC(27) + γ CCCC(18) + γ NCCCC(18)				
434.8	1.87	440.8	β CNC(37) + β CCO(11) + γ CCCN(18)				
421.8	1.12	427.7	β OCC(11) + β CNC(32)				
417.5	1.35	423.3	τ CCCC(21) + γ CNCC(10) + γ CCCC(29)				
369.9	1.86	375.1	β CNC(44)				
356.9	0.12	361.9	β CCC(23) + τ CCCC(11) + γ CCCC(10)				
339.9	0.17	344.7	β CCC(11)				
316.1	0.35	320.5	β CCC(21) + τ CCCN(10)				
304.6	1.71	308.8					
293.2	0.57	297.3	τ CCCC(14)				
273.5	0.96	277.3	β CNC(20) + τ HCNC(11) + γ CCCN(10)				
254.6	0.23	258.2	β NCC(11) + β CNC(14) + τ HCNC(12)				
241.0	0.02	244.4	τ HCCC(82)				
237.1	0.63	240.4					
235.5	0.17	238.8	τ HCNC(61)				
224.5	0.16	227.6	β CO(11)				
198.8	0.13	201.5	τ CCCC(11) + τ COCC(13)				
159.3	0.05	161.5	β NCC(10) + τ CCCC(11)				
144.7	0.27	146.7	τ NCCO(14) + τ COCC(39)				
133.9	0.07	135.8	β CCC(10) + τ CCCN(12) + τ CCCC(21)				

Tabla A8 Frecuencias teóricas IR (en cm^{-1}), intensidad (Int, en km mol^{-1}), frecuencia escalada (Freq esc, en cm^{-1}) y PED ($\geq 10\%$) en el nivel de teoría BP86/cc-pVTZ para anandamida usando el factor de escala de 1.014 en cloroformo. Se representa el modo vibracional *stretching* (ν), el modo vibracional *bending* en el plano (β) y el modo vibracional torsional (τ).

Freq	Int	F esc	PED ($\geq 10\%$)	Freq	Int	F esc	PED ($\geq 10\%$)	Freq	Int	F esc	PED ($\geq 10\%$)
3535.8	5.20	3585.3	$\nu\text{NH}(100)$	2921.2	1.36	2962.1	$\nu\text{CH}(86)$	1311.4	3.13	1329.7	$\beta\text{HCC}(15)+\tau\text{HCCC}(11)+\tau\text{HCCN}(14)$
3299.1	100.00	3345.2	$\nu\text{OH}(99)$	2920.6	2.67	2961.4	$\nu\text{CH}(85)$	1286.1	0.07	1304.1	$\beta\text{HCC}(60)+\tau\text{HCCC}(13)$
3062.5	4.97	3105.4	$\nu\text{CH}(87)$	2879.4	12.68	2919.7	$\nu\text{CH}(96)$	1282.7	0.03	1300.7	$\beta\text{HCC}(46)+\tau\text{HCCC}(16)$
3061.5	6.93	3104.4	$\nu\text{CH}(86)$	1663.7	0.01	1686.9	$\nu\text{CC}(71)$	1281.9	0.25	1299.9	$\beta\text{HCC}(34)+\tau\text{HCCC}(23)$
3059.1	6.36	3101.9	$\nu\text{CH}(97)$	1658.0	0.63	1681.2	$\nu\text{CC}(60)$	1276.6	0.04	1294.4	$\beta\text{HCC}(11)+\tau\text{HCCC}(29)$
3056.4	6.80	3099.2	$\nu\text{CH}(98)$	1647.2	1.13	1670.2	$\nu\text{CC}(73)$	1264.4	2.88	1282.1	$\beta\text{HCC}(34)+\tau\text{HCCN}(13)$
3039.4	0.69	3082.0	$\nu\text{CH}(97)$	1635.9	0.25	1658.8	$\nu\text{CC}(62)$	1263.3	0.08	1281.0	$\tau\text{HCCC}(39)$
3038.6	1.03	3081.1	$\nu\text{CH}(97)$	1625.1	36.01	1647.9	$\nu\text{OC}(73)$	1259.2	0.32	1276.8	$\beta\text{HCC}(32)$
3034.1	2.13	3076.6	$\nu\text{CH}(97)$	1496.3	34.10	1517.3	$\nu\text{NC}(27)+\beta\text{HNC}(48)$	1257.8	0.80	1275.4	$\beta\text{HCC}(10)$
3029.8	2.70	3072.2	$\nu\text{CH}(97)$	1463.5	18.02	1484.0	$\beta\text{HOC}(81)+\beta\text{HCO}(10)$	1256.2	0.06	1273.8	$\beta\text{HCC}(10)$
3027.9	3.36	3070.3	$\nu\text{CH}(99)$	1457.6	1.41	1478.0	$\beta\text{HCH}(82)$	1254.2	0.92	1271.7	$\beta\text{HCC}(10)$
3017.0	7.27	3059.3	$\nu\text{CH}(99)$	1449.3	2.07	1469.5	$\beta\text{HCH}(85)$	1246.5	0.10	1263.9	$\tau\text{HCCC}(19)$
3011.4	7.40	3053.5	$\nu\text{CH}(82)$	1447.8	0.16	1468.1	$\beta\text{HCH}(60)$	1243.6	0.15	1261.0	$\beta\text{HCC}(26)+\tau\text{HCCC}(12)$
3010.1	10.64	3052.2	$\nu\text{CH}(92)$	1447.7	0.57	1468.0	$\beta\text{HCH}(74)+\tau\text{HCCN}(10)$	1242.8	0.89	1260.2	$\beta\text{HCC}(11)+\tau\text{HCCC}(33)$
2989.7	0.07	3031.5	$\nu\text{CH}(81)$	1443.0	1.09	1463.2	$\beta\text{HCH}(77)+\tau\text{HCCC}(14)$	1241.2	0.02	1258.5	$\beta\text{HCC}(35)$
2989.6	9.54	3031.4	$\nu\text{CH}(84)$	1436.5	0.06	1456.6	$\beta\text{HCH}(60)$	1227.8	4.10	1245.0	$\tau\text{HCCC}(10)$
2984.9	1.79	3026.7	$\nu\text{CH}(76)$	1430.8	0.20	1450.8	$\beta\text{HCH}(61)$	1214.9	1.32	1231.9	$\beta\text{HCO}(31)+\tau\text{HCCN}(39)$
2984.0	2.66	3025.8	$\nu\text{CH}(71)$	1427.7	0.88	1447.7	$\beta\text{HCH}(48)$	1212.4	0.42	1229.3	$\tau\text{HCCC}(45)$
2982.3	3.73	3024.0	$\nu\text{CH}(73)$	1425.2	0.14	1445.2	$\beta\text{HCH}(79)$	1202.1	0.58	1218.9	$\beta\text{HCC}(30)$
2977.8	2.03	3019.5	$\nu\text{CH}(81)$	1421.3	0.76	1441.2	$\beta\text{HCH}(77)$	1198.9	4.70	1215.7	$\nu\text{NC}(10)+\tau\text{HCCN}(12)$
2973.7	6.90	3015.4	$\nu\text{CH}(89)$	1414.6	1.59	1434.4	$\beta\text{HCH}(63)$	1190.1	0.02	1206.7	$\beta\text{HCC}(13)$
2971.4	13.22	3012.9	$\nu\text{CH}(95)$	1413.6	1.13	1433.4	$\beta\text{HCH}(82)$	1180.2	0.03	1196.7	
2961.4	6.89	3002.9	$\nu\text{CH}(87)$	1411.8	3.08	1431.6	$\beta\text{HCH}(70)+\tau\text{HCNC}(10)$	1160.8	0.18	1177.1	$\beta\text{HCC}(19)$
2960.9	0.70	3002.4	$\nu\text{CH}(98)$	1405.8	0.32	1425.4	$\beta\text{HCH}(83)$	1128.1	0.85	1143.9	$\beta\text{HCC}(30)$
2954.6	3.50	2996.0	$\nu\text{CH}(100)$	1385.4	0.04	1404.8	$\beta\text{HCC}(38)$	1110.8	0.14	1126.4	$\beta\text{HCC}(15)$
2950.9	0.91	2992.2	$\nu\text{CH}(100)$	1384.3	2.06	1403.6	$\beta\text{HCC}(69)$	1092.3	0.40	1107.6	$\nu\text{CC}(14)+\tau\text{HCCC}(13)$
2950.3	5.78	2991.6	$\nu\text{CH}(96)$	1377.4	0.13	1396.6	$\beta\text{HCC}(60)$	1087.9	1.94	1103.1	$\nu\text{NC}(10)$
2949.1	0.39	2990.4	$\nu\text{CH}(99)$	1371.7	10.50	1390.9	$\beta\text{HCC}(74)$	1067.4	2.91	1082.3	$\nu\text{OC}(26)$
2948.8	2.67	2990.1	$\nu\text{CH}(77)$	1356.6	0.19	1375.6	$\beta\text{HCH}(91)$	1061.0	5.84	1075.9	$\nu\text{OC}(18)$
2948.6	7.29	2989.9	$\nu\text{CH}(94)$	1341.9	1.97	1360.6	$\beta\text{HCC}(21)+\beta\text{HCO}(10)+\beta\text{HCH}(15)+\tau\text{HCCN}(31)$	1054.8	2.75	1069.6	$\nu\text{CC}(26)+\beta\text{CCN}(10)+\tau\text{HCCN}(14)+\tau\text{OCCN}(16)$
2941.9	2.85	2983.1	$\nu\text{CH}(92)$	1339.2	0.24	1358.0	$\tau\text{HCCC}(66)$	1047.2	1.16	1061.9	$\nu\text{NC}(17)+\nu\text{CC}(11)$
2937.8	15.27	2978.9	$\nu\text{CH}(94)$	1332.2	3.33	1350.8	$\beta\text{HCH}(10)+\tau\text{HCCC}(24)+\tau\text{HCCN}(36)$	1039.9	0.19	1054.5	$\nu\text{CC}(80)$
2932.6	0.37	2973.7	$\nu\text{CH}(94)$	1324.8	4.01	1343.3	$\beta\text{HCH}(15)+\tau\text{HCNC}(63)$	1037.3	0.12	1051.8	
2921.8	3.75	2962.7	$\nu\text{CH}(90)$	1320.7	0.08	1339.2	$\tau\text{HCCC}(53)$	1024.0	2.64	1038.3	$\nu\text{CC}(28)$

(Continúa en la siguiente página)

(Continuación)

Anandamida							
Freq	Int	F esc	PED ($\geq 10\%$)	Freq	Int	F esc	PED ($\geq 10\%$)
1021.6	0.36	1035.9	vCC(34)	474.2	6.18	480.8	τ HNCC(45)
1014.1	0.97	1028.3	vCC(68)	444.4	2.11	450.6	τ CCCC(10)
1011.2	0.39	1025.4	vCC(52)	413.6	1.16	419.4	β NCC(23)
994.0	1.05	1007.9	vCC(32)	390.6	0.30	396.1	β CCC(14)
981.8	0.47	995.6	vCC(65)	362.6	0.00	367.7	β CCC(34)
977.3	0.10	991.0	τ HCCC(67)+ τ CCCC(19)	357.7	0.02	362.7	β OCC(20)+ β CCN(13)
976.1	0.08	989.7	τ HCCC(71)	339.3	0.06	344.1	β CCC(22)
975.8	0.05	989.5	τ HCCC(56)+ τ CCCC(27)	321.5	0.55	326.0	β CCC(11)
974.8	0.04	988.5	τ HCCC(51)	302.3	0.18	306.6	β CCC(10)
957.6	1.19	971.0		281.2	0.41	285.1	β CCC(10)
946.4	2.60	959.6	vCC(10)	261.6	0.15	265.3	
939.5	3.62	952.6	vCC(13)	242.3	1.19	245.7	β CNC(28)
938.7	1.23	951.9	vOC(16)	236.6	0.00	239.9	τ HCCC(90)
933.6	5.52	946.6	vCC(22)	221.8	0.47	224.9	β CNC(11)
916.1	1.53	928.9	vCC(10)	205.1	0.30	207.9	β CCC(21)+ τ OCCN(10)
908.2	0.50	921.0	vCC(31)	186.7	0.46	189.3	τ OCCN(18)
892.5	0.10	905.0		177.7	0.69	180.2	β CCC(10)
882.8	0.93	895.2	vCC(34)	140.6	0.21	142.6	β CCC(10)+ τ CNCC(10)
868.5	0.23	880.6	vCC(42)+ τ HCCC(24)	134.9	0.04	136.8	τ CCCC(52)
855.3	0.19	867.3	τ HCCC(13)	121.4	0.04	123.1	τ CCCC(23)
826.2	0.96	837.8	τ HCCC(11)+ τ HCCN(14)	114.4	0.03	116.0	τ CNCC(20)
817.7	0.12	829.1	τ HCCC(32)	102.2	0.08	103.6	τ CCCC(23)
786.8	0.82	797.8	vNC(15)+vCC(29)	91.6	0.03	92.9	τ CCCC(42)
748.4	0.69	758.9	τ HCCC(46)	82.2	0.01	83.4	β CCC(22)+ τ CCCC(11)
737.1	2.73	747.4	τ HCCC(22)	72.6	0.08	73.6	τ CNC(19)
733.3	3.92	743.6	γ OCNC(13)	62.8	0.15	63.7	τ CCCC(28)
728.9	5.67	739.1		56.4	0.09	57.2	τ CCCC(25)
717.0	7.54	727.1	τ HCCC(31)	52.5	0.12	53.3	τ CCCC(46)
711.2	3.08	721.1	τ HCCC(51)	46.6	0.05	47.3	τ CCCC(60)
708.4	1.11	718.3	β HCC(23)+ τ HCCC(54)	38.6	0.26	39.2	τ CNCC(45)+ τ CCCC(13)
704.7	2.63	714.6	β OCCN(11)+ γ OCNC(10)	31.2	0.00	31.7	τ CCCC(28)
676.2	11.51	685.7	τ HOCC(84)	26.6	0.09	27.0	τ CCCC(53)
633.0	0.57	641.9	vCC(12)+ β OCCN(18)+ γ OCNC(30)	22.8	0.26	23.1	τ NCCC(28)+ τ CCCC(10)+ τ CNCC(12)
561.6	0.08	569.5	β CCC(31)	13.4	0.98	13.6	τ NCCC(28)+ τ CCCC(44)
556.7	0.60	564.5		10.9	0.08	11.0	τ CCCC(34)
547.2	10.17	554.8		6.8	0.01	6.9	τ CCCC(80)
542.4	0.02	550.0	β CCC(53)	4.2	0.01	4.2	τ CCCC(55)
523.6	0.01	530.9					
504.3	0.48	511.4					
489.0	2.91	495.9	τ HNCC(20)				
485.7	1.51	492.5	β OCC(20)+ β CCN(12)+ τ HNCC(16)				