



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MÉXICO**



**FACULTAD DE QUÍMICA**

---

---

***CÁLCULO DEL POTENCIAL DE OXIDO-REDUCCIÓN INVOLUCRADO  
EN LA FORMACIÓN DE ENLACES DISULFURO QUE ACTÚAN COMO  
SWITCH REDOX POR EL MÉTODO G3(MP2)***

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

***QUÍMICO***

PRESENTA:

***PAUL JESSUS***

DIRECTOR DE TESIS:

***DRA. NELLY***

Toluca, Estado de México.

2021







<b>1</b>	<b>Índice General.</b>	
<b>2</b>	<b>Índice de Tablas</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Índice de Figuras</b>	<b>8</b>
<b>4</b>	<b>Introducción.</b>	<b>10</b>
<b>5</b>	<b>Antecedentes.</b>	<b>11</b>
5.1	Aminoácidos	11
5.2	Diagrama de Ramachandran.	17
5.3	Enlace Disulfuro.	19
5.4	Swith redox.	22
5.5	Disulfuros prohibidos.	24
5.6	Teoría G3.	30
5.6.1	Teoría G3(MP2).	32
5.7	Termoquímica.	34
5.7.1	Potencial Redox.	34
5.7.2	Ciclos termodinámicos.	36
5.7.2.1	Método 1	36
5.7.2.2	Método 2	37
5.7.3	Entalpías de formación de iones.	38
5.7.3.1	Convención de electrones ( <i>CE</i> , convention of the electron)	38
5.7.4	Energía libre de solvatación.	39
5.7.5	Atomización total.	41
<b>6</b>	<b>Planteamiento del problema.</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Objetivos</b>	<b>44</b>
7.1	Objetivo General	44
7.2	Objetivos Específicos.	44
<b>8</b>	<b>Metodología.</b>	<b>45</b>

<b>9</b>	<b>Soporte.</b>	<b>46</b>
<b>10</b>	<b>Calibración.</b>	<b>47</b>
<b>11</b>	<b>Análisis y Discusión de Resultados.</b>	<b>52</b>
<b>11.1</b>	<b>Diagrama de Ramachandran</b>	<b>52</b>
<b>11.2</b>	<b>Cálculos.</b>	<b>59</b>
11.2.1	1DL0.	60
11.2.2	6ESX.	63
11.2.3	2ND0.	64
<b>11.3</b>	<b>Ciclo termodinámico y Potencial Redox.</b>	<b>69</b>
<b>12</b>	<b>Conclusión.</b>	<b>72</b>
<b>13</b>	<b>Anexos</b>	<b>73</b>
<b>13.1</b>	<b>Estructura J-atracotoxin (J-ACTX) (Id-pdb: 1DL0).</b>	<b>73</b>
<b>13.2</b>	<b>Estructura Tiorredoxina (Trx1) (Id-pdb: 6ESX)</b>	<b>74</b>
<b>13.3</b>	<b>Estructura enzima EcDsbA (Id-pdb: 2ND0)</b>	<b>75</b>
<b>14</b>	<b>Referencias.</b>	<b>76</b>

## 2 Índice de/ Tablas

Tabla 1. Tipos y ejemplos de interruptores de Azufre. _____	24
Tabla 2. Tipos y Clasificación de disulfuros Prohibidos. _____	28
Tabla 3. Ejemplos de disulfuros Prohibidos. _____	29
Tabla 4. Entalpia de formación de elementos (kcal/mol). Corrección de la entalpia para los elementos. Entropía de los átomos. _____	42
Tabla 5. Cálculos requeridos por la metodología G3(MP2), $E_0[G3(MP2)] = QCISD(T)/6-31G(d) + \Delta E_{MP2} + E(HLC) + E(ZPE)$ . Molécula metanol ( $CH_3OH$ ). _	47
Tabla 6. Para la corrección de alto nivel $E[HLC]$ , se utilizó la ecuación: $-A n_\beta - B(n_\alpha - n_\beta)$ . $E_0[G3(MP2)]$ el cálculo del método G3(MP2), la energía electrónica más la corrección de punto-cero y las correcciones térmicas de la energía. _____	47
Tabla 7. Datos reportados y resultado calculado. Metanol. _____	49
Tabla 8. Resultados método G3(MP2). Ácido acético, Glicina y Cisteína <sup>-1</sup> . _____	51
Tabla 9. Ángulos ( $\Phi$ , $\Psi$ ) 1DL0 entre residuos Ala12, Cys13, Cys14 y Pro 15. _	54
Tabla 10. Ángulos ( $\Phi$ , $\Psi$ ) 6ESX residuos Cys31, Gly32, Pro 33 y Cys 34. ____	55
Tabla 11. Ángulos ( $\Phi$ , $\Psi$ ) 2ND0 residuos Cys30, Pro 31, His32 y Cys 33. ____	57
Tabla 12. Cálculos requeridos por la metodología G3(MP2), Estructura Oxidada. Estructura Reducida. (1DL0). _____	60
Tabla 13. Longitudes atómicas. Estructura reducida 1DL0. _____	61
Tabla 14. Cálculos requeridos por la metodología G3(MP2). Estructura oxidada. Estructura reducida. (6ESX). _____	63
Tabla 15. Longitudes atómicas. Estructura reducida 6ESX. _____	64
Tabla 16. Cálculos requeridos por la metodología G3(MP2). Estructura Oxidada. Estructura Reducida. (2ND0) _____	65
Tabla 17. Longitudes atómicas. Estructura Reducida 2DN0 _____	65
Tabla 18. Resultados G3(MP2) para las moléculas 1DL0, 6ESX y 2ND0 en estado oxidado y reducido. b) El valor de los modelos de solvatación $G^\circ(aq)$ obtenida con COSMO. _____	68
Tabla 19. Potenciales redox (mV) para las estructuras 1DL0, 6ESXy 2ND0. ____	70

### 3 Índice de Figuras

Figura 1. 20 aminoácidos más comunes.	12
Figura 2. Enlace peptídico, ángulo de rotación libre ( $\psi$ , $\phi$ ) (Murray et al., 2013)	12
Figura 3. Enlace peptídico (C-N), carácter de doble enlace parcial.	13
Figura 4. Orientación de átomos sobre eje (hélice- $\alpha$ ). (Murray et al., 2013)	14
Figura 5. Hojas- $\beta$ plegadas antiparalela (arriba) y paralelas. (abajo) (Murray et al., 2013)	15
Figura 6. Fuerzas que originan la estructura terciaria.	16
Figura 7. Diagrama de Ramachandran. ('Ramachandran Plot', 2013)	18
Figura 8. Enlace disulfuro.	20
Figura 9. Reacciones en la que está involucrada la formación de enlace disulfuro.	23
Figura 10. Ciclo termodinámico método 1.	36
Figura 11. Ciclo termodinámico método 2.	37
Figura 12. Ciclo energía libre de Solvatación.	39
Figura 13. Ciclo termodinámico para la entalpía de formación del metanol mediante atomización total. ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )	48
Figura 14. Diagrama de Ramachandran (1DL0). Puntos rojos Ala12, Cys13, Cys14 y Pro15. (ACCP).	53
Figura 15. Planos cadena peptídica (1DL0). Residuos Ala12 (A12), Cys13 (C13), Cys14 (C13) y Pro15 (P15).	54
Figura 16. Diagrama de Ramachandran (6ESX). Puntos rojos Cys31, Gly32, Pro33 y Cys34. (CGPC).	55
Figura 17. Planos cadena peptídica (6ESX). Residuos Cys31 (C31), Gly32 (G32), Pro33 (P33) y Cys34 (C34)	56
Figura 18. Aminoácidos. Sustituyentes (R) para Histidina y Glicina.	56
Figura 19. Diagrama de Ramachandran (2ND0). Puntos rojos Cys30, Pro31, His32 y Cys33. (CPHC).	57
Figura 20. Planos cadena peptídica (2ND0). Residuos Cys30 (C30), Gro31 (P31), His32 (H32) y Cys33 (C33)	58
Figura 21. Reacción de oxido-reducción. Reducida (tiol) - Oxidada (disulfuro).	59



<i>Figura 22. Estructura oxidada 1DL0.</i>	61
<i>Figura 23. Estructura reducida 1DL0.</i>	61
<i>Figura 24. Laplaciano de densidad electrónica (1DL0). Estructura oxidada plano atómico S15, S25 y C24.</i>	62
<i>Figura 25. Laplaciano de densidad electrónica. Estructura reducida plano atómico S15, S25 y H49</i>	62
<i>Figura 26. Intercambio tiol/disulfuro</i>	63
<i>Figura 27. Estructura reducida 6ESX.</i>	64
<i>Figura 28. Estructura oxidada 6ESX.</i>	64
<i>Figura 29. Estructura Oxidada 2ND0</i>	65
<i>Figura 30. Estructura Reducida 2ND0</i>	65
<i>Figura 31. Laplaciano de densidad electrónica. Estructura reducida 2ND0. Plano atómico S5, S43, H56 y H57.</i>	66
<i>Figura 32. Intercambio Tiol/Disulfuro. (Shouldice et al., 2011)</i>	67
<i>Figura 33. Ciclo termodinámico propuesto para los sistemas analizados. Si R=R' pertenece a la misma cadena peptídica.</i>	69

#### 4 Introducción.

Las proteínas desempeñan diversas funciones biológicas dependiendo de su localización celular. Algunas proteínas utilizan la formación de enlaces disulfuro reversible como interruptor, regulando funciones biológicas como la activación y/o inhibición. Los enlaces disulfuro estabilizan la conformación de un péptido, sin embargo, la formación del enlace más común es la oxidación de dos moléculas de cisteína para llegar a la formación de cistina, resultando en un proceso redox.

Los grupos tiol pueden ser sometidos a la transferencia de uno o dos electrones para generar productos oxidados, ya que la reacción de Inter-conversión redox tiol-disulfuro se ve influenciada por el potencial redox, el estudio se verá enfocado al análisis estructural y descripción de los potenciales de reducción asociados a la formación del enlace.

El cálculo de energías termodinámicas, como la energía de atomización molecular, o la entalpía de formación (en la aplicación de ciclos termodinámicos para el cálculo de potenciales redox) con una precisión química, lo que significa una precisión de 1 kcal/mol. Los funcionales actualmente disponibles en la teoría del funcional de la densidad (DFT) no cuentan con la precisión adecuada. Métodos de alto nivel como cúmulos acoplado simples-dobles y excitaciones triples (CCSD(T)), la interacción de configuración cuadrática con excitaciones simples-dobles y una contribución de excitaciones triples (QCISD(T)) y la interacción de configuraciones con excitaciones simples-dobles-triple-cuádruples (CISDTQ) con bases adecuada, pueden hacerlo, pero son mucho más costosos, excepto para moléculas pequeñas. Por lo que el método Gaussian-3 que usa MP2 (teoría de perturbación de Møller-Plesset de segundo orden), para las correcciones de extensión de conjunto de base (G3(MP2)), es una alternativa para el estudio de sistemas de gran tamaño.

## **5 Antecedentes.**

### **5.1 Aminoácidos**

Las proteínas son estructuras que desempeñan distintas funciones físicas y catalíticas, al colocar grupos químicos específicos (aminoácidos) en una disposición tridimensional precisa. Los aminoácidos (AA) son un grupo de moléculas orgánicas que se forman mediante un grupo carboxilo (-COOH), un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) y una cadena lateral (-R). Las proteínas están formadas mediante cadenas de aminoácidos, las cuales se unen mediante enlaces peptídicos. El andamio polipeptídico que contiene estos grupos debe adoptar una conformación tanto eficiente desde el punto de vista funcional como fuerte en el aspecto físico. (Mcmurry, 2008; Murray *et al.*, 2013)

De los más de 300 aminoácidos que existen de manera natural, 20 constituyen las unidades monómero de proteínas predominantes (Figura 1). Algunas proteínas contienen aminoácidos adicionales que surgen por modificación de un aminoácido ya presente en un péptido. Dichas modificaciones extienden la diversidad biológica de las proteínas al alterar su solubilidad, estabilidad e interacción con otras proteínas. (Murray *et al.*, 2013) La clasificación de los aminoácidos se puede llevar a cabo considerando diversos criterios como su esencialidad, su destino metabólico, su cadena lateral (grupo R), el punto isoeléctrico y el índice hidropático.

Dado que la glicina es el aminoácido de menor tamaño, puede adaptarse en lugares inaccesibles a diferencia de otros aminoácidos, a menudo se encuentra donde los péptidos muestran una flexión aguda. Los grupos R cargados de aminoácidos básicos y ácidos estabilizan conformaciones proteínicas específicas por medio de interacciones iónicas o puentes salinos. Estas interacciones también funcionan en sistemas de “relevo de carga” durante catálisis enzimática y transporte de electrones. El grupo alcohol primario de la serina y el grupo tiol (tiol -SH) de la cisteína son excelentes nucleófilos y pueden funcionar como tales durante la catálisis enzimática. (Murray *et al.*, 2013)

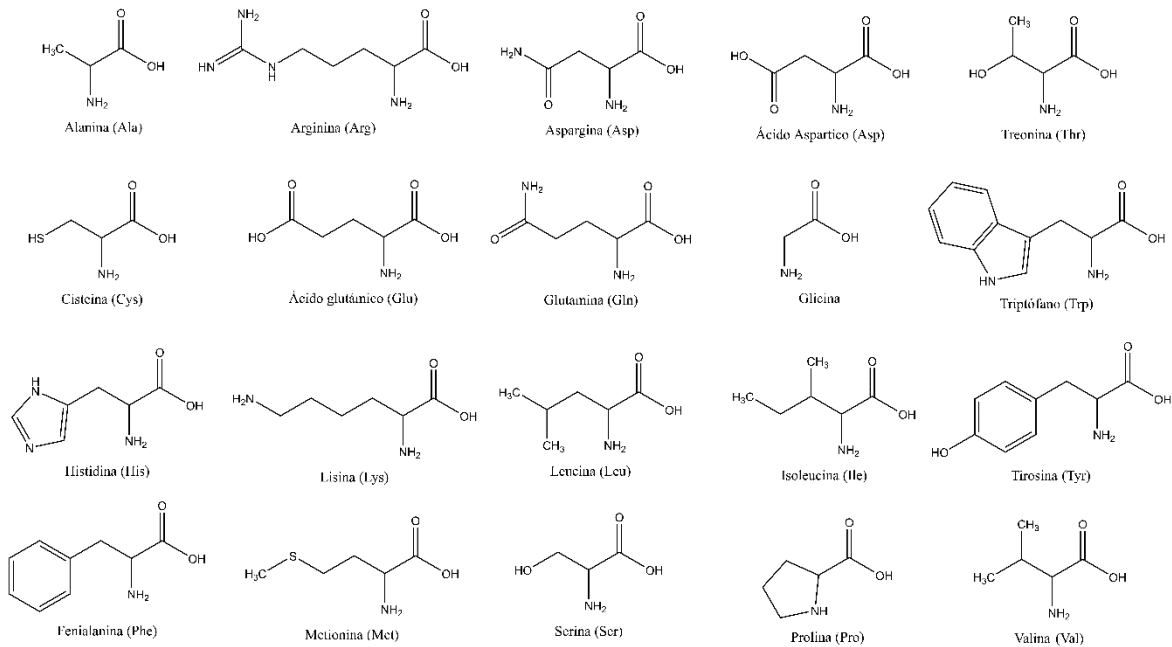


Figura 1. 20 aminoácidos más comunes.

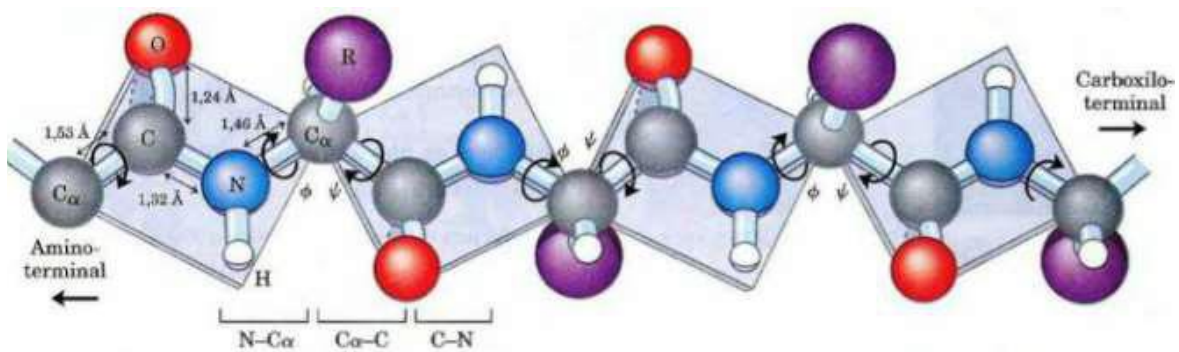


Figura 2. Enlace peptídico, ángulo de rotación libre ( $\psi$ ,  $\phi$ ) (Murray *et al.*, 2013)

Las rotaciones en los enlaces peptídicos solo son posibles alrededor de dos de los tres enlaces covalentes del esqueleto polipeptídico (Figura 2). Ya que las observaciones de cristalografía de proteína muestran que el enlace peptídico es ligeramente más corto que un enlace simple C-N, adquiriendo un carácter parcial de doble enlace. (Figura 3) El carácter de doble enlace en el enlace peptídico requiere que los átomos soportados permanezcan coplanares, donde el plano evita una rotación libre. Los únicos enlaces con capacidad de rotación son entre N-C $\alpha$  recibiendo el nombre ángulo  $\phi$  ( $\phi$ ), mientras que el enlace entre C-C $\alpha$  es nombrado ángulo  $\psi$  ( $\psi$ ). (Murray *et al.*, 2013) Esta semi-rigidez impuesta del enlace peptídico

tiene consecuencias importantes para la manera en la cual los péptidos se pliegan para generar órdenes de estructura superiores. (Nelson and Cox, 2002; McMurry, 2008; Murray *et al.*, 2013)

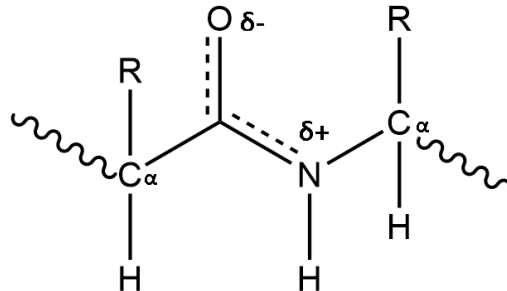


Figura 3. Enlace peptídico (C-N), carácter de doble enlace parcial.

El plegamiento de las proteínas determina algunas de su función dependiendo del tipo del arreglo estructural (Nelson and Cox, 2002; Murray *et al.*, 2013)

Hay cuatro niveles distintos de estructura proteica.

- Estructura primaria: Secuencia que presentan los aminoácidos a lo largo de la cadena en donde se presentan interacciones débiles (4-30 kJ/mol) que estabilizan la estructura las cuales pueden ser enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals (VdW) o puentes disulfuro.
- Estructura secundaria: Plegamiento de segmentos de polipéptidos cortos (3-30 residuos) y contiguos, unidades ordenadas de manera geométrica. Los ángulos que definen los dos tipos más frecuentes de estructura secundaria son la hoja o lamina  $\beta$  y la hélice- $\alpha$ .
  - Hélice- $\alpha$ . Los diagramas esquemáticos representan a las hélices- $\alpha$  como espirales o cilindros. El esqueleto polipeptídico de una hélice- $\alpha$  está torcido una cantidad igual alrededor de cada carbono  $\alpha$  con un ángulo  $\phi$  de aproximadamente  $-57^\circ$  y un ángulo  $\psi$  de alrededor de  $-47^\circ$ . Un giro completo de la hélice contiene un promedio de 3.6 residuos y la distancia ascendente por cada giro de 0.54 nm. (Figura 4) Los grupos R de cada

residuo aminoacilo en una hélice- $\alpha$  se orientan hacia afuera. Las proteínas sólo contienen L-aminoácidos, para los cuales una hélice- $\alpha$  diestra es con mucho la más estable. La estabilidad de una hélice- $\alpha$  proviene sobre todo de los puentes de hidrógeno formados entre el oxígeno del enlace peptídico del grupo carbonilo y el átomo de hidrógeno del grupo amino del enlace peptídico del cuarto residuo en dirección descendente por la cadena de polipéptido. La capacidad para formar el número máximo de enlaces de hidrógeno, complementada por las fuerzas VdW en el centro de esta estructura estrechamente apretada, brinda la fuerza impulsora termodinámica para la formación de una hélice- $\alpha$ . Debido a que el nitrógeno del enlace peptídico de la prolina carece de un átomo de hidrógeno para contribuir a un enlace de hidrógeno, la prolina sólo puede adaptarse de manera estable dentro del primer giro de una hélice- $\alpha$ . Cuando está presente en otro sitio, la prolina altera la conformación de la hélice y produce una flexión. Debido a su pequeñez, la glicina a menudo también induce flexiones en hélices- $\alpha$ .

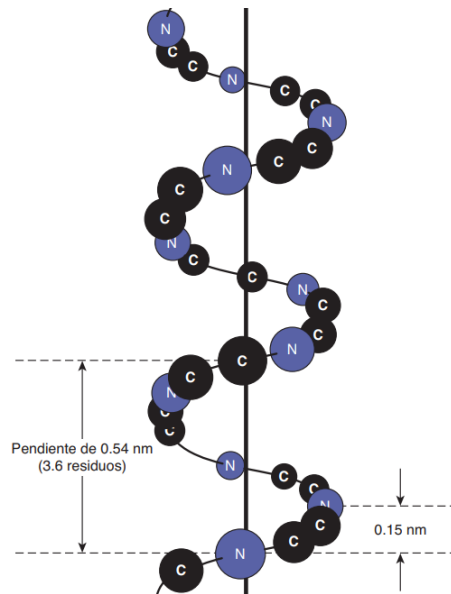


Figura 4. Orientación de átomos sobre eje (hélice- $\alpha$ ). (Murray et al., 2013)

- Hojas- $\beta$ . Los residuos aminoácidos de una hoja- $\beta$  forman un modelo en zigzag o plisado en el cual los grupos R de residuos adyacentes apuntan en direcciones opuestas. A diferencia del esqueleto compacto de la hélice- $\alpha$ , el esqueleto peptídico de la hoja- $\beta$  está muy extendido; sin embargo, al igual que la hélice- $\alpha$ , gran parte de la estabilidad de las hojas- $\beta$  se deriva de los puentes de hidrógeno entre los oxígenos carbonilo y los hidrógenos amida de enlaces peptídicos. En contraste con la hélice- $\alpha$ , estos enlaces se forman con segmentos adyacentes de hoja- $\beta$ . Las hojas- $\beta$  que interactúan pueden disponerse para formar una hoja- $\beta$  paralela, en la cual los segmentos adyacentes de la cadena polipeptídica proceden en la misma dirección amino hacia el carbonilo, o una hoja antiparalela, en la cual proceden en direcciones opuestas. (Figura 5)

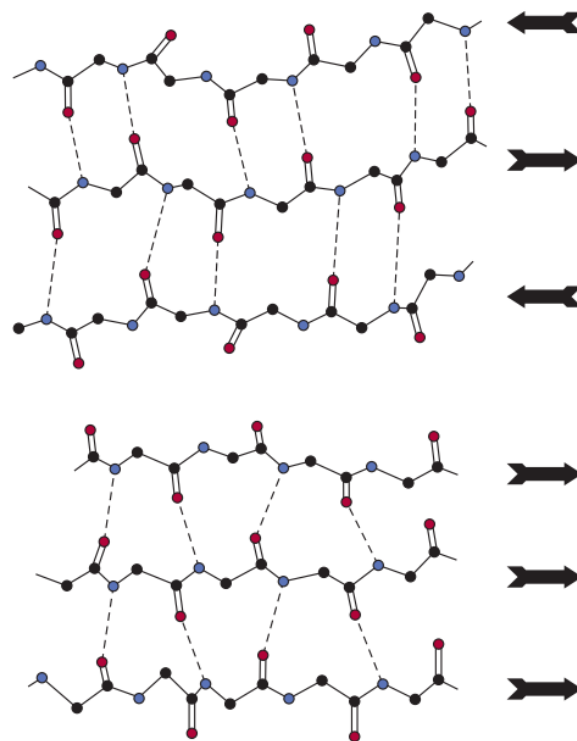
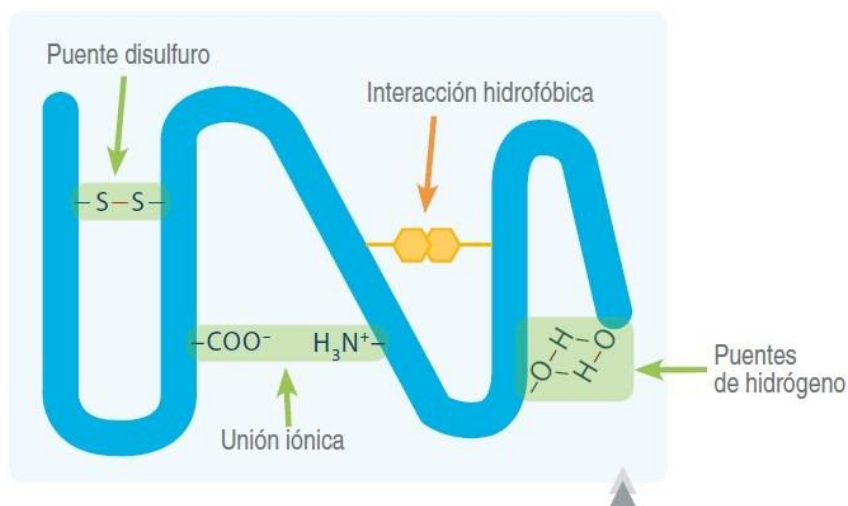


Figura 5. Hojas- $\beta$  plegadas antiparalela (arriba) y paralelas. (abajo) (Murray et al., 2013)

- Estructura terciaria: Montaje de unidades estructurales secundarias hacia unidades funcionales de mayor tamaño como el polipéptido maduro y los dominios que lo componen. Formada por medio de la interacción de estructuras secundarias a través de los sitios polares y apolares que la constituyen ayudando a su estabilización. (Figura 6) Las dos categorías principales de estructura terciaria de proteínas son la fibrosa y la globular:
  - Las proteínas fibrosas son filamentos alargados de cadenas proteínicas que son insolubles en agua y con frecuencia presentan una función estructural de protección.
  - Las proteínas globulares son esféricas y solubles en agua, aunque pueden formar dispersiones coloidales.



*Figura 6. Fuerzas que originan la estructura terciaria.*

- Estructura cuaternaria: Es la unión de dos o más polipéptidos que se pueden asociar con otras macromoléculas para dar origen a estructuras con diversas funciones. Se clasifican de dos maneras de acuerdo al número y tipo de cadena polipeptídica: homo-oligómeros y hetero-oligómeros. La estructura cuaternaria se divide en dominios que son la combinación de estructuras secundarias y motivos que dan origen a una estructura terciaria



## 5.2 Diagrama de Ramachandran.

El diagrama de Ramachandran (Figura 7) es un método que proporciona una manera fácil de visualizar la distribución de los ángulos de torsión ( $\psi$ ,  $\phi$ ) de la estructura de la proteína. También proporciona una visión general de las regiones permitidas y no permitidas de los valores de ángulos de torsión. Los ángulos de torsión se encuentran entre los parámetros estructurales locales más importantes que controlan el plegamiento de las proteínas. El diagrama nos proporciona ayuda en la determinación de la estructura secundaria de una proteína. Las diferentes estructuras secundarias se pueden distinguir por los valores  $\psi$  vs  $\phi$  graficados en el diagrama que se mapean en la región contenida en este. ('Ramachandran Plot', 2013; Murray *et al.*, 2013)

- **Cuadrante I:** Muestra una región donde se permiten algunas conformaciones. Aquí es donde yacen las raras hélices- $\alpha$  zurdas. Entre 0 a 180 para  $\psi$  y 0 a 180 para  $\phi$ .
- **Cuadrante II:** Muestra la región más grande del gráfico. Es la región de las conformaciones más favorable. Conformaciones estéricamente permitidas para las hojas- $\beta$ . Entre 0 a 180 para  $\psi$  y -180 a 0 para  $\phi$ .
- **Cuadrante III:** Es la siguiente región más grande. Es donde se muestran las hélices- $\alpha$  diestras. Entre -180 a 0 para  $\psi$  y -180 a 0 para  $\phi$ .
- **Cuadrante IV:** Casi no tiene regiones delineadas. La región esta desfavorecida debido al impedimento estérico. Entre -180 a 0 para  $\psi$  y 0 a 180 para  $\phi$ .

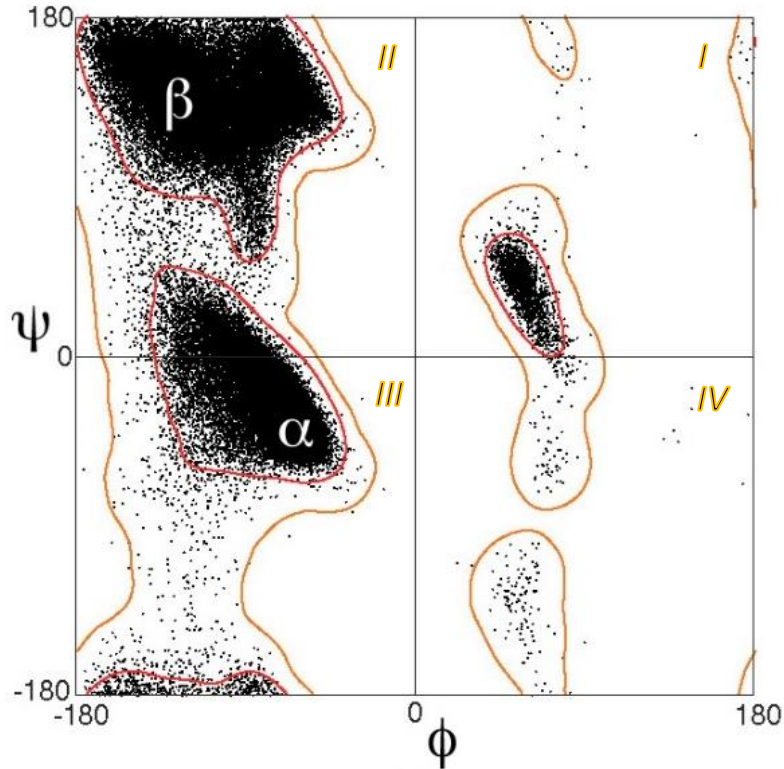


Figura 7. Diagrama de Ramachandran. ('Ramachandran Plot', 2013)

Las enzimas son polímeros biológicos que catalizan las reacciones químicas que hacen posible la vida tal como la conocemos. La presencia y el mantenimiento de un conjunto completo y equilibrado de enzimas son esenciales para la desintegración de nutrientes a fin de que proporcionen energía y bloques de construcción químicos. Casi todas las enzimas son proteínas. Las excepciones notables comprenden RNA ribosomales. Además de servir como los catalizadores para todos los procesos metabólicos, su impresionante actividad catalítica, especificidad para sustrato y estereo-especificidad permiten a las enzimas desempeñar funciones clave en otros procesos relacionados con la salud y el bienestar de seres humanos. Al igual que todos los catalizadores, las enzimas no se consumen ni se alteran de manera permanente como consecuencia de su participación en una reacción, las enzimas también son catalizadores en extremo selectivos. Al contrario de casi todos los catalizadores usados en química sintética, las enzimas son específicas tanto para el tipo de reacción catalizada como para un sustrato único o un pequeño conjunto de sustratos estrechamente relacionados. Las

enzimas también son catalizadores estereo-específicos y de manera típica catalizan reacciones de sólo un estereoisómero en un compuesto dado. La especificidad extrema de las enzimas confiere a las células vivas la capacidad para conducir de manera simultánea y controlar de modo independiente una amplia gama de procesos químicos. (Murray *et al.*, 2013)

Las enzimas se clasifican de acuerdo al tipo de reacción que catalizan, la *International Union of Biochemists* (IUB) las agrupo en seis clases. (Murray *et al.*, 2013)

- *Oxidoreductasas*: catalizan oxidaciones y reducciones.
- *Transferasas*: catalizan la transferencia de grupos funcionales, como los grupos glucosilo, metilo o fosforilo.
- *Hidrolasas*: catalizan la división hidrolítica de C-C, C-O, C-N y otros enlaces covalentes.
- *Liasas*: catalizan la división de C-C, C-O, C-N y otros enlaces covalentes mediante eliminación de distintos grupos funcionales, dejando dobles enlaces.
- *Isomerasas*: catalizan cambios geométricos o estructurales dentro de una molécula.
- *Ligasas*: catalizan la unión de dos moléculas en reacciones acopladas a la hidrólisis de ATP.

### 5.3 Enlace Disulfuro.

Las células utilizan las reacciones de óxido-reducción (redox) para promover y modular el crecimiento de los organismos. Procesos biológicos tan diferentes como la inflamación y la fotosíntesis requieren inevitablemente la transferencia de electrones o de hidrógenos ( $[H] \equiv H^+ + e^-$ ) para mantener las proporciones adecuadas de las formas [Oxidada]/[Reducida] de una especie química. (Aran *et al.*, 2009)

Las proteínas que contienen aminoácidos con azufre dentro de su estructura tienen diversas propiedades como ayudar a mejorar la calidad del cabello, uñas y piel;

favorecer la depuración de toxinas; y la secreción de bilis por parte del hígado. El azufre que se consume procede de los aminoácidos metionina y cisteína presentes en alimentos como el ajo, la cebolla, la col, la coliflor y el brócoli. La presencia de estos aminoácidos se ha asociado con efectos para la salud, dado que la carencia de azufre en el organismo causa un retraso en el crecimiento, ya que está relacionado con la síntesis de proteínas que participan en esta función. (Wouters, Fan and Haworth, 2010)

Un enlace disulfuro es uno de varios tipos de elementos estructurales que imparten estabilidad conformacional a las proteínas. Una cuestión que se aborda en los estudios de ingeniería de proteínas es el grado en que los disulfuros modificados producen efectos estabilizadores en la estructura. (Katzs and Kossiakoff, 1986)

Algunas proteínas contienen enlaces disulfuro covalentes ( $R_xS-SR_y$ ) donde la cisteína presenta una abundancia del 3% siendo esenciales en algunos procesos biológicos. El grupo tiol participa en diversas reacciones redox, donde el intercambio tiol/disulfuro es la reacción más común. La formación de enlaces disulfuro comprende oxidación de los grupos cisteinilo sulfhidrilo. Los enlaces disulfuro (Figura 8) estabiliza la conformación de un péptido, sin embargo, la formación de enlaces disulfuro se lleva en condiciones oxidantes, una cisteína puede formar un enlace disulfuro con el R-SH de otro residuo. (Murray *et al.*, 2013)

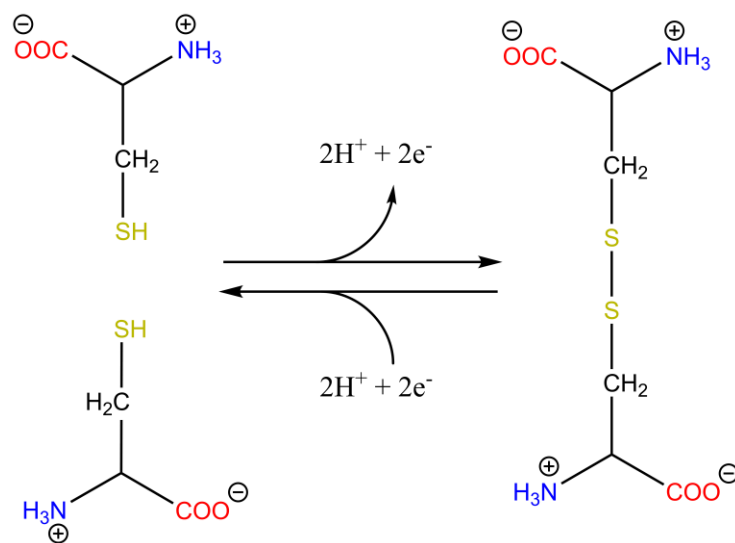


Figura 8. Enlace disulfuro.

El grupo tiol de la cisteína tiene una gran afinidad por iones metálicos que permiten el desarrollo de la vida, así como el hierro, el zinc, el cobre o el níquel. Sin embargo, también forma parte de proteínas defensivas contra metales dañinos como el cadmio, el mercurio y el plomo debido a ese mismo comportamiento. El azufre presenta una configuración electrónica ( $3s^23p^4$ ) lo que le permiten adoptar estados de oxidación entre +6 y -2. Debido a esas características electrónicas, en las proteínas los tioles de las cisteínas constituyen el estado más reducido (-2), (Housecreft and Sharpe, 2006) por lo que en el ambiente intracelular los residuos de cisteína de las proteínas se encuentran involucradas en diversos procesos como lo son los ciclos celulares, las acciones hormonales, la replicación del ADN, las transcripciones, la meiosis, el desarrollo embrionario temprano, reparación y ensamble de proteínas, así como la germinación de semillas, entre otros. (Wells and Wells, 1978; Paulsen and Carroll, 2013)

La formación de puentes disulfuro se da en su mayoría con una distancia menor a 24 residuos, siendo más frecuentes cuando existen de 10 a 14 residuos, aunque se han observado puentes con distancias de 2 residuos, denominados disulfuros locales. Por otro lado, se encuentran los disulfuros no locales los cuales se forman más allá de 45 residuos de distancia. Dicho puente se encuentra cerca del N-terminal del polipéptido en donde la distancia más lejana se aproxima a 129 residuos con lo que las proteínas se pueden estabilizar produciendo que la cisteína sea más reactiva por efecto del dipolo dentro de la cadena proteica (Wouters, Fan and Haworth, 2010)

Las hojas- $\beta$  y las hélices- $\alpha$  impiden en algunos casos la formación de dichos disulfuros de acuerdo a diversos criterios como se muestran a continuación. (Nelson and Cox, 2002; Murray *et al.*, 2013);

- 1) Si dos cisteínas se encuentran en una misma hoja- $\beta$  o hélice- $\alpha$  no pueden formar un puente disulfuro debido a impedimentos estéricos.
- 2) Dos cisteínas de hebras de hojas- $\beta$  no adyacentes no pueden formar puentes S-S si están demasiado alejadas entre sí, incluso si se encuentran cerca la estructura prefiere no estar tensa.

- 3) No se pueden formar disulfuros entre cisteínas adyacentes dentro de una estructura primaria debido a que los carbonos  $\alpha$  se encuentran muy cerca.
- 4) Para que la formación del enlace S-S sea estable, el loop que interviene en la formación debe de tener una energía similar a  $1 \times 10^{-3}$  Kcal/mol.
- 5) No existe la formación de puentes disulfuro si las cisteínas están alejadas más de 150 residuos o entre cisteínas que se encuentran en diferentes dominios.

Los grupos sulfhidrilo pueden tener un mínimo de separación de 4.8 Å mientras que los puentes disulfuro pueden tener una separación de 2.08 Å. Dichas longitudes están en “función” de las fuerzas de VdW y de la energía de torsión en el enlace. Un factor que influye en la estabilidad de las estructuras son las condiciones entrópicas debido a que, en estado oxidado, los grados de libertad son menores que en estado reducido lo que provoca que la molécula presente menor movilidad, originando que se almacene una mayor cantidad de energía. Según resultados obtenidos reportados en el trabajo de Garduño. (Garduño J., 2017)

#### **5.4 Swith redox.**

El azufre dentro del proteoma redox tiene un uso fundamentalmente importante como un interruptor de estructura-función. A nivel molecular, a menudo no existe una separación significativa de estructura y actividad relacionada con los efectos redox sobre el azufre. Sin embargo, a nivel macroscópico la estructura y la actividad se pueden medir de forma independiente. (Go, Chandler and Jones, 2015)

La formación de enlaces disulfuro dentro de las proteínas depende de la localización celular, adquiriendo comportamientos celulares que difieren en sus potenciales redox. Algunas proteínas utilizan la formación de enlaces disulfuro reversible como interruptor redox regulando funciones biológicas como la activación y/o inhibición. Para que el proceso redox se lleve a cabo debe existir un entorno de condiciones básicas, la reacción puede ser catalizada por oxígeno y metales disueltos dentro del ambiente celular, sin embargo, la reacción es reversible si existen algunos componentes adecuados debido al bajo potencial de reducción que presenta el

enlace disulfuro en condiciones neutras. El enlace disulfuro se puede llevar a cabo de manera intermolecular o intramolecular. (Groitl and Jakob, 2014)

Los grupos tiol en las proteínas pueden ser sometidos a la transferencia de uno o dos electrones para generar productos oxidados. Con la oxidación de un electrón, los grupos tiol se convierten en radicales tiolo ( $R-S^*$ ). Estas especies pueden participar en la reacción en cadena de radicales libres formando diversas especies oxidadas. La reacción del tiolato ( $R-SH$ ) con  $H_2O_2$ , hidroperóxidos orgánicos y peroxinitrito son procesos de transferencia de dos electrones, donde forma un primer producto oxidado (ácido sulfenico,  $R-SOH$ ) como intermediario metaestable que fácilmente se transforma en otros productos oxidados, como “enlaces disulfuro” y sulfenamidas (Figura 9). (Liebert, Linke and Jakob, 2003; Wouters, George and Haworth, 2007; Ragsdale and Yi, 2011)

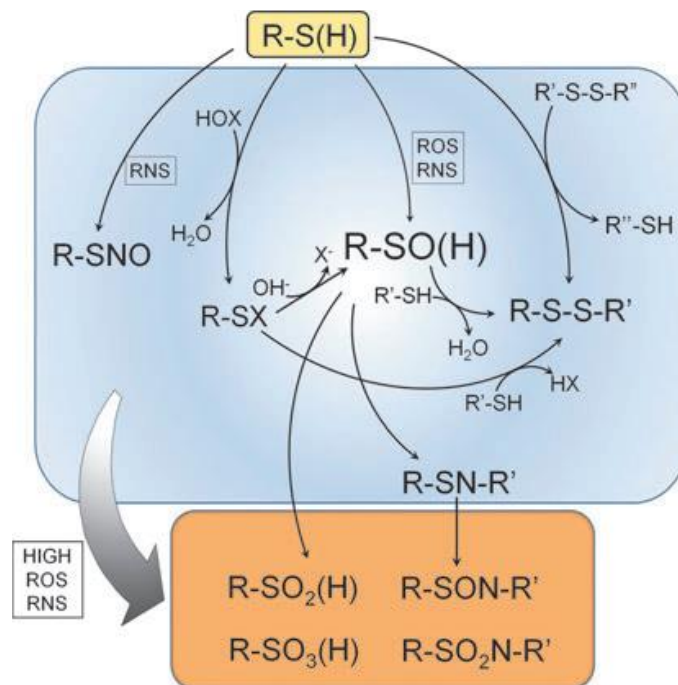


Figura 9. Reacciones en la que está involucrada la formación de enlace disulfuro.

Se pueden encontrar listados (Tabla 1) donde se enumeran los tipos de interruptores redox entre el metabolismo, la estructura biológica y su actividad, mostrando cuatro principales tipos; encendido-apagado proporciona un cambio de actividad cualitativa, como la inactivación de las proteínas tirosinfosfatasas por

oxidación en la señalización de la quinasa. Un interruptor alostérico ajusta la actividad, como ocurre en la regulación de enzimas, como Trx1. (Cheng *et al.*, 2011) Un interruptor de interacción proporciona un cambio en el carácter vinculante. Finalmente, una tiolación diferente en un residuo Cys específico puede cambiar la función de una proteína. Estos interruptores de azufre brindan diversas capacidades para la integración de estructuras y funciones biológicas. Estos mecanismos de cambio de azufre del proteoma redox evolucionaron con el genoma para proporcionar un sistema común para coordinar y optimizar sistemas biológicos complejos. (Go and Jones, 2013)

Switch	Función	Ejemplo
On-Off	Activación o inhibición de un elemento.	PTP
Alostérico	Acelera la actividad de un elemento.	Trx1
Interacción	Regula la unión.	Unión al ADN de NF-κB
Tiolacion	Via o Función de carga.	MIF/GIF

*Tabla 1. Tipos y ejemplos de interruptores de Azufre.*

### **5.5 Disulfuros prohibidos.**

A pesar de los criterios establecidos para la formación de disulfuros, se han encontrado disulfuros que no se rigen por estos criterios, denominados “disulfuros prohibidos”, considerados un grupo metaestable constituido por una parte estructural y un switch redox sensible. Están relacionados estrechamente con el ambiente celular, formando cuatro grupos principales; Adyacentes, No adyacentes, En una sola hoja o hélice y vecinales. (Go and Jones, 2013; Groitl and Jakob, 2014)



Es bien sabido que algunos disulfuros son activos redox y pasan al menos parte de su tiempo como tioles reducidos. Los pares de cisteína que cambian entre estados reducidos y oxidados como parte del ciclo catalítico en enzimas como la tiorredoxina (TRXn) son ejemplos bien conocidos. Algunos de estos interruptores disulfuro ejercen su influencia sobre la función de las proteínas de forma alostérica. Otros inactivan directamente las cisteínas catalíticas en el sitio activo mediante la formación de enlaces disulfuro. La abundancia inusual de disulfuros prohibidos en sistemas biológicos apunta a un rol importante dentro de las estructuras que les

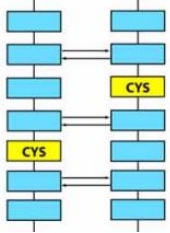
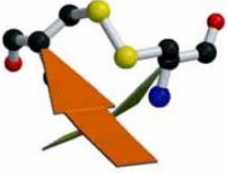
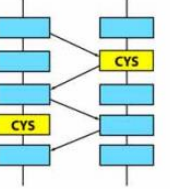
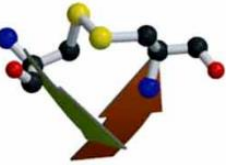
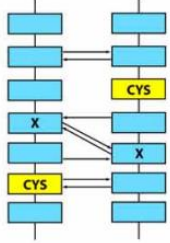



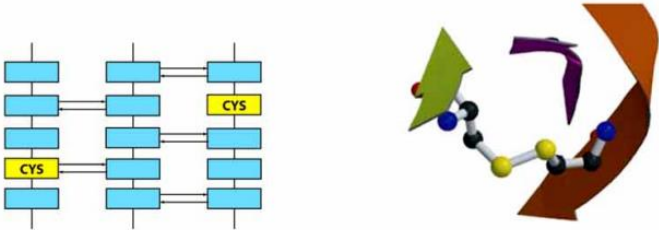
permite existir donde se han encontrado que pueden actuar como switch redox. Los puentes disulfuros prohibidos participan en funciones como la coagulación de la sangre, en el sistema inmunológico y como parte de agentes infecciosos. Además de proteínas que se piensa participan en diversos procesos como en el control de epítomos, funciones de membranas, tiolreductasas, ribonucleotido-reductasa, receptor interleucina, dominio del plasminogeno Kringle IV, receptor transferrinin, entre otros. (Hogg, 2003; Wouters, George and Haworth, 2007; Groitl and Jakob, 2014)

Poco es lo que se sabe sobre los disulfuros prohibidos estructuralmente y funcionalmente. Debido a la elevada energía que tienen, su formación pareciera no ser espontánea lo que ocasiona una suposición acerca de cómo se generan; dentro de las posibles explicaciones acerca de su formación es que se pudieran generar por una oxidación o reducción como parte del ciclo SH/SS parecido a la oxidación de las tioredoxinas. (Cemazar *et al.*, 2002; Wouters, George and Haworth, 2007; Messens, 2013)

En la Tabla 2 se presentan las características y algunos ejemplos de sistemas que contienen disulfuros prohibidos.

Localización	Disulfuros Prohibidos.	Características.
Adyacentes	<p>Disulfuros de hoja-<math>\beta</math> Cruzada Antiparalela (aCSD, Antiparallel Cross-Strand Disulfide)</p> 	<p>Los (aCSDs) se forman entre residuos de cisteínas en hojas-<math>\beta</math> antiparalelas adyacentes, localizados en regiones donde no existen puentes de hidrógeno, con espacios que se alternan con regiones donde se presentan los puentes de hidrógeno a lo largo de la hoja; y perpendicular al eje de la hoja, paralelo a los enlaces de hidrógeno; para formar una hoja-<math>\beta</math> antiparalela regular. Donde el enlace se logra cuando se inclinan las hojas-<math>\beta</math> una hacia la otra.</p> <p>Ejemplo: Neurotoxina Botulínica A o Botox tipo A.</p>
	<p>Paralelos (pCSD)</p> 	<p>Los residuos de cisteína en pCSDs se encuentran en hojas-<math>\beta</math> paralelas adyacentes unidas covalentemente, donde los puentes de hidrógeno son los encargados de la estabilidad.</p> <p>Ejemplo: La fosfatasa 2 inductora de fase M (CDC25B)</p>

Adyacentes	<p>Disulfuros antiparalelos <math>\beta</math>-diagonales (aBDD)</p>  	<p>El disulfuro esta unido a entre la cisteína <math>i</math> de una hoja y la cisteína <math>j_{\pm 2}</math> de otra hoja adyacente de manera antiparalela. Al igual que aCSDs, se encuentran en el sitio donde no existen puentes de hidrógeno.</p> <p>Ejemplo: Veneno de Serpiente.</p>
	<p>Disulfuros paralelos <math>\beta</math>-diagonales (pBDD)</p>  	<p>Similar a aBDD pero entre hebras paralelas. Se caracteriza por tener un alto giro de hebra siendo muy escasos.</p> <p>Ejemplo: Apolipoproteína A (APO A)</p>
	<p>Disulfuros <math>\beta</math>-flip</p>  	<p>El disulfuro está enlazado con la cisteína <math>i</math> de una hoja con la cisteína <math>j_{\pm 3}</math> de otra hoja adyacente. El patrón de enlace de hidrógeno es inusual y se logra mediante la disposición de espalda con espalda de dos protuberancias clásicas en las hojas adyacentes. En cada protuberancia, el residuo X en cada hebra está estabilizado por puentes de hidrógeno a dos residuos adyacentes. Donde ambas hebras adoptan una conformación cóncava para acomodar el disulfuro.</p>

No adyacentes	<p>Hojas diagonales intercaladas (JSD, Jump Strand Diagonal)</p> 	<p>El disulfuro se forma entre hebras no adyacentes con una hebra intermedia. Los JSD generalmente une la cisteína <math>i</math> y cisteína <math>k_{\pm 2}</math>.</p>
Media cisteína en una sola hoja o hélice	<p>Disulfuros inter-helicoidales (IHD)</p> <hr/> <p>Disulfuros a lo largo de una hoja (ASD)</p>	<p>Se encuentran en las familias de las transferrinas que se encargan del transporte del hierro en el flujo sanguíneo; las IHD son parte del ribonucleótido reductasas que se encargan de regular el paso final de la síntesis de ADN donde las actividades catalíticas estas reguladas por el proceso redox que sufren los disulfuros.</p>
Vecinales	<p>La formación de un puente disulfuro vecino se lleva a cabo en una estructura primaria donde se distorsionan los enlaces peptídicos de las cisteínas. Se tienen reportadas pocas estructuras con este tipo de puente, por ejemplo, la toxina de araña (atracotoxina), el metanol deshidrogenasa (MDH) y la subunidad del receptor de acetilcolina (AChR).</p>	

*Tabla 2. Tipos y Clasificación de disulfuros Prohibidos.*

En la siguiente tabla se muestra ejemplos de proteínas con disulfuros prohibidos.

<b>Función</b>	<b>Proteína.</b>	<b>Residuos.</b>
<b>Ciclo Celular</b>	CDC25B	426-473
	GlmU	307-324
	MurD	208-272
	Ribonucleasa reductasa R2	268-272
<b>Proteínas trasportadoras</b>	Retinol binding protein	120-129
	Receptor transferrina	556-558
<b>Entrada celular</b>	Proteína de fusión del virus del dengue	92-116
		185-285
		3-30
		60-121
	Genotoxina Cdt	865-882
	Influenza neuraminidasa	498-513
	Influenza haemaglutina	A47-A274
<b>Coagulación de sangre</b>	Co-aglutinina de víbora	498-513
	Factor de tejido	146-209
<b>Receptor citoquina</b>	Clase I de CBM (receptor eritropoyetina)	28-38
	Clase II de CBM (factor de tejido)	186-209
	Receptor de hormona de crecimiento	308-322
	Interleucina 10-R	35-54
<b>Homólogos de MHC</b>	HLA_DM en humanos	B25-B35
	MICA	C36-C41
	RAE-1 $\beta$	A7-A26
<b>Inmunidad innata</b>	Lectina unida $\alpha$ -fucosa	82-83
	Defensina	5-20

*Tabla 3. Ejemplos de disulfuros Prohibidos.*

## 5.6 Teoría G3.

(Curtiss *et al.*, 1998; 'Ab Initio Molecular Orbital Calculations', 2003)

El método Gaussian-3 (G3) es un método compuesto que usa una serie de cálculos *ab initio* más correcciones empíricas. El objetivo de un método compuesto, como es el caso de G3, es lograr 1 kcal/mol de precisión con un tiempo de cálculo que permita cálculos de moléculas con varios átomos diferentes de hidrógeno. El método G3 está diseñado para dar un resultado cercano al que se obtendría de un cálculo QCISD(T)/G3large (*G3large* es una versión mejorada de la base 6-311+G(3df,2p)) en mucho menos tiempo que el requerido para este tipo de cálculo. En el método G3 consiste en una secuencia de cálculos *ab initio* de orbitales moleculares bien definidos para llegar a una energía total de una determinada especie molecular.

A continuación, se enlistan los pasos cruciales que aplica el método G3.

1. La optimización de la estructura es obtenida con Hartree-Fock (HF) con la función de base 6-31G(d). La función de onda de Hartree-Fock restringida (RHF) es usada para estados de singulete y la función de onda Hartree-Fock sin restringir (UHF) para los otros estados.
2. La optimización de HF/6-31G(d) es usada para calcular las frecuencias armónicas con un factor 0.8929. Estas frecuencias nos dan la Energía de punto-cero E(ZPE).
3. Una nueva optimización de la geometría usando la teoría de perturbaciones de segundo orden [MP2(full)/ 6-31G(d)], utilizando todos los electrones para el cálculo de energías de correlación. La geometría obtenida se usa para todos los siguientes cálculos de *single-point*.
4. Una serie de *single-point* de energía se calcula con niveles de teoría altos. El primer cálculo de nivel de teoría alto es la teoría de perturbaciones completa de Møller–Plesset de cuarto orden con la función de conjunto de base 6-31G(d). Esta energía es modificada por una serie de correcciones.
  - a. Corrección de función difusa  $\Delta E (+)$ .

$$\Delta E (+) = E [\text{MP4} / 6-31+G(d)] - E [\text{MP4} / 6-31G(d)].$$

- b. Corrección para las funciones de polarización en los átomos que no son hidrógenos y las funciones-p en los hidrógenos  $\Delta E (2df, p)$ .

$$\Delta E (2df,p) = E [\text{MP4} / 6-31G(2df,p)] - E [\text{MP4} / 6-31G(d)].$$

- c. Corrección para los efectos de correlación más allá de la teoría de perturbaciones de cuarto orden utilizando el método de interacción de configuración cuadrática  $\Delta E (QCI)$ .

$$\Delta E (QCI) = E [\text{QCISD}(T) / 6-31G(d)] - E [\text{MP4} / 6-31G(d)].$$

- a. Corrección para los efectos del conjunto de base *large* y para la no-aditividad causada por el supuesto de extensiones de conjuntos de base separadas para funciones difusas y funciones *large* de polarización  $\Delta E (G3large)$ .

$$\begin{aligned} \Delta E (G3large) = & E [\text{MP2}(full) / G3large] - E [\text{MP2} / 6-31G(2df,p)] \\ & - E [\text{MP2} / 6-31+G(d)] + E [\text{MP2} / 6-31G(d)]. \end{aligned}$$

5. La energía  $\text{MP4} / 6-31G(d)$  y las cuatro correcciones del paso 4 se combinan de manera aditiva junto con una corrección de spin-orbital,  $\Delta E (SO)$ , solo para especies atómicas.

$$\begin{aligned} \Delta E (combi) = & E [\text{MP4} / 6-31G(d)] + \Delta E (+) + \Delta E (2df,p) + \Delta E (QCI) \\ & + \Delta E (G3large) + \Delta E (QCI) + \Delta E (SO). \end{aligned}$$

La corrección spin-orbital se toma de la parte experimental del método descrito. (Curtiss *et al.*, 1998)

6. Se agrega una corrección de nivel alto (HLC, por sus siglas en inglés Higher Level Correction) para tener en cuenta las deficiencias restantes en los cálculos de energía.

$$E_e(G3) = E(combi) + E(HLC).$$

Donde HLC para moléculas  $-An_\beta - B(n_\alpha - n_\beta)$  y  $-Cn_\beta - D(n_\alpha - n_\beta)$  para átomos (incluyendo iones), donde  $n_\beta$  y  $n_\alpha$  son el número de electrones de valencia  $\beta$  y  $\alpha$ , respectivamente y  $n_\alpha \geq n_\beta$ . Por lo tanto,  $A$  es la corrección para los pares de electrones de valencia en la molécula,  $B$  la corrección para los electrones no apareados en la molécula,  $C$  la corrección de los pares de electrones de valencia en el átomo,  $D$  la corrección para los electrones no apareados en el átomo.  $A$ ,  $B$ ,  $C$  y  $D$  son parámetros empíricos, donde;  $A=6.386$  mh,  $B=2.977$  mh,  $C=6.219$  mh,  $D=1.185$  mh. Los valores  $A$ ,  $B$ ,  $C$  y  $D$  se eligen para proporcionar la desviación absoluta promedio más pequeña.

7. La energía total  $E_0$  a 0 K es obtenida cuando se incluye la energía del punto-cero  $E$  (ZPE).

$$E_0(G3) = E_e(G3) + E(ZPE).$$

Esta energía se denomina como “Energía G3”

Dado que los cálculos MP4 son los pasos más lentos en el método G3, se limita a su aplicación a moléculas más bien pequeñas.

### 5.6.1 Teoría G3(MP2).

(Curtiss *et al.*, 1999)

El método G3(MP2) es una modificación de G3 que reemplaza los cálculos MP4 por cálculos MP2, acelerando los cálculos y permitiendo que se traten moléculas de mayor tamaño. Se basada en una última optimización con nivel de teoría MP2(full)/6-31G(d) más una serie de cálculos de *single-point* llevados a cabo a un nivel de teoría más alto. Los cálculos posteriores incluyen solo electrones de valencia en el tratamiento de la correlación de electrones, es decir, al núcleo congelado (fc). El primer cálculo de nivel superior se encuentra en la interacción de configuración cuadrática con excitaciones simples-dobles y una contribución de excitaciones triples con el conjunto de base 6-31G(d), es decir, QCISD(T)/6-31G(d). Esta energía es luego modificada por una serie de correcciones para obtener una energía total  $E_0$ . (Curtiss *et al.*, 1999)



En el método G3(MP2) la energía del punto cero (E(ZPE)) se obtiene escalando las frecuencias obtenidas de un cálculo de frecuencias con HF/6-31G(d) con el factor 0.893. Todos los cálculos subsecuentes se realizan para la geometría optimizada obtenida de un cálculo MP2(full)/6-31G(d). Los siguientes puntos simples de energía como correcciones de la energía, estos cálculos de energía incluyen el nivel de teoría de interacción de configuración cuadrática con la base 6-31G(d) QCISD(T)/6-31G(d).

$$E_0 [\text{G3 (MP2)}] = \text{QCISD(T) / 6-31(d)} + \Delta E_{\text{MP2}} + \Delta E (\text{SO}) + E (\text{HLC}) + E (\text{ZPE}).$$

La corrección de la teoría de perturbaciones de Møller–Plesset de segundo orden  $\Delta E_{\text{MP2}}$  está dada por

$$\Delta E_{\text{MP2}} = [ E (\text{MP2 / G3MP2large}) ] - [ E (\text{MP2 / 6-31G(d)}) ].$$

La función de base *G3MP2large* es parecida que la función de base *G3large* usada en la teoría G3, excepto por la función de polarización del núcleo. La función de base *G3MP2large* se diferencia de la base 6-311+G(3df,2p) por;

- a) La función de polarización 2df en la primera fila de átomos (Li-Ne) y la función de polarización 3d2f en los átomos Na-Ar.
- b) Una nueva base 6-311G para S, Cl y Ar que esta optimizada para átomos neutros.
- c) La función difusa sobre hidrógenos. Además, el cálculo MP2/G3MP2large en la teoría G3(MP2) se hace con el núcleo congelado (fc).

La corrección  $\Delta E(\text{SO})$ , se incluye solo para especies atómicas.

Una corrección de nivel superior (HLC) es añadida para tener en cuenta las deficiencias restantes en los cálculos de energía, donde HCL se define como:

$$-An_{\beta} - B(n_{\alpha} - n_{\beta}).$$

Para moléculas los terminos  $n_{\alpha}$  y  $n_{\beta}$  son los números de electrones de valencia  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente con  $n_{\alpha} \geq n_{\beta}$ . Los términos A y B están dados por una desviación absoluta promedio más pequeña para un conjunto de pruebas de energía experimentales de G2/97 test, donde para G3(MP2) A=9.279 mh y B=4.471 mh.

## 5.7 Termoquímica.

### 5.7.1 Potencial Redox.

El potencial de redox o potencial de oxidación-reducción es una medida de la viabilidad termodinámica de las reacciones de oxido-reducción. Expresa la actividad de los electrones en una reacción química, donde se dan fenómenos de transferencia de electrones, lo que significa que hay sustancias que actúan como donadores de electrones (agentes reductores) y otras que los aceptan (agentes oxidantes).

En este caso en particular se estudiará la reacción redox entre tiol/disulfuro, donde es preciso conocer los potenciales redox de las especies involucradas usando ciclos termodinámicos, para el cálculo teórico de cantidades termodinámicas, que incluyen energía libre y, por lo tanto, los potenciales de reducción. (Li, Baldus and Gräter, 2015) En primera instancia el cálculo de energía potencial molecular mediante cálculos de estructura electrónica, así como el movimiento nuclear como son las vibraciones. Para el método basado en ciclos termodinámicos en los que las energías libres de Gibbs de reducción se calcularán de las; energías libres de solvatación, así tanto de fase gaseosa de los productos y reactivos. Dichos métodos también se usan ampliamente en las predicciones de  $pK_a$ , así como en estudios de otras reacciones, como la polimerización por radicales libres. (Lin and Kim, 1989; Liptak *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2016)

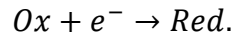
Para la termodinámica electrónica se toma el potencial químico ( $\mu$ ), que equivale a la energía de Gibbs molar (G) para una sustancia pura y la energía de Gibbs molar parcial para un componente en solución

$$1) \quad \mu_A = \mu_A^\circ + RT \ln \left( \frac{\gamma C}{C^\circ} \right) = \mu_A^\circ + RT \ln(a).$$

Donde C es la concentración, a y  $\gamma$  son la actividad y el coeficiente de actividad respectivamente. Los estados estándar habituales en fase gas son; un gas ideal a presión de 1 atm, los estados en solución ideales a una concentración de 1M o 1m. El coeficiente de actividad adimensional se define como,

$$a_i = \gamma_i \frac{c_i}{c_i^\circ}$$

Si aplicamos la ecuación 1) a la siguiente reacción



La energía libre molar de la reacción se define como

$$2) \quad \Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln Q = \Delta G^\circ + RT \ln \left( \frac{a_{Red}}{a_{Ox}} \right).$$

Donde  $Q$  es el cociente de reacción adimensional. La relación entre la energía libre y el trabajo eléctrico máximo que se puede realizar se expresa en términos del potencial del electrodo  $E$  de semicelda que se expresa como

$$3) \quad \Delta G = -nFE.$$

Donde  $F$  es la constante de Faraday (96485 C/mol), y  $n$  es el número de electrones de intercambio en la reacción. Combinando la ecuación 2 en la ecuación de Nernst

$$4) \quad E = E^\circ - \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{a_{Red}}{a_{Ox}} \right).$$

$E^\circ$  es el potencial del electrodo estándar, también llamado potencial de semicelda.

Si  $E=E^\circ$  la actividad de todas las especies es 1. Sin embargo, estas condiciones son difíciles de lograr, y los potenciales estándar son reemplazados por potenciales formales ( $E^\circ$ ). Los potenciales formales en ocasiones se denominan potenciales condicionales para denotar que se aplican en condiciones específicas y no en condiciones estándar.

Por ejemplo, el potencial absoluto del electrodo normal de hidrogeno (NHE, por sus siglas en inglés; Normal Hydrogen Electrode) está basado en concentraciones iguales de protones a 1 mol/L. Esto se puede corregir para obtener el potencial absoluto del electrodo de hidrógeno estándar (SHE) teniendo en cuenta el coeficiente de actividad para una solución de 1 mol/L de  $[H^+]$  en agua.

$$5) \quad E = E^{\circ'} - \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{a_{Red}}{a_{Ox}} \right).$$

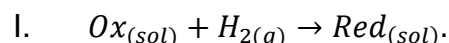
En algunas ocasiones, los potenciales de reducción estándar experimental se obtienen al asumir una forma que modela la dependencia del potencial de la fuerza iónica. Luego se llevan a cabo mediciones formales de potencial a diferentes valores de fuerza iónica, y se extrapolan a la fuerza iónica a cero donde los coeficientes de actividad se aproximan a la unidad.

## 5.7.2 Ciclos termodinámicos.

### 5.7.2.1 Método 1

(Winget, Cramer and Truhlar, 2004; Liu *et al.*, 2015; Ho *et al.*, 2016)

La reacción de un estado oxidado a un estado reducido se puede describir con la siguiente ecuación.



Para obtener  $E^\circ$ , el cambio total de la energía libre de Gibbs  $\Delta G^\circ_{(i)}$  de la reacción I se establece el siguiente ciclo termodinámico.

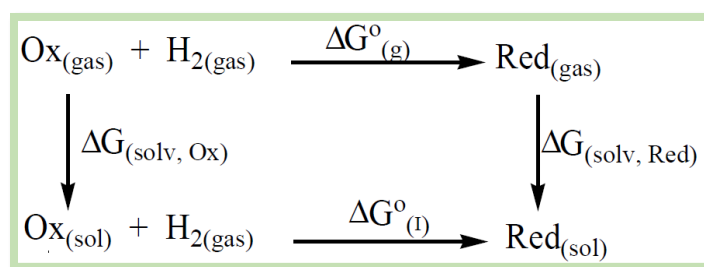


Figura 10. Ciclo termodinámico método 1.

Se puede calcular  $\Delta G^\circ_{(i)}$  mediante la siguiente ecuación.

$$6) \quad \Delta G^\circ_{(i)} = \Delta G^\circ_{(g)} + \Delta G_{(solv)}.$$

En la ecuación 6,  $\Delta G^\circ_{(g)}$  y  $\Delta G^\circ_{(solv)}$  son el cambio de energía de Gibbs en fase gaseosa y el cambio de energía de solvatación en fase acuosa, respectivamente, y se expresan como

$$7) \quad \Delta G^\circ_{(g)} = \Delta G^\circ_{(g,Red)} - \Delta G^\circ_{(g,Ox)} - G^\circ_{(g,H_2)}.$$

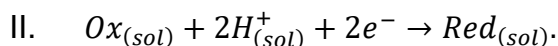
$$8) \quad \Delta G^\circ_{(solv)} = \Delta G^\circ_{(solv,Red)} - \Delta G^\circ_{(solv,Ox)}.$$

Donde  $\Delta G^{\circ}(*, \text{Red})$  y  $\Delta G^{\circ}(*, \text{Oxi})$  son las energías libres de Gibbs del estado reducido y estado oxidado en fase gas y en solvatación.

### 5.7.2.2 Método 2

(Liptak *et al.*, 2002; Eslami, Zare and Namazian, 2012; Liu *et al.*, 2015)

Se puede considerar la reacción de dos electrones y semicelda,



Para la reacción II se establece el siguiente ciclo.

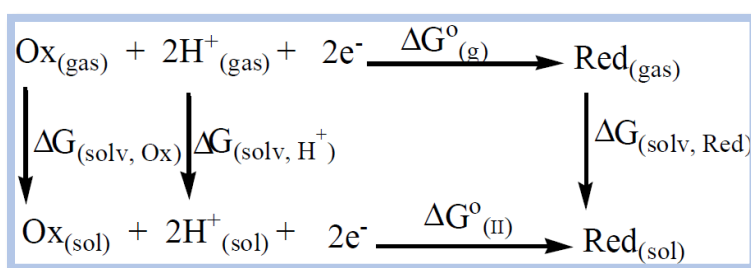


Figura 11. Ciclo termodinámico método 2.

Y para  $\Delta G^{\circ}_{(ii)}$

$$9) \quad \Delta G^{\circ}_{(ii)} = \Delta G^{\circ}_{(g)} + \Delta G_{(\text{solv}, \text{Red})} - \Delta G_{(\text{solv}, \text{Oxi})} - 2\Delta G_{(\text{solv}, \text{H}^+)} - \Delta n\Delta G^{o \rightarrow *}$$

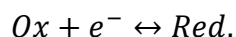
Donde  $\Delta G^{\circ}_{(g)}$  es el cambio de energía libre de Gibbs en la fase gas;  $\Delta G_{(\text{solv}, \text{Red})}$  y  $\Delta G_{(\text{solv}, \text{Oxi})}$  son las energías de solvatación, para la especie reducida y oxidada, respectivamente;  $\Delta G^{o \rightarrow *}$  es la corrección para el cambio en el estado estándar “o” de 1 atm para cálculos de la fase gaseosa a 1 mol/L en solución “\*” el cual es 7.9 kJ/mol (1.9 kcal/mol) para cada componente,  $\Delta n$  es el cambio de moles de  $\text{e}^-$  presentes en el sistema.

Los cálculos de entalpías de formación constituyen una herramienta importante, Ya que  $\Delta H_f^{\circ}$ , se define como el incremento de la entalpía en la reacción cuando se forma un compuesto a partir de sus elementos. Ya que la entalpía de formación de una molécula no puede ser calculada directamente en estado estándar de un elemento no pueden ser determinadas con métodos de mecánica cuántica estándar. Para tal fin se emplean el método de energía de atomización total. Las

entalpías de formación se calculan indirectamente mediante la combinación de datos experimentales y teóricos.

### 5.7.3 Entalpías de formación de iones.

Al calcular las energías de ionización y las energías de unión de electrones a temperaturas distintas de cero o al calcular la energía libre de reacción de procesos como la ecuación,



Es necesario tener en cuenta la energía libre de Gibbs del electrón. Hay dos convenciones termoquímicas relativas a la termodinámica del electrón, la convención de electrones (CE) y la convención iónica (CI). (Ho *et al.*, 2016)

#### 5.7.3.1 Convención de electrones (CE, convention of the electron)

Un punto importante es que la energía libre de Gibbs obtenida de una convención particular debe ser compatible con el cálculo químico cuántico, es decir, deben tener el mismo cero de energía. En química cuántica, es conveniente definir un cero de energía, al menos temporalmente, como correspondiente a todos los núcleos y electrones que están infinitamente separados y en reposo. Con respecto al cero de energía para el electrón libre, en las dos convenciones difieren principalmente en su definición de la entalpía de formación del electrón. CE trata al electrón como un elemento químico estándar con una entalpía de formación definida como cero a todas las temperaturas. Dado que la termodinámica estándar es un sistema no racionalizado, el efecto de restringir la entalpía de formación del gas de electrones a cero en todas las temperaturas es que la capacidad calorífica integrada del electrón debe acomodarse en otra parte de la ecuación, es decir, en el valor derivado de la entalpía de formación del ion. Un tratamiento correcto de la capacidad calorífica de un gas de electrones utiliza la estadística de Fermi-Dirac, en lugar de Boltzmann  $5/2 RT$  (6.197 kJ / mol a 298 K). Ya que, usando la estadística de Boltzmann y el modelo de gas ideal, la energía de Gibbs del electrón es 0 kJ /mol a 298 K. Sin embargo, dado que los electrones son fermiones, la estadística de Fermi-Dirac es más apropiadas y esto produce una energía de Gibbs de -3.6 kJ/mol a 298 K. (Bartmess, 1994; Ho *et al.*, 2016; Lias and E., 2021)

### 5.7.4 Energía libre de solvatación.

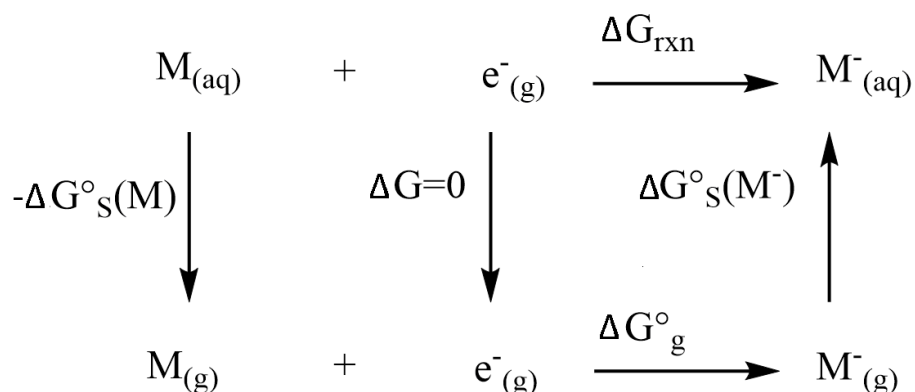


Figura 12. Ciclo energía libre de Solvatación.

Los cálculos *ab initio* precisos de los efectos del disolvente requieren el uso de formas moleculares más realistas que las formas esféricas o elipsoidales. Los modelos de solvatación continua se han diseñado para realizar predicciones precisas de las energías libres de solvatación. Las energías libres de solvatación se pueden combinar con las energías de Gibbs en fase gaseosa en las siguientes ecuaciones para obtener la energía libre de reacción de Gibbs en solución.

$$\begin{aligned}
 \Delta G^{\circ}_{\text{g}} &= G^{\circ}(\text{M}^{-}) - G^{\circ}(\text{M}) \\
 &= [U_e(\text{M}^{-}) + ZPE(\text{M}^{-}) + \Delta G_{\text{therm}}(\text{M}^{-})] - [U_e(\text{M}) + ZPE(\text{M}) + \Delta G_{\text{therm}}(\text{M})] \\
 &= -EA(\text{M}) + [\Delta G_{\text{therm}}(\text{M}^{-}) - \Delta G_{\text{therm}}(\text{M})] \\
 &= -EA(\text{M}) + \Delta \Delta G_{\text{therm}}.
 \end{aligned}$$

donde el cambio de energía de Gibbs de la reacción en fase gaseosa que se muestra en la Figura 12 y el cambio es simplemente la afinidad electrónica de la especie (M), EA(M), más la contribución térmica a la energía libre de Gibbs ( $\Delta G_{\text{therm}}$ ) de  $\text{M}^{-}$  menos la de M.

$U_e$  denota la energía potencial de equilibrio de Born-Oppenheimer,  $ZPE$  la energía vibracional de punto zero y  $\Delta G_{\text{therm}}$  la contribución térmica. La contribución térmica incluye la energía libre debida a múltiples conformaciones (si están presentes),

rotaciones y excitación vibratoria y electrónica. Tomando en cuenta el cambio en ZPE incluido en EA, se utiliza la entalpia 0 K, que se etiqueta como  $H_0$ . Entonces:

$$H_0 = U_e + ZPE,$$

las ecuaciones anteriores se vuelven

$$\Delta G^{\circ}_g = H_0(M^-) + \Delta G_{therm}(M^-) - H_0(M) - \Delta G_{therm}(M).$$

En los modelos de solvatación continua, el soluto se encapsula en una cavidad de forma molecular incrustada en un continuo dieléctrico. El soluto es puesto en un campo de reacción, que es el campo ejercido sobre el soluto por el continuo dieléctrico polarizado, y la polarización del soluto por este campo se calcula mediante la ecuación de Poisson para un medio dieléctrico no homogéneo. El campo de reacción se utiliza para calcular la contribución electrostática global, que luego se combina con los términos electrostáticos que no globales para producir la energía libre de solvatación.

Algunos modelos de solventes continuos como los modelos PCM (modelo continuo polarizable)(Tomasi, Mennucci and Cammi, 2005) (por ejemplo, IEF-PCM y CPCM) modelan los contribuciones electrostáticos y electrostáticos no globales de forma independiente; estos modelos se denominan modelos de tipo 3. Los métodos más precisos son los modelos de solvatación continua de tipo 4 como SM8, SM8AD y SMD (También llamados Modelos SMx). (Takano *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2016)

El modelo COSMO-RS adopta una estrategia diferente en la que se realiza un cálculo de apantallamiento similar a un conductor en una molécula para generar un conjunto de cargas de apantallamiento en la cavidad de la molécula. La distribución de estas cargas forma una "huella dactilar electrostática" única (llamada perfil- $\sigma$ ) que es característica de esa molécula. La energía libre de solvatación se evalúa luego a partir de un procedimiento mecánico estadístico que involucra la interacción de las cargas del soluto y las del solvente. El modelo COSMO-RS tiene una buena precisión (similar a los modelos SMx), al menos para solutos neutros.



### 5.7.5 Atomización total.

(Barone and Cossi, 1998; Ochterski and Ph, 2000; Zeng *et al.*, 2006; Brothers *et al.*, 2007; Ferreira, Escalante and Tuccheri, 2015; Manaa, Fried and Kuo, 2016)

Este método se fundamenta en la energía de atomización total,  $\Sigma D_0(M)$ , que se define como la energía necesaria para disociar totalmente una molécula en los átomos que la conforman.

Según la reacción de atomización



donde  $A_x B_y C_z$  es la molécula de interés  $M$  y los átomos que la constituyen son  $A$ ,  $B$  y  $C$ . Primero se obtienen los valores de energía a 0 K, para la molécula  $[E_0(M)]$  y los átomos correspondientes  $[E_0(X_n)]$  mediante un cálculo de optimización de geometría y un cálculo de frecuencias de vibración al nivel de teoría deseado. Dado que el método G3(MP2) es una metodología compuesta por diversos niveles de cálculo, se tomará con base a los resultados obtenidos por el mismo.

La energía a 0 K de una molécula,  $E_0$ , es la suma de la energía electrónica y la energía del punto cero de la misma.

$$[E_0(M)] = E_{elect}(M) + E_{ZPE}(M) = E_0(M)[G3(MP2)].$$

Y para un átomo, del mismo método G3(MP2).

$$[E_0(X)] = E_{electr}(X).$$

Con estos datos se calcula la energía de atomización total a 0 K,  $\Sigma D_0(M)$

$$\sum D_0(M) = wE_0(A) + yE_0(B) + zE_0(C) - [E_0(M)] = \sum_{\text{átomos}} xE_0(X) - [E_0(M)].$$

Posteriormente se calcula la entalpía de formación a 0 K de la especie  $M$ ,  $\Delta H_{F,0}^\circ(M)$ , con la diferencia entre la suma de las entalpias de formación de los átomos aislados  $[\Delta H_{F,0}^\circ(X)]$ , que se obtienen de la Tabla 4 (Ochterski and Ph, 2000) y la energía de atomización de la molécula  $M$  en el paso anterior,  $\Sigma D_0(M)$

Átomo	$\Delta H^{\circ}_f(0\text{ K})$	$H^{\circ}(298\text{ K}) - H^{\circ}(0\text{ K})$	$S^{\circ}(298\text{ K})$
H	51.63±0.001	1.01	27.418±0.004
C	169.98±0.2	0.25	37.787±0.21
N	112.53±0.02	1.04	36.640±0.01
O	58.99±0.02	1.04	38.494±0.005
S	65.66±0.06	1.05	40.112±0.008

Tabla 4, Entalpia de formación de elementos (kcal/mol). Corrección de la entalpia para los elementos. Entropía de los átomos.

$$\Delta H^{\circ}_{f,0}(M) = \sum_{\text{átomos}} [x\Delta H^{\circ}_{f,0}(X)] - \sum D_0(M).$$

Para la entalpia de formación a 298 K,  $\Delta H^{\circ}_{F,298}(M)$ , se aplican las correcciones térmicas de la Tabla 4.

$$\Delta H^{\circ}_{f,298}(M) = \Delta H^{\circ}_{f,0}(M) + [H^{\circ}_{298}(M) - H^{\circ}_0(M)] - \sum_{\text{átomos}} (x[H^{\circ}_{298}(X) - H^{\circ}_0(X)]).$$

donde;

$\Delta H^{\circ}_{F,0}(M)$  corresponde a la entalpia de formación de la especie M a 0 K.

$[H^{\circ}_{298}(M) - H^{\circ}_0(M)]$  es la corrección térmica de la especie M.

Para una molécula, este valor es  $H_{\text{corr-}\epsilon_{zpe}}(M)$ , donde  $H_{\text{corr}}$  es el valor de la corrección térmica de la entalpia.

$[H^{\circ}_{298}(X) - H^{\circ}_0(X)]$  considera las contribuciones a los átomos, para H, C, N, O y S.

$$[H^{\circ}_{298}(M) - H^{\circ}_0(M)] = E_{\text{vib}}(298\text{ K}) + E_{\text{tran}}(298\text{ K}) + E_{\text{rot}}(298\text{ K}) + \Delta PV(298\text{ K}).$$

Las correcciones térmicas para le especie M es calculado de las frecuencias de vibración.

## **6 Planteamiento del problema.**

La determinación de los potenciales redox de las proteínas de forma experimental es elaborada. En principio, los potenciales redox se puede calcular a partir de la concentración del agente reductor durante la titulación. Sin embargo, aunque los potenciales redox se mide experimentalmente con bastante precisión, se sabe que los potenciales redox medidos varía según la pareja redox (proteínica) y las condiciones experimentales. Además, ajustar un potencial redox mediante mutagénesis de proteínas requiere muchos recursos, ya que los efectos de un solo mutante en la estabilidad de un enlace disulfuro dependen de varios factores. Más precisamente, la estructura de la proteína, el valor de pKa del disulfuro, la tensión en el enlace y el entorno electrostático de la proteína tienen un gran impacto en el potencial redox. (Li and Baldus, 2015)

Los enlaces disulfuro se pueden reducir y volver a oxidar de forma reversible, donde el estado redox de estos enlaces se ha convertido en un elemento de señalización. En los cloroplastos, por ejemplo, la reducción enzimática de los enlaces disulfuro se ha relacionado con el control de numerosas vías metabólicas, así como con la expresión génica.

Pare ello que las herramientas de Química Computacional nos puedan aportar una ruta alternativa para la determinación de potenciales redox, en sistemas reportados que actúan como un interruptor redox gracias al carácter reversible del enlace disulfuro.

## **7 Objetivos**

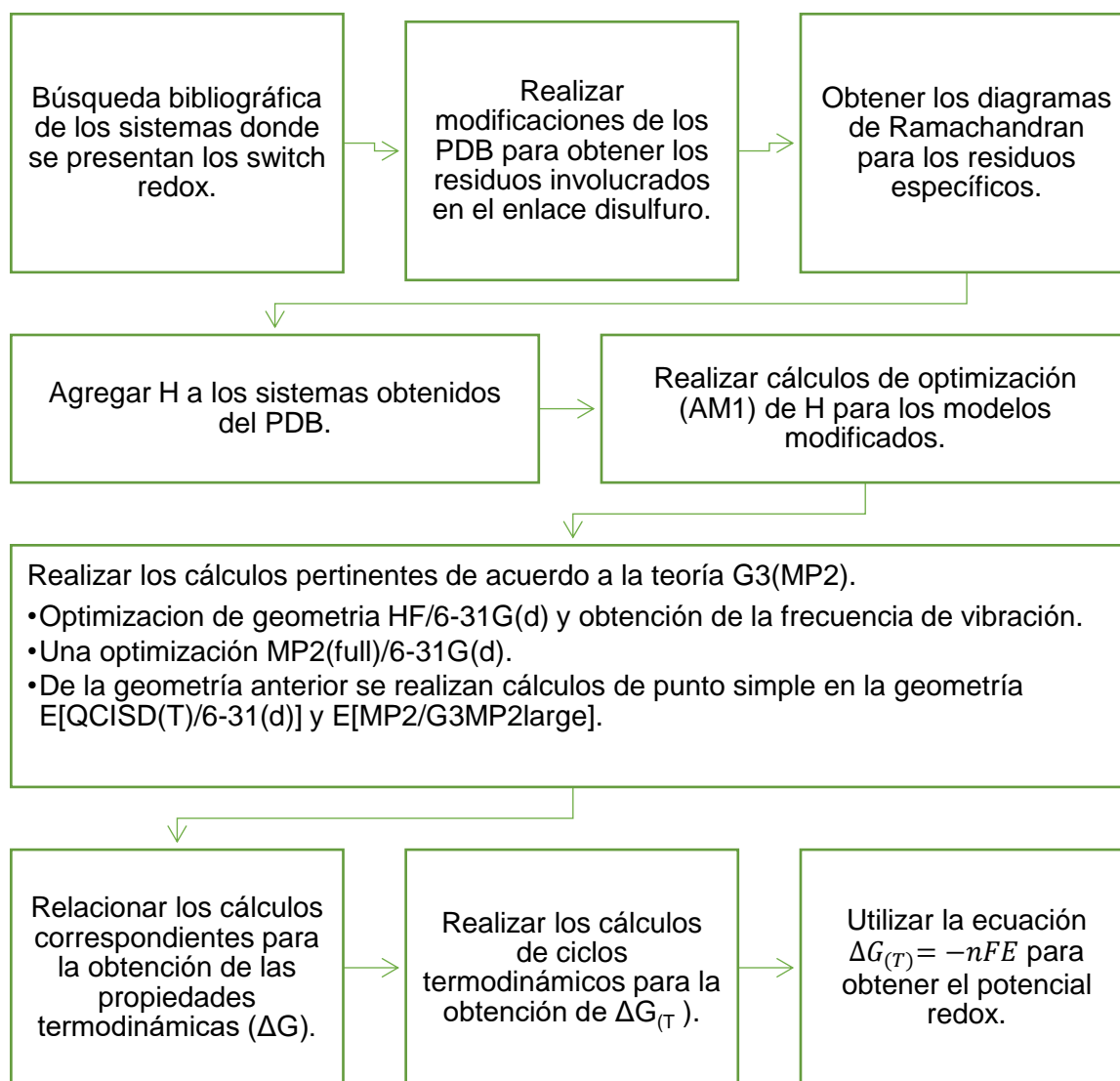
### **7.1 Objetivo General**

Descripción de los potenciales redox en la formación de enlaces disulfuro no convencionales que actúan como un switch redox por medio de análisis estructural y cálculo de energías termodinámicas gracias a la aplicación de la química computacional.

### **7.2 Objetivos Específicos.**

- Calibración de la metodología G3(MP2) en la aplicación de moléculas de relevancia en los análisis posteriores.
- Búsqueda y análisis de sistemas que funcionan como switch redox en algunas proteínas basadas en la literatura.
- Obtener modelos a estudiar que involucren a los aminoácidos adyacentes en el que participa en el enlace disulfuro.
- Obtención de los diagramas de Ramachandran para cada modelo analizado.
- Realizar los cálculos necesarios de obtención de parámetros termodinámicos ( $\Delta G$ ) tanto en fase gas como en solución.
- Análisis estructural final en los métodos de cálculo.
- Realizar ciclos termodinámicos en el proceso redox.
- Realizar la ecuación de oxido-reducción en la formación de enlaces disulfuro
- Obtener el potencial redox a la formación de enlaces disulfuro.

## 8 Metodología.



## **9 Soporte.**

Las estructuras obtenidas son rescatadas del PDB (Protein Data Bank) (*RCSB PDB: Homepage*, 2021). 1DL0, 6ESX y 2NDO.

El análisis y el arreglo de los sistemas se realizó con los softwares Chimera 1.11.2, Avogadro y GaussView 5.0.

La optimización de H se realiza con MOPAC2016.

Los cálculos siguientes se realizarán con el software NWChem, con ayuda del clúster Yoltla, perteneciente al Laboratorio de Supercomputo y Visualización en Paralelo (LSVP) de la UAM-Unidad Iztapalapa.

La construcción de los modelos de calibración se realizó por medio del paquete ChemBioOffice 2014.

Los análisis de función de onda se realizaron con Multiwfn software de código abierto.

## 10 “Calibración”.

Se realizaron cálculos pertinentes según la metodología G3(MP2) por medio de software NwChem a un grupo de moléculas que comparten similitud estructural con un aminoácido; Metanol, Ácido Acético, Glicina y Cys<sup>-1</sup>.

Para el metanol (CH<sub>3</sub>OH) se obtuvieron los valores reportados en la Tabla 5, donde se realizaron cálculos específicos del método G3(MP2), tanto como optimizaciones de geometría, cálculo de frecuencias de vibración y de punto simple de energía al nivel de teoría específico del método G3(MP2). El metanol se propuso como sistema de estudio, ya que, la aplicación de ciclos termodinámicos a sistemas complejos puede verse afectada por la complejidad de los mismos, para ello que el metanol fuera un punto de partida adecuado para tratar sistemas comprensibles y elucidar problemáticas al momento de experimentar en sistemas de mayor tamaño.

Tipo de cálculo.	Valor (u.a.)
Opt – HF/6-31G(d)	-115.03541816
Freq – HF/6-31G(d)	E[ZPE] = 0.049388978
Opt – MP2(full)/6-31G(d)	-115.35329490
SP – MP2/G3(MP2)large	-115.51369294
SP – QCISD(T)/6-31G(d)	-115.38221547

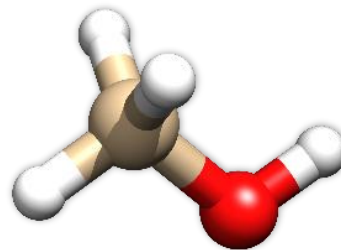


Tabla 5, Cálculos requeridos por la metodología G3(MP2),  $E_0[G3(MP2)] = QCISD(T)/6-31G(d) + \Delta E_{MP2} + E(HLC) + E(ZPE)$ . Molécula metanol (CH<sub>3</sub>OH).

Se aplicaron los cálculos correspondientes para la determinación de los parámetros termodinámicos de entalpia y energía libre obteniendo los resultados mostrados en la siguiente tabla.

	Valor (a.u.)
E[HLC]	-0.064953
E <sub>0</sub> [G3(MP2)]	-115.5581775
E[G3(MP2)]	-115.5549225
G3(MP2) Entalpia [H]	-115.5539784
G3(MP2) Energía libre [G]	-115.5807348

Tabla 6, Tabla 6. Para la corrección de alto nivel E[HLC], se utilizó la ecuación:  $-An\beta - B(n\alpha - n\beta)$ . E<sub>0</sub>[G3(MP2)] el cálculo del método G3(MP2), la energía electrónica más la corrección de punto-cero y las correcciones térmicas de la energía

Se realizó una comparación de la entalpía de formación calculada contra su parte reportada de la base de datos NIST para corroborar la correcta aplicación del método G3(MP2), esto gracias a herramientas de termodinámica computacional, en este caso por el cálculo de la energía de atomización total. Ya que la entalpía de formación de un compuesto permite estimar la estabilidad de una molécula, cuanto mayor sea la energía que libera en su formación ( $\Delta H_f < 0$ ) mayor será su estabilidad ya que necesita mayor energía para su descomposición. Puesto que la entalpía de formación es calculada indirectamente se utilizan datos tanto experimentales como teóricos acoplados al siguiente ciclo termodinámico en este caso del metanol de sus correspondientes átomos en estado estándar: carbono, hidrogeno y oxígeno (grafito, H<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>) (Figura 13)

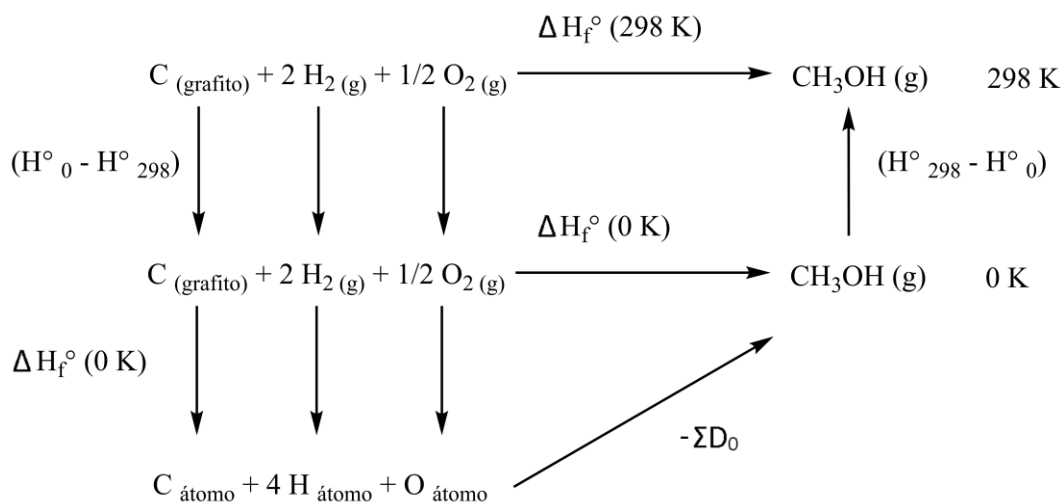


Figura 13. Ciclo termodinámico para la entalpía de formación del metanol mediante atomización total. (CH<sub>3</sub>OH)

Para el método de atomización total se aplicando los valores reportados para E<sub>0</sub>(X) del método G3(MP2). (Curtiss *et al.*, 1999)

$$\begin{aligned} \sum D_o(CH_3OH) &= E_0(C) + 4E_0(H) + E_0(O) - [E_0(CH_3OH)] \\ &= -37.7893 + (4 * -0.5018) - 74.9897 + 115.5581 \\ &= 77.1682 \times 10^{-2} \text{ h} = \mathbf{484.2376 \text{ kcal/mol.}} \end{aligned}$$

Subsecuente, se estima la entalpía de formación a 0 K de CH<sub>3</sub>OH,  $\Delta H_{F,0}^{\circ}(CH_3OH)$ .



$$\begin{aligned}\Delta H_{f,0}^{\circ}(\text{CH}_3\text{OH}) &= \sum_{\text{átomos}} [x\Delta H_{f,0}^{\circ}(X)] - \sum D_0(\text{CH}_3\text{OH}) \\ &= 169.98 + (4 * 51.63) + 58.99 - 484.2376 = -48.7476 \text{ kcal/mol}.\end{aligned}$$

Finalmente se calcula la entalpia de formación a 298 K,  $\Delta H_{F,298}^{\circ}(M)$  aplicando las correcciones térmicas de la Tabla 4 y las correcciones térmicas del metanol,  $[H_{298}^{\circ}(\text{CH}_3\text{OH}) - H_0^{\circ}(\text{CH}_3\text{OH})]$ , tomados de los cálculos de las frecuencias de vibración.

$$\begin{aligned}\Delta H_{f,298}^{\circ}(M) &= \Delta H_{f,0}^{\circ}(\text{CH}_3\text{OH}) + [H_{298}^{\circ}(\text{CH}_3\text{OH}) - H_0^{\circ}(\text{CH}_3\text{OH})] \\ &\quad - \sum_{\text{átomos}} (x[H_{298}^{\circ}(X) - H_0^{\circ}(X)]) \\ &= -48.7476 + (2.0412 + 0.5629) - (0.25 + 4 * 1.01 + 1.04) \\ &= -51.4734 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}} = -215.3650 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}.\end{aligned}$$

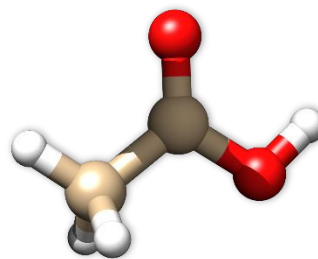
El valor obtenido de este método de atomización total acoplado a resultados del método G3(MP2) fue de  $-215.3650 \text{ kJ/mol}$ , comparado con el valor especificado en la base de datos ( $-205 \pm 10 \text{ kJ/mol}$ ) (*Libro del Web de Química del NIST. Base de Datos de Referencia Estándar del NIST, 2018*), donde se observa que nuestro valor se encuentra entre los valores de margen de error según el valor reportado.

Dato reportado (NIST, 2011)	Dato calculado.
$-205 \pm 10 \text{ kJ/mol}$	$-215.3650 \text{ kJ/mol}$

Tabla 7. Datos reportados y resultado calculado. Metanol.

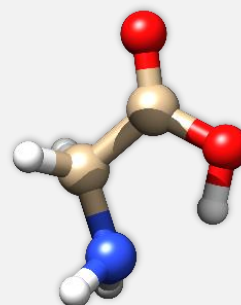
Los siguientes sistemas fueron seleccionados por la similitud estructural con relación a los aminoácidos; en principio para el ácido acético ya que al momento de sustituir un H del  $C_{\alpha}$ , por un grupo amino, se obtendría la estructura de la glicina. Para los sistemas siguientes (Ácido Acético, Glicina y Cys<sup>-1</sup>) se realizó el mismo tipo de cálculos, primeramente, para los cálculos del método G3(MP2) aplicando los cálculos pertinentes y finalizar con la estimación de la entalpia de formación por medio de la energía de atomización total.

Ácido Acético.  
CH<sub>3</sub>COOH

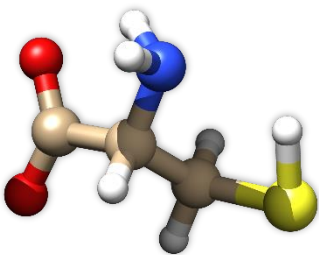


Eo[G3(MP2)]	-228.7813249 h
E[G3(MP2)]	-228.7769749 h
G3(MP2) Entalpia [H]	-228.7760307 h
G3(MP2) Energía libre [G]	-228.8081487 h
Entalpia de formación (Calculada)	-428.2320 kJ/mol
Entalpia de formación (Reportada)	-433 ± 3 kJ/mol

Glicina – Gly.  
NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH – C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>



Eo[G3(MP2)]	-284.053353 h
E[G3(MP2)]	-284.047979 h
G3(MP2) Entalpia [H]	-284.047035 h
G3(MP2) Energía libre [G]	-284.081910 h
Entalpia de formación (Calculada)	-391.5269929 kJ/mol
Entalpia de formación (Reportada)	-390.5 ± 4.6 kJ/mol

<b>Cisteína - Cys<sup>-1</sup></b> <b>C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>2</sub>S</b>		
<b>E<sub>0</sub>[G3(MP2)]</b>	-720.516446 h	
<b>E[G3(MP2)]</b>	-720.508222 h	
<b>G3(MP2) Entalpia [H]</b>	-720.507278 h	
<b>G3(MP2) Energía libre [G]</b>	-720.550023 h	
<b>Entalpia de formación (Calculada)</b>	-530.8040633 kJ/mol	
<b>Entalpia de formación (Reportada) Cys</b>	-382.6 ± 1.8 kJ/mol	

*Tabla 8. Resultados método G3(MP2). Ácido acético, Glicina y Cisteína<sup>-1</sup>.*

El uso de la metodología G3(MP2) muestra que algunos valores calculados se encuentran dentro de las desviaciones que presenta la literatura, como es el caso del metanol y la glicina. El ácido acético no entra dentro de los valores reportados, con 2 kJ/mol fuera del rango. No se encuentran valores reportados para Cys<sup>-1</sup>, en cambio sí hay un valor reportado para Cys.

La utilización de ciclos termodinámicos se puede aplicar a moléculas orgánicas en su estado reducido y oxidado, aplicando las correcciones necesarias se podrá determinar el potencial redox, involucrado en la formación de enlaces disulfuro.

Los resultados de atomización total, podrían ser comparadas con el método de reacciones isodesmicas en la determinación de entalpías de formación y observar las desviaciones que pudieran estar presentes, conociendo las limitaciones de cada método utilizado.

## 11 Análisis y Discusión de Resultados.

Los sistemas utilizados fueron recuperados de la base de datos PDB (*RCSB PDB: Homepage*, 2021) de acuerdo a su análisis en su estructura por poseer grupos de cisteína peculiar en este caso por ser disulfuros prohibidos como los son los disulfuros vecinales en el caso de la J-atracotoxin (J-ACTX) (Id-pdb: 1DL0) (Wang *et al.*, 2000) un péptido utilizado en la actividad insecticida. Disulfuros adyacentes como es el caso de una Tioredoxina (Trx1) (Id-pdb: 6ESX) (Cheng *et al.*, 2011; Meir *et al.*, 2018) que está implicada en una diversa variedad de procesos, que van desde la defensa del estrés oxidativo hasta la transducción de señales, siendo los residuos de cisteína claves en la reducción de sustratos. Así como la encima EcDsbA (Id-pdb: 2ND0) (Shouldice *et al.*, 2011) una proteína peri-plasmática bacteriana que introduce enlaces disulfuro en diversos sustratos, efectos similares a las tioredoxinas. Dado que la formación de los enlaces disulfuro en estos ejemplos pueden desempeñar un papel regulador al cambiar la estructura de la proteína, la carga superficial o la reactividad, se proponen como un switch redox.

### 11.1 Diagrama de Ramachandran

Se graficaron los ángulos de las estructuras para determinar si los ángulos contenidos son estéricamente favorables para la formación del enlace. Se muestran los diagramas de las 3 distintas estructuras a analizar.

Los ángulos mostrados en los diagramas son los respectivos para toda la estructura de la proteína ya que esta metodología busca encontrar la relación estructural con el comportamiento de activación-inhibición de los sistemas descritos, ya que las características que conforman a un switch redox vinculan claramente los sitios donde el enlace disulfuro tiene participación, además de los residuos que conforman sus entornos.

La *Figura 14* muestra el diagrama de Ramachandran de la estructura 1DL0. Observando la región de cuadrante II donde se encuentran la mayoría de los ángulos de la estructura, siendo estas mayormente laminas- $\beta$ , la región donde se encuentra los residuos Ala12 y Cys13, es el cuadrante III, sitio en el que las hélices- $\alpha$  tienen mayores ángulos permitidos. El análisis de los ángulos formados con sus

respectivos planos se muestra en la Figura 15, donde se puede observar que existe una gran tensión angular por parte las cisteínas vecinales. Esto explicaría la regio en donde se encuentra la Cys31. Ya que en el plano se nota un tanto distorsionado por parte de la formación del enlace disulfuro. Los planos mostrados (plano amarillo-verde) en la Figura 15 se construyeron debido al carácter parcial de doble enlace en enlace peptídico, y así identificar el ángulo de torción generado por cada plano en este caso para la estructura 1DL0.

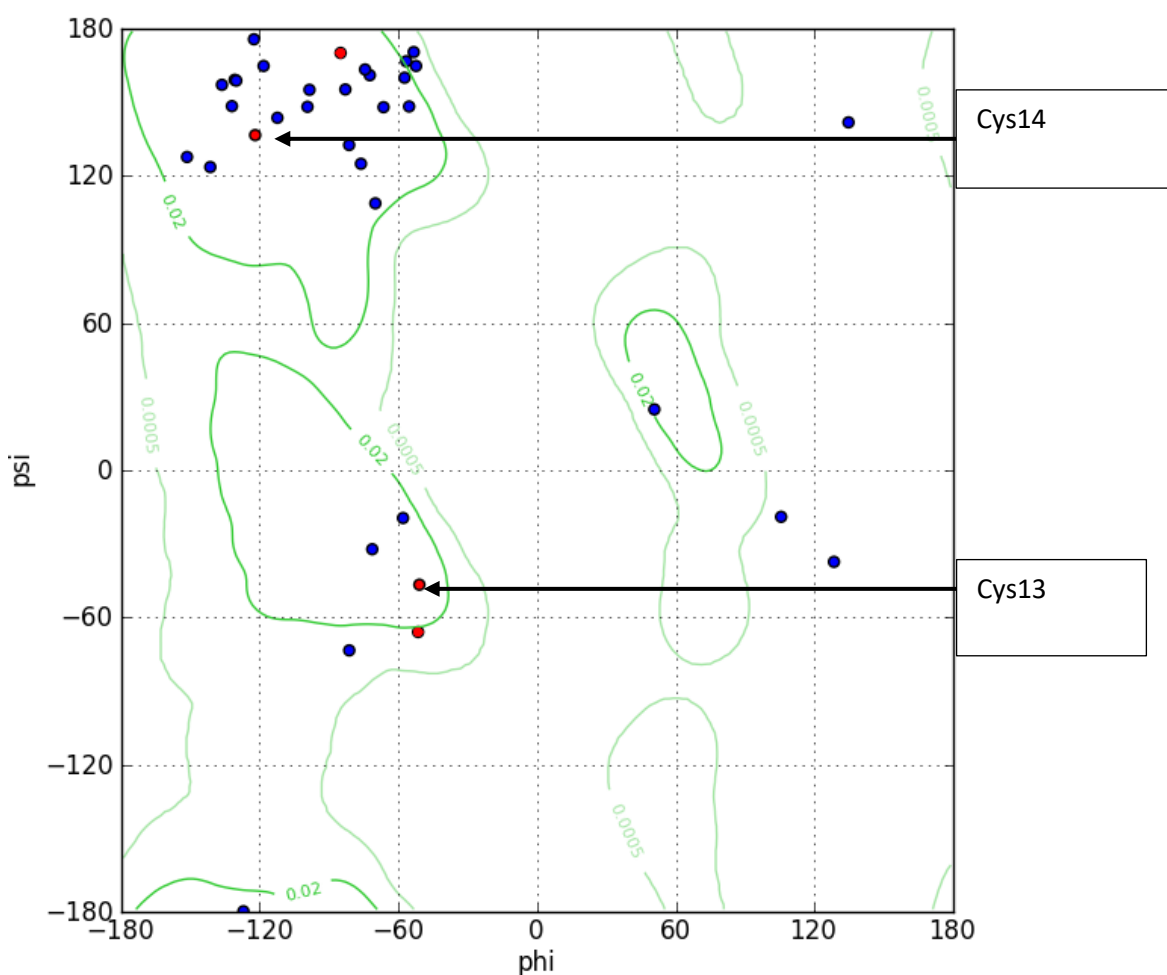


Figura 14, Diagrama de Ramachandran (1DL0). Puntos rojos Ala12, Cys13, Cys14 y Pro15. (ACCP).

Residuos.	$\phi_x$ . (°)	$\psi_y$ . (°)
<b>Ala 12</b>	-51.433	-65.518
<b>Cys 13</b>	-51.128	-47.128
<b>Cys 14</b>	-120.920	139.787
<b>Pro 15</b>	-85.116	-170.547

Tabla 9. Ángulos (Phi, Psi) 1DL0 entre residuos Ala12, Cys13, Cys14 y Pro 15.

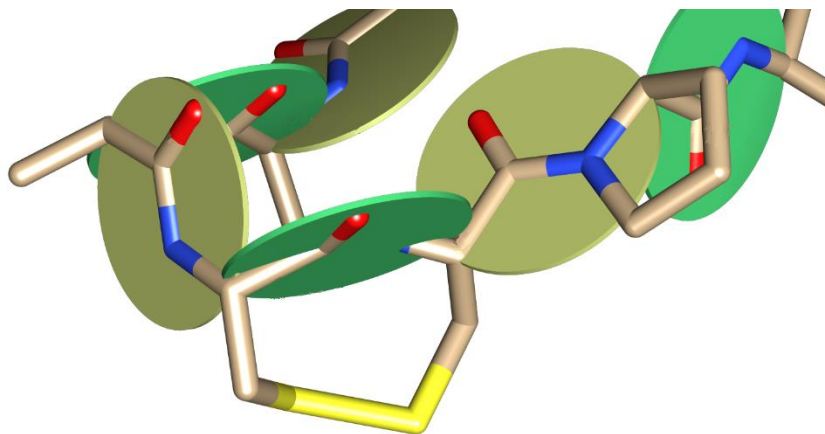


Figura 15. Planos cadena peptídica (1DL0). Residuos Ala12 (A12), Cys13 (C13), Cys14 (C13) y Pro15 (P15).

En la estructura 6ESX se graficó el diagrama de Ramachandran, Figura 16, obteniendo dos claras regiones; región II y región III. Siendo estas una proteína con estructuras secundarias de proporción similar para hélices- $\alpha$  y laminas- $\beta$ . Los residuos en este caso son adyacentes con diferencia de 2 residuos como intermediarios siendo estos Glicina y Prolina. La estructura con la que se trabajará es el inicio del plegamiento de una hélice- $\alpha$ . Cabe mencionar que los únicos residuos de cisteína son (Cys31 y Cys34) los mostrados en el péptido, dando un mayor incentivo de poder establecer el potencial de oxido-reducción en la formación del enlace disulfuro. En la Figura 17 se observan los planos (gris-vino) para la estructura 6ESX, donde la prolina dicta la mayor parte de la conformación adquirida por el sistema y gracias a que la glicina es el aminoácido de menor tamaño puede adaptarse a una conformación que otros aminoácidos no son capaces de obtener.

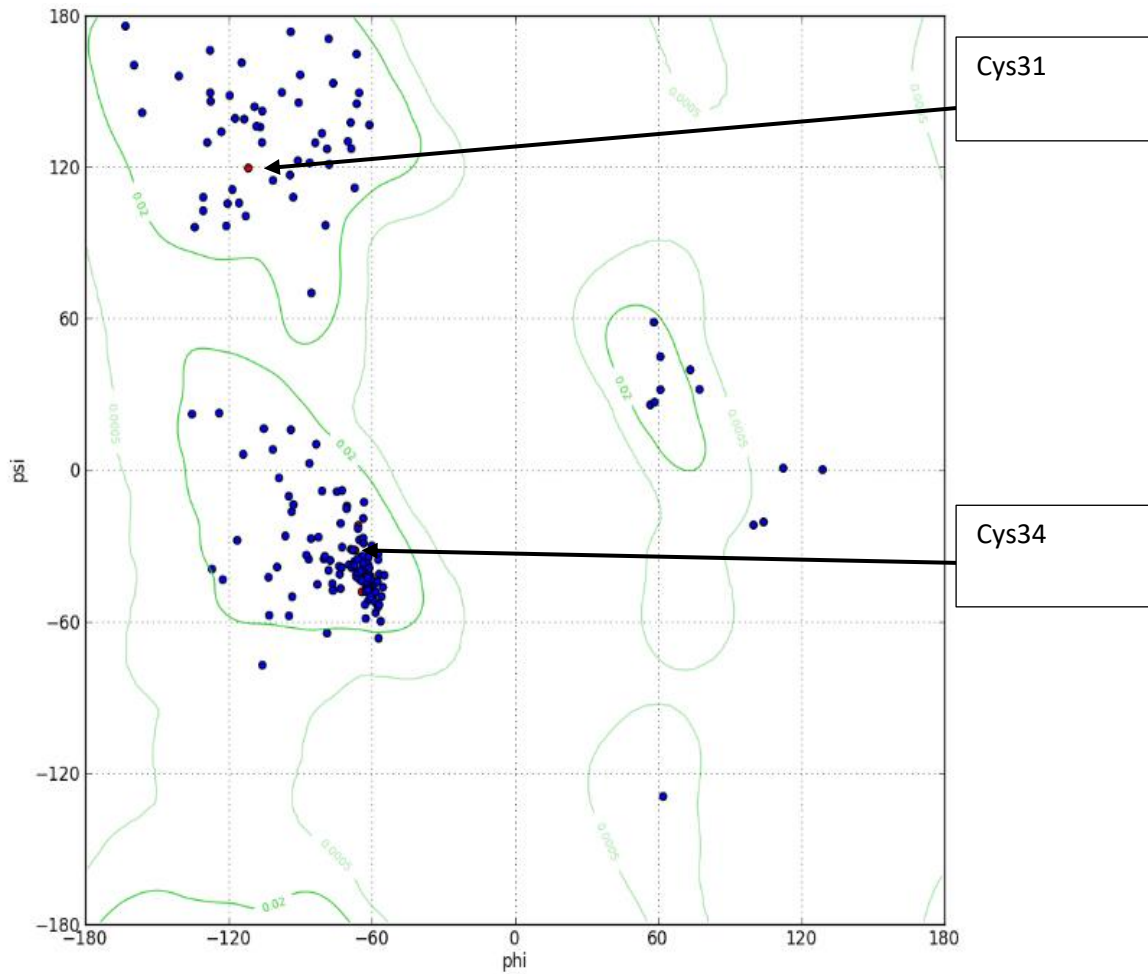


Figura 16. Diagrama de Ramachandran (6ESX). Puntos rojos Cys31, Gly32, Pro33 y Cys34. (CGPC).

Residuos.	$\phi_x$ . (°)	$\psi_y$ . (°)
<b>Cys 31</b>	-111.653	119.633
<b>Gly 32</b>	-65.673	-21.673
<b>Pro 33</b>	-64.141	-48.252
<b>Cys 34</b>	-66.883	-31.824

Tabla 10. Ángulos (Phi, Psi) 6ESX residuos Cys31, Gly32, Pro 33 y Cys 34.

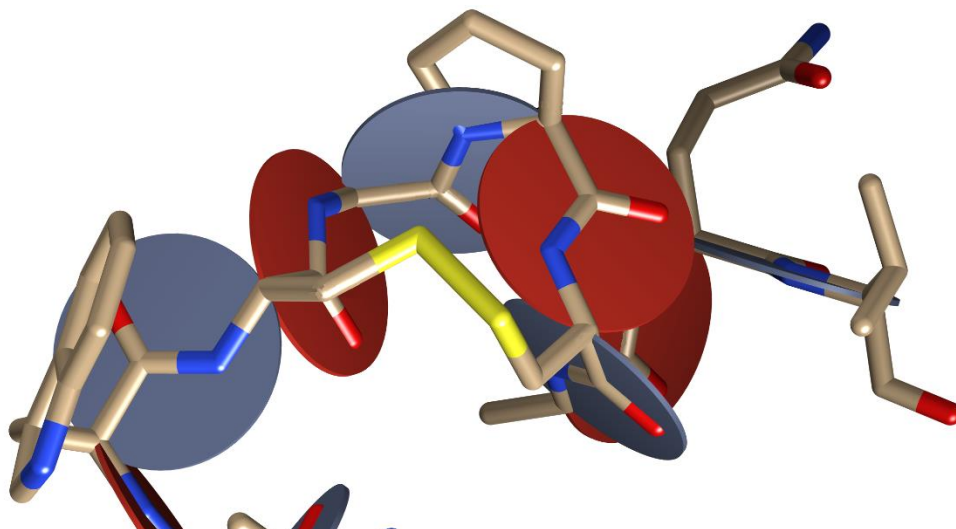


Figura 17. Planos cadena peptídica (6ESX). Residuos Cys31 (C31), Gly32 (G32), Pro33 (P33) y Cys34 (C34)

El diagrama Ramachandran de la estructura 2ND0 se puede observar en la Figura 19, con una mayor concentración de puntos en la región III, gracias a esto se determina su estructura de hélices- $\alpha$ . Al igual que la Tiorredoxina (6ESX) presenta un solo conjunto de cisteína (Cys30 y Cys33) implicando el sitio de interés, así como la adyacencia de cisteínas por dos unidades. Al comparar con 6ESX se denota el cambio de uno de sus dos residuos intermediarios glicina por histidina (Figura 18). Este cambio en el sustituyente puede que demuestre un cambio significativo en la determinación de su potencial. Los planos para le estructura 2ND0 se muestran en la Figura 20 (naranja – morado) donde la histida contienen un sustituyente (R) formado por un anillo de imidazol, donde las conformaciones que adquiere el sistema ayudan favorecen a que el grupo imidazol pueda participar en procesos de sujeción de sustrato en el sitio activo de la enzima para llevar su acción catalítica.

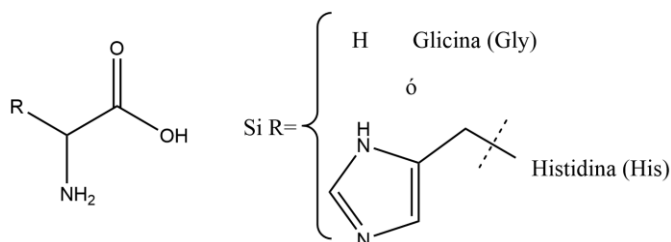


Figura 18. Aminoácidos. Sustituyentes (R) para Histidina y Glicina.



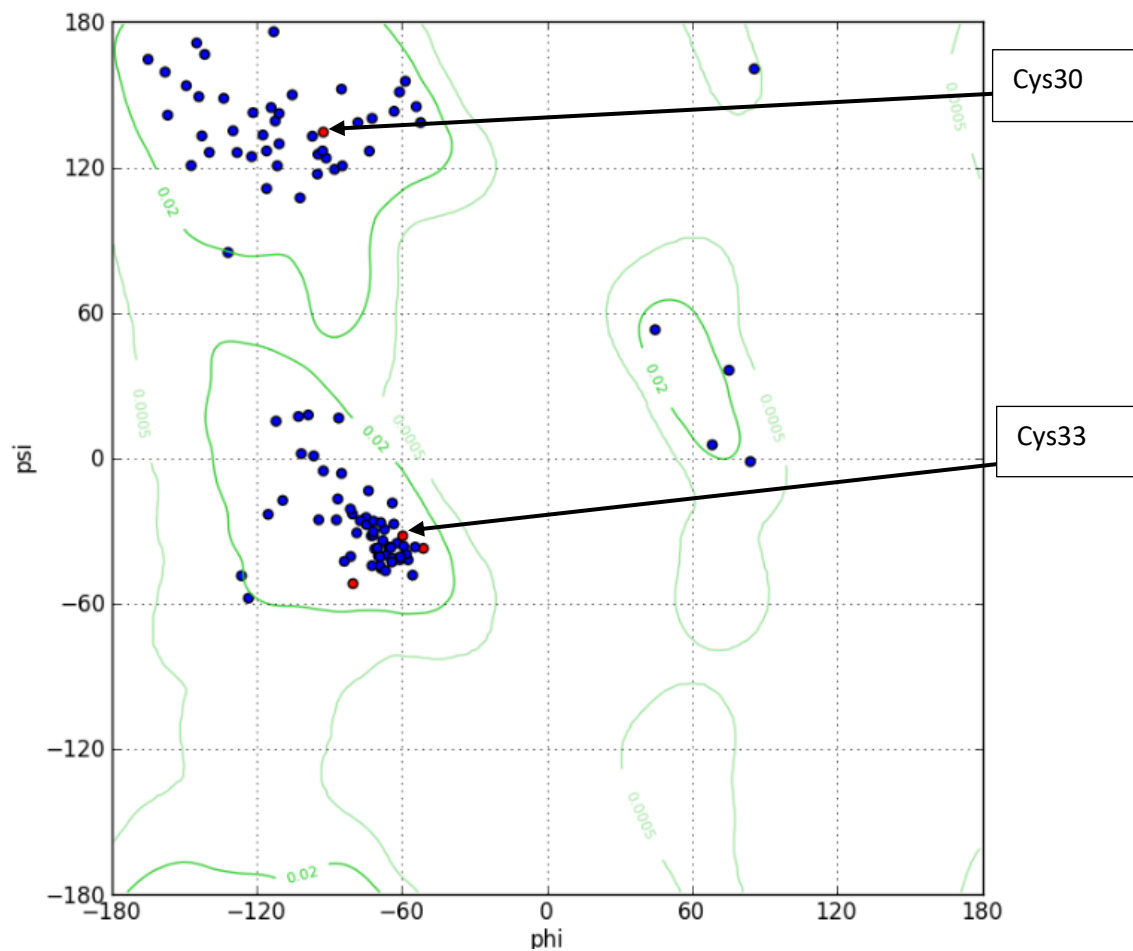
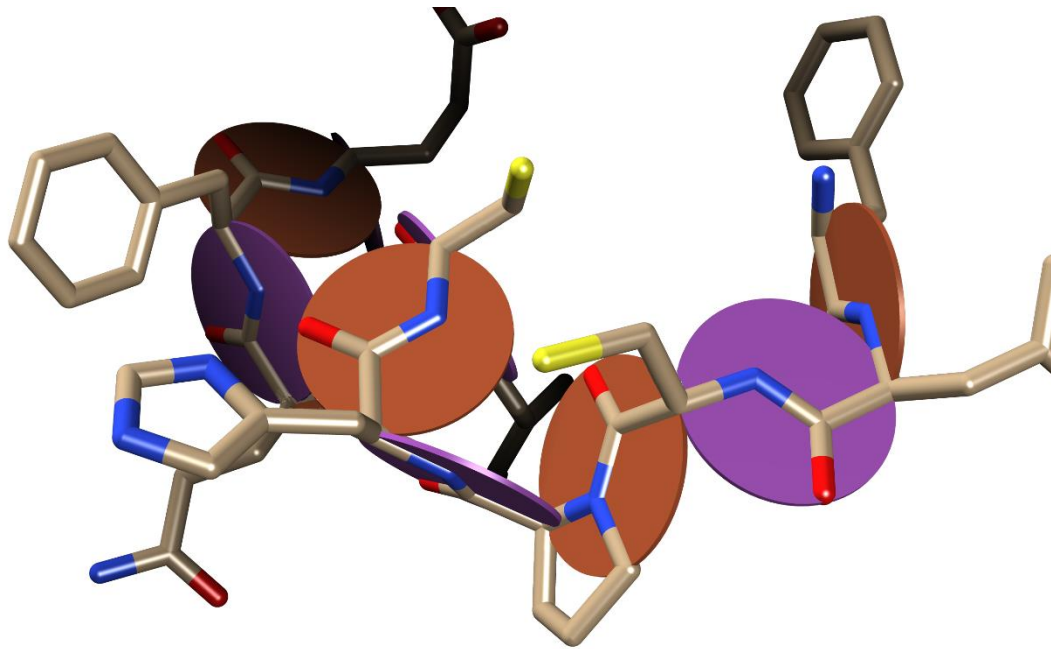


Figura 19. Diagrama de Ramachandran (2ND0). Puntos rojos Cys30, Pro31, His32 y Cys33. (CPHC).

Residuos.	$\phi_x$ . (°)	$\psi_y$ . (°)
<b>Cys 30</b>	-92.714	124.501
<b>Pro 31</b>	-80.220	-51.715
<b>His 32</b>	-51.119	-37.119
<b>Cys 33</b>	-61.979	-29.437

Tabla 11. Ángulos (Phi, Psi) 2ND0 residuos Cys30, Pro 31, His32 y Cys 33.



*Figura 20. Planos cadena peptídica (2ND0). Residuos Cys30 (C30), Gro31 (P31), His32 (H32) y Cys33 (C33)*

Los diagramas de Ramachandran mostraron similitud en la posición del ángulo permitido para las cisteínas, encontrando cada uno de los residuos ya sea en la región II o la región III. Dando una idea de las conformaciones permitidas para que un grupo pueda tener la característica adecuadas para la formación del enlace disulfuro (para las cistinas). Los residuos encontrados conllevan a la distribución y conformación lo que nos indica las características estructurales que tienen que poseer los sistemas para llevar el acabo el enlace, siendo las restricciones estéricas tanto como los grados de libertad entre los planos de los sustituyentes participantes.

## 11.2 Cálculos.

Se estableció el tamaño del sistema a un máximo de dos residuos adyacentes a las cisteínas de los sistemas siendo un total de 4 residuos involucrados en los cálculos. Al ser rescatados del Protein Data Bank (*RCSB PDB: Homepage*, 2021) se obtiene la estructura del análisis de cristalografía de proteínas (X-ray) y puesto que la técnica no muestra H se le agregaron a los sistemas, donde se realizó un cálculo por el método semiempírico AM1, Austin Model 1 (por medio del software MOPAC), esto únicamente para los hidrógenos agregados, ya que utiliza parámetros derivados de resultados experimentales para simplificar los cálculos cuánticos. De igual manera se obtuvo la forma reducida (tiol) y oxidada (disulfuro) (figura 21) para cada uno de los 3 sistema (la forma oxidada y reducida viene reportada dentro de la estructura del PDB en ocasiones en diferente análisis).

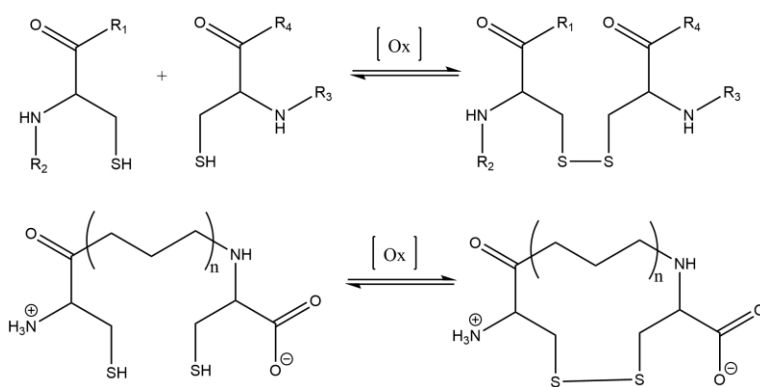


Figura 21. Reacción de oxido-reducción. Reducida (tiol) - Oxidada (disulfuro).

El primer cálculo que se realizó según G3(MP2) es una optimización de geometría y el cálculo de frecuencias de vibración con el nivel de teoría HF/6-31G(d). Evitando que el esqueleto peptídico tenga grados de libertad en las rotaciones, se fijan los grupos donde se llevaría a cabo la hidrólisis del enlace peptídico tanto para N-terminal y C-terminal. Teniendo así una secuencia parecida a la estructura secundaria propia de la proteína. Una vez terminado se rescata las frecuencias de vibración la energía del punto cero E [ZPE] corrigiendo con el factor de 0.8929. A la geometría obtenida del cálculo anterior se realiza una nueva optimización de geometría esta vez con el nivel de teoría MP2(full)/6-31G(d). Al recuperar la geometría y la energía requerida [ E(MP2(full)/6-31G(d) ] se realizan los últimos

cálculos de single-point con los niveles teoría más altos de la metodología MP2/G3(MP2)large y QCISD(T)/6-31G(d) además de la corrección E(HLC).

Para calcular la energía de solvatación, se utilizó un modelo de solvatación continua COSMO (**C**onductor-like **S**creening **M**odel) con el nivel teórico recomendado, B3LYP/6-31+G(d) utilizando agua como solvente.

### 11.2.1 1DL0.

Los resultados obtenidos de la primera molécula (oxidada y reducida. 1DL0) se muestran en la Tabla 12 siendo estos los necesarios para la aplicación del método G3(MP2). Se analizó la estructura oxidada final en el último cálculo de optimización encontrando una longitud de enlace entre los átomos (S15 – S25) de 2.0198 Å, siendo característica de un enlace disulfuro (2.05 Å). (Roberts et al., 2005) Para la segunda estructura reducida se analizó del último paso de optimización y se determinaron las longitudes de enlaces entre los grupos tiol, así como las longitudes entre S (S15 y S25) y H (H48 y H49) de cada grupo mostrados en la Tabla 13. Se observa que la longitud del enlace en estado oxidado es ligeramente menor que en su estado reducido. Los valores entre los átomos S25-H49 muestran una longitud menor en relación a S25-H48 al igual que con la longitud de S15-H49 implicando que sea la región donde se llevaría a cabo el enlace

<b>Tipo de cálculo.</b>	<b>E. Oxidado. (u.a)</b>	<b>E. Reducido. (u.a)</b>
<b>Opt - HF/6-31G(d)</b>	-1930.08693802	-1930.84611397
<b>Freq – HF/6-31G(d) E[ZPE]</b>	0.363590818	0.37787617
<b>Opt – MP2(full)/6-31G(d)</b>	-1933.2268690818	-1934.5967106400
<b>SP – MP2/G3(MP2)large</b>	-1935.5833127045	-1936.4507129549
<b>SP – QCISD(T)/6-31G(d)</b>	-1933.7871671900	-1934.9899891817

*Tabla 12. Cálculos requeridos por la metodología G3(MP2), Estructura oxidada. Estructura reducida. (1DL0).*

Longitud de enlace disulfuro (estructura oxidada) 2.0198 Å. (S15-S25)

Para una visualización más simplificada se ocultaron algunos de los hidrógenos participantes en las moléculas.

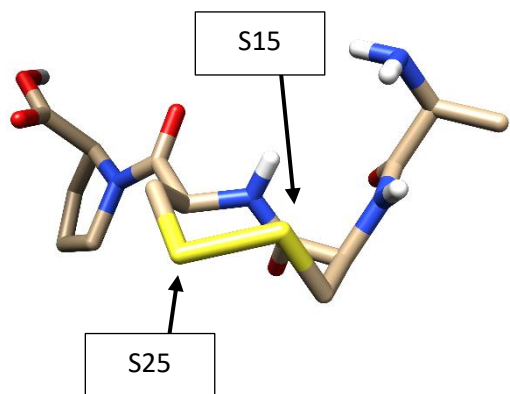


Figura 22. Estructura oxidada 1DL0.

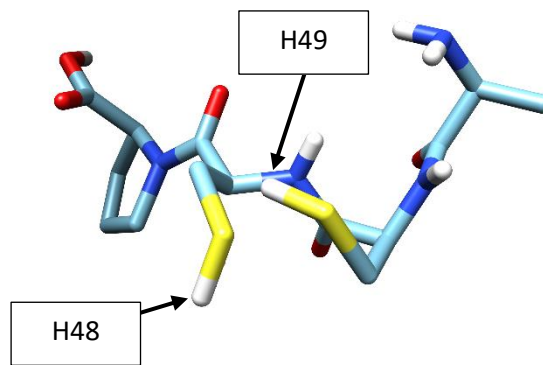


Figura 23. Estructura reducida 1DL0.

Átomos.	Longitud (Å).
<b>S25-S15</b>	2.0203
<b>S25-H48</b>	1.3597
<b>S15-H49</b>	1.3601
<b>S25-H49</b>	1.3525

Tabla 13. Longitudes atómicas. Estructura reducida 1DL0.

Se obtuvo la función de onda de las especies del último paso de optimización para poder determinar el laplaciano de la densidad electrónica en el plano generado por los átomos involucrados S15, S25, H48 y H49. Observando que la concentración de densidad electrónica converge sobre los átomos S15-H49 (Figura 25) genera el enlace covalente aún mostrando una longitud mayor con respecto de S25-H49. Esto debido a la conformación adquirida por parte de los efectos estéricos y el solapamiento de los participantes, ya que, para generar un enlace óptimo se exige el máximo solapamiento entre las especies involucradas.

En la Figura 24 se muestra el laplaciano de densidad electrónica, en este caso para la estructura oxidada observando la región de flujo (concentración) electrónico entre los átomos que forman el enlace disulfuro (S15-S25), en comparación con la estructura reducida (Figura 25) no muestra enlace alguno dado las longitudes obtenidas, demostrando la factibilidad que tendría en su reactividad al momento de

entrar en contacto con agentes oxidantes y viceversa (agentes reductores) gracias al ser un proceso reversible.

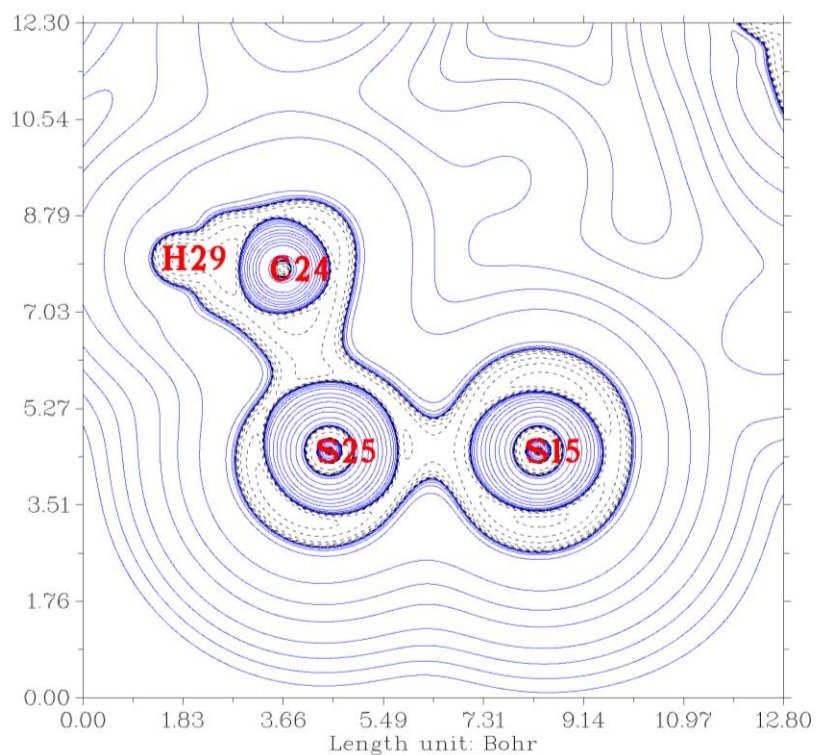


Figura 24. Laplaciano de densidad electrónica (1DL0). Estructura oxidada plano atómico S15, S25 y C24.

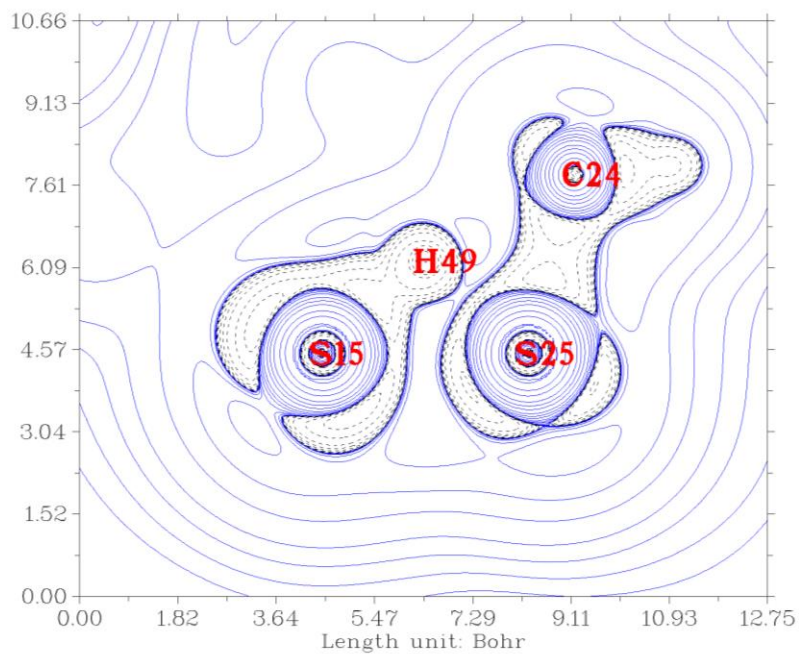


Figura 25. Laplaciano de densidad electrónica. Estructura reducida plano atómico S15, S25 y H49

### 11.2.2 6ESX.

Los datos para G3(MP2) (6ESX) se muestran en la Tabla 14. La estructura final de molécula en estado oxidado (Figura 28) muestra una longitud de enlace de 2.0322 Å entre S6-S23, así como la longitud de la estructura reducida (Tabla 15) 3.5926 Å mostrando una longitud más lejana a la posición de enlace, esto debido a la tensión generada por el residuo de prolina, posicionado entre el residuo Cys31-Gly32-Pro33-Cys34, ya que su estructura impide cierto grado de rotación al momento de la formación del enlace peptídico debido a que su  $\alpha$ -amina es una amina secundaria, pues su cadena lateral es cíclica compuesta por tres unidades de metileno cerrando el ciclo en su C $\alpha$ . La estructura reducida muestra una conformación adquirida por parte de los grupos tiol de las cisteínas más alejados ya que una de las características de las tioredoxinas es el intercambio tiol-disulfuro (Figura 26) (Gilbert, 1990, 1995) de donde se derivan los hidrógenos llevando a la ruptura del enlace disulfuro.

Tipo de calculo	E. Oxidado. (u.a)	E. Reducido. (u.a)
Opt - HF/6-31G(d)	-1891.03758244	-1892.14897430
Freq - HF/6-31G(d) E[ZPE]	0.3351464434	0.388729
Opt - MP2(full)/6-31G(d)	-1894.640531	-1895.75116670
SP - MP2/G3(MP2)large	-1896.35054561	-1897.47909990
SP - QCISD(T)/6-31G(d)	-1894.79113260	-1895.91788770

Tabla 14. Cálculos requeridos por la metodología G3(MP2). Estructura oxidada.  
Estructura reducida. (6ESX).



Figura 26. Intercambio tiol/disulfuro



Longitud de enlace disulfuro (estructura oxidada) 2.0322 Å. (S6-S23)

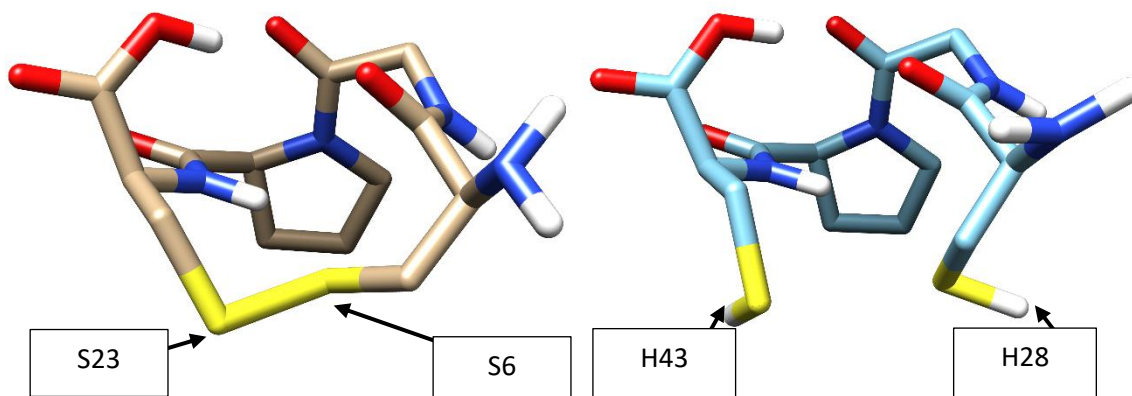


Figura 28. Estructura oxidada 6ESX.

Figura 27. Estructura reducida 6ESX.

Átomos	Longitud. (Å)
S6-S23	3.5926
S6-H28	1.4077
S23-H43	1.4057

Tabla 15. Longitudes atómicas. Estructura reducida 6ESX.

### 11.2.3 2ND0.

Los datos para el cálculo G3(MP2) de 2ND0 se muestran en la Tabla 16. Al igual que la estructura analizada (6ESX) se encuentran longitudes de enlace (oxidada 2ND0) de 2.0321Å mayores a sus estados reducidos. Las conformaciones que adquieren las estructuras por parte del residuo prolina se pueden ver diferencias en relación con (6ESX) por tratarse de la secuencia Cys30-Pro31-His32-Cys33 ya que en el caso de 2ND0 se trata de una cisteína N-terminal en comparación con 6ESX al tratarse de una cisteína C-terminal. Ya que se genera el enlace peptídico entre el carbonilo de la cisteína y el  $\alpha$ -amina de la prolina adquiriendo una conformación angular más restringida. Por parte del residuo de histidina (His32), en la revisión bibliográfica (Shouldice et al., 2011) se describe como uno de los grupo que ayuda a la identificación y sujeción (loop Connecting) del sustrato en el sitio activo para llevar a cabo el intercambio tiol-disulfuro removiendo hidrogeno de los tioles de



sustrato, (Figura 32) (Shouldice et al., 2011) demostrando que la determinación del potencial redox en la formación de este grupo es crucial para conocer los efectos en su actividad.

Tipo de calculo	E. Oxidada (u.a.)	E. Reducida (u.a.)
Opt - HF/6-31G(d)	-2153.92674686	-2154.79229595
Freq – HF/6-31G(d) E[ZPE]	0.4285027100	0.4476143416
Opt – MP2(full)/6-31G(d)	-2158.38371583	-2159.38316999
SP – MP2/G3(MP2)large	-2160.53651570	-2161.59382184
SP – QCISD(T)/6-31G(d)	-2158.90925751	-2159.91658411

Tabla 16. Cálculos requeridos por la metodología G3(MP2). Estructura oxidada.  
Estructura reducida. (2ND0)

Longitud de enlace disulfuro 2.0321 Å. (S5-S43).

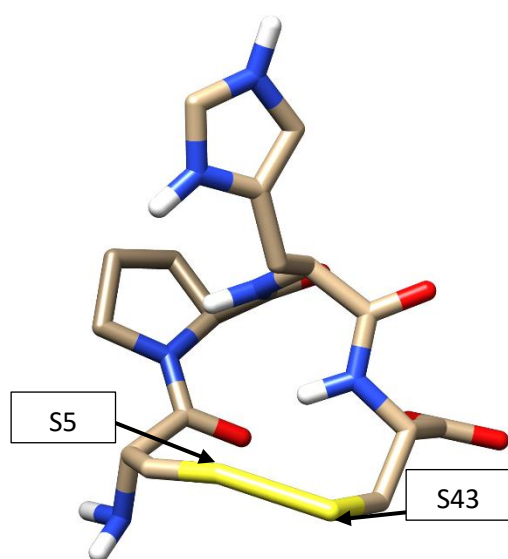


Figura 29. Estructura Oxidada 2ND0

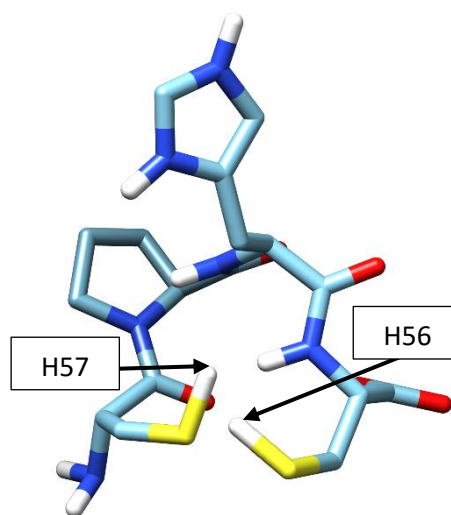
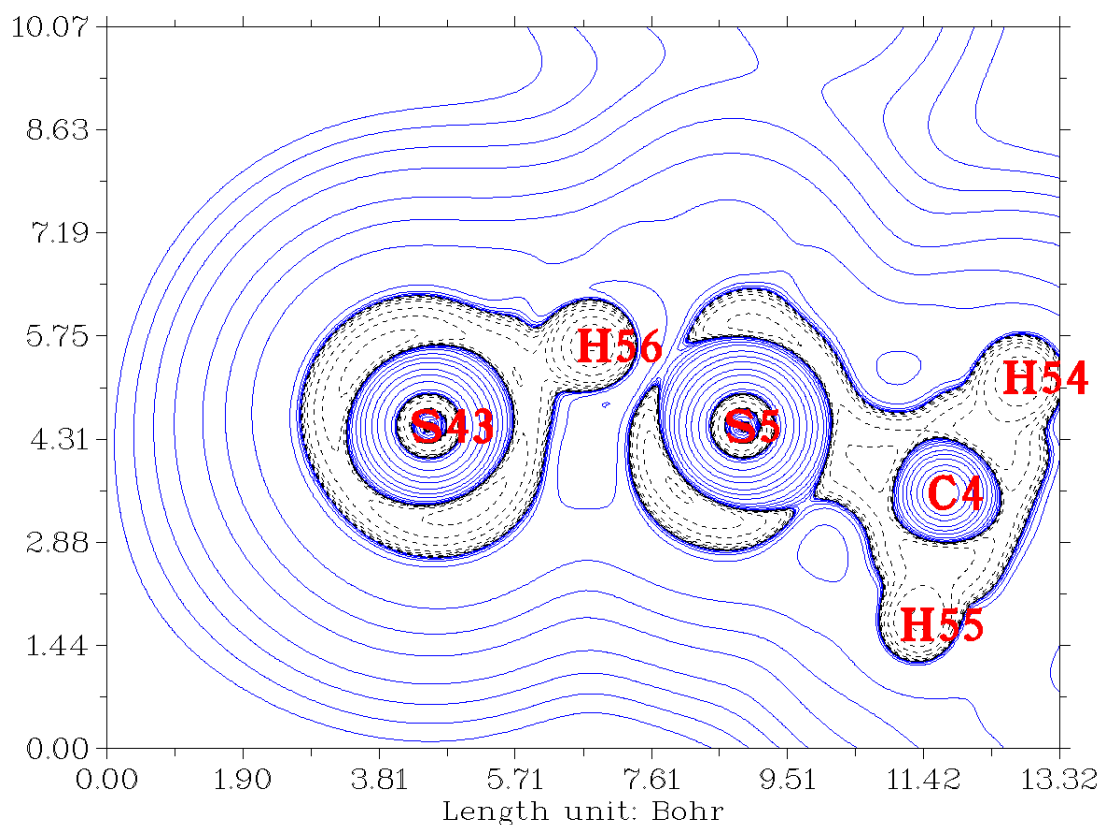


Figura 30. Estructura Reducida 2ND0

Átomos	Longitud (Å)
S5-S43	2.3202
S5-H57	1.3603
S43-H56	1.3601
S5-H56	1.2461

Tabla 17. Longitudes atómicas. Estructura Reducida 2DN0

Las longitudes (Reducida 2ND0) entre S43-H56 (1.3601 Å) se observan con mayor amplitud que las de S5-H56 (1.2461 Å). Realizando un análisis del laplaciano de densidad electrónica sobre la última estructura (reducida) del paso de optimización al obtener su función de onda, se observan en la Figura 31 que la concentración del flujo de densidad electrónica se encuentra entre los átomos S43-H56 aún teniendo una mayor longitud que entre S5-H56 ya que como anteriormente se mencionó sobre las implicaciones del solapamiento y los efectos estéricos, además de tener en cuenta la conformación adquirida hacia el proceso de oxidación para llevar a cabo su actividad catalítica, donde el H56 se observa en dirección de una región de disminución de carga por parte del S5 (pares electrónicos).



*Figura 31. Laplaciano de densidad electrónica. Estructura reducida 2ND0. Plano atómico S5, S43, H56 y H57.*

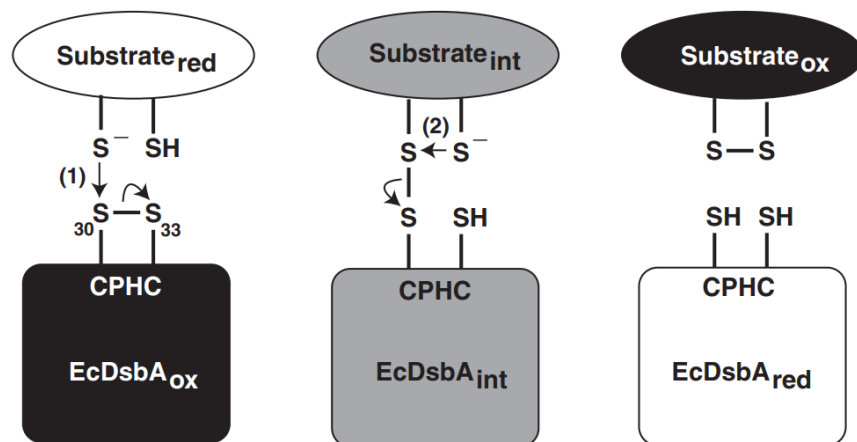


Figura 32. Intercambio Tiol/Disulfuro. (Shouldice et al., 2011)

El resultado de la aplicación de la metodología G3(MP2) para cada uno de los tres sistemas, tanto para sus estructuras oxidadas y reducidas (Tabla 12, 1DI0. Tabla 14, 6ESX. Tabla 16, 2ND0), se muestran en las Tabla 18, así como el cálculo del modelo de solvatación COSMO. Los resultados de la tabla 18 son los requeridos para la aplicación de los ciclos termodinámicos, recordando las correcciones necesarias para la determinación de la energía libre Gibbs.

<b>G3(MP2)</b>	<b>1DL0</b>		<b>6ESX</b>		<b>2ND0</b>	
	Oxidada	Reducida	Oxidada	Reducida	Oxidada	Reducida
<b>E<sub>0</sub>[G3(MP2)] a.u.</b>	-1935.308946	-1937.134924	-1894.168571	-1896.806251	-2161.450061	-2162.510237
<b>E[G3(MP2)] a.u.</b>	-1935.288552	-1937.115581	-1894.146828	-1896.786123	-2161.429664	-2162.490897
<b>G3(MP2) [H] a.u.</b>	-1935.287608	-1937.114637	-1894.145884	-1896.785179	-2161.428720	-2161.489950
<b>G3(MP2) [G°] a.u.</b>	-1935.359696	-1937.183455	-1894.217969	-1896.854219	-2161.500808	-2162.558768
<b>G°(aq) a.u. <sup>b</sup></b>	-1937.965383	-1938.843410	-1897.893780	-1898.654019	-2163.196868	-2164.037286

Tabla 18. Resultados G3(MP2) para las moléculas 1DL0, 6ESX y 2ND0 en estado oxidado y reducido. b) El valor de los modelos de solvatación G°(aq) obtenida con COSMO.

Aplicando las ecuaciones:

$$E_0[G3(MP2)] = QCISD(T)/6 - 31(d) + \Delta E_{MP2} + \Delta E(SO) + E(HLC) + E(ZPE).$$

Recordando que  $\Delta E(SO)$  solo aplica a especies atómicas.

$$\Delta E_{MP2} = [E(MP2/G3(MP2)large)] - [E(MP2(full)/6 - 31G(d))].$$

La corrección  $E(HLC)$  para tener en cuenta las deficiencias restantes del cálculo por medio de  $-An_\beta - B(n_\alpha - n_\beta)$ .

Las unidades de los cálculos se determinan en Hartree (E<sub>h</sub>, H) o unidades atómicas. Se realizan las conversiones necesarias según sus equivalencias; 1H = 627.509391 kcal/mol = 2625.5 kJ/mol = 27.2113845 eV.

### 11.3 Ciclo termodinámico y Potencial Redox.

Se propone el uso de un ciclo termodinámico donde se involucren los cambios de energía entre los estados reducido y oxidado, así como; la pérdida de los protones ( $H^+$ ), el intercambio electrónico ( $e^-$ ), el cambio entre la fase gaseosa y acuosa. Sin olvidar los factores de corrección involucrados.

En el siguiente ciclo propuesto se muestran las especies del enlace disulfuro (estado oxidado) y los residuos con el grupo tiol (estado reducido) formado.

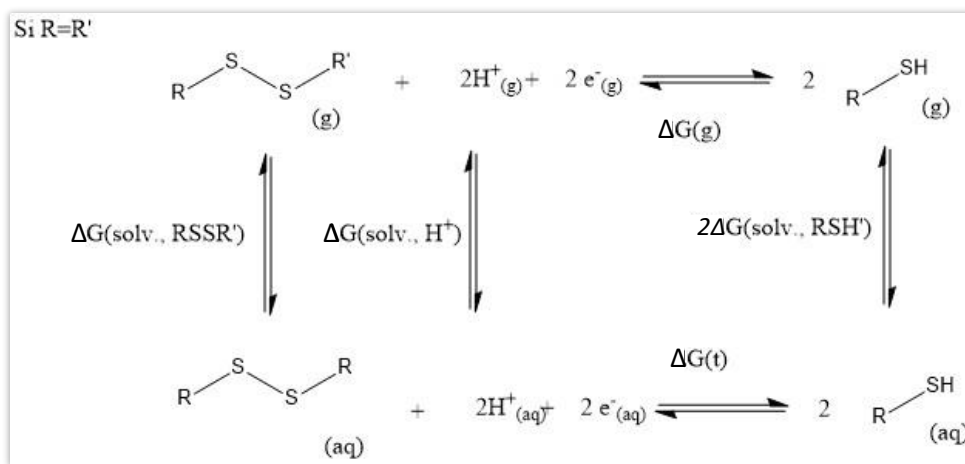


Figura 33. Ciclo termodinámico propuesto para los sistemas analizados. Si  $R=R'$  pertenece a la misma cadena peptídica.

Dado el ciclo anterior se establecen las ecuaciones en la determinación de  $\Delta G(t)$  total.

$$\Delta G^*(t) = \Delta G^\circ(g) + 2\Delta G^*(\text{solv}, RH_2) - \Delta G^*(\text{solv}, R) - 2G^*(\text{solv}, H^+) + \Delta n\Delta G^{\circ \rightarrow *}$$

Los cambios de la energía libre en la fase gas  $\Delta G^\circ(g)$  están dados por los estado reducido y oxidado del cálculo G3(MP2) según el ciclo anterior. Para el electrón libre se utilizó EC (Lias and E., 2021), usando el valor de la capacidad calorífica integrada para el electrón utilizando la estadística de Fermi-Dirac (3.145 kJ/mol, 0.0326 eV), donde la energía y la entropía del electrón es reportada como 3.720 kJ/mol y 22.734 J/mol a 298 K respectivamente. Así como la energía libre de  $H^+(g)$  reportada como -26.3 kJ/mol (*Libro del Web de Química del NIST. Base de Datos de Referencia Estándar del NIST, 2018*).

$\Delta G^*(solv, RH_2)$  y  $\Delta G^*(solv, R)$  son las energías de solvatación de las especies reducida y oxidada respectivamente.  $\Delta G^{\circ \rightarrow *}$  es la corrección para el cambio en el estado estándar con valor de 7.9kJ/mol para cada componente.  $\Delta n$  son los moles de carga intercambiados -2.  $\Delta G^*(solv, H^+)$  con un valor de -1104.6 kJ/mol. (Namazian, Zare and Coote, 2008; Ho *et al.*, 2016)

Los datos obtenidos del método G3(MP2) se muestran en la Tabla 18 donde se obtienen los valores de las energías de los estados reducido y oxidado, así como las energías de solvatación. Estas se utilizan en la ecuación propuesta del ciclo termodinámico para determinar la  $\Delta G^*(t)$ .

Ya que el cambio de energía libre estándar de esta reacción se relaciona con el potencial de reducción absoluto se aplica la siguiente ecuación.

$$E^\circ = -\Delta G^*(t)/nF$$

Siendo  $n$  el número de electrones transferidos ( $n=2$ ) y la constante de Faraday (96485 C/mol). Así obtenido el potencial redox ( $E^\circ$ ) para cada uno de las estructuras analizadas, Tabla 18.

<b>Estructura.</b>	<b>E° (mV).</b>
1DL0.	-383.7066
6ESX.	-287.1187
2ND0.	-127.9896

Tabla 19. Potenciales redox (mV) para las estructuras 1DL0, 6ESXy 2ND0.

Los resultados muestran el potencial estándar de cada una de las especies, donde el potencial mayor obtenido es en 1DL0, esto por ser un grupo de cisteínas vecinales, las restricciones estéricas no favorecen mucho a la estabilidad de sistema llevando a su ruptura. Los siguientes sistemas 6ESX y 2ND0 al ser adyacentes con dos residuos como intermediarios mostraron potenciales menores.

Los residuos con los que se trabajaron (ACCP) en 1DL0, (CGPC) en 6ESX y (CPHC) para 2ND0, muestran un residuo en común, este es al caso de la prolina unido directamente a una de las dos cisteínas ya sea al residuo C-terminal o N-

terminal. Ya que el grupo sustituyente voluminoso de la prolina influye en el proceso de formación de enlace disulfuro, debido a su carácter angular restringido favoreciendo una confirmación específica. Las longitudes obtenidas, por parte del grupo tiol, en relación a la posición de la prolina podrían suponer un carácter más reactivo para el intercambio tiol/disulfuro. En los dos últimos casos la prolina se mantiene como residuo similar. El cambio notorio en la estructura (2ND0) es la histidina que contiene un grupo que sirve como un tipo de ancla en la sujeción de sustrato para lograr llevar un intercambio tiol/disulfuro según la literatura (Shouldice *et al.*, 2011) esto comparado con los datos obtenidos en relación con un potencial menor podría implicar que la formación del enlace se ve favorecida tanto por efectos del residuo vecino como la contribución de los efectos estéricos en la prolina.

La bibliografía cuenta con el dato de potencial redox determinado para 6ESX por ser una tiorredoxina el cual se encuentra en -270mV (Go and Jones, 2013) dando un indicio de la validez de nuestro método utilizado para la determinación del potencial. Tomando a 6ESX como control ya que los resultados pudieran variar para sistemas de gran tamaño.

## 12 Conclusión.

Una ruta alternativa en el cálculo de potenciales redox puede ser establecida por parte de la química computacional ya que las metodologías seguidas nos pueden llevar a resultados un tanto satisfactorios a su determinación. Lo que gracias a un método combinado donde se utilizan cálculo ab initio y correcciones empíricas del mismo, pueden ser permitidos en moléculas de tamaño considerable. Un inconveniente podría estar señalado en los recursos que se pueden adquirir para realizar este tipo de cálculos. La metodología de G3(MP2) se realizó por separado según lo establecido por el método. Teniendo acceso a cálculos completamente independientes donde las deficiencias computacionales pudieron ser un obstáculo a su determinación. Nuestro valor de referencia en el potencial de las tiorredoxinas corresponde a -270mV con una desviación de 17mV del valor calculado.

Ya que el análisis se centró en un tipo específico de disulfuros prohibidos el cual fue el caso de un disulfuro *vecinal* además de disulfuros *inter-helicoidales* (IHD). Se aporta nueva evidencia a este tipo de disulfuros, donde los enlaces se notan desfavorecidos por el posicionamiento tanto de los residuos como los grupos sustituyentes (R) en el esqueleto proteico.

Los ángulos graficados gracias a los diagramas de Ramachandran nos sugieren las regiones donde este tipo de disulfuros pueden estar favorecidos debido a impedimentos en sus rotaciones, donde la prolina es el residuo que dicta la conformación en un péptido para llevar a cabo un enlace disulfuro, ya que al momento de romper el enlace disulfuro en un péptido, este se puede llegar a desnaturalizar, perdiendo su actividad catalítica.

Los análisis de estructuras nos amplían el panorama acerca de la función que llevan a cabo los interruptores redox, ya que las conformaciones adquiridas que nos ofrecen ciertos residuos, nos aportan información para un posible diseño de sistemas con características específicas, donde la formación de un enlace (en este caso disulfuro) pueda intervenir tanto a su inhibición como en la activación del mismo, donde los valores del ciclo redox tior/disulfuro son cruciales para esta formación.



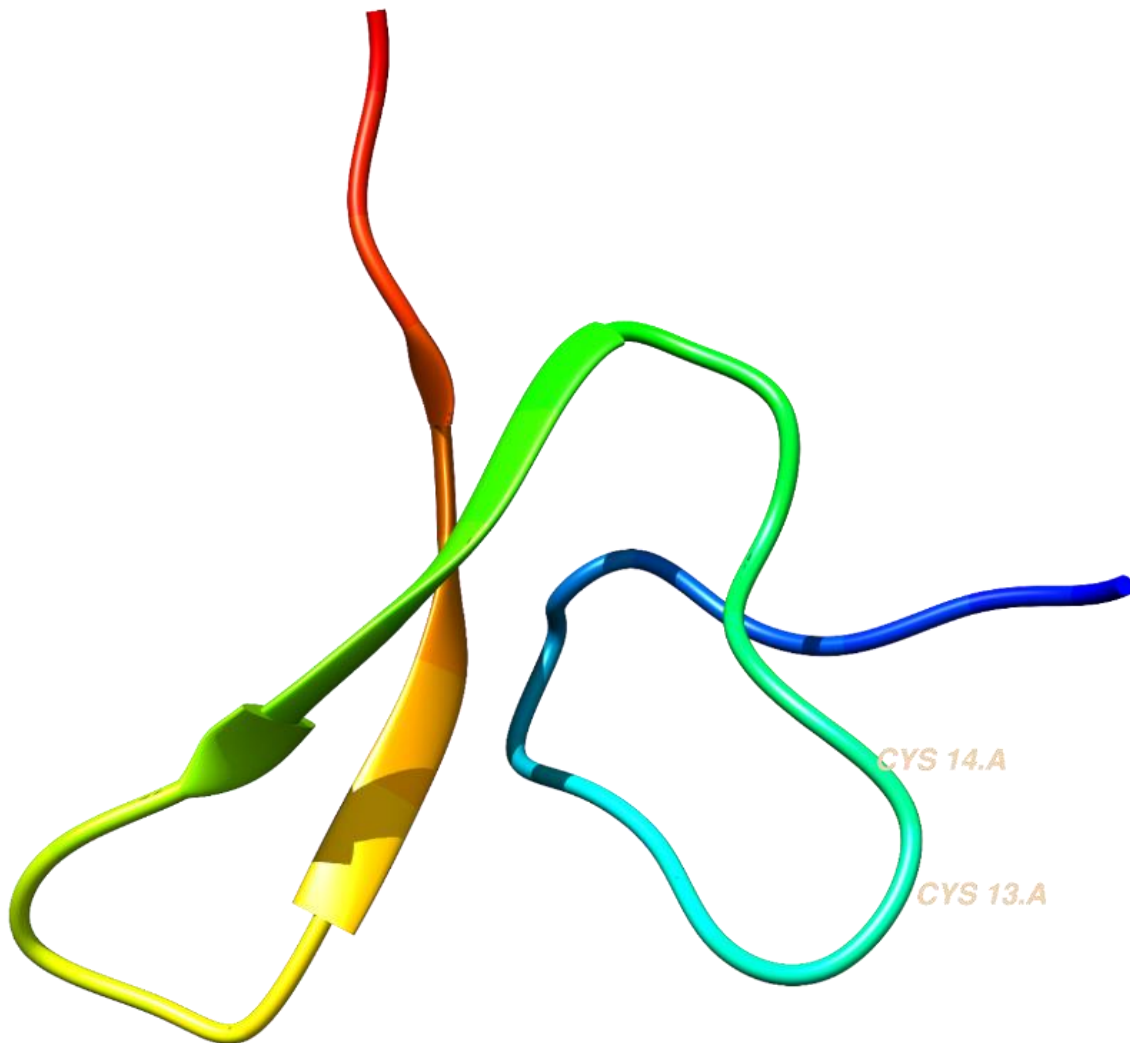
## 13 Anexos

### 13.1 Estructura J-atracotoxin (J-ACTX) (Id-pdb: 1DL0).

Secuencia:

AICTGADRPCA**ACCP**CCPGTSCKAESNGVSYCRKDEP

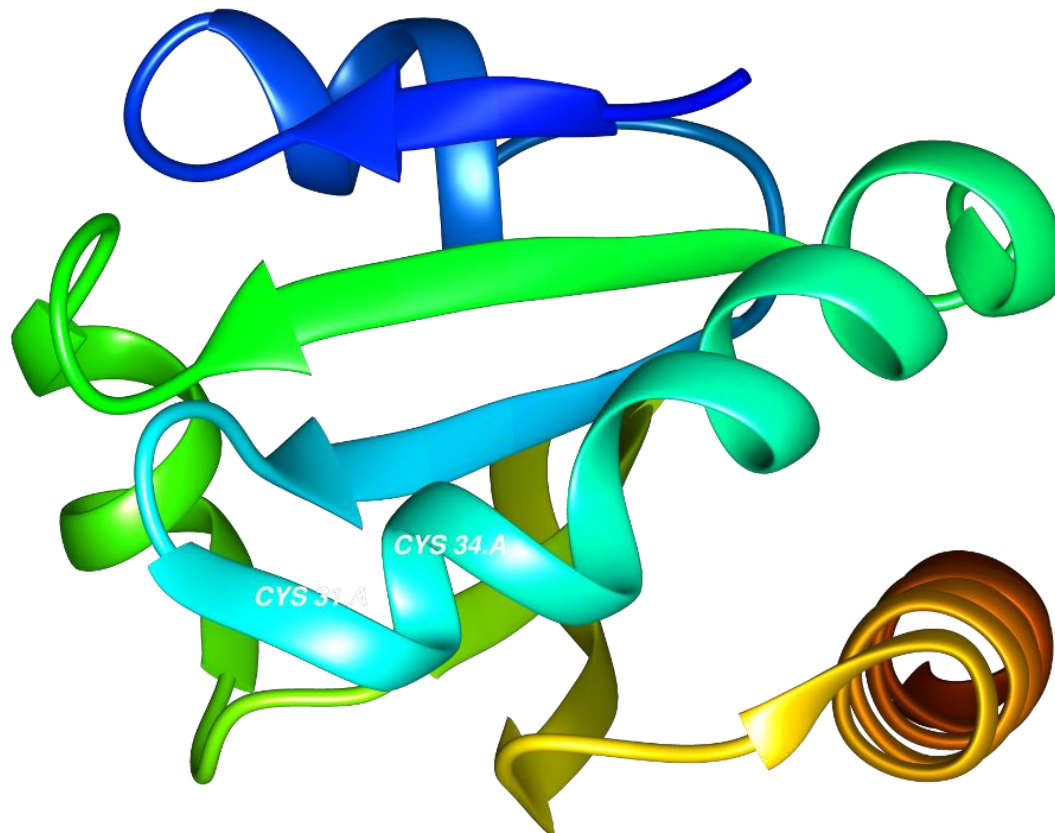
En rojo las cisteínas de análisis



## 13.2 Estructura Tioredoxina (Trx1) (Id-pdb: 6ESX)

Secuencia:

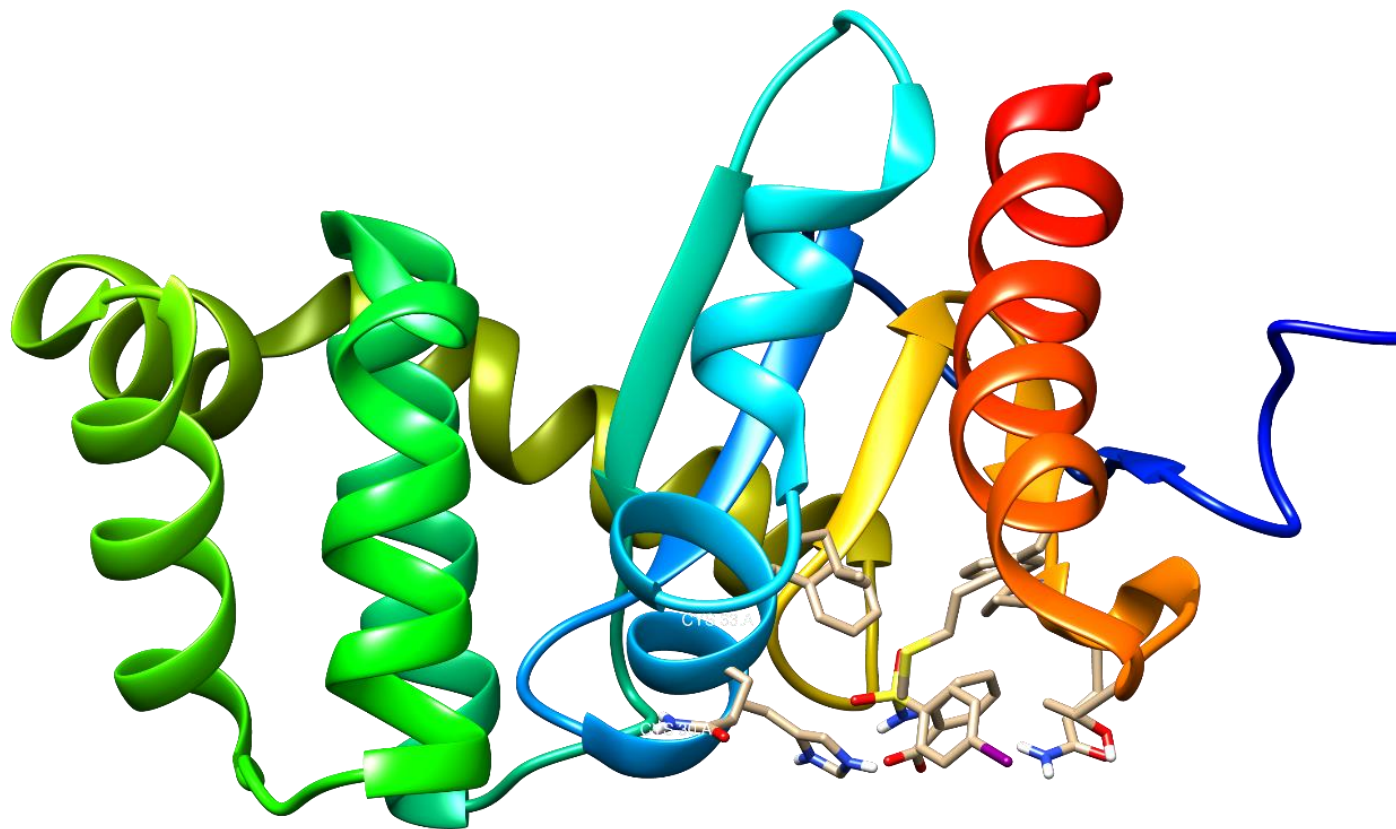
MSTVAVTDATFEADV LKSSKPVLVDFWAEW **CGPC**KQIAPALEQLSEELADVVTIAKVNIEDSPTTPSRYGVRGIPTMMLFRD  
GQMTSMKVGAMPKQKILEWLNEAGVQAALEH



### 13.3 Estructura enzima EcDsbA (Id-pdb: 2ND0)

Secuencia:

AQYEDGKQYTTLEKPVAGAPQVLEFFSFFCPHCYQFEEVLHISDNVKKKLPEGVKMTKYHVNFMGGDLGKDLTQAWAVA  
MALGVEDKVTVPLFEGVQKTQTIRSASDIRDVFINAGIKGEEYDAAWNSFVVKSLVAQQEKAAADVQLRGVPAMFVNGKYQ  
LNPQGMDTSNMDVVFVQQYADTVKYLSEKK



## 14 Referencias.

'Ab Initio Molecular Orbital Calculations' (2003) *Computational Chemistry Using the PC*. (Wiley Online Books), pp. 299–332. doi:

<https://doi.org/10.1002/0471474908.ch10>.

Aran, M. *et al.* (2009) 'Reevaluación de los Residuos cisteína en el señalamiento Redox', *Química Viva*, 8(3), pp. 162–184.

Barone, V. and Cossi, M. (1998) 'Quantum Calculation of Molecular Energies and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model', *The Journal of Physical Chemistry A*, 102(11), pp. 1995–2001. doi: 10.1021/jp9716997.

Bartmess, J. E. (1994) 'Thermodynamics of the electron and the proton', *Journal of Physical Chemistry*, 98(25), pp. 6420–6424. doi: 10.1021/j100076a029.

Brothers, E. N. *et al.* (2007) 'On calculating a polymer's enthalpy of formation with quantum chemical methods.', *The journal of physical chemistry. B. United States*, pp. 13869–13872. doi: 10.1021/jp076975o.

Cemazar, M. *et al.* (2002) 'Oxidative folding intermediates with nonnative disulfide bridges between adjacent cysteine residues', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pp. 0–5. doi: 10.1073/pnas.2225470100.

Cheng, Z. *et al.* (2011) 'Reactivity of Thioredoxin as a Protein Thiol-Disulfide Oxidoreductase', *Chemical Reviews*, 111(9), pp. 5768–5783. doi: 10.1021/cr100006x.

Curtiss, L. A. *et al.* (1998) 'Gaussian-3 ( G3 ) theory for molecules containing first and second-row atoms and second-row atoms', 3. doi: 10.1063/1.477422.

Curtiss, L. A. *et al.* (1999) 'Gaussian-3 theory using reduced Møller-Plesset order Gaussian-3 theory using reduced Mo', 4703, pp. 1–8. doi: 10.1063/1.478385.

Eslami, M., Zare, H. R. and Namazian, M. (2012) 'Thermodynamic Parameters of Electrochemical Oxidation of L-DOPA : Experimental and Theoretical Studies Thermodynamic Parameters of Electrochemical Oxidation of L-DOPA :

Experimental and Theoretical Studies', *J. Phys. Chem*, pp. 12552–12557. doi: 10.1021/jp3054229.

Ferreira, Escalante, M. L. and Tucceri, M. E. (2015) 'Caracterización estructural, espectroscópica y termoquímica del C<sub>2</sub>CL<sub>4</sub> de interés medioambiental.', *Reportes Científicos de la FACEN*, 6(2), pp. 22–31.

Fiel, M. J. (2007) *A practical Introduction to the Simulation of Molecular Systems*. Second Edi. New York, United States of America: The Edinburgh Building, Cambridge. doi: 9780521852524.

Garduño J., J. C. (2017) *ANÁLISIS TEÓRICO DE LA FORMACIÓN DE PUENTES DISULFURO VECINALES*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO.

Gilbert, H. F. (1990) 'Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange.', *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, pp. 69–172. doi: 10.1002/9780470123096.ch2.

Gilbert, H. F. (1995) 'Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfidebond stability', *Methods in Enzymology*, pp. 8–28. doi: 10.1016/0076-6879(95)51107-5.

Go, Y., Chandler, J. D. and Jones, D. P. (2015) 'Free Radical Biology and Medicine The cysteine proteome', 84, pp. 227–245. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.022.

Go, Y. and Jones, D. P. (2013) 'The Redox Proteome \*', 288(37), pp. 26512–26520. doi: 10.1074/jbc.R113.464131.

Groitzl, B. and Jakob, U. (2014) 'Thiol-based redox switches', *BBA - Proteins and Proteomics*. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.03.007.

Ho, J. *et al.* (2016) 'Theoretical Calculation of Reduction Potentials', in Hammerich, O. and Speiser, B. (eds) *Organic Electrochemistry*. 5th Editio, pp. 229–259.

Hogg, P. J. (2003) 'Disulfide bonds as switches for protein function', 28(4), pp. 210–214. doi: 10.1016/S0968-0004(03)00057-4.

- Housecreft, C. E. and Sharpe, A. G. (2006) *Química Inorganica*. 2a Edición. PEARSON EDUCACIÓN, S.A., Madrid, 2006.
- Katzs, B. A. and Kossiakoff, A. (1986) 'The Crystallographically Determined Structures of Atypical Strained Disulfides Engineered into Subtilisin \*', (33), pp. 15480–15485.
- Li, W., Baldus, I. B. and Gräter, F. (2015) 'Redox potentials of protein disulfide bonds from free-energy calculations', *Journal of Physical Chemistry B*, 119(17), pp. 5386–5391. doi: 10.1021/acs.jpcc.5b01051.
- Lias, S. G. and E., B. J. (2021) *Gas-Phase Ion Thermochemistry*. Available at: <https://webbook.nist.gov/chemistry/ion/#TC> (Accessed: 1 March 2021).
- Libro del Web de Química del NIST. Base de Datos de Referencia Estándar del NIST* (2018). doi: 10.18434/T4D303.
- Liebert, M. A., Linke, K. and Jakob, U. (2003) 'Not Every Disulfide Lasts Forever : Disulfide Bond Formation as a Redox Switch TO LIVE WITH OXYGEN IS TO LIVE WITH RADICALS', 5(4).
- Lin, T. Y. and Kim, P. S. (1989) 'Urea Dependence of Thiol-Disulfide Equilibria in Thioredoxin: Confirmation of the Linkage Relationship and a Sensitive Assay for Structure', *Biochemistry*, 28(12), pp. 5282–5287. doi: 10.1021/bi00438a054.
- Liptak, M. D. *et al.* (2002) 'Absolute pK a Determinations for Substituted Phenols', (4), pp. 7314–7319.
- Liu, M. *et al.* (2015) 'Experimental and Theoretical Prediction of The Redox Potential of Dopamine and Its Supramolecular Complex With Glycine', 10, pp. 235–247.
- Manaa, M. R., Fried, L. E. and Kuo, I. F. W. (2016) 'Determination of enthalpies of formation of energetic molecules with composite quantum chemical methods', *Chemical Physics Letters*, 648, pp. 31–35. doi: 10.1016/j.cplett.2016.01.071.
- Mcmurry, J. (2008) *QUÍMICA ORGANICA*. 7A Edición. Edited by S. R. Cervantes

González. Cengage Learning Editores, S.A.

Meir, A. *et al.* (2018) 'Legionella DotM structure reveals a role in effector recruiting to the Type 4B secretion system', *Nature Communications*, 9(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41467-017-02578-x.

Messens, J. (2013) 'Thiol – Disulfide Exchange in Signaling : Disulfide Bonds As a Switch', 18(13), pp. 18–20. doi: 10.1089/ars.2012.5156.

Murray, R. K. *et al.* (2013) *Bioquímica ilustrada*. 29° edición. MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.

Namazian, M., Zare, H. R. and Coote, M. L. (2008) 'Determination of the absolute redox potential of Rutin : Experimental and theoretical studies', 132, pp. 64–68. doi: 10.1016/j.bpc.2007.10.010.

Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2002) *Lehninger Principios de Bioquímica*. Third Edit. New York, United States: W.H.FREEMAN AND COMPANY.

Ochterski, J. W. and Ph, D. (2000) 'Thermochemistry in Gaussian', *Gaussian Inc Pittsburgh PA*, 264(1), pp. 1–19. Available at: [http://www.gaussian.com/g\\_whitepap/thermo/thermo.pdf](http://www.gaussian.com/g_whitepap/thermo/thermo.pdf).

Paulsen, C. E. and Carroll, K. S. (2013) 'Cysteine-Mediated Redox Signaling : Chemistry , Biology , and Tools for Discovery'. doi: 10.1021/cr300163e.

Ragsdale, S. W. and Yi, L. (2011) 'Thiol = Disulfide Redox Switches in the Regulation of Heme Binding to Proteins', 14(6).

'Ramachandran Plot' (2013) *Proteopedia*. doi: 10.14576/381225.1772128.

*RCSB PDB: Homepage* (2021). Available at: <https://www.rcsb.org/> (Accessed: 20 February 2019).

Shouldice, S. R. *et al.* (2011) 'Structure and Function of DsbA, a Key Bacterial Oxidative Folding Catalyst', *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, 14(9), pp. 1729–1760. doi: 10.1089/ars.2010.3344.

Stover, M. L. *et al.* (2012) 'Fundamental Thermochemical Properties of Amino

Acids: Gas-Phase and Aqueous Acidities and Gas-Phase Heats of Formation’.

Takano, Y. *et al.* (2005) ‘Benchmarking the Conductor-like Polarizable Continuum Model (CPCM) for Aqueous Solvation Free Energies of Neutral and Ionic Organic Molecules’, pp. 70–77. doi: 10.1021/ct049977a.

Tomasi, J., Mennucci, B. and Cammi, R. (2005) ‘Quantum mechanical continuum solvation models’, *Chemical Reviews*, 105(8), pp. 2999–3093. doi: 10.1021/cr9904009.

Wang, X. H. *et al.* (2000) ‘Discovery and characterization of a family of insecticidal neurotoxins with a rare vicinal disulfide bridge’, *Nature Structural Biology*, 7(6), pp. 505–513. doi: 10.1038/75921.

Wells, A. F. and Wells, A. F. (1978) *Química inorgánica estructural*. Reverte.

Winget, P., Cramer, C. J. and Truhlar, D. G. (2004) ‘Computation of equilibrium oxidation and reduction potentials for reversible and dissociative electron-transfer reactions in solution’, *Theoretical Chemistry Accounts*, pp. 217–227. doi: 10.1007/s00214-004-0577-0.

Wouters, M. A., Fan, S. W. and Haworth, N. L. (2010) ‘Disulfides as Redox Switches : From Molecular Mechanisms to Functional Significance’, 12(1).

Wouters, M. A., George, R. A. and Haworth, N. L. (2007) ‘“ Forbidden ” Disulfides : Their Role as Redox Switches’, pp. 484–495.

Zeng, Q. *et al.* (2006) ‘Evaluation of the Thermodynamic Data of CH<sub>3</sub>SiCl<sub>3</sub> Based on Quantum Chemistry Calculations’, *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 35(3), pp. 1385–1390. doi: 10.1063/1.2201867.