

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

## Hidrólisis del enlace éster fosfato asistida por compuestos de cobre con ligantes donadores de nitrógeno

#### **TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

### DOCTOR EN CIENCIAS

**PRESENTA** 

### M.C. BRANDON MEZA GONZÁLEZ

TUTOR

DR. FERNANDO CORTÉS GUZMÁN FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, JUNIO DE 2024





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

### DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

## Hidrólisis del enlace éster fosfato asistida por compuestos de cobre con ligantes donadores de nitrógeno

#### **TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

## DOCTOR EN CIENCIAS

**PRESENTA** 

### M.C. BRANDON MEZA GONZÁLEZ

TUTOR

DR. FERNANDO CORTÉS GUZMÁN FACULTAD DE QUÍMICA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, JUNIO DE 2024

# Índice general

Ι	Introducción				
1.	Intr	Introducción			
II	A	ntece	dentes y Planteamiento del Proyecto	7	
2.	Ant	eceder	ntes	9	
	2.1.	Fosfoé	steres	10	
		2.1.1.	Fosfatos de interés bioquímico	11	
		2.1.2.	Mecanismo de hidrólisis de fosfoésteres	12	
	2.2.	Comp	uestos de coordinación de cobre (II)	14	
		2.2.1.	Mecanismo catalizado de hidrólisis de fosfoésteres	18	
	2.3.	Análisis computacional de la reacción de hidrólisis			
		2.3.1.	Dinámica molecular	21	
		2.3.2.	Métodos de muestreo de energía libre	37	
3.	Plai	nteami	ento del Problema y Objetivos Generales	47	
	3.1.	Plante	eamiento del problema	47	
3.2. Objetivos generales					
	3.3.	Hipóte	esis	50	

II	I I	Result	zados y Discusión	51	
4.	Hid	rólisis	de fosfoésteres mediada por un complejo de cobre	53	
	4.1.	Objeti	vos específicos	. 53	
	4.2.	Metod	lología	. 55	
	4.3.	Result	ados	. 56	
		4.3.1.	Optimización del radio de corte	. 56	
		4.3.2.	Obtención de la estructura inicial	. 59	
		4.3.3.	Calibración de parámetros para trayectorias WT–MetaD	. 63	
		4.3.4.	Descripción del mecanismo de hidrólisis catalizada mediante el com-		
			plejo $[Cu(phen)(H_2O)_2]^{2+}$	. 67	
	4.4.	Conclu	usiones parciales	. 85	
5.	Hid	rólisis	de un pesticida asistida por un complejo injerto en una men	n-	
	brana polimérica				
	5.1. Objetivos específicos				
	5.2.	Metod	lología	. 88	
	5.3.	Resultados			
		5.3.1.	Validación de trayectorias QM/MM	. 89	
		5.3.2.	Construcción del modelo de membrana	. 90	
		5.3.3.	Absorción molecular del fosfato en la membrana	. 93	
		5.3.4.	Formación del complejo de fosfato sobre la membrana modificada	. 98	
		5.3.5.	Descripción del mecanismo de hidrólisis catalizada mediante la mem-		
			brana modificada	. 103	
	5.4.	Conclu	usiones parciales	. 108	
IJ	7 <b>(</b>	Concl	usiones y Perspectivas	109	
6.	Con	clusio	nes Globales	111	
7.	Pers	spectiv	/as	113	

$\mathbf{V}$	Referencias	115
VI	Artículo Publicado	143

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Física y Química Teórica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutela del Dr. Fernando Cortés Guzmán. También, parte de este trabajo se realizó en una estancia doctoral en el Departamento de Química de la Universidad de Zürich, bajo la tutela de la Dra. Marcella Iannuzzi.

Dr. Fernando Cortés Guzmán

Tutor

### Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por otorgarme la oportunidad de formar una vida profesional.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM, por la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado.

Al Dr. Fernando Cortés Guzmán por su gran apoyo durante mis estudios de posgrado y su asesoría para realizar este trabajo.

A los integrantes del comité tutor el Dr. Juan Raúl Álvarez Idaboy y el Dr. Rodolfo Gómez Balderas, por su invaluable apoyo durante toda mi formación doctoral.

A cada uno de los sinodales, las doctoras Lena Ruiz Azuara, Noráh Yolanda Barba Behrens, y Margarita Isabel Bernal-Uruchurtu; y a los doctores Juan Raúl Álvarez Idaboy y Joaquín Barroso Flores. Gracias por el tiempo y el apoyo.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología, CONAHCYT, por la Beca Nacional otorgada bajo el número de becario 660455, y por el apoyo con el proyecto CF2019-1561802/2020.

A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación, DGTIC, por el tiempo de cómputo, bajo el proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-194.

A la Profesora Josefina Tenopala García, por su orientación y apoyo en la parte administrativa de mis estudios de posgrado.

Al Profesor Jesús Gumaro Viacobo Flores, por su gran apoyo a los postulantes ante el CONAHCYT.

A los Técnicos María Magdalena Aguilar Araiza, Gladys Edith Cortés Romero y José David Vázquez Cuevas del Instituto de Química, UNAM por la administración de los servicios de cómputo.

A Dalia por acompañarme día con día en todos los momentos de mi doctorado. Gracias, güerita.

## Congresos y Publicaciones

Una sección de los resultados del presente trabajo lograron ser parte del artículo:

■ B. Meza-González, and F. Cortés-Guzmán. "Hydrolysis of ester phosphates mediated by a copper complex", Phys. Chem. Chem. Phys., 2023,25, 18652-18658

Además, este trabajo fue presentado en los siguientes congresos:

- Simposio del Instituto de Química, 2022, México. Póster: Free energy surfaces for the hydrolysis of phosphate ester bond by a copper complex. Brandon Meza González,
   Fernando Cortés Guzmán
- XX Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica, 2022, México. Póster: Free energy surfaces for the hydrolysis of phosphate ester bond by a copper (II) complex. Brandon Meza González, Fernando Cortés Guzmán
- LatinXChem Twitter Conference 2022 Póster: A Free Energy Perspective on the Hydrolysis of Ester Phosphates Mediated by a Copper Complex. Brandon Meza González, Fernando Cortés Guzmán.
- Reunión de Química Inorgánica, CIDETEQ, 2021, México. Póster: Free energy surfaces for the hydrolysis of phosphate ester bond by a copper complex. Brandon Meza González, Fernando Cortés Guzmán
- LatinXChem Twitter Conference 2021. Póster: Free energy surfaces for the hydrolysis of phosphate ester bond by a copper (II) complex. Brandon Meza González, Fernando Cortés.
- Reunión de Química Inorgánica Medicinal. SiQIM, 2021, México Plática: Hydrolysis of Ester Phosphates Mediated by a Copper Complex: A Free Energy Perspective. Brandon Meza González, Fernando Cortés.

# Parte I

Introducción

1

## Introducción

La hidrólisis de fosfoésteres es una reacción química de gran importancia biológica, que está presente en procesos como rutas metabólicas y señalización celular. Esta transformación puede ocurrir de manera espontánea o ser catalizada por enzimas o complejos metálicos. Los detalles del mecanismo de reacción han sido ampliamente estudiados pero no se ha alcanzado un consenso. Por otro lado, algunos compuestos basados en [Cu(1,10-fenantrolina)]<sup>2+</sup> muestran propiedades anticancerígenas relacionadas con la hidrólisis de grupos fosfato. De igual modo, estos complejos han sido empleados en procesos de remoción de pesticidas basados en fosfatos. Por ello, caracterizar en detalle este proceso es crucial para comprender la actividad enzimática, el papel del cobre en compuestos anticancerígenos y el desarrollo de nuevos catalizadores.

En este trabajo se presenta un estudio computacional de la hidrólisis catalizada de

diversos fosfoésteres. Se emplean métodos de dinámica molecular y técnicas de muestreo acelerado para explorar las coordenadas de reacción y describir con detalle el proceso químico.

El texto comienza planteando la problemática. Para este fin, se exponen los antecedentes relevantes sobre la naturaleza química de los fosfoésteres y del complejo metálico seleccionado. Posteriormente, se abordan las generalidades de los métodos computacionales empleados, seguido de la exposición de los objetivos generales del trabajo. Una vez presentado el marco teórico, se procede a presentar los hallazgos.

Los resultados se separan en dos partes. En la primera parte se muestra el estudio de la hidrólisis de nueve moléculas de fosfoéster, mediada por el complejo de cobre  $[Cu(1,10-fenantrolina)(H_2O)]^{2+}$ . El análisis de esta reacción se realiza principalmente usando las superficies de energía libre del proceso, las cuales fueron reconstruidas con la técnica de metadinámica bien templada. Se observó que el mecanismo ocurre a través de diferentes vías según el grado de sustitución del fosfato. Para mono- y di-ésteres se observa un mecanismo concertado, donde un grupo hidroxilo coordinado ataca al átomo de fósforo. Los di- y tri-ésteres forman intermediarios fosforanos antes de cruzar la barrera de reacción. Por otro lado, los tri-ésteres muestran además un mecanismo de esfera externa. Todas estas reacciones proceden con un solo paso lento y un estado de transición similar. En todas ellas, el átomo de cobre participa activando el enlace O=P, enlazándose al átomo de oxígeno.

En la segunda parte del trabajo se propone un modelo de membrana modificada, con actividad catalítica hacia la hidrólisis de fosfoésteres. Sobre esta membrana se injertan complejos de cobre que actúan como catalizadores de la molécula de paraoxón, la cual es un pesticida basado en fósforo. Se estudió la interacción del paraoxón con la membrana modificada y se observó que el mecanismo de reacción del sustrato sigue un mecanismo de esfera externa, similar al de los tri-ésteres con el complejo aislado. A diferencia de la catálisis con el complejo aislado, la presencia de la membrana orienta el ataque nucleofílico por la parte posterior del fosfato. La barrera de energía calculada es menor que con el complejo aislado, y este cambio se atribuye a interacciones estabilizadoras entre sustrato

y la membrana. De este modo, el modelo predice que la membrana mejora la catálisis del paraoxón. Esto abre la pauta para mejorar el diseño de catalizadores soportados.

La investigación computacional aporta información importante sobre este complejo mecanismo de importancia en química y biología. La exploración continua de metodologías computacionales es esencial para elucidar por completo el proceso de hidrólisis catalizada de fosfoésteres. Comprender completamente este mecanismo puede tener grandes implicaciones en la comprensión de la catálisis enzimática y en el diseño de nuevos catalizadores con aplicaciones ambientales.

# Parte II

Antecedentes y Planteamiento del Proyecto

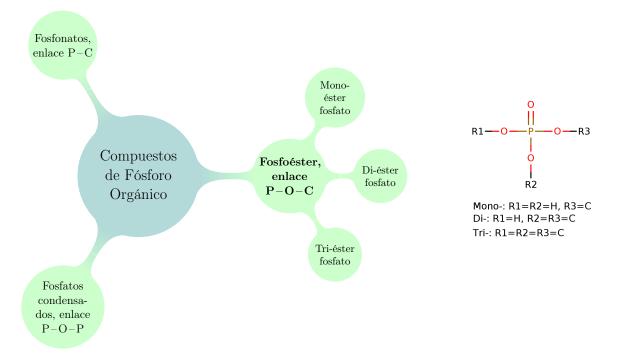
2

## Antecedentes

Los fosfoésteres son compuestos que contienen enlaces del tipo P-O-C, los cuales participan en importantes procesos bioquímicos como rutas metabólicas y señalización celular. La hidrólisis de estos enlaces, conocida como transferencia de fosforilo, es catalizada por enzimas llamadas fosfatasas. Sin embargo, los detalles del mecanismo de esta reacción aún no están totalmente dilucidados. Por ello, se han estudiado complejos de metales de transición, incluidos cobre, para entender y mimetizar la actividad enzimática. No obstante, tampoco existe consenso sobre el mecanismo preciso mediante el cual estos complejos metálicos catalizan la hidrólisis de fosfoésteres. En este trabajo se utilizan métodos computacionales para estudiar la reacción entre un complejo mononuclear de cobre con diversos fosfatos, con el fin de elucidar la trayectoria de energía mínima y el mecanismo detallado de esta transformación química.

### 2.1. Fosfoésteres

Los fosfatos son compuestos que se encuentran presentes en una gran variedad de procesos químicos, desde rutas metabólicas en el cuerpo humano, hasta detergentes y pesticidas. Darch et. al. definen al los compuestos con fósforo orgánico como aquellos que contienen fósforo, carbono e hidrógeno. En la Figura 2.1 es posible observar los tres principales grupos que conforman los compuestos de fósforo orgánico.



**Figura 2.1 :** A la izquierda clasificación de compuestos de fósforo orgánico. A la derecha estructura general de fosfoésteres.

Los fosfoésteres, o ésterfosfatos, son compuestos formados por el remplazo de uno o más grupos hidróxido del ácido fosfórico. Así, estas moléculas se caracterizan por el enlace P-O-C. Estos compuestos reaccionan principalmente mediante procesos de hidrólisis. En los fosfoésteres (FE) las rupturas al enlace P-O son las más comunes, debido a la estabilidad del grupo saliente que se forma. El proceso de hidrólisis de estas moléculas, también llamado transferencia de fosforilo (-PO<sub>3</sub>R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>), cumple diversos roles en procesos bioquímicos. Estas moléculas pueden reaccionar mediante catálisis enzimática o descomponerse mediante ataques nuecleofílicos, lo que les permite ser intermediarios en vías metabólicas

y transducción de señales celulares.<sup>1,5</sup>

En la actualidad se cree que muchas reacciones de transferencia de fosforilo, tanto enzimáticas como no enzimáticas, proceden a través de algún grado de carácter disociativo. Sin embargo, la comprensión del mecanismo de reacción no está del toda clara. En este sentido, conocer el detalle mecanísticos de las reacciones de transferencia de fosforilo, abre la pauta al entendimiento de los mecanismos de reacción enzimáticos.

### 2.1.1. Fosfatos de interés bioquímico

Específicamente, los di-ésterfosfatos son extremadamente resistentes a las rupturas solvolíticas. El ácido fosfórico puede unirse con dos nucleótidos mediante un enlace estable, y mantenerse cargado negativamente en pH fisiológico. Esta carga evita que el enlace éster se hidrolice y mantiene el material genético dentro de la célula. Por ejemplo, los enlaces éster fosfato en el ácido desoxirribonucleico (ADN) tienen una vida media estimada de 30 millones años, a pH 6.8 y 25°C. Basándose en estos datos, se espera que se produzca la hidrólisis de únicamente dos enlaces fosfodiéster en el ADN humano cada semana. Esta cualidad explica el porqué los grupos fosfato aparecen en las cadenas de ácido desoxirribonucleico y ribonucleico (ADN y ARN).

La descomposición del ADN y ARN puede ocurrir a través de dos mecanismos principales: la ruptura oxidativa y la ruptura nucleofílica. La ruptura oxidativa generalmente procede mediante la eliminación de átomos de hidrógeno de las azúcares de los nucleósidos, lo que resulta en el rompimiento de la hebra de ADN. En contraste, la ruptura nucleofílica implica el ataque de un nucleófilo al átomo de fósforo dentro de un grupo fosfo-diéster. Esto conduce a la ruptura de la cadena a través de un estado de transición pentacoordinado, con estructura de bipirámide trigonal. Durante este estado de transición, el nucleófilo que ataca, y el alquilóxido que parte, ocupan generalmente las posiciones apicales. Así mismo, se han estudiado diversos mecanismos de apoptosis celular mediados por complejos metálicos, en los cuales la hidrólisis de la molécula de ADN puede ser el mecanismo de acción de la actividad citotóxica. 10,11

Por otro lado, no existen funciones biológicas ni fuentes naturales que contengan triésterfosfatos. En la actualidad el uso de pesticidas basados en tri-ésterfosfatos es de gran importancia. Por tanto, es esencial reconocer que su aplicación generalizada puede dar lugar a problemas de salud. Estos incidentes pueden ser derivados tanto de la exposición laboral como de la exposición no intencional. <sup>12</sup> Además, la acumulación de estos compuestos en el medio ambiente representa una amenaza ecológica ampliamente reconocida, con consecuencias adversas para los seres humanos y otras especies de mamíferos. <sup>13</sup> Los tri-ésteres son inhibidores irreversibles de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). La AChE es una enzima encargada de hidrolizar la acetilcolina, durante este proceso las células nerviosas transmiten impulsos a otras células nerviosas, musculares o endocrinas. 14 Por esta razón, los síntomas típicos de intoxicación por fosfoésteres son agitación y debilidad muscular, mientras que los más agudos pueden ser paros respiratorios, pérdida de consciencia y la muerte. <sup>15</sup> Por otra parte, las fosfotriesterasas son metaloenzimas que no tienen sustratos naturales establecidos, pero se han desarrollado en bacterias con el propósito de descomponer los enlaces P-O presentes en varios compuestos organofosforados, incluvendo varios pesticidas agrícolas como el paraoxón. En este sentido, ha habido distintos esfuerzos exitosos para conseguir hidrolizar estos pesticidas, empleando metales de transición y sus complejos.<sup>9,16</sup>

### 2.1.2. Mecanismo de hidrólisis de fosfoésteres

La transferencia de fosforilo es el nombre que se le da al mecanismo de reacción en el cual el grupo fosforilo de un fosfato (o anhídrido de fosfato) se transfiere a un nucleófilo. Cuando el nucleófilo es una molécula de agua, el proceso se describe como una hidrólisis. Por ejemplo, en condiciones fisiológicas (pH=7.4, 25°C), 17 el metilfosfato tiene un tiempo de vida media de 500 000 años, respecto a la hidrólisis no catalizada. En la naturaleza, este proceso se lleva a cabo mediante las fosfatasas, las cuales son enzimas que hidrolizan mono-ésterfosfatos, produciendo el ion fosfato como producto. Por otro lado, las enzimas llamadas quinasas producen el proceso opuesto, el cual implica la fosforilación de sustratos. Tanto las fosfatasas como las quinasas son partícipes en procesos de señalamiento celular.

El balance entre la actividad de estos dos tipos de enzimas regula una gran cantidad de procesos bioquímicos, incluyendo procesos metabólicos, transcripción y replicación de ADN, diferenciación celular y respuestas inmunes.<sup>18</sup>

Debido al papel fundamental que desempeñan las reacciones de transferencia de fosforilo en los procesos bioquímicos, se ha dedicado una amplia investigación al estudio de los mecanismos de hidrólisis de FE, catalizados y no catalizados. Se reconocen tres mecanismos principales, i) un mecanismo disociativo, análogo a la sustitución  $S_N1$  y designado por la IUPAC como  $D_N + A_N$ , ii) un mecanismo asociativo o de dos pasos: adición-eliminación, llamado  $A_N + D_N$  y iii) un mecanismo concertado del tipo  $S_N2$ , nombrado como  $A_ND_N$ . Estos mecanismos se presentan en la Figura 2.2.

**Figura 2.2 :** Mecanismos reportados de hidrólisis de un mono-fosfoéster. a) Mecanismo disociativo:  $D_N + A_N$ . b) Mecanismo asociativo:  $A_N + D_N$ . c) Mecanismo concertado:  $A_N D_N$ 

En el mecanismo disociativo el grupo éster actúa como grupo saliente y se separa primero, para que posteriormente el nucleófilo ataque el centro reactivo. Por otro lado, en el mecanismo asociativo la transferencia de fosforilo es un proceso de adición-eliminación, en el cual el nucleófilo se añade en el primer paso y el grupo saliente se separa en el segundo paso. Por último, en el mecanismo concertado el nucleófilo se añade y el grupo saliente se separa en el mismo paso.

En ausencia de catalizadores, los mecanismos por los cuales los fosfoésteres reaccionan dependen de su estado de alquilación o arilación.<sup>6,9</sup> Los monoésteres reaccionan ya sea por un mecanismo disociativo  $(D_N + A_N)$ , o por un mecanismo concertado  $(A_N D_N)$  con un estado de transición laxo.<sup>1</sup> Comúnmente, el mecanismo de adición-eliminación se presenta en reacciones de hidrólisis de di– y tri–fosfoésteres y se especula que este mecanismo ocurre en las fosfatasas.<sup>6,8</sup> Cuando los di–ésteres y tri–ésteres contienen un buen grupo saliente, tienden a reaccionar a través de mecanismos con estados de transición progresivamente más tensos. Esto ocurre hasta el límite de un mecanismo asociativo  $(A_N + D_N)$  que implica un intermediario fosforano cuando están sustituidos con un grupo saliente deficiente.<sup>19</sup>

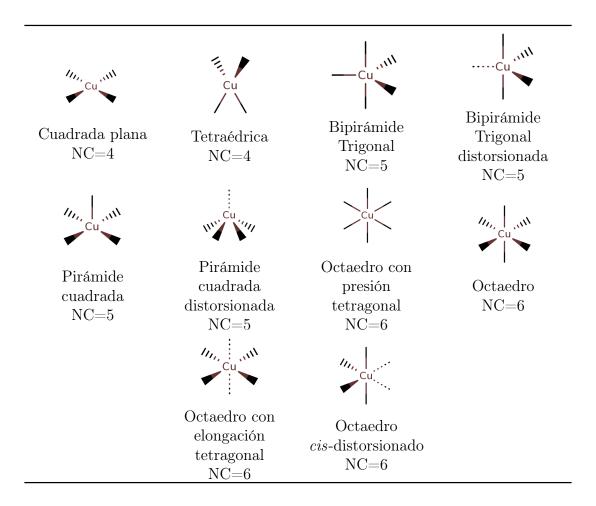
Respecto a su carácter ácido-base, los monoésteres existen como una mezcla de mono y dianiones, ya que su  $pK_a$  está comúnmente al rededor de 7, lo que les permite estar cargados a pH fisiológico.<sup>17</sup>

## 2.2. Compuestos de coordinación de cobre (II)

Los compuestos de Cu(II) son ampliamente utilizados en química de disoluciones. <sup>20</sup> El cobre tiende a formar compuestos paramagnéticos en el estado Cu(II), con configuración d<sup>9</sup>. En estos complejos el número de coordinación (NC) varía de cuatro a seis. Comúnmente, las estructuras con cuatro ligantes forman una geometría de cuadrado plano; con cinco, geometrías de bipirámide trigonal o pirámide cuadrada; y con seis ligantes, la geometría suele ser octaédrica. Estos complejos, a menudo, muestran distorsiones tetragonales. <sup>21</sup> En los complejos de cobre, el efecto Jahn–Teller favorece este tipo de distorsiones. Este efecto aparece en moléculas no lineales simétricas y ocurre cuando el estado fundamental de un sistema tiene varios niveles de energía degenerados. Este arreglo energético suele ser inestable, lo que propicia que el sistema sufra una distorsión geométrica que reduzca la energía de algunos de los estados, eliminando así la degeneración. <sup>20,22</sup> En la Tabla 2.1 se muestran las estructuras más comunes de complejos de cobre (II).

Los complejos de cobre (II) muestran un carácter paramagnético debido a que presentan un electrón desapareado en orbitales 3d. Los ambientes químicos en los que el cobre

**Tabla 2.1 :** Geometrías típicas para compuestos de coordinación de Cu(II), adaptada del trabajo de Tisato *et al.*<sup>23</sup> NC corresponde al número de coordinación.



se encuentra son comúnmente de baja simetría, debido a los efectos Jahn-Teller.<sup>20,24</sup> Las geometrías de complejos de cobre se han caracterizado mediante técnicas experimentales como UV-Vis, EPR o voltamperometrías.<sup>25</sup> Por ejemplo, los complejos de cobre (II) exhiben bandas de absorción características en el espectro visible entre 600-900 nm. Este efecto propicia sus colores característicos azulados. Se ha propuesto mediante cálculos de estructura electrónica que estas transiciones electrónicas ocurren principalmente entre los orbitales d y están influenciadas por la geometría del complejo.<sup>26,27</sup> De igual modo, combinaciones de técnicas como EPR con simulaciones mecano cuánticas se han empleado en el estudio de la estructura electrónica de los complejos de cobre (II), proporcionando

información directa de la geometría y estabilidad de los complejos. <sup>28,29</sup>

Por otro lado, respecto a fuentes naturales de complejos de cobre, existe una amplia variedad de metaloenzimas en plantas y animales que contienen cobre. Estas enzimas desempeñan diversas funciones, como la transferencia de electrones (ejemplos incluyen a la azurina, plastocianina y lacasa), reacciones de oxigenación (como las realizadas por la tirosinasa y ascorbato oxidasa) y de transporte de oxígeno (como en la hemocianina). <sup>23</sup> En estos sistemas el cobre puede estar en diversos estados, como Cu(I)  $d^{10}$ , Cu(II)  $d^{9}$  o Cu(III)  $d^{8}$ . A estas enzimas se les conoce como enzimas de tipo I, II y III, respectivamente.

Las enzimas de cobre de tipo I, también conocidas como proteínas de cobre azul, suelen presentar un centro tetraédrico distorsionado. Esto sucede cuando la enzima es susceptible a procesos de oxidación que generan un estado Cu(II) en el sitio activo. <sup>30</sup> Sin embargo, en el caso de la azurina y la plastocianina, los centros de cobre (I) adoptan una geometría trigonal. Estos sitios de cobre de tipo I experimentan cambios estructurales mínimos durante la interconversión redox. 31,32 Por otro lado, las enzimas de cobre de tipo II muestran diversos ambientes de coordinación de cobre que varían en función de la enzima y su función específica. Las geometrías incluven planos cuadrados, tetraedros, bipirámides trigonales y octaedros. Por ejemplo, en la azurina el cobre(II) adopta una estructura con geometría de bipirámide trigonal, 33 mientras que en enzimas como tirosinasas o catecol oxidasa el cobre adopta una geometría cuadrada plana.<sup>33</sup> Además, estudios computacionales<sup>34,35</sup> han revelado la presencia de átomos de cobre en estados electrónicos entáticos. Un estado entático se refiere a la adaptación geométrica o electrónica de un átomo o grupo al ser incorporado en una proteína, lo que facilita su función específica. Esto sugiere que los átomos de cobre no están limitados únicamente por las restricciones geométricas impuestas por la matriz proteica.<sup>23</sup>

Estos ejemplos pretenden mostrar la diversidad de los sitios reactivos del cobre en enzimas. Resulta complicado entender en su totalidad la relación estructura—reactividad en estos sistemas biológicos. Sin embargo, una comprensión más profunda de la estructura y los mecanismos de reacción en las enzimas logrará dirigir la síntesis de catalizadores metálicos para que mimeticen propiedades enzimáticas específicas. De igual modo, y en

un sentido inverso, el estudio de catalizadores basados en complejos metálicos contribuye al entendimiento de la actividad enzimática. Es por esta razón que en el presente trabajo se propone el estudio de un complejo de cobre que mimetiza la actividad enzimática de hidrólisis de fosfoésteres.

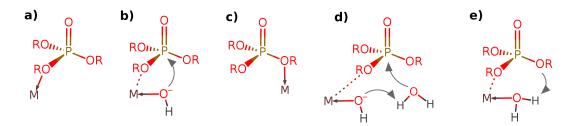
Desde los años setentas, ha habido un esfuerzo considerable en la síntesis de nucleasas artificiales utilizando metales de transición. <sup>36,37</sup> Esto ha llevado a la exploración de complejos metálicos que logren funcionar como catalizadores del rompimiento del enlace ésterfosfato. En este sentido, los átomos de Zn(II) y Cu(II) han sido ampliamente estudiados. Estos metales cuentan con coordinaciones bien establecidas, y en el caso del Cu(II), sus compuestos son fáciles de analizar mediante técnicas espectroscópicas. Además de ser lábiles hacia la sustitución, tanto los complejos de Cu(II) como de Zn(II) logran polarizar los enlaces P-O en sustratos de ésteres de fosfato y activar el centro de fósforo hacia el ataque nucleofílico. <sup>38</sup> Además, los valores de pKa de las moléculas de agua coordinadas al Cu(II) a menudo caen en el rango de pH de 7 a 9, lo que permite que los complejos de estos iones promuevan reacciones hidrolíticas en condiciones fisiológicas o cercanas a fisiológicas. <sup>8</sup>

Se ha dedicado un esfuerzo considerable al empleo de complejos metálicos de cobre en la hidrólisis de FE, gracias a su biocompatibilidad.<sup>8,9,16,19,39-41</sup> Algunos complejos de cobre con ligantes donadores de nitrógeno, incluyendo [Cu(1,10-fenantrolina)]<sup>2+</sup> o [Cu(phen)]<sup>2+</sup>, exhiben propiedades anticancerígenas. Estos compuestos presentan la capacidad de romper el ADN ya sea mediante la hidrólisis nucleofílica de los grupos fosfato o produciendo especies reactivas de oxígeno mediante una reacción de Fenton, en la cual un radical ataca los grupos desoxirribosa.<sup>42</sup> Se sabe que en la estructura de [Cu(phen)]<sup>2+</sup>, el cobre está complejado muy fuertemente con el ligante,<sup>9</sup> además de que esta estructura puede hidrolizar FE.<sup>19,43</sup> Específicamente, puede hidrolizar grupos fosfato que se encuentran presentes en pesticidas basados en fósforo.<sup>44</sup> Por lo tanto, una caracterización detallada de este mecanismo es crucial para comprender la actividad enzimática, el papel del cobre en compuestos anticancerígenos y el desarrollo de nuevos catalizadores basados en cobre.

### 2.2.1. Mecanismo catalizado de hidrólisis de fosfoésteres

Al igual que en la hidrólisis no catalizada, el mecanismo catalizado para la ruptura del enlace P-O ha sido estudiado ampliamente, pero no se ha generado un consenso. Se ha discutido que el mecanismo de hidrólisis puede llevarse de manera similar a la hidrólisis no catalizada<sup>9,19</sup> (ver Figura 2.2), sin embargo, existen diversos tipos de activación que el complejo metálico genera sobre el sustrato.

Según Chin et al., 45 existen tres formas directas de activación de esfera interna, en las cuales un ion metálico puede acelerar la tasa de hidrólisis fosfoésteres. Estos modos se presentan en la Figura 2.3. a) La activación directa presenta una coordinación del oxígeno(s) del fosfato con el metal; b) la activación mediante nucleófilo sucede por la coordinación de un nucleófilo con el metal, para posteriormente atacar al fosfato; c) y la activación del grupo saliente se centra en la coordinación del oxígeno del grupo saliente con el metal. Además, existen dos formas indirectas o de esfera externa: d) Los hidróxidos coordinados al metal podrían actuar como catalizadores de base general intramoleculares; y e) las moléculas de agua coordinadas al metal como catalizadores de ácido general intramoleculares. 46 Además, la interacción electrostática entre átomos no metálicos y el ésterfosfato no coordinado también podría proporcionar un incremento en la velocidad de la hidrólisis. 46,47 Este caso específico puede aparecer en interacciones del tipo enzima—sustrato, o bien membrana—sustrato.



**Figura 2.3 :** Procesos de activación para la hidrólisis de un fosfoéster, asistida por un complejo metálico. a) Activación directa, b) Activación mediante nucleófilo, c) Activación de grupo saliente, d) Activación por base general intramolecular, e) Activación por ácido general intramolecular

Respecto a la hidrólisis enzimática de fosfoésteres, se ha encontrado que las enzimas suelen contener dos o más iones metálicos  $(Zn^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+})$  en proximidad

a sus sitios activos. Sus roles catalíticos han sido discutidos en detalle, proponiéndose principalmente cuatro modos, los cuáles son análogos a los procesos de activación nombrados anteriormente. i) Activación de ácido de Lewis del sustrato a través de la unión  $M^{2+}\cdots O=P$ , ii) liberación de un hidróxido o alcóxido unido al metal que sirve como nucleófilo o base, iii) la estabilización del grupo saliente mediante la coordinación del ion metálico y la iv) estabilización electrostática del sustrato a través de la unión a su sitio activo y la subsecuente disminución de la energía del estado de transición de la reacción. Así, se han diseñado catalizadores que emplean varios, pero rara vez todos estos modos de catálisis con el objetivo de sintetizar nucleasas artificiales de alta eficiencia. 9

Debido a la diversidad de mecanismos de reacción (Figura 2.2) y procesos de activación (Figura 2.3) y mediante los cuales los complejos de cobre pueden hidrolizar fosfoésteres, la química computacional se ha convertido en una herramienta esencial para la elucidación de estas rutas de reacción. Sin embargo, numerosos estudios mecanísticos han convergido en varias observaciones. Por ejemplo, el mecanismo de adición-eliminación  $(A_N + D_N)$  es una vía donde se forma un intermedio pentacoordinado estable (fosforano). La hipótesis experimental indica que algunas reacciones de di- y tri-ésteres de fosfato siguen este paso, y se ha especulado que este mecanismo ocurre en fosfatasas. Se sabe que esta reacción es termodinámicamente favorable. No obstante, tiene una barrera cinética muy alta, lo que hace que la hidrólisis no catalizada sea extremadamente lenta. Las reacciones no catalizadas de mono-ésteres suelen seguir la vía concertada  $(A_N D_N)$ , aunque su confirmación permanece pendiente. 48,49

Es importante destacar que solo la interpretación de datos experimentales, como los resultados de relaciones lineales de energía libre o efectos isotópicos, no justifican enteramente las hipótesis. Se ha sugerido que las transferencias de protones entre el nucleófilo, los átomos de oxígeno fosforilo y el grupo saliente pueden oscurecer tendencias relacionadas con las propiedades del estado de transición. Además, la caracterización cinética directa de estas reacciones no es accesible debido a procesos competitivos y limitaciones experimentales. Por estas razones, los cálculos cuánticos son cruciales para obtener una comprensión mecanística del proceso.

Se han realizado diversos estudios computacionales que caracterizan la reactividad de compuestos de cobre. La reactividad de metalomicelas hacia la hidrólisis de fosfatos se ha estudiado mediante cálculos estáticos DFT.<sup>51</sup> Existen también diversos trabajos en los que se vislumbran los estados de transición de reacciones de hidrólisis del enlace éster fosfato mediante compuestos de cobre binucleares,<sup>52–55</sup> pero los estudios para compuestos mononucleares son escasos.<sup>56,57</sup> En todos estos trabajos, la caracterización también se realiza mediante DFT. Alternativamente, se han estudiado mediante docking y dinámica molecular los sitios de interacción de complejos binucleares de cobre en ADN.<sup>26,10,58</sup>

La elucidación computacional de trayectorias de reacción para los sistemas aquí descritos sigue considerándose incompleta. De igual modo el trabajo previo sobre la hidrólisis de fosfoésteres mediante complejos de cobre es escaso. En la actualidad no existen trabajos computacionales en donde se presenten estados de transición para reacciones de fosfoésteres con complejos mononucleares de cobre. La mayoría de estos trabajos se encuentran enfocados en compuestos biniclueares de cobre y mononucleares de zinc. 56,59,55,52,54,57,60

## 2.3. Análisis computacional de la reacción de hidrólisis

En química computacional, los métodos de muestreo han sido ampliamente utilizados para explorar Superficies de Energía Libre (FES, *Free Energy Surfaces*) que resultan complejas. La exploración de estas superficies proporciona información detallada sobre las trayectorias de reacción y sus perfiles energéticos asociados. <sup>61</sup> Estos métodos son acoplados a propagaciones de dinámica molecular, tanto clásicas como *Ab Initio*. <sup>62,63</sup>

La Metadinámica (MetaD) es un método de muestreo basado en la reconstrucción de la FES para un determinado proceso. Esta reconstrucción se logra mediante la introducción de un potencial de sesgo que actúa sobre grados de libertad específicos, conocidos como variables colectivas (CV, por sus siglas en inglés). Aunque este método es robusto, no hay estudios publicados en donde se utilicen trayectorias de Metadinámica para investigar el mecanismo de hidrólisis de éster fosfatos con cobre. No obstante, numerosos estudios han empleado MetaD en el estudio de la reactividad de complejos metálicos 66-68

y en reacciones de sustitución nucleofílica en moléculas con carbono. <sup>69</sup>

Warshel<sup>70</sup> ha destacado la importancia de la reconstrucción de superficies de energía libre y del análisis de las trayectorias de reacción en el estudio de la hidrólisis de fosfato. Su trabajo presenta el estudio de diversos mecanismos que respaldan observaciones experimentales. Por su parte, Kamerlin y colegas<sup>49</sup> han identificado desafíos en las simulaciones computacionales, las cuales son:<sup>71</sup> (i) la reactividad inherente de los fosfatos y (ii) la capacidad de elucidación teórica de las vías mecanísticas, ya que requiere una suposición a priori sobre la naturaleza de la trayectoria de reacción.

El segundo punto se puede solucionar mediante el uso de MetaD. Esta técnica genera una representación detallada de la ruta de mínima energía (MEP, *Minimum Energy Pathway*) que conecta dos estados metaestables.<sup>72,73</sup> En consecuencia, reduce el sesgo científico al construir automáticamente la coordenada de reacción.<sup>64</sup> La MetaD ofrece ventajas sobre los cálculos estáticos, acelerando el muestreo de eventos poco probables y explorando las regiones de baja energía libre de un sistema. En cambio, los cálculos cuánticos estáticos exploran rutas individuales,<sup>48</sup> lo que puede introducir sesgo en las estructuras iniciales encontradas y en las rutas de mínima energía que siguen las reacciones.<sup>49</sup>

El objetivo de las siguientes secciones es exponer superficialmente los conceptos mínimos necesarios para entender la metodología empleada en este trabajo. Su propósito es únicamente el de contextualizar la elección de los métodos utilizados.

### 2.3.1. Dinámica molecular

La dinámica molecular (Molecular Dynamics, MD), es una metodología computacional con la que es posible estudiar el comportamiento temporal de sistemas moleculares. Las simulaciones de dinámica molecular permiten determinar diversas propiedades termodinámicas, estructurales y de transporte. Propiedades como el coeficiente de expansión térmica, punto de fusión, capacidad térmica, conductividad térmica y función de distribución radial, pueden calcularse directamente a partir de las trayectorias atómicas generadas en las simulaciones. Otras propiedades más complejas pueden obtenerse mediante análisis estadísticos avanzados de los datos atómicos, como posiciones, velocidades, energías y fuerzas, registrados en cada paso de tiempo durante la trayectoria propagada.<sup>74</sup>

En una simulación típica de dinámica molecular se llevan a cabo tres pasos: (1) estimar las fuerzas y calcular la energía potencial en función de las posiciones y velocidades atómicas actuales; (2) actualizar las coordenadas y velocidades atómicas según el algoritmo del integrador; y (3) realizar el postprocesamiento y la visualización a partir de los datos de la simulación.<sup>75,76</sup>

### Dinámica molecular clásica

El enfoque de dinámica molecular clásica implica la utilización de un campo de fuerza que represente de manera continua las interacciones, tanto enlazantes como no enlazantes, dentro del conjunto de átomos.<sup>77</sup> A continuación se enumeran los factores más importantes que se deben considerar al momento de implementar y utilizar simulaciones de dinámica molecular.

Cálculo de fuerzas y uso de campos de fuerzas Para el caso específico de la dinámica molecular clásica, las energías de atracción repulsión entre los átomos se establecen a través del uso de potenciales de interacción definidos, también llamados campos de fuerza (force fields, FF). El cálculo de fuerzas se realiza mediante funciones definidas de energía potencial, las cuales dependen de las posiciones atómicas  $\mathbf{R}_N$  como ilustra la Ecuación 2.1

$$V(\mathbf{R}_N) = V_{\text{enlace}}(\mathbf{R}_N) + V_{\text{no enlace}}(\mathbf{R}_N)$$
 (2.1)

en donde  $V_{\text{enlace}}(\mathbf{R}_N)$  corresponde simplificadamente a:<sup>78</sup>

$$V_{\text{enlace}} = \sum_{\text{enlaces}} k_i^b (r_i - r_{i,0})^2 + \sum_{\text{ángulos}} k_j^{\theta} (\theta_j - \theta_{j,0})^2 + \sum_{\text{diedros}} k_l^{\xi} (\xi_l - \xi_{l,0})^2 + \sum_{\text{diedros}} k_m^{\phi} \left[ 1 + \cos \left( n\phi_m - \phi_{m,0} \right) \right]$$
(2.2)

mientras que  $V_{\text{no enlace}}(\mathbf{R}_N)$  se define por

$$V_{\text{noenlace}} = \sum_{j>i} \left( 4\epsilon_{ij} \left[ \frac{C_{ji}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ji}^{(6)}}{r_{ij}^{6}} \right] + \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right)$$
(2.3)

En la ecuación 2.2 se presentan los términos para el potencial de interacciones de enlace, de ángulos simples y ángulos diedros. Por otro lado, en la ecuación 2.3, el primer término corresponde al potencial de Lennard-Jones, mientras que el segundo término describe las interacciones coulómbicas.

La determinación de la fuerza se realiza a través de la consideración de un modelo de interacciones aditivas por pares.

$$V(\mathbf{r}_1 \dots \mathbf{r}_N) = \sum_{i>j} V(r_{ij})$$
(2.4)

en donde  $r_{ij} = |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|$  es la distancia entre las partículas i y j. Así, la fuerza actuando sobre la partícula i es la suma de todas las contribuciones debido a sus vecinos j. Por tanto, si no hay algún otro campo que interaccione con el sistema, la fuerza que actúa sobre cada partícula se define como

$$\mathbf{F}_{i} = -\frac{\partial V(\mathbf{R}_{N})}{\partial \mathbf{r}_{i}} = m_{i}\ddot{\mathbf{r}}_{i} \tag{2.5}$$

Las fuerzas sobre los átomos pueden calcularse si se conoce el potencial del sistema,

como función de la distancia interatómica. Los potenciales interatómicos se calculan comúnmente de manera empírica, ya sea mediante la teoría de funcionales de la densidad (DFT) o ajustando datos experimentales. Los campos de fuerza utilizados para definir la interacción interatómica enlazada y no enlazada son fundamentales para cualquier simulación atomística.<sup>74</sup>

Uno de los campos de fuerza más populares en la actualidad es el Campo de Fuerza General de Amber (GAFF, por sus siglas en inglés). Está diseñado para ser compatible con los campos de fuerza utilizados típicamente en la química de moléculas orgánicas de interés biológico.<sup>79</sup> El campo de fuerza GAFF proporciona una descripción detallada de las interacciones no enlazantes en moléculas orgánicas, incluyendo parámetros precisos para las interacciones de enlaces de hidrógeno. Contiene además potenciales optimizados para los elementos más comunes en estos sistemas, como carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo y halógenos, y una cantidad limitada de metales de transición y contraiones.<sup>80</sup>

Integración de las ecuaciones de movimiento La ecuación 2.5 representa un conjunto de N ecuaciones diferenciales de segundo orden. Debido al tamaño típico de los sistemas de estudio, es imposible obtener trayectorias de átomos resolviendo este conjunto de ecuaciones de manera exacta. Como resultado, en la simulación de dinámica molecular se emplea el enfoque de diferencias finitas. Para calcular la trayectoria de cada átomo, las ecuaciones de Newton se resuelven numéricamente con pasos de tiempo discretos, llamados timesteps. En primer lugar, a partir del potencial dado, se calculan las fuerzas que actúan sobre todos los átomos. Después, se integran las ecuaciones calculando las aceleraciones de todos los átomos. Posteriormente, se utilizan técnicas de diferencias finitas para determinar las posiciones y velocidades en el tiempo  $t + \Delta t$ . 74

Uno de los algoritmos más empleados es  $velocity\ Verlet,^{81}$  el cual calcula las posiciones  ${\bf r}$  y velocidades  ${\bf v}$  mediante una expansión de Taylor:<sup>82</sup>

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}(t)\Delta t + \frac{\mathbf{F}(t)}{2m}\Delta t^{2}$$
(2.6)

$$\mathbf{v}(t + \Delta t) = \mathbf{v}(t) \frac{\mathbf{F}(t + \Delta t) + \mathbf{F}(t)}{2m} \Delta t$$
 (2.7)

Dado que la segunda ley de Newton es una ecuación de segundo orden, su resolución requiere especificar dos condiciones iniciales: las posiciones iniciales y las velocidades iniciales. Para comenzar una simulación es esencial asignar posiciones y velocidades iniciales a todas las partículas, a través de una distribución de Boltzmann que depende de la temperatura. Además se necesita satisfacer la condición de que el momento lineal total sea cero.<sup>74,83</sup> El conjunto inicial de posiciones y velocidades establece la configuración inicial del sistema, pero cuando la simulación se lleva a cabo correctamente, el estado de equilibrio final no depende fuertemente de las condiciones iniciales.<sup>82</sup>

Elección del paso de tiempo, o timestep Un factor importante en la integración de las ecuaciones de movimiento es el timestep. Un paso de tiempo más pequeño aumenta el costo computacional y, en la mayoría de los casos, mejora la precisión, mientras que un paso de tiempo más grande tiene el efecto contrario. El energy drift se refiere al cambio gradual en la energía total con el tiempo. Este cambio es el resultado de artefactos de integración numérica que surgen al utilizar un paso de tiempo demasiado grande. La energía tiende a cambiar con un incremento de segundo orden, ya que cada paso introduce pequeñas perturbaciones  $\Delta \mathbf{v}$  en el valor real de la velocidad  $\mathbf{v}_{\text{real}}$ , 82 siguiendo la relación:

$$E = \sum m\mathbf{v}^2 = \sum m\mathbf{v}_{\text{real}}^2 + \sum m\Delta\mathbf{v}^2$$
 (2.8)

En la integración numérica se asume que la velocidad, aceleración y fuerza de cada átomo son constantes en cada paso de tiempo.<sup>74</sup> Por lo tanto, el paso de tiempo debe mejorarse tanto como sea posible para acelerar la simulación, manteniendo al mismo tiempo la conservación de energía y la estabilidad de la trayectoria. En este paso de tiempo, los átomos no deben recorrer más de 1/30 de la distancia al vecino más cercano,

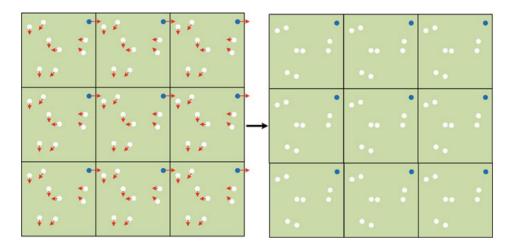
lo que resulta en pasos de tiempo típicos que van desde 0.1 hasta varios femtosegundos.<sup>84</sup> Sin embargo, es importante hacer notar que en las simulaciones de dinámica molecular clásica, el *timestep* no puede ser mayor a la frecuencia más rápida de vibración de enlace en el sistema.<sup>77,74,82,84</sup> Esta vibración típicamente se establece para el enlace O–H, lo cual genera que los pasos de tiempo sean no mucho mayores de 0.5 fs.

Condiciones Periódicas a la Frontera Los sistemas analizados en este trabajo son sistemas en su fase bulto continuo, o *bulk*, donde el volumen de la simulación se ve afectado por un gran número de átomos circundantes (aproximadamente 10<sup>23</sup>). Esta cantidad de átomos no puede incluirse explícitamente en la simulación. La influencia de los átomos vecinos puede considerarse de manera implícita y aproximada mediante un tratamiento especial de las condiciones límites, o condiciones periódicas a la frontera (*Periodic Boundary Conditions*, PBC).<sup>85</sup>

La presencia de bordes definidos es indeseable durante la simulación. Los átomos en los bordes de la caja pueden experimentar fuerzas resultantes muy diferentes en comparación con los del centro, lo que podría llevar a que se desplacen fuera de la celda unitaria y, como resultado, ocasionar cambio en la densidad del sistema.<sup>74</sup> La implementación de PBC ayuda a resolver esta clase de problemas.<sup>82</sup>

La Figura 2.4 muestra una representación de un sistema periódico. Cuando se imponen las condiciones de fronteras periódicas, un átomo que sale de la caja principal de simulación se trata como si estuviera entrando desde el lado opuesto. Así, hay una caja de simulación primaria, seguida de imágenes periódicas. Sólo los átomos dentro de la caja primaria ubicada en el centro se simulan realmente, y todas las imágenes simplemente duplican la caja primaria. La fuerza entre un átomo y su imagen periódica se cancela, y si es necesario, una simple transformación de coordenadas actualiza las ubicaciones de las partículas en la caja de la imagen vecina.<sup>74</sup>

Distancia de corte El empleo de condiciones periódicas genera que cada partícula tenga un número teóricamente infinito de vecinos interactuantes. La energía potencial total de un sistema periódico en una caja cúbica con longitud de lado L se puede expresar



**Figura 2.4 :** Representación de un sistema periódico tratado con PBC, tomado de Verma et al.<sup>74</sup>

mediante la siguiente ecuación:

$$E_{\text{Tot}}^{\text{PB}} = \frac{1}{2} \sum_{i,j,\mathbf{n}}^{'} V\left(|\mathbf{r}_{i,j} + \mathbf{n}L|\right)$$
(2.9)

Aquí, cada átomo analizado se representa con i, mientras que j representa a un átomo vecino. El factor 1/2 asegura que cada par se cuente solo una vez,  $\mathbf{n}$  es un vector de enteros, y la prima sobre la suma indica que para  $\mathbf{n}=0$ , el término donde i=j no debe contarse.

En el caso de interacciones a corta distancia, es razonable realizar una aproximación y limitar el número de interacciones mediante la aplicación de un límite, denominado distancia o radio de corte,  $r_c$ , alrededor de cada partícula. Sin embargo, para interacciones a larga distancia, es necesario tener en cuenta las imágenes periódicas. En términos de la Ecuación 2.9, esto significa que para la parte de corto alcance solo es necesario incluir el término  $\mathbf{n}=0.^{86}$  Así, el límite definido por  $r_c$  forma un vecindario esférico alrededor de cada partícula y en general, si L es el borde más corto de la caja de simulación, entonces  $r_c < L/2.^{74}$  Si esto no ocurre, un átomo puede interactuar tanto con un átomo en la caja principal como con su imagen en la cajas periódicas, lo que resulta en una interacción doble sin significado físico.

Aunada a esta restricción, la convención de la imagen mínima, o  $Minimum\ Image\ Convention$ , es también aplicada. Esta convención establece que el vector de desplazamiento relativo entre el átomo i y j se toma como el más corto de todos los vectores que conectan el átomo i con todas las réplicas periódicas de j. En otras palabras: cada partícula en la simulación interactúa con la imagen más cercana de las demás partículas en el sistema. Esta convención puede aplicarse a potenciales que decaen rápidamente, como el potencial de Lennard-Jones. Sin embargo, es inapropiada para interacciones electrostáticas a distancias más largas.  $^{82}$ 

Un método importante para considerar las interacciones electrostáticas a larga distancia es la suma de Ewald. 88 Funciona dividiendo el sistema en espacios real y recíproco, calculando la energía de interacción en cada espacio y combinando los resultados para obtener la energía total de interacción, considerando todas las imágenes en el sistema. En la actualidad, existen métodos como *Particle-mesh Ewald*, PME, el cual es ampliamente usado por su mejor implementación computacional. 89

Ensambles En la mecánica estadística, al igual que en la termodinámica, el estado del sistema está determinado por varios parámetros de control, algunos de ellos extensivos (por ejemplo, N, el número de partículas) y otros intensivos (por ejemplo, la presión P o la temperatura T). Se conoce como ensamble al conjunto de todas las realizaciones de un sistema, que son compatibles con un conjunto de parámetros de control. 82

El ensamble es una idealización que consiste en considerar un gran número de copias virtuales de un sistema, tomando en cuenta todas a la vez. Cada una de estas copias representa un estado posible en el que el sistema real podría encontrarse, es decir, describe una distribución de probabilidad para el estado del sistema.<sup>90</sup>

Los ensambles más comunes para simulaciones de dinámica molecular son el Microcanónico (NVE), canónico (NVT), isobárico-isotérmico (NPT) y gran canónico  $(\mu VT)$ . La elección del ensamble tiene un impacto en los promedios estadísticos, aunque estas diferencias tienden a disminuir en el límite termodinámico (sistema de tamaño infinito) y son ya relativamente pequeñas para sistemas con algunas centenas de partículas. 82 Ensamble microcanónico En MD, la energía total E y el momento lineal total P son constantes a lo largo de la simulación. En este caso, los promedios de cantidades físicas se calculan en el ensamble microcanónico (NVE). Para un sistema de N partículas que interactúan a través de un potencial de interacción se tiene que la energía total está dada por el Hamiltoniano  $\mathcal{H}$ , el cual es la suma de energía cinética y potencial:

$$\mathcal{H}\left(\mathbf{r}^{N}, \mathbf{p}^{N}\right) = \sum_{i}^{N} \frac{\mathbf{p}_{i}^{2}}{2m_{i}} + V(\mathbf{r}^{N})$$
(2.10)

En mecánica clásica, el estado instantáneo de un sistema está completamente definido por las posiciones ( $\mathbf{r}$ ) y momentos ( $\mathbf{p}$ ) de todas las partículas, y se le denomina comúnmente microestado ( $\Gamma$ ). En tres dimensiones, esto equivale a 6N variables, constituyendo un punto dentro del espacio de fase.

La función de partición clásica en el ensamble microcanónico,  $\Omega_{E,V,N}$  es la integral del espacio fase sobre la hipersuperficie en donde el valor del Hamiltoniano es igual al valor E impuesto para la energía. Esta restricción puede imponerse a través de una función delta,  $\delta$ 

$$\Omega_{E,V,N} = \frac{1}{h^{3N}N!} \int d\mathbf{p}^N d\mathbf{r}^N \delta \left( \mathcal{H} \left( \mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N \right) - E \right)$$
 (2.11)

**Ensamble canónico** El ensamble de estados a  $N,\ V$  y T constante se denomina canónico. La función de partición Q se define como

$$Q_{N,V,T} = \frac{1}{h^{3N}N!} \int d\mathbf{p}^N d\mathbf{r}^N \exp\left[-\beta \mathcal{H}\left(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N\right)\right]$$
 (2.12)

en donde  $\beta=1/(k_BT),$ y $k_B$ es la constante de Boltzmann.

Se puede demostrar que la energía potencial no depende de los momentos del sistema.

La integración analítica sobre el momento da como resultado

$$\int d\mathbf{p}^N \exp\left[-\beta \sum_{i=1}^N \frac{\mathbf{p}_i^2}{2m}\right] = \left[\int dp \exp\left[-\beta \frac{p^2}{2m}\right]\right]^{3N} = \left(\frac{2\pi m}{\beta}\right)^{3N/2}$$
(2.13)

Definiendo la longitud de onda térmica de De Broglie como  $\Lambda$ 

$$\Lambda = \sqrt{\frac{h^2}{2\pi m k_B T}} \tag{2.14}$$

y la integral de configuración como

$$Z(N, V, T) = \int d\mathbf{r}^N \exp\left[-\beta U(\mathbf{r}^N)\right]$$
 (2.15)

es posible escribe la función canónica como

$$Q(N, V, T) = \frac{1}{\Lambda^{3N} N!} \int d\mathbf{r}^N \exp\left[-\beta U(\mathbf{r}^N)\right]$$

$$Q(N, V, T) = \frac{1}{\Lambda^{3N} N!} Z(N, V, T)$$
(2.16)

Por último, la función de partición canónica está relacionada con la energía libre de Helmholtz mediante

$$F = -k_B T \ln Q(N, V, T) \tag{2.17}$$

Lo cual será de utilidad en la siguiente sección, cuando se defina la base conceptual de la metadinámica.

**Termostatos** Desde un punto de vista de mecánica estadística, para imponer una temperatura constante, el sistema debe estar en contacto con un baño térmico. Las simulaciones de dinámica molecular a temperatura constante utilizan enfoques que permiten que algunos átomos absorban la energía adicional del baño mediante diversas técnicas. <sup>74,82</sup> Al elegir un termostato para una simulación de dinámica molecular es importante considerar qué aproximaciones o suposiciones hace para satisfacer la restricción en la temperatura. <sup>82</sup>

Termostato GLE (Generalized Langevin Equation) La mayoría de los termostatos estocásticos no conservan el momento lineal del sistema. Como consecuencia, no pueden reproducir el flujo hidrodinámico. Aún así, esta clase de termostatos han sido ampliamente utilizados. Por ejemplo, el termostato GLE es útil para mejorar el muestreo en el ensamble canónico, incluir efectos cuánticos nucleares de manera eficiente y excitar de manera selectiva algunos modos normales. 92

En este formalismo, en cada paso de tiempo, la velocidad de todas las partículas se corrige mediante una fuerza aleatoria (noise) y se reduce mediante una fricción constante (drag). Adicionalmente, el termostato GLE se ha probado ergódico, y permite además timesteps más largos comparados con termostatos no estocásticos.<sup>82</sup>

### Dinámica molecular Ab Initio

La dinámica molecular Ab Initio (Ab Initio Molecular Dynamics, AIMD) es un tipo de simulación que utiliza los mismos elementos revisados en la sección anterior de dinámica molecular clásica. La diferencia central consiste en los potenciales de interacción que emplea. En este tipo de simulaciones se utiliza una aproximación cuántica para obtener los potenciales de interacción. <sup>93</sup> La idea básica consiste en emplear un método Ab Initio para calcular las fuerzas que actúan sobre los núcleos por parte de los electrones. Estos cálculos de fuerzas se realizan "sobre la marcha" (on the fly) mientras la trayectoria se propaga en términos de la dinámica clásica de los núcleos y de la mecánica estadística. <sup>94</sup> Como resultado, la parte de la estructura electrónica se simplifica resolviendo la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo. La evolución temporal de la estructura electrónica

está determinada y guiada por su dependencia paramétrica con la dinámica clásica de los núcleos.  $^{93}$ 

De manera análoga a la Ecuación 2.5, para los cálculos de AIMD es necesario plantear un conjunto de ecuaciones de movimiento, 93 el cual se definen por

$$M_I \ddot{\mathbf{R}}_I(t) = -\frac{dV(\{\mathbf{R}_I(t)\})}{d\mathbf{R}_I}$$
 (2.18)

Los núcleos de masa M se propagan empleando el potencial de interacción de los electrones del sistema, los cuáles dependen paramétricamente de las posiciones nucleares  $\mathbf{R}$ .

En la dinámica molecular Born-Oppenheimer (BOMD), se emplea la aproximación del mismo nombre para calcular el potencial de interacción mostrado en la Ecuación 2.18. En este trabajo el cálculo se realizó mediante la teoría de funcionales de la densidad, (DFT por sus siglas en inglés). El potencial de interacción se puede obtener mediante el potencial de Kohn y Sham:<sup>93</sup>

$$V(\{\mathbf{R}_{I}(t)\}) = \min_{\phi} \left[ E_{KS}(\{\phi\}; \mathbf{R}) \right]$$
 (2.19)

La energía potencial  $E_{KS}(\{\phi\}; \mathbf{R})$  es minimizada a cada paso de la dinámica molecular, con respecto a los orbitales  $\phi(\mathbf{r})$  bajo la condición de ortonormalidad holonómica:<sup>95</sup>

$$\langle \phi_i(\mathbf{r})|\phi_j(\mathbf{r})\rangle = \delta_{ij}$$
 (2.20)

Esto puede expresarse en un formalismo Lagrangiano de la siguiente manera

$$\mathcal{L}_{BO}\left(\{\phi\}; \mathbf{R}, \dot{\mathbf{R}}\right) = \frac{1}{2} \sum_{I=1}^{N} M_I \dot{\mathbf{R}}^2 - \min_{\phi} \left[ E_{KS}(\{\phi\}; \mathbf{R}) \right] + \sum_{i,j} \Lambda_{i,j} \left( \langle \phi_i | \phi_j \rangle - \delta_{i,j} \right) \quad (2.21)$$

en donde  $\Lambda_{i,j}$  son los multiplicadores de Lagrange asociados, los cuales son necesarios para imponer la restricción en la ecuación.

Resolviendo las correspondientes ecuaciones de Euler-Lagrange<sup>95</sup> se puede obtener las ecuaciones de movimiento asociadas:

$$M_I \ddot{\mathbf{R}}_I(t) = -\nabla_{\mathbf{R}_I} \left[ \left. \min_{\phi} \left[ E_{KS}(\{\phi\}; \mathbf{R}) \right] \right|_{\langle \phi_i(\mathbf{r}) | \phi_j(\mathbf{r}) \rangle = \delta_{ij}} \right]$$
(2.22)

$$0 = -H_e^{KS} \phi_i + \sum_j \Lambda_i, j\phi_j \tag{2.23}$$

en donde  $H_e^{KS}$  es el Hamiltoniano efectivo de una partícula de Kohn y Sham. Por otro lado, existe un enfoque diferente que se basa en la Ecuación 2.19. En lugar de diagonalizar un Hamiltoniano de una partícula, se realiza la minimización restringida directamente, utilizando técnicas de optimización no lineales de manera explícita.  $^{93}$ 

Como consecuencia de la aproximación de Born-Oppenheimer, los subsistemas electrónico y nuclear están completamente desacoplados. Gracias a la separación adiabática, no hay restricciones adicionales sobre el paso máximo de tiempo de integración permitido. Por lo tanto, este puede elegirse hasta el límite de resonancia nuclear. Esto es válido independientemente del *band gap*, lo que permite, en principio, simular directamente los átomos metálicos. <sup>95</sup>

Método GPW (Gaussian and Plane Waves scheme) El código CP2K<sup>96</sup> es un software eficiente de cómputo científico, enfocado específicamente en cálculos AIMD.

En CP2K los cálculos sobre la matriz de Kohn y Sham escalan linealmente, debido al uso de una base local, la cual está construida con una combinación de funciones gaussianas esféricas y contraídas. Por otro lado, la energía coulómbica y de correlación se calcula mediante un conjunto de ondas planas. A este esquema se le conoce como GPW (Gaussian and Plane Waves). <sup>97</sup> La ventaja de la base gaussiana es la naturaleza analítica de todas las

integrales de un electrón, mientras que el esquema GPW evita la necesidad de integrales de cuatro centros y dos electrones en cálculos GGA. El esquema GPW se puede entender como un método de base auxiliar, que representa la densidad mediante una base de ondas planas, o de manera equivalente, en una rejilla equidistante en el espacio real.

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{\alpha\beta} P_{\alpha\beta} \chi_{\alpha}(\mathbf{r}) \chi_{\beta}(\mathbf{r})$$

$$= \sum_{\mathbf{G}} c_{\mathbf{G}} e^{i\mathbf{G} \cdot \mathbf{r}}$$
(2.24)

en donde  $P_{\alpha\beta}$  es la matriz de densidad en la base gaussiana con  $\chi_{\alpha}(\mathbf{r})$  como funciones de base. G representa los vectores de red en el espacio recíproco. Los coeficientes de expansión de onda plana  $c_G$  se obtienen mediante la determinación de la densidad en la malla del espacio real. Las ondas planas, por lo tanto, no forman parte de la base principal, sino que son una representación auxiliar de la densidad. Esta representación permite el uso de técnicas basadas en la transformada de Fourier, para calcular energías y potenciales dependientes de la densidad.  $^{93}$ 

El método GPW requiere una representación de la densidad electrónica en una malla equidistante. La descripción de los electrones del *core* en estas mallas es computacionalmente ineficiente. Sin embargo, para describir fenómenos químicos, puede bastar con tener una descripción exacta solo de los electrones de valencia. Se puede describir correctamente la densidad usando el método GPW mediante un pseudopotencial en el espacio dual. El pseudopotencial GTH consta de dos partes: una parte local que es una función de la distancia entre el núcleo y el electrón, mientras que la parte no local es una función del vector de onda. El pseudopotencial GTH es particularmente útil para sistemas con elementos pesados. Se posedos electrónicas al tiempo que reduce el costo computacional de la simulación. Se

### Dinámica molecular QM/MM

El uso de mecánica molecular (MM, *Molecular Mechanics*) en sistemas biológicos está bien documentado. <sup>101</sup> Sin embargo, con el objetivo de estudiar con más detalle ciertas regiones de sistemas grandes, el uso de cálculos embebidos basados en mecánica cuántica (QM, *Quantum Mechanics*) ha tenido un gran desarrollo. <sup>101–103</sup> Estas metodologías se conocen como cálculos mixtos cuánticos/clásicos, cálculos híbridos o metodologías QM/MM. <sup>104,105</sup>

Una de las clases más empleadas de cálculos QM/MM es la aproximación totalmente atomística. En esta representación una cierta región de átomos QM está embebida en un sistema más grande formado por átomos clásicos.<sup>93</sup>

En el "esquema aditivo" la energía total QM/MM se obtiene mediante la adición de energías cuánticas y clásicas,  $E^{\rm QM}$  y  $E^{\rm MM}$ , respectivamente, y que están acopladas con un término  $E^{\rm QM-MM}$ 

$$E^{\text{QM/MM}} = E^{\text{QM}}(\{\mathbf{R}_{\alpha}\}) + E^{\text{MM}}(\{\mathbf{R}_{\beta}\}) + E^{\text{QM-MM}}(\{\mathbf{R}_{\alpha}\}, \{\mathbf{R}_{\beta}\})$$
(2.25)

en donde las posiciones atómicas de los núcleos clásicos se expresan con  $\mathbf{R}_{\beta}$ , mientras que  $\mathbf{R}_{\alpha}$  se usan para representar las posiciones nucleares de la parte cuántica, incluyendo átomos de unión y centros representados por pseudopotenciales. <sup>93</sup>

En este trabajo, la energía  $E^{\rm QM}$  es calculada mediante DFT utilizando el algoritmo Quickstep de CP2K. Por otro lado, la energía del subsistema clásico se calcula también en CP2K con el driver FIST. Aunque la implementación de campos de fuerza en CP2K pueden no ser tan eficiente como en los códigos especializados para la simulación de biomoléculas o materiales, su flexibilidad resulta útil para sistemas no convencionales y simulaciones QM/MM. CP2K le ofrece un control completo al usuario dentro de un solo código.  $^{96}$ 

El término energético  $E^{\text{QM-MM}}$  contiene todas las contribuciones de enlace y de no enlace presentes entre los subsistemas QM y MM. De manera general es posible separar

las contribuciones en

$$E^{\text{QM-MM}} = E_{\text{enlace}}^{\text{QM-MM}} + E_{\text{no enlace}}^{\text{QM-MM}}$$
 (2.26)

y a su vez

$$E_{\text{no enlace}}^{\text{QM-MM}} = E_{\text{C}}^{\text{QM-MM}} + E_{\text{VdW}}^{\text{QM-MM}}$$
(2.27)

El término  $E_{\rm enlace}^{\rm QM-MM}$  debe introducirse cuando existen interacciones covalentes entre ambos subsistemas. Un esquema que trata este problema es el esquema de "átomos enlazados", como lo es la aproximación IMOMM (Integrated molecular orbital and molecular mechanics). En esta aproximación la parte cuántica se satura electrónicamente mediante el uso de átomos "de tapa" (capping atoms), a menudo átomos monovalentes como el hidrógeno.  $^{106}$ 

En la partición energética de la Ecuación 2.27, el término  $E_{\rm C}^{\rm QM-MM}$  corresponde a la parte electrostática y  $E_{\rm VdW}^{\rm QM-MM}$  a la interacción estérica o de Van der Waals. Este último término encuentra su representación en el campo de fuerzas especificado. 93

El término  $E_{\mathrm{C}}^{\mathrm{QM-MM}}$  puede expresarse de la siguiente forma

$$E_{\mathcal{C}}^{\mathcal{QM}-\mathcal{MM}} = \sum_{\beta \in MM} q_{\beta} \int \frac{\rho(\mathbf{r})}{|\mathbf{r} - \mathbf{R}_{\beta}|} d\mathbf{r}$$
 (2.28)

en donde la carga de los átomos clásicos se representa con  $q_{\beta}$  y  $\rho(\mathbf{r})$  es la densidad electrónica total del sistema cuántico (electrónica más nuclear).

Debido a la naturaleza de las simulaciones QM/MM el problema conocido como *spill-out* o desbordamiento electrónico es una situación común. El desbordamiento electrónico sucede cuando la densidad electrónica cuántica interacciona a una distancia demasiada corta de los átomos clásicos, puesto que estos se simulan como cargas puntuales. <sup>105</sup> Con el objetivo de resolver la problemática, se empleó el método GEEP (*Gaussian Expansion of* 

the Electrostatic Potential), el cual representa la carga de los átomos MM como una densidad de carga, que interacciona de una manera congruente con los electrones cuánticos. <sup>107</sup> La Ecuación 2.29 describe las interacciones electrostáticas entre ambos subsistemas.

$$v_{\beta}(\mathbf{r}, \mathbf{R}_{\beta}) = \sum_{N_g} A_g \exp\left[-\left(\frac{|\mathbf{r} - \mathbf{R}_{\beta}|}{G_g}\right)^2\right] + R_{\text{low}}(|\mathbf{r} - \mathbf{R}_{\beta}|)$$
(2.29)

En esta representación, el potencial coulómbico está suavizado (lo cual vuelve a los cálculos más eficientes) y se expresa como una suma de  $N_g$  funciones gaussianas con ancho  $G_g$  y amplitud  $A_g$ . La función  $R_{\text{low}}(|\mathbf{r} - \mathbf{R}_{\beta}|)$  se conoce como función residual, la cual sirve para ajustar correctamente el potencial calculado. Estos parámetros han sido ajustados por Laino y colaboradores<sup>107</sup> e implementados en CP2K. El algoritmo admite un acoplamiento electrostático completo entre la distribución de carga QM y las cargas puntuales clásicas mediante una técnica de malla múltiple altamente eficiente. <sup>108</sup>

Por último, con el objetivo de considerar las condiciones periódicas en sistemas QM/MM, se emplea un método de desacoplamiento—reacoplamiento de Blöchl. <sup>109</sup> El método desacopla imágenes periódicas del subsistema cuántico mediante el uso de cargas puntuales derivadas de la densidad. Posteriormente se aplican las condiciones periódicas y el subsistema QM se reincorpora a la simulación. Esto produce que el sistema en su totalidad sea simulado con condiciones periódicas, evitando interacciones artificiales entre las partes QM y MM.

### 2.3.2. Métodos de muestreo de energía libre

En un proceso químico la escala temporal del suceso depende directamente de la topología de la superficie de energía libre. Según la teoría del estado de transición, el tiempo necesario para superar una barrera de energía libre sigue una relación exponencial con su altura. Esto sugiere que superar una barrera de reacción alta, es un evento con una baja probabilidad de ocurrir. En una dinámica molecular convencional los intervalos de tiempo que se simulan suelen ser mucho más cortos que los necesarios para observar

cambios químicos con barreras de reacción altas. Es por esto que es necesario el uso de métodos de muestreo de energía libre.

### Metadinámica

La metadinámica pertenece a una familia de métodos diseñados para mejorar el muestreo de la superficie de energía y reconstruir la distribución de probabilidad en función de una o algunas variables colectivas predefinidas. Debido al uso de estas variables colectivas (CV), el algoritmo está basado en una disminución de la dimensionalidad del sistema. <sup>111</sup>

La principal ventaja del algoritmo de metadinámica es su capacidad para construir automáticamente la superficie del proceso, sin necesidad de conocer previamente el perfil de energía libre, minimizando así la intervención del usuario. El algoritmo guía al sistema para iniciar explorando las regiones de baja energía libre. 112 Esto resulta importante debido a la posible existencia de múltiples intermediarios y productos en una superficie de energía libre. Además, estos estados pueden ser desconocidos por motivos cinéticos o entrópicos. 113 Por lo tanto, este método es útil tanto para reconstruir la superficie de energía libre de un proceso como para acelerar la ocurrencia de eventos atípicos en la dinámica molecular.<sup>72</sup> Sin embargo, para obtener resultados significativos, se deben cumplir ciertas condiciones. La elección de las variables colectivas apropiadas es el paso crucial de todo el procedimiento, y es aquel en el que el conocimiento sobre el sistema debe ser aprovechado al máximo. Estas CV deben diferenciar claramente entre reactivos y productos, así como entre estados de transición e intermedios de reacción metaestables. 112 de este modo el conjunto de CV elegidas debe ser finito. Definimos  $\mathbf{s}(\mathbf{R})$  como el conjunto de variables colectivas que dependen de las posiciones atómicas del sistema y que en la práctica pueden definir, longitudes y ángulos de enlace, diedros, números de coordinación, diferencias entre distancias, raíz del error cuadrático medio de las posiciones atómicas o RMSD, entre otros.

$$\mathbf{s}(\mathbf{R}) = (s_1(\mathbf{R}), s_2(\mathbf{R}), \dots, s_d(\mathbf{R})) \tag{2.30}$$

Definidas las CV, es posible reescribir la función de partición canónica presentada en la Ecuación 2.16 en términos de  $\mathbf{s}(\mathbf{R})$  y considerando las coordenadas nucleares

$$Q_{\mathbf{s}}(N, V, T, \mathbf{s}) = \frac{1}{\Lambda^{3N} N!} \int d\mathbf{R} \exp\left[-\beta U(\mathbf{R})\right] \left(\prod_{i} \delta\left[\mathbf{s}_{i}(\mathbf{R}) - \mathbf{s}_{i}\right]\right)$$
(2.31)

en donde la  $\delta$  de Dirac selecciona todas las configuraciones microscópicas correspondientes a un valor específico  $\mathbf{s}_i$  en las variables colectivas. Considerando la relación entre la energía libre F y la función de partición canónica, expresada en la Ecuación 2.17 es posible obtener

$$F(\mathbf{s}) = \ln \left[ \int d\mathbf{R} \exp\left[-\beta U(\mathbf{R})\right] \left( \prod_{i} \delta\left[\mathbf{s}_{i}(\mathbf{R}) - \mathbf{s}_{i}\right] \right) \right] + C$$
 (2.32)

en donde C es una constante arbitraria.

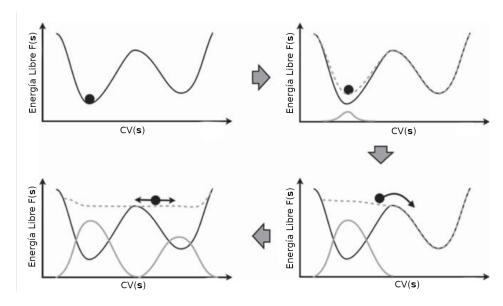
En la metadinámica, la superficie de energía libre es reconstruida recursivamente, iniciando desde el mínimo del pozo de energía. Esto se lleva a cabo mediante la adición de un potencial repulsivo gaussiano,  $V_G(\mathbf{s},t)$ , que actúa sobre las variables colectivas y que tiene como objetivo llevar al sistema a explorar una porción más grande del espacio de configuraciones.<sup>72,114</sup>

$$V_G(\mathbf{s}, t) = W \sum_{\substack{t' < t \\ t' = \tau_G, 2\tau_G, \dots}} \exp\left(-\sum_{i=1}^d \frac{(\mathbf{s}_i(\mathbf{R}) - \mathbf{s}_i((\mathbf{R}(t')))^2}{2\sigma_i^2}\right)$$
(2.33)

En la Ecuación 2.33 se observa que el potencial gaussiano está centrado en puntos del espacio de las variables colectivas. Tienen un ancho definido,  $\sigma$  y una altura W y están siendo depositado cada  $\tau_G$ . Si las gaussianas son extensas, la superficie de energía libre se explorará rápidamente, pero el perfil reconstruido se verá afectado por errores significativos. En cambio, si las gaussianas son pequeñas o se colocan con poca frecuencia,

la reconstrucción será más precisa, aunque tomará más tiempo.  $^{72}\,$ 

En la Figura 2.5 se presenta una esquematización del proceso de metadinámica. Primero, el sistema evoluciona mediante una dinámica molecular convencional, luego se deposita un potencial gaussiano representado en la imagen con una línea gris sólida. Esta adición lleva al sistema a un estado de más alta energía, modificando la FES. Sin ningún potencial impuesto, el sistema tendría una probabilidad muy baja de atravesar esa barrera energética. Después de un tiempo, la suma de potenciales gaussianos llena el primer estado metaestable y el sistema se mueve al segundo mínimo en la superficie. Después de esto, el segundo mínimo se llena. En este punto, la superficie del sistema evoluciona en una meseta energética. 114



**Figura 2.5 :** Representación pictórica del proceso de metadinámica. El sistema es simbolizado por un círculo negro. Adaptado de Bussi *et al.*<sup>114</sup>

La suma del potencial depositado, representado por el perfil gris sólido en el último recuadro, proporciona una primera estimación del perfil de energía libre. La suposición básica en metadinámica es que el potencial impuesto  $V_G(\mathbf{s},t)$  converge a la superficie de energía libre del sistema:

$$\lim_{t \to \infty} V_G(\mathbf{s}, t) = -F(\mathbf{s}) \tag{2.34}$$

La veracidad de la relación 2.34 se ha demostrado empíricamente mediante pruebas extensas en modelos simplificados<sup>64</sup> y mediante comparaciones con resultados obtenidos con otros métodos de energía libre en sistemas complejos. <sup>115,116</sup> También se ha demostrado formalmente que la superficie de energía libre reconstruida es una estimación verdadera de la energía libre real. <sup>116</sup> Se ha definido, tanto empírica como teóricamente, <sup>117</sup> que el error en el perfil reconstruido ( $\epsilon$ ) está determinado por el cociente w, definido entre la altura de la gaussiana y el tiempo de deposición ( $w = W/\tau_G$ ).

$$\epsilon \propto \sqrt{\frac{\omega}{\beta}}$$
 (2.35)

De este modo, el error en la reconstrucción de la FES crece a medida que aumenta la altura de la gaussiana y los intervalos entre las deposiciones de potencial se hacen más cortos.

### Metadinámica Bien templada (WT-MetaD)

En contraste con las ventajas ya descritas, la metadinámica presenta dos inconvenientes principales:

- 1. En una sola simulación, el potencial impuesto  $V_G$  no converge exactamente al perfil de energía libre, más bien oscila alrededor de él. Este hecho tiene dos consecuencias:
  - a) El potencial impuesto puede empujar al sistema hacia regiones de alta energía en el espacio de CV, en donde aparecen configuraciones termodinámicas irrelevantes del proceso.<sup>114</sup>
  - b) Decidir cuándo detener una simulación se vuelve un problema complicado. Sin embargo, como regla general, se puede decir que si se utiliza la metadinámica para encontrar el punto de silla más cercano, debe detenerse tan pronto como el sistema salga del mínimo.<sup>73</sup>

2. Identificar un conjunto de CV apropiado para describir la superficie de energía libre puede ser un proceso muy complejo, dependiendo del sistema de estudio.

Para solucionar el primer problema, se ha desarrollado el formalismo de metadinámica bien templada, o Well-Tempered Metadynamics (WT-MetaD). En esta metodología la tasa de deposición del potencial gaussiano disminuye con el tiempo de simulación. Esto se logra utilizando una expresión diferente para la altura del potencial  $V_G$ , la cual depende del tiempo y de un parámetro  $\Delta T$ , los cuales se definen por el usuario. 65,114

$$W(t) = W_0 \exp\left(-\frac{V(\mathbf{s}(\mathbf{R})), t}{k_B \Delta T}\right)$$
(2.36)

La Ecuación 2.36 implica que se agregan gaussianas de diferentes alturas en diferentes regiones del espacio de CV. Sobre pozos profundos, donde ya se ha acumulado un potencial considerable, las gaussianas adicionales tendrán una altura pequeña. En contraste, en el borde de la región explorada, donde el potencial todavía es pequeño, las gaussianas adicionales tendrán una mayor altura. Así, en el límite de un tiempo extendido, el sistema pasa más tiempo en las regiones donde se utilizan gaussianas más pequeñas, es decir, sobre pozos más profundos. También, es posible advertir que la tasa de deposición disminuye como 1/t. De esta forma, la dinámica de todas las variables microscópicas avanza progresivamente hacia el equilibrio termodinámico durante la simulación.  $^{73}$ 

En esta metodología, a diferencia de en MetaD (Ecuación 2.34), el potencial impuesto converge a una fracción  $\frac{T}{T+\Delta T}$  de la energía libre

$$\lim_{t \to \infty} V_G(\mathbf{s}, t) = -\frac{T}{T + \Delta T} F(\mathbf{s}) + C \tag{2.37}$$

en donde C es una constante arbitraria. En WT–MetaD es necesario emplear un factor de escala  $\gamma = \frac{T+\Delta T}{T}$  conocido a priori, con el objetivo de cruzar las barreras de energía existentes en la FES.<sup>114</sup> Esta estimación se hace considerando que la barrera de energía

más alta en el sistema es del orden de

Barrera más alta esperada 
$$\approx k_B \Delta T$$
 (2.38)

Esta característica de es de gran ventaja, ya que limita la exploración del espacio de CV solo a regiones de energía libre que resulten de interés. De hecho, al fijar la magnitud  $\gamma$  a la altura típica de la barrera de energía para el problema en cuestión, se evita superar barreras mucho más altas, disminuyendo el tiempo de cómputo.

Además, a diferencia de MetaD, en WT–MetaD el potencial converge a su valor límite en una sola simulación. En límite de un tiempo extendido, el sistema explorará la distribución canónica sesgada:

$$P(\mathbf{s}) \propto \exp\left[-\frac{F(\mathbf{s}) + V_G(\mathbf{s}, t)}{k_B T}\right] \propto \exp\left[-\frac{F(\mathbf{s})}{k_B (T + \Delta T)}\right]$$
 (2.39)

en donde las CV exploran el ensamble canónico a una temperatura efectiva  $T+\Delta T$  mientras que las otras variables microscópicas son muestreadas a una temperatura T usando el termostato impuesto en la trayectoria de MD.<sup>114</sup>

### Integración termodinámica

Al igual que en MetaD, la integración termodinámica (TI) es un método que emplea CV con el objetivo de muestrear una región específica de la superficie de energía libre. La técnica TI es empleada para reconstruir la FES mediante el uso de restricciones atómicas.<sup>82</sup>

Comúnmente, en simulaciones tradicionales de MD se utilizan restricciones geométricas para congelar vibraciones rápidas en los enlaces y así poder usar timesteps más grandes. Este tipo de restricciones son menos importantes en simulaciones AIMD. Sin embargo, en la integración termodinámica, las restricciones son cruciales. El método de ensamble Blue Moon o "dinámica con coordenadas de reacción restringida" permite calcular el potencial de fuerza media (PMF) y la ruta de energía libre en función de una restricción elegida. 118, 119

Las conformaciones correspondientes a valores grandes de  $F(\mathbf{s})$  tienen baja probabilidad de ocurrir. Esta es una observación muy importante en términos de eficiencia numérica. En la región de transición, por ejemplo, la energía libre es máxima y típicamente se obtienen muy pocos puntos de muestra durante la simulación de dinámica molecular.  $^{120}$ 

Las diferencias en energía libre entre dos estados pueden ser obtenidas directamente de la fuerza promedio sobre las restricciones:

$$\Delta F(\mathbf{s}) = F(\mathbf{s}_1) - F(\mathbf{s}_0) = \int_{\mathbf{s}_0}^{\mathbf{s}_1} \left( \frac{\partial F}{\partial \mathbf{s}} \right) d\mathbf{s}$$
 (2.40)

De esta forma es es posible calcular  $\left(\frac{\partial F}{\partial \mathbf{s}}\right)$  reconociendo que es igual al promedio estadístico:<sup>82</sup>

$$\left(\frac{\partial F}{\partial \mathbf{s}}\right) = \left\langle\frac{\partial \mathcal{H}}{\partial \mathbf{s}}\right\rangle_{\mathbf{s}}$$
(2.41)

El subíndice s indica que el promedio se calcula para un valor fijo de s, es decir, en un punto dado de la FES. Tal promedio corresponde a una fuerza promedio que actúa sobre la coordenada de reacción s.

El método del ensamble *Blue Moon* implica realizar simulaciones con un valor fijo de s en regiones relevantes entre  $s_0$  y  $s_1$ . Esto se logra aplicando una fuerza que restringe a s. El promedio estadístico de esta fuerza permiten recuperar la derivada de la energía libre,  $\partial F/\partial s$ .

Además, se puede demostrar que

$$\left\langle \frac{\partial \mathcal{H}}{\partial \mathbf{s}} \right\rangle \approx \langle \lambda \rangle$$
 (2.42)

en donde  $\lambda$  es un multiplicador de Lagrange que se puede conseguir directamente de outputs de CP2K<sup>96</sup> y se iguala a su vez a la fuerza de restricción. Esto significa que la

fuerza de restricción es una medida directa de la derivada de la energía libre.

Esta técnica permite, en principio, obtener buenos muestreos incluso en regiones raramente visitadas, proporcionando un control eficiente sobre el error estadístico. Sin embargo, el sistema debe prepararse de manera que s tenga el valor deseado y se debe realizar equilibración del sistema en este valor. Además, no siempre es evidente cuántos puntos se necesitan para calcular la integral de la Ecuación 2.40.

Una consideración importante es que podría ser difícil identificar todas las conformaciones relevantes del sistema con s fijo, ya que pueden existir múltiples trayectorias que conectan dos estados A y B. Si bien suele ser fácil para el sistema entrar en una u otra trayectoria cuando está cerca de A o B, cambiar en medio de la trayectoria suele ser muy difícil. Esto quiere decir que si se comienza una simulación con una configuración en una trayectoria, es improbable que el sistema cruce para explorar conformaciones asociadas con otra trayectoria. 120

Con la información presentada en esta sección, se cubrieron los puntos más generales de la metodología empleada en este trabajo. Su exposición tiene como objetivo justificar la elección de las herramientas computacionales utilizadas.

3

# Planteamiento del Problema y Objetivos Generales

### 3.1. Planteamiento del problema

La hidrólisis de fosfoésteres es una reacción importante que desempeña un papel fundamental tanto en procesos enzimáticos como no enzimáticos, incluyendo la ruptura de ADN y la degradación de pesticidas fosforados. Se ha demostrado que uno de los mecanismos por el cual ciertos complejos metálicos generan apóptosis celular, es precisamente la hidrólisis del ADN. Así mismo, los pesticidas basados en fósforo, y en particular los basados en fosfo—triésteres, son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, lo cual los posiciona como agentes tóxicos para el ser humano. Aunque es una reacción ampliamente estudiada, los detalles mecanísticos precisos, sobre todo para complejos de cobre, siguen siendo motivo

de debate. Para contribuir a la discusión, se analizará la hidrólisis catalizada de mono-, diy tri-fosfoésteres mediada por el complejo de cobre (II)  $[Cu(1,10-fenantrolina)(H_2O)_2]^{2+}$ . Al conocer detalladamente el proceso de hidrólisis catalizada de fosfoésteres, se espera entender el rol del catalizador y así mejorar su diseño en futuras investigaciones.

### 3.2. Objetivos generales

Este trabajo tiene como objetivo aplicar técnicas computacionales de muestreo acelerado en el estudio de la hidrólisis catalizada de fosfoésteres. En esta sección se presentan los objetivos generales del proyecto, mientras que en las Secciones 4.1 y 5.1 se describirán los objetivos específicos de cada una de las dos partes del trabajo.

- 1. Describir computacionalmente el mecanismo de hidrólisis de fosfoésteres catalizada por el compuesto  $[Cu(1,10-fenantrolina)(H_2O)_2]^{2+}$
- 2. Estudiar la hidrólisis catalizada de un pesticida basado en fósforo sobre una membrana polimérica modificada.

La primera etapa del proyecto se centra en el objetivo número 1. En ella se analizan diversos mecanismos de reacción para una serie de 9 moléculas con el grupo ésterfosfato. El análisis se lleva a cabo a través de la reconstrucción de las superficies de energía de cada proceso, utilizando metadinámica bien templada, WT–MetaD.

En la segunda etapa se emplea la aproximación QM/MM acoplada a las técnicas de muestreo mencionadas en la Sección 2.3: metadinámica e integración termodinámica. Ambas etapas comparten como propósito la descripción detallada del proceso de hidrólisis de fosfoésteres, mediado por un complejo de coordinación basado en cobre.

### 3.3. Hipótesis

El mecanismo de hidrólisis de los fosfoésteres dependerá de su grado de sustitución y del tipo de catalizador empleado. El uso de compuestos de cobre con ligantes donadores de nitrógeno promoverá cambios en el mecanismo de reacción de hidrólisis. A través de técnicas de muestreo acelerado, se podrán elucidar los detalles energéticos y estructurales de estos mecanismos de reacción, proporcionando información esencial para el desarrollo racional de catalizadores soportados en membranas poliméricas modificadas.

## Parte III

Resultados y Discusión

4

### Hidrólisis de fosfoésteres mediada por un complejo de cobre

### 4.1. Objetivos específicos

En la primera parte del trabajo se buscó describir el mecanismo de reacción de hidrólisis de fosfoésteres, catalizadas por el complejo  $[Cu(1,10-fenantrolina)(H_2O)_2]^{2+}$ , o  $[Cu(phen)(H_2O)_2]^{2+}$ . De esta forma, los objetivos específicos de esta sección son:

- Obtener estructuras equilibradas del sistema complejo-sustrato para el análisis de metadinámica.
- 2. Reconstruir las superficies de energía libre del proceso de hidrólisis catalizada.

- 3. Calcular las rutas de mínima energía y relacionarlas con la barrera de reacción del proceso.
- 4. Describir el mecanismo de reacción en términos de la superficie de energía libre y de las rutas de mínima energía.

### 4.2. Metodología

El flujo de trabajo seguido en la primera parte del proyecto se muestra en la Figura 4.1. El software empleado para estas simulaciones fue CP2K en su versión 6.1. <sup>96</sup> El primer paso en la metodología corresponde a una optimización del radio de corte, el cual se usa en la aproximación GPW. <sup>97</sup> El objetivo de esta optimización es mejorar la descripción energética del sistema y el tiempo de cómputo.

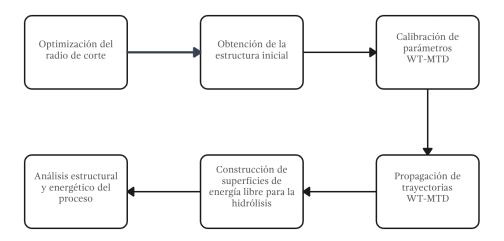


Figura 4.1: Metodología empleada en la hidrólisis mediada por un complejo de cobre.

Una vez obtenidos los valores adecuados para el radio de corte y el radio de corte relativo, se equilibró el sistema  $[Cu(phen)(PO_4)]^{1-}$  con un modelo de disolvente mixto. En la parte implícita se utilizó el modelo SCCS para agua, <sup>121</sup> mientras que la parte explícita se formó con 54 moléculas de  $H_2O$ . Este número de moléculas de agua logra formar una esfera de solvatación de 5 Å al rededor del complejo.

Después de la equilibración del sistema, se realizó una activación del enlace Cu-Fosfato mediante metadinámica convencional. Se generó una estructura inicial de la cual partirían las trayectorias de los 9 sustratos seleccionados. Posteriormente, se propagaron por trayectorias por triplicado mediante el formalismo de metadinámica bien templada, WT-MetaD, con el objetivo de reconstruir las superficies de energía libre del proceso. Una vez obtenidas las superficies, se analizó su topología, las rutas de mínima energía y los cambios estructurales durante la reacción de hidrólisis del enlace éster-fosfato.

Las trayectorias de dinámica molecular Ab Initio, así como los cálculos de MetaD y WTMetaD se llevaron a cabo utilizando el funcional  $\omega B97X-D3$ . Se ha presentado en la literatura que el carácter híbrido de este funcional logra describir adecuadamente los mecanismos de hidrólisis de fosfatos. 48,123 Esto se debe a que la incorporación del intercambio exacto puede resolver el problema de la subestimación de barreras energéticas en funcionales GGA. 124, 125 Además, la descripción precisa de las interacciones no covalentes y de enlace de hidrógeno en sistemas complejos se logra con la inclusión de una corrección empírica para los efectos de dispersión.  $^{126-129}$  Del mismo modo, el funcional  $\omega$ B97X–D3  $^{122}$ ha sido ampliamente validado en la caracterización de interacciones Cobre-ligante, tales como interacciones con ligantes donadores de nitrógeno e interacciones en complejos Cu-Oxo.  $^{130-132}$  Es bien conocido que  $\omega$ B97X–D3 es un funcional altamente transferible, debido a su bajo número de parámetros empleados en su construcción. 133, 134 Por otro lado, el conjunto de bases empleado es un conjunto numérico doble $-\zeta$ , el cuál se encuentra optimizado y está implementado en CP2K, bajo el esquema GPW, como se nombró en la Sección 2.3.1. Así, el conjunto de bases nombrado MOLOPT-DZVP se ha usado ampliamente combinado con los potenciales GTH, 99,100 dando buenos resultados en el estudio de las interacciones cobre-ligante. 135-137 Aunque la base MOLOPT-DZVP se encuentra optimizada para ciertos tipos de funcionales, como PBE y B3LYP, su uso en otros funcionales como rVV10, PBE0 y HSE06 ha sido estudiada y validado con éxito inclusive en sistemas metálicos. 138-140 Para todas estas simulaciones se consideraron propiedades periódicas en los sistemas.

### 4.3. Resultados

### 4.3.1. Optimización del radio de corte

Todos los cálculos fueron realizados empleando la aproximación GPW.<sup>97</sup> Este método requiere, en principio, de una optimización del radio de corte de las ondas planas empleadas en el sistema.

El módulo de estructura electrónica implementado en CP2K, llamado Quickstep, 98

requiere el uso de una malla de integración en el espacio real para representar la densidad electrónica y otras funciones gaussianas. Quickstep emplea un sistema de mallas múltiples para mapear las funciones gaussianas y la densidad electrónica en el espacio real. Seleccionar una cuadrícula de integración lo suficientemente fina para un cálculo es crucial para obtener resultados significativos y precisos.

CP2K construye múltiples mallas, cada una con diferentes radios de corte (cutoff) de las ondas planas. Este valor define la malla más fina ( $E^1_{cut}$ ), mientras que los cutoffs de las mallas subsecuentes i se definen por

$$E_{\text{cut}}^i = \frac{E_{\text{cut}}^1}{\alpha^{(i-1)}} \tag{4.1}$$

en donde  $\alpha$  se denomina factor de progresión y tiene un valor predeterminado en CP2K de 3.0. Una vez construido el arreglo de mallas, Quickstep debe asignarles las funciones gaussianas. El radio de corte relativo o relative cutoff (rel\_cut) controla qué gaussianas se asignan a qué nivel del arreglo de mallas. CP2K intenta asignar cada gaussiana a una malla de manera que el número de puntos de la malla cubiertos por la gaussiana, sin importar el ancho de la función, sea aproximadamente el mismo. El radio de corte relativo define el truncado de la onda plana de una malla de referencia cubierta por una gaussiana con desviación estándar unitaria ( $e^{|\mathbf{r}|^2}$ ). Así, la gaussiana se asigna al nivel más amplio de la malla y abarcará un número de puntos en la malla igual o superior a los puntos que la malla definida por la gaussiana  $e^{|\mathbf{r}|^2}$  cubriría en la malla de referencia establecida por el cutoff relativo.

Por lo tanto, los dos parámetros más importantes que afectan la malla de integración y la precisión de un cálculo son el *cutoff* y el *cutoff* relativo. Si el *cutoff* es demasiado bajo, todas las mallas serán gruesas y el cálculo puede volverse impreciso. Por otro lado, si el *cutoff* relativo es demasiado bajo, incluso si se tiene un *cutoff* alto, todas las gaussianas se asignarán al nivel más grueso de las mallas, y por lo tanto, la malla de integración efectiva para el cálculo resultará en un arreglo poco preciso. <sup>98</sup>

La optimización del *cutoff* y el *cutoff* relativo se llevó a cabo para el complejo de cobre

[Cu(phen)(PO<sub>4</sub>)]<sup>1-</sup>, el cual contiene las interacciones cobre-ligante que interesa analizar con mejor precisión en el sistema. Para esto se llevaron a cabo múltiples cálculos de puntos simples de energía del sistema optimizado.

En la Tabla 4.1 se muestran los resultados para la calibración del *cutoff*, considerando un *cutoff* relativo de 60 Ry. Este último valor es usualmente suficiente para cálculos de este tipo de sistemas, sin embargo se calibró también el *cutoff* relativo mediante los resultados mostrados en la Tabla 4.2. Durante las calibraciones se busca tener variaciones de energía lo más pequeñas posibles (menores a 10<sup>-6</sup> Ry), empleando el menor número de Gaussianas. De este modo es posible ver en la Tabla 4.1 que el radio de corte de 300 Ry cumple con esta condición, ya que los cambios en la energía son sumamente pequeños (del orden de 10<sup>-10</sup> Ry). Al incrementar el número de gaussianas no se observa una mejora substancial en el error observado en la energía total.

**Tabla 4.1 :** Calibración del radio de corte para el sistema [Cu(phen)(PO<sub>4</sub>)]<sup>1-</sup>.

		Número de Gaussianas				
Cutoff [Ry]	Energía Total [Ha]	Malla 1	Malla 2	Malla 3	Malla 4	
100	-315.8855740194	2827740	436952	187283	12783	
200	-315.8206170632	2353105	648107	355882	107664	
300	-315.7937341470	2014044	813696	436952	200066	
400	-315.7937341470	1751923	889233	534581	289021	
500	-315.7937341471	1598913	867593	608578	389674	
600	-315.7937341471	1401338	951767	648107	463546	
700	-315.7937341471	1296828	973212	659521	535197	
800	-315.7937341474	1138843	1013009	746662	566244	
900	-315.7937341473	1081884	932160	813696	637018	
1000	-315.7937341471	976173	929101	847137	712347	
1100	-315.7937341470	829217	1010127	855776	769638	
1200	-315.7937341470	661718	1090205	889233	823602	

Una vez obtenido el *cutoff*, se calculó el *cutoff* relativo. Según los resultados de la Tabla 4.2 se obtuvo que el radio de corte relativo óptimo es de 40 Ry, ya que el error en la energía deja de variar de manera importante una vez alcanzado este valor.

Aunque es posible utilizar los parámetros por defecto para el *cutoff* y el *cutoff* relativo, es siempre mejor idea optimizar estos parámetros para un uso más eficiente del tiempo de

		Número de Gaussianas			
Cutoff Relativo [Ry]	Energía Total [Ha]	Malla 1	Malla 2	Malla 3	Malla 4
10	-316.0714021293	5295	553940	1109754	1795769
20	-315.8069057407	301628	995200	973212	1194718
30	-315.7929778799	559235	1109754	857149	938620
40	-315.7927317207	937761	935639	859623	731735
50	-315.7927317210	1109998	983655	779767	591338
60	-315.7927317209	1296828	973212	659521	535197
70	-315.7927317207	1401338	951767	648107	463546
80	-315.7927317207	1555267	886448	608839	414204
90	-315.7927317205	1668989	857149	574303	364317
100	-315.7927317205	1719973	878748	566589	299448

**Tabla 4.2:** Calibración del radio de corte relativo para el sistema [Cu(phen)(PO<sub>4</sub>)]<sup>1-</sup>.

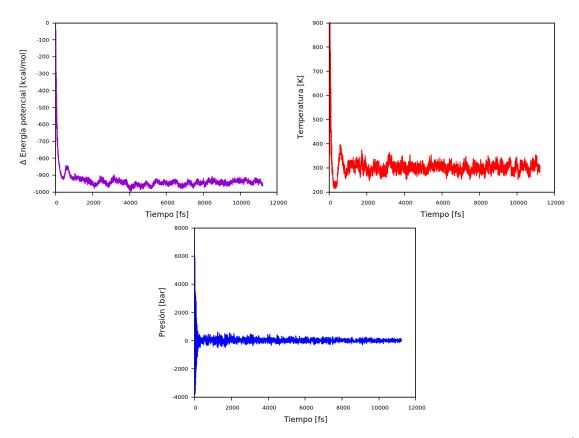
cómputo. Así, se eligió para las simulaciones una combinación de 300 Ry/40 Ry para el radio de corte de las funciones empleadas. Esto asegura un uso adecuado de los recursos de cómputo y una buena descripción energética.<sup>98</sup>

### 4.3.2. Obtención de la estructura inicial

### Proceso de equilibración

El primer paso de la descripción del mecanismo consistió en la obtención de las estructuras iniciales equilibradas. Estas estructuras se emplearon para iniciar la propagación de las simulaciones de metadinámica. El primer sistema estudiado fue el complejo [Cu(phen)]<sup>2+</sup>. La equilibración se llevó a cabo rodeando el sistema con 54 moléculas de agua y empleando el modelo SCCS de disolvente implícito para agua. Esta equilibración se propagó por 10 ps, empleando un timestep de 1.0 fs, logrando así 10 000 pasos de AIMD. La simulación se llevó a cabo en el ensamble NPT utilizando el termostato GLE<sup>92</sup> a 300 K y el barostato de Berendsen a 1 atm. Para considerar las interacciones electrostáticas a larga escala y las interacciones artificiales debido a la periodicidad del sistema, se empleó el método periódico de Poisson. La El tamaño de las celdas corresponden al doble del tamaño de la longitud más larga del sistema. Por último, con el objetivo

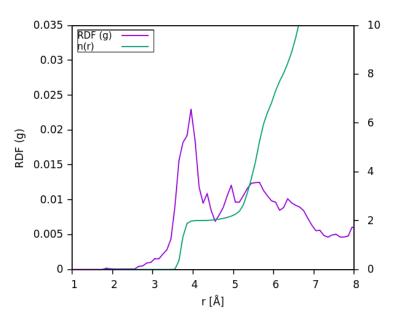
de hacer aún más eficiente la optimización de la función de onda se empleó el método de transformación orbital (OT, Orbital Transformation). Este método es un esquema de minimización directa, particularmente eficiente para sistemas grandes y bases extensas. La idea básica de su implementación consiste en encontrar el mínimo del funcional de energía con respecto a los coeficientes de los orbitales moleculares. Debido a su construcción garantiza la convergencia de la función y es significativamente más rápido que los métodos basados en diagonalización.<sup>143</sup>



Una vez equilibrado el sistema  $[Cu(phen)]^{2+}$ , se incluyó una molécula de fosfato  $(PO_4^{3-})$  en la primera esfera de coordinación del cobre y se equilibro por 10 ps más, bajo las mismas condiciones. Se analizó la trayectoria del sistema  $[Cu(phen)(PO_4)]^{1-}$  y se extrajo la estructura de mínima energía. La equilibración de los sistemas fue confirmada mediante los perfiles de energía, temperatura y presión, presentados en la Figura 4.2. En promedio la temperatura mostró un valor de 303.59  $\pm$  17.66 K, para la diferencia de

energía potencial es de -934.74  $\pm$  47.44 kcal/mol, mientras que para la presión es de 11.54  $\pm$  171.92 bar. Se sabe que la presión es una cantidad que fluctúa considerablemente en sistemas condensados.<sup>93</sup>

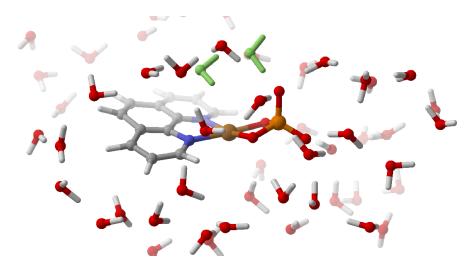
Es posible observar que después de 2000 fs la estructura se relaja y se mantiene equilibrada por el resto de la simulación. Además, considerando la importancia de las moléculas de agua explícitas en el mecanismo<sup>123</sup> y teniendo en cuenta el costo computacional (~600 h con 48 nodos MPI por trayectoria) se seleccionaron las moléculas de agua que interaccionaron a una menor distancia del cobre. Se observó que solo dos moléculas de agua participaron activamente en la equilibración. Dicha información se confirmó mediante al análisis de la integración de la función de distribución radial (ver Figura 4.3). Para calcular esta función se consideró al centro metálico y a las moléculas de agua en el sistema.



**Figura 4.3 :** En morado la función de distribución radial entre el cobre y los oxígenos de las moléculas de agua. En verde la integración de la función.

Por esta razón, la estructura de energía mínima extraída del proceso de equilibración, mostrada en la Figura 4.4, presenta dos moléculas de agua marcadas en color verde. Únicamente estas dos moléculas de  $H_2O$  explícitas se mantuvieron en las simulaciones de metadinámica subsecuentes. Además, la estructura obtenida muestra similitudes con fosfoésteres coordinados a complejos de cobre reportados anteriormente (DEHLOT<sup>144</sup> y

 $FISZOX^{145}$ ).



**Figura 4.4 :** Estructura equilibrada del complejo  $[Cu(phen)(PO_4)]^{1-}$ , en color verde se encuentran marcadas las moléculas de agua seleccionadas para las trayectorias WT-MetaD.

#### Proceso de activación

Partiendo del complejo  $[Cu(phen)(PO_4)]^{1-}$  mostrado en la Figura 4.4, y considerando solo las dos moléculas de agua seleccionadas, se realizó una simulación de metadinámica con el objetivo de tener una estructura reactiva, como se ha sugerido en la literatura.  $^{66,113,146,147}$ 

La trayectoria de metadinámica convencional se propagó en un ensamble NVT y con las mismas condiciones mostradas en la sección anterior. Las variables colectivas empleadas fueron la distancia entre el átomo de cobre y una de las moléculas de agua que actúa como nucleófilo, d(Cu-Nu) y la distancia entre el fósforo y el nucleófilo, d(P-Nu). El potencial gaussiano fue adicionado cada 50 fs, con una altura de 0.50 kcalmol $^{-1}$  y un factor de escala de 0.3 Å para representar su ancho. Esta breve simulación de 2 ps se empleó con el objetivo de conseguir la estructura inicial que serviría como andamio para todas las simulaciones WT-MetaD de los 9 sustratos elegidos.

Respecto a los sustratos, se seleccionaron tres moléculas para cada clase de fosfoéster, procurando considerar diferentes tipos de compuestos: moléculas modificadas utilizadas en ensayos cinéticos, metabolitos, pesticidas y nucleótidos. Las estructuras de estas moléculas

se muestran en la Figura 4.5 y su clasificación en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3 :** Sustratos estudiados en el presente trabajo. Se muestra el grado de saturación y el tipo de molécula.

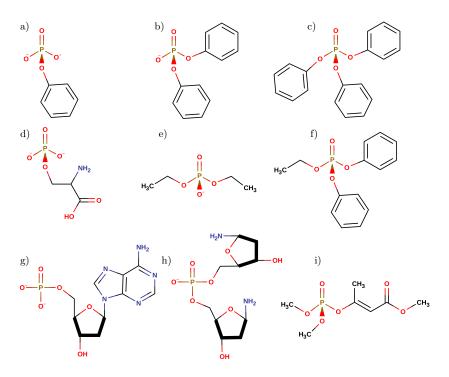
Molécula	Fosfoéster	Tipo de molécula
Fenilfosfato	Mono-éster	Ensayos cinéticos
Fosfoserina	Mono-éster	Metabolitos
Nucleótido de Adenina	Mono-éster	Nucleótidos
Difenilfosfato	Di–éster	Ensayos cinéticos
Dietilfosfato	Di–éster	Metabolitos
Dideoxirribosa-fosfato N-sustituida	Di-éster	Nucleótidos
Trifenilfosato	Tri–éster	Ensayos cinéticos
Etil difenilfosfato	Tri–éster	Metabolitos
Mevinphos	Tri–éster	Pesticidas

Para **mono-ésteres** se consideraron: fenilfosfato, fosfoserina, nucleótido de adenina; para **di-ésteres**: difenilfosfato, dietilfosfato, dideoxirribosa-fosfato N-sustituido; y para **trié-ésteres**: trifenilfosfato, etil difenilfosfato, Mevinphos. Dado que el complejo  $[Cu(phen)]^{2+}$  puede estar involucrado en procesos bioquímicos, <sup>42</sup> los sustratos se protonaron como las especies más probables en el entorno fisiológico a pH = 7.4. <sup>148</sup>

## 4.3.3. Calibración de parámetros para trayectorias WT-MetaD

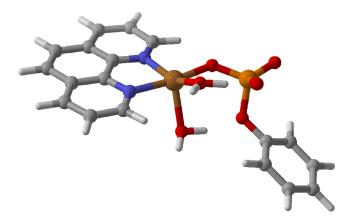
Antes de iniciar la propagación de los sistemas con los nueve sustratos mostrados en la Figura 4.5, se empleó el complejo [Cu(phen)(fenilfosfato)( $H_2O$ )<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> para llevar a cabo la validación de los parámetros de las simulaciones WT–MetaD. Esta estructura, además de ser la más sencilla de la serie de fenil fosfatos, presenta un buen grupo saliente, que no requiere de asistencia del cobre para su formación. <sup>16</sup> Se propagaron trayectorias usando el formalismo WT-MetaD en el ensamble NVT, empleando un factor de escala  $\gamma$  de 30. La elección de este valor se llevo a cabo considerando la Ecuación 2.38 y prediciendo que las barreras a cruzar tienen una altura aproximada de 20 kcal/mol, como se ha reportado experimentalmente para sistemas similares. <sup>9,19</sup>

Por otra parte, para elegir la altura y ancho del potencial gaussiano impuesto, así como



**Figura 4.5 :** Moléculas seleccionadas para el análisis del mecanismo de hidrólisis catalizada. a) fenilfosfato, b) difenilfosfato, c) trifenilfosfato, d) fosfoserina, e) dietilfosfato, f) etil difenilfosfato, g) nucleótido de adenina, h) dideoxirribosa-fosfato N-sustituida, i) Mevinphos.

de su frecuencia de adición, se realizaron diferentes simulaciones empleando la estructura ya mencionada, que se muestra en la Figura 4.6. Esta conformación corresponde a la estructura base empleada para estudiar los nueve sustratos seleccionados.



**Figura 4.6 :** Estructura inicial del sistema  $[Cu(phen)(fenilfosfato)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]^{2+}$  usada para la validación de la FES.

Dado que esta estructura inicial presenta una interacción directa entre el fosfato y el cobre, y moléculas de agua en la primera esfera de coordinación, se propuso que el mecanismo de activación sea un mecanismo de esfera interna (ver Figura 2.3). Se espera que la reacción de hidrólisis transcurra por el mecanismo simplificado descrito en la Figura 4.7. En este mecanismo el nucleófilo ataca al grupo fosfato para posteriormente promover la partida del grupo saliente.

Figura 4.7: Mecanismo simplificado de hidrólisis catalizada de un mono-éster

Por esta razón, se buscó que las trayectorias de metadinámica representaran dicho cambio químico. De este modo, las superficies de energía libre reconstruidas para esta calibración mostraron en general tres patrones. Todas las superficies de energía muestran en el eje horizontal la CV1, o distancia entre el nucleófilo y el fósforo, mientras que en el eje vertical se grafica la CV2 correspondiente a la distancia entre el fósforo y el grupo saliente (LG, por sus siglas en inglés). En color azul se muestran los mínimos de energía en la superficie.

En las superficies etiquetadas como Tipo I en la Figura 4.8, se observa un único mínimo que corresponde al nucleófilo acercándose al fósforo, pero no existe reacción. En estas simulaciones la altura de las gaussianas fue de 0.10 kcalmol<sup>-1</sup> y su ancho de 0.5 Å. La frecuencia de adición se fijó en 50 fs.<sup>64,66,117</sup> Estos parámetros producen que el potencial impuesto no sea lo suficiente para forzar que el sistema visite otras configuraciones.

En el Tipo II se observa un cambio importante, en este tipo de superficies la altura de las gaussianas empleadas para el potencial fue de 2.00 kcalmol<sup>-1</sup> y el factor para el ancho de la función fue de 0.1 Å, manteniendo la misma frecuencia de adición. Esta combinación genera que los cambios sean muy pronunciados y que la superficie se reconstruya con demasiado detalle, impidiendo la caracterización de los mínimos formados.

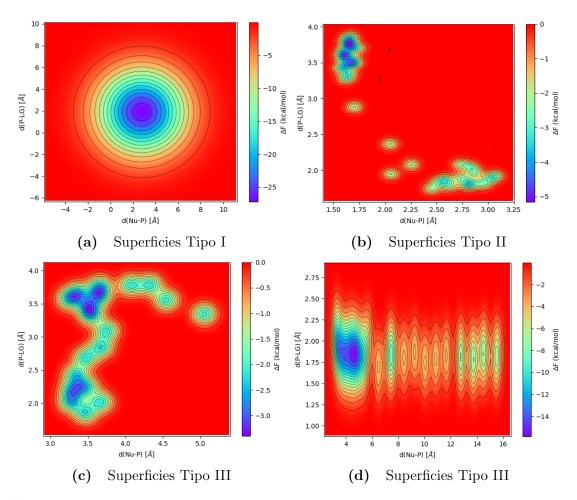


Figura 4.8: Superficies de energía libre para procesos donde no se observa la hidrólisis.

Para los dos ejemplos de superficie Tipo III la altura de potencial fue aún mayor, siendo 4.00 kcalmol<sup>-1</sup> con un ancho de 0.2 Å y una frecuencia de adición distinta a los anteriores, pasando de 50 fs a 100 fs. Aquí se observa que los mínimos están más definidos que en las superficies de Tipo II, sin embargo, el sistema visita conformaciones que no resultan de interés, debido a que el potencial impuesto es demasiado grande.

Considerando estos casos se concluyó que al adicionar las gaussianas cada 50 fs y fijando los parámetros de altura y anchura a 0.50 kcalmol<sup>-1</sup> y 0.3 Å, respectivamente, se obtendría un muestreo correcto de la superficie de energía libre del proceso de hidrólisis. Además, disminuir la altura del potencial gaussiano y espaciar razonablemente la adición de estas funciones tiene como consecuencia una disminución en el error de la simulación, como muestra la Ecuación 2.35.

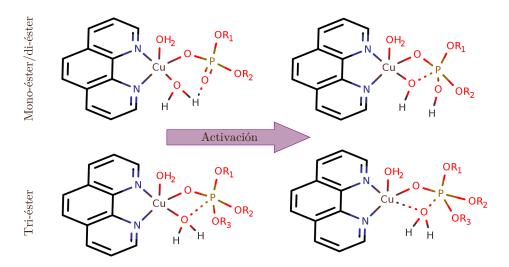
# 4.3.4. Descripción del mecanismo de hidrólisis catalizada mediante el complejo $[Cu(phen)(H_2O)_2]^{2+}$

### Análisis de superficies de energía libre

Una vez fijados los parámetros empleados en las simulaciones de metadinámica, se procedió a propagar trayectorias para los 9 sustratos seleccionados (Figura 4.5). Iniciadas las simulaciones, se observó que el primer cambio conformacional importante corresponde a la activación del nucleófilo en el sistema.

En la Figura 4.9 se presenta el proceso de activación de los nucleófilos. Estas estructuras representan los estados estables alcanzados durante la simulación de metadinámica, es decir, son los estados reactivos de la reacción. En el caso de mono-ésteres y di-ésteres, el proceso de activación corresponde a una transferencia de protón, desde una molécula de agua coordinada ecuatorialmente hacia un oxígeno del fosfoéster. Este intercambio de protones es un proceso breve de duración promedio de 30 fs. El sistema que presenta el tiempo de transferencia más largo corresponde al difenilfosfato siendo de 44 fs. En contraste, la dideoxirribosa-fosfato N-sustituida muestra el tiempo más corto, de 19 fs. En todos los casos, la transferencia de protones se observó sin aplicar ningún potencial externo al sistema, puesto que la primera gaussiana se adiciona a los 50 fs. Esto indica que las barreras para estos procesos son factibles a la temperatura de simulación. De igual modo, se ha demostrado con estudios cinéticos que la complejación del sustrato y los rearreglos intramoleculares son pasos rápidos en las reacciones catalizadas por complejos de cobre. 150

Respecto a los mono— y di–ésteres, se observa que después de la transferencia de protón, la distancia HO¯····P disminuye, indicando un probable ataque nucleofílico, lo cual es esperado en esta reacción. En cuanto a los tri–ésteres, la formación del estado reactivo implica simplemente la incorporación de una molécula de H<sub>2</sub>O a la esfera de coordinación del fósforo. Esta molécula de agua se encuentra a distancias de hasta 3 Å del átomo de cobre. La migración de la molécula de agua es en general un proceso más lento, en comparación con la transferencia de protón. Así, esta migración se encuentra



**Figura 4.9 :** Cambios estructurales durante la formación del estado reactivo. Sección superior: activación de nucleófilos para mono- y di-éster por transferencia de protones, en mono-éster R2 = H. Sección inferior: intercambio de molécula de agua para tri-ésteres.

acelerada por el proceso de muestreo de metadinámica. Es decir, sin el uso de esta técnica la escala de tiempo en la que se observaría este cambio podría superar el límite de tiempo alcanzable en una simulación.

Para reacciones catalizadas con metales, en el límite cuando el grupo saliente es muy bueno, el nucleófilo efectivo será aquel que tenga la mayor concentración en la solución, es decir, el disolvente. En este tipo de reacciones, se espera que los intercambios de protones estén presentes entre el nucleófilo, el oxígeno del fosfato y el grupo saliente. Sin embargo, se ha encontrado experimentalmente que las transferencias de protones que involucran a estas tres especies dificultan enormemente la identificación de tendencias significativas relacionadas con las propiedades del estado de transición. <sup>1,50</sup> De esta forma el análisis computacional se vuelve necesario para identificar y esclarecer los mecanismos de reacción de hidrólisis. <sup>48</sup>

Las variables colectivas seleccionadas para reconstruir la superficie de energía, CV1 y CV2, fueron las distancias d(Nu-P) y d(P-LG), respectivamente. Se probaron otros conjuntos de variables colectivas, incluyendo los números de coordinación para Cu y P, pero no lograron reconstruir la FES. Además, para restringir el campo de exploración y evitar el muestreo de partes no interesantes del espacio de configuración,  $^{126}$  se impuso un

potencial cuártico en CV2. Esta pared se extiende desde 7.0 Å hacia valores más grandes de CV2, utilizando una constante de potencial de 0.1 E<sub>h</sub>. Tras un análisis de las superficies formadas, la frecuencia de adición, altura y ancho del potencial gaussiano se ajustaron a 50 fs, 0.5 kcal/mol y 0.3 Å, respectivamente (Revisar Sección 4.3.3). Todas las trayectorias WT-MetaD se propagaron utilizando el modelo implícito de solvatación SCCS.

De esta manera, se completó la FES correspondiente para cada sistema, observando que la diferencia de energía entre los dos mínimos globales haya sido ~0.10 kcalmol<sup>-1</sup>, lo cual indica un muestreo conformacional suficiente. Por esta razón, el tiempo de propagación es diferente para cada trayectoria. Los datos de las superficies de energía libre se obtuvieron con la herramienta graph implementada en CP2K, la cual reconstruye la FES a partir de la información del potencial gaussiano. Luego, se empleó el código MEPSA<sup>152</sup> para la visualización y la reconstrucción de la ruta de mínima energía basada en el algoritmo de Dijkstra. Esta reconstrucción, permite obtener la coordenada de reacción, así como la barrera de reacción asociada al proceso. La Figura 4.10 presenta un resumen del flujo de trabajo mostrado en esta sección.

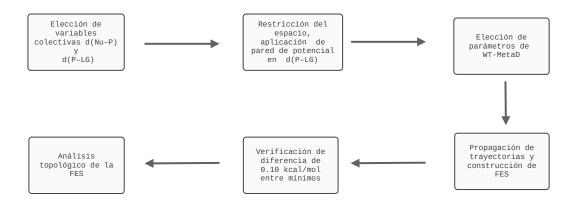


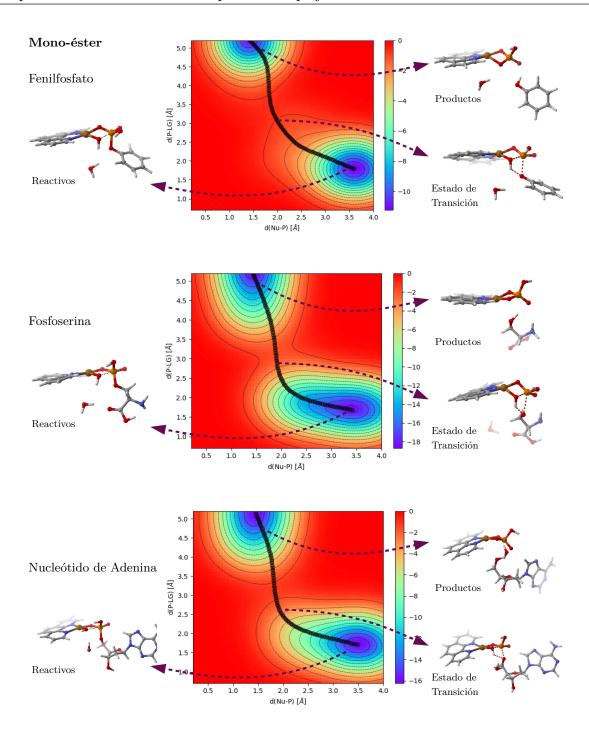
Figura 4.10 : Flujo de trabajo del análisis de superficies de energía libre del mecanismo de hidrólisis catalizado.

Las superficies de energía libre para las reacciones con mono-ésteres, di-ésteres y tri-ésteres se presentan en las Figuras 4.11, 4.13 y 4.14, respectivamente. Resulta importante aclarar que la superficie se mapea en dos CVs, pero toda la información química se almacena en la trayectoria de la dinámica molecular *Ab Initio*.

Para mono— y di-ésteres, Nu se refiere a la estructura activada HO¯, mientras que para tri-ésteres Nu representa a la molécula de agua. En cada una de las superficies hay dos mínimos claros, uno asociado con los reactivos y otro con los productos. Los reactivos se encuentran en la esquina inferior derecha, en donde la distancia Nu−P es grande, y la distancia P−LG es pequeña. Esto describe un estado en donde el nucleófilo no se ha enlazado al fósforo, y por lo tanto el grupo saliente se mantiene unido al fosfato. Por otro lado, los productos se representan en el mínimo superior izquierdo, en donde la distancia Nu−P es corta, ya que el nucleófilo está enlazado al fósforo, y la distancia P−LG es grande, representando la partida del grupo saliente. Estas superficies de energía libre reconstruidas muestran una topología similar a las que han sido reportadas previamente para catálisis sin complejos metálicos. 48

También, es importante señalar que las estructuras iniciales del proceso que se muestran en la Figura 4.9, cambian casi inmediatamente una vez iniciada la simulación. Por esta razón no forman un mínimo en la superficie de energía libre. La superficie de energía libre tiene la capacidad de representar configuraciones específicas adoptadas por los sistemas. De esta manera, el tamaño de la región donde se alojan los mínimos puede interpretarse en función de la duración de ciertas configuraciones en el espacio de variables colectivas.<sup>64,65</sup>

Para los mono-ésteres, la posición del mínimo de los reactivos en las superficies de energía libre es la más alejada de la serie de FE. En promedio, la distancia Nu-P de dicho mínimo es de 3.6 Å. Respecto al mínimo de los productos, las tres series muestran una distancia promedio de 1.7 Å para la interacción Nu-P. La separación de los mínimos en la FES de los mono-ésteres es en promedio 4.1 Å, siendo la más grande de las tres series de fosfatos. En la Figura 4.11 es posible observar que los reactivos presentan una estructura cuadrada plana respecto el átomo de cobre y una tetraédrica para el fósforo. El fosfato coordina  $\eta^1$ , debido a que el nucleófilo está la mayor parte del tiempo a una distancia  $HO^{-1}\cdots P$  mayor a 3.0 Å. Además, en las tres estructuras reactivas de la Figura 4.11, se observa que la reacción es asistida por sustrato, ya que que la molécula de agua cambia a un estado  $OH^-$  activado.  $^{48,154}$ 



**Figura 4.11:** Superficies de energía libre para el proceso de hidrólisis de mono-ésteres fosfato. Se muestran las posiciones aproximadas de los Reactivos, Productos y Estados de Transición. Las estructuras ilustradas presentan las conformaciones más representativas en la trayectoria. Además, se ilustra la ruta de mínima energía calculada. Las unidades de la energía son [kcal/mol].

Tanto la posición del mínimo de reactivos, como la distancia entre mínimos, caracterizan el proceso de reacción. En este caso, la reacción se encuentra gobernada por un proceso de poca asociación entre el nucleófilo y el fosfato. Se observaron para fosfoserina y para el nucleótido de adenina superficies de energía libre que presentan regiones extendidas en el mínimo de reactivos, de 1.5 a 2.5 Å. Con esta información se infiere que los complejos con fosfoserina y el nucleótido de adenina visitan conformaciones en donde la distancia Nu-P es menor. Analizando las trayectorias de dinámica se observan conformaciones en donde los grupos electronegativos de los fosfatos logran una estabilización del OH<sup>-</sup> a distancias menores, en comparación al grupo fenilo. Para todos los estados de transición estudiados en las nueve moléculas, se observa la formación de un anillo de cuatro miembros, formado por dos átomos del nucleófilo: el oxigeno atacante y el protón que se donará al grupo saliente, además del átomo de fósforo y el oxígeno del grupo saliente. Esta configuración ha sido observada en diversas estructuras cristalinas.<sup>155</sup>

La sustitución nucleofílica en los centros de fósforo de moléculas no coordinadas ha sido revisada en varios trabajos; por ejemplo, van Bochove et al. encontraron que la reacción  $SN_2$  por el lado posterior (backside) compite con la reacción frontal (frontside), la cual es termodinámicamente favorable. En la Figura 4.12 se muestran estos tipos de reacción.



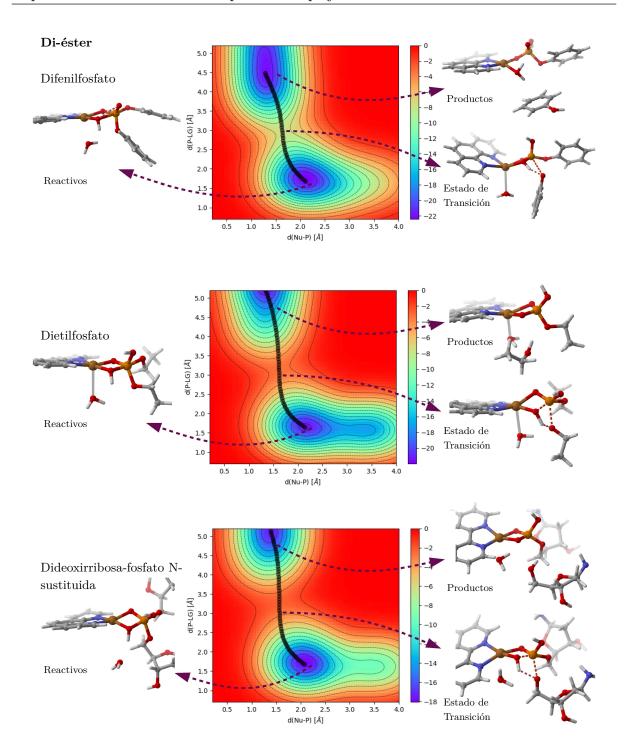
**Figura 4.12 :** Modos de reacción a) *frontside* o frontal y b) *backside* o posterior, para la sustitución nucleofílica en fosfatos.

En el caso del complejo  $[Cu(phen)(H_2O)_2]^{2+}$ , el papel del cobre se centra en forzar el ataque frontal del nucleófilo coordinado al centro de fósforo. Esta observación es soportada por diversas evidencias cinéticas y espectroscópicas experimentales.<sup>1,9,19,157</sup> En los tres mono-ésteres el grupo saliente parte abstrayendo un protón del nucleófilo, formando un producto eléctricamente neutro. Este hecho se repite en los 9 fosfoésteres estudiados. Al

finalizar la reacción de hidrólisis en mono-ésteres, los fosfatos terminan bicoordinados al complejo de cobre, manteniendo la estructura cuadrada plana durante todo el proceso (ver Figura 4.11). La reacción también puede mapearse siguiendo parámetros estructurales del fosfato, como se presentará en las Figuras 4.15 y 4.16.

Respecto a los di–ésteres fosfatos, la posición del mínimo de los reactivos está alrededor de 2.1 Å para la distancia Nu–P. La separación entre los mínimos es de 3.4 Å. En estos sistemas el estado reactivo presenta un átomo de fósforo pentavalente, conocido como estado fosforano, el cual se puede identificar tanto por la posición del mínimo de reactivos como por la separación entre mínimos. Con distancias Nu–P menores a 3.0 Å y separación entre mínimos menor a 4.0 Å , se espera la formación de dicho estado fosforano. En los di–ésteres, el estado fosforano se encuentra coordinado  $\eta^2$  al átomo de cobre, mediante un oxígeno del fosfato y haciendo puente con el nucleófilo hidroxilo, como se muestra en la Figura 4.13. Los tres di–éster fosfatos estudiados presentan estructuras reactivas similares.

En los sistemas con dietilfosfato y Dideoxirribosa-fosfato N-sustituida, es posible observar una región extendida para el mínimo de reactivos, la cual se alarga a valores mayores a 2.5 Å. En estos complejos, la interacción entre el nucleófilo y el oxígeno protonado del fosfato dificulta la estabilización del estado reactivo a distancias Nu-P más cortas. Se observó que la interacción inhibe la formación del aducto fosforano momentáneamente, lo que genera que el sistema pase más tiempo en la región >2.5 Å. En esta región el nucleófilo aún no forma el estado pentavalente de fósforo. Esta interacción no se observó en ninguna trayectoria del difenilfosfato, ya que el fosfato logró posicionarse en un arreglo que facilitó el ataque del nucleófilo. Se observan similitudes en el rol desempeñado por el átomo de cobre en comparación con la hidrólisis de fosfoésteres mono-sustituidos. En esta hidrólisis el metal fuerza también un ataque nucleofílico frontal respecto al átomo de fósforo. En la Figura 4.13 es posible ver que los estados de transición se conforman por el ataque del nucleófilo, el cual se encuentra en una posición apical respecto a la geometría del fósforo, y por la partida del grupo saliente, que está en una posición ecuatorial. Durante el proceso, el fósforo cambia su estructura de una bipirámide trigonal a un tetraedro. Por esto, la reacción se puede analizar siguiendo los cambios en los ángulos internos del fosfato, como

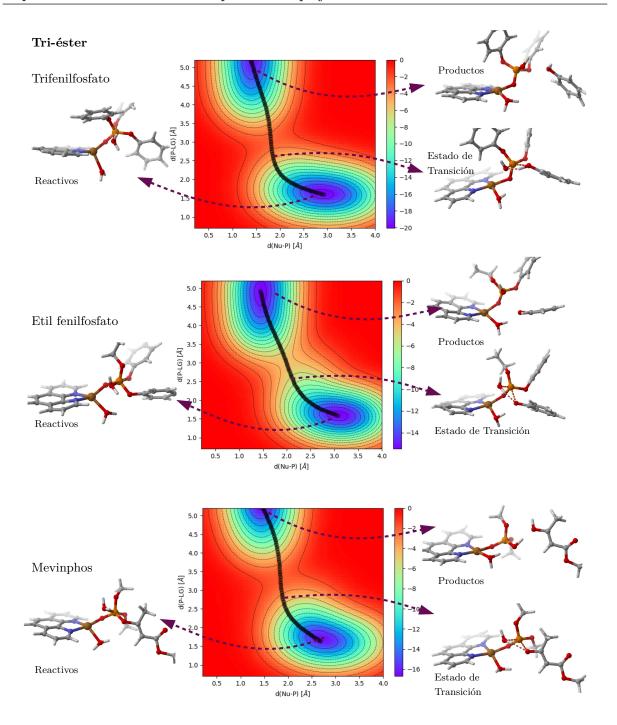


**Figura 4.13 :** Superficies de energía libre para el proceso de hidrólisis de di-ésteres fosfato. Se muestran las posiciones aproximadas de los Reactivos, Productos y Estados de Transición. Las estructuras ilustradas presentan las conformaciones más representativas en la trayectoria. Además, se ilustra la ruta de calculada. Las unidades de la energía son [kcal/mol].

se presenta en las Figuras 4.15 y 4.16.

El comportamiento observado en mono— y di-ésteres resulta similar al a la hidrólisis de GTP catalizada por enzimas GTPasas, en donde la reacción sucede a través de un mecanismo asistido por sustrato.<sup>154</sup> Los productos de la hidrólisis de fosfodi-ésteres se componen del grupo saliente protonado, el cual abstrae un protón del nucleófilo OH<sup>-</sup>, y del complejo de cobre unido al fosfato. En el sistema con fenilfosfato, el complejo de cobre presenta una geometría cuadrada plana, en donde el fosfato está enlazado por un solo oxígeno. Por otro lado, con los otros dos di-ésteres, el cobre presenta una geometría de pirámide de base cuadrada, con los fosfatos bicoordinados en las posiciones ecuatoriales. La diferencia de estructuras puede radicar en la naturaleza de los sustituyentes del fosfato. Tampoco se descarta un segundo ataque nucleofílico en ninguno de los sistemas con fosfatos di-sustituidos.

Para los fosfotri-ésteres, la separación entre mínimos es de 3.8 Å, mayor a los di-, pero menor que los mono-ésteres. La posición de los reactivos respecto a la distancia Nu-P es en promedio de 2.9 Å. Las estructuras de reactivos y productos son muy similares a las observadas en los di-ésteres. En ambos casos, las estructuras que anteceden al estado fosforano tienen un tiempo de vida muy corto, y por lo tanto no forman un mínimo en la superficie de energía libre. Así, el fosfato se encuentra mono-coordinado al complejo durante todo el proceso, como se muestra en la Figura 4.14. En la serie de tri-ésteres, solo se observa una diferencia significativa en el sistema con Mevinphos, donde el mínimo del estado reactivo se desplaza ligeramente a una distancia Nu-P más corta. La estructura de Mevinphos presenta dos grupos  $-O-CH_3$ , los cuales no generan una restricción estérica importante, debido a la baja voluminosidad de los grupos metoxi. 158 Por esta razón, el intermediario fosforano aparece a distancias Nu-P más cortas. Como se muestra en las Figuras 4.15 y 4.16, es posible relacionar el proceso de reacción con ciertos cambios estructurales en el fosfoéster. A diferencia de los fosfatos mono-, y di-sustituidos, en los tri-sustituidos el mecanismo catalizado de hidrólisis sucede por un mecanismo asistido por solvente, como se ha reportado en la literatura. <sup>9,19</sup> Para estos sistemas, la función del átomo de cobre difiere de las dos series anteriores. Mientras que el fosfato tri-sustituido



**Figura 4.14:** Superficies de energía libre para el proceso de hidrólisis de tri-ésteres fosfato. Se muestran las posiciones aproximadas de los Reactivos, Productos y Estados de Transición. Las estructuras ilustradas presentan las conformaciones más representativas en la trayectoria. Además, se ilustra la ruta de mínima energía calculada. Las unidades de la energía son [kcal/mol].

mantiene la coordinación con el metal, el nucleófilo actúa de manera independiente al complejo metálico. Por lo tanto, en estos sistemas el proceso de activación nucleofílica es de esfera externa. De igual modo, se observa en la Figura 4.14 que el ataque nucleofílico en posición apical orilla a la salida del grupo en posición ecuatorial respecto al átomo de fósforo, el complejo *i.e.* fuerza un ataque frontal. Por último, la estructura del complejo metálico pasa de un cuadrado plano deformado en los reactivos, a un cuadrado plano más simétrico al llegar al estado de transición, el cual se mantiene en los productos.

#### Análisis de las barreras de reacción

El análisis de las superficies de energía ofrece una visión importante del proceso químico estudiado. Para comprender a profundidad la FES, resulta necesario analizar las rutas de mínima energía, o MEPs, que conectan reactivos y productos. Esta trayectoria es la coordenada donde la reacción sucede en el espacio de las variables colectivas.

Como se mencionó en la Sección 2.3.2, una ventaja importante de las simulaciones de metadinámica es que no existe sesgo humano al buscar la ruta o coordenada de reacción, una vez iniciado el proceso. La MEP es calculada mediante el algoritmo de Dijkstra, <sup>153</sup> empleando la superficie de energía libre. <sup>73</sup> La Tabla 4.4 presenta las energías de las barreras observadas para cada reacción de hidrólisis, obtenidas mediante un análisis de las trayectorias WT–MetaD. Dichas trayectorias se propagaron por triplicado <sup>152</sup> en cada sistema. Considerando esta información, puede concluirse que el paso limitante de la reacción ocurre a través de un mecanismo concertado, en donde únicamente una barrera es observada.

Las diferencias más pronunciadas mostradas en la Tabla 4.4 aparecen entre los monoésteres, al ser comparadas con los di— y tri-ésteres. Como se ha discutido, los di— y
tri-ésteres forman un fósforo pentavalente antes de llegar el estado de transición. La
estabilización energética de este intermediario podría explicar el incremento energético en
la barreara para di— y tri-ésteres. La disminución en la energía del sistema puede producir
un incremento proporcional en la barrera de reacción. En otras palabras, en estos sistemas
el fósforo logra una estructura relativamente estable, la cual requiere más energía para

**Tabla 4.4 :** Barreras de energía de la hidrólisis catalizada de fosfoésteres. Los errores corresponden a la desviación estándar de las trayectorias triplicadas.

Molécula	Fosfoéster	Energía libre [kcal/mol]
Fenilfosfato	Mono-éster	$11.5 \pm 0.7$
Fosfoserina	Mono-éster	$10.2 \pm 1.1$
Nucleótido de Adenina	Mono-éster	$10.9 \pm 0.9$
Difenilfosfato	Di–éster	$14.8 \pm 1.0$
Dietilfosfato	Di–éster	$17.3 \pm 1.1$
Dideoxirribosa-fosfato N-sustituida	Di–éster	$14.9 \pm 0.8$
Trifenilfosato	Tri–éster	$16.9 \pm 1.2$
Etil difenilfosfato	Tri–éster	$14.0 \pm 0.9$
Mevinphos	Tri–éster	$15.7 \pm 1.0$

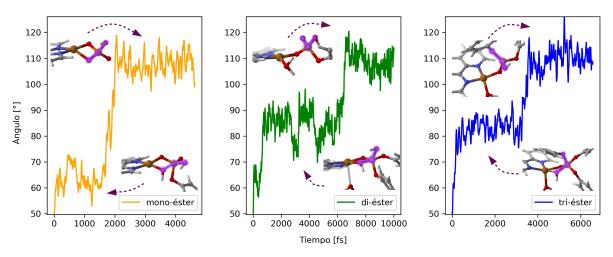
poder transformarse a productos. Estos resultados son consistentes con las observaciones realizadas en las superficies de energía, en donde la existencia del fosforano pentavalente conlleva a un cambio en la topología de la FES.

Brown y colaboradores<sup>38</sup> han apoyado la idea de la formación de un intermediario pentacoordinado en reacciones de tri-ésteres. Esta formación antecede a una transformación preferencial del intermediario al producto. La conclusión está respaldada por experimentos cinéticos y de efecto isotópico. En estos resultados, al igual que en el presente trabajo, se postula una sustitución de tipo  $S_N 2$ , mediante un mecanismo asociativo con salida concertada y asincrónica para el grupo saliente. Además, las magnitudes de las barreras aquí obtenidas son similares a las reportadas en la literatura. Se han observado valores de alrededor de 20 kcalmol<sup>-1</sup> para la hidrólisis de mono- y di-ésteres catalizada por hidroxilo<sup>159–162</sup> y complejos metálicos.<sup>52,163</sup> Específicamente, Zhang et al. <sup>164</sup> encontraron barreras de reacción de 11.90 kcalmol<sup>-1</sup> para el fosfato de bis(p-nitrofenilo) (BNPP), utilizando un complejo de cobre con ligantes basados en nitrógeno. Por otra parte, considerando la estructura  $[Cu(phen)]^{2+}$  pero utilizando otro conjunto de fosfoésteres, Brown y sus colaboradores encontraron barreras experimentales de alrededor de 16 kcalmol<sup>-1</sup> para mono-ésteres, 21 kcalmol<sup>-1</sup> para di-ésteres y 23 kcalmol<sup>-1</sup> para tri-ésteres.<sup>9,19</sup> Cabe resaltar la similitud entre las barreras de di- y tri-ésteres al compararse con los mono-ésteres.

Esta tendencia es similar a la mostrada en los resultados de la Tabla 4.4.

#### Análisis estructural de la reacción de hidrólisis

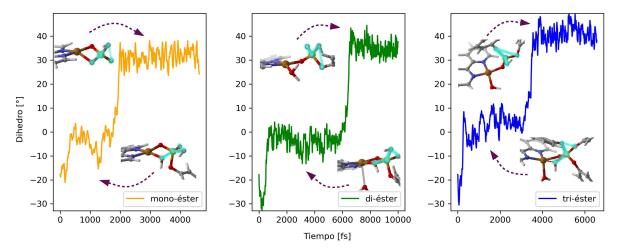
Como se ha discutido en la sección anterior, además del análisis de la superficie de energía libre, es posible analizar la reacción en función de ángulos internos de la estructura del fosfato. Este análisis pone en evidencia las diferencias mecanísticas entre las series de fosfatos. En la Figura 4.15 se muestran los cambios en el ángulo (Nu)O-P-O, mientras que la Figura 4.16 presenta los cambios en el ángulo diedro (Nu)O-P-O<sub>1</sub>-O<sub>2</sub> del fosfato. Ambos ángulos se encuentran resaltados en las figuras. Dadas las similitudes entre las superficies de energía y las trayectorias de dinámica para las molécula con un mismo grado de sustitución, estas gráficas muestran únicamente los resultados de la serie de fenil, difenil y trifenilfosfato.



**Figura 4.15 :** Cambios en el ángulo (Nu)O-P-O durante la metadinámica. Las flechas indican las zonas en donde se encuentra la estructura modelo.

En el estado de reactivos de los mono-ésteres, el ángulo (Nu)O-P-O es de aproximadamente 60°. En estos casos el nucleófilo no puede formar el estado fosforano, a diferencia de los sistemas di- y tri-éster donde los reactivos se caracterizan por la formación de este intermediario. Este estado presenta una geometría de bipirámide trigonal para el átomo de fósforo, caracterizado aquí por un ángulo (Nu)O-P-O de aproximadamente 90°. Esto indica que el nucleófilo se encuentra en la posición apical del fosforano para di- y tri-

ésteres, mientras que para el mono-éster el fósforo mantiene una estructura con mayor carácter tetraédrico. En todos los sistemas, el ángulo (Nu)O-P-O para los productos aumenta a valores alrededor de 110°, lo que indica una conformación tetraédrica para el fosfato.



**Figura 4.16**: Cambios en el ángulo (Nu)O-P-O<sub>1</sub>-O<sub>2</sub> durante la metadinámica. Las flechas indican las zonas en donde se encuentra la estructura modelo.

De igual manera, la reacción puede ser caracterizada mediante cambios en el ángulo diedro  $(Nu)O-P-O_1-O_2$ , destacado en las estructuras de la Figura 4.16. Los tres tipos de fosfatos alcanzan la estabilización en el estado de reactivos cuando el ángulo  $(Nu)O-P-O_1-O_2$  es aproximadamente  $0^\circ$ . Se observan pequeños incrementos de 1 o 2 unidades en el valor promedio del diedro al ir aumentando el grado de sustitución. Al cambiar a productos, el ángulo diedro también muestra un ligero aumento de mono– a di– y posteriormente a tri–ésteres. Estas variaciones entre las series se atribuyen al efecto estérico entre los grupos del fosfato, que se vuelve más importante al aumentar el grado de sustitución.  $^{48,158}$ 

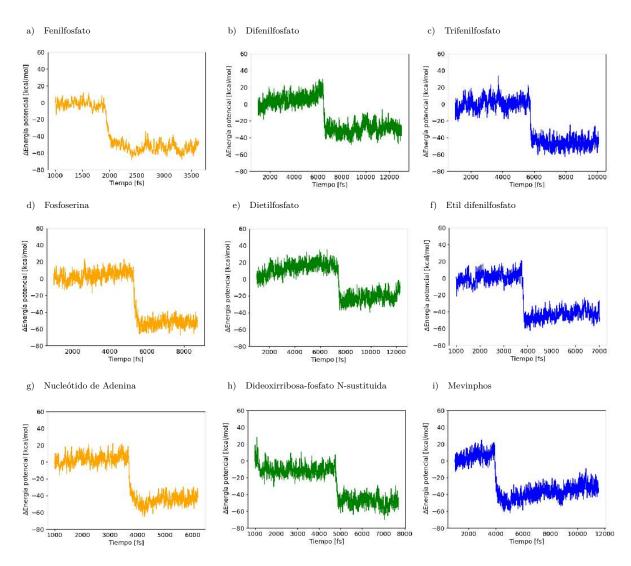
Observando las Figuras 4.15 y 4.16 se puede notar que los tiempos en el que ocurren los cambios químicos son distintos para cada sistema. Dado que los tiempos de propagación son diferentes para cada trayectoria, la Tabla 4.5 muestra los tiempos promedios de duración para cada complejo. Es importante recordar que en las simulaciones de metadinámica bien templada la tasa de deposición del potencial gaussiano disminuye con el

**Tabla 4.5 :** Tiempo promedio para las simulaciones de Metadinámica bien templada (WT–MetaD).

Serie	Tiempo WT-MetaD [ps]
Mono-éster	
Fenilfosfato	3.4
Fosfoserina	6.7
Nucleótido de Adenina	5.6
Di–éster	
Difenilfosfato	13.0
Dietilfosfato	17.8
Dideoxirribosa-fosfato N-sustituida	6.0
Tri–éster	
Trifenilfosato	9.7
Etil difenilfosfato	10.1
Mevinphos	10.0

tiempo de simulación. Esto impide que el potencial empuje al sistema hacia regiones de alta energía, donde surgen configuraciones termodinámicas irrelevantes para el proceso. <sup>114</sup> Además, la naturaleza del sistema define la cantidad de tiempo necesario para completar el proceso de reconstrucción de la FES.

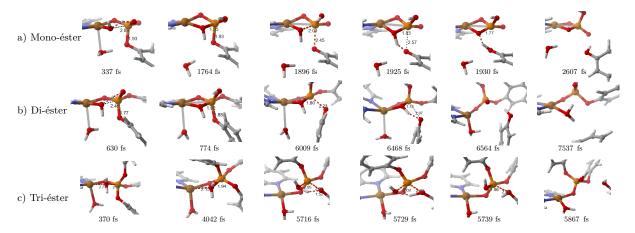
La superficie de energía libre es una representación visual poderosa que nos da indicios claros del proceso de reacción. No obstante, es relevante mencionar que la simulación de dinámica molecular está representando una reacción química, por lo que se espera una disminución de la energía potencial del sistema durante la trayectoria. La Figura 4.17 presenta los cambios en la energía potencial para los procesos estudiados. Se puede observar que la coordenada de reacción procede con una disminución de la energía potencial total del sistema, al cambiar de reactivos a productos. Estas disminuciones son notorias y cambian en su posición temporal en cada sistema. Tanto en los perfiles energéticos, como en los cambios de ángulos internos del fosfato, es posible observar estos cambios abruptos, los cuales se relacionan directamente con una estabilización de los productos. Cabe mencionar que el análisis de las barreras de reacción se realiza no con los perfiles de energía potencial, sino con las rutas de mínima energía calculadas para cada una de las superficies.



**Figura 4.17 :** Perfiles de energía potencial del conjunto de moléculas analizadas. Amarillo: mono-ésteres, verde: di-ésteres y azul: tri-ésteres.

Para analizar el mecanismo con detalle estructural es importante revisar las trayectorias de dinámica molecular. La Figura 4.18 muestra la representación detallada de las transformaciones estructurales a lo largo de las trayectorias de dinámica molecular Ab Initio. Al igual que en el análisis de los ángulos del fosfato, las estructuras aquí mostradas corresponden a la serie de fenilfosfatos.

Además de los cambios estructurales en el fosfato, es posible observar los rearreglos en el complejo metálico durante las simulaciones. Para los mono- -y di-ésteres, se pue- de observar en el primer fotograma que la reacción avanza a través de un mecanismo



**Figura 4.18 :** Capturas seleccionadas para las trayectorias de WT–MetaD: a) Fenilfosfato, b) Difenilfosfato, c) Trifenilfosfato. Cada captura representa el inicio de un arreglo estructural específico durante la trayectoria.

coordinado, asistido por sustrato. En este proceso el nucleófilo y el fosfato se encuentran enlazados directamente al cobre. Se observa que el ion metálico entrega simultáneamente un nucleófilo coordinado y además actúa como un ácido de Lewis que polariza el enlace P-O (mecanismos a) y b) de la Figura 2.3), mejorando la velocidad y en la selectividad del proceso. 16 Este mecanismo es común en reacciones hidrolíticas y metanolíticas promovidas por metales de transición. Por otro lado, el mecanismo del tri-éster es no coordinado, asistido por solvente. El cobre polariza el enlace P-O, pero el nucleófilo está fuera de la primera esfera de coordinación. Sin embargo, las trayectorias de los tres tipos de fosfo-ésteres presentan ataques nucleofílicos no lineales o frontside, 49 demostrando que este tipo de ataque es factible, a diferencia de los obtenidos para la hidrólisis mediada por OH<sup>-</sup>. Los ataques frontales se caracterizan por formar un ángulo (Nu)O-P-(O)LG menor a 180°. En este caso, este ángulo es de aproximadamente 90°, como se puede ver en los primeros tres cuadros de la Figura 4.18 y en el análisis estructural de la Figura 4.16. También es posible notar que para di- y tri-ésteres, el fosforano pentavalente tiene una vida más larga (mayor a 4 ps) en comparación con la misma interacción en el monoéster (menor a 300 fs). Esto muestra que los monoésteres no pueden estabilizar este intermediario fosforano, como se ha discutido anteriormente. En otras palabras, la posibilidad de formar un intermediario fosforano nace de la naturaleza del fosfato. Durante la formación del fosforano existe una considerable acumulación de carga en el fósforo, la cual es mejor

estabilizada con el aumento de grupos –R en el fosfato. También, los múltiples sustituyentes pueden imponer efectos estéricos que favorecen la geometría bpt del fosforano sobre el estado tetraédrico más compacto del fosfo-éster. Finalmente, las configuraciones de alta energía por las que reaccionan los sistemas se muestran en los cuadros 3 y 4. Estas configuraciones viven alrededor de 40 fs en la trayectoria de metadinámica. Por convención, las reacciones que ocurren en intervalos de tiempo menores a 60 fs, como las reacciones simples de Diels-Alder, son conocidas como "dinámicamente concertadas". <sup>165, 166, 69</sup>

Respecto a la coordinación del cobre, la estructura del complejo permanece como cuadrada plana para mono-ésteres. La molécula de agua en posición apical abandona la primera esfera de coordinación del cobre, promoviendo la aparición del mecanismo coordinado (ver cuadros 1 y 2 en la Figura 4.18). El cobre forma una estructura cuadrada plana que se mantiene durante toda la trayectoria. En di- y tri-ésteres se observó un cambio de geometría para el Cu, desde una bipirámide trigonal (bpt) hacia una estructura cuadrada plana, la cual se aprecia claramente en los últimos dos recuadros. La formación del fosforano en di- y tri-ésteres permite al centro metálico mantener la unión con las moléculas de agua, ya que su esfera de coordinación no está tan comprometida con enlaces Cu-Fosfato, como en los mono—ésteres. Se puede ver que en estos sistemas, una molécula de agua se intercambia de una posición apical a una ecuatorial, promoviendo así el cambio en la geometría del complejo metálico. Este fenómeno se ha observada en nucleasas artificiales basadas en Cu(II).<sup>8,16,19,39-41,52</sup> De igual modo, para di- y tri-ésteres se hace visible la posibilidad de repetir el ciclo catalítico mediante el ataque al centro metálico por parte de otra molécula de H<sub>2</sub>O.

El análisis de la ruta de mínima energía revela que todas estas reacciones catalizadas siguen un proceso concertado con un único paso lento y un estado de transición similar. En todos los sistemas, el cobre logra inducir un ataque no lineal del nucleófilo al fosfato, a pesar de que puedan existir variaciones en el grado de asociación de esta última especie. Esta conformación del complejo conduce a una disminución en la barrera de reacción para la hidrólisis de los fosfoésteres.

# 4.4. Conclusiones parciales

Con la metodología propuesta fue posible observar el proceso de hidrólisis de un conjunto de diferentes fosfoésteres, asistido por el complejo $[Cu(phen)(H_2O)]^{2+}$  y empleando un enfoque de energía libre. El análisis detallado de las superficies de energía y de las trayectorias de dinámica molecular Ab Initio son un herramienta útil en la elucidación y entendimiento del mecanismo.

El mecanismo ocurre a través de diferentes rutas, en función del grado de sustitución del éster fosfato. Para mono- y di-ésteres, una molécula de agua coordinada ecuatorialmente al átomo de Cu intercambia un protón con un átomo de oxígeno disponible en el fosfoéster. Luego, el nucleófilo activado ataca el centro de fósforo a través de un mecanismo coordinado asistido por sustrato. De esta manera se forma el grupo saliente, que después se protona con el átomo de hidrógeno restante del nucleófilo. Por otro lado, en tri-ésteres, una molécula de agua no coordinada al cobre ataca el fósforo a través de un mecanismo de esfera externa mediado por solvente. Posteriormente, el grupo saliente forma un enlace con un protón del H<sub>2</sub>O atacante y luego se libera.

La información obtenida de la FES permite comprender la participación de intermediarios fosforanos para di— y tri-ésteres. Esto indica que la formación del fosforano depende del grado de sustitución del éster. Justamente, la presencia del fosforano en di— y tri-ésteres se debe a que estos sistemas pueden estabilizar esta geometría a través de procesos de estabilización de carga y de disminución de efectos estéricos. Se observó que los mono-ésteres mantienen una estructura más tetraédrica en los reactivos y productos, mientras que los di— y tri-ésteres pueden formar un intermediario fosforano con geometría de bipirámide trigonal.

Todas estas reacciones catalizadas proceden de manera concertada con solo un paso lento y un estado de transición similar, según revela el análisis de la ruta de mínima energía. En todos los sistemas el cobre logra forzar un ataque no lineal del nucleófilo al fosfato, aunque existan diferencias en el grado de asociación de esta última especie. Dicho arreglo produce una disminución en la barrera de reacción de la hidrólisis de los

fosfoésteres. Estas características de la coordinación del complejo y de la reactividad del fosfato, pueden ser relacionada con la topología de la FES y por tanto con el mecanismo de reacción.

5

# Hidrólisis de un pesticida asistida por un complejo injerto en una membrana polimérica

# 5.1. Objetivos específicos

En la segunda parte del trabajo se buscó modelar la hidrólisis del pesticida paraoxón por un compuesto de cobre injerto sobre una membrana polimérica. Dado que en la sección anterior se describieron los detalles técnicos para simular la hidrólisis de diversos fosfoésteres, los objetivos específicos de esta sección son:

- Construir un modelo de membrana polimérica, con un ligante injerto en su estructura.
- 2. Describir la formación de complejos de cobre injertos en la membrana.

- 3. Describir la interacción del paraoxón sobre la membrana modificada.
- 4. Detallar el mecanismo de reacción del paraoxón sobre la membrana en términos de la superficie de energía libre.
- 5. Comparar la actividad del complejo de cobre injerto en la membrana con el complejo aislado.

## 5.2. Metodología

Todos los cálculos realizados en esta sección se llevaron a cabo con el mismo radio de corte optimizado en la Sección 4.2. De esta manera, la labor inicial se centró en la modelación de la membrana polimérica modificada. Para esta parte del trabajo, el nivel de teoría empleado fueron los cálculos híbridos mecánica cuántica (QM)/mecánica molecular (MM), o QM/MM. Por esta razón resultó importante validar la nueva metodología, comparando los resultados obtenidos con los ya mostrados en la sección anterior.

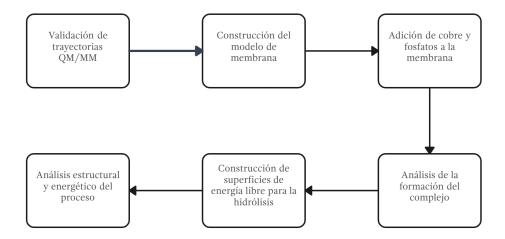


Figura 5.1: Metodología empleada en la hidrólisis mediada por una membrana modificada.

Una vez validada la implementación QM/MM en CP2K 8.1, se procedió a construir el modelo de membrana. Este modelo se generó a partir de unidades de polipropileno con un ligante injerto en su estructura. Después de equilibrar esta membrana se adicionaron átomos de cobre y moléculas de paraoxón. La simulación inicial de la membrana y los

sustratos se realizó empleando mecánica molecular con el campo de fuerzas GAFF2. 
Posteriormente, con el objetivo de analizar a un nivel cuántico la formación del complejo, se realizó un análisis de integración termodinámica en un subsistema DFT. Este subsistema se compuso de un ligante, un átomo de cobre, dos moléculas de agua y un fosfato. Por último, se procedió a analizar la reacción de hidrólisis del tri-éster mediante la reconstrucción de las superficies de energía libre y las rutas de mínima energía.

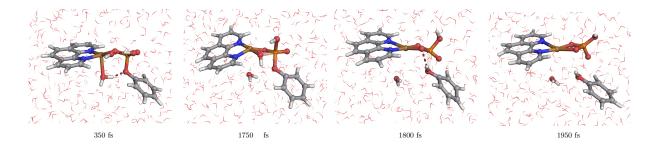
## 5.3. Resultados

## 5.3.1. Validación de trayectorias QM/MM

Con el objetivo de validar los resultado de los cálculos QM/MM, se analizó el mismo sistema de prueba empleado para la calibración de los parámetros WT-MetaD. Así, el complejo [Cu(phen)(fenilfosfato)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> fue simulado empleando la aproximación QM/MM. La configuración inicial del sistema corresponde a la estructura base mostrada en la Figura 4.6. Toda la estructura del complejo se seleccionó como el subsistema cuántico. Para modelar el disolvente, no se empleó disolvente implícito. Se utilizaron 8000 moléculas de H<sub>2</sub>O descritas mediante el campo de fuerzas TIP3P, <sup>168</sup> el cual ha sigo ampliamente utilizado en sistemas complejos,  $^{169-172}$  así como en simulaciones QM/MM.  $^{173-176}$ Todas las interacciones clásicas se modelaron con el campo de fuerza GAFF2, el cual es el campo de fuerza recomendado para moléculas orgánicas. Este force field logra reproducir con mayor precisión geometrías moleculares, espectros vibracionales y energías de interacción Ab Initio en comparación con su predecesor, GAFF. 167 La trayectorias se propagó en un ensamble NVT utilizando el termostato  $CSVR^{177}$  con un timestep de 1 fs. Se empleó el método de desacoplamiento-reacoplamiento de Blöchl<sup>109</sup> para considerar las condiciones periódicas en el sistema QM/MM. Se utilizó el método Smooth Particle Mesh Ewald (SPME)<sup>178</sup> para considerar las interacciones electrostáticas del subsistema MM. Por otro lado, el acoplamiento electrostático entra las secciones QM y MM se llevo a cabo bajo el esquema GEEP, <sup>107</sup> con el objetivo de evitar el fenómeno de *spill-out* o desbordamiento electrónico. 105 Los parámetros para la parte QM fueron los mismos que los empleados en

la sección anterior. Se utilizó el nivel de teoría  $\omega$ B97X–D3/MOLOPT-GTH-DZVP en el esquema GPW y el método de transformación orbital para la convergencia de la función de onda. Se repitieron los parámetros WT–MetaD: 50 fs, 0.5 kcalmol<sup>-1</sup>, 0.3 Å, para el tiempo de deposición, altura y ancho del potencial gaussiano, y se usaron las mismas variables colectivas d(Nu-P) y d(P-LG).

Replicando estos parámetros se observó una trayectoria similar a la obtenida mediante la simulación enteramente QM. Se presenta en la Figura 5.2 capturas seleccionadas del proceso de hidrólisis del fosfato. Pueden observarse las moléculas de agua explícitas que rodean al sistema (sección clásica), así como la formación y ruptura de enlaces (sección cuántica). Considerando estos resultados, se concluyó que los parámetros empleados para estas simulaciones QM/MM son capaces de replicar el comportamiento obtenido con el modelo Ab Initio puro. Con esta conclusión se procedió al diseño del modelo de membrana, el cual no podría realizarse a nivel totalmente DFT debido a la cantidad de átomos que la modelación necesita. Por esta razón parte de la membrana se modeló usando mecánica clásica.



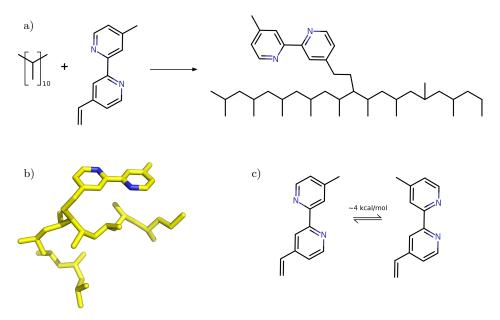
**Figura 5.2 :** Capturas seleccionadas para la trayectoria de validación de metadinámica QM/MM usando el sistema  $[Cu(phen)(fenilfosfato)(H_2O)_2]^{2+}$ .

### 5.3.2. Construcción del modelo de membrana

En la actualidad, existen diversos esfuerzos orientados a la modificación de membranas poliméricas, con el objetivo de mejorar sus propiedades mecánicas o su capacidad de adsorción hacia determinado sustrato. Diversos trabajos se centran en la utilización de membranas de polipropileno (PP) modificadas para mejorar la adsorción de compuestos, como metales pesados y compuestos de arsénico. <sup>179–182</sup> De forma paralela, se ha descrito la posibilidad de injertar ligantes donadores de nitrógeno, como la vinilbipiridina. <sup>183</sup> El objetivo es formar complejos de cobre injertos en membranas de trimetilolpropano trimetacrilato (TRIM) capaces de hidrolizar fosfatos. Por un lado, se ha reportado que las membranas modificadas de polipropileno son capaces de ofrecer mejor selectividad y resistencia química al compararse con las membranas sin modificar. <sup>180</sup> Por otro lado, se ha demostrado la formación exitosa de complejos de cobre en membranas con ligantes donadores de nitrógeno. <sup>184,183</sup> Estos dos aspectos motivaron la elección de un modelo de membrana de polipropileno con moléculas de 4–vinil–4'–metil–2,2'–bipiridina (vbpy) injertadas en la matriz polimérica.

En ciencia de polímeros los modelos de membrana simuladas con dinámica molecular suelen construirse mediante la replicación de una unidad monomérica base. <sup>185–194</sup> Diversos trabajos han presentado el análisis de propiedades de membranas de polipropileno mediante la modelación computacional. En este trabajo se formó la unidad monomérica base utilizando una relación de segmentos isotácticos: atácticos 9:1, ya que es la relación que se encuentra comúnmente en el PP industrializado. <sup>188</sup> Unida a la cadena alifática, se adición una molécula de vbpy, lo cual forma la unidad PPB mostrada en la Figura 5.3a). Esta adición corresponde a un porcentaje de injerto (grafting degree, GD) del 46 %.

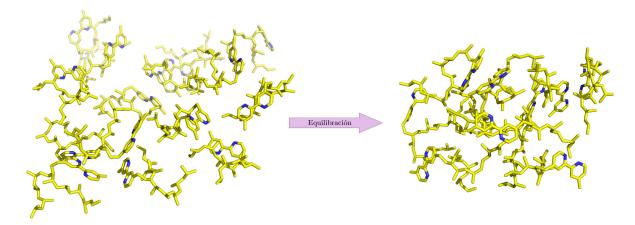
Con el objetivo de partir de una estructura estable, se realizó una búsqueda de confórmeros para la unidad PPB. La búsqueda se llevó a cabo mediante una aproximación que combina los cálculos semiempíricos GFN2-xTB, <sup>195</sup> con cálculos de metadinámica basados en el RMSD de la estructura. Esta aproximación, conocida como iMetaD-GC, se encuentra implementada en el código CREST. <sup>196</sup> Dada la complejidad del sistema a visualizar, se escogió una representación simplificada de la estructura PPB, la cual se presenta en la Figura 5.3b). Una vez obtenida la estructura de más baja energía mediante un cálculo de optimización, se procedió a crear el modelo de membrana empleando 15 unidades PPB. Esta arreglo estructural se realizó mediante el programa Packmol. <sup>197</sup> Se han publicado en la literatura trabajos en donde se emplean 10<sup>189,190,194</sup> o 12<sup>193,198</sup> unidades monoméricas para formar el modelo de la membrana. En la Figura 5.4a) se muestra la estructura inicial



**Figura 5.3 :** Diseño de la unidad PPB para la formación de la membrana. a) Formación estructural del monómero PPB. b) Confórmero más estable del monómero PPB. c) Energía de rotación del diedro entre anillos de la molécula vbpy.

obtenida Packmol. Los parámetros de la estructura PPB para el campo de fuerza GAFF2 se obtuvieron mediante antechamber. <sup>199</sup> Las trayectorias se propagaron solvatando el sistema con 18K moléculas de agua en un octaedro truncado. El sistema se equilibró durante 300 ps en un ensamble NVT para obtener la estructura mostrada en la Figura 5.4b). La estructura equilibrada muestra un rearreglo de los motivos N–N en el sistema. Dada la polaridad de estos grupos, los anillos de la bipiridina se estabilizan en la parte externa de la membrana. Mientras tanto, en la parte interna las interacciones débiles entre la parte alifática gobiernan la estructura.

Una vez formado el modelo de membrana, los siguientes pasos consisten en la adición de átomos de cobre para formar los complejos, seguida de la incorporación de moléculas de paraoxón que servirán como sustrato. La Figura 5.5 muestra el proceso químico que se describirá en esta segunda parte del trabajo, en donde el objetivo es crear un modelo de membrana capaz de hidrolizar a la molécula del pesticida.



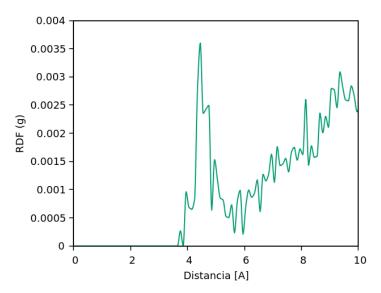
**Figura 5.4 :** Proceso de equilibración del modelo de membrana. El modelo consta de 15 unidades PPB.

**Figura 5.5 :** Proceso químico esperado para la hidrólisis de paraoxón sobre la membrana modificada.

## 5.3.3. Absorción molecular del fosfato en la membrana

Con el fin de analizar las interacciones Cu-N dentro de la membrana, se agregaron 15 átomos de Cu<sup>2+</sup> al sistema equilibrado mostrado en la Figura 5.4b). Esta elección se realizó con el fin de tener una relación 1:1 con las unidades PPB. Como contraiones se usaron 30 átomos de Cl<sup>-</sup>. Ambos conjuntos de iones fueron colocados mediante ambertools, empleando los parámetros de interacción de GAFF2. Este nuevo sistema se equilibró

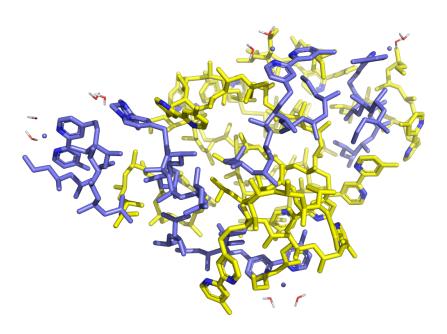
nuevamente por 300 ps, en las mismas condiciones, usando una celda cúbica de 120 Å. La Figura 5.6 muestra la función de distribución radial calculada para la interacción  $Cu^{2+}-N(vbpy)$ , se calculó para los último 200 ps de la trayectoria, con un tamaño de bin de 0.1Å. Es posible observar que las distancias entre los átomos de cobre y los nitrógenos de los ligantes aparecen pobladas hasta después de 4Å.



**Figura 5.6 :** Función de distribución radial entre los átomos de cobre y los nitrógenos en el modelo clásico.

Estos resultados indican que no existe una interacción importante entre los átomos clásicos de cobre y los átomos de nitrógeno. Los átomos de cobre agregados adicionados con antechamber se modelan como cargas puntuales, dotados únicamente de parámetros que describen los contactos a largo alcance. Por tanto, las interacciones metal—ligante no se encuentran bien descritas, es por eso que no se observan interacciones Cu-N a distancias más corta. Antes de analizar el sistema mediante QM/MM, se modeló completamente mediante mecánica molecular, con el objetivo de eficientar el proceso de cálculo . Para analizar con mayor detalle las interacciones metal—ligante, los factores estructurales de los complejos de cobre con vbpy se parametrizaron empleando el servidor Pyred,  $^{200}$  con el nivel de teoría  $\omega$ B97X-D3/6-31+G(2d,2p). Los parámetros obtenidos de los enlaces y ángulos a nivel DFT se agregaron al campo de fuerza GAFF2. Dado que los ángulos diedros que forman los átomos de cobre con los ligantes son esencialmente rígidos, se

emplearon los parámetros estándar de AMBER.<sup>201,202</sup> En la Figura 5.3c) se presenta la barrera rotacional de la bipiridina, siendo de ~4 kcalmol<sup>-1</sup>,<sup>203</sup> esto indica que es un cambio que puede lograrse a la temperatura de la simulación. Empleando la última estructura equilibrada del modelo de membrana, se analizaron las bipiridinas que se encontraban en un arreglo *cis* respecto a los átomos de nitrógeno. Se encontraron cinco unidades PPB con esto arreglo. Dichas unidades se seleccionaron para formar complejos de cobre con u na molécula de vbpy y 2 moléculas de agua, formando una estructura cuadrada plana.<sup>23</sup> Las nuevas unidades se nombraron PPC y se muestran en la Figura 5.7 en color morado. Resultados experimentales de la membrana TRIM con bipiridina muestran una concentración de cobre absorbida de 18 mg Cu/1 g polímero,<sup>183</sup> esta concentración equivale de 1 a 3 átomos de cobre por unidad de vbpy, dependiendo el porcentaje de ligante injerto en el polímero. En el modelo aquí mostrado, la concentración de cobre es 3 átomos por unidad de bipiridina.



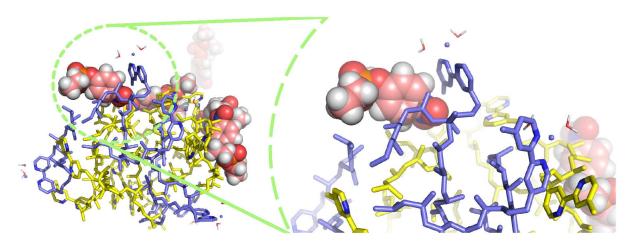
**Figura 5.7 :** Modelo de membrana con unidades PPB y PPC, las cuales contienen complejos de cobres parametrizados.

La estructura mostrada en la Figura 5.7 fue equilibrada por 500 ps, en las mismas condiciones que las simulaciones anteriores. Después de la equilibración del modelo completo de la membrana se procedió a la adición de las moléculas de paraoxón, como muestra el proceso de la Figura 5.5. Para tener la misma relación Cu:Fosfato, se adicionaron 5 moléculas de paraoxón al sistema de forma aleatoria, utilizando Packmol. Se restringió la distancia inicial entre los fosfatos y el cobre a 10 Å. Estos arreglos se realizaron por triplicado con el objetivo de disminuir el sesgo en la colocación de las posiciones de los fosfatos.

La distancia Cu-OP resulta importante para caracterizar la interacción metal-ligante, ya que se espera que la interacción metal-ligante proceda a través del oxígeno sin sustituir del fosfato. En general, las distancias a las cuales interacciona el fosfato con los átomos metálicos son mayores a 10 angstrom. Esto indica que los fosfatos no tienen un sitio preferido en la membrana, y por lo tanto las interacciones que estabilizan su adsorción son interacciones débiles con la cadena alifática. Para una de las tres trayectorias propagadas se observó la menor disminución de esta distancia, mostrando valores de aproximadamente 10 Å. Por esta razón se eligió esta trayectoria para realizar las siguientes simulaciones.

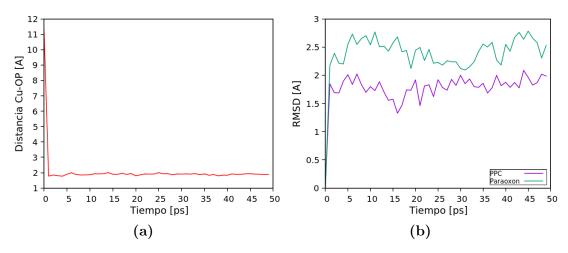
De la trayectoria elegida se extrajo la estructura con la menor distancia Cu-OP, la cual se encontró alrededor de 450 ps de simulación. Posteriormente, la estructura se equilibró 300 ps en el ensamble NVT. La Figura 5.8 muestra la estructura equilibrada. En la imagen es posible observar que cuatro de las cinco moléculas de paraoxón se encuentran interaccionando directamente con la superficie de la membrana. Sin embargo, las interacciones membrana-fosfato son principalmente débiles. Este número de moléculas de fosfato absorbidas sobre la superficie se observa en las tres trayectorias propagadas. En el acercamiento realizado a la figura se aprecia que la interacción Cu-fosfato no es como se esperaba, ya que el fosfato y el cobre están muestran una gran separación.

Debido a que las simulaciones se realizaron mediante dinámica molecular convencional, los fosfatos no visitaron todas las conformaciones posibles en el tiempo de simulación. Por esta razón se propuso la imposición de un potencial armónico sobre la distancia Cu-OP del sistema. El potencial se impuso con una constante de 3.1kcalmol<sup>-1</sup>. El potencial se



**Figura 5.8 :** Modelo de membrana equilibrado con fosfatos absorbidos sobre la superficie. Se presentan un acercamiento a la región Cu–Fosfato.

incorporó por 3 ps y posteriormente se eliminó. El perfil de la distancia Cu-OP se muestra en la Figura 5.9a). Se observa que después de la aplicación del potencial, la distancia Cu-OP se mantuvo oscilando en 1.9 Å, hasta completar los 50 ps de simulación. Esto indica que la interacción entre el cobre y el fosfato se encuentra estabilizada a lo largo de la simulación, y es solo la duración de la trayectoria la que evita que se observe esta interacción en una simulación convencional. Para verificar la estructura del sistema después de la imposición del potencial, se analizó el RMSD del fosfato y de la unidad PPC involucradas en la interacción (ver Figura 5.9b)). Los cambios en el RMSD indican un salto importante en la primera parte del gráfico, lo cual se relaciona a la imposición del potencial armónico. Sin embargo, una vez que este se elimina, se observa que el RMSD de la unidad PPC, y de la molécula de paraoxón, se mantienen oscilando en un valor constante. Es decir, una vez que el sistema encuentra la interacción del fosfato con el cobre, tanto la distancia metal-ligante, como la estructura del sistema, se mantienen estabilizadas en esa región. La Figura 5.9 muestra la estructura estable del complejo injerto una vez removido el potencial impuesto. De este modo, se podría concluir que el fosfato puede llegar a formar un complejo estable con el metal injerto en la membrana, usando la bipiridina como ligante.



**Figura 5.9 :** a) Perfil de distancia Cu-OP. El potencial impuesto se aplicó de 0 a 3 ps. b) RMSD del fosfato y la unidad PPC interactuantes.

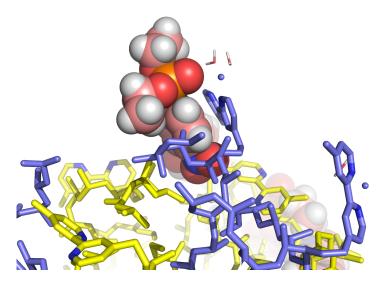
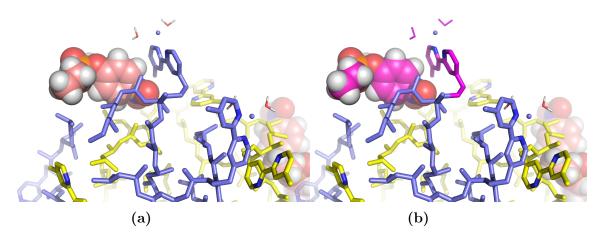


Figura 5.10 : Estructura estable del sistema después de la imposición del potencial sobre la distancia Cu-OP.

# 5.3.4. Formación del complejo de fosfato sobre la membrana modificada

Las interacciones entre el fosfato y el complejo analizadas hasta el momento se realizaron a nivel clásico, considerando únicamente interacciones electrostáticas y de Van der Waals. Por esta razón se realizó un análisis QM/MM para describir con más detalle

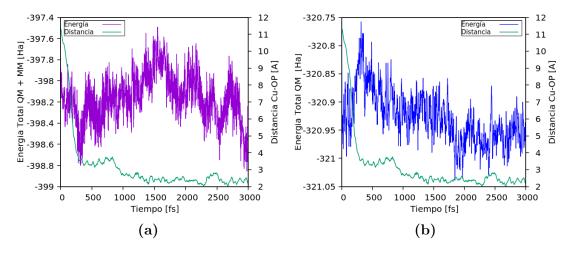
las interacciones entre el sustrato y el complejo injerto en la membrana. En la Figura 5.11 se presenta la estructura de partida para las trayectorias QM/MM. Esta estructura corresponde a la última conformación equilibrada mediante mecánica molecular, antes de la imposición del potencial en la distancia Cu-OP. La configuración contiene ~17K átomos, de los cuales 64 están simulados con DFT. La imagen 5.11b) muestra los átomos seleccionados para los cálculos QM. Esta subsección corresponde a todos los átomos del fosfato, dos moléculas de agua, un átomo de cobre, y los átomos de la bipiridina marcados en rosa, incluyendo además nitrógenos e hidrógenos.



**Figura 5.11 :** Estructura inicial para la simulación QM/MM. a) Última equilibración del sistema clásico. b) En rosa aparecen los motivos moleculares simulados a nivel DFT.

Para tener un indicio de la energía de interacción entre el metal y el sustrato, se hizo un análisis similar al de la sección anterior. Se propagaron simulaciones con un potencial impuesto en la distancia Cu-OP, utilizando una constante de resorte de 3.1 kcalmol<sup>-1</sup>, al igual que en el experimento anterior. Los resultados de estas simulaciones mostraron un movimiento abrupto entre los dos átomos, logrando que la simulación se volviera poco estable e imposible de propagar. A diferencia de las simulaciones MM, en las simulaciones Ab Initio el tratamiento de los electrones se hace a través de densidades electrónicas, más susceptibles a deformaciones e interacciones de corto y largo alcance. Por esta razón la constante se disminuyó a 0.6 kcalmol<sup>-1</sup>. El potencial se adicionó unicamente en los primeros 500 fs, y después fue removido. La Figura 5.12 muestra los perfiles de energía y de distancia para la propagación de este sistema. Ambas gráficas presentan los cambios

de energía y de distancia Cu-OP como función del tiempo. La gráfica 5.12a) muestra los cambios en la energía total del sistema incluyendo tanto la contribución de mecánica molecular como de mecánica cuántica (QM+MM). Por otro lado, la figura 5.12b) presenta solo la energía calculada con DFT (QM). La energía QM + MM presenta oscilaciones muy grandes que no se relacionan directamente con el proceso de interacción cobre-fosfato. El perfil energético presenta un máximo alrededor de 1500 fs que se relaciona con un arreglo del disolvente en el sistema. Por otro lado, el análisis del perfil energético QM muestra un incremento sincronizado con la disminución de la distancia Cu-OP. Posteriormente, los valores de los perfiles de energía y de distancia disminuyen con el tiempo. Es decir, observamos una estabilización energética acompañada de una disminución de la distancia metal-ligante. El valor de la barrera en el subsistema cuántico fue de aproximadamente 60 kcalmol<sup>-1</sup>, lo cual es sumamente grande para la naturaleza de la interacción. Estas interacciones del tipo enzima-sustrato suelen oscilar alrededor de 5 a 15 kcalmol<sup>-1</sup>. <sup>204,205</sup>



**Figura 5.12 :** Perfiles de energía y distancia para el sistema QM/MM. a) Energía total del subsistema QM+MM b) Energía total del subsistema QM.

#### Integración termodinámica

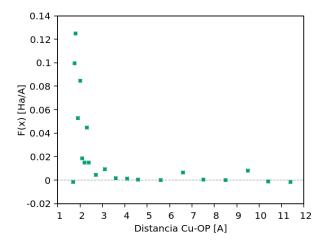
Debido al alto valor de la barrera de energía obtenida de la trayectoria QM/MM, se procedió a realizar un análisis energético más fino para la complejación del sustrato. En el sistema fosfato-membrana el fosfato se encuentra en un medio mucho más complejo que el

simple solvente,<sup>150</sup> ya que también existen interacciones con los átomos de la membrana. Para obtener una mejor aproximación de las barreras energéticas es necesario emplear un método de muestreo de energía libre. En este caso se utilizó el método de integración termodinámica, con el objetivo de conocer la energía del proceso de complejación del sustrato. Partiendo de la estructura inicial mostrada en la Figura 5.11, se eligieron distintos puntos entre la posición inicial de 11.4 Å hasta 1.7 Å. De 1.7 Å hasta 4.1 Å se hicieron espaciamientos más pequeños con el objetivo de analizar cambios más pronunciados en esa región. Cada uno de estos puntos mostrados en la Figura 5.13 representa una propagación de dinámica molecular, con una restricción en la distancia Cu-OP.

La estructura inicial es la mostrada en la Figura??. Las restricciones partieron desde la distancia Cu-OP de este sistema. Sin embargo, las restricciones a valores pequeñas, pueden desembocar en inestabilidades en el sistema, ya que se promueve un cambio abrupto en la conformación de la membrana y del complejo injerto. Por esta razón, las propagaciones se iniciaron aplicando un potencial armónico a la distancia Cu-OP durante 2000 fs. Terminada esta simulación, se empleó la restricción sin ninguna clase de potencial. Los sistemas QM/MM se equilibraron durante 8000 fs. Como se muestra en la Figura 4.2, este tiempo resulta suficiente para equilibrar simulaciones de dinámica Ab Initio. Una vez equilibrado el sistema, se procede a analizar el valor del multiplicador de Lagrange asociado a la restricción. El valor medio de este término corresponde a la fuerza que se necesita para mantener fija la restricción (ver sección 2.3.2). Este término es el que se presenta en el eje vertical de la Figura 5.13. Por otro lado, el valor de la restricción se grafica en el eje horizontal. De esta forma, es posible asociar los máximos del gráfico con los estados en donde se requiere una mayor fuerza para que el sistema se mantenga en esa configuración. En la Figura se observan máximos locales alrededor de 6.5 Å y 9.5 Å, los cuales se relacionan con conformaciones que son ligeramente más energéticas, debido a interacciones del fosfato con la membrana. Este es otro indicio de la estabilización del fosfato sobre la membrana de polipropileno.

Es posible identificar que la barrera más alta del sistema se encuentra alrededor de 1.9Å. Hacia distancias Cu-OP más cortas el sistema se estabiliza y baja su energía. Para

obtener la barrera energética asociada a este cambio es necesario integrar numéricamente el perfil. La integración de la curva se realizó empleando la regla de Simpson, implementada en SciPy.  $^{206}$  El valor de la barrera de energía libre calculada es de  $10.1~\rm kcalmol^{-1}$ , el cual muestra una mayor concordancia con la naturaleza de la interacción. Así, empleando una equilibración clásica, es posible obtener estructuras iniciales que representen la interacción del sustrato sobre la membrana. Posteriormente, la interacción enlazante entre el paraoxón y el complejo se debe analizar mediante una aproximación Ab~Initio.



**Figura 5.13 :** Integración termodinámica para el proceso de complejación del fosfato. El punto más alejado es su estado inicial absorbido sobre la membrana, y el punto más cercano es la distancia de complejación con el metal.

El método de integración termodinámica nos da un indicio del proceso de complejación del fosfato, el cual se difunde a través de la membrana hasta formar a un complejo metálico. La estructura con el fosfato coordinado, obtenida de la integración termodinámica, se equilibró por 5 ps para asegurar la estabilidad del sistema. La estructura final de este proceso se presenta en la Figura 5.14. Se aprecia que la conformación del fosfato es similar a la estructura equilibrada en la aproximación totalmente clásica (ver Figura 5.10). La estructura mostrada en la Figura 5.14 presenta dos tipos de molécula agua. Las moléculas en color rosa corresponden a moléculas del subsistema QM, mientras que las moléculas de agua marcadas en verde pertenecen al subsistema MM. Al propagar la trayectoria, una de las moléculas cuánticas abandona la esfera de coordinación del cobre, difundiéndose hacia el medio clásico. Interesantemente, el cobre logra completar su esfera de coordinación me-

diante la interacción de las moléculas de agua clásicas ya mencionadas. Este fenómeno da certeza de la buena descripción de las interacciones metal—ligante, entre los sistemas QM y MM. La estructura del complejo [Cu<sup>(II)</sup>(vbpy)(paraoxon)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>-mebrana]<sup>2+</sup>, mostrada en la Figura 5.14, fue utilizada para el análisis de la reacción de hidrólisis del fosfo-éster.

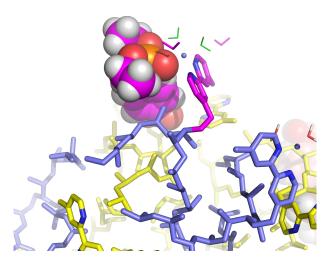


Figura 5.14: Estructura QM/MM equilibrada después de la integración termodinámica.

## 5.3.5. Descripción del mecanismo de hidrólisis catalizada mediante la membrana modificada

### Análisis de la superficie de energía libre

El modelado computacional del sistema [Cu<sup>(II)</sup>(vbpy)(paraoxon)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>-mebrana]<sup>2+</sup> representa una configuración estable de la interacción metal-ligante (Figure 5.14). Esta configuración inicial fue empleada en el análisis del mecanismo de hidrólisis de la molécula de paraoxón. Basándose en evidencia teórica<sup>48</sup> y experimental,<sup>1,16</sup> así como en los resultados ya presentados en la Sección 4, se espera que el fosfato reaccione por un mecanismo no coordinado de esfera externa, el cual está asistido por solvente. En este mecanismo el tri-ésterfosfato logra estabilizar un estado pentavalente (intermediario fosforano). El átomo de cobre compleja con el fósforo y esta interacción promueve el ataque de una molécula de agua al átomo central del fosfato, formando así el fosforano.

El análisis de esta reacción se llevó a acabo empleando la técnica WT–MetaD, al igual que en la sección anterior. Todos los parámetros anteriormente calibrados fueron empleados de nuevo para las simulaciones QM/MM. Las variables colectivas utilizadas incluyeron la distancia entre el átomo de fósforo y una de las moléculas de agua que actuó como nucleófilo, d(Nu-P), y la distancia fósforo–grupo saliente, d(P-LG). Se agregó un potencial gaussiano cada 50 fs, con una altura de 0.50 kcalmol $^{-1}$  y un ancho de 0.3 Å. Kirby y colaboradores $^{207}$  han desarrollado ampliamente que el aumentar la nucleofilia del grupo atacante no generará un aumento considerable en la velocidad del catálisis, pero sí sucederá un aumento al mejorar la partida del grupo saliente. Bajo esta suposición, el nucleófilo usado en esta sección del trabajo no cambió, pero sí el medio que estabiliza al sustrato y al grupo saliente. De igual modo, Chin et al. han presentado trabajos que detallan las magnitudes de los efectos aceleradores inducidos por iones metálicos (ver Sección 2.2.1). Han encontrado que para alcanzar las velocidades de las rupturas enzimáticas de fosfoésteres se necesita la asistencia del grupo saliente.  $^9$ 

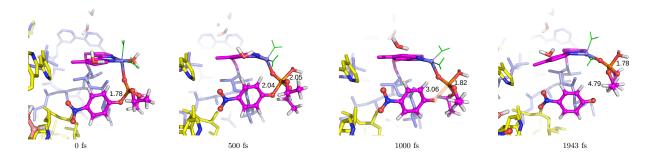
La Figura 5.15 muestra la comparación de las superficies de energía calculadas para dos sistemas. Se analizó el complejo aislado [Cu(vbpy)(paraoxon)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, y el complejo injerto en la membrana, con la estructura inicial ya discutida en la Figura 5.14. En ambas superficies es posible observar un mínimo que corresponde al estado fosforano a distancias Nu–P largas y P–LG cortas. Este mínimo representa el estado en donde el grupo saliente aún no abandona el fosfato. El mínimo correspondiente a productos es el superior izquierdo, en donde la distancia P–LG es larga, mostrando la partida del grupo y la hidrólisis del enlace del fosfato. Aunque el comportamiento general se mantiene en ambos sistemas, existen diferencias entre las superficies. En primer lugar, se observa una región extendida para el mínimo de reactivos en el complejo injerto en la membrana, la cual se alarga a valores mayores a 3.0 Å. Esta región representa la interacción que el fosfato presenta con la membrana, impidiendo un acercamiento inmediato al nucleófilo. En ambas superficies se observa que el mínimo de reactivos corresponde al intermediario pentavalente, o fosforano. No obstante, este mínimo en el complejo injerto muestra un corrimiento a la izquierda. El valor presentando en el complejo aislado es de 2.4 Å, mientras

**Figura 5.15**: Comparación de las superficies de energía libre para la hidrólisis de paraoxón. A la izquierda la FES del complejo aislado. A la derecha la FES del complejo injerto en la membrana. Las unidades de la energía están en kcalmol<sup>-1</sup>.

que en el complejo injerto s de 2.1 Å. Esto se traduce como una estabilización del fosforano a distancias más cortas. El fosfato interacciona con motivos alifáticos en la membrana, los cuales sirven de cavidad estabilizadora. De igual modo, el mínimo de los productos difiere en posición para ambos sistemas. En la superficie del complejo injerto en la membrana, el mínimo se encuentra recorrido a valores más cortos de d(P–LG). Este cambio se puede relacionar con la estabilización de la molécula de fenol en la membrana. En el complejo aislado esta molécula tiende a difundirse en el medio y a estar a una distancia más larga del fosfato. En el caso de la membrana, la estabilización del grupo saliente se da una distancia más corta. El fenol encuentra estabilización con los átomos de la membrana, los cuales rodean el sitio reactivo. El cambio estructural detallado se muestra en la Figura 5.16.

### Análisis Estructural

El proceso de hidrólisis en la membrana sigue un mecanismo de esfera externa, en donde una molécula de agua cuántica ataca al fosfato, siguiendo el mismo proceso de activación visto en tri-ésteres (ver Figura 4.9). Una vez que el agua ataca al centro de fósforo, se forma el intermediario pentavalente fosforano (ver recuadros 1 y 2 en Figura 5.16). A diferencia de la catálisis con el complejo aislado, el complejo en la membrana logra orientar al sustrato para un ataque por el lado posterior (backside), en donde el grupo saliente abandona el fosfato por el lado opuesto al nucleófilo (cuadros tres y cuatro). Durante toda la trayectoria se presentan distancias menores a 3 Å entre el grupo saliente y la membrana, lo cual produce una conformación apta para el ataque nucleofílico por el lado posterior del fosfato. Este arreglo puede explicarse dada la estabilización del sustrato sobre la membrana polimérica.



**Figura 5.16 :** Capturas seleccionadas de las trayectorias de WT–MetaD de la hidrólisis del paraoxón en la membrana modificada. En color verde se muestran moléculas de agua clásicas que completan la coordinación del cobre.

Durante el proceso de hidrólisis el átomo de cobre pasa de una geometría octaédrica (recuadro 1) a una geometría de pirámide cuadrada distorsionada (cuadros 2-4). En los reactivos, el paraoxón ocupa una posición apical, a diferencia de lo visto en la hidrólisis de tri-ésteres con el complejo aislado [Cu(phen)]<sup>2+</sup>, en donde ocupaba una posición ecuatorial. A lo largo de la reacción, la geometría cambia y el sustrato procede a ocupar una posición en la base de la pirámide. Esta estructura es similar a la observada en los reactivos de di-ésteres y en los productos de los tri-ésteres de la sección anterior. Debido a que el ataque fue del tipo backside el grupo saliente no logra captar el protón del nucleófilo.

La molécula de  ${}^-\mathrm{OPhNO}_2$  se estabiliza tanto con la membrana como con las moléculas de agua del medio, pero al ser clásicas, no se observa una transferencia de protón. No obstante, como se observa en las superficies de energía mostradas en la Figura 5.15, la reacción avanza por un solo paso lento, que corresponde a la sustitución nucleofílica.

**Tabla 5.1 :** Barreras de energía de la hidrólisis catalizada de fosfotri-ésteres. Los errores corresponden a la desviación estándar de las trayectorias triplicadas.

Molécula	${ m Catalizador}{+2{ m H}_2{ m O}}$	Energía libre [kcal/mol]
Trifenilfosato	$[\mathrm{Cu}(\mathrm{phen})]^{2+}$	$16.9 \pm 1.2$
Etil difenilfosfato	$[\mathrm{Cu}(\mathrm{phen})]^{2+}$	$14.0 \pm 0.9$
Mevinphos	$[Cu(phen)]^{2+}$	$15.7 \pm 1.0$
Paraoxón	$[\mathrm{Cu(vbpy)}]^{2+}$	$18.3 \pm 1.1$
Paraoxón	$[Cu^{(II)}(vbpy)-membrana]$	$11.0 \pm 0.7$

#### Análisis de las barreras de reacción

Es posible analizar las rutas de mínima energía calculadas sobre las superficies de la Figura 5.15. Al igual que en el complejo aislado, la MEP para el complejo injerto en la membrana muestra un único paso lento, caracterizado por una energía libre de 11.0±0.7 kcalmol<sup>-1</sup>, mientras que el proceso con el complejo aislado presenta una barrera de 18.3±1.1 kcalmol<sup>-1</sup>. Las diferencias topológicas entre las dos superficies de hidrólisis del paraoxón resultan en una diferencia energética apreciable en la barrera de reacción. Los mecanismos de estabilización del sustrato sobre la membrana a lo largo de todo el proceso, logran disminuir en más de 7 kcalmol<sup>-1</sup> la barrera de reacción. El proceso de reconocimiento del sustrato en la membrana, así como la orientación del intermediario fosforano y la estabilización del grupo saliente son factores importantes en la disminución de la energía de activación del proceso. La Tabla 5.1 también muestra la comparación en las barreras de energía para todos los tri-ésteres estudiados en este trabajo. Aunque no es posible postular conclusiones globales debido a la diferencia en la estructura de los catalizadores, se observa que la barrera del proceso en la membrana es el que tiene

el menor valor. Esto da pie a proponer la síntesis de complejos metálicos de cobre, con ligantes donadores de nitrógeno que se encuentran soportados en membranas poliméricas. La principal aplicación de estas membranas puede ser la remoción de átomos pesados, como átomos de cobre, y la hidrólisis de éster–fosfatos de interés biológico o ambiental.

### 5.4. Conclusiones parciales

Con las herramientas computacionales propuestas fue posible modelar la hidrólisis del pesticida paraoxón catalizada por un complejo de cobre injertado en una membrana polimérica de polipropileno. Se construyó un modelo computacional de la membrana de PP con el ligante 4-vinil-4'-metil-2,2'-bipiridina (vbpy) injertado y se analizó la formación de complejos de Cu(II) en la membrana. Después, se estudió la interacción del paraoxón con la membrana modificada y se observó que su estabilización en la membrana sucedía a través de interacciones débiles. Por otro lado, se observó que el mecanismo de reacción del sustrato sigue un mecanismo de esfera externa, con formación de un intermediario fosforano pentavalente. El mecanismo de activación y la hidrólisis del fosfato muestran similitudes con los observados en los tri-ésteres hidrolizados por un complejo aislado.

En este sistema específico, la presencia de la membrana orienta al sustrato de modo que el ataque nucleofílico ocurre por la parte posterior del fosfato (backside). Esta orientación del mecanismo es opuesta a la encontrada en el complejo [Cu(vbpy)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>. Sin embargo, la barrera de energía libre calculada para la hidrólisis en la membrana (11.0 kcal/mol) es menor que la del complejo aislado (18.3 kcal/mol). Esto se atribuye a interacciones estabilizadoras del sustrato con la membrana.

En conclusión, el modelo computacional predice que la presencia de la membrana polimérica mejora la catálisis del paraoxón mediada por el complejo de Cu(II). Con esto en mente, se abre la pauta para mejorar el diseño de catalizadores soportados en membranas. Con los resultados obtenidos se propone que los catalizadores soportados en membranas deben maximizar las interacciones del sustrato con el polímero, con el objetivo de generar una disminución en la energía de complejación, y los posteriores pasos de la catálisis.

## Parte IV

Conclusiones y Perspectivas

6

### Conclusiones Globales

En este trabajo se estudiaron los mecanismos de reacción para la hidrólisis de diversos fosfoésteres. Se encontró que usando el complejo aislado [Cu(phen)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, el mecanismo de reacción depende del grado de sustitución del fosfato. Para mono– y di–ésteres, una molécula de agua coordinada al Cu(II) intercambia un protón con el fosfato, activando así al nucleófilo. Posteriormente, el nucleófilo ataca frontalmente al fósforo vía un mecanismo coordinado asistido por sustrato, en donde tanto el fosfato como el nucleófilo se encuentran coordinados al cobre. En tri–ésteres, una molécula de agua no coordinada al complejo ataca al fosfato mediante un mecanismo de esfera externa, el cual es mediado por solvente. Únicamente di– y tri–ésteres forman intermediarios fosforano antes del estado de transición. Durante la formación del fosforano, se produce una notable acumulación de carga en el átomo de fósforo, la cual se estabiliza de manera más efectiva con la incorpo-

ración de grupos -R en el fosfato. Además, la presencia de múltiples sustituyentes puede generar efectos estéricos que promueven la adopción de la geometría bpt del fosforano. No obstante, todas las reacciones proceden por un mecanismo concertado, con una única barrera energética. Es decir, la reacción exhibe un único paso lento correspondiente al ataque nucleofílico concertado hacia el fosfato.

El análisis de las rutas de mínima energía confirman la existencia de una única barrera de reacción. Analizando estos valores, se observó que los mono-éster fosfatos son los sustratos con las menores energías de activación, promediando 10.9 kcalmol<sup>-1</sup>. Al compararse con di- y tri-ésteres, se observa que estos dos últimos grupos muestran una energía mayor, siendo en promedio 15.7 y 15.5 kcalmol<sup>-1</sup>, respectivamente. En estos datos puede apreciarse una diferencia clara entre mono-ésteres al ser comparados con di- y tri-ésteres. Las diferencias energéticas pueden relacionarse con las diferencias en los mecanismos ya citadas, puesto que los di- y tri-ésteres pasan por un intermediario fosforano con un mayor grado de asociación.

Por otro lado, se estudió la hidrólisis de paraoxón en una membrana de PP con el complejo de cobre injertado, el cual se encuentra complejado mediante una molécula de vinilbipiridina.

El tri-éster reaccionó mediante un mecanismo de esfera externa. La estabilización del fosfato en la membrana logra que el ataque del nucleófilo sea del tipo backside, por lo cual el mecanismo discrepa del proceso seguido en los complejos aislados. No obstante, el proceso muestra un solo paso lento con una única barrera energética. La energía de activación de este proceso en la membrana resultó menor (11.0 kcalmol<sup>-1</sup>) al compararse con la catálisis del complejo aislado (18.3 kcalmol<sup>-1</sup>). La diferencia en la barrera se puede explicar mediante las interacciones estabilizadoras que presentó el sustrato durante todo el proceso, desde la adsorción hasta la hidrólisis.

En conclusión, el modelado computacional es una herramienta útil para entender estos procesos complejos. El entendimiento de los procesos de reacción de hidrólisis de fosfo-ésteres dan información importante para el entendimiento de la actividad enzimática y el diseño racional de catalizadores soportados en membranas.

7

## Perspectivas

El trabajo aquí expuesto propone información novedosa acerca de la hidrólisis de fosfoésteres, catalizada por complejos metálicos. No obstante, esta investigación es únicamente una parte pequeña del enorme campo de trabajo que sigue construyéndose. Por esta razón, basándose en lo aquí expuesto, se proponen ideas que sirvan para continuar la línea de trabajo y contribuir al debate actual del campo. De este modo, el modelo computacional desarrollado en este trabajo abre diversas posibilidades para estudios futuros que profundicen el entendimiento de estos sistemas.

Se busca extraer las estructuras de mínima energía a lo largo de la superficie de energía libre. Esto permitiría realizar un análisis estructural detallado con la teoría cuántica de átomos en moléculas (QTAIM). De este modo, se podría caracterizar la formación y ruptura de enlaces durante la reacción utilizando propiedades atómicas, como la población

electrónica, el dipolo y el cuadrupolo atómico. Otra alternativa es estudiar en mayor profundidad la interacción entre el fosfato y la membrana polimérica, usando esta misma teoría.

Adicionalmente, los resultados cinéticos del modelo, como las constantes de velocidad y el número de recambio, podrían contrastarse con datos experimentales. Estas comparaciones permitirían validar las predicciones computacionales sobre la reactividad.

También se pueden calcular propiedades espectroscópicas, como espectros IR y UV, de las estructuras obtenidas. Su contraste con resultados experimentales aportaría información valiosa sobre los cambios electrónicos y estructurales durante el proceso de reacción.

Así, el modelo computacional desarrollado sienta las bases para estudios más detallados sobre la reactividad y la interacción sustrato-membrana durante el proceso catalítico. Su comparación con resultados experimentales permitiría validar y mejorar el modelo. Estas líneas de investigación futura profundizarían la comprensión de estos sistemas complejos de interés químico y biológico.

# Parte V

Referencias

### Bibliografía

- [1] a. D. H. Jonathan K. Lassila, Jesse G. Zalatan, "Biological phosphoryl-transfer reactions: Understanding mechanism and catalysis," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 80, pp. 669–702, 7 2011.
- [2] A. Madariaga-Mazón, A. Osnaya-Hernández, A. Chávez-Gómez, J. C. García-Ramos, F. Cortés-Guzmán, D. J. Castillo-Pazos, and K. Martínez-Mayorga, "Distribution of toxicity values across different species and modes of action of pesticides from PESTIMEP and PPDB databases," *Toxicology Research*, vol. 8, no. 2, pp. 146–156, 2019.
- [3] T. Darch, M. S. Blackwell, J. M. Hawkins, P. M. Haygarth, and D. Chadwick, "A meta-analysis of organic and inorganic phosphorus in organic fertilizers, soils, and water: Implications for water quality," *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, vol. 44, no. 19, pp. 2172–2202, 2014.
- [4] M. Boyd, Organic Chemistry. Prentice Hall of India, 6 ed., 2007.
- [5] F. H. Westheimer, "Why nature chose phosphates," Science, vol. 235, no. 4793, pp. 1173–1178, 1987.
- [6] A. C. Hengge, *Phosphoryl Transfer Reactions*. John Wiley and Sons, Ltd, 1 2015.
- [7] G. K. Schroeder, C. Lad, P. Wyman, N. H. Williams, and R. Wolfenden, "The time required for water attack at the phosphorus atom of simple phosphodiesters and of dna," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 11, pp. 4052– 4055, 2006.

- [8] D. Desbouis, I. P. Troitsky, M. J. Belousoff, L. Spiccia, and B. Graham, "Copper(II), zinc(II) and nickel(II) complexes as nuclease mimetics," *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 256, no. 11-12, pp. 897–937, 2012.
- [9] C. Tony Liu, A. A. Neverov, C. I. Maxwell, and R. Stan Brown, "Demonstration of prominent Cu(ll)-promoted leaving group stabilization of the cleavage of a homologous set of phosphate Mono-, Di-, and triesters in methanol," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, no. 10, pp. 3561–3573, 2010.
- [10] R. Galindo-Murillo, L. Ruíz-Azuara, R. Moreno-Esparza, and F. Cortés-Guzmán, "Molecular recognition between DNA and a copper-based anticancer complex," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 14, no. 44, pp. 15539–15546, 2012.
- [11] J. C. García-Ramos, R. Galindo-Murillo, A. Tovar-Tovar, A. L. Alonso-Saenz, V. Gómez-Vidales, M. Flores-Álamo, L. Ortiz-Frade, F. Cortes-Guzmán, R. Moreno-Esparza, A. Campero, and L. Ruiz-Azuara, "The π-back-bonding modulation and its impact in the electronic properties of cu(ii) antineoplastic compounds: an experimental and theoretical study," Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany), vol. 20, pp. 13730–13741, 10 2014.
- [12] H. Morales-Rojas and R. A. Moss, "Phosphorolytic reactivity of o-lodosylcarboxylates and related nucleophiles," *Chemical Reviews*, vol. 102, no. 7, pp. 2497–2521, 2002.
- [13] L. G. Sultatos, "Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides," Journal of Toxicology and Environmental Health, vol. 43, no. 3, pp. 271–289, 1994. PMID: 7966438.
- [14] J. Stenersen, Chemical Pesticides Mode of Action and Toxicology. CRC Press, first ed., 2004.
- [15] M. B. Olovi, D. Z. Krsti, T. D. Lazarevi-Pati, A. M. Bondi, and V. M. Vasi, "Acetyl-cholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology," *Current Neuropharmacology*, vol. 11, pp. 315–335, 2013.

- [16] A. A. Neverov and R. S. Brown, "Cu(II)-Mediated decomposition of phosphorothionate P=S pesticides. Billion-fold acceleration of the methanolysis of fenitrothion promoted by a simple Cu(II)-ligand system," Organic and Biomolecular Chemistry, vol. 2, no. 15, pp. 2245–2248, 2004.
- [17] E. Hopkins, T. Sanvictores, and S. Sharma, "Physiology, acid base balance," 2021.
- [18] S. Lander and L. M. L. et al., "Initial sequencing and analysis of the human genome international human genome sequencing consortium\* the sanger centre: Beijing genomics institute/human genome center," *Nature*, pp. 860–921, 2001.
- [19] M. A. R. Raycroft, C. T. Liu, and R. S. Brown, "Comparison of Cu(II)-promoted leaving group stabilization of the cleavage of a homologous set of phosphate mono-, di-, and triesters in water, methanol, and ethanol," *Inorganic Chemistry*, vol. 51, no. 6, pp. 3846–3854, 2012.
- [20] F. A. Cotton, G. Wilkinson, C. A. Murillio, and M. Bochmann, Advanced Inorganic Chemistry. Chichester: Wiley, 6 ed., 1999.
- [21] M. R., Copper. McCleverty JA, Meyer TJ, editors, vol. 6. ed., 2004.
- [22] M. W. Lufaso and P. M. Woodward, "Jahn-teller distortions, cation ordering and octahedral tilting in perovskites," Acta Crystallographica Section B Structural Science, vol. 60, no. 1, pp. 10–20, 2004.
- [23] F. Tisato, C. Marzano, M. Porchia, M. Pellei, and C. Santini, "Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies," *Medicinal Research Reviews*, vol. 30, pp. 708–749, 2010.
- [24] L. Shi, K. Chen, T. Huang, Y. Zhang, Z. Wang, and Q. Zhang, "Unraveling the role of cu2+ induced jahn-teller distortion and electron occupation alternation in modulating electronic and optical properties of cuxfe1-xfe2o4," Ceramics International, vol. 50, pp. 23937–23944, July 2024.

- [25] C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato, and C. Santini, "Copper complexes as anticancer agents," *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, vol. 9, pp. 185–211, Feb. 2009.
- [26] Z. Molphy, D. Montagner, S. S. Bhat, C. Slator, C. Long, A. Erxleben, and A. Kellett, "A phosphate-targeted dinuclear Cu(II) complex combining major groove binding and oxidative DNA cleavage," *Nucleic Acids Research*, vol. 46, no. 19, pp. 9918–9931, 2018.
- [27] L. G. Ramírez-Palma, R. Castro-Ramírez, L. Lozano-Ramos, R. Galindo-Murillo, N. Barba-Behrens, and F. Cortés-Guzmán, "Dna recognition site of anticancer tinidazole copper(<scp>ii</scp>) complexes," *Dalton Transactions*, vol. 52, no. 7, pp. 2087–2097, 2023.
- [28] L. G. Ramírez-Palma, A. Espinoza-Guillén, F. Nieto-Camacho, A. E. López-Guerra, V. Gómez-Vidales, F. Cortés-Guzmán, and L. Ruiz-Azuara, "Intermediate detection in the casiopeina-cysteine interaction ending in the disulfide bond formation and copper reduction," *Molecules*, vol. 26, p. 5729, Sept. 2021.
- [29] M. Drosou, C. A. Mitsopoulou, M. Orio, and D. A. Pantazis, "Epr spectroscopy of cu(ii) complexes: Prediction of g-tensors using double-hybrid density functional theory," *Magnetochemistry*, vol. 8, p. 36, Mar. 2022.
- [30] J. Guo and O. S. Fisher, "Orchestrating copper binding: structure and variations on the cupredoxin fold," *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 27, no. 6, pp. 529–540, 2022.
- [31] T. Inoue, N. Nishio, S. Suzuki, K. Kataoka, T. Kohzuma, and Y. Kai, "Crystal structure determinations of oxidized and reduced pseudoazurins from achromobacter cycloclastes: Concerted movement of copper site in redox forms with the rearrangement of hydrogen bond at a remote histidine\*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 25, pp. 17845–17852, 1999.

- [32] B. R. Crane, A. J. Di Bilio, J. R. Winkler, and H. B. Gray, "Electron tunneling in single crystals of pseudomonas aeruginosa azurins," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 123, no. 47, pp. 11623–11631, 2001. PMID: 11716717.
- [33] I. S. MacPherson and M. E. P. Murphy, "Type-2 copper-containing enzymes," Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 64, pp. 2887–2899, Sept. 2007.
- [34] E. I. Solomon, R. K. Szilagyi, S. DeBeer George, and L. Basumallick, "Electronic structures of metal sites in proteins and models: Contributions to function in blue copper proteins," *Chemical Reviews*, vol. 104, no. 2, pp. 419–458, 2004. PMID: 14871131.
- [35] U. Ryde, M. H. Olsson, B. O. Roos, and A. C. Borin, "A theoretical study of the copper-cysteine bond in blue copper proteins," *Theoretical Chemistry Accounts*, vol. 105, pp. 452–462, 5 2001.
- [36] J. W. Huff, K. S. Sastry, M. P. Gordon, and W. E. C. Wacker, "The action of metal ions on tobacco mosaic virus ribonucleic acid\*," *Biochemistry*, vol. 3, no. 4, pp. 501–506, 1964. PMID: 14188164.
- [37] R. S. Brown, B. E. Hingerty, J. C. Dewan, and A. Klug, "Pb(ii)-catalysed cleavage of the sugar-phosphate backbone of yeast trnaphe—implications for lead toxicity and self-splicing rna," *Nature*, vol. 303, pp. 543–546, Jun 1983.
- [38] R. S. Brown and A. A. Neverov, Metal-catalyzed alcoholysis reactions of carboxylate and organophosphorus esters, pp. 271–331. Elsevier, 2007.
- [39] F. Jiang, B. Jiang, Y. Cao, X. Meng, X. Yu, and X. Zeng, "Metallomicellar catalysis: Hydrolysis of phosphate monoester by Cu(II), Zn(II), Ni(II) and Co(II) complexes of pyridyl ligands in CTAB micellar solution," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 254, no. 1-3, pp. 91–97, 2005.
- [40] T. WAGNER-JAUREGG, "Model reactions of phosphorus containing enzyme inactivators," *Arzneimittel-Forschung*, vol. 4, no. 9, pp. 527–531, 1954.

- [41] T. Niittymäki and H. Lönnberg, "Artificial ribonucleases," Organic and Biomolecular Chemistry, vol. 4, no. 1, pp. 15–25, 2006.
- [42] M. E. Bravo-Gómez, J. C. García-Ramos, I. Gracia-Mora, and L. Ruiz-Azuara, "Antiproliferative activity and qsar study of copper(ii) mixed chelate [cu(n-n)(acetylacetonato)]no3 and [cu(n-n)(glycinato)]no3 complexes, (casiopeínas®)," Journal of Inorganic Biochemistry, vol. 103, no. 2, pp. 299–309, 2009.
- [43] M. Wall, B. Linkletter, D. Williams, A. M. Lebuis, R. C. Hynes, and J. Chin, "Rapid hydrolysis of 2',3'-camp with a cu(ii) complex: Effect of intramolecular hydrogen bonding on the basicity and reactivity of a metal- bound hydroxide," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 121, pp. 4710–4711, 5 1999.
- [44] M. M. Mortland and K. V. Raman, "Catalytic Hydrolysis of Some Organic Phosphate Pesticides by Copper (II)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 15, no. 1, pp. 163–167, 1967.
- [45] N. H. Williams, B. Takasaki, M. Wall, and J. Chin, "Structure and nuclease activity of simple dinuclear metal complexes: Quantitative dissection of the role of metal ions," Accounts of Chemical Research, vol. 32, no. 6, pp. 485–493, 1999.
- [46] X. Zhou, X.-P. Zhang, W. Li, J. Jiang, H. Xu, Z. Ke, D. L. Phillips, and C. Zhao, "Unraveling mechanisms of the uncoordinated nucleophiles: theoretical elucidations of the cleavage of bis(p-nitrophenyl) phosphate mediated by zinc-complexes with apical nucleophiles," RSC Adv., vol. 9, pp. 37696–37704, 2019.
- [47] L. Yu, F. zhen Li, J. yi Wu, J. qing Xie, and S. Li, "Development of the aza-crown ether metal complexes as artificial hydrolase," *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 154, pp. 89–102, 2016.
- [48] F. Duarte, A. Barrozo, J. Åqvist, N. H. Williams, and S. C. Kamerlin, "The competing mechanisms of phosphate monoester dianion hydrolysis," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 138, pp. 10664–10673, 8 2016.

- [49] D. Petrovic, K. Szeler, and S. C. L. Kamerlin, "Challenges and advances in the computational modeling of biological phosphate hydrolysis," *Chemical Communi*cations, vol. 54, pp. 3077–3089, 2018.
- [50] J. Aqvist, K. Kolmodin, J. Florian, and A. Warshel, "Mechanistic alternatives in phosphate monoester hydrolysis: What conclusions can be drawn from available experimental data?," *Chemistry and Biology*, vol. 6, no. 3, pp. 71–80, 1999.
- [51] Y. Liu, X. G. Meng, J. M. Li, and X. H. Li, "Hydrolysis of phosphodiester catalyzed by metallomicelles with histidine residue: Kinetics and mechanism," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 436, pp. 839–845, 2013.
- [52] S. K. Barman, T. Mondal, D. Koley, F. Lloret, and R. Mukherjee, "A phenoxobridged dicopper(II) complex as a model for phosphatase activity: mechanistic insights from a combined experimental and computational study," *Dalton Transactions*, vol. 46, no. 12, pp. 4038–4054, 2017.
- [53] "Copper(II) and Zinc(II) Complexes of Conformationally Constrained Polyazamacrocycles as Efficient Catalysts for RNA Model Substrate Cleavage in Aqueous Solution at Physiological pH," Chemistry - A European Journal, vol. 22, no. 30, pp. 10426–10437, 2016.
- [54] L. F. Esteves, N. A. Rey, H. F. Dos Santos, and L. A. S. Costa, "Theoretical Proposal for the Whole Phosphate Diester Hydrolysis Mechanism Promoted by a Catalytic Promiscuous Dinuclear Copper(II) Complex," *Inorganic Chemistry*, vol. 55, no. 6, pp. 2806–2818, 2016.
- [55] M. Protocol, C. Cao, Y.-w. Chen, Y. Wu, and E. Deumens, "OPAL: A Multiscale Multicenter Simulation Package Based on MPI-2 Protocol," *International Journal* of Quantum Chemistry, vol. 111, no. Ii, pp. 4020–4029, 2011.
- [56] E. H. Wanderlind, C. R. Bittencourt, A. M. Manfredi, A. P. Gerola, B. S. Souza, H. D. Fiedler, and F. Nome, "Cu(II)-catalyzed hydrolysis of tris-2-pyridyl phosphate

- assisted by sodium dodecyl sulfate micelles," *Journal of Physical Organic Chemistry*, vol. 32, no. 1, pp. 1–8, 2019.
- [57] P. Das, N. B. Chandar, S. Chourey, H. Agarwalla, B. Ganguly, and A. Das, "Role of metal ion in specific recognition of pyrophosphate ion under physiological conditions and hydrolysis of the phosphoester linkage by alkaline phosphatase," *Inorganic Chemistry*, vol. 52, no. 19, pp. 11034–11041, 2013.
- [58] R. G. Efremov, Y. A. Kosinsky, D. E. Nolde, R. Tsivkovskii, A. S. Arseniev, and S. Lutsenko, "Molecular modelling of the nucleotide-binding domain of Wilson's disease protein: Location of the ATP-binding site, domain dynamics and potential effects of the major disease mutations," *Biochemical Journal*, vol. 382, no. 1, pp. 293– 305, 2004.
- [59] S. Dasgupta, G. Aullón, E. Zangrando, and D. Das, "Mapping the working route of phosphate monoester hydrolysis catalyzed by copper based models with special emphasis on the role of oxoanions by experimental and theoretical studies," *New Journal of Chemistry*, vol. 43, no. 6, pp. 2501–2512, 2019.
- [60] Y. Fan and Y. Q. Gao, "A DFT study on the mechanism of phosphodiester cleavage mediated by monozinc complexes," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, no. 4, pp. 905–913, 2007.
- [61] V. Babin, C. Roland, and C. Sagui, "Adaptively biased molecular dynamics for free energy calculations," *Journal of Chemical Physics*, vol. 128, 2008.
- [62] K. Leung and J. A. Greathouse, "Ab initio molecular dynamics free energy study of enhanced copper (ii) dimerization on mineral surfaces," *Communications Chemistry*, vol. 5, p. 76, Jun 2022.
- [63] E. Akkus, O. Tayfuroglu, M. Yildiz, and A. Kocak, "Accurate binding free energy method from end-state md simulations," *Journal of Chemical Information and Mo*deling, vol. 62, no. 17, pp. 4095–4106, 2022. PMID: 35972783.

- [64] A. Laio, A. Rodriguez-Fortea, F. L. Gervasio, M. Ceccarelli, and M. Parrinello, "Assessing the accuracy of metadynamics," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, pp. 6714–6721, 4 2005.
- [65] A. Barducci, G. Bussi, and M. Parrinello, "Well-tempered metadynamics: A smoothly converging and tunable free-energy method," *Physical Review Letters*, vol. 100, 1 2008.
- [66] L. Foppa, M. Iannuzzi, C. Copéret, and A. Comas-Vives, "Co methanation on ruthenium flat and stepped surfaces: Key role of h-transfers and entropy revealed by ab initio molecular dynamics," *Journal of Catalysis*, vol. 371, pp. 270–275, 3 2019.
- [67] S. Gallardo-Fuentes and R. Ormazabal-Toledo, "Theoretical insights into the activation of n2o by a model frustrated lewis pair. an ab-initio metadynamics study," Chemical Physics Letters, vol. 741, p. 137002, 2020.
- [68] K. R. Gorantla and B. S. Mallik, "Mechanism and electronic perspective of oxygen evolution reactions catalyzed by [fe(otf)2(bpbp)]," *Journal of Physical Chemistry* C, vol. 2, 2021.
- [69] Y. Fu, L. Bernasconi, and P. Liu, "Ab initio molecular dynamics simulations of the sn1/sn2 mechanistic continuum in glycosylation reactions," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 143, pp. 1577–1589, 2021.
- [70] M. Klahn, E. Rosta, and A. Warshel, "On the mechanism of hydrolysis of phosphate monoesters dianions in solutions and proteins," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, pp. 15310–15323, 11 2006.
- [71] E. Rosta, S. C. Kamerlin, and A. Warshel, "On the interpretation of the observed linear free energy relationship in phosphate hydrolysis: A thorough computational study of phosphate diester hydrolysis in solution," *Biochemistry*, vol. 47, pp. 3725– 3735, 3 2008.

- [72] A. Laio and F. L. Gervasio, "Metadynamics: A method to simulate rare events and reconstruct the free energy in biophysics, chemistry and material science," *Reports on Progress in Physics*, vol. 71, 2008.
- [73] A. Barducci, M. Bonomi, and M. Parrinello, "Metadynamics," Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, vol. 1, pp. 826–843, 2011.
- [74] A. Verma, Forcefields for Atomistic-Scale Simulations. No. v.99 in Lecture Notes in Applied and Computational Mechanics Series, Singapore: Springer, 1st ed. ed., 2022. Description based on publisher supplied metadata and other sources.
- [75] G. Rajasekaran, P. Narayanan, and A. Parashar, "Effect of point and line defects on mechanical and thermal properties of graphene: A review," *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, vol. 41, pp. 47–71, Oct. 2015.
- [76] J. G. Lee, Computational Materials Science: An Introduction, Second Edition. CRC Press, Nov. 2016.
- [77] J. Gelpi, A. Hospital, R. Goñi, and M. Orozco, "Molecular dynamics simulations: advances and applications," Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry, p. 37, Nov. 2015.
- [78] D. C. Young, *Computational chemistry*. New York: Wiley, 2001. Includes bibliographical references and index.
- [79] R. Galindo Murillo, Estudio de la densidad electrónica de casiopeínas y sus interacciones específicas con el ADN. PhD thesis, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, 2011.
- [80] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, and D. A. Case, "Development and testing of a general amber force field," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 25, pp. 1157–1174, Apr. 2004.
- [81] W. C. Swope, H. C. Andersen, P. H. Berens, and K. R. Wilson, "A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of

- physical clusters of molecules: Application to small water clusters," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 76, pp. 637–649, Jan. 1982.
- [82] D. Frenkel, *Understanding molecular simulation*. Amsterdam: Academic Press, third edition ed., 2023. Includes bibliographical references and index.
- [83] A. Martini, "Short course on molecular dynamics simulation," Oct 2009.
- [84] B. D. Jensen, K. E. Wise, and G. M. Odegard, "The effect of time step, thermostat, and strain rate on reaxff simulations of mechanical failure in diamond, graphene, and carbon nanotube," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 36, pp. 1587–1596, June 2015.
- [85] S. Gorbunov, A. Volkov, and R. Voronkov, "Periodic boundary conditions effects on atomic dynamics analysis," *Computer Physics Communications*, vol. 279, p. 108454, 2022.
- [86] F. Hedman, "Algorithms for molecular dynamics simulations," 2006.
- [87] M. Hloucha and U. K. Deiters, "Fast coding of the minimum image convention," Molecular Simulation, vol. 20, pp. 239–244, Mar. 1998.
- [88] J. Kolafa and J. W. Perram, "Cutoff errors in the ewald summation formulae for point charge systems," *Molecular Simulation*, vol. 9, pp. 351–368, Jan. 1992.
- [89] T. Darden, D. York, and L. Pedersen, "Particle mesh ewald: An nlog(n) method for ewald sums in large systems," The Journal of Chemical Physics, vol. 98, pp. 10089– 10092, June 1993.
- [90] S. G. Moore, "A brief overview of molecular dynamics statistical mechanics atomic potentials.,"
- [91] L. Stella, C. D. Lorenz, and L. Kantorovich, "Generalized langevin equation: An efficient approach to nonequilibrium molecular dynamics of open systems," *Physical Review B*, vol. 89, p. 134303, Apr. 2014.

- [92] K. Gaalswyk, E. Awoonor-Williams, and C. N. Rowley, "Generalized langevin methods for calculating transmembrane diffusivity," *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 12, pp. 5609–5619, Oct. 2016.
- [93] D. Marx and J. Hutter, Ab initio molecular dynamics. Cambridge: Cambridge University Press, repr. ed., 2010.
- [94] M. Boero and A. Oshiyama, Car-Parrinello Molecular Dynamics, pp. 1–10. Springer Netherlands, 2015.
- [95] T. D. Kühne, "Ab-initio molecular dynamics," ChemarXiv, 2012.
- [96] J. Hutter, M. Iannuzzi, F. Schiffmann, and J. Vandevondele, "Cp2k: Atomistic simulations of condensed matter systems," Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, vol. 4, no. 1, pp. 15–25, 2014.
- [97] G. Lippert, J. Hutter, and M. Parrinello, "A hybrid gaussian and plane wave density functional scheme," *Molecular Physics*, vol. 92, pp. 477–487, Oct. 1997.
- [98] J. VandeVondele, M. Krack, F. Mohamed, M. Parrinello, T. Chassaing, and J. Hutter, "Quickstep: Fast and accurate density functional calculations using a mixed gaussian and plane waves approach," Computer Physics Communications, vol. 167, pp. 103–128, Apr. 2005.
- [99] S. Goedecker and M. Teter, "Separable dual-space Gaussian pseudopotentials," Physical Review B Condensed Matter and Materials Physics, vol. 54, no. 3, pp. 1703–1710, 1996.
- [100] C. Hartwigsen, S. Goedecker, and J. Hutter, "Relativistic separable dual-space gaussian pseudopotentials from h to rn," *Physical Review B*, vol. 58, pp. 3641–3662, Aug. 1998.
- [101] A. Warshel and M. Levitt, "Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme," *Journal of Molecular Biology*, vol. 103, pp. 227–249, May 1976.

- [102] M. J. Field, P. A. Bash, and M. Karplus, "A combined quantum mechanical and molecular mechanical potential for molecular dynamics simulations," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 11, pp. 700–733, July 1990.
- [103] U. C. Singh and P. A. Kollman, "A combined ab initio quantum mechanical and molecular mechanical method for carrying out simulations on complex molecular systems: Applications to the ch3cl + cl- exchange reaction and gas phase protonation of polyethers," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 7, pp. 718–730, Dec. 1986.
- [104] J. Åqvist and A. Warshel, "Simulation of enzyme reactions using valence bond force fields and other hybrid quantum/classical approaches," *Chemical Reviews*, vol. 93, pp. 2523–2544, Nov. 1993.
- [105] P. Sherwood, "John von neumann institute for computing hybrid quantum mechanics / molecular mechanics approaches," in *Modern Methods and Algorithms of Quantum Chemistry*, 2000.
- [106] T. K. Woo, L. Cavallo, and T. Ziegler, "Implementation of the imomm methodology for performing combined qm/mm molecular dynamics simulations and frequency calculations," *Theoretical Chemistry Accounts: Theory, Computation, and Modeling* (Theoretica Chimica Acta), vol. 100, pp. 307–313, Dec. 1998.
- [107] T. Laino, F. Mohamed, A. Laio, and M. Parrinello, "An efficient real space multi-grid qm/mm electrostatic coupling," *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 1, pp. 1176–1184, Oct. 2005.
- [108] T. Laino, F. Mohamed, A. Laio, and M. Parrinello, "An efficient linear-scaling electrostatic coupling for treating periodic boundary conditions in qm/mm simulations," Journal of Chemical Theory and Computation, vol. 2, pp. 1370–1378, Aug. 2006.
- [109] P. E. Blöchl, "Electrostatic decoupling of periodic images of plane-wave-expanded densities and derived atomic point charges," The Journal of Chemical Physics, vol. 103, pp. 7422–7428, Nov. 1995.

- [110] K. Huang, Statistical mechanics. New York, NY [u.a.]: Wiley, 2. ed. ed., 1987.
- [111] C. Theodoropoulos, Y.-H. Qian, and I. G. Kevrekidis, ""coarse" stability and bifurcation analysis using time-steppers: A reaction-diffusion example," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, pp. 9840–9843, Aug. 2000.
- [112] L. Sutto, S. Marsili, and F. L. Gervasio, "New advances in metadynamics," Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, vol. 2, no. 5, pp. 771– 779, 2012.
- [113] M. Iannuzzi, A. Laio, and M. Parrinello, "Efficient exploration of reactive potential energy surfaces using car-parrinello molecular dynamics," *Physical Review Letters*, vol. 90, no. 23, pp. 4–4, 2003.
- [114] G. Bussi and D. Branduardi, "Free-energy calculations with metadynamics: Theory and practice," Apr. 2015.
- [115] A. Laio and M. Parrinello, "Escaping free-energy minima," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 99, pp. 12562–12566, 2002.
- [116] F. L. Gervasio, A. Laio, and M. Parrinello, "Flexible docking in solution using metadynamics," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, pp. 2600–2607, Feb. 2005.
- [117] G. Bussi, A. Laio, and M. Parrinello, "Equilibrium free energies from nonequilibrium metadynamics," *Physical Review Letters*, vol. 96, p. 090601, Mar. 2006.
- [118] E. Carter, G. Ciccotti, J. T. Hynes, and R. Kapral, "Constrained reaction coordinate dynamics for the simulation of rare events," *Chemical Physics Letters*, vol. 156, pp. 472–477, Apr. 1989.
- [119] M. Sprik and G. Ciccotti, "Free energy from constrained molecular dynamics," The Journal of Chemical Physics, vol. 109, pp. 7737–7744, Nov. 1998.

- [120] C. Abrams and G. Bussi, "Enhanced sampling in molecular dynamics using metadynamics, replica-exchange, and temperature-acceleration," *Entropy*, vol. 16, no. 1, pp. 163–199, 2014.
- [121] C. Hille, S. Ringe, M. Deimel, C. Kunkel, W. E. Acree, K. Reuter, and H. Oberhofer, "Generalized molecular solvation in non-aqueous solutions by a single parameter implicit solvation scheme," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 150, Dec. 2018.
- [122] J. D. Chai and M. Head-Gordon, "Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 10, pp. 6615–6620, 2008.
- [123] A. Pabis, N. H. Williams, and S. C. Kamerlin, "Simulating the reactions of substituted pyridinio-: N -phosphonates with pyridine as a model for biological phosphoryl transfer," *Organic and Biomolecular Chemistry*, vol. 15, pp. 7308–7316, 2017.
- [124] A. J. Cohen, P. Mori-Sánchez, and W. Yang, "Challenges for density functional theory," *Chemical Reviews*, vol. 112, pp. 289–320, Dec. 2011.
- [125] N. Gerrits, E. W. F. Smeets, S. Vuckovic, A. D. Powell, K. Doblhoff-Dier, and G.-J. Kroes, "Density functional theory for molecule-metal surface reactions: When does the generalized gradient approximation get it right, and what to do if it does not," The Journal of Physical Chemistry Letters, vol. 11, pp. 10552–10560, Dec. 2020.
- [126] L. Liu, B. Lukose, and B. Ensing, "Hydrogen activation by frustrated lewis pairs revisited by metadynamics simulations," *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 121, pp. 2046–2051, 2 2017.
- [127] S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, and H. Krieg, "A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu," *Journal of Chemical Physics*, vol. 132, no. 15, 2010.
- [128] K. E. Riley, M. Pitončák, P. Jurecčka, and P. Hobza, "Stabilization and structure calculations for noncovalent interactions in extended molecular systems based on wave

- function and density functional theories," *Chemical Reviews*, vol. 110, pp. 5023–5063, 9 2010.
- [129] K. S. Thanthiriwatte, E. G. Hohenstein, L. A. Burns, and C. D. Sherrill, "Assessment of the performance of dft and dft-d methods for describing distance dependence of hydrogen-bonded interactions," *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 7, pp. 88–96, 1 2011.
- [130] G. Sciortino, J. D. Maréchal, I. Fábián, N. Lihi, and E. Garribba, "Quantitative prediction of electronic absorption spectra of copper(ii)-bioligand systems: Validation and applications," *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 204, no. November 2019, pp. 110953–110953, 2020.
- [131] P. Wu, F. Fan, J. Song, W. Peng, J. Liu, C. Li, Z. Cao, and B. Wang, "Theory demonstrated a "coupled" mechanism for o2 activation and substrate hydroxylation by binuclear copper monooxygenases," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 141, no. 50, pp. 19776–19789, 2019. PMID: 31746191.
- [132] R. Marion, F. Sguerra, F. Di Meo, E. Sauvageot, J.-F. Lohier, R. Daniellou, J.-L. Renaud, M. Linares, M. Hamel, and S. Gaillard, "Nhc copper(i) complexes bearing dipyridylamine ligands: Synthesis, structural, and photoluminescent studies," *Inorganic Chemistry*, vol. 53, no. 17, pp. 9181–9191, 2014. PMID: 25134011.
- [133] N. Mardirossian and M. Head-Gordon, "Thirty years of density functional theory in computational chemistry: An overview and extensive assessment of 200 density functionals," *Molecular Physics*, vol. 115, no. 19, pp. 2315–2372, 2017.
- [134] Z. Zara, J. Iqbal, K. Ayub, M. Irfan, A. Mahmood, R. A. Khera, and B. Eliasson, "A comparative study of dft calculated and experimental uv/visible spectra for thirty carboline and carbazole based compounds," *Journal of Molecular Structure*, vol. 1149, pp. 282–298, 2017.
- [135] K. R. Gorantla and B. S. Mallik, "Three-electron two-centered bond and single-electron transfer mechanism of water splitting via a copper-bipyridine complex,"

The Journal of Physical Chemistry A, vol. 127, no. 1, pp. 160–168, 2023. PMID: 36594604.

- [136] N. F.-H. Jesús Baldenebro-López, José Castorena-González and D. Glossman-Mitnik, "Quantum chemical study of a new class of sensitisers: influence of the substitution of aromatic rings on the properties of copper complexes," *Molecular Physics*, vol. 112, no. 7, pp. 987–994, 2014.
- [137] R. M. R. da Silva, I. M. L. Rosa, W. X. C. Oliveira, O. C. Alves, E. C. S. Santos, F. Garcia, H. C. Silva Junior, G. B. Ferreira, G. P. Guedes, W. D. do Pim, M. Julve, and M. V. Marinho, "Carbon dioxide uptake by [cu(bpca)]+: synthesis, crystal structure, and magnetic properties of [Na(H2O)2][Cu2(bpca)2(CO3)(HCO3)]n [hbpca = bis(2-pyridylcarbonyl)amide]," New J. Chem., vol. 47, pp. 1066–1075, 2023.
- [138] F. Gao, D. Mei, Y. Wang, J. Szanyi, and C. H. F. Peden, "Selective catalytic reduction over cu/ssz-13: Linking homo- and heterogeneous catalysis," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 139, no. 13, pp. 4935–4942, 2017. PMID: 28288511.
- [139] A. Floris, S. Haq, M. In't Veld, D. B. Amabilino, R. Raval, and L. Kantorovich, "Driving forces for covalent assembly of porphyrins by selective c-h bond activation and intermolecular coupling on a copper surface," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 138, no. 18, pp. 5837–5847, 2016. PMID: 27097295.
- [140] F. Santanni, A. Albino, M. Atzori, D. Ranieri, E. Salvadori, M. Chiesa, A. Lunghi, A. Bencini, L. Sorace, F. Totti, and R. Sessoli, "Probing vibrational symmetry effects and nuclear spin economy principles in molecular spin qubits," *Inorganic Chemistry*, vol. 60, no. 1, pp. 140–151, 2021. PMID: 33305944.
- [141] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak, "Molecular dynamics with coupling to an external bath," The Journal of Chemical Physics, vol. 81, pp. 3684–3690, Oct. 1984.

- [142] L. Genovese, T. Deutsch, and S. Goedecker, "Efficient and accurate threedimensional poisson solver for surface problems," *Journal of Chemical Physics*, vol. 127, 2007.
- [143] J. VandeVondele and J. Hutter, "An efficient orbital transformation method for electronic structure calculations," *Journal of Chemical Physics*, vol. 118, no. 10, pp. 4365–4369, 2003.
- [144] X. Wang, J. Peng, D. Wang, M. Liu, C. Meng, A. Tian, K. Alimaje, and Z. Shi, "Two polyoxomolybdate-tuned hybrids composed of tripodal star-like ligand copper complexes," *Inorganica Chimica Acta*, vol. 392, pp. 160–164, Sept. 2012.
- [145] S. Youngme, P. Phuengphai, C. Pakawatchai, G. A. van Albada, and J. Reedijk, "A novel polymeric trinuclear-based μ3-phosphato-bridged cu(ii) complex containing two different types of monophosphate. synthesis, structure and magnetism of [Cu3(di-2-pyridylamine)3(μ3,η3-HPO4)(μ3,η4-PO4)(H2O)] (PF6)(H2O)3n," *Inorganica Chimica Acta*, vol. 358, pp. 2125–2128, Mar. 2005.
- [146] L. Foppa, M. Iannuzzi, C. Copéret, and A. Comas-Vives, "Facile fischer-tropsch chain growth from ch2 monomers enabled by the dynamic co adlayer," ACS Catalysis, vol. 9, no. 7, pp. 6571–6582, 2019.
- [147] A. Urakawa, M. Iannuzzi, J. Hutter, and A. Baiker, "Towards a rational design of ruthenium co2 hydrogenation catalysts by ab initio metadynamics," *Chemistry - A European Journal*, vol. 13, no. 24, pp. 6828–6840, 2007.
- [148] J. E. Brinkman and S. Sharma, Physiology, Metabolic Alkalosis. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023.
- [149] N. Iché-Tarrat, M. Ruiz-Lopez, J. Barthelat, and A. Vigroux, "Theoretical evaluation of the substrate-assisted catalysis mechanism for the hydrolysis of phosphate monoester dianions," *Chemistry A European Journal*, vol. 13, pp. 3617–3629, Apr. 2007.

- [150] Z.-L. Lu, C. T. Liu, A. A. Neverov, and R. S. Brown, "Rapid three-step cleavage of rna and dna model systems promoted by a dinuclear cu(ii) complex in methanol. energetic origins of the catalytic efficacy," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, pp. 11642–11652, Aug. 2007.
- [151] A. M. Abramyan, Z. Liu, and V. Pophristic, "Helix handedness inversion in ary-lamide foldamers: Elucidation and free energy profile of a hopping mechanism," Chemical Communications, vol. 52, pp. 669–672, 2016.
- [152] I. Marcos-Alcalde, J. Setoain, J. I. Mendieta-Moreno, J. Mendieta, and P. Gómez-Puertas, "Mepsa: minimum energy pathway analysis for energy landscapes," *Bioinformatics*, vol. 31, pp. 3853–3855, July 2015.
- [153] E. W. Dijkstra, A Note on Two Problems in Connexion with Graphs, pp. 287–290.
  ACM, July 2022.
- [154] A. Barrozo, D. Blaha-Nelson, N. H. Williams, and S. C. L. Kamerlin, "The effect of magnesium ions on triphosphate hydrolysis," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 89, no. 6, pp. 715–727, 2017.
- [155] S. Youngme, P. Phuengphai, N. Chaichit, C. Pakawatchai, G. A. van Albada, O. Roubeau, and J. Reedijk, "The coordination chemistry of mono(di-2-pyridylamine) copper(ii) complexes with monovalent and divalent oxoanions: crystal structure, spectroscopic and magnetic properties of dinuclear [cu(l)(μ-h2po4)(h2po4)]2 and polynuclear [cu(l)(μ3-hpo4)]n," *Inorganica Chimica Acta*, vol. 357, pp. 3603–3612, Sept. 2004.
- [156] M. A. Van Bochove, M. Swart, and F. M. Bickelhaupt, "Nucleophilic substitution at phosphorus centers (sn2@p)," *ChemPhysChem*, vol. 8, no. 17, pp. 2452–2463, 2007.
- [157] L. M. Rossi, A. Neves, A. J. Bortoluzzi, R. Hörner, B. Szpoganicz, H. Terenzi, A. S. Mangrich, E. Pereira-Maia, E. E. Castellano, and W. Haase, "Synthesis, structure

- and properties of unsymmetrical μ-alkoxo-dicopper(ii) complexes: biological relevance to phosphodiester and dna cleavage and cytotoxic activity," *Inorganica Chimica Acta*, vol. 358, pp. 1807–1822, Mar. 2005.
- [158] M. Gallegos, A. Costales, and Ángel Martín Pendás, "A real space picture of the role of steric effects in <scp> s <sub>n</sub> 2 </scp> reactions," Journal of Computational Chemistry, 3 2022.
- [159] S. C. Kamerlin, J. Florián, and A. Warshel, "Associative versus dissociative mechanisms of phosphate monoester hydrolysis: On the interpretation of activation entropies," *ChemPhysChem*, vol. 9, pp. 1767–1773, 8 2008.
- [160] S. C. Kamerlin, N. H. Williams, and A. Warshel, "Dineopentyl phosphate hydrolysis: Evidence for stepwise water attack," *Journal of Organic Chemistry*, vol. 73, pp. 6960–6969, 9 2008.
- [161] A. Alkherraz, S. Kamerlin, G. Feng, Q. Sheikh, A. Warshel, and N. Williams, "Phosphate ester analogues as probes forunderstanding enzyme catalysed phosphoryltransfer," *Faraday Discussions*, vol. 145, pp. 9–14, 2010.
- [162] S. C. L. Kamerlin, "Theoretical comparison of p-nitrophenyl phosphate and sulfate hydrolysis in aqueous solution: Implications for enzyme-catalyzed sulfuryl transfer," *Journal of Organic Chemistry*, vol. 76, pp. 9228–9238, 11 2011.
- [163] M. R. Molavian, A. Abdolmaleki, and K. Eskandari, "Theoretical investigation of proton-transfer in different membranes for pemfc applications in low humidity conditions," *Computational Materials Science*, vol. 122, pp. 126–138, 2016.
- [164] L. Zhang, B. Li, X. Meng, L. Huang, and D. Wang, "Degradation of four organop-hosphorous pesticides catalyzed by chitosan-metal coordination complexes," Environmental Science and Pollution Research, vol. 22, pp. 15104–15112, 10 2015.
- [165] A. H. Weber and F. H. George, Mathematical Methods for Physicist seventh Edition. 2013.

- [166] A. Patel, Z. Chen, Z. Yang, O. Gutiérrez, H. W. Liu, K. N. Houk, and D. A. Singleton, "Dynamically complex [6+4] and [4+2] cycloadditions in the biosynthesis of spinosyn a," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 138, pp. 3631–3634, 3 2016.
- [167] X. He, V. H. Man, W. Yang, T.-S. Lee, and J. Wang, "A fast and high-quality charge model for the next generation general amber force field," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 153, Sept. 2020.
- [168] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein, "Comparison of simple potential functions for simulating liquid water," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 79, pp. 926–935, July 1983.
- [169] S. S. Mousavi Khadem, A. H. Mashhadzadeh, S. Habibzadeh, M. T. Munir, E. C. Lima, and M. R. Saeb, "A theoretical probe into the effects of material and operational variables on water purification with zeolite membranes," *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 320, p. 111070, June 2021.
- [170] J. Goldsmith and C. C. Martens, "Pressure-induced water flow through model nanopores," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 11, no. 3, pp. 528–533, 2009.
- [171] J.-A. Garate, N. English, and J. MacElroy, "Carbon nanotube assisted water self-diffusion across lipid membranes in the absence and presence of electric fields," *Molecular Simulation*, vol. 35, pp. 3–12, Jan. 2009.
- [172] Z. Zhang, J. Gou, X. Zhang, Z. Wang, N. Xue, G. Wang, R. Sabetvand, and D. Toghraie, "Molecular dynamics simulation of polyacrylonitrile membrane performance in an aqueous environment for water purification," *Journal of Water Process Engineering*, vol. 47, p. 102678, June 2022.
- [173] H. Hu, M. Elstner, and J. Hermans, "Comparison of a qm/mm force field and molecular mechanics force fields in simulations of alanine and glycine "dipeptides" (ace-ala-nme and ace-gly-nme) in water in relation to the problem of modeling the

- unfolded peptide backbone in solution," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 50, pp. 451–463, Jan. 2003.
- [174] M. Parac, M. Doerr, C. M. Marian, and W. Thiel, "Qm/mm calculation of solvent effects on absorption spectra of guanine," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 31, pp. 90–106, May 2009.
- [175] K. Kwac, K.-K. Lee, J. B. Han, K.-I. Oh, and M. Cho, "Classical and quantum mechanical/molecular mechanical molecular dynamics simulations of alanine dipeptide in water: Comparisons with ir and vibrational circular dichroism spectra," The Journal of Chemical Physics, vol. 128, Mar. 2008.
- [176] M. Garcia-Viloca, C. Alhambra, D. G. Truhlar, and J. Gao, "Hydride transfer catalyzed by xylose isomerase: Mechanism and quantum effects," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 24, pp. 177–190, Dec. 2002.
- [177] G. Bussi, D. Donadio, and M. Parrinello, "Canonical sampling through velocity rescaling," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 126, Jan. 2007.
- [178] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, and L. G. Pedersen, "A smooth particle mesh ewald method," The Journal of Chemical Physics, vol. 103, pp. 8577–8593, Nov. 1995.
- [179] B. Meza-González, R. M. Gómez-Espinosa, and F. Cortés-Guzmán, "Computational modeling of metal ions removal by a modified polypropylene membrane," *Chemical Physics Letters*, vol. 749, no. April, pp. 137452–137452, 2020.
- [180] O. A. Hernández-Aguirre, A. Núñez-Pineda, M. Tapia-Tapia, and R. M. G. Espinosa, "Surface modification of polypropylene membrane using biopolymers with potential applications for metal ion removal," *Journal of Chemistry*, vol. 2016, 2016.
- [181] J. J. García-García, R. M. Gómez-Espinosa, R. N. Rangel, R. R. Romero, and G. R. Morales, "New material for arsenic (v) removal based on chitosan supported onto

- modified polypropylene membrane," Environmental Science and Pollution Research, vol. 29, pp. 1909–1916, Aug. 2021.
- [182] N. Flores-Alamo, R. M. Gómez-Espinosa, M. Solache-Ríos, J. L. García-Rivas, R. E. Zavala-Arce, and B. García-Gaitán, "Adsorption behaviour of copper onto a novel modified chitosan material: thermodynamic study," *Desalination and Water Treatment*, vol. 57, no. 52, pp. 25080–25088, 2016.
- [183] C. M. Hartshorn, A. Singh, and E. L. Chang, "Metal-chelator polymers as organop-hosphate hydrolysis catalysts," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 12, pp. 602–605, 2002.
- [184] A. Manzak, Y. Yıldız, M. Sezer, and N. Demirhan, "Extraction of metal ions using polymer inclusion membranes containing 1,10-phenanthroline and peg," *Chemical Papers*, vol. 76, pp. 2907–2915, Jan. 2022.
- [185] A. Iscen, N. C. Forero-Martinez, O. Valsson, and K. Kremer, "Molecular simulation strategies for understanding the degradation mechanisms of acrylic polymers," *Macromolecules*, 2023.
- [186] S. Rouhi, Y. Alizadeh, and R. Ansari, "Molecular dynamics simulations of the interfacial characteristics of polypropylene/single-walled carbon nanotubes," *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part L: Journal of Materials: Design and Applications*, vol. 230, no. 1, pp. 190–205, 2016.
- [187] R. Kim, H. G. Kim, G. Doo, C. Choi, S. Kim, J.-H. Lee, J. Heo, H.-Y. Jung, and H.-T. Kim, "Ultrathin nafion-filled porous membrane for zinc/bromine redox flow batteries," *Scientific Reports*, vol. 7, Sept. 2017.
- [188] V. Sorkin, Q. X. Pei, P. Liu, W. Thitsartarn, C. B. He, and Y. W. Zhang, "Atomistic-scale analysis of the deformation and failure of polypropylene composites reinforced by functionalized silica nanoparticles," *Scientific Reports*, vol. 11, Nov. 2021.

- [189] I. Cozmuta, M. Blanco, and W. A. Goddard, "Gas sorption and barrier properties of polymeric membranes from molecular dynamics and monte carlo simulations," The Journal of Physical Chemistry B, vol. 111, pp. 3151–3166, Mar. 2007.
- [190] H. Ebadi-Dehaghani, M. Barikani, H. A. Khonakdar, S. H. Jafari, U. Wagenknecht, and G. Heinrich, "On o2 gas permeability of pp/pla/clay nanocomposites: A molecular dynamic simulation approach," *Polymer Testing*, vol. 45, pp. 139–151, Aug. 2015.
- [191] H. Kitano, K. Takeuchi, J. Ortiz-Medina, R. Cruz-Silva, A. Morelos-Gomez, M. Fujii, M. Obata, A. Yamanaka, S. Tejima, M. Fujishige, N. Akuzawa, A. Yamaguchi, and M. Endo, "Enhanced antifouling feed spacer made from a carbon nanotube-polypropylene nanocomposite," ACS Omega, vol. 4, pp. 15496–15503, Sept. 2019.
- [192] Q. Yang and W. I. Whiting, "Molecular-level insight of the differences in the diffusion and solubility of penetrants in polypropylene, poly(propylmethylsiloxane) and poly(4-methyl-2-pentyne)," *Journal of Membrane Science*, vol. 549, pp. 173–183, Mar. 2018.
- [193] Z.-W. Dai, L.-S. Wan, X.-J. Huang, J. Ling, and Z.-K. Xu, "Selective adsorption of isopropyl alcohol aqueous solution on polypropylene surfaces: A molecular dynamics simulation," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 115, pp. 22415–22421, Oct. 2011.
- [194] D. M. Whitley and D. B. Adolf, "Barrier properties of polyethylene terephthalate, atactic polypropylene, and cis-1,4-polybutadiene via molecular dynamics simulation," Soft Matter, vol. 7, no. 6, p. 2981, 2011.
- [195] C. Bannwarth, S. Ehlert, and S. Grimme, "Gfn2-xtb—an accurate and broadly parametrized self-consistent tight-binding quantum chemical method with multipole electrostatics and density-dependent dispersion contributions," *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 15, pp. 1652–1671, Feb. 2019.

- [196] P. Pracht, F. Bohle, and S. Grimme, "Automated exploration of the low-energy chemical space with fast quantum chemical methods," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 22, no. 14, pp. 7169–7192, 2020.
- [197] L. Martínez, R. Andrade, E. G. Birgin, and J. M. Martínez, "P<scp>ackmol</scp>: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations," Journal of Computational Chemistry, vol. 30, pp. 2157–2164, Feb. 2009.
- [198] M. B. Stewart, D. T. Myat, M. Kuiper, R. J. Manning, S. R. Gray, and J. D. Orbell, "A structural basis for the amphiphilic character of alginates implications for membrane fouling," *Carbohydrate Polymers*, vol. 164, pp. 162–169, May 2017.
- [199] J. Wang, W. Wang, P. A. Kollman, and D. A. Case, "Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations," *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 25, pp. 247–260, Oct. 2006.
- [200] E. Vanquelef, S. Simon, G. Marquant, E. Garcia, G. Klimerak, J. C. Delepine, P. Cieplak, and F.-Y. Dupradeau, "R.e.d. server: a web service for deriving resp and esp charges and building force field libraries for new molecules and molecular fragments," *Nucleic Acids Research*, vol. 39, pp. W511–W517, May 2011.
- [201] T. Xue, S. Cui, Y. Wang, B. Yang, and G. Chen, "An integrating strategy of amber force field parameters for the photoinduced copper nucleases," *Theoretical Chemistry Accounts*, vol. 134, Dec. 2014.
- [202] F. Lin and R. Wang, "Systematic derivation of amber force field parameters applicable to zinc-containing systems," Journal of Chemical Theory and Computation, vol. 6, pp. 1852–1870, May 2010.
- [203] A. H. Göller and U.-W. Grummt, "Detailed energy decomposition of the rotational barrier in 2,2-bipyridine: a density functional study," *Chemical Physics Letters*, vol. 354, pp. 233–242, Mar. 2002.

- [204] R. L. Schowen, "How an enzyme surmounts the activation energy barrier," Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 100, pp. 11931–11932, Oct. 2003.
- [205] J. Åqvist, "Computer simulations reveal an entirely entropic activation barrier for the chemical step in a designer enzyme," ACS Catalysis, vol. 12, pp. 1452–1460, Jan. 2022.
- [206] P. Virtanen, R. Gommers, T. E. Oliphant, M. Haberland, T. Reddy, D. Cournapeau, E. Burovski, P. Peterson, W. Weckesser, J. Bright, S. J. van der Walt, M. Brett, J. Wilson, K. J. Millman, N. Mayorov, A. R. J. Nelson, E. Jones, R. Kern, E. Larson, C. J. Carey, İ. Polat, Y. Feng, E. W. Moore, J. VanderPlas, D. Laxalde, J. Perktold, R. Cimrman, I. Henriksen, E. A. Quintero, C. R. Harris, A. M. Archibald, A. H. Ribeiro, F. Pedregosa, P. van Mulbregt, and SciPy 1.0 Contributors, "SciPy 1.0: Fundamental Algorithms for Scientific Computing in Python," Nature Methods, vol. 17, pp. 261–272, 2020.
- [207] S. A. Khan and A. J. Kirby, "The reactivity of phosphate esters. multiple structure-reactivity correlations for the reactions of triesters with nucleophiles," J. Chem. Soc. B, vol. 0, no. 0, pp. 1172–1182, 1970.

# Parte VI

Artículo Publicado

# **PCCP**



# COMMUNICATION

**View Article Online** 

Cite this: Phys. Chem. Chem. Phys., 2023, 25, 18652

Received 10th January 2023, Accepted 26th June 2023

DOI: 10.1039/d3cp00146f

rsc.li/pccp

# Hydrolysis of ester phosphates mediated by a copper complex†

Brandon Meza-González and Fernando Cortés-Guzmán \*\*

Phosphate ester hydrolysis is an important reaction that plays a major role in both enzymatic and non-enzymatic processes, including DNA and pesticide breaking. Although it is a widely studied reaction, the precise mechanistic details, especially for copper complexes, remain under discussion. To contribute to the debate, we present the catalyzed hydrolysis of phosphomono-, di- and tri-esters mediated by the [Cu<sup>(II)</sup>(1,10-phenanthroline)] complex. The reaction coordinates for several substrates were explored through the metadynamics formalism. Thus, we found that for mono- and di-substituted ester phosphates a concerted mechanism is observed, where a coordinated hydroxyl group attacks the phosphorus atom at the same side as the leaving group, along with a proton transfer. In contrast, tri-substituted phosphate remains coordinated with the metal, and the nucleophile acts independently following an addition-elimination process. That is, the metallic complex achieves a specific nucleophile-phosphate interaction that produces a concerted transition state in the phosphoester hydrolysis process.

# 1 Introduction

Esther phosphates are molecules that play multiple roles in biochemistry. They react under enzymatic catalysis or decompose by a nucleophilic attack, allowing them to be an intermediate in metabolic pathways and cellular signal transduction. 1,2 Although it is thought that many phosphoryl transfer reactions, both enzymatic and non-enzymatic, proceed via some degree of dissociative character,<sup>3</sup> the understanding of the exact reaction mechanism remains unclear. In this regard, considering the mechanistic data from nonenzymatic phosphoryl transfer reactions has led to unveiling the mechanisms of phosphatases.<sup>2</sup>

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, Mexico. E-mail: fercor@unam.mx

† Electronic supplementary information (ESI) available: Detailed computational methodology, additional potential energy profiles, structural characterization for the chemical process, free energy surfaces of each system and movie files of the trajectories. See DOI: https://doi.org/10.1039/d3cp00146f

Moreover, there is a considerable effort toward the use of metallic complexes to catalyze this hydrolysis, especially copper, due to its bio-compatibility.4,5 Some copper complexes with nitrogen-donor ligands (including [Cu<sup>(11)</sup>(1,10-phenanthroline)] or Cu-Phen) exhibit anticarcinogenic properties. They have the capability of breaking DNA by either nucleophilic hydrolysis of phosphate groups or producing reactive oxygen species by a Fenton reaction, where radicals attack the deoxyribose groups.<sup>6</sup> It is known that the Cu-Phen scaffold can hydrolyze ester phosphates.<sup>5,7</sup> Specifically, it can hydrolyze phosphorus groups found in pesticides.8 Thus, a detailed characterization of this mechanism is crucial to understand the enzymatic activity, the role of copper in anticarcinogenic compounds, and the development of new copper-based catalysts. This work aims to study the non-radical hydrolysis of phosphate mono-, di- and tri-esters, employing a Cu-Phen complex as a catalyst, from a Free Energy perspective. Thus, it has not attempted to validate the studies cited in this text but focused on a new set of real-world phosphates catalyzed by a complex with biochemical implications.

Free-energy molecular dynamics is suitable for exploring complicated Free-Energy Surfaces (FES). It can yield detailed reaction pathways and their associated energetics. It can be obtained by adding a bias potential that acts on a selected number of degrees of freedom, referred to as collective variables (CVs). Although it is a very robust method, to the best of our knowledge, there are no Metadynamics (MTD) studies for the ester phosphate--copper hydrolysis mechanism. Even so, there are several studies about the reactivity of metal complexes, 10-12 and important works about nucleophilic substitution using MTD. 13 Furthermore, Warshel and co-workers 14 have clarified and validated the importance of surface and reaction path reconstruction in the study of phosphate hydrolysis. Also, numerous mechanistic studies converged in several observations. For instance, the addition-elimination hydrolysis  $(A_N + D_N)$  is a pathway where a stable pentacoordinate intermediate (phosphorane) is formed. The experimental hypothesis indicates that some phosphate di- and tri-ester reactions follow this step, and such a mechanism has been speculated to occur

in phosphatases.<sup>15</sup> It is known that this reaction is thermodynamically favorable. However, it has a very high kinetic barrier, making the uncatalyzed hydrolysis extremely slow.<sup>15</sup> The uncatalyzed reactions of phosphate monoesters usually follow the concerted pathway  $(A_N D_N)$ , although its confirmation remains pending.<sup>16,17</sup> It is important to note that solely the interpretation of experimental data, such as results of linear free energy relationships or isotope effects, does not justify the results.<sup>14,18</sup> Besides, direct kinetic characterization of these reactions is not accessible due to competing processes and experimental limitations; for this reason, quantum calculations are crucial to gain mechanistic insight.<sup>16</sup> The computational elucidation of reaction trajectories for the target systems remains unclear, and previous work studying copper-complex hydrolysis is scarce.<sup>19</sup>

Kamerlin and co-workers have indicated different possible mechanisms presented in phosphate ester hydrolysis.<sup>17</sup> Also, they have rationalized the following problems behind the computational simulations of ester phosphate hydrolysis: (i) the inherent reactivity of phosphates and (ii) the capability of theoretical elucidation of mechanistic pathways, as it requires an a priori assumption concerning the nature of the reaction pathway.<sup>20</sup> For the latter, using MTD is helpful, because it can accomplish a fine image of the minimum energy pathway (MEP) connecting two meta-stable states. Thus, it minimizes scientific bias by automatically building the reaction coordinate. MTD offers benefits over static calculations; for example, it accelerates the sampling of events and inherently explores the low freeenergy regions of a system. Whereas quantum static calculations explore individual routes,16 which can lead to a bias in initial structures and preferred pathways.21 On the other hand, MTD presents two major drawbacks<sup>21</sup>: (i) It is not trivial to decide when to stop a simulation because the bias potential can overfill the underlying FES and pushes the system toward high-energy regions of the CV space, and (ii) in some systems, the election of CVs is a very complicated task. The solution to the former is the Well-Tempered Metadynamics (WT-MTD) formalism,<sup>22</sup> which was used in the present work. Through this technique, the deposition rate of the Gaussian potential applied decreases over simulation time. For the latter problem, the CV selection was driven by the reaction coordinate of an SN reaction: nucleophile bond formation (Nu) and bond breaking for the best-leaving group (LG). Nevertheless, different sets of CVs were studied for these systems, including coordination numbers of phosphorus and copper atoms, but they were not useful for the FES.

# 2 Computational details

#### 2.1 System preparation

AIMD equilibration of the Cu–Phen system was carried out in the NPT ensemble with 54 explicit water molecules for 10 ps. Then, a phosphate moiety  $(PO_4^{\ 3-})$  was included near the first coordination sphere of the relaxed complex for another 10 ps NPT equilibration. Considering the importance of explicit water molecules in the mechanism<sup>23</sup> and considering the computational cost

( $\sim$ 600 h with 48 MPI nodes per trajectory), minimum energy structures were analyzed. Then, it was observed that only two molecules of water participated actively in the equilibrium process. Thus, the minimum energy structures extracted from the equilibration process include two water molecules (one working as Nu). The ester phosphates coordinated with the copper complex present similar geometries to those reported previously (DEHLOT<sup>24</sup> and FISZOX<sup>25</sup>).

#### 2.2 Well-tempered metadynamics propagation

First, to activate the relaxed complex (bonded by two phosphate oxygens), a standard MTD run was carried out employing d(Cu-Nuc) and d(P-Nuc) as the collective variables. The resulting system with phosphate coordinated by only one oxygen was used as a scaffold for the Well-Tempered Metadynamics (WT-MTD) propagation. Then, NVT trajectories through the WT-MTD<sup>22</sup> formalism were propagated using a well-tempered bias factor of 30. The selected collective variables CV1 and CV2 are the Nu-P and P-LG distances, respectively. Other CV sets, including coordination numbers for Cu and P were tested, but they could not reconstruct the FES. Besides, to restrict the exploration field and prevent the sampling of uninteresting parts of the configuration space,<sup>26</sup> a quartic wall was imposed on CV2. This wall extends from 7.0 Å towards larger values of CV2, using a potential constant of 0.1 Ha. The Gaussian bias potentials were spawned every 50 fs, with a height of 0.5 kcal mol<sup>-1</sup> and a scalar factor of 0.5. All the WT-MTD trajectories were propagated employing the SCCS implicit solvation model, tuned specifically for water.<sup>27</sup> In this way, the corresponding FES for each system was completed, noticing that the energy difference between the two global minima ( $\sim 0.1$  kcal mol<sup>-1</sup>) indicates sufficient conformational sampling.<sup>28</sup> For this reason, the propagation time is different for each trajectory. FES data was obtained with the graph tool provided by CP2K. Here, the surface was reconstructed from Gaussian potential information. Then, MEPSA<sup>29</sup> was employed for visualization and MEP reconstruction through the Dijkstra algorithm.30

All these Born–Oppenheimer DFT simulations were carried out at the  $\omega$ 97X-D3<sup>31</sup>/DZVP-MOLOPT-(SR)-GTH<sup>32,33</sup> level of theory, as implemented in CP2K 6.1<sup>34</sup> with the Gaussian and plane-wave method<sup>35</sup> (280 Ry Cutoff/40 Ry Relative Cutoff) and orbital transformation applied.<sup>33</sup> Also, a time step of 1.0 fs and a GLE thermostat at  $T=300~{\rm K}^{36}$  were selected. Additionally, for all the calculations, we considered the spurious interactions within the systems and the periodic boundary conditions using the Periodic Poisson solver as implemented in CP2K.<sup>37</sup> Finally, structure visualizations were obtained using CYLview 20.<sup>38</sup> FES maps and MEPs were calculated with a modified version of MEPSA 1.4 python code.<sup>29</sup>

## 3 Results and discussion

The proposed workflow is as follows. First, a conventional *ab-initio* Molecular Dynamics (AIMD) was used for the equilibration step of the Cu-Phen complex. Then, the phosphate

**PCCP** Communication

moiety (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) was relaxed near the first coordination sphere of the complex. This structure works as a scaffold for all the complex-substrate structures. Thus, with this setup, triplicated WT-MTD trajectories were obtained independently for each complex-phosphoester system. Three molecules were selected for each class of phosphoester, trying to consider different types of substrates: modified molecules used in kinetic essays (E), metabolites (M), pesticides (P), and nucleotides (D). Then, for mono-esters we have: phenylphosphate (E), phosphoserine (M), adenine nucleotide (D); for di-esters: diphenylphosphate (E), dietylphosphate (M), N-substituted dideoxyribosephosphate (D); and for tri-esters: triphenylphosphate (E), ethyl diphenilphosphate (M), Mevinphos (P). As the Cu-Phen complex can be involved in biochemical processes,6 substrates were protonated as the most probable species in the physiological environment at pH =  $7.4.^{39}$  For all trajectories, the  $\omega$ B97X-D3 functional was chosen. Due to its hybrid character, this functional has performed very well in other phosphate hydrolysis mechanistic studies. 16,23 It has been observed that the incorporation of exact exchange solves the problem of GGA functionals in underestimation of energy barriers226 and accurately describes hydrogen-bond and non-covalent interactions. 40 In the same way, the  $\omega$ B97X-D3 functional has been utterly validated in the characterization of Cu-ligand interactions, such as copper and N-donor ligand interaction, and Cu-oxo complexes. 41-43 ωB97X-D3 is a highly

Fig. 1 Structural changes during the reactive state formation. Upper section: mono- and di-ester nucleophile activation by proton transfer, in mono-ester  $R_2$  = H. Lower section: water molecule interchange for tri-esters

transferable functional, due to the low number of parameters in its construction. 44,45 Additionally, the DZVP basis set in conjunction with MOLOPT-GTH potentials has been extensively used in the study of copper-ligand interactions, 46-48 giving good results even with rVV10, PBE0 and HSE06 functionals. 49-51

In this work, we defined the distances Nu-P and P-LG as CVs for the free energy surface reconstruction. In addition, it is essential to clarify that the surface is mapped on two CVs, but all the chemical information is stored in the ab-initio molecular dynamics trajectory.

Fig. 1 presents the stable states reached by phosphates within the metadynamics. The first step in mono- and di-ester cases is a proton transfer from an equatorial coordinated water molecule to an ester phosphate oxygen. This is a short process within 30 fs on average, where diphenyl phosphate presents the largest proton transfer time of 44 fs. In contrast, N-substituted di-deoxyribose phosphate shows the shortest time, 19 fs. In these cases, the proton transfer was observed without applying any external potential to this atom, which means that the barriers to these processes are feasible at the simulation temperature.<sup>52</sup> After the proton transfer, the distance HO-...P decreases as a sign of the nucleophilic attack. Furthermore, it has been reported that proton transfers between the nucleophile (H<sub>2</sub>O), the phosphoryl oxygen atoms, and the leaving group make it difficult to find meaningful trends related to transition-state properties. 18 Regarding the tri-esters, the first step is just the inclusion of an uncoordinated H<sub>2</sub>O molecule into the phosphorus coordination sphere.

WT-MTD trajectories were used to reconstruct the twodimensional FES, as a function of both Nu-P and P-LG distance CVs, which are depicted in Fig. 2. It should be mentioned that for mono- and di-esters, Nu refers to the H-O structure whereas Nu stands for H<sub>2</sub>O in tri-ester structures. On each surface, there are two minima, one associated with the reactants and the other with the products. Besides, for all the processes herein studied, the reaction coordinate occurs with a decrease in the total potential energy of the system from reactants to products, as depicted in ESI† S1. Specifically, the FES can reflect particular configurations adopted by the systems. In this way, the extent of the RS area can be considered in terms of the

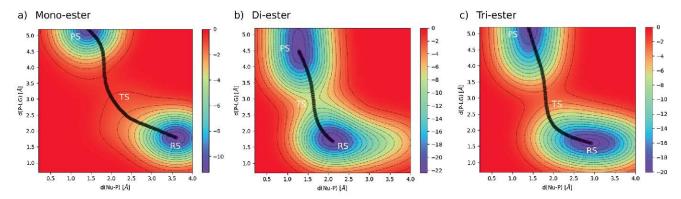
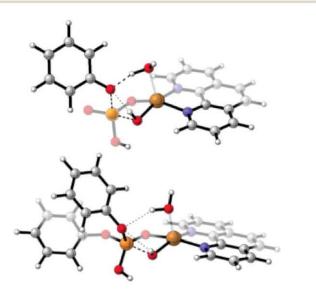


Fig. 2 FES reconstructions with minimum energy pathways connecting reactant (RS) and product (PS) states, for (a) mono-ester, (b) di-ester and (c) tri-ester. The transition state TS approximate position is also depicted. Energy is in kcal  $mol^{-1}$ .

lifetime of certain configurations in the CV space. These reconstructed FESs have a similar topology to those previously reported for non-metallic catalysis. Also, it is important to note that the structures expected previous to the proton transfer shown in Fig. 1, change almost immediately after the simulation starts with a short lifetime, and they do not form a minimum in the FES (specific structures associated with each surface are shown in the ESI†).

For di-phosphate esters, the RS position is around  $\sim 2.1 \text{ Å}$ , with an average RS-PS minima separation of 3.4 Å. In this case, RS presents a penta-coordinated phosphorous, di-coordinated to the copper atom and bridged by an oxygen atom and a hydroxyl group (shown in Fig. S5, ESI†). Regarding the di-ester series, an extended RS region (>3.0 Å) is observed for the di-ethylphosphate and N-sub di-deoxyribosephosphate systems. In these systems, the interaction between the nucleophile and a protonated phosphate oxygen makes their stabilization difficult because it inhibits the formation of the phosphorane adduct HO-POHR<sub>2</sub> momentarily (see ESI† Movies S7). The mono and di-ester behavior is similar to the catalyzed process seen in GTPases, where the mechanism goes by a solvent-assisted pathway.<sup>53</sup> The role of the copper atom is the same as in the case of mono-substituted phosphates, to force the frontside attack of the coordinated nucleophile to the phosphorous center.

We took selected dynamics points to search the transition states at the  $\omega$ B97X-D3/6-31g(d,p) theoretical level to gain further insight into the reaction mechanism. In the case of the monosubstituted ester phosphates, it is possible to observe a concerted mechanism where a coordinated hydroxyl group attacks the phosphorus atom by the same side of the leaving group, along with a proton transfer. Fig. 3 shows the transition state of the concerted process. This process yields a four-membered ring where oxygen atoms bridge the copper and phosphorus atoms. Youngme *et al.* also observed the four-membered ring in a crystal structure. <sup>54</sup> The nucleophilic substitution at the phosphorus



**Fig. 3** Transition state of mono- and disubstituted ester phosphate mediated by the copper complex with phenanthroline.

centers of uncoordinated molecules has been reviewed in several works; for example, van Bochove *et al.* found that the backside SN<sub>2</sub> reaction competes with thermodynamically favorable frontside pathways.<sup>55</sup> In our case, the role of copper is to force the frontside attack of the coordinated nucleophile to the phosphorous center. There is experimental evidence that supports the intramolecular frontside attack.<sup>56</sup>

For tri-phosphate esters the RS-PS separation is 3.8 Å on average, with RS minima localized at  $\sim\!2.9$  Å. The RS and TS structures are similar to those observed in the case of di-esters. In both cases, the structures previous to the penta-coordinated phosphorous species have a very short lifetime and are not observed in the FES. Finally, for the tri-ester series, only a significant difference is observed in Mevinphos, where the RS minimum is slightly moved to a shorter Nu–P distance. Mevinphos has two –O–CH $_3$  groups, which do not generate an important steric hindrance due to the relative bulkiness of these groups. Therefore the phosphorane intermediate appears in a shorter Nu–P distance. As shown in Fig. S2 and S3 (ESI†), it is possible to relate the reaction process to some structural changes in the phosphoester, such as internal phosphate angles.

The role of the copper atom is different from the previous two cases. The tri-substituted phosphate remains coordinated with the metal, but the nucleophile acts independently of the metal complex.

Detailed structural changes observed during the molecular dynamics trajectories are depicted in Fig. 4. The presented illustrations are only for the phenyl phosphate series, due to the similarities between FES and AIMD trajectories for each molecule in its respective substitution degree. Trajectories for all systems are presented as animation files in the ESI.† For monoand di-esters, it can be observed in the first frame, that the reaction proceeds through a coordinated mechanism, where the Nu and the phosphate are both bonded directly to the copper. On the other hand, the tri-ester mechanism is a non-coordinated one, because the nucleophile is outside the first coordination sphere. However, all the trajectories present non-inline pathways, 17 showing that this type of attack is feasible, contrary to those reported for OH<sup>-</sup> mediated hydrolysis.<sup>52</sup> It is possible to note that for di- and tri-esters, the pentavalent intermediate has a longer life (>4 ps) as compared with the same interaction in the mono-ester (<300 fs). That means mono-esters cannot stabilize this phosphorane intermediate.<sup>15</sup> In addition, the systems studied react through high-energy configurations (frames 3 and 4) that live around 40 fs in the MTD trajectory. During the simulation runs, copper coordination remains planar for mono-esters, where the coordinate water molecule leaves the first coordination sphere (snapshots 1 and 2). But for di- and tri-esters, there was a geometry change from trigonal bipyramid (tbp) to planar, another similarity that can be related to the FES topology and the reaction mechanisms. That is, there is a possibility to form a phosphorane intermediate due to the phosphate nature,<sup>2</sup> and this phenomenon forces the metallic center to interchange a water molecule from an apical to an equatorial position, promoting the change in geometry (which has already been observed in artificial nuclease based on Cu(II)5,58). Likewise, it will also be

**PCCP** 

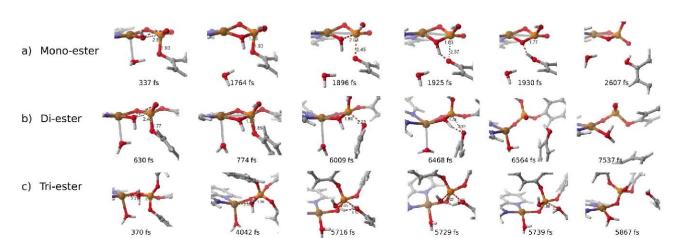


Fig. 4 Selected snapshots for ester-phosphate WT-MTD trajectories: (a) phenylphosphate, (b) diphenylphosphate, and (c) triphenylphosphate. Each snapshot represents the beginning of a specific structural arrangement in the system during the trajectory.

possible that another  $H_2O$  coordinates the copper at the end of the reaction to form a tbp again to repeat the catalytic cycle.

Free energy surfaces can give an important view of the chemical process. Still, it is also necessary to analyze the minimum energy pathway that connects reactants and products to gain better insight into the FES topology. This pathway is the coordinate where the reaction happens mapped on the CV space. As stated before, one advantage of these simulations is that there is no human bias when searching the chemical route. The MEP is calculated automatically, employing the free energy surface reconstructed in the MD trajectory. To obtain the values of energy barriers depicted in Table 1, WT-MTD trajectories were run in triplicate and then analyzed. Subsequently, it can be concluded that the rate-limiting step in the reaction occurs through a concerted mechanism, where only one barrier is observed.

The most pronounced differences in Table 1 are between mono-esters compared to di-/tri-esters. Di- and tri-esters form a phosphorane intermediate before reaching the transition state, as discussed above. This intermediate's stabilization could explain the increase in the free energy for di- and tri-esters, since its stabilization can lead to a proportional increase in the barrier. These results are consistent with the observations made for the energy surfaces, in which the existence of the pentacoordinate phosphorane for di- and tri-esters leads to a change in the FES topology.

 $\begin{tabular}{ll} \textbf{Table 1} & Energy barriers of phosphoester catalyzed hydrolysis, using triplicated trajectories. Energy units: kcal mol$^-1$ \\ \end{tabular}$ 

Molecule	Phosphoester	Free energy
Phenylphosphate	Mono-ester	$11.5 \pm 0.7$
Phosphoserine	Mono-ester	$10.2\pm1.1$
Adenine nucleotide	Mono-ester	$10.9\pm0.9$
Diphenylphosphate	Di-ester	$14.8\pm1.0$
Diethylphosphate	Di-ester	$17.3\pm1.1$
<i>N</i> -sub dideoxyribosephosphate	Di-ester	$14.9 \pm 0.8$
Triphenylphosphate	Tri-ester	$16.9\pm1.2$
Ethyl diphenylphosphate	Tri-ester	$14.0\pm0.9$
Mevinphos	Tri-ester	$\textbf{15.7}\pm\textbf{1.0}$

The magnitudes of the barriers are in agreement with the literature where values of  $\sim 20$  kcal  $\mathrm{mol}^{-1}$  are observed for mono- and di-ester hydroxo<sup>59-61</sup> and  $\mathrm{metal}^{58,62}$  catalyzed hydrolysis; specifically, Zhang *et al.*<sup>63</sup> have found reaction barriers of 11.9 kcal  $\mathrm{mol}^{-1}$  for  $\mathrm{bis}(p\text{-nitrophenyl})$  phosphate (BNPP), employing a copper complex with nitrogen-based ligands. Considering the Cu–Phen scaffold but using another set of phosphoesters, Brown, and co-workers have found experimental barriers of  $\sim 16$  kcal  $\mathrm{mol}^{-1}$  for mono-esters,  $\sim 21$  kcal  $\mathrm{mol}^{-1}$  for di-esters, and  $\sim 23$  kcal  $\mathrm{mol}^{-1}$  for tri-esters.<sup>4,5</sup>

## 4 Conclusion

In conclusion, with the proposed methodology, it was possible to observe the hydrolysis process for a set of different phosphoesters, assisted by the Cu(Phen) complex, employing a Free energy approach. The mechanism occurs via different pathways, in the function of the substitution of esterphosphate. For mono- and di-esters, a water molecule equatorial coordinated to the Cu atom, interchanges a proton with one oxygen atom available in the phosphoester. Then, the activated nucleophile attacks the phosphorous center through a coordinated mechanism, forming the leaving group, which is protonated with the remaining hydrogen atom of the nucleophile. On the other hand, in tri-esters, a water molecule non-coordinated with copper attacks the phosphorus through an outer sphere mechanism. Later, the leaving group forms a bond with a proton of the attacking H<sub>2</sub>O, then it is liberated. The FES information obtained for the process makes it possible to understand the participation of phosphorane intermediates for di- and triesters, meaning its formation depends on the degree of ester substitution. All these catalyzed reactions proceed in a concerted way with only a slow step, and a similar transition state, as revealed by an MEP analysis. In the case of the mono- and di-substituted ester phosphates, it is possible to observe a concerted mechanism where a coordinated hydroxyl group attacks the phosphorus atom at the same side as the leaving group, along with a proton transfer. In contrast, tri-esters form

pentavalent phosphorane intermediates before crossing the higher energy barrier, with a tighter transition state.

## **Author contributions**

Brandon Meza-González: methodology, formal analysis, writing – original draft, writing – review & editing, visualization. Fernando Cortés-Guzmán: formal analysis, writing – review & editing, supervision, project administration.

## Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

# Acknowledgements

The authors thank DGTIC-UNAM (LANCAD-UNAM-DGTIC-194) for the computer time, and CONACyT (CF2019-1561802/2020) and DGAPA-UNAM (IN207822) for the financial support. BMG thanks CONACYT (Grant 660455). The authors also thank Pablo Carpio-Martinez for his valuable comments on this work.

## References

- 1 F. H. Westheimer, Science, 1987, 235, 1173-1178.
- 2 D. Herschlag, J. K. Lassila and J. G. Zalatan, Annu. Rev. Biochem., 2011, 80, 669-702.
- 3 J. D. R. Robert and J. Ouellette, *Organic Chemistry: Structure, Mechanism, and Synthesis*, Elsevier, 1st edn, 2014.
- 4 C. Tony Liu, A. A. Neverov, C. I. Maxwell and R. Stan Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 3561–3573.
- 5 (a) M. A. R. Raycroft, C. T. Liu and R. S. Brown, *Inorg. Chem.*, 2012, 51, 3846–3854; (b) F. Jiang, B. Jiang, Y. Cao, X. Meng, X. Yu and X. Zeng, *Colloids Surf.*, A, 2005, 254, 91–97; (c) T. Wagner-Jauregg, *Arzneim. Forsch.*, 1954, 4, 527–531; (d) T. Niittymäki and H. Lönnberg, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, 4, 15–25; (e) A. A. Neverov and R. S. Brown, *Org. Biomol. Chem.*, 2004, 2, 2245–2248; (f) D. Desbouis, I. P. Troitsky, M. J. Belousoff, L. Spiccia and B. Graham, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, 256, 897–937.
- 6 M. E. Bravo-Gómez, J. C. García-Ramos, I. Gracia-Mora and L. Ruiz-Azuara, *J. Inorg. Biochem.*, 2009, **103**, 299–309.
- 7 M. Wall, B. Linkletter, D. Williams, A. M. Lebuis, R. C. Hynes and J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 4710–4711.
- 8 M. M. Mortland and K. V. Raman, *J. Agric. Food Chem.*, 1967, 15, 163–167.
- A. Laio and M. Parrinello, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002,
   99, 12562–12566.
- L. Foppa, M. Iannuzzi, C. Copéret and A. Comas-Vives, J. Catal., 2019, 371, 270–275.
- 11 S. Gallardo-Fuentes and R. Ormazabal-Toledo, *Chem. Phys. Lett.*, 2020, **741**, 137002.
- 12 K. R. Gorantla and B. S. Mallik, *J. Phys. Chem. C*, 2021, 125, 1313–1322.
- 13 Y. Fu, L. Bernasconi and P. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, **143**, 1577–1589.

- 14 M. Klahn, E. Rosta and A. Warshel, J. Am. Chem. Soc., 2006, 128, 15310–15323.
- 15 A. C. Hengge, *Phosphoryl Transfer Reactions*, John Wiley and Sons, Ltd, 2015, pp. 1–7.
- 16 F. Duarte, A. Barrozo, J. Åqvist, N. H. Williams and S. C. Kamerlin, J. Am. Chem. Soc., 2016, 138, 10664–10673.
- 17 D. Petrovic, K. Szeler and S. C. L. Kamerlin, *Chem. Commun.*, 2018, **54**, 3077–3089.
- 18 J. Aqvist, K. Kolmodin, J. Florian and A. Warshel, *Chem. Biol.*, 1999, **6**, 71–80.
- (a) E. H. Wanderlind, C. R. Bittencourt, A. M. Manfredi,
   A. P. Gerola, B. S. Souza, H. D. Fiedler and F. Nome, *J. Phys. Org. Chem.*, 2019, 32, 1–8; (b) P. Das, N. B. Chandar,
   S. Chourey, H. Agarwalla, B. Ganguly and A. Das, *Inorg. Chem.*, 2013, 52, 11034–11041.
- 20 E. Rosta, S. C. Kamerlin and A. Warshel, *Biochemistry*, 2008, 47, 3725–3735.
- 21 A. Barducci, M. Bonomi and M. Parrinello, *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci.*, 2011, 1, 826–843.
- 22 A. Barducci, G. Bussi and M. Parrinello, *Phys. Rev. Lett.*, 2008, **100**, 826–843.
- 23 A. Pabis, N. H. Williams and S. C. Kamerlin, *Org. Biomol. Chem.*, 2017, 15, 7308–7316.
- 24 X. Wang, J. Peng, D. Wang, M. Liu, C. Meng, A. Tian, K. Alimaje and Z. Shi, *Inorg. Chim. Acta*, 2012, 392, 160–164.
- 25 S. Youngme, P. Phuengphai, C. Pakawatchai, G. A. van Albada and J. Reedijk, *Inorg. Chim. Acta*, 2005, **358**, 2125–2128.
- 26 L. Liu, B. Lukose and B. Ensing, *J. Phys. Chem. C*, 2017, **121**, 2046–2051.
- 27 C. Hille, S. Ringe, M. Deimel, C. Kunkel, W. E. Acree, K. Reuter and H. Oberhofer, *J. Chem. Phys.*, 2019, **150**, 041710.
- 28 A. M. Abramyan, Z. Liu and V. Pophristic, *Chem. Commun.*, 2016, **52**, 669–672.
- 29 I. Marcos-Alcalde, J. Setoain, J. I. Mendieta-Moreno, J. Mendieta and P. Gomez-Puertas, *Bioinformatics*, 2015, **31**, 3853–3855.
- 30 E. W. Dijkstra, A Note on Two Problems in Connexion with Graphs, 1959.
- 31 J. D. Chai and M. Head-Gordon, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2008, **10**, 6615–6620.
- 32 N. Mardirossian and M. Head-Gordon, *Mol. Phys.*, 2017, 115, 2315–2372.
- 33 J. VandeVondele and J. Hutter, *J. Chem. Phys.*, 2003, **118**, 4365–4369.
- 34 J. Hutter, M. Iannuzzi, F. Schiffmann and J. Vandevondele, Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci., 2014, 4, 15–25.
- 35 J. Vandevondele, M. Krack, F. Mohamed, M. Parrinello, T. Chassaing and J. Hutter, *Comput. Phys. Commun.*, 2005, **167**, 103–128.
- 36 M. Ceriotti, G. Bussi and M. Parrinello, *Phys. Rev. Lett.*, 2009, 102, 020601.
- 37 L. Genovese, T. Deutsch and S. Goedecker, *J. Chem. Phys.*, 2007, **127**, 054704.
- 38 C. Y. Legault, CYLview20, Université de Sherbrooke, 2020.
- 39 E. Hopkins, T. Sanvictores and S. Sharma, *Physiology, Acid Base Balance*, 2021, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507807/.

PCCP Communication

- 40 (*a*) K. E. Riley, M. Pitončák, P. Jurecčka and P. Hobza, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 5023–5063; (*b*) K. S. Thanthiriwatte, E. G. Hohenstein, L. A. Burns and C. D. Sherrill, *J. Chem. Theory Comput.*, 2011, 7, 88–96.
- 41 G. Sciortino, J.-D. Maréchal, I. Fábián, N. Lihi and E. Garribba, *J. Inorg. Biochem.*, 2020, **204**, 110953.
- 42 P. Wu, F. Fan, J. Song, W. Peng, J. Liu, C. Li, Z. Cao and B. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, **141**, 19776–19789.
- 43 R. Marion, F. Sguerra, F. Di Meo, E. Sauvageot, J.-F. Lohier, R. Daniellou, J.-L. Renaud, M. Linares, M. Hamel and S. Gaillard, *Inorg. Chem.*, 2014, 53, 9181–9191.
- 44 N. Mardirossian and M. Head-Gordon, *Mol. Phys.*, 2017, **115**, 2315–2372.
- 45 Z. Zara, J. Iqbal, K. Ayub, M. Irfan, A. Mahmood, R. A. Khera and B. Eliasson, *J. Mol. Struct.*, 2017, **1149**, 282–298.
- 46 K. R. Gorantla and B. S. Mallik, *J. Phys. Chem. A*, 2023, 127, 160–168.
- 47 J. Baldenebro-López, J. Castorena-González, N. Flores-Holguín and D. Glossman-Mitnik, *Mol. Phys.*, 2014, 112, 987–994.
- 48 R. M. R. da Silva, I. M. L. Rosa, W. X. C. Oliveira, O. C. Alves, E. C. S. Santos, F. Garcia, H. C. Silva Junior, G. B. Ferreira, G. P. Guedes, W. D. do Pim, M. Julve and M. V. Marinho, *New J. Chem.*, 2023, 47, 1066–1075.
- 49 F. Gao, D. Mei, Y. Wang, J. Szanyi and C. H. F. Peden, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 4935–4942.
- 50 A. Floris, S. Haq, M. Int Veld, D. B. Amabilino, R. Raval and L. Kantorovich, *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, **138**, 5837–5847.

- 51 F. Santanni, A. Albino, M. Atzori, D. Ranieri, E. Salvadori, M. Chiesa, A. Lunghi, A. Bencini, L. Sorace, F. Totti and R. Sessoli, *Inorg. Chem.*, 2021, 60, 140–151.
- 52 N. Iche-Tarrat, M. Ruiz-Lopez, J. C. Barthelat and A. Vigroux, *Chem. Eur. J.*, 2007, **13**, 3617–3629.
- 53 A. R. Calixto, C. Moreira and S. C. L. Kamerlin, *ACS Omega*, 2020, 5, 4380–4385.
- 54 S. Youngme, P. Phuengphai, N. Chaichit, C. Pakawatchai, G. A. Van Albada, O. Roubeau and J. Reedijk, *Inorg. Chim. Acta*, 2004, 357, 3603–3612.
- 55 M. A. van Bochove, M. Swart and F. M. Bickelhaupt, *Chem-PhysChem*, 2007, **8**, 2452–2463.
- 56 L. M. Rossi, A. Neves, A. J. Bortoluzzi, R. Hörner, B. Szpoganicz, H. Terenzi, A. S. Mangrich, E. Pereira-Maia, E. E. Castellano and W. Haase, *Inorg. Chim. Acta*, 2005, 358, 1807–1822.
- 57 M. Gallegos, A. Costales and Á. Martín Pendás, *J. Comput. Chem.*, 2022, 43(11), 785–795.
- 58 S. K. Barman, T. Mondal, D. Koley, F. Lloret and R. Mukherjee, *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 4038–4054.
- 59 S. C. Kamerlin, N. H. Williams and A. Warshel, *J. Org. Chem.*, 2008, 73, 6960–6969.
- 60 A. Alkherraz, S. Kamerlin, G. Feng, Q. Sheikh, A. Warshel and N. Williams, *Faraday Discuss.*, 2010, **145**, 9–14.
- 61 S. C. L. Kamerlin, J. Org. Chem., 2011, 76, 9228-9238.
- 62 M. R. Molavian, A. Abdolmaleki and K. Eskandari, *Comput. Mater. Sci.*, 2016, **122**, 126–138.
- 63 X. Zhang, X. Liu, D. L. Phillips and C. Zhao, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 1593–1603.