

Universita degli Studi di Lecce
Dipartimento di Ingegneria dell'Innovazione

MASTER DI II LIVELLO

Interazioni tra campi elettromagnetici ed ambiente

Relazione Finale sul tirocinio svolto al Dipartimento di Ingegneria Elettronica

Università Degli Studi "La Sapienza" ROMA

Effetti di campi elettromagnetici su molecole proteiche

TUTOR

Prof. Guglielmo D'inzeo

CANDIDATO

Dott. Salvatore Donatiello

ANNO ACCADEMICO 2003-2004

Introduzione

Il bioelettromagnetismo, inteso come l'insieme dei fenomeni elettrici e magnetici associati ai sistemi ed alle reazioni biochimiche, è una branca tanto interessante quanto vasta, per il numero e la complessità di sistemi presenti negli esseri viventi.

In particolare, l'interazione bioelettromagnetica studia l'azione del campo elettromagnetico con i sistemi biologici. Quest'ultimo aspetto risulta di estremo interesse sia nell'ambito di applicazioni di tipo medicale, (le nuove tecnologie diagnostiche e terapeutiche utilizzano massicciamente campi a basse frequenze [ELF]), sia dal punto di vista protezionistico (ad esempio valutare e studiare il rischio di esposizione prodotto da linee elettriche a bassa frequenza e trasmettitori per la radiodiffusione e le comunicazioni mobili, ad alta frequenza). Relativamente alla strumentazione biomedica di natura elettromagnetica, si ricorda come è ormai prassi quotidiana l'utilizzo di apparati diagnostici per RMN (Risonanza Magnetica Nucleare), TAC (Tomografia Assiale Computerizzata), elettrocardiografia, elettroencefalografia, elettromiografia e di apparati terapeutici per ipertermia a microonde e per la ricostruzione ossea.

Nel percorso di studio scientifico dell'interazione bioelettromagnetica è emerso prima l'aspetto energetico dell'accoppiamento, quindi inizialmente sono stati presi in considerazione solamente gli effetti denominati "termici", legati al trasferimento di potenza del campo elettromagnetico ai tessuti biologici.

Tali studi sono stati fondamentali per stabilire i primi, e tutt'ora unici, standard di sicurezza per l'esposizione ai campi elettromagnetici. Generalmente i limiti fissati per la popolazione sono cento volte inferiori a valori di campo minimi che inducono effetti diretti acuti, quali il riscaldamento a radiofrequenza e la stimolazione elettrica nervosa alla frequenza di rete.

Il susseguirsi di studi teorici e sperimentali ha evidenziato la presenza di effetti "non termici", mentre l'approfondimento delle conoscenze biologiche, della citologia, dello stesso bioelettromagnetismo, hanno permesso di cominciare a sistematizzare il problema con particolare riguardo ai meccanismi d'interazione. Un esempio per tutti della necessità per la ricerca in questo settore, che rappresenta uno degli aspetti più discussi dell'effettivo danno che i campi elettromagnetici a bassa ed alta frequenza possano causare, è dato dall'apparente legame fra campi di debole intensità e l'insorgere di patologie cancerogene in seguito a lunghe esposizioni (della durata anche di molti anni).

L'interdisciplinarietà della ricerca si rivela essenziale per il raggiungimento di una comprensione più dettagliata dei fenomeni. Le nuove tecnologie hanno permesso un enorme scambio d'informazione sui geni, proteine, dinamica cellulare e risposte biologiche alle mutazioni ed all'ambiente, ma non hanno ancora spiegato come tutti questi fattori si ricombinano all'interno di un essere vivente.

La biologia dei sistemi utilizza la matematica, la statistica, la fisica, il supercalcolo, l'ingegneria, per costruire modelli ed integrare i dati in un quadro più completo di funzionamento della rete biologica.

Metodologicamente, per valutare come un campo emesso da una sorgente possa alterare le normali funzioni fisiologiche di un sistema biologico è necessario:

- valutare il campo indotto dalla sorgente esterna all'interno di un campione biologico fino ad un livello microscopico cellulare e sub-cellulare (percorso dosimetrico)
- identificare i possibili effetti biologici prodotti dal campo indotto (confronto con un esposto)
- comprendere i meccanismi di interazione responsabili degli effetti (percorso modellistico).

Mentre i primi due punti sono suscettibili di verifica sperimentale diretta, tramite tecniche di misura ormai consolidate, il terzo punto, che risulta essere fondamentale al fine dell'identificazione di nuovi effetti, richiede una modellizzazione di elevato grado di sofisticatezza.

Secondo un approccio attualmente seguito è inoltre possibile correlare tra loro i risultati ottenuti a diversi livelli della scala di complessità.

Un più rigoroso approccio possibile per la comprensione del meccanismo d'interazione bioelettromagnetica richiede di scendere a livello molecolare e di studiare in prima analisi come un campo elettromagnetico agisca sulla distribuzione di carica di una molecola attraverso la conoscenza di:

- descrizione della forma molecolare del sistema in analisi (descrizione della posizione e della velocità di ciascun atomo)
- descrizione della struttura molecolare del sistema (descrizione di tutte le forze fisiche e dei legami chimici esistenti tra atomi)
- descrizione delle forze esterne (non endogene)
- valutazione della risposta dinamica del sistema alla stimolazione esterna (descrizione della posizione e della velocità di ciascun atomo in diversi intervalli di tempo in assenza e presenza di forze esterne).

Tale approccio richiede chiaramente una dettagliata conoscenza del sistema sotto analisi a livello atomico, così come la necessità di risolvere il problema con appropriata accuratezza in tempi ragionevoli. Questo tipo di problematiche ha il proprio ambiente naturale nei calcolatori ad elevate prestazioni, che possono sostenere l'enorme quantità di calcoli necessari per una loro risoluzione. I metodi della chimica computazionale quali la meccanica molecolare, la meccanica quantistica e le simulazioni di dinamica molecolare sono stati sviluppati per lo studio dei materiali, ed oggi trovano largo impiego anche in questo nuovo settore della ricerca. Tali strumenti, infatti permettono di avere una rappresentazione più accurata del sistema biomolecolare attraverso la descrizione della sua configurazione elettronica, permettendo di ricavare la distribuzione di campo elettromagnetico associato. Queste simulazioni non possono dare un quadro completo della complessità dell'intera struttura di una molecola, perchè necessiterebbero di un modello chimico troppo complicato per potere tener conto della complessità del sistema. Per quanto riguarda l'aspetto dell'interazione, questi pacchetti di calcolo permettono di prendere in considerazione la presenza di un campo esterno attraverso diversi approcci perturbativi. In questo lavoro si è preso come target biologico la molecola dell'eme in cui l'atomo centrale di ferro è legato oltre che con i quattro atomi di azoto dell'anello pirroico anche con l'imidazolo e con la molecola di ossigeno. È stato costruito un modello geometrico dell'intera molecola, servito come punto di partenza per le ottimizzazioni geometriche della struttura a varie distanze dell'ossigeno con il ferro. Con tale procedura si è potuta costruire una curva di potenziale del legame Fe-O₂, che verrà discussa in seguito. Il passaggio successivo è stato quello di inserire un campo elettrico statico non endogeno con la finalità di studiare le variazioni da questo apportate sulla curva di potenziale calcolata in assenza di campo. Il lavoro è servito per determinare in ultima analisi se la presenza di campo elettrico esterno induce sulla molecola variazioni della barriera di potenziale sul legame ferro-ossigeno.

Emoglobina

L'emoglobina è una delle molecole fondamentali presenti nei globuli rossi. Essa è fondamentale per legare l'ossigeno e trasportarlo all'interno delle cellule, legando successivamente l'anidride carbonica affinché possa essere eliminata. La presenza della molecola di emoglobina è fondamentale, in quanto, in sua assenza l'ossigeno trasportato in soluzione all'interno del fluido sanguigno è insufficiente per l'alimentazione cellulare. L'ossigeno disciolto risulta essere infatti pari a 2,5 cc per litro contro i 200 cc normalmente trasportati dall'emoglobina. Se poi l'emoglobina non fosse racchiusa nel globulo rosso e fosse disciolta nel sangue, le sue dimensioni relativamente ridotte le farebbero attraversare gli interstizi intercellulari facendola disperdere nell'organismo.

Le emoglobine svolgono un fondamentale ruolo fisiologico nel trasporto dell'ossigeno molecolare nel mondo animale. Esse sono formate da un medesimo gruppo prostetico, l'eme, che contiene il

ferro e lega l'ossigeno. La struttura quaternaria dell'emoglobina come mostrato nella Fig. 1 è un tetramero che risulta composto da quattro sub-unità organizzate in una configurazione a tetraedro. Nell'uomo adulto la globina è formata da quattro catene polipeptidiche, legate non covalentemente, due denominate α e due β . Ognuna di tali catene contiene un gruppo eme. Le catene α sono costituite da 141 residui amminoacidi, quelle β da 149.

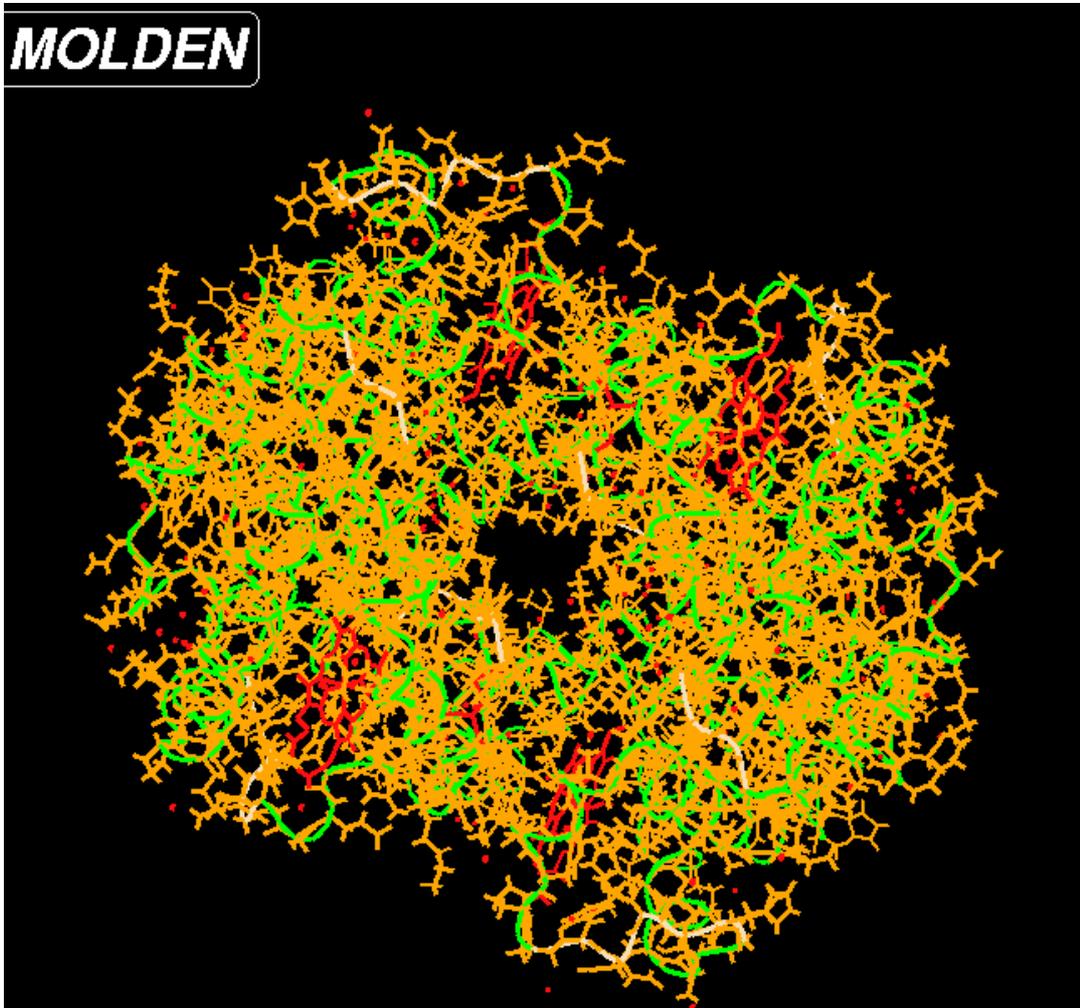
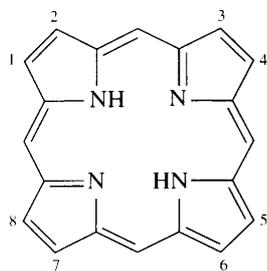


Fig. 1 Immagine dell'emoglobina rilevata con i raggi X. In rosso sono ben visibili i 4 gruppi dell'eme. (PDB)

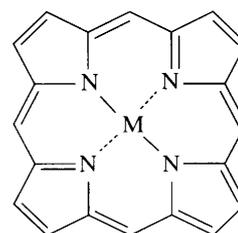
L'emoglobina oltre al trasporto dell'ossigeno molecolare lega anche CO_2 , NO e H^+ . Inoltre, essa è una proteina allosterica, ovvero le proprietà di legame dell'ossigeno da parte dell'emoglobina sono controllate da interazioni tra siti lontani nella molecola stessa. Un esempio è dato dal legame cooperativo, vale a dire, il legame di O_2 con l'emoglobina favorisce il legame di un'altra molecola di O_2 alla stessa molecola di emoglobina. L'eme è formato da una molecola di protoporfirina IX complessata con un atomo di ferro centrale. Le porfirine sono composti aromatici il cui nucleo centrale è costituito dall'anello macrociclico della porfina. Le porfirine derivano dalla porfina per la sostituzione di alcune o di tutte le otto posizioni periferiche con delle catene laterali. Quando nell'anello centrale si lega un atomo metallico sono dette metalloporfirine come illustrato in (I) e (II).

(I) Porfina



(I)

(II) Metalloporfina



(II)

Esse svolgono ruoli importanti in vari processi biologici. Nel campo della ricerca biomedica e farmacologia, le porfirine si sono rivelate ottime candidate per lo sviluppo di molecole capaci di riconoscere selettivamente le cellule sulle quali intervenire. Data la loro affinità per le cellule tumorali ed il loro forte assorbimento nel visibile, le metalloporfirine (porfirine contenenti un atomo metallico nell'anello macrociclico) sono adatte per il trattamento di neoplasie mediante terapia fotodinamica: somministrate nel paziente, si localizzano nelle cellule tumorali che, irradiate con un opportuno fascio laser vengono foto-ossidate, preservando i tessuti circostanti. In particolare, porfirine idrosolubili e loro derivati metallici sono recentemente utilizzate in numerose applicazioni nel trattamento chemioterapico dei tumori. Una linea di ricerca attuale è indirizzata alla progettazione, alla sintesi ed alla caratterizzazione chimica di porfirine idrosolubili (Fig. 2) non aventi sistemi carichi, con particolare attenzione alla sintesi di porfirine recanti, in posizioni periferiche, catene polimeriche idrosolubili e biocompatibili.

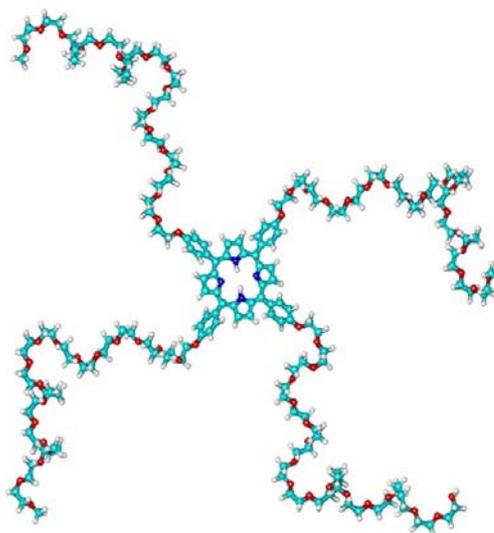


Fig. 2 Polimero porfirinico idrosolubile

Alcune applicazioni delle metalloporfirine riguardano lo sviluppo di sensori molecolari di specie chimiche, quali gas tossici. Esse legano facilmente piccole molecole gassose (O_2 , CO , NO , SO_2) modificando contemporaneamente la loro struttura elettronica. Per questo motivo possono essere presi come parametri per monitorare proprietà elettroniche, come la resistenza al flusso degli elettroni, oppure le proprietà ottiche in strumenti a nanostruttura.

I Chimica computazionale

L'applicazione di metodi di simulazione numerica in vari campi della ricerca è diventata negli ultimi decenni un campo della ricerca fondamentale per lo studio di sistemi statici e dinamici complessi. Il suo sviluppo incrementa parallelamente alla potenza di calcolo raggiunta dai processori di anno in anno.

Un settore in cui in particolare si sta dimostrando fondamentale l'applicazione di codici di calcolo avanzati riguarda lo studio della struttura elettronica di solidi, liquidi e molecole. Questo campo prende il nome di chimica computazionale, e si affianca a pieno titolo ad altre discipline, per l'interpretazione e la comprensione di dati sperimentali e per la progettazione di nuovi sistemi con proprietà ben definite.

In effetti la chimica computazionale è solo una branca di un settore più ampio in rapida evoluzione che va sotto il nome di scientific computing. Questa nuova disciplina sta affiancando sempre più l'approccio tradizionale alla soluzione di problemi scientifici e tecnologici finora basati esclusivamente sulla sperimentazione diretta. Gli esperimenti producono nuove scoperte ed il ruolo della teoria è quello di interpretarli con un quadro di riferimento il più possibile universale.

L'uso combinato di software, algoritmi e potenza di calcolo oggi permette di simulare un esperimento al computer prima di effettuarlo con costi più bassi e risposte più rapide.

La simulazione di processi chimici consiste nel riprodurre al calcolatore fenomeni estremamente complessi che vanno dalla combinazione di due o più atomi isolati a formare una molecola gassosa, sino a trasformazione a molti stadi che coinvolgono molecole di grandi dimensioni in soluzioni a molte componenti quali possono essere i processi biochimici.

Grandezze fondamentali per la risoluzione di qualsiasi problema chimico sono il tempo e la temperatura. I processi chimici sono processi dinamici, in cui le scale temporali vanno da qualche ps a migliaia di anni. Ciò comporta delle simulazioni con relativi calcoli proporzionali a queste due fondamentali variabili. La temperatura misura l'energia termica di un sistema, a sua volta legata al moto molecolare. Per considerare questi fattori è necessario effettuare delle simulazioni dinamiche, in cui si tiene conto della temperatura e l'evoluzione del sistema viene seguita in tempi sufficientemente lunghi. Questo risulta essere l'ambito della Dinamica Molecolare, l'obiettivo finale di buona parte delle simulazioni chimiche. Per arrivare ad una buona conoscenza dei fenomeni dinamici è però necessario avere come base una conoscenza accurata dei campi di forze che governano le interazioni tra atomi e molecole e quindi dei processi elementari che governano la generazione e la rottura dei legami chimici. Questa è la base della Teoria Quantistica della chimica, cioè la possibilità di prevedere e calcolare a priori la stabilità di nuovi composti chimici, la loro reattività ed il costo energetico. Per la determinazione di questi fattori non è strettamente necessario inserire come parametro la temperatura. È necessario però risolvere le equazioni quanto – meccaniche con il minor numero di approssimazioni, vale a dire l'introduzione di parametri dedotti da valori sperimentali. Quindi occorre giungere alla soluzione del problema quanto – meccanico utilizzando solo ed esclusivamente grandezze universali come massa, carica di elettroni e nuclei atomici, ecc; lo studio di sistemi chimici con l'utilizzazione di costanti universali prende il nome di metodo ab initio o anche dei primi principi.

Il fatto di risolvere le complesse equazioni quanto – meccaniche che descrivono in modo “esatto” la struttura elettronica, rende questi metodi assai pesanti dal punto di vista computazionale, tanto che oggi essi sono limitati a sistemi che contengono al massimo poche centinaia di atomi.

Verso la metà degli anni '80 Roberto Car e Michele Parrinello, riuscirono ad estendere l'uso di metodi ab initio allo studio di problemi dinamici, dando inizio al nuovissimo campo della dinamica molecolare in cui l'evoluzione temporale e la temperatura vengono inclusi senza approssimazioni empiriche. Oggi, questo tipo di simulazioni rappresenta una realtà, anche se ristretta a tempi di simulazione molto brevi e per un numero di atomi limitato, per l'eccessiva potenza di calcolo richiesta.

Esistono altri metodi computazionali, utilizzati quando devono essere descritti sistemi di grandi dimensioni. Il problema viene risolto, in questi casi, introducendo approssimazioni come ad esempio l'uso di parametri empirici. Questo tipo di approccio è detto semi-empirico e permette di fare calcoli quantomeccanici su scale temporali significative in tempi accettabili al costo di una minore accuratezza dei risultati.

Quando invece devono essere trattati problemi che descrivono sistemi ancora più complessi (la maggior parte dei processi chimici studiati), la simulazione diviene di tipo esclusivamente statistico rinunciando quasi totalmente all'ambizioso progetto di partire dalle leggi fondamentali della fisica per descrivere l'intero sistema.

Decidere con quale tipo di tecnica può essere affrontato un problema di chimica computazionale non è un compito estremamente semplice. Occorre in primis definire il modello chimico che si vuole studiare specificandone essenzialmente le grandezze che si vogliono determinare e soprattutto il numero di atomi o di molecole in gioco. Quest'ultimo passo diventa fondamentale per decidere, in base alla potenza di calcolo di cui si dispone.

Un sistema chimico è costituito da oggetti materiali che possono essere puntiformi od estesi quali gli elettroni ed i nuclei.

La complessità di un modello dipende essenzialmente dal livello di descrizione degli elettroni. Una delle principali approssimazioni utilizzate è quella di Born-Oppenheimer, che separa il moto dei nuclei e degli elettroni. Consiste nel considerare i nuclei essenzialmente fermi, perché hanno velocità inferiori a quelle elettroniche. (Sono assegnati agli elettroni delle funzioni d'onda che dipendono solo dalle coordinate degli stessi elettroni, mentre per i nuclei si assegnano solo le coordinate della loro posizione spaziale). Non è applicabile (o si applica difficilmente) allo studio di stati elettronici eccitati, transizioni non adiabatiche, incroci tra stati.

La complessità di un modello dipende essenzialmente dal livello di descrizione degli elettroni e questo determina il tipo di approccio che si vuole utilizzare, nell'ambito dei tre fondamentali attualmente conosciuti:

- ab initio
- semi-empirico
- statistico

I metodi numerici quanto-meccanici ab initio partono dall'equazione di Schrödinger esatta e ne cercano soluzioni sotto opportune approssimazioni a diversi livelli di accuratezza.

I metodi numerici quanto-meccanici semiempirici partono da Hamiltoniani approssimati e parametrizzati tramite dati sperimentali.

Le simulazioni numeriche molecolari con approccio statistico infine utilizzano rappresentazioni del sistema seguendo le leggi della meccanica classica, senza considerare esplicitamente gli elettroni, applicando funzioni di distribuzione.

(a) Metodi ab initio

Modelli quantistici (QM) che a loro volta si dividono in

- Hartree-Fock (HF)
- DFT (Density Function Teory)
- Post-HF

Questi modelli partono tutti dall'equazione di Schrödinger indipendente dal tempo

$$\sum_i^{\text{elettroni}} \left[-\frac{\eta}{2m} \left(\frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_i^2} \right) + V(\mathbf{r}_i) \right] \Psi(x_1, y_1, z_1, \Lambda, x_i, y_i, z_i, \Lambda) =$$

$$= E \Psi(x_1, y_1, z_1, \Lambda, x_i, y_i, z_i, \Lambda)$$

Dove $V(\mathbf{r}_i)$ contiene i termini di interazione con i nuclei (termini coulombiani), interazione con altri elettroni (correlazione del moto elettronico), interazione con campi esterni (spesso time-dependent). La funzione d'onda è scritta per il modello a particelle indipendenti come combinazione lineare dei vari orbitali atomici che vengono utilizzati nell'approssimazione voluta

$$\Psi(x_1, y_1, z_1, \Lambda, x_i, y_i, z_i, \Lambda) =$$

$$= \psi_1(x_1, y_1, z_1) \cdot \psi_2(x_2, y_2, z_2) \cdot \psi_3(x_3, y_3, z_3) \Lambda +$$

$$- \psi_1(x_2, y_2, z_2) \cdot \psi_2(x_1, y_1, z_1) \cdot \psi_3(x_3, y_3, z_3) \Lambda +$$

$$- \psi_1(x_3, y_3, z_3) \cdot \psi_2(x_2, y_2, z_2) \cdot \psi_3(x_1, y_1, z_1) \Lambda + \Lambda$$

Esistono diversi insiemi di funzioni di base (basis set) dalle quali dipende la qualità del calcolo (in special modo per un calcolo HF).

Le funzioni matematiche che possono essere utilizzate per la descrizione degli orbitali atomici possono essere in linea di principio di qualsiasi genere: esponenziale, gaussiana, polinomiale, onda piana, ecc. Le funzioni maggiormente utilizzate sono gli Slater Type Orbitals (STO) ed i Gaussian Type Orbitals (GTO), rispettivamente esponenziale e gaussiana.

STO

$$\chi_{n,l,m}(r, \theta, \varphi) = N r^{n-1} e^{-\xi r} Y_{l,m}(\theta, \varphi)$$

GTO

$$\chi_{i,j,k}(x, y, z) = N x^i y^j z^k e^{-\alpha r^2}$$

$$\varphi_i^{(s)} = b_{i1} \chi_1^s + b_{i2} \chi_2^s + b_{i3} \chi_3^s$$

$$\varphi_j^{(p)} = b_{j1} \chi_1^p + b_{j2} \chi_2^p + b_{j3} \chi_3^p$$

Gli esponenziali delle gaussiane α ed i coefficienti di espansione b_{ij} sono scelti all'inizio del calcolo e lasciati invariati.

Un calcolo Hartree Fock dipende solo dalle funzioni di base, e consiste nel calcolo di integrali contenenti le funzioni di base degli orbitali atomici e loro combinazioni lineari.

Il costo computazionale cresce circa in proporzione ad N^4 dove N è il numero delle funzioni di base. Quindi raddoppiando il numero di atomi, oppure il numero delle funzioni di base, il calcolo costa 16 volte di più.

Volendo in generale trattare atomi a molti elettroni e molecole contenenti orbitali molecolari è necessario effettuare un calcolo aggiuntivo che tenga conto delle interazioni elettrone – elettrone cioè della correlazione elettronica. Questo passo viene effettuato utilizzando la teoria del funzionale

densità (DFT Density Functional Theory), che è il più usato, oppure altri metodi quali il Post-HF, il Perturbation Theory (MP2, MP3), il Configuration Interaction (CI) ed il Coupled Cluster Single e Double (CCSD).

Il termine di correlazione viene espresso con la seguente funzione:

$$V_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$$

dove $\rho(\mathbf{r})$ rappresenta la densità elettronica,

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_i |\psi_i|^2$$

ed è parametrizzato assumendo la forma qui espressa:

$$\psi_1 = c_{11} \varphi_1^{(s)} + c_{12} \varphi_2^{(s)} + c_{13} \varphi_3^{(p)} + \Lambda$$

$$\psi_2 = c_{21} \varphi_1^{(s)} + c_{22} \varphi_2^{(s)} + c_{23} \varphi_3^{(p)} + \Lambda$$

Λ

c_{ij} sono delle costanti che rimangono tali per tutto il calcolo e $\varphi_i^{(s,p,d)}$ rappresentano le funzioni dei vari orbitale atomici considerati come base per la combinazione.

Con i metodi di meccanica quantistica sopra menzionati è possibile calcolare le energie molecolari dei prodotti analizzati quali possono essere le stabilità relative, le energie di isomerizzazione, le energie di reazione e le barriere di reazione.

Inoltre è possibile calcolare le geometrie molecolari (minimi e stati di transizione), le frequenze di vibrazione (armoniche o correlazioni enarmoniche), varie proprietà elettroniche (dipolo, quadrupolo, polarizzabilità, shielding NMR, coupling ESR, ...), transizioni elettroniche (UV-Vis, fluorescenza, ...) solo a livello post HF, o TD-DFT.

Vantaggi dei calcoli con la meccanica quantistica sono essenzialmente due. La possibilità di tenere il calcolo sempre sotto controllo e la possibilità di aumentare indefinitamente la precisione, tutto questo a svantaggio dei costi computazionali che come abbiamo visto crescono con un fattore N^4 con il numero delle variabili in gioco.

(b') Metodi semiempirici.

Questi metodi, introdotti verso la metà degli anni '60 riducono drasticamente i costi computazionali al prezzo di minore precisione di calcolo.

Lo scaling N^4 del metodo HF viene ridotto trascurando alcuni integrali. Gli elettroni considerati nel calcolo sono esclusivamente quelli che giocano un ruolo importante nella reazione chimica, mentre i più interni vengono rinormalizzati e quindi non considerati se non come costanti aggiuntive.

I metodi maggiormente usati sono lo ZDO (zero differential overlap), il CNDO (complete neglect of differential overlap), dove gli integrali bi-elettronici che coinvolgono più centri di ricombinazione o sono trascurati o parametrizzati.

Quindi, in definitiva, i metodi semi-empirici permettono di calcolare le stesse quantità ricavabili con i metodi di QM con una riduzione drastica dei tempi di calcolo dovuta ad uno scaling molto limitato (che ne segna la precisione). Lo svantaggio principale è dovuto alla parametrizzazione che viene introdotta per la descrizione delle grandezze fisiche.

(b'') Metodologia Perturbed Matrix Method (PMM)

La metodologia PMM utilizza la notazioni delle matrici per esprimere l'equazione di Schrödinger tempo-indipendente, rendendo possibile rappresentare le funzioni d'onda perturbate. Tale metodo fa uso dei principi primi della teoria quanto-meccanica ed è quindi rigoroso all'interno della sola approssimazione dovuta al troncamento della matrice Hamiltoniana perturbata. Normalmente l'effetto di un campo esterno viene valutato utilizzando la teoria delle perturbazioni. Per esempio, l'effetto di un campo elettrico statico ed omogeneo può essere considerato semplicemente sommando all'operatore hamiltoniano imperturbato il termine perturbativo che generalmente è rappresentato come un prodotto tra il campo ed il momento di dipolo (nel caso di un campo elettrico applicato). Il problema viene risolto diagonalizzando la matrice perturbata di Hamilton espressa nella base delle autofunzioni imperturbate. Storicamente questo tipo di approccio è stato solo raramente utilizzato a livello molecolare e solo per trattare perturbazioni interne come ad esempio l'accoppiamento spin-orbita, che in una teoria non-relativistica, viene considerato come una perturbazione interna. Per trattare perturbazioni più generali, l'approccio sopraindicato non è stato mai utilizzato, pur presentando dei vantaggi (di recente un lavoro di dottorato dell'ing. Lorenzo Dominici dal titolo "Studio di siti e meccanismi privilegiati di interazione bioelettromagnetica tramite codici di chimica computazionale" ha condotto al perfezionamento di questo metodo). Esso è in principio una procedura rigorosa entro la sola approssimazione pratica, che sorge dal troncamento della dimensione della matrice hamiltoniana perturbata, cioè la generazione di una base limitata di autofunzioni dell'hamiltoniana non perturbata. Comunque, va ricordato che l'approccio attuale, potrebbe risentire di una non rigorosa deviazione degli autostati imperturbati dovuta alle limitazioni che possono insorgere quando vengono considerati autostati altamente eccitati. D'altro canto, esso appare uno strumento di investigazione molto promettente per sistemi molecolari che richiedono costi computazionali elevati, poiché le autofunzioni imperturbate devono essere valutate solo una volta per una data geometria, anche se la perturbazione esterna viene fatta variare.

Il calcolo PMM utilizza la base dei primi n livelli (base+eccitati) imperturbati, calcolati per trovare i primi n stati in presenza del campo esterno. Quindi non va ad alterare la matrice di Slater aggiungendovi queste nuove combinazioni tra stati, ma costruisce una nuova matrice $n \times n$ e poi la diagonalizza, calcolandone i suoi autovalori. Le vere approssimazioni alla base di questo metodo sono il troncamento del set di base atomico (ABS) e del numero di determinanti per il calcolo configurazionale. Si ricorda che in meccanica quantistica, per risolvere esattamente il problema agli autovalori è necessaria una base di infiniti stati (procedimento chiaramente impossibile da applicare al calcolatore). Per questo motivo tutti i metodi di calcolo hanno bisogno di effettuare dei troncamenti. La particolarità del PMM è quella di utilizzare una base costruita esclusivamente con i valori di n stati determinati con altre procedure di risoluzione delle equazioni quanto-meccaniche. Il vantaggio del metodo PMM è il basso costo computazionale. La procedura standard consiste nell'effettuare un primo calcolo quanto-meccanico per ricavare la geometria della struttura in esame e ricavare i valori dei dipoli puri e di transizione (nella procedura standard PMM la geometria della struttura viene calcolata con il metodo HF, nel nostro caso l'ottimizzazione geometrica è stata effettuata con il DFT, più preciso). Successivamente utilizzando come input i risultati dell'HF la diagonalizzazione della matrice hamiltoniana viene eseguita abbastanza rapidamente per diversi valori del campo applicato non endogeno (punto cruciale della nostra ricerca).

Il metodo perturbativo standard effettuerebbe invece di nuovo tutto il calcolo HF per ogni geometria e per ogni valore del campo applicato.

Con riferimento a quanto detto sopra, gli elementi della diagonale principale della matrice $n \times n$ che viene costruita sono detti vettori di dipoli puri, mentre i termini fuori diagonale sono noti come vettori dipoli di transizione.

Nell'applicazione del metodo PMM nel presente lavoro, le autofunzioni imperturbate di base ($n=5$) sono calcolate con una procedura HF con un basis set specifico. Dopo questo calcolo iniziale, vengono calcolati $n-1=4$ stati eccitati ed i relativi dipoli puri con una procedura configurazionale

CISD. I dipoli di transizione vengono calcolati con una procedura state-average. Queste tre fasi vengono condotte con il pacchetto GAMESS US. Infine, a partire dai valori energetici e dalla matrice dei dipoli viene applicato il programma di diagonalizzazione PMM per una serie di campi elettrici di diversa orientazione ed intensità. Il numero di stati utilizzati, stato base più quattro eccitati non è elevato ma è sufficiente per studiare il solo stato base perturbato.

(c') Dinamica Molecolare

Fino ad ora si è introdotto come calcolare l'energia totale e le proprietà di una molecola, senza considerare la sua evoluzione nel tempo. Sono stati descritti metodi "statici", in cui le posizioni nucleari del sistema sono mantenute fisse. Un'importanza particolare hanno i metodi di calcolo dinamico di un sistema di atomi o molecole. I metodi tradizionali sono suddivisi in due grandi famiglie:

- 1- Simulazioni stocastiche
- 2- Simulazioni deterministiche.

Questi metodi sono rappresentati dal metodo di Monte Carlo (MC) e dal metodo di Dinamica Molecolare (MD) rispettivamente.

Le simulazioni di Monte Carlo si basano su un approccio statistico, che genera varie configurazioni del sistema sotto esame con la generazione di moto casuale delle particelle. Successivamente un algoritmo particolare permette di scegliere la configurazione utile, utilizzando una statistica di Boltzmann.

Al contrario, i metodi di dinamica molecolare si basano sulle equazioni del moto definite dall'hamiltoniana del sistema. Viene risolta l'equazione per ottenere le nuove posizioni e velocità delle singole particelle. Le simulazioni richiedono sempre la creazione di un modello delle forze per le interazioni tra le varie componenti del sistema. Tale modello deve sempre essere confrontato con i dati sperimentali disponibili.

Gli elementi indispensabili per una simulazione di meccanica molecolare sono il campo di forza e la procedura di minimizzazione dell'energia potenziale. Per una simulazione di dinamica molecolare sono indispensabili il modello del campo di forza e delle equazioni del moto, un integratore per propagare le posizioni e le velocità in un intervallo di tempo predefinito, un ensemble statistico e le condizioni al contorno.

(c'') Metodo di Dinamica Molecolare Car-Parrinello (CPMD)

In teoria è possibile effettuare un calcolo per la determinazione di una dinamica delle coordinate nucleari lungo una superficie di potenziale calcolata con metodi ab initio della meccanica quantistica. Questo però è molto oneroso dal punto di vista della potenza di calcolo, alternativamente si può saltare questa fase ed eseguire direttamente la dinamica calcolando le forze in ogni passo della simulazione di Dinamica Molecolare. Queste tecniche hanno coinvolto la generazione di una funzione d'onda completamente convergente ad ogni passo temporale. Verso la metà degli anni '80 Car e Parrinello dimostrarono che era possibile procedere con la simulazione anche facendo convergere la funzione al primo passo. L'essenza del loro metodo è quella di far evolvere gli orbitali simultaneamente alle variazioni delle posizioni nucleari. Questo passo viene effettuato includendo i parametri orbitali come variabili con masse fittizie. Tranne che nel punto iniziale, le forze sui nuclei non sono corrette, poiché la funzione d'onda elettronica non converge nello spazio dei parametri orbitali. Questo errore, però, può essere controllato con una accurata scelta dei parametri dinamici. Tale tipo di simulazione può essere svolta con qualsiasi funzione d'onda, ma a causa del loro costo computazionale solamente i metodi DFT sono stati correttamente utilizzati con i metodi (CPMD).

II Risultati

Il mio lavoro di applicazione di una simulazione di meccanica quantistica a molecole biologicamente significative quali l'emoglobina del sangue è segnato da alcuni passi fondamentali.

- 1- Creazione di un modello chimico della molecola analizzata, la $\text{FeP}(\text{Im})(\text{O}_2)$.
- 2- Ottimizzazione configurazionale delle posizioni degli atomi costituenti, al variare della distanza tra due atomi presi come riferimento (nel mio caso la distanza fissata per ottenere l'ottimizzazione geometrica è stata quella relativa tra Ferro e ossigeno).
- 3- Applicazione di un campo elettrico statico esterno alla molecola per l'analisi energetica con la procedura PMM.

Come base di partenza è stato utilizzato un file dall'archivio del Protein Data Bank (PDB), contenente la struttura dell'emoglobina di capodoglio ricavata ai raggi X, quindi non contenente gli atomi di idrogeno. Dalla molecola quaternaria è stata estratta la struttura dell'eme con l'imidazolo e successivamente aggiunta la molecola di ossigeno che si lega con il ferro.

Servendosi del programma di visualizzazione molecolare Molden è stata generata una struttura ideale di partenza del gruppo sotto analisi (Fig. 3) utilizzando i dati estratti direttamente dal PDB confrontati con dati presenti in letteratura [1].

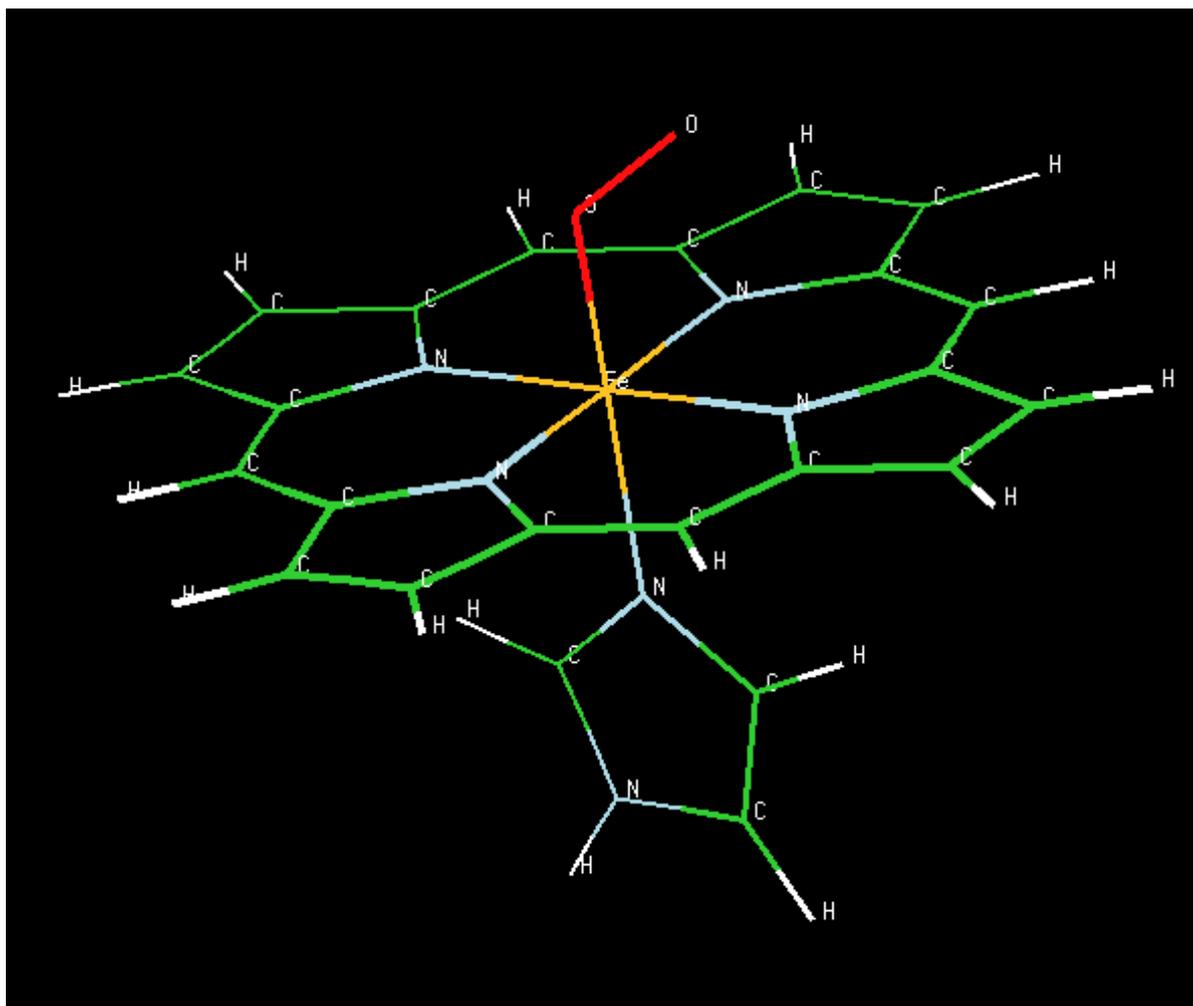


Fig. 3 La molecola $\text{FeP}(\text{Im})(\text{O}_2)$ costruita con Molden. Gli atomi di H aggiunti sono rappresentati in bianco.

Il programma Molden permette anche di creare una Z-matrix che contiene tutte le informazioni geometriche della molecola, a partire dall'ordine di inserimento degli atomi, le distanze interatomiche, gli angoli piani formati da tre atomi e gli angoli diedri (generati utilizzando 4 atomi). La generazione della matrice è un passo fondamentale per la buona riuscita dei calcoli di ottimizzazione geometrica che sono stati effettuati per la costruzione della curva di potenziale a varie distanze Fe-O₂. Sono state generate varie Z-matrix prima di trovare quella adatta per il tipo di calcolo. Qui di seguito aggiungo la Z-matrix di partenza utilizzata per tutte le ottimizzazioni:

Tab. 1

zmat angstroms

```

fe
n 1 nfe2
n 1 nfe3      2 nfen3
n 1 nfe2      3 nfen4      2 dih4
n 1 nfe5      4 nfen5      3 dih5
c 2 cn6       1 cnfe6      3 dih6
c 2 cn7       1 cnfe7      5 dih7
c 4 cn6       1 cnfe6      3 dih8
c 4 cn7       1 cnfe7      5 dih9
c 3 cn10      1 cnfe10     2 dih10
c 3 cn10      1 cnfe10     4 dih11
c 5 cn12      1 cnfe12     2 dih12
c 5 cn12      1 cnfe12     4 dih13
c 6 cc14      2 ccn14      1 dih14
c 7 cc15      2 ccn15      1 dih15
c 8 cc14      4 ccn14      1 dih16
c 9 cc15      4 ccn15      1 dih17
c 10 cc18     3 ccn18      1 dih18
c 11 cc18     3 ccn18      1 dih19
c 12 cc20     5 ccn20      1 dih20
c 13 cc20     5 ccn20      1 dih21
c 10 cc22     3 ccn22      1 dih22
c 11 cc22     3 ccn22      1 dih23
c 12 cc24     5 ccn24      1 dih24
c 13 cc24     5 ccn24      1 dih25
o 1 ofe26     2 ofen26     7 dih26
o 26 oo27     1 oofe27     2 dih27
n 1 nfe28     2 nfen28     7 dih28
c 28 cn29     1 cnfe29     2 dih29
c 28 cn30     1 cnfe30     2 dih30
c 30 cc31     28 ccn31     1 dih31
n 31 nc32     30 ncc32     28 dih32
h 14 hc33     6 hcc33      2 dih33
h 16 hc33     8 hcc33      4 dih34
h 15 hc35     7 hcc35      2 dih35
h 17 hc35     9 hcc35      4 dih36
h 22 hc37     6 hcc37      2 dih37
h 23 hc37     8 hcc37      4 dih38
h 18 hc39     10 hcc39     3 dih39
h 19 hc39     11 hcc39     3 dih40
h 24 hc41     7 hcc41      2 dih41
h 25 hc41     9 hcc41      4 dih42
h 20 hc43     12 hcc43     5 dih43
h 21 hc43     13 hcc43     5 dih44
h 29 hc45     28 hcn45     1 dih45
h 30 hc46     28 hcn46     1 dih46
h 31 hc47     30 hcc47     28 dih47
h 32 hn48     31 hnc48     30 dih48

```

variables

```

nfe2      1.970000
nfe3      1.970000
nfen3      90.000
nfe2      1.970000
nfen4      90.000
dih4      180.000
nfe5      1.970000
nfen5      90.000
dih5      180.000
cn6       1.390000
cnfe6     127.800
dih6      0.000
cn7       1.390000
cnfe7     127.800
dih7      0.000

```

cn6	1.390000
cnfe6	127.800
dih8	0.000
cn7	1.390000
cnfe7	127.800
dih9	0.000
cn10	1.390000
cnfe10	127.800
dih10	0.000
cn10	1.390000
cnfe10	127.800
dih11	0.000
cn12	1.390000
cnfe12	127.800
dih12	0.000
cn12	1.390000
cnfe12	127.800
dih13	0.000
cc14	1.440000
ccn14	110.800
dih14	-180.000
cc15	1.440000
ccn15	110.800
dih15	180.000
cc14	1.440000
ccn14	110.800
dih16	180.000
cc15	1.440000
ccn15	110.800
dih17	180.000
cc18	1.440000
ccn18	110.800
dih18	-177.417
cc18	1.440000
ccn18	110.800
dih19	-180.000
cc20	1.440000
ccn20	110.800
dih20	-180.000
cc20	1.440000
ccn20	110.800
dih21	180.000
cc22	1.380000
ccn22	125.100
dih22	0.000
cc22	1.380000
ccn22	125.100
dih23	0.000
cc24	1.380000
ccn24	125.100
dih24	0.000
cc24	1.380000
ccn24	125.100
dih25	0.000
ofe26	1.750000
ofen26	90.000
dih26	-90.000
oo27	1.280000
oofe27	125.000
dih27	111.300
nfe28	2.070000
nfen28	90.000
dih28	90.000
cn29	1.312196
cnfe29	126.400
dih29	90.000
cn30	1.369009
cnfe30	127.758
dih30	-90.000
cc31	1.364875
ccn31	111.662
dih31	-180.000
nc32	1.378093
ncc32	103.058
dih32	0.000
hc33	1.090000
hcc33	124.400
dih33	-180.000

hc33	1.090000
hcc33	124.400
dih34	180.000
hc35	1.090000
hcc35	124.400
dih35	-180.000
hc35	1.090000
hcc35	124.400
dih36	-180.000
hc37	1.090000
hcc37	117.800
dih37	-180.000
hc37	1.090000
hcc37	117.800
dih38	-180.000
hc39	1.090000
hcc39	124.400
dih39	180.000
hc39	1.090000
hcc39	124.400
dih40	-180.000
hc41	1.090000
hcc41	117.800
dih41	180.000
hc41	1.090000
hcc41	117.800
dih42	-180.000
hc43	1.090000
hcc43	128.400
dih43	-180.000
hc43	1.090000
hcc43	124.400
dih44	-180.000
hc45	1.090000
hcn45	126.165
dih45	0.000
hc46	1.090000
hcn46	120.198
dih46	0.000
hc47	1.090000
hcc47	133.070
dih47	180.000
hn48	1.090000
hnc48	125.788
dih48	180.000

Nella quasi totalità degli studi di ottimizzazione effettuati sulla molecola dell'eme sono aggiunti atomi di idrogeno per chiudere i legami covalenti esterni. Noi abbiamo utilizzato la medesima procedura per poter avere dei riferimenti con cui confrontare i dati ottenuti.

Utilizzando un codice di calcolo di meccanica quantistica, Gaussiann98, presente sulle macchine del CASPUR (Centro per il calcolo ad alte prestazioni) si è proceduto ad una ottimizzazione geometrica del modello di base dell'eme. Sono state effettuate varie prove per trovare il basis set adeguato per l'ottimizzazione. Siamo giunti infine ad utilizzare il metodo DFT con basis set ROB3LYP. Si è preferito utilizzare il metodo delle funzioni densità, in quanto molto più accurato del metodo HF ed anche perché è il metodo maggiormente utilizzato per la determinazione delle configurazioni di minima energia. La maggior parte dei lavori in cui si cerca di determinare la geometria di molecole viene infatti effettuata con tale metodo, che a differenza dell'HF permette di avere valori maggiormente confrontabili con quelli sperimentali.

I calcoli di ottimizzazione geometrica della molecola sono stati effettuati considerando due stati di spin, il singoletto ed il tripletto. Nello stato di spin di singoletto gli orbitali atomici sono degeneri, vale a dire che ogni orbitale contiene tutte e due gli elettroni (si parla quindi di closed shell). Nello stato di tripletto al contrario gli elettroni di valenza possono essere su più orbitali, vale a dire che possono essere accettati altri elettroni per chiudere le shell (open shell). È chiaro da ciò che le shell chiuse sono molto più stabili di quelle aperte in quanto meno reattive (non hanno bisogno di legarsi ad altri atomi per chiudere l'orbitale incompleto).

Qui di seguito sono riportate alcune geometrie ottimizzate per il singoletto ed il tripletto di spin (rispettivamente sm1 e sm3).

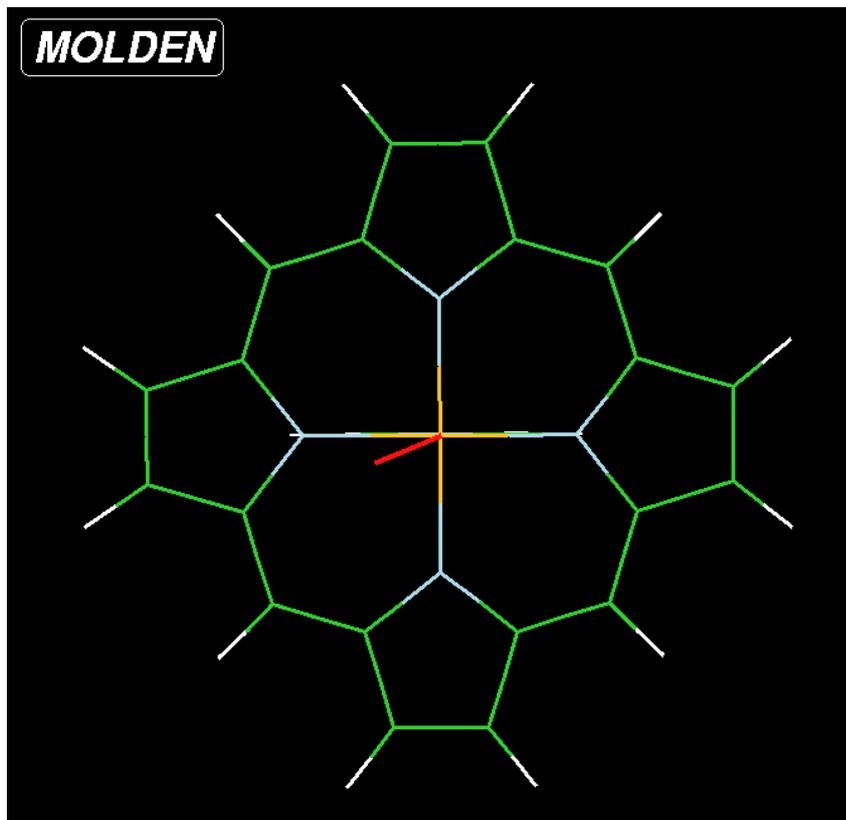


Fig. 4 Configurazione d'input per il calcolo DFT di ottimizzazione (piano xy)

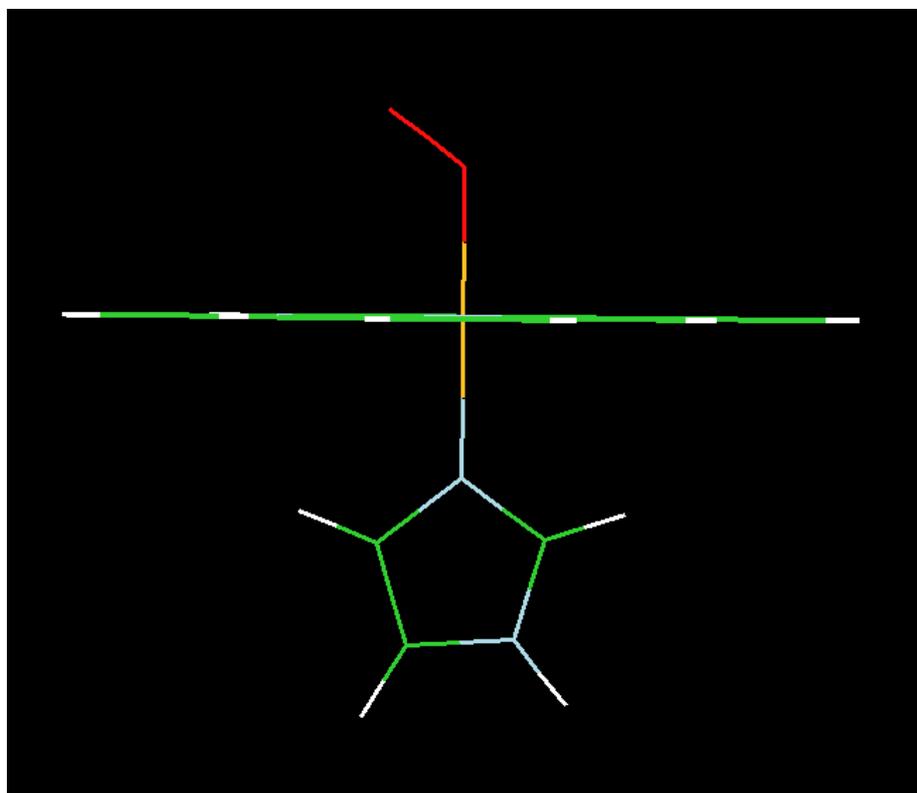


Fig. 5 Configurazione d'input per il calcolo DFT di ottimizzazione (piano xz)

Le figure 4 e 5 rappresentano la visualizzazione grafica della Z-Matrix riportata in tabella 1, che è stata utilizzata per creare il file d'input per il metodo DFT.

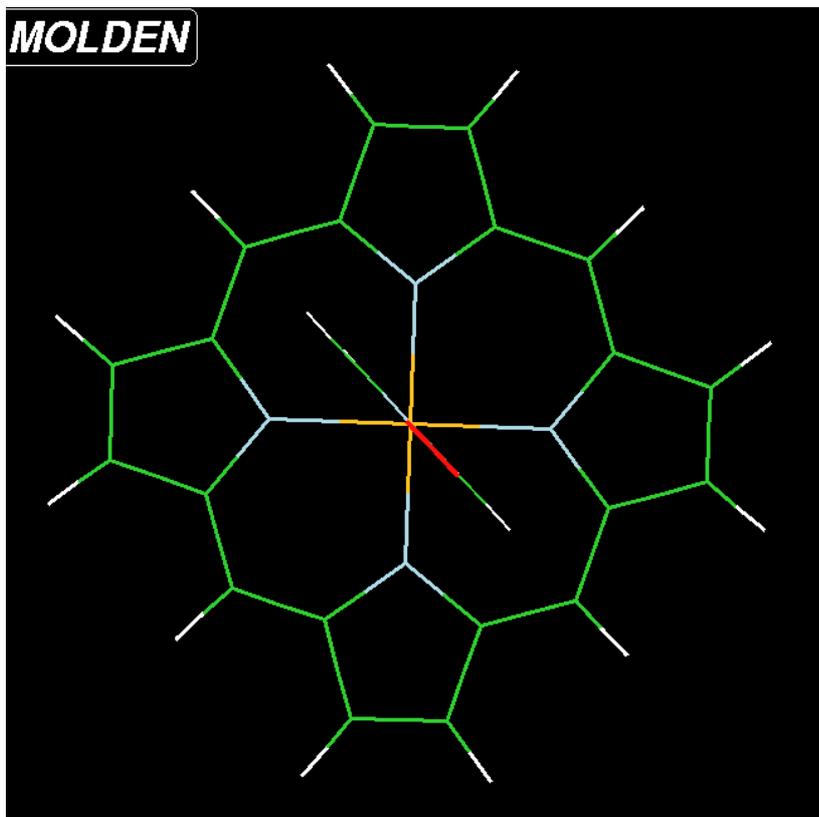


Fig. 6 Configurazione ottimizzata nel punto di minima energia, distanza Fe-O₂ 1.75 Å (molteplicità di spin 1)

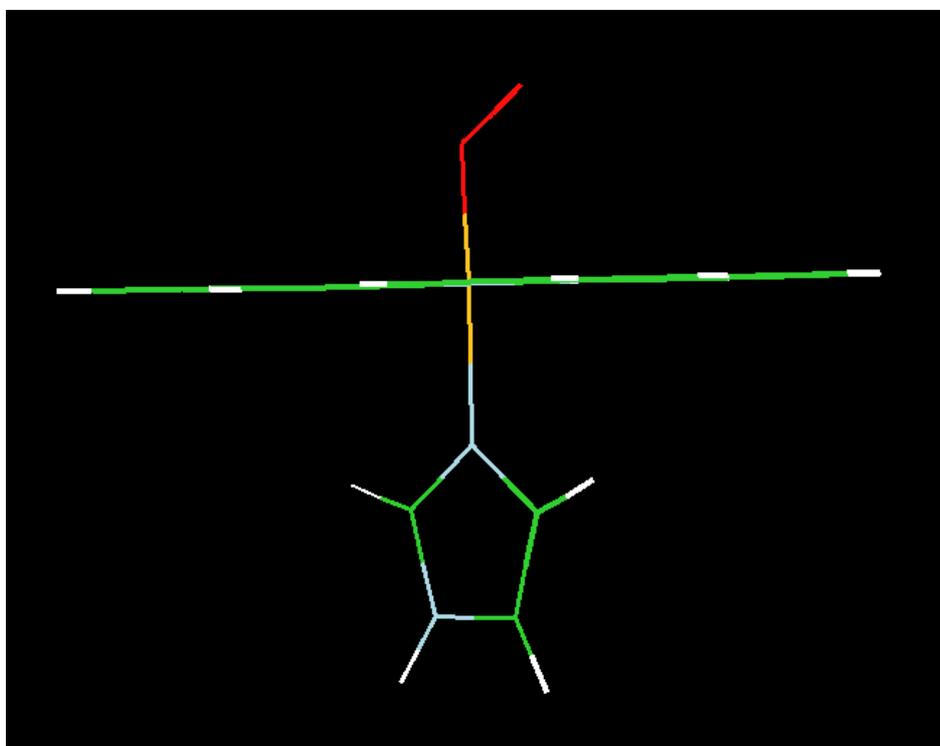


Fig. 7 Configurazione ottimizzata nel punto di minima energia, distanza Fe-O₂ 1.75 Å (molteplicità di spin 1)

Si può notare come la configurazione di minima energia per la distanza Fe-O₂ preveda l'allineamento della molecola di ossigeno con il gruppo dell'imidazolo, il quale a sua volta è orientato con un angolo di circa 45° rispetto al piano dell'anello macrociclico (Fig. 6 e 7).

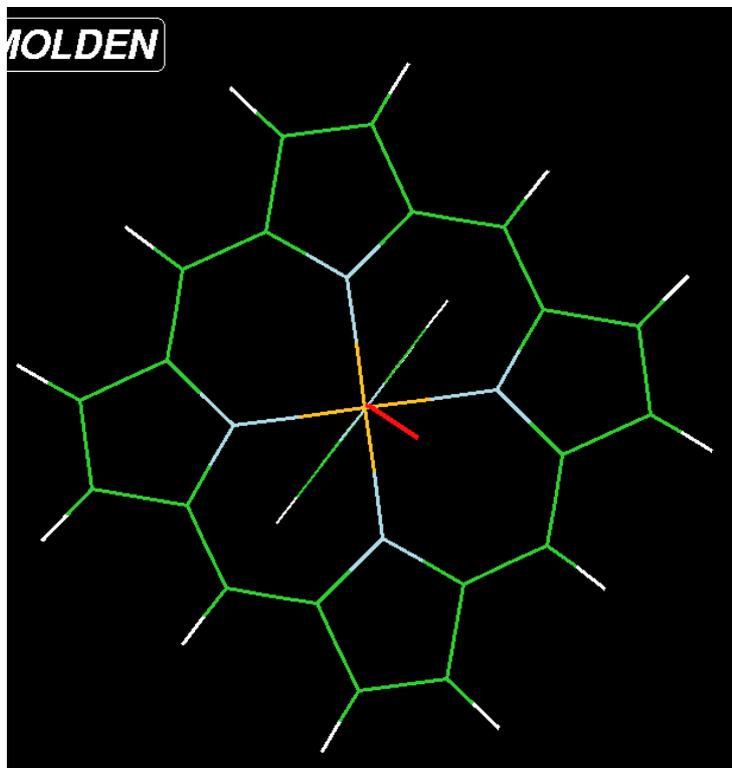


Fig. 8 Configurazione ottimizzata nel punto di minima energia, distanza Fe-O₂ 1.95 Å (molteplicità di spin 3)

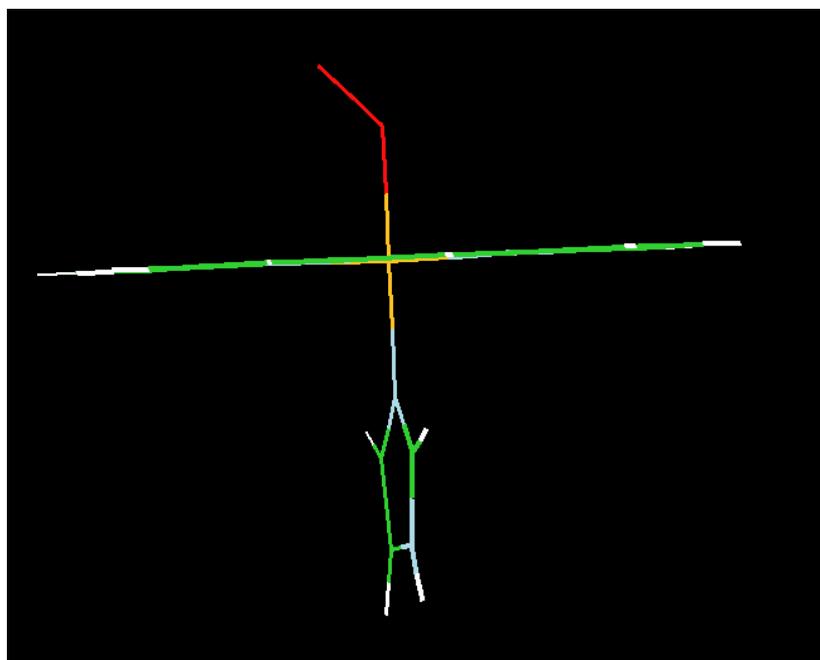


Fig. 9 Configurazione ottimizzata nel punto di minima energia, distanza Fe-O₂ 1.95 Å (molteplicità di spin 3)

A differenza della molteplicità di spin 1, nella configurazione di minimo potenziale della molteplicità di spin 3 la molecola di ossigeno risulta trovarsi sul piano ortogonale a quello contenente l'imidazolo (Fig. 8 e 9). Studi effettuati per la determinazione della configurazione geometrica di equilibrio sono vari e tra loro discordanti. I nostri risultati presentano valori concordi

con alcuni articoli, nel caso della molteplicità di spin 1, e con altri per molteplicità di spin 3 [1][2][3]. Va inoltre menzionato che il modello geometrico di partenza è privo di simmetrie eccezion fatta per le distanze tra gli atomi.

Il metodo utilizzato per la determinazione della curva di potenziale della molecola di FeP(Im)(O₂) (ferro-porfirina complessata con l'imidazolo e con la molecola di ossigeno), è stato quello di fissare un passo di 0.20 Å a partire dalla distanza minima di 1.55 Å tra il ferro e l'atomo di ossigeno che si lega, e quindi di far calcolare la configurazione di minima energia del sistema in esame per ogni valore della distanza ferro-ossigeno fino ad un massimo di 2.95 Å per la molteplicità di spin 1 e di 2.75 Å per quella di spin=3. La molecola presenta alcune simmetrie C_{2v} (simmetria rispetto ad un asse principale) solo per gli angoli piani e per le distanze interatomiche, mentre sono completamente privi di vincoli gli angoli diedri e le due molecole che si legano al ferro (ossigeno ed imidazolo).

Le distanze utilizzate per l'ottimizzazione sono state: 1.55, 1.75, 1.95, 2.15, 2.35, 2.55, 2.75 Å.

Il calcolo è stato ripetuto per due molteplicità di spin differenti, molteplicità 1 e 3. Sperimentalmente e dalla letteratura scientifica si sa che l'O₂ quando non è legato si trova in uno stato di tripletto di spin, quindi il suo stato è un open shell. Questa caratteristica della molecola rende l'ossigeno particolarmente difficile da studiare, in quanto risulta avere orbitali particolarmente vicini tra loro e facilmente confondibili. È questo uno dei motivi principali per cui ancora oggi non si è convinti che lo stato fondamentale dell'ossigeno legante il ferro nell'eme possa essere quello a molteplicità 1. Alcuni lavori portano questo risultato, ormai come completamente acquisito, ma gli attuali metodi di simulazione (con le loro approssimazioni) non permettono di discernere un risultato esatto da un altro, ed è quindi tutt'ora aperta la discussione sullo stato fondamentale di questa molecola.

Nelle tavole 2 e 3 sono riportate le grandezze fondamentali del calcolo di ottimizzazione rispetto alle molteplicità fissate. È possibile fare un confronto con i relativi dati sperimentali per rendersi conto della notevole qualità del modello chimico costruito e del basis set utilizzato per ottimizzare l'intera struttura.

d Fe-O2	d O-O	Angolo Fe-O-O	d Fe-N	d FeN(Imidazolo)
exp 1,75	1,2	131	1,98	2,07

Tav. 1 Valori sperimentali

Molteplicità di spin 1				
d Fe-O2	d O-O	Angolo Fe-O-O	d Fe-N	d FeN(Imidazolo)
1.55	1.32	124,93	2.00-2.03	2.07
1,75	1,31	121,67	2,00-2,026	2.02
1,95	1,3	118,91	2,00-2,02	1,98
2,15	1,298	116,18	2,00-2,015	1,95
2,35	1,294	112,99	2,00-2,012	1,94
2,55	1,292	108,7	2,00-2,01	1,93
2,75	1,291	103,21	2	1,926
2,95	1,29	97	2	1,922

TAV. 2 Struttura calcolata con DFT B3LYP (d=distanza in Å)

Molteplicità di spin 3				
d Fe-O2	d O-O	Angolo Fe-O-O	d Fe-N	d FeN(Imidazolo)
1.55	1,32	138,73	2,01-2,03	2,025
1,75	1,3	137,19	2,01-2,02	1,98
1,95	1,29	133,69	2,015	1,95
2,15	1,29	128,08	2,011	1,94
2,35	1,288	121,62	2,01	1,93

2,55	1,287	114,73	2,008	1,92
2,75	1,287	106,77	2,007	1,92

TAV. 3 Struttura calcolata con DFT ROB3LYP

Prendendo i dati relativi all'energia è stato possibile costruire la curva di potenziale cercata, come è possibile vedere dal grafico

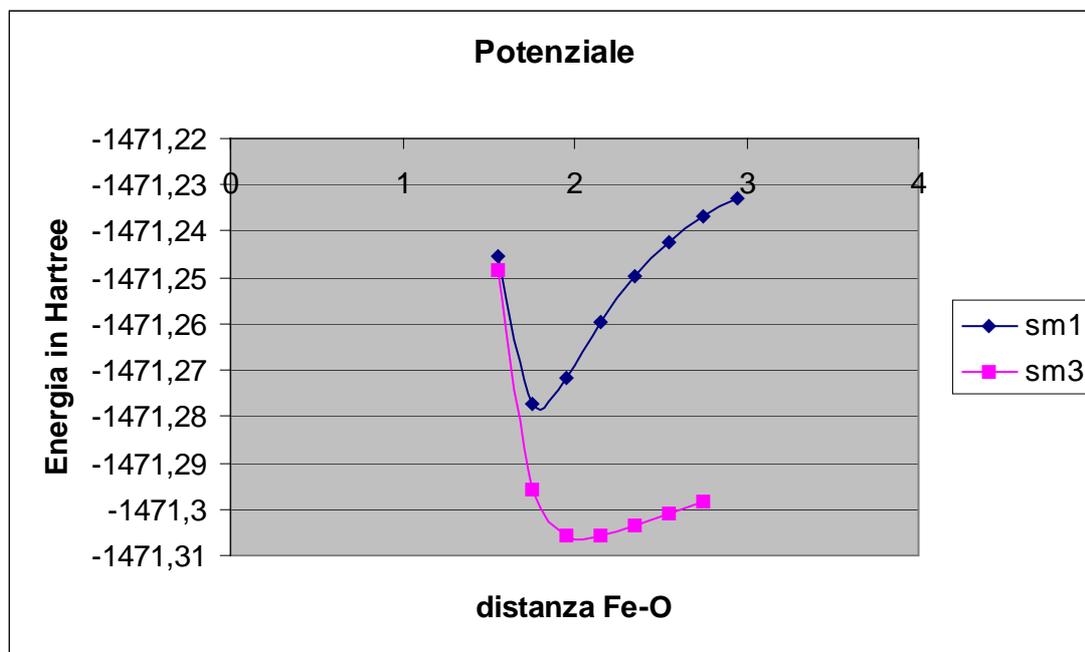


Grafico 1 Curve di potenziale del $FeP(Im)(O_2)$

Dai nostri calcoli si evince che il ground state risulta essere quello a molteplicità di spin 3. Molti dati di letteratura tra cui alcuni articoli di Parrinello [1][4], individuano lo stato fondamentale essere quello a molteplicità 1. Il dato venuto fuori nelle nostre simulazioni risulta essere attendibile con i metodi di ottimizzazione usati, che sono gli stessi di molti articoli, tra cui quelli di Parrinello. Il motivo del nostro risultato differente va ricercato forse, nel modo in cui abbiamo costruito il modello chimico, che rispetto a quelli citati in vari articoli risulta essere più libero da simmetrie. Inoltre facendo un confronto con i dati sperimentali, molti dei risultati ottenuti per la geometria ottimizzata nello stato di molteplicità 3 risultano essere maggiormente concordi [Tavole 1-2-3]. Questo porta a pensare che lo stato fondamentale possa essere con molta probabilità quello di tripletto (quanto meno per il modello da noi utilizzato). Inoltre vorrei richiamare l'attenzione sul fatto che la molecola di ossigeno non legata si trova in uno stato di tripletto (sperimentalmente e computazionalmente dimostrato), mentre legata con l'eme dovrebbe essere nello stato di singoletto, per rendere l'intera struttura poco reattiva (caratteristica di tutte le molecole biologiche). Ma questo passaggio di stati non è evidenziato su nessuna curva di potenziale, che dovrebbe mostrare un qualche segno di variazione di potenziale quando l'ossigeno si lega o si svincola dal legame con il ferro.

Una volta ottimizzata la posizione degli atomi che costituiscono la molecola, si è passati all'applicazione della vera e propria procedura PMM che può essere sintetizzata nei seguenti passi:

- 1- Calcolo dell'energia e della densità elettronica dello stato fondamentale,
- 2- Calcolo dei dipoli di transizione (o radiativi) per i primi n stati eccitati (nel nostro caso sono stati sufficienti 4) a partire dalla densità elettronica dello stato fondamentale,
- 3- Calcolo della densità elettronica e dei dipoli puri di n-1 stati eccitati, a partire dalle densità elettroniche dello stato fondamentale.

Il primo passo cioè il calcolo dell'energia e della densità elettronica relativa alla geometria ottimizzata della molecola era già stato ultimato con il metodo DFT (Grafico 1).

Il passo successivo nell'analisi della struttura FeP(Im)(O₂) è quello di utilizzare le geometrie ottimizzate come partenza per il calcolo dei dipoli puri e di transizione tramite il metodo CISD (Configuration Interaction con Singles and Doubles). Questo metodo d'interazione configurazionale permette di calcolare la correlazione elettronica delle cariche presenti su ogni atomo e di utilizzare una loro combinazione lineare per il calcolo delle correlazioni di elettroni condivisi tra più atomi per mezzo degli orbitali molecolari.

Nell'implementare la procedura PMM si è voluto ricalcolare l'energia e la densità elettronica dello stato fondamentale, con il metodo HF, per generare dei file d'input che potessero essere facilmente letti dal programma Gamess (che implementa il metodo CISD); infatti tale codice utilizza come matrici di base quelle dell'HF. In realtà con il metodo HF si ottengono risultati meno precisi di quelli ottenuti con il metodo DFT ma è possibile ottenere grandezze che sono necessarie per la procedura PMM (come ad esempio le grandezze relative agli stati eccitati).

Il calcolo iniziale Hartree-Fock costituisce una base per gli altri due. Il file .dat generato contiene i coefficienti della combinazione tra orbitali atomici. Questo viene utilizzato come input per il calcolo della correlazione elettronica. Per le due fasi successive, come già detto è stato utilizzato il metodo CISD disponibile su Gaussian98 e Gamess. Però nel primo pacchetto, tale programma calcola solamente la densità dello stato base e non quella degli stati eccitati, per cui non può ottenere i dipoli puri per gli stati eccitati. Si è scelto di utilizzare per tutti e tre i passi il programma Gamess. Per il calcolo dell'energia e della densità elettronica HF è stata però utilizzata la geometria ottimizzata ricavata con DFT di Gaussian98.

Ottenuti in uscita i dipoli di transizione e quelli puri abbiamo deciso di applicare il metodo PMM cominciando dallo stato di tripletto, considerandolo quello che maggiormente si approssimava alla realtà fisica della molecola. (I calcoli PMM per lo stato di singoletto sono tutt'ora in fase di esecuzione)

Durante il calcolo dei dipoli per lo stato di tripletto siamo riusciti ad ottimizzare 5 punti su 7 di partenza. Il motivo della perdita dei due punti iniziali sarà spiegato in seguito.

Quindi siamo riusciti a preparare i file d'input per le seguenti distanze Fe-O: 1.95, 2.15, 2.35, 2.55 e 2.75 Å. Da notare che la distanza 1.95 rappresenta il minimo trovato per lo stato di tripletto.

Riportiamo qui di seguito i valori di dipolo calcolati per la distanza Fe-O pari a 1.95.

Per ogni dipolo sono espresse le proiezioni sugli assi cartesiani dei dipoli puri e di transizione. Si può notare come nel nostro caso la componente lungo l'asse delle z è quella predominante. Tale asse rappresenta la direzione Fe-O.

Tab. 2
25

		x	y	z
1	1	-1.111025	0.094242	-5.039728
1	2	0.000127	-0.003165	0.000076
1	3	-0.003024	-0.000103	0.000039
1	4	-0.000216	-0.000017	0.000042
1	5	-0.000066	0.000510	-0.000099
2	1	0.000127	-0.003165	0.000076
2	2	-1.073070	0.093870	-5.061200
2	3	0.004736	-0.005186	0.000135
2	4	-0.023017	0.029258	-0.000314
2	5	-0.048692	-0.019486	0.101084
3	1	-0.003024	-0.000103	0.000039
3	2	0.004736	-0.005186	0.000135
3	3	-1.107505	0.079065	-5.000692
3	4	-0.061548	-0.019214	0.045355

3	5	0.007549	-0.047608	0.001883
4	1	-0.000216	-0.000017	0.000042
4	2	-0.023017	0.029258	-0.000314
4	3	-0.061548	-0.019214	0.045355
4	4	-1.118481	0.058494	-5.040275
4	5	0.029100	-0.040917	0.002965
5	1	-0.000066	0.000510	-0.000099
5	2	-0.048692	-0.019486	0.101084

Questi file sono stati elaborati in parte manualmente ed in parte con specifici programmi di elaborazione di matrici al fine di ottenere il file d'input da utilizzare per il calcolo dell'energia potenziale in presenza di un campo elettrico statico esterno. Questo è ciò che ci serve per mettere in atto la procedura PMM.

Per ogni singolo punto sono stati scelti 20 valori differenti di campo elettrico esterno. La direzione di tale campo è stata scelta per ovvi motivi quella di massima interazione con i dipoli della molecola, vale a dire l'asse delle z.

Tab. 3

20

0.000	0.000	-0.005
0.000	0.000	-0.004
0.000	0.000	-0.003
0.000	0.000	-0.002
0.000	0.000	-0.0010
0.000	0.000	-0.0009
0.000	0.000	-0.0007
0.000	0.000	-0.0005
0.000	0.000	-0.0003
0.000	0.000	-0.0001
0.000	0.000	0.0001
0.000	0.000	0.0003
0.000	0.000	0.0005
0.000	0.000	0.0007
0.000	0.000	0.0009
0.000	0.000	0.0010
0.000	0.000	0.002
0.000	0.000	0.003
0.000	0.000	0.004
0.0	0.000	0.005

Il risultato della simulazione di campi esterni è riportato nel grafico sottostante:

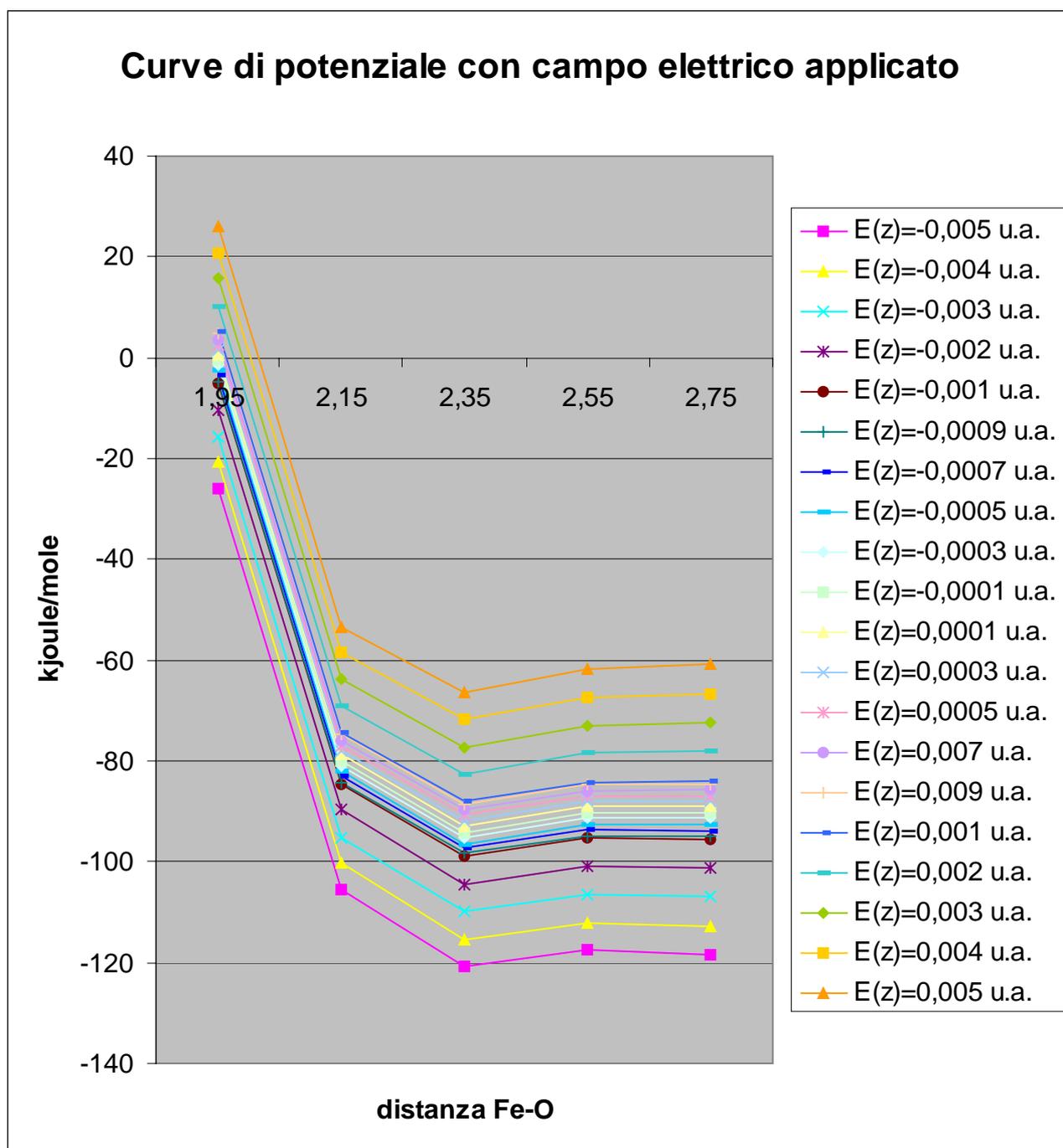


Grafico 2 Curve di potenziale della FeP(Im)(O₂) in presenza di campo elettrico statico non endogeno.

Il campo elettrico è espresso in unità atomiche e varia da $5 \cdot 10^7$ a $25 \cdot 10^8$ V/m in ambedue i versi dell'asse z. Tali unità sono estremamente alte se confrontate con i valori di campo delle radiazioni elettromagnetiche utilizzate per scopi industriali e commerciali. Invece, degli effetti sono visibili per campi dell'ordine di grandezza dei campi biologici locali, come la tensione di membrana e campi enzimatici.

È possibile notare come il metodo HF sposti di quasi 0.40 Å la posizione del minimo della curva di potenziale (il minimo si trova ora a 2.35Å): questo è dovuto alla minore accuratezza del calcolo Hartree-Fock rispetto a quello DFT.

Questo shift del minimo verso distanze maggiori tra l'atomo di ferro e quello di ossigeno spiega anche in parte perchè con il metodo HF non sono giunti a convergenza i primi due punti posti ad

1.55 ed 1.75Å. A tali distanze, infatti l'energia potenziale sarebbe estremamente elevata e quindi un pur minimo spostamento dalla posizione di partenza, durante le fasi di ottimizzazione, comporterebbe grandi variazioni di energia da non permettere la giusta convergenza degli algoritmi utilizzati per l'ottimizzazione.

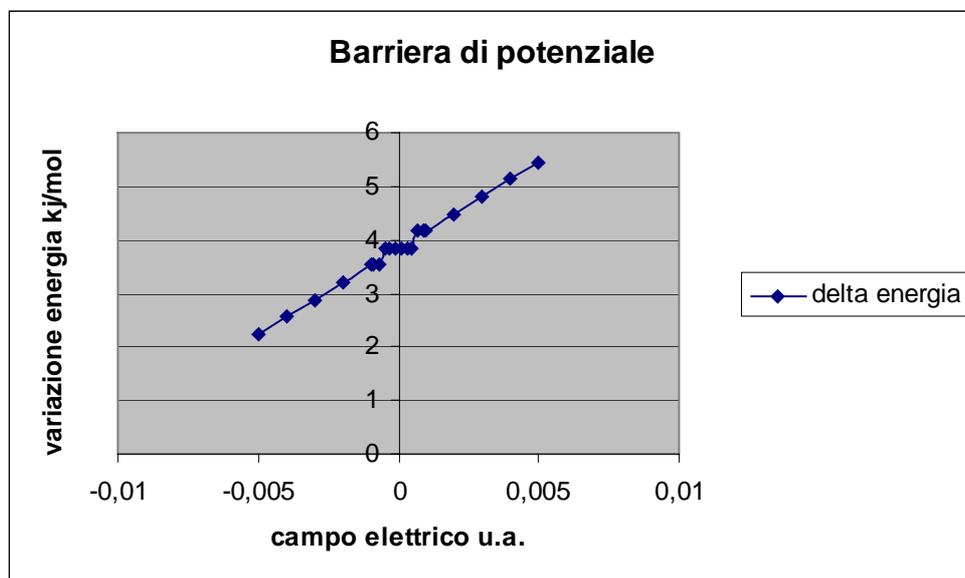


Grafico 3 Variazione energetica della barriera di potenziale dovuta al campo elettrico applicato.

Nel grafico 3 è riportato la variazione della barriera di potenziale al variare del campo elettrico applicato. È possibile vedere come tale barriera aumenta, passando da valori di campo applicato concordi con l'orientazione del momento di dipolo elettrico fino ad arrivare a barriere molto alte per campi applicati discordi con il dipolo. Essendo stata utilizzata una variazione non lineare per l'intensità del campo elettrico applicato [Tab. 3], e considerando i limiti di precisione del calcolo, i valori centrali del grafico devono intendersi come un proseguimento della retta. In definitiva l'andamento della barriera di potenziale cresce linearmente con il campo elettrico applicato.

Questi risultati permettono di fare due considerazioni importanti. La prima riguarda lo spostamento dell'intera curva di potenziale verso valori maggiori o minori di energia in funzione del verso del campo elettrico applicato, tipo di comportamento facilmente prevedibile dalle leggi della fisica. La molecola infatti presenta un momento di dipolo, che come tale deve necessariamente interagire con campi ad esso applicati. La seconda e credo importante considerazione riguarda l'ordine di grandezza dei campi che sono stati utilizzati. Essi sono di molti ordini di grandezza superiori a quelli che comunemente sono presenti nell'ambiente. Quindi, considerando questo tipo di modello molecolare, sono da escludersi completamente effetti particolari su molecole organiche da parte di campi ambientali. A questa considerazione occorre però aggiungere qualche riflessione. Nel modello analizzato non è presente l'intera molecola di emoglobina, ma solamente una sua parte. Perciò, avendo detto che i campi applicati nella simulazione sono dell'ordine di quelli proteici, niente ci vieta di poter escludere a priori che un'analisi dettagliata (presumibilmente con le tecniche di dinamica molecolare) possa rivelare effetti ancora sconosciuti di campi elettromagnetici nel range delle microonde. Inoltre si deve ricordare che nel nostro modello è stato inserito un campo elettrico statico e non un campo elettromagnetico. La ricerca è ancora agli albori in questo nuovo settore della meccanica e dinamica molecolare, ma negli ultimi anni si stanno compiendo molti sforzi per poter riuscire a riprodurre in modo più verosimile possibile la realtà.

Bibliografia

- [1] **C. Rovira, K. Kune, J. Hutter, P. Ballone, M. Parrinello**
Equilibrium Geometries and Electronic Structure of Iron-Porphyrin Complex: A Density Functional Study. J. Phys. Chem. A 1997, **101**, 8914-8925.
- [2] **P. J. Kasper Ulf Ryde**
How O₂ binds to heme: Reasons for rapid binding and spin inversion
JBC Paperrrs in Press. Published on January 29, 2004 The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- [3] **Stefan Franzen**
Sin-dependent mechanism for diatomic ligand binding to heme
PNAS, december 24, 2002 vol.99 no.26 16754-16759.
- [4] **C. Rovira, M. Parrinello**
First-Principles Molecular Dynamics Simulations of Models for the Myoglobin Active Center
International Journal of Quantum Chemistry, Vol. 80, 1172-1180 (2000)
- [5] **J.-D. Maréchal, G. Barea, F. Maseras, A. LLdòs, L. Mouawad, D. Pérahia**
Theoretical Modeling of the Heme Group with a Hybrid QM/MM Method
Journal of Computational Chemistry, Vol.21, No. 4, 282-294 (2000)
- [6] **Lorenzo Dominici**
Studio di siti e meccanismi privilegiati di interazione bioelettromagnetica tramite codici di chimica computazionale
Tesi di dottorato XVI ciclo 2000-2003