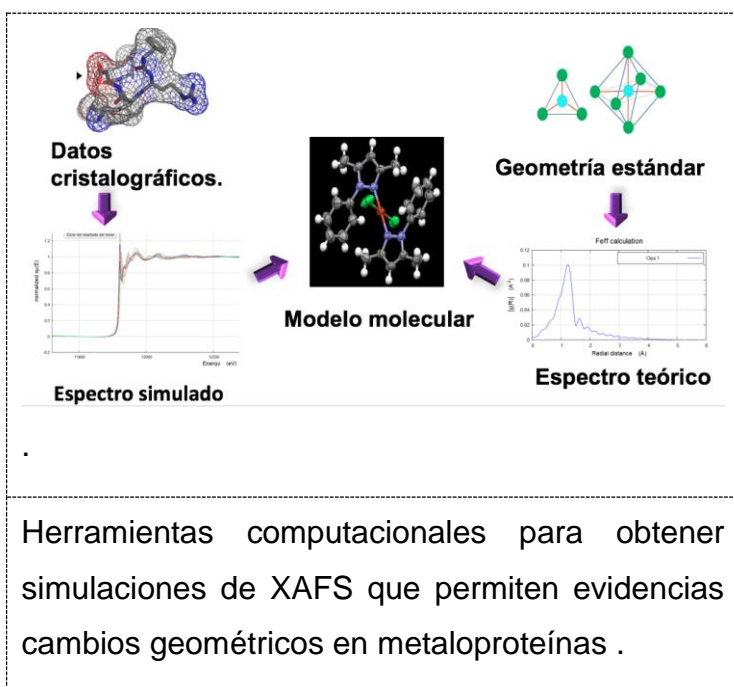


Niveles de Abertura como Estrategia de Enseñanza en la Simulación de Espectros de Absorción de Rayos-X (XAS)

Aplicados a Modelos Biomoleculares.

Aperture Levels as a Teaching Strategy in the Simulation of X-Ray

Absorption Spectra (XAS) Applied to Biomolecular Models.



**Niveles de Abertura como Estrategia de Enseñanza en la
Simulación de Espectros de Absorción de Rayos-X (XAS)
Aplicados a Modelos Biomoleculares.**

***Aperture Levels as a Teaching Strategy in the Simulation of X-Ray
Absorption Spectra (XAS) Applied to Biomolecular Models.***

Laura Liliana More Osorio*

** Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

Dirigido por: Edwin Andrés Malagón Bernal. Químico Ms.C Ph. D

Resumen

Los enfoques computacionales para simular espectros de múltiples técnicas analíticas y evaluar datos experimentales han cobrado importancia en los últimos años en la enseñanza a nivel de pregrado. La dificultad de acceso al uso de los equipos y lo costoso del proceso hacen que su aplicación en programas de tipo pregrado sea restringido. Este manuscrito presenta una estrategia de enseñanza que entrena a los estudiantes en habilidades básicas de obtención de espectros simulados dentro del marco de trabajo se utilizaron los softwares ATOMS, ARTEMIS, ATHENA. Además, los estudiantes pueden simular espectros de absorción de rayos-X (XAS) de varios grupos prostéticos con gran relevancia biológica, piedra angular de la enzimática y un tema clave en muchos cursos de bioquímica en pregrado. Se introducen aquí varios ejemplos de simulación de espectros a partir de información cristalográfica disponible para varios tipos de hemoglobina, vitamina b12, rubredoxina y anhidrasa carbónica. Además se aplicó ejemplo de refinamiento molecular y un aplicativo de XAS para entender procesos

metabólicos bacterianos. esta práctica desarrolla la comprensión en las áreas de química bioinorgánica, espectroscopia, habilidades de codificación y análisis de espectros XAS se obtuvo una guía base aplicativa a estudiantes de pregrado.

Abstract

Computational approaches to simulate spectra of multiple analytical techniques and evaluations of experimental data have gained importance in recent years in teaching at the undergraduate level. This manuscript presents a teaching strategy that trains students in the basic skills of obtaining simulated spectra within the framework of the ATOMS, ARTEMIS, ATHENA software. In addition, students can simulate X-ray absorption spectra (XAS) from various prosthetic groups with high biological relevance, a cornerstone of the enzyme, and a key topic in many undergraduate biochemistry courses. Additionally, students can simulate X-ray absorption spectra (XAS) from various prosthetic groups with high biological relevance, a cornerstone of the enzyme, and a key topic in many undergraduate biochemistry courses. Several examples of spectrum simulation are introduced here from available crystallographic information for various types of hemoglobin, vitamin b12, rubredoxin and carbonic anhydrase. In addition, an example of molecular refinement and an XAS application were applied to understand bacterial metabolic processes. This practice develops understanding in the areas of bioinorganic chemistry, spectroscopy, coding skills, and XAS spectrum analysis. An application-based guide for undergraduate students was obtained.

Keywords: Spectrum simulation, x-ray absorption, metalloproteins, chemical coordination, chemical geometry.

1. Introducción

Los métodos basados en rayos-X son herramientas muy poderosas para el estudio de sistemas biológicos, en particular la difracción y absorción de Rayos-X (1). Sin embargo, presentan importantes problemas en su implementación a nivel de estudios de pregrado, por el difícil acceso a fuentes de radiación de sincrotrón, ya que en regiones como Latinoamérica solamente Brasil cuenta con una fuente de radiación de este tipo (2).

La espectroscopia de difracción es relativamente extendida debido a que es uno de los métodos más usados para conocer estructuras y la geometría de un compuesto químico, aunque en el caso de su aplicación al estudio de biomoléculas existen una serie de limitaciones debido a los tamaños y complejidad de los sistemas (3). Además, es difícil la obtención de monocristales de tamaño y calidad adecuados para proteínas o ácidos nucleicos. Esto sumado a la baja resolución para extraer información sobre el entorno metal-proteína, conforman las razones por las que el número de estructuras macromoleculares resueltas es reducido (4).

Por otra parte, los métodos de absorción de rayos-X (XAS) son relativamente poco conocidos, a pesar de ser muy útiles en la determinación estructural de sistemas sobre todo cuando contienen metales. Los métodos de XAS dan información acerca de distancias de enlace y detalles estructurales en los entornos cercanos al átomo metálico, su gran ventaja radica en el hecho de que las muestras no requieren demasiada preparación (p.ej. no se necesita la cristalización, algo muy difícil en proteínas; tampoco se requiere una purificación de la proteína) y pueden ser estudiados sistemas biológicos muy complejos sin alterar los medios nativos (3).

Los XAS consisten en la irradiación de una muestra con energías mayores a las correspondientes a niveles de energía más cercanos al núcleo de un átomo central (nivel core), la energía con la que será irradiada la muestra es característica al

elemento que la constituyen, siendo diferente para todos los elementos y esto, da la posibilidad de identificar la especie que está absorbiendo la radiación, debido a parámetros atómicos, como la masa y número atómico, la densidad de la muestra y la energía del fotón de rayos-X que incide sobre el átomo (3,5). Cuando el átomo absorbe la energía, es expulsado un electrón de su nivel core y se le designa a esta energía absorbida como borde o edge. A su vez, se genera un coeficiente de absorción que es medido con XAS el cual conforme varía la energía de los fotones de rayos-X incidentes en el material, el coeficiente de absorción presenta variaciones (6,7).

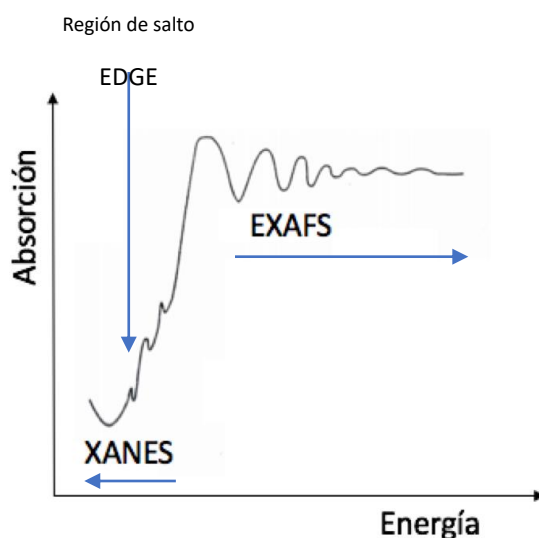


Figura 1. Regiones del espectro XAS, modificado de ref. 3.

La excitación del electrón en el nivel core, genera que éste pase a niveles de alta energía, o incluso al continuo. La relajación se da por el llenado del nivel vacío. Esto se da por el paso de un electrón de un nivel superior, o por la emisión de electrones de Mossbauer. El proceso está acompañado por la emisión de fotoelectrones (3).

La absorción en el edge se relaciona con el estado de oxidación, geometría y naturaleza de los átomos que rodean al átomo que absorbe. Las modulaciones de la región EXAFS se producen por la dispersión "*scattering*" del fotoelectrón eyectado (al continuo) hacia los átomos vecinos (*scatterers*). Además, es posible que se den

fenómenos de retrodispersión de las ondas generadas “*backscattering*”. El análisis de esta región da información de distancias, número y tipo de dichos átomos vecinos (8). El efecto de backscatter genera la modulación de las ondas resultantes, por esta razón se obtiene la información del ambiente que rodea al átomo absorbedor. Esta información se interpreta mediante el uso de métodos como la ecuación estándar EXAFS (9).

Estos métodos, básicamente, analizan las interferencias constructivas o destructivas con la onda del fotoelectrón eyectado. El resultado es una modulación sinusoidal. La amplitud de la señal depende del número y tamaño de los scatterers, y la fase depende de los tipos de scatterers y su distancia. Estas relaciones se expresan en la ecuación EXAFS (11):

$$X(K) = \sum_J S_0^2 \frac{N_j F_j(k) e^{-\frac{2R}{\lambda(k)}} e^{-2K^2 \sigma^2}}{k R_j^2} \sin \sin [2kR_j + \delta_j(k)] \quad (\text{Ec. 1})$$

donde, N_j es el número de átomos vecinos de tipo S, R_j la distancia a los átomos vecinos, $F_j(k)$ da cuenta de la amplitud y $\delta_j(k)$ corrimiento de fase de la onda del fotoelectrón dispersado (factor de Debye-Waller), que refleja propiedades de los átomos vecinos al dispersar el fotoelectrón y σ_j la desviación cuadrática media de la distancia a los vecinos. δ_j es el cambio de fase del átomo scattering. $\lambda(k)$, o recorrido libre medio del fotoelectrón relacionado con el tiempo de vida del fotoelectrón, K es el vector del fotoelectrón (11)(12).

El espectro EXAFS final es la suma de las ondas sinusoidales provocadas por cada interacción entre el átomo que absorbe y la retrodispersión de las ondas, esta es la razón por la que en la terminología de espectroscopia de rayos-X se refiera a los átomos que absorben la radiación y a sus vecinos como Scatterers y Backscatterers, esto último cuando hay un efecto de rebote de la onda entre el átomo central y los vecinos.

Usualmente, los espectros EXAFS se muestran en función de K , en unidades de \AA^{-1} (10). Los datos de absorción se miden en función de la energía (eV). Además, la contribución de cada scatterer puede ser visualizada aplicando el procedimiento de

transformación de Fourier, común en muchos tipos de espectroscopias, por ejemplo en infrarrojo (FT-IR) y en resonancia, donde el espectro obtenido es una función de caída de inducción, y el espectro que se analiza es en realidad una transformación de esta señal (7).

El análisis de los espectros EXAFS requiere de un espectro simulado, y su posterior ajuste (fitting) con los datos experimentalmente obtenidos. Esta es una diferencia con respecto a espectroscopias con las que se tiene más familiaridad, ya que usualmente la interpretación de espectros se hace comparando la posición y forma de señales con datos tabulados. La simulación a su vez necesita de una información acerca de la geometría de los scatterers alrededor del átomo central. Dicha geometría, en términos generales, se refiere a una descripción de las coordenadas espaciales, es decir, de un sistema de coordenadas cartesianas. Esta descripción puede obtenerse a partir de modelos geométricos o desde información cristalográfica (13).

La aplicación más destacada de los métodos de absorción de rayos-X en sistemas biológicos se fundamenta en el estudio de metaloproteínas, debido a que son los metales quienes absorben la radiación en sus niveles de core, facilitando la interpretación y la aplicación experimental de los métodos de rayos-X (7). Dichas proteínas se encargan de una amplia gama de funciones biológicas esenciales de la vida como transporte (hemoglobina), almacenamiento (mioglobina), catálisis (peroxidasas y catalasas); son abundantes en vías bioenergéticas, como la fotosíntesis y respiración (14).

En un extenso estudio de análisis de estructura de absorción de rayos -X (EXAFS) de las peroxidasas, catalasas y globinas, se ha demostrado que la estructura del sitio activo del hemo difiere entre las peroxidasas y las globinas. La histidina proximal, que proporciona el único enlace entre el hemo y el esqueleto de la proteína en la mayoría de las hemoproteínas, está significativamente más cerca del hierro (0,5 Å) en las peroxidasas y catalasas que en las globinas (15). De tal forma, la espectroscopia EXAFS es importante en la elucidación estructural de metaloproteínas.

En patologías como la diabetes mellitus tipo 2 se genera una unión irreversible de la glucosa a algunas proteínas haciéndolas disfuncionales; como es el caso de la glicosilación de la hemoglobina (HbA1c), donde la longitud del enlace Fe – N aumenta aproximadamente 0.02 Å, disminuyendo la afinidad por el oxígeno, además afectar su capacidad para transportar el mismo (16) .

Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se desea demostrar algunos conceptos y métodos que son claves en la introducción de espectroscopia de absorción de rayos-X en cursos de pregrado de Bioquímica y Química Bioinorgánica. Para este fin se utilizan los programas ATOMS ARTEMIS y ATHENA, incluidos en el paquete de DEMETER.

El propósito de este trabajo es desarrollar una estrategia de enseñanza para los estudiantes de pregrado del área de la bioquímica y química bioinorgánica. Implementando los niveles de abertura propuestos por Herron (1971) usados en las prácticas cooperativas de química Sin embargo no se presentan detalles acerca de la técnica experimental, o de los conceptos más avanzados solo algunos intentos de abordar simulaciones de sistemas complejos por parte de los estudiantes. Se describen y se incluyen los procedimientos y resultados típicamente obtenidos en la información de soporte. Los programas usados son posibles de implementar en computadores personales, y ofrecen algunas aplicaciones educativas, que también se incluyen en el presente trabajo. Se ofrece una serie de actividades que cubren desde modelos geométricos sencillos, hasta la interpretación cualitativa comparada con datos experimentales disponibles en referencias bibliográficas.

2. Materiales y Métodos

2.1 Software:

El paquete de programas para EXAFS fue obtenido de <https://bruceravel.github.io/demeter/>. Se trata de una serie de programas que

permiten la generación de espectros simulados (ATOMS), el procesamiento de datos experimentales (ATHENA) y la comparación entre ambos (ARTEMIS). El desarrollador, Bruce Ravel, permite la descarga y uso de los programas en una licencia de creative commons (6).

2.1.1 ATHENA:

Es una interfaz gráfica de usuario que es utilizada para el procesamiento de datos crudos obtenidos en EXAFS. Maneja una amplia gama de funciones que se utilizan para el manejo de datos, depuración de errores, alineación, fusión, remoción de fondo, transformadas de Fourier, entre otros procedimientos experimentales. ATHENA es un programa que se ha desarrollado para ser usado en interface con ARTEMIS, para el tratamiento de datos experimentales obtenidos de fuentes sincrotrónicas (6). En este trabajo se utilizó la base de datos de EXAFS International X-Ray Absorption Society (IXAS) disponible en [:http://ixs.iit.edu/database/](http://ixs.iit.edu/database/).

2.1.2 ARTEMIS:

Es una interfaz gráfica de usuario para ajuste de datos de EXAFS, que usa estándares teóricos que son generados a partir de archivos FEFF. Además, ofrece un modelamiento sofisticado de datos en conjunto para permitir la visualización flexible de los datos y el análisis estadístico. ARTEMIS incluye interfaz con ATOMS y FEFF (6).

2.1.3 ATOMS:

Es un programa que permite generar datos de funcionalidad cristalográfica para quienes realizan espectroscopia de absorción de rayos- X. Su función primaria es generar archivos de entrada para el código teórico de XAFS, el FEFF, a partir de datos cristalográficos. Éste puede producir también otras listas útiles de coordenadas atómicas, hacer cálculos usando tablas de coeficientes de absorción, y algunas otras funciones de interés. ATOMS genera los archivos de entrada FEFF.INP, para materiales cristalinos. El código FEFF produce amplitudes y fases

de dispersión utilizadas en muchos códigos de análisis XAFS modernos, así como otras propiedades estructurales (6).

2.1.4 CHIMERA:

UCSF Chimera es un programa para la visualización interactiva, el análisis de estructuras moleculares y datos relacionados, incluyendo mapas de densidad, trayectorias y alineaciones de secuencias. Además, permite el análisis de información cristalográfica proteica a partir de bases de datos, como Uniprot <https://www.uniprot.org/> mediante el código proteico de Protein Data Bank (PDB) obtenido de <https://www.rcsb.org/>. Chimera utilizado para obtener distancias metal-ligando, a partir de la información cristalográfica disponible en las bases de datos (17).

2.1.5 enCIFER

Este programa está disponible en The Cambridge Crystallographic Data Centre <https://www.ccdc.cam.ac.uk/Community/csd-community/encifer/>. Permite visualizar las estructuras cristalinas usando archivos cristalográficos con extensión Crystallography Information (. CIF).

2.2 Métodos

En este trabajo se implementó una serie de procedimientos para ilustrar tanto el uso de los programas, como la interpretación de resultados simulados y su comparación con datos experimentales. Además, se incluyó un ejemplo del uso de EXAFS en aplicaciones biológicas. Los métodos se describen a continuación:

2.2.1. Uso de ATOMS para simular espectros

La aplicación ATOMS tiene como objetivo generar un modelo de ondas de scattering y backscattering, esta información puede ser visualizada o generarse en un archivo FEFF para comparaciones con espectros reales. En cualquier caso, se requiere de información de partida. Esta información consiste en una matriz donde se describen las posiciones de los átomos que rodean al átomo metálico, que actúa como absorbedor de la radiación.

La descripción no solo se limita a los átomos que rodean al metal (en una primera esfera de coordinación) sino que puede incluir átomos más distantes, o contemplar la totalidad de la estructura molecular. En general, los efectos más importantes sobre las ondas de dispersión se deben a la primera esfera de coordinación. Por lo que la evaluación de los vecinos más cercanos al metal son los que se analizan con mayor detalle en las espectroscopias de absorción de rayos-X .

Los programas de análisis de EXAFS (no solo ATOMS) requieren de las coordenadas, en plano cartesiano, de los átomos vecinos. Dichas coordenadas pueden ser arbitrariamente generadas, pero tienen sentido solamente si están basadas en criterios estructurales, como la coordinación, simetría y distancias usuales para el ion metálico seleccionado para análisis. Otra opción consiste en generar un FEFF (y su visualización) a partir de información cristalográfica.

a) Generación de FEFF desde coordenadas arbitrarias.

Este procedimiento requiere crear un archivo en bloc de notas, como se muestra en la figura 2. (Anexo 1). Donde se da una descripción de los átomos involucrados. Usualmente el átomo absorbedor se ubica en el origen de coordenadas (0, 0, 0), aunque esto no es necesario, se hace por facilidad. En la figura 2 se muestra el sistema de coordenadas para una geometría cuadrado planar, donde el hierro es el átomo central, y está rodeado de cuatro átomos iguales, de azufre, a una distancia equivalente de 2.267Å.

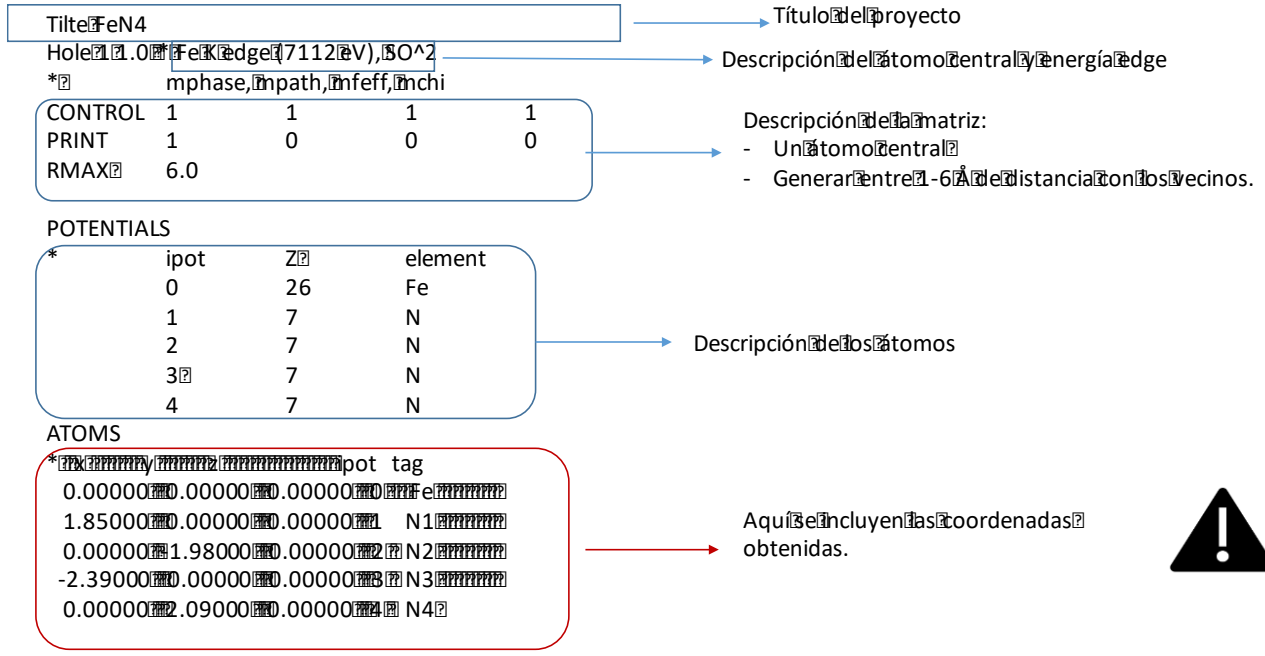


Figura 2. Sistema de coordenadas típico, para crear un FEFF desde distancias y geometrías arbitrarias.

Una vez hecho este procedimiento se debe abrir la aplicación ATOMS, se genera una pantalla de inicio, que se muestra en la figura 3. Allí se selecciona la pestaña FEFF, basta con copiar el texto que se creó en bloc de notas al espacio en blanco del inferior de la aplicación. Posteriormente, se da click en “run FEFF” para obtener las ondas que se generan desde este modelo. El programa permite la visualización en espacio K, en energía, o la transformación de Fourier (que muestra una distribución de distancia radial). Usualmente, se facilita la visualización como espacio K.

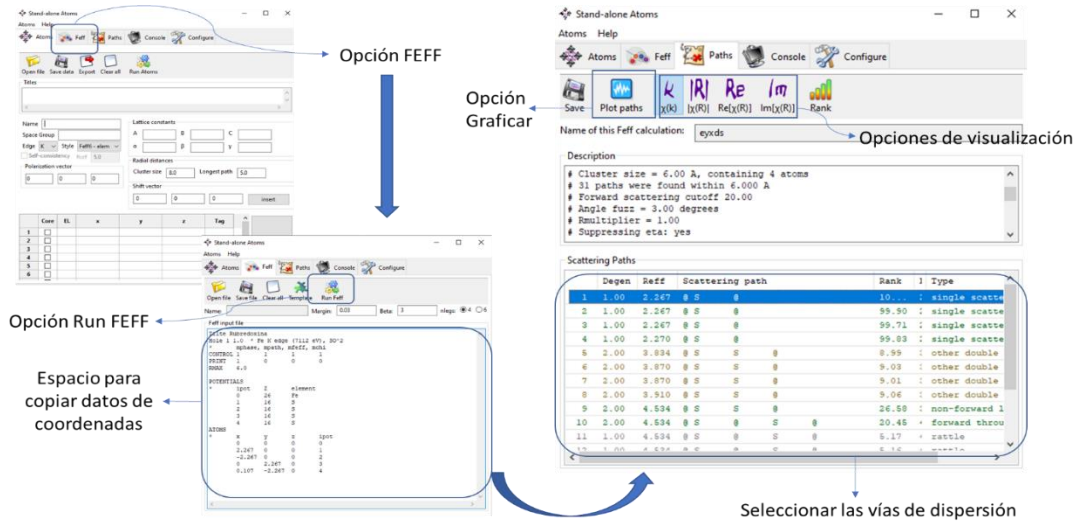


Figura 3. Diagrama de generación de FEFF en ATOMS.

Es importante notar que la gráfica requiere que se seleccionen unas “vías de dispersión” (Scattering Paths), para esto se seleccionan marcando y arrastrando con ctrl+shift del computador. Las vías incluyen dispersión simple (single scattering) o retrodispersión (multiple scattering), que pueden ser lineales o direccionadas (figura 4). Usualmente las vías que generan más contribución a las ondas finales son las simples, una herramienta de utilidad para seleccionar las dispersiones más significativas se ofrece en la pestaña “Rank” de ATOMS, que organiza los resultados de acuerdo a la magnitud de la contribución. Además, puede seleccionarse la representación gráfica de una sola vía, para comparar su forma con las demás vías. Infortunadamente ATOMS no genera la suma de las ondas obtenidas.

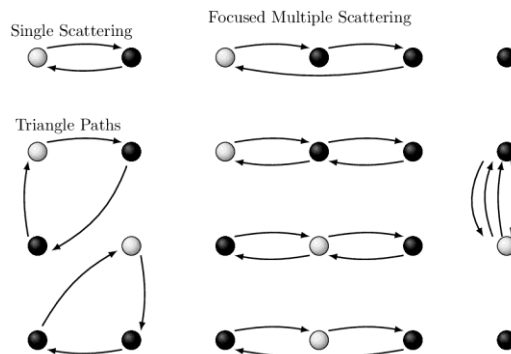


Figura 4. Vías de dispersión de las ondas generadas: Single, Multiple Scattering. Imagen tomada de (18).

b) Generación de FEFF a partir de datos cristalográficos.

Aunque este procedimiento no genera la simulación de ondas generadas por estructuras sencillas, sino por el total de la estructura cristalina del compuesto a analizar, se incluye en esta parte debido a la similitud con los procedimientos descritos previamente.

En este caso el procedimiento es más sencillo, ya que el archivo .CIF contiene los datos completos de descripción de todos los átomos. Solamente hay que abrir el archivo desde ATOMS y ejecutar la opción "run FEFF", esto genera las vías de dispersión para ser graficadas.

Puede ser de utilidad abrir el archivo.CIF en enCIFER para visualizar la molécula. Además, esto permite medir distancias interatómicas. La limitante más importante de ATOMS es su baja capacidad para simular espectros desde moléculas complejas, como proteínas, así que es necesario usar modelos geométricos sencillos. En este trabajo se usó información cristalográfica de una molécula no-biológica (el ferroceno) para ilustrar el uso del software. Anexo 2

2.2.2 Uso de ATHENA para tratamiento de datos experimentales

El programa ATHENA es muy dependiente de la calidad y archivo de origen de los datos experimentales. En términos generales, un espectro EXAFS tal como se obtiene desde las líneas de sincrotrón, consiste en una lista (en archivo de texto) donde aparecen los datos de longitud de onda, energía, fluorescencia, algunos parámetros de normalización de espectro. No necesariamente aparecen todos estos datos, ni en este orden. Esta es una limitante importante para usar los datos obtenidos de bases de datos, ya que se encuentran las listas, pero sin una adecuada descripción del contenido del archivo. Adicionalmente, los archivos no son estandarizados, y algunos simplemente no son compatibles con ATHENA.

En este trabajo, se usó una modificación del espectro disponible para el ferroceno, de la base de datos de IXAS. http://ixs.iit.edu/database/data/Farrel_Lytle_data/RAW/Fe/index.html Además, es compatible con el archivo FEFF creado en ATOMS. El propósito de esta sección, es ilustrar la comparación cualitativa de los espectros, tanto el que se obtiene desde el modelo cristalográfico, como el que se dispone de datos experimentales publicados. El procedimiento detallado, junto con los resultados se indican en anexo 3.

2.2.3 Uso de ARTEMIS para comparación de espectros

El programa ARTEMIS requiere de un proyecto en ATHENA, generado con los datos experimentales. Otro input es ATOMS. La comparación de los espectros se facilita en cuanto a la visualización haciendo la gráfica de este en espacio K. ARTEMIS permite la evaluación para revisar si el modelo coincide con el resultado experimental. Para esto, puede hacerse una comparación de la forma y de los máximos de los espectros. Adicionalmente, se pueden obtener parámetros estadísticos de ajuste (Fitting). Los procedimientos de comparación se fundamentan en interacciones, que finalmente generan cambios en el modelo de partida, lo que implica generar nuevas coordenadas y distancias en ATOMS.

En este sentido, cuanto más se aproxime el modelo a los parámetros de la ecuación estándar EXAFS, el ajuste será más confiable. Cuando el modelo no tiene relación con el espectro experimental el ajuste no guarda relación entre ambos, es necesario modificar el modelo hasta obtener una adecuada correlación. Finalmente, la interpretación del espectro EXAFS da como resultado una estructura que describe la geometría alrededor del átomo central. Estos procedimientos requieren de un manejo muy avanzado de la espectroscopia, por lo que escapan del alcance del presente trabajo. En vez de esto, se muestra el uso de datos ya calibrados (disponibles en bases de datos) para mostrar la aplicación biológica del

metabolismo de oro por parte de la cianobacteria *Plectonema boryanum* UTEX 485.

Anexo 4

Los datos para este procedimiento fueron obtenidos de <http://bruceravel.github.io/XAS-Education/>, se trata de una página con diversas aplicaciones y tutoriales para el manejo de ARTEMIS.

2.2.4 Métodos pedagógicos aplicados a EXAFS

Como parte de los objetivos del presente trabajo, se presenta los *niveles de abertura* como estrategia para la enseñanza de los conceptos relacionados con EXAFS. Dicha estrategia, se sustenta en el constructivismo, puesto que lo que se busca según los planteamientos de Ortiz en 2015 (19), es un intercambio dialéctico entre los conocimientos del docente y los del estudiante para generar un aprendizaje significativo en ciencias. El proceso de esta construcción, estaría mediado por la orientación del docente y por la permanente interacción entre ambos actores.

En este sentido, el trabajo se constituye en una propuesta que complementa la didáctica del docente, ya que refuerza algunos contenidos del curso de fisicoquímica II y desarrolla en los estudiantes, habilidades en el manejo de diversos programas para EXAFS, con la generación de espectros simulados, el procesamiento de datos experimentales y su comparación, lo que sería de gran utilidad, pues se abordarían los temas de forma más aplicada y se potenciarían los procesos cognitivos de bajo orden en los estudiantes, que según lo definido por la Taxonomía de Bloom (1956) corresponderían al conocimiento, comprensión y aplicación, que en otros contextos de aprendizaje pueden conllevar a procesos cognitivos de alto orden o más complejos, como son análisis, síntesis y evaluación.

Tabla 1. Niveles de abertura Herron

Nivel	Nombre	Objetivo	Material	Método	Solución
0	Demostración	dado	dado	dado	dada
1	Ejercicio	dado	dado	dado	abierta
2	Investigación estructurada	dado	dado todo o en parte	dado en parte o abierto	abierta
3	Investigación abierta	dado	abierto	abierto	abierta
4	Proyecto	dado en parte o abierto	abierto	abierto	abierta

De acuerdo con lo anterior, Schwab (1962), Priestley (1997) y Herron (1971), proporcionan las escalas de los niveles de abertura para las actividades prácticas de laboratorio, que en el caso particular de este trabajo se hace una adaptación de la propuesta de Herron, con el uso de 3 niveles de los 4 planteados para el manejo de los programas de simulación para analizar espectros de sustancias de interés biológico. Desde esta perspectiva, el grado de abertura o nivel de descubrimiento en relación con las actividades prácticas, se basa según Casas, Pinzón y Molina en 2013 (20) en la proporción en la que el docente suministra el problema, las maneras y los medios para afrontar dicho problema y su respuesta (21), en esa medida, en el *nivel de abertura 0*, correspondiente a la demostración, se realiza una sesión en la que se da a conocer el objetivo, se abordan algunas teorías específicas (20), luego en el *nivel de abertura 1* (ejercicio), se dan a conocer los métodos, se brindan técnicas específicas en el manejo de los programas y se hacen algunos ejercicios prácticos. En el *nivel de abertura 2* (Trabajo estructurado), se les proporcionan a los estudiantes datos que pueden darse de forma completa o suprimiendo algunas partes de la metodología para que apliquen el método y en últimas en el *nivel de abertura 3* (Trabajo semi-abierto), los estudiantes pueden identificar un problema, lo formulan, escogen el método más apropiado y analizan.

Tabla 2. Propuesta: matriz de niveles de abertura

Nivel	Nombre del nivel	Metodología	Solución	Estilo de la clase	Proceso cognitivo requerido	Resultado de aprendizaje
0	Inicial	Dado	Dada	Expositivo	Conocimiento	-Conocer las teorías de absorción de rayos X -Conocer la química de coordinación.
1	Ejercicio	Dado	Abierta	Expositivo Guiada	Conocimiento Comprensión	-Determinar coordenadas cartesianas de estructuras geométricas sencillas y simularlas en ATOMS. -Generar FEFF desde coordenadas arbitrarias o datos cristalográficos obtenidos de Uniprot.
2	Trabajo estructurado	Dado en parte o abierto	Abierta	Expositiva Participativa	Comprensión Aplicación	- Simular espectros desde datos cristalográficos y comparar con datos EXAFS experimentales.
3	Trabajo semi-abierto	Abierto	Abierta	Expositiva Participativa	Aplicación Análisis	- Usar la información adquirida para la utilización de los softwares y su aplicación en sistemas biológicos. (Análisis de datos EXAFS)

Tabla 3. Diseño metodológico.

Nivel	Nombre del Nivel	Resultados de aprendizaje	Actividad
0	Inicial	-Conocer las teorías de absorción de rayos X -Conocer la química de coordinación.	Generar espectros simulados de estructuras geométricas sencillas en ATOMS como cuadrada-planar tetraédrica y octaédrica.
1	Ejercicio	-Determinar coordenadas cartesianas de estructuras geométricas sencillas y simularlas en ATOMS. -Generar FEFF desde coordenadas arbitrarias o datos cristalográficos obtenidos de Uniprot.	
2	Trabajo estructurado	- Simular espectros desde datos cristalográficos y comparar con datos EXAFS experimentales.	Usar información cristalográfica de metaloproteínas para generar espectros simulados de relevancia biológica. Identificar cambios en información espectroscópica originados por las geometrías de la rubredoxina y malformaciones de metaloproteínas como la glicosilación de la hemoglobina.
3	Trabajo semi-abierta	- Análisis y aplicación información adquirida para la utilización de los softwares y su aplicación en sistemas biológicos.	Usar de información cristalográfica y datos crudos de EXAFs para el procesamiento y análisis de espectros.

Como se observa en la tabla 1, del nivel 0 a 2, se genera procesos cognitivos de bajo orden, cuyo estilo de trabajo es expositivo. Dicho trabajo en el aula se caracteriza porque el docente orienta, da instrucciones o indicaciones de manejo de los programas, los resultados son conocidos con anterioridad y, en ocasiones, también por los estudiantes; y si éste no los conoce, el docente utilizará los resultados obtenidos para compararlos con el resultado esperado (20). Por su parte,

en el nivel 3, se requiere que el estudiante tenga un rol, en el que desarrolla y conduce su propio trabajo, además de formular hipótesis y predecir el resultado (22), por lo que, implica que haga análisis de datos y posteriormente verifique si lo que planteo inicialmente era lo esperado, facilitando de este modo, la relación con los conocimientos previos y la integración de los conocimientos adquiridos con su aplicación, siendo ésta una característica fundamental del aprendizaje significativo (23).

El uso de los niveles de apertura como estrategia de enseñanza, se considera un método útil, ya que la flexibilidad de los niveles, permite que sean aplicados de acuerdo con el ritmo de aprendizaje de cada estudiante, atendiendo a la diversidad y a la complejización gradual del conocimiento, lo que favorece que desarrollen una mejor actitud hacia la investigación científica puesto que permite asociar de una manera más clara los conceptos teóricos con los datos empíricos (24).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Generación en ATOMS de espectros simulados de estructuras geométricas sencillas

Los cationes metálicos casi siempre se encuentran en la naturaleza formando algún tipo de complejo que los estabiliza. Estos metales se encuentran rodeado por cierto número de iones o moléculas neutras distribuidas conforme a una geometría particular (25). Dependiendo del número de coordinación, es decir, el número de enlaces químicos que este puede formar (tabla 2), se presentan diferentes geometrías de los iones complejos. En estructuras proteicas, este arreglo genera los conocidos grupos prostéticos, unidades no peptídicas específicas fuertemente unidas a la cadena polipeptídica, y que son requeridas para la función biológica de algunas proteínas (25) .

Tabla 4. Números de coordinación y sus respectivas geometrías. Modificada de (25)

Numero de coordinación	Geometría
2	Planar
3	Trigonal planar
4	Tetraédrica
	Plana- Cuadrada
5	Bipiramidal trigonal, Piramidal de base cuadrada

La geometría más sencilla que se encuentra con frecuencia en la naturaleza es la plana-cuadrada, como su nombre lo indica se coordinan en forma de cuadrado plano por lo que los átomos están parcialmente equidistantes del átomo central como es el caso del grupo hemo (figura 5A). Donde el hierro forma un complejo de coordinación con la porfirina. Este tipo de geometrías son relativamente fáciles de transferir a un sistema de coordenadas cartesianas ya que al ser plana sus componentes se encuentran sobre sus eje X, Y. Tomando el hierro como origen (0,0,0; figura 5C). Por medio de información cristalográfica (código pdb:3A0G) en la base de datos UniProt analizados por medio de chimera, se pueden obtener las coordenadas para el input de ATOMS (Figura 5B) para obtener el espectro (Figura 5D).

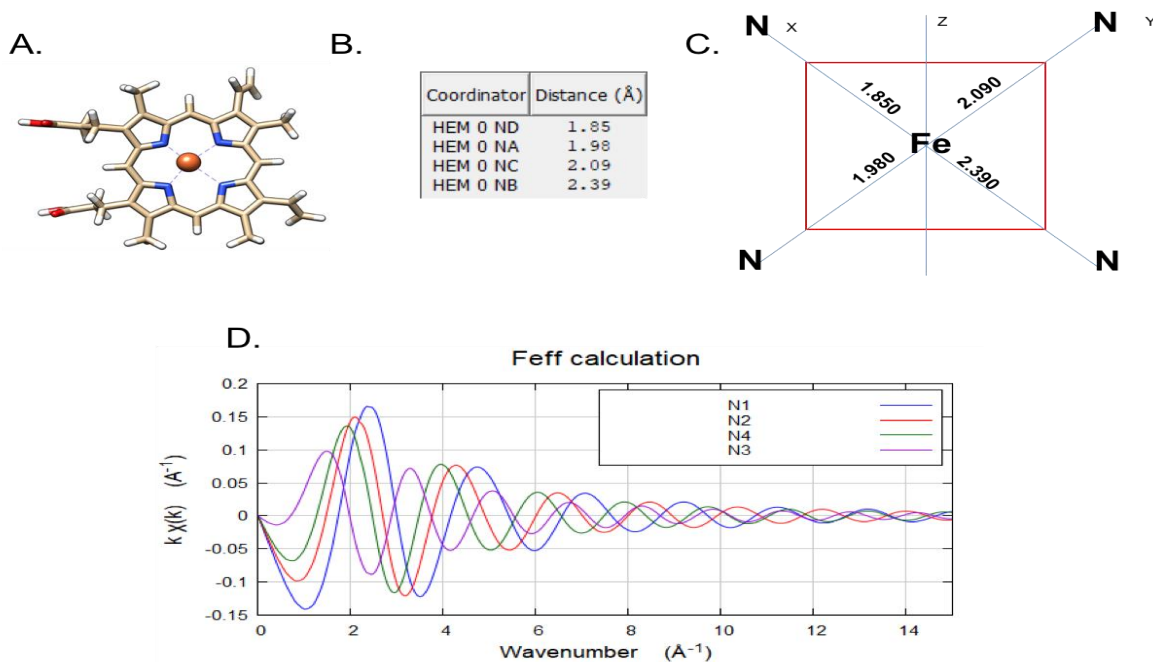


Figura 5. Sistema de coordenadas típicas en una geometría cuadrado planar y espectro obtenido en ATOMS.

La figura 5D muestra la retrodispersión simple Fe-N. Cada una de las ondas obtenidas muestra claramente la asimetría del sistema, es decir, se obtiene una onda principal (línea azul) que corresponde al scattering originado por la interacción con el nitrógeno más cercano al átomo absorbedor (1.85 Å), y la onda más atenuada con el más lejano (2.39 Å), este es el espectro simulado para la coordinación del hierro con el anillo porfirínico. Esto muestra cómo la onda obtenida es muy variable ante cambios de 0.54 Å, o aún menores. Debe compararse esta observación con el espectro generado con un sistema cuadrado planar simétrico (donde todos los átomos de nitrógeno se encuentran a la misma distancia), de 2.0 Å que se muestra en la figura 6, y que corresponde a un sistema teórico.

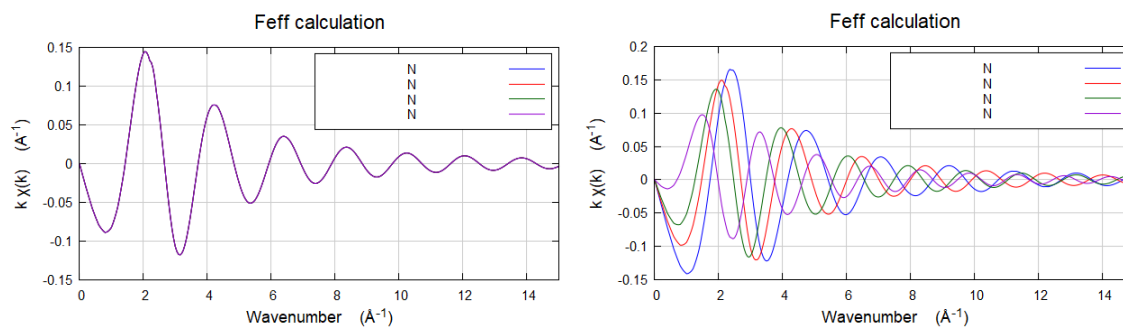


Figura 6. Comparación de estructuras cuadrado planar; izquierda : estructura simétrica; derecha : estructura simétrica.

Otra geometría sencilla, común en los sistemas biológicos, es la tetraédrica. Al igual que la cuadrada-plana está rodeada por 4 átomos, lo que las diferencia es la ubicación de dichos átomos en el espacio. Un ejemplo de esta geometría es la coordinada por el zinc en el centro activo de la anhidrasa carbónica E.C: 4.2.1.1(Figura 7A), donde el zinc coordina tres histidinas y una molécula de agua. Fue la primera enzima de zinc descubierta y la misma cataliza la hidratación reversible del CO₂ (26).

Para plantear esta geometría en un sistema de coordenadas cartesianas (como se muestra en figura 7C), a diferencia del anterior en que uno de los átomos vecinos

no tiene su componente en los vértices, con la información cristalográfica (código pdb:1avn) en la base de datos UniProt analizados por medio de chimera (Figura 7 B) se simulo el espectro posible para esta coordinación (Figura 7D). En este caso se incluye el cálculo de la estructura más simétrica, con las distancias de todos los nitrógenos a 2.11 Å, y conservando la distancia del oxígeno (Figura 7E). Puede verse un ligero desfase de las ondas provocada por el alejamiento de uno de los átomos de nitrógeno en la estructura de la enzima obtenida de PDB.

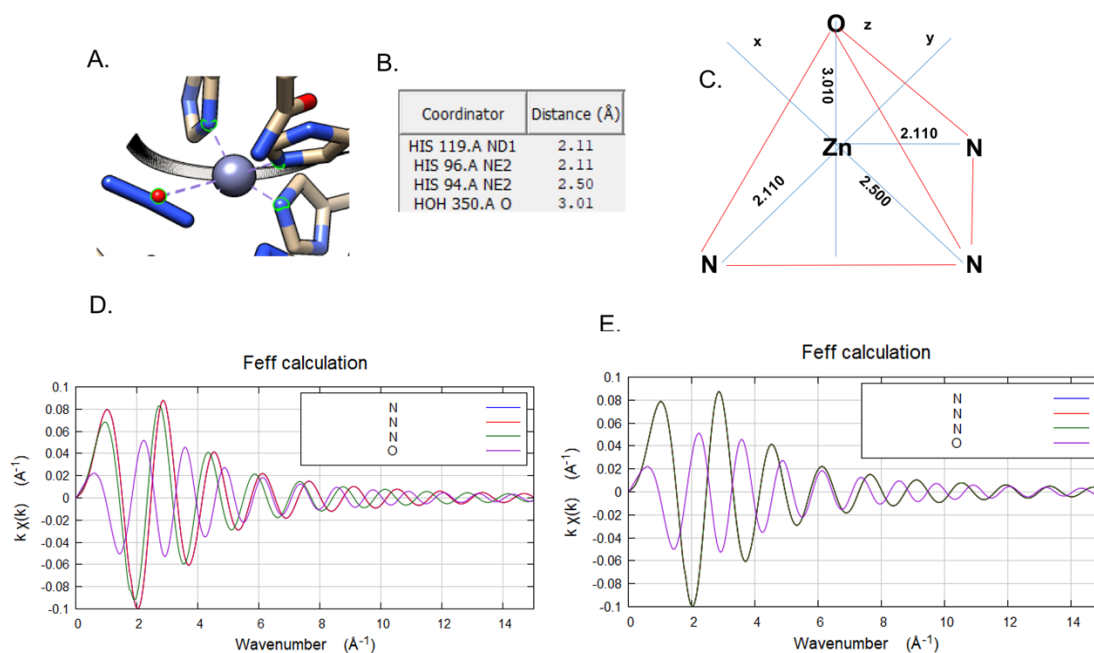


Figura 7. Sistema de coordenadas típicas en una geometría tetraédrica y espectro obtenido en ATOMS.

El reconocimiento de algunos cambios en los espectros de las geometrías sencillas es imprescindible para comprender la importancia de la coordinación debido a que las proteínas contienen grupos prostético prototipo, o análogos estructurales estrechamente relacionados, generando diversidad funcional notable (27). Además, los cambios en la información espectroscópica permite identificar el posible mecanismo de reacción que utilizan las enzimas al catalizar una reacción, o posibles cambios que disminuyen la actividad de dichas enzimas con es el caso de la figura 7E donde se simularon las mismas distancias obtenidas en las

cristalografía, variando su geometría, este cambio generó una disminución en el número de vías de retrodispersión presentes en el espectro, que generará a su vez un cambio en la información espectroscópica brindada. Adicionalmente, es una forma de verificar como evidencian los cambios espectroscópicos la afectación del sitio activo.

3.2 Uso de información cristalográfica de metaloproteínas para generar espectros simulados de relevancia biológica.

a) Caso de estudio: Hemoglobina.

Una de las metaloproteínas más estudiadas por estas técnicas de elucidación de estructuras es la hemoglobina (Hb) (28) . Cuenta con un grupo prostético hemo, su función es la captación y transporte de oxígeno. La hemoglobina es un conjunto de cuatro subunidades proteicas globulares. Cada subunidad está compuesta por una cadena estrechamente asociada a este grupo protésico de naturaleza no proteica.

El grupo hemo de la Hb tiene como meta central el Fe(II) que forma un complejo con el anillo porfirínico mostrado anteriormente (Figura 5A). Además, está enlazado a un cuarto nitrógeno perteneciente a una histidina que fija el grupo prostético a la estructura peptídica. Cuando la hemoglobina capta un átomo de oxígeno se genera un sexto enlace de coordinación con dicho átomo (Figura 7A) generando su característica geometría octaédrica (Figura 7B), correspondiente a la forma oxihemoglobina (HbO). La simulación del espectro de la hemoglobina mediante los datos cristalográficos de la base de datos Uniprot (código pdb:3A0G figura 7A) se muestra en la figura 8.

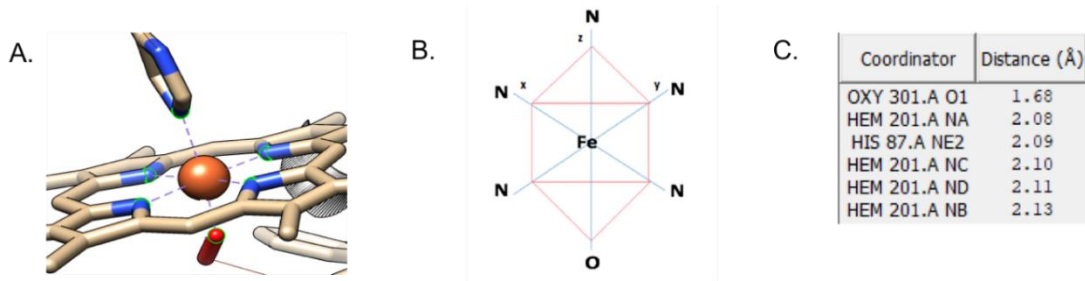


Figura 7. Sistema de coordenadas típicas en una geometría octaédrica correspondiente a la oxihemoglobina.

En la figura 8 se muestra el espectro simulado para la HbO (Figura 8A), Hb (Figura 8B), el espectro EXAFS publicado en literatura (Figura 8C, tomado de referencia (29)) y por último el espectro de Hb donde se muestran algunas vías de retrodispersión múltiple N-N en forma triangular (como se muestra en la figura 4).

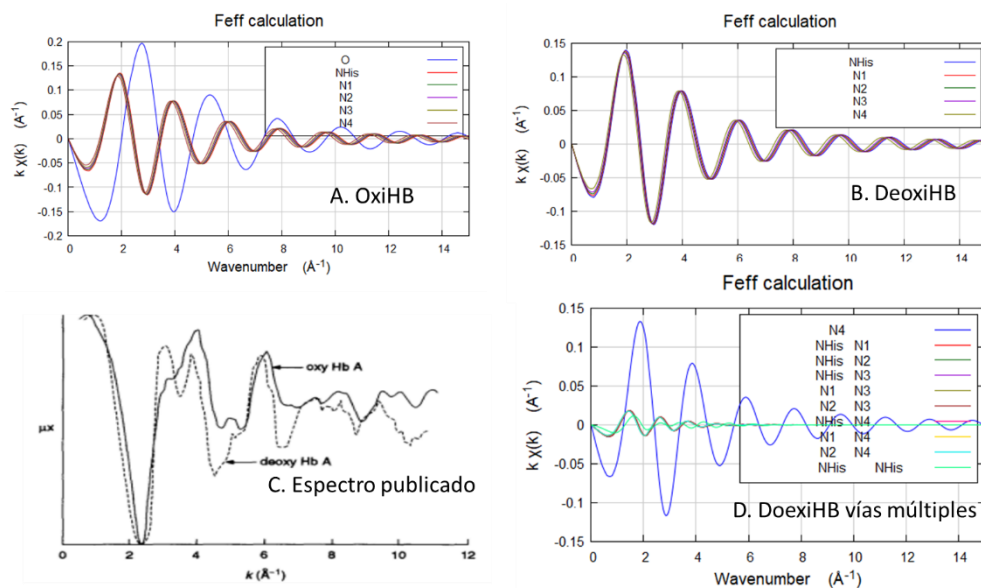


Figura 8. Espectros simulados de Hb, HbO, espectro EXAFS publicado y HbO en vías múltiples de retrodispersión.

Al ser la Hb una de las proteínas cuya estructura es modelo para comprender la coordinación de los metales en los centros activos y funcionales. Se cuenta con información experimental real EXAFS. La cual fue comparada cualitativamente teniendo en cuenta que en la simulación solo se tomaron los átomos que interactúan

con el átomo central en la primera esfera de coordinación. Sin embargo, experimentalmente no son los únicos átomos que intervienen en el espectro, sino que tiene que contemplarse los backscattered ubicados en otras esferas de coordinación. Como se muestra en la figura 8C, el espectro EXAFS final es la suma de las ondas sinusoidales provocadas por cada una de las interacciones entre el átomo que absorbe y la retrodispersión de las ondas de todos los átomos vecinos (13). Adicionalmente, debe considerarse que en los espectros simulados cada uno de los scatterers se muestran individualmente, y no la suma de todas las posibles vías, esta es una limitación de ATOMS.

Es importante reconocer cómo influye el oxígeno enlazado en cada caso, su presencia genera la onda principal del espectro, esta corresponde a la línea azul en la figura 8A, que puede compararse con la línea generada en la figura 8C. La señal a 2.8 \AA^{-1} y 5.8 \AA^{-1} se asignan a la forma HbO, mientras que las ondas de las vías de scattering múltiple son responsables de las oscilaciones pequeñas que se observan en los espectros de Hb y HbO. Debe resaltarse que el análisis de las formas de hemoglobina puede ser estudiada incluso *in vivo*, gracias a las técnicas de EXAFS y constituyen una prueba directa de la geometría de los átomos alrededor del Fe(II). Así, que esto muestra la importancia de los métodos de absorción de rayos-X frente a los métodos de difracción. Por ejemplo, las distancias obtenidas por EXAFS pudieron determinar la distancia exacta entre Fe y el átomo de N de la histidina proximal, y también determinar que el cambio de dicha distancia es de sólo 0.03 \AA entre las formas Hb y HbO, esto es imposible por métodos de cristalografía.

b) Caso de estudio: Vitamina B12.

Las familias de las cobalaminas tienen variadas funciones a nivel biológico. En especial la vitamina B12, esencial para el funcionamiento normal del cerebro, sistema nervioso, para la formación de la sangre y de varias proteínas (29). La hidroxocobalamina es una coenzima que participa en varias funciones metabólicas,

incluido el metabolismo de lípidos, carbohidratos y en la síntesis de proteínas (29). La estructura tiene como átomo central Co(III) que forma un complejo coordinado con un ligando macrocíclico con varios sustituyentes, un resto orgánico complejo, constituido por un grupo fosfato, un azúcar y una base orgánica (dimetilbenzimidazol). Esta última es la que une al átomo metálico a través de uno de sus antígenos, y un sexto ligando hidroxilo, coordinado por una geometría octaédrica (Figura 5A). Planteando esta geometría en un sistema de coordenadas cartesianas como se muestra en figura 5B con ayuda de la información cristalográfica (código pdb: 1req) en la base de datos UniProt analizados por medio de chimera (Figura 5C) se genera la simulación del espectro para esta biomolécula (Figura 5D). Este es otro ejemplo de la coordinación octaédrica en sistemas de relevancia biológica.

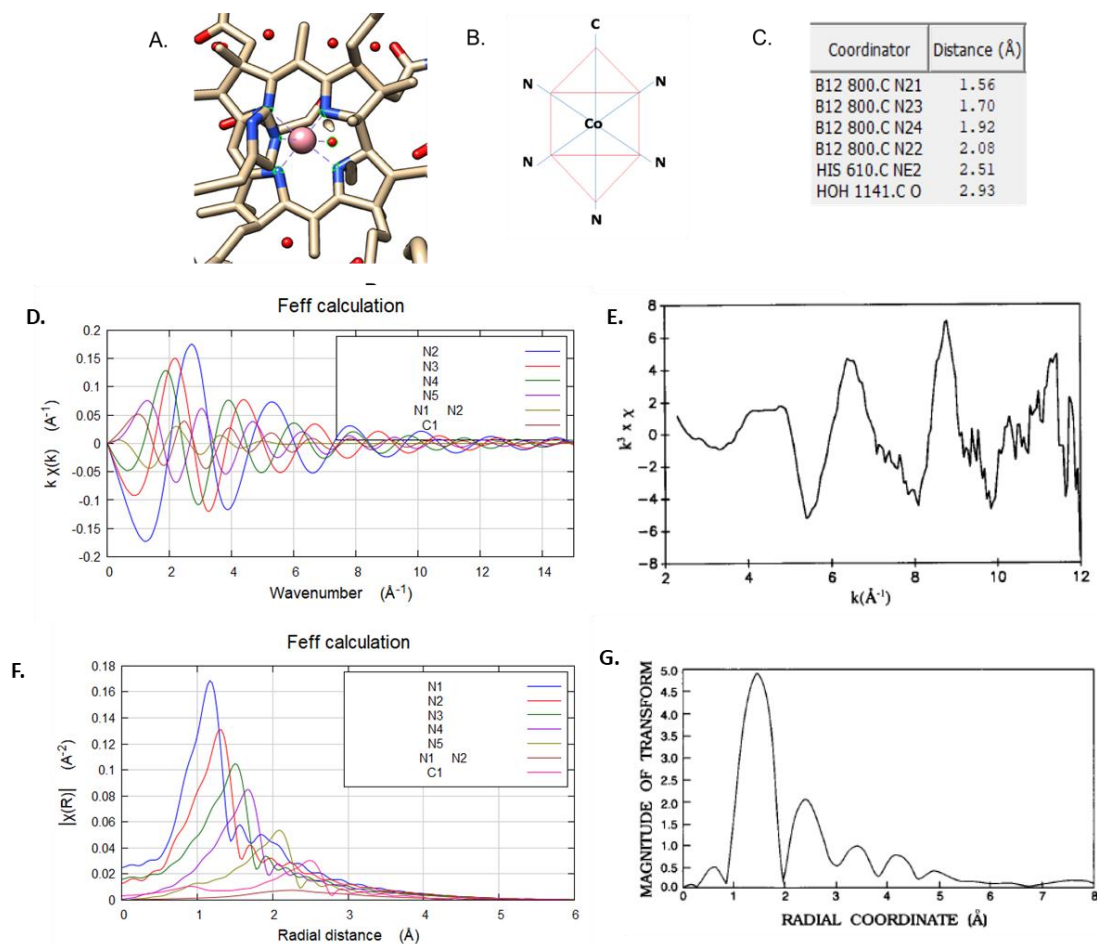


Figura 9. Sistema de coordenadas típicas en una geometría octaédrica correspondiente a la cianocobalamina y espectros simulados junto con los espectros EXAFS publicados. Se

muestran en espacio K y su transformación de Fourier (30).

Los complejos coordinados pueden encontrarse como grupos protésicos unidos fuertemente a las proteínas unidos incluso a través de enlaces covalente como se observó en la hemoglobina y también como cosustratos (coenzimas) necesarias para la catálisis enzimática los cuales se encuentran unidos parcialmente, dependientes de su coordinación al sitio activo de la reacción, como se observó con la vitamina B12. El caso de las cobalaminas muestra que el espectro, que presenta unas ondas complejas, se debe a la distorsión de la geometría, esto puede compararse en la figura 10, donde se muestra la simulación del espectro considerando una geometría muy regular.

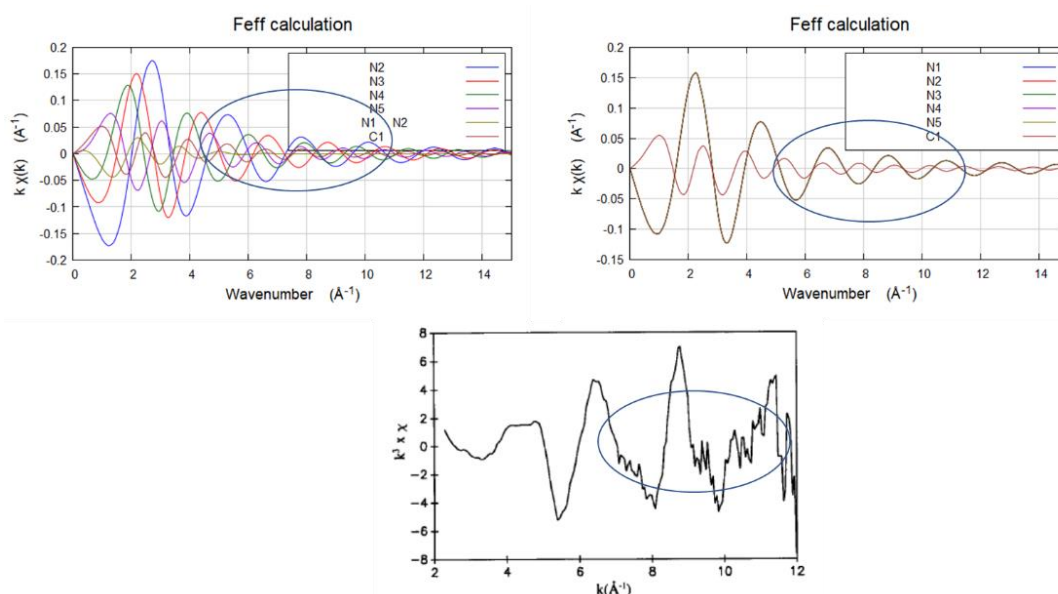


Figura 10. Comparación de los espectros simulados en una geometría distorsionada , regular y el espectro experimental de Cianocobalamina.

En la figura 10 se han marcado en un círculo azul las principales ondas obtenidas en espacio K. Puede notarse que si la estructura es modelada como un octaedro regular, genera menos interferencias, o interferencias en fase, que generan pocas interferencias resultantes. Mientras que una geometría distorsionada describe mejor el resultado experimental (30).

Las cobalaminas son cofactores esenciales en reacciones mediadas por enzimas

transferasas, por ejemplo, en el intercambio de hidrógeno por un grupo funcional como $-NH_2$. El mecanismo de acción involucra el clivaje del enlace Co-C homolíticamente, formando un radical alquilo y un intermediario Co(II) de la vitamina B12. La información acerca del mecanismo se ha obtenido relacionando la energía de activación con la energía requerida para este tipo de ruptura, pero también se ha reportado la ruptura no-homolítica. El mecanismo de las enzimas dependientes de cobalto se estableció como mixto (homolítico y no-homolítico) debido a que la estructura distorsionada de la geometría del cobalto así lo favorece, esto debido al ambiente inusualmente tensionado proporcionado por la proteína que rodea al grupo prostético (30).

3.3 Evidencia de cambios en información espectroscópica originados por las geometrías características y malformaciones de metaloproteínas .

a) Caso de estudio: Rubredoxina

Nuevamente el caso del hierro proporciona ejemplos acerca del uso de espectroscopia de absorción de rayos-X en cambios estructurales de proteínas. Los centros Fe/S son conocidos por su papel en las reacciones de oxidación-reducción como parte del transporte de electrones mitocondrial. Poseen también otras funciones, como es el caso de la catálisis en la aconitasa, como donantes de azufre en la biosíntesis del ácido lipoico y la biotina, y la regulación de la expresión génica (31). Se representa el ejemplo ilustrativo de una de las geometrías de coordinación propuestas de algunos centros de Fe/S (Figura 11).

Las rubratoxinas son una clase de proteínas de bajo peso molecular que contienen hierro y se encuentran en bacterias y arqueas que metabolizan azufre. A veces son clasificadas como proteínas hierro-azufre, sin embargo no contienen azufre inorgánico contienen un solo átomo de hierro, unido a cuatro azufres de tipo orgánico el entorno del hierro es aproximadamente tetraédrico (32).

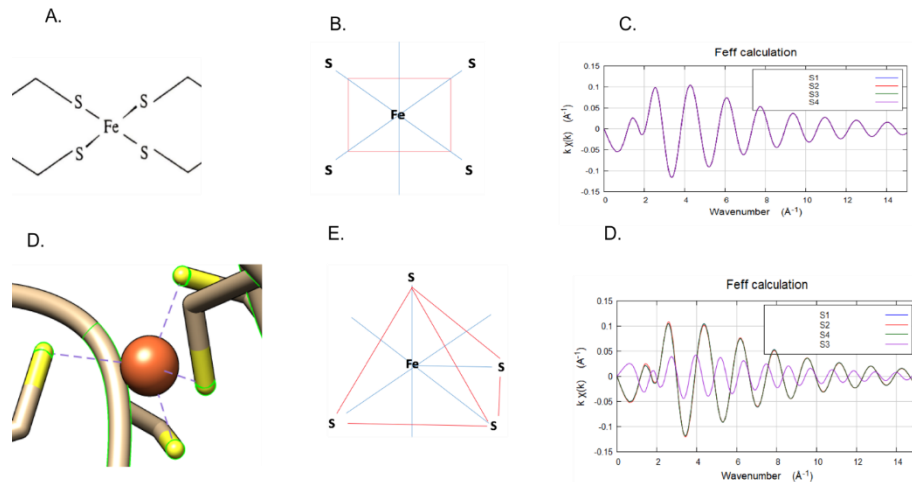


Figura 12. Comparación de los espectros simulados en una geometría cuadrada plana y tetraédrica para rubredoxina

La relación de función / estructura se debe a la coordinación particular de cada sistema, las variaciones en la información de los espectros XAS permite comprender el mecanismo de reacción de las proteínas, en este ejemplo en particular utilizando la distancia teórica promedio de enlace Fe-S 2.267\AA , se planteó el sistema de coordenadas cartesianas representativo para cada geometría: cuadrado planar y tetraédrica. Como resultado, la simulación de cada caso (Figura 12) modelo centro permite observar que, a pesar de que se encuentran participando los mismos átomos, y con una misma distancia de enlace, su geometría es diferente. Esto implica cambios en el número y patrón de las vías de retrodispersión presentes en el espectro, generando un patrón bien diferenciado en cada caso.

b) Caso de estudio: Hemoglobina glicosilada

Las peroxidasa y las globinas cuentan con un grupo protésico hemo, sin embargo este sitio varía en la distancia de unión de la histidina proximal, la cual proporciona el único enlace entre el hemo y el esqueleto proteico. En la glicosilación de la hemoglobina la longitud del enlace Fe – N aumenta aproximadamente 0.02\AA , disminuyendo la afinidad por el oxígeno y un aumento en la acidosis del paciente (16), se observa un cambio importante en la información espectroscópica en comparación con el espectro simulado con los datos cristalográficos de la hemoglobina (Figura 13A) al simular el posible espectro de la forma glicosilada

(HbGly, Figura 13B).

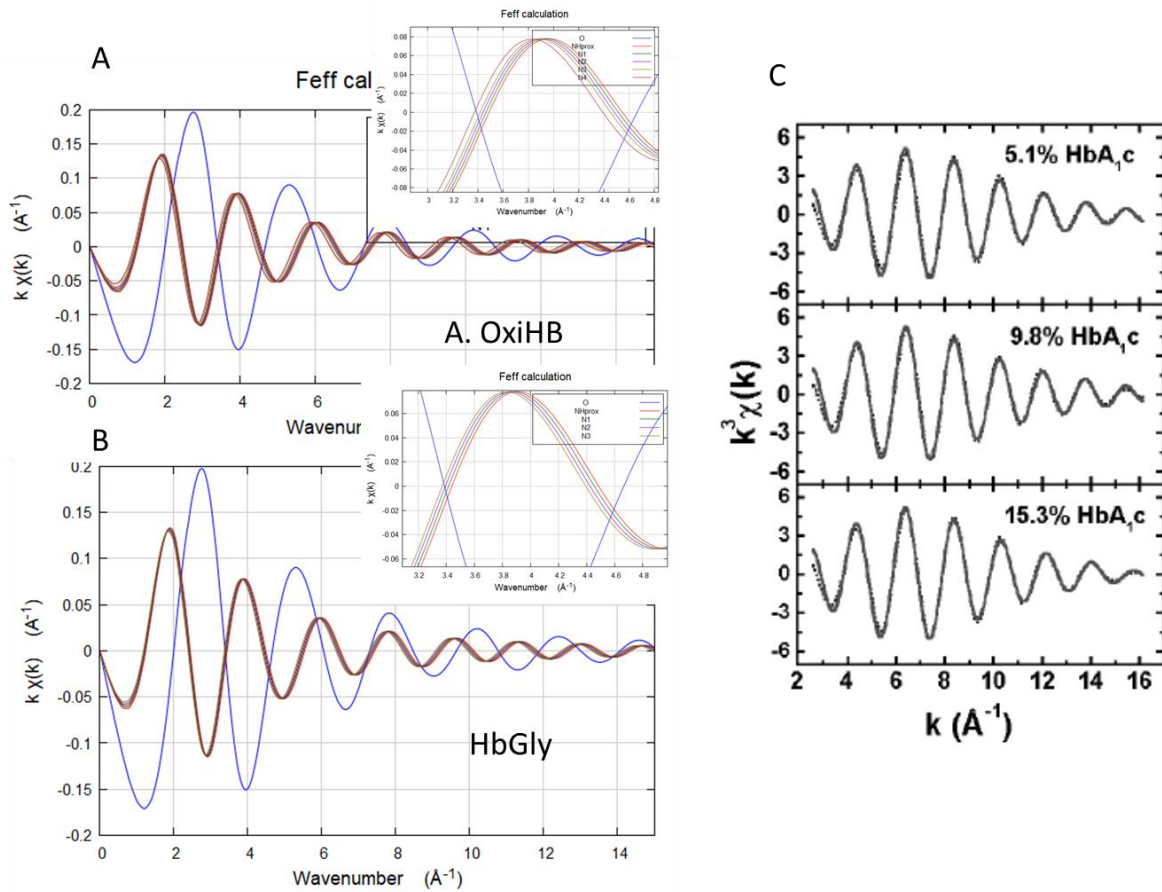


Figura 13. Espectros simulados de OxiHb, HbGly, y comparación con datos reportados en literatura.

Puede notarse tanto en las simulaciones, como en los espectros reportados en literatura, un cambio muy pequeño en la diferencia de amplitud de las ondas de dispersión; siendo un poco más unidas en la forma glicosilada. En la figura 13 aparece un inserto donde se muestra una ampliación del máximo de las crestas que se generan alrededor de 4\AA^{-1} . La presencia de ondas con menor desfase en HbGly tiene sentido al considerar que un alargamiento de las distancias Fe-N implica una disminución de la afinidad de esta proteína por el oxígeno. Aunque es poco notorio, las técnicas de EXAFS son capaces de medir cambios conformacionales como en el caso de HbGly, este aumento en la distancia del enlace Fe-N es suficiente para generar una disfunción en la proteína.

3.4 Uso de información cristalográfica y datos crudos de EXAFs para el procesamiento y análisis de espectros.

a) Ferroceno

Las técnicas de absorción, como se ha mencionado antes, son ideales para el refinamiento de estructuras moleculares. Un caso muy particular es el ferroceno, algunas sales derivadas de este compuesto exhiben actividad anticancerosa, y se ha informado de un fármaco experimental que es una versión ferrocenil del tamoxifeno utilizado como terapia complementaria contra el cáncer de mama (33,34).

El ferroceno muestra una coordinación inusual de Fe(II), a partir del átomo central se coordina a cada lado anillos de ciclopentadieno enfrentados entre sí, a los que se enlaza, formando enlaces equivalentes en distancia. Además, se dispone de información cristalográfica y datos de EXAFS en bases de datos (35). Para el procesamiento de los datos, fue necesario realizar una modificación de los datos como se muestra en el anexo 3. Como se evidencio en los ensayos anteriores, se inicia con la simulación del espectro EXAFS a partir de la información cristalográfica en ATOMS generando el FEFF o espectro teórico. Los datos cristalográficos, procesados en enCIFER generan la estructura mostrada en la figura 14.

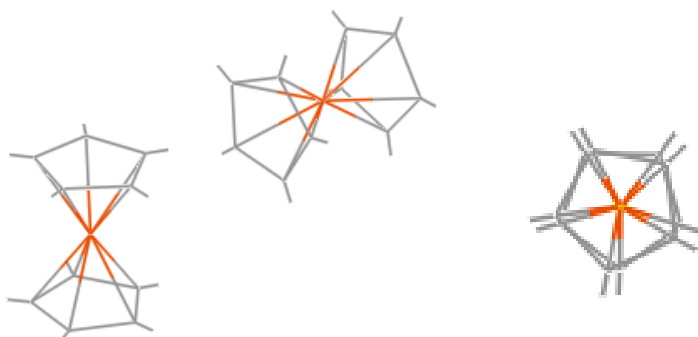


Figura 14. Estructura del ferroceno obtenida a partir de la información cristalográfica vista desde diferentes perspectivas. En color naranja: Fe(II), en gris carbono.

Como se ha descrito previamente, el procedimiento comprende la simulación del espectro en ATOMS. En este caso, la generación del mismo no se hace a través de sistemas de coordenadas, sino directamente desde el archivo. CIF, que contiene las coordenadas y el grupo espacial que corresponde a P2, la cual corresponde a un espacio monoclinico, con una simetría correspondiente al grupo D_{5d} (3). En caso de que esto no se especifique no es posible generar las retrodispersiones, o el programa generará unas coordenadas que no corresponden a la simetría adecuada alrededor del hierro. Luego se ejecutó en ATOMS, generando el FEFF.

Con el fin de mostrar el procedimiento de tratamiento de los datos experimentales, esta sección está orientada al manejo de ATHENA y ARTEMIS, desde un punto de vista de interpretación cualitativa de los resultados. El archivo de datos crudos se edita para que sea compatible con ATHENA, y se usa para obtener el espectro en unidades de energía que se muestra en la figura 15.

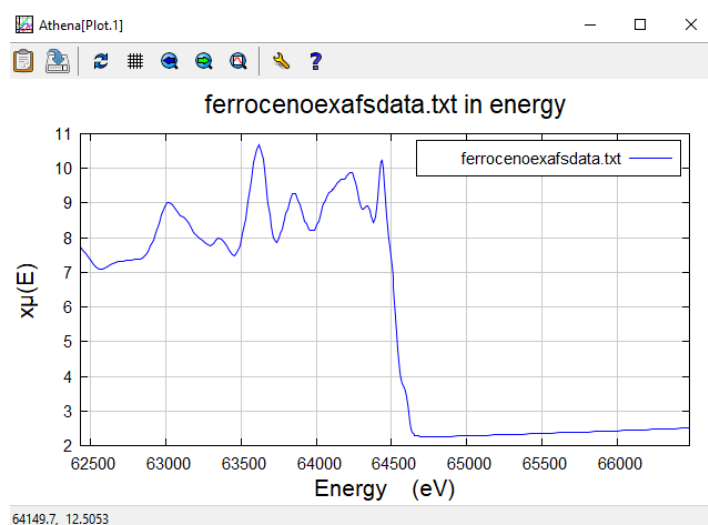


Figura 15. Espectro EXAFS del ferroceno, obtenido en unidades de energía.

El análisis de los datos se procesa en ARTEMIS quien hará una comparación entre los espectros, tratando de disminuir al máximo el porcentaje de error en el resultado estructural. Usualmente, la comparación es en espacio k se efectúa en unidades entre 1-12, para los parámetros de Fourier. En el ejemplo realizado en este trabajo, no se hizo calibración ni una adecuada normalización de los datos, ya que esto

escapa del alcance de la propuesta. Por lo que se espera un porcentaje de error más alto en el resultado de este refinamiento como se muestra en la figura 16.

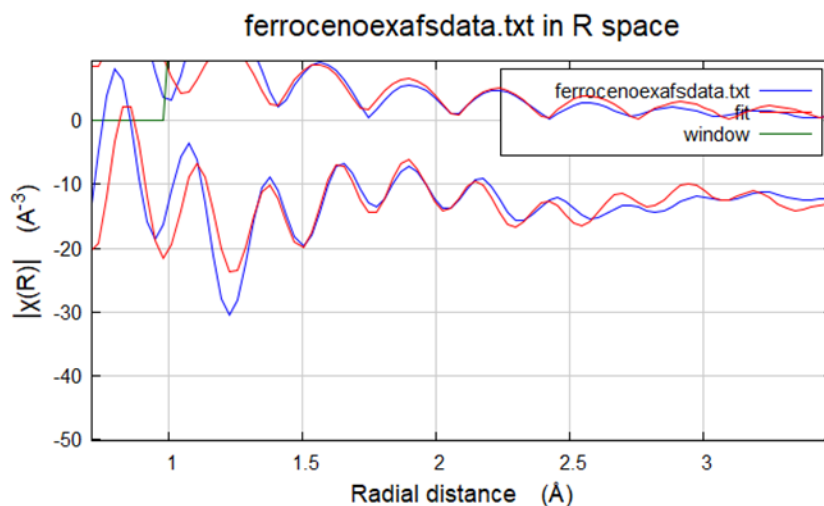


Figura 16. Comparación de los espectros de ferroceno. Azul: datos experimentales, rojo: datos de simulación.

De acuerdo con los resultados obtenidos, puede verse que el ajuste entre los espectros: experimental y simulado, genera unas señales similares en cuanto a las ondas de dispersión generadas "DATOS". Esto implica que hay una buena correlación entre la interpretación es que el modelo cristalográfico describe adecuadamente la estructura del ferroceno obtenida en EXAFS. Desde el punto de vista de la propuesta del presente trabajo, esta comparación fue hecha con el fin de dar robustez a las comparaciones estructurales hechas con modelos biológicos de metaloproteínas, y para ilustrar el uso de ARTEMIS .

b) Ejemplo de aplicación: Bioacumulación de Oro en Cianobacterias.

Estas herramientas de absorción de rayos-X , no solo son útiles para la elucidación de la estructura de los centros metálicos de proteínas. Los mecanismos de bioacumulación de oro por cianobacterias (*Plectonema boryanum* UTEX 485) han sido estudiados por métodos EXAFS (36). Estas cianobacterias usan el cloruro acuoso de oro (III) AuCl_3 PONER COMLEJOS generando la precipitación de

nanopartículas de sulfuro de oro amorfo (I) en las paredes celulares, y finalmente genera oro metálico METODOLOGÍAS .

Las especies intermediarias en el metabolismo de oro por parte de la cianobacteria se encontraron en cultivos, las bacterias fueron alimentadas con AuCl_3 , y se tomaron los espectros EXAFS de muestras del cultivo a diferentes tiempos (hasta 40 horas). Los espectros fueron comparados con muestras de oro en diferentes estados de oxidación (Figura 17): Au metálico, Sulfuro de oro (Au_2S , donde el metal tiene estado +1), y AuCl_3 . En este caso, de acuerdo con la energía de Edge (XANES) y con los análisis de EXAFS, pudo determinarse la cinética de la reducción del oro, así como las especies intermediarias. Estos procedimientos aparecen detallados en referencias (34) ATHENA metodología detallar.

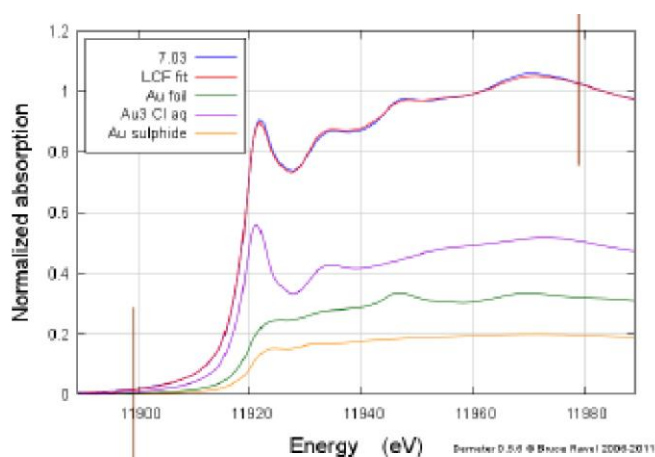


Figura 17. Espectros EXAFS de diferentes especies de oro (17)

En este trabajo se realizó un aporte adicional para la comprobación de los resultados obtenidos por Lenke et al, 2006 mostrados en la siguiente figura 18 en términos de cinética.

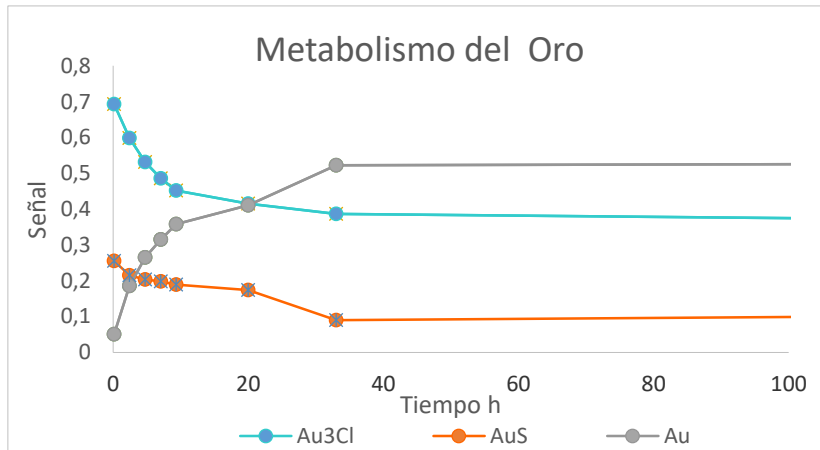


Figura 18. Cinética del metabolismo de oro por *Plectonema boryanum* UTEX 485)

En la figura 18 se observa que a medida que avanza el tiempo disminuye la señal que hace referencia a una disminución en la concentración cloruro de oro (III) inicial, la generación de sulfuro de oro amorfo (I) poco estable para finalizar con un aumento en la señal y por ende aumento en la concentración de oro metálico pasadas aproximadamente 7 horas.

Conclusiones

Con esta propuesta se espera que con los niveles de abertura 0 y 1, el estudiante sea capaz de generar espectros simulados en ATOMS, a partir de coordenadas geométricas arbitrarias o moléculas con importancia biológica que son proporcionadas a través de CHIMERA y enCIFER. Estos visualizadores permiten la generación de coordenadas aptas para el modelamiento y uso del software.

Para el caso del nivel de abertura 2, se espera que el estudiante utilice la información brindada por CHIMERA para aplicarla a sistemas biológicos más complejos. Esto gracias a las teorías aprendidas y aplicadas en el desarrollo de las actividades que pueden ser de gran utilidad a nivel de pregrado.

Por último, en el nivel de abertura 3, el estudiante adquiere habilidades para el manejo de algunas herramientas que brindan el paquete de softwares DEMETER, ya sea en el refinamiento molecular en ARTEMIS o en el análisis y obtención de espectros experimentales EXAFS como es el caso de ATHENA, lo que permite desarrollar uno de los procesos cognitivos de alto orden.

El uso de los niveles de abertura como estrategia de enseñanza, se considera un método útil, ya que la flexibilidad de los niveles, permite que sean aplicados de acuerdo con el ritmo de aprendizaje de cada estudiante, atendiendo a la diversidad y a la complejización gradual del conocimiento, lo que favorece que desarrollen una mejor actitud hacia la actividad científica, puesto que permite asociar de una manera más clara los conceptos teóricos con los datos empíricos

Agradecimientos

Al profesor Edwin Andrés Malagón por su gran apoyo incondicional antes y durante la realización de este proyecto debido a la difícil situación vivida.

Al grupo de investigación ciencias biológicas y químicas y al proyecto FODEIN-USTA 2020 al que contribuí con mi trabajo.

A mis abuelitos, a mis tíos y mi prima por estar y apoyarme cada día durante el proceso

A Dimas Rodríguez que sin ser mi papá me lo ha dado todo.

A mis amigos y colegas quienes apoye y me apoyaron en cada momento y etapa de nuestra carrera.

A la persona más importante de mi vida a mi madre, EDITH OSORIO HIDALGO, desde quiera que estés gracias por tanto... ¡lo logramos!

1. Hendrickson WA. X Rays in Molecular Biophysics. *Phys Today*. 1995;48(11):42–8.
2. Hércules DE. Brasil acoge la edición latinoamericana de hércules. 2020;1–4.
3. Baran EJ. *Química Bioinorgánica*. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.; 1994.
4. Linear S, Synchrotron S. X-Ray Absorption Spectroscopic Studies of the Active Sites of Nickel-and Copper-Containing Metalloproteins. 1993;408.
5. Koningsberger DC, Mojet BL, Van Dorssen GE, Ramaker DE. XAFS spectroscopy; fundamental principles and data analysis. *Top Catal*. 2000;10(3–4):143–55.
6. Ravel B, Newville M. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: Data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J Synchrotron Radiat*. 2005;12(4):537–41.
7. Figueroa A. Espectroscopía de Absorción de Rayos-X, XAFS: Una Técnica Para Análisis Local en Sólidos. 2009;01(1):3–6.
8. Lee E, Bang JY, Park GW, Choi D, Kang JS. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. 2007;3143–53.
9. Avanzados M, María D, Montero E, Diana I, Burciaga C. QUE SE PRESENTA COMO REQUISITO PARA CIENCIA Y TECNOLOGIA AMBIENTAL " Uso de Radiación Sincrotrónica para la caracterización de especies de uranio de diversas fases ". 2010;0–39.
10. Newville M. Fundamentals of XAFS. *Rev Mineral Geochemistry*. 2014;78:33–74.
11. 4_EXAFS II.pdf.
12. Sayers DE, Stern EA, Lytle FW. New technique for investigating noncrystalline structures: Fourier analysis of the extended x-ray-absorption fine structure. *Phys Rev Lett*. 1971;27(18):1204–7.
13. Análisis de estructura fina por absorción de rayos x usando radiación de sincrotrón para $\text{LiNbO}_3 : \text{Zn}$. 2012;15:21–6.
14. Arcovito A, Benfatto M, Cianci M, Hasnain SS, Nienhaus K, Nienhaus GU, et al. X-ray structure analysis of a metalloprotein with enhanced active-site resolution using in situ x-ray absorption near edge structure spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(15):6211–6.
15. Ellis TN, Kuehn MJ. Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74(1):81–94.
16. Wu Z, Benfield RE, Wang Y, Guo L, Tan M, Zhang H, et al. EXAFS study on the local atomic structures around iron in glycosylated haemoglobin. *Phys Med Biol*. 2001;46(3).
17. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25(13):1605–12.
18. Steefel CI. Reactive Transport at the Crossroads. *Rev Mineral Geochemistry*. 2019;

19. Granja DO. El constructivismo como teoría y método de enseñanza. *Sophia*. 2015;(19):93–110.
20. Valverde GJ, Jiménez RL, Viza AL. La atención a la diversidad en las prácticas de laboratorio de química: los niveles de abertura. *Enseñanza las ciencias Rev Investig y Exp didácticas*. 2006;24(1):59–70.
21. Casas JA, Pinzón DC, Molina MF. Determinación de cobre y zinc en muestras falseadas de latón. Niveles de abertura como propuesta de enseñanza de la técnica de titulación complexométrica. *Rev Eureka sobre Enseñanza y Divulg las Ciencias*. 2013;10(3):445–57.
22. Tamir P. How are the laboratories used? *J Res Sci Teach*. 1977;14(4):311–6.
23. Novak JD, Gowin DB, Otero J. *Aprendiendo a aprender*. Martínez roca Barcelona; 1988.
24. Pickering M. Lab is a puzzle, not an illustration. *J Chem Educ*. 1985;62(10):874.
25. Basolo F, Busch RH, Johnson RC. *Química de los compuestos de coordinación*. 1980;176.
26. Monroy LE, Vargas MPS. Anhidrasa carbónica, nuevas perspectivas. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir*. 2010;69(4):200–9.
27. Browne WR. Resonance raman spectroscopy and its application in bioinorganic chemistry. *Practical Approaches to Biological Inorganic Chemistry*. BV; 2019. 275–324 p.
28. Pin S, Alpert B, Congiu-castellano A, Longa S Della. [14] *By*. 1994;232:266–92.
29. CARRANZA RR. *VADEMÉCUM ACADÉMICO DE MEDICAMENTOS 6ª EDICIÓN*. 6ª EDICIÓN MCGRAW HILL. 2015.
30. Wirt MD, Sagi I, Chance MR. Formation of a square-planar Co (I) B12 intermediate Implications for enzyme catalysis Sample preparation. *Biophys J*. 1992;63(2):412–7.
31. Rosenthal JA, Chen L, Baker JL, Putnam D, DeLisa MP. Pathogen-like particles: Biomimetic vaccine carriers engineered at the nanoscale. *Curr Opin Biotechnol*. 2014;28:51–8.
32. Merino M, Ahedo E. Simulation of plasma flows in divergent magnetic nozzles. *IEEE Trans Plasma Sci*. 2011;39(11 PART 1):2938–9.
33. Top S, Vessières A, Leclercq G, Quivy J, Tang J, Vaissermann J, et al. Synthesis, Biochemical Properties and Molecular Modelling Studies of Organometallic Specific Estrogen Receptor Modulators (SERMs), the Ferrocifens and Hydroxyferrocifens: Evidence for an Antiproliferative Effect of Hydroxyferrocifens on both Hormone-Depen. *Chem - A Eur J*. 2003;9(21):5223–36.
34. Koch W, Holthausen MC. *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*. A Chemist's Guide to Density Functional Theory. 2001.
35. Seiler P, Dunitz JD. The structure of triclinic ferrocene at 101, 123 and 148 K. *Acta Crystallogr Sect B Struct Crystallogr Cryst Chem*. 1979;35(9):2020–32.
36. Lengke MF, Ravel B, Fleet ME, Wanger G, Gordon RA, Southam G. Mechanisms of

gold bioaccumulation by filamentous cyanobacteria from gold(III)-chloride complex. Environ Sci Technol. 2006;40(20):6304–9.

Anexos

1. Calculo FEFF

Para calcular el FEFF es necesario generar un block de notas con el código el cual es sujeto a modificaciones según el sistema que se quiera plantear (Fig. 13):

```
TITLE FeN4 10K,a=3.885,c=4.139

HOLE      1  1.0  * FYI: (Ti K edge @ 4966 eV, second number is S0^2)
*          mphase,mpath,mfeff,mchi
CONTROL   1    1    1    1
PRINT     1    0    0    0

RMAX      4.2
*NLEG     4

POTENTIALS
* ipot  Z      tag
  0     26     Fe
  1     7      N1
  2     7      N2
  3     7      N3
  4     7      N4

ATOMS                      * this list contains 94 atoms
*  x          y          z      ipot tag      distance
  0.00000    0.00000    0.00000  0  Fe      0.00000
  1.85000    0.00000    0.00000  1  N1      1.85000
  0.00000   -1.98000    0.00000  2  N2      1.98000
 -2.39000    0.00000    0.00000  3  N3      2.39000
  0.00000    2.09000    0.00000  4  N4      2.09000
```

Fig 13. Código para el cálculo de FEFF

Este código debe ser ingresado copiando y pegando el código en el interfaz de ATOMS en la pantalla que dice Feff, seguido de esto se debe dar clic en la opción run feff para empezar la simulación de los espectros XAS en diferentes espacios, para este estudio se tomó solo espectro en espacio-k.

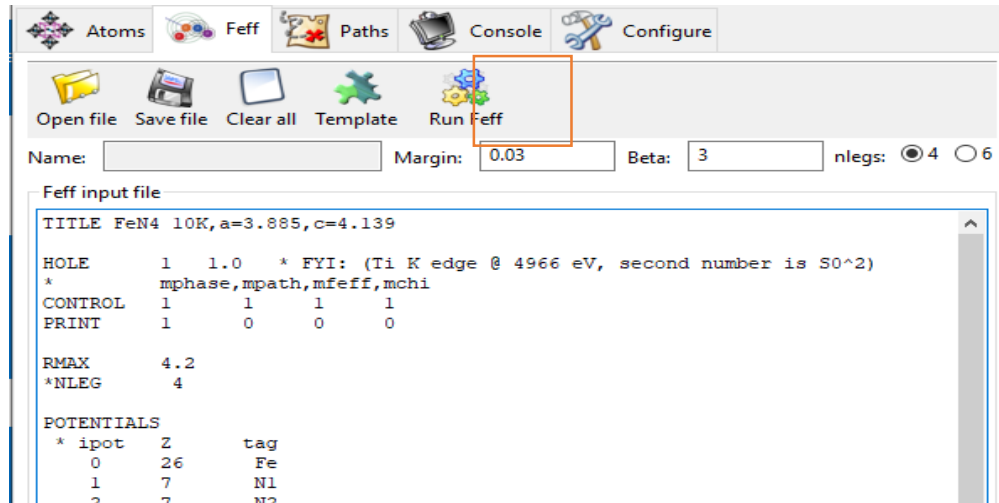


Fig 14. Procesamiento del Código para el cálculo de FEFF

Seleccionar los átomos de interés elegir el espacio que se quiere graficar y se da clic en plot paths como se muestra en la fig. 15.

Atoms Feff Paths Console Configure

Save Plot paths $\chi(k)$ $|\chi(R)|$ $\text{Re}[\chi(R)]$ $\text{Im}[\chi(R)]$ Rank

Name of this Feff calculation: vlmji

Description

```
# TITLE FeN4 10K a 3.885 c 4.139
# This paths.dat file was written by Demeter 0.9.26
# The central atom is denoted by this token: @
# Cluster size = 4.20 Å, containing 4 atoms
# 15 paths were found within 4.200 Å
# Forward scattering cutoff 20.00
```

Scattering Paths

	Degen	Reff	Scattering path	Rank	l	Type
1	1.00	1.850	@ N1 @	10...		single scatte
2	1.00	1.980	@ N2 @	85.81		single scatte
3	1.00	2.090	@ N4 @	75.99		single scatte
4	1.00	2.390	@ N3 @	55.23		single scatte

Fig 15. Como generar el espectro simulado en ATOMS

Obtener el siguiente espectro (Fig. 16):

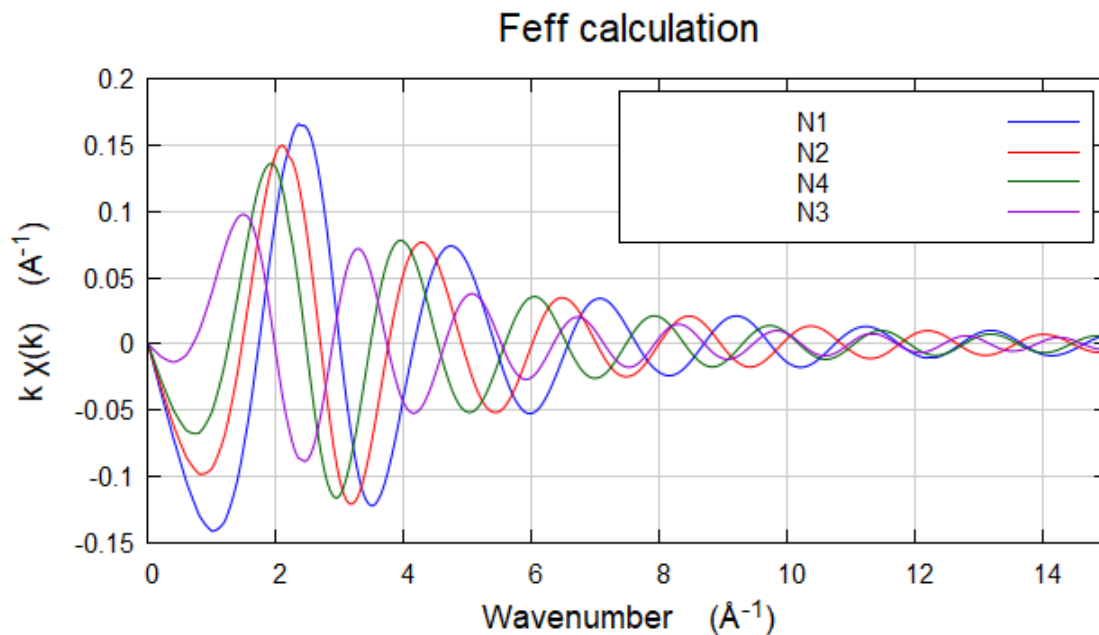


Fig 16. Ejemplo de un espectro simulado en ATOMS.

2. Datos EXAFS MODIFICADOS

Descargar el archivo de la base de datos <http://ixs.iit.edu/database/> del ferroceno y empezar a traba.

3. Refinamiento estructural

Crear un documento.txt en un block de notas y para generar el espectro de los resultados experimentales, luego importar estos datos a la interfaz de ATHENA.

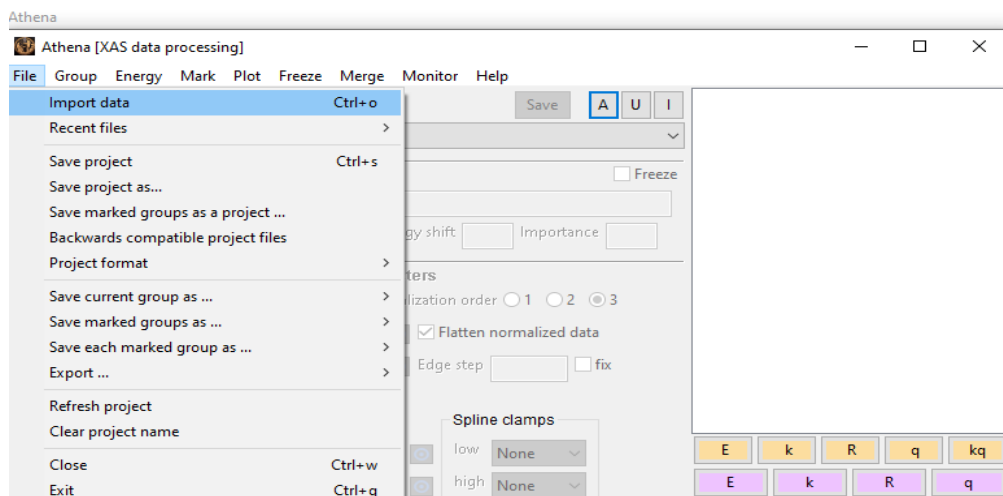


Fig 16. Procedimiento de importación de datos experimentales a ATHENA.

La lista de datos se refiere a datos de energía (que aparecen en la columna 1 de dicha lista), y se requiere hacer una normalización de los datos listados en la tabla en las columnas 2 y 3. Esto se muestra en la fig. 17. Puede notarse que los demás campos se mantienen en la opción predeterminada. Hecho esto se genera automáticamente el espectro en unidades de energía, que se muestra en la fig. 18.

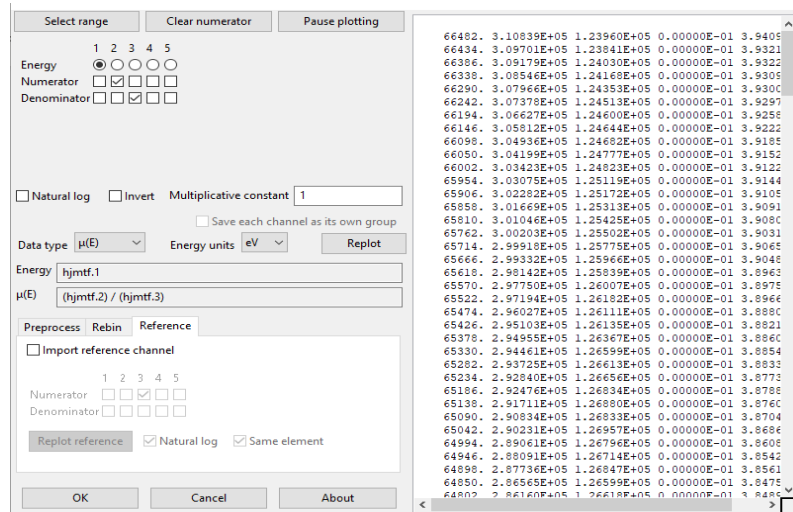


Fig 17. Tratamiento de los datos crudos obtenidos de bases de datos para ferroceno.

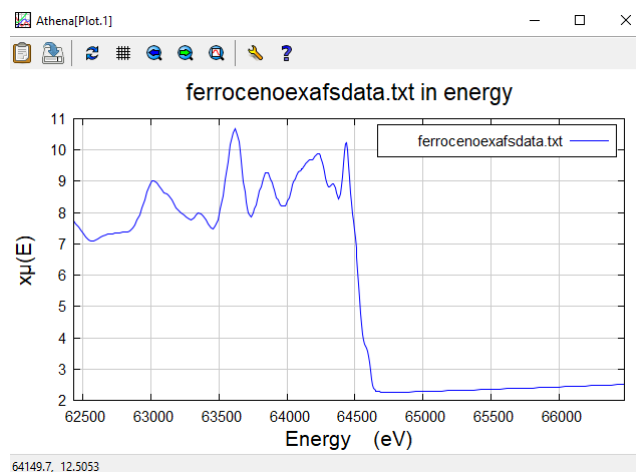


Fig 18. Espectro EXAFS del ferroceno, obtenido en unidades de energía

Finalmente, sólo es necesario volver al diálogo inicial del programa, teniendo cuidado de seleccionar los parámetros para el átomo de hierro, y el valor de energía de salto (que puede ser consultado en la aplicación HEPHAESTUS, incluida en ARTEMIS. Esto es: número atómico 26 y valor del salto desde el nivel K 7112 (Fig. 19)

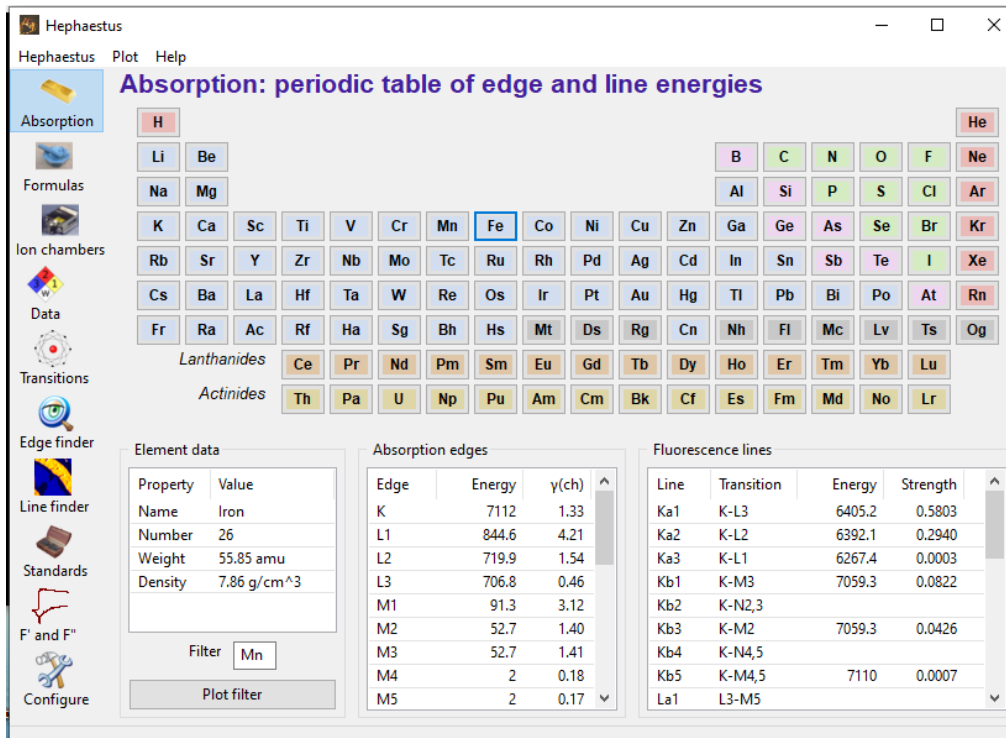


Fig 19. Datos experimentales para el análisis del espectro de Fe. Obtenidos con Hephaestus.

El espectro así obtenido debe guardarse como proyecto de ATHENA, para luego ser comparado con el espectro simulado

Generación del espectro simulado.

En aquellos casos en donde se desea hacer una comparación con el espectro experimental, es más conveniente procesar ATHOMS directamente desde ARTEMIS , ya que en última instancia las simulaciones adquieren sentido a través de esta comparación.

En el ambiente de ARTEMIS aparece una barra de importación de datos, una para datos experimentales y otra para generar simulación (Fig. 18). La parte izquierda se usa para adicionar (Add) el proyecto que ha sido creado en ATHENA. La parte derecha para generar el FEFF.

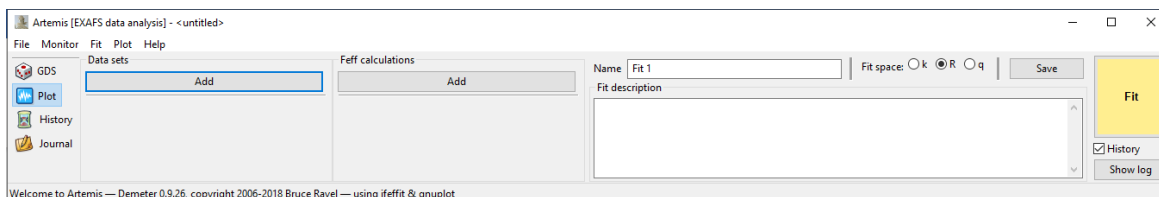


Fig 18. Pantalla de inicio de ARTEMIS .

Seleccionar “Add” para introducir el proyecto de ATHENA, y seleccionar el archivo donde se guardó este archivo. Esto genera un diálogo de representación gráfica de los datos, una mejor comparación puede ser observada a partir de la opción “espacio R”, como se muestra en la figura 19.

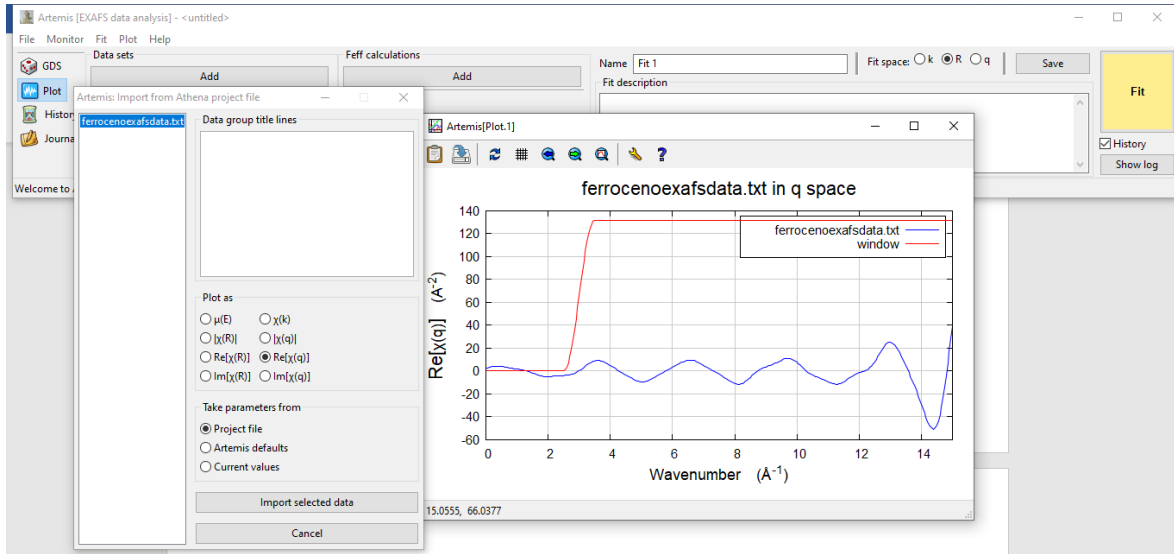


Fig 19. Generación del espectro experimental en ARTEMIS .

Posteriormente, se debe hacer clic en la opción “import selected data”. Que abre el siguiente paso (Fig 20). Este consiste en la creación del archivo FEFF que contiene las ondas de retrodispersión. Esto puede hacerse seleccionando “Add” en la opción “FEFF calculations”, o también desde la ventana de diálogo abierta en la opción “Import cristal data or a FEFF input file”. En cualquier caso, el programa solicita el archivo CIF (que contiene la información cristalográfica, el cual ya ha sido descargado de bases de datos).

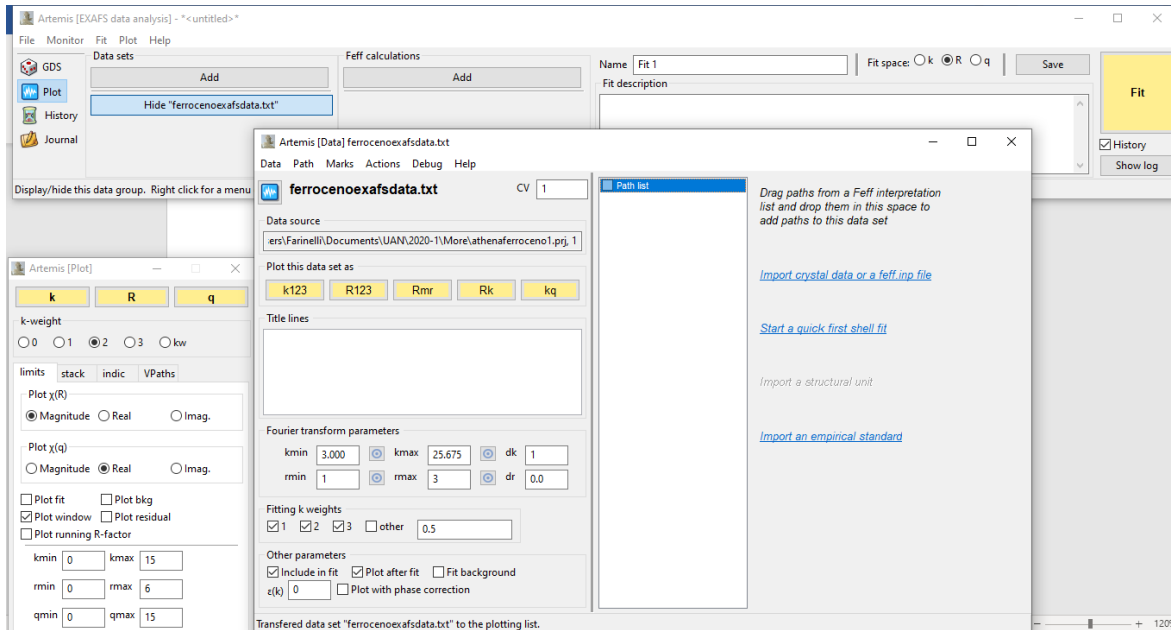


Fig 20. Diálogo para adicionar los datos FEFF desde los datos cristalográficos.

La ventana consiste en una vista de ATOMS, en la que ya aparece la información de las coordenadas. Esto se muestra en la fig. 21. Nótese que ya aparece automáticamente seleccionado el hierro como átomo central, indistintamente de que se sitúe en el origen de coordenadas. Es importante incluir el grupo espacial (Space Group) que corresponde a la descripción de la simetría del ferroceno, que es P2, la cual corresponde a un espacio monoclinico, con una simetría correspondiente al grupo D_{5d} . En caso de que esto no se especifique no es posible generar las retrodispersiones, o el programa generará unas que no corresponden a la simetría adecuada alrededor del hierro. Luego se corre ATOMS y se genera el FEFF.

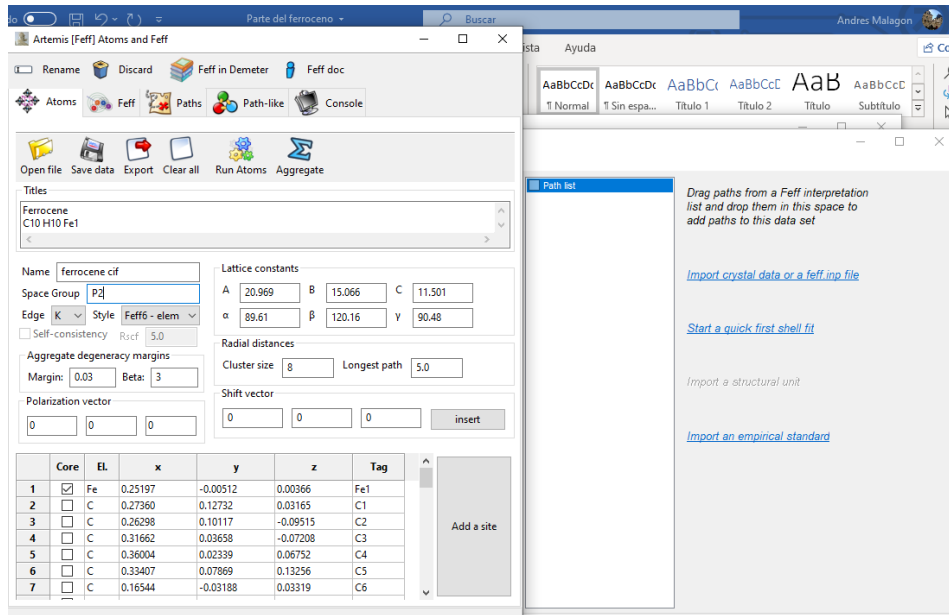


Fig 21. Archivo ATOMS obtenido desde datos cristalográficos.

La excepcional simetría del ferroceno solo genera tres vías de retrodispersión. Se muestran en la figura 22.

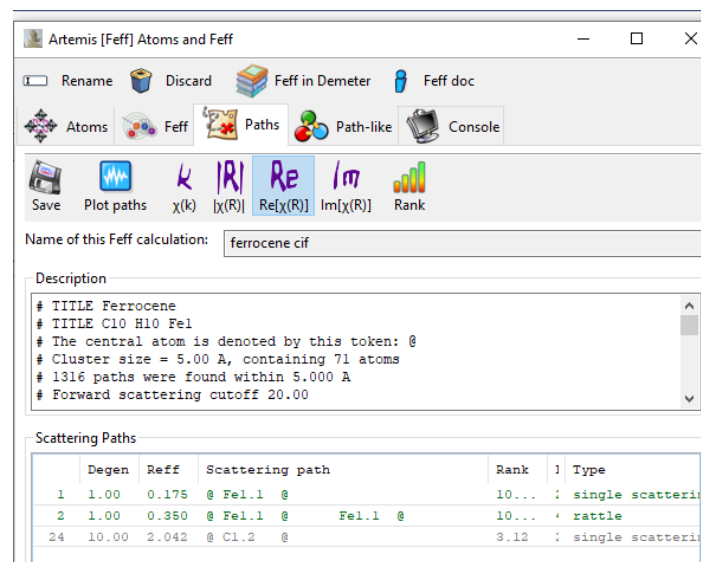


Fig 22. Archivo FEFF generado desde la información cristalográfica.

Para incluir las retrodispersiones calculadas, basta con seleccionarlas y arrastrarlas al espacio en blanco que aparece en la aplicación, como muestra la fig. 23.

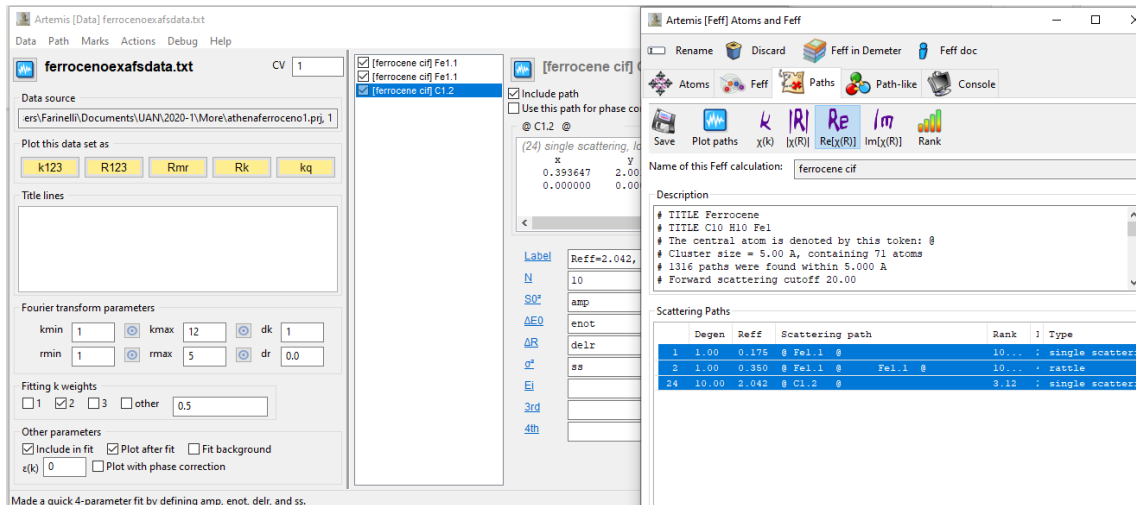


Fig 23. Selección de las vías de retrodispersión para comparación con los datos experimentales

La comparación exige que se determinen unos valores de partida para la iteración. Dado que solo se generan tres vías de retrodispersión se deben seleccionar todas. Esto se hace en la opción "marks" y escogiendo "mark all". Además, los parámetros de la ecuación estándar EXAFS se pueden escoger desde la opción "path" y "quick 4 parameter fit", que proporciona unos valores iniciales simples.

Con los valores seleccionados puede intentarse el ajuste a la opción "Fit" de ARTEMIS, se genera la gráfica que se muestra en la figura 23, donde la línea azul corresponde al espectro experimental y la roja a el espectro simulado. Puede verse un buen ajuste, sobre todo al comparar los máximos de la función que deben coincidir entre ambas.

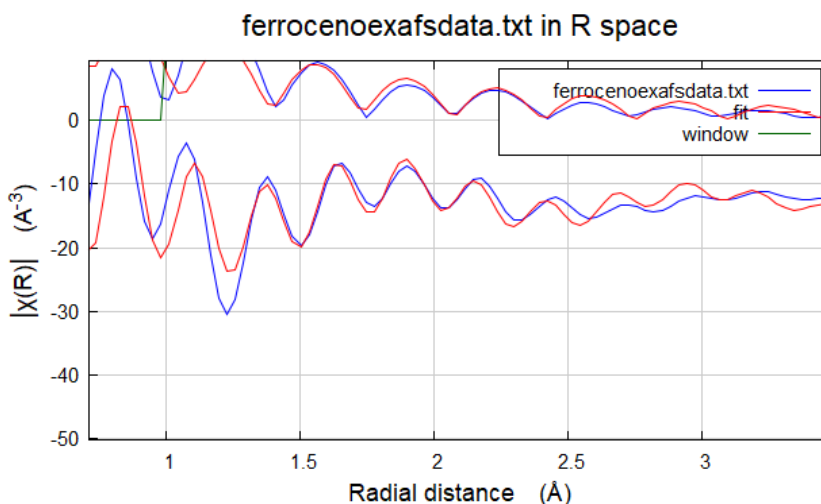


Fig 24. Espectro EXAF comparativo teórico vs experimental.

4. Metabolismo del oro

Ingresar a <https://bruceravel.github.io/demeter/> seleccionar guía de usuario de ATHENA como se ve en la fig. 25.

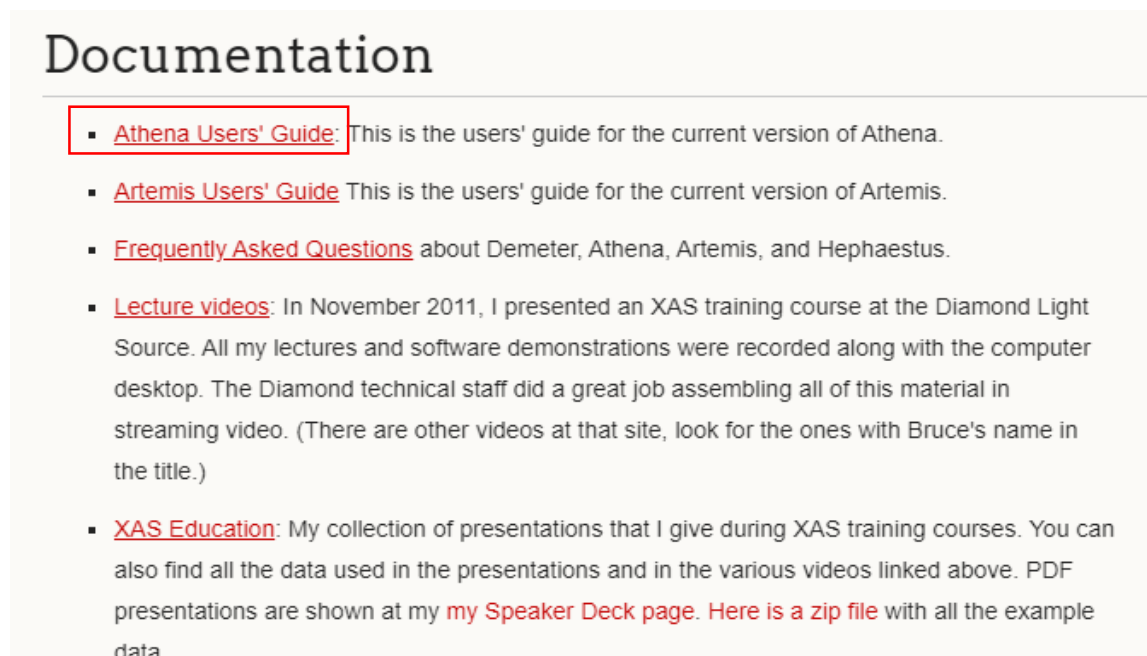


Fig 25. Inicio de la página web DEMETER.

Clic en Bruce's XAS Education page como se muestra en la figura 26.

- 6. User Interface
- 7. Setting parameters
- 8. Data export
- 9. Data processing
- 10. Data analysis
- 11. Other main window chores
- 12. Worked examples
- 13. Hephaestus

Helpful Links

Current Demeter version: 0.9.26

- Demeter homepage
- Demeter @ github
- Iffeffit mailing list
- Larch homepage
- Iffeffit @ github
- Bruce's XAS Education page
- xafs.org
- Athena manual
- Artemis manual
- Bug reporting hints
- How to ask a good question



Fig 26. Ingreso de a la página de Bruce's XAS.

Click en thus zip file (Fig. 27).

XAS Education

Educational materials for XAS training courses

[View On GitHub](#)
DOWNLOADS:
[ZIP](#)
[TAR](#)

RT	The Ramsauer-Townsend effect in EXAFS analysis
----	--

Examples

These folders contain the XAS and structural data used in the talks. All these examples can be downloaded from [this zip file.](#)

folder	contents
Au+Cyanobacteria	LCF example using gold(III) chloride reduced to gold metal
Cr2O3	The Cr2O3 data from the CLT talk
Cr standards	Cr 3+ and 6+ oxide standards
Cu metal	Copper foil at 3 temperatures + crystal data

Fig 27. Descargue de los datos crudos.

Importar datos como se muestra en la figura 16.

Se inicia examinando los datos, seleccione los datos que desea examinar y de clic en Normalized esto le dará como resultado los espectros normalizados como se muestra en la figura 28.

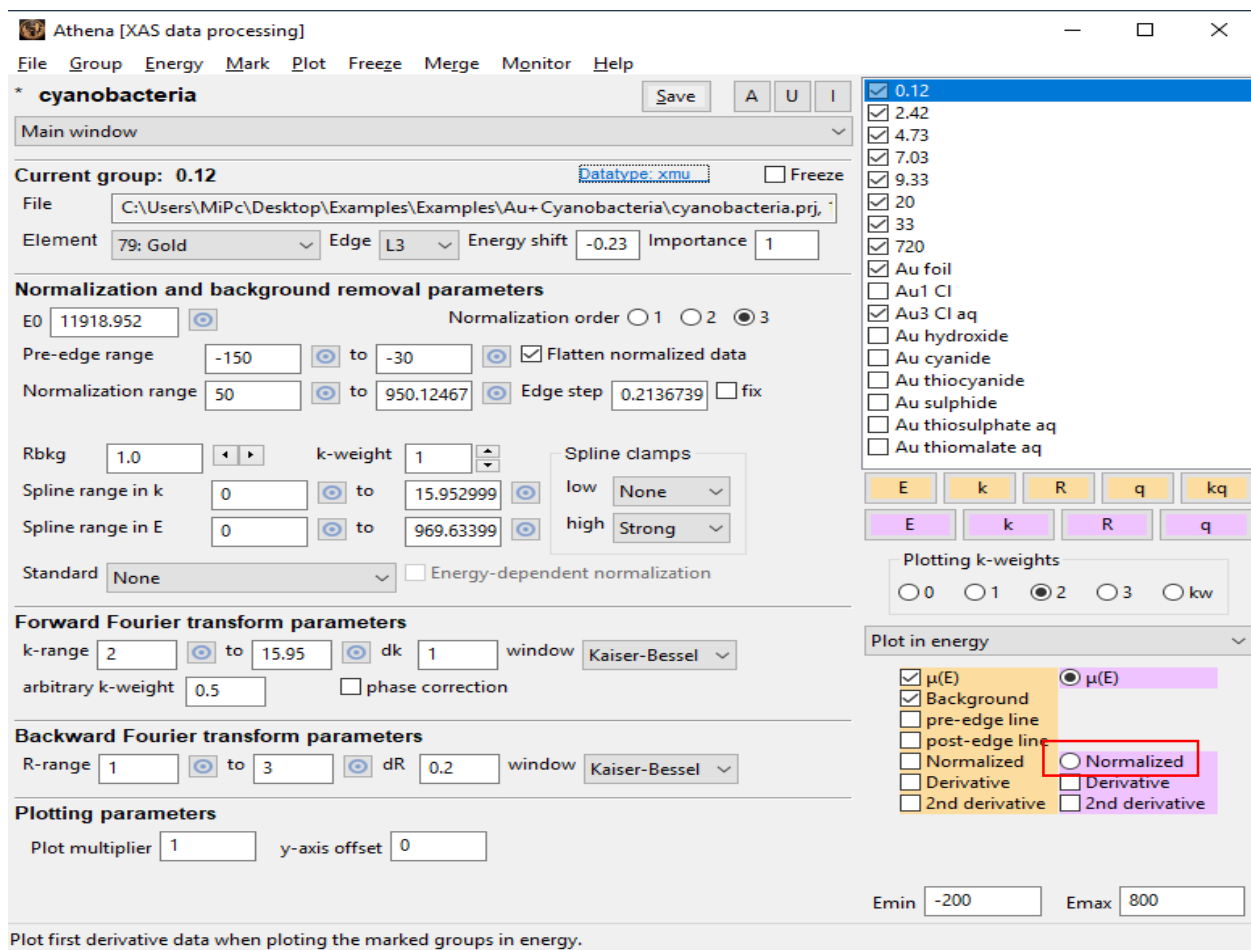


Fig 28. Normalización de los datos crudos.

Para identificar respuestas a posibles preguntas con los espectros obtenidos se usa la herramienta de linear combination fitting.

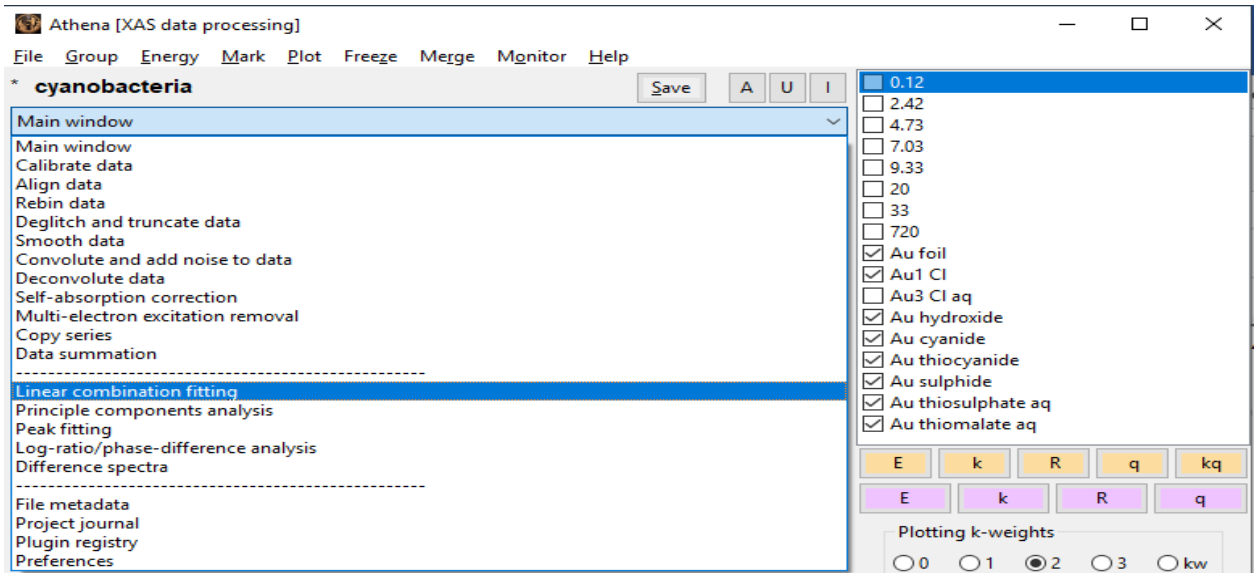


Fig 29. linear combination fitting.

De los dos primeros menús desplegable, seleccione sus parámetros, como se muestra a continuación. En la lista de operaciones, haga clic en fit this group para realizar el ajuste inicial a estos datos. Una vez que finaliza el ajuste, se traza el resultado del ajuste, que se muestra a continuación. La pestaña etiquetada Resultados de ajuste se activa como se muestra en la figura 30.

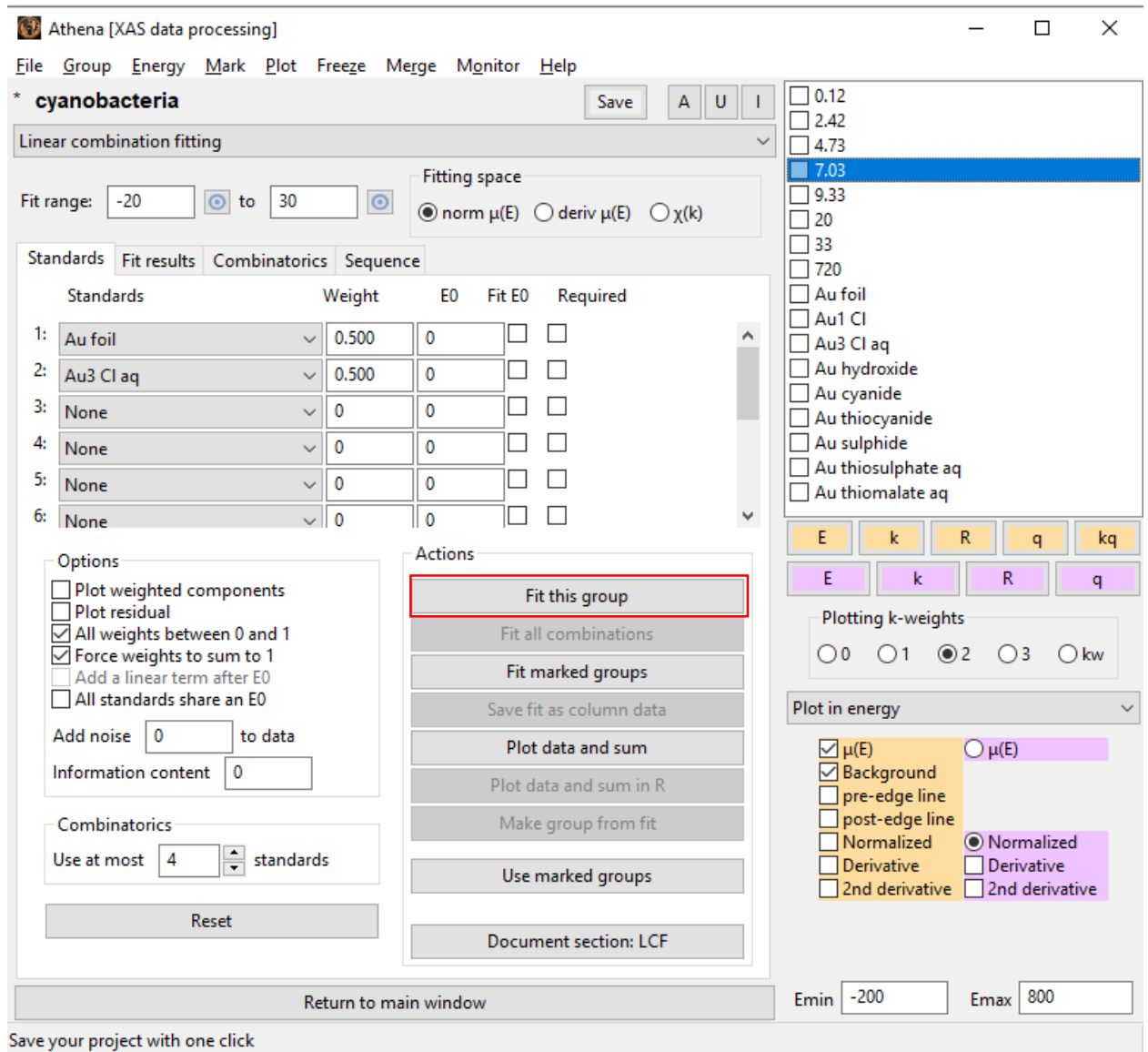


Fig 30. Interfaz linear combination fitting.

Para hacer la comparación entre los estándares y la muestra se realiza un análisis combinatorio. Primero marque todos los estándares y ninguno de los datos. Clic en use marked groups como se muestra en la figura 30.

Athena [XAS data processing]

File Group Energy Mark Plot Freeze Merge Monitor Help

* cyanobacteria Save A U I

Linear combination fitting

Fit range: -20 to 30 Fitting space: norm $\mu(E)$ deriv $\mu(E)$ $\chi(k)$

Standards Fit results Combinatorics Sequence

Standards	Weight	E0	Fit E0	Required
1: Au foil	0.111	0	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2: Au1 Cl	0.111	0	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3: Au3 Cl aq	0.111	0	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4: Au hydroxide	0.111	0	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5: Au cyanide	0.111	0	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6: Au thiocvanide	0.111	0	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Options

Plot weighted components
 Plot residual
 All weights between 0 and 1
 Force weights to sum to 1
 Add a linear term after E0
 All standards share an E0

Add noise 0 to data
Information content 9.553

Combinatorics
Use at most 4 standards

Reset

Actions

Fit this group
Fit all combinations
Fit marked groups
Save fit as column data
Plot data and sum
Plot data and sum in R
Make group from fit
Use marked groups
Document section: LCF

Return to main window

Fit the current group using the current model.

0.12
2.42
4.73
7.03
9.33
20
33
720

Au foil
 Au1 Cl
 Au3 Cl aq
 Au hydroxide
 Au cyanide
 Au thiocyanide
 Au sulphide
 Au thiosulphate aq
 Au thiomalate aq

E k R q kq
E k R q

Plotting k-weights
 0 1 2 3 kw

Plot in k-space

$\chi(E)$ $\chi(E)$
 Background
 Window

kmin 0 kmax 15

Fig 31. Comparación de espectros.

Clic Fit all combinations.

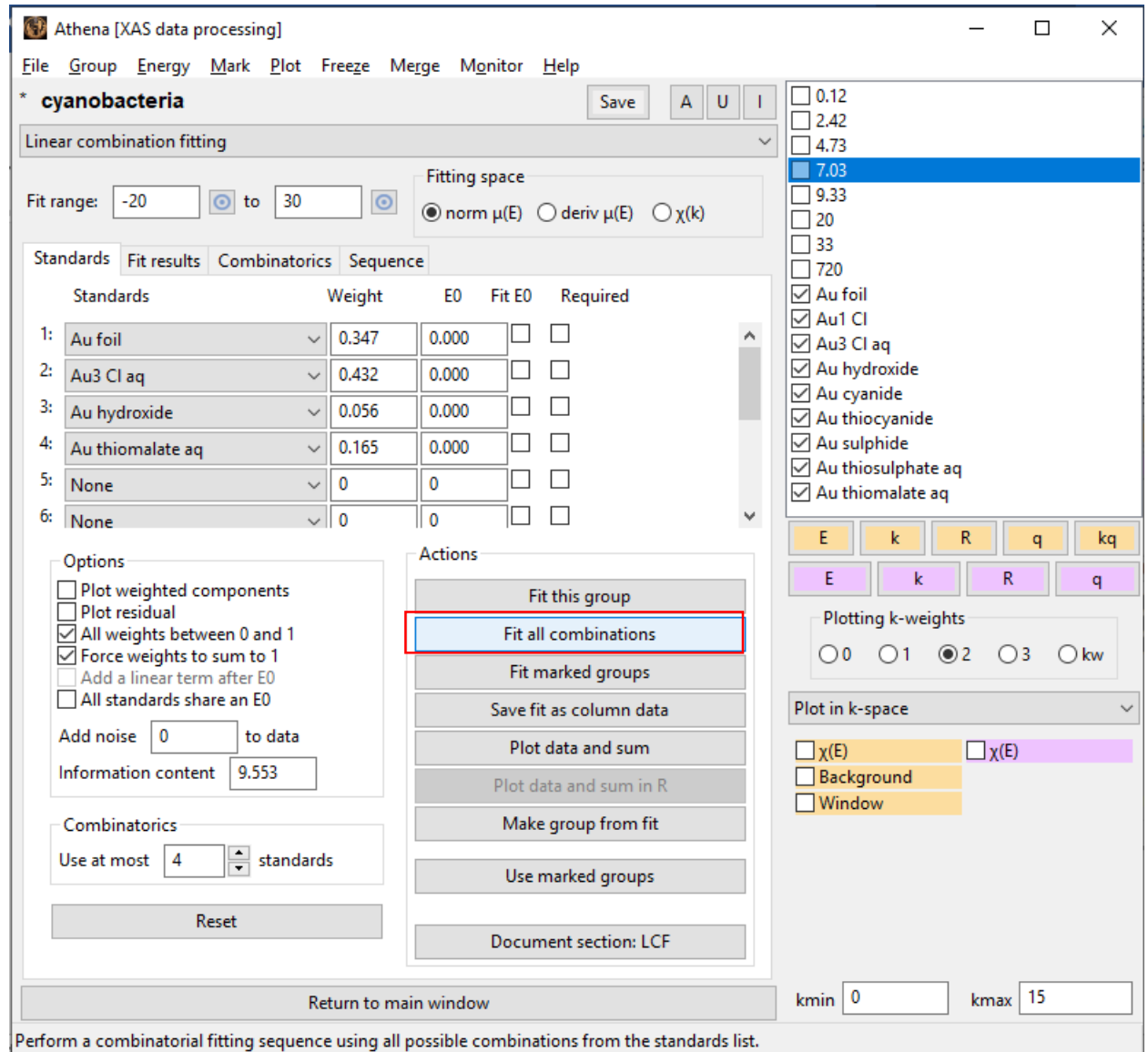


Fig 31. selección de la opción fit all combinations.

Para el análisis de los datos haga clic en sequence luego marque todos los grupos datos experimentales y desmarque todos los estándares y haga clic fit marked groups (Fig 32).

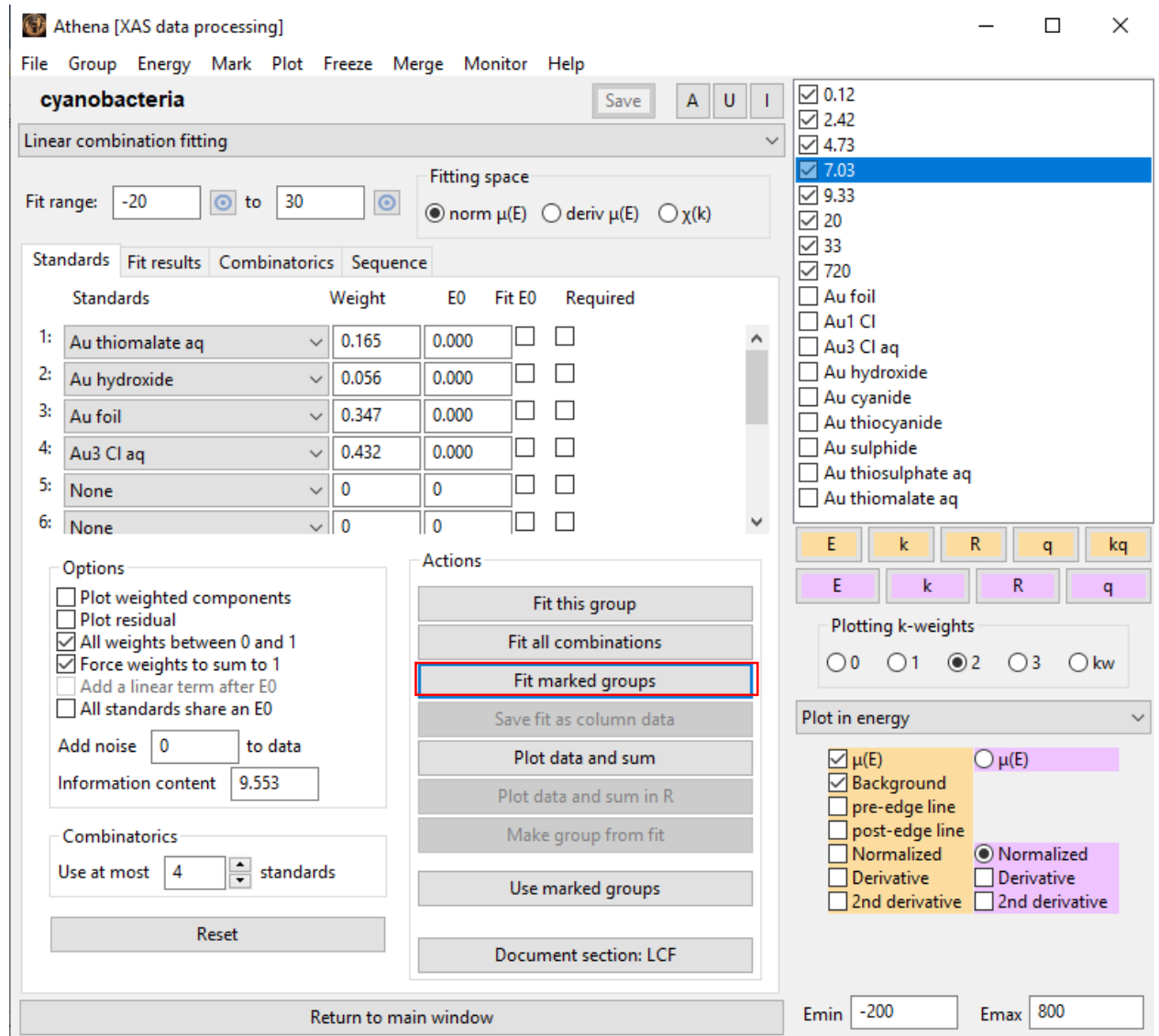


Fig 32. selección de la opción fit marked groups.

Click en save fit sequence report as an excel file (Fig.33)

Athena [XAS data processing]

File Group Energy Mark Plot Freeze Merge Monitor Help

cyanobacteria Save A U I

Linear combination fitting

Fit range: -20 to 30 Fitting space: norm $\mu(E)$ deriv $\mu(E)$ $\chi(k)$

Standards Fit results Combinatorics Sequence

Data	R-factor	Red. chi-sq...	Au thiomal...	Au hydroxi...	Au foil
0.12	0.0014264	0.0001953	0.228(0.414)	0.012(0.015)	0.052(0.044)
2.42	0.0002338	3.37e-005	0.183(0.411)	0.047(0.006)	0.210(0.018)
4.73	0.0001055	1.53e-005	0.169(0.411)	0.057(0.004)	0.297(0.012)
7.03	6.06e-005	8.8e-006	0.165(0.411)	0.056(0.003)	0.347(0.009)
9.33	4.27e-005	6.2e-006	0.155(0.411)	0.057(0.003)	0.393(0.008)
20	3.65e-005	5.3e-006	0.142(0.411)	0.053(0.002)	0.443(0.007)
33	0.0001968	2.86e-005	0.077(0.411)	0.060(0.006)	0.547(0.017)
720	0.0004671	7.06e-005	0.138(0.412)	0.067(0.009)	0.601(0.027)

LCF fit of 7.03 as flattened $\mu(E)$ from 11899.083 to 11949.083

Fit included 100 data points and 3 variables, and approximately 0 measurements

Weights sum to 1: yes
 Weights forced between 0 and 1: yes
 Overall e0 shift used: no
 Noise added to data: 0
 R-factor = 0.0000606
 Chi-square = 0.00087
 Reduced chi-square = 0.0000088

.	standard	weight	e0

Plot components from fit sequence

Save fit sequence report as an Excel file

Return to main window

Plotting k-weights: 0 1 2 3 kw

Plot in energy

$\mu(E)$ $\mu(E)$
 Background $\mu(E)$
 pre-edge line
 post-edge line
 Normalized Normalized
 Derivative Derivative
 2nd derivative 2nd derivative

Emin -200 Emax 800

Perform a combinatorial fitting sequence using all possible combinations from the standards list.

Fig 33. Obtención de datos Excel.

Para este caso en particular para simular la cinética del proceso se graficó el tiempo vs señal (Fig. 34).

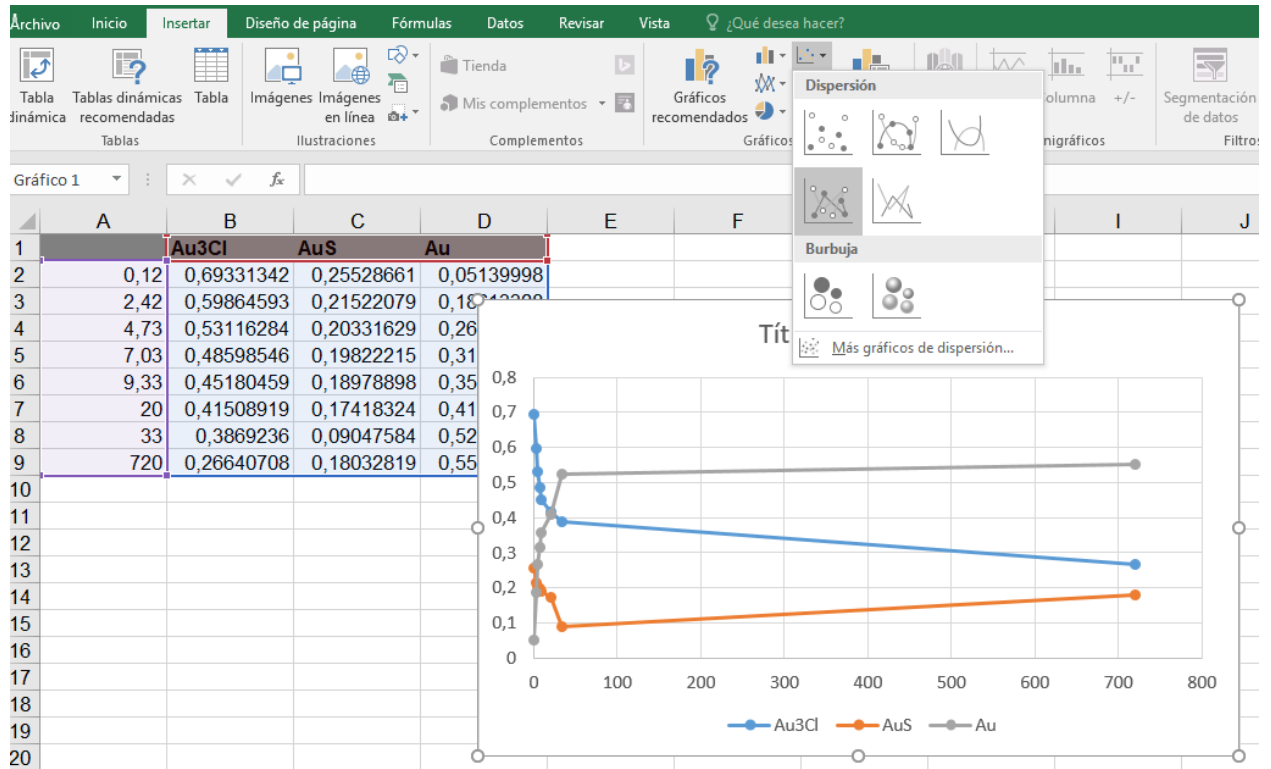


Fig 34. Grafica cinética del proceso metabólico.