



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Posgrado en Ciencias Químicas

Facultad de Ciencias Químicas

Centro de Química-Instituto de Ciencias (ICUAP)

**ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LA
INTERACCIÓN Y REACTIVIDAD DE
FÁRMACOS CON POSIBLE
ACTIVIDAD CONTRA LA
TUBERCULOSIS**

T E S I S

PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS

ÁREA DE FISICOQUÍMICA

P R E S E N T A

M.C. ANDREA MORENO CEBALLOS

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante

Dra. María Eugenia Castro Sánchez

PUEBLA, PUE.

ENERO 2024

AGRADECIMIENTOS



Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México)** por la beca de Doctorado No. 769481.



A la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP-BUAP)** por el apoyo a través de los proyectos: Complejos de vanadio para el tratamiento del cáncer y la diabetes. Un estudio teórico de primeros principios (100256733-VIEP2019); Síntesis y caracterización teórico-experimental de nuevos complejos de ciclotetranadato y decavanadato con potencial actividad farmacológica (100517029-VIEP2021); Estructura y reactividad química de un grupo de xantonas y su interacción con enzimas involucradas en el desarrollo de cáncer de mama. Un estudio teórico (100256733-VIEP2022); y Estudio computacional DFT y de acoplamiento molecular de fármacos anti-tuberculosis (100517029-VIEP2023).



Al **Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS-BUAP)** de la red CONACYT de laboratorios nacionales por los recursos computacionales y el soporte para la realización de la tesis.



Al Laboratorio de Supercómputo y Visualización en Paralelo de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I, México) por los recursos computacionales otorgados para la realización de la tesis.



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

prodep
TIPO SUPERIOR

Al Cuerpo Académico BUAP-CA-263 “Investigación Experimental-Computacional de Nuevos Materiales y Sistemas Biomoleculares” (SEP, PRODEP).

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



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por el Dr. Jesús Guillermo Soriano Moro, Dra. Norma Angélica Caballero Concha, Dr. Tomás Guerrero Briseño, Dr. Julián Alejandro Yunes Rojas y el Dr. José Manuel Pérez Aguilar, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Estudio Computacional de la Interacción y Reactividad de Fármacos con Posible Actividad Contra la Tuberculosis”**, que presenta la alumna **M.C. Andrea Moreno Ceballos** para obtener el grado de Doctora en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los quince días del mes de enero del año dos mil veinticuatro.

ATENTAMENTE

Dr. Jesús Guillermo Soriano Moro

Dra. Norma Angélica Caballero Concha

Dr. Tomás Guerrero Briseño

Dr. Julián Alejandro Yunes Rojas

Dr. José Manuel Pérez Aguilar

Posgrado en Ciencias Químicas
FCQ-ICUAP

Edif. 105 I, Ciudad Universitaria,
Col. San Manuel, Puebla, Pue.
C.P. 72570
01 (222) 2 29-55-00 Ext. 7387

Publicaciones derivadas de la tesis.

Andrea Moreno Ceballos, Norma A. Caballero, Liliana Mammino, María Eugenia Castro. Capítulo 3. Modelando Moléculas Anti-Tuberculosis en Caminar Juntas en la Ciencia. Ed. Tirant humanidades, 1ª edición, pp 53-75. Ciudad de México, México, 2023. ISBN: 978-84-19588-11-1.

Andrea Moreno-Ceballos, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, Liliana Mammino, Francisco J. Melendez. Implicit and Explicit Solvent Effects on the Global Reactivity and the Density Topological Parameters of the Preferred Conformers of Caespitate. *Computation*, 2024, 12(1), 5. DOI: 10.3390/computation12010005

Andrea Moreno-Ceballos, Norma A. Caballero, María Eugenia Castro, Jose Manuel Perez-Aguilar, Liliana Mammino, Francisco J. Melendez. Molecular Docking and MM/GBSA Studies of Anti-Tuberculosis Activity of Caespitate in H37Rv Strain. Submitted *Molecules*, 2023.

Los resultados de este trabajo se presentaron en los siguientes congresos nacionales e internacionales:

XVII Reunión Mexicana de Físicoquímica Teórica, “Acoplamiento molecular de derivados de caespitato con UGM con actividad anti-tuberculosis.” Andrea Moreno-Ceballos, Norma A. Caballero, María Eugenia Castro, José Manuel Pérez-Aguilar, Liliana Mammino, Francisco J. Meléndez, Toluca, Estado de México, México, del 24 al 26 de octubre de 2019.

XXIV Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas, “Estudio fisicoquímico de los derivados de floroglucinol y acil floroglucinol con posible actividad contra la tuberculosis.” Andrea Moreno-Ceballos, Jesús Guillermo Soriano Moro, María Eugenia Castro, Puebla, Puebla, México, del 11 al 15 de noviembre de 2019.

XXV Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas, “Estudio computacional de la interacción y reactividad de fármacos con posible actividad contra la tuberculosis.” Andrea Moreno-Ceballos, Francisco J. Meléndez, María Eugenia Castro, Puebla, Puebla, México, del 9 al 13 de noviembre de 2020.

LatinXChem 2021, “Computational analysis of the anti-tuberculosis activity of caespitate with the UGM enzyme.” Andrea Moreno-Ceballos, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, José Manuel Pérez-Aguilar, Liliana Mammino, Francisco J. Meléndez, 20 de septiembre de 2021, modalidad virtual.

XXVI Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas, “Estudio computacional de la interacción y reactividad de fármacos con posible actividad contra la tuberculosis.” Andrea Moreno-Ceballos, Francisco J. Meléndez, María Eugenia Castro, Puebla, Puebla, México, del 9 al 12 de noviembre de 2021.

XIX Reunión Mexicana de Físicoquímica Teórica, “Estudio de la actividad antituberculosa del caespitato con la proteína Enoil ACP-reductasa.” Andrea Moreno-Ceballos, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, José Manuel Pérez-Aguilar, Liliana Mammino, Francisco J. Meléndez, del 18 al 19 de noviembre de 2021, modalidad virtual.

XVII Reunión Mexicana de Química Orgánica, “Análisis de los índices de reactividad química global de caespitato mediante DFT conceptual”. Andrea Moreno-Ceballos, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, José Manuel Pérez Aguilar, Liliana Mammino, Francisco J. Meléndez, Puebla, Puebla, México, del 25 al 26 de agosto de 2022.

XXVII Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas, “Estudio computacional de la interacción y reactividad de fármacos con posible actividad contra la tuberculosis.” Andrea Moreno-Ceballos, Francisco J. Meléndez, María Eugenia Castro, Puebla, Puebla, México, del 7 al 10 de noviembre de 2022.

IV Congreso de investigadoras del SNI y de Iberoamérica, “Modelando Moléculas Anti-tuberculosis.” Andrea Moreno-Ceballos, Norma A. Caballero, Liliana Mammino, María Eugenia Castro, Puebla, Puebla, México, del 10 al 12 de noviembre de 2022, modalidad híbrida.

LatinXChem 2022, “Acoplamiento molecular de confórmers de caespitato con enzimas de *Mycobacterium tuberculosis*.” Andrea Moreno-Ceballos, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, José Manuel Pérez-Aguilar, Liliana Mammino, Francisco J. Meléndez, 28 de noviembre de 2022, modalidad virtual.

XX Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica, “Efecto del disolvente sobre los parámetros topológicos de la densidad del caespitato.” Andrea Moreno-Ceballos, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, José Manuel Pérez-Aguilar, Liliana Mammino, Francisco J. Meléndez, Cuernavaca, Morelos, México, del 17 al 19 de noviembre de 2022.

La Mujer y la Niña en la Ciencia, “Refinamiento MM/GBSA de caespitato con enzimas de *Mycobacterium tuberculosis*.” Andrea Moreno-Ceballos, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, Liliana Mammino, Francisco J. Meléndez, Puebla, Puebla, México, 10 de febrero de 2023.

LatinXChem 2023, “Efecto del disolvente explícito en las conformaciones preferidas de caespitato.” Andrea Moreno-Ceballos, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, Liliana Mammino, Francisco J. Meléndez, del 16 al 17 de octubre de 2023, modalidad virtual.

XXI Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica, “Estudio comparativo de acoplamiento molecular de la actividad antituberculosa de caespitato.” Andrea Moreno-Ceballos, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, Liliana Mammino, Francisco J. Meléndez, Pachuca, Hidalgo, México, del 9 al 11 de noviembre de 2023.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xv
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xix
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	3
1.1. Enfermedad de tuberculosis y moléculas anti-tuberculosis	3
1.2. Actividad anti-tuberculosa del <i>Helichrysum caespitium</i>	6
1.3. Puentes de hidrógeno intramoleculares en los floroglucinoses	7
1.4. Blancos terapéuticos en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
CAPÍTULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
2.1. Planteamiento del problema	17
2.2. Hipótesis	17
2.3. Objetivos	18
2.3.1. Objetivo general	18
2.3.2. Objetivos específicos	18
CAPÍTULO III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	20
3.1. Ecuación de Schrödinger y Hamiltoniano molecular	20
3.2. Teoría del funcional de la densidad (DFT)	21
3.3. Conjunto de funciones base	24
3.4. Análisis de poblaciones	27

3.5. Solvatación implícita	27
3.6. Solvatación explícita	29
3.7. Reactividad química global	30
3.8. Teoría cuántica de átomos en moléculas (QTAIM)	31
3.9. Acoplamiento molecular	34
3.10. Método MM/GBSA	39
CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA	41
4.1. Análisis conformacional	41
4.2. Análisis poblacional	41
4.3. Solvatación implícita y explícita	41
4.4. Análisis de reactividad química global	42
4.5. Análisis QTAIM	43
4.6. Validación de los modelos de disolvente mediante espectroscopia de RMN	43
4.7. Acoplamiento molecular	43
4.8. Validación de los cálculos de acoplamiento molecular.	45
4.9. Estudio MM/GBSA	45
CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
5.1. Análisis conformacional y poblacional en fase gas y con disolvente implícito	47
5.2. Análisis conformacional con disolvente explícito	55
5.3. Análisis de reactividad química global	64
5.4. Análisis QTAIM	77
5.5. Validación de los modelos de disolvente mediante espectroscopia de RMN	85
5.6. Acoplamiento molecular en AutoDock Vina	87

5.6.1. Acoplamiento rígido con la enzima InhA	88
5.6.2. Acoplamiento rígido con la enzima MabA	95
5.6.3. Acoplamiento rígido con la enzima UGM	102
5.6.4. Acoplamiento rígido con la enzima PanK	109
5.7. Acoplamiento molecular en Glide	116
5.7.1. Acoplamiento rígido con la enzima InhA	116
5.7.2. Acoplamiento rígido con la enzima MabA	124
5.7.3. Acoplamiento rígido con la enzima UGM	131
5.7.4. Acoplamiento rígido con la enzima PanK	138
5.8. Validación de los cálculos de acoplamiento molecular	146
5.9. Estudio MM/GBSA	148
CONCLUSIONES	153
BIBLIOGRAFÍA	156
ANEXOS	173
ANEXO A. Acoplamiento semiflexible en AutoDock Vina	173
ANEXO B. Acoplamiento semiflexible en Glide	201

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen de la planta <i>Helichrysum caespititium</i> y la estructura 2D de los isómeros <i>Z</i> (1) y <i>E</i> (2) de caespitato.	6
Figura 2. Estructura de floroglucinol.	7
Figura 3. Estructura general de acilfloroglucinoles.	7
Figura 4. Estructura 3D de la proteína transportadora de enoil acilo reductasa (InhA) en cintas y NAD en bastones.	11
Figura 5. Estructura 3D de la proteína transportadora de β -cetoacil-ACP reductasa (MabA) en cintas.	12
Figura 6. Estructura 3D de la enzima uridina 5'-difosfato (UDP) galactopiranos mutasa (UGM) en cintas y FAD en bastones.	14
Figura 7. Estructura 3D de la enzima en cintas pantotenato quinasa (PanK tipo I).	15
Figura 8. Estructura de los profármacos 5-metil-N-(4-nitrofenil)tiofeno-2-carboxamida (4) y 3-fenil-N-[(4-piperidin-1-ilfenil)carbamoil]propanamida (5).	16
Figura 9. Estructuras moleculares de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en fase gas (G1-G5).	49
Figura 10. Estructuras moleculares de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en agua (A1-A5) usando el modelo SMD.	50
Figura 11. Estructuras moleculares de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en cloroformo (C1-C5) usando el modelo SMD.	51
Figura 12. Estructuras moleculares de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en acetonitrilo (Ac1-Ac5) usando el modelo SMD.	52
Figura 13. Estructuras moleculares de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en DMSO (D1-D5) usando el modelo SMD.	53

- Figura 14.** Estructuras de las geometrías optimizadas de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir del conformero más estables en fase gas (G1). En agua (AG1E), en cloroformo (CG1E), en acetonitrilo (AcG1E) y en DMSO (DG1E). 58
- Figura 15.** Estructuras de las geometrías optimizadas de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir de los conformeros más estables en disolución implícita: en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1). En agua (A1E), en cloroformo (C1E), en acetonitrilo (Ac1E) y en DMSO (D1E). 59
- Figura 16.** Comparación de las estructuras optimizadas del conformero más estable en fase gas (G1) (color rojo) rodeado de disolvente implícito. En agua (AG1E), en cloroformo (CG1E), en acetonitrilo (AcG1E) y en DMSO (DG1E) (color azul). 62
- Figura 17.** Comparación de las estructuras optimizadas de los conformeros más estables en disolvente implícito en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1) (color rojo) con la estructura correspondiente más estable en disolvente explícito en agua (A1E), en cloroformo (C1E), en acetonitrilo (Ac1E) y en DMSO (D1E) (color azul). 63
- Figura 18.** Isosuperficies de los orbitales moleculares frontera (HOMO y LUMO) de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en fase gas y en disolución. En fase gas (G1), en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1). 69
- Figura 19.** Isosuperficies de los orbitales moleculares frontera (HOMO y LUMO) de las diferentes geometrías optimizadas de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir del conformero más estable en fase gas (G1). En agua (AG1E), en cloroformo (CG1E), en acetonitrilo (AcG1E) y en DMSO (DG1E). 70
- Figura 20.** Isosuperficies de los orbitales moleculares frontera (HOMO y LUMO) de las diferentes geometrías optimizadas de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir de los conformeros más estables en disolución implícita: en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1). En agua (A1E), en cloroformo (C1E), en acetonitrilo (Ac1E) y en DMSO (D1E). 71

Figura 21. Potencial Electrostático Molecular (MEP) de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en fase gas y en disolución. En fase gas (G1), en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1).	74
Figura 22. Potencial Electrostático Molecular (MEP) de las geometrías optimizadas de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir del conformero más estables en fase gas (G1). En agua (AG1E), en cloroformo (CG1E), en acetonitrilo (AcG1E) y en DMSO (DG1E).	75
Figura 23. Potencial Electrostático Molecular (MEP) de las geometrías optimizadas de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir de los conformeros más estables en disolución implícita: en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1). En agua (A1E), en cloroformo (C1E), en acetonitrilo (Ac1E) y en DMSO (D1E).	76
Figura 24. Grafos moleculares de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en fase gas y en disolución. En fase gas (G1), en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1).	82
Figura 25. Grafos moleculares de los conformeros más estables de las geometrías optimizadas de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir del conformero más estables en fase gas (G1). En agua (AG1E), en cloroformo (CG1E), en acetonitrilo (AcG1E) y en DMSO (DG1E).	83
Figura 26. Grafos moleculares de las geometrías optimizadas de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir de los conformeros más estables en disolución implícita: en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1). En agua (A1E), en cloroformo (C1E), en acetonitrilo (Ac1E) y en DMSO (D1E).	84
Figura 27. Estructura numerada de caespitato para la asignación de los desplazamientos químicos (δ) de RMN ^1H y ^{13}C .	85
Figura 28. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular rígido en AutoDock Vina de los complejos de la enzima InhA con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) InhA-G1r, (b) InhA-A1r, (c) InhA-C1r, (d) InhA-Ac1r y (e) InhA-D1r.	90

Figura 29. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular rígido en AutoDock Vina de los complejos de la enzima MabA con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) MabA-G1r, (b) MabA-A1r, (c) MabA-C1r, (d) MabA-Ac1r y (e) MabA-D1r.	97
Figura 30. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular rígido en AutoDock Vina de los complejos de la enzima UGM con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) UGM-G1r, (b) UGM-A1r, (c) UGM-C1r, (d) UGM-Ac1r y (e) UGM-D1r.	104
Figura 31. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular rígido en AutoDock Vina de los complejos de la enzima PanK con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) PanK-G1, (b) PanK-A1, (c) PanK-C1, (d) PanK-Ac1 y (e) PanK-D1.	111
Figura 32. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular rígido en Glide de los complejos de la enzima InhA con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) InhA-G1r, (b) InhA-A1r, (c) InhA-C1r, (d) InhA-Ac1r y (e) InhA-D1r.	119
Figura 33. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular rígido en Glide de los complejos de la enzima MabA con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) MabA-G1r, (b) MabA-A1r, (c) MabA-C1r, (d) MabA-Ac1r y (e) MabA-D1r.	126
Figura 34. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular rígido en Glide de los complejos de la enzima UGM con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) UGM-G1r, (b) UGM-A1r, (c) UGM-C1r, (d) UGM-Ac1r y (e) UGM-D1r.	133
Figura 35. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular rígido en Glide de los complejos de la enzima PanK con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) PanK-G1r, (b) PanK-A1r, (c) PanK-C1r, (d) PanK-Ac1r y (e) PanK-D1r.	141
Figura A1. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular semiflexible en AutoDock Vina de los complejos de la enzima InhA con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) InhA-G1s, (b) InhA-A1s, (c) InhA-C1s, (d) InhA-Ac1s y (e) InhA-D1s.	175
Figura A2. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular semiflexible en AutoDock Vina de los complejos de la enzima MabA con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) MabA-G1s, (b) MabA-A1s, (c) MabA-C1s, (d) MabA-Ac1s y (e) MabA-D1s.	182

Figura A3. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular semiflexible en AutoDock Vina de los complejos de la enzima UGM con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) UGM-G1s, (b) UGM-A1s, (c) UGM-C1s, (d) UGM-Ac1s y (e) UGM-D1s.	189
Figura A4. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular semiflexible en AutoDock Vina de los complejos de la enzima PanK con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) PanK-G1s, (b) PanK-A1s, (c) PanK-C1s, (d) PanK-Ac1s y (e) PanK-D1s.	196
Figura B1. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular semiflexible en Glide de los complejos de la enzima PanK con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: InhA-G1s, InhA-A1s, InhA-C1s, InhA-Ac1s y InhA-D1s.	203
Figura B2. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular semiflexible en Glide de los complejos de la enzima PanK con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: MabA-G1s, MabA-A1s, MabA-C1s, MabA-Ac1s y MabA-D1s.	205
Figura B3. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular semiflexible en Glide de los complejos de la enzima PanK con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: UGM-G1s, UGM-A1s, UGM-C1s, UGM-Ac1s y UGM-D1s.	207
Figura B4. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular semiflexible en Glide de los complejos de la enzima PanK con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: PanK-G1s, PanK-A1s, PanK-C1s, PanK-Ac1s y PanK-D1s.	209

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de puntos críticos en la Teoría de Átomos en Moléculas.	33
Tabla 2. Energía libre relativa (ΔG), porcentaje de población (%) y formación de los IHBs de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en fase gas y en disolución implícita usando el modelo SMD.	48
Tabla 3. Energías totales (en u.a.) de los sistemas calculados mediante el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) con disolvente explícito obtenidos a partir de los conformeros más estables en fase gas y en disolución implícita. En agua (AG1E/A1E), en cloroformo (CG1E/C1E), acetonitrilo (AcG1E/Ac1E) y DMSO (DG1E/D1E).	56
Tabla 4. Parámetros seleccionados (distancias en Å y ángulos en grados) de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) con el modelo de solvatación implícita SMD y calculados con el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) usando solvatación explícita. En agua (A1/A1E), en cloroformo (C1/C1E), en acetonitrilo (Ac1/Ac1E) y en DMSO (D1/D1E).	60
Tabla 5. Energías HOMO y LUMO, e índices de reactividad global (eV) de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311++G(2d,p) en fase gas y en disolución.	66
Tabla 6. Energías HOMO y LUMO, e índices de reactividad global (eV) de los sistemas calculados mediante el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) con disolvente explícito obtenidos a partir de los conformeros más estables en fase gas y en disolución implícita. En agua (AG1E/A1E), en cloroformo (CG1E/C1E), acetonitrilo (AcG1E/Ac1E) y DMSO (DG1E/D1E).	67
Tabla 7. Parámetros topológicos (u.a.), $E_{H...Y}$ (kcal mol ⁻¹), distancias interatómicas (D_{inter} , Å) y ángulos de enlace (A_{inter} , °) de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en fase gas y en disolución implícita. En fase gas (G1), en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1).	80
Tabla 8. Parámetros topológicos (u.a.), $E_{H...Y}$ (kcal mol ⁻¹), distancias interatómicas (D_{inter} , Å) y ángulos de enlace (A_{inter} , °) de las geometrías optimizadas de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir del conformero más estable en fase gas (G1) y de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir de los conformeros más estables en disolución implícita. En agua (AG1E/A1E), en cloroformo (CG1E/C1E), acetonitrilo (AcG1E/Ac1E) y DMSO (DG1E/D1E).	81

Tabla 9. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H experimentales, calculados y recalculados δ (ppm) con respecto al TMS del conformero más estable del caespitato calculado en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en fase gas y en disolución implícita y explícita.	85
Tabla 10. Desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C experimentales, calculados y recalculados δ (ppm) con respecto al TMS del conformero más estable del caespitato calculado en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en fase gas y en disolución implícita y explícita.	87
Tabla 11. Energías de afinidad (kcal mol^{-1}) e interacciones principales del acoplamiento molecular rígido en AutoDock Vina de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima InhA.	89
Tabla 12. Energías de afinidad (kcal mol^{-1}) e interacciones principales del acoplamiento molecular rígido en AutoDock Vina de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima MabA.	96
Tabla 13. Energías de afinidad (kcal mol^{-1}) e interacciones principales del acoplamiento molecular rígido en AutoDock Vina de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima UGM.	103
Tabla 14. Energías de afinidad (kcal mol^{-1}) e interacciones principales del acoplamiento molecular rígido en AutoDock Vina de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima PanK.	110
Tabla 15. <i>Docking score</i> (kcal mol^{-1}) e interacciones principales del acoplamiento molecular rígido en Glide de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y disolución con la enzima InhA.	118
Tabla 16. <i>Docking score</i> (kcal mol^{-1}) e interacciones principales del acoplamiento molecular rígido en Glide de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y disolución con la enzima MabA.	125
Tabla 17. <i>Docking score</i> (kcal mol^{-1}) e interacciones principales del acoplamiento molecular rígido en Glide de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y disolución con la enzima UGM.	132
Tabla 18. <i>Docking score</i> (kcal mol^{-1}) e interacciones principales del acoplamiento molecular rígido en Glide de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y disolución con la enzima PanK.	140
Tabla 19. Energías libres de unión (kcal mol^{-1}) y RMSD (\AA) de las simulaciones de re-docking de InhA, UGM y PanK con sus respectivos sustratos e inhibidores, calculadas con AutoDock Vina y Glide.	148

Tabla 20. Energías libres de enlace MM/GBSA (kcal mol ⁻¹) de los complejos entre los conformeros más estables de caespitato en fase gas y disolución con las enzimas InhA, MabA, UGM y PanK.	149
Tabla 21. Parámetros energéticos de MM/GBSA (kcal mol ⁻¹) de los complejos entre los conformeros más estables de caespitato en fase gas y disolución con las enzimas InhA, MabA, UGM y PanK.	151
Tabla A1. Energías de afinidad (kcal mol ⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular semiflexible en AutoDock Vina de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima InhA.	174
Tabla A2. Energías de afinidad (kcal mol ⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular semiflexible en AutoDock Vina de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima MabA.	181
Tabla A3. Energías de afinidad (kcal mol ⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular semiflexible en AutoDock Vina de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima UGM.	188
Tabla A4. Energías de afinidad (kcal mol ⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular semiflexible en AutoDock Vina de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima PanK.	195
Tabla B1. Energías de afinidad (kcal mol ⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular semiflexible en Glide de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima InhA.	202
Tabla B2. Energías de afinidad (kcal mol ⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular semiflexible en Glide de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima MabA.	204
Tabla B3. Energías de afinidad (kcal mol ⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular semiflexible en Glide de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima UGM.	206
Tabla B4. Energías de afinidad (kcal mol ⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular semiflexible en Glide de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima PanK.	208

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad global que se encuentra en todos los países del mundo, pero con alta prevalencia en países en desarrollo, entre ellos México. Es la principal causa infecciosa de muerte en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud estima que 1.8 millones de personas, cerca de una cuarta parte de la población mundial, están infectadas con *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), la bacteria que causa la TB. Desafortunadamente, esta enfermedad ha presentado farmacoresistencia a los tratamientos actuales, por ello existe la necesidad de descubrir nuevos fármacos con mayor eficacia.

El objetivo general del presente proyecto se enfoca en el estudio computacional de la reactividad química y la evaluación de la actividad farmacológica del caespitato como posible inhibidor de la actividad de las siguientes enzimas, la proteína transportadora de enoil acilo reductasa (InhA), β -cetoacil-ACP reductasa (MabA), uridina 5'-difosfato (UDP) galactopiranososa mutasa (UGM) y la enzima pantotenato quinasa (PanK tipo I). Estas macromoléculas están involucradas en la biosíntesis de la pared celular de *Mtb*. El caespitato es una molécula extraída de la planta *Helichrysum caespitium* utilizada como medicina alternativa para tratar la TB. Usando métodos computacionales se estudia la reactividad química y la formación de enlaces no-covalentes de los conformeros más estables de caespitato, el cual presenta actividad experimental anti-TB. Se estudia el efecto de diferentes disolventes de manera implícita y explícita en dichas conformaciones. Se analizan las interacciones de estos compuestos con los diferentes blancos terapéuticos previamente identificados mediante la técnica de acoplamiento molecular. Finalmente, se realiza el refinamiento de la energía libre de unión del complejo ligante-proteína mediante el método MM/GBSA. Los resultados muestran que los complejos UMG-G1, UGM-D1, PanK-G1 y PanK-D1, con las conformaciones más estables de caespitato en fase gas y DMSO, muestran mejor energía de afinidad, debido a las diversas contribuciones energéticas.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a global disease, but with high prevalence in developing countries, including Mexico. It is the leading infectious cause of death worldwide. The World Health Organization estimates that 1.8 billion people, about a quarter of the world's population, are infected with *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), the bacterium that causes TB. Unfortunately, the disease has developed drug resistance to current treatments, so there is a need to discover new drugs with greater efficacy.

The general objective of the present project focuses on the computational study of the chemical reactivity and evaluation of the pharmacological activity of caespitate as possible inhibitor of the enzyme activity of enoyl acyl carrier protein reductase (IhnA), β -ketoacyl-ACP reductase (MabA), uridine 5'-diphosphate (UDP) galactopyranose (UGM) and the enzyme pantothenate kinase (PanK type I). These macromolecules are involved in *Mtb* cell wall biosynthesis. These macromolecules are involved in the biosynthesis of the *Mtb* cell wall. Caespitate is a molecule extracted from the plant *Helichrysum caespititium* used as an alternative medicine to treat TB. Using computational methods, the chemical reactivity and non-covalent bond formation of the most stable conformers of caespitate and other natural compounds with experimental anti-TB activity are studied. The effect of different solvents is studied implicitly and explicitly for these conformations. The interactions of these compounds with the different therapeutic targets previously identified will be analyzed using the molecular docking technique. Finally, rescoring of the free energy of binding of the ligand-protein complex will be performed by the popular MM/GBSA method. The results show that the UMG-G1, UGM-D1, PanK-G1 and PanK-D1 complexes show better affinity energy, due to different energetic contributions.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), la cual se transmite entre humanos a través de la vía aérea. La TB es la enfermedad provocada por un solo agente infeccioso con más muertes ocasionadas a nivel mundial después del COVID-19. Actualmente, las muertes por TB se producen mayoritariamente en países emergentes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2021 reportó que 1.4 millones de personas murieron a causa de este padecimiento y otras 206 mil personas infectadas por *Mtb* presentaron farmacoresistencia a los tratamientos actuales basados en la administración de fármacos como la isoniazida, rifampicina y etambutol. En este sentido, existe la necesidad de diseñar nuevos fármacos con mayor eficacia, tomando como bases fitoquímicos como el caespitato. El caespitato es un acilfloroglucinol aislado de la planta *Helichrysum caespititium*, la cual es endémica de África y es utilizada por la población nativa como medicina alternativa para tratar la TB.

Desde el punto de vista biológico, es posible erradicar por completo la TB, ya que se puede identificar, tratar y curar; no obstante, no sólo es un problema biológico sino socioeconómico. La tasa de curación de la TB es del 100 % cuando se tiene acceso a terapias modernas, sin embargo, uno de los mayores problemas de las personas infectadas pertenecientes a países emergentes, es el acceso a los tratamientos.

En esta tesis doctoral, se realiza un análisis computacional de los confórmeros más estables y poblados del caespitato, así como de los índices de reactividad química y de las interacciones no-covalentes, aplicado a la descripción de su actividad anti-TB, buscando proponer nuevos fármacos para erradicar la enfermedad. El conjunto de confórmeros con mayor estabilidad y población, así como con mejores índices de reactividad y que presenten mayor cantidad de interacciones no-covalentes, como puentes de hidrógeno intra- e intermoleculares, serán potenciales inhibidores de la actividad de las enzimas transportadora de enoil acilo reductasa (IhnA), β -cetoacil-ACP reductasa (MabA), de la proteína uridina 5'-difosfato (UDP) galactopiranos mutasa (UGM) y de la enzima pantotenato quinasa (PanK tipo I). La interacción de los confórmeros de caespitato con las enzimas se analiza mediante datos obtenidos por el método de acoplamiento molecular (*molecular docking*), aunado a esto, para tener una mayor correlación con los resultados

experimentales, se realiza el refinamiento de la energía libre de unión del complejo ligante-proteína mediante el método MM/GBSA, este procedimiento se lleva a cabo con los 4 blancos terapéuticos propuestos con el ligante caespitato, determinando así, la mejor diana farmacológica para este acilfloroglucinol. Este proyecto se propone como una buena opción en el diseño de estructuras moleculares con propiedades farmacológicas anti-TB, encontrando así una alternativa al diseño sintético experimental para enfrentar un problema de salud pública.

CAPITULO I. ANTECEDENTES.

1.1. Enfermedad de tuberculosis y moléculas anti-tuberculosis

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*. Esta enfermedad se propaga rápidamente de persona a persona, principalmente por vía aérea, es decir, cuando las personas hablan, tosen, estornudan o escupen, posteriormente los bacilos se propagan desde su localización inicial en los pulmones a otras partes del cuerpo [1-3]. La bacteria suele atacar a los pulmones, pero puede dañar también otras partes del cuerpo como los riñones, la columna vertebral y el cerebro [4]. La mayoría de las personas que padecen TB presentan los siguientes síntomas: tos crónica (mayor a 15 días), pérdida de peso, fiebre intermitente, sudores nocturnos, esputo, hemoptisis, debilidad generalizada [1, 2].

La TB es una enfermedad que se remonta tiempo atrás al año 460 a.C, Hipócrates y Galeno ya conocían este padecimiento y tenían sospechas de su naturaleza contagiosa. En 1877, Cohnheim y Salamonsen inocularon exitosamente TB en el ojo de un conejo y Tappeiner experimentó con perros mediante la exposición e inhalación de material infectado con TB. Posteriormente, el 24 de marzo de 1882, Koch anunció el descubrimiento del bacilo de la TB [5].

A partir de entonces, la TB se ha convertido en un tema importante de investigación, ya que es una de las 10 causas principales de muerte en el mundo. Sorprendentemente, la TB es la enfermedad provocada por un solo agente infeccioso con más muertes ocasionadas a nivel mundial después del COVID-19. Actualmente, más del 95 % de las muertes por TB se producen mayoritariamente en países emergentes [6, 7]. Según la Organización Mundial de la Salud, en el año 2020, 9.9 millones de personas enfermaron de TB y 1.3 millones murieron por esta enfermedad. Se registró que 30 países con una carga elevada de TB representaron el 86 % de los nuevos casos de la enfermedad. Los continentes más afectados son el asiático y el africano. Por un lado, los países del continente asiático con mayor incidencia de este padecimiento son India, China, Indonesia, Filipinas, Pakistán y Bangladesh [8]. Por otro lado, la mayoría de los países del continente africano se encuentran entre los 20 de países con el mayor número de casos de incidencia de TB, los cuales son: Angola, Congo, Etiopia, Kenia, Mozambique, Myanmar, Nigeria, Sudáfrica,

Tanzania, adicionalmente, La República Centroafricana, Lesoto, Liberia, Namibia, Sierra Leona, Zambia y Zimbawe [6]. Mientras que, en el continente americano, se estimaron 291.000 casos de TB, siendo los países más afectados: México, Perú, Brasil y Argentina [9].

En México, más de 19 mil casos nuevos de TB se registran por año, de los cuales más de 2 mil causan la muerte [10]. De acuerdo con el Programa Nacional de Tuberculosis (PNT) de la Secretaría de Salud de México (SSA) se reporta que en el año 2019 se registraron 22.285 casos nuevos a nivel nacional [11, 12]. Las entidades en el país que concentran el mayor número de casos de TB son: Baja California, Sonora, Sinaloa, Guerrero y Tamaulipas [13].

En México, el número de muertes se ha reducido en más del 45 %, pero la incidencia se ha mantenido, y aunque ha existido una ligera disminución en el número de casos, la TB no se ha logrado erradicar.

Dicha enfermedad es prevenible y curable. Esto depende de un rápido y buen diagnóstico, tratamiento acertado y continuas revisiones de la persona enferma. En la actualidad, el tratamiento consiste en la administración de diversos fármacos de primera línea como la isoniazida [14], rifampicina [15], etambutol [16], etc.

Sin embargo, la TB ha presentado resistencia a los fármacos actuales. Esto se conoce como farmacoresistencia. La causa de la farmacoresistencia se debe a una mala utilización de los medicamentos antituberculosos, ya sea a través de su prescripción incorrecta por los dispensadores de atención de salud, la mala calidad de los medicamentos o la interrupción prematura del tratamiento por la mayoría de los pacientes. La farmacoresistencia puede ser multirresistente (Multidrug-resistant, MDR) o extremadamente resistente (extensively drug-resistant, XDR). La MDR se refiere a que la TB es resistente a más de dos fármacos de primera línea, por otro lado, la TB XDR se define como resistencia a la mayoría de los fármacos del régimen, ya sea a fármacos de primera o segunda línea (fluorquinolonas, capreomicina, protionamida [17]). Este tipo de TB desafortunadamente no tiene cura, dejando como única alternativa, el seguimiento del paciente y tratamientos paliativos. Con el fin de poder contrarrestar la farmacoresistencia se emplea un régimen basado en la administración de algunos fármacos como: ácido aminosalicílico [18], cicloserina [19] y

ciprofloxacina [20]. Contrario a lo esperado, el uso de la mayoría de estas terapias es de acción prolongada, con una eficacia cuestionable y una alta toxicidad [21].

Debido a esto, se han buscado alternativas en el uso de extractos de plantas medicinales y productos naturales para curar la TB, como es el caso de la planta *Camchaya calcárea*, originaria de Tailandia, de la cual se aislaron dos sesquiterpenos con actividad contra la TB [22]. Además, los flavonoides *upinifolinol*, *dehidrolupinifolinol* y *flemichin*, aislados de *Eriosema chinense*, una raíz de origen chino, mostraron una inhibición significativa del crecimiento de *Mtb* [23]. En este sentido, un ejemplo importante es Sudáfrica, en donde las comunidades más afectadas por este padecimiento utilizan la planta endémica de este país *Helichrysum caespititium*, para tratar enfermedades bacteriales como la TB y otras enfermedades respiratorias [24-28].

Helichrysum caespititium (Figura 1) es una hierba postrada y ramificada. Se ha reportado que los basotho, una tribu sudafricana y los pueblos indígenas de Zimbabwe inhalan humo de la planta para el alivio de dolor de cabeza, resfriado y dolor de pecho. Se afirma que los exudados de esta hierba son efectivos contra enfermedades de transmisión sexual, TB y ulceración [25]. *H. caespititium* es rica en floroglucinoles y acilfloroglucinoles que han demostrado actividad anti-bacterial (incluyendo anti-TB) y anti-fúngica [26-28]. A partir de *H. caespititium* se extrae el caespitato ($C_{17}H_{22}O_6$), un acilfloroglucinol con un grupo acilo (RCO) y una cadena prenilada vecinal que tiene un grupo éster terminal de ácido acético. El doble enlace de esta cadena da origen a los isómeros *Z* y *E*, siendo el primero el biológicamente activo (ver Figura 1). Además, esta molécula forma puentes de hidrógeno intramoleculares, los cuales le confieren importantes características estructurales y biológicas [29].

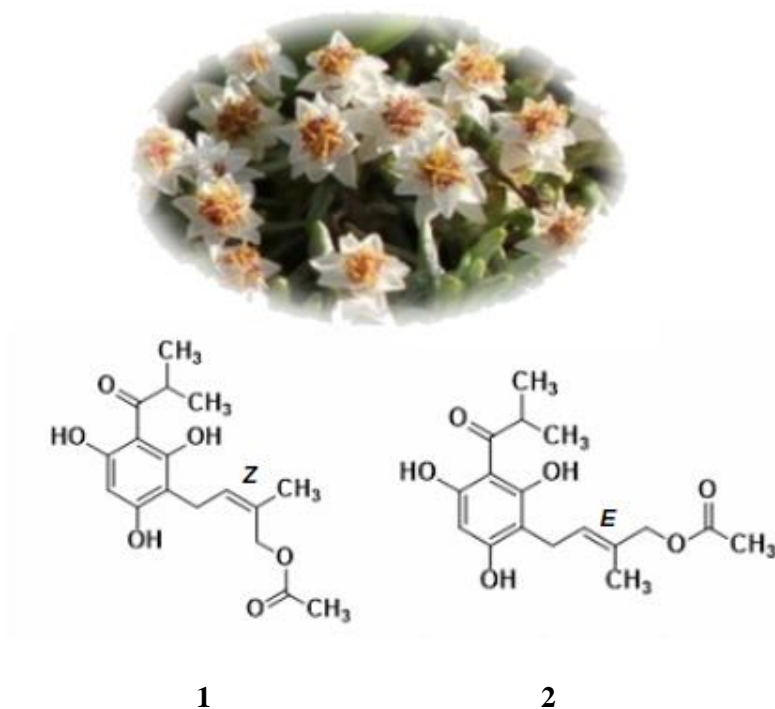


Figura 1. Imagen de la planta *Helichrysum caespititium* y la estructura 2D de los isómeros Z (1) y E (2) de caespitato.

1.2. Actividad anti-tuberculosa del *Helichrysum caespititium*

Entre la diversidad de actividades biológicas que presenta el extracto de la planta *H. caespititium* como antigonorrea, antimicobacteriano, antifúngico y citotóxico [26, 27, 30-34], su actividad anti-TB ha sido ampliamente estudiada.

En 1983, Dekker y colaboradores aislaron el isómero Z del compuesto caespitato, también nombrado acetato de (Z)-2-metil-4-(2,4,6-trihidroxi-3-isobutirilfenil)but-2-en-1-ilo de la planta *H. caespititium* [28]. Posteriormente, Mathekga y colaboradores en el año 2000 aislaron y caracterizaron, con diferentes técnicas espectroscópicas, el mismo isómero de acilfloroglucinol de la planta *H. caespititium*, donde se determinó la actividad antituberculosa, mediante la evaluación las propiedades antimicobacterianas del extracto en acetona y en fase acuosa de la hoja de *H. caespititium* frente a la cepa H37Rv de *Mtb* y a otras cepas sensibles a los fármacos mediante la técnica de la placa de agar, obteniendo una concentración de 0.5 mg/mL contra los patógenos de estudio con el extracto en acetona.

Las actividades exhibidas por el extracto de acetona contra *Mtb* se corroboraron mediante el uso del método radiométrico rápido y se halló que el valor MIC es de 0.1 mg/mL. Se determinó que el valor MIC del caespitato es de 0.1 mg/mL para las cepas de *Mtb*. Estos antecedentes dan la oportunidad para seguir investigando este tipo de compuestos [28, 32].

1.3. Puentes de hidrógeno intramoleculares en los floroglucinoles.

El floroglucinol ($C_6H_6O_3$, 1,3,5-trihidroxibenceno) (Figura 2) es la estructura parental de una amplia clase de moléculas con actividad biológica y está presente en una variedad de productos naturales utilizados en la medicina tradicional en varios continentes debido a su actividad farmacológica de tipo anti-bacterial, anti-viral, anti-fúngica, anti-oxidante y anti-depresiva [35].

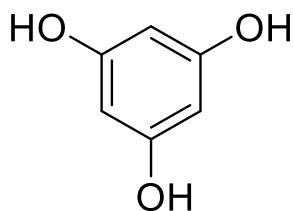
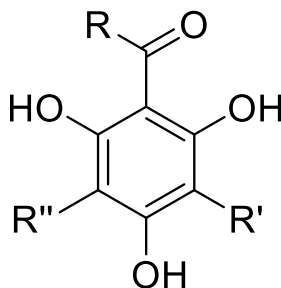


Figura 2. Estructura de floroglucinol.

Por otro lado, los acilfloroglucinoles (ACPLs) (Figura 3) son derivados del floroglucinol que se caracterizan por la presencia de por lo menos un grupo acilo RCO, en su mayoría con un grupo alquilo como sustituyente R [36]. Ambos tipos de compuestos son atractivos por su gran potencial como fármacos debido a la actividad biológica que presentan.



R = Metilo, fenilo o H
R' = Metilo, fenilo o H
R'' = Metilo, fenilo o H

Figura 3. Estructura general de acilfloroglucinoles.

El uso de los floroglucinoles y acilfloroglucinoles para tratar la TB ha llamado la atención de diversos grupos de investigación. Se han estudiado las características estructurales y el efecto estabilizador de los puentes de hidrógeno intramoleculares O–H···O (IHB) de una serie de estructuras representativas de acilfloroglucinoles, concluyendo que los IHB formados dependen del tipo y posición de los grupo OH que contienen los derivados de esta molécula, los cuales interactúan con otras moléculas de agua, esto es relevante en el análisis de parámetros como el reconocimiento molecular, actividad antitumoral y selectividad química, los cuales son indicadores importantes de la posibilidad para utilizarse como fármacos potenciales contra la TB [37, 38].

Mammino y Kabanda en 2007, analizaron la influencia de los IHBs sobre las preferencias conformacionales y la energía de estructuras modelo de floroglucinoles acilados. Se calcularon y compararon todas las conformaciones geométricas posibles para cada acilfloroglucinol usando métodos semiempíricos AM1 y PM3, métodos *ab initio* HF y MP2, y cálculos DFT con el funcional B3LYP. Para el caespitato, los resultados mostraron una preferencia del primer IHB de formarse del mismo lado de la cadena prenilada y la influencia de diversos aspectos de la orientación de los grupos OH en la formación de un segundo IHB [38].

Posteriormente, se analizaron las características de los IHBs en una serie de acilfloroglucinoles con diferentes sustituyentes, donde concluyeron que las características de los IHBs no son dependientes del tamaño y tampoco de la estructura del sustituyente, sino de las características del grupo floroglucinol. La eliminación de los IHBs provoca un cambio relevante en la geometría, minimizando la repulsión del par libre de electrones del átomo de O, encontrando que el aumento de energía asociado a la eliminación del IHB sigue patrones similares usando cálculos MP2 y B3LYP en fase gas [39].

Adicionalmente, se estudió el efecto del disolvente sobre los IHBs de una serie de acilfloroglucinoles, incluyendo la molécula de caespitato, usando tres disolventes con diferentes polaridades: agua, acetonitrilo y cloroformo, utilizando el modelo de solvatación implícita PCM. Los cálculos se realizaron en los niveles de teoría HF/6-31G(d,p) y MP2/6-31G(d,p), donde se concluye que el medio tiene poca influencia en los parámetros de los IHBs. También se analizó el aumento de la energía con la eliminación de los IHBs en las

diferentes fases de disolución, sin embargo, varios factores indican que la fuerza de los IHBs es similar a la calculada en fase gas [40].

Se analizó la contribución de los IHBs más débiles en la estabilización conformacional de diferentes acilfloroglucinoles, considerando los puentes de hidrógeno C–H···O y O–H··· π usando los métodos HF, B3LYP y MP2. Los resultados en fase gas y en disolución en cloroformo, acetonitrilo y agua, usando el modelo PCM, mostraron que el IHB asociado a la interacción C–H···O desempeña un papel importante en cualquier disolvente, mientras que el O–H··· π disminuye al aumentar la polaridad del disolvente [41].

Un extenso estudio computacional de las preferencias conformacionales de los dos isómeros (*Z* y *E*) de la molécula de caespitato, se llevó a cabo en fase gas y en disolución, con el modelo PCM, en cloroformo, acetonitrilo y agua, para tratar de identificar diferencias significativas. La principal diferencia encontrada fue la mayor capacidad del isómero *Z* para formar un IHB con el grupo éster de la cadena prenilada con un OH vecino, el cual tiene un mayor efecto estabilizador [29].

Posteriormente, se realizó un estudio conformacional en fase gas, cloroformo, acetonitrilo y agua (usando PCM), con los métodos HF, B3LYP y MP2, de 118 acilfloroglucinoles, considerando sustituyentes comunes e investigando las preferencias conformacionales y las energías relativas, así como la influencia de características estructurales específicas. En este estudio se analizaron los aspectos conformacionales más estrechamente vinculados con las actividades biológicas de diferentes compuestos. Los resultados destacaron patrones que permitirían realizar predicciones confiables de las preferencias conformacionales de las moléculas de acilfloroglucinol [42].

Se reportaron las características geométricas y los efectos estabilizadores de los IHBs O–H···O adicionales formados entre el átomo de O sp^2 del carbonilo y un grupo OH en la posición *orto* del fenilo. Se consideró una selección de estructuras representativas con las posibilidades más comunes para la formación de estos IHBs. Se compararon los resultados en fase gas, cloroformo, acetonitrilo y agua (usando PCM). Los resultados mostraron que la formación de los IHBs depende de los tipos y posiciones de los átomos que los forman, y para los resultados en disolución, también de la naturaleza del disolvente. Los efectos

estabilizadores, importantes en fase gas, disminuyeron al aumentar la polaridad del disolvente. En disolución acuosa, los IHBs adicionales pueden actuar como grupos donadores o aceptores para formar IHBs soluto-disolvente [37].

Por otra parte, se han reportado estudios de acilfloroglucinoles incluyendo disolvente explícito. Se estudiaron los efectos del agua como disolvente y la molécula de caespitato como soluto, considerando moléculas de agua explícitas unidas por puentes de hidrógeno a sus centros donador y aceptor. Los cálculos en el nivel de teoría HF/6-31G(d,p) mostraron que el primer IHB de caespitato se mantiene en la mayoría de casos, mientras que el segundo IHB no se forma, debido a que se encuentra en competencia con los puentes de hidrógeno intermoleculares con moléculas de agua. Los arreglos geométricos preferidos de las moléculas de agua alrededor del caespitato fueron identificados [43]. Realizando cálculos en los niveles de teoría HF/6-31G(d,p), MP2/6-31+G(d,p) y MP2/6-31++G(d,p), se analizó la debilidad de los IHB a través de la competencia con la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares con las moléculas de disolvente (agua) para diferentes acilfloroglucinoles.

Los resultados mostraron que la longitud del IHB no se incrementó significativamente en el aducto, lo cual significa que el IHB no se debilita por la presencia del disolvente, mostrando que la región del IHB es hidrofóbica, lo que implica que las moléculas de disolvente no se aproximan al área del IHB, y por lo tanto no compiten por el átomo de H del grupo carbonilo o del grupo hidroxilo. Con los resultados anteriores, se concluye que la fuerza del IHB está relacionada con la distribución de los sitios donadores o sitios aceptores de puentes de hidrógeno en las moléculas de acilfloroglucinoles [37, 40, 44]. Finalmente, se analizó la presencia de varios sitios donadores o aceptores de puente de hidrógeno en aductos con moléculas de agua explícitas rodeando toda la molécula de acilfloroglucinol, considerando aductos de todos los conformeros relevantes calculados con el nivel de teoría HF/6-31G(d,p).

Se concluyó que las moléculas de agua explícitas consideradas en la primera capa de solvatación indican la influencia de las características estructurales y geométricas en el arreglo y disposición de las moléculas de agua alrededor del acilfloroglucinol y en la energía de interacción agua-acilfloroglucinol [29, 41, 45].

1.4. Blancos terapéuticos en *Mycobacterium tuberculosis*.

La actividad farmacológica de los conformeros más estables y poblados de caespitato se evaluarán como posibles inhibidores de la actividad de las enzimas 2-trans-enoil-ACP reductasa (InhA), β -cetoacil-ACP reductasa (MabA), UDP-galactopiranos mutasa (UGM) y la enzima pantotenato quinasa (PanK), las cuales han tomado relevancia en los últimos años en la investigación de fármacos anti-TB, pues en el caso de las tres primeras, están involucradas en la biosíntesis de la pared celular de *Mtb*, mientras que PanK está involucrada en el crecimiento celular de esta micobacteria.

InhA es una proteína transportadora de enoil acil reductasa (ENR) que se encuentra en *Mtb*, cuyo papel es el de catalizar la reducción de trans-2-enoil-ACP de cadena larga en la biosíntesis de ácidos grasos de tipo II de *Mtb*. La inhibición de InhA interrumpe la biosíntesis de los ácidos micólicos que son componentes centrales de la pared celular micobacteriana [46,47]. Estructuralmente hablando, la enzima InhA es un homotetrámero compuesto por dos subunidades A y B, dos subunidades C y D, y dos subunidades E y F, todas iguales entre sí, que proporcionan un sitio de unión al cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (Figura 4).

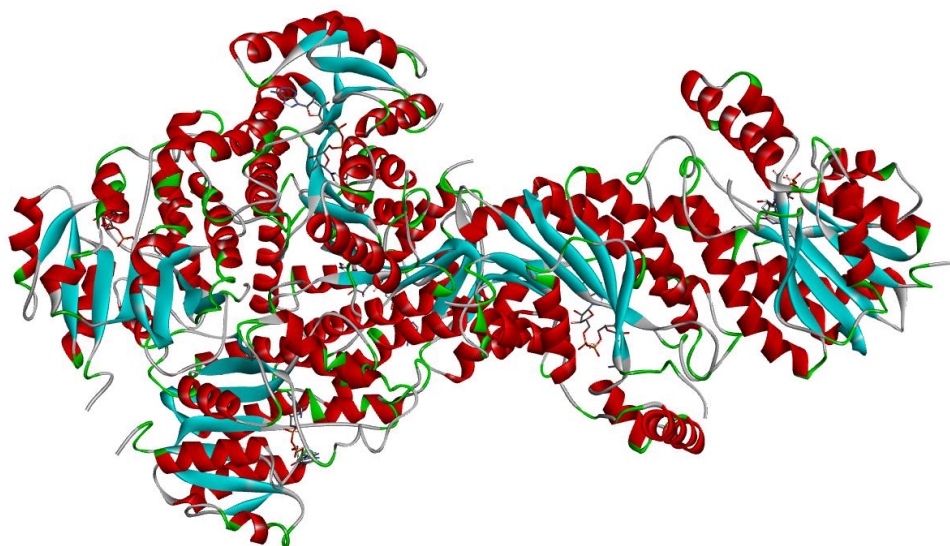


Figura 4. Estructura 3D de la proteína transportadora de enoil acilo reductasa (InhA) en cintas y el cofactor NAD en bastones.

MabA es un miembro del sistema FAS-II, que alarga los precursores de los ácidos grasos acilados dando lugar a la larga cadena de carbono de la rama meromicolato de los ácidos micólicos, el sello distintivo de las micobacterias [47]. Esta enzima es clasificada como transferasa y está constituida estructuralmente por una cadena nombrada como A. Es esencial para la supervivencia de *Mtb*. Se ha demostrado que la fosforilación postraduccional de MabA por la actividad de la proteína quinasa Ser/Thr regula negativamente la biosíntesis del ácido micólico [48]. Las deshidratasas de *Mtb* FAS-II (HadAB y HadBC) y las metiltransferasas forman parte de un interactoma de biosíntesis de ácidos micólicos y participa en la coordinación de la elongación y su modificación química (Figura 5) [49-51].

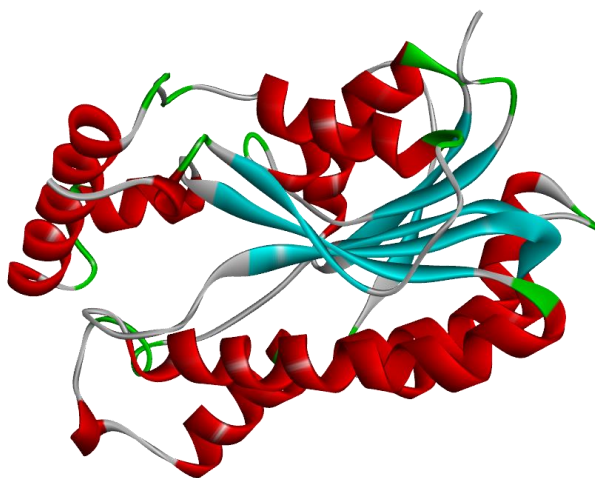


Figura 5. Estructura 3D de la proteína transportadora de β -cetoacil-ACP reductasa (MabA) en cintas.

Las enzimas InhA y MabA pertenecen al tipo II del sistema de elongación de ácidos grasos conocido como FAS-II. Ambas enzimas están relacionadas funcional y estructuralmente, pues presentan la misma especificidad por los sustratos de cadena larga y son inhibidas por el fármaco de primera línea isoniazida [52-56]. En 2015 Shilpi y colaboradores, llevaron a cabo estudios de acoplamiento molecular de dos derivados del ácido elágico: el ácido pteleoelágico aislado de *Ludwigia adscendens* y el ácido 3,3'-di-O-metil elágico 4-O- α -rhamnopiranosido aislado de *Trewia nudiflora*, para investigar su unión con InhA, MabA y Pank [57]. En 2021, Rafael Baptista y colaboradores, utilizaron un enfoque de acoplamiento molecular inverso para predecir las interacciones de 53 productos naturales

que han demostrado tener actividad *in vitro* contra *Mtb* frente a dianas micobacterianas “farmacológicamente viables” conocidas como ClpP1P2, DprE1, InhA, KasA, PanK, PknB y Pks13 [58]. Por otro lado, en el año 2020, Venugopala y colaboradores, analizaron la actividad antituberculosa *in vitro* de una serie de indolizinas 1,2,3-trisustituidas en células enteras frente a cepas de *Mtb* susceptibles H37Rv y multirresistentes (MDR). Esta serie de indolizinas trisustituidas fueron activas frente a la cepa H37Rv con una concentración inhibitoria mínima (MIC) que osciló entre 4 y 32 $\mu\text{g/mL}$, mientras que las indolizinas con un grupo éster etílico en la posición 4 del anillo de benceno, también mostraron actividad anti-MDR-MTB (CIM = 16-64 $\mu\text{g/mL}$). El estudio de acoplamiento *in silico* reveló que la proteína transportadora de InhA y la antranilato fosforibosiltransferasa son dianas moleculares potenciales de las indolizinas [59].

UGM es un biocatalizador involucrado en la conversión de la uridina difosfogalactopiranososa (UDP-GalP) en uridina difosfogalactofuranosa (UDP-GalF), que es un componente importante para la construcción de la pared celular de *Mtb* [60-62], en su biosíntesis interviene la flavoenzima UGM, que produce el precursor Gal f : UDP-Gal f . Esta enzima cataliza la interconversión de UDP-galactopiranososa (UDP-Gal p) en UDP-Gal f mediante la explotación del cofactor flavin adenina dinucleótido (FAD). Esta enzima pertenece a la familia de isomerasas y está constituida estructuralmente por 3 cadenas nombradas por simplicidad como A, B y C. Al ser una apoenzima, UGM requiere de un cofactor, es decir, una molécula de naturaleza no proteica que le proporcione los grupos funcionales que le hacen falta para llevar a cabo su actividad catalítica. El cofactor de UGM es flavin adenina dinucleótido (FAD) (Figura 6) [63, 64].

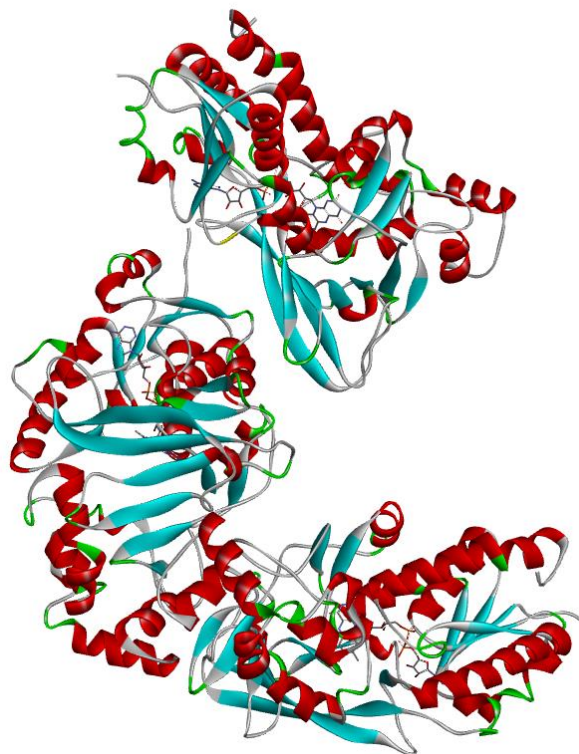


Figura 6. Estructura 3D de la enzima uridina 5'-difosfato (UDP) galactopiranososa mutasa (UGM) en cintas y el cofactor FAD en bastones.

Dado que UGM está ausente en mamíferos [65], la inhibición de esta isomerización enzimática representa una atractiva estrategia terapéutica, por ello, en 2017, el grupo de investigación de Vincent, reportaron un estudio de una nueva clase de flavonoides, que son potentes inhibidores de UGM derivados de un cribado de productos naturales. Además, realizaron la síntesis de nuevos flavonoides metilados y analizaron la relación estructura-actividad, determinando qué grupos funcionales y elementos estructurales eran necesarios para la inhibición de la UGM, reportando que el modo de unión de uno de los mejores inhibidores resultó ser no competitivo. Por otro lado, reportaron las simulaciones de acoplamiento donde concluyeron que era probable que esta molécula se uniera a UGM en su conformación abierta, en una cavidad recientemente identificada como bolsillo “drogable” (Gln167–Arg184), el cual está directamente relacionado con el sustrato. Este bucle se cierra al unirse el sustrato al sitio activo y permanece abierto cuando el bolsillo está vacío [66]. En 2018, Hassan y colaboradores, exploraron la eficacia antimicrobiana del ácido psorómico (PA) derivado de líquenes frente a cepas clínicas de *Mtb*. Además, se

estudió la eficacia inhibitoria del PA frente a dos enzimas críticas asociadas a *Mtb*, UGM y arilamina-*N*-acetiltransferasa, como dianas farmacológicas para la terapia antituberculosa [67].

Finalmente, se conoce que la enzima PanK, que interviene en la biosíntesis del cofactor coenzima A (CoA) a partir del ácido pantoténico, es esencial para el crecimiento de *Mtb*. [68]. Su función se basa en catalizar la fosforilación del pantotenato, el primer paso comprometido y limitante de la biosíntesis de la coenzima A (CoA). Esta enzima está clasificada como transferasa y tiene 2 cadenas en su estructura, llamadas A y B. La isoforma de tipo I codificada por el gen *CoA* es una enzima pantotenato quinasa esencial *Mtb*, y esta información vital fue explotada para cribar grandes bibliotecas para la identificación de clases mecánicamente diferentes de inhibidores de PanK (Figura 7) [69].

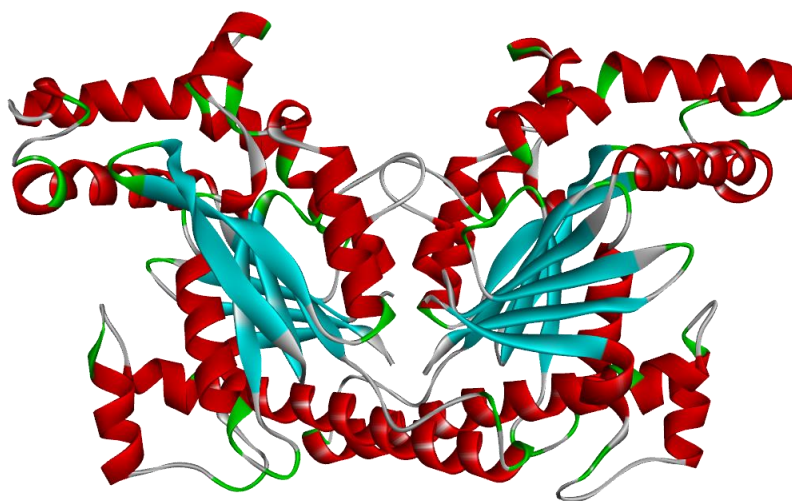


Figura 7. Estructura 3D de la enzima en cintas pantotenato quinasa (PanK tipo I).

En 2018, Chiarelli y colaboradores, reportaron metodologías microbiológicas, bioquímicas e *in silico* para demostrar que dos profármacos 4 y 5 (Figura 8) poseían una segunda diana, la pantotenato quinasa PanK. Además, se demostró que el compuesto 11426026, el metabolito activo del 7947882 también inhibe directamente a PanK. En un cribado independiente de una biblioteca de compuestos contra la CTP sintetasa PyrG, se descubrió que otros dos inhibidores también eran activos contra PanK [70]. Asimismo, los trabajos

mencionados anteriormente en este apartado [57,58], involucran a PanK como un buen blanco terapéutico contra *Mtb*.

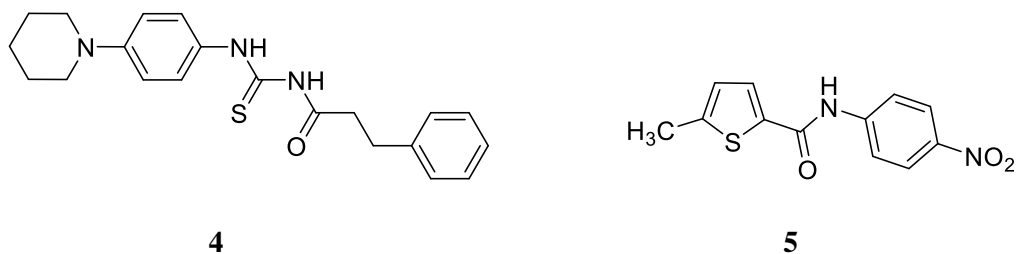


Figura 8. Estructura de los profármacos 5-metil-*N*-(4-nitrofenil)tiofeno-2-carboxamida (4) y 3-fenil-*N*-[(4-piperidin-1-ilfenil)carbamotioil]propanamida (5).

Debido a la importancia de estas enzimas para la supervivencia de *Mtb*, en este proyecto de tesis doctoral se decidió estudiarlas con la finalidad de predecir si es posible que la actividad biológica de la molécula de caespitato sea mediada por el acoplamiento a ellas y tener un panorama más amplio para el desarrollo de fármacos contra la TB.

CAPÍTULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Planteamiento del problema

A pesar de los descubrimientos y aportaciones en la farmacología para combatir la TB, aún no se ha logrado erradicar a nivel mundial. Desafortunadamente los países en vías de desarrollo como Sudáfrica, India y México son afectados por esta enfermedad. Por otro lado, la farmacorresistencia es un factor crucial para la permanencia de este padecimiento, por lo que la población recurre al uso de medicina tradicional, como es el caso de la planta *H. caespititium*, de la cual se han reportado experimentos *in vitro* para inhibir a la *Mtb*. En este sentido, el caespitato es un novedoso acilfloroglucinol aislado e identificado a partir de esta planta. Los resultados muestran la capacidad inhibitoria de crecimiento de la cepa H37Rv con un amplio espectro anti-bacterial. Además, este compuesto es de gran interés de estudio, debido a su estructura privilegiada, pues posee propiedades químicas interesantes como la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares, donde se han estudiado los efectos estabilizadores y diversas conformaciones que posee esta molécula, ya sea en fase gas o en diferentes disolventes. Basándonos en estos hallazgos, se propone abordar esta problemática, desde un enfoque mecano-cuántico, obteniendo los conformeros más estables y poblados, además de estudiar su reactividad química. Por otra parte, se sugiere que la actividad anti-tuberculosis del caespitato se investigue por medio de la inhibición de la actividad de las enzimas esenciales para la supervivencia de *Mtb* como InhA, MabA, UGM y PanK. Una vez que se identifiquen las principales interacciones entre ellos a través de estudios *in silico*, se podrán proporcionar indicios importantes para el diseño de fármacos anti-tuberculosis.

2.2. Hipótesis

Las enzimas InhA, MabA, PanK y UGM son blancos terapéuticos prometedores para la interacción con derivados de compuestos naturales, principalmente a través de interacciones π - π , π -alquilo y de puente de hidrógeno. Además, el conocimiento detallado de las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos y su interacción a nivel molecular

con dichas enzimas ayudarán a identificar las propiedades indispensables de los ligantes que sean clave en el desarrollo subsecuentemente de nuevos compuestos con actividad anti-TB.

Mediante una metodología computacional basada en DFT conceptual, QTAIM y acoplamiento molecular, se propone que el conjunto de conformeros más estables y poblados del compuesto natural caespitato que presenten los mejores índices de reactividad y una mayor cantidad de interacciones no-covalentes, como puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, presenten las propiedades óptimas para interactuar con los blancos terapéuticos específicos de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, como potenciales inhibidores de la actividad de las enzimas transportadora de enoil acilo reductasa (InhA), β -cetoacil-ACP reductasa (MabA), de la proteína uridina 5'-difosfato (UDP) galactopiranosamutasa (UGM) y de la enzima pantotenato quinasa (PanK tipo I), y así proponer compuestos novedosos, selectivos y efectivos para el tratamiento de la TB contribuyendo a su erradicación.

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo general

Estudiar computacionalmente potenciales fármacos anti-tuberculosis derivados de acilfloroglucinol a través de métodos de estructura electrónica, análisis de reactividad química, la teoría cuántica de átomos en moléculas y acoplamiento molecular con las enzimas InhA, MabA, UGM y PanK de *Mtb*.

2.3.2. Objetivos específicos

1. Obtener las estructuras más estables con disolvente implícito y explícito, y más pobladas de caespitato como inhibidor de la actividad de enzimas que constituyen a la bacteria *Mtb*.
2. Obtener los índices de reactividad química basados en la teoría de DFT conceptual y los parámetros topológicos de la densidad electrónica, basados en la teoría cuántica de átomos en moléculas de los conformeros de caespitato como posibles inhibidores de la actividad de las enzimas de *Mtb*.

3. Realizar el acoplamiento molecular entre el ligante caespitato con las enzimas: InhA, MabA, UGM y PanK responsables de la actividad bacteriana de la *Mtb*.
4. Realizar un proceso de refinamiento de la afinidad de las enzimas InhA, MabA, UGM y PanK con caespitato, empleando el método híbrido MM/GBSA.

CAPÍTULO III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1. Ecuación de Schrödinger y Hamiltoniano molecular

En términos de la mecánica cuántica, las propiedades del estado estacionario y la energía de una molécula se calculan al resolver la ecuación de Schrödinger, la cual describe el estado de una partícula mediante la función de onda, esta ecuación tiene la forma:

$$\hat{H}\Psi(\vec{r}, \vec{R}) = E\Psi(\vec{r}, \vec{R}) \quad (3.1)$$

donde Ψ representa a la función de onda que depende de la posición de los núcleos \vec{R} y los electrones \vec{r} en la molécula, \hat{H} es el operador Hamiltoniano y E es la energía del sistema [71].

El Hamiltoniano molecular \hat{H} es la suma de varios términos. Cuando se omiten las interacciones *spin*-órbita, magnéticas y relativistas, el Hamiltoniano del sistema se describe como en la siguiente ecuación:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2}\sum_{i=1}^{elec} \left(\frac{\partial^2}{\partial^2 x_i} + \frac{\partial^2}{\partial^2 y_i} + \frac{\partial^2}{\partial^2 z_i} \right) - \frac{1}{2}\sum_{\mu=1}^{nucl} \left(\frac{\partial^2}{\partial^2 x_\mu} + \frac{\partial^2}{\partial^2 y_\mu} + \frac{\partial^2}{\partial^2 z_\mu} \right) + \sum_{\mu=1}^{nucl} \sum_{v>1} \frac{Z_\mu Z_v}{|\vec{R}_\mu - \vec{R}_v|} - \sum_{\mu=1}^{nucl} \sum_{i=1}^{elec} \frac{Z_\mu}{|\vec{r}_i - \vec{R}_\mu|} + \sum_{\mu=1}^{nucl} \sum_{v>1} \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} \quad (3.2)$$

donde, μ y ν representan a los núcleos, y los electrones se representan como i y j .

El primer término de esta ecuación corresponde al operador de la energía cinética de los electrones. El segundo término es el operador de energía cinética de los núcleos, las repulsiones entre los núcleos corresponden al tercer término, donde \mathbf{R}_μ y \mathbf{R}_ν son vectores de posición de los núcleos ν y μ de número atómico Z_μ y Z_ν . El siguiente término representa la energía potencial de las atracciones entre el núcleo y los electrones, donde \mathbf{r}_i y \mathbf{R}_μ son vectores de posición del electrón i y del núcleo μ . El último término describe al operador de energía potencial de repulsión entre pares de electrones i y j [72].

Resolver esta ecuación representa un gran reto, pues se busca describir los fenómenos físicos a escala microscópica, por lo que se emplean diferentes metodologías bajo ciertas aproximaciones, además el tratamiento mecano-cuántico incluye el cálculo de la función de onda electrónica.

Los métodos más importantes que realizan las aproximaciones en un proceso de minimización de energía electrónica para calcular las propiedades moleculares son: los métodos semiempíricos, los métodos *ab initio* y los métodos DFT. Los métodos semiempíricos utilizan un Hamiltoniano más simple considerando parámetros obtenidos experimentalmente, además son computacionalmente más rápidos, por lo que se pueden aplicar para sistemas de cientos de átomos, sin embargo, su fiabilidad es baja cuando se estudian moléculas con metales de transición o sistemas que no están parametrizados. El método PM3 y su versión mejorada PM6 han tenido gran aceptación para predecir geometrías y entalpías de reacción de compuestos orgánicos. Los métodos *ab initio* no emplean información empírica que no sea la de las constantes físicas fundamentales (constante de Planck, velocidad de la luz, masa y carga del electrón y del núcleo), además en contraste con los métodos semiempíricos, los métodos *ab initio* usan el Hamiltoniano molecular verdadero.

Con estos métodos es posible predecir una gran variedad de propiedades moleculares con una exactitud considerable. Sin embargo, los métodos exactos tienen altos costos computacionales y requieren de gran cantidad de tiempo computacional. Dentro de los métodos *ab initio*, los métodos de Moller-Plesset (MP) y de Coupled-Cluster (CC), llamados métodos post-Hartree Fock son altamente considerados por su capacidad para describir la correlación electrónica, los cuales se pueden ordenar jerárquicamente de la siguiente forma: HF → MP2 → CCSD → CCSD(T). Finalmente, los métodos basados en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) no calculan la función de onda. Éstos se basan en la densidad electrónica para calcular todas las propiedades del sistema.

En este proyecto de tesis se usó la teoría DFT, por lo que se describe con más detalle en la siguiente sección.

3.2. Teoría del Funcional de la Densidad (DFT).

En la teoría DFT, no se calcula la función de onda molecular, sino se obtiene la densidad de probabilidad electrónica molecular, denotado por ρ , obteniendo la energía molecular a partir de la densidad. Además, es una función que depende de $3N$ variables para N

partículas, es decir, es una función de 3 variables que no depende del número de partículas, lo anterior es una de las ventajas de usar la teoría DFT. Además, permite calcular las propiedades de los sistemas con precisión y con bajo costo computacional.

La teoría DFT se basa en los teoremas de Hohenberg y Kohn [73, 74]. El primer teorema indica que el estado fundamental, denominado \mathbf{E}_0 , se determina por la densidad electrónica, conocida como ρ_0 , como en la siguiente ecuación:

$$E_0 = E_0[\rho_0] \quad (3.3)$$

Por otro lado, el segundo teorema establece que la verdadera densidad electrónica en el estado fundamental (ρ_0) minimiza el funcional de energía $E_0[\rho']$ igual que la verdadera función de onda normalizada del estado fundamental minimiza la integral variacional, de acuerdo con la ecuación:

$$E_0[\rho'] \geq E_0[\rho_0] \quad \text{si} \quad \rho' \neq \rho_0 \quad (3.4)$$

Definiendo $\mathbf{E}_0[\rho_0]$ en términos del funcional de la densidad:

$$E_0[\rho_0] = T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] + E_{en}[\rho_0] + V_{nn} \quad (3.5)$$

donde T representa la energía cinética electrónica, E_{ee} es la interacción electrón-electrón, E_{en} es la interacción electrón-núcleo y V_{nn} es la repulsión internuclear.

El funcional de Hohenberg-Kohn se define por la ecuación (3.6), dividiéndola en dos partes, la parte que considera el funcional para la energía del sistema $T[\rho_0]$ y la interacción electrón-electrón, E_{ee} . Este funcional se expresa de la siguiente manera:

$$F_{HK}[\rho_0] = T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] \quad (3.6)$$

Dividiendo el término $E_{ee}[\rho_0]$ del funcional en dos términos:

$$E_{ee}[\rho_0] = J[\rho_0] + E_{xc}[\rho_0] \quad (3.7)$$

donde $J[\rho_0]$ se refiere a la interacción clásica de Coulomb de la densidad electrónica consigo misma y $E_{xc}[\rho_0]$ contempla las interacciones de correlación, intercambio o corrección a la autointeracción (no clásicas).

Por lo tanto, la energía total se expresa como:

$$E_0[\rho_0] = E_{en}[\rho_0] + V_{nn} + J[\rho_0] + (T[\rho_0] + E_{xc}[\rho_0]) \quad (3.8)$$

Para calcular el término de energía cinética de forma exacta para un conjunto de electrones N , considerando que estos son no interaccionantes y se describen por un orbital Ψ_i , la DFT introduce las ecuaciones de Kohn y Sham [75]:

$$T = \sum_{i=1}^N \langle \Psi_i | -\frac{1}{2} \nabla^2 | \Psi_i \rangle \quad (3.9)$$

Se incorpora en el término E_{xc} , la energía cinética que no se toma en cuenta, al derivar las fórmulas para este término, es un reto, pues este se considera como la suma de diferentes términos expresados de la siguiente manera:

$$E_{xc}[\rho_0] = E_x[\rho_0] + E_c[\rho_0] \quad (3.10)$$

donde, $E_x[\rho_0]$ es un término de intercambio y $E_c[\rho_0]$ es un término de correlación.

Según el método utilizado para calcular el término de intercambio-correlación, los métodos DFT se clasifican de la siguiente manera: métodos de densidad local, métodos X_α , métodos del gradiente corregido y métodos híbridos.

Los funcionales híbridos se usan comúnmente, ya que proporcionan un valor exacto en términos de intercambio por medio del método Hartree-Fock (HF), además de aproximarse al valor de correlación DFT [76].

Uno de los funcionales utilizados en este trabajo es el funcional híbrido de Austin-Frisch-Petersson (APFD) [77]. Este funcional introduce las interacciones atractivas o repulsivas de largo alcance a través de una corrección de dispersión empírica, basada en el modelo de átomo esférico (SAM). Además, reproduce con una alta precisión las energías conformacionales relativas de moléculas orgánicas, de gran importancia para este trabajo. Por otra parte, debido a que estas moléculas también se estudiaron en disolución, fue necesario describir el efecto del disolvente explícito sobre las estructuras obtenidas en el estudio conformacional. El otro funcional utilizado para tal efecto fue el funcional ω B97X-D3, el cual es un funcional híbrido que incluye correcciones de largo alcance y de dispersión. Es adecuado para una amplia gama de aplicaciones, como energías de reacción, interacciones intermoleculares y estados excitados. Es una variante de ω B97X, que está

diseñado para mejorar la precisión termoquímica, la cinética y las interacciones no-covalentes [78].

3.3. Conjunto de funciones base

Los conjuntos de funciones base se definen como un conjunto de funciones exponenciales y funciones angulares combinadas linealmente. El conjunto de funciones base, proporcionan una mejor aproximación a la solución de la ecuación de Schrödinger, además describen los estados electrónicos de las moléculas, mediante la construcción de funciones de onda para los estados electrónicos usando orbitales moleculares. Debido a que estas funciones de onda son aproximaciones, se construye una función para un orbital molecular ψ_i como una combinación lineal de funciones φ_j , estas funciones se pueden considerar como representaciones de los orbitales atómicos:

$$\psi_i = \sum_j c_{ij} \varphi_j \quad (3.11)$$

Los dos tipos de funciones atómicas comúnmente utilizadas son:

El conjunto de funciones tipo Slater (STO), las cuales describen los orbitales atómicos, llevan a cabo el cálculo de las integrales bielectrónicas, el cual requiere de mucho tiempo de cómputo [79].

Este conjunto de funciones de tipo Slater se expresan de la siguiente forma:

$$X^{STO} = N r^{n-1} e^{-\zeta r} Y_{lm}(\Theta, \Phi) \quad (3.12)$$

donde N se define como la constante de normalización, ζ representa a la constante llamada exponente del orbital y determina el tamaño de éste, r representa la distancia electrón-núcleo, n representa el número cuántico principal y el término Y_{lm} representa un armónico esférico.

Para optimizar el tiempo de evaluación de las integrales moleculares, Boys [80] introdujo las funciones de tipo Gaussianas (GTO) que actualmente es el conjunto de base más utilizado. Este tipo de funciones muestran una serie de propiedades para la realización de cálculos moleculares, son una representación menos precisa de los orbitales atómicos, sin

embargo, al reducir el tiempo de resolución de integrales moleculares, se reduce el costo computacional.

El conjunto de funciones de tipo Gaussianas tiene la siguiente forma:

$$X^{GTO} = N x^l y^m z^n e^{-\alpha r^2} \quad (3.13)$$

donde α representa al exponente de la gaussiana y l , m y n representan enteros no negativos. X , y y z son coordenadas al origen. La constante de normalización gaussiana es:

$$N = \left(\frac{2\alpha}{\pi}\right)^{3/4} \left[\frac{(8\alpha)^{l+m+n} l!m!n!}{(2l)!(2m)!(2n)!}\right]^{1/2} \quad (3.14)$$

Cuando $l = m = n = 0$ se tiene un orbital atómico GTO de tipo s , mientras que si $l + m + n = 1$ se tiene un orbital atómico GTO de tipo p , y así sucesivamente. Algunos de los conjuntos de funciones base más utilizados son: el conjunto de funciones de base mínima, el conjunto de funciones de base tipo *split valence*, los conjuntos de funciones base de Dunning [81], el conjunto de funciones base de Ahlrichs [82-84], entre otras. Algunas se describen brevemente a continuación:

El conjunto de funciones extendidas o conjunto base *split valence*, usan más de una función para la representación del orbital atómico. El conjunto de base doble zeta (ξ) se refiere al uso de dos conjuntos de funciones base para cada orbital y así sucesivamente. Se denominan *split valence* debido al desdoblamiento de la base que se restringe solo a la capa de valencia. Los conjuntos diseñados por Pople y colaboradores son del tipo *split valence* [85]. A este conjunto de funciones se les puede añadir funciones de polarización, permitiendo aumentar la flexibilidad de los orbitales, aumentando la deformación de la nube electrónica de los átomos en una molécula. En este tipo de conjunto de funciones base, los valores antes de la G (de Gaussiana) indican las funciones s y p en la base; las funciones de polarización se colocan después de la G. Estos tipos de conjuntos de base tienen la restricción adicional de utilizar el mismo exponente para las dos funciones s y p para los electrones de valencia [86-89].

Por otro lado, las funciones difusas son útiles cuando es necesario añadir funciones con exponentes pequeños, lo cual extiende las regiones de valencia, lo que logra una mejor

representación de las regiones donde los enlaces son débiles, además una ventaja de usar un conjunto de funciones difusas es debido a que los orbitales ocupan una región más grande en el espacio, como los compuestos aniónicos, compuestos con pares de electrones libres, compuestos con puentes de hidrógeno, estado excitados, etc., cuyos orbitales tienen tendencia a expandirse, con densidad electrónica significativa a grandes distancias del núcleo.

En este trabajo se utilizó el conjunto de funciones base 6-311+G(2d,p), una base triple ξ , donde el símbolo “+” indica que se ha añadido un conjunto de funciones *s* difusas y un conjunto de funciones *p* difusas a cada átomo pesado. El “2d” indica que dos conjuntos de funciones *d* de polarización y “p” indica que al hidrógeno se le añaden un conjunto de funciones *p* de polarización. Los conjuntos de funciones base de Pople más utilizadas son por ejemplo: 3-21G, 6-31G(d), 6-31G(d,p), 6-311G(d,p), 6-31+G(d,p), 6-311+G(d,p), 6-311++G(d,p), entre otras.

Ahlrichs y colaboradores diseñaron otros conjuntos de funciones base del tipo SV, SVP, TZV, TZVP, que se refieren a las iniciales de los conjuntos de funciones base de valencia *split valence* y de valencia triple zeta. El conjunto de funciones base *split valence polarized* (SVP) es una contracción [3s2p] de un conjunto (7s4p) de funciones primitivas, mientras que el conjunto *Triple Zeta Valence* (TZV) es una contracción [5s3p] de un conjunto (11s6p) de funciones primitivas. La serie se ha ampliado con un conjunto de bases *Quadruple Zeta Valence* (QZV), que es una contracción [7s4p] de un conjunto (15s8p) de funciones primitivas. Tanto los conjuntos de funciones base TZV como QZV emplean más funciones *s* contraídas que los conjuntos TZ y QZ. Los exponentes *s* y *p*, y los coeficientes de contracción correspondientes se optimizan en el nivel HF, mientras que las funciones de polarización se toman de los conjuntos de funciones base cc-pVxZ. Actualmente se han redefinido estos conjuntos de funciones base generando nuevos conjuntos como Def2SV, Def2SVP, Def2SVPP, Def2TZV, Def2TZVP, Def2TZVPP, Def2QZV, Def2QZVP, Def2QZVPP y QZVP. Los conjuntos de funciones base “Def2” forman un sistema de conjuntos de funciones base contraídas segmentadas para los elementos químicos del H-Rn, proporcionando diferentes niveles de flexibilidad y precisión. Los conjuntos de funciones base se denominan Def2-SV(P) a Def2-QZVPP. Por ejemplo, con el conjunto de base

Def2-TZVP tiene las funciones de polarización en todos los átomos y se obtienen mejores resultados que la mayoría de los conjuntos de base de la serie 6-311G, mientras que con el conjunto Def2-TZVPP es similar a Def2-TZVP, pero con polarización *2p1d* para el átomo de hidrógeno, aumentando la precisión de los resultados.

3.4. Análisis de poblaciones

El análisis de la población se calcula mediante la distribución de Boltzmann en equilibrio termodinámico, involucrando las energías libres relativas, ΔG , utilizando la ecuación:

$$N_i/N_{total} = e^{-\Delta G_i/RT} / \sum_{k=1}^M e^{-\Delta G_k/RT} \quad (3.15)$$

donde N_i es la probabilidad de encontrar el conformero i del número total de conformeros N_{total} , T es la temperatura del sistema a 298.15 K, R es la constante universal de los gases ideales y M es el número de todos conformeros accesibles [90].

3.5. Solvatación implícita

En un sistema soluto-disolvente, la predicción teórica de las propiedades termodinámicas de las moléculas de soluto debe ser precisa. Este requisito se basa en la descripción del disolvente y en la selección de un modelo adecuado que tome en cuenta las interacciones y los átomos que juegan un papel importante en el sistema. Existen diferentes modelos de solvatación, llamados modelos de solvatación implícita y explícita [91, 92]. En esta sección se define el concepto de solvatación implícita y los modelos más utilizados.

En general, la solvatación implícita se refiere a un método de representación del disolvente como un medio continuo que rodea al soluto en lugar de moléculas individuales de disolvente rodeándolo explícitamente. Los modelos de campo de reacción autoconsistente (SCRF, *Self-consistent Reaction Field*), consideran al disolvente como un continuo con una constante dieléctrica uniforme ϵ (campo de reacción). En modelos de solvatación implícita, el soluto se coloca dentro de una cavidad electrostática de tamaño molecular rodeada por un medio dieléctrico que representa el disolvente (medio homogéneo continuo polarizable), es decir, el disolvente se describe mediante un continuo que interactúa con las cargas de la

superficie de la cavidad que están determinadas por el soluto, y el problema se resuelve de forma iterativa [93].

La energía de solvatación se descompone en dos términos principales: energía electrostática (ΔG_{ENP}) y energía de dispersión de cavidad (ΔG_{CDS}), la cual se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{solv}^{\circ} = \Delta G_{ENP} + \Delta G_{CDS} \quad (3.16)$$

Algunos de los modelos de solvatación implícita más utilizados son los siguientes:

Modelo de Continuo Polarizable (PCM, *Polarized Continuum Model*): la cavidad se define como la unión de un conjunto de esferas conectadas a nivel atómico. Este modelo usa una integración numérica sobre la densidad de carga del soluto [94].

Modelo de Continuo Polarizable Conductor (CPCM, *Conductor-like Polarizable Continuum Model*): en este modelo el disolvente se trata como un continuo polarizable similar a un conductor y los principales parámetros para definir el modelo son el índice de refracción y la constante dieléctrica del medio [95].

Modelo de Continuo Polarizable de Isodensidad (IPCM, *Isodensity PCM*): este modelo utiliza una cavidad definida por una isosuperficie de la densidad electrónica. Ésta se define iterativamente ejecutando cálculos SCF con la cavidad hasta que se alcanza una cierta convergencia [91].

Modelo de Isodensidad Autoconsistente PCM (SCI-PCM, *Self Consistent Isodensity*): este modelo es similar al IPCM, pero diferente en su implementación, ya que incluye el cálculo de la cavidad en el procedimiento SCRF para tener en cuenta el acoplamiento entre las dos partes del cálculo (el cálculo SCRF y el cálculo de la superficie de isodensidad) [91].

Modelo universal de Solvatación basado en la Densidad (SMD, *Universal Solvation Model Based on Density*): este modelo se considera una mejora al modelo CPCM, ya que utiliza la densidad electrónica completa del soluto para calcular la contribución de la dispersión de la cavidad, en lugar del área solamente, es decir, el modelo SMD calcula directamente la energía libre de solvatación de un proceso de solvatación ideal, por ejemplo, un gas ideal con una concentración de 1 mol/L o una solución ideal con concentración de 1 mol/L a

298.15 K. Mediante el uso de fórmulas termodinámicas estándar estos parámetros se pueden convertir a energías libres de solvatación de estado estándar. La energía de solvatación estándar se define como la transferencia de moléculas de un gas ideal con presión de 1 bar o una solución ideal con concentración 1 molar. Este modelo requiere más parámetros, lo que lo hace menos flexible para disolventes desconocidos [91]. En este proyecto de tesis se utilizó el modelo de solvatación implícita SMD para evaluar el efecto de disolventes implícitos con diferente polaridad en los conformeros de caespitato.

3.6. Solvatación explícita

En este tipo de modelos, las moléculas de disolvente se incluyen explícitamente para modelar las interacciones electrostáticas soluto-disolvente y reproducir la resistencia por fricción debido a las moléculas de disolvente, también se incluyen las coordenadas y algunos grados de libertad de las moléculas de disolvente. Las aplicaciones de estos modelos se encuentran en las simulaciones de mecánica molecular (MM) y dinámica molecular (MD) o de Monte Carlo (MC). El uso de diversos disolventes comunes, como el agua, han generado modelos ideales, los cuales reducen los grados de libertad evaluados en el cálculo de energía sin perder precisión, sin embargo, estos modelos pueden ser específicos. Se han utilizado ampliamente modelos como:

Potenciales Intermoleculares Transferibles (TIPXP, *Transferable Intermolecular Potentials*): X es un número entero que sugiere el número de sitios utilizados para la evaluación de la energía, es decir, en el modelo TIP3P, los tres sitios residen en los centros de la molécula del agua, donde un centro se encuentra en el átomo de oxígeno y dos en los átomos hidrógeno. En el modelo TIP4P, el cuarto sitio se denomina sitio M y se ubica fuera del centro del átomo de oxígeno a una distancia de 0.15 a lo largo de la bisectriz de los dos enlaces O-H [96].

Modelos de Carga Puntual Simple (SPC, *Simple Point Charge Models*): Un modelo típico de este tipo utiliza un número fijo de sitios (a menudo tres para el agua), en cada sitio se coloca una carga puntual parametrizada y un parámetro de repulsión y dispersión. Estos

modelos suelen estar restringidos geoméricamente con aspectos de la geometría fijos, como la longitud o los ángulos de enlace [97].

Modelo propio de Orbital molecular integrado en N capas + Mecánica molecular (ONIOM, *Our own N-layered Integrated molecular Orbital + Molecular mechanics*): Este método híbrido involucra mecánica cuántica/mecánica molecular (QM/MM), es decir, se aplican diferentes métodos *ab initio*, semiempíricos o de mecánica molecular a distintas partes de un sistema en combinación para producir una geometría y una energía fiables a un coste computacional reducido. Una característica clave del método ONIOM es un sencillo procedimiento de extrapolación lineal, que permite ampliar el método ONIOM a ONIOM (QM1:QM2) de dos capas, ONIOM (QM1:QM2:MM) de tres capas y, en principio, a cualquier método de n capas de n niveles de teoría. El enfoque computacional ONIOM ha resultado especialmente útil para modelar sistemas biológicos, así como complejos metálicos [92, 98]. En este proyecto se utilizó el modelo ONIOM (QM1:QM2), usando XTB2 como QM2, para analizar el efecto de la solvatación explícita sobre los conformeros de caespitato usando diferentes disolventes.

3.7. Reactividad química global

Para conocer la capacidad de un sistema molecular para donar o aceptar electrones es importante definir los orbitales frontera HOMO (por sus siglas en inglés *Highest Occupied Molecular Orbital*) y LUMO (por siglas en inglés *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), los cuales están relacionados con la capacidad de donar o aceptar electrones, es decir, la energía del orbital HOMO, indica donde se encuentra el par de electrones que más fácilmente puede ser donado, mientras que el orbital LUMO, indica si la molécula aceptaría un par de electrones fácilmente (aceptor).

Los índices de reactividad global se calculan usando el enfoque conceptual DFT [99] que define cada uno de los índices a partir de las energías de los orbitales frontera HOMO y LUMO, usando el formalismo de Kohn-Sham con la teoría DFT [99] y el teorema de Koopmans [100], que indica que la energía de ionización de un sistema molecular es aproximadamente igual al negativo de la energía del orbital más alto ocupado (HOMO),

mientras que la afinidad electrónica es igual al negativo de la energía del orbital más bajo desocupado (LUMO).

Los índices de reactividad global basados en lo anterior son:

Potencial químico (μ): está asociado con el intercambio de densidad electrónica con el entorno en el estado fundamental. En términos de las energías de los orbitales HOMO y LUMO se define por la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{E_{\text{LUMO}} + E_{\text{HOMO}}}{2} \quad (3.17)$$

Electronegatividad (χ): es la resistencia a la pérdida de densidad electrónica. Es el negativo del potencial químico. Se define por la siguiente ecuación:

$$\chi = -\frac{E_{\text{HOMO}} + E_{\text{LUMO}}}{2} \quad (3.18)$$

Dureza (η): es la resistencia de una molécula a intercambiar densidad electrónica con el entorno. Su ecuación es:

$$\eta = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}} \quad (3.19)$$

Blandura (S): se define como el inverso de la dureza, a valores altos de blandura el sistema puede modificar fácilmente su densidad electrónica. Su ecuación es:

$$S = \frac{1}{\eta} \quad (3.20)$$

Índice de electrofilicidad (ω): mide la estabilización de la energía cuando un sistema adquiere carga electrónica adicional proveniente de los alrededores. Su ecuación es la siguiente:

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (3.21)$$

3.8. Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas (QTAIM)

La Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas (QTAIM) fue propuesta por Bader y colaboradores [101] como una herramienta para entender el enlace químico y las propiedades atómicas. En esta teoría la estructura molecular es caracterizada por la

topología de la distribución electrónica $\rho(r)$, donde la morfología dominante define un átomo en una molécula. Dicha morfología se asocia a la cantidad y tipo de características topológicas de la distribución de la densidad electrónica. La densidad electrónica de las moléculas $\rho(r; X)$ se define con la siguiente ecuación:

$$\rho(r; X) = N \int d\tau' \Psi^*(x; X)\Psi(x; X) \quad (3.22)$$

donde N representa el número de electrones, $d\tau'$ es el elemento de volumen, r son las coordenadas electrónicas y X son las coordenadas nucleares.

Esta teoría tiene su fundamento en la topología de ρ y en la topología del Laplaciano de ρ , es decir en $\nabla^2\rho(r)$.

Las características topológicas de la densidad electrónica se describen mediante los puntos críticos de enlace (BCP, *Bond Critical Point*) y líneas de gradiente. El gradiente de $\rho(r)$ contribuye a la construcción de la estructura molecular, es importante mencionar que los valores de $\rho(r)$ en los puntos críticos (el gradiente se anula) y en los campos escalares son imprescindibles para la caracterización del enlace químico de las moléculas.

Debido a la gran utilidad de las propiedades topológicas de la densidad y sus derivadas, el estudio del enlace se realiza mediante los puntos críticos de enlace (BCP), el cual se define como un punto a lo largo de la trayectoria del enlace en la superficie entre los átomos, donde el gradiente del campo densidad de carga es cero, es decir, la densidad electrónica que ambos átomos comparten alcanza un mínimo. Existen diferentes tipos de puntos críticos descritos en la Tabla 1, los cuales están asociados a las características estructurales del sistema químico.

Por consiguiente, los puntos $(3,-1)$ son importantes ya que indican que matemáticamente existe un enlace químico entre dos átomos. Además, los puntos de anillo $(3,+1)$ permiten la caracterización matemática de la existencia de una estructura cíclica.

El Laplaciano de la densidad, $\nabla^2\rho(r)$ se obtiene al aplicar el operador ∇^2 a una función escalar. Este se relaciona con el teorema local del virial [102], que menciona que cuando el Laplaciano de la densidad tiene valores positivos, los electrones están deslocalizados y cuando el Laplaciano de la densidad tiene valores negativos, los electrones de un sistema

están localizados. Lo anterior indica que cuando el valor de $\nabla^2\rho(r)$ es negativo existe la formación de enlaces covalentes, por el contrario, cuando el valor de $\nabla^2\rho(r)$ es positivo habrá interacciones no-covalentes: interacciones electrostáticas, fuerzas intermoleculares de van der Waals, puente de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas [103].

Tabla 1. Clasificación de puntos críticos en la Teoría de Átomos en Moléculas.

Tipo de punto crítico	Definición
(3,-1) Punto crítico de enlace (BCP: <i>bond critical point</i>)	Punto de silla donde dos curvaturas son negativas, es decir, $\rho(r)$ es un máximo en el plano definido por las dos coordenadas asociadas. La tercera curvatura es negativa, donde $\rho(r)$ es mínimo a lo largo del eje perpendicular a dicho plano.
(3,-3) Punto crítico nuclear (NCP: <i>nuclear critical point</i>)	Todas las curvaturas de la $\rho(r)$ son negativas, es decir, $\rho(r)$ es un máximo en ese punto (r).
(3,+3) Punto crítico de caja (CCP: <i>cage critical point</i>)	Todas las curvaturas de la $\rho(r)$ son positivas, o sea $\rho(r)$ es un mínimo en ese punto (r).
(3,+1) Punto crítico de anillo (RCP: <i>ring critical point</i>)	Punto de silla donde dos curvaturas son positivas, es decir, $\rho(r)$ es un mínimo en el plano definido por las dos coordenadas asociadas. La tercera curvatura es positiva, donde $\rho(r)$ es un máximo a lo largo del eje perpendicular a dicho plano.

La energía cinética Hamiltoniana, $H(r)$, incluye los cálculos de la energía cinética Lagrangiana $G(r)$ y la densidad de energía potencial $V(r)$ en el punto crítico. Esta energía es útil para caracterizar el grado de covalencia de un enlace. Si el valor de $H(r)$ es positivo la acumulación de la densidad de carga entre dos núcleos conduce a una desestabilización del sistema, característico de las interacciones iónicas y de van de Waals. Si el valor de $H(r)$ es negativo, el sistema se estabiliza por la acumulación de densidad de carga electrónica en la región internuclear, la cual se encuentra presente en las interacciones covalentes. La energía cinética Hamiltoniana $H(r)$ se define con la siguiente ecuación:

$$H(r) = G(r) - V(r) \quad (3.23)$$

La energía de interacción, $E_{H...Y}$, es la mitad del valor de la densidad de energía potencial, la cual caracteriza la energía de interacción de un puente de hidrógeno, un valor superior de $E_{H...Y}$, indica que dicho puente de hidrógeno tiene un efecto estabilizador mayor [104]. La energía de interacción $E_{H...Y}$ se define mediante la ecuación:

$$E_{H...Y} = \frac{1}{2}V(r) \quad (3.24)$$

Finalmente, los índices de deslocalización, DI, se definen como una medida de cómo los electrones están deslocalizados entre las cuencas atómicas individuales, también pueden utilizarse para estimar el orden formal de enlace de un enlace químico. Los índices de deslocalización se calculan a partir de matrices de solapamiento atómico. Además, se pueden calcular entre cualquier par de átomos indistintamente si éstos están enlazados o no. Es importante destacar que el índice de deslocalización no mide la deslocalización de los electrones de valencia en todo el sistema molecular. El índice de deslocalización de las interacciones C-C muy débiles se sitúa entre 10^{-2} y 10^{-3} órdenes de magnitud. Por ejemplo, el valor de DI de 10^{-1} orden de magnitud para los enlaces C-C es característico de las interacciones C-C moderadas.

3.9. Acoplamiento molecular

Los estudios de acoplamiento molecular (*Molecular Docking*) son una herramienta computacional que permite explorar la interacción de una molécula (ligante) con una proteína (receptor), conociendo o no su sitio de acción [105]. El uso de esta herramienta ha ganado gran popularidad para identificar nuevos fármacos, en el cribado virtual, etc.

Al realizar un cálculo de acoplamiento molecular, es necesario tomar en cuenta aspectos importantes como la búsqueda conformacional, la representación del sistema, además de otro tipo de parámetros, estos aspectos se relacionan con la elección de la superficie que decide el algoritmo para realizar la búsqueda de conformacional y clasificar las potenciales soluciones. Además, en el acoplamiento molecular, la superficie del receptor se describe mediante modelos matemáticos, ya sean descriptores o un *grid*, el cual puede posicionarse en el sitio activo de la enzima mediante coordenadas o bien, puede abarcar toda la superficie del blanco terapéutico.

Existen dos tipos de acoplamiento molecular, que se conocen como acoplamiento rígido y flexible; ya sea configurando el ligante y la proteína rígidos, o bien manteniendo el ligante flexible y la proteína rígida, o ligante y proteína, flexibles [106].

Al realizar un acoplamiento molecular no se conoce la conformación más adecuada del ligante para interactuar con el blanco terapéutico seleccionado. Por ello, el primer paso para realizar un acoplamiento molecular es la selección del algoritmo, que trata de determinar el modo de unión de un ligante con el receptor. Los algoritmos se pueden clasificar en: métodos sistemáticos o estocásticos. Los métodos de búsqueda sistemáticos tienen ligeras variaciones a nivel estructural, es decir, cambian gradualmente la conformación del ligante, estos métodos pueden clasificarse en:

Exhaustivos: Las búsquedas exhaustivas exploran sistemáticamente los valores de cada grado de libertad de forma combinatoria, rotando todos los ángulos diedros del ligante según un intervalo predeterminado de valores y un conjunto de restricciones iniciales.

Construcción incremental: Es un enfoque de fragmentación basado en la separación del ligante en fragmentos más pequeños, seguido de la selección y acoplamiento de un fragmento base en el sitio de unión del receptor.

Conjunto conformacional: Se encarga de modelar el acoplamiento rígido de un conjunto de conformaciones de ligante previamente generadas en el sitio de unión.

Por otro lado, los métodos estocásticos, modifican de manera aleatoria la estructura de los ligantes mediante la generación de conjuntos de conformaciones moleculares. Este método aumenta la posibilidad de encontrar un mínimo global, sin embargo, el costo computacional es considerable debido a la amplia cobertura del panorama energético. Dentro de los métodos estocásticos se encuentran los algoritmos más importantes que se resumen a continuación:

Emparejamiento rápido de forma (MA, *Matching Algorithms*): Estos algoritmos toman en cuenta la superposición geométrica entre dos moléculas. Además, identifica los posibles sitios de unión del blanco terapéutico por medio de la superficie macromolecular. Un ejemplo es el acoplamiento rígido.

Simulación de Monte Carlo (MC): Este método toma una modificación gradual del ligante por medio de la rotación y traslación del enlace o de todo el ligante. Este algoritmo es diferente a los demás debido a que mantiene un registro de espacio de búsqueda del sitio de unión que ya ha sido estudiado, garantizando una máxima exploración.

Algoritmo genético (GA, *Genetic Algorithms*): Este método proviene de la selección natural, donde se codifican los grados de libertad como cadenas binarias conocidas como genes que a su vez darán origen a los cromosomas, los cuales representan las diferentes poses del ligante. Ambos elementos tienen relación por medio de la mutación y cruce de los operadores genéticos, GA. La mutación produce cambios genéticos de manera aleatoria, el cruce realiza un intercambio genético entre dos cromosomas. Cuando los operadores genéticos afectan a los genes, por lo tanto, el resultado será una nueva estructura de ligante. Estas estructuras se evalúan mediante la función puntuación y las que superan el umbral se usan en la próxima generación.

En la presente tesis doctoral se utiliza el programa AutoDock Vina que emplea el algoritmo genético Lamarckiano [107], así como el programa Glide [108] que hace uso del algoritmo sistemático.

Por otro lado, el siguiente paso en la realización de cálculo de acoplamiento molecular, después de la elección del algoritmo, es hacer uso de las funciones de puntuación (*score function*) que se definen como métodos matemáticos para estimar la afinidad de unión, estas funciones ayudan a la optimización de los resultados del acoplamiento, ya que filtran compuestos de una extensa base de datos mediante una búsqueda virtual, donde la pose de un compuesto debe coincidir con la pose de mejor energía de unión [107]. De esta forma, las funciones de puntuación evalúan las interacciones intermoleculares e intramoleculares, efectos electrostáticos y entrópicos, además de las interacciones de solvatación, lo que hace posible obtener valores de energía de unión real en un tiempo mínimo.

Las funciones de puntuación se clasifican como:

Funciones de puntuación basadas en la física: Este tipo de funciones están basadas en campos de fuerza, métodos de mecánica cuántica y los modelos de solvatación. Las siguientes ecuaciones resumen este tipo de funciones:

Campo de fuerza:

$$E_{bind} = E_{vdW} + E_{elec} \quad (3.25)$$

Mecánica cuántica:

$$E_{bind} = E_{QM/MM} + \Delta G_{solv} \quad (3.26)$$

Modelos de disolvente:

$$E_{bind} = E_{vdW} + E_{elec} + \Delta G_{solv} \quad (3.27)$$

La ventaja de este tipo de funciones se basa en una precisión predictiva mayor que otras funciones *score*, ya que considera la entalpía, la entropía y la solvatación. Éstas pueden calcular directamente las interacciones entre átomos de la proteína y el ligante, además de su energía libre de unión. Sin embargo, las funciones híbridas (MM/QM) tienen un costo computacional elevado. Un ejemplo de *software* que usan funciones híbridas son los programas Glide (Grid-based Ligand Docking with Energetics) [108], el cual está implementado en el programa Schrödinger, y AutoDock Vina [109], usados para realizar los cálculos en el presente trabajo de investigación.

Funciones de *score* empíricas: Estas funciones estiman la afinidad de unión a partir de varios componentes de energía (entropía de enlace, interacciones iónicas, puentes de hidrógeno y efectos hidrofóbicos). Un ejemplo de este tipo de funciones empíricas es la función “*X-score*”. Los beneficios de usar estas funciones de *score*, se basa en su eficiencia, pues son buenas en la predicción de la afinidad de unión, la pose de ligante y el cribado virtual con bajo costo computacional. No obstante, estos beneficios disminuyen cuando se utilizan en la descripción de la relación entre afinidad de unión y estructuras cristalinas.

Funciones de *score* “*Knowledge-based*”: Estas funciones están basadas en el potencial estadístico, utilizan potenciales de energía que se obtienen de la información de estructuras determinadas experimentalmente. El principio de estas funciones de *score* se define por los potenciales por pares que se obtienen de la frecuencia de aparición de pares de átomos en una base de datos. Estas funciones ofrecen precisión y rapidez, además la base de datos puede ser grande y diversa.

La ecuación (3.28) expresa la forma general de la función de puntuación de AutoDock Vina:

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij}) \quad (3.28)$$

donde la suma es sobre todos los pares de átomos que pueden moverse uno respecto al otro, excluyendo normalmente las interacciones 1-4, es decir, átomos separados por tres enlaces covalentes consecutivos. En la ecuación, a cada átomo i se le asigna un tipo t_i , y debe definirse un conjunto simétrico de funciones de interacción $f_{t_i t_j}$ de la distancia interatómica r_{ij} .

En este sentido, la función de puntuación es utilizada para predecir la afinidad de unión del complejo ligante-proteína. Por lo tanto, la siguiente ecuación (3.29) es utilizada en el programa AutoDock Vina para estimar la energía de afinidad:

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{vdW} + \Delta G_{H-bond} + \Delta G_{deformation} + \Delta G_{hydrophobic} + \Delta G_0 \quad (3.29)$$

donde, ΔG_{vdW} representa las interacciones van der Waals entre el ligante y la proteína; ΔG_{Hbond} representa los puentes de hidrógeno entre el ligante y la proteína; $\Delta G_{deformation}$ representa el efecto de deformación; $\Delta G_{hydrophobic}$ representa el efecto hidrofóbico; ΔG_0 es la constante de regresión que incluye implícitamente los efectos debidos a la pérdida de entropía traslacional y rotacional en el proceso de enlace ligante-proteína.

En cambio, el programa Glide, utiliza la función de puntuación *GlideScore*, que incluye un término para el efecto estérico, añade términos para grupos polares ocultos, ya sea al plegarse o al unirse a otra proteína (para penalizar los desajustes electrostáticos), penalizaciones de torsión de amida, términos de la zona hidrofóbica y penalizaciones de volumen excluido, y tiene modificaciones en otros términos, lo anteriormente mencionado se resume en la siguiente ecuación:

$$GScore = 0.05 * vdW + 0.15 * Coul + Lipo + Hbond + Metal + Rewards + RotB + Site \quad (3.30)$$

donde, vdW representa la energía de van der Waals, la cual se calcula con las cargas iónicas reducidas de grupos como metales, carboxilatos y guanidinos. *Coul* es la energía de Coulomb, la cual se calcula de manera semejante a la vdW . El término *Lipo* representa el

término lipofílico, que es un término de pares en SP (*Standard-precision*), pero se deriva del potencial de red hidrofóbico para XP (*Extra-precision*). *HBond* es el término de puente de hidrógeno, el cual se divide en componentes con distinta ponderación, que dependen de la carga del donador y del aceptor, es decir, ambos pueden ser neutros, uno puede estar cargado y el otro no, o ambos pueden estar cargados. El término *Metal*, representa el término de enlace metálico. Sólo se incluyen las interacciones con átomos aceptores aniónicos o altamente polares. El término *Rewards*, significa recompensas y penalizaciones para diversas características, como grupos polares ocultos, zona hidrofóbica, enlaces de hidrógeno correlacionados, etc. El término *RotB* es la penalización por inmovilización de enlaces rotatorios. Y finalmente, el término *Site*, representa las interacciones polares en el sitio activo.

Para proporcionar estimaciones de la energía libre de unión, el programa Glide utiliza la siguiente ecuación:

$$G = E_{bind} + E_{el} + E_{vdw} + G_{pol} + G_{np} - TS \quad (3.31)$$

donde G es la energía total de enlace, la cual se calcula como la suma de los términos de energía mecánica molecular estándar, E_{bind} , que es la energía de las interacciones de enlace, E_{el} , que es la energía electrostática, y E_{vdw} , que representa las interacciones de van der Waals, más las contribuciones a la energía libre de solvatación (ΔG_{solv}): G_{pol} (polar) y G_{np} (no polar), y donde T es la temperatura absoluta, la cual está multiplicada por la entropía.

3.10. Método MM/GBSA

El método de Mecánica Molecular-Generalizada Born/Área de Superficie (MM/GBSA, Molecular Mechanics and Generalized Born Surface Area) identifica y realiza una búsqueda virtual de los ligantes, proporcionando precisión en las energías de unión experimentales. Este método utiliza un modelo de solvatación implícito continuo y una estructura proteica con una energía libre de Gibbs (ΔG) minimizada, discriminando las poses verdaderas de los señuelos [110].

Es un método basado en un campo de fuerza que usa la combinación de energías de MM, y las contribuciones de energía libre de solvatación, es decir, las interacciones de solvatación polar y no polar, y también considera la entropía para calcular la energía libre de unión (ΔG_{bind}) del complejo ligante-proteína, el cambio entre el complejo ligante-proteína unido (ΔG_{P-L}), el receptor no unido ($\Delta G_{P_{non-bind}}$) y el ligante en solución (ΔG_{lig}), lo que se resume en la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{P-L} - \Delta G_{P_{non-bind}} - \Delta G_{lig} \quad (3.32)$$

Los términos anteriores se descomponen en energía de MM en fase gas (ΔE_{MM}) y se toman en cuenta los términos de solvatación polar y no polar (ΔG_{solv}) y de entropía (ΔS) a temperatura pre-establecida (T)

$$\Delta G_{(P-L, P_{nonbind}, \Delta G_{lig})} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{solv} - T(\Delta S) \quad (3.33)$$

ΔE_{MM} es la suma de la energía de enlaces químicos, ángulos y torsión (ΔE_{tor}), las energías de van der Waals (ΔE_{vdW}) y de Coulomb ($\Delta E_{Coulomb}$). ΔG_{solv} son términos de solvatación polar (ΔG_p) y no polar (ΔG_{np}).

$$\Delta G_{(P-L, P_{nonbind}, \Delta G_{lig})} = \Delta E_{tor} + \Delta E_{vdW} + \Delta E_{Coulomb} + \Delta G_{np} + \Delta G_p - T(\Delta S) \quad (3.34)$$

El método MM/GBSA es eficiente y rápido para clasificar las afinidades de unión de los ligantes, además utiliza ligantes estructuralmente diversos.

CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA

4.1 Análisis conformacional

La búsqueda conformacional del caespitato se realizó inicialmente con mecánica molecular (MM) usando el campo de fuerza MMFF94 [111] a través de la utilidad GMMX [112] del programa GaussView 6.0.16 [113]. En este primer paso se generaron 86 conformeros con energías relativas $\Delta E \leq 6$ kcal mol⁻¹. Posteriormente, se realizó una optimización completa para todos los conformeros mediante cálculos DFT con el funcional APFD [77] y el conjunto base 6-31+G(d) [114], obteniéndose las estructuras estables con energías $\Delta E \leq 4$ kcal mol⁻¹.

A continuación, utilizando el mismo funcional APFD con el conjunto base 6-311+G(2d,p) [88] se realizó la optimización completa y el cálculo de frecuencias vibracionales en las estructuras estables con energías $\Delta E \leq 2$ kcal mol⁻¹. Los cálculos de frecuencias vibracionales se realizaron para poder obtener los correspondientes parámetros termoquímicos y asegurar estructuras que correspondieran a mínimos locales en la superficie de energía potencial sin frecuencias imaginarias para cada conformero ($\nu_i > 0$). Los cálculos se realizaron en fase gas y tomando en cuenta la disolución implícita y explícita con los disolventes de agua, cloroformo, acetonitrilo y DMSO. Todas las optimizaciones, frecuencias vibracionales y cálculos de función de onda se realizaron con el programa Gaussian 16 [115].

4.2. Análisis poblacional

Se realizó el análisis poblacional usando la ecuación de la distribución de Boltzmann (3.15) para determinar el porcentaje de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en los diferentes disolventes: agua, cloroformo, acetonitrilo y DMSO.

4.3. Solvatación implícita y explícita

Se consideró el efecto del disolvente utilizando el modelo de solvatación implícita SMD [91] para la evaluación de las diferentes estructuras conformacionales y energéticas de los

confórmeros más estables y poblados de caespitato. Los cálculos se llevaron a cabo con disolventes de diferentes polaridades (diferente constante dieléctrica, ϵ) como son: agua ($\epsilon=78.4$), cloroformo ($\epsilon=4.7$), acetonitrilo ($\epsilon=35.7$) y DMSO ($\epsilon=46.8$) [116].

Además, se utilizó la metodología ONIOM (QM:XTB2) [92] para simular el efecto explícito del disolvente. El modelo multiescala utilizado es QM1:QM2, como primera capa QM1 se utilizó el nivel de teoría ω B97X-D3/Def2-TZVP [78, 117] adicionando en el cálculo el conjunto de bases auxiliares Def2/J [118] y Def2-TZVP/C [1159] sobre la geometría de los confórmeros más estables y poblados de caespitato. En la segunda capa QM2, se empleó un nivel semi-empírico que utiliza el efecto de la dispersión XTB2 [120, 121] para simular las moléculas de cada uno de los disolventes: agua, cloroformo, acetonitrilo y DMSO. Para representar adecuadamente las interacciones soluto-disolvente a través del modelo de solvatación explícito se construyó una caja cúbica de 30 x 30 x 30 Å con 31 moléculas de cada disolvente para rodear a la molécula de caespitato usando el programa Autosolvate [122]. Los cálculos usando ONIOM (QM:XTB2) se realizaron en el programa ORCA 5.0.3 [123]. La visualización de los resultados se llevó a cabo utilizando los programas GaussView 6.0 [113] y ChemCraft 1.8 [124].

Se analizaron las diferencias geométricas entre los confórmeros obtenidos con disolvente implícito y explícito mediante los valores de la raíz de la desviación cuadrática media o desviación de la media cuadrática (RMSD, *Root Mean Square Deviation*) utilizando el programa VMD [125].

4.4. Análisis de reactividad global

De los confórmeros de caespitato más estables y poblados en cada fase, se analizaron los índices de reactividad global como potencial químico (μ), electronegatividad (χ), dureza (η), blandura (s) e índice de electrofilicidad (ω) a partir de las energías de los orbitales frontera HOMO y LUMO mediante la teoría DFT conceptual, el teorema de Koopmans y el formalismo de Kohn-Sham [99, 100], usando las ecuaciones (3.17-3.21). Las isosuperficies de los orbitales frontera HOMO y LUMO se graficaron con un isovalor de 4.0×10^{-4} u.a. Las isosuperficies de los potenciales electrostáticos moleculares (MEP) se graficaron con un

isovalor de 4.0×10^{-4} u.a. en un intervalo de -3.0×10^{-2} e a.u.⁻³ to 3.0×10^{-2} e a.u.⁻³. Ambas isosuperficies se graficaron en el programa GaussView 6.0 [113].

4.5. Análisis QTAIM

Se realizó la caracterización de los puentes de hidrógeno intramoleculares de caespitato, mediante los parámetros topológicos de la densidad empleando la Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas (QTAIM) [101]. Se analizó la densidad electrónica $\rho(r)$ en los puntos críticos de enlace (BCP), el Laplaciano de la densidad, $\nabla^2 \rho(r)$, la energía cinética Lagrangiana, $G(r)$, la energía cinética Hamiltoniana, $H(r)$ (ecuación 3.23), la densidad de energía potencial, $V(r)$, la energía de interacción, $E_{H...Y}$ (ecuación 3.24), la distancia interatómica, D_{inter} , el ángulo de valencia, A_{inter} , y los índices de deslocalización, DI . El análisis QTAIM se realizó con el programa AIMAll 17.11.14 [126].

4.6. Validación de los modelos de disolvente mediante espectroscopia de RMN

Los modelos de disolvente implícito y explícito se validaron mediante espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C. Los cálculos de RMN se realizaron con el método GIAO (*Gauge Including Atomic Orbitals*) [127]. Se utilizó la molécula de tetrametilsilano (TMS) como referencia, la cual se optimizó usando los mismos modelos implícito y explícito. Los cálculos de espectroscopia de RMN se realizaron utilizando el programa Gaussian 16 [115].

4.7. Acoplamiento molecular

Para los estudios de acoplamiento molecular, se utilizaron como ligantes los confórmers más estables y poblados en fase gas y en los disolventes implícitos: agua, cloroformo, acetonitrilo y DMSO. Las estructuras cristalinas de las enzimas InhA (PDB ID: 1BVR), MabA (PDB ID: 1UZN), UGM (PDB ID: 4RPJ) y PanK (PDB ID: 4BFW) fueron extraídas de la base de datos Protein Data Bank [128]. En la preparación de las cuatro proteínas se eliminaron las moléculas de agua y residuos usando el programa Chimera [129].

Posteriormente, se usó el programa AutoDock Tools 1.5.7 (ADT) [107] para adicionar a la proteína hidrógenos polares y cargas de Kollman, mientras que para los ligantes se añadieron las cargas Gasteiger y se detectaron los enlaces rotables. Los cálculos de acoplamiento molecular se realizaron con el programa AutoDock Vina 1.1.2 [109], usando el algoritmo genético Lamarckiano. En general, los parámetros del tamaño de la caja se configuraron con ADT. El tamaño de la caja se fijó en 30 x 30 x 30 Å para todas las enzimas excepto para MabA, con tamaño de 22 x 22 x 22 Å. La caja se encuentra centrada en el ligante, ubicada en los sitios activos de las enzimas InhA, MabA, UGM y PanK, los cuales se identificaron previamente [51, 54, 130, 131]. Se realizaron cálculos de acoplamiento semiflexible (ligante libre y proteína rígida) y de acoplamiento rígido (proteína y ligante rígidos). La representación gráfica de los resultados de AutoDock Vina del acoplamiento molecular en 3D y en 2D se realizó en el programa Discovery Studio Visualizer [132].

Por otro lado, se utilizó el algoritmo de acoplamiento del módulo Glide del programa Schrödinger [108] para realizar los mismos cálculos de acoplamiento semi-flexible y rígido llevados a cabo con el programa AutoDock Vina. Las estructuras de las enzimas InhA, MabA, UGM y PanK, previamente limpias (remoción de moléculas de agua y residuos con el programa Chimera [129]), se prepararon usando el asistente de preparación de proteínas *Protein Preparation Wizard*. Esta preparación implica la inserción de átomos de hidrógeno faltantes, un pre-procesamiento de la estructura, el ajuste de los órdenes de enlace del cofactor y las cargas formales y, por último, se ejecuta una minimización de la estructura de la proteína. Por otro lado, a las geometrías de los ligantes previamente optimizadas en fase gas y en disolución implícita, se les asignaron las cargas parciales mediante el visualizador Maestro 11.8 [133]. La caja se fijó en el sitio activo de cada enzima con un tamaño de 20 Å de forma predeterminada, esto se realizó con el módulo *Receptor Grid Generator*. Se realizó un acoplamiento rígido y se seleccionó la mejor pose basándose en la puntuación de acoplamiento de *Glide XP* con el algoritmo sistemático [108]. La representación gráfica de los resultados del módulo de Glide del acoplamiento molecular en 3D y en 2D se realizó en el programa Discovery Studio Visualizer [132]. Estos resultados se aproximaron a los obtenidos con acoplamiento rígido con AutoDock Vina, tanto en las energías de afinidad

como en las interacciones observadas y los cuales se utilizaron posteriormente para los cálculos MM/GBSA como se describe en la sección 4.9.

4.8. Validación de los cálculos de acoplamiento molecular.

La validación de los cálculos de acoplamiento molecular con las enzimas InhA, UGM y PanK se realizó utilizando tanto AutoDock Vina [109] como Glide [108]. Esta validación se realizó mediante *re-docking*, comparando los ligantes co-cristalizados de cada una de las enzimas y las poses obtenidas del acoplamiento molecular, obteniendo valores de RMSD < 1 Å, dando la oportunidad de proceder con el protocolo de acoplamiento válido.

Para la enzima MabA la validación se realizó reproduciendo los resultados de acoplamiento molecular reportados en el estudio previo [57], donde se usó el inhibidor dinucleótido de isonicotínico-acetil-nicotinamida-adenina como ligante, extraído de la estructura cristalina con el PDB ID: 1ZID. La validación del acoplamiento molecular con la enzima MabA se realizó utilizando el programa AutoDock Vina [109].

4.9. Estudio MM/GBSA

La metodología MM/GBSA se aplicó sobre los resultados de acoplamiento molecular rígido obtenidos con el módulo Glide implementado en el programa Schrödinger [108]. Se calcularon las energías libres de unión con el método híbrido MM/GBSA usando el módulo Prime MM/GBSA implementado en el programa Schrödinger [133]. Se usó el modelo de solvatación VSGB 2.0 y el campo de fuerza OPLS3 [134], que contiene parámetros de van der Waals y cargas atómicas, además de realizar un ajuste de energía libre de solvatación. En la parte de flexibilidad de la proteína se tomaron los parámetros por *default*:

- Solvatación: La utilidad *Solvation model* permite elegir el modelo utilizado para solvatar a la proteína. Por *default* el modelo que utiliza es VSGB, que es un modelo acuoso para estructuras proteicas de alta resolución. Presenta un modelo de disolvente implícito optimizado, así como correcciones para los puentes de hidrógeno, las interacciones π - π y las interacciones hidrofóbicas.

- Cargas parciales del ligante de entrada: Se utilizan las cargas parciales de los ligantes de entrada en lugar del campo de fuerza.
- Flexibilidad de la proteína: Este paso es opcional y define una región dentro de cierta distancia del ligante para la cual la estructura de la proteína se relajará en el cálculo. El parámetro por *default* es de 0.0 Å.

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Análisis conformacional y poblacional en fase gas y con disolvente implícito

Se obtuvieron 24 conformeros en fase gas (G), 10 en agua (A), 26 en cloroformo (C), 33 en acetonitrilo (Ac) y 34 en DMSO (D) con energías libres ≤ 2 kcal mol⁻¹ en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p). En la Tabla 2 se muestran únicamente las energías libres relativas, ΔG , y los porcentajes de población de los cinco conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución.

En fase gas, la energía absoluta para el conformero de menor energía G1 es de -1111.89 u.a. en comparación con -1105.80 u.a., previamente obtenido en el nivel de teoría HF/6-31G(d,p) en fase gas [29], mostrando claramente la influencia de incluir términos de dispersión al utilizar el funcional APFD. En trabajos anteriores, se ha reportado la importancia de incluir el efecto de la correlación electrónica y funciones difusas para describir adecuadamente la formación de los IHBs con los métodos B3LYP y MP2. Los resultados obtenidos con HF, B3LYP y MP2 mostraron patrones geométricos similares [29, 37, 39-42].

Las Figuras 9 a 13 muestran las estructuras moleculares optimizadas de los conformeros más estables de la molécula caespitato obtenidas en fase gas (Figura 9), agua (Figura 10), cloroformo (Figura 11), acetonitrilo (Figura 12) y DMSO (Figura 13).

Tabla 2. Energía libre relativa (ΔG), porcentaje de población (%) y formación de los IHBs de los confórmeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en fase gas y en disolución implícita usando el modelo SMD.

Confórmero	ΔG (kcal mol⁻¹)	Population (%)	Número de IHBs	Tipo de estructura
Gas				
G1	0.0000	24.60	1er y 2do IHB	Extendida
G2	0.0971	23.65	1er y 2do IHB	Extendida
G3	0.5277	19.88	1er y 2do IHB	Extendida
G4	3.2109	6.73	1er y 2do IHB	Horquilla
G5	3.3738	6.31	1er y 2do IHB	Horquilla
Agua				
A1	0.0000	26.50	1er IHB	Horquilla
A2	1.0738	17.19	1er y 2do IHB	Horquilla
A3	1.3810	15.18	1er IHB	Horquilla
A4	1.5648	14.10	1er IHB	Horquilla
A5	2.2422	10.72	1er IHB	Horquilla
Cloroformo				
C1	0.0000	49.10	1er y 2do IHB	Extendida
C2	1.9061	22.76	1er y 2do IHB	Extendida
C3	5.0619	6.37	1er y 2do IHB	Horquilla
C4	5.2326	5.95	1er y 2do IHB	Horquilla
C5	5.3901	5.58	1er y 2do IHB	Horquilla
Acetonitrilo				
Ac1	0.0000	20.25	1er IHB	Horquilla
Ac2	0.6564	15.54	1er y 2do IHB	Extendida
Ac3	0.7535	14.94	1er y 2do IHB	Horquilla
Ac4	0.8559	14.34	1er y 2do IHB	Extendida
Ac5	1.3049	11.96	1er y 2do IHB	Extendida
DMSO				
D1	0.0000	23.62	1er y 2do IHB	Horquilla
D2	0.2153	21.66	1er y 2do IHB	Extendida
D3	1.4624	13.10	1er y 2do IHB	Extendida
D4	2.9537	7.18	1er y 2do IHB	Horquilla
D5	2.9826	7.09	1er y 2do IHB	Horquilla

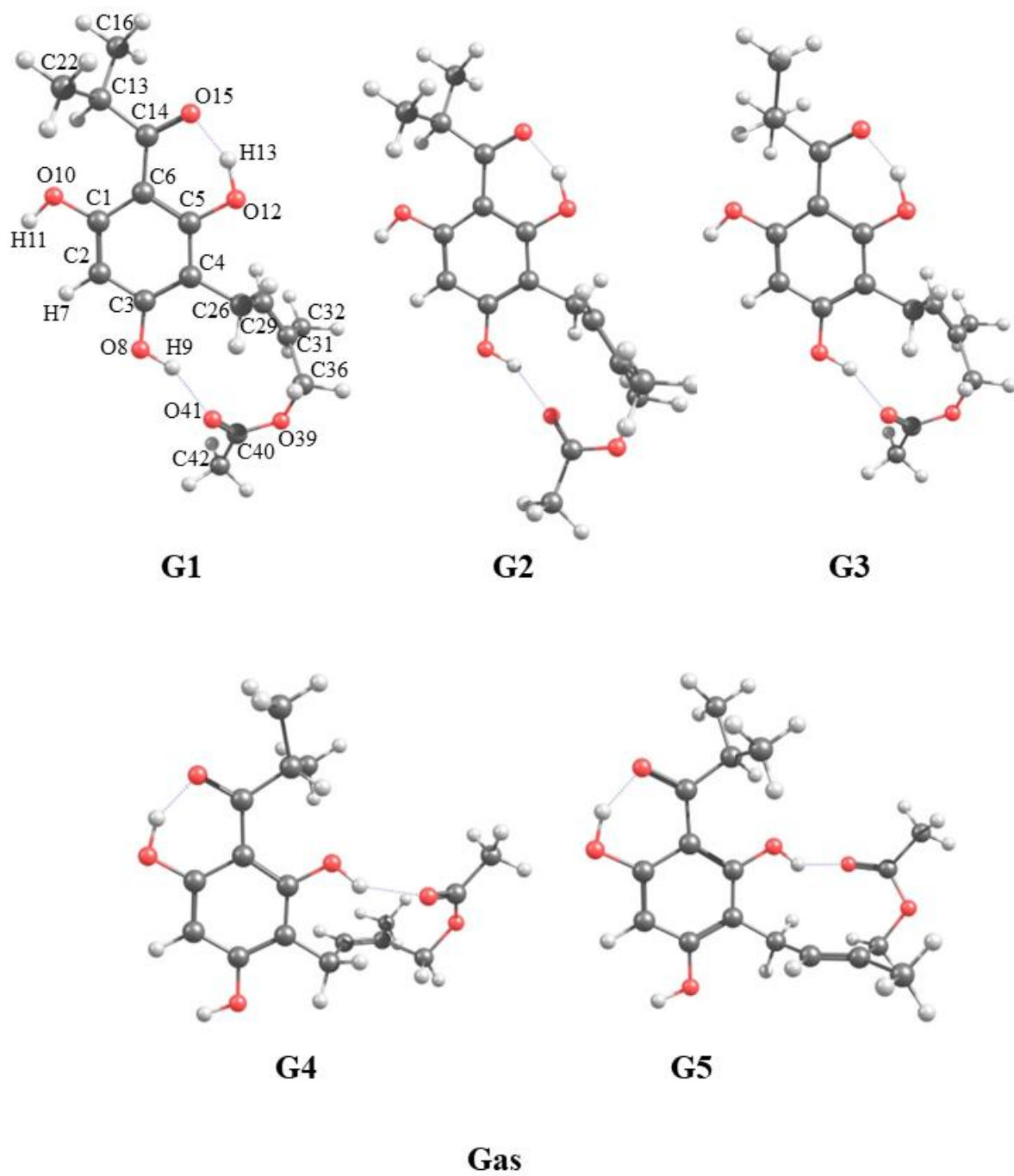
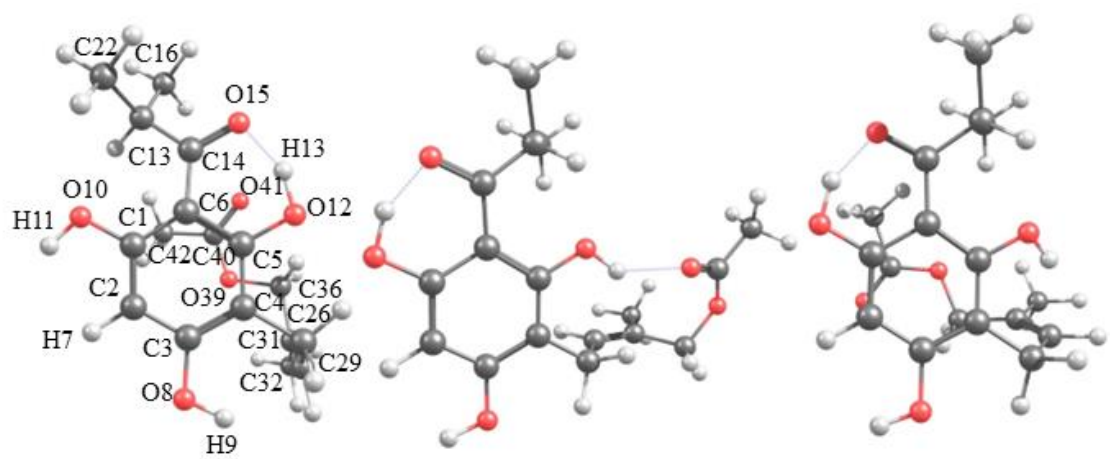


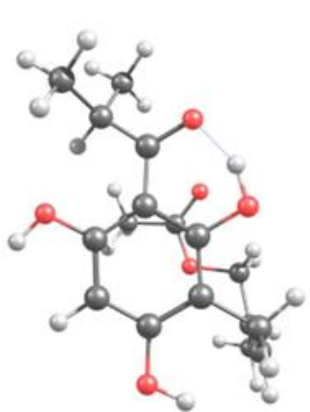
Figura 9. Estructuras moleculares de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en fase gas (G1-G5).



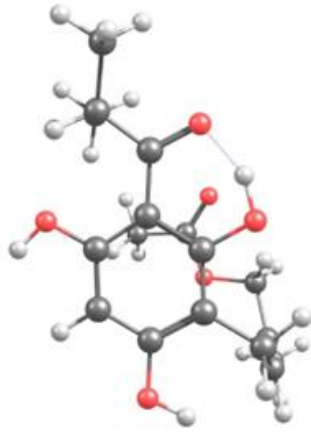
A1

A2

A3



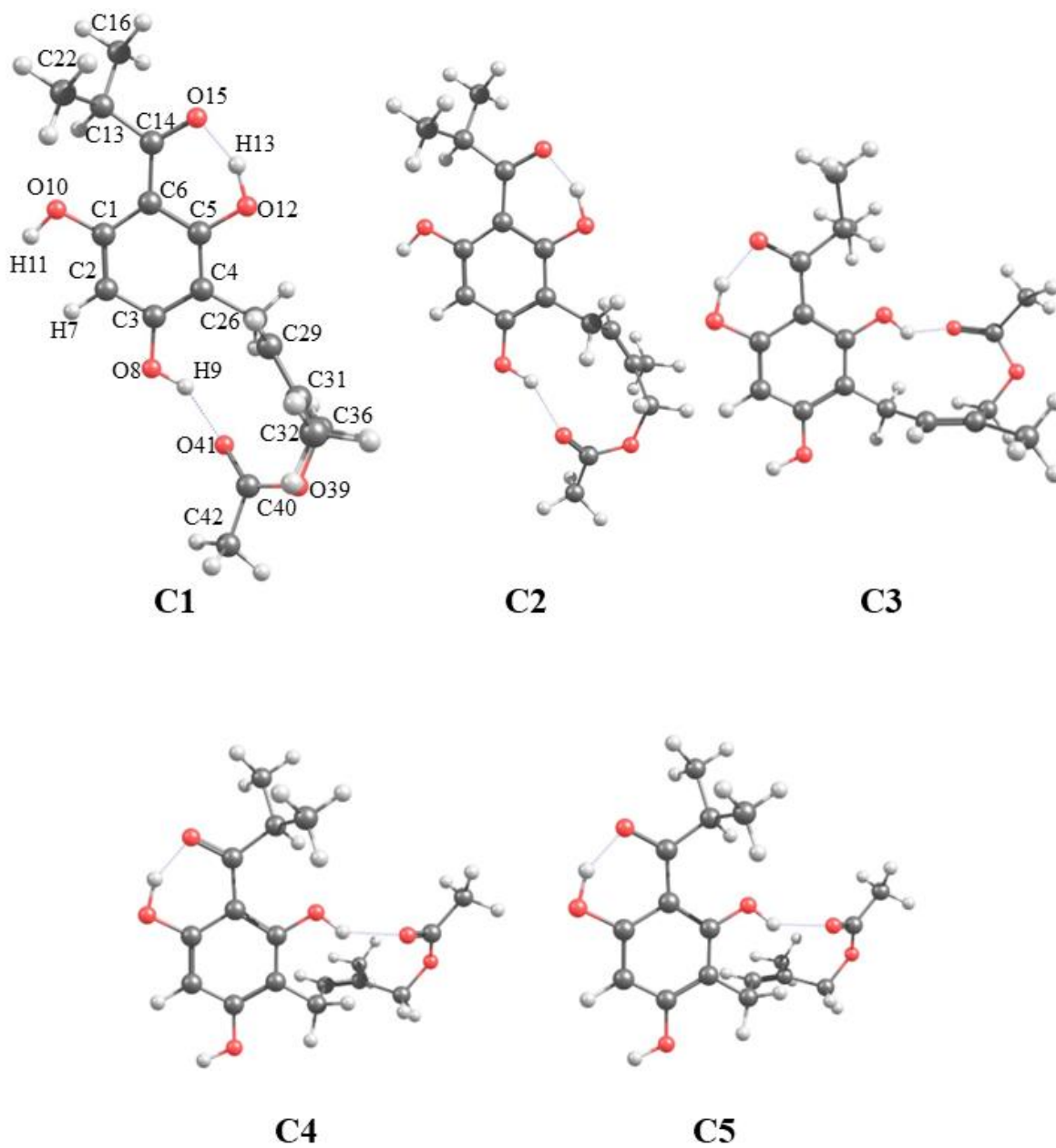
A4



A5

Agua

Figura 10. Estructuras moleculares de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en agua (A1-A5) usando el modelo SMD.



Cloroformo

Figura 11. Estructuras moleculares de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en cloroformo (C1-C5) usando el modelo SMD.

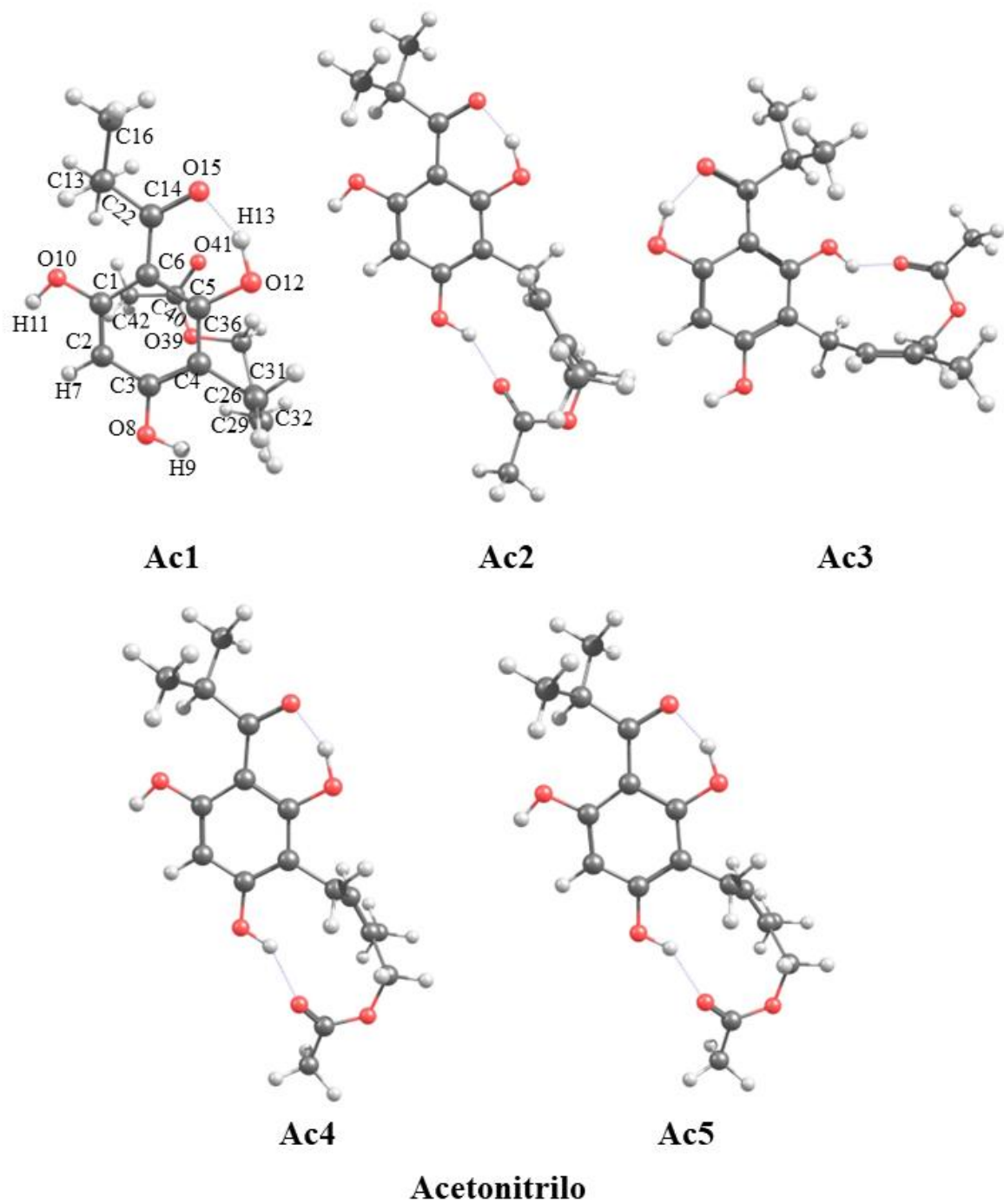


Figura 12. Estructuras moleculares de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en acetonitrilo (Ac1-Ac5) usando el modelo SMD.

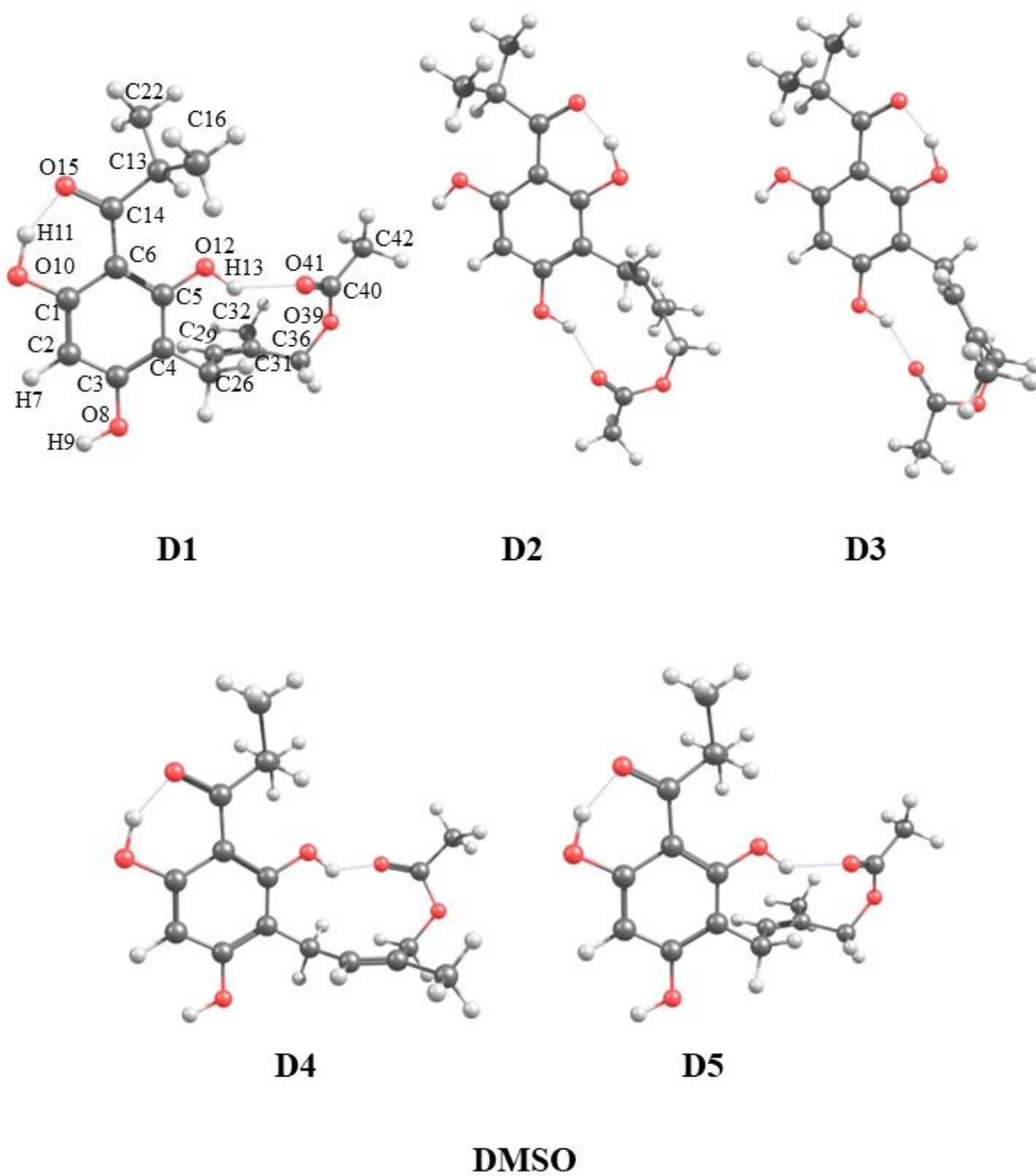


Figura 13. Estructuras moleculares de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en DMSO (D1-D5) usando el modelo SMD.

El análisis conformacional muestra que en fase gas y cloroformo, los conformeros más estables G1 (Figura 9) y C1 (Figura 11) tienen conformaciones extendidas, mientras que, en agua, el conformero A1 (Figura 10), en acetonitrilo, el conformero Ac1 (Figura 12) y en

DMSO, el conformero D1 (Figura 13) presentan conformaciones en horquilla. En las estructuras anteriores se observan dos tipos de IHB. El primer IHB se forma a través del átomo de oxígeno sp^2 del grupo acilo con los átomos de H de los grupos hidroxilo OH en posición *orto*, en este caso entre O15...H13 para G1 (Figura 9), A1 (Figura 10), C1 (Figura 11) y Ac1 (Figura 12), y O15...H11 para D1 (Figura 13). El segundo IHB se forma con el átomo de oxígeno sp^2 de la cadena prenilada y el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo OH, en este caso O41...H9 para G1 (Figura 9) y C1 (Figura 11), y O41...H13 para D1 (Figura 13). Se observa que las conformaciones extendidas G1 y C1, y la conformación en horquilla D1 conservan ambos IHB, mientras que A1 y Ac1 sólo mantienen un IHB. Estas conformaciones concuerdan con las geometrías más estables previamente reportadas con cálculos HF en las fases gas, agua, cloroformo y acetonitrilo [29].

En la Figura 8, se muestran los cinco conformeros de menor energía optimizados en fase gas (G1-G5) que mantienen ambos IHB. El mismo comportamiento ocurre para los conformeros en cloroformo (C1-C5) y DMSO (D1-D5) (ver Figuras 11 y 13). Mientras que los conformeros en acetonitrilo, sólo cuatro de cinco (Ac2-Ac5) conservan ambos IHB (ver Figura 12), y para los conformeros en fase acuosa, sólo un conformero de cinco (A2) conserva ambos IHB (ver Figura 10). Se observa que en gas la conformación extendida es la dominante, mientras en disolución la conformación de horquilla es la que predomina.

Estos resultados no siguen la misma tendencia reportada previamente en la literatura [29], donde se menciona que el número de conformeros de menor energía que tienen ambos IHB disminuye a medida que aumenta la polaridad del medio, es decir, en disolución de cloroformo y acetonitrilo hay más conformaciones con dos IHB que en solución acuosa, la cual sólo contiene un IHB. La diferencia con los resultados obtenidos en este proyecto de tesis, se puede atribuir al uso de un funcional que incluye términos de dispersión como APFD y un conjunto de base que incluye funciones difusas y doblemente polarizadas como 6-311+G(2d,p) respecto a 6-31G(d,p) utilizado en el estudio previo [29], ambas mejoras en el nivel de teoría describen adecuadamente los IHB. Además, el modelo de solvatación SMD empleado utiliza un potencial electrostático continuo que rodea la molécula de soluto, siendo versátil y flexible, lo que permite su aplicación en una amplia gama de disolventes. Además, este método se considera particularmente preciso en el caso de disolventes no

polares y aquellos con constantes dieléctricas altas, en comparación con el modelo PCM utilizado en [29].

En general, las conformaciones generadas en este proyecto de investigación con los métodos MM y DFT (86 conformeros con energías ≤ 6 kcal mol⁻¹) concuerdan con las obtenidas en gas, agua, cloroformo y acetonitrilo, calculadas con el modelo PCM [29], y usando el nivel de teoría HF/6-31G(d,p) con energías ≤ 10 kcal mol⁻¹.

Por otro lado, los resultados del análisis de población (Tabla 2) muestran que en fase gas el conformero G1 es el más poblado con un porcentaje de 24.60 %, además G2 y G3 están significativamente poblados con un 23.65 % y un 19.88 %, respectivamente, por lo que los conformeros de menor energía representan el 68.10 % de la población total. Esta población es menor que la reportada previamente de 76.60 % para el conformero más estable en gas, y los siguientes conformeros con 18.30 y 1.30 % [29]. Con respecto a los resultados en disolución implícita, en el caso de agua, A1 es el más poblado con 26.50 %, y los siguientes conformeros tienen población entre 10.72-17.19 %. En cloroformo, C1 es el conformero más poblado con un 49.10 %, C2 tiene una población significativa del 22.76 %, mientras que C3-C5 disminuye considerablemente su población con valores en el intervalo de 5.58-6.37 %. En acetonitrilo, el conformero Ac1 es el más poblado con un 20.25 %, y los siguientes conformeros Ac2-Ac5 tienen poblaciones similares en el intervalo de 11.96-15.54 %. Por último, en DMSO, D1 es el más poblado con un 23.62 %. Como se puede observar, D2 tiene una población similar a D1 con un porcentaje de 21.66 %. Las siguientes conformaciones D3-D5 tienen un valor de población entre 7.09-13.10 %. En general, con estos resultados se puede observar que la conformación extendida, que preserva ambos IHBs, es la conformación dominante en fase gas (G1) y en disolución implícita de cloroformo (C1), ver Tabla 2.

5.2. Análisis conformacional con disolvente explícito

Debido a que un objetivo más de esta tesis es describir el análisis conformacional en el que los átomos del soluto involucrados se encuentran rodeados de muchos otros átomos (como pueden ser moléculas de disolvente), resulta adecuado utilizar metodologías que

combinen la parte cuántica (QM1) con otra parte basada en mecánica clásica (MM) o bien con otra parte cuántica de más bajo nivel de teoría (QM2), a esta combinación de métodos se les conoce como métodos híbridos (QM1:MM o QM1:QM2). En este trabajo se usa este tipo de métodos, donde el operador Hamiltoniano está constituido por la suma de la contribución del soluto \hat{H}_{QM1} y el disolvente \hat{H}_{QM2} , más el término de acoplamiento soluto-disolvente $\hat{H}_{QM1-QM2}$, donde la energía total está dada por la suma de los tres términos: $E_{Total} = E_{QM1} + E_{QM2} + E_{QM1-QM2}$.

Las energías totales de los sistemas soluto-disolvente explícito se obtuvieron usando como estructuras de partida las estructuras más estables de caespitato optimizadas en fase gas (Figura 14) y en disolvente implícito (Figura 15). Las geometrías optimizadas de los sistemas soluto-disolvente obtenidas mediante la solvatación explícita con el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) se caracterizaron como mínimos a través de una análisis de frecuencias vibracionales ($\nu_i > 0$). En la Tabla 3 se comparan las energías totales de los diferentes sistemas en el modelo de disolvente explícito contemplando 31 moléculas de cada uno de los disolventes.

Tabla 3. Energías totales (en u.a.) y energías relativas (en kcal mol⁻¹) de los sistemas calculados mediante el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) con disolvente explícito obtenidos a partir de los conformeros más estables en fase gas y en disolución implícita. En agua (AG1E/A1E), en cloroformo (CG1E/C1E), en acetonitrilo (AcG1E/Ac1E) y en DMSO (DG1E/D1E).

Disolvente explícito	Fase Gas ^a	Disolvente implícito ^b	ΔE
AG1E/A1E	-1270.265219	-1270.265739	-0.33
CG1E/C1E	-1617.743739	-1617.751660	-4.97
AcG1E/Ac1E	-1382.303840	-1382.307069	-2.03
DG1E/D1E	-1566.503477	-1566.501234	+1.41

^aGeometría inicial en fase gas (G1).

^bGeometría inicial que corresponde a la geometría optimizada en disolución implícita: en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1).

Es bien sabido que existe cierta estabilidad cuando el soluto está rodeado por varias moléculas de disolvente, lo cual corresponde a la primera capa de solvatación [92]. Como se puede observar en la Tabla 3, existe una estabilidad adicional en la energía de cada uno de los conformeros cuando se optimizan con el disolvente explícito usando ONIOM y se pasa de la conformación en fase gas G1 a la conformación en disolvente implícito (a partir de A1, C1 y Ac1), excepto para aquel que se encuentra rodeado de las 31 moléculas de DMSO (a partir de D1). Para el conformero más poblado de caespitato en cloroformo, C1E, la energía de estabilización (como aquella más negativa) es de $-4.97 \text{ kcal mol}^{-1}$, mientras que para los conformeros A1E, Ac1E y D1E la energía de estabilización fue de -0.33 , -2.03 y $+1.41 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente.

Los resultados muestran que las 31 moléculas de cloroformo proporcionan mayor estabilidad a la conformación del caespitato, la cual tiene forma extendida tanto en disolvente implícito (ver C1 en Figura 11) como explícito (ver CG1E y C1E en Figuras 14 y 15). Por otro lado, las 31 moléculas de agua y acetonitrilo favorecen la forma de horquilla sobre la extendida (ver A1E y Ac1E en Figura 15), caso contrario se presentó con el conformero en DMSO donde la energía de estabilidad fue la más alta ($+1.41 \text{ kcal mol}^{-1}$), indicando que el conformero en forma extendida (ver DG1E en Figura 14) es preferentemente favorecida sobre la forma de horquilla (ver D1E en Figura 15) e indicando por lo tanto que los conformeros de caespitato en DMSO pueden existir preferentemente en forma extendida rodeados de moléculas de disolvente. Adicionalmente, se puede observar que la estabilidad tomando de partida tanto la estructura en fase gas (G1) como las estructuras más estables de disolvente implícito (A1, C1, Ac1 y D1), presentan el mismo orden de estabilidad en cada uno de los disolventes de manera explícita: $E_{C1E} > E_{D1E} > E_{Ac1E} > E_{A1E}$.

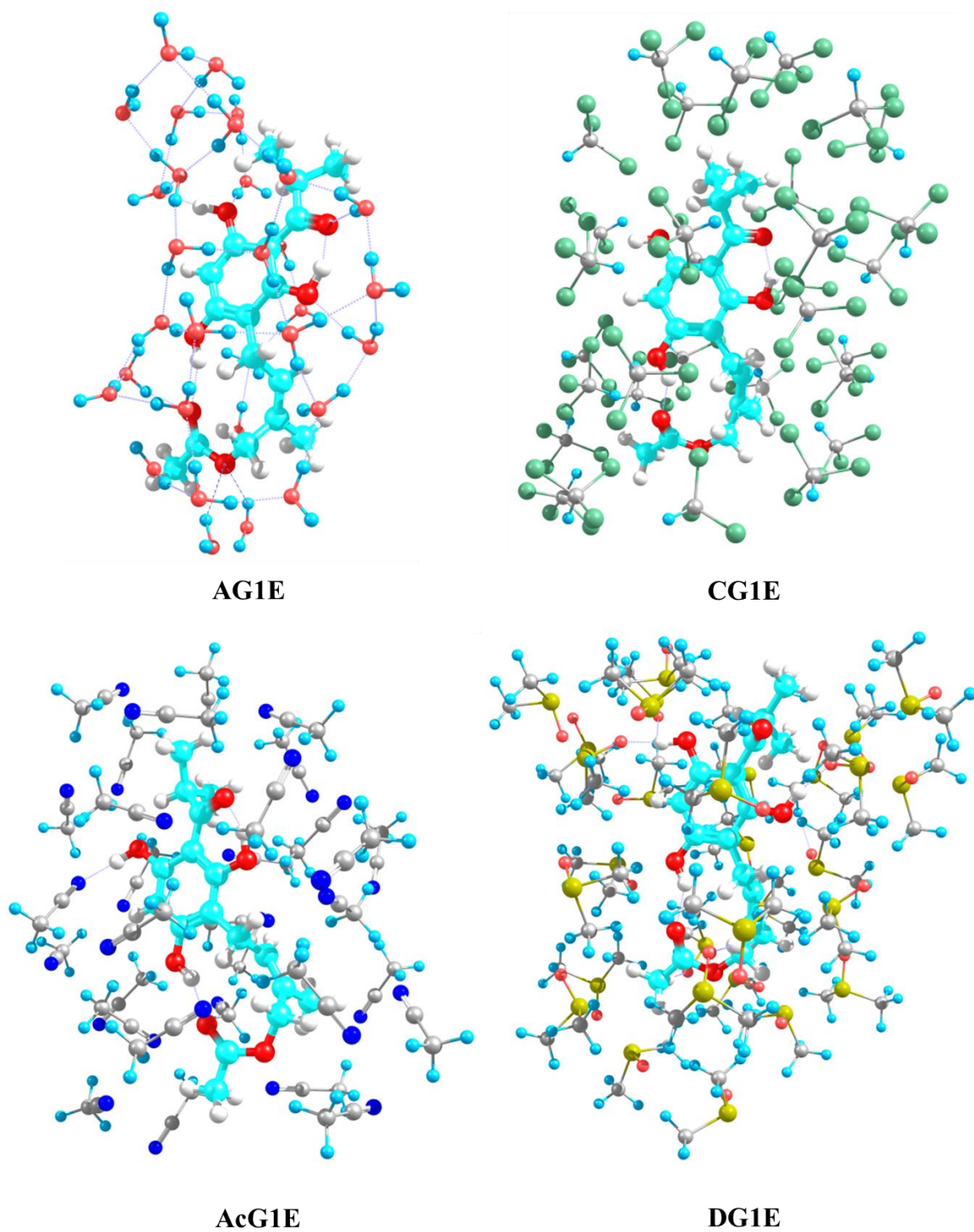
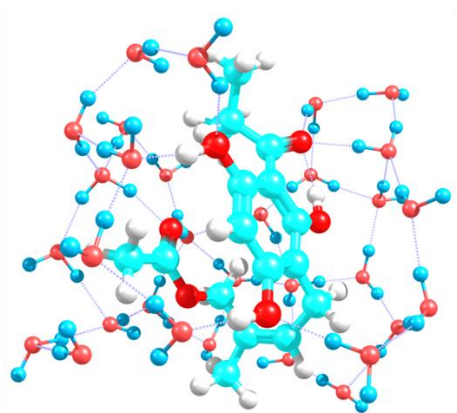
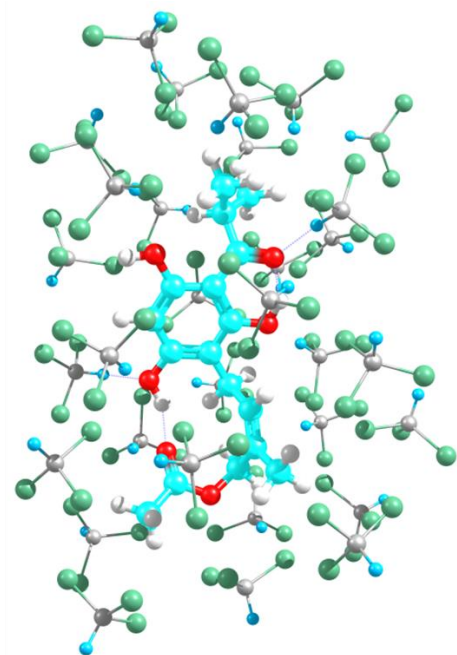


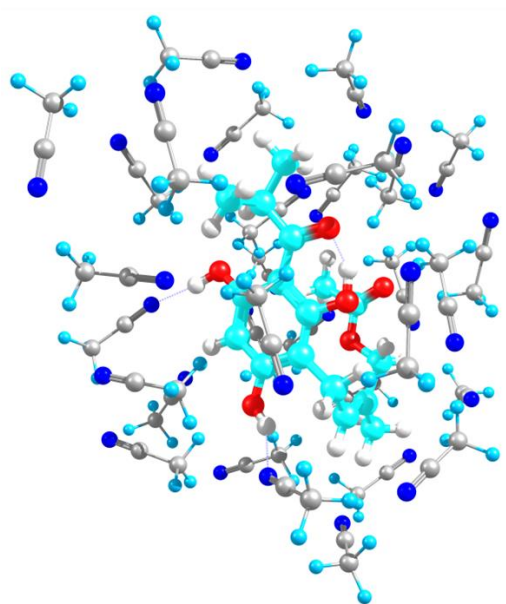
Figura 14. Estructuras de las geometrías optimizadas de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir del conformero más estables en fase gas (G1). En agua (AG1E), en cloroformo (CG1E), en acetonitrilo (AcG1E) y en DMSO (DG1E).



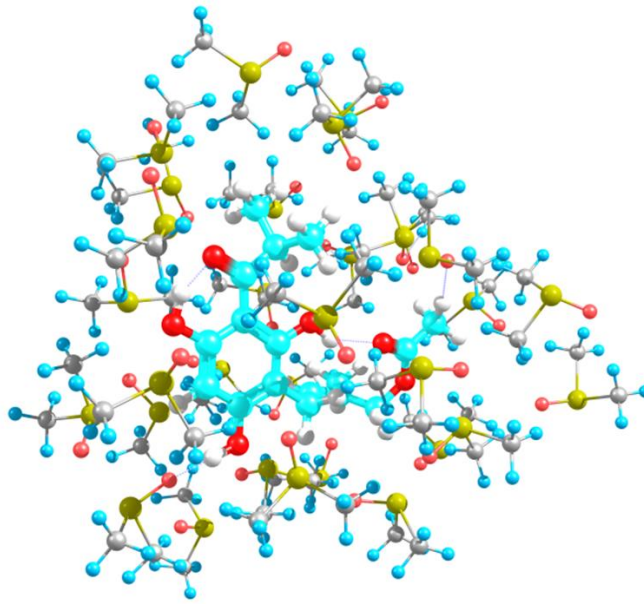
A1E



C1E



Ac1E



D1E

Figura 15. Estructuras de las geometrías optimizadas de los sistemas caespitane-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir de los conformeros más estables en disolución implícita: en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1). En agua (A1E), en cloroformo (C1E), en acetonitrilo (Ac1E) y en DMSO (D1E).

Para evaluar el efecto que tiene la solvatación explícita sobre las conformaciones más pobladas en fase gas y en disolución implícita del caespitato se analizan algunos parámetros seleccionados tanto en los sistemas en disolución implícita como en disolución explícita. Los resultados obtenidos usando disolvente implícito y disolvente explícito con el método ONIOM se muestran en la Tabla 4. La idea fundamental es conocer cómo son afectados los parámetros al ser considerado el disolvente explícito sobre las geometrías obtenidas con los cálculos del disolvente implícito.

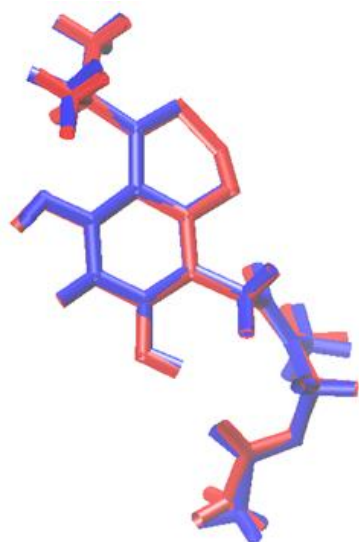
Tabla 4. Parámetros seleccionados (distancias en Å y ángulos de enlace en grados) de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) con el modelo de solvatación implícita SMD y calculados con el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) usando solvatación explícita. En agua (A1/A1E), en cloroformo (C1/C1E), en acetonitrilo (Ac1/Ac1E) y en DMSO (D1/D1E).

Parámetros	Disolvente implícito APFD/6-311+G(2d,p)			
	A1	C1	Ac1	D1
O15...H13	1.501	1.493	1.483	—
O15...H11	—	—	—	1.503
O41...H9	—	1.813	—	—
O41...H13	—	—	—	1.868
O15...H13-O12	153.17	153.44	154.00	—
O15...H11-O10	—	—	—	152.94
O41...H9-O8	—	150.45	—	—
O41...H13-O12	—	—	—	142.44
O15-C14-C6-C5	-10.60	-0.80	-0.45	179.11
C5-C4-C26-C29	-115.87	95.57	-123.20	-71.74
Parámetros	Disolvente explícito ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2)			
	A1E	C1E	Ac1E	D1E
O15...H13	1.791	1.642	1.516	—
O15...H11	—	—	—	1.556
O41...H9	—	1.810	—	—
O41...H13	—	—	—	1.928
O15...H13-O12	141.43	147.72	152.85	—
O15...H11-O10	—	—	—	150.47
O41...H9-O8	—	156.14	—	—
O41...H13-O12	—	—	—	146.58
O15-C14-C6-C5	-30.10	-24.19	9.84	-171.75
C5-C4-C26-C29	-111.71	75.08	-122.02	-73.97

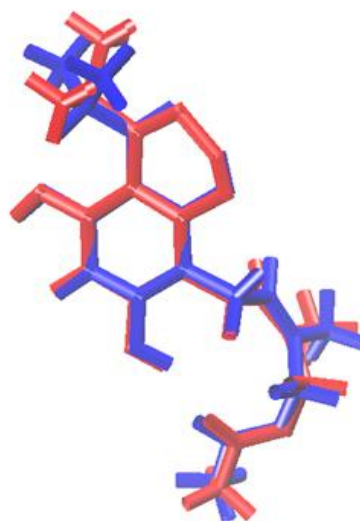
En general, los confórmeros de caespitato conservan su conformación similar a la obtenida en disolvente implícito cuando se rodean de cada uno de los disolventes de forma explícita. Se puede observar un ligero incremento en la longitud de enlace de los puentes de hidrógeno y una ligera disminución en los ángulos de valencia en disolvente explícito. También en todos los confórmeros en disolvente explícito se observa una variación en el ángulo diedro formado por los átomos O15–C14–C6–C5, indicando que el átomo de O15 se encuentra fuera del plano del anillo de floroglucinol más que en los confórmeros en disolución implícita. La cadena preñílica conserva en general su posición, dada por el ángulo diedro C5–C4–C26–C29, excepto para el confórmero en cloroformo C1E, el cual tiene la mayor variación de aproximadamente 20°.

La variación entre los confórmeros en disolvente implícito y explícito también se analiza mediante el valor calculado de RMSD, donde se puede observar que para el confórmero G1 rodeado de 31 moléculas de cada disolvente, confórmeros AG1E, CG1E, AcG1E y DG1E, conservan la conformación extendida de G1, con valores de RMSD de 0.19 a 0.79 Å (ver Figura 16) con la mayor variación usando DMSO (ver DG1E en Figura 16). Los confórmeros AG1E, CG1E y AcG1E conservan ambos IHBs como en el confórmero G1, mientras que DG1E únicamente conserva el segundo IHB (ver Figura 16).

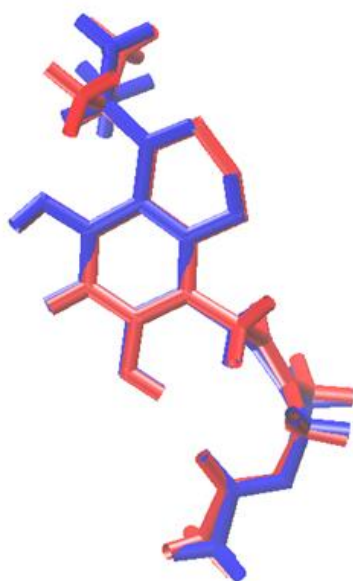
Por otra parte, la variación de los confórmeros A1, C1, Ac1 y D1 rodeados del correspondiente disolvente explícito tienen valores de RMSD de 0.22 a 0.73 Å (ver Figura 17), con la mayor variación usando agua como disolvente (ver A1E en Figura 17). Los confórmeros A1E y Ac1E tienen conformación en forma de horquilla y conservan el primer IHB, mientras que D1E también en forma de horquilla conserva ambos IHBs, al igual que en los sistemas con disolvente implícito (ver A1, Ac1 y D1 en Figuras 10, 12 y 13). El confórmero C1E conserva la conformación extendida y ambos IHBs como en disolución implícita (ver C1 en Figura 11).



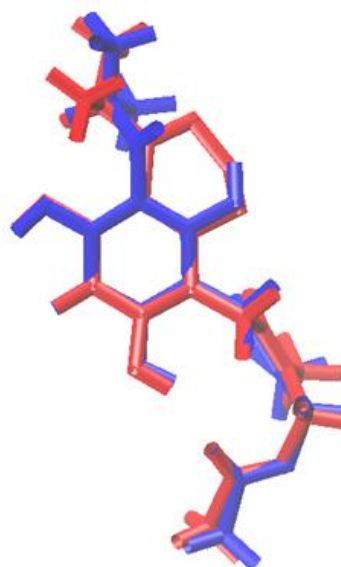
RMSD: 0.19 Å
G1/AG1E



RMSD: 0.48 Å
G1/CG1E



RMSD: 0.55 Å
G1/AcG1E



RMSD: 0.79 Å
G1/DG1E

Figura 16. Comparación de las estructuras optimizadas del conformero más estable en fase gas (G1) (color rojo) rodeado de disolvente implícito. En agua (AG1E), en cloroformo (CG1E), en acetonitrilo (AcG1E) y en DMSO (DG1E) (color azul).

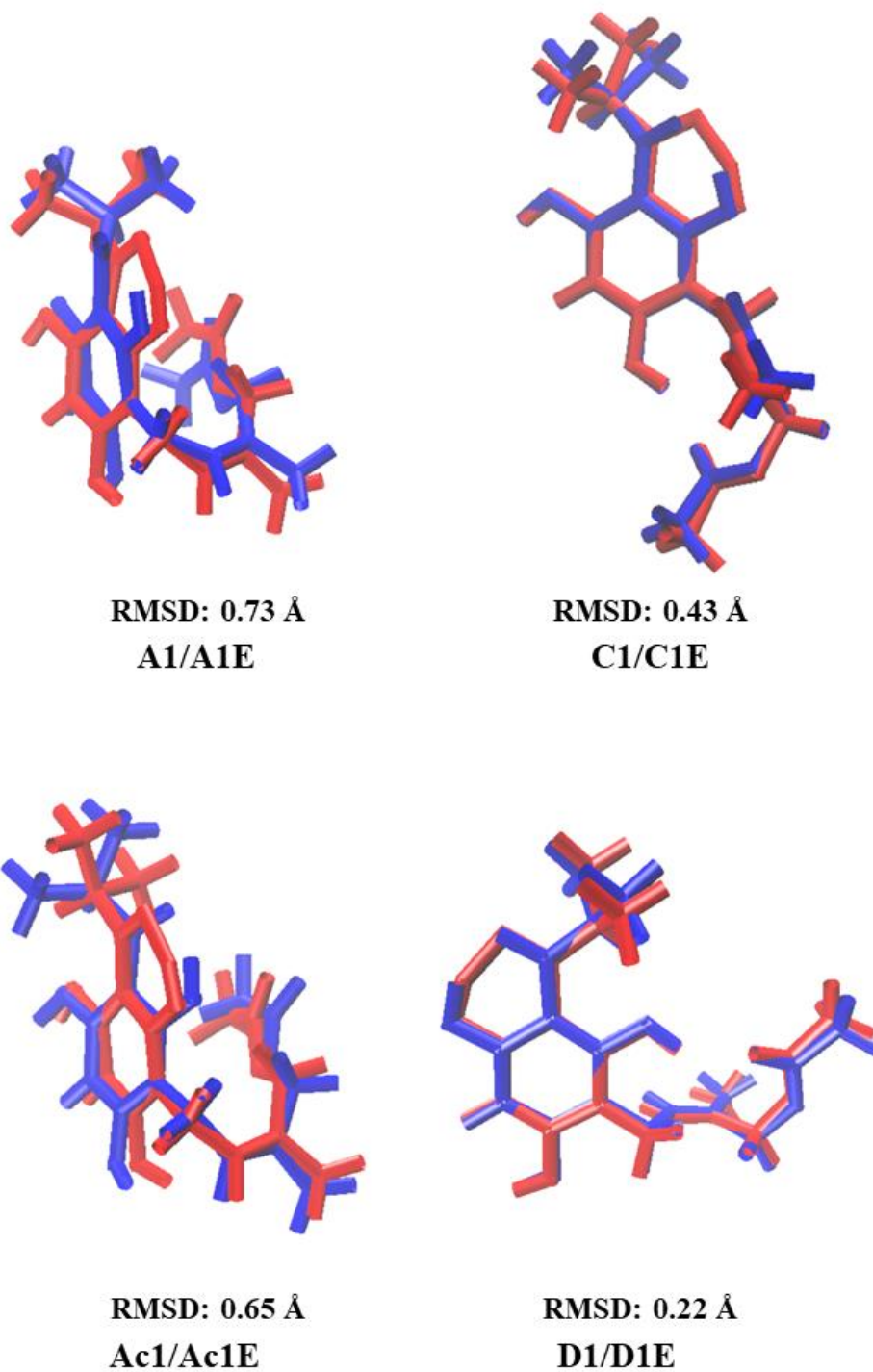


Figura 17. Comparación de las estructuras optimizadas de los conformeros más estables en disolvente implícito en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1) (color rojo) con la estructura correspondiente más estable en disolvente explícito en agua (A1E), en cloroformo (C1E), en acetonitrilo (Ac1E) y en DMSO (D1E) (color azul).

5.3. Análisis de reactividad química global

Los valores de las energías de los orbitales frontera HOMO y LUMO, así como los descriptores de reactividad química global: potencial químico (μ), electronegatividad (χ), dureza (η), blandura (S) y el índice de electrofilicidad (ω), para los confórmeros más estables en fase gas y en disolución se presentan en la Tabla 5. Los descriptores de reactividad química global se evaluaron de acuerdo con el enfoque de DFT conceptual [99], usando las ecuaciones 3.17–3.21. Los valores de energía HOMO están en el intervalo de -6.12 a -6.03 eV en fase gas, mientras que en disolución están en el intervalo -6.26 a -6.11 eV. Los confórmeros G4 y G5 tienen valores mayores de energía HOMO en fase gas, mientras que en disolución los valores mayores de HOMO corresponden a los confórmeros en cloroformo C3, C4 y C5. Estos valores están relacionados con la habilidad electrodonadora, un valor mayor de HOMO indica que estos confórmeros tienen un mayor comportamiento donador en comparación a los demás. Estos confórmeros presentan conformación en forma de horquilla y conservan sus dos IHB, ver Figuras 9 y 11. Por otro lado, los valores de energía LUMO están en el intervalo de -1.29 a -1.24 eV en fase gas, mientras que en disolución se encuentran en el intervalo de -1.61 a -1.36 eV. Los valores de menor energía LUMO corresponden a los confórmeros G1, G2 y G3 en fase gas, mientras que en disolución los valores de menor de energía LUMO corresponden a los confórmeros en agua A1-A5. Los confórmeros G1, G2 y G3 tienen una conformación extendida con ambos IHBs, mientras que los confórmeros en agua tienen una conformación de horquilla con el primer IHB, excepto A2 que tiene ambos IHBs, ver Figuras 9 y 10. Los valores pequeños de energía LUMO indican una mayor afinidad electrónica o mayor capacidad electroattractora. En este sentido, el disolvente tiene influencia en la capacidad electrodonadora y electroattractora de los confórmeros de caespitado. Los confórmeros en cloroformo presentan una mayor capacidad electrodonadora, observada en el valor de las energías de los orbitales HOMO, mientras que los confórmeros en agua exhiben una mayor afinidad electrónica observada en los valores de las energías de los orbitales LUMO. En relación con la polaridad de los disolventes, se observa que los confórmeros en los disolventes menos polares como acetonitrilo, cloroformo y DMSO presentaron una mayor capacidad electrodonadora, mientras que los confórmeros en el disolvente más polar, como el agua, presentaron mayor afinidad electrónica.

Por otro lado, en la Tabla 6 se presentan los valores de las energías de los orbitales HOMO y LUMO, y de los descriptores de la reactividad química global de las geometrías optimizadas en los sistemas caespitato-disolvente explícito, obtenidos a partir del conformero más estable en fase gas (G1) rodeado con los diferentes disolventes: AG1E, CG1E, AcG1E y DG1E (ver Figura 14) y a partir de los conformeros más estables en disolución implícita rodeados de moléculas del disolvente correspondiente: A1E, C1E, Ac1E y D1E (ver Figura 15). Los valores de energía HOMO a partir de G1 están en el intervalo de -6.20 a -6.02 eV, mientras que los valores a partir de los conformeros en disolución implícita son similares en el intervalo de -6.26 a -6.16 eV. Los conformeros AcG1E y DG1E, y Ac1E y D1E tienen valores mayores de energía HOMO, indicando mayor habilidad electrodonadora. Los conformeros AcG1E y DG1E (al igual que AG1E y CG1E) conservan la conformación extendida de G1. El sistema AcG1E conserva el primer IHB como el conformero G1, mientras que DG1E no conserva el primer IHB, sin embargo, ambos conformeros conservan el segundo IHB, ver Figura 16. Por otro lado, los conformeros Ac1E y D1E tienen conformación en forma de horquilla, Ac1E conserva el primer IHB y D1E conserva ambos IHBs, al igual que en los sistemas con disolvente implícito, ver Figura 17. Por otro lado, los valores de energía LUMO a partir de G1 están en el intervalo de -1.32 a -0.82 eV, mientras que los valores a partir de los conformeros en disolución implícita se encuentran en el intervalo de -1.50 a -1.38 eV. Los valores de menor energía LUMO corresponden a los conformeros AG1E y AcG1E, y A1E y Ac1E, indicando una mayor capacidad electroattractora. Cabe resaltar que el orbital LUMO del conformero DG1E (G1 rodeado de DMSO) es mayor respecto a los sistemas rodeados de agua, cloroformo y acetonitrilo. Los conformeros AG1E y AcG1E conservan la conformación extendida de G1 y ambos IHBs como en disolvente implícito, ver Figura 16, mientras que A1E y Ac1E tiene conformación en forma de horquilla y conservan el primer IHB, al igual que en disolvente implícito, ver Figura 17. En general, se observa una similitud en las energías del orbital HOMO tanto en disolvente implícito como explícito. Las diferencias más notorias se observan en agua y en DMSO con valores de energía HOMO ligeramente mayores con disolvente explícito. Por otro lado, los valores de las energías del orbital LUMO en disolvente implícito tienden a ser menores en comparación con los valores con disolvente explícito, lo cual indica que los sistemas en disolvente

implícito tienden a mostrar una mayor capacidad para atraer electrones, debido a que en los sistemas rodeados con disolvente explícito se forman interacciones no-covalentes entre las moléculas de disolvente y la molécula de caespitato está menos disponible para donar o aceptar electrones.

Tabla 5. Energías HOMO y LUMO, e índices de reactividad global (eV) de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311++G(2d,p) en fase gas y en disolución.

Confórmero	HOMO	LUMO	μ	χ	η	S	ω
Gas							
G1	-6.1177	-1.2833	-3.7005	3.7005	4.8344	0.2069	1.4163
G2	-6.1188	-1.2855	-3.7021	3.7021	4.8333	0.2069	1.4178
G3	-6.1188	-1.2852	-3.7020	3.7020	4.8336	0.2069	1.4177
G4	-6.0325	-1.2351	-3.6338	3.6338	4.7974	0.2084	1.3762
G5	-6.0328	-1.2354	-3.6341	3.6341	4.7974	0.2084	1.3764
Agua							
A1	-6.2584	-1.6068	-3.9326	3.9326	4.6516	0.2150	1.6624
A2	-6.2589	-1.6096	-3.9343	3.9343	4.6494	0.2151	1.6646
A3	-6.2579	-1.5995	-3.9287	3.9287	4.6584	0.2147	1.6566
A4	-6.2603	-1.6082	-3.9343	3.9343	4.6521	0.2150	1.6636
A5	-6.2540	-1.6060	-3.9300	3.9300	4.6480	0.2151	1.6615
Cloroformo							
C1	-6.1542	-1.3870	-3.7706	3.7706	4.7672	0.2098	1.4912
C2	-6.1544	-1.3862	-3.7703	3.7703	4.7683	0.2097	1.4906
C3	-6.1068	-1.3606	-3.7337	3.7337	4.7462	0.2107	1.4686
C4	-6.1063	-1.3611	-3.7337	3.7337	4.7452	0.2107	1.4689
C5	-6.1090	-1.3606	-3.7348	3.7348	4.7484	0.2106	1.4688
Acetonitrilo							
Ac1	-6.1615	-1.4653	-3.8134	3.8134	4.6962	0.2129	1.5483
Ac2	-6.1966	-1.4452	-3.8209	3.8209	4.7514	0.2105	1.5363
Ac3	-6.1588	-1.4270	-3.7929	3.7929	4.7318	0.2113	1.5201
Ac4	-6.1944	-1.4447	-3.8196	3.8196	4.7498	0.2105	1.5358
Ac5	-6.1958	-1.4436	-3.8197	3.8197	4.7522	0.2104	1.5351

	DMSO						
D1	-6.1542	-1.4199	-3.7870	3.7870	4.7343	0.2112	1.5147
D2	-6.1977	-1.4376	-3.8177	3.8177	4.7601	0.2101	1.5309
D3	-6.1972	-1.4384	-3.8178	3.8178	4.7588	0.2101	1.5314
D4	-6.1539	-1.4202	-3.7870	3.7870	4.7337	0.2112	1.5148
D5	-6.1542	-1.4188	-3.7865	3.7865	4.7354	0.2112	1.5139

Tabla 6. Energías HOMO y LUMO, e índices de reactividad global (eV) de los sistemas calculados mediante el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) con disolvente explícito obtenidos a partir de los conformeros más estables en fase gas y en disolución implícita. En agua (AG1E/A1E), en cloroformo (CG1E/C1E), acetonitrilo (AcG1E/Ac1E) y DMSO (DG1E/D1E).

Confórmero	HOMO	LUMO	μ	χ	η	S	ω
Fase Gas^a							
AG1E	-6.1838	-1.3170	-3.7504	3.7504	4.8668	0.2055	1.4451
CG1E	-6.1974	-1.2577	-3.7276	3.7276	4.9397	0.2024	1.4064
AcG1E	-6.1321	-1.2672	-3.6920	3.6920	4.8649	0.2056	1.4068
DG1E	-6.0148	-0.8242	-3.4195	3.4195	5.1906	0.1927	1.1264
Disolvente implícito^b							
A1E	-6.2600	-1.5056	-3.8828	3.8828	4.7544	0.2103	1.5854
C1E	-6.2240	-1.3815	-3.8028	3.8028	4.8425	0.2065	1.4931
Ac1E	-6.1590	-1.4414	-3.8002	3.8002	4.7176	0.2120	1.5306
D1E	-6.1971	-1.4185	-3.8078	3.8078	4.7786	0.2093	1.5171

^aGeometría inicial en fase gas (G1).

^bGeometría inicial que corresponde a la geometría optimizada en disolución implícita: en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1).

La Figura 18 muestra la distribución de los orbitales frontera de los conformeros más estables en fase gas y en disolución. Las isosuperficies se graficaron con un isovalor de 2.0×10^{-2} u.a. Se observa una distribución similar de los orbitales HOMO en los conformeros G1 y C1, con mayor contribución de los grupos OH en posición *orto* y del anillo aromático, ambos con conformación extendida, mientras que los orbitales HOMO de los conformeros A1, Ac1 y D1 muestran una distribución similar con mayores

contribuciones de los tres grupos OH, del grupo carbonilo y del anillo aromático. En este caso todos tienen conformación de horquilla. Respecto a los orbitales LUMO, la distribución en G1, C1 y D1 es similar, pues la contribución mayor se les atribuye a los grupos OH, carbonilo y al anillo aromático, y no se observa contribución de la cadena prenilada. En los conformeros A1 y Ac1 se observan mayores contribuciones de los grupos OH, el grupo acilo y del anillo aromático.

La Figura 19 muestra la distribución de los orbitales frontera de las geometrías optimizadas en los sistemas caespitato-disolvente explícito obtenidos a partir del conformero más estable en fase gas (G1) rodeado con los diferentes disolventes (ver Figura 14), mientras que en la Figura 19 se muestran las isosuperficies de los orbitales frontera de las geometrías optimizadas a partir de los conformeros más estables en disolvente implícito (ver Figura 15). En la Figura 19, se observa una distribución similar de los orbitales HOMO en los conformeros AG1E, CG1E y AcG1E. En estos conformeros se observa una mayor contribución tanto del anillo aromático como de los grupos OH. En contraste, el orbital HOMO del conformero DG1E muestra una contribución adicional proveniente del carbonilo del grupo acilo. En la Figura 20, se observa una distribución similar de los orbitales HOMO en los conformeros C1E y Ac1E, con mayor contribución del anillo aromático y los grupos OH, mientras que los orbitales HOMO de A1E y D1E muestran adicionalmente contribuciones de la cadena prenilada. En los orbitales LUMO de la Figura 19, se observa una distribución similar en todos los conformeros (AG1E, CG1E, AcG1E y DG1E) donde las mayores contribuciones son del anillo aromático, de los sustituyentes OH y del grupo acilo. En la Figura 20, la distribución de los orbitales LUMO en A1E, C1E y D1E es similar, pues las contribuciones mayores se les atribuyen a los grupos carbonilo, OH y al anillo aromático, y no se observa contribución de la cadena prenilada, mientras en Ac1E se observa menor contribución de los grupos metilo unidos al grupo acilo. En general se observa que las distribuciones de los orbitales HOMO y LUMO son similares tanto en disolvente implícito como explícito.

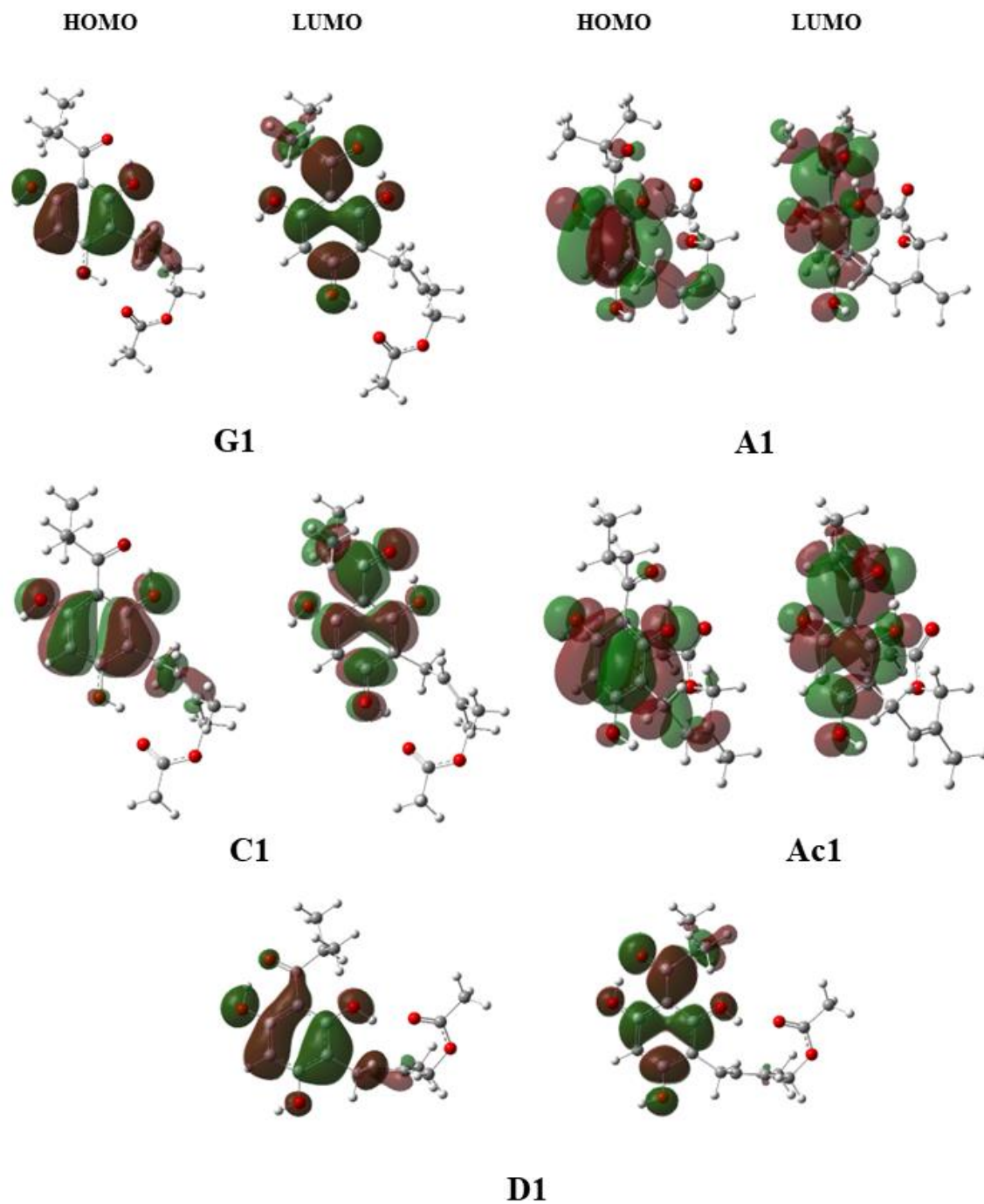


Figura 18. Isosuperficies de los orbitales moleculares frontera (HOMO y LUMO) de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en fase gas y en disolución. En fase gas (G1), en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1).

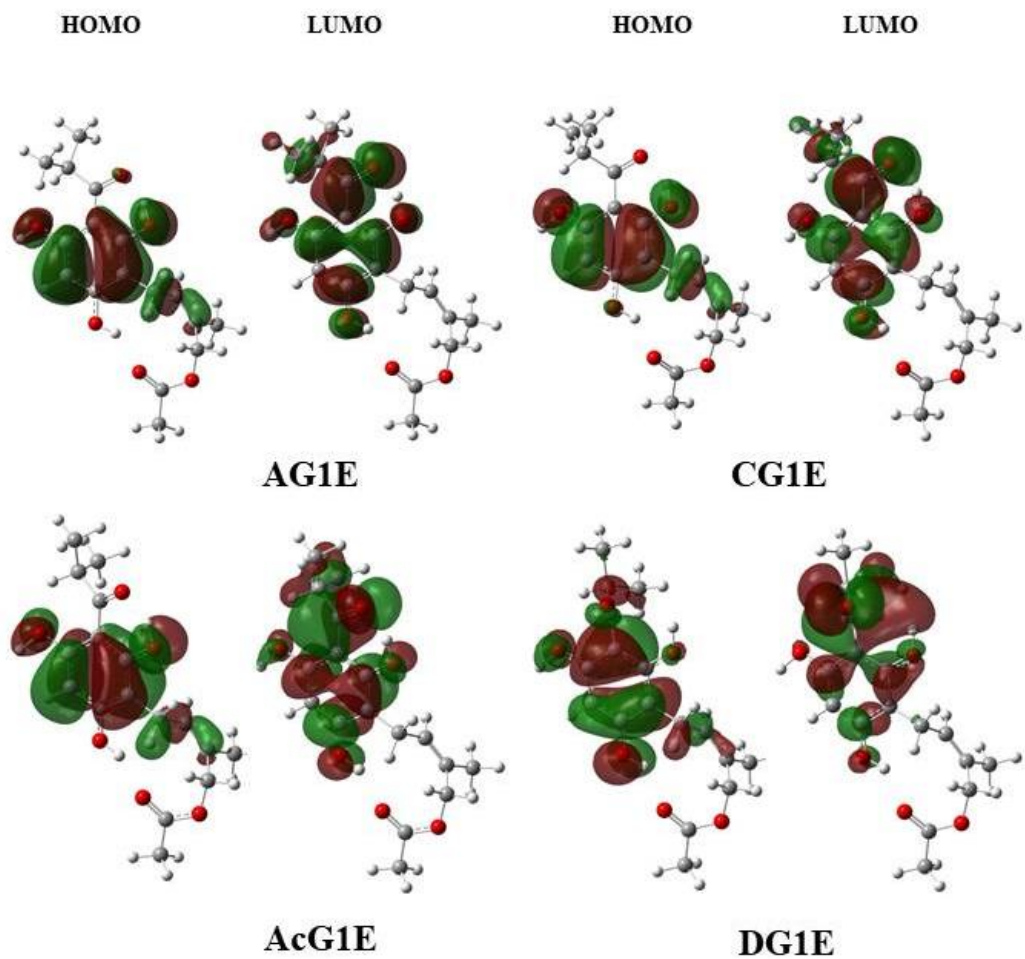


Figura 19. Isosuperficies de los orbitales moleculares frontera (HOMO y LUMO) de las diferentes geometrías optimizadas de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir del conformero más estable en fase gas (G1). En agua (AG1E), en cloroformo (CG1E), en acetonitrilo (AcG1E) y en DMSO (DG1E).

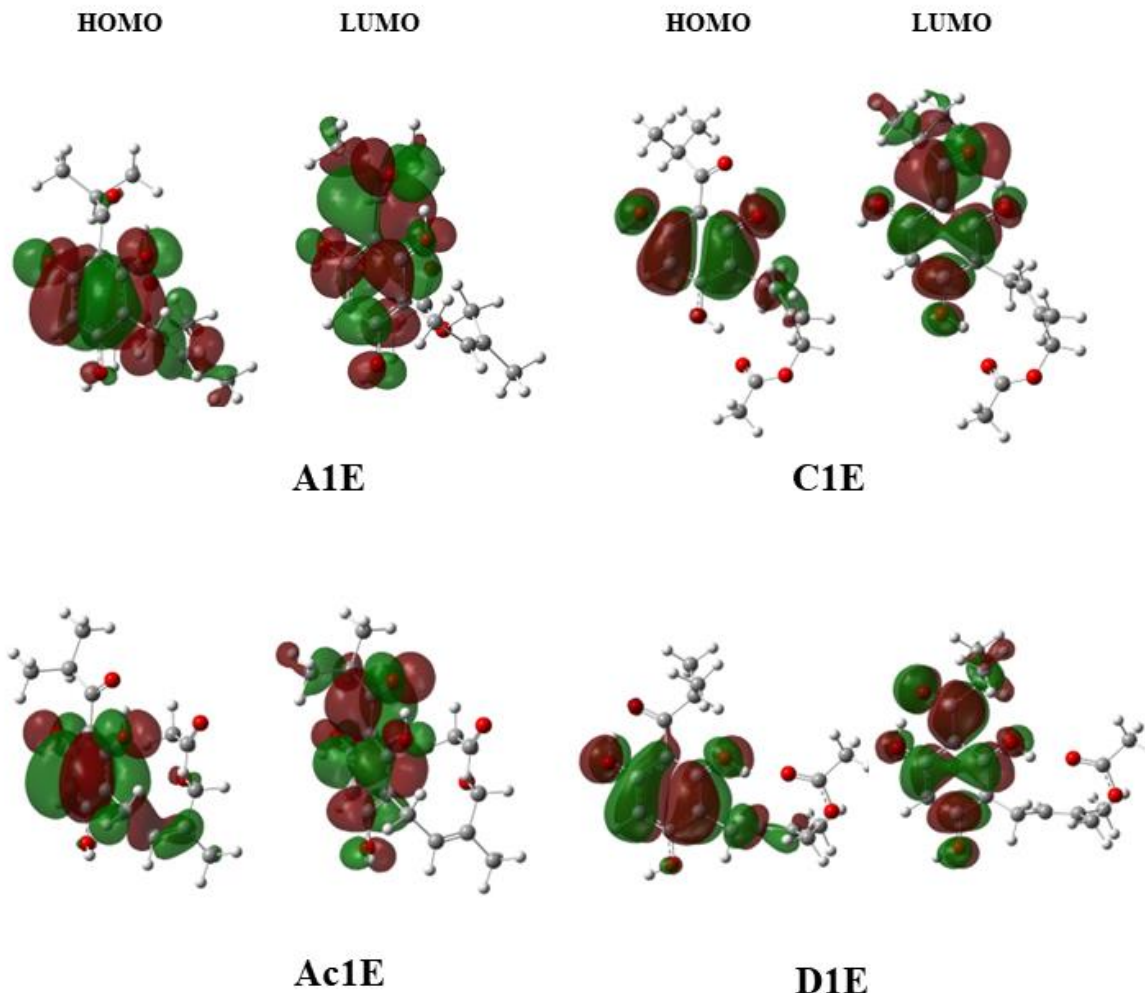


Figura 20. Isosuperficies de los orbitales moleculares frontera (HOMO y LUMO) de las diferentes geometrías optimizadas de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir de los conformeros más estables en disolución implícita: en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1). En agua (A1E), en cloroformo (C1E), en acetonitrilo (Ac1E) y en DMSO (D1E).

Con respecto a los valores de los descriptores de reactividad global, los valores mayores del potencial químico, μ , son de los conformeros G4 y G5 ($\cong -3.63$ eV) en fase, gas mientras que en disolución los conformeros en cloroformo C3, C4 y C5 ($\cong -3.73$ eV) tienen valores ligeramente mayores que el resto. Estos valores representan mayor intercambio de densidad electrónica con el entorno. De forma contraria, estos conformeros tienen los valores de menor electronegatividad, χ , es decir, presentan menor resistencia a la pérdida de densidad electrónica. Los conformeros G1, G2 y G3 en fase gas ($\cong 4.83$ eV) exhiben un valor

ligeramente mayor de dureza, representada por η , mientras que en disolución los conformeros C1, C2 y D2 ($\cong 4.76$ eV) tienen valores ligeramente mayores a los demás conformeros, lo que indica que estos conformeros presentan más resistencia a cambiar su distribución de densidad electrónica. De manera contraria, los conformeros G4 y G5 (0.2084 eV) en fase gas tienen valores ligeramente mayores de blandura, S, y en disolución los conformeros en agua A1-A5 ($\cong 0.215$ eV) son ligeramente más blandos que en los demás disolventes, lo cual indica que estos conformeros pueden modificar con facilidad su densidad electrónica. Por otro lado, los conformeros que presentan mayor índice de electrofilicidad, ω , en fase gas son G1-G3 ($\cong 1.42$ eV), mientras que en disolución los conformeros en agua A1-A5 ($\cong 1.66$ eV) presentan valores mayores a los demás conformeros, lo cual indica que estos conformeros tienen un comportamiento como mejor electrófilo.

En el caso de los sistemas con disolución explícita, los valores mayores del potencial químico, μ , son de los conformeros DG1E (-3.42 eV) a partir de G1 y todos los conformeros a partir de las geometrías más estables en disolución implícita (-3.80 eV). Todos estos conformeros serán más susceptibles al intercambio de densidad electrónica con el entorno. De forma contraria, estos conformeros tienen los valores de menor electronegatividad, χ , es decir, presentan menor resistencia a la pérdida de densidad electrónica. Respecto a los valores de dureza, η , los conformeros DG1E (5.19 eV) y C1E (4.76 eV) tienen los valores mayores, lo que indica que estos conformeros presentan más resistencia a cambiar su distribución electrónica. De manera contraria, los conformeros AG1E, CG1E y AcG1E ($\cong 0.20$ eV), y A1E y Ac1E ($\cong 0.212$ eV) son ligeramente más blandos, que los demás y pueden modificar con mayor facilidad su densidad electrónica. Por otro lado, los conformeros que presentan mayor índice de electrofilicidad, ω , son AG1E (1.45 eV), y A1E y Ac1E (1.59 y 1.53 eV, respectivamente), lo cual indica que estos conformeros tienen un mejor comportamiento como electrófilos. En general, se observa que los valores de los índices de reactividad global en disolvente explícito son ligeramente mayores a los del disolvente implícito.

La Figura 21 muestra el mapa de potencial electrostático molecular (MEP) en fase gas y en disolución. Las isosuperficies se graficaron con un isovalor de 4.0×10^{-4} u.a. en un intervalo

de -3.0×10^{-2} e u.a.⁻³ (regiones en color rojo) a 3.0×10^{-2} e u.a.⁻³ (regiones en color azul). Se observa que la mayor densidad electrónica se concentra sobre el átomo de O del grupo –OH en posición *para* del anillo aromático y ligeramente sobre el átomo de O del grupo acilo en los conformeros A1 y Ac1, mientras que en los conformeros G1, C1 y D1, la mayor densidad se concentra en el átomo de O del grupo acilo y los átomos de O de los tres grupos –OH del anillo aromático. Las zonas deficientes de densidad electrónica se observan en la región sobre el átomo de H del grupo –OH en posición *orto* que no forma puentes de hidrógeno en los conformeros G1, A1, C1 y Ac1, mientras que en D1 se observa sobre el átomo de H del grupo –OH en posición *para* que tampoco forma puente de hidrógeno. Otra zona de menor densidad electrónica es el metilo del grupo éster de la cadena prenilada en todos los conformeros, que se atribuye al efecto inductivo aceptor o negativo del grupo carboxilo del éster, el cual atrae electrones hacia sí e induce carga positiva en el resto de los átomos, en este caso en el grupo metilo.

Las Figuras 22 y 23 muestran los MEP para los sistemas en disolución explícita. En general, se observa que para la mayoría de los conformeros, la mayor densidad electrónica se concentra sobre el anillo aromático, el átomo de O de los sustituyentes –OH en posición *orto* y *para* del anillo aromático, sobre el átomo de O del grupo acilo y en el átomo de O del grupo éster de la cadena prenilada en los conformeros AG1E, CG1E, AcG1E, DG1E, C1E y D1E, mientras que en los conformeros A1E y Ac1E, la mayor densidad se concentra en el átomo de O del grupo carbonilo y en el átomo de O del grupo éster de la cadena prenilada. Las zonas deficientes de densidad electrónica se observan en la región sobre la cadena prenilada para los conformeros AG1E, CG1E, AcG1E, DG1E, C1E y D1E, mientras que para A1E y Ac1E se observa sobre los grupos metilo y algunos protones del anillo aromático.

En general, se observan pocas diferencias en la distribución de los MEP en los sistemas empleando disolución implícita y explícita. En el primer caso, se aprecia una concentración de la densidad electrónica en el anillo aromático y en los sustituyentes OH (ver Figura 21), mientras que, en el segundo caso, se observa una disminución de la densidad electrónica en estos grupos, lo cual se puede atribuir a la interacción con las moléculas de disolvente que las rodean (ver Figuras 22 y 23).

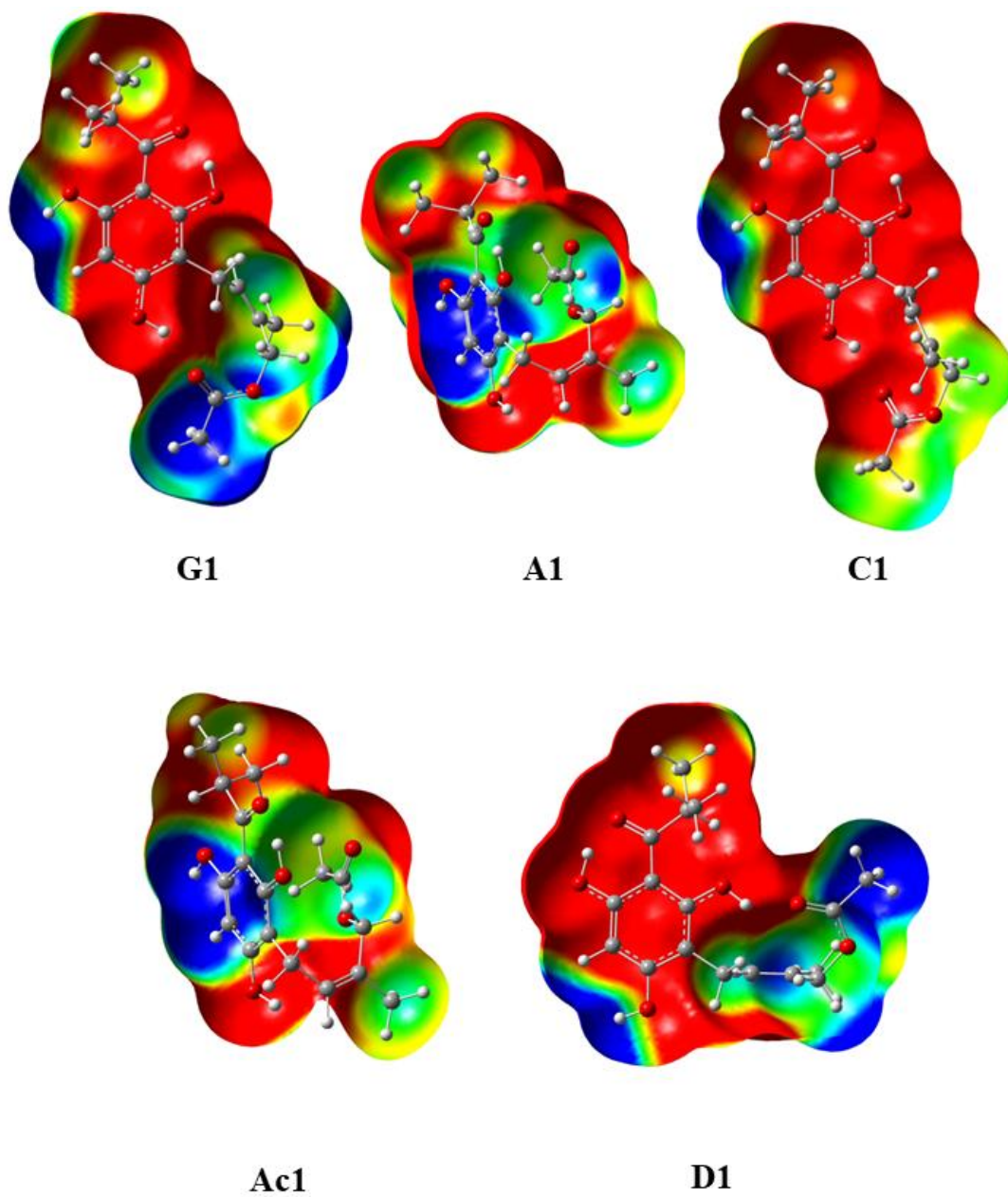


Figura 21. Potencial Electrostático Molecular (MEP) de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en fase gas y en disolución. En fase gas (G1), en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1).

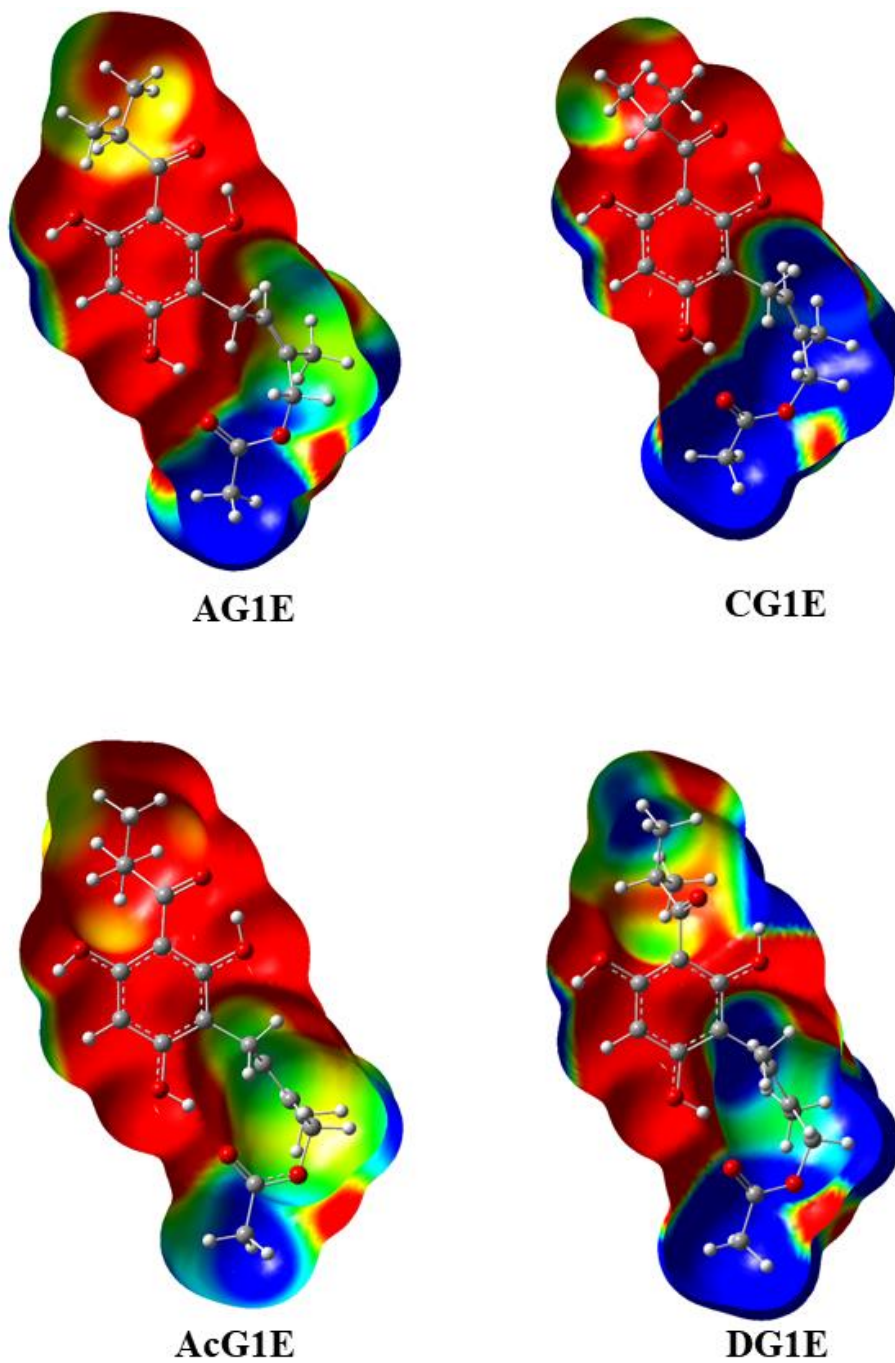


Figura 22. Potencial Electrostático Molecular (MEP) de las geometrías optimizadas de los sistemas caespitaco-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir del conformero más estables en fase gas (G1). En agua (AG1E), en cloroformo (CG1E), en acetonitrilo (AcG1E) y en DMSO (DG1E).

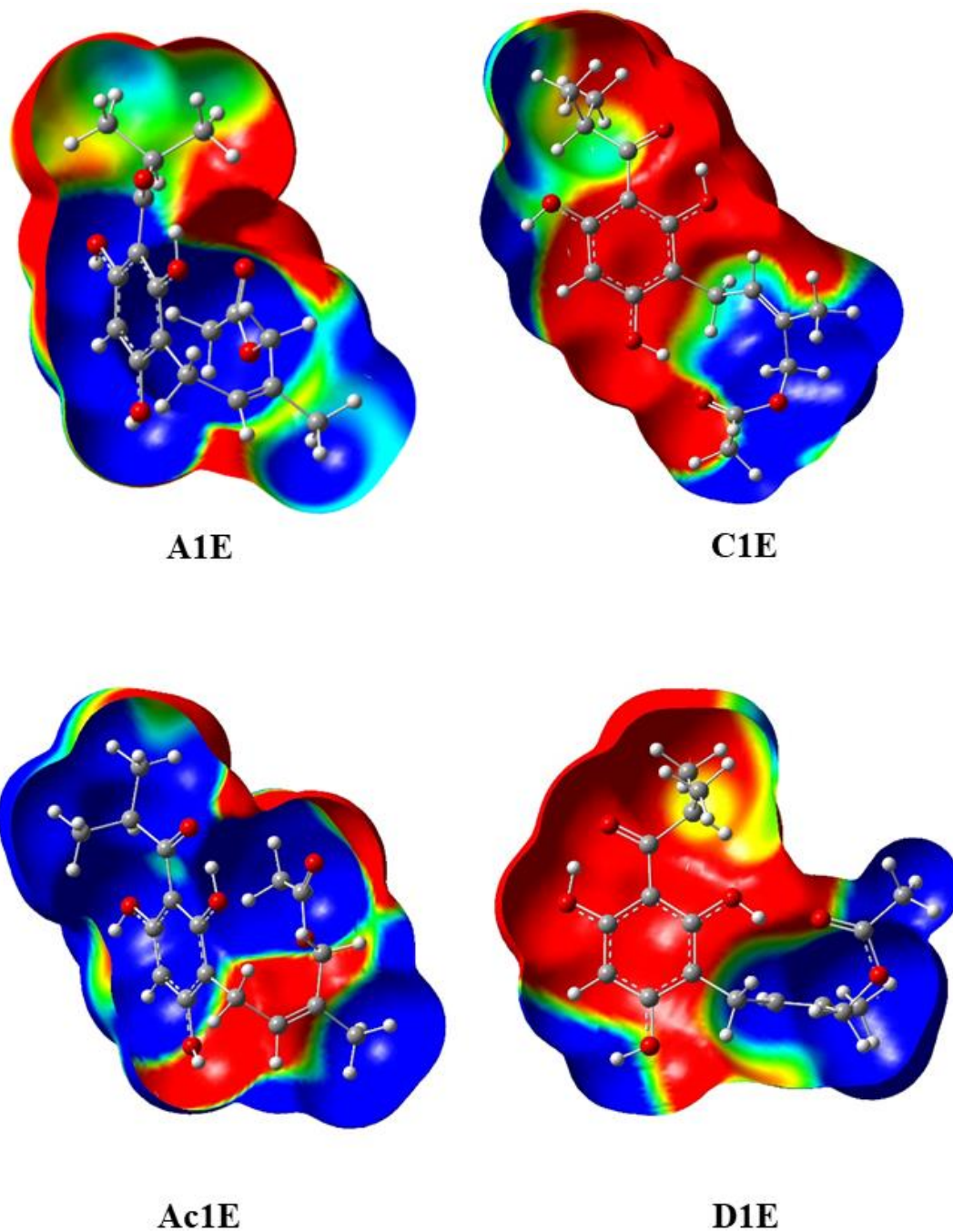


Figura 23. Potencial Electrostático Molecular (MEP) de las geometrías optimizadas de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir de los conformeros más estables en disolución implícita: en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1). En agua (A1E), en cloroformo (C1E), en acetonitrilo (Ac1E) y en DMSO (D1E).

5.4. Análisis QTAIM

Los puentes de hidrógeno intramoleculares (IHB) son especialmente relevantes para el estudio de moléculas biológicamente activas debido a sus funciones en el reconocimiento molecular, la actividad anticancerígena, la selectividad química y las interacciones entre la molécula y su diana biológica. La capacidad interesante de esta molécula para formar dos IHBs ha sido estudiada en trabajos anteriores [135, 136]. En nuestro caso, el primer IHB está formado por O15···H13 u O15···H11. El segundo IHB está formado por O41···H9 u O41···H13, ver Figura 24. La Figura 24 muestra los grafos moleculares de los conformeros más estables en fase gas y en disolución. Los puntos críticos de enlace (BCPs) están indicados en puntos de color verde y los puntos críticos de anillo (RCPs) en color púrpura. En la Tabla 7 se muestran los valores de la densidad electrónica, $\rho(\mathbf{r})$, el Laplaciano de la densidad electrónica, $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$, la energía cinética Lagrangiana, $G(\mathbf{r})$, la densidad de energía potencial, $V(\mathbf{r})$, la energía cinética Hamiltoniana, $H(\mathbf{r})$, la energía de interacción, $E_{H\dots Y}$, la distancia interatómica, D_{inter} , el ángulo de valencia, A_{inter} , y los índices de deslocalización, DI , de los BPCs correspondientes a ambos IHBs. Los valores de densidad electrónica, $\rho(\mathbf{r})$, de los puntos críticos de enlace (BCP) y de los puntos críticos de anillo (RCP) muestran la formación de enlaces no covalentes O···H y la formación de anillos estables en todos los conformeros. El primer IHB corresponde al BCP O15···H13 para G1, A1, C1 y Ac1, y al BCP O15···H11 para D1 con valores de $\rho(\mathbf{r})$ en el intervalo de 0.079 a 0.083 u.a., mientras que el segundo IHB corresponde al BCP O41···H9 de los conformeros G1 y C1, y al BCP O41···H13 para D1 con valores de $\rho(\mathbf{r})$ de 0.026 a 0.030 u.a., indicando que el primer IHB es más fuerte que el segundo. Los valores positivos de $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$ en los BCPs confirman la existencia de enlaces no-covalentes de tipo puente de hidrógeno débiles o de fuerza media, exhibiendo una disminución local de la densidad electrónica ($\nabla^2\rho(\mathbf{r}) > 0$) [137]. Además, el signo positivo del parámetro $H(\mathbf{r})$ indica que no hay suficiente acumulación de densidad de carga sobre el puente de hidrógeno para considerarse como enlace de puente de hidrógeno fuerte. Así, el signo positivo de $H(\mathbf{r})$ indica que la acumulación de densidad de carga sobre el enlace de hidrógeno tiene un efecto desestabilizante [138]. El parámetro $H(\mathbf{r})$ se interpreta como una consecuencia de la acumulación de densidad de carga en la interacción del BCP [139]. Los enlaces de puente de hidrógeno débiles o de fuerza media muestran valores positivos de $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$ y $H(\mathbf{r})$

[140]. Los valores de energía de interacción, $E_{H...Y}$, para el primer IHB se encuentran en el intervalo de 28.43 a 30.47 kcal mol⁻¹, siendo el conformero Ac1 el de mayor magnitud. Para el segundo IHB de los conformeros G1, C1 y D1, los valores están en el intervalo de 6.62 a 7.72 kcal mol⁻¹, siendo C1 el conformero de mayor valor. Cabe mencionar, que los valores de $E_{H...Y}$ del primer IHB son claramente mayores que los del segundo IHB, lo que indica que el primer IHB tiene un efecto estabilizador mayor en comparación del segundo. La clasificación de la fuerza de los puentes de hidrógeno indica que los puentes de hidrógeno fuertes tienen una energía de 15-40 kcal mol⁻¹ y los puentes de hidrógeno de fuerza media o moderada tienen energía de 4-15 kcal mol⁻¹ [141]. De acuerdo con esta clasificación el primer IHB es un puente de hidrógeno fuerte y el segundo es un puente de hidrógeno de fuerza media. Por otra parte, los índices de deslocalización, DI, tienen valores < 1.0 correspondientes a interacciones no-covalentes para ambos IHBs. Los DI para el BCP de los enlaces covalentes O12-H13 y O10-H11 tienen valores de $\cong 1.0$ u.a., indicando que estos enlaces tienen una fuerza de un enlace sencillo y que los átomos H13 y H11 contribuyen en menor extensión a la formación del puente de hidrógeno con O15. Las distancias de enlace de ambos puentes de hidrógeno O \cdots H, $D_{inter} \cong 1.50$ y 1.80 Å, indican que podrían tratarse de enlaces fuertes, sin embargo, los ángulos de valencia H-O \cdots H no son óptimos ($A_{inter} \cong 142.5$ -156.0 °) para la formación de puentes de hidrógeno fuertes, los cuales deben tener un valor cercano a 180° [142]. Con respecto a $\rho(r)$ en los RCP, los valores del primer IHB de todos los conformeros son similares, en un intervalo de 0.0239–0.0243 u.a., mientras que los valores de $\rho(r)$ en el RCP del segundo IHB son de 0.0079–0.0091 u.a., mostrando que las estructuras de anillo formadas por el puente de hidrógeno O15 \cdots H13 u O15 \cdots H11 estabilizan a la estructura en el mismo orden a los cinco conformeros, mientras que el anillo en los conformeros G1 y C1 con la formación de O41 \cdots H9, y D1 con la formación O41 \cdots H13 no contribuye significativamente a la estabilización del sistema. También se observan otras interacciones no-covalentes de tipo electrostático, por ejemplo, la interacción formada entre los átomos de hidrógeno del grupo metilo del grupo acilo y el átomo de oxígeno de los grupos OH en posición *orto* que no forma el primer IHB y algunas otras interacciones en la cadena prenilada, ver Figura 24.

Para el caso de los sistemas caespitato-disolvente explícito obtenidos a partir del conformero más estable en fase gas (G1) rodeado con los diferentes disolventes (ver Figura 13) y a partir de los conformeros más estables en disolvente implícito (ver Figura 15), se observa en la Tabla 8 que los valores de densidad electrónica, $\rho(\mathbf{r})$, para el primer IHB que corresponde al BCP O15...H13 para AG1E, CG1E, AcG1E, A1E, C1E y Ac1E u O15...H11 para D1E están en el intervalo de 0.038 a 0.076 u.a. Cabe destacar que el primer IHB no se conserva en el conformero DG1E (ver Figura 25). El segundo IHB corresponde al BCP O41...H9 para AG1E, CG1E, AcG1E, DG1E, C1E u O41...H13 para D1E con valores de $\rho(\mathbf{r})$ de 0.022 a 0.029 u.a. (ver Figura 25). Estos valores indican que el primer IHB es más fuerte que el segundo. Al igual que en disolución implícita, los valores positivos de $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$ y $H(\mathbf{r})$ en los BCP indican la presencia de enlaces no-covalentes (débiles o de fuerza media) [140]. Los valores de energía de interacción, $E_{H...Y}$, para el primer IHB se encuentran en el intervalo de 10.61 a 27.29 kcal mol⁻¹, siendo los conformeros AG1E y Ac1E los de mayor magnitud. Para el segundo IHB, los valores están en el intervalo de 5.21 a 7.65 kcal mol⁻¹, siendo CG1E y C1E los conformeros de mayor valor. De forma similar a los valores de $E_{H...Y}$ de solvatación implícita, para el primer IHB son mayores a los del segundo IHB, lo que indica un mayor efecto estabilizador del primer IHB en comparación con el segundo. En cuanto a los valores de DI, se observa que son < 1.0, indicando que corresponden a interacciones no-covalentes. Además, los DI para los enlaces covalentes O12-H13 y O10-H11 tienen valores de $\cong 1.0$ u.a., correspondientes a enlaces sencillos, indicando que los átomos H13 y H11 tienen contribuciones menores en la formación de los puentes de hidrógeno con O15. Las distancias de enlace de los dos puentes de hidrógeno O...H, $D_{\text{inter}} \cong 1.52$ y 1.90 Å, y los ángulos de valencia H-O...H, están en el intervalo de $A_{\text{inter}} \cong 141.7$ - 156.7° . Estos parámetros, al igual que en disolución implícita no son ideales para la formación de puentes de hidrógeno fuertes. Además, en el caso del conformero DG1E, la distancia de enlace del primer puente de hidrógeno O...H es de 2.74 Å, y el ángulo de valencia H-O...H es de 109.59° , lo que indica que el puente de hidrógeno no se conserva en este caso, a diferencia del conformero G1 en disolución implícita. En cuanto a $\rho(\mathbf{r})$ en los RCP, los valores del primer puente de hidrógeno (IHB) en todos los conformeros son similares en el intervalo de 0.020-0.023 u.a., mientras que para el segundo IHB varían entre 0.0051-0.0098 u.a. Esto indica que las estructuras de

anillo formadas por el puente de hidrógeno O15...H13 u O41...H13 estabilizan el sistema en todos los conformeros, excepto en DG1E. Por otro lado, la formación del anillo formado por el puente de hidrógeno O41...H9 u O41...H13 no contribuye significativamente a la estabilización del sistema. Además, se pueden apreciar otras interacciones no covalentes de naturaleza electrostática, como la interacción entre los átomos de hidrógeno presentes en el grupo metilo del grupo acilo y los átomos de oxígeno en posición *orto* de los grupos OH, que no participan en la formación del primer enlace de hidrógeno, y algunas otras interacciones en la cadena prenilada, como se muestra en las Figuras 25 y 26. De manera general, las energías de interacción, $E_{H...Y}$, de los sistemas caespitato-disolvente explícito son menores (10.60-27.30 kcal mol⁻¹ para el primer IHB y 5.20-6.55 kcal mol⁻¹ para el segundo IHB) respecto a las obtenidas con disolvente implícito (28.43-30.37 kcal mol⁻¹ para el primer IHB y 6.62-7.72 kcal mol⁻¹ para el segundo IHB), lo cual se puede explicar debido a las interacciones no-covalentes entre las moléculas de disolvente que rodean a la molécula de caespitato en los sistemas A1E, C1E, Ac1E y D1E.

Tabla 7. Parámetros topológicos (u.a.), $E_{H...Y}$ (kcal mol⁻¹), distancias interatómicas (D_{inter} , Å) y ángulos de enlace (A_{inter} , °) de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en fase gas y en disolución implícita. En fase gas (G1), en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1).

BCP	$\rho(\mathbf{r})$	$\nabla^2\rho(\mathbf{r})$	$G(\mathbf{r})$	$V(\mathbf{r})$	$H(\mathbf{r})$	$E_{H...Y}$	D_{inter}	A_{inter}	DI	RCP
G1										
O15...H13	0.0792	0.1694	0.0666	-0.0908	0.1574	28.49	1.50190	152.76	0.1542	0.0241
O41...H9	0.0289	0.1195	0.0269	-0.0240	0.0509	7.53	1.81314	155.80	0.0693	0.0091
A1										
O15...H13	0.0789	0.1700	0.0665	-0.0906	0.1571	28.43	1.50109	153.17	0.1528	0.0239
C1										
O15...H13	0.0813	0.1701	0.0682	-0.0939	0.1621	29.46	1.49256	153.44	0.1579	0.0242
O41...H9	0.0294	0.1205	0.0274	-0.0246	0.0520	7.72	1.81260	150.45	0.0698	0.0082
Ac1										
O15...H13	0.0833	0.1701	0.0698	-0.0971	0.1669	30.47	1.48306	154.00	0.1605	0.0243
D1										
O15...H11	0.0793	0.1704	0.0668	-0.0910	0.1580	28.54	1.50269	152.94	0.1555	0.0240
O41...H13	0.0263	0.1095	0.0242	-0.0211	0.0450	6.62	1.86758	142.44	0.0501	0.0079

Tabla 8. Parámetros topológicos (u.a.), $E_{H...Y}$ (kcal mol⁻¹), distancias interatómicas (D_{inter} , Å) y ángulos de enlace (A_{inter} , °) de las geometrías optimizadas de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir del confórmero más estable en fase gas (G1) y de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir de los confórmeros más estables en disolución implícita. En agua (AG1E/A1E), en cloroformo (CG1E/C1E), acetonitrilo (AcG1E/Ac1E) y DMSO (DG1E/D1E).

Fase Gas ^a										
BCP	$\rho(r)$	$\nabla^2\rho(r)$	G(r)	V(r)	H(r)	$E_{H...Y}$	D_{inter}	A_{inter}	DI	RCP
AG1E										
O15...H13	0.0759	0.1742	0.0651	-0.0866	0.1517	27.17	1.517	151.82	0.1468	0.0239
O41...H9	0.0226	0.0993	0.0211	-0.0174	0.0385	5.45	1.925	139.23	0.0535	0.0058
CG1E										
O15...H13	0.0554	0.1542	0.0475	-0.0565	0.1040	17.73	1.639	148.38	0.1194	0.0220
O41...H9	0.0283	0.1193	0.0266	-0.0235	0.0501	7.373	1.840	141.71	0.0666	0.0051
AcG1E										
O15...H13	0.0672	0.1678	0.0578	-0.0736	0.1314	23.092	1.564	150.94	0.1359	0.0232
O41...H9	0.0254	0.1090	0.0237	-0.0201	0.0474	6.306	1.857	156.73	0.0622	0.0087
DG1E										
O15...H13	--	--	--	--	--	--	2.741	109.59	---	--
O41...H9	0.0257	0.1104	0.0241	-0.0206	0.0447	6.463	1.867	144.68	0.0607	0.0065
Disolvente implícito^b										
BCP	$\rho(r)$	$\nabla^2\rho(r)$	G(r)	V(r)	H(r)	$E_{H...Y}$	D_{inter}	A_{inter}	DI	RCP
A1E										
O15...H13	0.0379	0.1299	0.0331	-0.0338	0.0669	10.605	1.516	152.84	0.0839	0.0198
C1E										
O15...H13	0.0550	0.1561	0.0476	-0.0562	0.1038	17.633	1.642	147.71	0.1178	0.0221
O41...H9	0.0293	0.1197	0.0271	-0.0244	0.0515	7.655	1.809	156.13	0.0712	0.0098
Ac1E										
O15...H13	0.0762	0.1731	0.0651	-0.0870	0.1521	27.296	1.516	152.84	0.1480	0.0238
D1E										
O15...H11	0.0689	0.1688	0.0591	-0.0760	0.1351	23.845	1.556	150.46	0.1398	0.0231
O41...H13	0.0220	0.0949	0.0202	-0.0166	0.0368	5.208	1.927	146.58	0.0532	0.0085

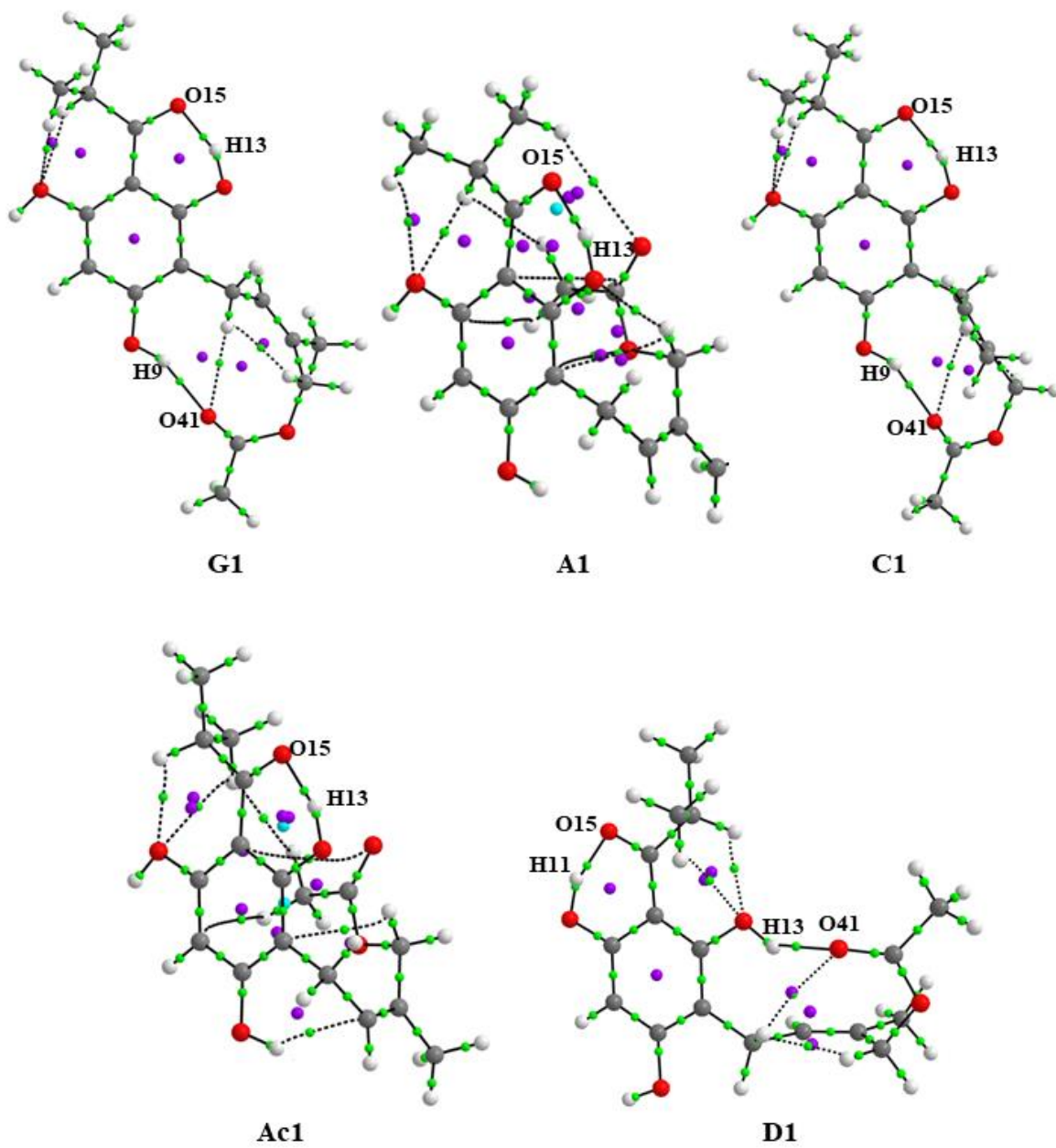


Figura 24. Grafos moleculares de los conformeros más estables de caespitato calculados en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en fase gas y en disolución. En fase gas (G1), en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1).

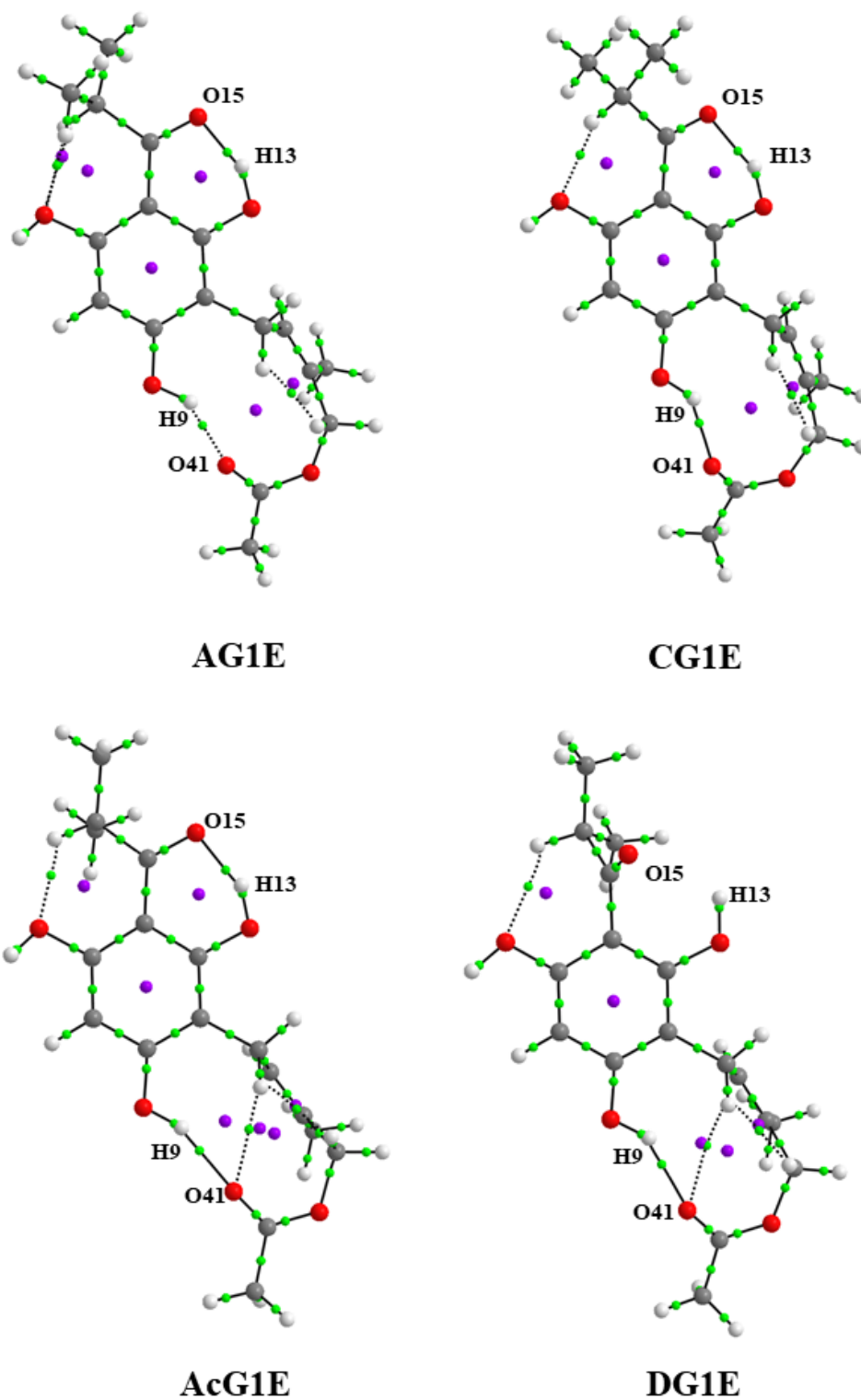


Figura 25. Grafos moleculares de los conformeros más estables de las geometrías optimizadas de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir del conformero más estables en fase gas (G1). En agua (AG1E), en cloroformo (CG1E), en acetonitrilo (AcG1E) y en DMSO (DG1E).

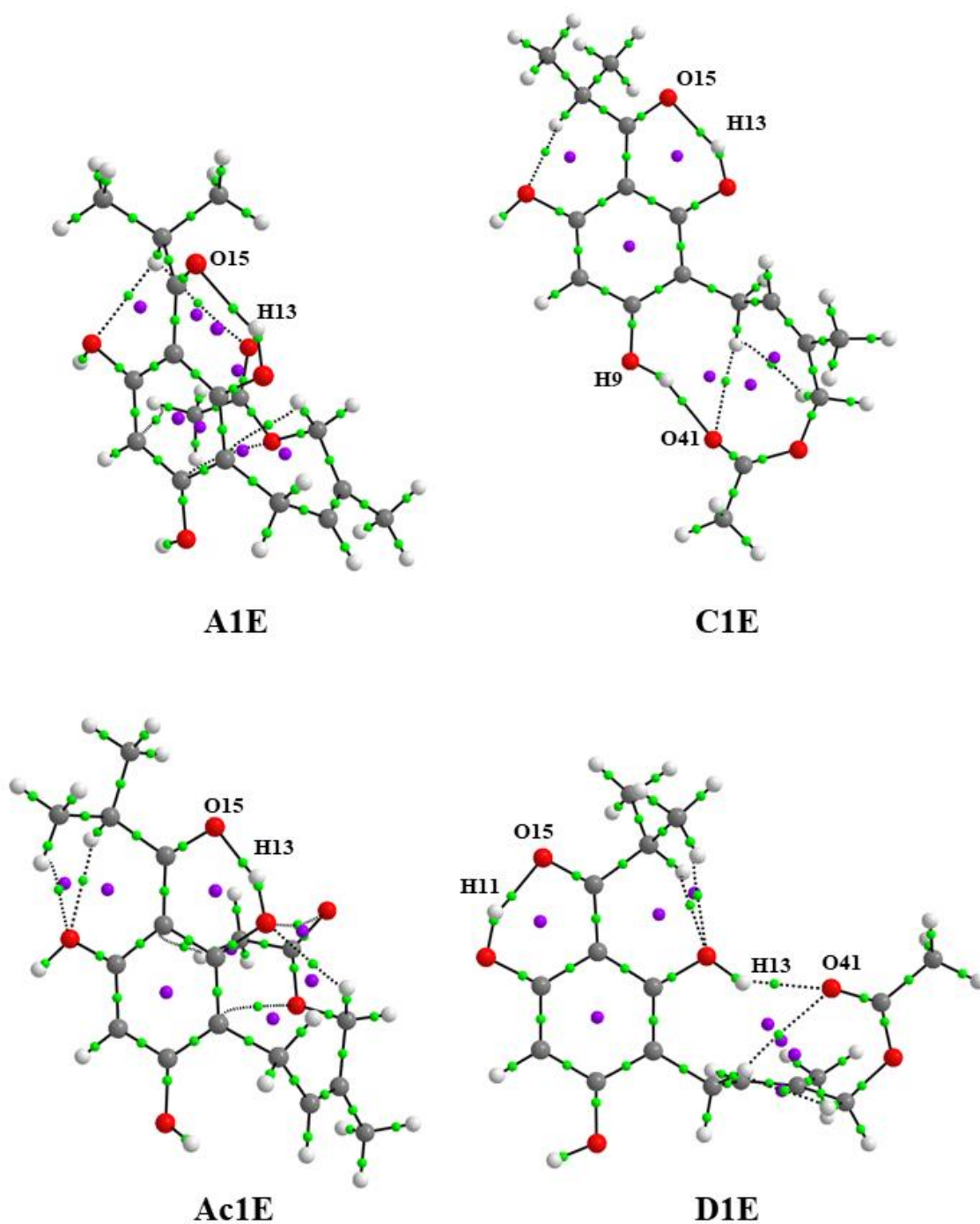


Figura 26. Grafos moleculares de las geometrías optimizadas de los sistemas caespitato-disolvente explícito usando el método ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2) obtenidos a partir de los conformeros más estables en disolución implícita: en agua (A1), en cloroformo (C1), en acetonitrilo (Ac1) y en DMSO (D1). En agua (A1E), en cloroformo (C1E), en acetonitrilo (Ac1E) y en DMSO (D1E).

5.5. Validación de los modelos de disolvente mediante espectroscopia RMN

Para validar los resultados de las estructuras de los conformeros más estables del caespitato considerando el disolvente implícito y explícito, se realizaron los cálculos de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C y se compararon con los espectros experimentales en cloroformo [26]. Los desplazamientos químicos (δ) de ^1H y ^{13}C en ppm se obtuvieron utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia. Para validar el nivel de teoría utilizado y confirmar que los desplazamientos químicos corresponden a la conformación extendida de caespitato en fase gas (G1) y en cloroformo utilizando los modelos implícito y explícito (C1 y C1E), se lleva a cabo una correlación entre los valores calculados y los datos experimentales reportados en cloroformo [26]. Las Tablas 9 y 10 muestran los valores experimentales (δ_{Exp}), calculados (δ_{Calc}) y recalculados (δ_{Recalc}) del desplazamiento químico de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , respectivamente. Los valores δ_{recalc} se estimaron mediante una ecuación de regresión lineal simple, $\delta_{\text{Recalc}} = (\delta_{\text{Calc}} - b)/m$, con pendiente m y ordenada al origen b [143]. Para asignar los desplazamientos químicos se utilizó el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en fase gas y en disolución implícita y explícita de acuerdo con la Figura 27.

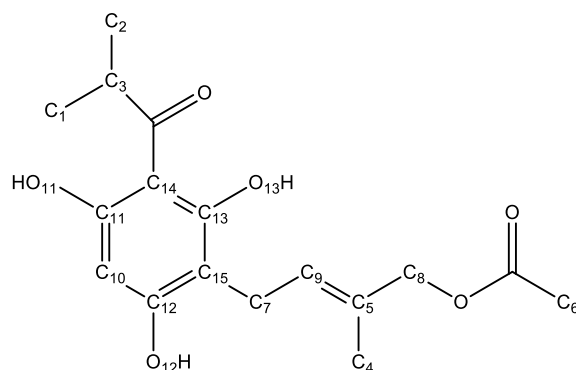


Figura 27. Estructura numerada de caespitato para la asignación de los desplazamientos químicos (δ) de RMN de ^1H y ^{13}C .

Los cálculos del desplazamiento químico (δ) para el conformero extendido del caespitato (G1, C1 y C1E) se llevaron a cabo para validar la metodología utilizada en este trabajo y verificar que la conformación extendida del caespitato es la más estable reportada experimentalmente [26]. Los valores de las Tablas 9 y 10 muestran una buena correlación

entre los valores experimentales, los calculados y los recalculados. Se obtuvieron coeficientes de correlación R^2 en el intervalo de 0.9753 a 0.9995 para ^1H y de 0.9986 a 0.9991 ^{13}C . En la Tabla 9, para los δ de ^1H algunos valores calculados en fase gas sobreestiman los datos experimentales, sin embargo, considerando el disolvente implícito varios valores mejoran y finalmente, considerando el disolvente explícito la mayoría de los valores concuerdan con los datos experimentales. En la Tabla 10, se observa una tendencia similar para los δ de ^{13}C . En fase gas algunos valores están sobreestimados respecto a los valores experimentales, pero considerando el disolvente implícito los resultados mejoran y finalmente considerando el disolvente explícito se obtiene la mejor correlación.

Tabla 9. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H experimentales, calculados y recalculados δ (ppm) con respecto al TMS del conformero más estable del caespitato calculado en el nivel de teoría APFD/6-311+G(2d,p) en fase gas y en disolución implícita y explícita.

Asignación	Experimental	Fase Gas		Disolvente implícito		Disolvente explícito	
	$\delta_{\text{Exp.}}$	$\delta_{\text{Calc.}}$	$\delta_{\text{Recalc.}}^a$	$\delta_{\text{Calc.}}$	$\delta_{\text{Recalc.}}^b$	$\delta_{\text{Calc.}}$	$\delta_{\text{Recalc.}}^c$
3H, <i>d</i> , C ₃ H–C ₁	1.17	1.092	1.520	0.906	1.014	1.111	1.202
3H, <i>d</i> , C ₃ H–C ₂	1.17	1.209	1.614	1.075	1.183	1.124	1.216
3H, <i>s</i> , =C ₅ –C ₄	1.73	1.782	2.077	1.722	1.836	1.637	1.731
3H, <i>s</i> , CO ₂ –C ₆	2.12	2.169	2.391	1.934	2.049	2.038	2.133
2H, <i>brd</i> , C ₉ –C ₇	3.40	3.760	3.678	3.339	3.464	3.309	3.410
1H, <i>septupl</i> , C ₃ H	3.96	3.899	3.790	3.606	3.733	3.853	3.956
2H, <i>s</i> , H–C ₈	4.79	4.875	4.580	4.803	4.938	4.507	4.613
1H, <i>brt</i> , H–C ₉	5.49	5.506	5.090	5.957	6.101	5.292	5.401
1H, <i>s</i> , H–C ₁₀	5.98	5.913	5.419	5.705	5.847	6.014	6.126
2H, <i>bs</i> , on H–O ₁₁ ; H–O ₁₂	7.90	7.583	6.770	7.442	7.596	7.782	7.902
1H, <i>bs</i> , on H–O ₁₃	12.90	16.128	13.682	12.658	12.848	12.778	12.918

$$^a\delta_{\text{Recalc}} = \frac{\delta_{\text{Calc}} + 0.6459}{1.2057}; R^2 = 0.9753$$

$$^b\delta_{\text{Recalc}} = \frac{\delta_{\text{Calc}} + 0.0778}{0.9880}; R^2 = 0.9951$$

$$^c\delta_{\text{Recalc}} = \frac{\delta_{\text{Calc}} + 0.0842}{0.9953}; R^2 = 0.9995$$

Tabla 10. Desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C experimentales, calculados y recalculados δ (ppm) con respecto al TMS del conformeros más estable del caespitato calculado en el nivel de teoría APFD/6-311+G (2d,p) en fase gas y en disolución implícita y explícita.

Asignación	Experimental	Fase Gas		Disolvente implícito		Disolvente explícito	
	δ_{Exp}	$\delta_{\text{Calc.}}$	$\delta_{\text{Recalc}}^{\text{a}}$	δ_{calc}	$\delta_{\text{recalc}}^{\text{b}}$	δ_{Calc}	$\delta_{\text{Recalc}}^{\text{c}}$
Me-C ₁	19.80	22.720	21.425	19.944	19.597	20.925	19.598
Me-C ₂	19.80	18.115	16.974	19.405	19.607	21.161	19.827
H ₂ -C ₇	21.50	23.651	22.326	23.812	23.394	25.086	23.634
Me-C ₄	21.70	22.941	21.639	23.409	22.998	23.527	22.122
Me-C ₆	21.70	22.579	21.289	21.008	21.623	22.625	21.248
2Me-C ₃	39.60	43.799	41.800	40.653	39.920	42.830	40.843
H ₂ -C ₈	64.80	66.789	64.021	64.508	63.330	65.386	62.718
H-C ₁₀	95.70	96.263	92.509	95.194	93.444	96.499	92.893
C ₁₄	104.50	105.240	101.187	107.617	105.636	108.476	104.509
C ₁₅	106.50	109.381	105.188	105.164	103.229	107.483	103.546
H-C ₉	129.50	138.954	133.773	137.302	134.767	137.963	133.106
C ₅	130.10	138.559	133.391	132.657	130.209	137.626	132.780
C ₁₁	160.20	164.646	158.605	162.111	159.114	163.896	158.257
C ₁₂	161.60	168.873	162.691	165.919	162.851	166.556	160.837
C ₁₃	164.00	172.110	165.819	166.913	163.826	167.933	162.173
OC=O	173.60	182.444	175.808	176.349	173.086	181.642	175.468
C=O	211.80	215.724	207.975	215.309	211.320	220.177	212.841

$$^{\text{a}}\delta_{\text{Recalc}} = \frac{\delta_{\text{Calc}} - 0.5528}{1.0346}; R^2 = 0.9986.$$

$$^{\text{b}}\delta_{\text{Recalc}} = \frac{\delta_{\text{Calc}} - 0.2344}{1.0173}; R^2 = 0.9992.$$

$$^{\text{c}}\delta_{\text{Recalc}} = \frac{\delta_{\text{Calc}} - 0.7169}{1.0311}; R^2 = 0.99951.$$

5.6. Acoplamiento molecular en AutoDock Vina

Los resultados del acoplamiento semiflexible para las enzimas InhA, MabA, UGM y PanK con los ligantes más estables de caespitato en fase gas (G1) y en disolución (A1, C1, Ac1 y D1) no simularon los datos experimentales, debido a que se perdió la conformación del ligante y, en consecuencia, también la de los IHB, que son muy importantes para mostrar la actividad biológica descrita. Los resultados del acoplamiento semiflexible se presentan en el Anexo A. En cambio, los resultados del acoplamiento rígido mostraron mejores energías de afinidad, se conservaron ambos IHB y se observaron interacciones con los aminoácidos esenciales con cada blanco terapéutico. A continuación, se muestran los resultados usando acoplamiento rígido.

5.6.1. Acoplamiento rígido con la enzima InhA

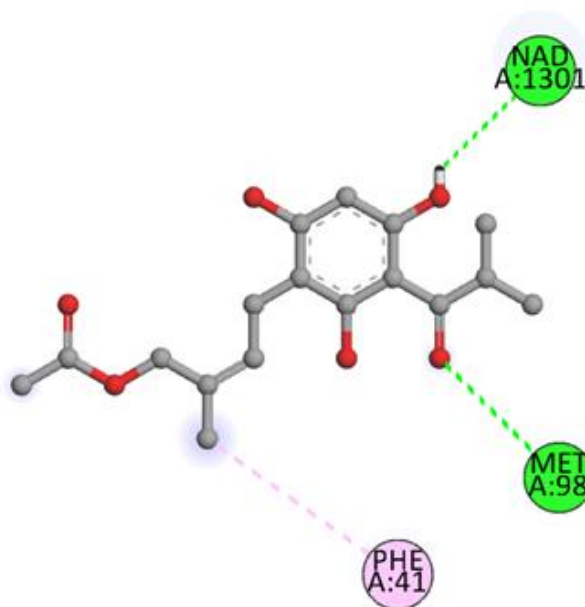
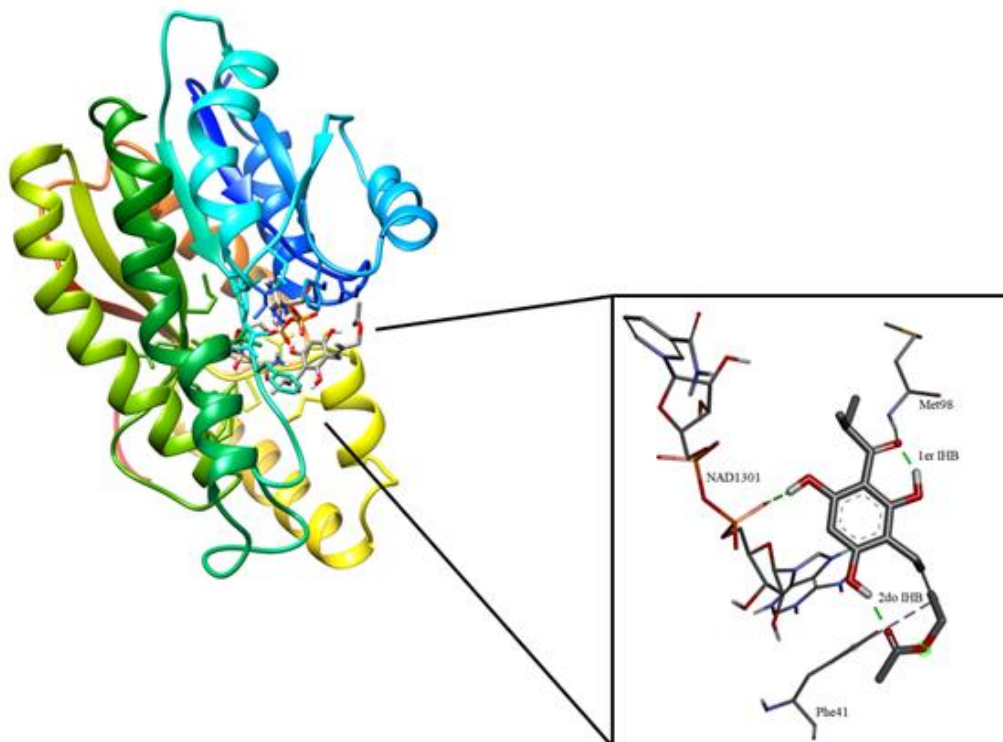
En la Tabla 11 y en la Figura 28, en los complejos InhA-G1r, InhA-A1r, InhA-C1r, InhA-Ac1r e InhA-D1r, las etiquetas G1, A1, C1, Ac1 y D1 se refieren a los conformeros optimizados más estables en cada fase y la letra r se refiere al acoplamiento rígido. Para los complejos con la enzima InhA, las energías de afinidad se obtienen en el intervalo de -7.0 a -7.8 kcal mol⁻¹, con el mejor valor para el complejo InhA-C1r (-7.8 kcal mol⁻¹), sin embargo, no se observan interacciones relevantes con los aminoácidos importantes de la enzima InhA para este complejo, ver Tabla 11. En la Figura 28 se observan las interacciones del acoplamiento rígido de los complejos con la enzima InhA. En el complejo InhA-G1r, el ligante presenta una interacción de puente de hidrógeno con la cadena lateral del residuo Met98. El residuo Met98 es importante [144], ya que pertenece al sitio activo previamente identificado [130]. En los complejos InhA-Ac1r e InhA-D1r se observa la interacción de puente de hidrógeno con el residuo Arg43. La cadena lateral del residuo Arg43 constituye un bolsillo no observado de la enzima [145]. En InhA-D1r, se observa la interacción de puente de hidrógeno con el residuo Ala198. El residuo Ala198 es importante ya que pertenece al bucle de unión al sustrato que se encuentra en el sitio activo. También se observa una interacción de puente de hidrógeno con el cofactor NAD en los complejos InhA-G1r, InhA-A1r e InhA-Ac1r, sin embargo, en InhA-A1r no se observan interacciones fuertes con ningún aminoácido del sitio activo al igual que en el acoplamiento semiflexible. Las interacciones con el cofactor NAD dan indicios de la afinidad del ligante por unirse al sitio con el cofactor, el cual está involucrado en la farmacorresistencia a la isoniazida.

En general, como se observa en la Tabla 11 en todos los complejos con la enzima InhA las energías de afinidad del acoplamiento rígido son mejores (de -7.0 a -7.8 kcal mol⁻¹) que en el caso del acoplamiento semiflexible (de -5.7 a -6.5 kcal mol⁻¹).

Tabla 11. Energías de afinidad (kcal mol^{-1}) e interacciones principales del acoplamiento molecular rígido en AutoDock Vina de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima InhA.

Medio	Complejo	Energía de afinidad	Aminoácidos	Tipo de interacción
Fase gas	InhA-G1r	-7.1	Met98	Puente de hidrógeno
			Phe41 NAD1301	π -alquilo Puente de hidrógeno
Agua	InhA-A1r	-7.0	NAD1301	Puente de hidrógeno
Cloroformo	InhA-C1r	-7.8	—	—
Acetonitrilo	InhA-Ac1r	-7.3	Arg43	Puente de hidrógeno
			NAD1301	Puente de hidrógeno
DMSO	InhA-D1r	-7.1	Arg43	Puente de hidrógeno
			Ile16	π -alquilo
			Phe41	π -alquilo
			Ala198	Puente de hidrógeno

(a)

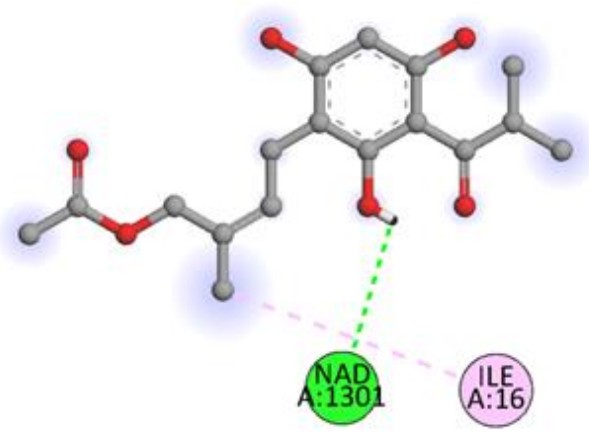
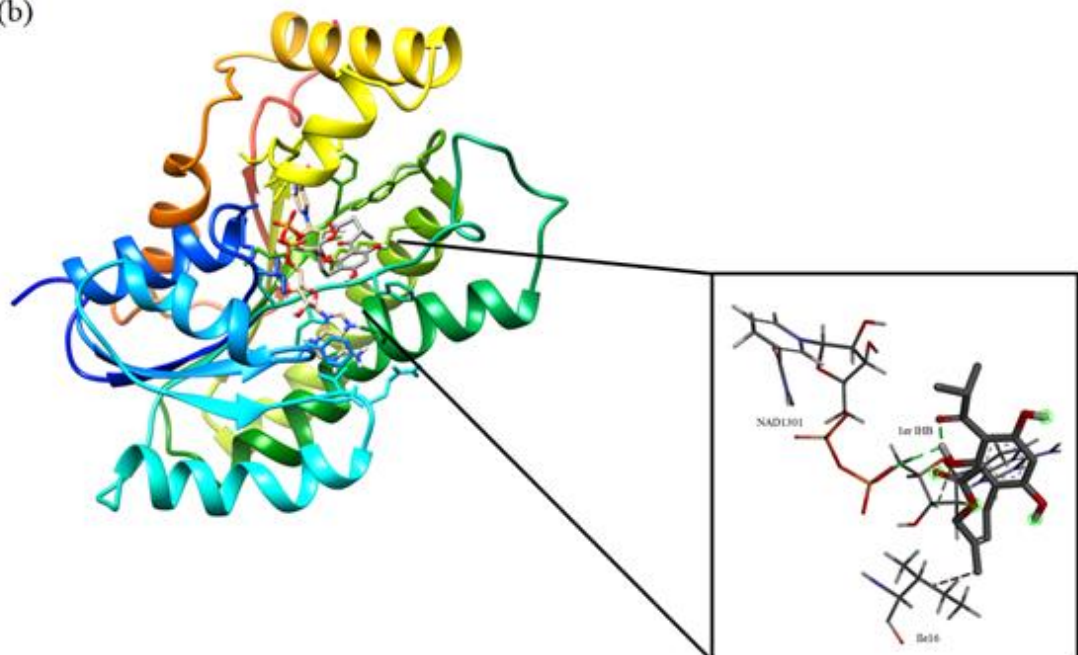


Interactions

Conventional Hydrogen Bond

Pi-Alkyl

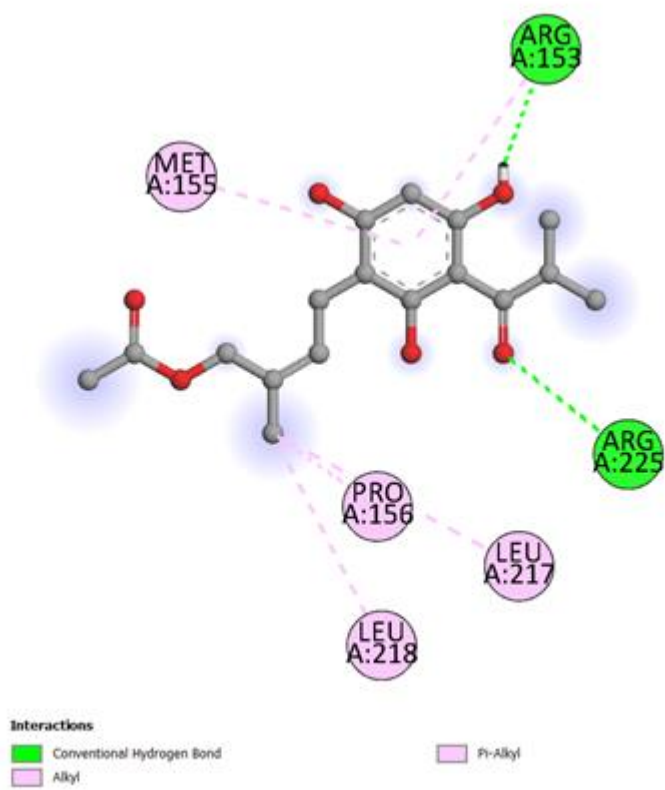
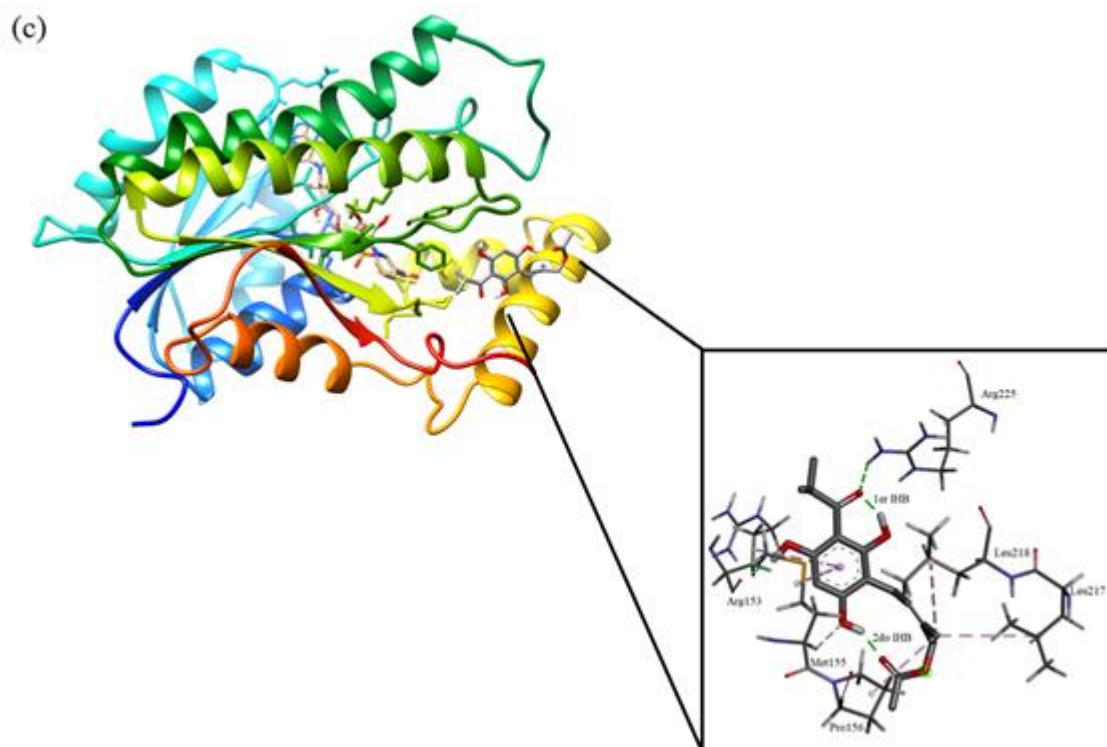
(b)



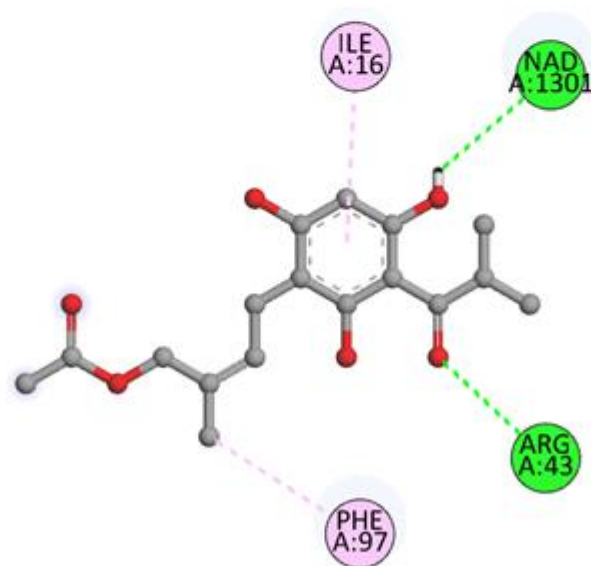
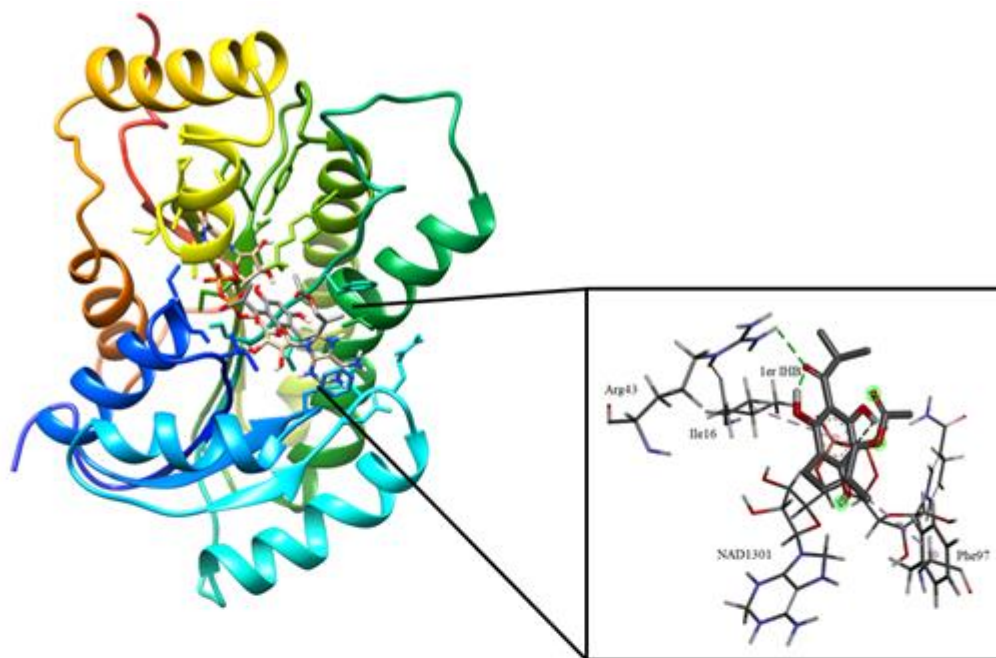
Interactions

 Conventional Hydrogen Bond

 Alkyl



(d)



Interactions

 Conventional Hydrogen Bond

 Pi-Alkyl

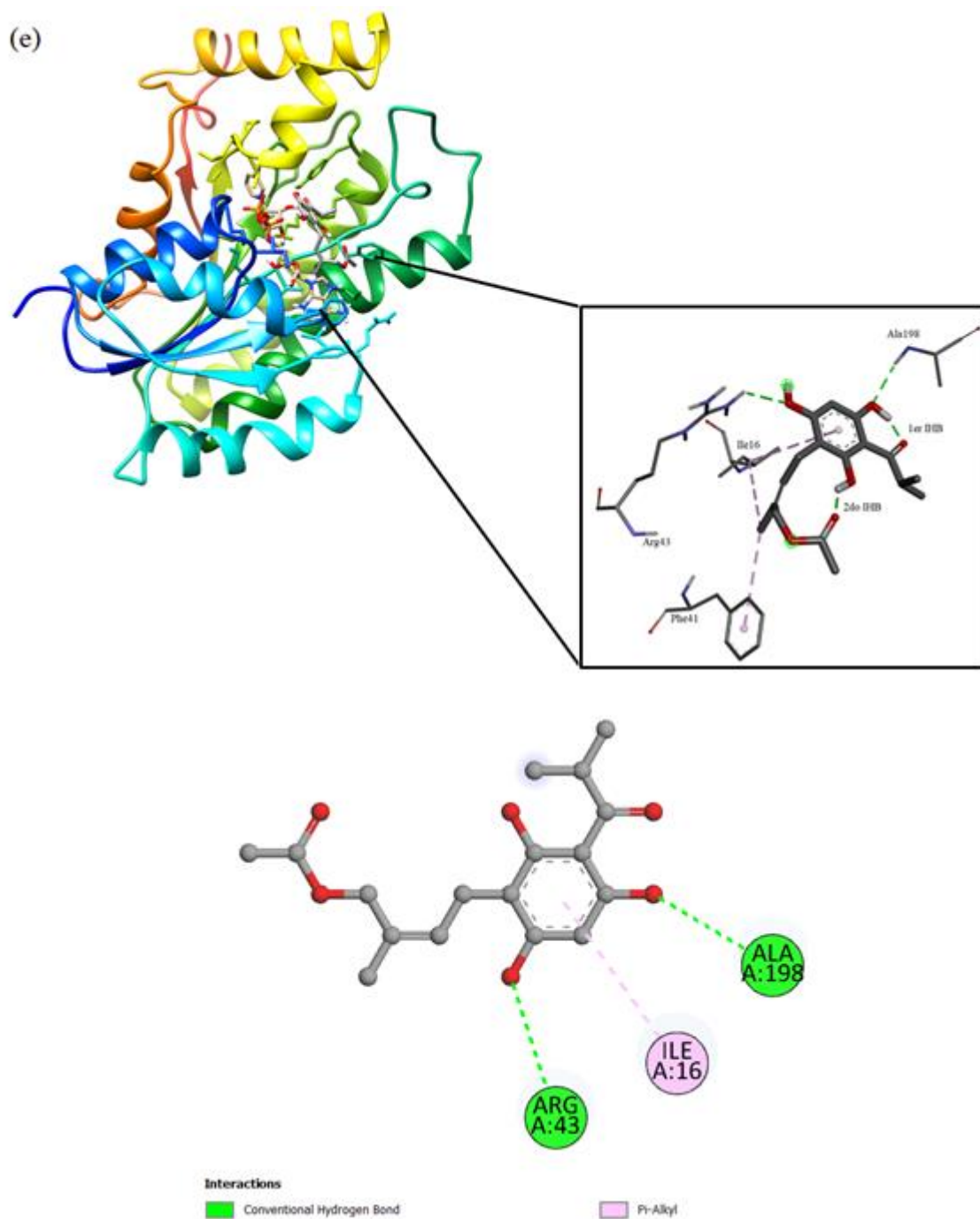


Figura 28. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular rígido en AutoDock Vina de los complejos de la enzima InhA con los conforméros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) InhA-G1r, (b) InhA-A1r, (c) InhA-C1r, (d) InhA-Ac1r y (e) InhA-D1r.

5.6.2 Acoplamiento rígido con la enzima MabA

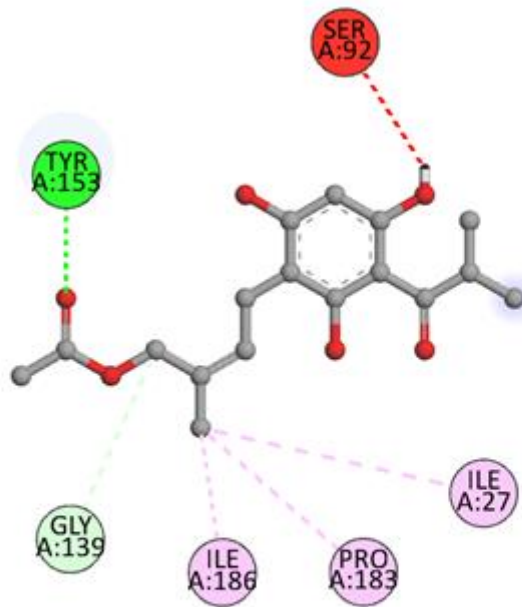
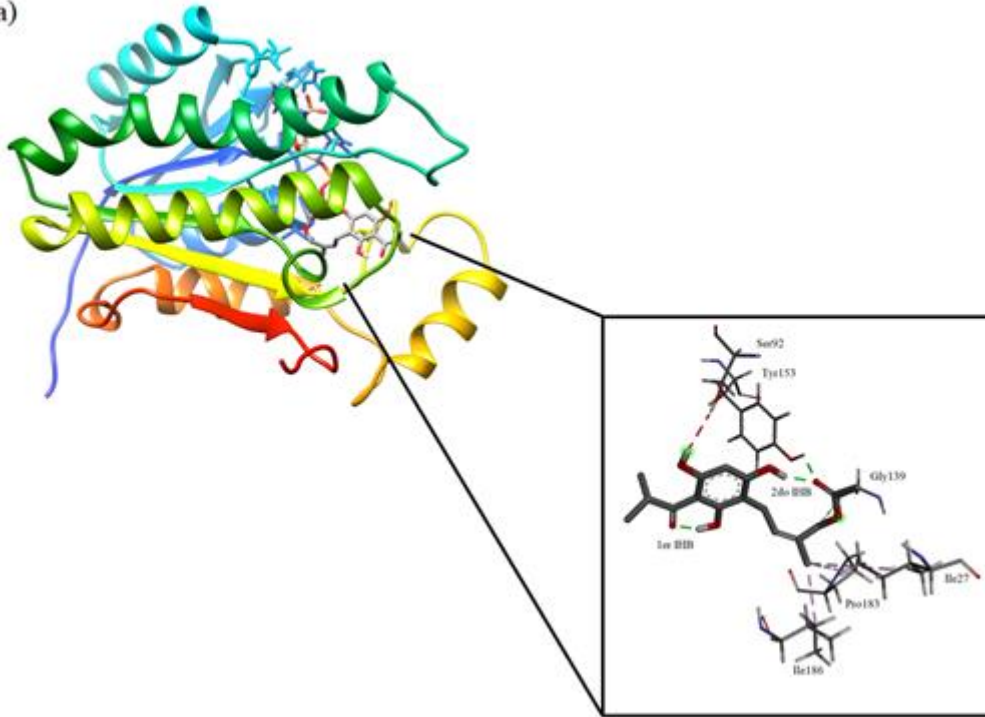
Las energías de afinidad se obtienen en el intervalo de -7.4 a -8.4 kcal mol⁻¹ para los complejos con la enzima MabA. El complejo MabA-C1r muestra una mejor energía de -8.4 kcal mol⁻¹, sin embargo, a pesar del valor de energía de afinidad obtenido, este complejo no presenta interacciones relevantes con los aminoácidos importantes de la enzima MabA, ver Tabla 12. En la Figura 29 se observa la interacción con el residuo Tyr153 en los complejos MabA-G1r y MabA-D1r vía puente de hidrógeno, mientras que en MabA-A1r y MabA-Ac1r existe una interacción desfavorable aceptor-aceptor y una interacción π - σ , respectivamente. El residuo Tyr153 pertenece a la tríada catalítica y juega un papel importante en la catálisis ácido-base de la enzima MabA. Los complejos MabA-A1r y MabA-C1r muestran interacción vía puente de hidrógeno con el cofactor NAP. Estas interacciones señalan la afinidad entre el ligante caespitato y el cofactor, que forma un aducto covalente con la isoniazida, lo que resulta en la inhibición de la actividad de MabA.

En general, los datos reportados en la Tabla 12 indican que en todos los complejos con la enzima MabA las energías de afinidad del acoplamiento rígido son ligeramente mejores (-7.4 a -8.4 kcal mol⁻¹) que en el caso del acoplamiento semiflexible (-7.0 a -7.3 kcal mol⁻¹).

Tabla 12. Energías de afinidad (kcal mol⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular rígido en AutoDock Vina de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima MabA.

Medio	Complejo	Energía de afinidad	Aminoácidos	Tipo de interacción
Fase gas	MabA-G1r	-7.5	Tyr153	Puente de hidrógeno
			Gly139	Enlace C-H
			Ile27	Alquilo
			Pro183	Alquilo
			Ser92	Desfavorable donador-donador
			Ile186	Alquilo
Agua	MabA-A1r	-7.7	Tyr153	Desfavorable acceptor-acceptor
Cloroformo	MabA-C1r	-8.4	NAP1249	Puente de hidrógeno
Acetonitrilo	MabA-Ac1r	-7.8	Tyr153	π - σ
DMSO	MabA-D1r	-7.4	Tyr153	Puente de hidrógeno
			Ser140	van der Waals
			Met190	Alquilo

(a)

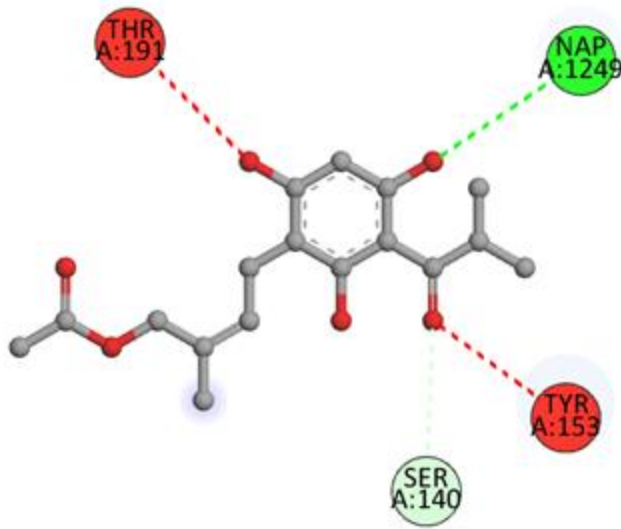
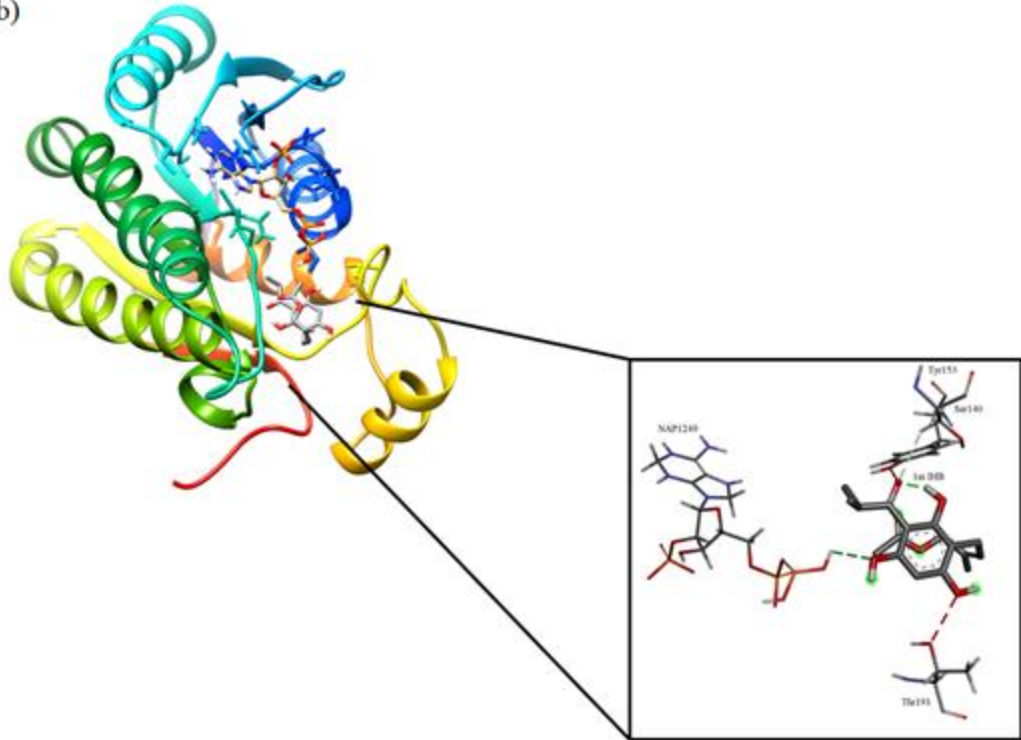


Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond

- Unfavorable Donor-Donor
- Alkyl

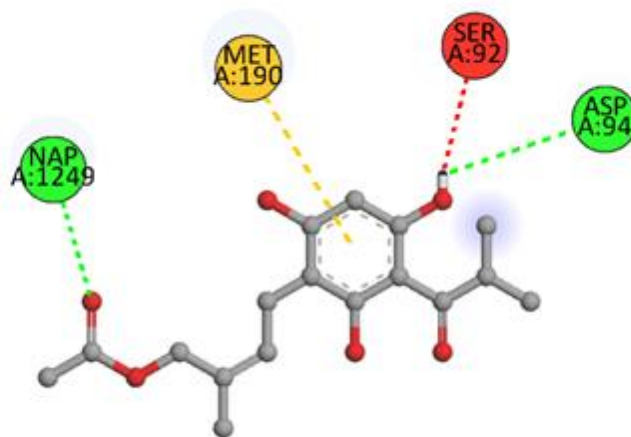
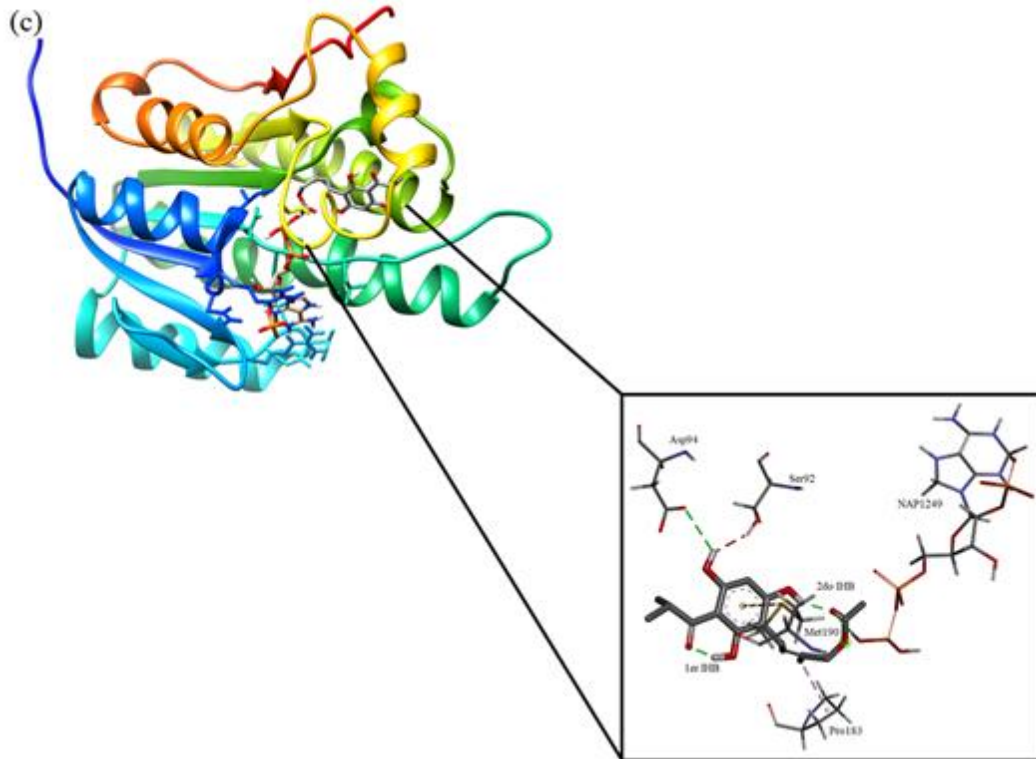
(b)



Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond

- Unfavorable Acceptor-Acceptor

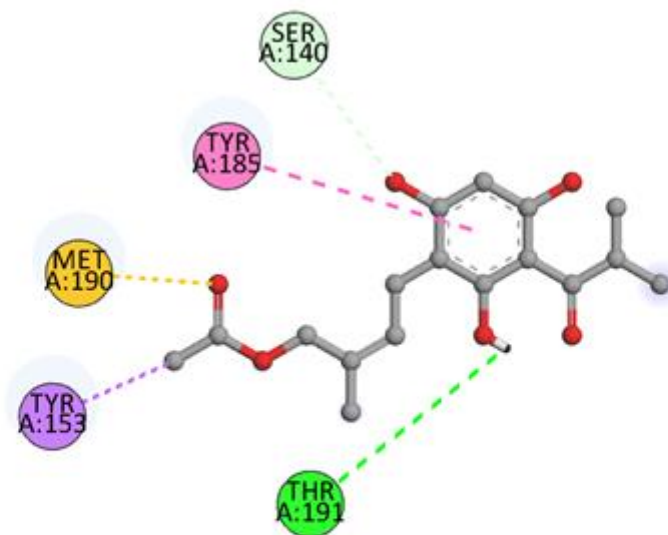
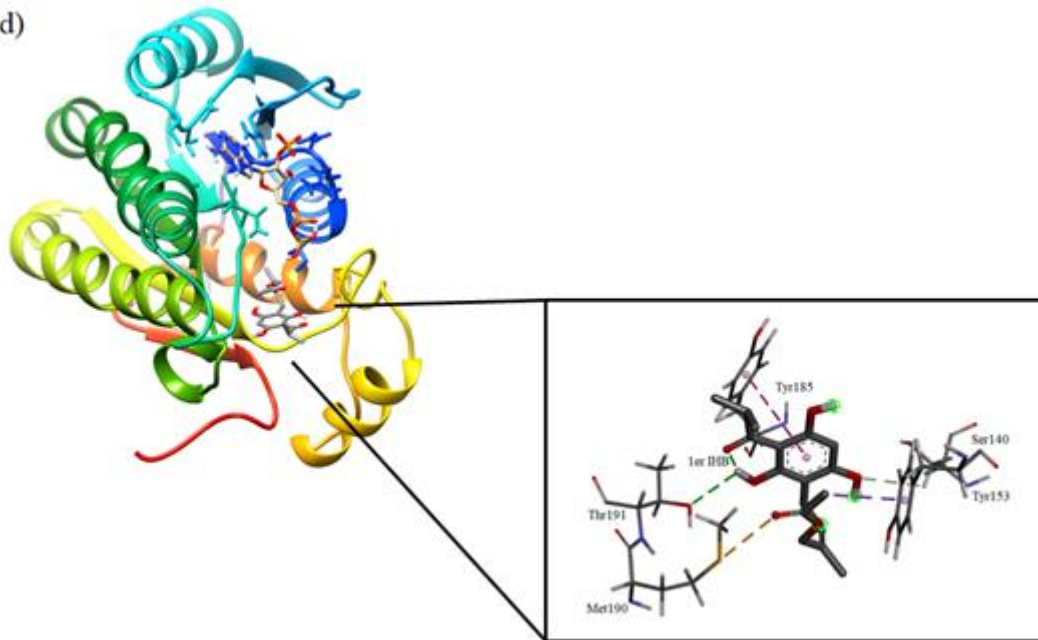


Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Unfavorable Donor-Donor

■ Pi-Sulfur

(d)



Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Sulfur-X

- Pi-Sigma
- Pi-Pi T-shaped

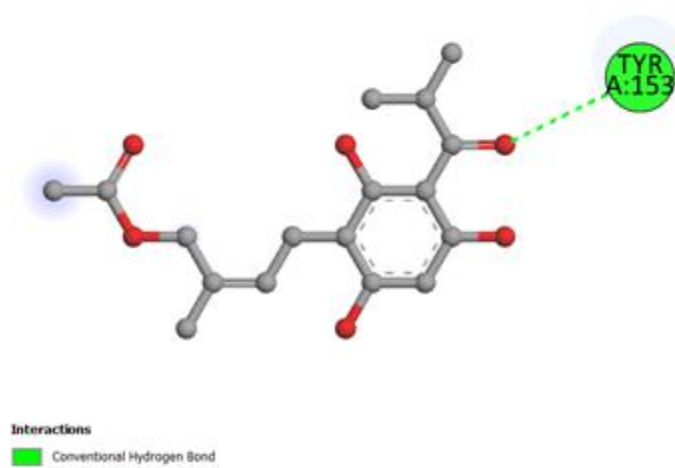
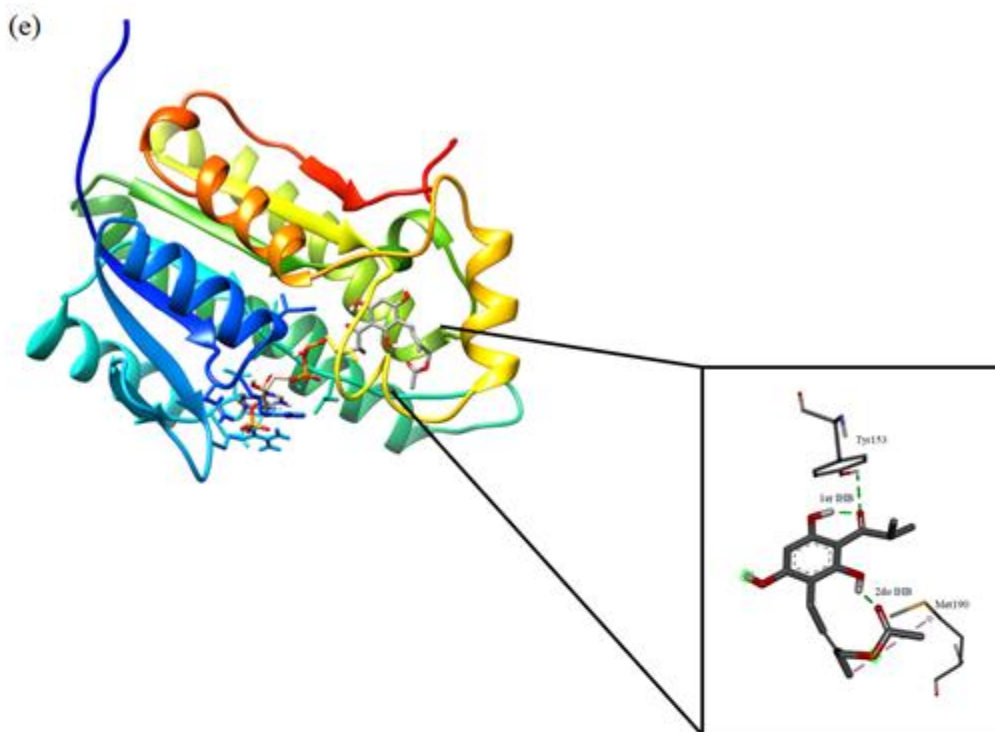


Figura 29. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular rígido en AutoDock Vina de los complejos de la enzima MabA con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) MabA-G1r, (b) MabA-A1r, (c) MabA-C1r, (d) MabA-Ac1r y (e) MabA-D1r.

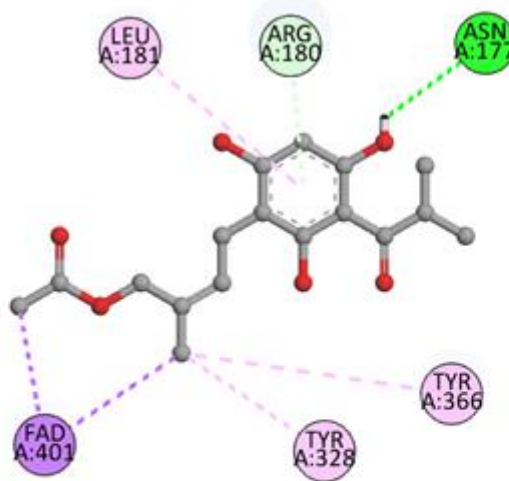
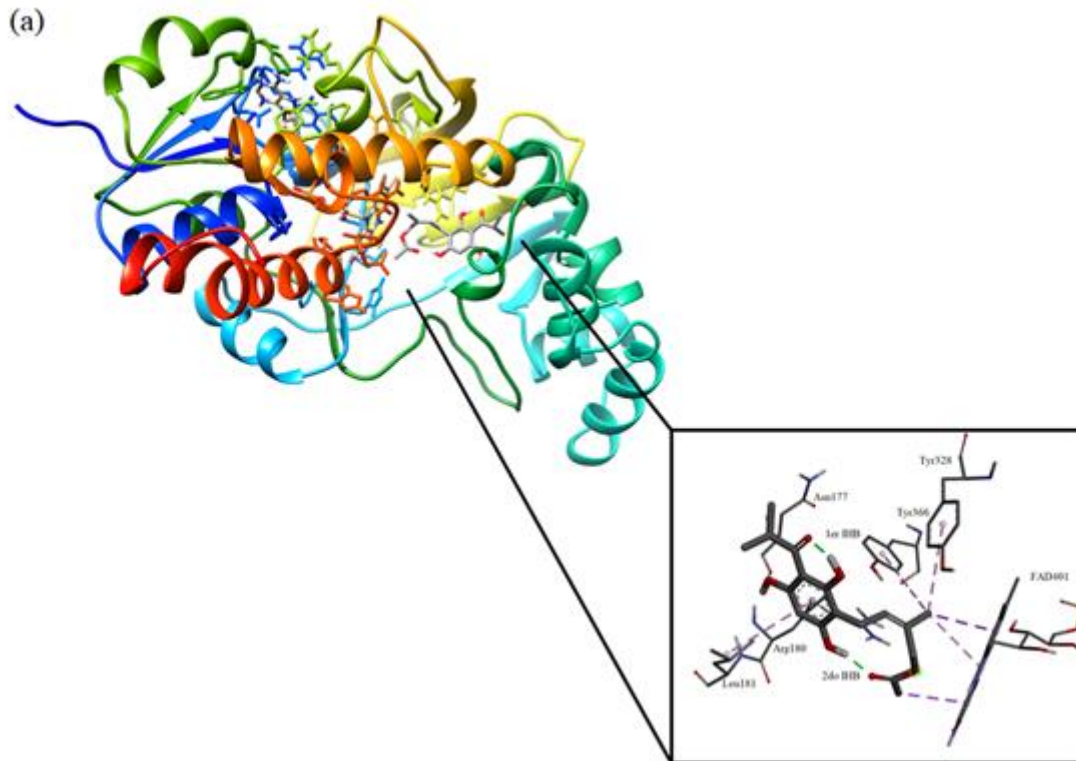
5.6.3 Acoplamiento rígido con la enzima UGM

Las energías de afinidad de los complejos con la enzima UGM se encuentran en el intervalo de -7.4 a -9.9 kcal mol⁻¹, siendo el complejo UGM-C1r mejor en valor de energía de afinidad con -9.9 kcal mol⁻¹, ver Tabla 13. En la Figura 30 se observan las interacciones del acoplamiento rígido de los complejos con la enzima UGM. Se observan las siguientes interacciones con el residuo Arg180: en el complejo UGM-G1r muestra una interacción vía puente de hidrógeno π -donador, UGM-A1r muestra la interacción de puente de hidrógeno e interacción desfavorable donador-donador, UGM-C1r muestra una interacción puente de hidrógeno y UGM-Ac1r muestra las interacciones de puente de hidrógeno y π -alquilo. El residuo Arg180 juega un papel esencial en la catálisis de UGM [146]. Con el residuo Tyr366 se observan las siguientes interacciones: con el complejo UGM-G1r se observa la interacción π -alquilo, en UGM-C1r se observa la interacción desfavorable aceptor-aceptor, y en UGM-A1r y UGM-D1r se observan interacciones de puente de hidrógeno convencional. El aminoácido Tyr366 está implicado en la estabilización del grupo β -fosfato del sustrato UDP. Por otro lado, en los complejos UGM-G1r, UGM-C1r y UGM-D1r se observan interacciones π - σ con el cofactor FAD, además el complejo UGM-C1r también muestra una interacción vía puente de hidrógeno con el cofactor FAD, esta interacción favorable indica que el ligante tiene afinidad por el cofactor. La enzima UGM necesita de FAD reducido para catalizar la interconversión reversible de UDP-galactopiranososa (UDP-Galp) y UDP-galactofuranosa (UDP-Galf).

En general, los datos reportados en la Tabla 13, indican que en todos los complejos de la enzima UGM, las energías de afinidad del acoplamiento rígido son mejores (-9.3 a -9.9 kcal mol⁻¹) que en el caso del acoplamiento semiflexible (-8.7 a -8.9 kcal mol⁻¹), excepto en los complejos UGM-Ac1r y UGM-D1r con -7.4 y -8.4 kcal mol⁻¹, respectivamente.

Tabla 13. Energías de afinidad (kcal mol⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular rígido en AutoDock Vina de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima UGM.

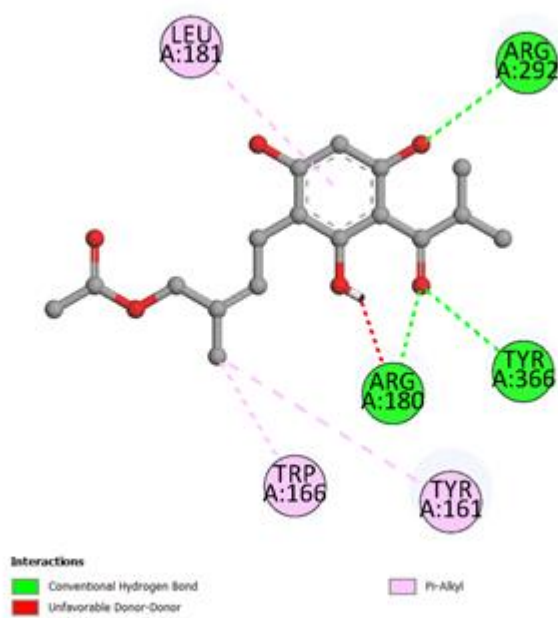
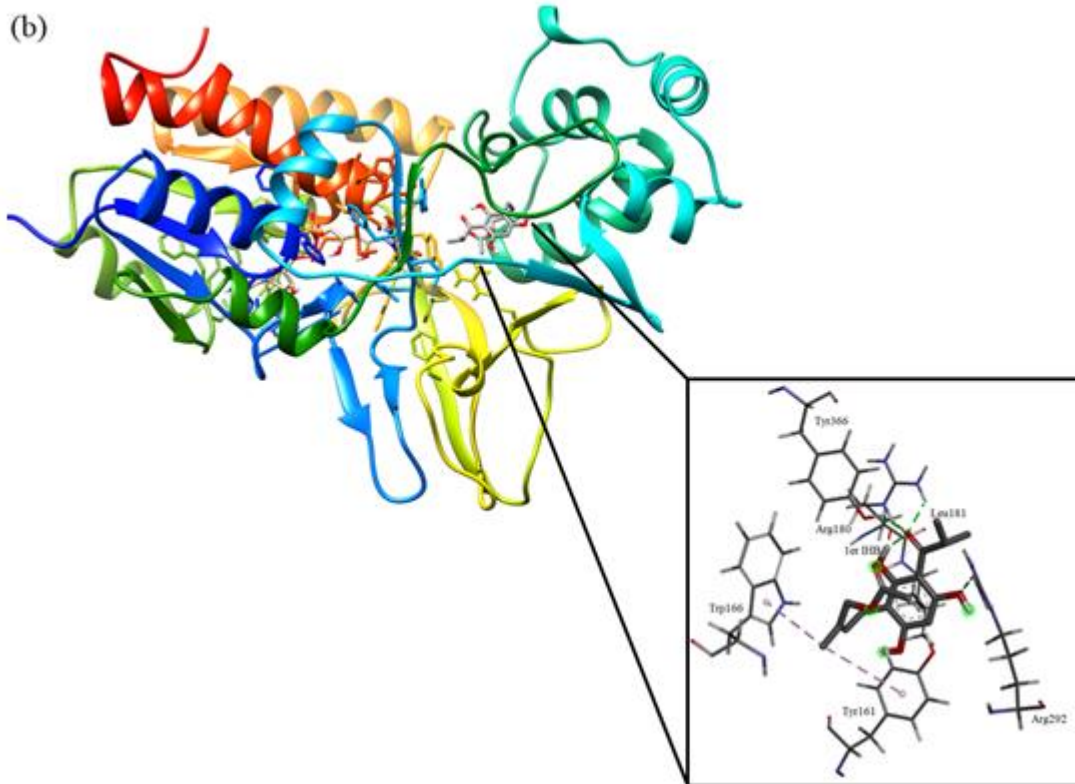
Medio	Complejo	Energía de afinidad	Aminoácidos	Tipo de interacción
Fase gas	UGM-G1r	-9.3	Arg180	Puente de hidrógeno π - donador
			Asn177	Puente de hidrógeno π - σ
Agua	UGM-A1r	-9.6	FAD401	π -alquilo
			Leu181	π -alquilo
			Tyr382	π -alquilo
			Tyr366	Puente de hidrógeno y desfavorable donador-donador
			Arg180	Puente de hidrógeno
Cloroformo	UGM-C1r	-9.9	Tyr366	Desfavorable aceptor- aceptor
			FAD401	Puente de hidrógeno y π - σ
Acetonitrilo	UGM-Ac1r	-7.4	Arg180	Puente de hidrógeno y π -alquilo
DMSO	UGM-D1r	-8.4	Tyr366	Puente de hidrógeno
			Tyr161	π - π
			Leu181	π -alquilo
			Tyr191	π -alquilo
			Phe192	π -alquilo
			Arg180	van der Waals
			FAD401	π - σ

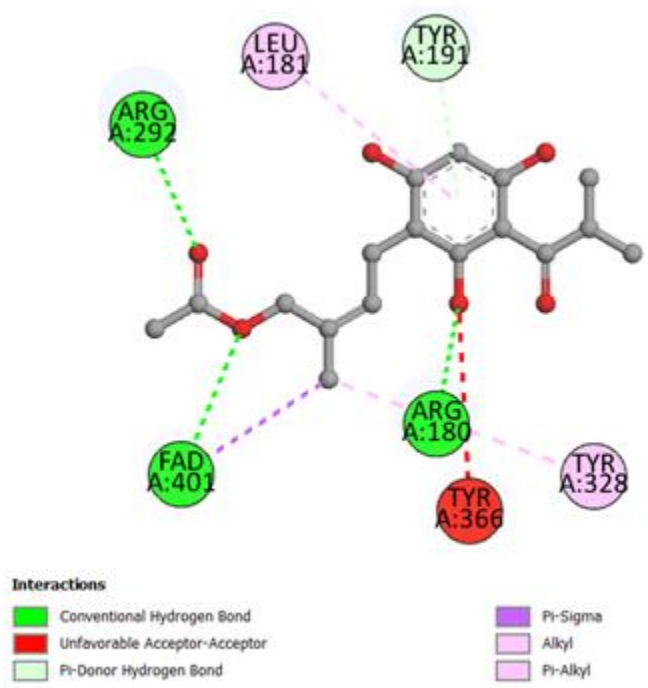
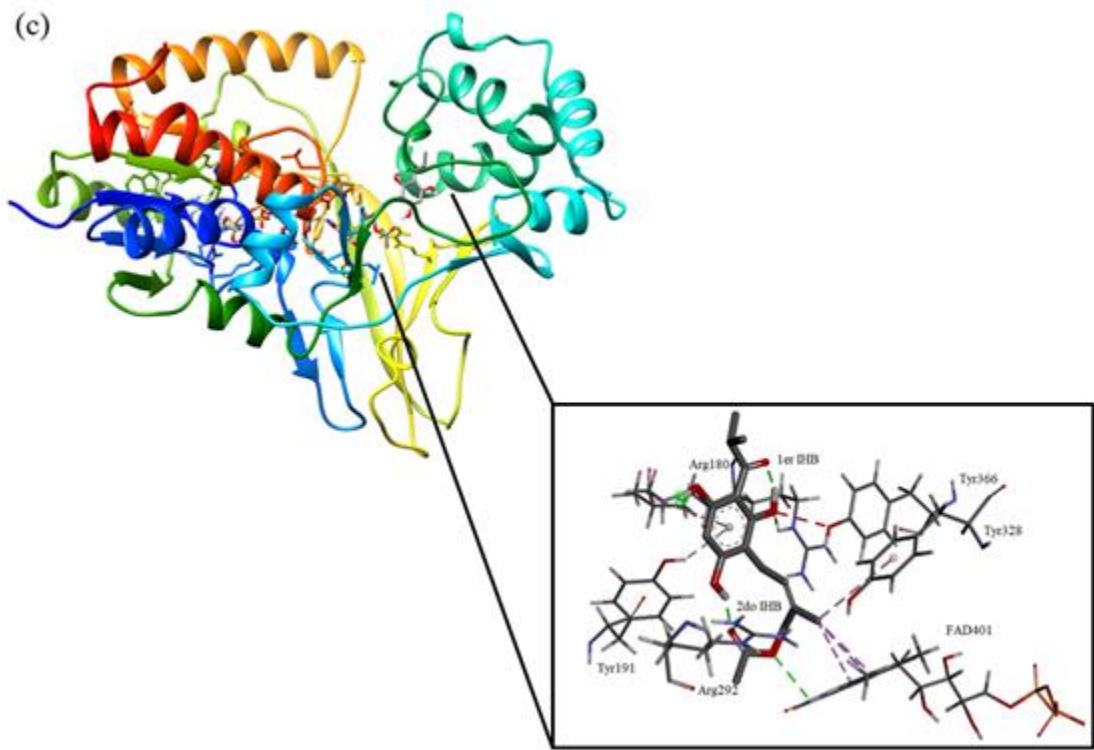


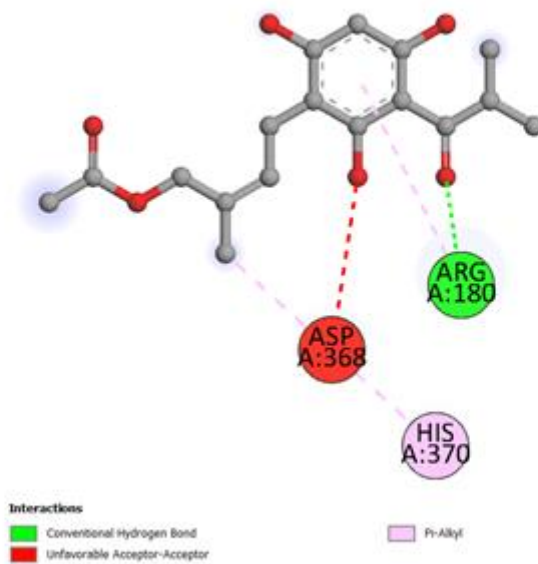
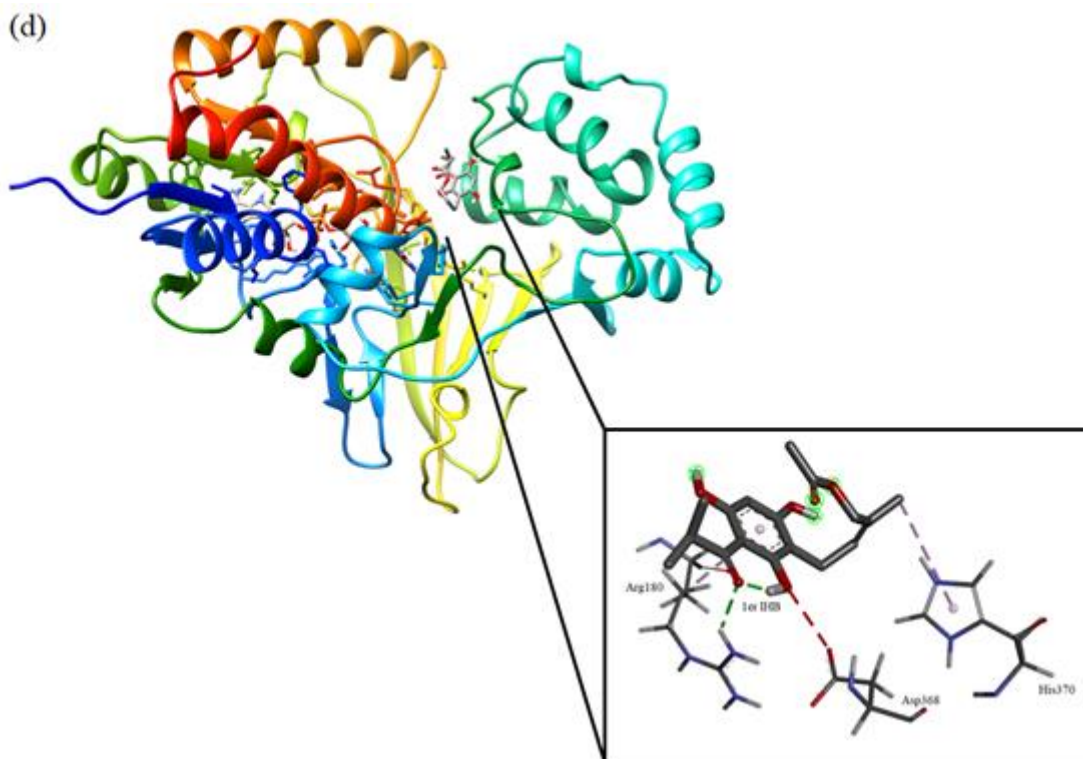
Interactions

■ Conventional Hydrogen Bond
■ Pi-Donor Hydrogen Bond

■ Pi-Sigma
■ Pi-Alkyl







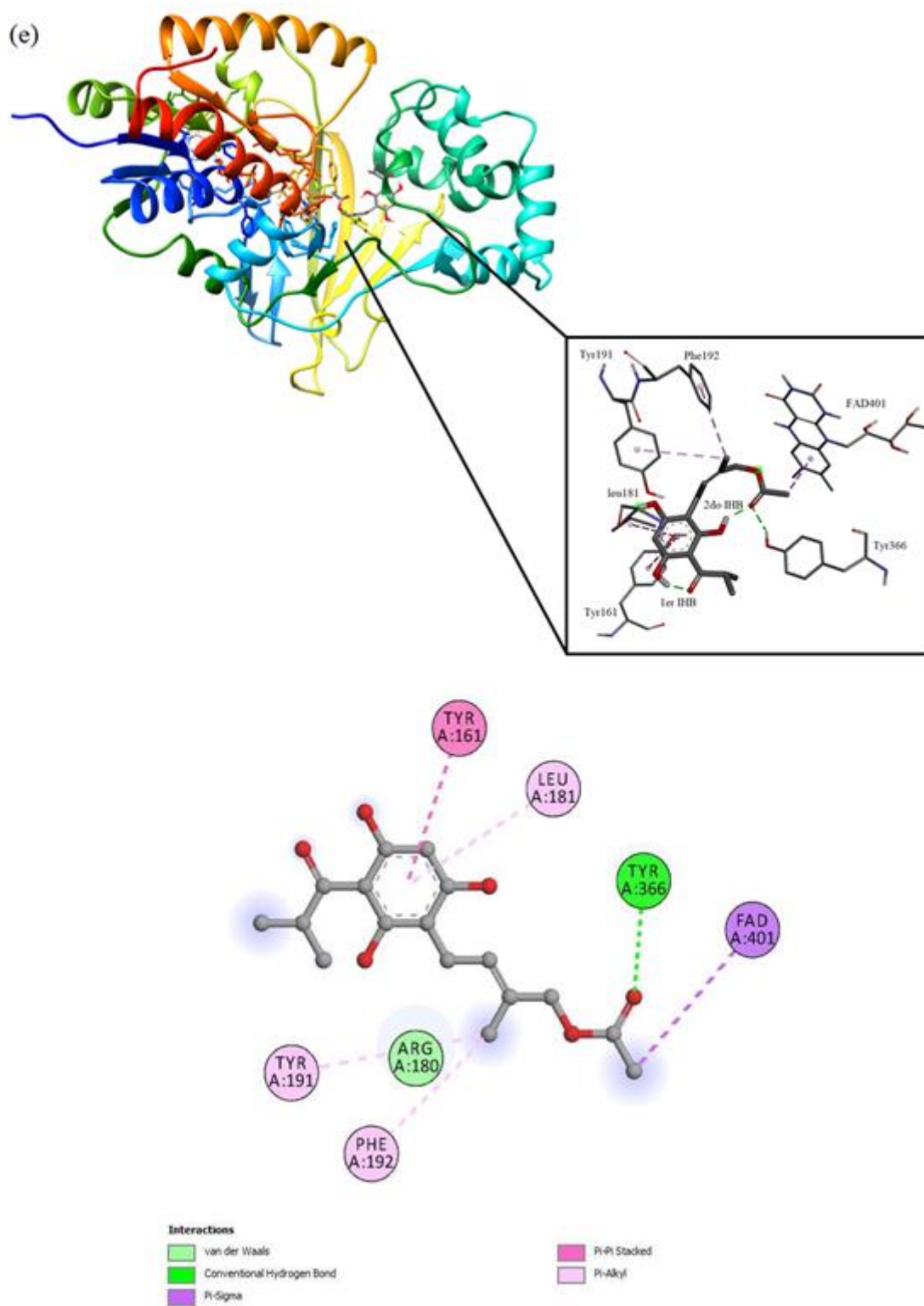


Figura 30. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular rígido en AutoDock Vina de los complejos de la enzima UGM con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) UGM-G1r, (b) UGM-A1r, (c) UGM-C1r, (d) UGM-Ac1r y (e) UGM-D1r.

5.6.4 Acoplamiento rígido con la enzima PanK

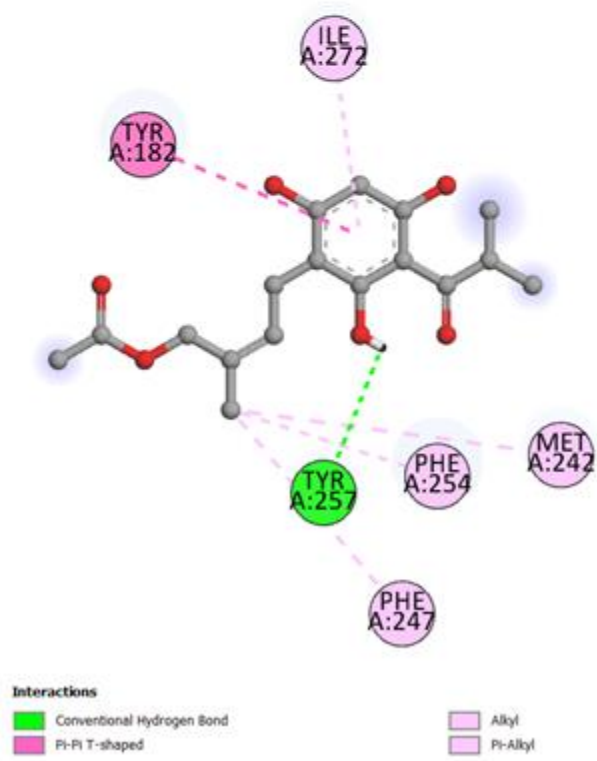
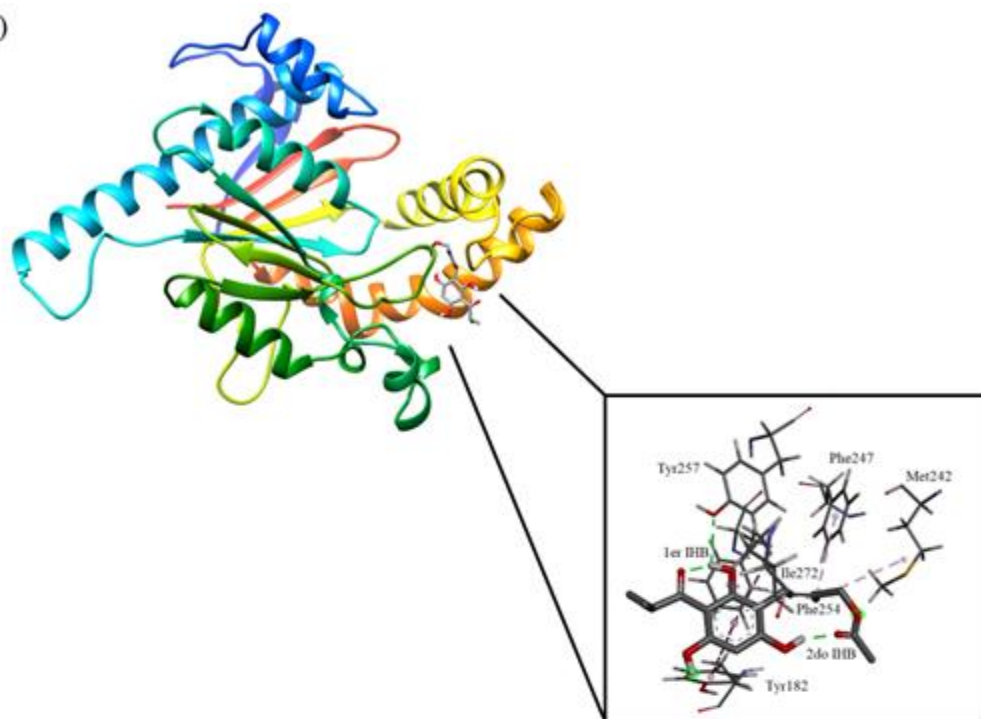
Las energías de afinidad de los complejos con la enzima PanK tienen valores similares en el intervalo de -8.8 a -9.0 kcal mol⁻¹, ver Tabla 14. En la Figura 31 se observan las interacciones del acoplamiento rígido de los complejos con la enzima PanK. En el complejo PanK-G1r se observa la interacción π -alquilo con el residuo Phe254, mientras que el complejo PanK-D1r muestra una interacción de van der Waals. También se observa la interacción vía puente de hidrógeno con el residuo Tyr257 en PanK-G1r. Ambos aminoácidos, Phe254 y Tyr257, forman parte del recubrimiento de un túnel preformado en el sitio activo de la enzima que no interviene en la unión del sustrato de la coenzima A. También se observa la interacción π - π entre el aminoácido Tyr182 en los complejos PanK-G1r, PanK-A1r y PanK-Ac1r, mientras que los complejos PanK-C1r y PanK-D1r muestran interacciones de puente de hidrógeno convencional y puente de hidrógeno π -donador con Tyr182, respectivamente. El aminoácido Tyr182 constituye el túnel preformado en el sitio activo de la enzima. Por otra parte, se observa una interacción desfavorable aceptor-aceptor, una de puente de hidrógeno convencional y de tipo π -alquilo en los complejos PanK-A1r, PanK-C1r y PanK-D1r, respectivamente, con el residuo Tyr235. El complejo PanK-C1r también presenta una interacción de puente de hidrógeno π -donador con el residuo Asn277, mientras que el complejo PanK-D1r muestra interacción de van der Waals con este aminoácido. Ambos residuos, Tyr235 y Asn277, son importantes ya que su cadena lateral de estos residuos recubre el túnel preformado (superficie mayormente hidrofóbica) en el sitio activo que no interviene en la unión del sustrato de la coenzima A.

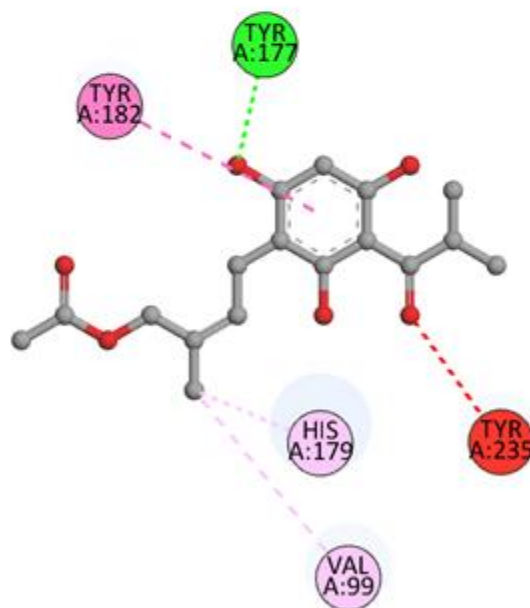
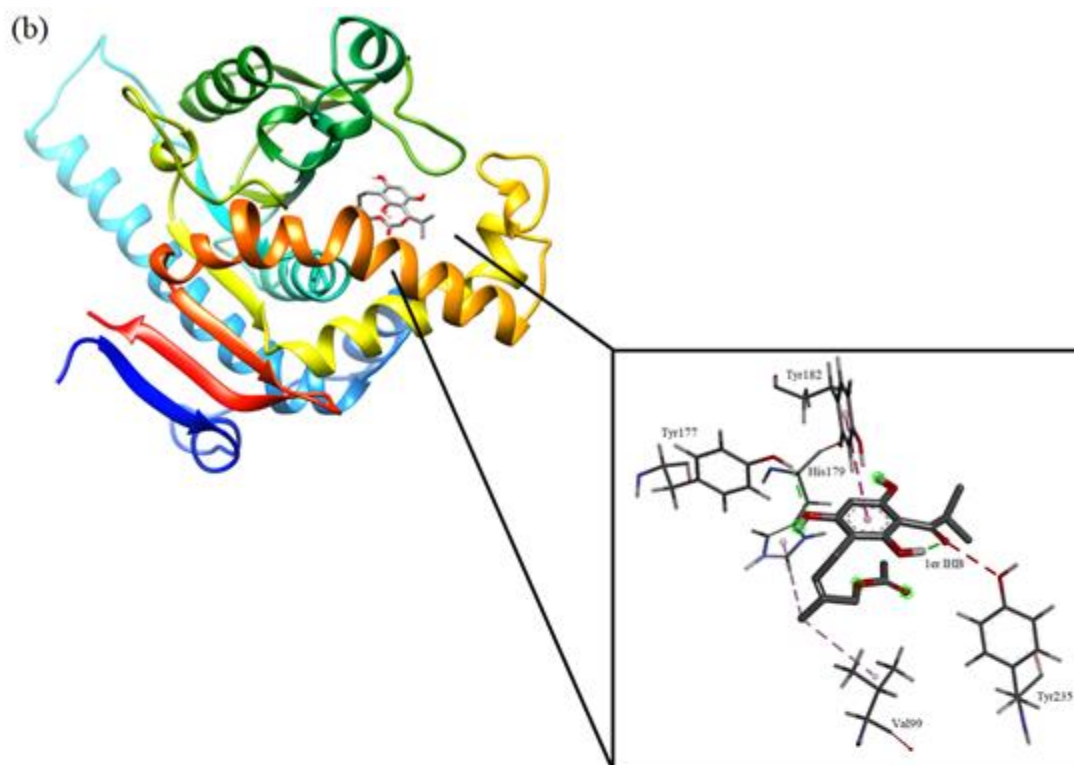
En general, los datos reportados en la Tabla 14 indican que en todos los complejos de la enzima PanK, las energías de afinidad del acoplamiento rígido son mejores (-8.8 a -9.0 kcal mol⁻¹) que en el caso del acoplamiento semiflexible (-7.0 a -7.3 kcal mol⁻¹).

Tabla 14. Energías de afinidad (kcal mol⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular rígido en AutoDock Vina de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima PanK.

Medio	Complejo	Energía de afinidad	Aminoácidos	Tipo de interacción
Fase gas	PanK-G1r	-9.0	Phe254 Tyr182 Tyr257 Phe247 Ile272 Met242	π -alquilo π - π Puente de hidrógeno π -alquilo π -alquilo Alquilo
Agua	PanK-A1r	-8.8	Tyr235 Tyr182	Desfavorable aceptor-aceptor π - π
Cloroformo	PanK-C1r	-9.0	Asn277 Tyr235 Tyr182	Puente de hidrógeno y π -donador Puente de hidrógeno Puente de hidrógeno
Acetonitrilo	PanK-Ac1r	-8.9	Tyr182	π - π
DMSO	PanK-D1r	-9.0	Tyr182 Lys174 Phe254 Tyr235 Phe239 Phe247 Ile276 Asn277	Puente de hidrógeno y π -donador Puente de hidrógeno van der Waals π -alquilo π -alquilo π -alquilo π -alquilo van der Waals

(a)

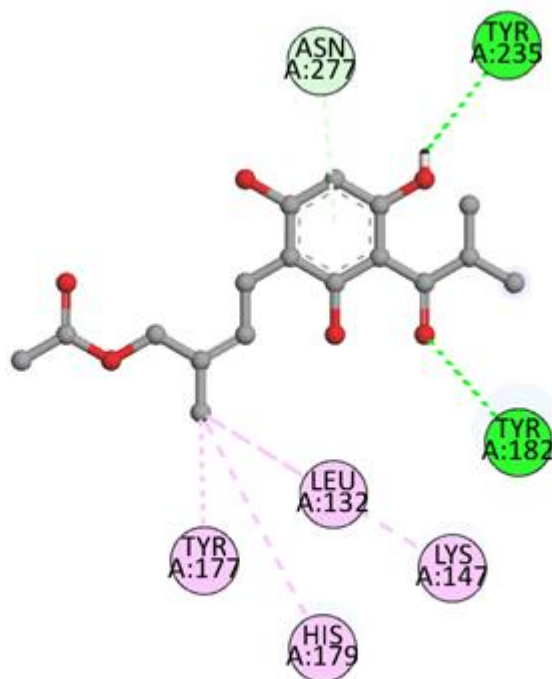
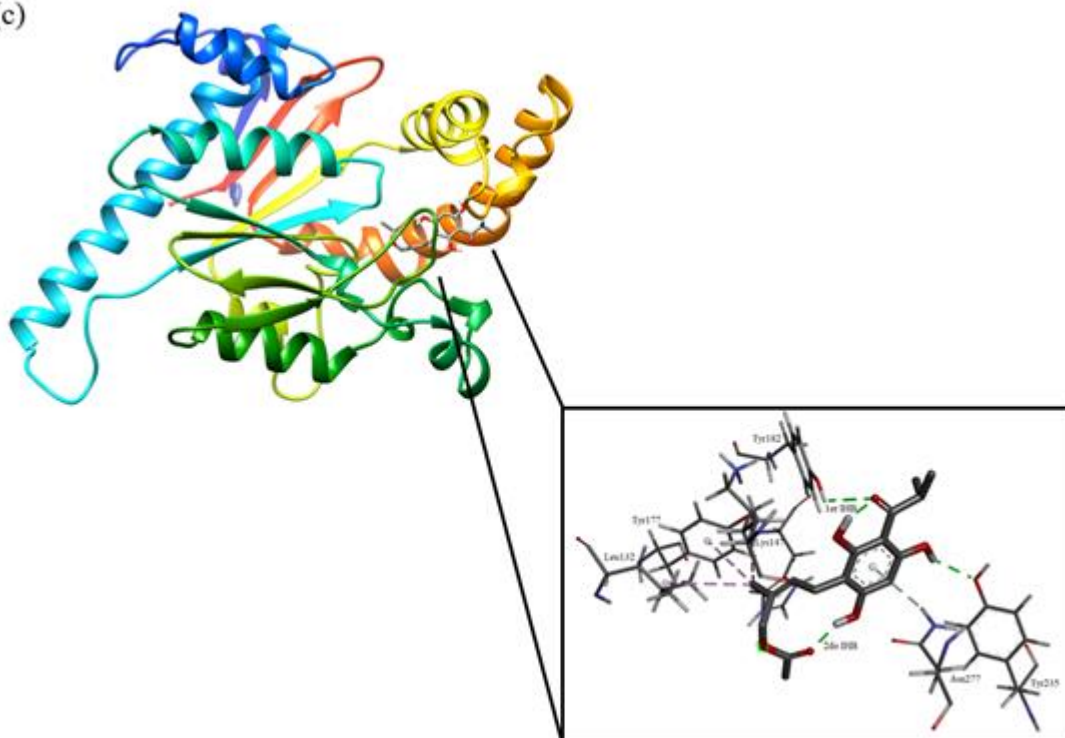




Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Unfavorable Acceptor-Acceptor
- Pi-Pi T-shaped
- Alkyl
- Pi-Alkyl

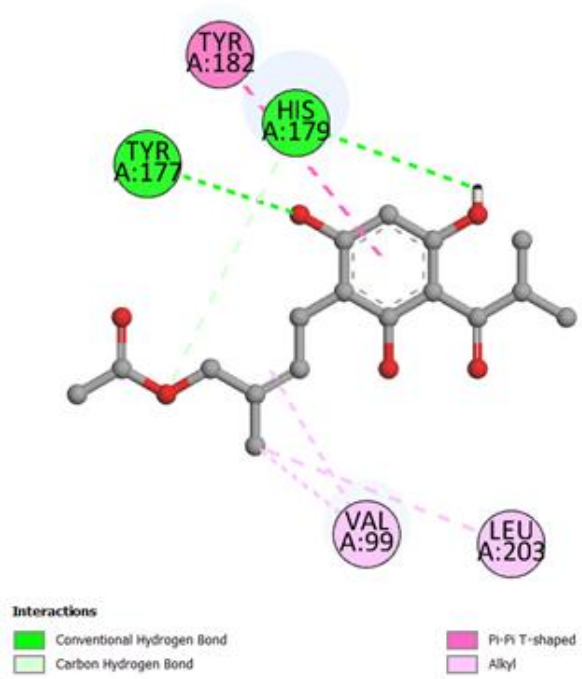
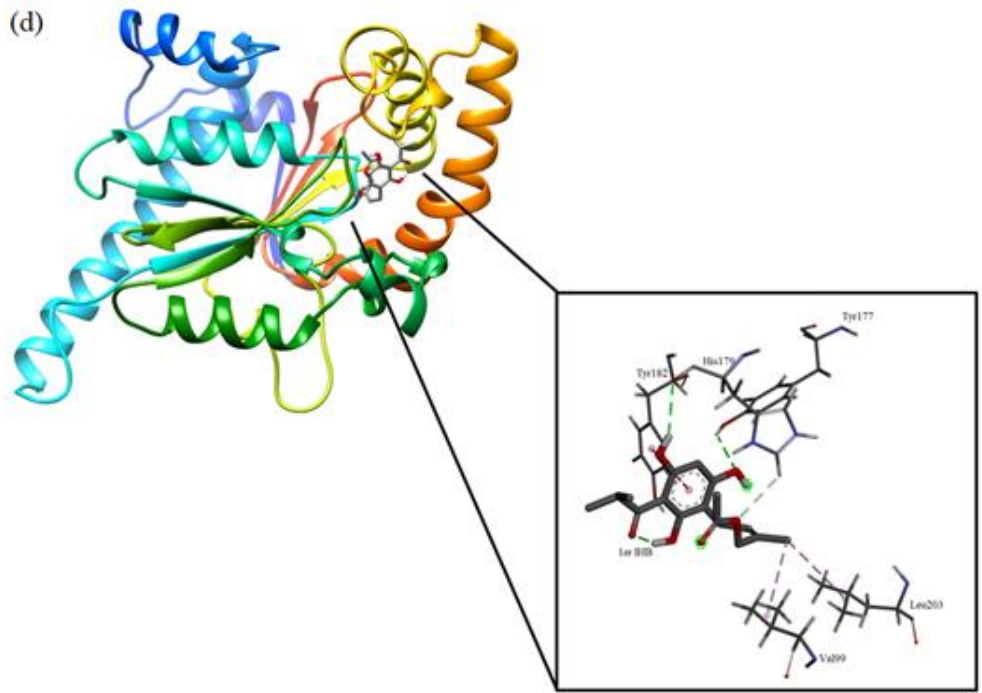
(c)



Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Pi-Donor Hydrogen Bond

- Alkyl
- Pi-Alkyl



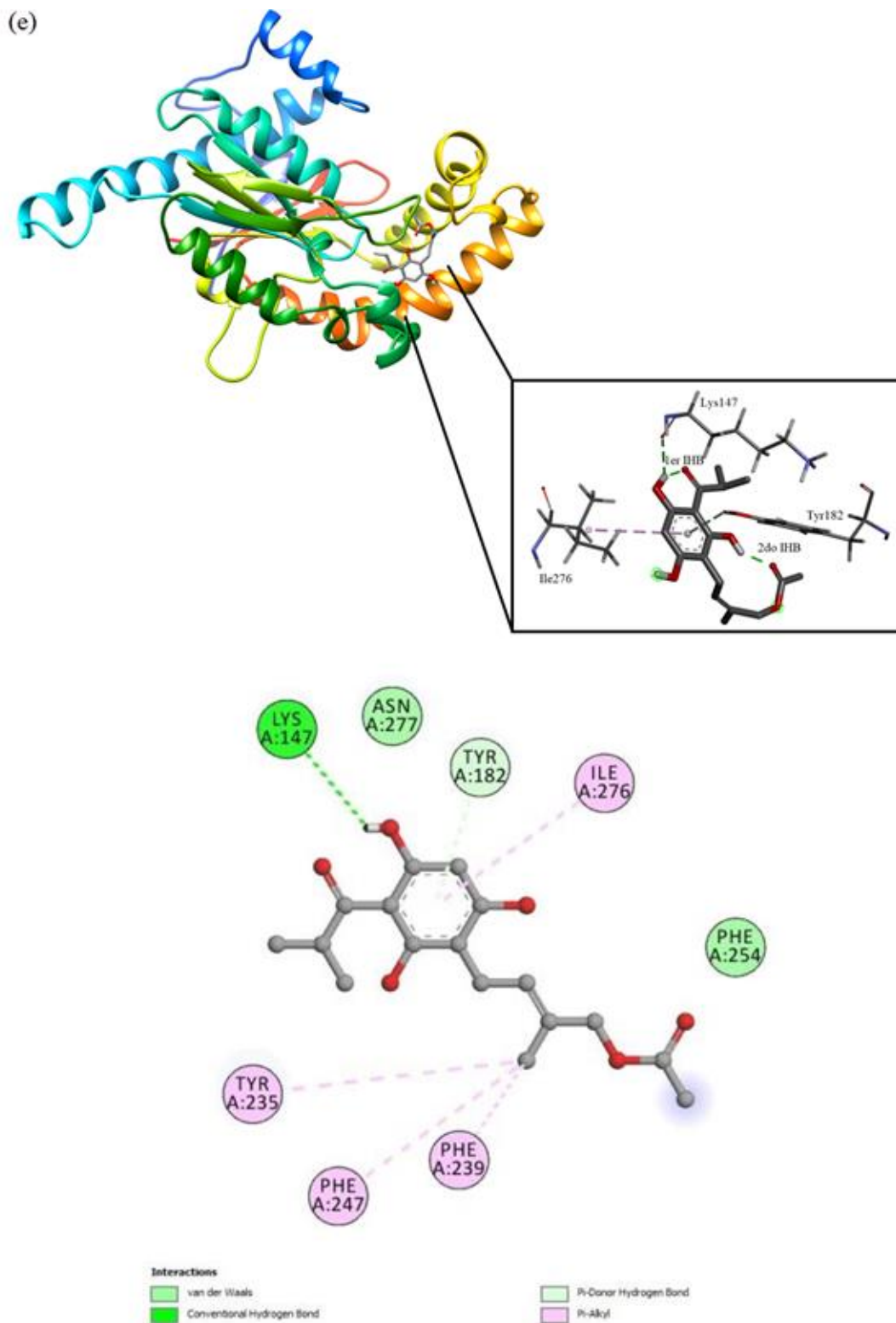


Figura 31. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular rígido en AutoDock Vina de los complejos de la enzima PanK con los conforméros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) PanK-G1, (b) PanK-A1, (c) PanK-C1, (d) PanK-Ac1 y (e) PanK-D1.

5.7. Acoplamiento molecular en Glide

En esta sección se presentan los resultados de los cálculos de acoplamiento rígido (proteína y ligante rígidos) de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con las enzimas InhA, MabA, PanK y UGM realizados con el módulo Glide implementado en el programa Schrödinger. Los resultados del acoplamiento semiflexible se detallan en el Anexo B. Estos resultados mostraron que los complejos formados por UGM y PanK con todos los conformeros tienen las mejores energías de afinidad. Los complejos formados por InhA presentaron interacción desfavorable con Thr196, aminoácido clave ya que está implicado en el proceso de fijación del cofactor NAD en el sitio activo de esta enzima. Es relevante destacar que todos los ligantes adoptan la misma conformación, sin importar si las estructuras de entrada presentan diversas configuraciones, ya sea extendida u horquilla. Los complejos con la enzima InhA conservan el primer IHB y los complejos con la enzima PanK conservan el segundo IHB, mientras que los complejos con las enzimas MabA y UGM no conservan ningún IHB.

5.7.1. Acoplamiento rígido con la enzima InhA

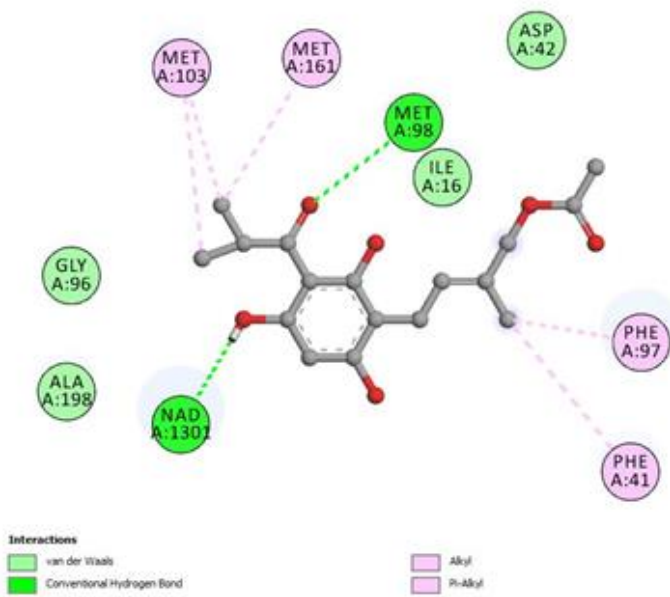
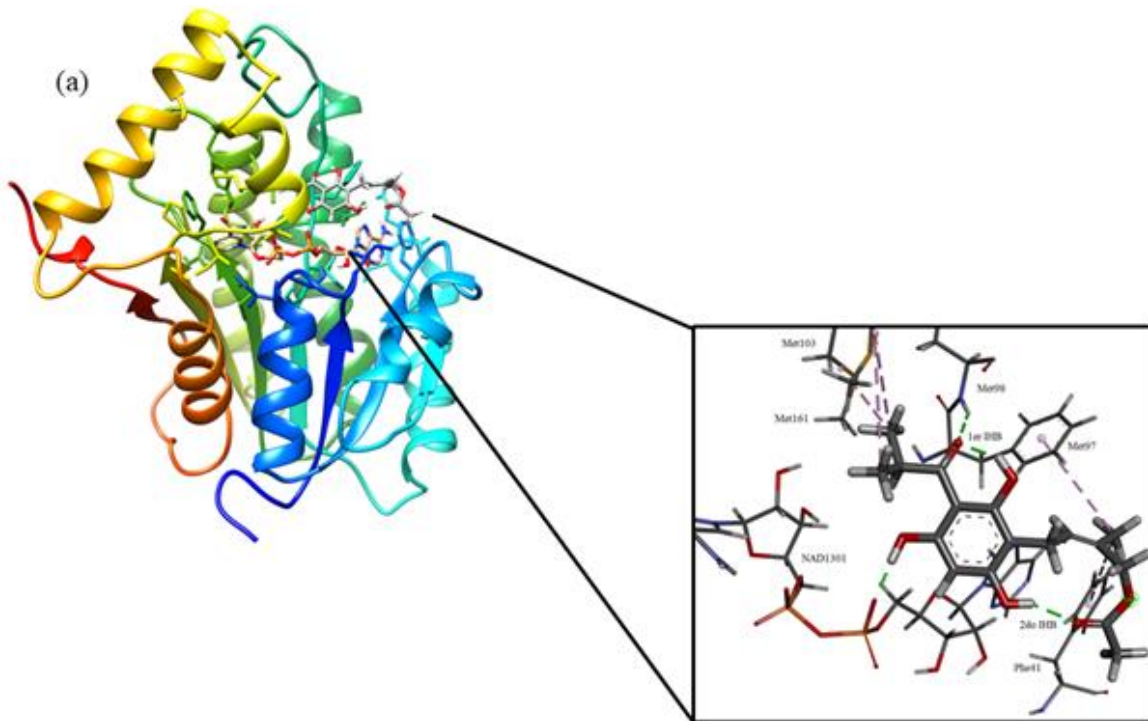
En la Tabla 15 se reporta la función de puntuación de Glide (*docking score*) y las interacciones principales del acoplamiento molecular de caespitato con la enzima InhA. Se observa que los complejos con la enzima InhA tienen un valor de *docking score* de -4.70 a -5.94 kcal mol⁻¹, siendo el complejo InhA-C1r el de mejor *docking score* (-5.94 kcal mol⁻¹). A diferencia de los resultados obtenidos en AutoDock Vina, en Glide sí se observaron interacciones de van der Waals y π -alquilo con los aminoácidos Phe149 y Tyr158 de la tríada catalítica para el complejo InhA-C1r. En la Figura 32 se muestran los diagramas 3D y 2D de interacción del acoplamiento rígido de los complejos con la enzima InhA. Los complejos InhA-G1r e InhA-Ac1r muestran interacción de van der Waals con el aminoácido Ala198, mientras que InhA-A1r, InhA-C1r e InhA-D1r muestran interacción π -alquilo con este mismo residuo. En AutoDock Vina, el complejo InhA-D1r presentó interacción de puente de hidrógeno con Ala198. El aminoácido Ala198 está involucrado en la estabilización de intermediarios y pertenece al bucle de unión al sustrato [130]. También se observa la interacción de van der Waals con Met199 en los complejos InhA-A1r y InhA-

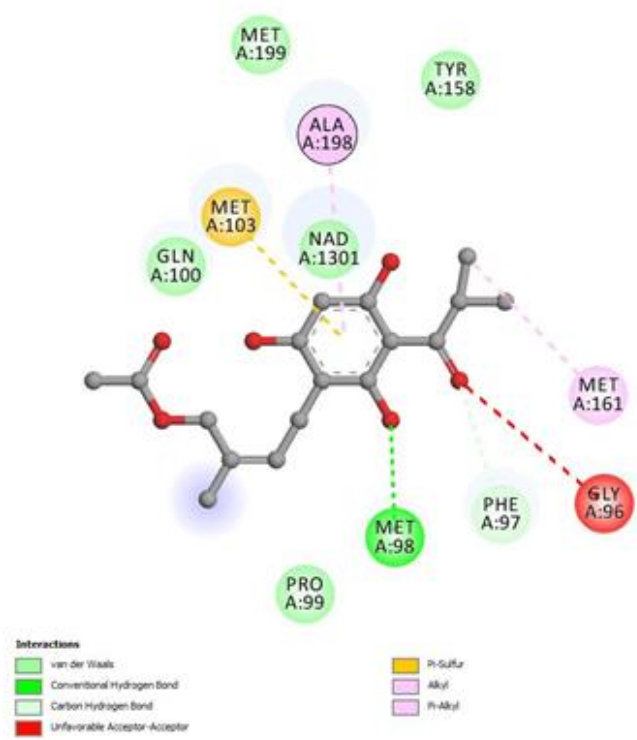
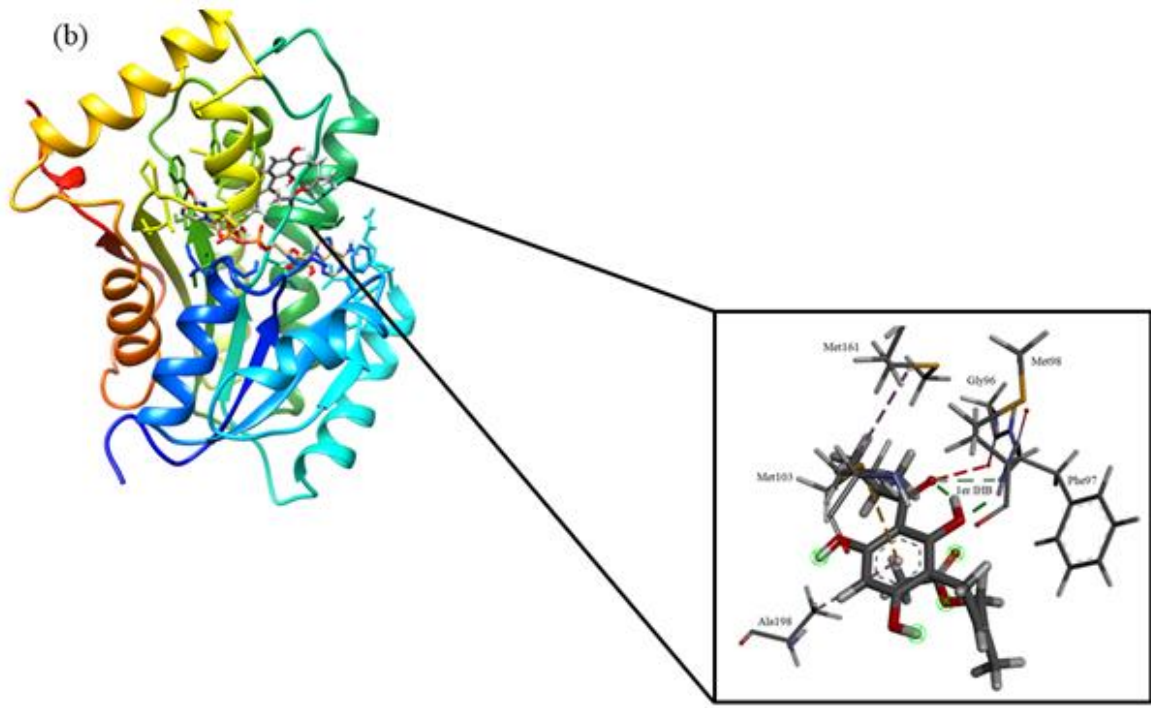
C1r. El residuo Met199 es responsable de la unión del sustrato al sitio de unión. Los complejos InhA-A1r y InhA-C1r muestran interacciones de van der Waals con el aminoácido Tyr158. Por otro lado, el complejo InhA-C1r también muestra interacción π -alquilo con el aminoácido Phe149. Ambos residuos, Phe149 y Tyr158, forman parte de la tríada catalítica (Phe149, Tyr158 y Lys165) de la enzima InhA [130]. Además, Tyr158 está involucrado en la interacción de InhA y su sustrato natural. También, se observa la interacción de van der Waals con Thr196 en el complejo InhA-C1r. El residuo Thr196 ayuda a fijar al cofactor NAD en el sitio activo de InhA. Finalmente, se observa una interacción de puente de hidrógeno con el cofactor NAD en los complejos InhA-G1r e InhA-D1r, además en InhA-D1r se observa una interacción π -alquilo con este cofactor, mientras que en los complejos InhA-A1r y InhA-C1r se observan interacciones de van der Waals con NAD. El cofactor NAD está involucrado en la farmacorresistencia a la isoniazida.

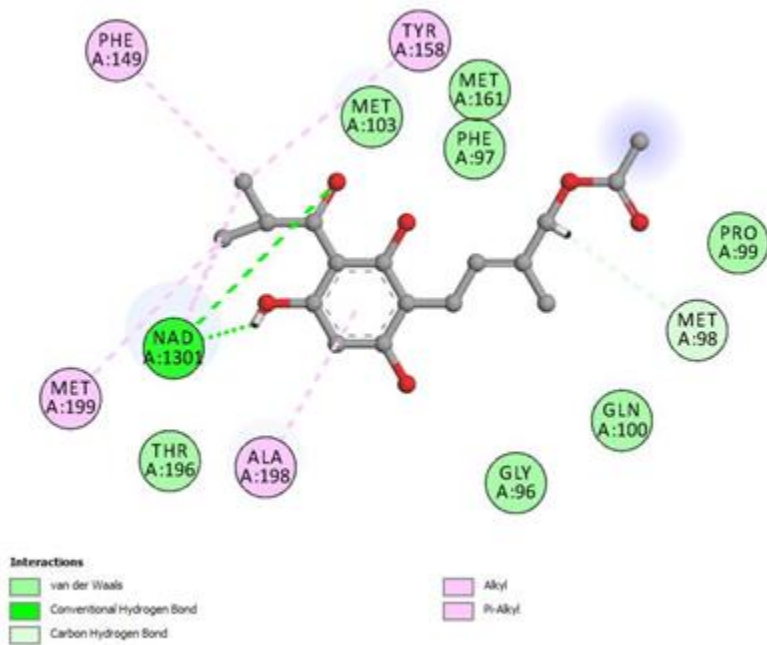
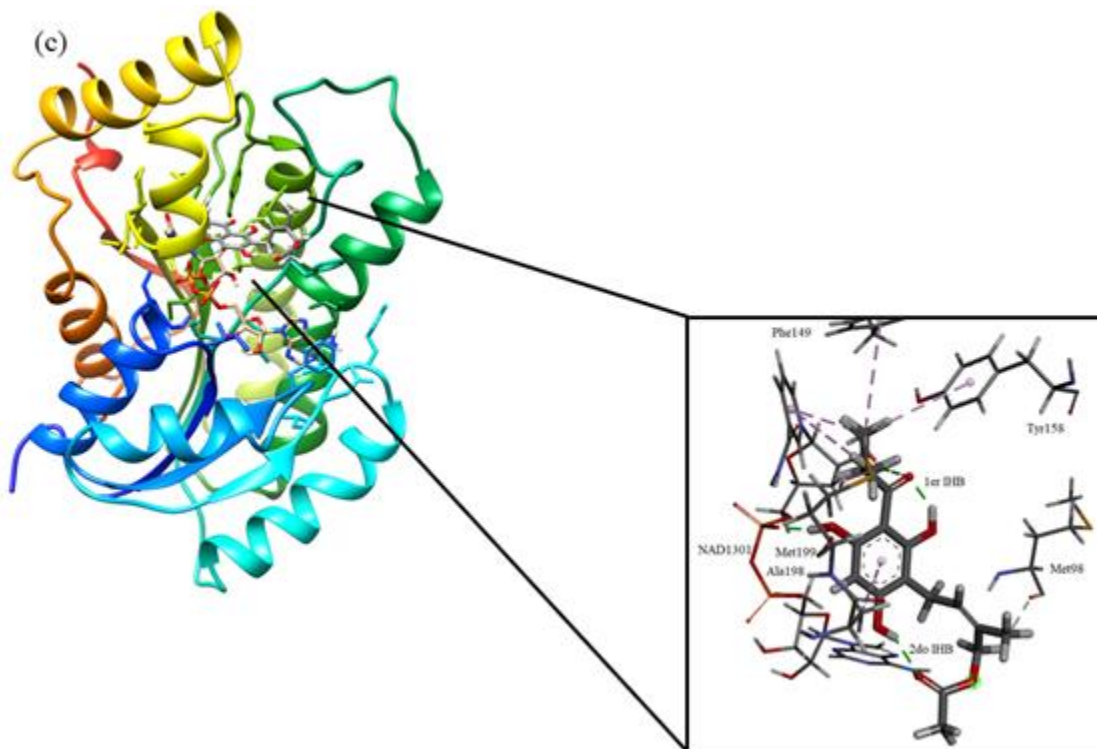
Respecto al *docking* rígido en AutoDock Vina, éste presenta mejor energía de afinidad que el *docking score* de Glide. Las interacciones encontradas con el programa Glide involucran interacciones de van der Waals y π -alquilo con los aminoácidos de la tríada catalítica (Phe149 y Tyr158) en los complejos InhA-A1r e InhA-C1r, mientras que en AutoDock Vina no se observan interacciones con los aminoácidos de la tríada catalítica. Por otro lado, en Glide se encuentran interacciones débiles con Ala198, Met199 y Thr196 de tipo van der Waals y π -alquilo, mientras que en AutoDock Vina se observan interacciones de puente de hidrógeno con aminoácidos importantes de la enzima como Met98, Ala198 y Arg43.

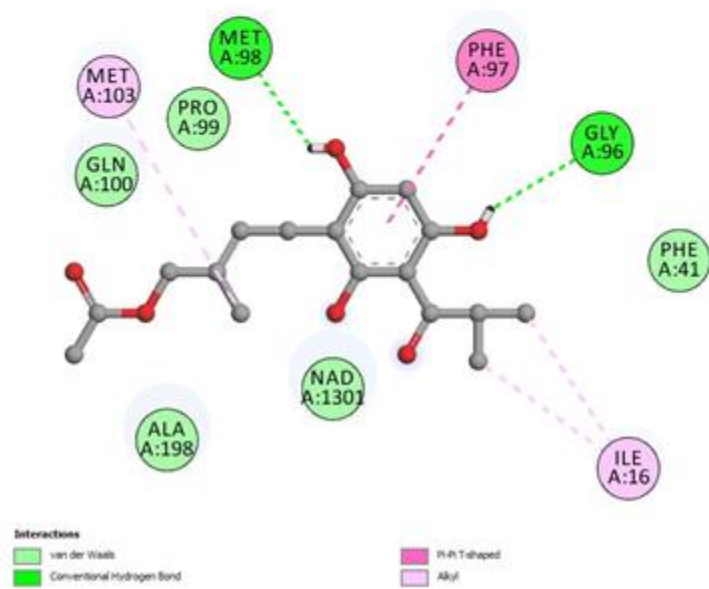
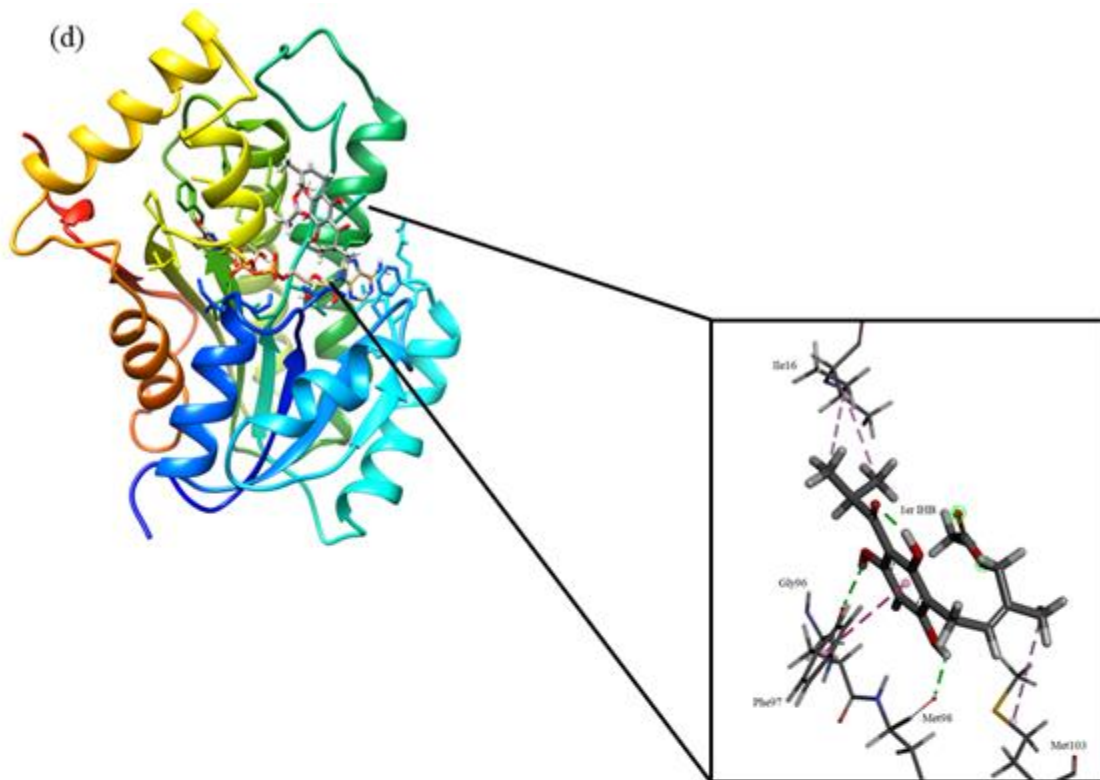
Tabla 15. *Docking score* (kcal mol⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular rígido en Glide de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima InhA.

Medio	Complejo	<i>Docking score</i>	Aminoácidos	Tipo de interacción
Fase gas	InhA-G1r	-5.48	Ala198 NAD1301	van der Waals Puente de hidrógeno
Agua	InhA-A1r	-4.70	Ala198 Met199 Tyr158 NAD1301	π -alquilo van der Waals van der Waals van der Waals
Cloroformo	InhA-C1r	-5.94	Tyr158 Ala198 Phe149 Thr196 Met199 NAD1301	van der Waals π -alquilo π -alquilo van der Waals van der Waals van der Waals
Acetonitrilo	InhA-Ac1r	-4.70	Ala198 NAD1301	van der Waals van der Waals
DMSO	InhA-D1r	-4.82	Ala198 NAD1301	π -alquilo Puente de hidrógeno y π - alquilo









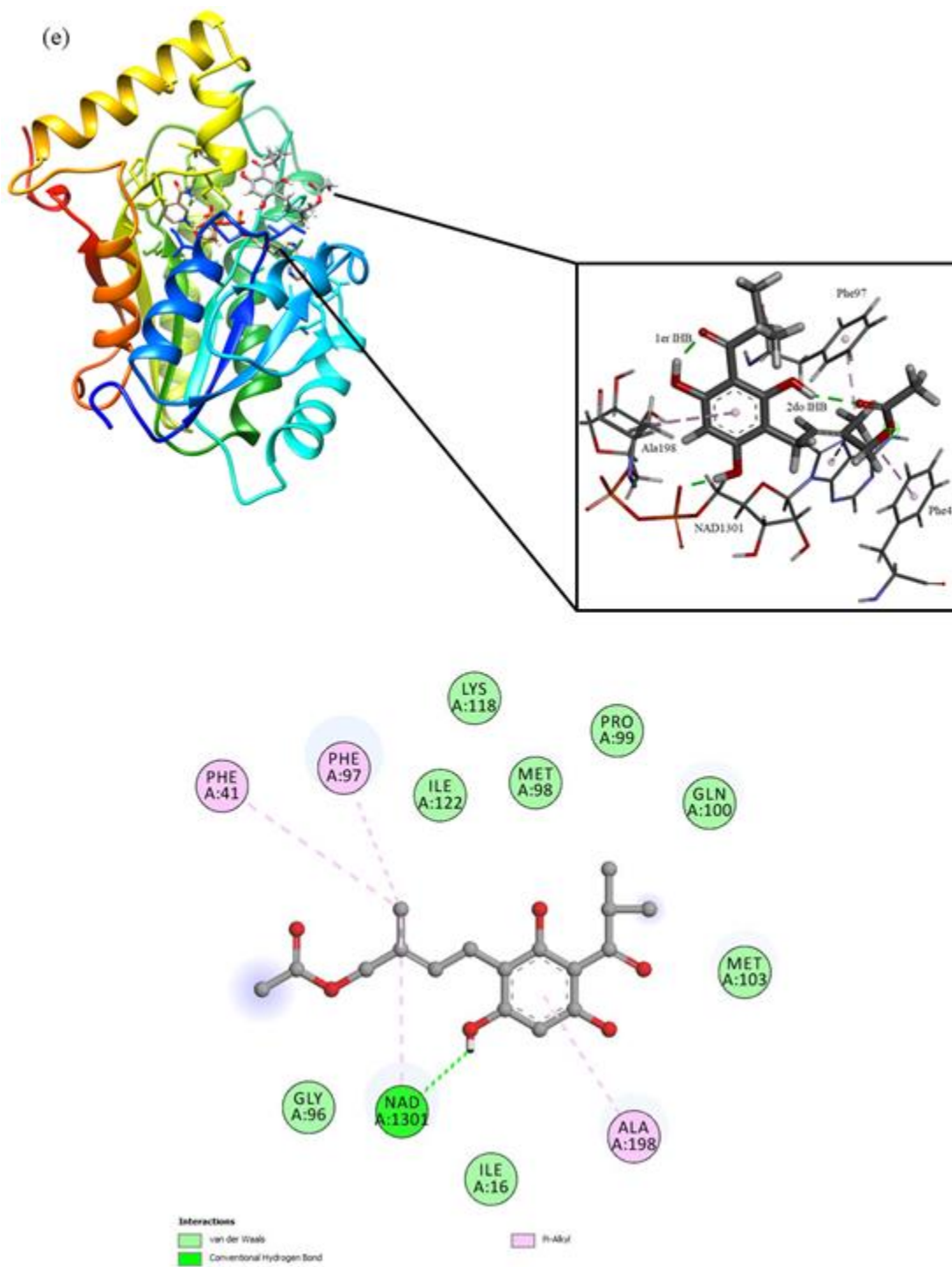


Figura 32. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular rígido en Glide de los complejos de la enzima InhA con los conforméros más estables de caespitoto en el sitio activo: (a) InhA-G1r, (b) InhA-A1r, (c) InhA-C1r, (d) InhA-Ac1r y (e) InhA-D1r.

5.7.2. Acoplamiento rígido con la enzima MabA

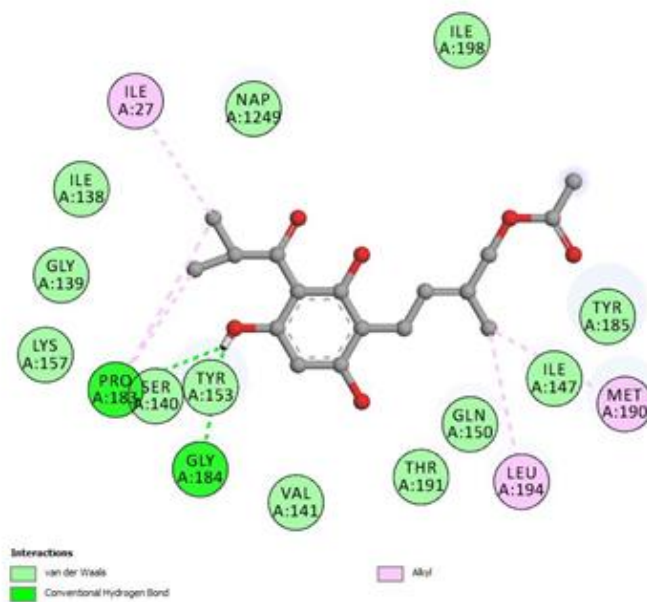
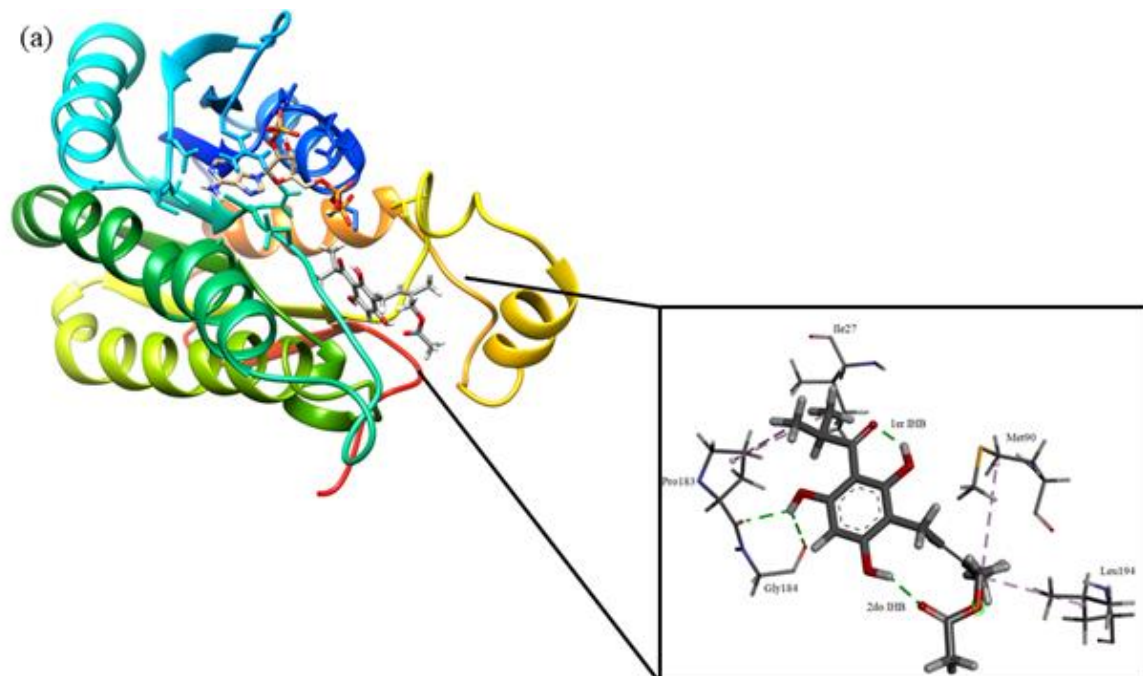
En la Tabla 16 se reporta la función de puntuación de Glide (*docking score*) y las interacciones principales del acoplamiento molecular de caespitado con la enzima MabA. El complejo MabA-G1r es el que tiene el mejor valor de *docking score* de $-5.78 \text{ kcal mol}^{-1}$, respecto a los demás complejos con valores entre -4.87 a $-5.71 \text{ kcal mol}^{-1}$. En la Figura 33, se muestran los diagramas 3D y 2D de interacción de los complejos con la enzima MabA. Se observan las interacciones con el aminoácido Tyr153 en los complejos MabA-G1r, MabA-C1r y MabA-Ac1r de tipo van der Waals, adicionalmente el complejo MabA-A1r muestra interacciones de puente de hidrógeno y desfavorable donador-donador con este residuo. Por otra parte, el complejo MabA-D1r muestra interacción π -alquilo con Tyr153. Todos los complejos en Glide muestran interacción en su mayoría de van der Waals con Tyr153, a diferencia de los resultados de AutoDock Vina donde se observan interacciones de puente de hidrógeno con Tyr153 en los complejos con G1r y D1r. El aminoácido Tyr153 es importante por el rol central en la catálisis ácido-base de la enzima [51]. Todos los complejos presentan una interacción de tipo van der Waals con el residuo Ser140, mientras que el complejo MabA-A1r presenta interacción de puente de hidrógeno con este mismo residuo. En el complejo MabA-G1r se observa una interacción de van der Waals con el aminoácido Lys157. Finalmente, MabA-G1r, MabA-C1r y MabA-Ac1r muestran interacción vía van der Waals con el cofactor NAP, mientras que MabA-A1r muestra una interacción vía puente de hidrógeno con el cofactor, a diferencia de los resultados en AutoDock Vina, donde los complejos MabA-A1r y MabA-C1r muestran interacciones vía puente de hidrógeno con NAP. La interacción con el cofactor es importante pues forma un aducto covalente con la isoniazida [56].

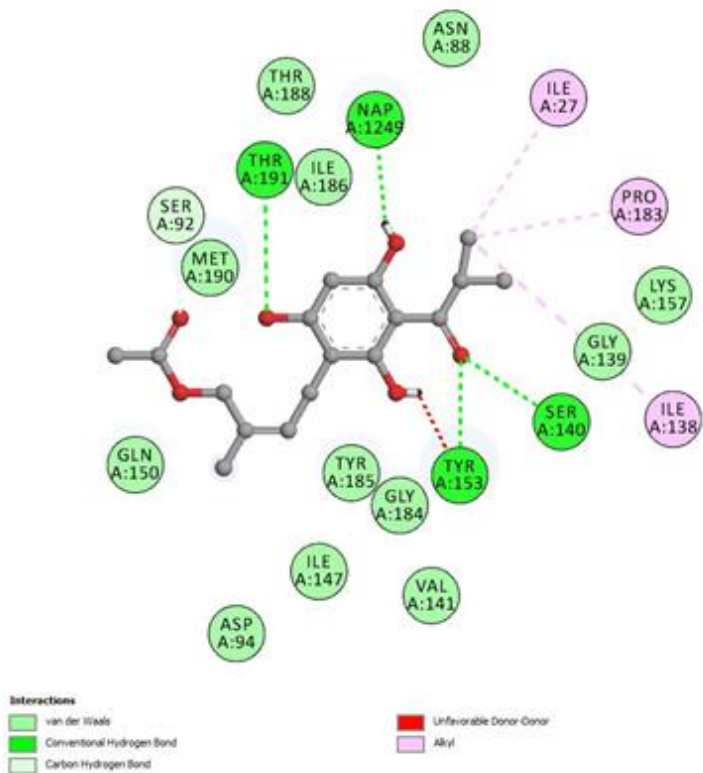
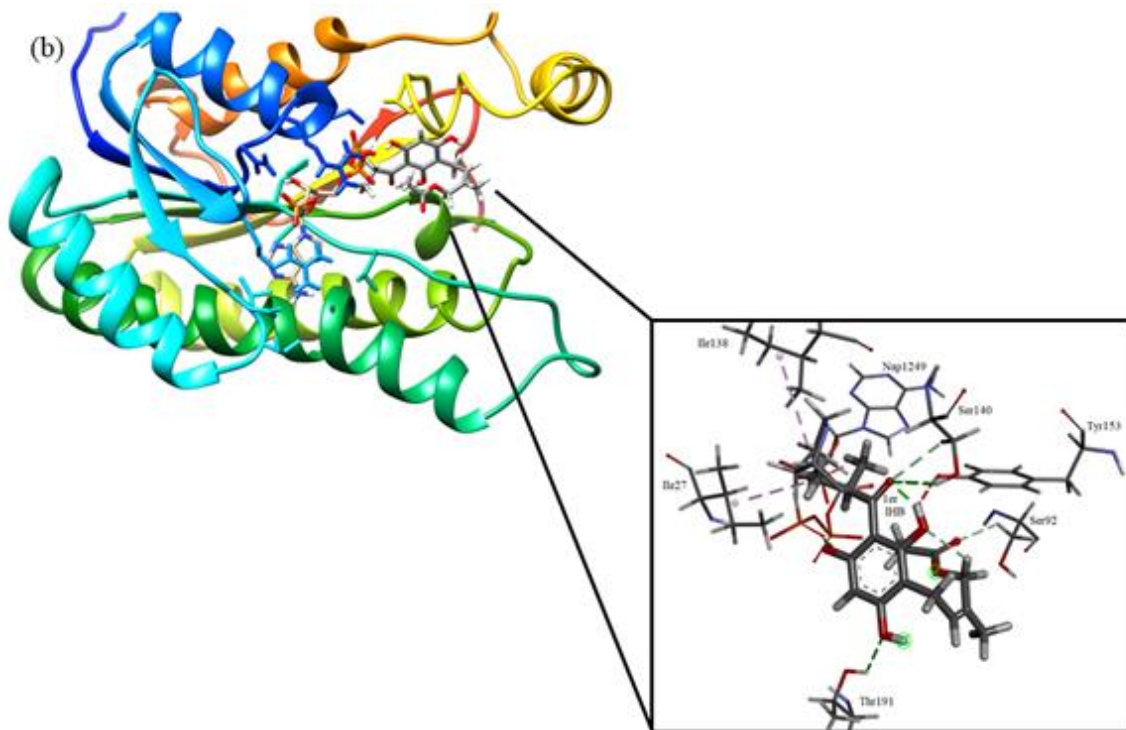
Respecto al *docking* rígido en AutoDock Vina, la energía de afinidad es mejor que los valores de *docking score* de Glide. De los resultados en Glide se observa que todos los complejos muestran interacciones débiles de tipo van der Waals o π -alquilo con al menos dos aminoácidos de la tríada catalítica (Tyr153, Ser140 y Lys157) de la enzima MabA, y solamente el complejo MabA-A1r presenta una interacción de puente de hidrógeno con Ser140. Esto contrasta con los resultados en AutoDock Vina, donde se observan

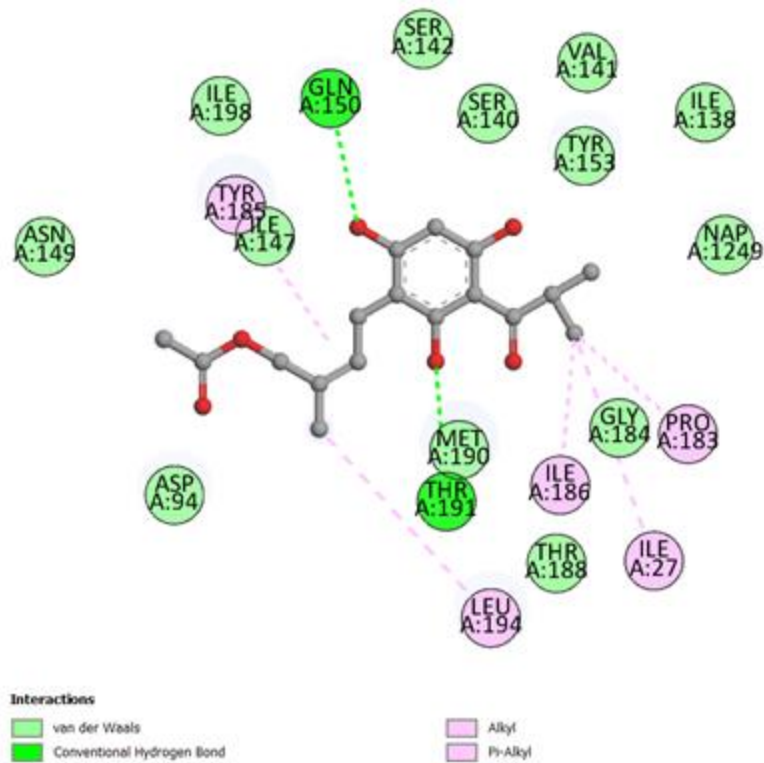
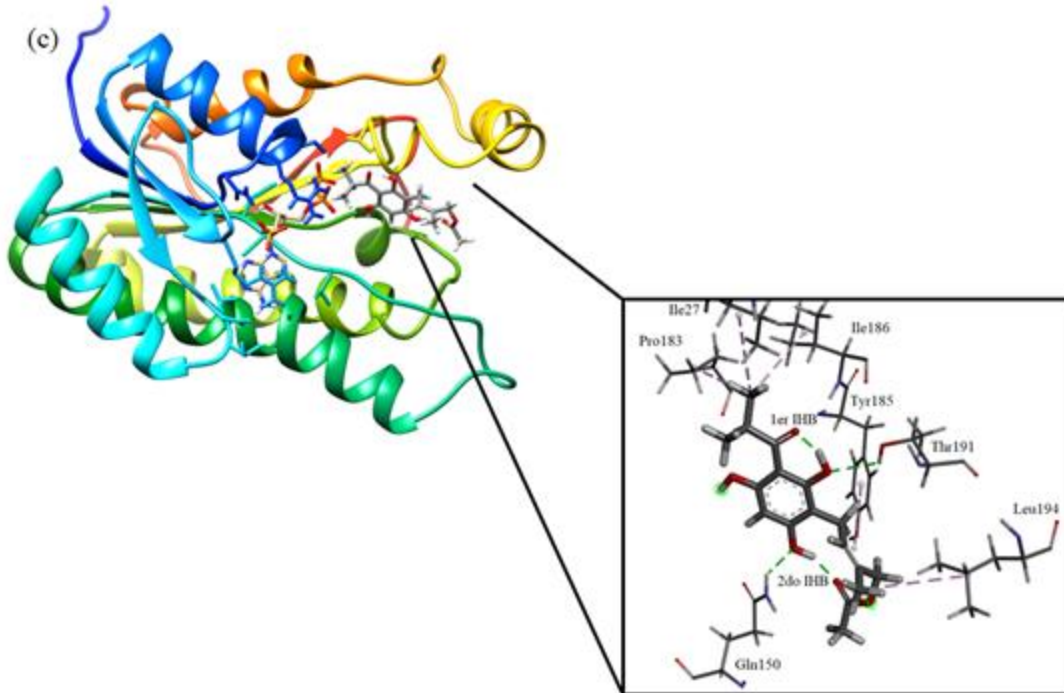
interacciones de puente de hidrógeno con un solo aminoácido de esta tríada (Tyr153) en los complejos MabA-G1r y MabA-D1r.

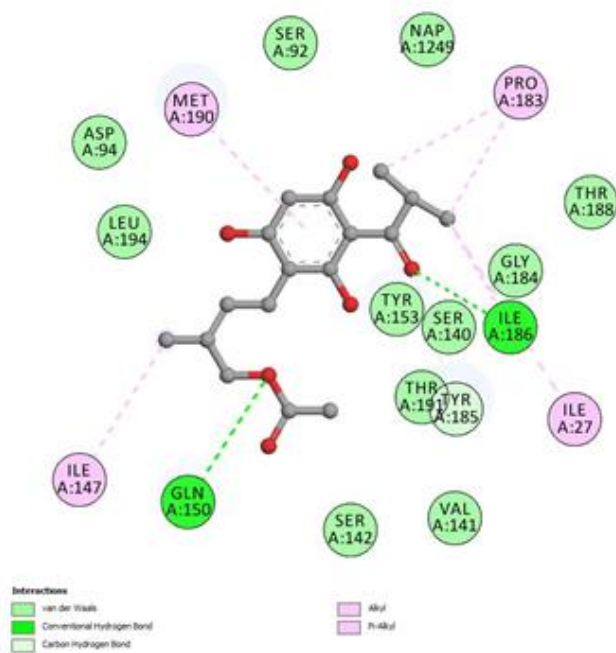
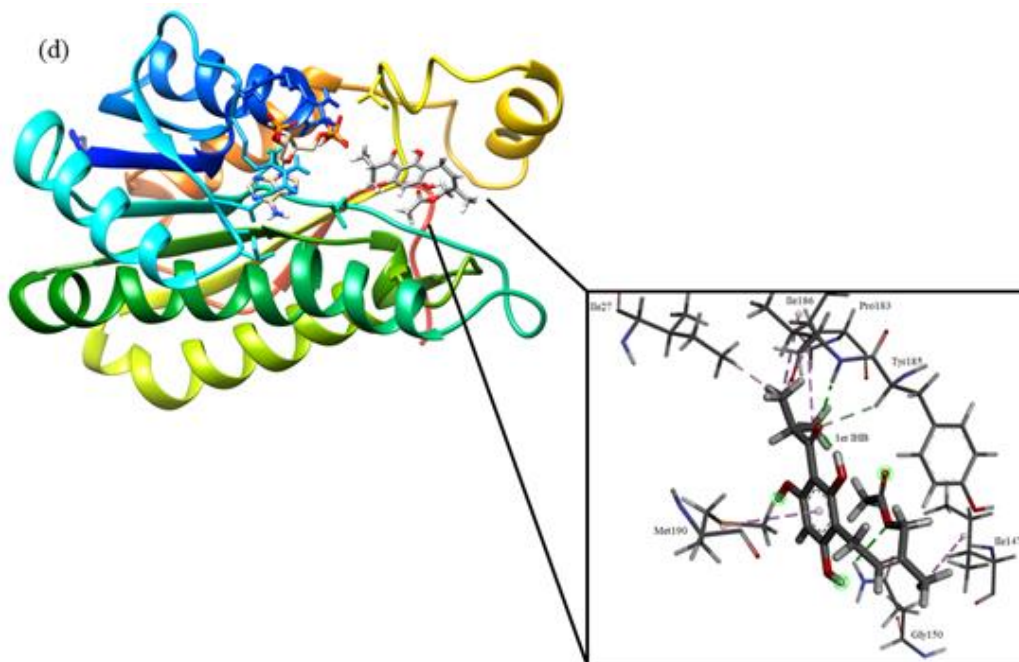
Tabla 16. *Docking score* (kcal mol⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular rígido en Glide de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima MabA.

Medio	Complejo	<i>Docking score</i>	Aminoácidos	Tipo de interacción
Fase gas	MabA-G1r	-5.78	Tyr153 Ser140 Lys157 NAP1249	van der Waals van der Waals van der Waals van der Waals
Agua	MabA-A1r	-4.87	Tyr153 Ser140 NAP1249	Puente de hidrógeno y desfavorable donador-donador Puente de hidrógeno Puente de hidrógeno
Cloroformo	MabA-C1r	-5.51	Tyr153 Ser140 NAP1249	van der Waals van der Waals van der Waals
Acetonitrilo	MabA-Ac1r	-5.58	Tyr153 Ser140 NAP1249	van der Waals van der Waals van der Waals
DMSO	MabA-D1r	-5.71	Ser140 Tyr153	van der Waals π -alquilo









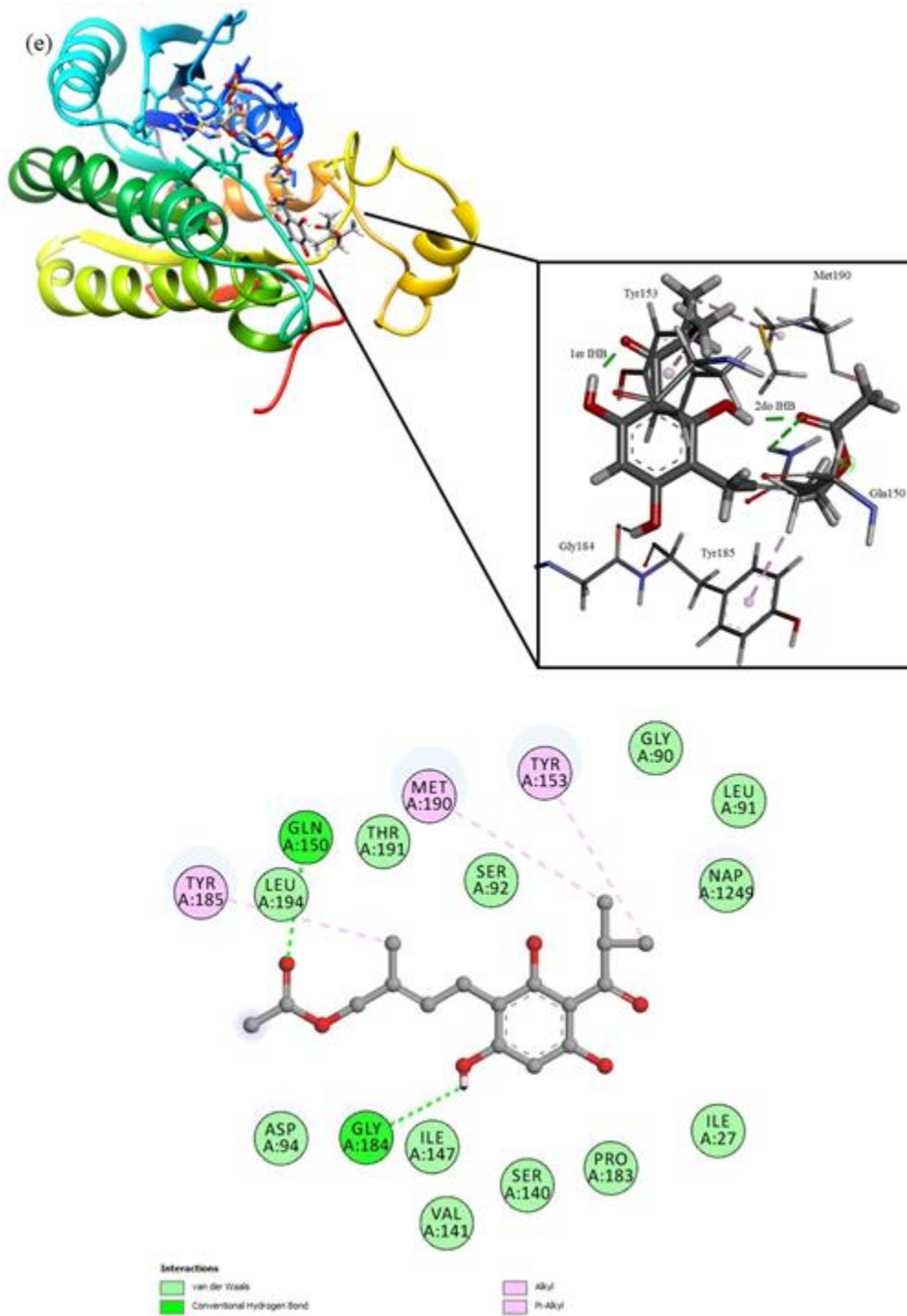


Figura 33. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular rígido en Glide de los complejos de la enzima MabA con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) MabA-G1r, (b) MabA-A1r, (c) MabA-C1r, (d) MabA-Ac1r y (e) MabA-D1r.

5.7.3. Acoplamiento rígido con la enzima UGM

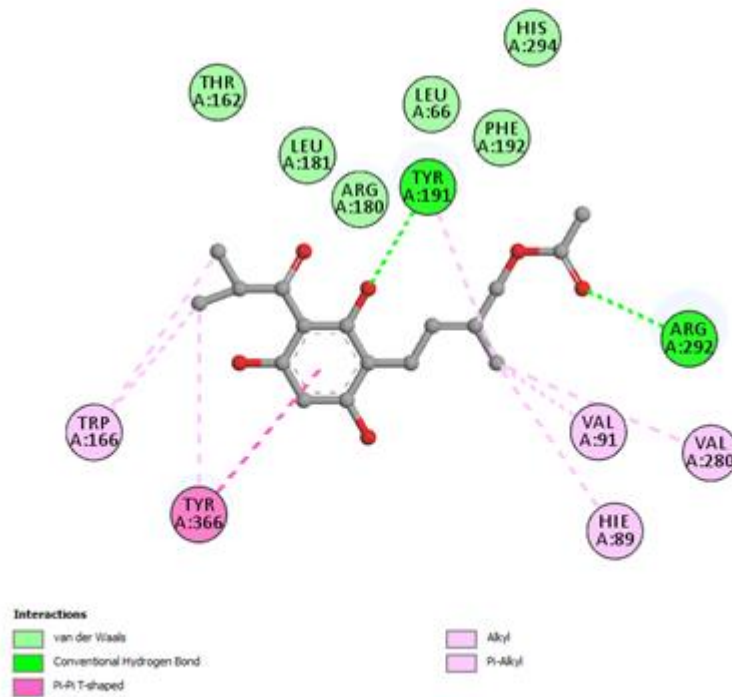
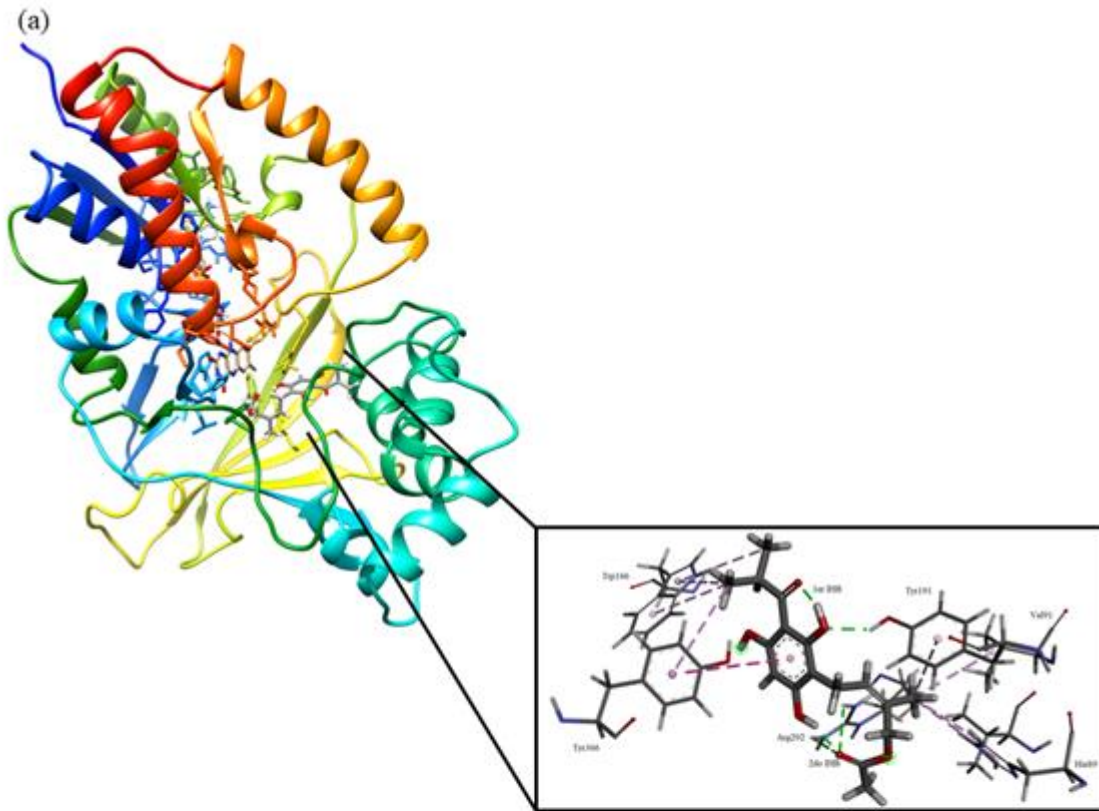
En la Tabla 17 se reporta la función de puntuación de Glide (*docking score*) y las interacciones principales del acoplamiento molecular de caespitato con la enzima UGM. El complejo UGM-C1r tiene el mejor valor de *docking score* de $-5.79 \text{ kcal mol}^{-1}$, al igual que en los resultados de AutoDock Vina. Los demás complejos formados con la enzima UGM tienen valores de *docking score* en el intervalo de -4.10 a $-5.65 \text{ kcal mol}^{-1}$. En la Figura 34, se muestran los diagramas 3D y 2D de interacción de los complejos con la enzima UGM. Los resultados muestran una variedad de interacciones en todos los complejos con el aminoácido Arg180. En el caso de UGM-G1r y UGM-D1r, se observan interacciones vía van der Waals. Por otro lado, en los complejos UGM-C1r y UGM-Ac1r, se destacan las interacciones de puente de hidrógeno, al igual que en AutoDock Vina en el complejo UGM-C1r. El complejo UGM-A1r muestra una interacción de puente de hidrógeno y desfavorable donador-donador con el mismo residuo, lo cual se asemeja también a los resultados de AutoDock Vina. El residuo Arg180 participa en la catálisis de UGM. Por otro lado, en todos los complejos con UGM también se observan interacciones con el aminoácido Tyr366. El complejo UGM-G1r presenta interacciones de apilamiento π - π y de tipo π -alquilo. En UGM-D1r se observan interacciones de puente de hidrógeno y π -alquilo. En UGM-C1r y UGM-Ac1r se observan interacciones de van der Waals y en el caso de UGM-A1r se establecen interacciones mediante puente de hidrógeno con Tyr366, al igual que en AutoDock Vina. El aminoácido Tyr366 es crucial para la estabilización del grupo β -fosfato del sustrato UDP. Por otro lado, en los complejos UGM-C1r y UGM-Ac1r se observan interacciones π -alquilo con el cofactor FAD, a diferencia de AutoDock Vina donde las interacciones con FAD son del tipo π - σ en los complejos UGM-G1, UGM-C1r y UGM-D1r, y adicionalmente de tipo puente de hidrógeno en UGM-C1r.

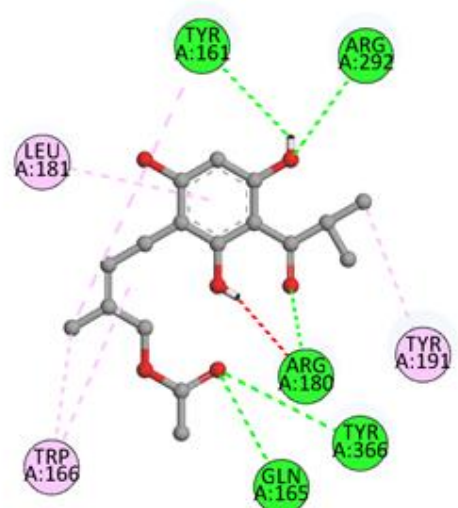
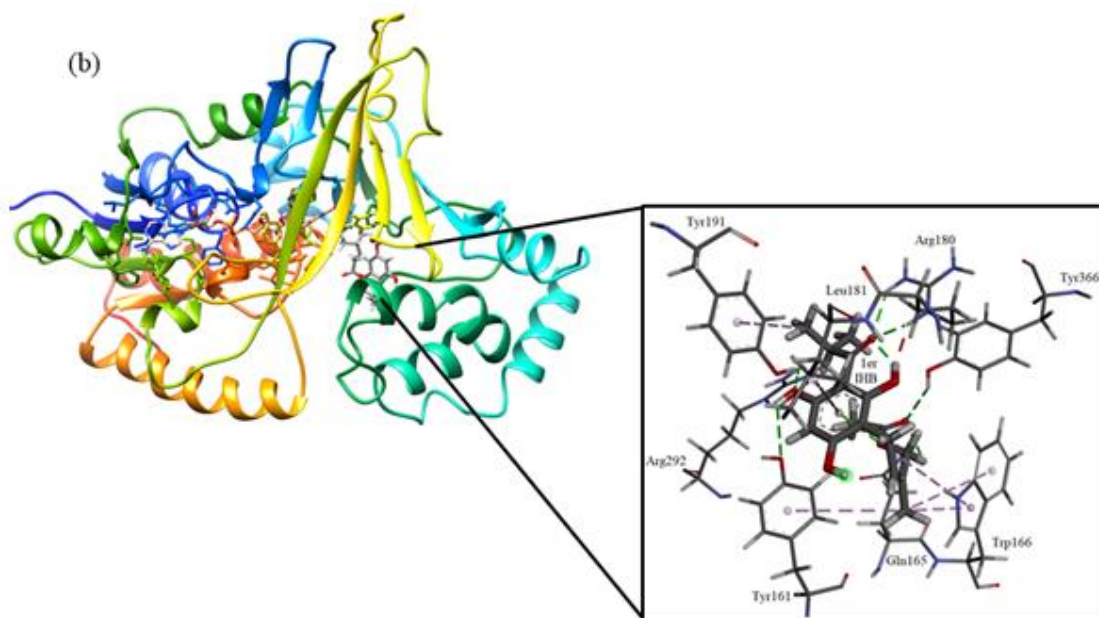
Respecto al docking rígido en AutoDock Vina, la energía de afinidad es mejor que la de *docking score* de Glide. Con respecto a las interacciones, en Glide se observan interacciones de puente de hidrógeno con Arg180 solamente en los complejos UGM-C1r y UGM-Ac1r, mientras que en AutoDock Vina, los complejos UGM-G1r, UGM-C1r y UGM-Ac1r muestran interacciones de puente de hidrógeno. Por otro lado, con relación al

residuo Tyr366, se observan interacciones de puente de hidrógeno en los complejos UGM-A1r y UGM-D1r tanto en Glide como en AutoDock Vina.

Tabla 17. *Docking score* (kcal mol⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular rígido en Glide de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima UGM.

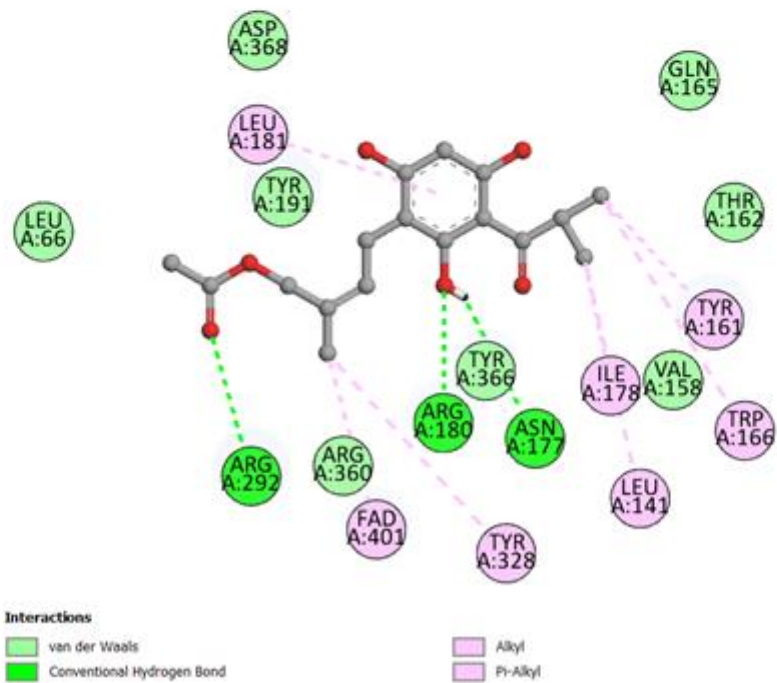
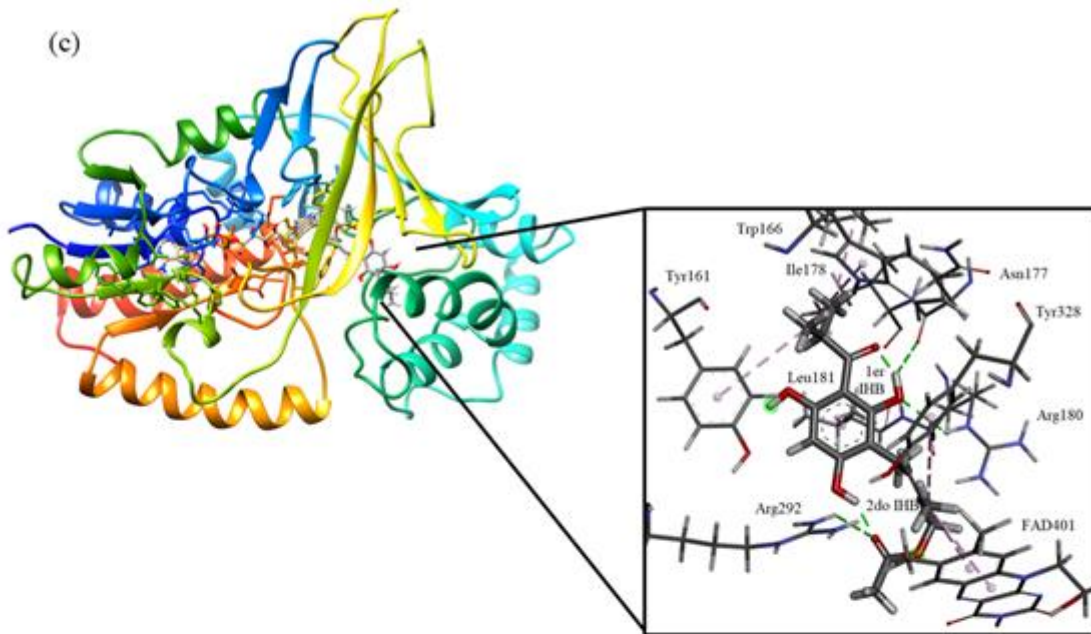
Medio	Complejo	<i>Docking score</i>	Aminoácidos	Tipo de interacción
Fase gas	UGM-G1r	-5.65	Arg180 Tyr366	van der Waals Apilamiento π - π y π -alquilo
Agua	UGM-A1r	-4.10	Arg180 Tyr366	Puente de hidrógeno y desfavorable donador-donador Puente de hidrógeno
Cloroformo	UGM-C1r	-5.79	Arg180 Tyr366 FAD401	Puente de hidrógeno van der Waals π -alquilo
Acetonitrilo	UGM-Ac1r	-5.37	Arg180 Tyr366 FAD401	Puente de hidrógeno van der Waals π -alquilo
DMSO	UGM-D1r	-5.61	Arg180 Tyr366	van der Waals Puente de hidrógeno y π -alquilo

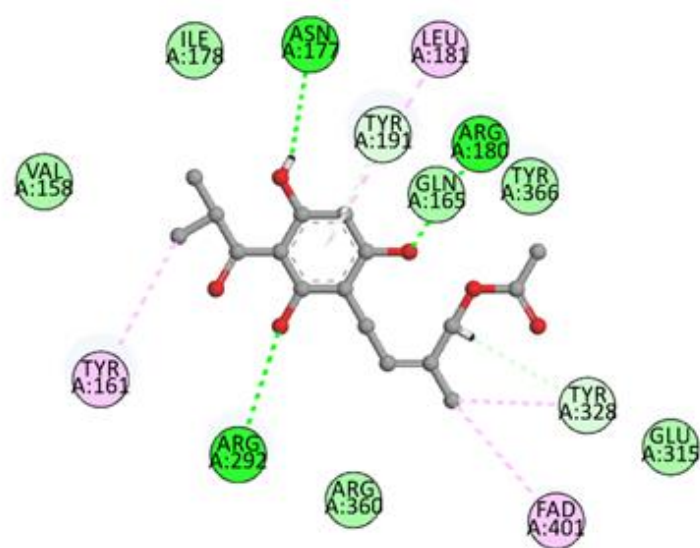
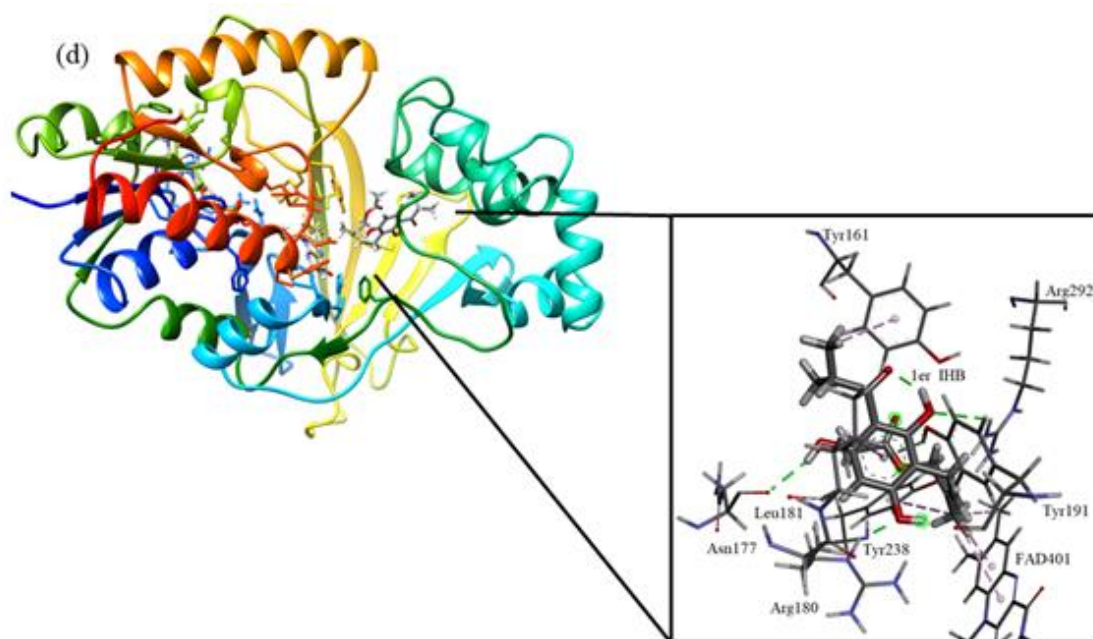




Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Unfavorable Donor-Donor
- Pi-Alkyl





Interactions

- | | |
|--|--|
|  van der Waals |  Pi-Donor Hydrogen Bond |
|  Conventional Hydrogen Bond |  Alkyl |
|  Carbon Hydrogen Bond |  Pi-Alkyl |

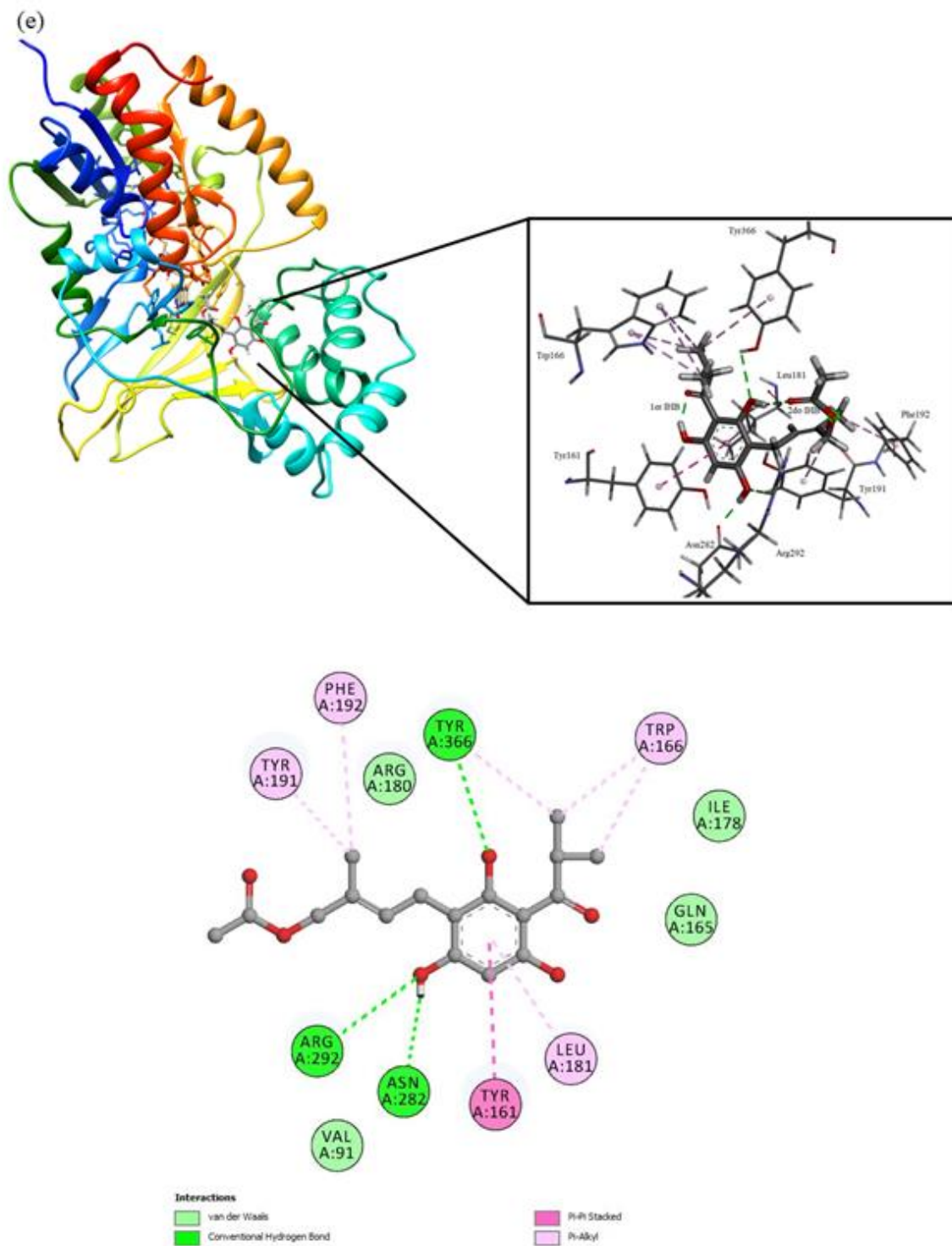


Figura 34. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular rígido en Glide de los complejos de la enzima UGM con los conforméros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) UGM-G1r, (b) UGM-A1r, (c) UGM-C1r, (d) UGM-Ac1r y (e) UGM-D1r.

5.7.4. Acoplamiento rígido con la enzima PanK

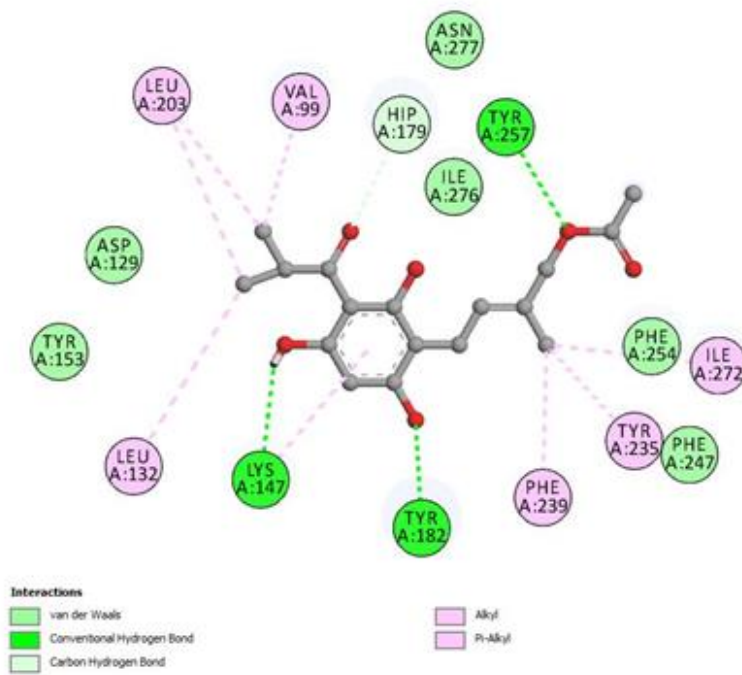
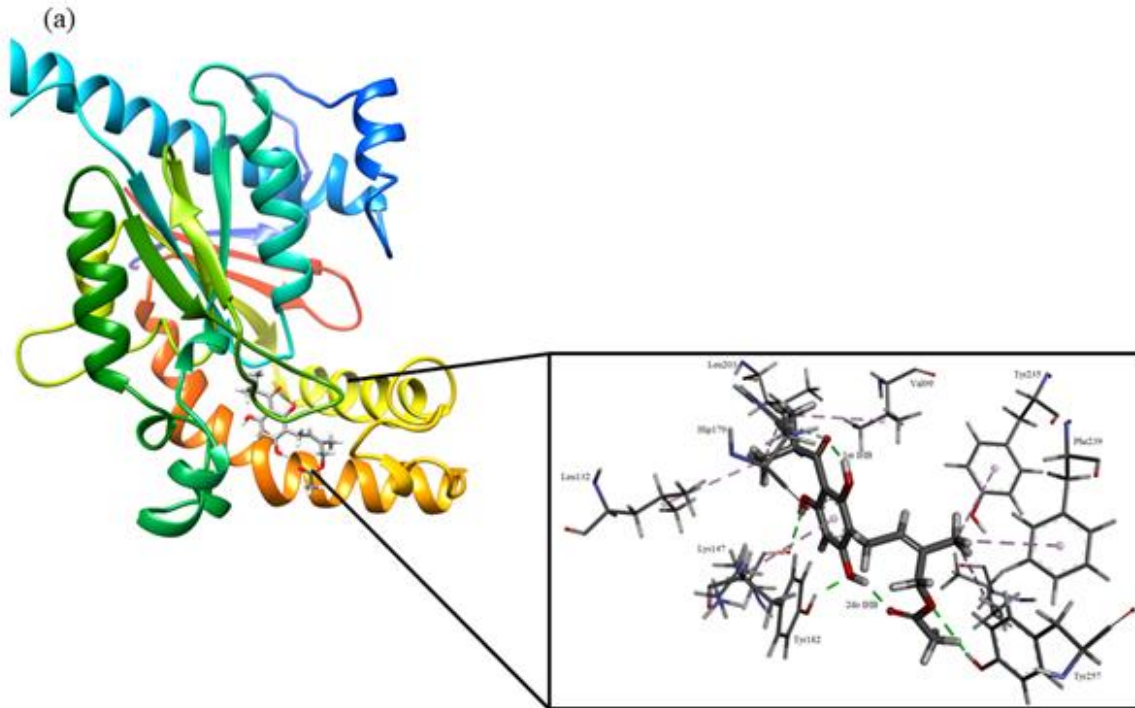
En la Tabla 18 se reporta la función de puntuación de Glide (*docking score*) y las interacciones principales del acoplamiento molecular de caespitado con la enzima PanK. El complejo PanK-A1r tiene un mejor valor de *docking score* de -8.07 kcal mol⁻¹ respecto a los valores de -6.29 a -7.19 kcal mol⁻¹ de los demás complejos. En la Figura 35, se muestran los diagramas 3D y 2D de interacción de los complejos de la enzima PanK. Los resultados muestran que en los complejos PanK-G1r, PanK-A1r y PanK-Ac1 se establecen interacciones de tipo van der Waals con el aminoácido Phe254, mientras que en los complejos PanK-C1r y PanK-D1r se observan interacciones de tipo π - π . De manera adicional, el complejo PanK-C1r muestra una interacción de tipo π -alquilo con este mismo residuo. En AutoDock Vina también se observan interacciones de tipo van der Waals y π -alquilo en algunos complejos con PanK. Los complejos PanK-G1r y PanK-C1r muestran una interacción vía puente de hidrógeno con el residuo Tyr257, mientras que los complejos PanK-A1r, PanK-Ac1r y PanK-D1r muestran interacciones de van der Waals con este aminoácido. En contraste con los resultados de AutoDock Vina, donde solo el complejo PanK-G1r presenta una interacción de puente de hidrógeno con este residuo. La cadena lateral de estos aminoácidos, Phe254 y Tyr257, recubren el túnel preformado del sitio activo que interviene en la unión del sustrato de la coenzima A. Por otro lado, todos los complejos, excepto en el caso de PanK-C1r, muestran una interacción de puente de hidrógeno con Tyr182. Además, el complejo UGM-D1r muestra una interacción de tipo π -alquilo con este residuo. A diferencia de lo observado en AutoDock Vina, donde solamente en los complejos PanK-C1r y PanK-D1r se observan interacciones vía puente de hidrógeno con este residuo. El aminoácido Tyr182 forma parte de un túnel preformado del sitio activo de la enzima. La interacción de tipo π -alquilo con el aminoácido Tyr235 se forma en todos los complejos evaluados en Glide. En contraste, con los resultados de AutoDock Vina, en donde se observa una interacción vía puente de hidrógeno únicamente en el complejo PanK-C1r. Por otro lado, se observa una interacción de tipo van der Waals con el residuo Asn277 en todos los complejos excepto en PanK-C1r donde no se observa interacción con Asn277. Mientras que en AutoDock Vina, solo el complejo PanK-C1r exhibe interacción de puente de hidrógeno y el complejo PanK-D1r de tipo van der Waals con Asn277. Los residuos Tyr235 y Asn277 están involucrados en la unión de pantotenato y fosfotenoato

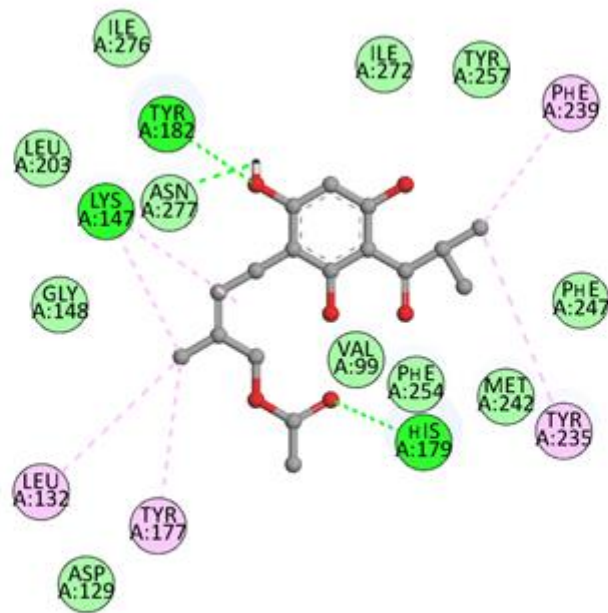
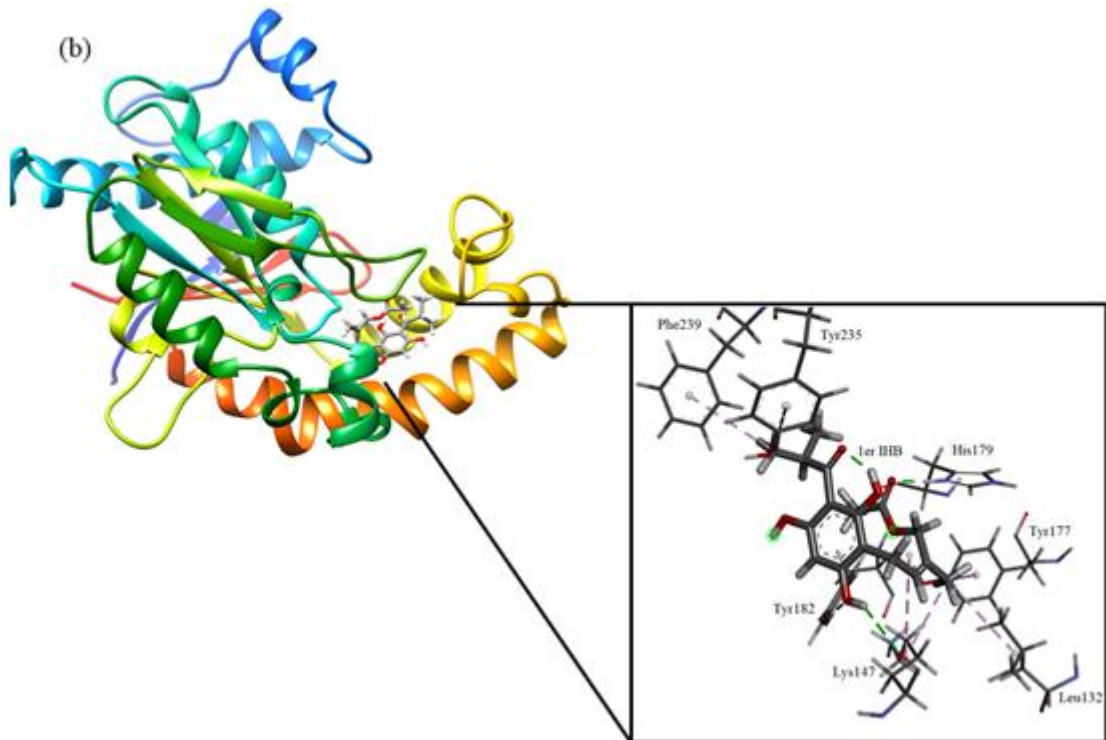
[68]. Adicionalmente, el complejo PanK-C1r muestra una interacción vía enlace C-H con Arg238. El residuo Arg238 sirve como conector entre el pantotenato fosforilado y el ATP [147].

Respecto al *docking* rígido en AutoDock Vina, la energía de afinidad es mejor en comparación con el *docking score* de Glide. En relación con las interacciones con Tyr257, en Glide se observan interacciones vía puente de hidrógeno tanto en PanK-G1r como en PanK-C1r, a comparación de los resultados de AutoDock Vina donde se observa esta interacción únicamente en el complejo PanK-G1r. En relación con Tyr182, se observan interacciones vía de puente de hidrógeno en todos los complejos excepto en PanK-C1r, mientras que en AutoDock Vina en se observan únicamente en los complejos PanK-C1r y PanK-D1r. Con respecto a los residuos Tyr235 y Asn277, no se observan interacciones por puente de hidrógeno en ninguno de los complejos evaluados, mientras que en AutoDock Vina se identifican interacciones vía puente de hidrógeno en el complejo PanK-C1r con ambos residuos.

Tabla 18. *Docking score* (kcal mol⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular rígido en Glide de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima PanK.

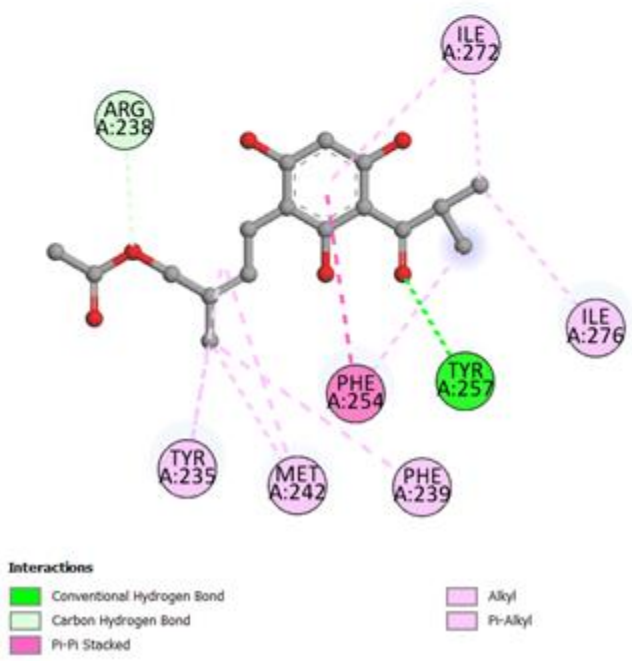
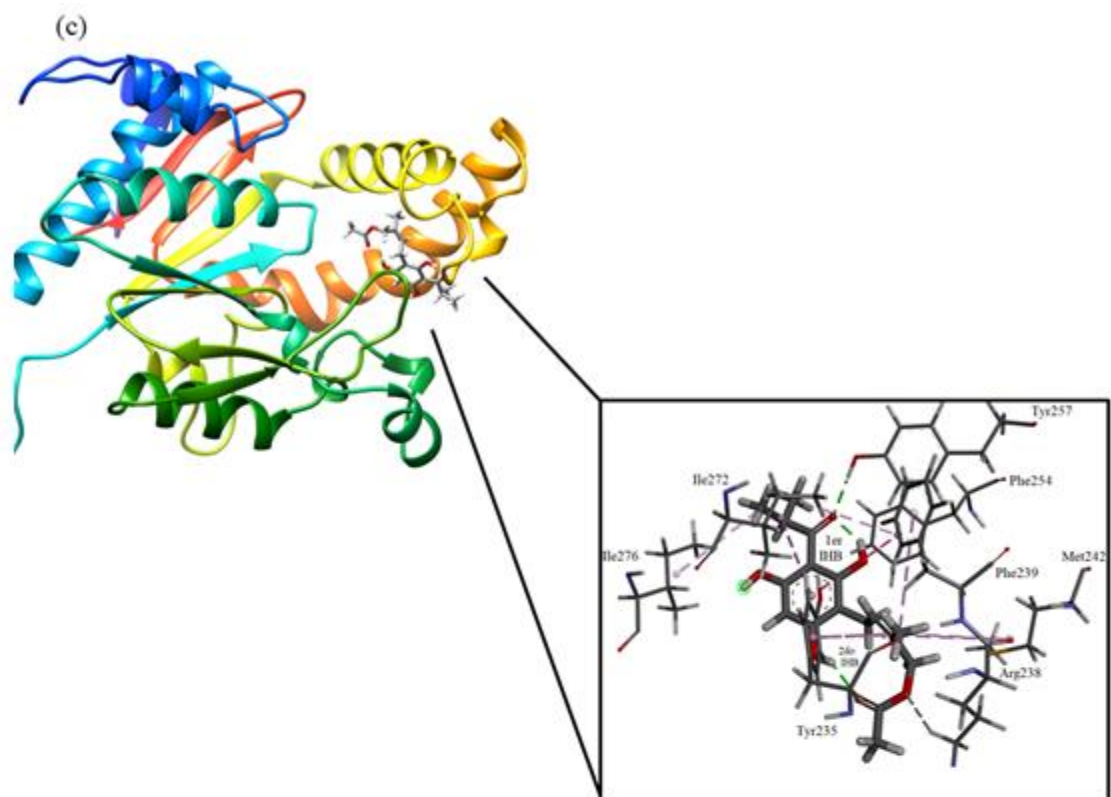
Medio	Complejo	<i>Docking score</i>	Aminoácidos	Tipo de interacción
Fase gas	PanK-G1r	-7.19	Phe254 Tyr257 Tyr235 Tyr182 Asn277	van der Waals Puente de hidrógeno π -alquilo Puente de hidrógeno van der Waals
Agua	PanK-A1r	-6.29	Phe254 Tyr257 Tyr235 Tyr182 Asn277	van der Waals van der Waals π -alquilo Puente de hidrógeno van der Waals
Cloroformo	PanK-C1r	-8.07	Phe254 Tyr257 Arg238 Tyr235	π -alquilo y π - π Puente de hidrógeno Enlace C-H π -alquilo
Acetonitrilo	PanK-Ac1r	-6.96	Phe254 Tyr257 Tyr235 Tyr182 Asn277	van der Waals van der Waals π -alquilo Puente de hidrógeno van der Waals
DMSO	PanK-D1r	-6.97	Phe254 Tyr257 Tyr235 Tyr182 Asn277	π - π van der Waals π -alquilo Puente de hidrógeno y π -alquilo van der Waals

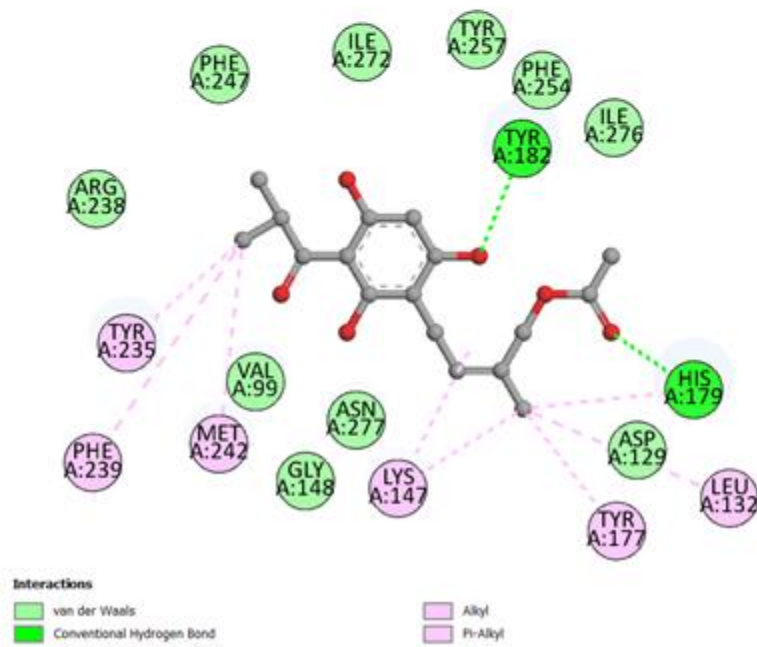
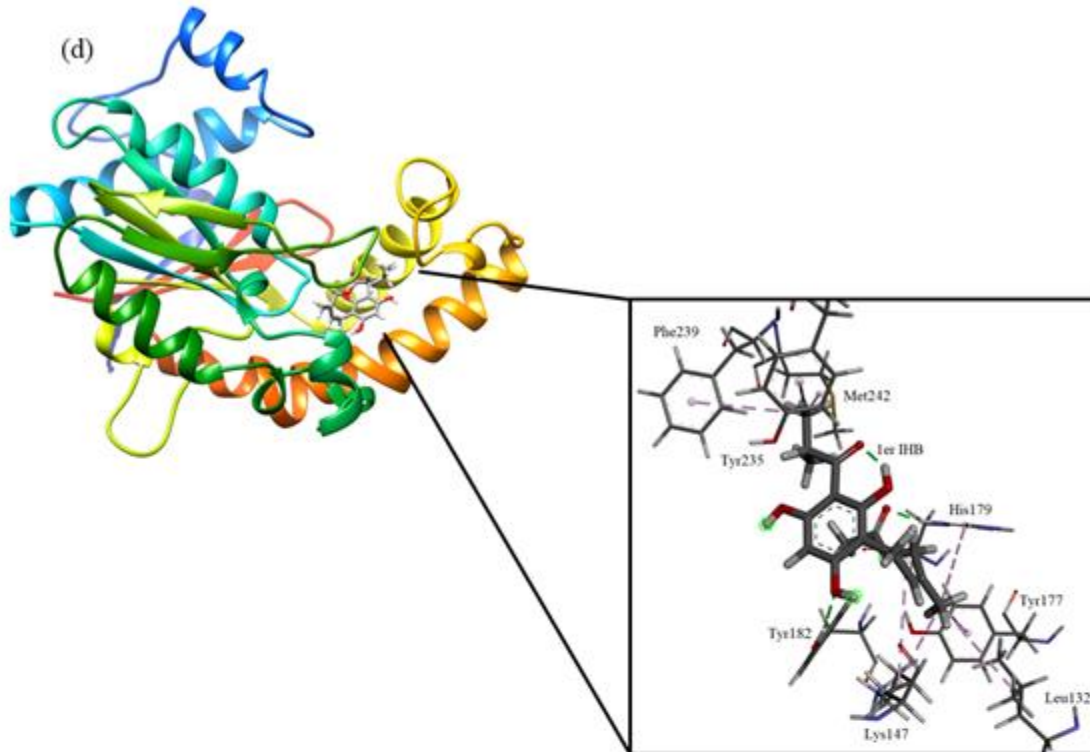




Interactions

- Van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Alkyl
- Pi-Alkyl





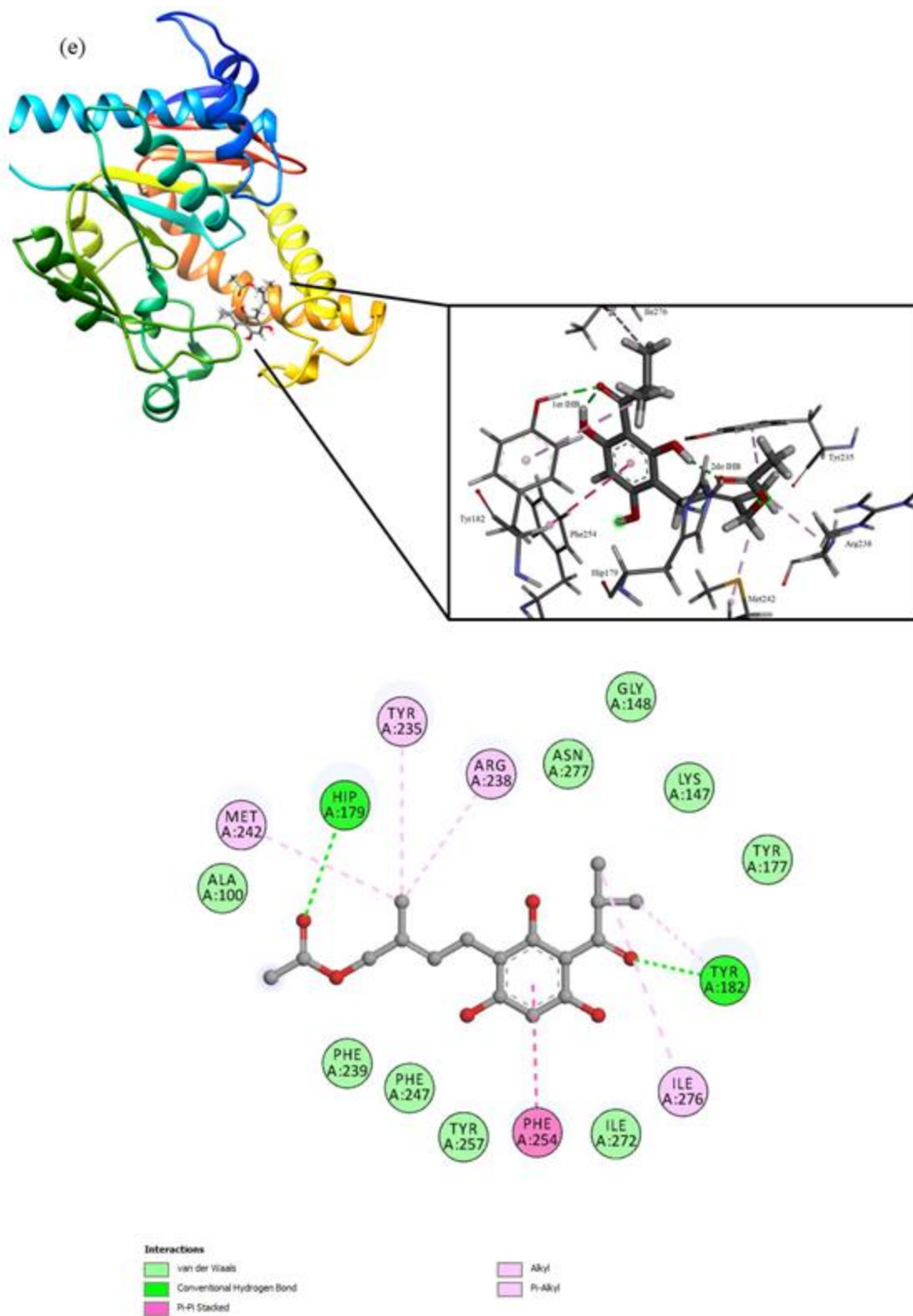


Figura 35. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular rígido en Glide de los complejos de la enzima PanK con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) PanK-G1r, (b) PanK-A1r, (c) PanK-C1r, (d) PanK-Ac1r y (e) PanK-D1r.

Cabe mencionar que estos resultados son similares a los obtenidos en el acoplamiento rígido con AutoDock Vina (ver Sección 5.6), tanto en la tendencia observada de la energía de afinidad como en las interacciones encontradas. Los resultados del acoplamiento molecular obtenidos en Glide de esta sección se utilizaron para el cálculo de MM/GBSA, cuyos resultados se presentan en la sección 5.9.

5.8. Validación de los cálculos de acoplamiento molecular

Con el propósito de validar los cálculos de acoplamiento molecular, se llevó a cabo un *re-docking* de los blancos InhA y UGM junto con los sustratos *trans*-2-hexadecenoil-(*n*-acetilcisteamina)-tioéster (THT) y uridina-5'-difosfato (UDP), respectivamente, mientras que en el caso de PanK se realizó un *re-docking* utilizando el inhibidor *N*-[1-(5-{[2-(4-fluorofenoxi)etil]sulfanil}-4-[(4-fluorofenil)metil]-4H-1,2,4-triazol-3-il)etil]-2-(trifluorometil)benzamida (ZVW).

A continuación, se presentan los resultados del *re-docking* molecular para los complejos InhA-THT, UGM-UDP y PanK-ZVW. En cuanto al *re-docking* rígido, las energías de afinidad obtenidas con AutoDock Vina son superiores en todos los casos en comparación con Glide (Tabla 19). Al analizar los valores de RMSD, se observa que tanto en AutoDock Vina como en Glide, todos los valores son inferiores a 2 Å, lo que indica una mayor similitud con la conformación inicial de cada uno de los ligantes. No obstante, se destaca que en AutoDock Vina existe una mayor similitud con los conformeros de los ligantes de referencia en comparación con los obtenidos en Glide. En cuanto al *re-docking* semiflexible, es importante señalar que en comparación con AutoDock Vina, Glide alcanzó una energía libre de unión superior para InhA-THT y ligeramente mayor para UGM-UDP. En cambio, en el caso de PanK-ZVW, la energía de afinidad fue ligeramente mayor en AutoDock Vina. Según los resultados obtenidos mediante la metodología MM/GBSA, los valores son más favorables en el acoplamiento semi-flexible para InhA-THT y UGM-UDP, (Tabla 19). Sin embargo, en el caso del complejo PanK-ZVW, la energía de unión resultó superior en el acoplamiento rígido en comparación con los resultados obtenidos en el acoplamiento semi-flexible. Al analizar los valores de RMSD, se observa que para InhA-THT y UGM-UDP, AutoDock Vina muestra resultados más favorables en comparación con

Glide (Tabla 19). No obstante, en el caso de PanK-ZVW, se observa una situación inversa, ya que en Glide se obtiene un valor menor de RMSD. Es relevante señalar que los valores de RMSD obtenidos para InhA-THT y PanK-ZVW superan los 2 Å, indicando la falta de similitud con las conformaciones iniciales.

Por otro lado, los valores obtenidos del *re-docking* se compararon con los obtenidos del acoplamiento rígido y semiflexible del ligante caespitato y las 4 enzimas propuestas. Como conclusión, se observó que en términos generales, los valores de afinidad de caespitato no superan a los de los sustratos o inhibidores de las enzimas, como ejemplo, se destaca el caso de los resultados del acoplamiento rígido en AutoDock Vina con el ligante caespitato, que mantiene los dos IHB y que se optimizó en DMSO, destacando su relevancia debido a su aplicación en ensayos biológicos. En el complejo InhA-D1r, el valor de afinidad de unión (Tabla 11) fue inferior en más de dos kcal mol⁻¹ al complejo sustrato-InhA (-9.5 kcal mol⁻¹) (Tabla 19), contrariamente a lo esperado para mostrar actividad inhibitoria. Para la enzima MabA, el valor de la puntuación de *docking* observado para el complejo MabA-D1r (Tabla 12), al igual que para el complejo InhA-D1r, fue inferior en más de dos kcal mol⁻¹ al inhibidor de control de MabA (isonicotina-acil-NADH), cuyo valor de puntuación fue de -9.5 kcal mol⁻¹ [57]. Para la UGM, el valor de la energía de afinidad para el complejo UGM-D1r fue menor en más de seis de kcal mol⁻¹ (Tabla 13) con respecto al complejo sustrato-UGM común (-13.6 kcal mol⁻¹). Para la enzima PanK, el valor de afinidad del complejo PanK-D1r fue menor en cinco kcal mol⁻¹ (Tabla 13) al inhibidor ZVW. Para los valores de *docking* semi-flexible tanto en AutoDock Vina y en Glide los valores no fueron mejores en comparación a los obtenidos con el sustrato y los inhibidores.

Para la validación del acoplamiento molecular con la enzima MabA se reprodujeron los valores de energía de afinidad de -9.5 kcal mol⁻¹ con el inhibidor dinucleótido de isonicotínico-acetil-nicotinamida-adenina como ligante (PDB ID: IZID), además también se identificaron las interacciones reportadas [57] de los aminoácidos Gly22, Asn24, Arg47, Gly90, Asn88, Ile27, Ile186, Lys157, Thr196 que pertenecen al sitio de unión de dicha enzima.

Tabla 19. Energías libres de unión (kcal mol⁻¹) y RMSD (Å) de las simulaciones de *re-docking* de InhA, UGM y PanK con sus respectivos sustratos e inhibidores, calculadas con AutoDock Vina y Glide.

Complejo Enzima-ligante	Rígido (kcal mol ⁻¹)			RMSD (Å)		Semi-flexible (kcal mol ⁻¹)			RMSD (Å)	
	A	G	M	A	G	A	G	M	A	G
InhA-THT	-9.5	-3.2	-56.09	0.74	0.76	-5.1	-8.0	-93.51	5.05	7.27
MabA-Inhibidor	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
UGM-UDP	-13.6	-10.2	-65.44	0.13	0.67	-10.3	-11.1	-73.23	0.40	1.4
PanK-ZVW	-14.1	-7.4	-83.90	0.34	0.43	-8.7	-8.1	-74.84	6.83	4.89

A = AutoDock Vina, G = Glide, M = MM/GBSA

5.9. Estudio MM/GBSA

El método Prime MM/GBSA [148] se utilizó para mejorar los valores de puntuación de los cálculos de acoplamiento molecular obtenidos en el módulo Glide. A continuación, se presentan los resultados del acoplamiento rígido, los cuales presentaron mejores valores de energía de afinidad y mejores interacciones de los complejos de las proteínas InhA, MabA, PanK y UGM con los ligantes más estables optimizados en fase gas (G1), agua (A1), cloroformo (C1), acetonitrilo (Ac1) y DMSO (D1).

En la Tabla 20 se muestran las energías libres de enlace MM/GBSA calculadas para los complejos con la enzima InhA y los ligantes más estables en fase gas y disolución, donde $MM/GBSA-\Delta G\text{-enlace} = \text{Complejo} - \text{Receptor} - \text{Ligante}$, $MM/GBSA-\Delta G\text{-enlace (Coulomb)} = \text{Complejo} - \text{Receptor} - \text{Ligante}$ en unidades Coulomb, $MM/GBSA \Delta G \text{ enlace (NS)} = \text{Complejo} - \text{Receptor (del complejo optimizado)} - \text{Ligante (del complejo optimizado)} = MM/GBSA \Delta G \text{ enlace} - \text{Tensión del Receptor} - \text{Tensión del Ligante}$ y finalmente $MM/GBSA-\Delta G\text{-enlace (NS) (Coulomb)}$, el cual se refiere a $MM/GBSA \Delta G \text{ enlace (NS)}$ en unidades Coulomb. NS significa no deformación; esta energía no considera los cambios conformacionales necesarios para la formación del complejo.

Como se observa en la Tabla 20, los complejos de la enzima InhA que presentaron las mejores energías de enlace ΔG son InhA-A1 y InhA-Ac1. Para los complejos con la enzima MabA, MabA-C1 presentó mejor energía de enlace ΔG de $-54.29 \text{ kcal mol}^{-1}$ respecto a los

demás complejos. Por otro lado, los complejos UGM-G1, UGM-C1 y UGM-D1 presentaron las mejores energías de enlace. Finalmente, de los resultados de la enzima PanK, el complejo que presenta mejor energía de enlace ΔG es PanK-G1 de $-59.59 \text{ kcal mol}^{-1}$, seguido de PanK-D1, PanK-C1 y PanK-A1, con energías muy similares que varían en menos de $1\text{-}2 \text{ kcal mol}^{-1}$ respecto a PanK-D1. Mientras que el complejo PanK-Ac1 presentó una energía no tan buena ($-56.49 \text{ kcal mol}^{-1}$) con respecto a al complejo PanK-D1. De manera general, cabe mencionar que los complejos formados con las enzimas UGM y PanK son los que presentan las mejores energías de enlace respecto a los complejos formados con las otras enzimas. Por otro lado, podemos observar en la Tabla 20 que los complejos que tienen mejor energía de enlace MM/GBSA- ΔG (NS), UGM-C1 y UGM-D1, presentan los mejores valores de energía de enlace MM/GBSA- ΔG .

Tabla 20. Energías libres de enlace MM/GBSA (kcal mol^{-1}) de los complejos entre los conformeros más estables de caespitato en fase gas y disolución con las enzimas InhA, MabA, UGM y PanK.

	InhA			
Confórmero	MM/GBSA-ΔG-enlace	MM/GBSA-ΔG-enlace (Coulomb)	MM/GBSA-ΔG-enlace (NS)	MM/GBSA-ΔG-enlace (NS)(Coulomb)
G1	-40.81	-9.47	-44.22	-7.74
A1	-54.72	-15.85	-59.26	-16.29
C1	-47.59	-2.76	-53.63	-1.85
Ac1	-54.72	-15.85	-59.26	-16.29
D1	-43.89	-6.97	-39.22	-5.54
	MabA			
Confórmero	MM/GBSA-ΔG-enlace	MM/GBSA-ΔG-enlace (Coulomb)	MM/GBSA-ΔG-enlace (NS)	MM/GBSA-ΔG-enlace (NS)(Coulomb)
G1	-47.12	-6.85	-54.05	-6.29
A1	-49.37	-10.91	-54.53	-10.79
C1	-54.29	-8.17	-57.03	-7.84
Ac1	-50.20	-10.18	-57.32	-9.33
D1	-47.83	-16.04	-58.00	-14.28

	UGM			
Confórmero	MM/GBSA- Δ G-enlace	MM/GBSA- Δ G-enlace (Coulomb)	MM/GBSA- Δ G-enlace (NS)	MM/GBSA- Δ G-enlace (NS)(Coulomb)
G1	-53.16	-8.86	-61.69	-6.95
A1	-47.29	-7.58	-58.49	-10.66
C1	-64.03	-16.4	-72.23	-16.95
Ac1	-47.77	-5.48	-57.56	-5.53
D1	-58.89	-4.38	-69.43	-8.55
	PanK			
Confórmero	MM/GBSA- Δ G-enlace	MM/GBSA- Δ G-enlace (Coulomb)	MM/GBSA- Δ G-enlace (NS)	MM/GBSA- Δ G-enlace (NS)(Coulomb)
G1	-59.59	-18.99	-62.62	-17.42
A1	-57.03	-13.74	-60.67	-13.92
C1	-58.80	-3.08	-64.68	-5.12
Ac1	-56.49	-18.88	-61.95	-18.40
D1	-58.96	-4.41	-63.08	-4.29

En la Tabla 21 se presentan los parámetros energéticos MM/GBSA. Las energías Δ G bind Lipo y Δ G bind vdW son las contribuciones más importantes para determinar la energía libre promedio de unión de todos los complejos. Para la enzima InhA se observa que los complejos InhA-G1, InhA-C1 e InhA-Ac1 se estabilizan mediante las contribuciones Δ G bind vdW, Δ G bind Lip y Δ G bind Solv GB contribuyen, sin embargo, Δ G bind Hbond es el que menos contribuye, lo que indica que hay una pobre estabilización de los enlaces de hidrógeno en todos los complejos con los aminoácidos de InhA. El término Δ G bind vdW revela que no hay buen contacto entre el sitio activo de InhA y los ligantes G1 y Ac1. Por otra parte, la contribución de Δ G bind Lipo indica que el sitio de unión de InhA es lipofílico y, en consecuencia, las interacciones lipofílicas son dominantes.

Para la enzima MabA, se observa que en el caso del complejo MabA-D1, la contribución que estabiliza al complejo es Δ G bind vdW, la cual revela un buen contacto entre el sitio activo de MabA y A1. Además, el valor de Δ G bind Solv GB es también favorable para su estabilización.

Para los complejos de la enzima UGM que mostraron mejor energía de enlace Δ G, se observa que el término Δ G bind vdW tiene una buena contribución para la estabilización de

los complejos UGM-G1, UGM-C1 y UGM-D1, mientras que el término ΔG bind Hbond no mostró una contribución favorable.

Finalmente, para los complejos con la enzima PanK, se observa que PanK-A1 y PanK-D seguido por el complejo PanK-Ac1 con una diferencia de 2 kcal mol⁻¹. Ambos complejos obtuvieron su estabilización mediante las contribuciones ΔG bind vdW y ΔG bind Lipo, pero ΔG bind Hbond es el parámetro que menos contribuye, lo que indica una pobre estabilización de los enlaces de hidrógeno entre G1 y D1, y los residuos de aminoácidos de PanK. El término ΔG bind vdW revela un buen contacto entre el sitio activo de PanK y D1, seguido por el del complejo PanK-G1. Por otra parte, la contribución de ΔG bind Lipo indica que el sitio de unión de PanK es lipofílico y, en consecuencia, las interacciones lipofílicas son dominantes. De acuerdo con los parámetros descritos anteriormente, ambos complejos UGM-G1 y UGM-D1 alcanzan la estabilidad por diferentes contribuciones, pero ambos pueden formarse mejor que los otros complejos proteína-G1 y proteína-D1.

Tabla 21. Parámetros energéticos de MM/GBSA (kcal mol⁻¹) de los complejos entre los conformeros más estables de caespitato en fase gas y disolución con las enzimas InhA, MabA, UGM y PanK.

	InhA			
Confórmero	ΔG bind Hbond	ΔG bind Lipo	ΔG bind Solv GB	ΔG bind vdW
G1	-0.99	-22.58	14.57	-22.95
A1	-0.61	-26.86	11.96	-25.99
C1	-0.74	-35.44	18.05	-30.95
Ac1	-0.61	-26.86	11.96	-25.99
D1	-0.83	-2.11	12.77	-20.89
	MabA			
Confórmero	ΔG bind Hbond	ΔG bind Lipo	ΔG bind Solv GB	ΔG bind vdW
G1	-0.43	-29.69	19.01	-31.77
A1	-0.77	-30.35	27.81	-38.14
C1	-0.8	-28.49	18.3	-36.97
Ac1	-0.78	-30.38	16.38	-27.77
D1	-0.76	-31.68	21.44	-29.77

UGM				
Confórmero	ΔG bind Hbond	ΔG bind Lipo	ΔG bind Solv GB	ΔG bind vdW
G1	-1.89	-36.12	20.49	-31.33
A1	-1.72	-36.91	21.25	-26.45
C1	-1.27	-37.67	24.8	-37.39
Ac1	-0.89	-36.67	14.84	-22.71
D1	-2.49	-36.65	17.36	-36.19
PanK				
Confórmero	ΔG bind Hbond	ΔG bind Lipo	ΔG bind Solv GB	ΔG bind vdW
G1	-0.7	-29.86	20.34	-32.57
A1	-1.3	-28.37	20.56	-35.37
C1	-0.41	-36.42	12.09	-31.52
Ac1	-1.3	-28.26	21.12	-32.02
D1	-0.53	-34.87	14.21	-34.89

Con estos resultados, se puede deducir que la actividad biológica de la molécula de caespitato se debe a que impide un paso de las reacciones catalizadas por las enzimas UGM y PanK. Los resultados muestran hallazgos relevantes debido a que ambas enzimas no son exclusivas de *Mtb*, y por lo tanto el caespitato presentaría un posible efecto antibacteriano específico en infecciones provocadas por *E. coli*, *B. ammoniagenes* [149, 150] en el caso de PanK, y *L. major* y *K. pneumoniae* [151, 152] en el caso de UGM.

CONCLUSIONES

En esta tesis se generaron 86 conformeros de caespitato con energías relativas $\Delta E \leq 6$ kcal mol⁻¹ mediante MM. Posteriormente, se realizó como primer filtro una optimización usando cálculos DFT en el nivel de teoría APFD/6-31+G(d) para obtener estructuras estables con energías $\Delta E \leq 4$ kcal mol⁻¹. A continuación, utilizando un nivel de teoría más alto, APFD/6-311+G(2d,p) como segundo filtro, se realizó la optimización y el cálculo de frecuencias vibracionales para obtener estructuras estables con energías $\Delta E \leq 2$ kcal mol⁻¹.

Se realizaron los cálculos en fase gas y en disolución implícita con los disolventes de agua, cloroformo, acetonitrilo y DMSO. Se obtuvieron 24 conformeros en fase gas (G), 10 en agua (A), 26 en cloroformo (C), 33 en acetonitrilo (Ac) y 34 en DMSO (D).

Las estructuras más estables en cada fase presentaron conformación extendida en fase gas (G1) y en cloroformo (C1), mientras que en agua (A1), acetonitrilo (Ac1) y DMSO (D1) tienen conformación en forma de horquilla. Las formas extendidas G1 y C1 conservaron dos puentes de hidrógeno intramoleculares (IHBs), mientras que en las conformaciones de horquilla solamente D1 conserva ambos puentes de hidrógeno, mientras que A1 y Ac1 solamente presentan un IHB.

El análisis de poblaciones, basado en la distribución de Boltzmann, indicó que la conformación extendida, que preserva ambos IHBs, es la conformación dominante en fase gas (G1) con un 24.60 % y en disolución implícita de cloroformo (C1) con un 49.10 %.

Para evaluar el efecto del disolvente de forma explícita se construyeron sistemas de caespitato rodeados por 31 moléculas de cada disolvente usando la metodología ONIOM (ω B97X-D3/Def2-TZVP:XTB2). Se obtuvieron estructuras optimizadas a partir del caespitato en fase gas (AG1E, CG1E, AcG1E y DG1E) y a partir de las estructuras en disolvente implícito (A1E, C1E, Ac1E y D1E). Los resultados mostraron una mayor energía de estabilización (-4.97 kcal mol⁻¹) para el caespitato rodeado de cloroformo que para los demás disolventes. También se observó que la estabilidad tomando de partida tanto la estructura en fase gas (G1) como las estructuras más estables de disolvente implícito (A1, C1, Ac1 y D1), presentan el mismo orden de estabilidad en cada uno de los disolventes de manera explícita: $E_{CG1E}/E_{C1E} > E_{DG1E}/E_{D1E} > E_{AcG1E}/E_{Ac1E} > E_{AG1E}/E_{A1E}$. En

general, los conformeros de caespitato conservan su conformación similar a la obtenida en disolvente implícito cuando se rodean de cada uno de los disolventes de forma explícita, lo cual fue evaluado mediante los valores de RMSD entre cada par de conformeros en disolución implícita y explícita.

Se analizaron los diferentes descriptores de reactividad global mediante el enfoque de DFT conceptual, a partir de las energías de los orbitales moleculares frontera HOMO y LUMO, tanto en disolvente implícito como explícito. En general, se observa que los valores de los índices de reactividad global en disolvente explícito son ligeramente mayores a los del disolvente implícito.

Por otro lado, el análisis QTAIM, utilizado para caracterizar los IHBs en las estructuras de caespitato, mostró que las energías de interacción $E_{H...Y}$ son menores en los sistemas con disolvente explícito respecto a las obtenidas con disolvente implícito, lo cual se puede explicar debido a las interacciones no-covalentes entre las moléculas de disolvente que rodean a la molécula de caespitato en los sistemas A1E, C1E, Ac1E y D1E.

Los resultados del acoplamiento molecular semiflexible, obtenidos en el programa AutoDock Vina, entre las enzimas InhA, MabA, UGM y PanK y los conformeros más estables de caespitato en fase gas (G1) y en disolución (A1, C1, Ac1 y D1) no lograron reproducir los datos experimentales. Esto se debe a la pérdida de la conformación del ligante y, en consecuencia, la de los enlaces de hidrógeno (IHB), que son cruciales para la actividad biológica asociada a estos sistemas.

En contraste, los resultados del acoplamiento rígido, obtenidos en el programa AutoDock Vina y en el módulo Glide del programa Schrödinger, arrojaron energías de afinidad más prometedoras. En este enfoque, se logró mantener a ambos puentes de hidrógeno (IHBs) y se observaron interacciones específicas en los sitios activos de cada blanco terapéutico. Estos hallazgos resaltan la efectividad del enfoque rígido en la simulación de las interacciones biomoleculares, lo que puede ser de gran utilidad en el diseño y desarrollo de fármacos en interacción con estas dianas terapéuticas.

Finalmente, se utilizó el método híbrido MM/GBSA para mejorar los valores de puntuación de los cálculos de acoplamiento molecular. Los complejos UGM-G1, UGM-D1, PanK-G1

y PanK-D1 mostraron una mayor estabilidad a través de las diferentes contribuciones energéticas. Estos resultados destacan la importancia de considerar las interacciones específicas entre la proteína y el ligante, así como las diferentes contribuciones que desempeñan un papel importante en la formación de complejos estables. Los resultados obtenidos son relevantes debido a que las enzimas UGM y PanK no son exclusivas de *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*, y por lo tanto el caespitato presentaría un posible efecto antibacteriano específico en infecciones provocadas *L. major* y *K. pneumoniae* en el caso de UGM, y por *E. coli*, *B. ammoniagenes* en el caso de PanK, por lo que es recomendable llevar a cabo estudios *in vitro* frente a estas bacterias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Enarson DA, Rieder HL, Arnadottir T, Trébuq A. A Guide For Low Income Countries. *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 2000, 5ta. ed. Disponible en línea: https://tbrieder.org/publications/books_spanish/orange_guide_sp.pdf (último acceso: 16 de enero de 2023)
2. Royal College of Physicians of London: “Tuberculosis”, 11 St. Andrews Place, London NW1 4LE, ISBN: 1 86016 277 0, 2006.
3. WHO. Tuberculosis. Disponible en línea: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis> (último acceso: 18 diciembre 2022)
4. Holmes KK, Bertozzi S, Bloom BR, JhaMajor P. Major Infectious Diseases, *Disease Control Priorities*. 2017, 6, 3er Ed. ISBN-13: 978-1-4648-0525-7
5. Sakula A. Robert Koch: Centenary of the Discovery of the Tubercle Bacillus. *Canadian Veterinary Journal*. 1983, 24: 127-131.
6. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020, Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2020
7. World Health Organization. Global tuberculosis report 2021, Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2021.
8. WHO|Tuberculosis 2019. Disponible en línea: www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis (último acceso: 7 diciembre 2022)
9. OPS. Tuberculosis en las Américas. Informe regional 2020. 2021. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. DOI: 10.37774/9789275324479.
10. CENAPRECE. “Manual para la Prevención y Control de la Transmisión de la Tuberculosis”. 2da. Edición: febrero 2020. Disponible en línea: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/662794/Manual_de_control_de_Infecciones_2020.pdf. (último acceso: 16 de enero del 2023)
11. Secretaría de Salud (SSA). Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). “Situación actual de la Tuberculosis en México, 2019”, Ciudad de México: SSA, CENAPRECE, 2020.
12. Sánchez Pérez HJ, Bernal D, Torres O, Colorado A. “Tuberculosis en México en tiempos de COVID-19: algunas reflexiones”, *Enfermedades Emergentes*, 20(3), 2021,

- 160-165 Disponible en línea: http://www.enfermedadesemergentes.com/articulos/a790/1_original_sanchez_web.pdf (último acceso: 16 de enero de 2023)
13. SSA, “México avanza en la reducción de incidencia y mortalidad por tuberculosis”: Disponible en línea: <https://www.gob.mx/salud/prensa/129-mexico-avanza-en-la-reduccion-de-incidencia-y-mortalidad-por-tuberculosis>. (último acceso: 16 de enero del 2023)
 14. Gegia M. Treatment of isoniazid-resistant tuberculosis with first-line drugs: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017, 17: 223–34. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30407-8
 15. Dutertre D. Rifampicina. *EMC Tratado de medicina*. 2017, 21: 1-5. DOI: 10.1016/S1636-5410(17)84249-5
 16. Schubert K. et al. The antituberculosis drug ethambutol selectively blocks apical growth in CMN group bacteria. *mBio*. 2017, 8:e02213-16. DOI: 10.1128/mBio.02213-16.
 17. García Ramos R. et al. Tratamiento actual de la tuberculosis. *Anales de Medicina Interna*. 2003, 20(2), 43-52. Disponible en línea: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992003000200011&lng=es&tlng=es (último acceso:16 de enero del 2023)
 18. Zhang T, Jiang G, Wen S, Huo F, Wang F, Huang H, Pang Y. Para-aminosalicylic acid increases the susceptibility to isoniazid in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Infection and Drug Resistance*. 2019, 12, 825-829. DOI: 10.2147/IDR.S200697
 19. Li Y, Wang F, Wu L, Zhu M et al. Cycloserine for treatment of multidrug-resistant tuberculosis: a retrospective cohort study in China. *Infection and Drug Resistance*. 2019, 12, 721-731. DOI: 10.2147/IDR.S195555
 20. Bergstermann H, Rüchardt A. Ciprofloxacin once daily versus twice daily for the treatment of pulmonary tuberculosis. *Infection*. 1997, 25(4), 227-32. DOI: 10.1007/BF01713149
 21. Ejalonibu MA, Ogundare SA, Elrashedy AA et al. Drug Discovery for Mycobacterium tuberculosis Using Structure-Based Computer-Aided Drug Design

- Approach. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(24), 13259. DOI: 10.3390/ijms222413259
22. Vongvanich N, Kittakoop P, Charoenchai P et al. Antiplasmodial, antimycobacterial, and cytotoxic principles from *Camchaya calcárea*. *Planta Medica*. 2006, 72, 1427e1430. DOI: 10.1055/s-2006-951711
 23. Sutthivaiyakit S, Thongnak O, Lhinhatrakool TO et al. Cytotoxic and antimycobacterial prenylated flavonoids from the roots of *Eriosema chinense*. *Journal of Natural Products*. 2009, 72, 1092e1096. DOI: 10.1021/np900021h
 24. Mitscher LA. et al. antimicrobial agents from higher plants. Introduction, rational, and methodology. *Lloydia*. 1972, 35: 157-166.
 25. Watt JM, Breyer-Brandwijk MG. Medicinal and poisonous plants. *Nature*. 1993,132, 336.
 26. Mathegka ADM, Meyer JJM, Horn MM, Drewes SE. An acylated phloroglucinol with antimicrobial properties from *Helichrysum caespititium*. *Phytochemistry*. 2000, 53, 93.2. DOI: 10.1016/S0031-9422(99)00424-0
 27. Meyer J, Lall N, Mathegka, ADS. In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by *Helichrysum caespititium*. *South African Journal of Botany*. 2002, 68,90.3. DOI: 10.1016/S0254-6299(16)30462-8
 28. Mathegka ADM. Antimicrobial activity of *Helichrysum* species and the isolation of a new phloroglucinol from *Helichrysum caespititium*. PhD Thesis, University of Pretoria, Pretoria, South Africa, 2001.
 29. Mammino L, Kabanda MM. The geometric isomers of caespitate: a computational study in vacuo and in solution. *International Journal of Biology and Biomedical Engineering*. 2012, 1:6, 114–133. Disponible en línea: <http://ijdri.com/ijbbe/2012/17-931.pdf> (último acceso: 15 de enero del 2023)
 30. Dekker TG, Fourie TG, Snyckers FO, Van der Schyf CJ. Studies of South African medicinal plants. part 2 caespitin, a new phloroglucinol derivative with antimicrobial properties from *Helichrysum caespititium*. *South African Journal of Chemistry*. 1983, 36:114–6

31. Mamabolo MP, Muganza FM, Olivier MT. Free radical scavenging and antibacterial activities of *Helichrysum caespititium* (DC) Harv. extracts. *Biology and Medicine*. 2017, 9:6.
32. Maroyi A. *Helichrysum caespititium* (DC.) Harv.: Review of its medicinal uses, phytochemistry and biological activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2019, 9(06):111–118. DOI: 10.7324/JAPS.2019.90616
33. Seleteng-Kose L, Moteetee A, Van Vuuren S. Medicinal plants used for the treatment of sexually transmitted infections in the Maseru district, Lesotho: antimicrobial validation, phytochemical and cytotoxicity studies. *South African Journal of Botany*. 2019, 122, 457-466. DOI: 10.1016/j.sajb.2019.01.035
34. Van Der Schyf CJ, Dekker TG, Fourie TG, Snyckers FO. Synthesis and antimicrobial activity of a series of caespitin derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1986, 30(3):375–81. DOI: 10.1128/aac.30.3.375
35. Wisespongpan P, Kuniyoshi M. Bioactive phloroglucinols from the brown alga *Zonaria diesingiana*. *Journal of Applied Phycology*. 2003, 15, 225–228. DOI: 10.1023/A:1023831131735
36. Sight I, Bharate S. Phloroglucinol compounds of natural origin. *Natural Product Reports*. 2006, 23, 558-591. DOI: 10.1039/b600518g
37. Mammino L, Kabanda MM. The role of additional O—H···O intramolecular hydrogen bonds for acylphloroglucinols' conformational preferences in vacuo and in solution. *Molecular Simulation*. 2013, 39(1), 1-13. DOI: 10.1080/08927022.2012.700483
38. Mammino L, Kabanda MM. Model structures for the study of acylated phloroglucinols and computational study of the caespitate molecule. *Theochem*. 2007, 805, 39– 52. DOI: 10.1016/j.theochem.2006.10.019
39. Mammino L, Kabanda MM. A study of the intramolecular hydrogen bond in acylphloroglucinols. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 2009, 901, 1–3, 210-219. DOI: 10.1016/j.theochem.2009.01.032.
40. Mammino L, Kabanda MM. A Computational Study of the Effects of Different Solvents on the Characteristics of the Intramolecular Hydrogen Bond in

- Acylphloroglucinols. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2009, 113, 52, 15064–15077. DOI: 10.1021/jp905180c
41. Mammino L, Kabanda MM. Computational study of the patterns of weaker intramolecular hydrogen bonds stabilizing acylphloroglucinols. *International Journal of Quantum Chemistry*. 2012, 112, 14, 2650-2658. DOI: 10.1002/qua.23280
 42. Mammino L, Kabanda MM. The conformational preferences of acylphloroglucinols—a promising class of biologically active compounds. *International Journal of Quantum Chemistry*. 2012, 112, 23, 3691-3702. DOI: 10.1002/qua.24012
 43. Mammino L, Kabanda MM. A Computational Study of the Interactions of the Caespitate Molecule with Water. *International Journal of Quantum Chemistry*. 2008, 108, 1772-1791. DOI: 10.1002/qua.21594
 44. Mammino L, Kabanda MM. A Computational Study of the Carboxylic Acid of Phloroglucinol in Vacuo and in Water Solution. *International Journal of Quantum Chemistry*. 2010, 110: 595-623. DOI: 10.1002/qua.22262
 45. Mammino L, Kabanda MM. Adducts of acylphloroglucinols with explicit water molecules: Similarities and differences across a sufficiently representative number of structures. *International Journal of Quantum Chemistry*. 2010, 110: 2378-2390. DOI: 10.1002/qua.22704
 46. He X, Alian A, Ortiz de Montellano PR. Inhibition of the Mycobacterium tuberculosis enoyl acyl carrier protein reductase InhA by arylamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007, 1;15, 21,6649-58. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.08.013
 47. Duan X, Xiang X, Xie J. Crucial components of mycobacterium type II fatty acid biosynthesis (Fas-II) and their inhibitors. *FEMS Microbiology Letters*. 2014, 360(2), 87-99. DOI: 10.1111/1574-6968.12597
 48. Banerjee A, Sugantino M, Sacchetti JC, Jacobs WR Jr. The mabA gene from the inhA operon of Mycobacterium tuberculosis encodes a β -ketoacyl reductase that fails to confer isoniazid resistance. *Microbiology*. 1998, 144:2697–2707. DOI: 10.1099/00221287-144-10-2697
 49. Veyron-Churlet R, Zanella-Cleon I, Cohen-Gonsaud M, Molle V, Kremer L. Phosphorylation of the Mycobacterium tuberculosis β -ketoacyl-acyl carrier protein

- reductase MabA regulates mycolic acid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2010, 285:12714–12725. DOI: 10.1074/jbc.M110.105189
50. Cantaloube S, Veyron-Churlet R, Haddache N, Daffé M, Zerbib D: The Mycobacterium tuberculosis FAS-II dehydratases and methyltransferases define the specificity of the mycolic acid elongation complexes. *PLOS ONE*. 2011, 6(12):e29564. DOI: 10.1371/journal.pone.0029564
 51. Rosado LA, Caceres RA, de Azevedo WF. et al. Role of Serine140 in the mode of action of Mycobacterium tuberculosis β -ketoacyl-ACP Reductase (MabA). *BMC Research Notes*. 2012, 5, 526. DOI: 10.1186/1756-0500-5-526
 52. Takayama K, Wang C, Besra GS. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005,18(1):81–101. DOI: 10.1128/CMR.18.1.81-101.2005
 53. Quemard A, Sacchettini JC, Dessen A, Vilcheze C, Bittman R, Jacobs WR, et al. Enzymic characterization of the target for isoniazid in Mycobacterium tuberculosis. *Biochemistry*. 1995, 34(26):8235–41. DOI: 10.1021/bi00026a004
 54. Marrakchi H, Lanéelle G, Quémard A. InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology*. 2000,146(2):289–96. DOI: 10.1099/00221287-146-2-289
 55. Marrakchi H, Ducasse S, Labesse G, Montrozier H, Margeat E, Emorine L, et al. MabA (FabG1), a Mycobacterium tuberculosis protein involved in the longchain fatty acid elongation system FAS-II. *Microbiology*. 2002,148(4):951–60. DOI: 10.1099/00221287-148-4-951
 56. Ducasse-Cabanot S, Cohen-Gonsaud M, Marrakchi H, Nguyen M, Zerbib D, Bernadou J, et al. In vitro inhibition of the Mycobacterium tuberculosis β -ketoacyl-acyl carrier protein reductase MabA by isoniazid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004, 48(1):242–9. DOI: 10.1128/AAC.48.1.242-249.2004
 57. Shilpi JA, Ali MT, Saha S, Hasan S, Gray AI, Seidel V. Molecular docking studies on InhA, MabA and PanK enzymes from Mycobacterium tuberculosis of ellagic acid derivatives from Ludwigia adscendens and Trewia nudiflora. *In Silico Pharmacology*. 2015,3(1):10. DOI: 10.1186/s40203-015-0014-1.

58. Baptista R, Bhowmick S, Shen J, Mur LAJ. Molecular Docking Suggests the Targets of Anti-Mycobacterial Natural Products. *Molecules*. 2021, 26(2):475. DOI: 10.3390/molecules26020475
59. Venugopala KN et al. Anti-tubercular activity and molecular docking studies of indolizine derivatives targeting mycobacterial InhA enzyme. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2021, 36,1, 1471-1486, DOI: 10.1080/14756366.2021.1919889
60. Richards MR, Lowary TL. Chemistry and Biology of Galactofuranose-Containing Polysaccharides. *ChemBioChem*. 2009, 10, 1920–1938. DOI:10.1002/cbic.200900208
61. Besra GS, Khoo KH, McNeil MR, Dell A, Morris HR, Brennan PJ. A new interpretation of the structure of the mycolyl-arabinogalactan complex of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosylalditol fragments by fast-atom bombardment mass spectrometry and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*. 1995,34, 4257–4266. DOI: 10.1021/bi00013a015
62. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Molecular Microbiology*. 2003, 48(1):77-84. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03425.x
63. Shankar-Sinha S et al 2004. The *Klebsiella pneumoniae* O antigen contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia. *Infection and Immunity Journal*. 721423-1430. DOI: 10.1128/IAI.72.3.1423-1430.2004
64. Besra GS et al. A new interpretation of the structure of the mycolyl-arabinogalactan complex of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosylalditol fragments by fast-atom bombardment mass spectrometry and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*. 1995, 34(13):4257-66. DOI: 10.1021/bi00013a015
65. Wangkanont K, Winton VJ, Forest KT, Kiessling LL. Conformational Control of UDP-Galactopyranose Mutase Inhibition. *Biochemistry*. 2017, 1;56(30):3983-3992. DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00189.

66. Villaume S. et al. Natural and Synthetic Flavonoids as Potent Mycobacterium tuberculosis UGM Inhibitors. *Chemistry*. 2017, 1;23(43):10423-10429. DOI: 10.1002/chem.201701812.
67. Hassan STS, Šudomová M, Berchová-Bímová K, Gowrishankar S, Rengasamy KRR. Antimycobacterial, Enzyme Inhibition, and Molecular Interaction Studies of Psoromic Acid in Mycobacterium tuberculosis: Efficacy and Safety Investigations. *Journal of Clinical Medicine*. 2018, 7(8):226. DOI: 10.3390/jcm7080226
68. Bjorkelid C, Bergfors T, Raichurkar AK, Mukherjee K, Malolanarasimhan K, Bandodkar B, et al. Structural and biochemical characterization of compounds inhibiting Mycobacterium tuberculosis pantothenate kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(25):18260–70. DOI: 10.1074/jbc.M113.476473
69. Reddy BK. Et al. Assessment of Mycobacterium tuberculosis pantothenate kinase vulnerability through target knockdown and mechanistically diverse inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014, 58(6):3312-26. DOI: 10.1128/AAC.00140-14
70. Chiarelli LR et al. A multitarget approach to drug discovery inhibiting Mycobacterium tuberculosis PyrG and PanK. *Scientific Reports*. 2018, 8, 3187. DOI: 10.1038/s41598-018-21614-4
71. Haken H, Wolf HC. Molecular Physics and Elements of Quantum Chemistry. Springer Book. 2004, 2, XXIV, 596. ISBN: 978-3-540-40792-8. DOI:10.1007/978-3-662-08820-3
72. Levine IN. Química Cuántica, 5ta edición, Editorial Prentice Hall, New Jersey, USA, 2001.
73. Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exchange. *Journal of Chemical Physics*. 1993, 98: 5648-5652. DOI: 10.1063/1.464913
74. Kohn W, Sham LJ. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review*. 1965, 140: 1133-1138. DOI: 10.1103/PhysRev.140.A1133
75. Lee TG, Park SC, Kim MS. Reaction dynamics of the four-centered elimination $\text{CH}_2\text{OH}^+ \rightarrow \text{CHO}^+ + \text{H}_2$: Measurement of kinetic energy release distribution and classical trajectory calculation. *Journal of Chemical Physics* s. 1996, 104: 4517-4529. DOI: 10.1063/1.471202

76. Becke D. A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories. *Journal of Chemical Physics*. 1993, 98 (2): 1372–1377. DOI:10.1063/1.464304
77. Austin A, Petersson GA, Frisch MJ, Dobek FJ, Scalmani G, Throssell K. A Density Functional with Spherical Atom Dispersion Terms. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2012 Dec 11;8(12):4989-5007. DOI: 10.1021/ct300778e
78. Chai, J.-D.; Head-Gordon, M. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom–atom dispersion corrections. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2008, 10, 6615. DOI: 10.1039/B810189B
79. Wadt WR, Hay PJ. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi. *Journal of Chemical Physics*. 1985, 91, 82 (1985) 284–298. DOI: 10.1063/1.448800
80. Boys SF, Electronic wave functions - I. A general method of calculation for the stationary states of any molecular system. Proceedings of the Royal Society of London, Series A. 1950, 200, 542–554. DOI: 10.1098/rspa.1950.0036
81. Dunning TH. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. the atoms boron through neon and hydrogen. *Journal of Chemical Physics*. 90(2):1007–1023, 1989. DOI: 10.1063/1.456153
82. Schaefer A, Horn H, Ahlrichs R. Fully optimized contracted Gaussian-basis sets for atoms Li to Kr. *Journal of Chemical Physics*. 97 (1992) 2571-77. DOI: 10.1063/1.463096
83. Schaefer A, Huber C, Ahlrichs A. Fully optimized contracted Gaussian-basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr. *Journal of Chemical Physics*. 100 (1994) 5829-35. DOI: 10.1063/1.467146
84. Weigend F, Ahlrichs A. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 7 (2005) 3297-305. DOI: 10.1039/B508541A
85. Binkley JS, Pople JA, Hehre WJ. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 21. Small Split-Valence Basis Sets for First-Row Elements. *Journal of the American Chemical Society*. 1980, 102:939-947. DOI: 10.1021/ja00523a008
86. Hehre WJ, Ditchfield R, Pople JA. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 12. Further extensions of Gaussian-type basis sets for use in molecular-orbital studies of

- organic-molecules. *Journal of Chemical Physics*. 1972, 56, 2257. DOI: 10.1063/1.1677527
87. Hariharan PC, Pople JA. Influence of polarization functions on molecular-orbital hydrogenation energies. *Theoretica Chimica Acta*. 1973, 28, 213-22. DOI: 10.1007/BF00533485
 88. Raghavachari K. Trucks GW. Highly correlated systems: Excitation energies of first row transition metals Sc-Cu. *Journal of Chemical Physics*. 1989, 91, 1062-65. DOI: 10.1063/1.457230
 89. McLean AD, Chandler GS. Contracted Gaussian-basis sets for molecular calculations. 1. 2nd row atoms, Z=11-18. *Journal of Chemical Physics*. 1980, 72, 5639-48. DOI: 10.1063/1.438980
 90. Ott JB, Boerio-Goates J. *Chemical Thermodynamics: Advanced Applications*. 2000, 1st ed. Academic Press, Utah, U.S.A
 91. Marenich AV, Cramer, CJ, Truhlar DG. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2009, 113, 6378-6396. DOI: 10.1021/jp810292n
 92. Chung LW, Hirao H, Li X, Morokuma K. The ONIOM method: its foundation and applications to metalloenzymes and photobiology. *WIREs Computational Molecular Science*. 2012, 2: 327-350. DOI: 10.1002/wcms.85
 93. Tomasi J, Mennucci B, Cammi R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chemical Reviews*. 2005, 105, 8, 2999–3094. DOI: 10.1021/cr9904009
 94. Barone V, Cossi M. Quantum Calculation of Molecular Energies and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model. *Journal of Physical Chemistry A*. 1998, 102,11, 1995-2001. DOI: 10.1021/jp9716997
 95. Foresman JB, Keith TA, Wiberg KB, Snoonian J, Frisch MJ. Solvent Effects 5. The Influence of Cavity Shape, Truncation of Electrostatics, and Electron Correlation on ab initio Reaction Field Calculations. *The Journal of Physical Chemistry*, 1996, 100, 16098-104. DOI: 10.1021/jp960488j

96. Price DJ, Brooks CL. A modified TIP3P water potential for simulation with Ewald summation. *The Journal of Chemical Physics*. 2004, 121 (20), 10096–10103. DOI: 10.1063/1.1808117
97. Berendsen HJC, Grigera JR, Straatsma TP. The missing term in effective pair potentials. *The Journal of Physical Chemistry*. 1987, 91, (24), 6269-6271. DOI: 10.1021/j100308a038
98. Dapprich S, Komaromi I, Byun KS, Morokuma K, Frisch MJ. A new ONIOM implementation in Gaussian98. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatives". *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 1999, 461–462: 1–21. DOI:10.1016/S0166-1280(98)00475-8
99. Domingo LR, Ríos-Gutiérrez M, Pérez, P. Applications of the Conceptual Density Functional Theory Indices to Organic Chemistry Reactivity. *Molecules*. 2016, 9, 21(6), 748. DOI: 10.3390/molecules21060748
100. Koopmans T. Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms. *Physica*. 1934, 1, 1-6, 104-113. DOI: 10.1016/S0031-8914(34)90011-2
101. Bader, R.F.W. Atoms in Molecules. *Accounts of Chemical Research*. 1985, 18, 1, 9–15. DOI: 10.1021/ar00109a003
102. Popelier PLA, Aicken FM, O'Brien SE. *Chemical Modelling: Applications and Theory*. 2000, 1, 143-198. Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK. SPR Chemical Modeling.
103. Durand-Niconoff JS, Ortiz-Blanco E, Sosa-Ortiz G, Olivares-Romero JL, Juárez-Aguilar E, Montoya-Hernández EL, Fernández-Pomares C, Tovar-Miranda R, Castro ME, Melendez FJ, Guerrero T. Mannich bases of hydroxycoumarins: synthesis, DFT/QTAIM computational study and assessment of biological activity. *RCS Advances*. 2021, 11,50, 31260-31271. DOI: 10.1039/D1RA04611J
104. Rangel-Galván M, Castro ME, Perez-Aguilar JM, Caballero NA, Melendez FJ. Conceptual DFT, QTAIM, and Molecular Docking Approaches to Characterize the T-Type Calcium Channel Blocker Anandamide. *Frontiers in Chemistry*. 2022, 10, 2296-2646. DOI: 10.3389/fchem.2022.920661

105. Morris GM, Lim-Wilby M. Molecular docking. *Methods Molecular Biology*. 2008, 443:365-82. DOI: 10.1007/978-1-59745-177-2_19
106. Ballon Paucara WG, Grados Torrez RE. Acoplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista CON-CIENCIA*. 2019,7,2,55-72. Disponible en línea: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652019000200006&lng=es&nrm=iso (último acceso:28 marzo 2023)
107. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*. 2009,30(16), 2785-2791. DOI: 10.1002/jcc.21256
108. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic J J, Mainz DT, Repasky MP, Knoll EH, Shaw DE, Shelley M, Perry JK, Francis P, Shenkin PS, Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004, 47, 1739–1749. DOI: 10.1021/jm0306430
109. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 2010, 31, 455-461. DOI: 10.1002/jcc.21334
110. Genheden S, Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2015, 10(5):449-61. DOI: 10.1517/17460441.2015.1032936.
111. Halgren TA. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*. 1996, 17: 490-519. DOI: 10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P
112. Dennington R, Keith T, Millam J. GMMX. GaussView, Version 6.0. Semichem Inc. 2019. Shawnee Mission, KS. Disponible en línea: <https://gaussian.com/gmmxprod/> (accessed on 4 enero 2023).
113. Dennington R, Keith T, Millam J. GaussView, Version 6.0. Semichem Inc. 2019. Shawnee Mission, KS.

114. McLean AD. Contracted Gaussian basis sets for molecular calculations. I. Second row atoms, $Z=11-18$. *Journal of Chemical Physics*. 1980, 72, 5639. DOI: 10.1063/1.438980
115. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, et al. Gaussian 16. Revision A.03; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2016.
116. Solvents List SCRF. Gaussian. Disponible en línea: <http://gaussian.com/scrf/?tabid=7> (último acceso 20 de junio de 2023)
117. Weigend F, Ahlrichs R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2005, 7, 3297-3305. DOI: 10.1039/B508541A
118. Weigend F. Accurate Coulomb-fitting basis sets for H to Rn. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2006, 8, 1057. DOI: 10.1039/B515623H
119. Pantazis D, Neese F. All-electron scalar relativistic basis sets for the 6p elements. *Theoretical Chemistry Accounts*. 2012,131, 1292. DOI: 10.1007/s00214-012-1292-x
120. Bannwarth C, Ehlert S, Grimme S. GFN2-xTB—An Accurate and Broadly Parametrized Self-Consistent Tight-Binding Quantum Chemical Method with Multipole Electrostatics and Density-Dependent Dispersion Contributions. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2019, 15, 3, 1652–1671 DOI: 10.1021/acs.jctc.8b01176
121. Castro ME, Rangel-Galván M, Morales Dávila E, Caballero NA, Melendez FJ. Theoretical NMR and IR spectroscopic analyses of the preferred conformers of the neurotransmitter anandamide. *International Journal of Quantum Chemistry*. 2023, 123(11), e27098. DOI: 10.1002/qua.27098
122. Hruska E, Gale A, Huang X, Liu F. AutoSolvate: A Toolkit for Automating Quantum Chemistry Design and Discovery of Solvated Molecules. *Journal of Chemical Physics*. 2022, 156, 124801
123. Neese F, Wennmohs F, Becker U, Riplinger C. The ORCA quantum chemistry program package. *The journal of chemical physics*. 2020, 1 52(22):224108. DOI: 10.1063/5.0004608

124. Andrienko GA. Chemcraft—Graphical Program for Visualization of Quantum Chemistry Computations, Version 1.8; 2016. Available online: <http://www.chemcraftprog.com> (accessed on 10 March 2023).
125. Humphrey W, Dalke, A.; Schulten, K. VMD-Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics.* 1996, 14, 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
126. Tod AK. 2017, AIMAll Version 17.11.14, TK Gristmill Software, Overland Park KS, USA (aim.tkgristmill.com). Available online: aim.tkgristmill.com (último acceso: 4 de enero de 2023)
127. Wolinski K, Hilton JF, Pulay P. Efficient implementation of the gauge-independent atomic orbital method for NMR chemical shift calculations. *Journal of American Chemical Society*, 1990, 112, 8251–8260. DOI: 10.1021/ja00179a005.
128. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank *Nucleic Acids Research*. 2000, 28: 235-242.
129. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*. 2004, 25(13):1605-12. Disponible en línea: www.rbvi.ucsf.edu/chimera (último acceso: 17 de febrero de 2023)
130. Rozwarski DA, Vilchèze C, Sugantino M, BittmanR, Sacchettini JC. Crystal Structure of the Mycobacterium tuberculosis Enoyl-ACP Reductase, InhA, in Complex with NAD⁺ and a C16 Fatty Acyl Substrate. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274, 22, 15582-15589. DOI: 10.1074/jbc.274.22.15582.
131. Van Straaten KE, Kuttiyatveetil JRA, Sevrain CM, Villaume SA, Jiménez-Barbero J, Linclau B, Vincent SP, Sanders DAR. Structural Basis of Ligand Binding to UDP-Galactopyranose Mutase from Mycobacterium tuberculosis Using Substrate and Tetrafluorinated Substrate Analogues. *Journal of the American Chemical Society*. 2015, 137, 1230–1244.
132. BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio Visualizer, v21.1.0.20298, San Diego: Dassault Systèmes, 2021.
133. Maestro, version 11.8. Schrödinger, LLC, New York. Disponible en línea: www.schrodinger.com/maestro (último acceso: 17 de febrero de 2023)

134. Li J, Abel R, Zhu K, Cao Y, Zhao S, Friesner, RA. The VSGB 2.0 model: A next generation energy model for high resolution protein structure modeling. *Proteins*. 2011, 79: 2794-2812. DOI: 10.1002/prot.23106
135. McDonagh AF, Lightner DA. Influence of Conformation and Intramolecular Hydrogen Bonding on the Acyl Glucuronidation and Biliary Excretion of Acetylenic Bis-Dipyrrinones Related to Bilirubin. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2007, 50, 3, 480–488. DOI:10.1021/jm060952.
136. Giordanetto F, Tyrchan C, Ulander J. Intramolecular Hydrogen Bond Expectations in Medicinal Chemistry. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2017, 8, 2, 139–142. DOI:10.1021/acsmchemlett.7b00002
137. Fuster F, Grabowski SJ. Intramolecular Hydrogen Bonds: the QTAIM and ELF Characteristics. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2011, 115 (35), 10078-10086. DOI: 10.1021/jp205685
138. Grabowski SJ. What Is the Covalency of Hydrogen Bonding? *Chemical Reviews*. 2011, 13;111(4):2597-625. DOI: 10.1021/cr800346f.
139. Duarte DJR, Angelina EL, Peruchena NM. Physical meaning of the QTAIM topological parameters in hydrogen bonding. *Journal of Molecular Modeling*. 2014, 20, 2510. DOI: 10.1007/s00894-014-2510-3
140. Rozas I, Alkorta I, Elguero J. Behavior of Ylides Containing N, O, and C Atoms as Hydrogen Bond Acceptors. *Journal of the American Chemical Society*. 2000, 122 (45), 11154-11161. DOI: 10.1021/ja0017864
141. Grabowski SJ. Theoretical studies of strong hydrogen bonds. *Annual Reports Section "C" (Physical Chemistry)*. 2006, 102, 131-165. DOI: 10.1039/B417200K
142. MacLeod JM, Rosei F. 3.02 – Directed Assembly of Nanostructures. *Comprehensive Nanoscience and Technology*, Academic Press, 2011, 13-68. DOI: 10.1016/B978-0-12-374396-1.00098-2.
143. Castro Sánchez ME, Noriega L, Perez-Aguilar JM, Caballero-Concha NA, Merino-Montiel P, Romero López A, Melendez Bustamante FJ. *In Advances in Green and Sustainable Chemistry. Green Chemistry and Computational Chemistry: Shared Lessons in Sustainability*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2022; 8, 193–214. DOI: 10.1016/B978-0-12-819879-7.00008-8.

144. Joshi S, More U, Sorathiya S, Koli D, Aminabhavi T. Pyrrolyl thiazoles as Mycobacterium tuberculosis inhibitors and their in silico analyses. *Research and Reports in Medicinal Chemistry*. 2015, 5:1-20 DOI: 10.2147/RRMC.S80395
145. Soutter HH, Centrella P, Clark MA, Cuzzo JW, Dumelin CE, Guie MA, Habeshian S, Keefe AD, Kennedy KM, Sigel EA, Troast DM, Zhang Y, Ferguson AD, Davies G, Stead ER, Breed J, Madhavapeddi P, Read JA. Discovery of cofactor-specific, bactericidal Mycobacterium tuberculosis InhA inhibitors using DNA-encoded library technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016, 113(49):E7880-E7889. DOI: 10.1073/pnas.1610978113.
146. Shi Y, Colombo C, Kuttiyatveetil, JRA, Zalatar N, van Straaten KE, Mohan S, Sanders DAR, Pinto BM. A Second, Druggable Binding Site in UDP-Galactopyranose Mutase from Mycobacterium tuberculosis? *ChemBioChem*. 2016, 17, 2264. DOI: 10.1002/cbic.201600469
147. Chetnani B, Kumar P, Surolia A, Vijayan M. M. tuberculosis Pantothenate Kinase: Dual Substrate Specificity and Unusual Changes in Ligand Locations. *Journal of Molecular Biology*. 2010, 400, 2, 171-185. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.04.064.
148. Prime, version 3.1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012
149. Suryatin Alim G, Iwatani T, Okano K, Kitani S, Honda K. In Vitro Production of Coenzyme A Using Thermophilic Enzymes. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 2021, 25;87(14):e0054121. DOI: 10.1128/AEM.00541-21.
150. Shimizu S, Katsuro K, Tani Y, Ogata K. Purification and Properties of Pantothenate Kinase from B-evibaclerizt.nz ammolziagenes IFO 12071. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1973, 37(12), 2863-2870
151. Beis K, Srikannathasan V, Liu H, Fullerton SWB, Bamford VA, Sanders DAR, Whitfield C, McNeil MR, Naismith JH. Crystal Structures of Mycobacteria tuberculosis and Klebsiella pneumoniae UDP-Galactopyranose Mutase in the Oxidised State and Klebsiella pneumoniae UDP-Galactopyranose Mutase in the (Active) Reduced State. *Journal of Molecular Biology*. 2005, 348, 4, 971-982. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.02.057.
152. Oppenheimer M, Valenciano AL, Sobrado P. Isolation and characterization of functional Leishmania major virulence factor UDP-galactopyranose mutase.

Biochemical and Biophysical Research Communications. 2011,407,3,552-556. DOI:
10.1016/j.bbrc.2011.03.057.

ANEXOS

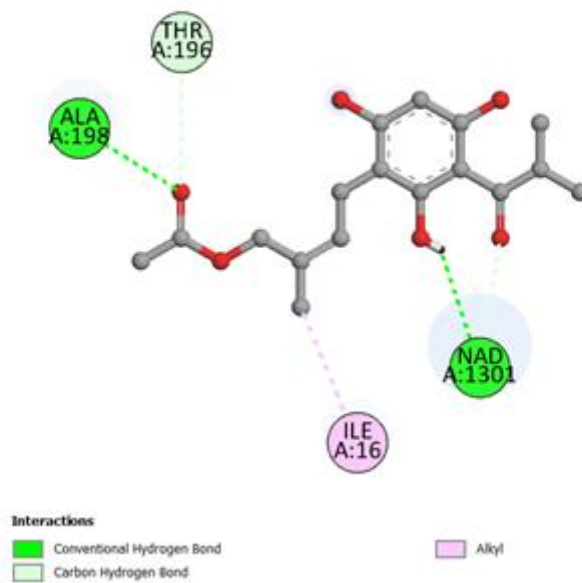
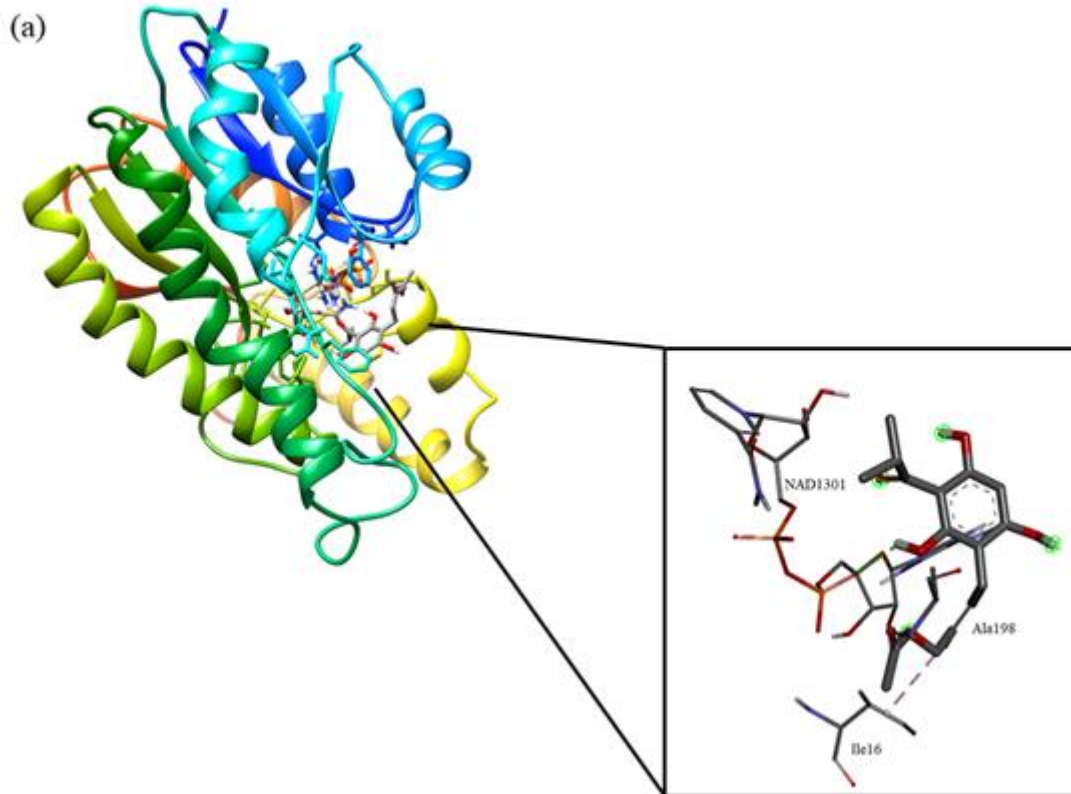
ANEXO A. Acoplamiento semiflexible en AutoDock Vina

A.1. Acoplamiento semiflexible con la enzima InhA

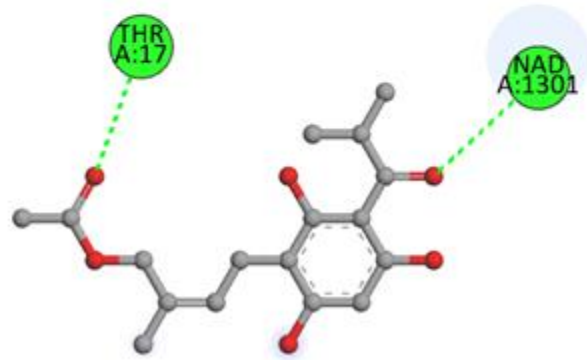
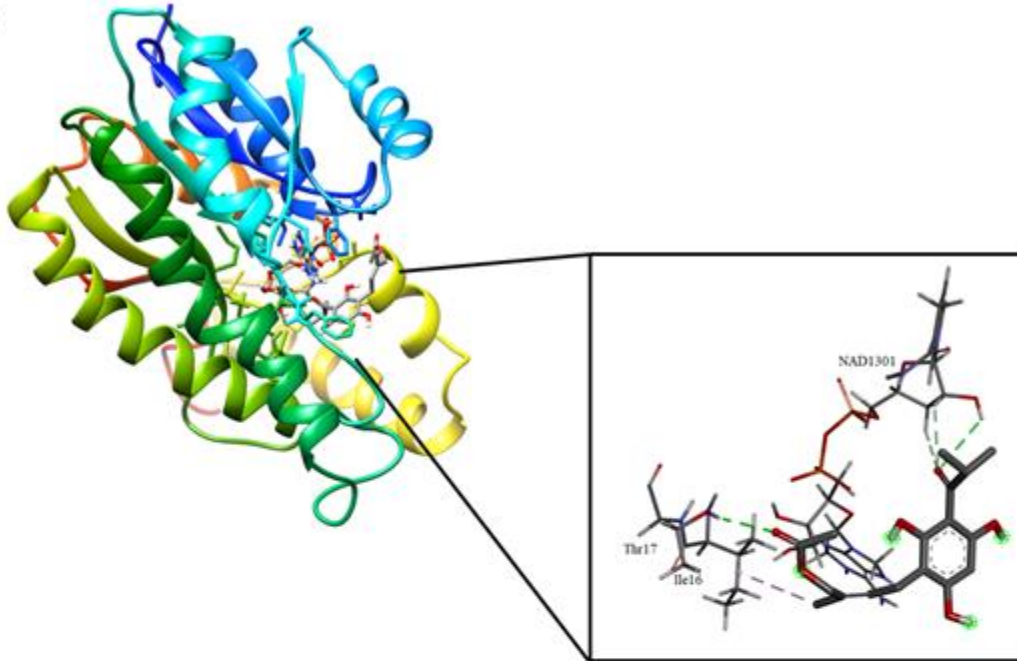
En la Tabla A1 se observan las interacciones principales de la molécula caespitato en fase gas y en los diferentes disolventes: agua, cloroformo, acetonitrilo y DMSO con la enzima InhA. Además, se reportan los valores de energía de afinidad en kcal mol⁻¹. En la Tabla A1 y en la Figura A1, en los complejos InhA-G1s, InhA-A1s, InhA-C1s, InhA-Ac1s e InhA-D1s, las etiquetas G1, A1, C1, Ac1 y D1 se refieren a los conformeros optimizados más estables en cada fase y la letra s se refiere al acoplamiento semiflexible. En el caso del acoplamiento semiflexible, las energías de afinidad están en el intervalo de -5.7 a -6.5 kcal mol⁻¹ para todos los complejos con el ligante. En la Figura A1 se observan las interacciones del acoplamiento semiflexible de los complejos con la enzima InhA. En los complejos InhA-G1s y InhA-A1s se observa la interacción de puente de hidrógeno con el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), mientras que InhA-C1s, además de tener interacción con NAD vía puente de hidrógeno, también presenta interacciones de enlace C-H y π -catión. InhA-D1s tiene interacciones con NAD del tipo enlace C-H y una interacción desfavorable donador-donador. La interacción con el residuo Ala198 se observa en los complejos InhA-G1s con interacción de puente de hidrógeno, InhA-C1s e InhA-D1s con interacción π -alquilo, e InhA-Ac1s con interacción tipo alquilo. El residuo Ala198 tiene participación en la estabilización de intermediarios y pertenece al bucle de unión al sustrato que se encuentra en el sitio activo de la enzima. En el complejo InhA-A1s no se observaron interacciones con aminoácidos importantes de la enzima InhA. En InhA-C1s e InhA-D1s, se observa la interacción vía puente de hidrógeno con el residuo Tyr158. Esta interacción importante ya que el aminoácido Tyr158 pertenece a la tríada catalítica (Phe149, Tyr158 y Lys165), además está involucrado en la interacción de InhA y con su sustrato natural. Finalmente, se observa que en InhA-G1s, InhA-A1s, InhA-C1s e InhA-D1s no se conserva ningún IHB, mientras que en InhA-Ac1s se forma un segundo IHB, O41...H13, mientras que el primer IHB de la conformación inicial (O15...H13) no se conserva.

Tabla A1. Energías de afinidad (kcal mol⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular semiflexible en AutoDock Vina de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima InhA.

Medio	Complejo	Energía de afinidad	Conservación de IHBs	Aminoácidos	Tipo de interacción
Fase gas	InhA-G1s	-5.9	Ninguno	Ala198	Puente de hidrógeno
				NAD1301	Puente de hidrógeno
Agua	InhA-A1s	-5.8	Ninguno	NAD1301	Puente de hidrógeno
Cloroformo	InhA-C1s	-6.4	Ninguno	NAD1301 Tyr158 Ala198	Puente de hidrógeno, Enlace C-H y π - cación Puente de hidrógeno π -alquilo
Acetonitrilo	InhA-Ac1s	-5.7	2do IHB	Ala198	Alquilo
DMSO	InhA-D1s	-6.5	Ninguno	Tyr158 Ala198 NAD1301	Puente de hidrógeno π -alquilo Enlace C-H y Desfavorable Donador-Donador



(b)

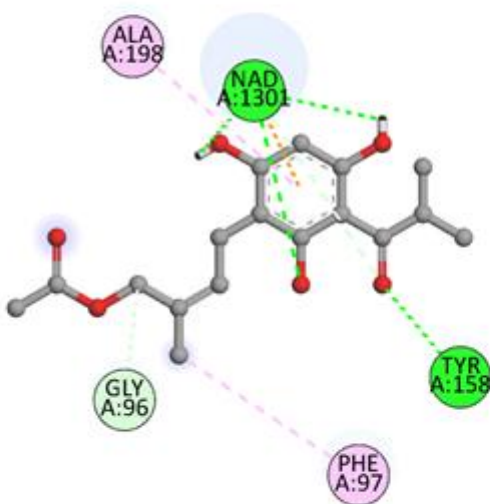
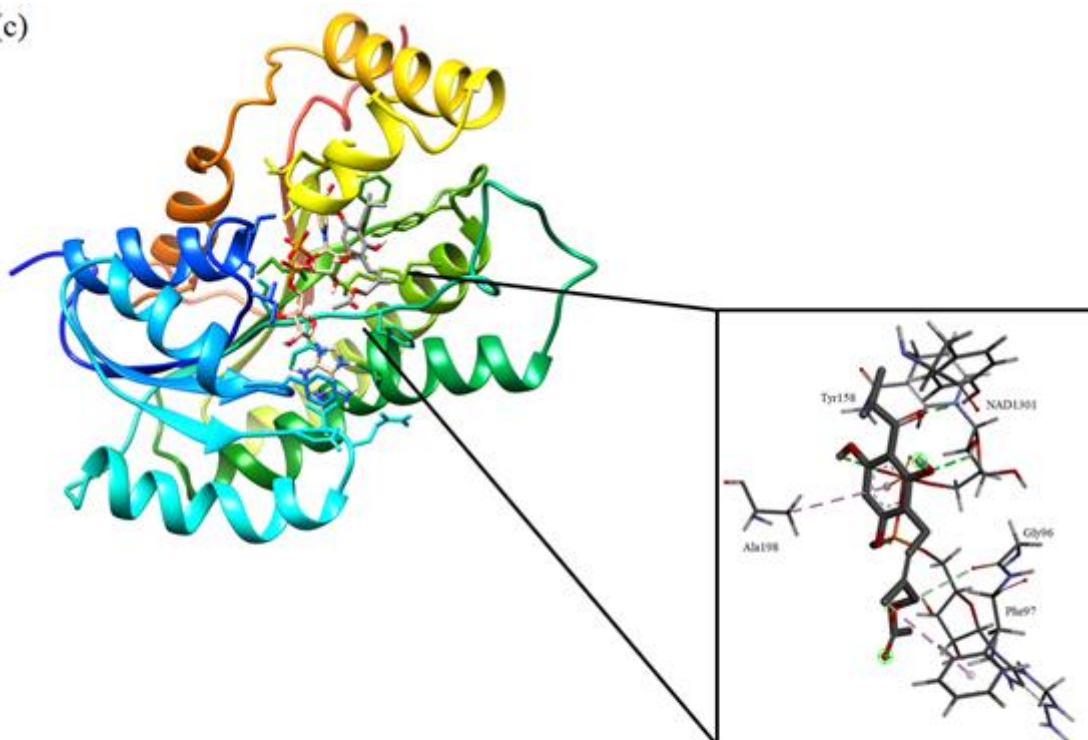


Interactions

Conventional Hydrogen Bond

Carbon Hydrogen Bond

(c)

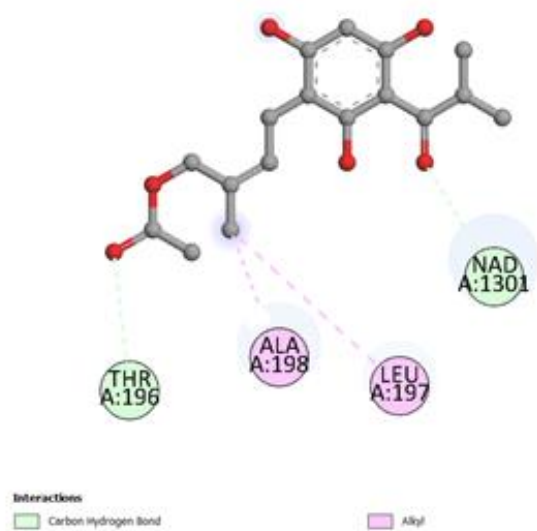
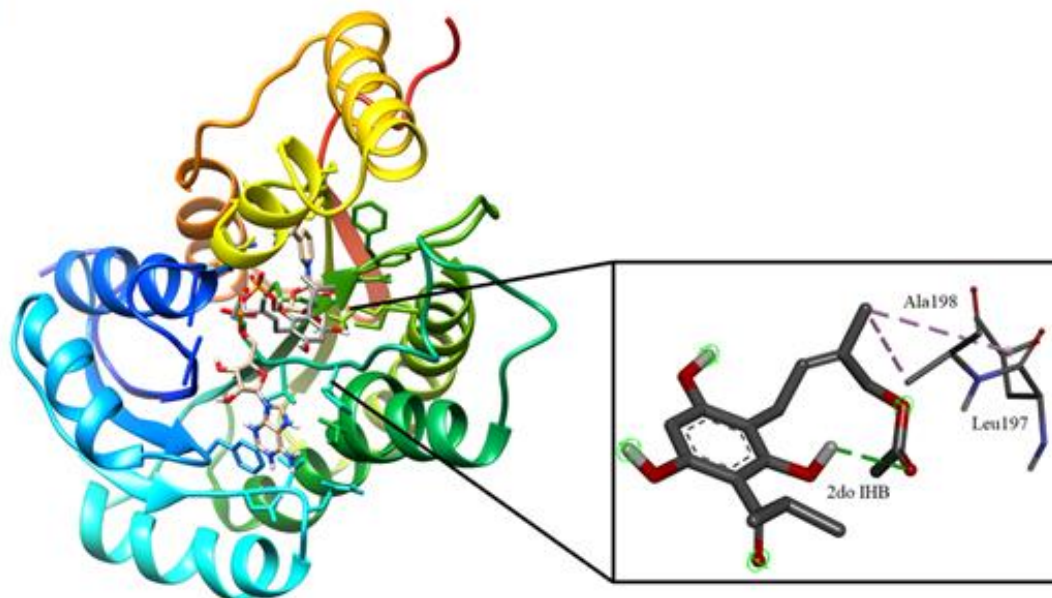


Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond

- Pi-Cation
- Pi-Allyl

(d)



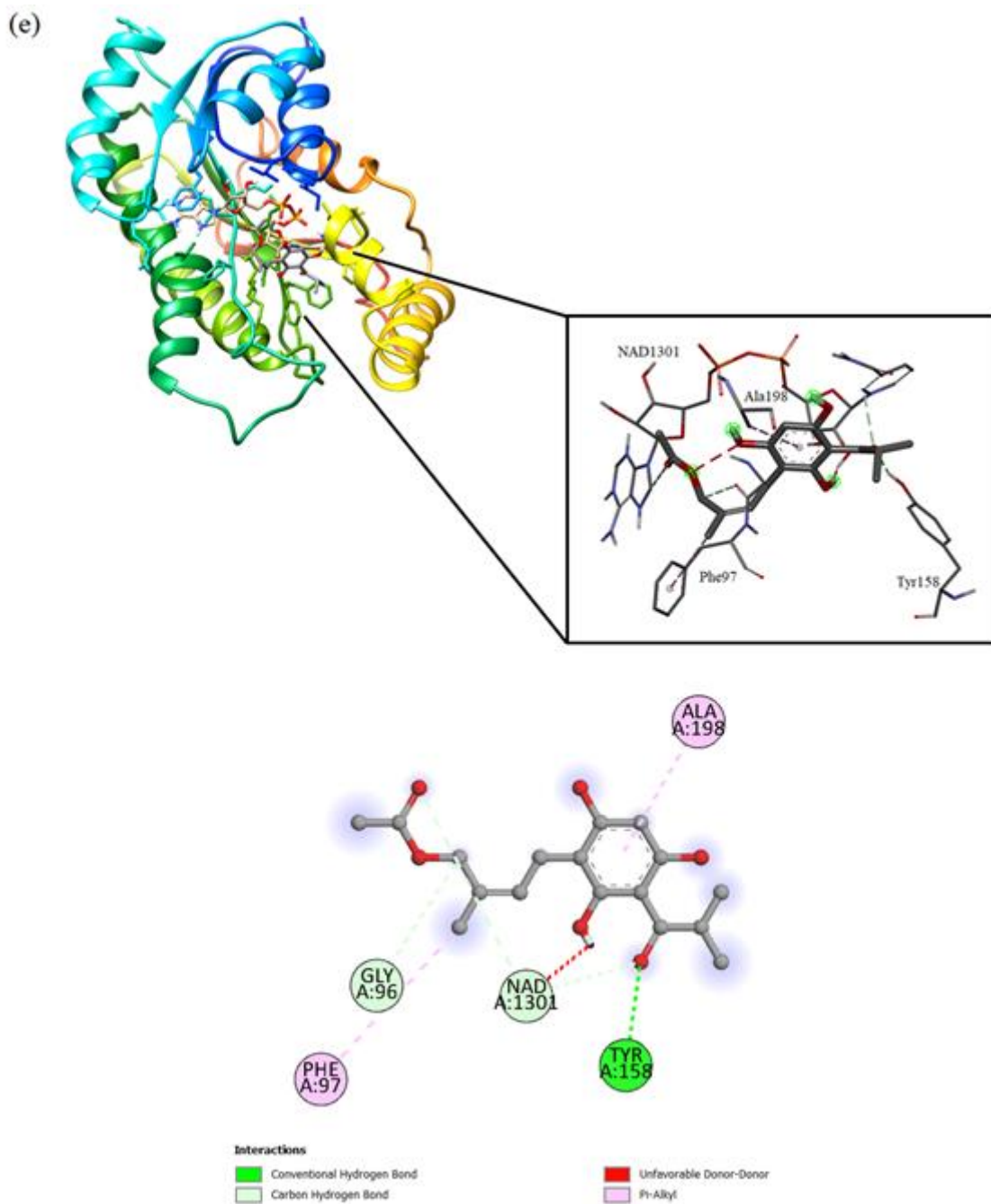


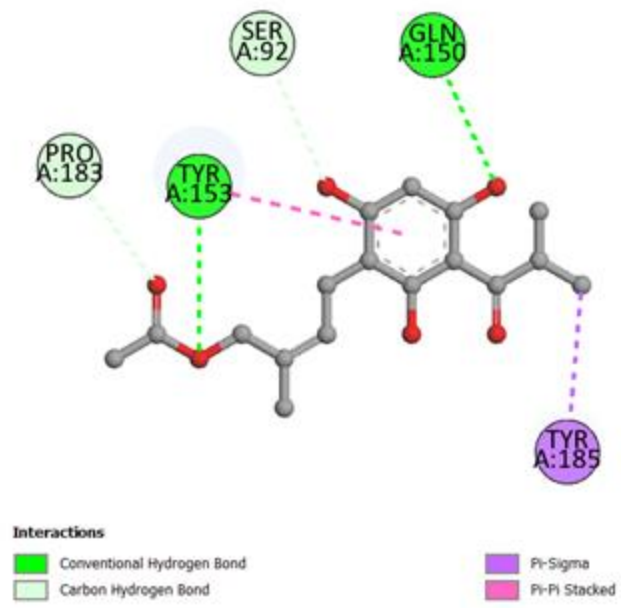
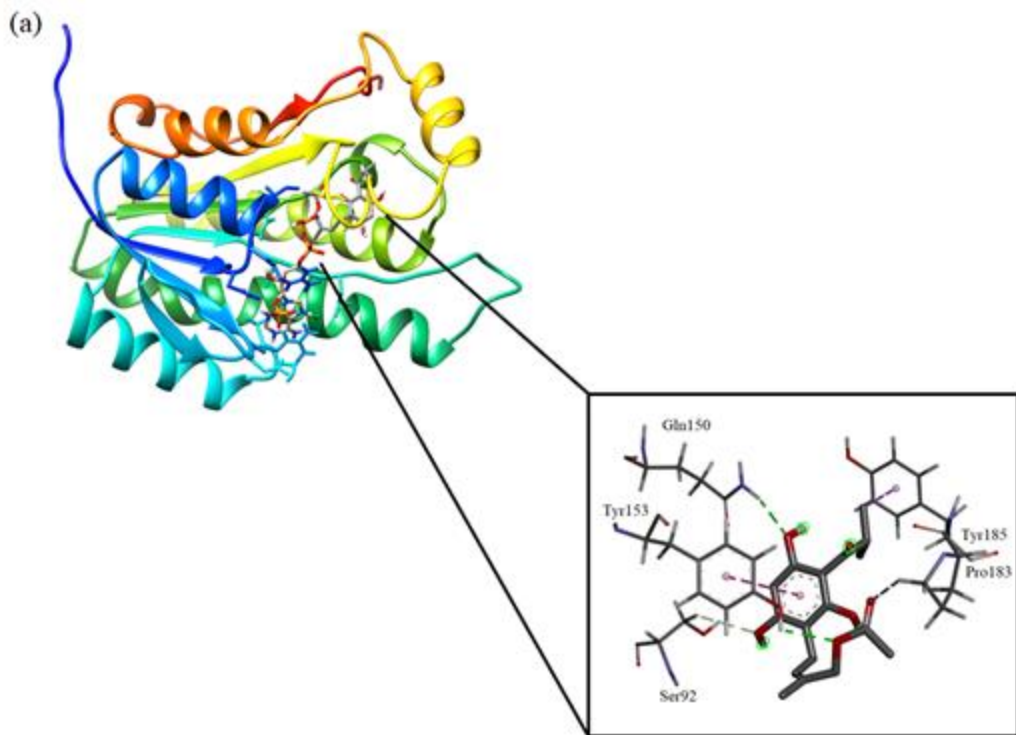
Figura A1. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular semiflexible en AutoDock Vina de los complejos de la enzima InhA con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) InhA-G1s, (b) InhA-A1s, (c) InhA-C1s, (d) InhA-Ac1s y (e) InhA-D1s.

A.2. Acoplamiento semiflexible con la enzima MabA

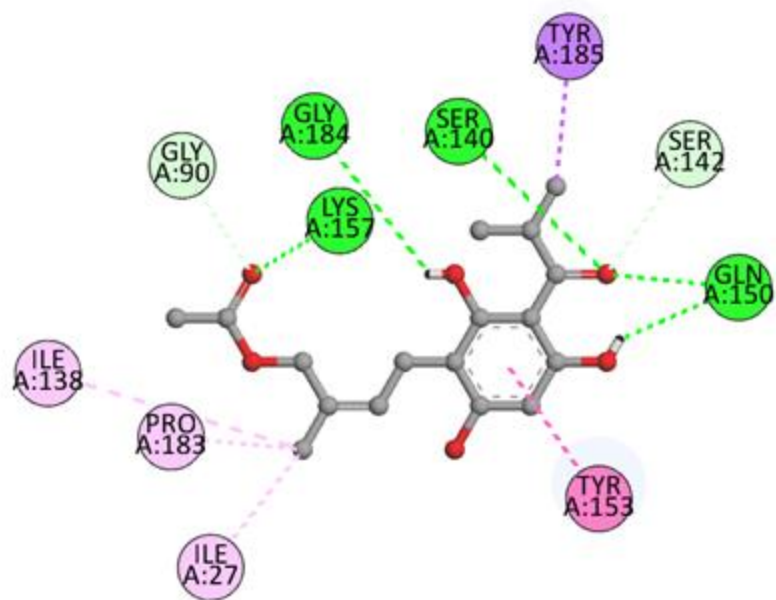
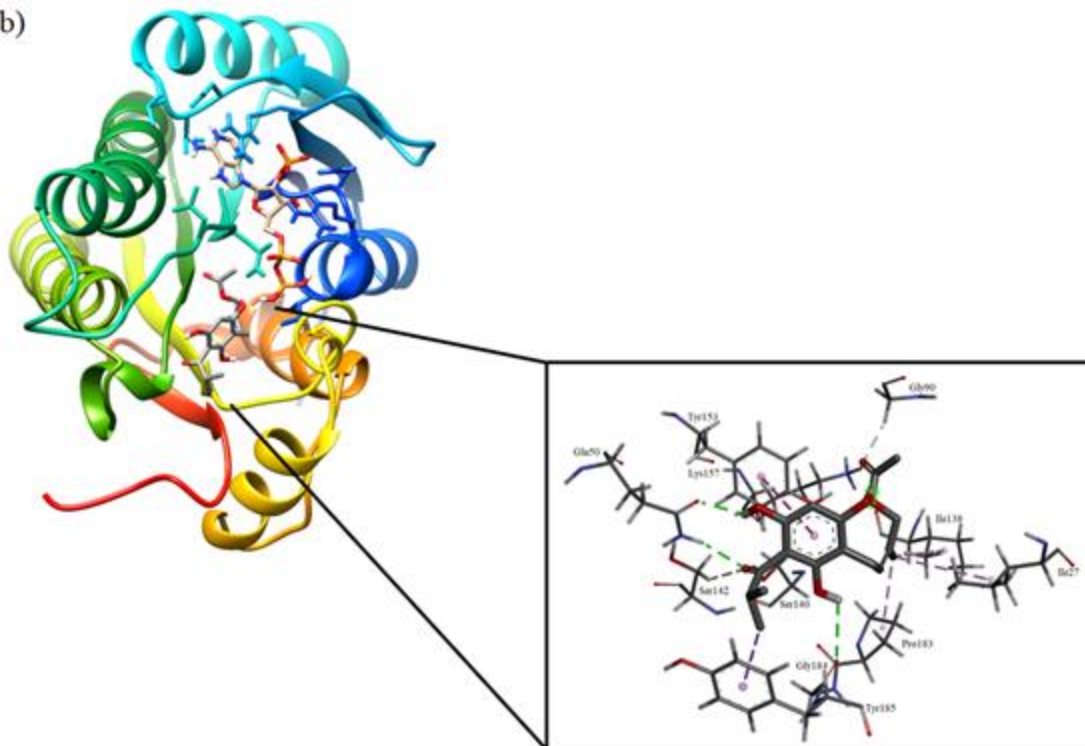
En la Tabla A2 se muestran las interacciones principales y los valores de energía de afinidad en kcal mol⁻¹ en fase gas y en los diferentes disolventes con la enzima MabA. En el caso del acoplamiento semiflexible, las energías de afinidad están en el intervalo de -7.0 a -7.3 kcal mol⁻¹ para todos los complejos receptor-ligante con MabA. En la Figura A2 se observan las interacciones del acoplamiento semiflexible de los complejos con la enzima MabA. En los complejos MabA-G1s y MabA-D1s se observa la interacción vía puente de hidrógeno con el residuo Tyr153, mientras que en los complejos MabA-C1s y MabA-Ac1s además de mostrar esta interacción vía puente de hidrógeno, muestran una interacción de apilamiento π - π con este mismo residuo. MabA-A1s solo presenta la interacción de apilamiento π - π con el residuo Tyr153. El residuo Tyr153 pertenece a la tríada catalítica [51] y tiene participación en la catálisis ácido-base de la enzima. En MabA-A1s y MabA-D1s se observan las interacciones de puente de hidrógeno con los residuos Ser140 y Lys157. Los residuos Ser140 y Lys157 también pertenecen a la tríada catalítica (Tyr153, Ser140 y Lys157) y desempeñan un papel importante en los procesos de la catálisis ácido-base de la enzima MabA. El complejo MabA-D1s muestra interacción con el cofactor NAP vía enlace C-H y una interacción desfavorable donador-donador, respectivamente. Además, los ligantes de caespitato en todos los complejos con MabA no conservan ningún IHB en su estructura.

Tabla A2. Energías de afinidad (kcal mol⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular semiflexible en AutoDock Vina de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima MabA.

Medio	Complejo	Energía de afinidad	Conservación de IHBs	Aminoácidos	Tipo de interacción
Fase gas	MabA-G1s	-7.0	Ninguno	Tyr153	Puente de hidrógeno
Agua	MabA-A1s	-7.3	Ninguno	Ser140 Tyr153 Lys157	Puente de hidrógeno Apilamiento π - π Puente de hidrógeno
Cloroformo	MabA-C1s	-7.0	Ninguno	Tyr153	Puente de hidrógeno y Apilamiento π - π
Acetonitrilo	MabA-Ac1s	-7.0	Ninguno	Tyr153	Puente de hidrógeno y Apilamiento π - π
DMSO	MabA-D1s	-7.2	Ninguno	Ser140 Tyr153 Lys157 NAP1249	Puente de hidrógeno Puente de hidrógeno Puente de hidrógeno Enlace C-H y Desfavorable Donador-Donador



(b)

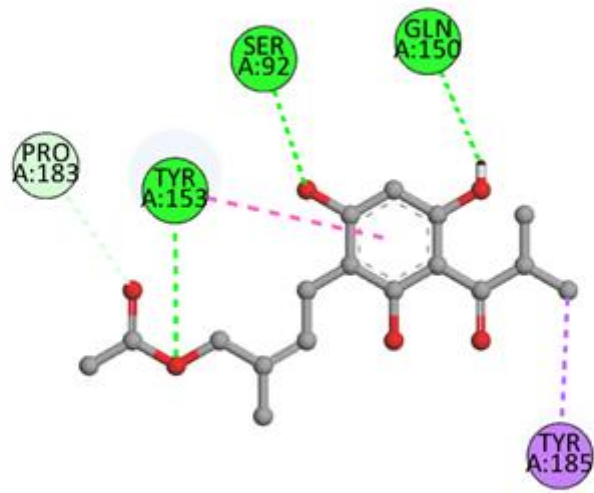
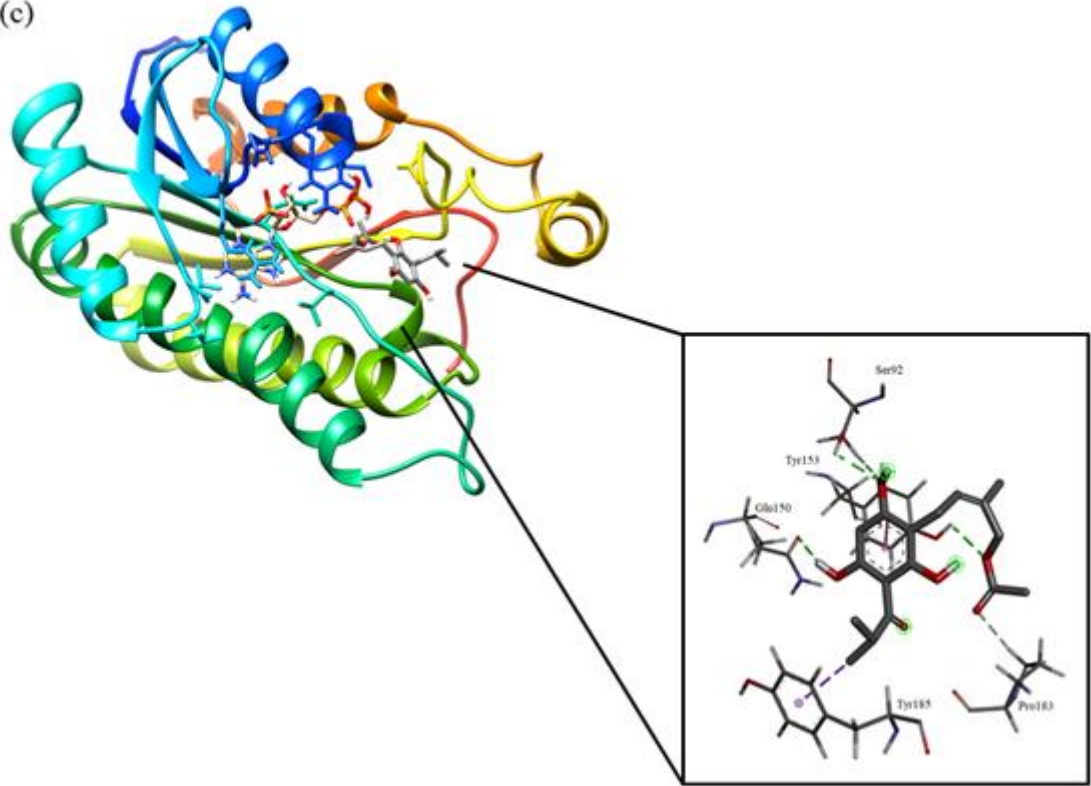


Interactions



- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Pi-Sigma

- Pi-Pi Stacked
- Alkyl

(c)

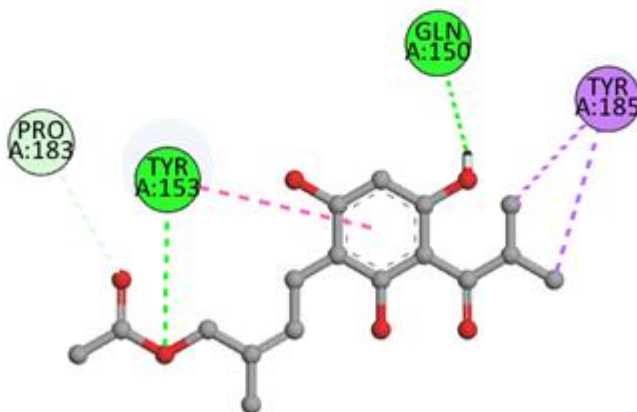
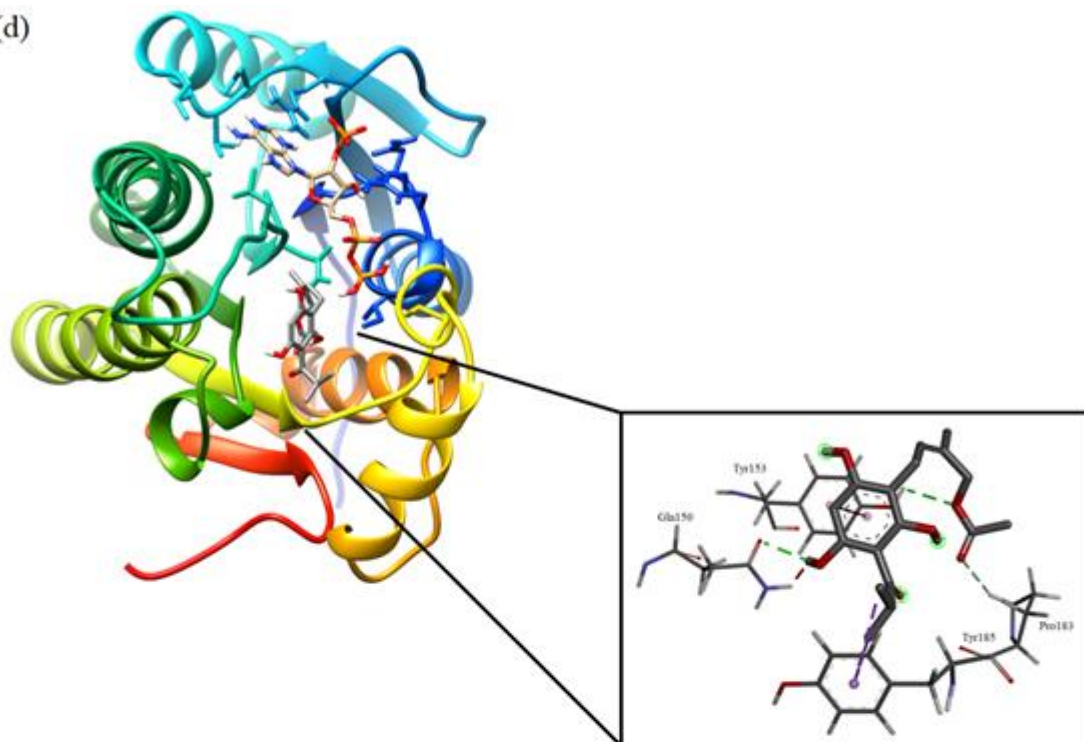


Interactions

-  Conventional Hydrogen Bond
-  Carbon Hydrogen Bond

-  Pi-Sigma
-  Pi-Pi Stacked

(d)



Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Unfavorable Donor-Donor

- Pi-Sigma
- Pi-Pi Stacked

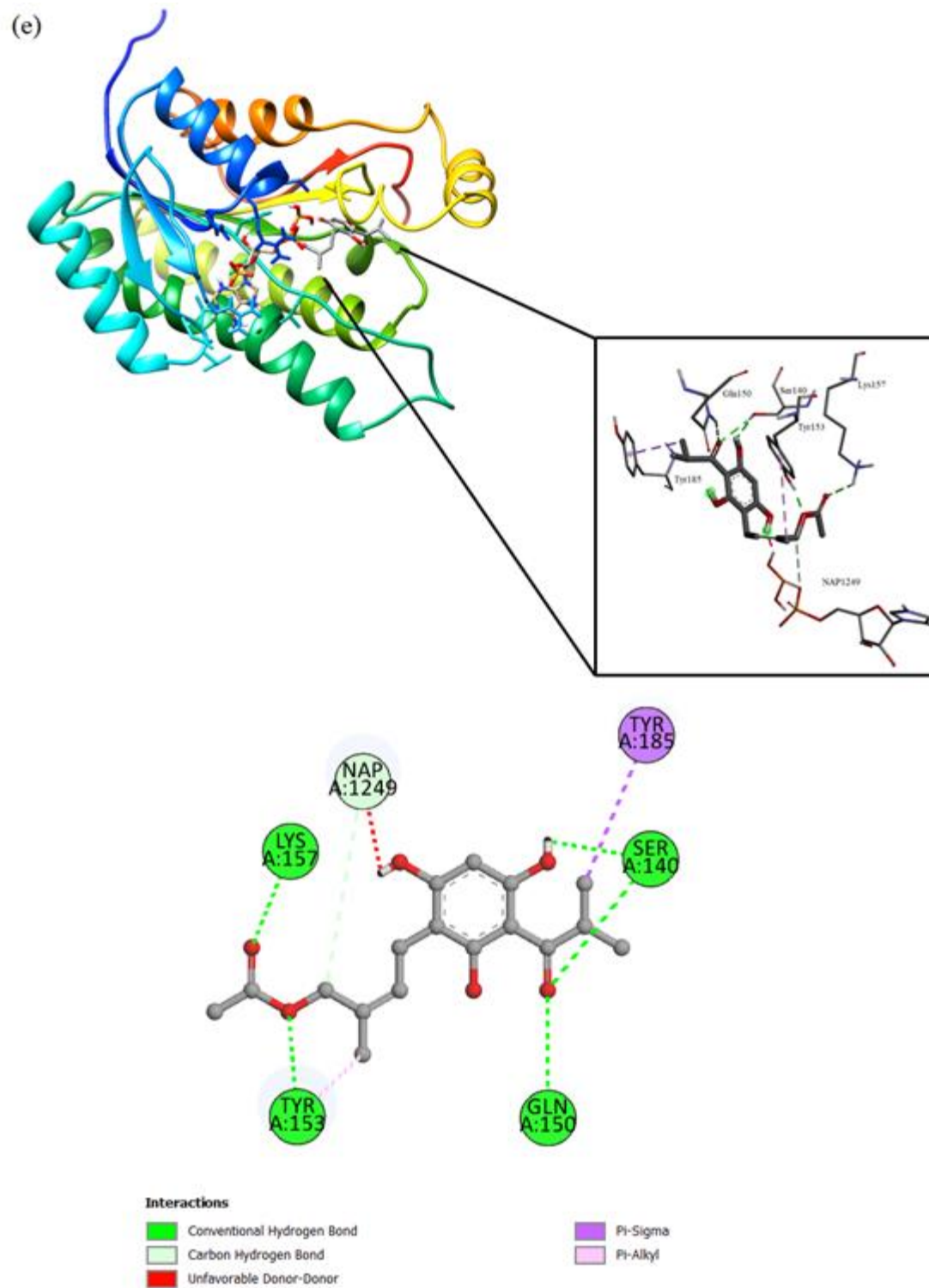


Figura A2. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular semiflexible en AutoDock Vina de los complejos de la enzima MabA con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) MabA-G1s, (b) MabA-A1s, (c) MabA-C1s, (d) MabA-Ac1s y (e) MabA-D1s.

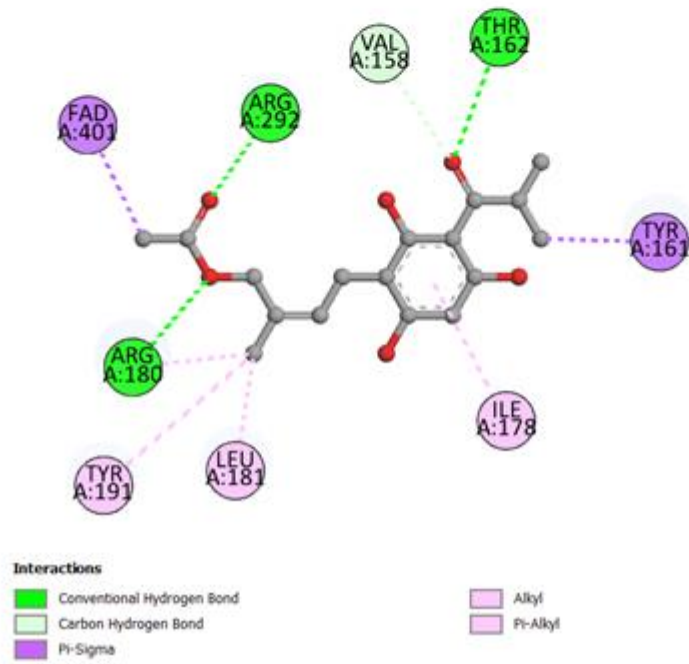
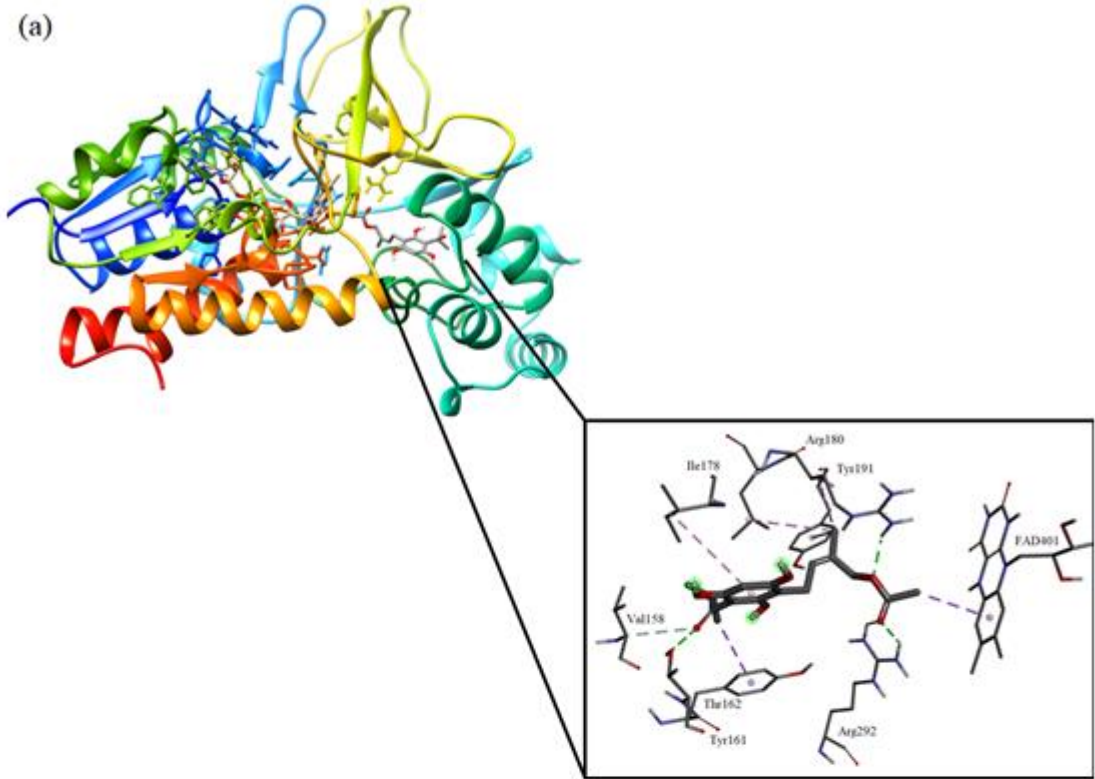
A.3. Acoplamiento semiflexible con la enzima UGM

En la Tabla A3 se muestran las interacciones principales y los valores de energía de afinidad en kcal mol⁻¹ en fase gas y en los diferentes disolventes con la enzima UGM. En el caso del acoplamiento semiflexible, las energías de afinidad son muy similares para cada complejo y están en el intervalo de -8.7 a -8.9 kcal mol⁻¹. En la Figura A3 se observan las interacciones del acoplamiento semiflexible de los complejos con la enzima UGM. En los complejos UGM-G1s, UGM-Ac1s y UGM-D1s se observan las interacciones vía puente de hidrógeno y alquilo con el residuo Arg180, mientras que en el complejo UGM-C1s se observa únicamente la interacción vía puente de hidrógeno con este residuo. El residuo Arg180 participa en la catálisis de UGM. Por otro lado, todos los complejos muestran una interacción vía π - σ con el cofactor FAD. También se observa la interacción vía puente de hidrógeno con el residuo Tyr366 con el UGM-C1s. El residuo Tyr366 es crucial para la estabilización del grupo β -fosfato del sustrato UDP. Con respecto a los IHB, los complejos no conservan ningún IHB, a excepción del complejo UGM-C1s que forma un nuevo primer IHB con O15...H11 y no conserva sus dos IHB de la conformación inicial (O15...H13 y O41...H9).

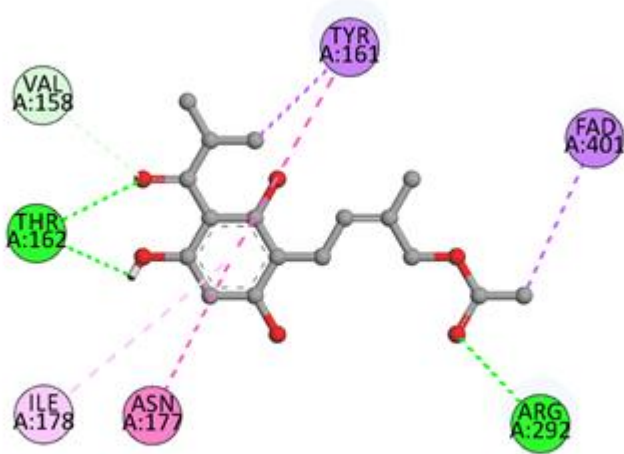
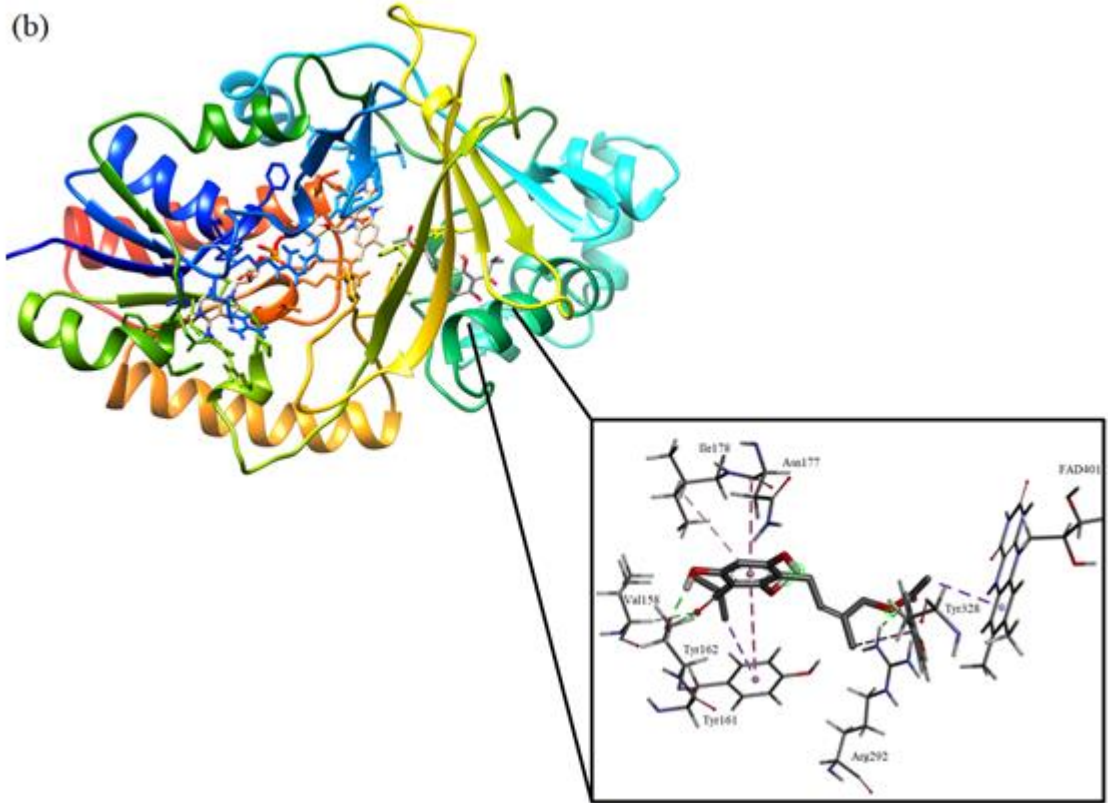
Tabla A3. Energías de afinidad (kcal mol⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular semiflexible en AutoDock Vina de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima UGM.

Medio	Complejo	Energía de afinidad	Conservación de IHBs	Aminoácidos	Tipo de interacción
Fase gas	UGM-G1s	-8.7	Ninguno	Arg180 FAD401	Puente de hidrógeno y π -alquilo π - σ
Agua	UGM-A1s	-8.9	Ninguno	FAD401	π - σ
Cloroformo	UGM-C1s	-8.7	1er IHB	Arg180 Tyr366 FAD401	Puente de hidrógeno Puente de hidrógeno π - σ
Acetonitrilo	UGM-Ac1s	-8.8	Ninguno	Arg180 FAD401	Puente de hidrógeno y alquilo π - σ
DMSO	UGM-D1s	-8.8	Ninguno	Arg180 FAD401	Puente de hidrógeno y alquilo π - σ

(a)



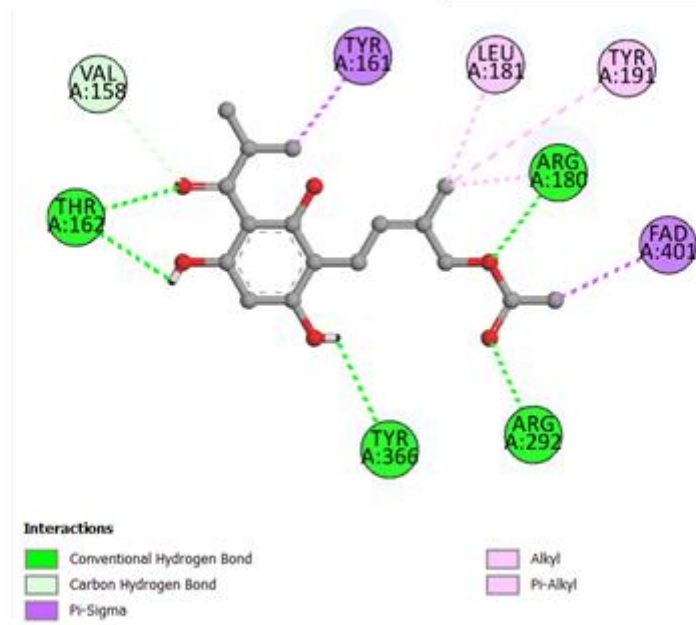
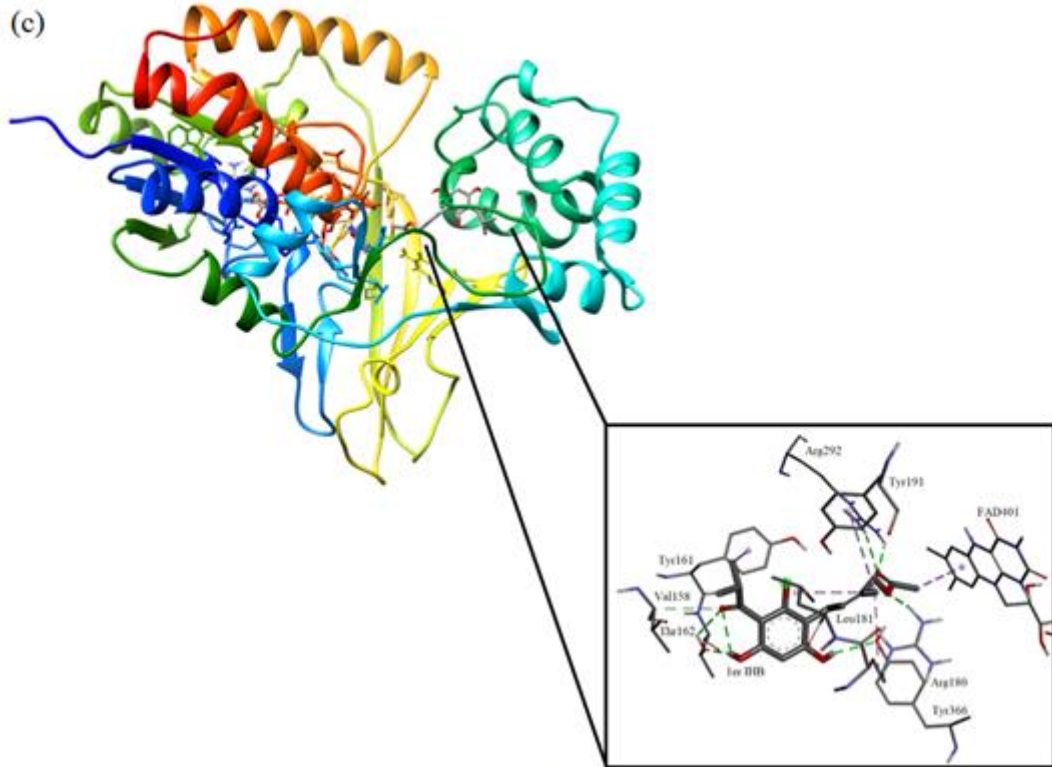
(b)

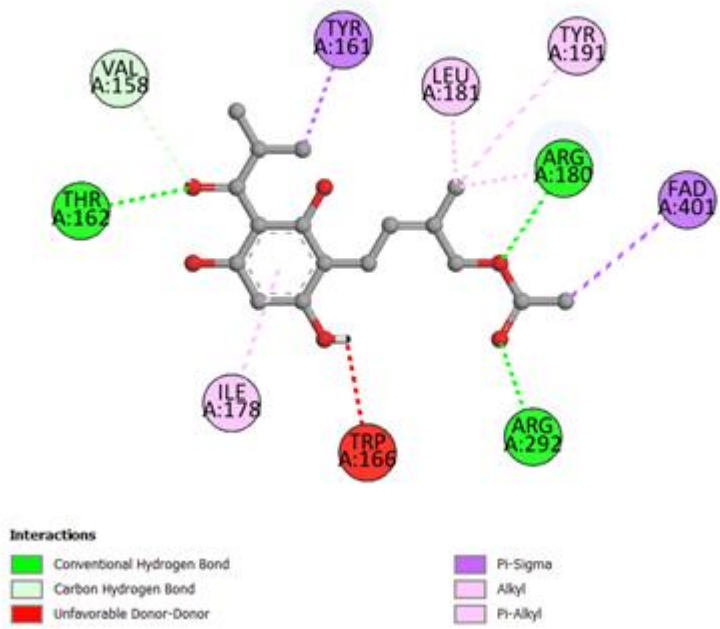
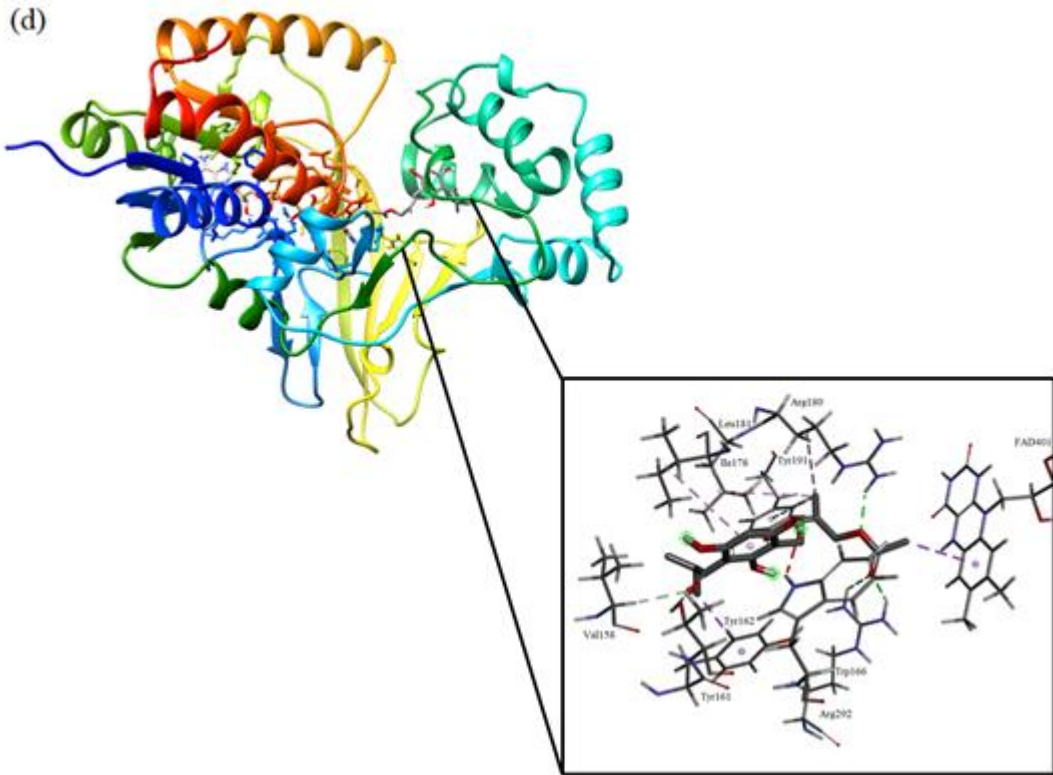


Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Pi-Sigma

- Pi-Pi Stacked
- Amide-Pi Stacked
- Pi-Alkyl





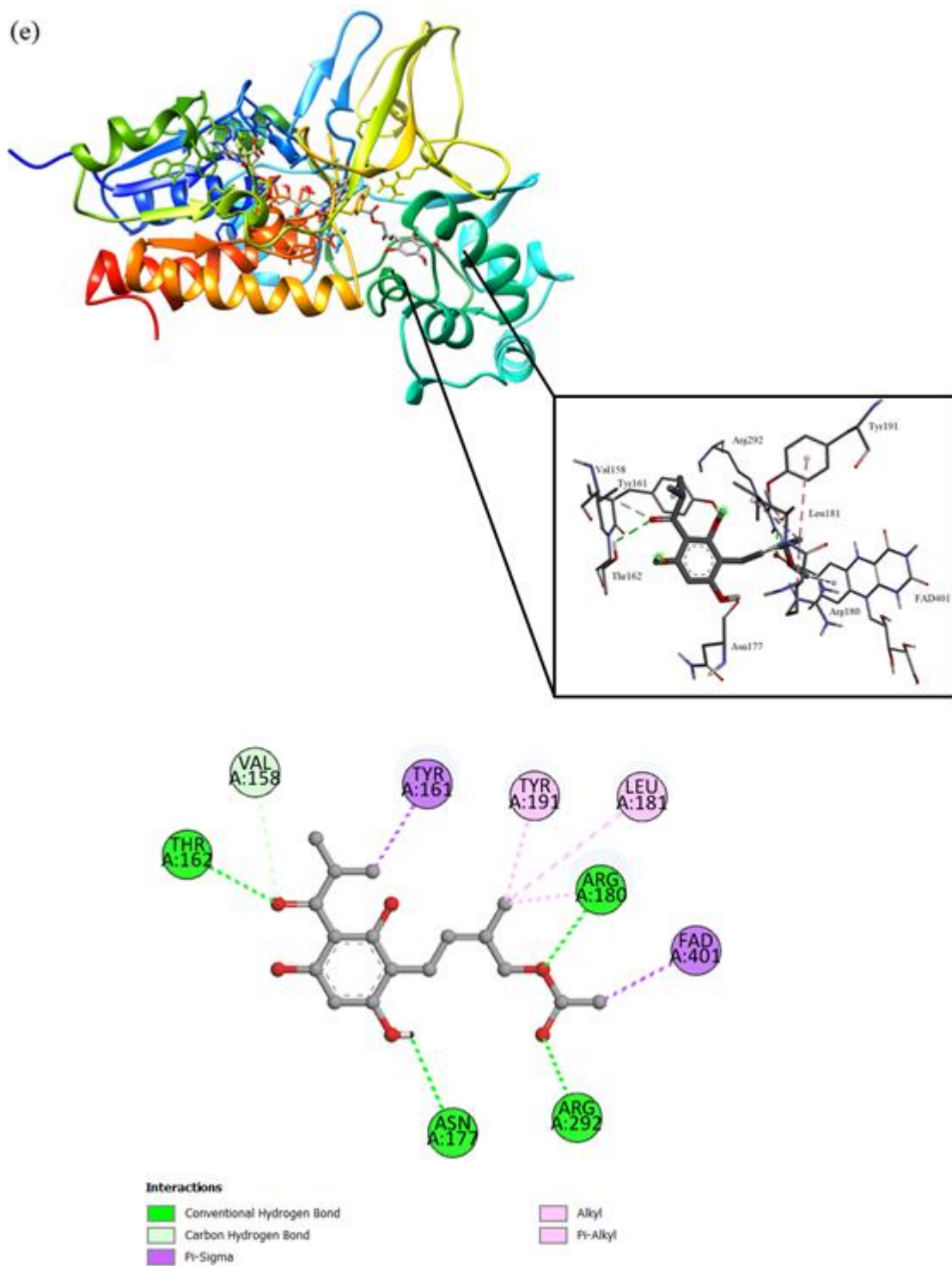


Figura A3. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular semiflexible en AutoDock Vina de los complejos de la enzima UGM con los conforméros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) UGM-G1s, (b) UGM-A1s, (c) UGM-C1s, (d) UGM-Ac1s y (e) UGM-D1s.

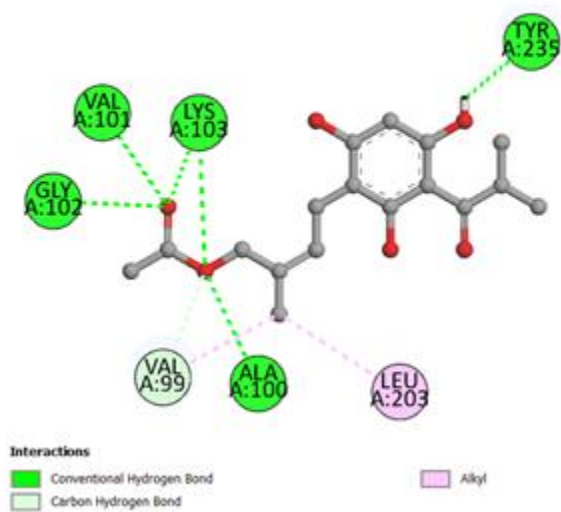
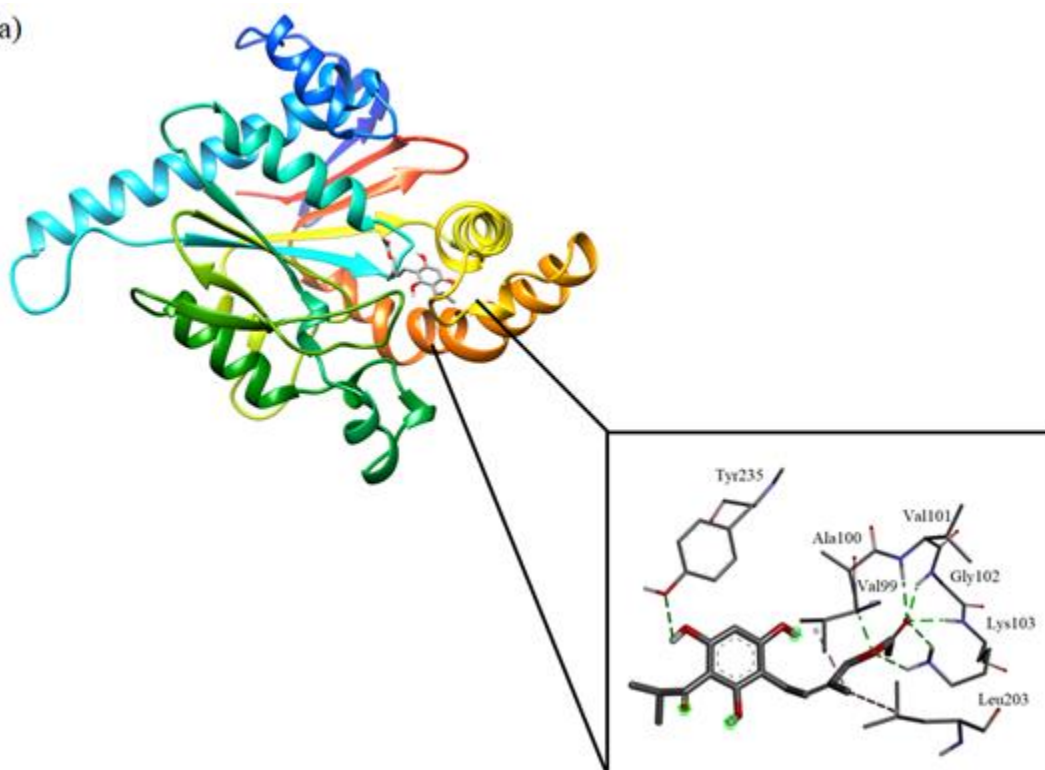
A.4. Acoplamiento semiflexible con la enzima PanK

En la Tabla A4 se reportan las interacciones principales y los valores de energía de afinidad en kcal mol⁻¹ en fase gas y en los diferentes disolventes con la enzima PanK. En el caso del acoplamiento semiflexible, las energías de afinidad están en el intervalo de -7.0 a -7.3 kcal mol⁻¹ para los complejos receptor-ligante con PanK. En la Figura A4 se observan las interacciones del acoplamiento semiflexible de los complejos con la enzima PanK. En los complejos PanK-G1s y PanK-A1s se observan las interacciones vía puente de hidrógeno con los residuos Ala100 y Tyr235, mientras que el complejo PanK-C1s solo muestra la interacción vía puente de hidrógeno con el residuo Ala100 y el complejo PanK-D1s solo muestra la interacción vía puente de hidrógeno con el residuo Tyr235. El residuo Ala100 es importante, ya que forma parte del bucle de la enzima, el cual es responsable de sostener a ATP durante la catálisis, mientras que el residuo Tyr235 está involucrado en la unión de pantotenato y fosfotenoato. Por otra parte, se observa la interacción enlace C-H con el aminoácido Arg238 en los complejos PanK-A1s, PanK-C1s y PanK-Ac1s, este último complejo también interactúa con Arg238 vía puente de hidrógeno. El aminoácido Arg238 es importante ya que actúa como residuo conector entre pantotenato fosforilado y ATP. También en el complejo PanK-A1s se observa la interacción π - σ y en PanK-D1s las interacciones π - σ y π -alquilo con el residuo Phe254. El residuo Phe254 recubre el túnel preformado de la enzima. Por otra parte, en el complejo PanK-D1s se observan las interacciones vía puente de hidrógeno y π -alquilo con el residuo Tyr182 y puente de hidrógeno con Asn277. El aminoácido Tyr 182 constituye el túnel preformado en el sitio activo de la enzima, mientras que el aminoácido Asn277 está involucrado en la función de pantotenato y fosfotenoato. Con respecto a la conservación de los IHB, los complejos con la enzima PanK no conservan ningún IHB, excepto el complejo PanK-D1s, el cual forma un nuevo segundo IHB, O41...H9, y no conserva sus dos IHBs de la conformación inicial (O15...H11 y O41...H13).

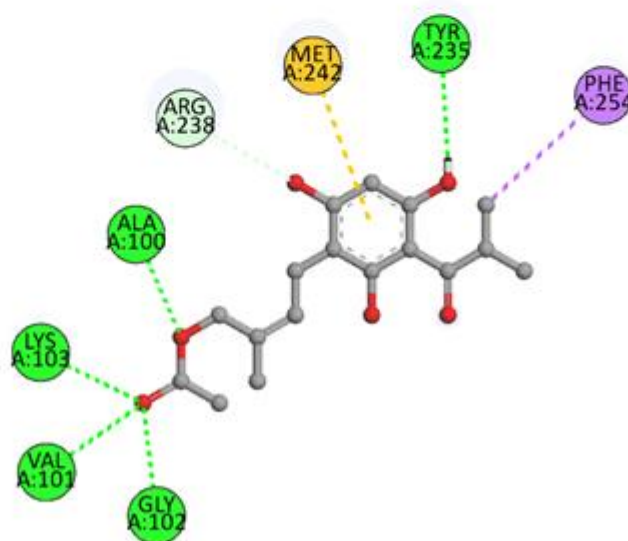
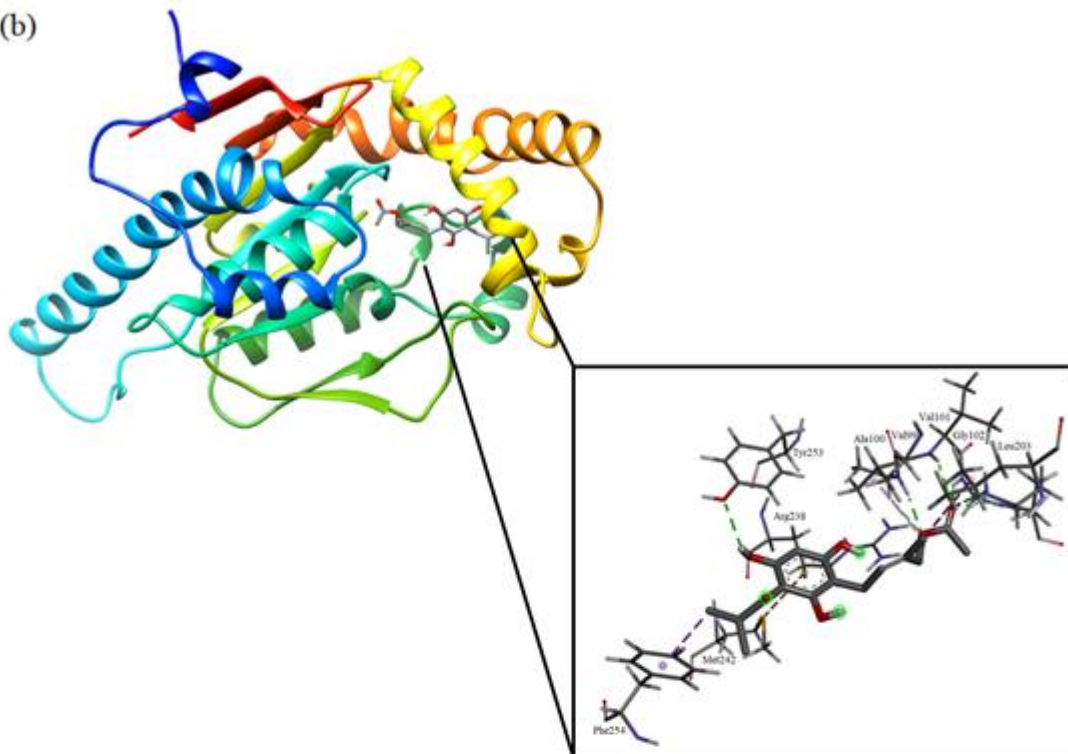
Tabla A4. Energías de afinidad (kcal mol⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular semiflexible en AutoDock Vina de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima PanK.

Medio	Complejo	Energía de afinidad	Conservación de IHBs	Aminoácidos	Tipo de interacción
Fase gas	PanK-G1s	-7.3	Ninguno	Ala100	Puente de hidrógeno
				Tyr235	Puente de hidrógeno
Agua	PanK-A1s	-7.3	Ninguno	Tyr235	Puente de hidrógeno
				Ala100	Puente de hidrógeno
				Arg238	Enlace C-H
				Phe254	π - σ
Cloroformo	PanK-C1s	-7.1	Ninguno	Arg238	Enlace C-H
				Ala100	Puente de hidrógeno
Acetonitrilo	PanK-Ac1s	-7.3	Ninguno	Arg238	Puente de hidrógeno y enlace C-H
DMSO	PanK-D1s	-7.0	2do IHB	Tyr182	Puente de hidrógeno y π -alquilo
				Phe254	π - σ y π -alquilo
				Asn277	Puente de hidrógeno
				Tyr235	Puente de hidrógeno

(a)



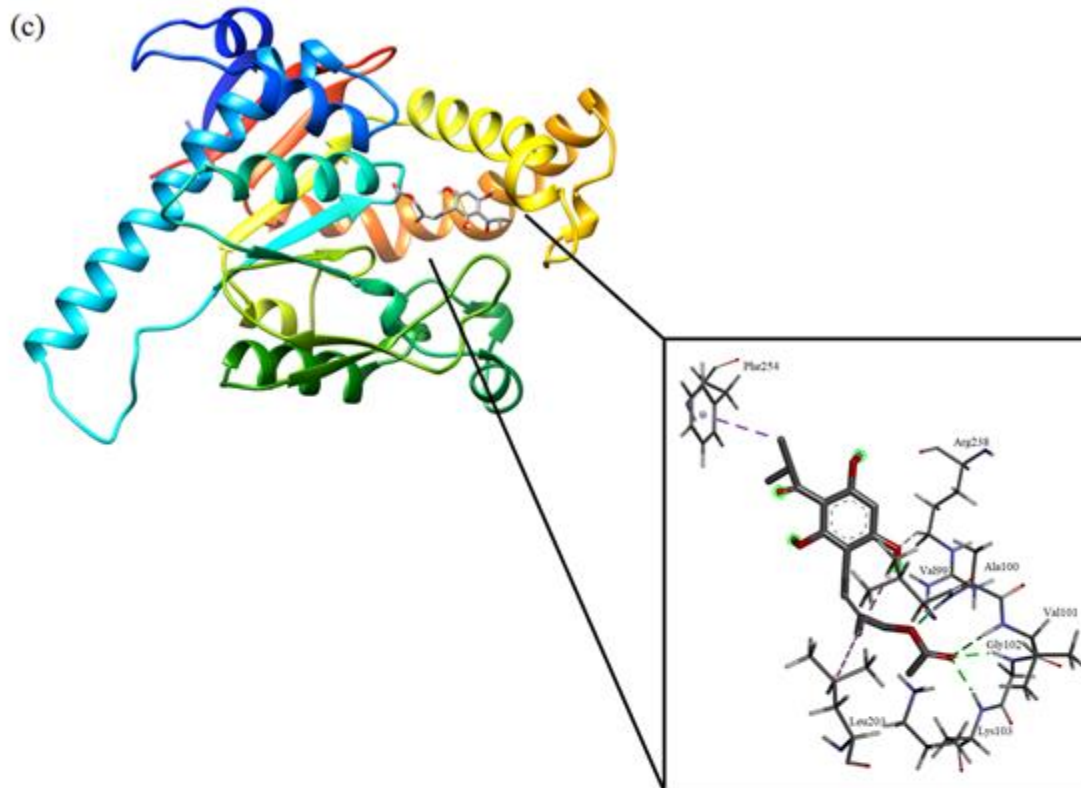
(b)



Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond

- Pi-Sigma
- Pi-Sulfur

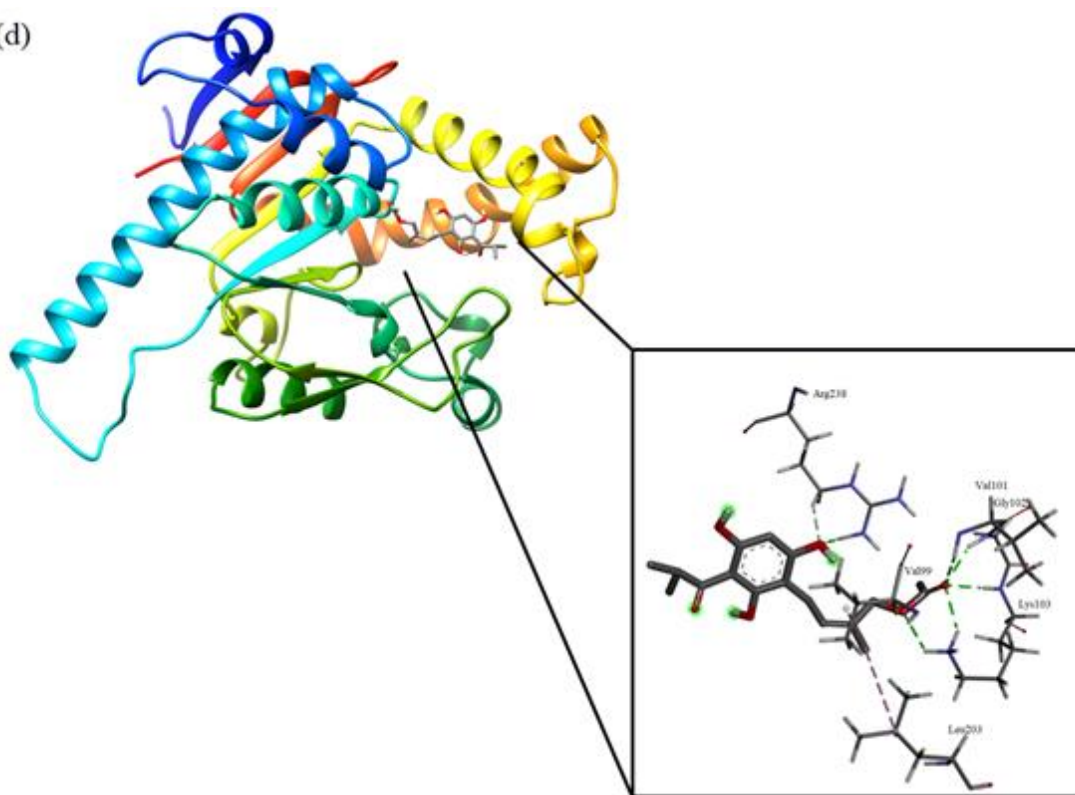


Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond

- Pi-Sigma

(d)



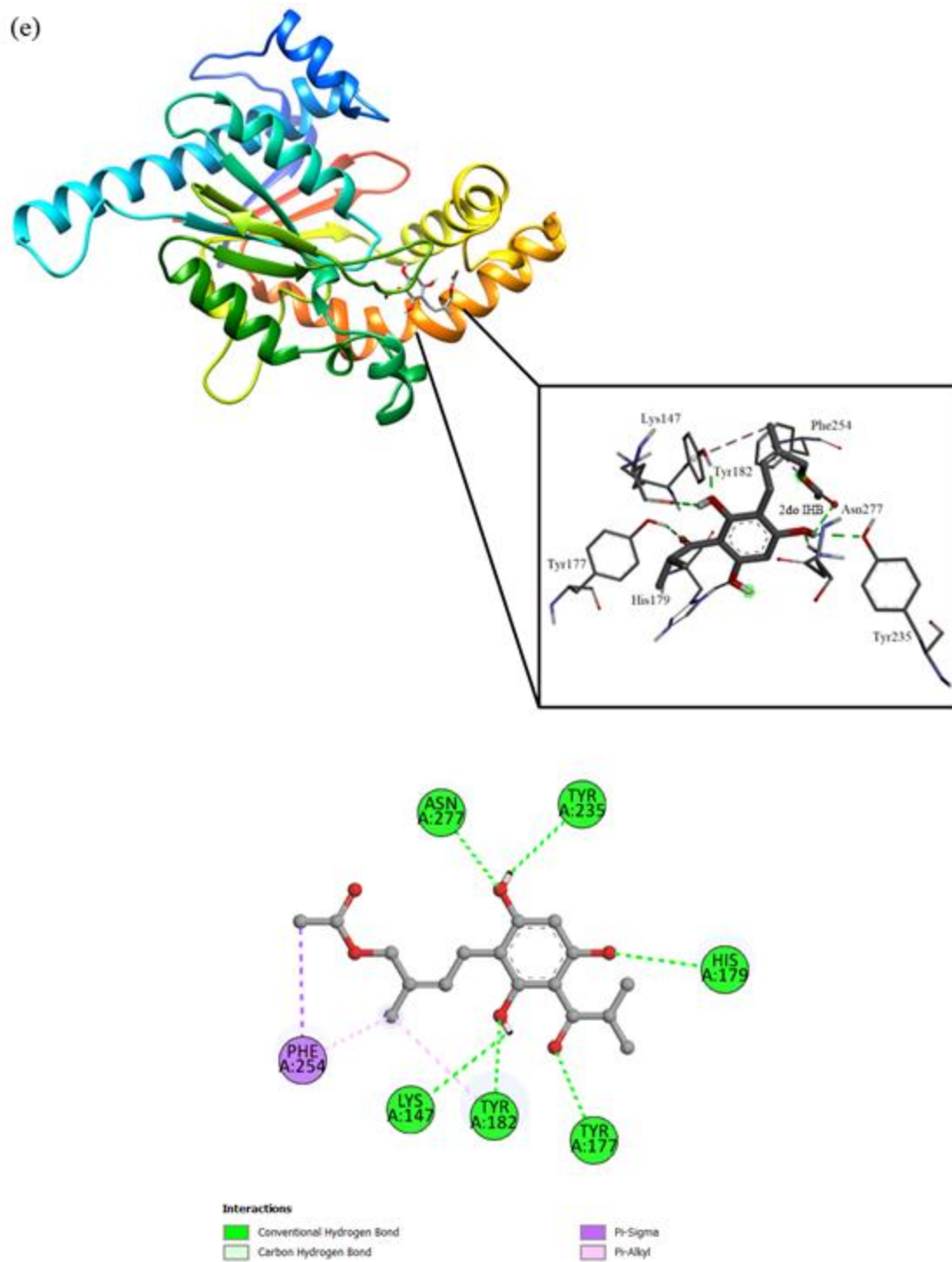


Figura A4. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular semiflexible en AutoDock Vina de los complejos de la enzima PanK con los conforméros más estables de caespitato en el sitio activo: (a) PanK-G1s, (b) PanK-A1s, (c) PanK-C1s, (d) PanK-Ac1s y (e) PanK-D1s.

ANEXO B. Acoplamiento semiflexible en Glide

Glide aproxima una búsqueda sistemática completa del espacio conformacional, orientación y posición del ligante. En esta búsqueda, se sigue una fase inicial de posicionamiento y puntuación aproximados que reduce drásticamente el espacio de búsqueda, seguida de una optimización de energía con flexibilidad torsional en una caja de potencial no enlazado OPLS-AA para unas pocas poses candidatas que sobreviven [108]. Como resultado, los hallazgos del acoplamiento semiflexible muestran que los ligantes Gs, As, Cs, Acs y Ds adoptaron la misma conformación, independientemente de las conformaciones presentes en las estructuras de entrada, ya sea extendida o en forma de horquilla.

B.1. Acoplamiento semiflexible con la enzima InhA

La energía de afinidad tiene un valor de $-6.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ en todos los complejos formados con la enzima InhA. En la Tabla B1, se observan la interacción π -alquilo con los aminoácidos Ala198, Tyr158, Phe149 y el cofactor NAD, además de interacciones vía puente de hidrógeno y enlace C-H con este cofactor. Sin embargo, se observa una interacción desfavorable donador-donador con el aminoácido Thr196, situado en la región del bucle de unión al sustrato, y se ha reportado que los inhibidores potentes de esta enzima establecen una interacción favorable del tipo enlace de hidrógeno con este residuo [18]. Finalmente, se destaca que todos los complejos conservaron el primer IHB, O15...H13, ver Figura B1.

Tabla B1. Energías de afinidad (kcal mol⁻¹) e interacciones principales del acoplamiento molecular semiflexible en Glide de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima InhA.

Medio	Complejo	Energía de afinidad	Conservación de IHBs	Aminoácidos	Tipo de interacción
Fase gas	InhA-G1s	-6.3	1er IHB	Ala198 Tyr158 Thr196 Phe149 NAD1301	π -alquilo π -alquilo Desfavorable donador-donador π -alquilo Puente de hidrógeno, π -alquilo y enlace C-H
Agua	InhA-A1s	-6.3	1er IHB	Ala198 Tyr158 Thr196 Phe149 NAD1301	π -alquilo π -alquilo Desfavorable donador-donador π -alquilo Puente de hidrógeno, π -alquilo y enlace C-H
Cloroformo	InhA-C1s	-6.3	1er IHB	Ala198 Tyr158 Thr196 Phe149 NAD1301	π -alquilo π -alquilo Desfavorable donador-donador π -alquilo Puente de hidrógeno, π -alquilo y enlace C-H
Acetonitrilo	InhA-Ac1s	-6.3	1er IHB	Ala198 Tyr158 Thr196 Phe149 NAD1301	π -alquilo π -alquilo Desfavorable donador-donador π -alquilo Puente de hidrógeno, π -alquilo y enlace C-H
DMSO	InhA-D1s	-6.3	1er IHB	Ala198 Tyr158 Thr196 Phe149 NAD1301	π -alquilo π -alquilo Desfavorable donador-donador π -alquilo Puente de hidrógeno, π -alquilo y enlace C-H

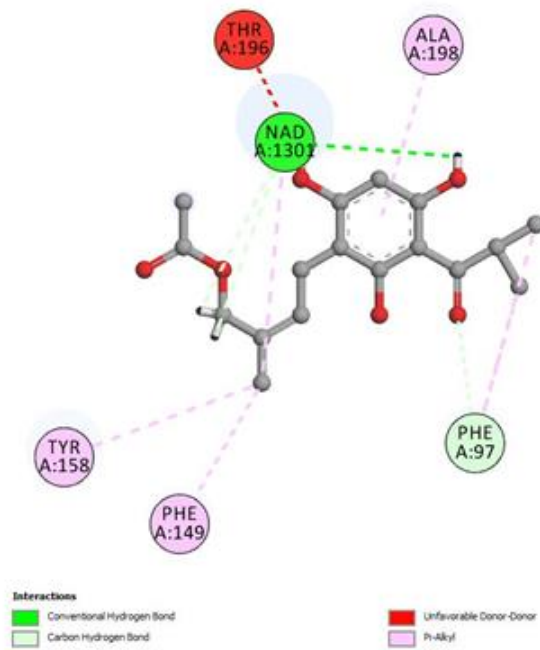
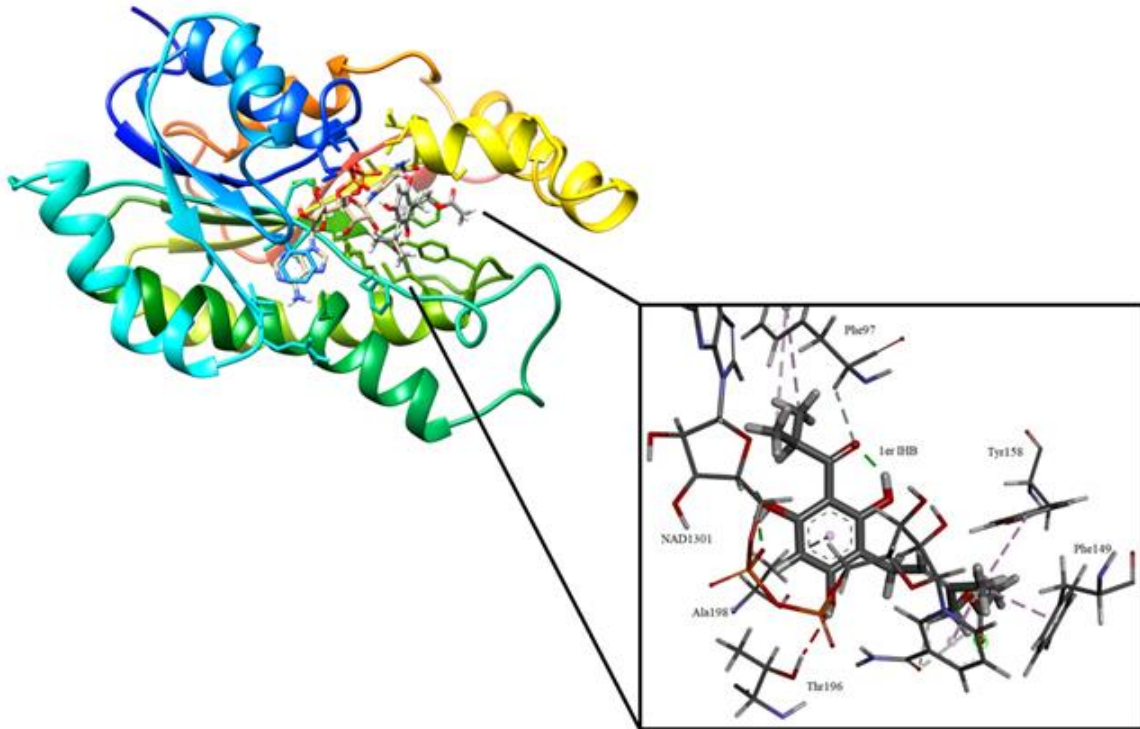


Figura B1. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular semiflexible en Glide de los complejos de la enzima PanK con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: InhA-G1s, InhA-A1s, InhA-C1s, InhA-Ac1s y InhA-D1s.

B.2. Acoplamiento semiflexible con la enzima MabA

En la Tabla B2 se reporta la energía de afinidad con un valor de $-6.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ en todos los complejos formados con la enzima MabA. Se observan la interacción de puente de hidrógeno con el residuo Ser140 y el cofactor NAP, además de interacciones π - π y π -alquilo. El residuo Ser140 es importante ya que pertenece a la triada catalítica de la enzima MabA. Finalmente, ningún complejo conservó algún IHB, ver Figura B2.

Tabla B2. Energías de afinidad (kcal mol^{-1}) e interacciones principales del acoplamiento molecular semiflexible en Glide de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima MabA.

Medio	Complejo	Energía de afinidad	Conservación de IHBs	Aminoácidos	Tipo de interacción
Fase gas	MabA-G1s	-6.7	Ninguno	Tyr153 Ser140 NAP1249	π - π y π -alquilo Puente de hidrógeno Puente de hidrógeno
Agua	MabA-A1s	-6.7	Ninguno	Tyr153 Ser140 NAP1249	π - π y π -alquilo Puente de hidrógeno Puente de hidrógeno
Cloroformo	MabA-C1s	-6.7	Ninguno	Tyr153 Ser140 NAP1249	π - π y π -alquilo Puente de hidrógeno Puente de hidrógeno
Acetonitrilo	MabA-Ac1s	-6.7	Ninguno	Tyr153 Ser140 NAP1249	π - π y π -alquilo Puente de hidrógeno Puente de hidrógeno
DMSO	MabA-D1s	-6.7	Ninguno	Tyr153 Ser140 NAP1249	π - π y π -alquilo Puente de hidrógeno Puente de hidrógeno

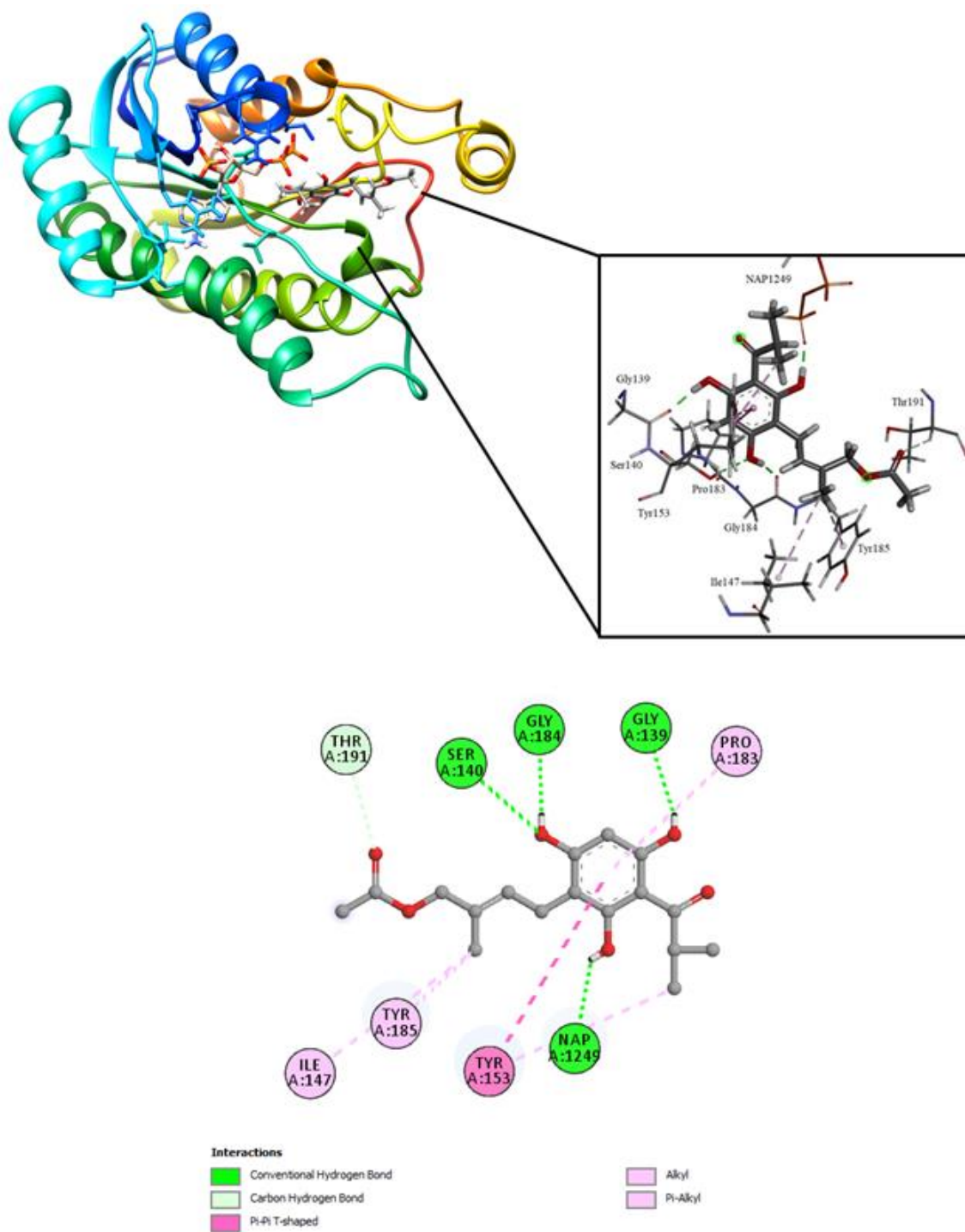


Figura B2. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular semiflexible en Glide de los complejos de la enzima PanK con los conformeros más estables de caespitato en el sitio activo: MabA-G1s, MabA-A1s, MabA-C1s, MabA-Ac1s y MabA-D1s.

B.3. Acoplamiento semiflexible con la enzima UGM

La energía de afinidad tiene un valor de $-9.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ en todos los complejos formados con la enzima UGM. En la Tabla B3, se observan la interacción alquilo con el residuo Arg180, además de interacciones vía puente de hidrógeno con este mismo residuo y Tyr366, cabe resaltar que estos aminoácidos son clave ya que están involucrados en procesos de catálisis y estabilización, respectivamente. Por otro lado, se observa la interacción π - σ con el cofactor FAD. Finalmente, todos los complejos no conservaron algún IHB, ver Figura B3.

Tabla B3. Energías de afinidad (kcal mol^{-1}) e interacciones principales del acoplamiento molecular semiflexible en Glide de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima UGM.

Medio	Complejo	Energía de afinidad	Conservación de IHBs	Aminoácidos	Tipo de interacción
Fase gas	UGM-G1s	-9.2	Ninguno	Arg180	Puente de hidrógeno y alquilo
				Tyr366 FAD401	Puente de hidrógeno π - σ
Agua	UGM-A1s	-9.2	Ninguno	Arg180	Puente de hidrógeno y alquilo
				Tyr366 FAD401	Puente de hidrógeno π - σ
Cloroformo	UGM-C1s	-9.2	Ninguno	Arg180	Puente de hidrógeno y alquilo
				Tyr366 FAD401	Puente de hidrógeno π - σ
Acetonitrilo	UGM-Ac1s	-9.2	Ninguno	Arg180	Puente de hidrógeno y alquilo
				Tyr366 FAD401	Puente de hidrógeno π - σ
DMSO	UGM-D1s	-9.2	Ninguno	Arg180	Puente de hidrógeno y alquilo
				Tyr366 FAD401	Puente de hidrógeno π - σ

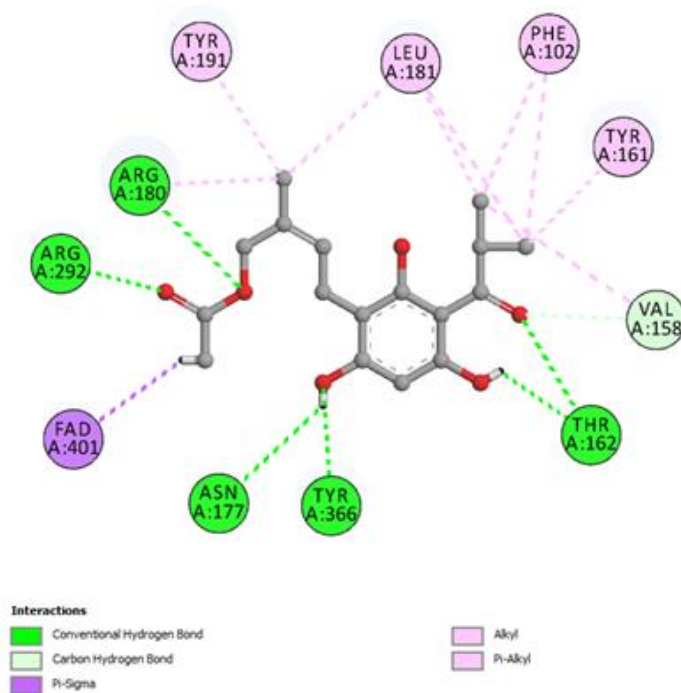
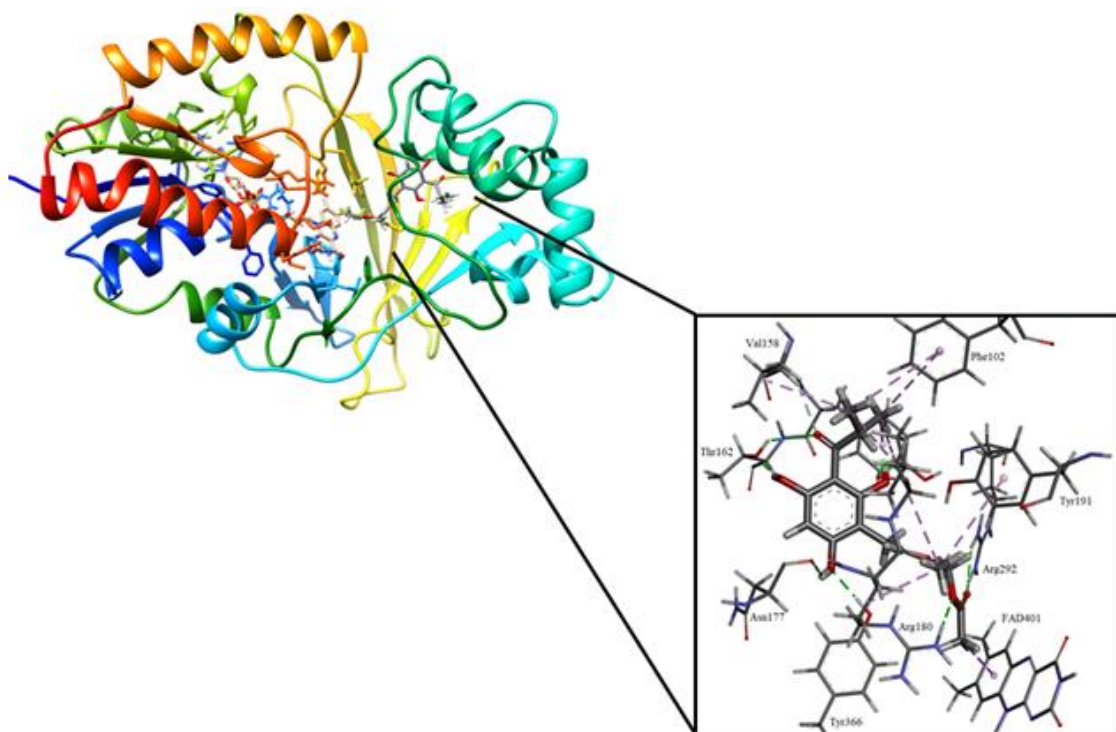


Figura B3. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular semiflexible en Glide de los complejos de la enzima PanK con los conforméros más estables de caespitato en el sitio activo: UGM-G1s, UGM-A1s, UGM-C1s, UGM-Ac1s y UGM-D1s.

B.4. Acoplamiento semiflexible con la enzima PanK

La Tabla B4 reporta la energía de afinidad con un valor de $-8.0 \text{ kcal mol}^{-1}$. Se observa la interacción π - π con el aminoácido Tyr182. Además, la interacción π - σ se observó con el residuo Phe254, ambos residuos forman parte del túnel preformado en el sitio activo de la enzima. Por otro lado, se observa una interacción vía puente de hidrógeno con el residuo Asn277, involucrado en la unión de pantotenato y fosfotenoato [68]. Finalmente, se observa la conservación del 2do IHB, O39...H13, en todos los complejos de la enzima PanK (Figura B4).

Tabla B4. Energías de afinidad (kcal mol^{-1}) e interacciones principales del acoplamiento molecular semiflexible en Glide de los conformeros más estables de caespitato en fase gas y en disolución con la enzima PanK.

Medio	Complejo	Energía de afinidad	Conservación de IHBs	Aminoácidos	Tipo de interacción
Fase gas	PanK-G1s	-8.0	2do IHB O39...H13	Tyr182	π - π
				Phe254	π - σ
				Asn277	Puente de hidrógeno
				Tyr257	π -alquilo
Agua	PanK-A1s	-8.0	2do IHB O39...H13	Tyr182	π - π
				Phe254	π - σ
				Asn277	Puente de hidrógeno
				Tyr257	π -alquilo
Cloroformo	PanK-C1s	-8.0	2do IHB O39...H13	Tyr182	π - π
				Phe254	π - σ
				Asn277	Puente de hidrógeno
				Tyr257	π -alquilo
Acetonitrilo	PanK-Ac1s	-8.0	2do IHB O39...H13	Tyr182	π - π
				Phe254	π - σ
				Asn277	Puente de hidrógeno
				Tyr257	π -alquilo
DMSO	PanK-D1s	-8.0	2do IHB O39...H13	Tyr182	π - π
				Phe254	π - σ
				Asn277	Puente de hidrógeno
				Tyr257	π -alquilo

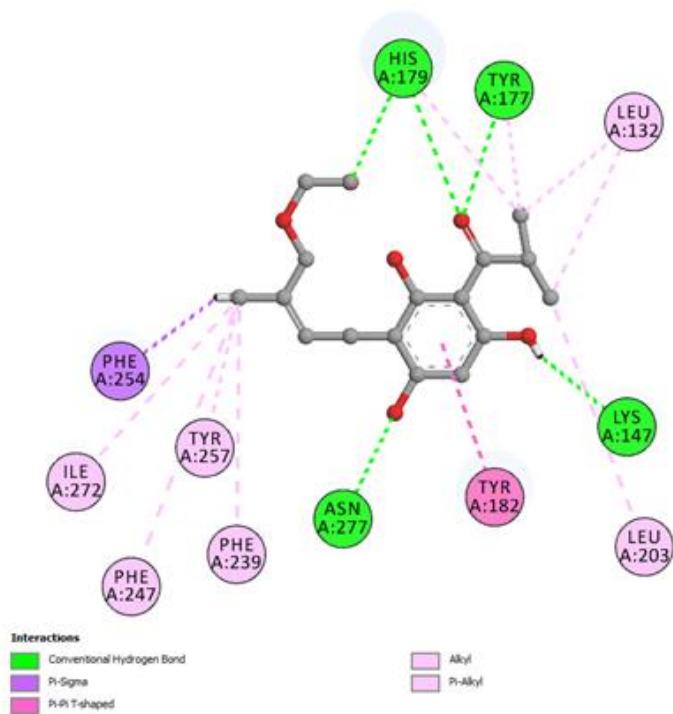
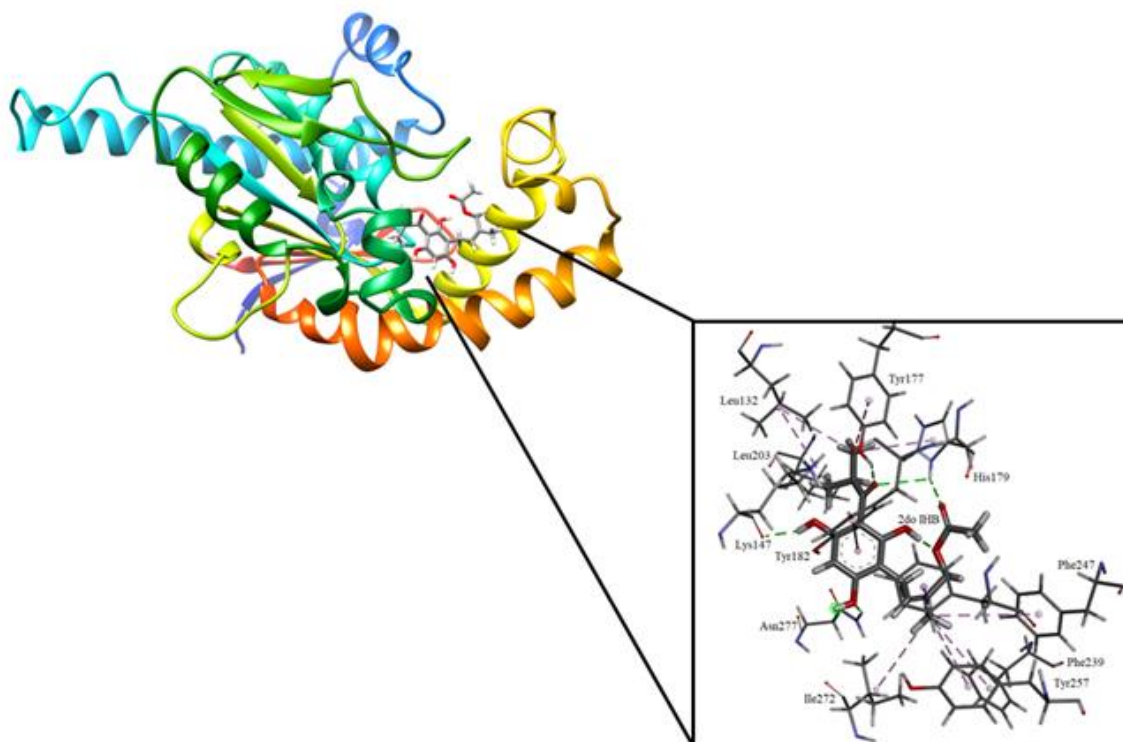


Figura B4. Representación gráfica en 3D y 2D del acoplamiento molecular semiflexible en Glide de los complejos de la enzima PanK con los conforméros más estables de caespitato en el sitio activo: PanK-G1s, PanK-A1s, PanK-C1s, PanK-Ac1s y PanK-D1s.