



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO TEÓRICO DE LAS INTERACCIONES ESPECÍFICAS DE COMPLEJOS DE Cu
(II) CON EL ADN

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. LILLIAN GISELA RAMÍREZ PALMA

Dr. FERNANDO CORTÉS GUZMÁN
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO DE 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

ESTUDIO TEÓRICO DE LAS INTERACCIONES ESPECÍFICAS DE COMPLEJOS DE Cu
(II) CON EL ADN

T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. LILLIAN GISELA RAMÍREZ PALMA

Dr. FERNANDO CORTÉS GUZMÁN
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM



Ciudad de México, Enero de 2022.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Químicas.

Al Dr. Fernando Cortés Guzmán, por la brillante guía y orientación, además del valioso apoyo durante alrededor de 10 años, gracias.

Al Dr. Juan Raúl Álvarez Idaboy y al Dr. José Iván Castillo, miembros del comité tutor, por sus comentarios y aportaciones a este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para los estudios de Doctorado (Número de becario: 308338, Número de CVU: 593249) y los proyectos 293294 y Ciencia Básica 220392.

A la Dirección General de Cómputo y Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC-UNAM) por el tiempo de cómputo derivado del proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-194.

A PAPIIT-UNAM por la beca otorgada y el financiamiento a los proyectos IN202717 y IN212520.

Al Dr. Rodrigo Galindo Murillo por todos los conocimientos compartidos y su valiosa aportación a esta tesis. Al Dr. Thomas Cheatam III y a Center for High Performance Computing (CHPC) por la beca y el tiempo de cómputo facilitados durante la estancia de investigación en el Colegio de Farmacia de la Universidad de Utah.

A la Dra. Lena Ruiz Azuara, el M. en C. Adrián Espinosa Guillén, Alexis Eduardo Guerra y Fabiola Nieto por el trabajo experimental y la colaboración en el trabajo referente a las Casiopeínas®.

Al Dr. Juan Carlos García Ramos, el Dr. César R. García Jacas, y al Q. Ricardo Almada-Monter por su colaboración en la identificación del sitio farmacofórico de compuestos de cobre.

A la Dra. Norah Barba-Behrens y M. en C. Rodrigo Castro por la colaboración generada en el estudio de los compuestos basados en tinidazol.

A los miembros del jurado, Dra. Norah Barba-Behrens, Dr. Juan Raúl Álvarez Idaboy, Dr. Francisco Miguel Castro Martínez, Dr. Rodolfo Gómez Balderas y Dra. Angélica Estrella Ramos Peña, por los comentarios acertados y sugerencias hechas en la revisión a este trabajo.

A la Ing. Gladys Edith Cortés Romero, el Mat. José David Vázquez Cuevas y la Mtra. María Magdalena Aguilar Araiza del Instituto de Química por la administración de los servicios de cómputo. Además, a los técnicos académicos del Instituto de Química: M. en C. Virginia Gómez Vidales por su colaboración en la obtención de los espectros EPR, la Dra. María del Carmen García González por las determinaciones de Espectrometría de Masas-DART, y a Q.F.B. Rocío Patiño Maya por las determinaciones de Infrarrojo-ATR.

Gracias por todo el apoyo, mi querida familia.

Juan Pablo, millones de gracias.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisicoquímica Teórica 2 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Fernando Cortés Guzmán.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'FCG', is positioned above a horizontal line.

Dr. Fernando Cortés Guzmán

Congresos y Publicaciones

El presente trabajo se ha presentado en su totalidad o parcialidad en los siguientes congresos.

- **“XV Reunión Mexicana de Físicoquímica Teórica”**. Del 17 al 19 de noviembre de 2016, en Mérida, Yucatán, México. Participación como expositor en la modalidad cartel del trabajo: “Estudio teórico de reacciones mediadas por complejos ternarios de Cu(II)”.
- **“100th Canadian Chemistry Conference and Exhibition”**. Del 28 de mayo al 1 de junio de 2017, en Toronto, Canadá. Participación como expositor en la modalidad cartel del trabajo: “Theoretical Study of Reactions Mediated by Ternary Cu (II) Complexes”.
- **“Sagamore XIX Conference on Quantum Crystallography”**. Del 8 al 13 de julio de 2018, en Halifax, Nueva Escocia, Canadá. Participación como expositor en la modalidad cartel del trabajo: “Theoretical study of reactions mediated by ternary Cu(II) complexes”.
- **“53° Congreso Mexicano de Química y 37° Congreso Nacional de Educación Química”**. Del 2 al 5 de octubre de 2018, en Ciudad de México, México. Participación como expositor en la modalidad oral del trabajo: “Estudio teórico de reacciones mediadas por complejos ternarios de Cu(II)”.
- **“54° Congreso Mexicano de Química y 38° Congreso Nacional de Educación Química”**. Del 30 de septiembre al 3 de octubre de 2019, en Puebla, México. Participación como expositor en la modalidad oral del trabajo: “Obtención de la función de onda de biomacromoléculas utilizando Orbitales Moleculares Extremadamente Localizados”.
- **“Simposio de Química Inorgánica Medicinal, SiQIM 2021”**. Reunión virtual el 29 y 30 de mayo de 2021, en Ciudad de México, México. Participación como expositor en la modalidad oral del trabajo: “Identificación de interacciones específicas y farmacóforo en compuestos de Cu^{II} que interactúan con el ADN”.

Los resultados derivados de este trabajo se han publicado, a la fecha, en dos artículos:

- Lillian G Ramírez-Palma, César R García-Jacas, Juan C García-Ramos, Ricardo Almada-Monter, Rodrigo Galindo-Murillo, Fernando Cortés-Guzmán. Pharmacophoric sites of anticancer metal complexes located using quantum topological atomic descriptors. *Journal of Molecular Structure*. **2020**, 1204, 127480. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127480>.
- Lillian G Ramírez-Palma, Adrián Espinoza-Guillén, Fabiola Nieto-Camacho, Alexis E. López-Guerra, Virginia Gómez-Vidales, Fernando Cortés-Guzmán, Lena Ruiz-Azuara. Intermediate Detection in the Casiopeína–Cysteine Interaction Ending in the Disulfide Bond Formation and Copper Reduction. *Molecules*. **2021**, 26(19), 5729. <https://doi.org/10.3390/molecules26195729>.

Índice

Resumen	13
1. Introducción	14
2. Antecedentes	15
2.1 Química inorgánica medicinal	15
2.2 Cobre	18
2.3 Química medicinal computacional	26
3. Objetivos Generales	33
4. Hipótesis	33
5. Resultados	34
5.1 Oxidación de cisteína por complejos de cobre(II)	34
5.1.1 Antecedentes	34
5.1.2 Objetivos particulares	36
5.1.3 Metodología	36
5.1.4 Resultados	37
<i>Reacción</i>	37
<i>Intermediario</i>	41
<i>Transferencia electrónica</i>	49
<i>Propuesta de mecanismo</i>	56
5.1.5 Conclusiones	58
5.2 Determinación del Farmacóforo	59
5.2.1 Antecedentes	59
5.2.2 Objetivos particulares	60
5.2.3 Metodología	61
5.2.4 Resultados	63
<i>Modelos</i>	63
<i>Validación</i>	66
<i>Interpretación</i>	68
5.2.5 Conclusiones	69
5.3 Interacción de complejos de cobre(II) tetraédricos con ADN	70
5.3.1 Antecedentes	70
5.3.2 Objetivos particulares	71
5.3.3 Metodología	72
5.3.4 Resultados	72
<i>Estructura del Complejo</i>	72
<i>Dinámica Molecular</i>	74
<i>Sitio de Reconocimiento</i>	78
<i>Interacciones específicas</i>	83
5.3.5 Conclusiones	92

6. Conclusiones	94
7. Referencias	95
8. Anexos	102
I. Resultados de la Interacción de compuestos de cobre(II) tetraédricos con ADN	102
II. Mecánica Molecular	135
III. Teoría de Funcionales de la Densidad	138
IV. Relación Cuantitativa Estructura-Actividad	143
V. Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas	145
VI. Artículos Publicados	149

Índice de Figuras

Figura 2.1. Cisplatino y sus derivados usados en el tratamiento de cáncer.	17
Figura 2.2. Geometrías preferidas por el cobre(I) y (II), donde A= ligante y NC= número de coordinación del centro metálico. Replicada de Tisato, et al.[25]	18
Figura 2.3. Ejemplos de compuestos antineoplásicos de cobre.	21
Figura 2.4. Estructura general de los compuestos de cobre(II) de la familia Casiopeínas®.	24
Figura 2.5. Estructura del ligante tinidazol (tnz) y compuestos de cobre(II) basados en tinidazol.	25
Figura 5.1. Mecanismo propuesto para la interacción de Casiopeínas® con reductores tiolados a nivel celular. Replicado de Kachadourian, et al.[55]	35
Figura 5.2. Casiopeínas® utilizadas en esta sección: (A) CasIII-ia, (B) CasIII-Ea, y (C) CasII-gly.	37
Figura 5.3. Reactivos e intermediarios de la reacción mecano-química en estado sólido: (A) cisteína (blanco), (B) CasIII-ia (Pantone 2139c), (C) Intermediario 1 (Pantone 289c), y (D) intermediario 2 (Pantone 532c). Imágenes de polvos proporcionadas por el grupo experimental de Casiopeínas®.	38
Figura 5.4. Estados de protonación del grupo sulfhidrilo de la cisteína en la interacción Cas-Cys.	39
Figura 5.5. Comparación del átomo coordinante de la cisteína al unirse a la CasIII-ia. Estructuras A y C corresponden a la forma zwitteriónica con átomo coordinante oxígeno y azufre, respectivamente. Estructuras B y D corresponden a la forma aniónica con átomo coordinante oxígeno y azufre, respectivamente.	41
Figura 5.6. Geometrías en estudio: (A) CasIII-ia, (B) Aducto CasIII-ia-Cisteína con geometría octaédrica, y (C) Aducto CasIII-ia-Cisteína con geometría pirámide de base cuadrada.	42
Figura 5.7. Espectro UV-Vis de la CasIII-ia a una concentración 5 mM.	43
Figura 5.8. Espectro experimental UV-Vis para el aducto Cas-Cys (negro), y su comparación con los espectros calculados con geometría octaédrica (rojo) y pirámide de base cuadrada (azul).	44
Figura 5.9. Orbitales moleculares que más contribuyen en la transición electrónica del cobre(II) para la geometría octaédrica.	45
Figura 5.10. Orbitales moleculares que más contribuyen en la transición electrónica del cobre(II) para la geometría pirámide de base cuadrada.	45
Figura 5.11. Espectro experimental de EPR para el aducto Cas-Cys (negro), y su comparación con los espectros calculados con geometría octaédrica (rojo) y pirámide de base cuadrada (azul).	47
Figura 5.12. Espectro DART del aducto Cas-Cys a 200 °C: A) Intervalo m/Z de 100 a 500; B) intervalo m/Z de 420.	49
Figura 5.13. Geometrías para el análisis de la densidad de espín en cada etapa: (A) CasIII-ia, (B) aducto CasIII-ia-Cys con geometría octaédrica, (C) aducto CasIII-ia-Cys con geometría pirámide de base cuadrada, y (D) CasIII-ia de cobre(I) con cisteína alejada hasta 5.0 Å.	50
Figura 5.14. Comportamiento de la densidad de espín (e-) del cobre (negro) y azufre (rojo), en las cuatro etapas de reacción para la CasIII-ia.	51

Figura 5.15. Cambio en la densidad de espín (e-) durante el barrido de la distancia de enlace Cu-S (Å) para (A) CasIII-ia, (B) CasIII-Ea y (C) CasII-gly. Valores de cobre en negro y valores de azufre en rojo. El marcador sin relleno corresponde a la geometría octaédrica (Figura 5.13-B) para su comparación.	53
Figura 5.16. Geometrías y distancias de enlace de cada punto en el barrido de la distancia Cu-S para la CasIII-ia.	53
Figura 5.17. Gráfica atómica para las geometrías con distancia de enlace Cu-S (A) 3.9 Å (antes de la transferencia electrónica) y (B) 4.0 Å (después de la transferencia electrónica). Puntos críticos: (3,+3) en morado, (3,+1) en rojo, y (3,-1) en amarillo.	54
Figura 5.18. Geometrías del aducto CasII-gly-Cisteína en presencia de oxígeno, en estado (A) cuarteto y (B) doblete.	55
Figura 5.19. Comportamiento de la densidad de espín (e-) de los átomos más importantes en la interacción Casiopeína®-Cisteína en presencia de oxígeno en estado cuarteto (negro) y doblete (rojo).	55
Figura 5.20. Densidad de espín (e-) en la formación del enlace disulfuro y el radical hidropoxilo.	56
Figura 5.21. Mecanismo propuesto para la interacción de Casiopeínas® con reductores tiolados en presencia (ruta izquierda) y ausencia (ruta derecha) de oxígeno.	57
Figura 5.22. Actividad experimental vs Actividad calculada mediante el modelo 1 para la actividad en la línea celular HCT-15.	65
Figura 5.23. Actividad experimental vs Actividad calculada mediante el modelo 2 para la actividad en la línea celular HeLa.	66
Figura 5.24. Gráfico de Williams para el modelo 1, correspondiente a la línea celular HCT-15.	67
Figura 5.25. Gráfico de Williams para el modelo 2, correspondiente a la línea celular HeLa.	67
Figura 5.26. Izquierda: estructura de equilibrio del aducto poly(GC)2-Cas después de 20 ns de simulación. Derecha: geometría aislada en la que la Cas interactúa directamente con la cadena de ADN, formando el aducto Desoxirribosa-Fosfato-Cas. Tomada de [56].	70
Figura 5.27. Geometrías de los complejos de Cull con tinidazol estudiados en esta sección.	71
Figura 5.28. Geometrías de los complejos 1-3 cuando los halogenuros son sustituidos por agua.	73
Figura 5.29. RMSD de la trayectoria total del complejo 1.	75
Figura 5.30. RMSD de la trayectoria total del complejo 2.	75
Figura 5.31. RMSD de la trayectoria total del complejo 3.	76
Figura 5.32. Giro en los residuos 6-7 del ADN generados por el complejo 1 (línea negra), complejo 2 (línea roja) y complejo 3 (línea azul).	76
Figura 5.33. Geometrías de los cortes del complejo 1.	79
Figura 5.34. Geometrías de los cortes del complejo 2.	80
Figura 5.35. Geometrías de los cortes del complejo 3.	81
Figura 5.36. Disposiciones del complejo preferidas en la interacción con ADN. Las interacciones A-C corresponden a la intercalación en el surco menor, y las interacciones D-F corresponden a la	

interacción con el esqueleto. M es el centro metálico (CuII), 1 y 2 se utiliza para diferenciar los dos ligantes tnz coordinados al cobre. El color rosa indica que el ligante está intercalado, mientras que el naranja indica que no lo está.	82
Figura 5.37. División del ligante tnz para la numeración de interacciones.	88
Figura 5.38. Geometría 3 del Complejo 2.	89
Figura 5.39. Geometría 1 del Complejo 3.	90
Figura 5.40. Contornos del Laplaciano de la Densidad electrónica para N1-Cu-N2 (izquierda), O1-Cu-O2 (derecha arriba) y O1-Cu-N1 (derecha abajo) en los complejos 2 y 3.	91
Figura 5.41. Isosuperficies del Laplaciano de la Densidad Electrónica del átomo de cobre en el complejo 2 (isovalor = -55 u.a.) y complejo 3 (isovalor= -50 u.a.).	91
Figura 5.42. Gráfica atómica del cobre(II) en el complejo 2 y complejo 3. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3,+3) en morado, (3,+1) en rojo y (3,-1) en amarillo.	91

Índice de Tablas

Tabla 2.1. Moléculas clave en el desarrollo de los agentes terapéuticos y de diagnóstico basados en metales.	16
Tabla 2.2. Enzimas dependientes de cobre en mamíferos.	20
Tabla 2.3. Proteínas involucradas en la homeostasis del cobre en mamíferos.	20
Tabla 5.1. Distancias de enlace (Å) Cu-O y Cu-S en los estados de protonación del grupo sulfhidrilo de la cisteína en la interacción Cas-Cys.	40
Tabla 5.2. Energía Libre de Gibbs para la reacción (kcal/mol) entre la Casiopeína® y la cisteína comparando el átomo coordinante del aminoácido. Geometrías referidas en la Figura 5.5.	41
Tabla 5.3. Selección de nivel de teoría para el cálculo de espectros UV-Vis para la CasIII-ia.	43
Tabla 5.4. Selección de nivel de teoría para el cálculo de espectros EPR de la CasIII-ia.	46
Tabla 5.5. Valores experimentales y computacionales de los parámetros g y A (MHz) de EPR para la CasIII-ia y el aducto Cas-Cys en geometría octaédrica y pirámide de base cuadrada (PBC).	47
Tabla 5.6. Señales de IR (cm ⁻¹) del espectro experimental y calculado de la cisteína y la CasIII-ia.	48
Tabla 5.7. Señales de IR (cm ⁻¹) para el aducto Cas-Cys, valores experimentales y computacionales en geometría octaédrica y pirámide de base cuadrada.	48
Tabla 5.8. Valores de densidad de espín (e ⁻) de los átomos de cobre y azufre en las etapas A, B, C y D (Figura 5.13) para CasIII-ia, CasIII-Ea y CasII-gly (Figura 5.2). NA indica que No Aplica, debido a que en la etapa A no hay presencia de azufre.	51
Tabla 5.9. Valores de densidad de espín (e ⁻) para los átomos de Cu y S durante el barrido de distancia entre ellos en la CasIII-ia. NA indica que No Aplica, debido a que en la etapa A no hay presencia de azufre.	52

Tabla 5.10. Valores de actividad antiproliferativa (CI50 en μM) en líneas celulares humanas tipo HeLa y HCT-15 para las estructuras consideradas en el estudio QSAR. Familia Casiopeínas [®] : (A) $\text{Cu}[(1,10\text{-fenantrolina})(\text{acetilacetato})]^+$ y (B) $\text{Cu}[(1,10\text{-fenantrolina})(\text{aminoacido})]^+$. Complejos de Cu(II) con azoles: (C) con benzimidazole, (D) con clotrimazol, y (E) tetraazo[1,5-a]pirimidina. La imagen superior muestra las estructuras base para los sustituyentes especificados en la tabla.[52,53,97,111–114]	62
Tabla 5.11. Mejores modelos QSAR obtenidos para describir la actividad biológica en células HeLa y HCT-15.	64
Tabla 5.12. Dominio de Aplicabilidad basado en Consenso para el conjunto de prueba de los modelos QSAR 1 y 2.	68
Tabla 5.13. Comparación de las distancias de enlace (\AA) y ángulos ($^\circ$) entre la estructura obtenida con Rayos X, los cálculos computacionales a nivel DFT (cambiando la esfera de coordinación) y la Dinámica Molecular (DM).	73
Tabla 5.14. Energías calculadas y energías de formación para los compuestos 1-3, con halogenuros (X_2 , geometrías en Figura 5.27) y agua ($(\text{H}_2\text{O})_2$, geometrías en Figura 5.28) coordinados al centro metálico.	74
Tabla 5.15. Energía de interacción de los complejos 1-3 con el ADN en el muestreo total.	74
Tabla 5.16. Energía de interacción de los complejos 1-3 con el ADN en la trayectoria filtrada. Donde A= Adenina, G= Guanina, C= Citosina y T=Timina.	77
Tabla 5.17. Contribución porcentual del ADN para las interacciones en el aducto. Columna 3: en paréntesis se señalan los residuos del dodecámero conservados en el corte. Columna 6: se indica en paréntesis el número de interacciones Cu-Ofosfato que no son consideradas en el cálculo de Eint E-M-L. Columnas 6-8 y última fila: el valor de arriba corresponde al número de interacciones de cada sección, mientras que el valor inferior indica el porcentaje correspondiente a dicho número de interacciones.	85
Tabla 5.18. Contribución energética y porcentual del complejo de CuI para las interacciones en el aducto. Columnas 5-12: el valor superior corresponde al número de interacciones de cada sección, el valor central indica el porcentaje correspondiente a dicho número de interacciones, y el valor inferior indica la contribución energética (en kcal/mol) de cada sección a la Eint E-M-L.	87

Abreviaturas

A	Adenina
Å	Ángstrom
acac	Acetilacetato
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
bipi	Bipiridina
C	Citosina
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria 50
Cys	cisteína
DFT	Teoría de Funcionales de la Densidad
DM	Dinámica Molecular
G	Guanina
Gly	glicina
GSH	glutati6n
nm	Nan6metros
Phen	1,10-fenantrolina
QSAR	Estudio Cuantitativo de la Relaci6n Estructura-Actividad
QTAIM	Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas
RSH	Especie tiolada
RSSR	Enlace disulfuro entre dos especies tioladas
SAR	Estudio de la Relaci6n Estructura-Actividad
T	Timina
tnz	tinidazol
Símbolos	
ΔG	Energía libre de Gibbs
ψ	funci6n de onda
N	Poblaci6n electr6nica
q	Carga
μ	Momento dipolar
δ	Deslocalizaci6n electr6nica
λ	Localizaci6n electr6nica
α	Densidad de espín alfa
β	Densidad de espín beta
$V(\mathbf{r}_{BCP})$	Densidad de energía potencial
C6digo de colores en los átomos	
C	Carbono: gris
H	Hidr6geno: blanco
O	Oxígeno: rojo
N	Nitr6geno: azul
P	F6sforo: naranja
S	Azufre: amarillo
Cu	Cobre: ocre
Br	Bromo: marr6n
Cl	Cloro: verde

Resumen

Día con día se busca la síntesis de nuevos compuestos con actividad antineoplásica que exhiban una mayor actividad y una menor toxicidad en comparación a los compuestos de platino que se usan comercialmente. Entre las propuestas que más destacan se encuentran los compuestos de cobre(II), entre otras razones debido a que dicho metal es esencial para nuestro organismo y está involucrado en diversos procesos bioquímicos y fisiológicos, proponiéndose que pueden interactuar directamente con el ADN o mediante un proceso de estrés oxidativo.

Este trabajo es una contribución al entendimiento del mecanismo de acción de dos familias de complejos de cobre(II) que presentan actividad biológica en células cancerosas: las Casiopeínas® y los compuestos basados en tinidazol. Aquí se consideran tres enfoques diferentes que nos permiten abarcar las oportunidades de acción de estos compuestos a un nivel biológico: (1) la interacción con especies reductoras tioladas, que lleva al estrés oxidativo celular; (2) la identificación de los átomos necesarios para la actividad biológica de los compuestos, llamado farmacóforo; y (3) la descripción del primer sitio de reconocimiento cuando los complejos de cobre(II) presentan una geometría tetraédrica.

En la primera sección se muestra el análisis de la reacción entre las Casiopeínas® y la especie tiolada cisteína, conduciendo a la elucidación de un intermediario no reportado mediante el uso de diversas técnicas espectroscópicas que son soportadas por resultados computacionales. Dicho intermediario de reacción conduce a una transferencia electrónica entre los átomos de cobre y azufre que resulta en la formación de un enlace disulfuro entre dos especies tioladas y en la reducción del complejo hasta un átomo de cobre(I). El conjunto de estos resultados lleva a la propuesta de un mecanismo para la reacción entre las Casiopeínas y la cisteína.

El siguiente apartado muestra la identificación de los átomos y enlaces que son significativos para actividad biológica, es decir, el farmacóforo o sitio farmacofórico. Para ello se construyeron modelos de Relación Cuantitativa Actividad-Estructura (QSAR) que describen la relación entre la actividad biológica en líneas celulares HeLa y HCT-15 de 31 compuestos de cobre(II) con una serie de descriptores topológicos atómicos que derivan de la densidad electrónica. Los mejores modelos muestran una estrecha relación entre la actividad biológica y el momento dipolar y la deslocalización electrónica en los enlaces C-N de los ligantes coordinados al metal, por tanto, se propone a dichos enlaces como el farmacóforo de los compuestos de cobre(II) estudiados.

Finalmente, con el fin de analizar la interacción de los compuestos de cobre(II) basados en tinidazol con el ADN se realizaron dinámicas moleculares. Mediante este estudio se identificó que la geometría tetraédrica en los compuestos conduce a una interacción directa del metal con los átomos de oxígeno de los grupos fosfato de la cadena de ADN, siendo este el primer sitio de reconocimiento para la familia de compuestos basados en tinidazol. Además, un análisis de la conectividad entre los complejos y el ADN permitió reconocer que la mayor contribución en la interacción se da por los enlaces de hidrógeno entre la Desoxirribosa y las secciones alifáticas del tinidazol.

Las tres aproximaciones nos dan detalle de cómo pueden darse los fenómenos responsables de la actividad biológica de los compuestos de cobre(II) unido a átomos donadores de oxígeno y nitrógeno, ya que por una parte se contribuye a la explicación del estrés oxidativo en las célula, y por otra se explica la interacción directa de los compuestos con el ADN, ambos observados experimentalmente.

1. Introducción

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud^[1], cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, y se caracteriza por la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, este último proceso se denomina metástasis y es la principal causa de muerte por cáncer.

Además, se ha reportado que el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, con casi 10 millones de fallecimientos en 2020^[2], divididos principalmente en los siguientes tipos: pulmonar (1.8 millones), de colon (935 000), hepático (830 000), gástrico (769 000) y de mama (685 000). Hablando de nuevos casos reportados en 2020, los principales tipos son: de mama (2.26 millones), pulmonar (2.21 millones), de colon (1.93 millones), de próstata (1.41 millones), de piel (no melanoma, con 1.20 millones) y gástrico (1.09 millones).

El cáncer se desarrolla debido a factores genéticos sumados a agentes externos físicos (como la radiación ultravioleta), químicos (por ejemplo, los componentes del humo de tabaco y el arsénico) y biológicos (tales como virus, bacterias y parásitos).

Dependiendo del tipo de cáncer, de una detección temprana y de un tratamiento adecuado, la probabilidad de recuperación puede aumentar. Sin embargo, el tratamiento para cada tipo de cáncer es muy específico, en algunos casos es posible curarlo por completo y en otros se busca simplemente prolongar la vida con cierta calidad. Actualmente, los tratamientos más usados son radioterapia, quimioterapia y/o cirugía.

Debido a que las terapias que se utilizan hoy en día no son completamente efectivas en todos los casos, o son tratamientos agresivos para el paciente, la química medicinal busca nuevas alternativas.

Desde el descubrimiento de la actividad antineoplásica del Cisplatino, un metalofármaco, se ha buscado un efecto similar o mayor con una menor toxicidad. Por lo cual, las propuestas de nuevos fármacos están dirigidas al uso de metales esenciales para nuestro organismo, entre los que se encuentra el cobre.

A la fecha se han reportado diversos compuestos de cobre(II) que presentan actividad frente a líneas celulares cancerosas, entre ellos se encuentran aquellos que tienen ligantes donadores de nitrógeno, aminoácidos y derivados de azoles, entre los que se encuentran las Casiopeínas[®] y los compuestos derivados de tinidazol.

En este trabajo se pretende resaltar la importancia de conocer la interacción entre un fármaco y su sitio de reconocimiento, enfocándonos en compuestos de coordinación de cobre(II) con actividad antineoplásica, mediante el estudio de diversas áreas que comprenden su mecanismo de acción a nivel biológico, y haciendo uso de técnicas computacionales.

2. Antecedentes

A continuación, se dará una breve reseña sobre los conceptos y datos históricos que han conducido al desarrollo de la Química Inorgánica Medicinal, además de la importancia del uso de la Química Computacional para el estudio de la interacción entre fármacos y sus blancos. Un hecho importante a resaltar es el descubrimiento del Cisplatino como agente anticancerígeno, y cómo éste fue el comienzo del desarrollo de compuestos inorgánicos con diversas propiedades biológicas, llegando al uso de los compuestos de cobre(II) como una propuesta prometedora en el tratamiento de cáncer.

2.1 Química inorgánica medicinal

La química inorgánica medicinal se define como el campo concerniente a los iones metálicos en el cuerpo humano, incluyendo los agentes terapéuticos y de diagnóstico basados en metales, y también la comprensión del metabolismo y modo de acción.^[3] Partiendo del hecho de que diversos iones metálicos cumplen funciones a nivel biológico, se ha estimulado el estudio de terapias o fármacos a base de metales. Químicamente hablando, los centros metálicos, al estar cargados positivamente, pueden unirse a regiones con un exceso de densidad electrónica en las biomoléculas; de tal forma que, los constituyentes de las proteínas y los ácidos nucleicos ofrecen dichos sitios en donde los iones metálicos pueden unirse. A pesar de que la industria farmacéutica está dominada por compuestos orgánicos, el descubrimiento de la actividad del cisplatino como un tratamiento para el cáncer ha abierto un sin número de posibilidades para el estudio de complejos metálicos.

La acumulación de metales en el organismo puede conducir a efectos no deseados, por lo que es importante considerar también la biodistribución y especificidad farmacológica. Es por ello que los candidatos a fármacos deben demostrar respuestas fisiológicas favorables en estudios *in vitro* e *in vivo*; pero sobre todo, es crucial comprender el mecanismo de cómo los complejos metálicos logran sus actividades, lo cual también resulta útil en el posterior diseño de nuevos compuestos con una actividad mejorada.^[4] Los avances en química de coordinación medicinal dependen, en gran medida, de entender tanto la termodinámica (estructuras y equilibrios) como la cinética y mecanismos de las reacciones de los metales en complejos, especialmente bajo condiciones biológicamente relevantes.^[5]

Guo y Sadler^[5] hicieron una recopilación de los metales usados en medicina, abarcando desde su uso en diagnóstico hasta su uso como agentes terapéuticos. Algunos de los compuestos que mencionan son:

- *Agentes de contraste en Resonancia Magnética*: algunos contienen Gd^{III} , Mn^{II} o Fe^{III} , debido al gran número de electrones desapareados que contienen (7, 5 y 5, respectivamente, en alto espín) y a los tiempos largos de relajación del espín electrónico. Cuatro compuestos de Gd^{III} han sido aprobados para uso clínico: contienen los ligantes DTPA (Magnevist), DOTA (Dotarem), BMA-DTPA (Omniscan) y HP-DOTA (Prohance), y son usados en la detección de anomalías en la barrera hematoencefálica.
- *Radiofármacos*: se centran en los emisores de rayos γ de alta intensidad, como ^{99m}Tc y ^{201}Tl , en el diagnóstico de imagen se hace uso de ^{111}In , ^{67}Ga , ^{51}Co , ^{51}Cr y ^{169}Yb , mientras que en el caso de terapias se utilizan emisores β como ^{89}Sr , ^{153}Sm y ^{186}Re . Algunos radiofármacos de ^{99m}Tc se utilizan en diagnóstico clínico, por ejemplo, el complejo [$^{99m}Tc^V(dl-hm-pao)$], comercialmente

conocido como Ceretec, que es un agente de obtención de imágenes de perfusión cerebral aprobado para la evaluación de accidentes cerebrovasculares.

- *Agentes antiinfecciosos*: debido a su actividad en bajas concentraciones y su poca toxicidad, la plata y sus compuestos se han utilizado como agentes antimicrobianos, por ejemplo, la sulfadiazina de plata(I), que se utiliza como agente antimicrobiano y antifúngico. Dos complejos de Sb^V, el antimonioato de *N*-metilglucamina (Glucantime) y el estibogluconato de sodio (Pentostam), son usados en el tratamiento de leishmaniasis, enfermedad causada por parásitos intracelulares.
- *Sistema Cardiovascular*: el complejo de Fe^{II}, de bajo espín, con nitroprusiato sódico se utiliza para disminuir la presión sanguínea en humanos. Su efecto hipotenso es notable después de segundos de la administración obteniendo la presión deseada después de uno o dos minutos. Es útil también en casos de hipertensión de emergencia, ataques al corazón y cirugías.
- *Agentes anticáncer*: los complejos de platino son los fármacos que más se utilizan en el tratamiento de cáncer. Se han aprobado para uso clínico cuatro compuestos inyectables de Pt^{II}: Cisplatino [Pt(NH₃)₂Cl₂], Carboplatino [Pt(NH₃)₂(CBDCA-*O,O'*)], Nedaplatino (complejo con glicolato) y el Oxaloplatino (complejo con oxalato, *I-OHP*, con *R,R*-1,2-diaminociclohexano, DACH). Estos fármacos son efectivos en combinación con quimioterapia en casos avanzados de cáncer de pulmón, de colon y de ovario.

Haciendo un recuento histórico, Thompson^[3] propone que las moléculas que han sido clave en el desarrollo de terapias y diagnósticos basados en metales son las que se muestran en la Tabla 2.1, cabe mencionar que algunas de ellas ya no están en uso clínico pero la mayoría de ellas lo está hoy en día.

Año	Compuesto	Función
1780	Subsalsalato de Bismuto (PeptoBismol)	Dispepsia
1890	Dicianuro de potasio y oro(I)	Antibacterial
1910	Arsfenamina	Sífilis
	Sulfato de Bario	Contraste en Rayos X
1949	Carbonato de Litio	Transtorno bipolar
1961	Pertecnecato ^{99m} Tc	Diagnóstico de cáncer de tiroides
1971	Cisplatino	Cáncer testicular
1980	Auranofina	Artritis reumatoide
1988	Magnevista	Contraste en Imagen por Resonancia Magnética
1997	¹⁵³ Sm-EDTMP	Alivio del dolor del cáncer de hueso
2004	Carbonato de lantano	Enfermedad renal en etapa terminal

Tabla 2.1. Moléculas clave en el desarrollo de los agentes terapéuticos y de diagnóstico basados en metales.

En definitiva, el acontecimiento más significativo hasta el momento ocurrió en 1970, cuando Rosenberg y VanCamp descubrieron al Cisplatino como un agente terapéutico para diversos tipos de cáncer.^[6-8] En la actualidad, el Cisplatino, *cis*-diamindicloro-platino(II) o [*cis*-Pt^{II}(NH₃)₂Cl₂] (Figura 2.1), es uno de los fármacos contra cáncer más usados en distintos tipos de la enfermedad, principalmente en cáncer testicular con una efectividad superior al 90%.^[4] Se sabe que este fármaco ingresa a la célula por difusión pasiva, y que su citotoxicidad se debe a los enlaces covalentes cruzados que forma con el ADN, generando así una distorsión completa en la hélice que resulta en la inhibición de la replicación y transcripción.^[9]

Sin embargo, el éxito clínico del cisplatino está limitado por sus efectos secundarios y a una resistencia adquirida o intrínseca.^[4] Eso ha conducido al diseño de nuevos agentes basados en platino buscando mejorar su actividad biológica, a la fecha algunos de ellos ya están en uso.

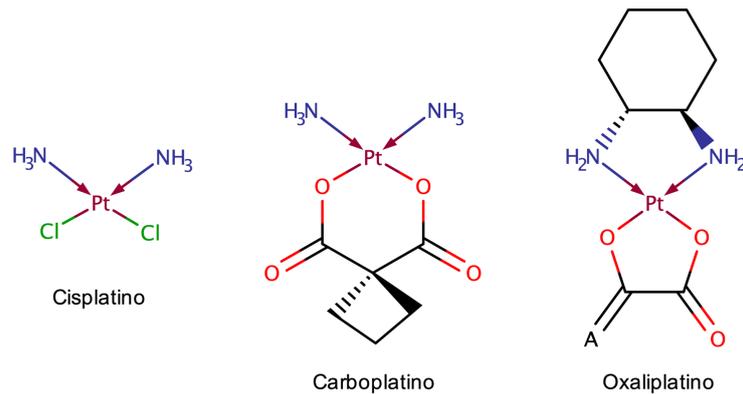


Figura 2.1. Cisplatino y sus derivados usados en el tratamiento de cáncer.

Los compuestos de platino que han mostrado actividad antitumoral deben tener dos ligantes amino en posición *cis*, ya que los isómeros *trans* han mostrado ser clínicamente ineficaces.^[9] Por ejemplo, el Carboplatino (*cis*-diamino(ciclobutano-1,1'-dicarboxilato-O,O')platino(II), representado en la Figura 2.1), ha logrado reducir la toxicidad pero muestra resistencia cruzada con el Cisplatino.^[10] El caso del Oxaliplatino (*trans*-L-diamino(ciclociclohexano-oxalato)platino(II), representado en la Figura 2.1), mostró falta de resistencia cruzada; además en Estados Unidos se ha usado para tratar el cáncer de colon y fue aprobado para usarse en Europa y China.^[11,12]

Como resultado de la toxicidad del platino(II), se buscaron alternativas con otros centros metálicos, como el rutenio y el oro. En el caso de rutenio, muchos compuestos en estados de oxidación 2+ o 3+ han mostrado actividad antitumoral, especialmente en cánceres metastásicos debido a que interfieren con la actividad colagenolítica de tipo IV y reducen el potencial metastásico de los tumores. Los complejos de Ru^{II} más estudiados son el *Natrans*-[Ru(Im)(Me₂SO)Cl₄] (NAMI) y su análogo (ImH)*trans*-[Ru(Im)(Me₂SO)Cl₄] (NAMI-A).^[13]

Hablando de los complejos con oro(I), además de ser útiles en el tratamiento de artritis reumatoide, han mostrado actividad antitumoral *in vivo* en algunas líneas celulares resistentes al Cisplatino, por ejemplo los complejos de Au^I con los ligantes 1,2-bis(difenilfosfino)etano y 1,2-bis(dipiridilfosfino)etano^[14]. En este caso, su citotoxicidad se debe a su habilidad de alterar la función mitocondrial e inhibir la síntesis de proteínas. Además, algunos complejos de Au^{III} también son buenos candidatos como agentes anticáncer, por ejemplo con ligantes multidentados como etilendiamina y dietilendiamina^[15], o ligantes bispiridil como la bipyridina^[16].

Sin embargo, ninguno de estos metales es esencial para nuestro organismo y, por tanto, no se tienen mecanismos de homeostasis a nivel biológico. Por ende, hoy en día es común el uso de agentes terapéuticos que en su conformación tengan metales esenciales para el organismo, reduciendo en gran medida la toxicidad que pudieran generar y contribuyendo a una fácil excreción del organismo. Recientemente la investigación en compuestos antitumorales se ha enfocado en metales esenciales como hierro, cobalto, manganeso y cobre.^[17-24] El metal esencial objeto de este trabajo es el cobre, el cuál se abordará en la siguiente sección.

2.2 Cobre

La configuración electrónica del átomo de cobre tiene un solo electrón fuera de la capa 3d completamente llena, es decir, es $[\text{Ar}] 4s^1 3d^{10}$. Al tener dicho acomodo electrónico, podemos pensar en dos estados de oxidación preferidos: 1+ y 2+. La estereoquímica de los estados de oxidación más importantes del cobre se muestra en la Figura 2.2. Algunos ejemplos para estos estados de oxidación, con su geometría, son:

- **Cu^I**: tetraédrica, como $\text{CuI}_{(s)}$ y $[\text{Cu}(\text{CN})_4]^{3-}$.
- **Cu^{II}**: cuadrada plana, como $\text{CuO}_{(s)}$, $[\text{Cu}(\text{py})_4]^{2+}$ y $[\text{CuCl}_4]^{2-}$; octaedro distorsionado con dos enlaces *trans* más grandes, como $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ y $\text{CuCl}_2_{(s)}$; y tetraédrica, como $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$.

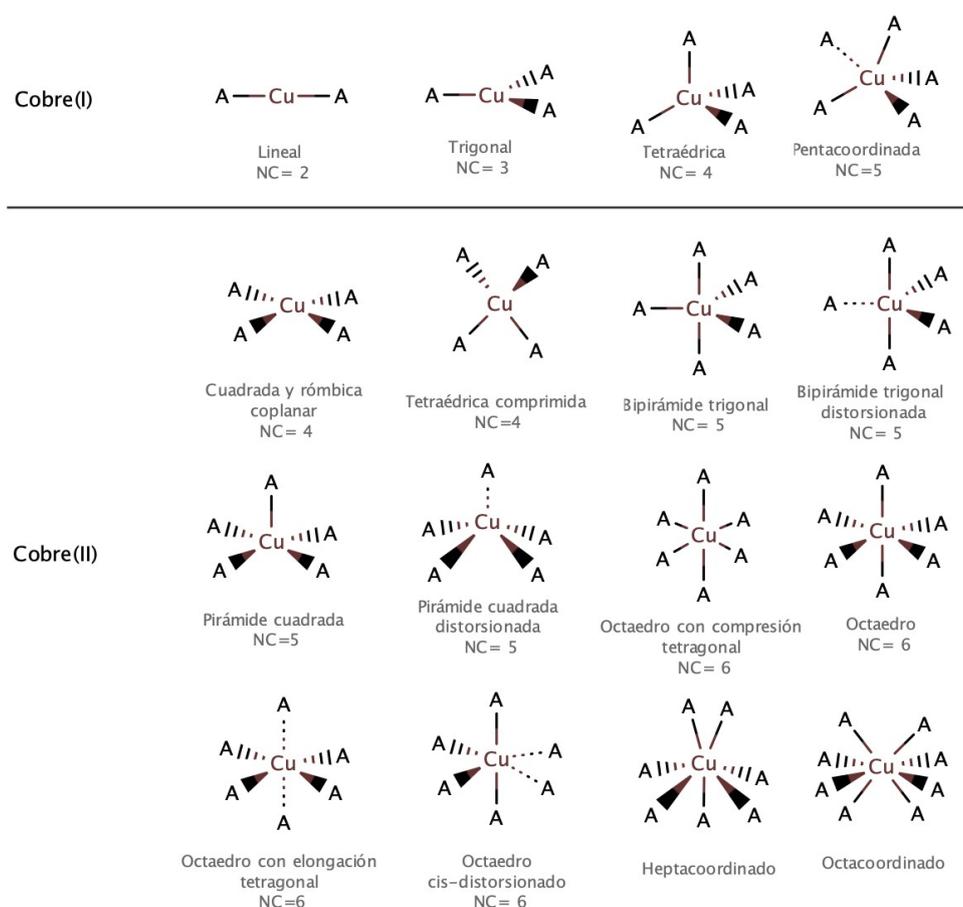
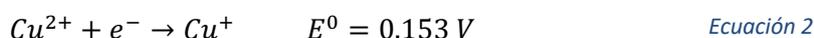


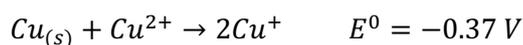
Figura 2.2. Geometrías preferidas por el cobre(I) y (II), donde A= ligante y NC= número de coordinación del centro metálico. Replicada de *Tisato, et al.*^[25]

Los compuestos de cobre(I) son diamagnéticos y, a excepción de que el anión o las bandas de transferencia de carga den el color, son incoloros. Los más comunes son con ligantes halogenuro o aminas, con una geometría típica tetraédrica.^[26]

Las estabilidades relativas de los estados Cu^I y Cu^{II} pueden indicarse a través de los potenciales:



Desde los cuales podemos ver que:



Ecuación 3

$$K = \frac{[\text{Cu}^+]^2}{[\text{Cu}^{2+}]} = \sim 10^6$$

Sin embargo, estas estabilidades relativas dependen en gran medida de la naturaleza de los aniones o ligantes presentes, y varían considerablemente con el disolvente o la naturaleza de los átomos vecinos en un cristal.^[26]

El ion Cu^{I} existe sólo a bajas concentraciones ($<10^{-2}$ M) en solución acuosa. Para que los compuestos de cobre(I) sean estables en agua deben ser altamente solubles, como CuCl o CuCN . Dicha inestabilidad en agua se debe en gran medida a grandes valores en las energías reticulares y de solvatación, además de las grandes constantes de formación para los complejos de Cu^{II} , lo que resulta en la inestabilidad de los compuestos iónicos derivados de Cu^{I} . La mayoría de los compuestos de Cu^{I} se oxidan rápidamente a Cu^{II} , pero la oxidación al siguiente estado, Cu^{III} , es difícil. Por tanto, la química en solución del ion Cu^{II} está muy bien definida, existiendo una gran variedad de sales solubles en agua, como $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ y CuSO_4 , y complejos formados con dicho ion, como $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$.^[26]

Se identifica un ambiente con simetría cúbica (por ejemplo, una geometría octaédrica o tetraédrica) como consecuencia de la configuración d^9 en un átomo de Cu^{II} , sujeta a distorsiones. Hablando de una geometría octaédrica, la distorsión característica indica que el cobre estará unido a cuatro enlaces cortos Cu-L en el plano, y a dos enlaces *trans* elongados. Este fenómeno es conocido como efecto Jahn-Teller.^[26]

A diferencia de los compuestos incoloros de Cu^{I} , la disolución de sales de Cu^{II} en medios ácidos da lugar a la formación del ion con agua que presenta un color azul-verdoso ($[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$). Al añadir ligantes a esta especie podemos llevar a cabo la formación de complejos, mediante la sustitución de las moléculas de agua. Incluso, ligantes multidentados que se coordinan al cobre a través de átomos donadores como O y N, como es el caso de aminoácidos, pueden conducir a la formación de complejos considerablemente estables.^[26]

Los compuestos de cobre pueden catalizar una increíble variedad de reacciones: heterogéneas, homogéneas, en fase vapor, en solventes orgánicos, y por supuesto, en solución acuosa. Muchas de estas reacciones, especialmente en solución acuosa, involucran procesos de oxidación-reducción, es decir, un par redox $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{II}}$. En algunos de estos casos se utiliza oxígeno molecular como oxidante, por ejemplo, en la oxidación catalizada por cobre del ácido ascórbico y en el proceso Wacker. Además, el cobre(II) es muy importante en aspectos bioquímicos.^[26]

El cobre es un cofactor esencial y/o un componente estructural en muchas enzimas importantes en las plantas y animales, prueba de ello son las enzimas que dependen de él y participan en diversos procesos biológicos y que se muestran en la Tabla 2.2.^[27]

La deficiencia nutricional de cobre da lugar a problemas como anemia, neuropatías y deterioro en la respuesta inmune. Mientras que la ingesta de cobre en grandes cantidades puede provocar náusea, vómito, dolor de cabeza, diarrea, anemia hemolítica, hemorragia gastrointestinal, falla en el hígado y riñón, incluso la muerte.^[27]

La presencia de cobre en el cuerpo está relacionada a dos padecimientos importantes, el primero de ellos corresponde a la enfermedad de Menkes, que se debe a la deficiencia genética de cobre; mientras que el segundo, corresponde a la enfermedad de Wilson, generada a partir de una

sobrecarga genética de cobre. Además, las alteraciones en los procesos de excreción del cobre han sido asociadas con enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y la enfermedad de Huntington, aunque el rol exacto del metal aún no está claro.^[27]

Enzima	Función
Citocromo c oxidasa	Fosforilación oxidativa
Cu,Zn superóxido dismutasa (SOD1)	Desintoxicación y señalización del superóxido
Ceruloplasmina (Cp)	Ferroxidasa
Lisil oxidasa (LOX)	Reticulación de colágeno y elastina
Tirosinasa	Síntesis de melanina
Dopamina-β-monooxigenasa (DβM)	Síntesis de noradrenalina
Enzima α-amidante de peptidilglicina (PAM)	Activación de hormonas peptídicas
Cobre amina oxidasa	Desaminación de aminas
Hefestina	Ferroxidasa
Factores de coagulación V y VIII	Coagulación de la sangre

Tabla 2.2. Enzimas dependientes de cobre en mamíferos.

Homeostasis de cobre celular

Las células han creado mecanismos para regular la concentración de cobre presente en ellas, tomando en cuenta la concentración requerida a nivel celular y la potencial toxicidad del metal. Muchos de los componentes involucrados en la homeostasis del cobre celular son bien conocidos, estos incluyen transportadores que se encargan de mediar la captación y salida de cobre, biomoléculas que secuestran y almacenan cobre, y proteínas especializadas llamadas chaperonas que guían al cobre a enzimas que dependen de él o a organelos que lo requieran. La Tabla 2.3 muestra las principales proteínas involucradas en la homeostasis del cobre.^[27]

Proteína	Función
Receptor transportador de cobre 1 (Ctr1)	Captación
Receptor transportador de cobre 2 (Ctr2)	Captación
Transportador metálico divalente 1 (DMT1)	Captación
Chaperona para superóxido dismutasa (CCS)	Tráfico intracelular
ATOX1	Tráfico intracelular
Cox17	Tráfico intracelular
Glutatión (GSH)	Tráfico intracelular, almacenamiento y desintoxicación
Metalotioneínas (MT)	Almacenamiento y desintoxicación
ATP7A	Exportación
ATP7B	Exportación

Tabla 2.3. Proteínas involucradas en la homeostasis del cobre en mamíferos.

La acumulación de cobre en el citosol induce un riesgo de daño oxidativo mediado por cobre y la unión de cobre a biomoléculas esenciales. Sin embargo, se ha calculado que en condiciones fisiológicas la

concentración de cobre libre en las células es de aproximadamente 10^{-18} M, lo que significa menos de un ion cobre libre por célula. Esta baja concentración de cobre libre se mantiene debido a la unión del metal a metalotioneínas (MTs) y a ligantes de bajo peso molecular como glutatión (GSH). MTs y GSH también son las moléculas que más se involucran en el secuestro y almacenamiento del exceso de cobre intracelular. Además, se ha sugerido que la mitocondria contribuye a la capacidad amortiguadora del cobre celular.^[27]

El tripéptido glutatión es la molécula tiolada con bajo peso molecular más abundante en células, estando presente en concentración milimolar. Además, el GSH es esencial para la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno, también ayuda a mantener el potencial de reducción de tior celular en un estado fuertemente reducido y participa en la regulación y señalización redox. También ha sido ligado al transporte y la desintoxicación de iones metálicos, incluyendo el cobre. De hecho, la mayoría de cobre citosólico está unido a GSH, y se cree que el cobre en forma de complejo $\text{Cu}^1\text{-GSH}$ es un contribuyente importante a la reserva intercambiable de cobre en el citosol. Sumado a eso, el GSH puede participar en la homeostasis del cobre celular regulando las actividades de las proteínas transportadoras de cobre, tales como ATP7A y ATP7B mediante glutationilación/deglutinationilación.^[27]

Compuestos antineoplásicos de cobre

La actividad citotóxica de un complejo metálico, que se relaciona en gran medida con su actividad antitumoral, es controlada por la identidad del metal, su estado de oxidación y las propiedades de los ligantes coordinados; sin embargo, en la mayoría de los casos, solo uno de dichos factores domina.^[28]

En el caso del cobre, la geometría adoptada dependerá en mayor medida de los ligantes coordinados al centro metálico ya que éste puede unirse fácilmente a átomos donadores como O, N y S. Algunos trabajos^[21,23,25,28] han recopilado los compuestos antineoplásicos de cobre reportados en los últimos 40 años, clasificándolos de acuerdo con los ligantes coordinados en cinco grupos; a continuación, se resaltan algunos ejemplos significativos de cada grupo citados en dichos trabajos y se esquematizan en la Figura 2.3:

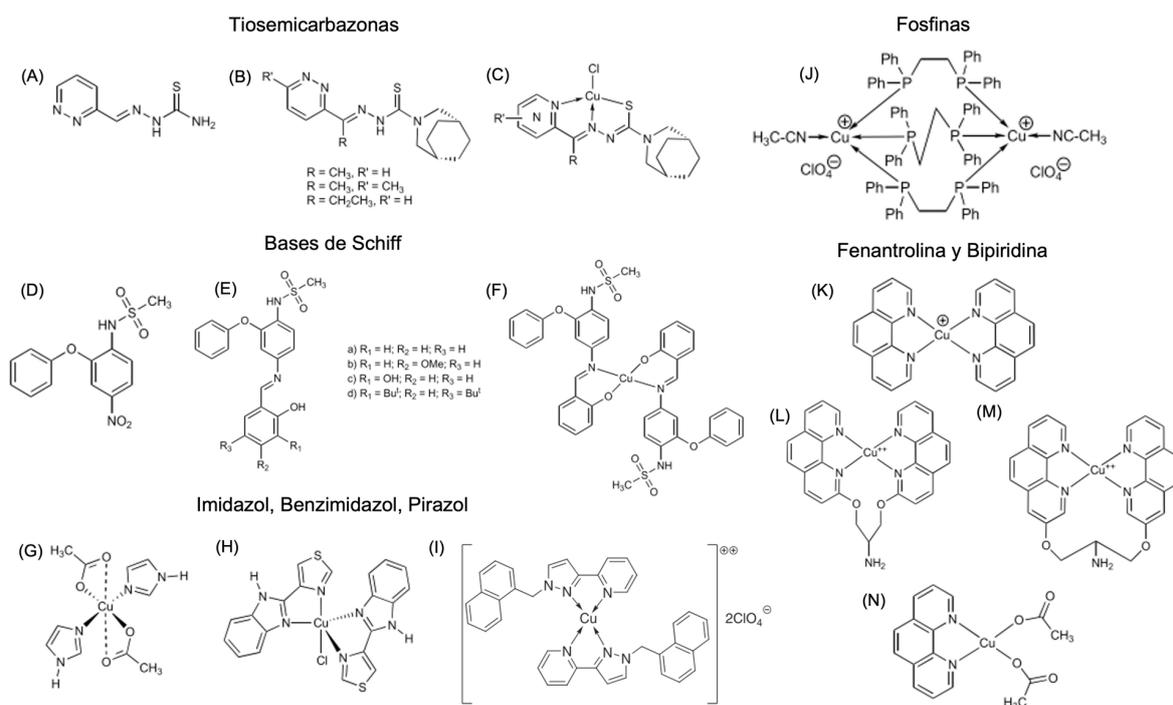


Figura 2.3. Ejemplos de compuestos antineoplásicos de cobre.^[21,23,25,28]

1. Tiosemicarbazonas

Se ha reportado la actividad anticancerígena de los compuestos tiosemicarbazonas desde los años 60s (Figura 2.3-A y B), eso condujo al diseño de compuestos con cobre (Figura 2.3-C) unidos a ligantes derivados de ellos que inhiben la proliferación de tumores en diversas líneas celulares, como CCRF-CEM de leucemia linfoblástica y HT-29 de adenocarcinoma de colon, con una concentración mucho menor ($CI_{50} = 0.004-1.51 \mu\text{M}$ en HT-29) a las del ligante solo ($CI_{50} = 0.011-2.22 \mu\text{M}$ en HT-29).^[29]

2. Bases de Schiff

La nimesulida (Figura 2.3-D) ha mostrado ser un buen inhibidor de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), por lo cual se han diseñado derivados (Figura 2.3-E) y complejos de cobre con ellos (Figura 2.3-F). En este caso se analizó la inhibición del crecimiento de líneas celulares tumorales pancreáticas BxPC-3 (COX-2 positivo) y MiaPaCa (COX-2 negativo), resultando en que el complejo inhibe el crecimiento en mayor medida ($CI_{50} = 3-26 \mu\text{M}$ para COX-2 positivo y $CI_{50} = 5-9 \mu\text{M}$ para COX-2 negativo) en comparación al ligante solo ($CI_{50} = 35 \mu\text{M}$ para COX-2 positivo y $CI_{50} > 100 \mu\text{M}$ para COX-2 negativo).^[30]

3. Donadores de N como Imidazol y sus derivados

Al identificar que el complejo [*trans*-bis(acetato)bis(imidazol)] de Cu^{II} (Figura 2.3-G) tenía una fuerte actividad antitumoral en la línea celular B16 de melanoma murino^[31], se han probado distintos complejos derivados del imidazol, benzimidazol, pirazol y triazol, una familia de compuestos orgánicos que presentan diversas actividades a nivel biológico.

El benzimidazol presenta actividad antibacteriana, antiviral, anticáncer y antifúngica. Uno de sus derivados, el 2-(4-tiazolil)benzimidazol o tiabendazol (HTBZ), y su especie coordinada al cobre, el $[\text{Cu}(\text{HTBZ})_2(\text{NO}_3)_2]$ (Figura 2.3-H: especie con cloro en lugar de nitro), ha sido probado en líneas celulares humanas de carcinoma de lengua (CAL-27) y melanoma de piel (SK-MEL-31), mostrando una mejora significativa cuando el centro metálico está presente.^[32]

En el caso del pirazol, se reportaron complejos de Cu^{II} y Zn^{II} con el ligante 2-[1-(naftalen-1-ilmetil)-1H-pirazol-3-il]piridina y ClO_4 (Figura 2.3-I); para los cuales, el complejo de cobre mostró mayor afinidad con el ADN y mayor citotoxicidad en líneas celulares humanas de leucemia (HL-60), cáncer de estómago (BGC-823) y cáncer de mama (MDA5), comparado con el ligante solo y el complejo de zinc.^[33] Sustituyendo el ClO_4 por NO_3 en el complejo de Cu^{II} , se evaluaron 6 líneas celulares más (HL-60, PC-3M-1E8, BCG-832, MDA, Bel-7402 y HeLa) mostrando concentraciones inhibitorias considerables y especificidad citotóxica.^[34]

4. Fosfinas

El primer compuesto introducido en el ámbito medicinal fue el Auranofín, trietilfosfina de (2,3,4,6-tetra-6-acetil-1-tio- β -D-glucopiranosato-S) de oro, útil en el tratamiento de artritis reumatoide.^[35] Posteriormente, se demostró que también presentaba actividad citotóxica y antitumoral.^[36] Se ha reportado que los compuestos con la fórmula $[\text{M}(\text{P-P})_2][\text{Cl}]$ (donde $\text{M} = \text{Au}^{\text{I}}, \text{Ag}^{\text{I}}$ y Cu^{II} , y P-P puede ser 1,2-bis(difenilfosfina)etano, 1,2-bis(difenilfosfina)propano, 1,2-bis(difenilfosfina)etileno) muestran actividad citotóxica en líneas celulares de leucemia murina (P388), melanoma (B16) y sarcoma de células de retículo (M5076).^[37] En el caso de los complejos de cobre derivados de propano y etileno se observó que su actividad es comparable a la del ligante solo, sin embargo, es hasta 20 veces más potente que sus análogos con Au^{I} . Un derivado de etano (Figura 2.3-J) ha mostrado gran actividad

citotóxica en células de carcinoma de pulmón (H460), con CI_{50} comparables al fármaco Adriamicina, un agente intercalante en el ADN.

5. Donadores de N como fenantrolina y bipyridina

Desde los años 70s se ha estudiado a detalle la actividad nucleasa del complejo bis-1,10-fenantrolina con cobre(II) (Figura 2.3-K), identificando que la presencia de agentes reductores y oxígeno molecular son esenciales para el proceso.^[38] Posteriormente, se identificó que dicho complejo induce apoptosis en líneas celulares de carcinoma de hígado (Bel-7402), y tiene una potente actividad citotóxica en líneas celulares de leucemia (HL60) y de estómago (SCG-7901), inhibiendo hasta un 90% el crecimiento celular.^[39,40] Con el fin de buscar una mejor actividad, se diseñaron algunos derivados del complejo bis de fenantrolina, como los compuestos $[Cu(2-Clip-phen)]^{2+}$ y $[Cu(3-Clip-Phen)]^{2+}$ (Figura 2.3-L y M, respectivamente), en donde se puentean los ligantes aromáticos mediante un grupo serinol^[41], o aquellos en donde se sustituye una de las fenantrolinas por otros ligantes donadores de oxígeno o nitrógeno, como ácido salicílico, ácido malónico, ácido acético (Figura 2.3-N), aminoacidatos, etc.; o en su defecto, reduciendo la aromaticidad de la fenantrolina al sustituirla por el ligante bipyridina^[42,43].

Estos reportes abrieron un nuevo panorama en el estudio de compuestos derivados de 1,10-fenantrolina y de bipyridina que presentan actividad nucleasa, citotóxica, antitumoral y antineoplásica; ejemplo de ello son los compuestos de cobre que se utilizan en este trabajo, los cuales pueden clasificarse dentro de los grupos 3 y 5, y se mencionan en seguida.

En este trabajo se estudiaron dos familias diferentes de complejos con propiedades importantes en común, como: el metal y su estado de oxidación, la coordinación a ligantes donadores de nitrógeno, y una actividad biológica que sugiere su acción directa sobre el ADN o mediante la generación de especies reactivas de oxígeno. Primero se hablará de los compuestos de la familia Casiopeínas®, creados desde los años 80s, para posteriormente hablar de unos compuestos que están basados en el ligante orgánico Tinidazol, reportados recientemente pero que hasta el momento han mostrado resultados prometedores en su acción con el ADN.

Casiopeínas®

Consisten en una familia de compuestos de Cu^{II} con geometría plano cuadrada ligeramente distorsionada, que tienen la fórmula general $[Cu(N-N)(O-O)]NO_3$ o $[Cu(N-N)(O-N)]NO_3$ (Figura 2.4), y que han sido patentados bajo el nombre de Casiopeínas®, donde N-N son ligantes bidentados donadores de nitrógeno (o diiminas), O-O son ligantes bidentados donadores de oxígeno, y O-N son ligantes bidentados donadores de oxígeno y nitrógeno.^[44-47]

El diseño de las moléculas se basó en tres factores principales: (a) utilizar un metal esencial con el fin de disminuir la toxicidad, (b) buscar la coordinación a ligantes quelatos que favorecieran una configuración *cis* para el centro metálico, y (c) considerar diferentes grados de hidrofobicidad, con el fin de favorecer la absorción y distribución a nivel biológico. En el caso de los donadores N-N, etiquetados como ligante primario, se eligieron la 1,10-fenantrolina (Figura 2.4-A) y la 2-2'-bipyridina (Figura 2.4-B y C) y sus derivados sustituidos, siendo la diferencia entre ellos un ciclo aromático que pudiera beneficiar en el proceso de interacción con el ADN. Para los donadores O-N, etiquetados como ligante secundario, se eligieron α -L-aminoácidos o péptidos (Figura 2.4-A) debido a su baja toxicidad y gran afinidad al cobre ya unido a los ligantes primarios. Y, en cuanto a los donadores O-O, como una alternativa de ligante secundario, se eligieron el acetilacetato (Figura 2.4-B) y el salicilaldehidato

(Figura 2.4-C), debido también a su afinidad al cobre unido a los ligandos primarios y a su capacidad de modular las propiedades óxido-reducción del centro metálico.^[28]

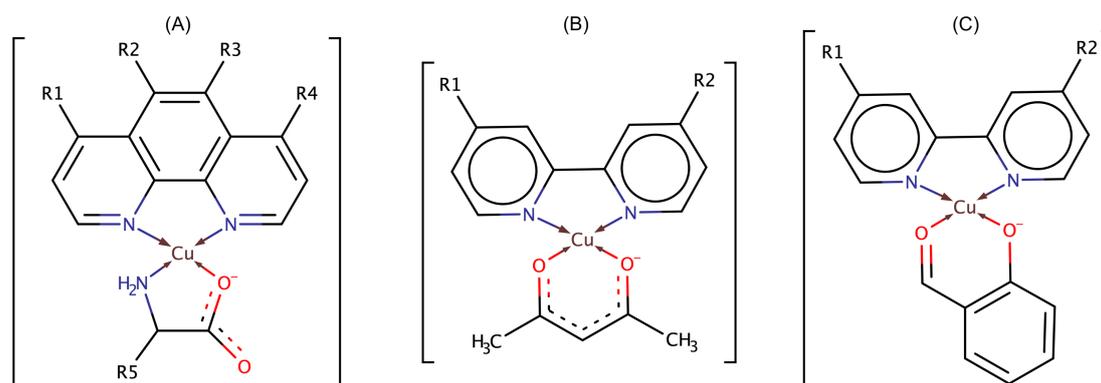


Figura 2.4. Estructura general de los compuestos de cobre(II) de la familia Casiopeínas®.

Esta familia de compuestos ha sido estudiada en modelos *in vitro* e *in vivo*, mostrando actividad antiproliferativa^[48], citotóxica^[49], citostática^[50], genotóxica^[49-51] y antitumoral^[52-54], proponiéndolos como una alternativa prometedora en comparación al Cisplatino (debido a una mejor concentración inhibitoria 50, éstos datos son presentados en la Tabla 5.10). Hoy en día, para esta familia de compuestos se realizan estudios en Fase Clínica I (con pacientes en etapa terminal). Hasta el momento se han desarrollado 5 generaciones de esta familia de compuestos con base metálica de Cu^{II}, cambiando los ligandos secundarios por ligandos neutros (etilendiamina, 2-aminoetil benzimidazol y 4,5-dimetil-o-fenantrolina), ligandos con actividad biológica (indometacina y curcumina), y ligandos tridentados de tipo Bases de Schiff y sus derivados hidrogenados.

Respecto a la actividad antitumoral *in vivo*, se ha probado principalmente en modelos murinos (L1210, S180, B16 y Lw1), en gliomas murinos (C6) y en modelos de tumores xenograftos como carcinoma de colon (HCT-15), mostrando excelentes resultados e identificando que la sustitución en los grupos diimina modifica notablemente la actividad biológica. Desafortunadamente, el modo de acción de las Casiopeínas® aún sigue sin ser completamente elucidado. Algunas evidencias sugieren que la actividad se debe a que los compuestos son capaces de inhibir la proliferación celular y producir muerte celular por apoptosis en modelos de tumores como meduloblastomas, HCT-15 y glioma murino C6.^[28]

Las dos propuestas que dominan en la explicación del mecanismo de acción de las Casiopeínas® son: (1) Un proceso de estrés oxidativo, en donde se observa la disminución en los niveles de glutatión reducido en las células como consecuencia de la generación de especies reactivas de oxígeno mediante una reacción tipo Fenton del compuesto de Cu^{II} en presencia de agentes reductores, generando así el daño mitocondrial y muerte celular.^[55] (2) La interacción directa de los complejos con el ADN, mediante procesos de intercalación en el surco menor y la interacción con los grupos fosfato de la hélice, siendo fundamental la presencia del centro metálico y del ligando primario.^[56,57]

Este trabajo busca seguir contribuyendo al entendimiento del mecanismo de acción de las Casiopeínas®, puesto que se perfilan como una propuesta bastante favorable en el tratamiento de distintos tipos de cáncer. Los resultados relacionados con esta familia de compuestos se discutirán en las secciones Oxidación de cisteína por complejos de cobre(II) y Determinación del Farmacóforo.

Compuestos basados en Tinidazol

Estudios *in vitro* han mostrado que el etil-(5-nitro-2-metil-1-imidazolil)etil sulfona, mejor conocido como tinidazol (tnz) (Figura 2.5-A), presenta actividad contra protozoos patógenos (como *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia duodenalis*), bacterias anaerobias (como *Bacteroides fragilis* y *Clostridium difficile*) y la bacteria microaerofílica *Helicobacter pylori*. Además, ha mostrado tasas de curación mayores al 90% en el tratamiento de pacientes con tricomoniasis, giardiasis, amebiasis y absceso hepático amebiano. Comparando el tinidazol con su análogo el metronidazol, en el caso de tricomoniasis ambos tuvieron una efectividad similar, pero en el caso de giardiasis y amebiasis el primero fue significativamente más efectivo que el segundo. Algunos de los efectos secundarios debido a su ingesta incluyen un sabor amargo, náusea, malestar abdominal, anorexia, vómito y fatiga.^[58]

En el año 2014^[59] se reportó la síntesis de cuatro compuestos derivados de tinidazol y CuCl_2 , ZnCl_2 y ZnBr_2 , en donde las estructuras resultantes están conformadas por el centro metálico coordinado a dos halógenos (bromo o cloro) y a dos ligantes tnz unidos mediante el nitrógeno del imidazol, presentando una geometría tetraédrica. En el caso de la reacción con cloruro de cobre, se aislaron dos conformeros: el producto cinético (Figura 2.5-C) distinguido por un color verde, en donde la cadena flexible del tnz se encuentra extendida; y el producto termodinámico (Figura 2.5-D) de color amarillo y con una conformación doblada en uno de los ligantes tnz debido a una interacción intramolecular de tipo π entre el par libre del átomo de oxígeno del grupo sulfona ($\text{S}=\text{O}$) y el anillo imidazol. Dicha interacción fue confirmada mediante un análisis de difracción de Rayos X, cálculos de estructura electrónica y del potencial electrostático.

Posteriormente, en el año 2017, se sintetizaron más derivados de la misma familia con cobalto(II), cobre(II) y zinc(II) y se analizó su actividad antihelmíntica *in vivo* e *in vitro*.^[60] En los estudios *in vitro*, gusanos monogénicos de tipo *dactylogyridae* fueron expuestos al tnz y los compuestos de coordinación derivados, mostrando que el ligante solo no presentaba actividad y que la concentración efectiva media era menor en el caso de los compuestos de cobre, en comparación a los de cobalto y zinc. Para los estudios *in vivo* se utilizaron peces infectados con *dactylogyridae* a los cuales se administraron los complejos $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$ (Figura 2.5-B), $[\text{Zn}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$ y el tnz solo; en este caso, el compuesto de cobre mostró mejor actividad.

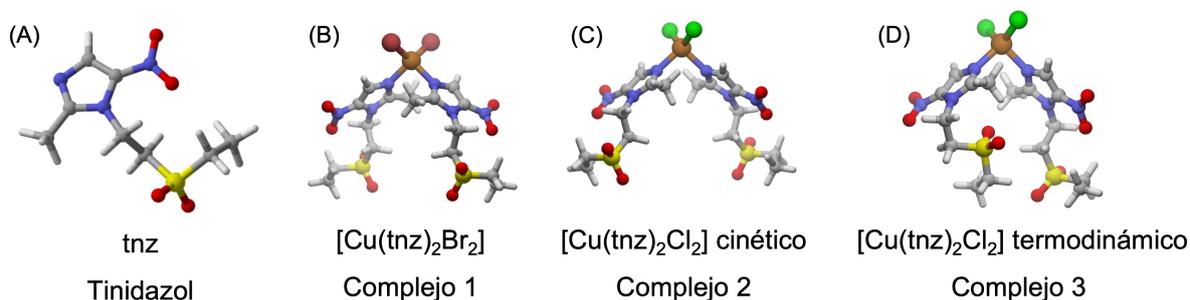


Figura 2.5. Estructura del ligante tinidazol (tnz) y compuestos de cobre(II) basados en tinidazol.

De igual forma, se realizaron estudios de electroforesis en gel para identificar el daño al ADN mediante una reacción tipo Fenton por los compuestos de Cu^{II} basados en tnz. Los resultados mostraron que puede producirse un daño de hasta el 90% al ADN mediante la generación de especies reactivas de oxígeno. Los valores de concentración efectiva para el daño al ADN (CE_{50}) fueron de entre 1.04 hasta 3.33 μM en presencia de H_2O_2 . Además, se realizó un ensayo de viabilidad celular identificando que

los compuestos de Cu^{II} muestran actividad en las líneas celulares de adenocarcinoma de colon (SW620) y adenocarcinoma de mama (MCF-7), a una concentración de 50 μM. El compuesto [Cu(tnz)₂Br₂] y su análogo [Cu(tnz)₂(μ-Cl)Cl]₂ mostraron los mejores valores de citotoxicidad en la línea celular MCF-7, con 28.9 y 9.2 μM respectivamente.^[61]

Todos los trabajos reportados y el hecho de tener un compuesto de Cu^{II} en una geometría tetraédrica, no típica para dicho estado de oxidación, fueron las razones principales para elegir esta familia de compuestos como objeto de estudio para su interacción con el ADN. Los resultados de este análisis se discutirán en la sección Interacción de complejos de cobre(II) tetraédricos con ADN.

2.3 Química medicinal computacional

El rápido desarrollo del cómputo ha permitido su uso en la resolución de ecuaciones matemáticas complejas y analizar desde un punto de vista cuántico estructuras y propiedades físicas de compuestos conocidos, desconocidos, estables o inestables. Incluso, algunas veces los resultados computacionales pueden superar en precisión a los experimentos debido a los errores en el trabajo experimental.^[62] En el caso de la química medicinal y el diseño de fármacos asistido por computadoras, la creación de paquetes con un ambiente gráfico ha permitido visualizar en tres dimensiones las interacciones entre un ligante y su blanco o su sitio de reconocimiento. Un ejemplo más específico es el uso de software que evalúa las interacciones ligante-blanco antes de sintetizarlos, facilitando así el proceso de creación de un nuevo fármaco mediante la síntesis de sólo los compuestos más prometedores, y por supuesto, reduciendo costos experimentales.^[62]

Diversas son las estrategias computacionales que se utilizan en química medicinal, a continuación se mencionan brevemente algunas de ellas y se incluye la Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas debido a que este trabajo busca posicionarla como una herramienta más en el estudio de la interacción entre un ligante y un blanco.

1. Mecánica molecular: Dinámica molecular

La mecánica molecular es uno de los métodos más populares para obtener modelos de sistemas de interés biológico, puesto que es sencillo de usar y requiere considerablemente menos tiempo de cómputo. Los programas de Dinámica Molecular (DM) permiten mostrar la naturaleza dinámica de las moléculas simulando el movimiento natural de los átomos en la estructura dependiendo del tiempo y la temperatura.^[62]

Esta aproximación teórica se basa en la suposición de que las posiciones relativas de los núcleos que forman una estructura son determinadas por las fuerzas de atracción y de repulsión, y que la energía potencial total (E_{total}) de una molécula está dada por la suma de todas las energías de las fuerzas de atracción y repulsión entre los átomos en la estructura. La estructura se representa como esferas con una masa proporcional a su masa atómica, que se unen entre sí mediante resortes que corresponden a los enlaces covalentes en la molécula. Además, no son considerados los aspectos cuánticos del movimiento nuclear, de forma que, se pueden aplicar las leyes de la Física Clásica para calcular la energía potencial de las fuerzas de atracción y repulsión que operan entre los átomos de la estructura.^[63]

Con este modelo, la E_{Total} se expresa en forma de ecuaciones matemáticas llamadas Campos de Fuerza, dichas ecuaciones permiten predecir las energías relativas y las barreras de interconversión de diferentes conformaciones, y generalmente tienen la forma de la Ecuación 4:

$$E_{Total} = \sum E_{stretching} + \sum E_{bend} + \sum E_{torsion} + \sum E_{vdW} + \sum E_{Coulombic} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde $E_{stretching}$ es la energía de estiramiento de enlace, E_{bend} es la energía de enlace debida a los cambios de ángulos, $E_{torsion}$ es la energía de enlace debida a los cambios en la conformación del enlace, E_{vdW} es la contribución total a la energía debido a las fuerzas de van der Waals y $E_{Coulombic}$ son las fuerzas electrostáticas repulsivas y atractivas que operan en la molécula entre átomos con una carga parcial o completa; si es necesario, en algunas ocasiones se cruzan o se añaden términos, por ejemplo para enlaces de hidrógeno.^[62] Para detalles en la forma general de calcular estas expresiones, ver el Anexo II.

En la actualidad hay muchos campos de fuerza que se diferencian en tres aspectos principales: ¿cuál es la forma funcional de cada término de la energía?, ¿cuántos términos cruzados incluyen?, y ¿qué tipo de información es usada para ajustar los parámetros? Eso agrupa a los campos de fuerza en tres tipos:

1. Clase I (también llamados armónicos o diagonales): son los diseñados para tratar sistemas muy grandes, como proteínas o ADN, entonces las formas funcionales se crean lo más simple posible. Eso significa que sólo se utilizan funciones armónicas para $E_{stretching}$ y E_{bend} (o incluso son términos omitidos, forzando a las distancias de enlace y ángulos a ser constantes), no se incluyen términos cruzados y se utiliza el potencial de Lennard-Jones para calcular E_{vdW} . Pueden ser simplificados al no considerar los hidrógenos explícitamente (enfoque del átomo unido), opción presente en campos de fuerza como AMBER, CHARM, GROMOS y DREIDING.

2. Clase II: se utilizan para modelar con gran precisión moléculas pequeñas o de tamaño mediano. Incluyen términos cruzados, utilizan una expansión al menos cúbica o cuarta para el cálculo de $E_{stretching}$ y E_{bend} , y posiblemente un potencial exponencial para E_{vdW} . Buscan describir geometrías, energías relativas y frecuencias vibracionales de manera más precisa.

3. Clase III: tienen un refinamiento mayor al permitir que los parámetros dependan de los tipos de átomos vecinos, por ejemplo para modelar hiperconjugación; además, incluyen efectos de polarización electrónica.

La calidad de un cálculo con campo de fuerza depende de dos factores: qué tan apropiada es la forma matemática de la expresión de energía, y la precisión de los parámetros. La validación de un campo de fuerza se calcula de acuerdo con qué tanto reproduce los datos de referencia, los cuales pueden o no ser usados en la parametrización. Puesto que cada campo de fuerza emplea diferentes conjuntos de datos, no pueden tener una comparación directa entre ellos; algunos campos de fuerza pueden funcionar en excelente forma para ciertos compuestos, pero no para otros sistemas. También es importante considerar la reproducibilidad del campo de fuerza, ya que si es construido con un conjunto de grupos funcionales después se pueden agregar más y, por tanto, los parámetros pueden modificarse hasta tener un ajuste aceptable.^[63]

La principal ventaja de los métodos de dinámica molecular es el tiempo de cómputo, permitiendo el estudio de sistemas de gran tamaño, como biomacromoléculas (proteínas y ADN), siendo de gran utilidad en el ámbito medicinal, empaquetamientos cristalinos y el análisis de efectos de solvatación. Una ventaja más es la determinación de barreras de interconversión de conformaciones. Desde luego,

es importante contar con parámetros iniciales de buena calidad para que la predicción de geometrías y de energías relativas sean buenas y obtenidas en un período de tiempo corto. De tal forma que, también podría considerarse como desventaja partir de parámetros si éstos no son buenos, teniendo como consecuencia la aplicación limitada de la técnica a solo aquellos sistemas de los que se tiene suficiente información. Además, la calidad de los resultados solo puede ser comparable con otros cálculos similares o con moléculas que tienen suficiente información experimental.^[63]

2. Mecánica cuántica

Se basa en el entendido que los electrones exhiben comportamiento de onda y partícula. Esto permite aplicar las matemáticas del movimiento de ondas en los electrones y estructuras atómicas y moleculares. La base de estos cálculos es la ecuación de Schrödinger, que en su forma simplificada puede entenderse como la Ecuación 5:

$$H\Psi = E\Psi \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde Ψ es una función matemática conocida como función de onda, la cual define el estado electrónico de un sistema. H corresponde al operador Hamiltoniano, el cual actúa sobre la función de onda para obtener el valor propio E , correspondiente a la energía electrónica del sistema.^[62]

La Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT, del inglés: *Density Functional Theory*), ideada por Hohenberg y Kohn, prueba que la energía electrónica de un sistema en estado basal puede calcularse a partir de la densidad electrónica (ρ) del mismo mediante el uso de un funcional. Se define como función, $f(\mathbf{x})$, a aquella operación de producir un número a partir de un conjunto de variables (pudiendo tratarse de coordenadas); mientras que un funcional, $F[f(\mathbf{x})]$, es la operación que produce un número a partir de una función, que a su vez depende de variables. En este caso, la función de onda y la densidad son funciones; mientras que la energía, que depende de la función de onda o de la densidad electrónica, es un funcional.^[63]

Los métodos DFT modernos toman como base la propuesta realizada por Kohn y Sham en 1965 de que la energía cinética electrónica debe ser calculada con un conjunto de orbitales auxiliares que representen la densidad electrónica. La energía de intercambio y correlación, que corresponde a una pequeña fracción de la energía total, es el único funcional desconocido, e incluso aproximaciones relativamente rudimentarias para este término proporcionan datos computacionales bastante precisos. De forma que, la diferencia entre los métodos DFT es la elección de la forma funcional para el cálculo de la energía de intercambio y correlación. El modelo más simple es la Aproximación Local de la Densidad (LDA), en el que se asume que la densidad electrónica varía lentamente, de tal forma que la energía de intercambio y correlación puede ser calculada usando fórmulas derivadas para una densidad electrónica uniforme. Una mejora significativa en la precisión se puede obtener haciendo el funcional de intercambio y correlación dependiente de la primera derivada de la densidad, como en las Aproximaciones de Gradiente Generalizado; otros refinamientos agregan también la segunda derivada, mezclan el intercambio de Hartree-Fock en el funcional e incorporan algunos parámetros empíricos, siendo éstos los funcionales híbridos. DFT es conceptual y computacionalmente muy similar a la teoría de Hartree-Fock, pero, al considerar la correlación electrónica, muestra mejores resultados y por consecuencia, es un método más usado.^[63]

Truhlar y colaboradores han desarrollado diversos funcionales híbridos útiles en el análisis termoquímico, cinética termoquímica y en interacciones no covalentes para átomos no metálicos y

metálicos, como los funcionales M05 y M05-2X (que incluye dos veces el intercambio).^[64] Estas características en esta familia de funcionales y la experiencia en el grupo de investigación para modelar de manera adecuada el comportamiento de los complejos de Cu(II)^[56,57,65] condujeron al uso del funcional M05-2X en la mayor parte de este trabajo.

Para más detalle sobre la construcción de la Teoría de Funcionales de la Densidad ver el Anexo III.

3. Relación Estructura-Actividad (SAR) y Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (QSAR)

La aproximación de Relación Estructura-Actividad (SAR, del inglés: *Structure-Activity Relation*) en el descubrimiento de fármacos se basa en la observación de que compuestos con estructuras similares a fármacos que se sabe actúan sobre un blanco específico, muy posiblemente serán biológicamente activos. Dicha actividad puede ser similar al compuesto original, diferir en potencia o en efectos secundarios, o incluso ser completamente diferente. Cuando se conoce una molécula líder y sus análogos, los métodos SAR se usan para determinar las partes de la estructura del compuesto que son responsables de su actividad biológica (el farmacóforo) y en el estudio de los efectos secundarios. Algunos de los cambios que se pueden sugerir en la molécula líder para considerarse análogos son principalmente: el tamaño y forma de los esqueletos de carbono, la naturaleza y posición de sustituyentes, y la estereoquímica.^[62]

En comparación, en el caso de la Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (QSAR, del inglés: *Quantitative Structure-Activity Relation*) se utilizan parámetros que representen las propiedades de los fármacos que se cree tienen mayor influencia en la acción biológica, los cuales deben tener forma de un valor numérico. Estos valores se usan para generar una ecuación que relacione la actividad biológica con los parámetros. Posterior a la elaboración del modelo, es posible predecir los valores de actividad de nuevos compuestos similares a los utilizados en la creación del modelo con el fin de elegir las moléculas líderes que se sintetizarán y estudiarán biológicamente, reduciendo así costos de operación en la creación de un fármaco.^[62] Tropsha^[66] enuncia que la aproximación QSAR puede ser descrita como la aplicación de métodos de análisis de datos y estadística para crear modelos que puedan predecir adecuadamente una actividad biológica o propiedad (en cuyo caso se habla de una Relación Cuantitativa Estructura-Propiedad o QSPR) de un compuesto con base en su estructura.

Todos los modelos QSAR implican, directa o indirectamente, un principio simple de similaridad muy útil en química medicinal experimental que indica: se espera que compuestos con estructuras similares presenten valores de actividad biológica similares.^[66] Las correlaciones QSAR se construyen con el fin de predecir las actividades a partir de otras características, llamadas descriptores, que pueden medirse con mayor facilidad (ya sea experimentalmente o computacionalmente), independientemente de la presencia clara de un vínculo causal entre el predictor y el predicho.^[67] Un modelo tiene la forma general de la Ecuación 6^[67]:

$$\begin{aligned} \text{Actividad biológica} &\equiv \log\left(\frac{1}{C}\right) = f(x_1, x_2, \dots, x_n) && \text{Ecuación 6} \\ &= \text{constante} + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m a_{ij} x_i^j \end{aligned}$$

En donde C es la concentración del compuesto que es necesaria para alcanzar el punto biológico, como la dosis letal del 50% (DL_{50}), la concentración inhibitoria del 50% (CI_{50}), o la dosis efectiva del 50% (DE_{50}), x_i es el i -ésimo descriptor (de n descriptores) elevado a la potencia j , y a_{ij} son los

coeficientes de ponderación obtenidos del ajuste estadístico. La última igualdad de la Ecuación 6 es la que da la forma explícita de la relación entre los descriptores y la respuesta predicha.

Las propiedades que se usan en la construcción de un modelo QSAR pueden incluir detalles obtenidos experimentalmente, resultados de cálculos químico-cuánticos, un simple conteo de átomos o tipos de enlace, información respecto a la conectividad en la molécula, propiedades fisicoquímicas, valores obtenidos mediante métodos espectroscópicos, propiedades biológicas y farmacológicas, etcétera. Al igual que las propiedades en estudio, los descriptores pueden ser características experimentales o calculadas de una estructura, respuestas fisicoquímicas, cálculos cuánticos o cualquier combinación de ellos.

Es importante resaltar que lo recomendable es que el número de compuestos utilizados para construir un modelo (conjunto de entrenamiento) sea al menos 5 veces el número de descriptores ($5n$), y la regla general es que en cuanto mayor es la relación entre el número de compuestos y el número de descriptores, mejor es el modelo.^[67] Desde luego, los factores a considerar son el cómputo disponible, el software utilizado y la disponibilidad de datos de partida.

Una generalidad de los modelos QSAR es que un modelo va a ser tan bueno como lo sean los datos utilizados para generarlo, por ello, es importante hacer énfasis en un buen curado de datos y preprocesamiento del conjunto de datos. Este curado implica la remoción de los datos que no pueden ser manejados apropiadamente por los programas de quimioinformática, por ejemplo: compuestos inorgánicos y organometálicos, contraiones, sales y mezclas, compuestos aromáticos, formas tautoméricas, duplicados, etc. Hoy en día existen programas que tienen herramientas específicas para el curado de datos, por mencionar algunos: Molecular Operating Environment (MOE) de CCG, ChemAxon, OpenEye, OpenBabel, ISIDA, HiT QSAR, Hyleos, entre otros.^[66]

Scior y colaboradores^[68] mencionan que de manera general, los pasos que involucran un estudio QSAR se dividen en tres bloques:

- i. Preparación de los datos de entrada y preprocesamiento: incluye recolectar los datos, seleccionar los congéneres (datos similares), y dividir adecuadamente el total de datos en un conjunto de entrenamiento y uno de prueba.
- ii. Generación de las ecuaciones y el modelo, incluyendo su validación: involucra analizar las diferencias entre las moléculas, la selección de los descriptores a utilizar y aplicar las técnicas estadísticas que conduzcan a un modelo, por ejemplo: Análisis de Componentes Principales (PCA), Regresión Lineal Múltiple (MLR), Regresión Lineal Simple (SLR), Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS), clustering y diseño factorial. Una vez generado el modelo se realiza una validación interna, pero si los parámetros obtenidos no son adecuados es necesario generar un nuevo modelo hasta lograr una buena aproximación. En seguida se realiza una validación externa en el grupo de prueba y, de igual forma, de ser necesario se genera un nuevo modelo.
- iii. Interpretación de los resultados: analizar el modelo final e iniciar un nuevo ciclo para un nuevo fármaco.

En caso de que los modelos QSAR sean utilizados con fines regulatorios, Gramatica^[69] menciona que se deben cumplir 5 puntos importantes:

- a) Tener un objetivo bien definido.
- b) Un algoritmo no ambiguo.

- c) Un dominio de aplicabilidad definido.
- d) Medición apropiada del ajuste, robustez y predictividad, incluyendo una validación interna y externa.
- e) Una interpretación.

Para más detalles sobre la generación de un modelo, el dominio de aplicabilidad y la validación en los métodos QSAR, ver el anexo IV.

4. Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas o QAIM

Esta teoría, creada por Richard Bader^[70], busca crear un vínculo entre la mecánica cuántica y la química mediante observables como la densidad electrónica ($\rho(\mathbf{r})$) y su topología, lo que permite llegar a la definición de átomo y enlace en una molécula. Es útil para responder a preguntas típicas y simples en la química, por ejemplo, ¿qué átomos están unidos en una molécula?, ¿podemos definir un átomo dentro de una molécula?, ¿cuánta carga se transfiere de un átomo a otro al formar un enlace?, entre otras.^[71]

Además, nos ayuda a conocer las propiedades promedio de un átomo unido a otros átomos en una molécula. Dichas propiedades se reducen a sus definiciones en mecánica cuántica para un átomo aislado, sin embargo, al sumarse todos los átomos de la molécula es posible obtener el valor promedio de esa propiedad para la molécula.^[70]

La topología de la densidad electrónica^[72] nos permite identificar puntos críticos (CP, del inglés: *Critical Points*), que se definen como puntos en el espacio para los cuales la primera derivada de la densidad es igual a cero, como muestra la Ecuación 7:

$$\nabla\rho = \mathbf{i}\frac{d\rho}{dx} + \mathbf{j}\frac{d\rho}{dy} + \mathbf{k}\frac{d\rho}{dz} \rightarrow \begin{cases} = \vec{0} & \text{en los puntos críticos y en } \infty \\ \neq \vec{0} & \text{en todos los demás puntos} \end{cases} \quad \text{Ecuación 7}$$

En donde el vector cero significa que cada derivada individual en el operador gradiente, ∇ , es cero y no sólo la suma. Así, podemos reconocer cuatro tipos diferentes de puntos críticos de la densidad electrónica: puntos críticos nucleares (NCP), puntos críticos de enlace (BCP), puntos críticos de anillo (RCP) y puntos críticos de caja (CCP).

Por otra parte, la topología también ayuda a dividir el espacio molecular en regiones separadas para cada núcleo, denominadas cuencas atómicas (Ω). Dicho espacio se delimita por una superficie de flujo cero en el vector de campo gradiente de la densidad electrónica, que cumple la condición representada en la Ecuación 8:

$$\nabla\rho(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{n}(\mathbf{r}) = 0, \text{ para todas las } \mathbf{r} \text{ que pertenecen a la superficie } S(\Omega) \quad \text{Ecuación 8}$$

En donde \mathbf{r} es la posición del vector y $\mathbf{n}(\mathbf{r})$ es el vector normal a la superficie $S(\Omega)$. Esta condición de frontera permite definir un átomo en una molécula como la unión de un núcleo y el espacio que abarca la cuenca asociada a dicho núcleo.

Esta división del espacio molecular en cuencas atómicas permite la partición de las propiedades electrónicas en las contribuciones atómicas. De tal forma que, el promedio de una propiedad O en una cuenca atómica Ω , $O(\Omega)$, se calcula como muestra la Ecuación 9^[72]:

$$O(\Omega) = \langle \hat{O} \rangle_{\Omega} = \frac{N}{2} \int_{\Omega} d\mathbf{r} \int d\tau' [\Psi^* \hat{O} \Psi + (\hat{O} \Psi)^* \Psi] \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde \hat{O} es un operador de un electrón o la suma de operadores de un electrón. Algunas de las propiedades que pueden calcularse de esta forma, y que son utilizadas en este trabajo, son la densidad electrónica total y de espín, la deslocalización y localización electrónica, y el momento dipolar.

Para más detalles de esta teoría y el cálculo de propiedades atómicas que derivan de la densidad electrónica ver el Anexo V.

3. Objetivos Generales

Contribuir al entendimiento de los diferentes fenómenos involucrados en el mecanismo de acción de complejos de cobre(II) con actividad anticancerígena, principalmente de la familia Casiopeínas® y los compuestos derivados de tinidazol, por tres vías diferentes:

- (a) La oxidación de especies tioladas, que conduce al estrés oxidativo.
- (b) La interacción con el ADN, mediante un proceso de intercalación.
- (c) Identificación del sitio farmacofórico de los complejos de cobre.

4. Hipótesis

En este trabajo se han planteado tres hipótesis, cada una referente a una sección del trabajo:

1. Existe una interacción directa entre la Casiopeína® y una especie tiolada, la cual promueve la formación de un aducto en el que se presenta el cambio en el estado de oxidación del centro metálico y la formación de un radical tílo.
2. La actividad anticancerígena de los complejos de cobre es función de las propiedades atómicas que derivan de la densidad electrónica, debido a que éstas describen la manera en que los electrones se transfieren, se deslocalizan y se distribuyen en una cuenca atómica.

$$\textit{Actividad anticancerígena} = f(N, \lambda, \mu, Q)$$

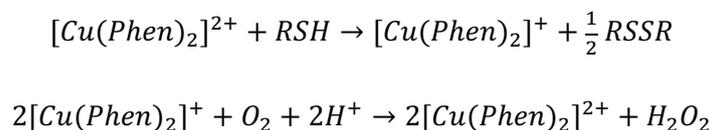
3. La interacción de compuestos de cobre(II) tetraédricos con el ADN se basa en el intercambio de ligantes, mientras que en compuestos de cobre(II) con geometría cuadrada plana se debe a la coordinación axial.

5. Resultados

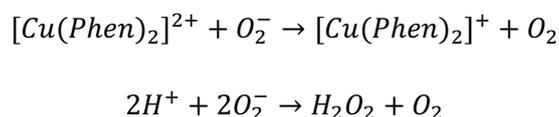
5.1 Oxidación de cisteína por complejos de cobre(II)

5.1.1 Antecedentes

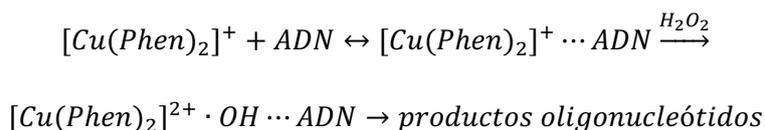
Los primeros estudios de la actividad nucleasa de compuestos de cobre surgieron en el año 1979, cuando Sigman y colaboradores descubrieron la actividad nucleasa del complejo bis de 1,10-fenantrolina (Phen) ($[Cu(1,10\text{-fenantrolina})_2]^+$) mientras investigaban cómo el ligante inhibía la polimerización del polinucleótido poly[d(A-T)]. A nivel biológico, este proceso de polimerización es dirigido por la ADN Polimerasa I de *E. Coli*.^[38] Durante esta investigación encontraron que dicha inhibición requería la presencia del ion cúprico y de un tiol (RSH); además, el peróxido de hidrógeno tiene una participación importante en la reacción ya que es generado en una mezcla de reacción que contiene Phen, Cu^{II}, tiol y oxígeno^[73,74] de la siguiente forma:



Sin embargo, si únicamente se encuentra este peróxido de hidrógeno no se puede explicar por sí sola la rapidez de la división observada del ADN. También es posible causar daño al ADN mediante la generación del anión superóxido, ya que la especie de Cu^{II} se reduce espontáneamente para formar la especie de Cu^I y el peróxido de hidrógeno:



Así, el mecanismo de acción de los compuestos $[Cu(phen)_2]^{2+}$ involucra: (i) la reducción, en solución, de $[Cu(phen)_2]^{2+}$ a $[Cu(phen)_2]^+$, (ii) la unión reversible de $[Cu(phen)_2]^+$ al ADN, (iii) la oxidación del complejo cuproso por la presencia de peróxido de hidrógeno, provocando una asociación entre el ión metálico y un radical hidroxilo (especie reactiva de oxígeno), y (iv) la abstracción de los protones más cercanos al oxígeno en la pentosa (H-1', H-4' y H-5') de la unidad desoxirribosa del surco menor del ADN por parte del radical generado, provocando finalmente la escisión de la doble hélice.^[75]



El trabajo de Sigman fue un parteaguas para la propuesta de nuevos compuestos formados por un centro metálico de cobre(II) y ligantes similares a los donadores de nitrógeno que mostraran actividad nucleasa, como es el caso de las Casiopeínas®.

Kachadourian en 2010^[55] reportó que el compuesto CasII-gly de la familia Casiopeínas®, formado por 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina y glicinato, produce una disminución dramática en los niveles de glutatión (GSH) en células de cáncer de pulmón (H157 y A549), siendo también capaz de usar el GSH como fuente de electrones para catalizar una reacción de tipo Fenton. En ambas líneas celulares, la toxicidad de la CasII-gly (2.5 – 5 μM) fue potenciada por el inhibidor de la síntesis de GSH, el L-butatión sulfoximina (BSO), y disminuida por el antioxidante catalítico de Mn^{III} con el ligante meso-tetrakis(N,N'-dietilimidazolio-2-il)porfirina (MnTDE-1,3-IP5+), teniendo así un papel importante en el estrés oxidativo. Además, se observó que el complejo causa una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés: *Reactive Oxygen Species*) en la mitocondria y una despolarización de la membrana mitocondrial. Por otra parte, la CasII-gly produce daño al ADN mitocondrial generando un desbalance de la expresión de las apoproteínas de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que también resulta en un aumento de las ROS. El conjunto de estos fenómenos sugiere que la CasII-gly promueve la sobreproducción de ROS de diversas formas, conduciendo a la disfunción mitocondrial y con ello, a la muerte celular. Con estos resultados, Kachadourian propuso que el mecanismo por el cual las Casiopeínas® generan estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, ocurre de esta forma (Figura 5.1): el glutatión (GSH) reacciona con la Casiopeína®, resultando en la reducción del cobre en el complejo (pasando de 2+ a 1+) y la formación del radical glutatilo (GS^\bullet), el cual reacciona con otro radical igual para generar glutatión oxidado (GSSG), o reacciona con GSH y oxígeno para formar el radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y GSSG. Posteriormente, la Superóxido Dismutasa (SOD) convierte el $\text{O}_2^{\bullet-}$ en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y este reacciona con la Casiopeína® reducida para producir el radical hidroxilo ($^\bullet\text{OH}$). El radical $^\bullet\text{OH}$ puede iniciar el daño al ADN mitocondrial (mtADN), produciendo un desbalance en la expresión de proteínas de la Cadena Respiratoria Mitocondrial (CRM) y que tiene como consecuencia la generación de más ROS. De esta forma, la disfunción mitocondrial puede ser resultado de la disminución en los niveles de GSH y el aumento en los niveles de H_2O_2 .

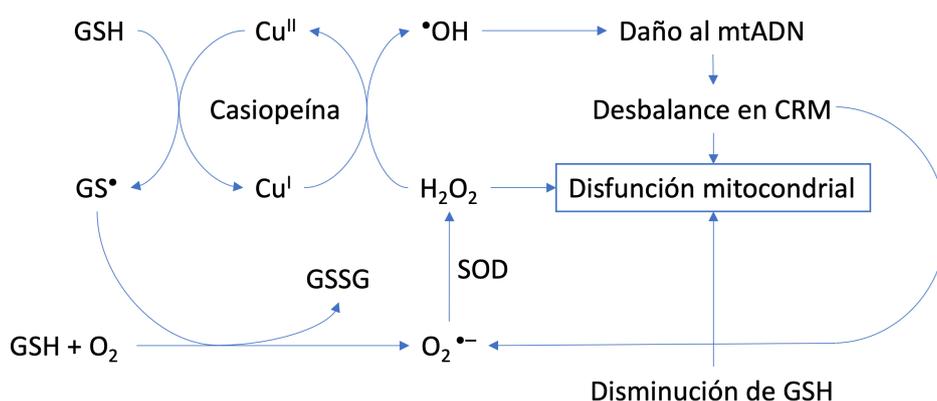


Figura 5.1. Mecanismo propuesto para la interacción de Casiopeínas® con reductores tiolados a nivel celular. Replicado de Kachadourian, et al.^[55]

En trabajos más recientes, se ha estudiado la cinética y el mecanismo del proceso de oxidación de glutatión (GSH) catalizado por un solo átomo de cobre. Ngamchuea y colaboradores^[76] proponen que en presencia de Cu^{II} , el primer paso de reacción involucra la formación rápida de un complejo Cu-Glutatión, siendo la coordinación a través del grupo tiol. El segundo paso de la reacción, un paso más lento en comparación al primero, conlleva la completa oxidación del grupo tiol hasta la formación de

un enlace disulfuro entre dos moléculas de GSH, pasando por un intermediario reactivo en que dos radicales glutatilo están coordinados al centro metálico.

También se demostró la formación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) como consecuencia de la reducción de un complejo bis-diimina de cobre(II) en presencia de ascorbato, sin embargo, no se describió el mecanismo por el que dicho proceso se lleva a cabo.^[77]

En el grupo en donde se desarrollaron las Casiopeínas[®] se han realizado estudios en solución de la interacción de los complejos de cobre(II) con reductores tiolados, comparando la cinética del glutatión y cisteína, mediante diversas técnicas espectroscópicas.^[78,79] En estos trabajos se demostró, principalmente por espectroscopia de Ultravioleta-Visible (UV-Vis), Voltamperometría cíclica y Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR), que se lleva a cabo la reducción del centro metálico al interaccionar la Casiopeína[®] con cisteína (en una relación 1:1), lo cual es más notorio cuando se añade un exceso de la especie tiolada (hasta 1:5). Además, se identificó que la cinética de reacción con glutatión es muy rápida, y por tanto, es más difícil apreciar la formación de algún intermediario, entonces se propuso el uso de cisteína como un modelo del sitio activo del grupo tiol y que presenta una cinética más lenta.

Sin embargo, no se han identificado o aislado los intermediarios reactivos que permitan proponer a detalle un mecanismo de acción. En conjunto con el grupo de investigación en Casiopeínas[®] se propuso una síntesis mecanoquímica, es decir, en sólido, con el fin de reducir la velocidad de reacción y con ello identificar el intermediario. Esta sección se enfoca en la identificación de dicho intermediario y en una propuesta mecanística para el proceso, mostrando algunos resultados experimentales que fueron soportados con cálculos computacionales.

5.1.2 Objetivos particulares

El objetivo principal de esta sección es formular un mecanismo del proceso de oxidación-reducción durante la interacción de las Casiopeínas[®] con un reductor tiolado, que conduce al estrés oxidativo. Para cumplirlo, se han propuesto los siguientes objetivos particulares:

1. Identificar el intermediario en la interacción Casiopeína[®]-tiol que permita dar precisión a la propuesta de un mecanismo de reacción.
2. Comparar los resultados experimentales de cada técnica espectroscópica con los obtenidos mediante cálculos computacionales en la caracterización del intermediario.
3. Conocer los cambios en la densidad electrónica que dan paso a la ocurrencia de tal mecanismo de reacción.

5.1.3 Metodología

Todas las estructuras fueron optimizadas a nivel DFT con el funcional m05-2x^[64] y el conjunto de base LanL2DZ^[80], implementados en el software Gaussian 09^[81]. En seguida se hicieron cálculos de frecuencias para verificar el estado de equilibrio y para obtener el espectro de Infrarrojo comparable al experimental, obtenido por el grupo de Casiopeínas[®].

En el caso de los espectros UV-Vis obtenidos experimentalmente en el grupo de Casiopeínas[®], se realizó un benchmark con el software Gaussian 09^[81] para identificar el mejor método de cálculo, comparando el espectro experimental de la CasIII-ia. Se probaron los funcionales: B3LYP^[82], CAM-B3LYP^[83], t-HCTHhyb^[84], PBE0^[85], wB97XD^[86] y M05-2X^[64], y las bases: LanL2DZ^[80], CC-PVTZ^[87], 6-

311+G(d,p)^[88], SDD^[89] y Def2-TZVP^[90] (en un solo caso), en donde el mejor método fue CAM-B3LYP/SDD con el modelo de solvatación SMD con agua como disolvente, por lo tanto, este fue el método usado para calcular los espectros UV-Vis del resto de estructuras.

Para los estudios de transferencia electrónica se utilizó la Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas^[70], partiendo del conjunto de orbitales de cada molécula se calcularon las propiedades que derivan de la densidad electrónica con el software AIMAll^[91].

En el caso de los parámetros de EPR también se realizó un benchmark para identificar el mejor método de cálculo con el software ORCA^[92], comparando los valores de la constante g y los tensores A obtenidos experimentalmente en el grupo de Casiopeínas®. Para la CasIII-ia se utilizaron los funcionales B3LYP, PBE0 y wB97XD3, y las bases LanL2DZ, Def2-TZVP, Def2-SVP^[90] y CC-PVDZ^[87]; y una vez identificado que el mejor método fue B3LYP/def2-SVP se calcularon los espectros para el resto de las moléculas optimizadas. Con los parámetros obtenidos se realizó la simulación de los espectros experimentales y computacionales con el software EasySpin (versión 5.2.28, easyspin.org)^[93] implementado en MATLAB R2019b.

Debido a que la Casiopeína® CasIII-ia ([Cu(4,4-dimetilbipiridina)(acac)]⁺, Figura 5.2-A) es la que mejor actividad ha mostrado, y que se encuentra actualmente en estudios de Fase Clínica I, será la utilizada en la mayor parte de este trabajo. Algunos resultados serán mostrados también con la CasIII-Ea ([Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)], Figura 5.2-B) y la CasII-gly ([Cu(1,10-fenantrolina)(glicinato)]⁺, Figura 5.2-C), especificando en los resultados el complejo. La diferencia en los complejos radica en que la CasIII-ia y la CasIII-Ea tienen el mismo ligante secundario, y difieren en el ligante primario; mientras que la CasIII-Ea y la CasII-gly tienen el mismo ligante primario, pero difieren en el ligante secundario.

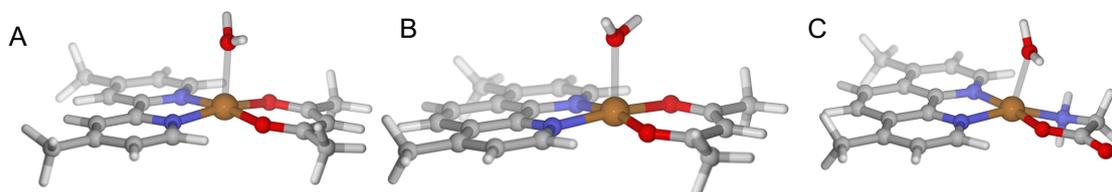
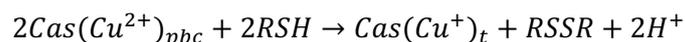


Figura 5.2. Casiopeínas® utilizadas en esta sección: (A) CasIII-ia, (B) CasIII-Ea, y (C) CasII-gly.

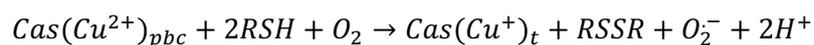
5.1.4 Resultados

Reacción

El objeto de estudio en este trabajo es la reacción que ocurre entre un grupo tiolado (RSH) y un complejo de cobre(II) de la familia Casiopeína® (Cas), la cual está representada de la siguiente forma:



Partimos de una geometría pirámide de base cuadrada (pbc) para el complejo de cobre(II) que al interactuar con un grupo tiolado cambia su estado de oxidación a cobre(I) y a una geometría tetraédrica (t), generándose también un enlace disulfuro entre dos equivalentes de tiol con la pérdida de los protones de los grupos -SH. Experimentalmente, las reacciones se han hecho en ausencia y presencia de oxígeno, y en el segundo caso se añade como producto el radical superóxido de esta forma:



Los potenciales redox de los pares GSSG/GSH y Cistina/Cisteína son muy similares, teniendo valores de -263 mV vs. Electrodo Normal de Hidrógeno (NHE) y -220 mV vs. NHE, respectivamente^[94,95], lo que señala que el glutatión es un mejor agente reductor. Mientras que los pares O_2/O_2^- y O_2^-/O_2^{2-} tienen valores de -160 mV y 890 mV vs. NHE^[96], respectivamente. Hablando de las Casiopeínas®, la CasIII-ia tiene un potencial redox de 62 mV vs. NHE^[97], por tanto, el complejo puede mediar el proceso de oxidación de los tioles mencionados anteriormente.

Se realizó la reacción en estado sólido, para ello en un mortero se molieron ambos reactivos (CasIII-ia y cisteína) en una relación 1:1 y se mezclaron hasta obtener un polvo homogéneo, posteriormente se añadieron sólo unas gotas de etanol y se continuó la molienda hasta secar nuevamente el polvo.

Durante este proceso se detectaron los cambios de color mostrados en la Figura 5.3, en este caso se hace una comparación de ellos con la escala Pantone®^[98] para identificar visualmente las diferencias. Los reactivos de partida, la cisteína y la CasIII-ia presentan un color blanco (Figura 5.3-A) y un color azul Pantone 2139c (Figura 5.3-B), respectivamente. El polvo obtenido después de adicionar etanol presenta un color azul más oscuro identificado como Pantone 289c (Figura 5.3-C). Después de un tiempo de reacción, el polvo sufre nuevamente un cambio de color hasta Pantone 532c (Figura 5.3-D) que se mantiene por tiempo indefinido.

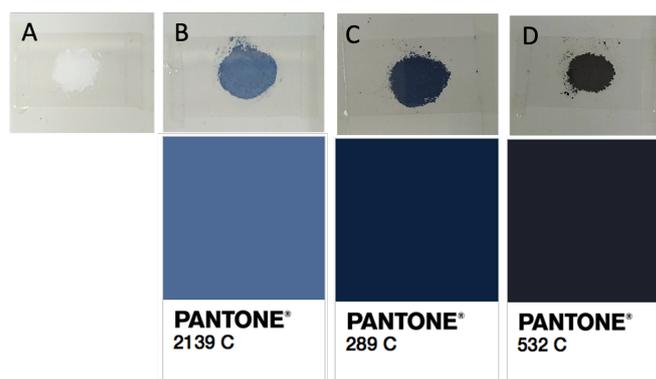


Figura 5.3. Reactivos e intermediarios de la reacción mecano-química en estado sólido: (A) cisteína (blanco), (B) CasIII-ia (Pantone 2139c), (C) Intermediario 1 (Pantone 289c), y (D) intermediario 2 (Pantone 532c). Imágenes de polvos proporcionadas por el grupo experimental de Casiopeínas®.

Este primer cambio de color en el complejo, pasando del Pantone 2139c al Pantone 289c, puede asociarse a la coordinación del grupo -SH al centro metálico, proponiendo este como el intermediario a caracterizar y que se etiquetara en este trabajo como el aducto Cas-Cys.

El primer paso de este estudio fue analizar cómo influye la protonación del grupo sulfhidrilo en las distancias de enlace Cu-S con la cisteína y Cu-O con la molécula de agua coordinada de manera axial, para ello decidimos calcular 4 estados de protonación y de coordinación del azufre al cobre(II) diferentes en 12 Casiopeínas® (mostrados en la Figura 5.4):

- A. Casiopeína® con molécula de agua axial, como comparación en cada caso.
- B. Casiopeína® sin molécula de agua axial y la cisteína coordinada con el azufre protonado.
- C. Casiopeína® sin molécula de agua axial y la cisteína coordinada con el azufre desprotonado.
- D. Casiopeína® con molécula de agua axial y la cisteína coordinada con el azufre protonado.
- E. Casiopeína® con molécula de agua axial y la cisteína coordinada con el azufre desprotonado.

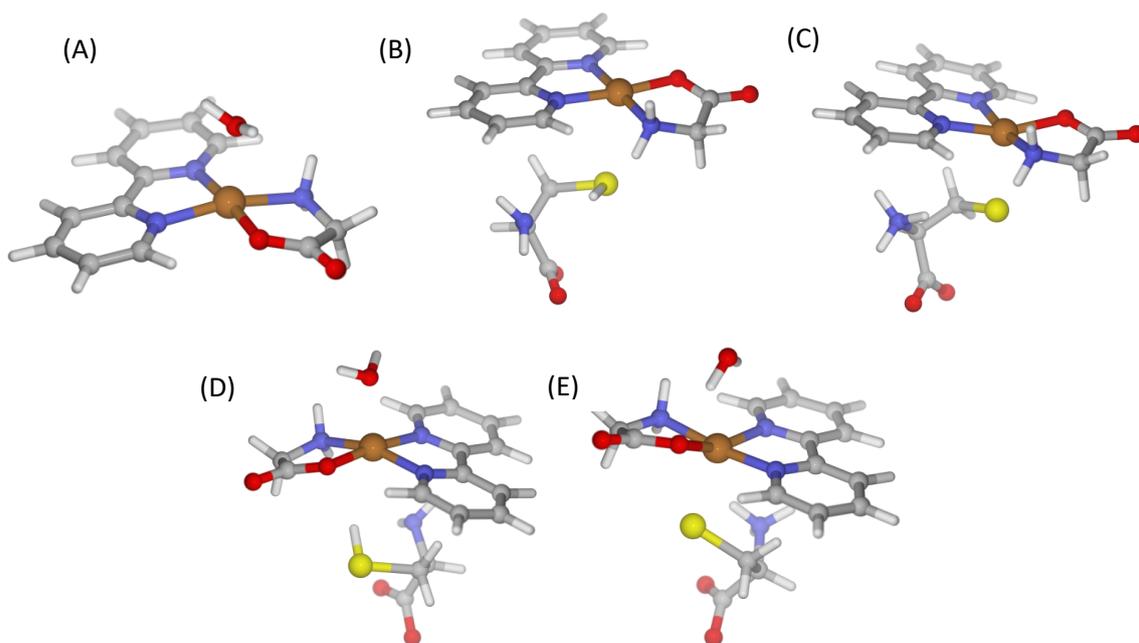


Figura 5.4. Estados de protonación del grupo sulfhidrilo de la cisteína en la interacción Cas-Cys.

Para cada estado de protonación y coordinación se minimizaron las estructuras de 12 Casiopeínas® diferentes, y una vez obtenidas las geometrías se compararon las distancias de enlace de interés. La Tabla 5.1 muestra primero cada Casiopeína® calculada, donde bpy y fen son los ligantes primarios bipyridina y 1,10-fenantrolina, respectivamente; gly y acac son los ligantes secundarios glicina y acetilacetato; la m indica el sustituyente metilo, ya sea di (d) o tetra (t); y los números indican las posiciones de la sustitución. Las siguientes columnas muestran los valores de las distancias de interés en cada estado: (A) únicamente la distancia Cu-O de la molécula de agua coordinada axial al cobre(II); para (B) y (C), al no tener agua coordinada, solo se muestra la distancia Cu-S de la cisteína, distinguiéndose entre paréntesis si el grupo sulfhidrilo está protonado (SH) o no (S); y para (D) y (E), al tener coordinadas en sus posiciones axiales una molécula de agua y una molécula de cisteína, se consideran ambas distancias de enlace en cada caso y diferenciando de igual forma la protonación (SH) o no (S) del grupo sulfhidrilo. Los valores – son aquellos complejos que no lograron converger.

Vemos que en el caso de las Casiopeínas® (estado A) la coordinación del agua al centro metálico se encuentra entre 2.26 Å y 2.30 Å. En el caso del estado B, la distancia de enlace Cu-S tiene un valor mínimo de 2.92 Å y alcanza valores de hasta 4.08 Å; sin embargo, cuando se desprotona el grupo sulfhidrilo (estado C), estos valores disminuyen considerablemente hasta 2.37 Å y 2.64 Å, indicando que la coordinación se va a preferir cuando el azufre este desprotonado y con un exceso de densidad electrónica disponible para compartir con el metal.

En el caso del estado D la distancia de enlace Cu-O con la molécula de agua toma valores entre 2.24 Å y 2.31 Å, mientras que la distancia de enlace Cu-S protonado toma valores entre 3.12 Å y 4.29 Å. En contraste, cuando se tiene la misma coordinación pero con el azufre desprotonado (estado E) vemos que la tendencia del estado D se invierte y en este caso los valores mayores se encuentran en el enlace Cu-O del agua en un rango de 2.96 Å hasta 3.20 Å, y los valores menores en la distancia de enlace Cu-S con valores entre 2.53 Å y 2.63 Å.

Casiopéínas®	Distancias de enlace (Å)						
	Estado A	Estado B	Estado C	Estado D		Estado E	
	Cu-O _{H2O}	Cu-S(SH)	Cu-S(S)	Cu-O _{H2O}	Cu-S(SH)	Cu-O _{H2O}	Cu-S(S)
bpygly	2.28979	3.19468	2.60354	2.2414	3.90186	3.01367	2.57677
bpyacac	2.28039	2.97855	2.62191	2.30768	3.95295	2.95503	2.62125
44dmbpygly	2.30225	-	2.60629	2.25272	3.86031	2.99941	2.55307
44dmbpyacac	2.28166	2.93769	2.37615	2.25349	4.28569	-	-
fengly	2.26996	3.99474	2.6034	2.29232	3.11789	2.99903	2.59019
fenacac	2.27247	2.92287	2.61535	2.25612	3.53554	3.09163	2.59667
47dmfengly	2.27366	3.82554	2.606	-	-	3.0108	2.53774
47dmfenacac	2.27918	3.83149	2.63622	2.24217	3.94686	3.10194	2.62538
56dmfengly	-	4.08155	2.59872	2.24986	3.84186	3.00729	2.56686
56dmfenacac	2.29486	3.20582	2.64091	2.25988	3.84755	3.02637	2.60955
tmfengly	2.3034	3.15978	2.55195	2.23885	3.84673	3.02293	2.53412
tmfenacac	2.28054	-	2.63503	-	-	3.17688	2.6279

Tabla 5.1. Distancias de enlace (Å) Cu-O y Cu-S en los estados de protonación del grupo sulfhidrido de la cisteína en la interacción Cas-Cys.

Estos datos muestran perfectamente el efecto Jahn-Teller reportado en los compuestos de cobre que nos habla de la elongación de los enlaces axiales en una geometría octaédrica debida al desdoblamiento de los orbitales *d* del centro metálico. En este caso es notoria la preferencia por la unión al centro metálico por parte de un átomo de azufre desprotonado provocando que la molécula de agua se aleje del cobre(II); en contraste, cuando el azufre se encuentra protonado se prefiere la unión de la molécula de agua al centro metálico y el enlace Cu-S es más lábil. Por tanto, en la reacción quizás sea necesario agregar una base que desprotona primero la cisteína para promover la interacción Cu-S o que esta desprotonación pueda derivarse de la acción del disolvente en la cisteína una vez que está coordinada al cobre.

De acuerdo con el diagrama de distribución de especies respecto al cambio de pH reportado por Castañeda^[99], sabemos que los tres pK_a de la cisteína corresponden a los presentados en la Figura 5.5 y que representan el cambio de la forma protónica a la forma zwitteriónica (pK_{a1} = 1.71), de la forma zwitteriónica a la forma aniónica (pK_{a2} = 8.33), y de la forma aniónica a la forma dianiónica (pK_{a3} = 10.78). Además, identificamos que a pH biológico (alrededor de 7.4) se encuentran presentes la forma zwitteriónica (85% de abundancia) y la forma aniónica (15% de abundancia). Sabiendo esto, se comparó la coordinación de la cisteína a la Casiopéína® CasIII-ia en ambos estados de protonación (formas zwitteriónica y aniónica) considerando las dos posibilidades de átomo donador (oxígeno y azufre), resultando en las geometrías A, B, C y D de la Figura 5.5.

En la Tabla 5.2 se muestra la Energía libre de Gibbs de la reacción que produce las especies A, B, C y D de la Figura 5.5, considerando una temperatura de reacción de 37 °C que simula un ambiente biológico. Comparando la coordinación por oxígeno o azufre cuando la cisteína presenta una forma

zwitteriónica (A y C, respectivamente) notamos una diferencia significativa en las distancias de enlace Cu-átomo donador, ya que en el caso del oxígeno el valor es de 2.26 Å y en el caso de azufre es de 3.85 Å, lo cual coincide con que el sistema se estabiliza más cuando el átomo coordinante es oxígeno si comparamos los valores de $\Delta G_{reacción}$. En contraste, cuando se compara la coordinación del oxígeno o azufre en la forma aniónica de la cisteína (B y D, respectivamente) la distancia de enlace Cu-O permanece casi igual (2.25 Å) pero la distancia de enlace Cu-S disminuye considerablemente (2.61 Å), además, los valores de $\Delta G_{reacción}$ ahora favorecen la formación de la especie coordinada por el azufre.

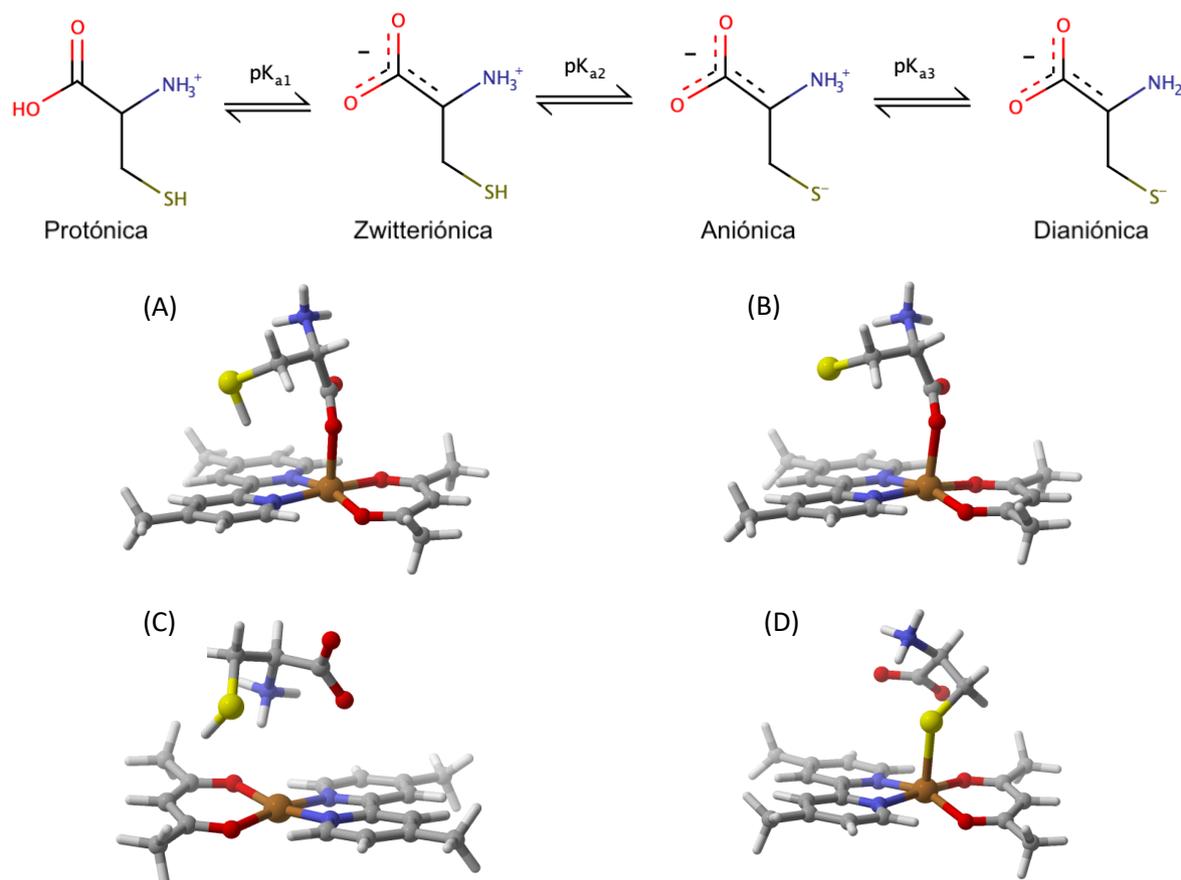


Figura 5.5. Comparación del átomo coordinante de la cisteína al unirse a la CasIII-ia. Estructuras A y C corresponden a la forma zwitteriónica con átomo coordinante oxígeno y azufre, respectivamente. Estructuras B y D corresponden a la forma aniónica con átomo coordinante oxígeno y azufre, respectivamente.

Geometría	Forma de Cisteína	Átomo coordinante	$\Delta G_{reacción}$ (kcal/mol)
A	Zwitteriónica	O	1.1
B	Aniónica	O	-69.2
C	Zwitteriónica	S	4.4
D	Aniónica	S	-71.3

Tabla 5.2. Energía Libre de Gibbs para la reacción (kcal/mol) a 37 °C entre la Casiopeína® y la cisteína comparando el átomo coordinante del aminoácido. Geometrías referidas en la Figura 5.5.

Intermediario

La minimización de las geometrías permitió dilucidar las posibles geometrías que adoptaría el complejo al interactuar con la cisteína. Partiendo de una geometría pirámide de base cuadrada

(Figura 5.6-A) la única posición disponible es la axial, por lo tanto, la propuesta es que al unirse el azufre al cobre(II) se obtenga una geometría octaédrica (Figura 5.6-B). Sin embargo, también existe la posibilidad de que ocurra el desplazamiento de uno de los átomos coordinados en posición ecuatorial del ligante secundario, acetilacetonato en este caso, y por tanto, la sustitución de la molécula de agua coordinada al centro metálico por parte del átomo desplazado en el ligante secundario mostrando entonces una geometría pirámide de base cuadrada (Figura 5.6-C). Se observó que cuando el ligante secundario es glicinato el átomo desplazado y que sustituye a la molécula de agua es el oxígeno, mientras que el azufre mantiene la coordinación en la posición axial y como consecuencia se obtiene una geometría bipirámide trigonal.

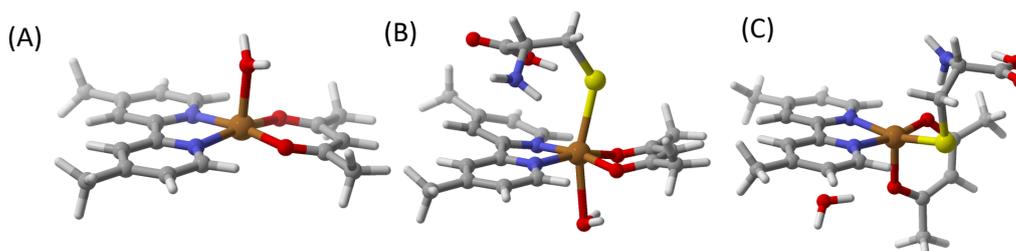


Figura 5.6. Geometrías en estudio: (A) CasIII-ia, (B) Aducto CasIII-ia-Cisteína con geometría octaédrica, y (C) Aducto CasIII-ia-Cisteína con geometría pirámide de base cuadrada.

Para la CasIII-ia la distancia de enlace Cu-S es de 2.82 Å en la geometría octaédrica, mientras que para la pirámide de base cuadrada tiene un valor de 2.37 Å. Energéticamente hablando, la geometría pirámide de base cuadrada es 4.9 kcal/mol más estable en comparación al octaedro. Debido a que la diferencia energética es muy pequeña, no podemos asegurar la preferencia de una geometría para la interacción, por tanto, todos los resultados de técnicas espectroscópicas fueron comparados con ambas geometrías con el fin de identificar cuál de ellas corresponde al intermediario. La reacción se realizaba al momento para el análisis del polvo mediante las técnicas espectroscópicas antes de que ocurriera el cambio de color del polvo C al polvo D; en algunos casos se añadió hidróxido de sodio para propiciar la desprotonación del grupo -SH. A continuación se discutirán algunas de las técnicas experimentales utilizadas en la caracterización del polvo, enfocándonos en los resultados más sobresalientes y en su aportación computacional.

a) UV-Vis

El primer paso fue identificar el nivel de teoría adecuado para modelar los espectros de absorción UV-Vis de las Casiopeínas®, para esto se tomaron como referencia los valores experimentales de los máximos asociados a las transiciones electrónicas de la CasIII-ia (Figura 5.7). El primer y segundo valor (240 y 295 nm) corresponden a las transiciones que ocurren en los ligantes, principalmente en el ligante primario. El valor que más nos interesa es el de 605 nm, que se asocia a las transiciones electrónicas que ocurren en el centro metálico.

Las transiciones electrónicas que pueden presentarse en una geometría pirámide de base cuadrada, son: $d_{xy} \leftarrow d_{xz}$, d_{yz} y $d_{x^2-y^2} \leftarrow d_{xy}$, con valores de 550-600 nm y 600-640 nm, respectivamente. Al encontrarse tan cercanas, dichas transiciones se observan como una sola señal con un valor máximo entre 590 y 620 nm.^[100]

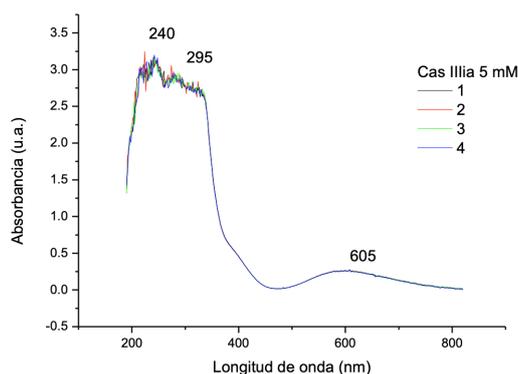


Figura 5.7. Espectro UV-Vis de la CasIII-a a una concentración 5 mM.

Los resultados de la comparación de niveles de teoría para el cálculo de espectros UV-Vis se muestran en la Tabla 5.3. En la primera fila se encuentran los valores experimentales tomados como referencia para la diferencia con las señales de los espectros calculados, indicando los métodos y bases utilizados en cada caso. En algunos de los espectros calculados no se logró identificar la primera señal experimental (240 nm) y es por ello que estos valores se muestran en blanco.

Max. Abs. Exp. (nm)	240	295	605	
Método	Base	Diferencia Teórico - Experimental		
B3LYP	LanL2DZ		15.49	-41.07
	CC-PVTZ		8.14	52.05
	6-311+G(d,p)		11.03	-18.93
	SDD		7.41	-9.96
CAM-B3LYP	LanL2DZ	36.33	-6.9	-6.39
	CC-PVTZ	31.64	-14.02	46.91
	6-311+G(d,p)	38.15	-2.47	20.1
	SDD	36.68	0.39	4.04
	Def2-TZVP	35.61	7	60.71
t-HCTHhyb	LanL2DZ		16.68	-5.5
	CC-PVTZ		17.22	14.44
	6-311+G(d,p)		19.53	-46.07
	SDD		15.98	-26.53
PBEO	LanL2DZ		10.45	-31.35
	CC-PVTZ		0.73	54.18
	6-311+G(d,p)		1.44	30.83
	SDD		-2.91	-1.6
wB97XD	LanL2DZ	34.91	1.33	-71.28
	CC-PVTZ	34.28	0.95	-31.17
	6-311+G(d,p)	38.09	-2.14	83.96
	SDD	28.88	-1.89	177.77
m05-2x	LanL2DZ		19.95	-13.88
	CC-PVTZ		17.46	-4.8
	6-311+G(d,p)		33.28	-3.12
	SDD		23.03	-11.75

Tabla 5.3. Selección de nivel de teoría para el cálculo de espectros UV-Vis para la CasIII-a.

Las diferencias en los valores de la primera señal se encuentran entre 28.88 nm y 38.15 nm, lo que indica que no se tiene una buena aproximación y que incluso no se logró identificar con algunos métodos. Respecto a la segunda señal (295 nm) el valor de mínima diferencia fue de 0.39 nm y el máximo de 33.38 nm, lo que señala que algunos métodos sí son capaces de describir dicha transición adecuadamente y se descarta a aquellos con valores muy grandes en la diferencia.

En el caso de la señal de nuestro interés, es decir, la encontrada en 605 nm y asociada al centro metálico del complejo, vemos que el valor mínimo de diferencia es adecuado (1.6 nm) y que el máximo (de 177.77 nm) podría ya tratarse de una transición completamente diferente. Vemos que varios de los métodos y bases se alejan demasiado de los valores experimentales, obteniéndose diferencias mayores a 30 nm que salen del rango mencionado anteriormente de 590-620 nm. Enfocándonos en los valores de diferencia menores, 1.6, 3.12 y 4.04 nm, y considerando las diferencias de los otros máximos, podemos identificar que el mejor nivel de teoría para describir las señales de absorción de las Casiopeínas® es CAM-B3LYP/SDD, el cual será utilizado en el cálculo del resto de espectros de absorción electrónica.

Teniendo esto en cuenta se calcularon los espectros UV-Vis de ambas geometrías propuestas para el intermediario, es decir, el aducto Cas-Cys con geometrías octaédrica y pirámide de base cuadrada, ambos mostrados en la Figura 5.8 en color rojo y azul, respectivamente. Además, en color negro se muestra el espectro experimental del aducto Cas-Cys en el que se observan dos máximos de absorción: el primero en 395 nm asociado a la parte aromática del complejo, y el segundo con un valor de 598 nm correspondiente a las transiciones del cobre(II). Si comparamos este valor con el máximo de 605 nm obtenido para la CasIII-ia vemos que hay un ligero desplazamiento del máximo de absorción hacia valores menores cuando el azufre se coordina al cobre(II) y ocupa la posición axial vacante.

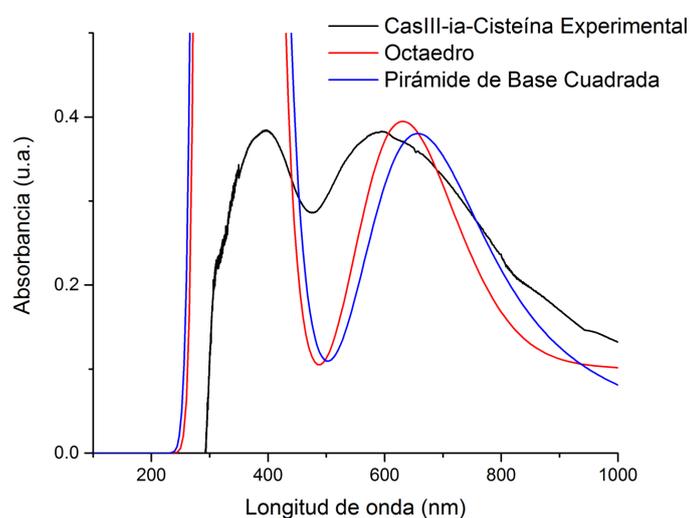


Figura 5.8. Espectro experimental UV-Vis para el aducto Cas-Cys (negro), y su comparación con los espectros calculados con geometría octaédrica (rojo) y pirámide de base cuadrada (azul).

Los espectros simulados muestran que la señal correspondiente al cobre(II) en el arreglo octaédrico tiene un valor de 626 nm. Esta señal se debe a 22 transiciones diferentes, siendo las que más contribuyen: SOMO-20→SOMO, SOMO-16→SOMO y SOMO-16→LUMO, en donde los orbitales SOMO se localizan principalmente en el ligante secundario, el centro metálico y la cisteína, mientras

que el LUMO se localiza en su mayoría sobre el ligante primario. Estos orbitales que más contribuyen se muestran en la Figura 5.9.

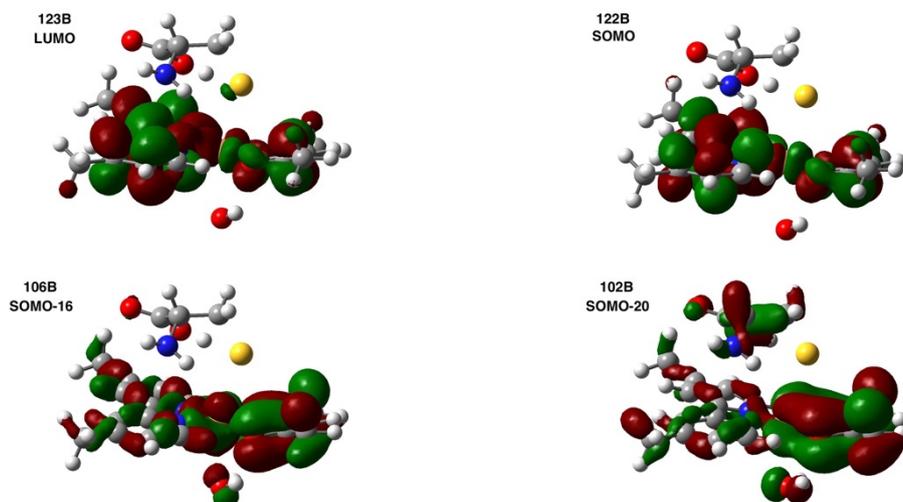


Figura 5.9. Orbitales moleculares que más contribuyen en la transición electrónica del cobre(II) para la geometría octaédrica.

En el caso de la geometría pirámide de base cuadrada el valor de transición electrónica del cobre(II) se encuentra hasta 663 nm. Esta señal se debe también a 22 transiciones diferentes, contribuyendo en su mayoría las transiciones: SOMO-18→SOMO, SOMO-18→LUMO and SOMO-15→LUMO, en donde los orbitales SOMO se localizan principalmente en el ligante secundario y el centro metálico, mientras que el LUMO se localiza en el ligante primario. Estos orbitales se muestran en la Figura 5.10.

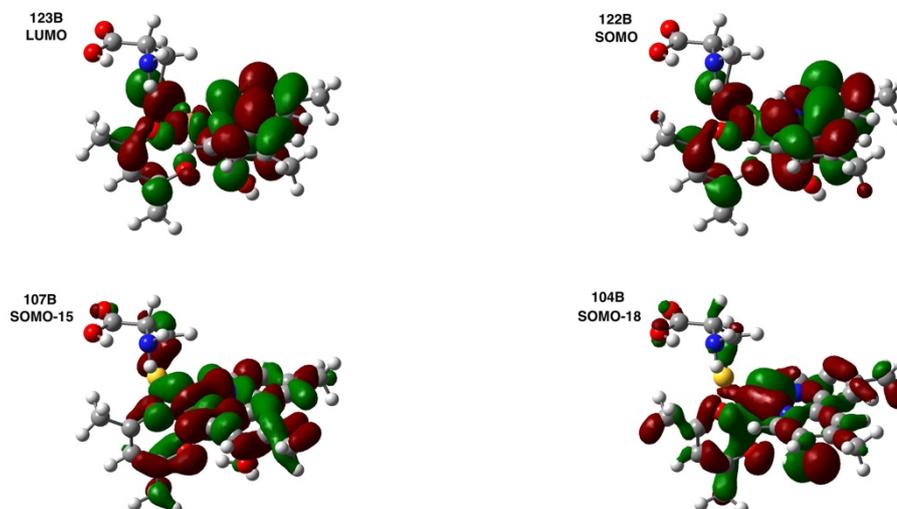


Figura 5.10. Orbitales moleculares que más contribuyen en la transición electrónica del cobre(II) para la geometría pirámide de base cuadrada.

Esta técnica espectroscópica no nos permite diferenciar aún cuál es la geometría preferida por el centro metálico al reaccionar con un grupo tiolado, sin embargo, éstos espectros indican que puede preferirse una geometría octaédrica por la cercanía entre los máximos de absorción del aducto Cas-Cys experimental y la simulación de esta geometría.

b) Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR)

Para analizar los espectros de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR, del inglés: *Electron Paramagnetic Resonance*), también fue necesario hacer el análisis del nivel de teoría más adecuado con el fin de obtener la mejor descripción de los experimentos.

La Tabla 5.4 muestra las diferencias entre los parámetros calculados y los del experimento con cada método y base utilizado. En la parte superior se muestran los valores experimentales de la CasIII-ia, es decir, la referencia en las diferencias de cada caso.

El espectro obtenido para la CasIII-ia es un espectro típico para una especie de cobre(II) con simetría axial y, por tanto, los parámetros $g_{xx} = g_{yy}$ y $A_{xx} = A_{yy}$. Para la CasIII-ia el valor de g_{xx} y g_{yy} es de 2.0767, y el de g_{zz} es 2.2517, y las constantes de acoplamiento A_{xx} y A_{yy} tienen el valor 7.47 MHz, y A_{zz} tiene el valor 117.4 MHz.

Parámetros de EPR		g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}
Experimental		2.0767	2.0767	2.2517	7.47	7.47	117.4
Método	Base	Diferencia Teórico - Experimental					
B3LYP	Def2-TZVP	-0.026	-0.026	-0.099	248.13	248.13	266.50
	Def2-SVP	-0.029	-0.029	-0.106	97.79	97.79	68.60
	CC-PVDZ	-0.023	-0.023	-0.094	248.74	248.74	247.02
PBE0	LanL2DZ	-0.025	-0.025	-0.095	272.02	271.02	204.14
	Def2-TZVP	-0.018	-0.018	-0.071	253.52	253.52	270.88
	Def2-SVP	-0.003	-0.003	-0.037	253.18	253.18	261.10
wB97X-D3	CC-PVDZ	-0.018	-0.018	-0.076	262.40	262.40	245.75
	Def2-TZVP	-0.016	-0.016	-0.066	310.21	310.21	219.96
	Def2-SVP	-0.016	-0.016	-0.072	232.14	232.14	240.11

Tabla 5.4. Selección de nivel de teoría para el cálculo de espectros EPR de la CasIII-ia.

Analizando los valores de diferencia entre el espectro calculado y el experimental, vemos que la variación de los métodos no influye en gran medida en los cambios del parámetro g , todas se encuentran en un rango de diferencia entre 0.003 y 0.106, pero sesgado alrededor de 0.02. En contraste, los valores de diferencia para las constantes de acoplamiento A son muy grandes y eso provoca que se alejen del comportamiento experimental; es por ello que la elección del mejor método se centró más en la diferencia de los valores de A que en los valores de g . Tomando esto en cuenta, la mejor aproximación se obtiene con el funcional B3LYP y la base Def2-SVP, en donde la diferencia en los valores de g es de 0.029 y 0.106, y la diferencia en los valores de A es de 97.79 y 68.60, siendo estas diferencias razonables al compararlas con otros trabajos de cálculos de espectros EPR para complejos de cobre(II)^[101,102].

La Tabla 5.5 muestra los valores de g y A experimentales y calculados con el nivel de teoría B3LYP/def2-SVP, para el reactivo de reacción (CasIII-ia) y el intermediario (aducto Cas-Cys) en las dos geometrías propuestas computacionalmente.

Los datos para el aducto Cas-Cys reflejan que se trata de una simetría isotrópica, es decir, ahora se cumple que $g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$ y $A_{xx} = A_{yy} = A_{zz}$, lo que indica un completo cambio en el ambiente electrónico del cobre(II). En este caso, el valor experimental de g es 2.10557 y el valor de A es 48.797 MHz.

Muestra	Espectro	Parámetros de EPR					
		g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}
CasIII-ia	Experimental	2.0767	2.0767	2.2517	7.47	7.47	117.4
	Computacional	2.0466	2.0466	2.1458	105.26	105.26	-185.99
Cas-Cys	Experimental	2.10557	2.10557	2.10557	48.797	48.797	48.797
	Computacional: Octaedro	2.1010	2.1010	2.1010	104.57	104.57	104.57
	PBC	2.0755	2.0755	2.0755	23.85	23.85	23.85

Tabla 5.5. Valores experimentales y computacionales de los parámetros g y A (MHz) de EPR para la CasIII-ia y el aducto Cas-Cys en geometría octaédrica y pirámide de base cuadrada (PBC).

La Figura 5.11 muestra los espectros del aducto Cas-Cys experimental (negro), y los espectros calculados para la geometría octaédrica (rojo) y pirámide de base cuadrada (azul). Al comparar estos valores con las dos geometrías propuestas vemos que el valor de g para el octaedro es más cercano al experimental (diferencia de 0.0045 para octaedro y 0.03 para PBC), pero que el valor de A de la geometría pirámide de base cuadrada es más cercano al valor experimental (diferencia de 55.77 MHz para octaedro y 24.95 MHz para PBC).

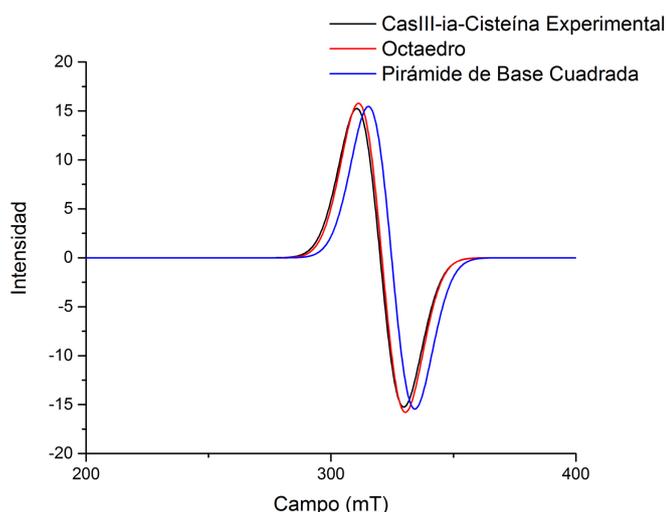


Figura 5.11. Espectro experimental de EPR para el aducto Cas-Cys (negro), y su comparación con los espectros calculados con geometría octaédrica (rojo) y pirámide de base cuadrada (azul).

Esta comparación aún no nos permite discernir entre la preferencia de una geometría u otra, aunque el acercamiento de los valores de g para la geometría octaédrica es mayor en comparación a la pirámide de base cuadrada.

c) Infrarrojo

Nuevamente se identificó inicialmente si el nivel de teoría era el adecuado mediante la comparación de los espectros Infrarrojo (IR) calculados con los experimentales, además, comparando las señales con base a lo reportado en la literatura para la cisteína^[103,104] y los trabajos del grupo de investigación en Casiopeínas^[105]. La Tabla 5.6 muestra los valores y las diferencias entre ellos para las señales más importantes en la cisteína y en la CasIII-ia, además de los átomos involucrados y el tipo de vibración en cada señal:

Molécula	Átomos de enlace	Tipo	Computacional	Experimental	Diferencia
Cisteína	C-N	Stretching	278.0	292.65	-14.65
	C-S	Stretching	669.99	692.32	-22.33
	S-H	in-plane bending	1056.73	1063.55	-6.82
CasIII-ia	C-N	Twisting	279.73	294.0	-14.27
	Cu-O	Rocking	603.88	596.0	7.88

Tabla 5.6. Señales de IR (cm^{-1}) del espectro experimental y calculado de la cisteína y la CasIII-ia.

Nos enfocamos en estos enlaces debido a que al momento de ocurrir una coordinación entre el complejo y la cisteína éstos son los enlaces que pudieran verse más afectados o involucrados en la nueva interacción.

En el caso de la cisteína la diferencia menor ocurre en el enlace S-H con un valor de 6.82 cm^{-1} y la mayor ocurre en el enlace C-S con un valor de 22.33 cm^{-1} . En la CasIII-ia las diferencias son 7.88 cm^{-1} para el enlace Cu-O y 14.27 cm^{-1} para el enlace C-N. Puesto que la diferencia entre las señales experimentales y computacionales es mínima, entre 6.82 y 22.33 cm^{-1} , se puede hablar de que el método M05-2X/LanL2DZ es adecuado para describir los espectros de infrarrojo.

La Tabla 5.7 muestra los valores de las señales más importantes del aducto Cas-Cys, comparando los valores experimentales (en rangos debido a que los espectros se tomaron a diferentes tiempos para ver la modificación del espectro con respecto a el) con los valores del espectro computacional para las geometrías octaédrica y pirámide de base cuadrada. El resultado más importante obtenido con el espectro IR computacional es la elucidación de la señal correspondiente a la coordinación del azufre al cobre, ya que, al observar esta señal en 179 cm^{-1} en el octaedro y en 194 cm^{-1} en la pirámide de base cuadrada podemos asociarla con la señal experimental en 187 cm^{-1} que apareció como una nueva señal en el aducto. Como consecuencia de esta nueva interacción, al llevarse a cabo la reacción entre la CasIII-ia y la cisteína podemos identificar los desplazamientos en las señales en los espectros experimentales. En el caso de la CasIII-ia, las señales correspondientes a los enlaces C-N se debilitan al formarse la nueva especie, pasando de 294 cm^{-1} a 289 cm^{-1} . Para la cisteína, la señal correspondiente al enlace C-S tuvo un desplazamiento desde 692 cm^{-1} hasta 685 cm^{-1} .

Geometría	Átomos de enlace	Tipo	Computacional	Experimental
Octaedro	Cu-S	symmetric stretching	178.75	175-188
	Cu-S	rocking	263.79	267-279
	C-S	symmetric stretching	628.08	636-652
	C-S	asymmetric stretching	702.07	692-707
Pirámide de Base Cuadrada	Cu-S	symmetric stretching	193.99	175-188
	O-Cu-S	asymmetric stretching	252.01	267-279
	O-Cu-O _{axial}	twisting	580.69	593-599
	C-S	symmetric stretching	669.8	636-652

Tabla 5.7. Señales de IR (cm^{-1}) para el aducto Cas-Cys, valores experimentales y computacionales en geometría octaédrica y pirámide de base cuadrada.

d) Espectrometría de Masas

Uno de los resultados experimentales más sobresalientes es el obtenido con la Espectrometría de Masas de Análisis Directo en Tiempo Real (DART-MS, por sus siglas en inglés). En este caso, el polvo de reacción se insertó en el detector y se obtuvo el espectro de la Figura 5.12 a una temperatura de 200°C . El pico con el valor $m/Z = 185$ corresponde al ligante primario de la CasIII-ia (dimetilbipiridina

en este caso), la señal en $m/Z= 262$ corresponde al complejo $\text{Cu}(\text{acetilacetato})_2$, y el pico en $m/Z= 346$ corresponde a la CasIII-ia.

La señal que cobra mayor interés es la obtenida en $m/Z= 423$ (Figura 5.12-B), ya que corresponde al aducto Cas-Cys con la pérdida del grupo carboxílico, en forma de agua y monóxido de carbono, de la cisteína debido al proceso de ionización de la técnica. Este proceso se ha reportado en aminoácidos, incluyendo la cisteína^[106,107].

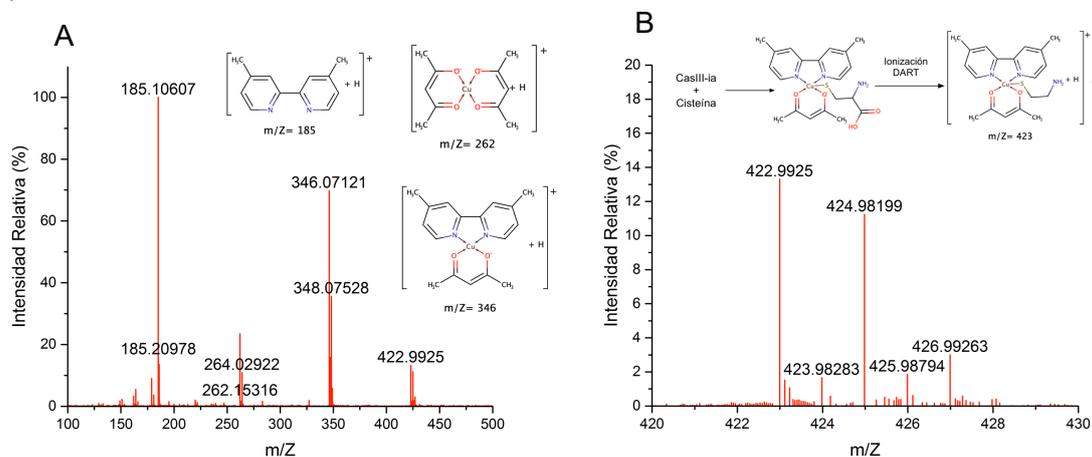


Figura 5.12. Espectro DART del aducto Cas-Cys a 200 °C: A) Intervalo m/Z de 100 a 500; B) intervalo m/Z de 420.

El conjunto de estas técnicas experimentales, aunque no ayudan a discernir entre una geometría u otra, confirman que la primera aproximación en la interacción entre una Casiopeína® y un grupo tiol se da mediante la formación de un aducto Cas-Cys, en donde ocurre una donación de densidad electrónica del azufre hacia el centro metálico. El siguiente paso es analizar qué ocurre en el ambiente electrónico del centro metálico al darse dicho acercamiento.

Transferencia electrónica

Con el fin de observar qué ocurre con la densidad electrónica durante el proceso de interacción entre las Casiopeínas® y una especie con un grupo tiol, se analizaron los cambios en las propiedades atómicas que derivan de la densidad electrónica, específicamente en la densidad de espín, para 3 complejos diferentes de la familia Casiopeína®: CasIII-ia [Cu(4,4'-dimetil-bipiridina)(acetilacetato)] (Figura 5.2-A), CasIII-Ea [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)] (Figura 5.2-B), y CasII-gly [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)] (Figura 5.2-C).

El primer paso consistió en comparar para cada complejo la densidad de espín en cuatro diferentes etapas de la reacción representadas por las geometrías minimizadas de la Figura 5.13 (se muestra la CasIII-ia como modelo): primero la Casiopeína® (A), que se toma como referencia durante el proceso; después las geometrías octaédrica (B) y pirámide de base cuadrada (C) para el aducto Casiopeína®-Cisteína; y finalmente, una geometría con una distancia de enlace Cu-S de 5.0 Å (D) que representa el producto final de la reacción, es decir, el complejo de cobre(I) y la formación del radical tiilo que posteriormente puede formar el enlace disulfuro. Esta última se obtuvo al minimizar la geometría manteniendo fija la distancia de enlace Cu-S en dicho valor, observándose que se tiene como resultado una geometría tetraédrica del complejo, típica de un cobre(I), al alejarse la cisteína después de estar coordinada al metal.

Cabe mencionar que las distancias de enlace Cu-S en el octaedro y la pirámide de base cuadrada son, en ese orden: 2.82 Å y 2.37 Å en la CasIII-ia, 2.63 Å y 2.37 Å en la CasIII-Ea, y para la CasII-gly 2.54 Å y 2.38 Å. La única diferencia significativa entre los complejos es que en la minimización de energía de la etapa C de la CasII-gly se obtuvo una geometría bipirámide trigonal, con el ligante primario y el nitrógeno del ligante secundario ocupando las posiciones de coordinación ecuatoriales, el oxígeno del ligante secundario ocupando la posición axial al desplazar la molécula de agua, y el átomo de azufre coordinado en la posición axial superior.

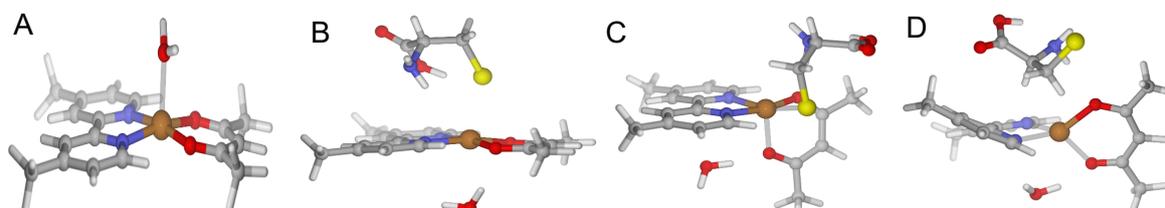


Figura 5.13. Geometrías para el análisis de la densidad de espín en cada etapa: (A) CasIII-ia, (B) aducto CasIII-ia-Cys con geometría octaédrica, (C) aducto CasIII-ia-Cys con geometría pirámide de base cuadrada, y (D) CasIII-ia de cobre(I) con cisteína alejada hasta 5.0 Å.

Para las cuatro geometrías de los tres complejos se calculó la densidad de espín del cobre y azufre bajo la aproximación de la Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas^[70]. Los valores de esta propiedad se muestran en la Tabla 5.8 y de manera gráfica en la Figura 5.14. Para las tres Casiopeínas® (etapa A) podemos ver que la densidad de espín del cobre toma valores entre 0.76 y 0.78 e^- ; en este caso el azufre no tiene un valor porque no se encuentra presente en la molécula.

Cuando se ve involucrada la cisteína en una geometría octaédrica (etapa B), este valor en el metal aumenta para la CasIII-ia y la CasIII-Ea, y disminuye ligeramente en la CasII-gly; además, vemos que los valores iniciales de densidad de espín en el azufre son de 0 e^- , indicando que su capa de valencia está completa. En contraste, cuando pasamos a la etapa C que corresponde a la geometría pirámide de base cuadrada vemos una disminución en los tres casos de alrededor de 0.1 e^- en el átomo de cobre, siendo notoria la transferencia al átomo de azufre debido al aumento de valor 0.1 e^- .

Sin embargo, al pasar de la etapa C a la etapa D se invierten por completo los valores, ya que el átomo de cobre en los tres complejos toma valores de 0 e^- y el átomo de azufre absorbe toda la densidad de espín tomando valores de 0.9 e^- . Esto indica una clara transferencia de densidad electrónica β desde el azufre, que inicialmente tenía sus capas α y β completas, hacia el cobre, que parte de un exceso de densidad α y deficiencia de densidad β indicativo del estado de oxidación 2+, y que conluye en el cambio en estado de oxidación del metal a 1+ y la formación de un radical en el átomo de azufre debido a un exceso de densidad α . La Figura 5.14 muestra en una gráfica de barras el comportamiento de estos cambios en la densidad de espín para la CasIII-ia, solo se representa dicho compuesto considerando que el comportamiento es muy similar en la CasIII-Ea y en la CasII-gly.

Cuando se ve involucrada la cisteína en una geometría octaédrica (etapa B), este valor en el metal aumenta para la CasIII-ia y la CasIII-Ea, y disminuye ligeramente en la CasII-gly; además, vemos que los valores iniciales de densidad de espín en el azufre son de 0 e^- , indicando que su capa de valencia está completa. En contraste, cuando pasamos a la etapa C que corresponde a la geometría pirámide de base cuadrada vemos una disminución en los tres casos de alrededor de 0.1 e^- en el átomo de cobre, siendo notoria la transferencia al átomo de azufre debido al aumento de valor 0.1 e^- .

Complejo	Átomo	Densidad de espín (e^-)			
		Etapa A	Etapa B	Etapa C	Etapa D
CasIII-ia	Cu	0.7828	0.7867	0.6978	0.0014
	S	NA	-0.0027	0.1452	0.9435
CasIII-Ea	Cu	0.784307	0.808387	0.694405	0.002164
	S	NA	-0.003054	0.150285	0.95111
CasII-gly	Cu	0.7629	0.7595	0.6892	-0.000098
	S	NA	0.0342	0.1324	0.9245

Tabla 5.8. Valores de densidad de espín (e^-) de los átomos de cobre y azufre en las etapas A, B, C y D (Figura 5.13) para CasIII-ia, CasIII-Ea y CasII-gly (Figura 5.2). NA indica que No Aplica, debido a que en la etapa A no hay presencia de azufre.

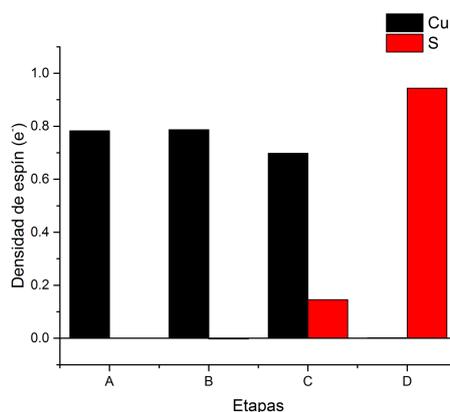


Figura 5.14. Comportamiento de la densidad de espín (e^-) del cobre (negro) y azufre (rojo), en las cuatro etapas de reacción para la CasIII-ia.

Sin embargo, al pasar de la etapa C a la etapa D se invierten por completo los valores, ya que el átomo de cobre en los tres complejos toma valores de $0 e^-$ y el átomo de azufre absorbe toda la densidad de espín tomando valores de $0.9 e^-$. Esto indica una clara transferencia de densidad electrónica β desde el azufre, que inicialmente tenía sus capas α y β completas, hacia el cobre, que parte de un exceso de densidad α y deficiencia de densidad β indicativo del estado de oxidación $2+$, y que concluye en el cambio en estado de oxidación del metal a $1+$ y la formación de un radical en el átomo de azufre debido a un exceso de densidad α . La Figura 5.14 muestra en una gráfica de barras el comportamiento de estos cambios en la densidad de espín para la CasIII-ia, solo se representa dicho compuesto considerando que el comportamiento es muy similar en la CasIII-Ea y en la CasII-gly.

Para obtener una descripción más detallada del cambio en la densidad de espín durante todo el proceso, especialmente de lo que ocurre entre las etapas C y D, se realizó un barrido de la distancia Cu-S con intervalos de 0.5 \AA y con intervalos de 0.1 \AA cerca de la transferencia electrónica, calculando dicha propiedad en cada punto.

La Tabla 5.9 muestra los valores de densidad de espín en el átomo de Cu y S conforme cambia la distancia de enlace entre ellos en la CasIII-ia, además se muestran los valores de la Casiopeína® (Figura 5.13-A) y se etiquetan los valores del aducto CasIII-ia-Cisteína octaédrico (Figura 5.13-B) y pirámide de base cuadrada (PBC, Figura 5.13-C). Estos datos muestran que los valores del átomo de cobre van disminuyendo conforme la distancia de enlace Cu-S aumenta; sin embargo, no es un cambio

significativo hasta que entre 3.9 Å y 4.0 Å se da la transferencia electrónica de manera inmediata. En contraste, los valores del átomo de azufre son de 0 e⁻ en las primeras distancias de enlace, al llegar a 4 Å alcanza un valor de 0.92 e⁻ y una vez que la distancia es de 5 Å (Figura 5.13-D) se alcanza el valor mayor de 0.94 e⁻.

Distancia Cu-S (Å)	Densidad de espín (e ⁻)	
	Cu	S
CasIII-ia	0.782737	NA
Octaedro (2.82)	0.78669	-0.002683
PBC (2.37)	0.697838	0.145241
3	0.674146	0.185521
3.5	0.784289	-0.001474
3.6	0.782192	-0.001251
3.7	0.780671	-0.001052
3.8	0.779553	-0.000832
3.9	0.79617	-0.000184
4	0.00137	0.920494
4.5	0.00287	0.928122
5	0.001442	0.943536

Tabla 5.9. Valores de densidad de espín (e⁻) para los átomos de Cu y S durante el barrido de distancia entre ellos en la CasIII-ia. NA indica que No Aplica, debido a que en la etapa A no hay presencia de azufre.

La Figura 5.15 representa gráficamente el comportamiento de los valores de densidad de espín para los átomos de Cu (en negro) y los átomos de azufre (en rojo) para los tres complejos: (A) CasIII-ia, (B) CasIII-Ea, y (C) CasII-gly. En todos los casos se parte de la geometría PBC (o bipirámide trigonal en el caso de la CasII-gly) y se muestra el valor de la geometría octaédrica como un marcador sin relleno como referencia de su comportamiento.

En el caso de la CasIII-Ea, la transferencia electrónica se da entre 3.5 Å y 3.6 Å; y en el caso de la CasII-gly, este cambio ocurre entre 3.95 Å y 4.0 Å. De manera general, podemos ver que la transferencia electrónica se da de manera concertada entre 3.5 y 3.9 Å, dependiendo del complejo, y no como un proceso gradual a lo largo de la coordenada de reacción.

En la Figura 5.16 se recopilan las geometrías de todos los puntos del barrido de distancia de enlace para la CasIII-ia, en donde vemos que a distancias menores de 3.0 Å el complejo prefiere una geometría PBC, y después de esta distancia se prefiere el octaedro hasta darse por completo la transferencia electrónica en 4.0 Å, culminando con una geometría tetraédrica correspondiente al complejo de cobre(I). También notamos que a partir de 4.0 Å es factible que la cisteína se aleje del centro metálico, prefiriendo la formación del radical en el azufre a buscar seguir coordinada por cualquier átomo donador al metal. Recordemos que, la geometría PBC en la CasIII-ia es sólo 4.9 kcal/mol más estable en comparación con la geometría octaédrica, y que esta diferencia nos habla de la posibilidad de llevar a cabo un intercambio entre ambas geometrías fácilmente.

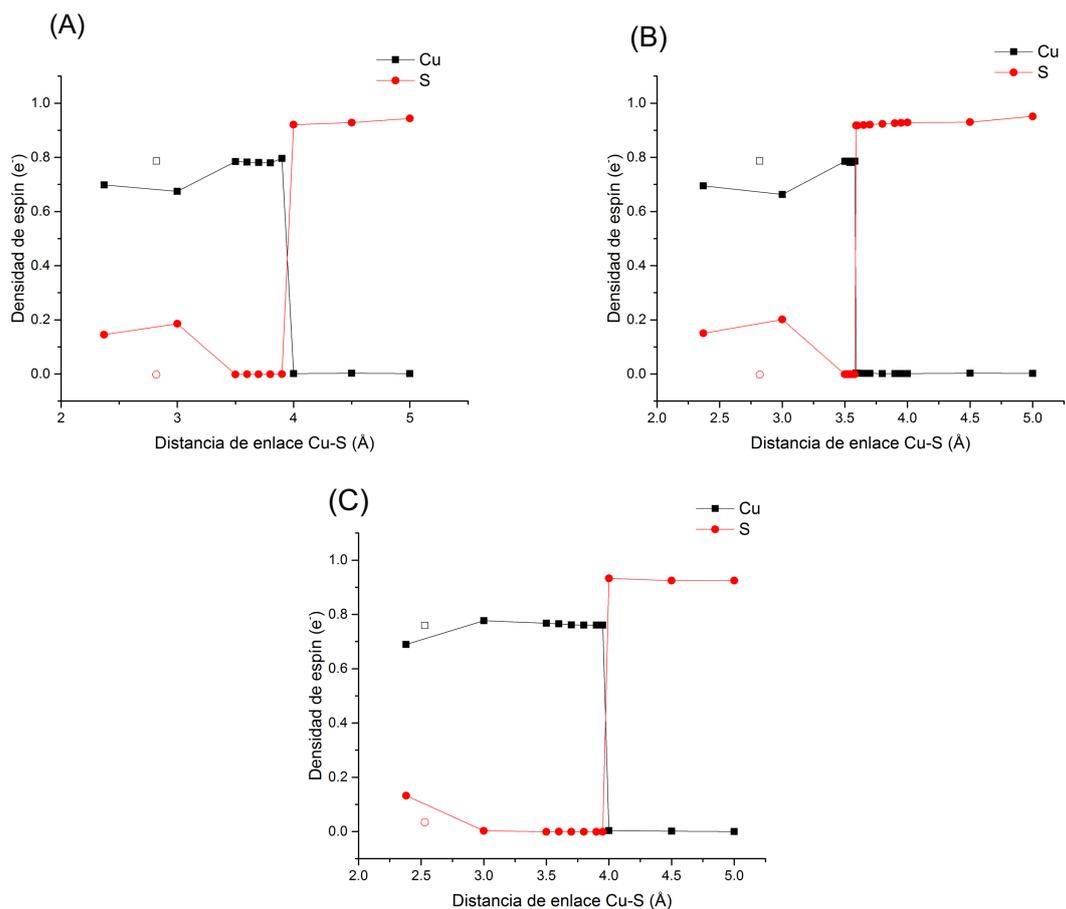


Figura 5.15. Cambio en la densidad de espín (e^-) durante el barrido de la distancia de enlace Cu-S (Å) para (A) CasIII-ia, (B) CasIII-Ea y (C) CasII-gly. Valores de cobre en negro y valores de azufre en rojo. El marcador sin relleno corresponde a la geometría octaédrica (Figura 5.13-B) para su comparación.

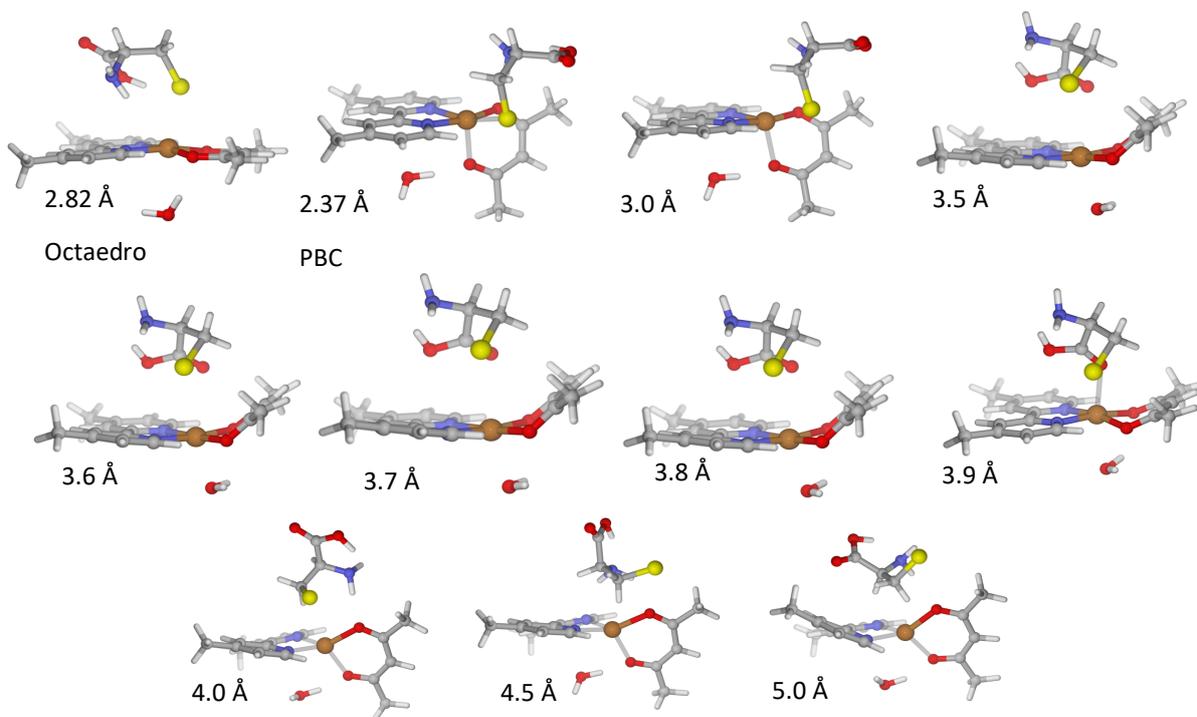


Figura 5.16. Geometrías y distancias de enlace de cada punto en el barrido de la distancia Cu-S para la CasIII-ia.

La teoría Cuántica de Átomos en Moléculas también nos ayudó a conocer las gráficas atómicas del cobre antes y después del proceso de transferencia electrónica, las cuales se muestran en A y B, respectivamente, de la Figura 5.17. Antes de la transferencia electrónica vemos que la gráfica atómica corresponde a un átomo de cobre(II), en donde los ligantes apuntan directamente a los huecos con deficiencia electrónica del metal. Después de la transferencia se lleva a cabo un reacomodo de la distribución electrónica y se obtiene una gráfica atómica típica de un cobre(I).

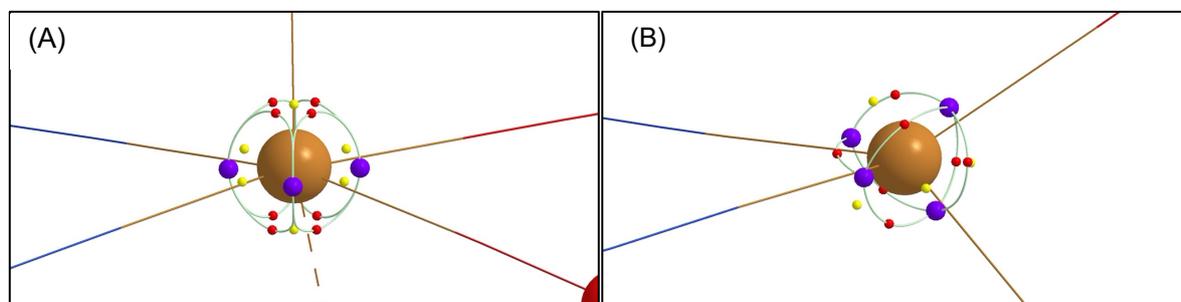


Figura 5.17. Gráfica atómica para las geometrías con distancia de enlace Cu-S (A) 3.9 Å (antes de la transferencia electrónica) y (B) 4.0 Å (después de la transferencia electrónica). Puntos críticos: (3,+3) en morado, (3,+1) en rojo, y (3,-1) en amarillo.

Con este ensayo fue posible notar que el cambio en la densidad de espín ocurre de forma concertada a una distancia de enlace Cu-S de 3.95 Å (puede variar hasta 0.5 Å dependiendo del complejo), lo cual nos indica que un electrón del azufre se transfiere al centro metálico y se produce el radical sulfhidrilo que llevará a cabo la formación del enlace disulfuro al encontrarse con otra especie tiolada, además del cambio en geometría del centro metálico en el complejo de Cu^{II} a Cu^I. Este intermediario puede reaccionar con otro sistema igual, o en su defecto con un sistema tiolado y formar el enlace disulfuro y la geometría tetraédrica del complejo de cobre, como se propone en el resto del mecanismo en la siguiente sección.

También se estudio qué sucede cuando hay oxígeno presente en la reacción con la CasII-gly, con el fin de modelar ese ambiente experimental que considera el mecanismo propuesto por Kachadourian^[55] y se representó en la Figura 5.1. En este caso proponemos que el oxígeno actúa directamente con el grupo tiol, y por tanto, analizamos cómo sucede esa interacción mientras la cisteína está coordinada a la Casiopeína®, esperando en este caso la generación del radical soportado en el átomo de oxígeno R-S-O-O• y el cambio en el estado de oxidación del metal a un sistema tetraédrico de Cu^I.

Para esta parte del mecanismo se minimizaron las geometrías en dos estados electrónicos que se muestran en la Figura 5.18: (A) cuarteto, debido a que el oxígeno es inicialmente triplete y sumado al aducto se obtienen tres electrones libres correspondientes a esta multiplicidad total; y (B) doblete, al cambiar el estado de oxidación del metal a cobre(I) y formarse el radical Cisteína-S-O-O• en el oxígeno se tiene un solo electrón libre, y por tanto, esta multiplicidad.

En el estado cuarteto, podemos ver que al encontrarse presente el oxígeno ya no se favorece la interacción Cu-S que se favorecía al desprotonar el grupo sulfhidrilo en el aducto, puesto que la distancia de enlace aumentó hasta 3.23 Å. Dicho enlace es aún menos favorecido cuando se obtiene el estado doblete, puesto que la distancia de enlace aumenta hasta 4.47 Å. Sin embargo, al cambiar al estado doblete sí se favorece el enlace S-O y la formación del radical R-S-O-O•, interacción importante para la promoción de la transferencia electrónica, partiendo de una distancia de enlace S-O en el

cuarteto de 1.92 Å y terminando en 1.88 Å en el estado doblete. Cabe mencionar que existe una diferencia energética de 16.57 kcal/mol favoreciendo a la especie en estado electrónico doblete.

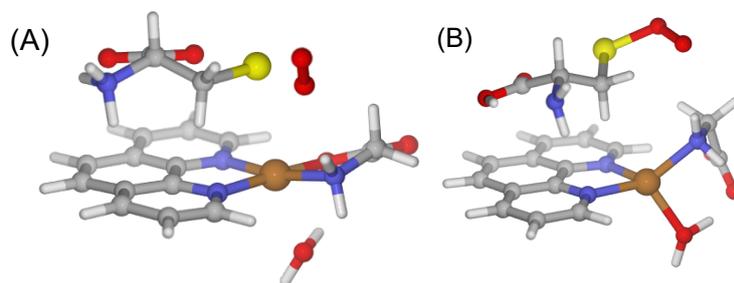


Figura 5.18. Geometrías del aducto CasII-gly-Cisteína en presencia de oxígeno, en estado (A) cuarteto y (B) doblete.

Para ambas geometrías se calculó la densidad de espín bajo la Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas, la Figura 5.19 muestra los valores en los átomos de cobre, azufre y oxígeno (siendo el O1 el más cercano al azufre y el O2 el más lejano) en color negro para el estado cuarteto y en color rojo para el estado doblete.

Si nos enfocamos en el cobre en estado cuarteto podemos ver que inicialmente tiene sus capas α y β llenas, esto indica que en este momento ya se llevó a cabo la transferencia de densidad electrónica β del azufre hacia el metal y se confirma por el valor en este estado para el azufre que indica un exceso de densidad α . Ambos átomos de oxígeno tienen en el estado cuarteto un exceso de densidad α , lo que concuerda con el estado electrónico triplete de esta molécula. Cuando se da el cambio de estado electrónico cuarteto a doblete notamos que el cobre dona densidad β al azufre, quedando con un exceso de densidad α , para que éste forme un enlace con el O1 mientras que el O2 permanezca con un exceso de densidad α y por tanto soporte el radical. Como resultado tenemos al complejo con una carga 2+ y la formación del radical Cisteína-S-O-O·.

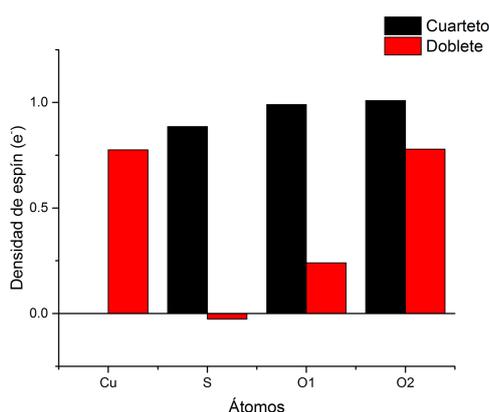


Figura 5.19. Comportamiento de la densidad de espín (e^-) de los átomos más importantes en la interacción Casiopeína®-Cisteína en presencia de oxígeno en estado cuarteto (negro) y doblete (rojo).

Tomando como punto de partida el radical Cisteína-S-O-O· se añadió una segunda molécula de cisteína, con el grupo tiol protonado, con el fin de estudiar la formación del enlace disulfuro (S-S) y del radical hidroperoxilo (H-O-O·). Para esta sección se analizaron los cambios en la densidad de espín

(mostrados en la Figura 5.20) en el reactivo, en un paso intermedio de la minimización y en el producto de la interacción en los átomos involucrados: el azufre (S1) y los átomos de oxígeno (O1 y O2) del radical Cisteína-S-O-O· (siendo el O2 el enlazado al S1, y el O1 el que soporta el radical) y el azufre (S2) de la segunda cisteína.

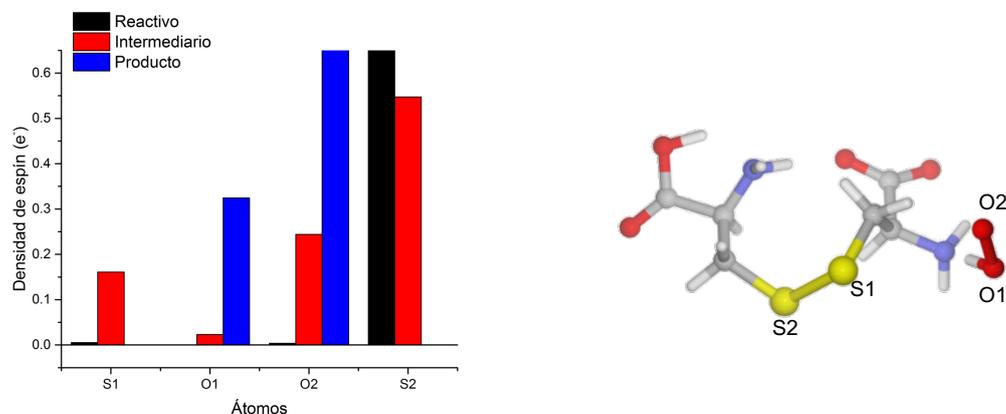


Figura 5.20. Densidad de espín (e^-) en la formación del enlace disulfuro y el radical hidroperoxilo.

El primer paso de este proceso es la desprotonación del azufre S2 por el oxígeno O2 del radical Cisteína-S-O-O·, lo que produce un exceso de densidad α en el S2 y la capa completa en el resto de los átomos. En ese momento ambos átomos de azufre se acercan y se lleva a cabo una redistribución de la densidad electrónica, en donde se nota la disminución de densidad α en el S2 que se reparte entre el S1 y ambos oxígenos. Finalmente, la pérdida de densidad de espín en ambos azufres indica la formación del enlace disulfuro (ambos completaron sus capas α y β), además se da la ruptura del enlace S1-O2, y como consecuencia la formación del radical hidroperoxilo (H-O-O·) comprobable con los valores de densidad de espín en el producto. El radical hidroperoxilo es una especie reactiva de oxígeno que puede interactuar con el ambiente y formar el radical hidroxilo, siendo este último el generador del daño celular.

Propuesta de mecanismo

El conjunto de todos los resultados mostrados en esta sección conducen a proponer el mecanismo de la interacción Casiopeína®-Cisteína en presencia (ruta izquierda) y ausencia (ruta derecha) de oxígeno como se detalla en la Figura 5.21.

Tenemos como punto de partida en ambos casos a los reactivos: Casiopeína® y una especie tiolada (cisteína o glutatión). El primer paso involucra la interacción Cu-S-H, a partir de una donación de densidad electrónica del azufre hacia el centro metálico, la cual se da mediante el acercamiento del azufre al cobre por la posición axial vacante en el complejo. Esta interacción Cu-S polariza el enlace S-H y fácilmente una molécula de disolvente puede acercarse y desprotonar al átomo de azufre. Dicha desprotonación del azufre favorece la interacción Cu-S, ya que la disminución en la distancia de enlace Cu-S indica el fortalecimiento del mismo y el debilitamiento del enlace Cu-O del agua coordinada al complejo, y como resultado puede observarse la formación de una especie octaédrica de Cu^{II}. A partir de la geometría octaédrica ocurre una transferencia electrónica que origina un cambio de geometría a una pirámide de base cuadrada. Estos cambios geométricos se asocian a los cambios de color en el

experimento y que caracterizamos como el intermediario en la reacción. Después de este paso, puede involucrarse o no una molécula de oxígeno.

Cuando el oxígeno está presente se sigue la ruta de la izquierda, en donde el movimiento de electrones en el aducto conduce a la formación del radical $R-S-O-O\cdot$ y al cambio en el estado de oxidación del cobre(II) a cobre(I) (primer producto de reacción). Este radical encuentra otra especie tiolada, y se lleva a cabo la formación del enlace disulfuro entre ellas y del radical hidroperoxilo ($H-O-O\cdot$), siendo este último quien genera más especies reactivas de oxígeno a nivel biológico.

En contraste, cuando el oxígeno no está presente y se da la ruta de la derecha, inicialmente se lleva a cabo un reacomodo del ambiente electrónico del metal que genera el intermediario con la geometría pirámide de base cuadrada o bipirámide trigonal (dependiendo de la Casiopeína®), para posteriormente llevarse a cabo la transferencia electrónica que conduce a la formación del complejo de cobre en estado de oxidación 1+ y del radical tiilo. Este radical tiilo se encuentra con una segunda especie tiolada y lleva a cabo la formación del enlace disulfuro.

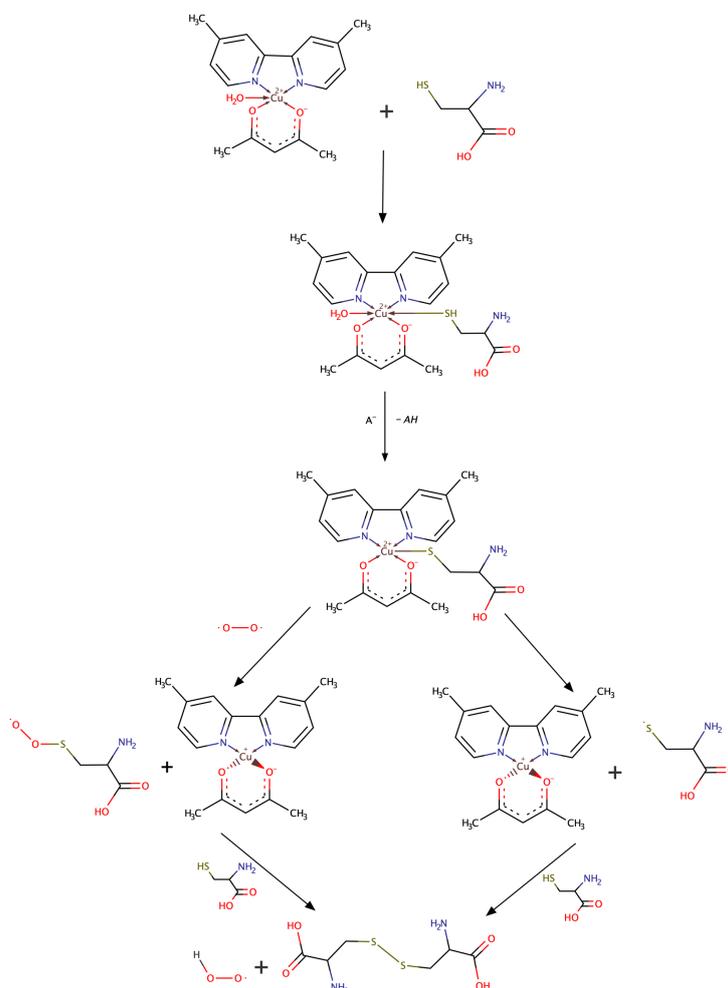


Figura 5.21. Mecanismo propuesto para la interacción de Casiopeínas® con reductores tiolados en presencia (ruta izquierda) y ausencia (ruta derecha) de oxígeno.

5.1.5 Conclusiones

El cambio en la estrategia de reacción experimental entre una Casiopeína[®] y una especie reductora tiolada, de un sistema en solución a un sistema en sólido, permitió identificar cambios de color en el sólido que corresponden a los cambios en el ambiente electrónico del centro metálico. Una de las etapas de reacción se caracterizó mediante diversas técnicas espectroscópicas que fueron complementadas con la aproximación computacional, contrastando de manera adecuada ambos resultados.

La caracterización del polvo y los cálculos computacionales conducen a la propuesta de dos geometrías diferentes para el aducto Casiopeína[®]-cisteína: (1) una geometría octaédrica, en donde los dos ligantes del compuesto de cobre ocupan las posiciones ecuatoriales, una molécula de agua ocupa una posición apical y la cisteína se une al cobre por el átomo de azufre en la posición apical restante; y (2) una geometría pirámide de base cuadrada, o bpirámide trigonal dependiendo del complejo de partida, en la cual, el azufre de la cisteína desplaza uno de los átomos de oxígeno del ligante secundario del complejo, y éste a su vez desplaza la molécula de agua de la posición apical.

A pesar de que los resultados experimentales correlacionan con los resultados computacionales, no se logró discernir entre una geometría u otra para el intermediario, por lo que se propone que inicialmente se obtiene la geometría octaédrica hasta que ocurre el proceso de transferencia electrónica en donde se pasa por la geometría pirámide de base cuadrada y el complejo finaliza en la geometría tetraédrica correspondiente al centro metálico reducido.

Además, se identificó el proceso de transferencia electrónica desde el átomo de azufre de la cisteína hacia el átomo de cobre de la Casiopeína[®] que se da de manera concertada a una distancia entre 3.5 y 4 Å (dependiendo del complejo). Dicha transferencia electrónica conduce a la reducción del complejo, pasando de un estado de oxidación Cu^{II} a Cu^I y cambiando de una geometría pirámide de base cuadrada a tetraédrica, y a la formación de un radical soportado en el azufre que posteriormente puede formar un enlace disulfuro con otro equivalente de especie tiolada.

Los resultados obtenidos en esta sección nos llevan a proponer un mecanismo de la interacción entre una Casiopeína[®] y una especie tiolada, obteniendo como productos una especie con un enlace disulfuro y un complejo de cobre(I), lo cual, no se ha reportado anteriormente con tanto detalle.

5.2 Determinación del Farmacóforo

En esta parte del trabajo presentaremos la identificación del sitio farmacofórico de una serie de complejos de cobre(II) que presentan actividad antitumoral. Para este fin se calcularon modelos de regresión lineal múltiple a partir de descriptores atómicos topológicos (TAD, del inglés: *Topological Atomic Descriptors*). Al identificar el farmacóforo podemos confirmar la importancia de estos enlaces en el reconocimiento molecular de los compuestos de Cu^{II} al momento de interactuar con el ADN.

Los resultados que se presentan a continuación fueron publicados en el año 2019 en la revista *Journal of Molecular Structure*. Para acceder al trabajo publicado, visite: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127480>.

5.2.1 Antecedentes

En el diseño de fármacos asistido por computadora es muy común usar el concepto de farmacóforo, el cual fue introducido por Monty Kier en una serie de trabajos publicados entre 1967 y 1971. Un farmacóforo o sitio farmacofórico se define como el arreglo espacial de grupos funcionales en una molécula que es esencial para su reconocimiento molecular y actividad biológica.^[108] Para ello, Kier utilizó el paquete de mecánica cuántica de la teoría de Hückel extendido de Roald Hoffmann en un estudio de agonistas muscarínicos, llamándolo inicialmente “patrón receptor propuesto”. Sin embargo, en 1971 decidió etiquetarlo como “farmacóforo muscarínico”, dándole el mismo sentido en el que se usa hoy en día.^[108]

La IUPAC ha definido un farmacóforo como el ensamble de características estéricas y electrónicas necesarias para asegurar las interacciones supramoleculares óptimas con un blanco biológico que presenta una estructura específica, para así desencadenar o bloquear su respuesta biológica.^[108] Generalmente, en un conjunto de moléculas este común denominador corresponde a grupos hidrofóbicos, anillos aromáticos y aceptores o donadores de enlaces de hidrógeno.

Gareth Thomas define al fármacoforo de un ligante biológicamente activo como las posiciones geométricas en tres dimensiones de los grupos (centros farmacofóricos) del ligante que forman un patrón único y reconocible por el receptor, el cual se cree que es responsable por la unión del ligante y el receptor.^[62]

Se pueden tener dos situaciones al momento de identificar un farmacóforo: la primera es que se tenga acceso a la información tanto del ligante como del receptor, y la segunda es que a partir de un conjunto de moléculas con cierta actividad biológica se indague sobre los patrones en las características moleculares que pudieran estar asociadas a dicha actividad. Y es precisamente mediante la segunda situación que surge el estudio Cuantitativo de la Relación entre la Actividad y la Estructura (QSAR), o en un sentido más general, el estudio Cuantitativo de la Relación entre una Propiedad y la Estructura (QSPR, del inglés: *Quantitative Structure-Property Relation*).

Un análisis QSAR se basa en herramientas matemáticas para correlacionar descriptores estructurales con una actividad biológica (respuesta o blanco variable). Además, se parte del principio de similitud, el cual indica que estructuras similares tienen actividades similares.^[68]

Existen diferentes tipos de métodos computacionales en QSAR, dando diferentes niveles de complejidad en los datos: de dos dimensiones, de tres dimensiones y métodos de dimensiones más altas. Un QSAR-2D no es sensible a los arreglos conformacionales de los átomos, mientras que un

QSAR-3D necesita la información de la posición de los átomos en tres dimensiones. En casos superiores, por ejemplo, QSAR-4D, se utilizan algoritmos genéticos que generan un conjunto de orientaciones y conformaciones para cada molécula.^[68]

Hablando de los descriptores en QSAR y QSPR, existen tres categorías principales: (1) en una dimensión, que nos da información constitucional, por ejemplo: el peso molecular, número y tipo de átomos y enlaces en una fórmula condensada; (2) los descriptores 2D, que se basan en propiedades de dos dimensiones de los fragmentos (como información de los sustituyentes) o de toda la molécula (como logP o información de reactividad); y (3) los descriptores 3D, que reflejan la naturaleza de las estructuras moleculares en tres dimensiones (como conformaciones e isomerismo) y el espacio alrededor (estereoquímica).^[68]

Hablando de los compuestos de cobre(II) de nuestro interés, las Casiopeínas®, se han realizado diversos estudios QSAR principalmente con descriptores experimentales que buscan describir el comportamiento de la actividad biológica en diversas líneas celulares.

El primer estudio se enfocó en comparar los ligantes que conforman los complejos de cobre(II), obteniéndose que en cuanto al ligante primario (el ligante diimina de los compuestos) es necesario el anillo aromático central en la 1,10-fenantrolina para preservar la actividad antiproliferativa, en comparación a cuando el ligante aromático es la bipyridina, que tiene ausente dicho tercer anillo aromático. Hablando del ligante secundario, al comparar glicinato con acetilacetato, se encontraron diferencias poco significativas en la actividad biológica en comparación al ligante primario.^[109]

También se identificó que el potencial de media onda ($E_{1/2}$) del centro metálico puede describir la actividad biológica mediante la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}), este ejemplo ayudó a identificar que los complejos más activos son aquellos que son menos oxidantes.^[97]

Además, se hizo la comparación con propiedades calculadas computacionalmente, en donde se identificó que algunas propiedades estructurales y electrónicas experimentales de los compuestos de coordinación (como el $E_{1/2}$ y los parámetros de resonancia paramagnética electrónica) pueden ser descritos mediante la densidad electrónica del metal, su deslocalización y la deformación de la nube electrónica^[110].

En este trabajo, también se utilizan herramientas computacionales para definir el arreglo espacial de grupos funcionales en una serie de compuestos de cobre(II) que es esencial para su reconocimiento molecular y actividad biológica, es decir, el fármacoforo.

5.2.2 Objetivos particulares

El objetivo de esta sección es presentar una idea novedosa para identificar un sitio farmacofórico en una familia de compuestos de cobre(II) que se sabe actúan en células cancerosas, haciendo uso de descriptores atómicos cuánticos topológicos.

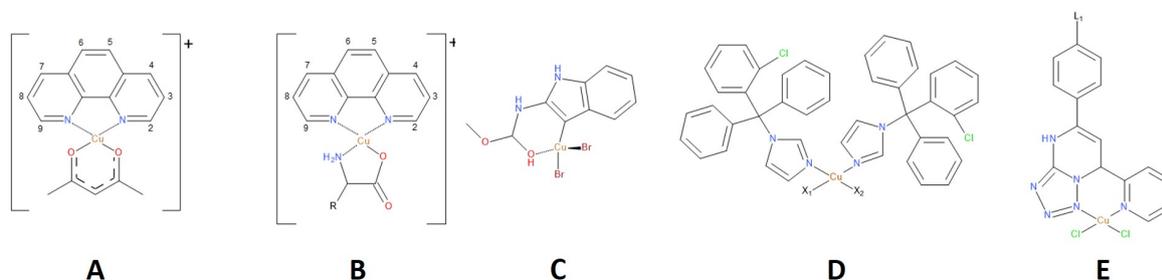
Para cumplir con este objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos particulares:

1. En un grupo de entrenamiento, generar modelos QSAR que correlacionen de manera adecuada la actividad biológica, en células de tipo HeLa y HCT-15, con descriptores atómicos.
2. Validar los modelos QSAR generados mediante un grupo de prueba.
3. Comprobar el poder predictivo de los modelos generados.

5.2.3 Metodología

La Tabla 5.10 muestra las 31 moléculas consideradas en este estudio, si formaron parte del conjunto de prueba o de entrenamiento, su estructura (que deriva de las imágenes en la parte superior de la tabla), y sus valores de actividad antiproliferativa en dos líneas celulares de tumor cancerígenos (HeLa y HCT-15). Los compuestos derivados de las estructuras A y B forman parte de la familia Casiopeínas[®][52,53,97,111], el compuesto C tiene como ligante benzimidazo^[112], los compuestos derivados de D tienen clotrimazol como ligante^[113] y los derivados de E están coordinados a tetrazo[1,5-a]pirimidina^[114]. Cabe resaltar que la elección de las moléculas se centró en el hecho de que todos tienen como centro metálico al átomo de cobre en su estado de oxidación 2+, y éste se encuentra coordinado a átomos donadores de densidad electrónica como oxígeno y nitrógeno.

Al final de la tabla se muestran los valores de actividad de Cisplatino con el fin de tomarlo como punto de comparación al ser uno de los tratamientos ampliamente usados en dichos padecimientos. En las columnas de actividad podemos notar que los compuestos de Cu^{II} pueden presentar una mejor actividad antiproliferativa con una menor toxicidad en comparación al Cisplatino.



Número de Estructura	Conjunto	Estructura	Cl ₅₀ (μM)	
			HeLa	HCT-15
1	Entrenamiento	A	10.7	7.3
2	Entrenamiento	4-Me-A	1.6	6.0
3	Entrenamiento	5-Me-A	6.2	2.6
4	Entrenamiento	4,7-diMe-A	1.4	2.1
5	Entrenamiento	5,6-diMe-A	3.4	1.9
6	Entrenamiento	3,4,7,8-tetraMe-A	1.9	1.4
7	Entrenamiento	5-phenyl-A	3.9	2.5
8	Entrenamiento	4,7-diphenyl-A	4.2	3.2
9	Entrenamiento	5-Cl-A	4.5	12.9
10	Entrenamiento	5-NO ₂ -A	21.3	35.0
11	Entrenamiento	B, R = H	13.9	21.2
12	Entrenamiento	4-Me-B, R = H	8.7	5.1

13	Entrenamiento	5-Me-B, R = H	6.2	3.7
14	Entrenamiento	4,7-diMe-B, R = H	5.5	2.0
15	Entrenamiento	5,6-diMe-B, R = H	5.3	2.1
16	Entrenamiento	3,4,7,8-tetraMe-B, R = H	1.8	1.8
17	Entrenamiento	4,7-diphenyl-B, R = H	5.1	7.6
18	Entrenamiento	5-Cl-B, R = H	14.3	22.3
19	Prueba	5-NO ₂ -B, R = H	44.8	47.3
20	Prueba	4,7-diMe-B, R = CH ₃	1.9	13.96
21	Prueba	4,7-diMe-B, R = -CH(CH ₃) ₂	1.5	4.59
22	Prueba	4,7-diMe-B, R = -CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	1.64	7.99
23	Prueba	4,7-diMe-B, R = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂	1.52	6.51
24	Prueba	4,7-diMe-B, R = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	1.33	3.68
25	Entrenamiento	C	95.59	26.72
26	Entrenamiento	X ₁ = X ₂ = Cl-D	6.80	15.40
27	Entrenamiento	X ₁ = X ₂ = Br-D	3.90	6.50
28	Entrenamiento	X ₁ = Clotramizole, X ₁ = NO ₃ -D	3.50	4.80
29	Prueba	L ₁ = H-E	0.69	0.45
30	Entrenamiento	L ₁ = OH-E	0.57	0.36
31	Entrenamiento	L ₁ = Cl-E	0.87	0.57
		Cisplatino	5.1	5.4

Tabla 5.10. Valores de actividad antiproliferativa (CI₅₀ en μ M) en líneas celulares humanas tipo HeLa y HCT-15 para las estructuras consideradas en el estudio QSAR. Familia Casiopeínas®: (A) Cu[(1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]⁺ y (B) Cu[(1,10-fenantrolina)(aminoácido)]⁺. Complejos de Cu(II) con azoles: (C) con benzimidazole, (D) con clotrimazol, y (E) tetraazo[1,5-a]pirimidina. La imagen superior muestra las estructuras base para los sustituyentes especificados en la tabla.^[52,53,97,111-114]

Una vez seleccionadas las 31 moléculas, se realizó la optimización de las geometrías con el nivel de teoría UM05-2x^[64]/6-31G++(d,p)^[115] con el software Gaussian 09 (versión D01)^[81]. La elección de dicho funcional se debe a que M05-2x ha sido útil en la descripción de propiedades de compuestos de cobre^[116], incluyendo el análisis del aducto Casiopeína-adenina y algunas interacciones no covalentes en la interacción con el ADN^[65]. Posteriormente, se utilizó el conjunto de orbitales Kohn-Sham para obtener la densidad electrónica y con ella calcular las propiedades atómicas con el programa AIMAll^[91]. Las propiedades atómicas fueron analizadas con el programa CODESSA^[117], generando una matriz de descriptores que permitió calcular modelos de Relación Cuantitativa Estructura-Actividad mediante procedimientos estadísticos de Regresión Lineal Múltiple (MLR) con el software MobyDigs (versión 1.0)^[118].

Con el fin de generar los mejores modelos se combinó el procedimiento de MLR con el Algoritmo Genético metaheurístico (GA), siendo este un método de selección de características y exploración del espacio químico. Se utilizaron los valores predeterminados en la configuración de los parámetros del GA, a excepción del tamaño de población que fue ajustado a 100. Dichos valores fueron elegidos con base en el análisis realizado por Todeschini^[118].

El proceso de búsqueda fue realizado con la función RQK^[119] para evitar modelos con características no deseadas, por ejemplo, modelos con correlación al azar. La función RQK utiliza el estadístico Q_{loo}^2 (validación cruzada dejando uno afuera, "leave-one-out") como la función de ajuste, satisfaciendo así cuatro restricciones: regla QUICK, regla asintótica Q_{loo}^2 , regla de redundancia y regla de sobre ajuste. Cabe resaltar que únicamente se construyeron modelos con dos y tres descriptores, partiendo de 229 descriptores atómicos cuánticos topológicos, basándonos en el principio de que cada variable en un modelo debe explicar la varianza de al menos 5 casos (o moléculas), es decir, la relación entre el caso y las variables independientes debe ser 5:1.

Además, para cada modelo QSAR generado se aplicaron los modelos de validación Bootstrapping (Q_{boot}^2) y Y-scrambling ($\alpha(Q^2)$) en el grupo de entrenamiento, con el fin de valorar la capacidad predictiva y la correlación al azar basada en la actividad biológica HCT-15 y HeLa. El método Bootstrapping^[120] consiste en formar al azar conjuntos de entrenamiento con cierto número de moléculas y considerando el resto de las moléculas como conjunto de prueba. El método Y-scrambling^[121] cambia aleatoriamente las variables de respuesta reales, en nuestro caso la actividad biológica, para determinar qué tan bueno es el modelo. En este trabajo se realizó el método Bootstrapping 5000 veces y el método Y-scrambling 300 veces. Además de los dos métodos mencionados, se utilizó la desviación estándar (s) para asegurar la calidad del entrenamiento. Finalmente, los mejores modelos elegidos de acuerdo con sus parámetros de entrenamiento fueron evaluados mediante la validación externa (Q_{ext}^2) en el conjunto de prueba^[122].

5.2.4 Resultados

Modelos

Hablando del conjunto de datos utilizados podemos notar que en el caso de la línea celular HeLa, correspondiente a cáncer cervicouterino, la mejor actividad se observa en los compuestos 4, 30 y 31. Mientras que en el caso de la línea celular HCT-15, correspondiente a cáncer de colon, la mejor actividad se observa en los compuestos 6, 30 y 31. En ambos casos, los compuestos que menor actividad presentan son aquellos derivados de Cl o NO₂. Si comparamos los valores de Cl₅₀ de los compuestos de Cu^{II} con los del Cisplatino, fármaco comúnmente usado y presente en el mercado, podemos notar que algunos de los compuestos presentan una mejor actividad (18 compuestos en el caso de HeLa y 17 para HCT-15). Si a eso sumamos el hecho de que el cobre es un metal esencial, podríamos considerar que se tienen buenos candidatos para el tratamiento de cáncer en ambas líneas celulares, con una menor toxicidad comparada con el platino.

El desarrollo de esta metodología nos permitió generar modelos predictivos que correlacionan la actividad anticáncer de compuestos de Cu^{II} y descriptores topológicos atómicos, considerando que no existe una relación directa entre dichos descriptores y la interacción de los compuestos a nivel biológico.

La Tabla 5.11 muestra los dos mejores modelos de regresión lineal obtenidos con el grupo de entrenamiento, uno para cada línea celular siendo el número 1 para la actividad en HCT-15 y el número 2 para la actividad en HeLa. El tamaño indica el número de descriptores que conforman el modelo, seguido de los parámetros estadísticos de la generación del modelo (R^2 y s) y de la validación del modelo (Q^2_{loo} , Q^2_{boot} , $a(Q^2)$ y Q^2_{ext}).

Los parámetros de la generación del modelo indican que éstos describen de manera adecuada la actividad en términos de diversos descriptores que condensan la información de las propiedades atómicas. Comparando los valores de R^2 es posible notar que el modelo para la línea HeLa tiene un mejor comportamiento en comparación al de HCT-15, aunque ambos tienen valores de desviación estándar (s) muy similares.

#	Tamaño	R^2	Q^2_{loo}	Q^2_{boot}	$a(Q^2)$	s	Q^2_{ext}	Modelos
Línea celular HCT-15								
1	3	0.7659	0.6959	0.5449	-0.273	4.827	0.8080	$\text{Actividad} = 17.933 - 85.3133 \sum \mu_{\text{intra}}(N_{\text{Cu-N}}) - 14.9478 \sum \mu_{\text{bond}}(N) - 14.4042 \sum \delta_{\text{non-bond}}(H)$
Línea celular HeLa								
2	3	0.9585	0.9012	0.8503	-0.204	4.858	0.7768	$\text{Actividad} = 66.1477 + 42.6102 \sum \mu(C_{\text{C-N}}) - 8.7483 \sum \mu_{\text{intra}}(H_{\text{C-H}}) - 129.4397 \sum \mu_{\text{intra}}(N_{\text{Cu-N}}) $

Tabla 5.11. Mejores modelos QSAR obtenidos para describir la actividad biológica en células HeLa y HCT-15.

En el caso de las células HCT-15, el modelo 1 en la Tabla 5.11 y representado gráficamente en la Figura 5.22, encontramos que la actividad puede ser descrita por tres descriptores:

- $\sum |\mu_{\text{intra}}(N_{\text{Cu-N}})|$: la suma de las magnitudes del momento dipolar intra atómico del nitrógeno en los enlaces Cu-N, es decir, los enlaces de coordinación al centro metálico.
- $\sum |\mu_{\text{bond}}(N)|$: la suma de las magnitudes del momento dipolar de los átomos de nitrógeno enlazados.
- $\sum \delta_{\text{non-bond}}(H)$: la suma de la deslocalización electrónica total de los átomos de hidrógeno con los átomos no enlazados.

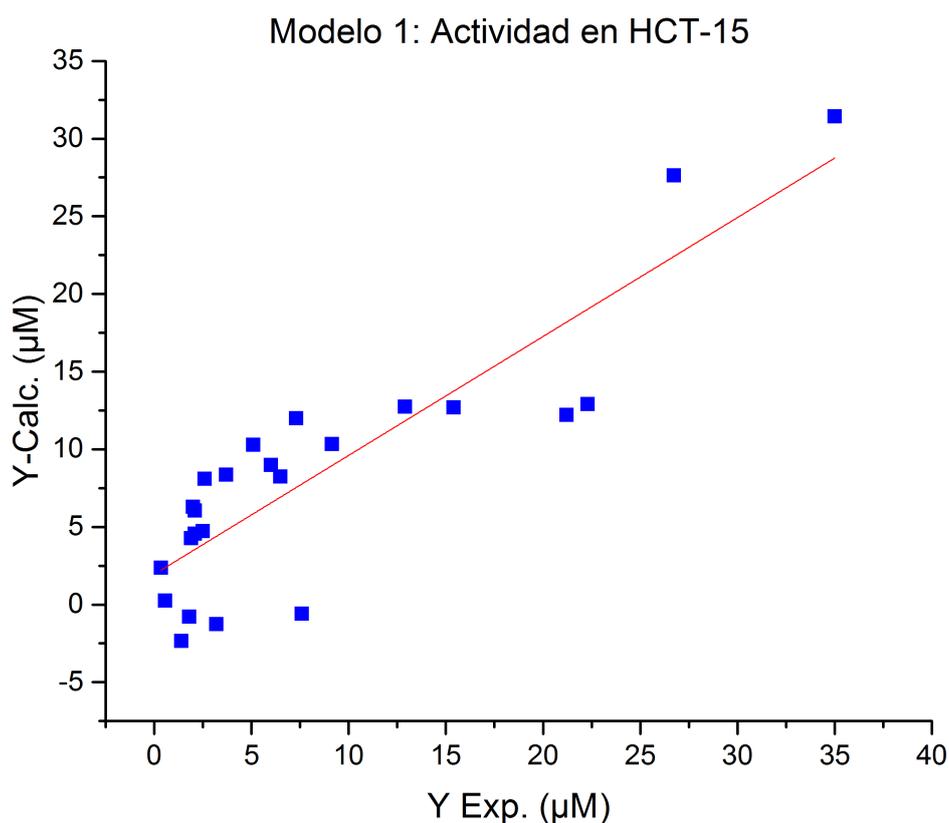


Figura 5.22. Actividad experimental vs Actividad calculada mediante el modelo 1 para la actividad en la línea celular HCT-15.

Por otra parte, el modelo 2 en la Tabla 5.11 y representado gráficamente en la Figura 5.23 es el más adecuado para describir la actividad biológica de los compuestos en las células HeLa. En este caso los descriptores son:

- $\sum |\mu(C_{C-N})|$: la suma de las magnitudes del momento dipolar del átomo de carbono en los enlaces C-N.
- $\sum |\mu_{intra}(H_{C-H})|$: la suma de las magnitudes del momento dipolar intra atómico del hidrógeno en los enlaces C-H.
- $\sum |\mu_{intra}(N_{Cu-N})|$: la suma de las magnitudes del momento dipolar intra atómico del nitrógeno en los enlaces Cu-N.

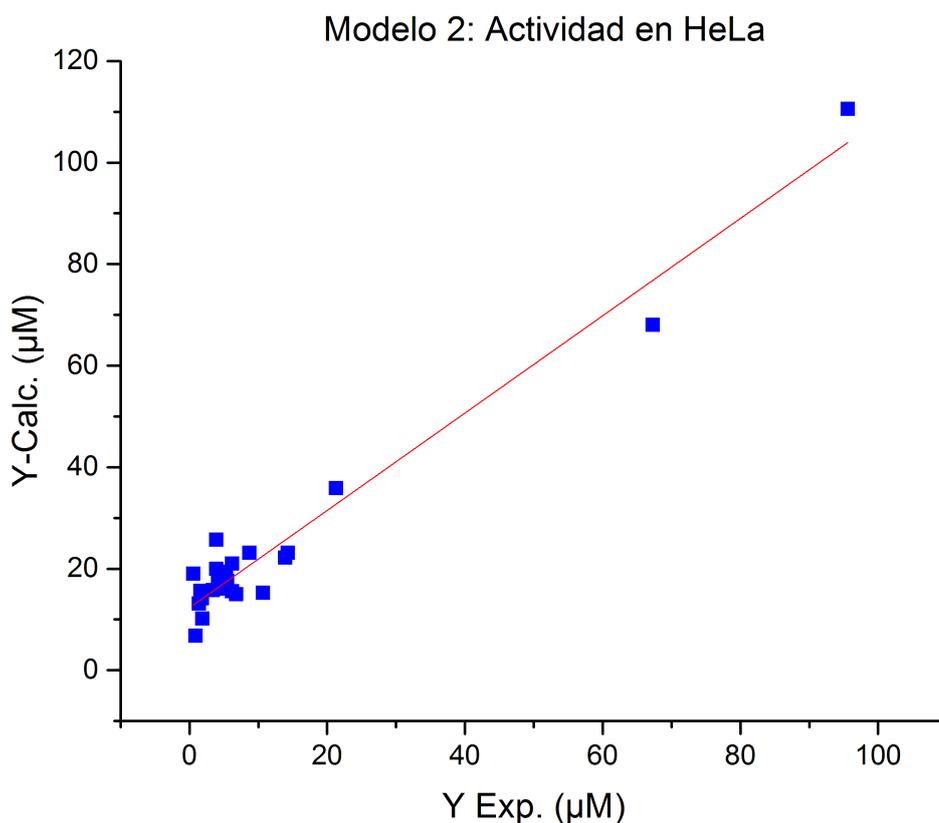


Figura 5.23. Actividad experimental vs Actividad calculada mediante el modelo 2 para la actividad en la línea celular HeLa.

El conjunto de estos descriptores nos habla de cómo se deforma la densidad electrónica al momento de formar los enlaces denotados en cada propiedad, indicando que la presencia de dichos enlaces y los cambios electrónicos que ocurren en ellos son esenciales para que la actividad en estudio se manifieste.

Validación

Los parámetros estadísticos dejando-uno-fuera (Q_{loo}^2) y Bootstrapping (Q_{boot}^2) tienen valores arriba de 0.69 y 0.5, respectivamente, para la validación en el grupo de entrenamiento, lo que nos muestra que ambos modelos tienen la capacidad de predecir adecuadamente la actividad biológica. El coeficiente $\alpha(Q^2)$, correspondiente al método Y-Scrambling, tiene valores inferiores a 0.3 en ambos modelos, indicando que existe muy poca tendencia a que exista correlación al azar.

Respecto a la validación externa en el conjunto de prueba, Q_{ext}^2 , los valores sugieren que los modelos tienen gran poder predictivo puesto que todos los valores son superiores a 0.75, es decir, 75% de la varianza total.

Se identificaron los *outliers* o casos atípicos por respuesta o por estructura mediante diagramas de Williams (gráfico de residuales vs *leverages*)^[118,123], éstos se presentan en la Figura 5.24 para el modelo 1 y Figura 5.25 para el modelo 2. En ambos gráficos las líneas superior e inferior muestran el límite por respuesta y la línea azul muestra el límite por estructura, es decir, si algún dato se encuentra fuera de dichos límites se considera un *outlier* por respuesta o estructura en cada caso.

Como resultado vemos que no se detectaron *outliers* por respuesta en ninguno de los modelos. Sin embargo, identificamos al compuesto 25 como un *outlier* por estructura en el modelo 2 para la línea celular HeLa. Dicho *outlier* corresponde al compuesto con 2-metilbenzimidazol, el cual presenta los mayores valores de CI_{50} en las dos líneas celulares.

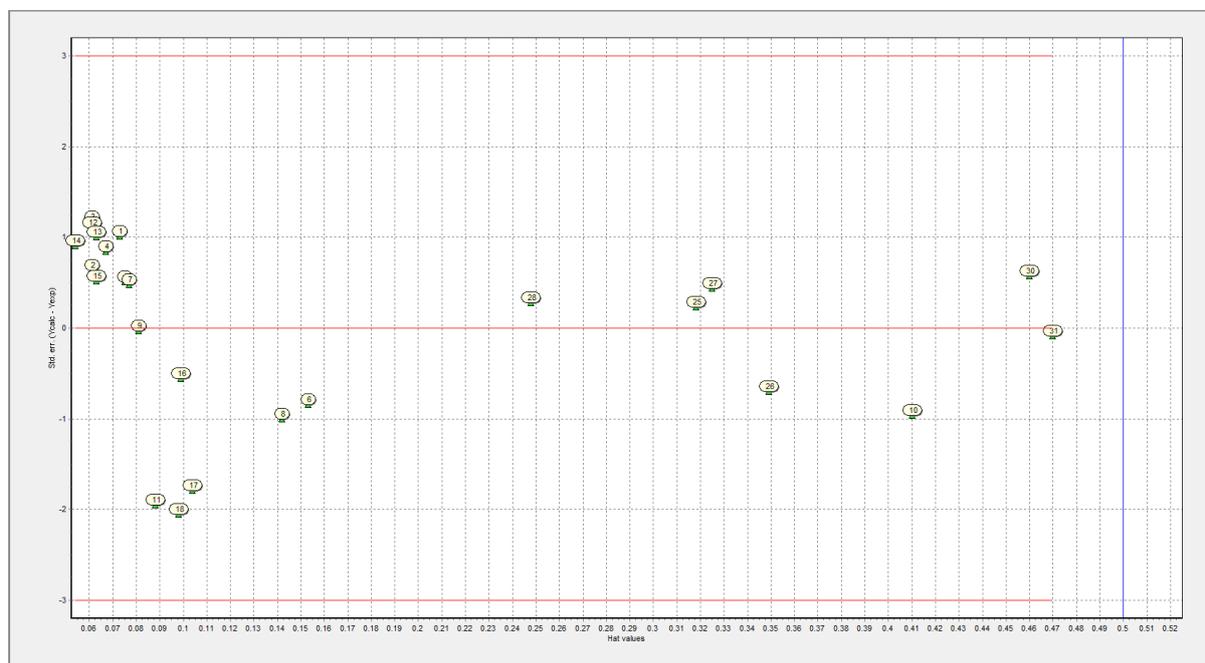


Figura 5.24. Gráfico de Williams para el modelo 1, correspondiente a la línea celular HCT-15.

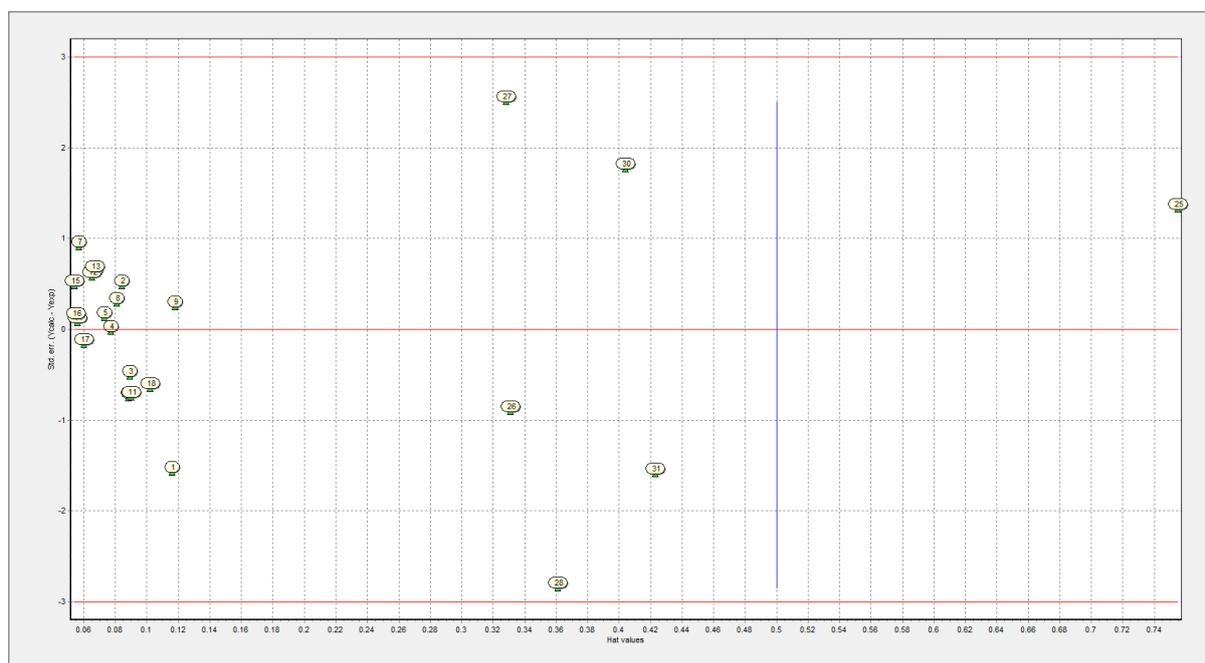


Figura 5.25. Gráfico de Williams para el modelo 2, correspondiente a la línea celular HeLa.

Finalmente, se realizó el análisis de Dominio de Aplicabilidad (DA) con el propósito de conocer el comportamiento de los modelos QSAR al momento de aplicarlos en predicción^[124]. Para ello se realizó un análisis del Dominio de Aplicabilidad basado en consenso^[125], considerando cinco aproximaciones diferentes: Rango, Euclideano, "City-block", Mahalanobis, y Densidad. De tal forma que, si un compuesto está fuera del DA en al menos 2 de las 5 aproximaciones entonces esa predicción se

considera desconfiable. Cada uno de los cinco métodos del Dominio de Aplicabilidad fue calculado en el programa AMBIT^[126]. La Tabla 5.12 muestra los Dominios de Aplicabilidad de los compuestos de prueba en cada uno de los 5 métodos, además de la decisión definitiva del consenso, en donde IN significa que se encuentra dentro del DA, y OUT significa que se encuentra fuera del mismo. Lo que podemos observar en esa tabla es que ambos modelos QSAR obtenidos en este trabajo, tanto para la línea celular HCT-15 como la línea celular HeLa, son confiables de acuerdo con el método de consenso. Por tanto, ambos modelos que estiman la actividad biológica son buenas alternativas en el estudio de esta familia de compuestos de Cu^{II}.

Línea Celular	Número de Estructura	Métodos de Dominio de Aplicabilidad					Consenso
		Rango	Euclidean	CityBlock	Mahalanobis	Densidad	
HCT-15 Modelo 1	19	IN	IN	IN	IN	OUT	IN
	20	IN	IN	IN	IN	IN	IN
	21	IN	IN	IN	IN	OUT	IN
	22	IN	IN	IN	IN	OUT	IN
	23	IN	IN	IN	IN	OUT	IN
	24	IN	IN	IN	IN	IN	IN
	29	IN	IN	OUT	IN	IN	IN
HeLa Modelo 2	19	IN	IN	IN	IN	IN	IN
	20	IN	IN	IN	IN	IN	IN
	21	IN	IN	IN	IN	IN	IN
	22	IN	IN	IN	IN	IN	IN
	23	IN	IN	IN	IN	IN	IN
	24	IN	IN	IN	IN	IN	IN
	29	OUT	IN	IN	IN	IN	IN

Tabla 5.12. Dominio de Aplicabilidad basado en Consenso para el conjunto de prueba de los modelos QSAR 1 y 2.

Interpretación

Para entender más a fondo la importancia de los modelos encontrados, ahora nos enfocaremos en los resultados previamente obtenidos en el grupo de investigación referentes al sitio de reconocimiento de las Casiopeínas[®] en el ADN. Sabemos que la coordinación de la 1,10-fenantrolina al centro metálico produce una redistribución de densidad electrónica y, por tanto, existen cambios en la deslocalización de la densidad electrónica en el enlace C-N del ligante. Cuantitativamente, la deslocalización en el enlace C-N aumenta un 11% cuando se lleva a cabo la coordinación, mientras que el momento dipolo disminuye un 6%.^[56,65] Partiendo de que los descriptores del modelo 1 y modelo 2 están íntimamente relacionados con dicho enlace, podemos identificar a los enlaces C-N de los ligantes como el farmacóforo de esta familia de compuestos de Cu^{II}. En el caso de las Casiopeínas[®] el ligante aromático es el que tiene mayor contribución en el modelo, sin embargo, los enlaces C-N del ligante secundario también forman parte del farmacóforo.

Ahora bien, si nos enfocamos en los resultados de la dinámica molecular de Casiopeínas[®] con el ADN se reportó que existe una interacción entre el enlace C-N del ligante del complejo y el esqueleto, lo

que resalta la importancia de dicho enlace en la conformación de los complejos de cobre(II). Además, el enlace C-N actúa como aceptor en diversas interacciones débiles con átomos de oxígeno de los grupos desoxirribosa del esqueleto del ADN, siendo ésta una interacción importante en el proceso de reconocimiento molecular.^[56,57]

La importancia de identificar el sitio farmacofórico reside en que la interacción de este enlace con el esqueleto del ADN es un indicio del mecanismo de acción de las Casiopeínas® a nivel biológico. Una vez que ocurre la unión, se pueden promover procesos de intercalación, o incluso hidrólisis de los grupos fosfato catalizada por la presencia del centro metálico, siendo éstos la causa de la ruptura del material genético.

5.2.5 Conclusiones

Con ayuda de métodos quimio-informáticos se logró identificar el farmacóforo de complejos metálicos de Cu^{II} que se unen a átomos donadores de nitrógeno y oxígeno, principalmente los que conforman la familia Casiopeínas®.

Para este fin, se realizaron modelos QSAR que correlacionan la actividad biológica en las líneas celulares HeLa y HCT-15 con descriptores atómicos cuánticos topológicos, encontrando que en los mejores modelos dichos descriptores condensan de manera adecuada las propiedades de los átomos más importantes que se relacionan con la actividad biológica.

El valor de R² para la actividad en células HeLa es de 0.9585, mientras que el obtenido para HCT-15 tiene un valor de R² igual a 0.7659. Los parámetros de validación y el dominio de aplicabilidad en ambos modelos muestran la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Los dos mejores modelos obtenidos para las líneas celulares HeLa y HCT-15, uno para cada una, están conformados principalmente por el momento dipolar del enlace C-N presente en el ligante aromático, aunque no se descarta la contribución de dicho enlace cuando está presente en el ligante secundario. En trabajos previos se ha identificado que el enlace C-N es de suma importancia en el reconocimiento molecular, lo que nos lleva a definirlo como el farmacóforo de la familia Casiopeínas®.

Los parámetros estadísticos muestran que ambos modelos son adecuados para la predicción, y por tanto, son modelos que pueden usarse en el pronóstico de la actividad biológica de nuevos compuestos de cobre(II) con actividad en ambas líneas celulares.

5.3 Interacción de complejos de cobre(II) tetraédricos con ADN

Se sabe que a nivel biológico muchas enzimas nucleasas que se encargan de mediar las reacciones de hidrólisis del ADN y ARN hacen uso de cofactores con iones metálicos. Por lo que ha surgido un interés en el diseño de metalo-nucleasas sintéticas y en el estudio de su eficiencia catalítica, considerando que la estabilidad de los ésteres de fosfato en los polinucleótidos es un factor importante en estos procesos.^[127] En esta sección se resalta la trascendencia de la interacción entre los fosfatos del ADN con compuestos de cobre(II), siendo éste el primer paso para la propuesta de un mecanismo de acción de dichas nucleasas químicas mediante una vía hidrolítica.

5.3.1 Antecedentes

Un primer indicio de que el cobre puede catalizar una reacción de hidrólisis se basa en el trabajo realizado por Raycroft^[128], que consistió en el estudio experimental de una reacción de escisión de una serie de mono-, di- y tri-ésteres de fosfato mediada por un átomo de cobre(II) coordinado a un grupo 2-fenantrolilo en la posición *orto* de un fenóxido que actúa como grupo saliente, utilizando agua, metanol y etanol como disolventes; concluyendo que la presencia del cobre es de vital importancia para favorecer la salida del grupo fenóxido en este sistema.

En el año 2012, Galindo y colaboradores^[56] estudiaron el sitio de reconocimiento molecular de las Casiopeínas[®] en el ADN mediante dinámicas moleculares, cálculos DFT y análisis topológico de la densidad electrónica. Encontraron que la Casiopeína[®] se une a la desoxirribosa-fosfato del surco menor mediante un enlace de coordinación entre el metal y el fosfato del esqueleto, el cual involucra varias interacciones π ($C-H \cdots \pi$, $O \cdots \pi(C)$ y $O \cdots \pi(N)$) entre el ligante aromático del complejo y el azúcar (Figura 5.26). La formación del aducto [Casiopeína[®]-Desoxirribosa Fosfato] nos permite proponer una reacción de hidrólisis de un grupo fosfodiéster de la cadena de ADN, considerándose la posibilidad de que éste sea un primer paso del mecanismo de acción por una vía hidrolítica para esta familia de compuestos, siendo un proceso concomitante a la propuesta de estrés oxidativo.

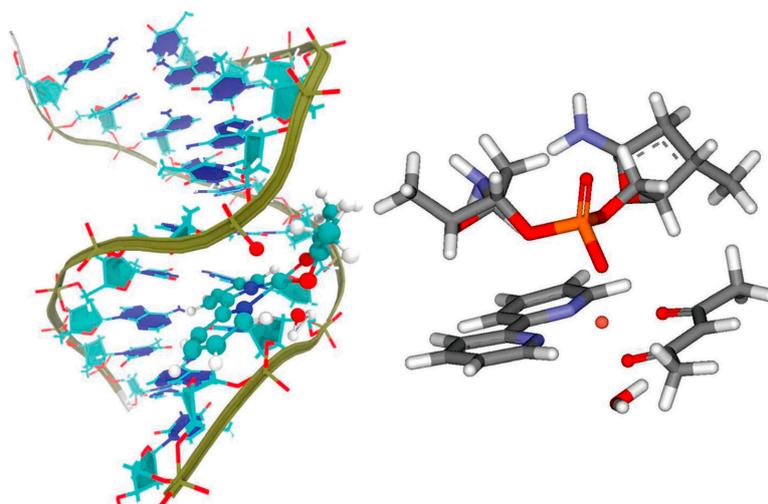


Figura 5.26. Izquierda: estructura de equilibrio del aducto $poly(GC)_2$ -Cas después de 20 ns de simulación. Derecha: geometría aislada en la que la Cas interactúa directamente con la cadena de ADN, formando el aducto Desoxirribosa-Fosfato-Cas. Tomada de ^[56].

También se identificó mediante dinámicas moleculares que los procesos de intercalación de las Casiopeínas® se deben al apilamiento π entre las bases nitrogenadas y el ligante diimina del complejo.^[57,65]

El desarrollo computacional permitió que en nuestro grupo de investigación se propusiera una metodología con la cual se tiene un mejor panorama de las interacciones específicas entre un ligante completamente orgánico y el ADN. Con el uso de Dinámica Molecular, Teoría de Funcionales de la Densidad y la Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas fue posible resaltar la importancia de los azúcares del ADN en el reconocimiento de un ligante orgánico (el compuesto aromático diamidina CGP 40215A) pues la interacción con estos conforma un tercio de la energía de interacción total.^[129]

En este trabajo, se hace uso de esta nueva metodología para el estudio del reconocimiento molecular de tres complejos de cobre(II) basados en tinidazol (tnz) con geometría tetraédrica (estructuras en Figura 5.27). El primero de ellos con dos átomos de bromo coordinados al cobre, $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$ (Complejo 1). El segundo y tercero con dos átomos de cloro coordinados, $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Cl}_2]$, existiendo en dos conformaciones diferentes: (a) el producto cinético que consiste en un producto de color verde con dos moléculas de tinidazol en un modo extendido (Complejo 2), y (b) el producto termodinámico con apariencia amarilla debido a que una molécula de tinidazol se encuentra plegada como consecuencia de una interacción $\text{S}=\text{O}\cdots\pi$ intramolecular (Complejo 3). Resultados experimentales sugieren que estos compuestos interactúan con el ADN mediante interacciones electrostáticas y/o intercalación en el surco, además de la generación de especies reactivas de oxígeno en presencia de un agente reductor produciendo el daño al ADN^[61], de ahí que resulten interesantes para su estudio mediante esta metodología.

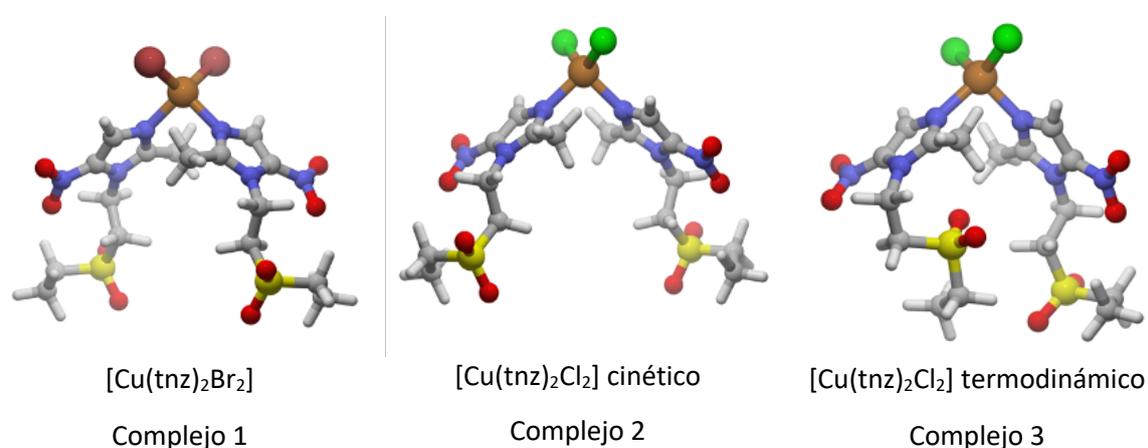


Figura 5.27. Geometrías de los complejos de Cu^{II} con tinidazol estudiados en esta sección.

5.3.2 Objetivos particulares

Esta sección tiene como objetivo estudiar a detalle la interacción entre los complejos de cobre(II) basados en tinidazol y el ADN, debido a que los resultados experimentales sugieren que dicha interacción puede darse por interacciones electrostáticas, este trabajo inicia con un estudio con Dinámica Molecular. Los objetivos particulares son:

1. Realizar simulaciones de Dinámica Molecular para los tres complejos en estudio.
2. Identificar el primer sitio de reconocimiento molecular en la interacción entre los complejos de cobre(II) basados en tinidazol y el ADN.

3. Reconocer las interacciones específicas entre los complejos de cobre(II) y el ADN.

5.3.3 Metodología

Las estructuras de los complejos 1-3 fueron optimizadas a nivel DFT con el funcional M06-2x^[130] y el conjunto de base 6-31G*^[131] como está implementado en Gaussian 16^[132], tomando las estructuras cristalinas reportadas^[60] (CCDC: 1539221, 1539222 y 1539223) como base. A partir de las geometrías minimizadas se obtuvieron los parámetros de distancias de enlace, valores de ángulos y ángulos diedros para generar los parámetros del campo de fuerza del centro metálico con el programa PARMCAL de AmberTools^[133,134]. Algunos parámetros adicionales fueron obtenidos del Campo de Fuerza General de Amber (GAFF). En seguida, se realizaron simulaciones de 1 ns de dinámica molecular (DM) con los complejos de cobre en presencia de moléculas de agua explícitas (modelo TIP3P) con AMBER 16^[133,134]. Se obtuvo una estructura promedio para cada complejo y se validaron las distancias de enlace y ángulos con los datos experimentales.

Posteriormente, para cada compuesto se construyeron los aductos conformados por dos equivalentes de complejo (estructuras promedio) con el dodecámero de Dickerson-Drew (que tiene la secuencia d(CGCGAATTCGCG))^[135,136], con los cuales se hizo la simulación. Los aductos fueron solvatados con el modelo de agua TIP3P en una caja octaédrica truncada y se añadieron iones Na⁺ y Cl⁻ hasta una concentración final de 0.2 M. Se utilizó el campo de fuerza OL15^[137,138] para describir el ADN, iniciando con 1000 pasos de minimización y 5000 pasos de calentamiento hasta una temperatura final de 300 K, utilizando el termostato de Berendsen^[139] para regular la temperatura. El muestreo total para los tres sistemas fue de 40 μ s.

Mediante una primera inspección visual de las dinámicas moleculares identificamos la importancia de la interacción entre los complejos y los grupos fosfato, debido a ello filtramos la trayectoria de acuerdo con una distancia de enlace Cu-P de 5.0 Å. Posteriormente, se identificaron los modos de unión preferidos en las trayectorias filtradas y se eliminaron los pares de bases que no se involucraban en dichas uniones con el fin de facilitar el cálculo.

Para las geometrías recortadas de los modos de unión, se calcularon los orbitales moleculares mediante un cálculo de punto simple con el nivel de teoría M06-2x/6-31G(d,p) implementado en Gaussian 16. A partir de estos orbitales analizamos la conectividad entre el complejo y el ADN haciendo uso de las propiedades locales de la densidad electrónica descritas por la Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas con el programa AIMAll^[91].

Cabe mencionar que, a lo largo del trabajo se etiquetara a los componentes del aducto de la siguiente forma: en el caso de los 24 residuos del dodecámero, con la inicial de la base nitrogenada y el número de residuo, por ejemplo: C1, correspondiente a la Citosina1; y en el caso de los dos equivalentes de cada complejo, como residuo Cu25 y Cu26.

5.3.4 Resultados

Estructura del Complejo

La Tabla 5.13 muestra los parámetros estructurales principales de los complejos de Cu^{II} con tnz, que son las distancias de enlace Cu-N1 y Cu-N2, y el ángulo N1-Cu-N2. En esta tabla se comparan los valores de la estructura cristalina, los cálculos a nivel DFT y la DM. En el caso de DFT, se compara la esfera de

coordinación de la siguiente forma: los complejos reportados formados por tinidazol y halogenuros ($[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{X}_2]$, donde $\text{X}=\text{Cl}$ o Br), cuando los halogenuros son sustituidos por moléculas de agua ($[\text{Cu}(\text{tnz})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$), y cuando el cobre solo está coordinado al tinidazol ($[\text{Cu}(\text{tnz})_2]$).

Complejo	Átomos	Rayos X	DFT			DM
			$\text{tnz}_2 + \text{X}_2$	$\text{tnz}_2 + (\text{H}_2\text{O})_2$	tnz_2	
1	Cu-N1	1.9953	2.0531	1.9695	1.8943	1.9743
	Cu-N2	1.9953	2.0531	1.9729	1.8889	1.9740
	N1-Cu-N2	95.04	91.41	95.91	95.91	92.32
2	Cu-N1	2.0067	2.0437	1.9730	1.8889	1.9573
	Cu-N2	2.0067	2.0437	1.9693	1.8944	1.9605
	N1-Cu-N2	93.75	93.62	95.94	95.96	92.07
3	Cu-N1	1.9898	2.0410	1.9622	1.8896	1.9816
	Cu-N2	1.9745	2.0407	1.9558	1.8826	1.9926
	N1-Cu-N2	94.05	90.71	98.93	98.93	95.65

Tabla 5.13. Comparación de las distancias de enlace (Å) y ángulos (°) entre la estructura obtenida con Rayos X, los cálculos computacionales a nivel DFT (cambiando la esfera de coordinación) y la Dinámica Molecular (DM).

Los cambios en la esfera de coordinación se proponen debido a que se ha observado que otros metalofármacos constituidos por halógenos en su estructura pierden este tipo de átomos en un proceso de hidrólisis al encontrarse en un ambiente biológico. El ejemplo más significativo de dicho mecanismo es el Cisplatino ($[\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$), ya que, una vez dentro de la célula, el primer paso de su mecanismo de acción consiste en la pérdida de los átomos de cloro coordinados al platino y son sustituidos por moléculas de agua, formando la especie $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ que puede reaccionar más rápido con el blanco^[9].

Partiendo de esta idea, proponemos que las interacciones entre el metal y los halogenuros en los complejos 1-3 son lábiles en disolución. Debido a ello, en la DM los halogenuros fueron sustituidos por moléculas de agua (Figura 5.28), que al estar en un sistema dinámico pueden ser sustituidas por otras moléculas de disolvente, asumiendo que dichas moléculas se pueden perder fácilmente en un ambiente biológico. Como resultado de la labilidad de estos enlaces el centro metálico tiene sitios de coordinación disponibles, promoviendo de esta forma la interacción con el ADN.

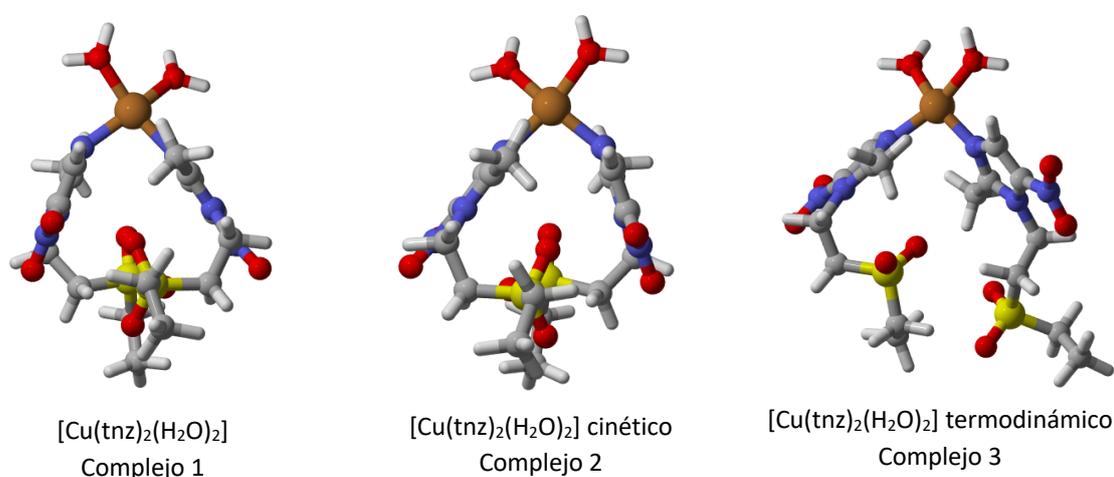


Figura 5.28. Geometrías de los complejos 1-3 cuando los halogenuros son sustituidos por agua.

Energéticamente hablando, la Tabla 5.14 muestra los valores obtenidos en la minimización a nivel DFT para los complejos 1-3 y cuando se sustituyen los halogenuros por moléculas de agua, además de la energía de formación de los compuestos. La sustitución por moléculas de agua hace que los compuestos sean energéticamente muy similares, sin embargo, estructuralmente se siguen diferenciando por las interacciones intramoleculares que el grupo sulfona tiene con la parte alifática del segundo tnz.

Complejo	tnz ₂ + X ₂		tnz ₂ + (H ₂ O) ₂	
	Minimización (u.a.)	Energía de Formación (kcal/mol)	Minimización (u.a.)	Energía de Formación (kcal/mol)
1	-9135.0	-702.5	-4143.7	-421.0
2	-4911.7	-681.6	-4143.7	-421.0
3	-4911.8	-697.4	-4143.6	-413.0

Tabla 5.14. Energías calculadas y energías de formación para los compuestos 1-3, con halogenuros (X₂, geometrías en Figura 5.27) y agua ((H₂O)₂, geometrías en Figura 5.28) coordinados al centro metálico.

La estructura de los complejos obtenida mediante una simulación de DM muestra que los parámetros estructurales concuerdan con los valores experimentales en los cristales, por lo tanto, el método utilizado y la parametrización son adecuados para continuar la metodología. El conjunto de estos resultados nos permite proponer que al encontrarse en un ambiente biológico el cobre solo permanecerá unido a los ligantes tnz la mayoría del tiempo, o, dichas posiciones serán ocupadas por moléculas de agua que fácilmente pueden intercambiarse; debido a ello, las geometrías sin halogenuros fueron utilizadas en el resto del trabajo.

Dinámica Molecular

Recordemos que se utilizó el dodecámero de Dickerson y Drew como modelo de ADN, el cual tiene la secuencia *d*(CGCGAATTCGCG). En cada dinámica se añadieron dos equivalentes de complejo, los cuales serán etiquetados como residuo Cu25 y Cu26 para facilidad en la explicación de resultados.

La Tabla 5.15 muestra la energía de interacción entre los complejos 1-3 y el ADN en el tiempo total de simulación de 40 μs. Podemos notar que los valores de desviación estándar son grandes, pero el error es muy pequeño. Energéticamente hablando, el orden de estabilidad de la interacción entre el ADN y los complejos es el siguiente: complejo 2 > complejo 3 > complejo 1.

Complejo	Energía de interacción del aducto (kcal/mol)	Desviación estándar	Error estándar de la media
1	-46.62	14.32	0.146
2	-72.91	15.77	0.158
3	-57.63	17.99	0.173

Tabla 5.15. Energía de interacción de los complejos 1-3 con el ADN en el muestreo total.

Además, se estudió la desviación estándar media (RMSD, del inglés: *Root Mean Square Deviation*) en el ADN en los aductos con cada complejo, la cual nos indica qué tanto cambian su posición los átomos de los residuos en el transcurso de las dinámicas moleculares tomando como referencia el primer punto de la simulación. Los resultados se muestran en la Figura 5.29, Figura 5.30 y Figura 5.31. En los tres casos se encontró que no hay una diferencia significativa en las posiciones de los átomos, salvo en algunas secciones en donde se infiere que el complejo interacciona directamente con el ADN.

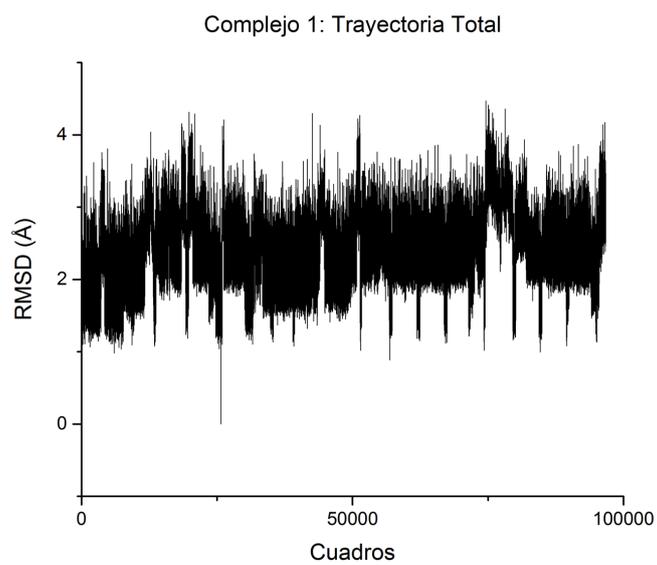


Figura 5.29. RMSD (Å) de la trayectoria total del complejo 1.

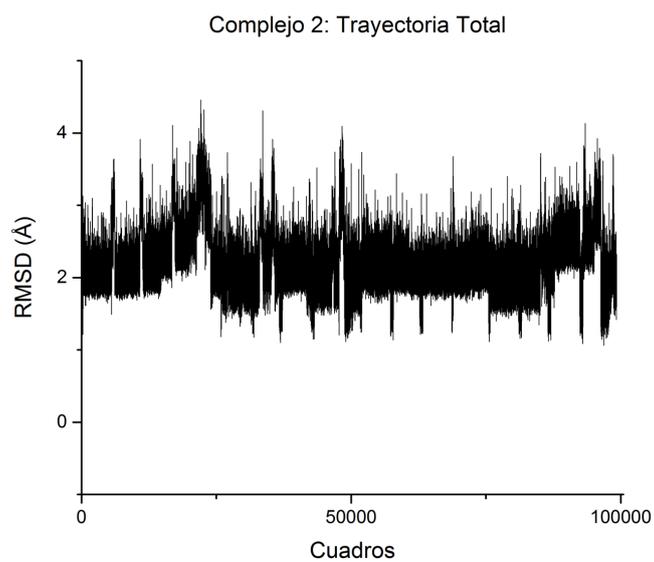


Figura 5.30. RMSD (Å) de la trayectoria total del complejo 2.

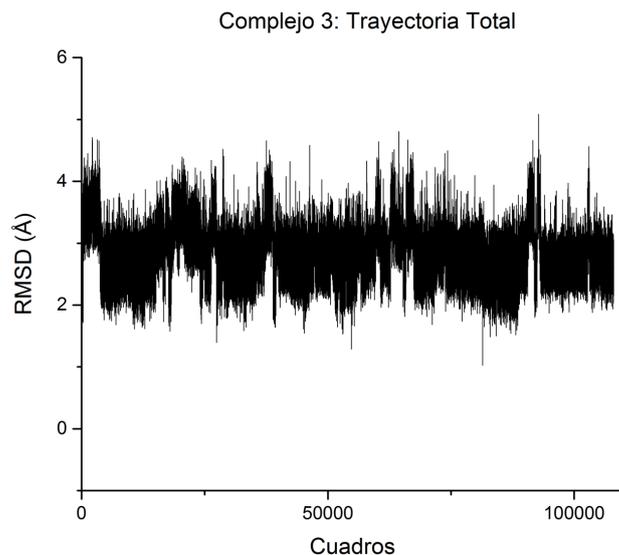


Figura 5.31. RMSD (Å) de la trayectoria total del complejo 3.

Además, se analizó si se da una distorsión de la hélice al interactuar con los complejos mediante el giro entre los residuos 6 y 7 del dodecámero, es decir, la parte central del ADN. Un valor de aproximadamente 36° nos habla de que no hay distorsión en la hélice al momento de la interacción con el complejo. La Figura 5.32 corresponde a los valores del ángulo de giro en los tres complejos (Complejo 1 en negro, Complejo 2 en rojo y Complejo 3 en azul), en donde podemos notar que la mayoría del tiempo los compuestos no generan distorsión en la hélice, sin embargo, en el caso del complejo 1 si se nota un cambio en dicho ángulo hasta un valor alrededor de 42° , lo que puede estar relacionado a procesos de intercalación del complejo en el ADN.

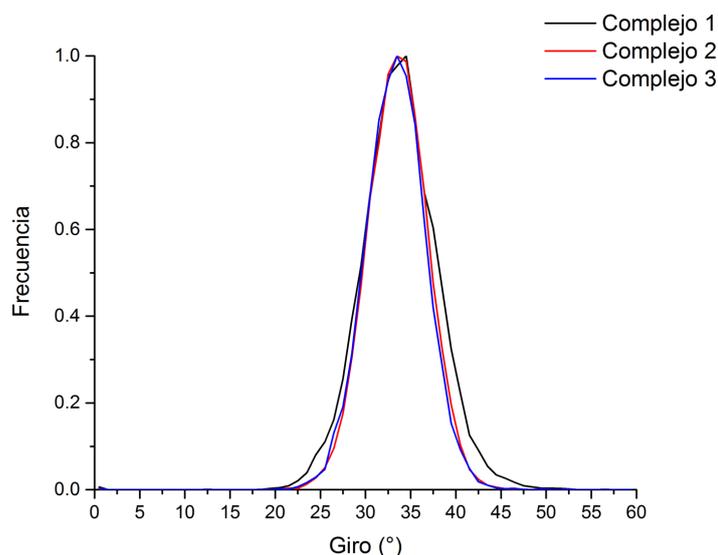


Figura 5.32. Giro en los residuos 6-7 del ADN generados por el complejo 1 (línea negra), complejo 2 (línea roja) y complejo 3 (línea azul).

Mediante una inspección visual de la trayectoria total se identificó que existía una preferencia por la interacción entre el átomo de cobre del complejo y los oxígenos de los grupos fosfato del esqueleto

del ADN, proponiendo este como el primer sitio de reconocimiento. Entonces, analizamos la evolución de la interacción Cu-Fosfato en cada trayectoria y conservamos los cuadros de la trayectoria que cumplieran con el criterio de presentar una distancia de enlace Cu-P de hasta 5.0 Å, el conjunto de estos cuadros se nombrará trayectoria filtrada a partir de ahora.

Los datos de las trayectorias filtradas de cada complejo se muestran en la Tabla 5.16, dividiéndose en dos debido a los dos equivalentes de compuesto involucrado en la DM (residuos Cu25 y Cu26). Para cada equivalente de complejo se muestran los dos residuos del ADN (Residuo Fosfato en el encabezado de la tabla) con mayor porcentaje de ocurrencia, es decir, aquellas interacciones Cu-P que más se repiten en la trayectoria filtrada. Se añade también el valor de la energía de interacción entre el complejo y el ADN, así como su desviación estándar y el error. Desde luego, existe una interacción con todos los residuos fosfato del dodecámero, pero con el fin de ir reduciendo la información nos centraremos en los porcentajes de ocurrencia mayores.

Para ser más explícitos, en la explicación de la tabla se ejemplifica la primera fila: el residuo Cu25 del complejo 1 interacciona un 9.53% del total de trayectoria filtrada con el residuo Adenina18 (A18) del dodecámero, el conjunto de estos cuadros tiene una energía de interacción del aducto de -24.4 kcal/mol, con una desviación estándar de 5.3 y un error de 0.19.

Con este análisis se resaltan dos puntos importantes: el primero de ellos es que al filtrarse la trayectoria y enfocarnos en una interacción, la desviación estándar disminuye considerablemente en la mayoría de los casos. El hecho de que las desviaciones para algunos casos del residuo 26 sigan siendo altas se debe al ruido que causa la presencia de dos complejos en la dinámica. Además, no se descarta la posibilidad de encontrar otros mínimos dentro de la trayectoria completa, representativos de otras interacciones entre los complejos y el ADN. El segundo punto y más importante es que este análisis nos permitió identificar cierta selectividad hacia los residuos de Citosina contiguos a un residuo Timina o Adenina, proponiendo además que la interacción puede extenderse a éstos últimos. Energéticamente hablando se mantiene el orden de estabilidad de los complejos indicado anteriormente ($2 > 3 > 1$).

Complejo	Residuo de Complejo	Residuo Fosfato	Ocurrencia de la interacción (%)	Energía de interacción del aducto filtrada (kcal/mol)	Desviación estándar	Error estándar de la media
1	Cu25	A18	9.53	-24.4	5.3	0.19
		G16	7.69	-23.6	3.7	0.15
	Cu26	T8	12.04	-24.9	12.1	0.37
		C21	9.58	-23.3	9.3	0.32
2	Cu25	C21	29.6	-48.8	7.1	0.13
		C9	12.28	-46.1	8.5	0.25
	Cu26	C21	23.64	-31.6	12.4	0.26
		C9	13.17	-30.9	10.7	0.30
3	Cu25	C9	12.9	-46.3	7.6	0.21
		A6	9.0	-27.4	8.2	0.27
	Cu26	C21	14.99	-32.5	14.6	0.38
		A17	9.92	-23.0	8.2	0.26

Tabla 5.16. Energía de interacción de los complejos 1-3 con el ADN en la trayectoria filtrada. Donde A= Adenina, G= Guanina, C= Citosina y T=Timina.

Sitio de Reconocimiento

Una vez que identificamos la interacción Cu-Fosfato como el primer sitio de reconocimiento entre los complejos 1-3 y el ADN, lo comparamos con los resultados obtenidos para las Casiopeínas® en el grupo de investigación^[56], en donde también se trata de la interacción entre el centro metálico y un oxígeno de un grupo fosfato del esqueleto (Figura 5.26). En el caso de las Casiopeínas®, al ser un complejo con geometría cuadrada plana, se tienen las posiciones axiales vacantes y no hay una pérdida de los ligantes, lo que genera una geometría del sitio de reconocimiento de tipo pirámide de base cuadrada con el átomo de oxígeno del grupo fosfato ocupando una de esas posiciones libres. En contraste, para los compuestos que derivan del tnz se parte de una geometría tetraédrica y se pierden los halogenuros, quedando vacantes ambas posiciones y generando que en el sitio de reconocimiento se observe una geometría tetraédrica en donde los oxígenos de fosfatos ocupan una o ambas posiciones vacantes (Figura 5.33, Figura 5.34 y Figura 5.35). Este hecho nos habla de la importancia de dicha interacción, por lo que decidimos hacer un análisis más profundo sobre las interacciones entre los compuestos basados en tinidazol y los grupos fosfato del esqueleto.

El siguiente paso es conocer los acomodos de esta familia de compuestos que es completamente diferente a la familia Casiopeínas®. Para ello, ya obtenidas las 12 trayectorias filtradas con mayor porcentaje de ocurrencia, se eligieron las que tenían mayor porcentaje para cada complejo y se realizó una inspección visual para reconocer los modos de unión del complejo, y, para los que predominaban se realizaron los cortes de los residuos que no intervienen con el fin de aligerar el tiempo de cómputo en la obtención de los orbitales. Las trayectorias filtradas elegidas para la inspección visual y los cortes fueron: para el complejo 1 el residuo Cu26 con el residuo T8; para el complejo 2 el residuo Cu25 con el residuo C21; y para el complejo 3 el residuo Cu26 con el residuo C21.

Hablando de los modos de unión más repetidos en cada complejo y para los cuales se recortaron los residuos que no participan, en el complejo 1 se identificaron 8 geometrías, para el complejo 2 se recortaron 5 geometrías y para el complejo 3 se establecieron 7 geometrías, siendo todas diferentes en cada conjunto. Las 20 geometrías se muestran en la Figura 5.33 para el complejo 1, Figura 5.34 para el complejo 2, y Figura 5.35 para el complejo 3. A continuación se detallarán todas las geometrías.

Complejo 1. En la geometría 1, el cobre se coordina a dos oxígenos de fosfato y uno de los tnz interacciona en la parte superior del esqueleto. La geometría 2 también tiene al cobre coordinado a dos oxígenos, pero en este caso, uno de los tnz interacciona con la parte inferior del esqueleto. También el cobre de la geometría 3 se coordina con dos oxígenos, pero en este caso ambos tnz se extienden e interaccionan con el esqueleto; la misma conformación adquieren los tnz en la geometría 4, pero en este caso sólo un átomo de oxígeno está coordinado al metal. En la geometría 5 el cobre solo se coordina con un fosfato y los ligantes tnz se intercalan. Las geometrías 6 y 7 tienen la misma conformación del tnz que las geometrías 1 y 2, pero el centro metálico sólo se coordina con un oxígeno. En la geometría 8 se encontró que ambos equivalentes de complejos interaccionan muy cercanos entre sí, el residuo Cu25 se coordina mediante un oxígeno y un tnz interacciona en la parte superior, mientras que el residuo Cu26 se intercala por completo.

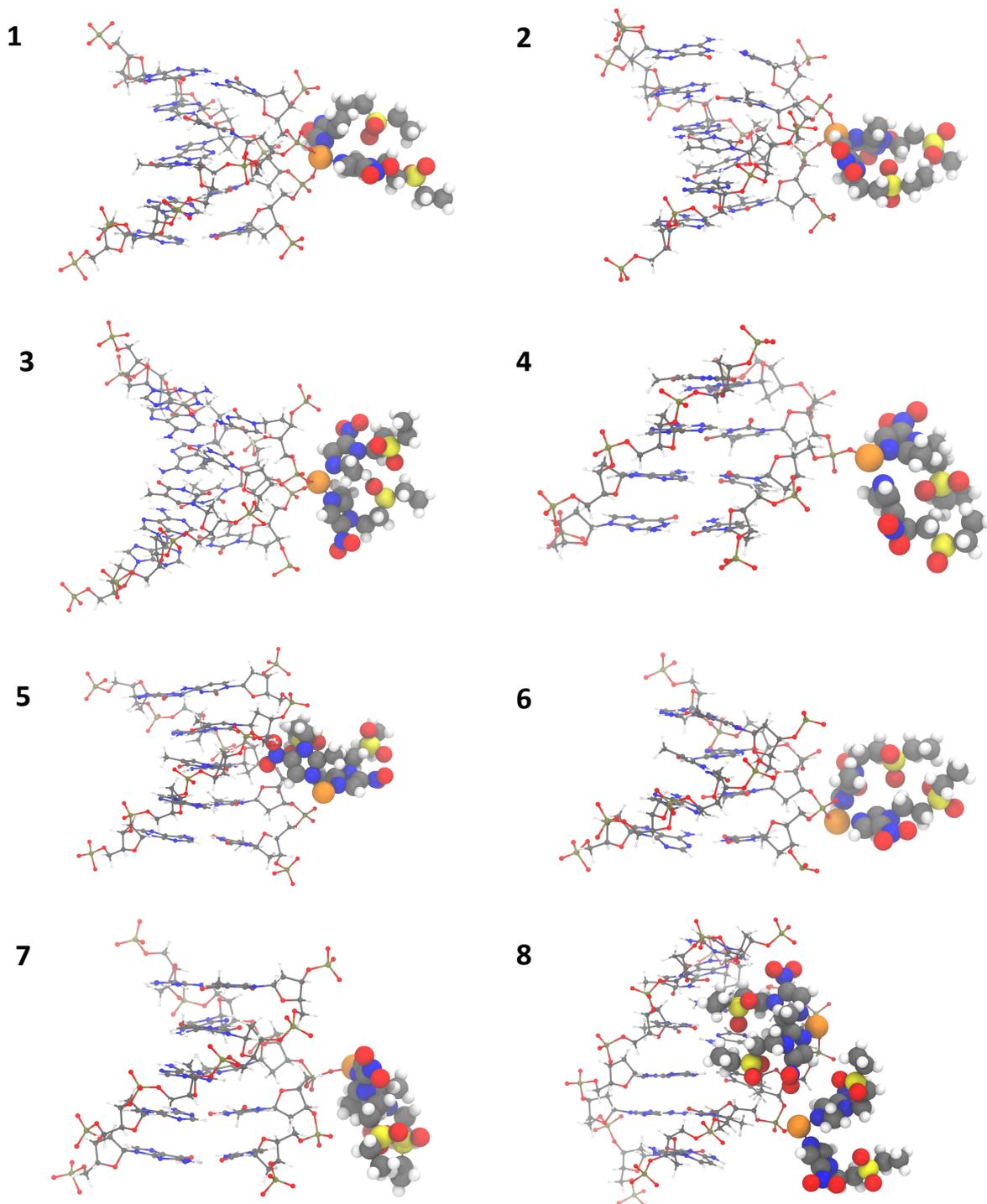


Figura 5.33. Geometrías de los cortes del complejo 1.

Complejo 2. En la geometría 1, el cobre se coordina con un oxígeno de fosfato, el primer tnz se encuentra intercalado en la parte superior y el segundo se encuentra fuera adoptando una conformación cerrada en dirección al primer tnz. La geometría 2 es muy similar a la geometría 1, pero se diferencia en el acomodo del segundo tnz, puesto que adopta una conformación semi-cerrada. En la geometría 3 el cobre se coordina con dos átomos de oxígeno de fosfato, el primer tnz se intercala en la parte superior y el segundo tnz se extiende por completo. En el caso de las geometrías 4 y 5, el

cobre se coordina únicamente con un oxígeno de fosfato, el primer ligante tnz se intercala en la parte inferior, pero el segundo tnz adopta una conformación cerrada en la geometría 4 y una conformación extendida en la geometría 5.

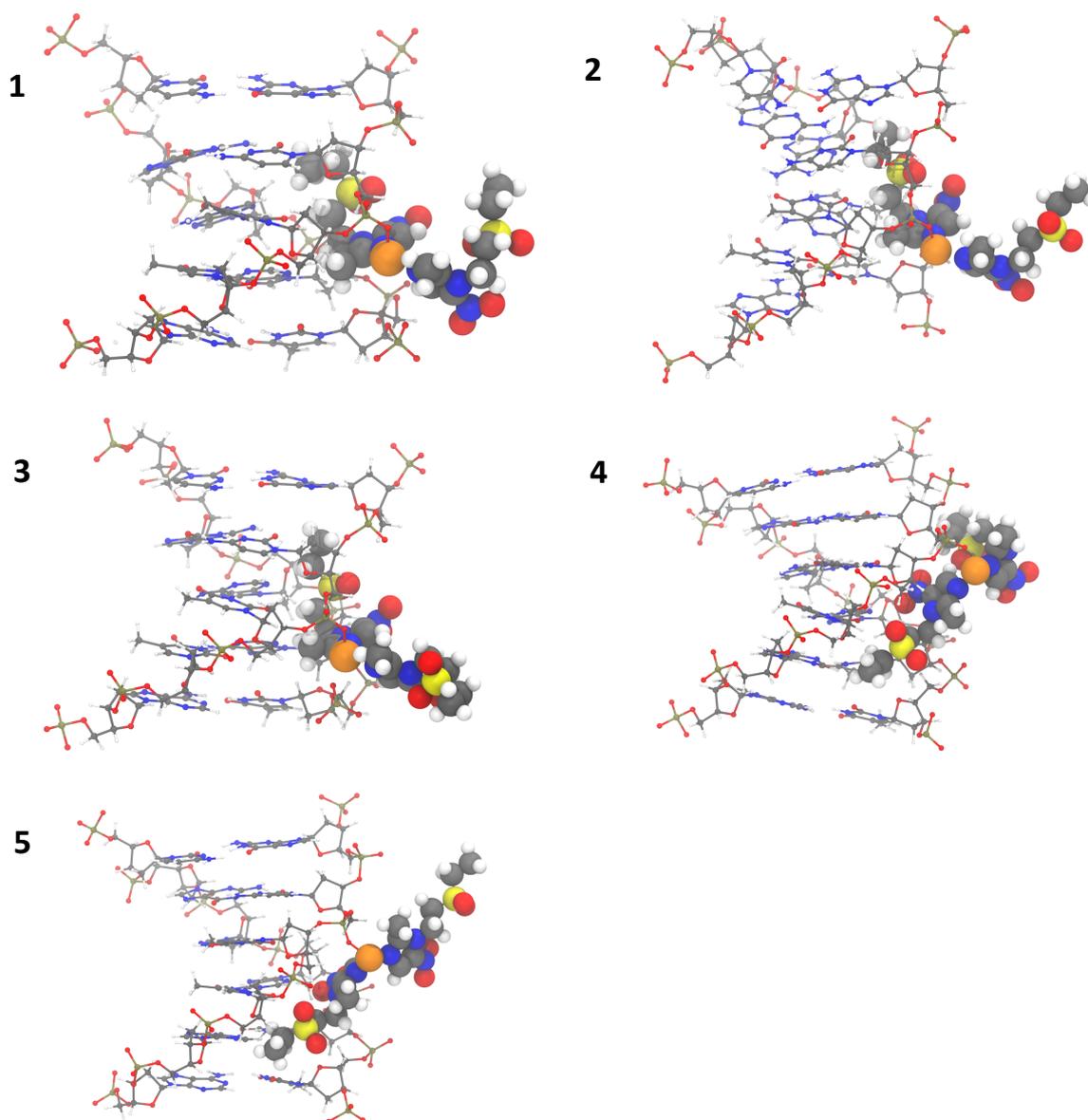


Figura 5.34. Geometrías de los cortes del complejo 2.

Complejo 3. En la geometría 1, el cobre se coordina con un oxígeno de fosfato, el primer tnz se encuentra intercalado en la parte superior y el segundo se encuentra fuera adoptando una conformación cerrada en dirección al primer tnz. La geometría 2 es muy similar a la geometría 1, pero se diferencia en el acomodo del segundo tnz, puesto que adopta una conformación semi-cerrada. En la geometría 3 el cobre se coordina con dos átomos de oxígeno de fosfato, el primer tnz se intercala en la parte superior y el segundo tnz se extiende por completo. En la geometría 4 el cobre está coordinado a solo un fosfato y uno de los tnz interacciona en la parte superior del esqueleto, lo mismo ocurre en la geometría 5, pero el tnz interacciona en la parte inferior. En la geometría 6 el cobre se coordina con dos oxígenos de fosfato y uno de los tnz interacciona con el esqueleto en la parte inferior.

La geometría 7 muestra al cobre coordinado con dos átomos de oxígeno de fosfato, y ambos ligantes tnz completamente intercalados.

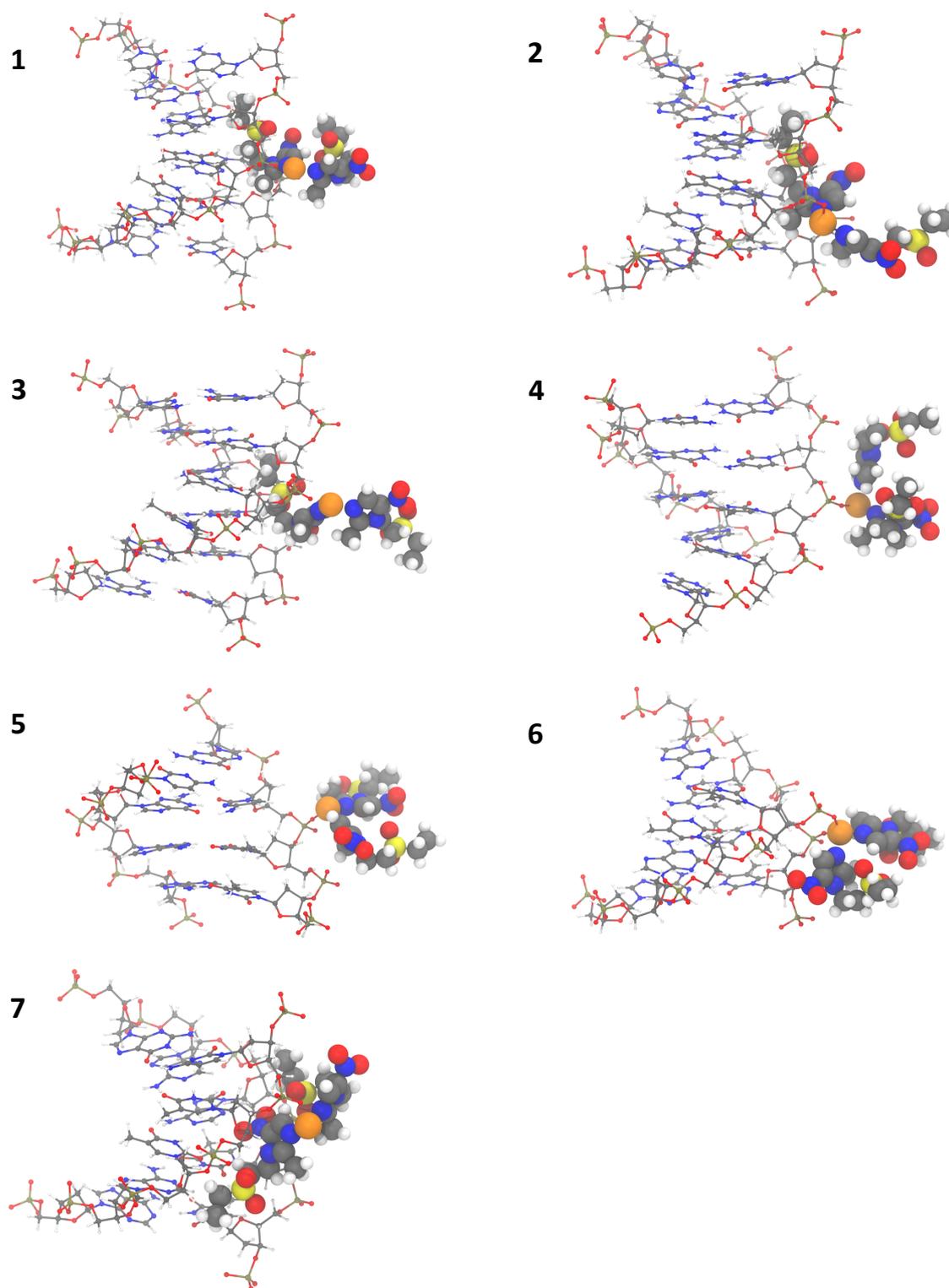


Figura 5.35. Geometrías de los cortes del complejo 3.

Debido a que los modos de unión son repetitivos, y con el fin de facilitar la visualización, los cortes se clasificaron de acuerdo con las disposiciones de la Figura 5.36. Las geometrías A, B y C corresponden a aquellos recortes en los que al menos una parte del complejo está intercalada en el surco menor (señalando que la intercalación no corresponde a la inserción en medio de las bases nitrogenadas, sino al cambio en la conformación del ADN); mientras que las geometrías D, E y F corresponden a aquellas que solo interactúan con el esqueleto del ADN. En todos los casos se representa al centro metálico con un círculo azul con la letra M, en los resultados posteriores, además, se indicará si el cobre se encuentra unido a un solo grupo fosfato o a dos con las etiquetas 1P o 2P, respectivamente, y éstos serán tomados como referencia para indicar una posición superior o inferior. Los ligantes tnz se representan con un rectángulo redondeado, enumerándolos con el fin de distinguirlos; también se diferencian en color dependiendo de si el ligante se intercala (color rosa) o si no se encuentra intercalado (color naranja). Las etiquetas aquí explicadas serán útiles para diferenciar las geometrías en los resultados presentados en las *Interacciones específicas*, principalmente en la Tabla 5.17 y Tabla 5.18.

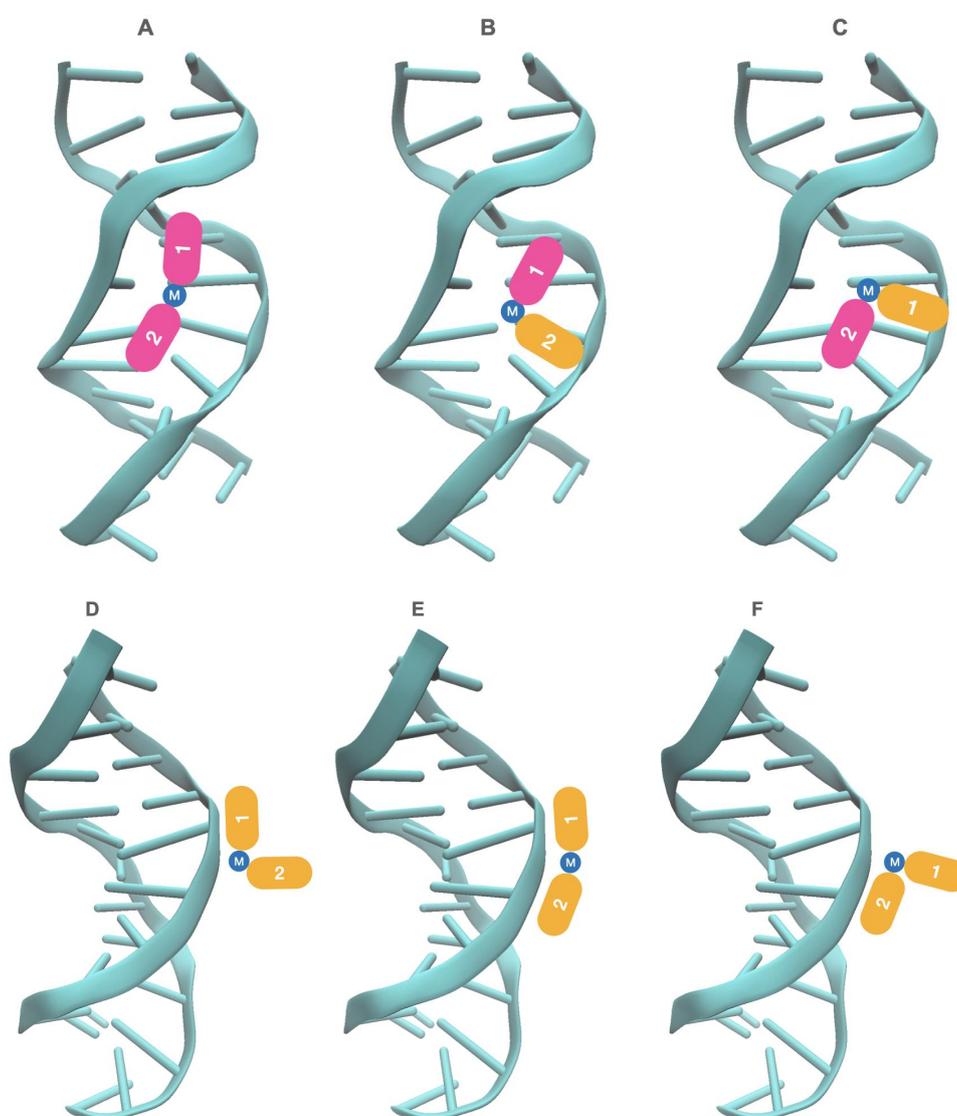


Figura 5.36. Disposiciones del complejo preferidas en la interacción con ADN. Las interacciones A-C corresponden a la intercalación en el surco menor, y las interacciones D-F corresponden a la interacción con el esqueleto. M es el centro metálico (Cu^{II}), 1 y 2 se utiliza para diferenciar los dos ligantes tnz coordinados al cobre. El color rosa indica que el ligante está intercalado, mientras que el naranja indica que no lo está.

Comparando todos los modos de unión podemos notar que existe una preferencia por la unión de tipo B, es decir, cuando el primer ligante tnz se intercala en la parte superior del grupo fosfato de referencia y el segundo ligante tnz se encuentra en la parte externa. Además, se prefiere la unión a solo un grupo fosfato, en donde el centro metálico tiene una geometría tetraédrica con una posición vacante. Esta conclusión es más notoria si nos centramos en la columna 2 de la Tabla 5.17 y la Tabla 5.18, resaltando que se repite en más ocasiones la etiqueta “1P” y “B”.

En cuanto a los residuos recortados, la columna 3 de la Tabla 5.17 muestra primero el número de residuos conservados de los 12 que conforman el dodecámero y entre paréntesis la secuencia conservada. Realizando un conteo de los residuos conservados podemos ver que en su mayoría se trata de geometrías con 5 pares de bases, seguida de 4 y 6; esto indica que se requieren 5 pares de bases para que el complejo, debido a las conformaciones que puede adoptar, muestre una interacción con el ADN. Comparando también cuáles son estos pares de bases que más se repiten, identificamos que la mayoría de las estructuras comienzan en el residuo C3 y terminan en el residuo T8, siendo la secuencia preferida en los cortes: $d(\text{CGAATT})$.

De la inspección visual para identificar los modos de unión, se observaron tres puntos muy importantes:

a) Mientras que un complejo interacciona con un fosfato, el otro complejo se mueve aleatoriamente, incluso llegando a interaccionar con el complejo como es el caso de la geometría 8 del complejo 1.

b) El cobre permanece unido en todo momento a al menos un grupo fosfato, pudiendo estar unido a dos grupos fosfato. La coordinación de los grupos fosfato ocupa las dos posiciones vacantes del centro metálico debidas a la pérdida de los halogenuros o moléculas de agua, manteniéndose en todo momento la geometría tetraédrica del cobre(II).

c) Al estar anclado a un grupo fosfato, los ligantes tnz del complejo pueden adoptar diversas conformaciones como estirarse e interaccionar con varios escalones del ADN, adoptar una posición cerrada en donde predominan las interacciones intra-moleculares, o uno o los dos tnz se intercalan en el surco menor del ADN.

Interacciones específicas

Una vez obtenidas las 20 geometrías de los recortes, se calcularon los orbitales para posteriormente realizar el análisis de la conectividad con base a la Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas. Para cada geometría se realizó el conteo de las interacciones (columna “#” en Tabla 5.17 y Tabla 5.18), identificando las secciones tanto del complejo como del ADN que se involucran en cada una.

Además, se calculó la Energía de Interacción (E_{int}) entre los complejos y el ADN de acuerdo con la aproximación de Espinosa-Molins-Lecomte (EML), que hace uso de la densidad de energía potencial ($V(\mathbf{r}_{BCP})$) en los puntos críticos de enlace (BCP) que unen a los átomos del complejo con los átomos del ADN. $V(\mathbf{r}_{BCP})$ se define como el campo de potencial efectivo promedio experimentado por la densidad de electrones y es proporcional a la energía de interacción inter-atómica. La suma de todas las energías de interacción asociadas a cada BCP es igual a la energía de interacción total (E_{int}), como se muestra en la Ecuación 10, en donde k es una constante que depende de cada interacción y en el caso de interacciones débiles y enlaces de hidrógeno su valor es 0.5.^[140]

$$\Delta E_{int} = \sum_{BCP} k V(\mathbf{r}_{BCP})$$

Es importante mencionar que para dicho cálculo sólo se consideran las interacciones ligantes tnz-ADN y no se considera la interacción Cu-O_{fosfato}, debido a que ésta es una interacción de tipo iónica y no electrostática o débil, por lo tanto, no se incluye dentro de la aproximación EML. Los valores resultantes se muestran en la Tabla 5.17 y la Tabla 5.18 con la etiqueta de columna “E_{int} EML”.

Los valores de E_{int} indican que la estructura más estable es la geometría 3 del complejo 2 con -46.0 kcal/mol, y la menos estable es la geometría 3 del complejo 1 con -1.0 kcal/mol. Si nos enfocamos en los 10 cortes más estables podemos ver que se mantiene la tendencia de estabilidad $2 > 3 > 1$, puesto que dentro de esos 10 se encuentran los 5 cortes del complejo 2, 4 cortes del complejo 3 y 1 corte del complejo 1, todos ellos tomando valores de energía entre -46.0 y -28.9 kcal/mol.

Para una mejor descripción de los resultados, a continuación, se explicará primero lo que sucede en el ADN, posteriormente lo que sucede en el ligante tnz, y, finalmente en el centro metálico.

1. ADN

La Tabla 5.17 presenta los datos de lo que ocurre en el ADN en las 20 geometrías recortadas, cada una diferenciada en la columna “Geometría del aducto” por la etiqueta generada a partir de la Figura 5.36. La columna “Residuos de ADN conservados” muestra el número de residuos que interactúan con el complejo y fueron mantenidos después del corte, entre paréntesis se señala la secuencia que fue conservada, por ejemplo, la geometría 1 del complejo 1 está formada por 5 residuos, desde el 4 hasta el 8 del dodecámero, lo que indica que se eliminaron los pares del 1 al 3 y 9 al 12. La siguiente columna muestra la Energía de Interacción EML en kcal/mol

Posteriormente, la sección interacciones de la tabla se divide en el número (#) de interacciones contadas entre los ligantes tnz y el ADN, y cuántas de ellas se dan entre el ligante y algún átomo del grupo fosfato (columna “Fosfato”), entre el ligante y algún átomo del azúcar desoxirribosa (columna “Azúcar”), y entre el ligante y cualquier átomo de las bases nitrogenadas (columna “Base”). En estas tres columnas el dato de la parte superior indica el número de interacciones para cada sección, en el caso de fosfato se añade entre paréntesis el número de interacciones Cu-O_{fosfato} aunque no sea considerado en la energía de interacción, y en la parte inferior se muestra el porcentaje de dichas interacciones para cada sección considerando como 100% el valor de la columna “#”. Finalmente, se muestran los residuos con mayor número de interacciones ligantes tnz-ADN, es decir, el preferido para la unión.

Podemos afirmar que la estabilidad aumenta conforme el número de interacciones aumentan, aunque no existe una relación directa entre ellas o un comportamiento lineal. Por ejemplo: la geometría 8b del complejo 1 tiene el mayor número de interacciones, 40, pero es el tercer aducto más estable, mientras que la geometría 4 del complejo 1 tiene el menor número de interacciones, 4, pero es el segundo compuesto menos estable.

La tendencia general que observamos es que para las geometrías más estables el mayor número de interacciones se da con los azúcares, mientras que, para las geometrías menos estables, el mayor número de interacciones se da con los grupos fosfato.

Si nos enfocamos en las geometrías del complejo 2, que presentan mayor estabilidad, vemos que los porcentajes de interacción del grupo fosfato van del 13.3% hasta el 33.3%, los de los azúcares van de

45.7% al 56.8%, y los de las bases se encuentran entre el 20.5% al 33.3%. En este caso, es notable que la mayor interacción se da con los átomos que forman parte de los azúcares, y que los átomos de los grupos fosfato y de las bases tienen una contribución similar ya que dependiendo de la geometría se involucra más uno que el otro.

Complejo	Geometría del aducto	Residuos de ADN conservados	E_{int} EML (kcal/mol)	Interacciones (# %)			Residuos en la interacción	
				#	Fosfato	Azúcar		Base
1	1: 2P-D	5 (4-8)	-12.6	13	9 (2) 69.2%	4 30.8%	0 0	C21/G22
	2: 2P-F	5 (4-8)	-10.4	9	5 (2) 55.6%	4 44.4%	0 0	T8
	3: 2P-E	5 (4-8)	-1.0	5	4 (2) 80.0%	1 20.0%	0 0	C21
	4: 1P-E	4 (6-9)	-4.6	4	3 (1) 75.0%	1 25.0%	0 0	T8
	5: 1P-A	5 (4-8)	-19.6	24	10 (1) 41.7%	12 50.0%	2 8.3%	T7
	6: 1P-D	4 (5-8)	-11.6	9	6 (1) 66.7%	3 33.3%	0 0	T7
	7: 1P-F	5 (5-9)	-8.4	8	5 (1) 62.5%	3 37.5%	0 0	T8
	8a: 1P-D	6 (4-9)	-6.5	6	5 (1) 83.3%	1 16.7%	0 0	T7
8b: 1P-A	-40.7		40	6 (1) 15.0%	23 57.5%	11 27.5%	T7	
2	1:1P-B	5 (3-7)	-38.4	35	10 (1) 28.6%	16 45.7%	9 25.7%	A6
	2: 1P-B	5 (3-7)	-33.8	30	4 (1) 13.3%	16 53.3%	10 33.3%	A6
	3: 2P-B	5 (3-7)	-46.0	39	13 (2) 33.3%	18 46.2%	8 20.5%	A6
	4: 1P-C	6 (3-8)	-38.1	37	8 (1) 21.6%	21 56.8%	8 21.6%	C21
	5: 1P-C	6 (3-8)	-30.7	30	4 (1) 13.3%	17 56.7%	9 30.0%	T8
3	1: 1P-B	5 (3-7)	-43.7	30	4 (1) 13.3%	20 66.7%	6 20.0%	C21
	2: 1P-B	5 (3-7)	-30.6	29	2 (1) 6.9%	19 65.5%	8 27.6%	A6/T7
	3: 1P-B	6 (3-8)	-28.9	27	4 (1) 14.8%	13 48.1%	10 37.0%	C21
	4: 1P-D	4 (3-6)	-7.8	8	5 (1) 62.5%	3 37.5%	0 0.0	C21
	5: 1P-F	4 (3-6)	-8.0	8	7 (1) 87.5%	1 12.5%	0 0	T20
	6: 2P-F	4 (5-8)	-12.1	14	9 (2) 64.3%	5 35.7%	0 0	T8
	7: 1P-A	5 (4-8)	-40.5	36	5 (1) 13.9%	23 63.9%	8 22.2%	T7/T20
Interacciones Totales				435 100%	128 29.0%	224 50.8%	89 20.2%	

Tabla 5.17. Contribución porcentual del ADN para las interacciones en el aducto. Columna 3: en paréntesis se señalan los residuos del dodecámero conservados en el corte. Columna 6: se indica en paréntesis el número de interacciones Cu-O_{fosfato} que no son consideradas en el cálculo de E_{int} E-M-L. Columnas 6-8 y última fila: el valor de arriba corresponde al número de interacciones de cada sección, mientras que el valor inferior indica el porcentaje correspondiente a dicho número de interacciones.

Si ahora ponemos atención al complejo 1, el menos estable y con las geometrías recortadas menos estables, estos porcentajes de interacción son: para el grupo fosfato entre el 41.7% hasta el 83.3%, teniendo un único caso del 15%; en contraste, la contribución de los azúcares va desde el 16.7% hasta el 57.5%, mientras que las bases solo contribuyen en dos de las 8 geometrías con 8.3% y 27.5%. Estos datos indican una inclinación hacia una contribución mayor de los grupos fosfato en las geometrías menos estables.

En el caso del complejo 3, al tener geometrías tanto estables como inestables, se identifican ambos comportamientos; en algunos casos la mayor contribución es de los grupos fosfato, en otros de los azúcares, y puede o no existir contribución de las bases.

Ahora bien, puesto que la conformación del ADN no se modifica en ningún caso, los datos son comparables entre sí y podemos hacer la sumatoria de las interacciones que corresponden a cada grupo. La última fila de la Tabla 5.17 muestra el número total de interacciones y la suma de interacciones de cada sección del ADN, así como los correspondientes porcentajes para su comparación. Esta última fila muestra que la mayor contribución en las interacciones con los ligantes tnz proviene de los átomos que conforman los azúcares del ADN, con un 50.8%, seguido de los grupos fosfato, con 29%, y finalmente con las bases, con un 20.2%.

Como se reportó previamente en el grupo de investigación para un ligante orgánico, las interacciones más importantes se dan con los azúcares del ADN.^[129] Esto confirma que los grupos fosfato, al ser el primer sitio de reconocimiento, son solo un ancla en la mayoría de las veces para que las interacciones más importantes se den con la desoxirribosa, y en algunos casos con las bases, tanto en compuestos orgánicos como inorgánicos.

La última columna de la Tabla 5.17 muestra los residuos del ADN que más se involucran en la interacción de cada geometría, haciendo un recuento de todos es posible notar que los que más interaccionan son los residuos Citosina21 y Timina7, confirmando que hay una preferencia por la unión en dichos pares de bases.

2. Complejo

En la Tabla 5.18 se observan los datos de los ligantes tnz que interaccionan con el ADN para cada una de las 20 geometrías recortadas; de igual forma que la Tabla 5.17, al inicio se encuentran las columnas de Complejo, "Geometría del aducto" con la etiqueta generada a partir de la Figura 5.36, y Energía de Interacción EML en kcal/mol.

Complejo	Geometría del aducto	E _{Int} EML (kcal/mol)	Interacciones (# % kcal/mol)								
			#	Cu	Ciclo	-H ciclo	-CH ₃ ciclo	-NO ₂ ciclo	CH ₂ CH ₂	SO ₂	CH ₂ CH ₃
1	1: 2P-D	-12.6	13	2	2	2	3	2	2	0	0
				15.4	15.4	15.4	23.1	15.4	15.4	0	0
	2: 2P-F	-10.4	9	-	-1.7	-1.2	-2.2	-3.0	-4.6	0	0
				2	1	1	2	1	2	0	0
				22.2	11.1	11.1	22.2	11.1	22.2	0	0
				-	-1.9	-3.0	-1.1	-1.5	-2.9	0	0
3: 2P-E	-1.0	5	2	1	0	0	2	0	0	0	
			40.0	20.0	0	0	40.0	0	0	0	
				-	-0.1	0	0	-0.9	0	0	0

	4: 1P-E	-4.6	4	1 25.0 -	0 0 0	1 25.0 -3.5	1 25.0 -1.1	1 25.0 0	0 0 0	0 0 0	
	5: 1P-A	-19.6	24	1 4.2 -	1 4.2 -0.5	2 8.3 -0.7	5 20.8 -3.9	5 20.6 -4.9	4 16.7 -5.1	2 8.3 -2.7	4 16.7 -1.8
	6: 1P-D	-11.6	9	1 11.1 -	2 22.2 -1.6	0 0 0	4 44.4 -4.4	1 11.1 -3.3	1 11.1 -2.4	0 0 0	0 0 0
	7: 1P-F	-8.4	8	1 12.5 -	1 12.5 -0.7	1 12.5 -0.4	2 25.0 -2.9	1 12.5 0	1 12.5 -2.0	0 0 0	1 12.5 -2.5
	8a: 1P-D	-6.5	6	1 16.7 -	0 0 0	2 33.3 -2.7	1 16.7 -1.1	2 33.3 -2.7	0 0 0	0 0 0	0 0 0
	8b: 1P-A	-40.7	40	1 2.5 -	2 5.0 -1.5	1 2.5 -2.1	5 12.5 -7.7	5 12.5 -6.3	8 20.0 -8.4	7 17.5 -6.3	11 27.5 -8.3
2	1:1P-B	-38.4	35	1 2.9 -	3 8.6 -4.0	2 5.7 -1.6	6 17.1 -5.7	5 14.3 -5.8	6 17.1 -8.6	3 8.6 -6.8	9 25.7 -5.8
	2: 1P-B	-33.8	30	1 3.3 -	1 3.3 -0.3	1 3.3 0	6 20.0 -9.2	2 6.7 -1.1	7 23.3 -10.2	4 13.3 -4.3	8 26.7 -8.7
	3: 2P-B	-46.0	39	2 5.1 -	3 7.7 -3.6	1 2.6 -1.5	9 23.1 -10.3	3 7.7 -2.3	10 25.6 -13.7	3 7.7 -5.8	8 20.5 -8.8
	4: 1P-C	-38.1	37	1 2.7 -	2 5.4 -1.4	1 2.7 -2.2	1 2.7 -2.8	5 13.5 -2.8	9 24.3 -9.1	5 13.5 -6.3	13 35.1 -13.5
	5: 1P-C	-30.7	30	1 3.3 -	3 10.0 -1.9	0 0 0	1 3.3 -0.5	5 16.7 -5.0	7 23.3 -5.6	4 13.3 -6.6	9 30.0 -11.2
3	1: 1P-B	-43.7	30	1 3.3 -	2 6.7 -1.5	0 0 0	5 16.7 -4.0	3 10.0 -7.2	8 26.7 -11.4	4 13.3 -9.0	7 23.3 -10.6
	2: 1P-B	-30.6	29	1 3.4 -	2 6.9 -1.3	0 0 0	6 20.7 -6.4	2 6.9 -1.3	9 31.0 -13.5	2 6.9 -2.6	7 24.1 -5.5
	3: 1P-B	-28.9	27	1 3.7 -	3 11.1 -4.0	0 0 0	3 11.1 -2.6	1 3.7 -2.5	6 22.2 -4.9	5 18.5 -6.0	8 29.6 -9.0
	4: 1P-D	-7.8	8	1 12.5 -	1 12.5 -0.8	0 0 0	4 50.0 -3.7	0 0 0	2 25.0 -3.4	0 0 0	0 0 0
	5: 1P-F	-8.0	8	1 12.5 -	1 12.5 -0.8	0 0 0	4 50.0 -4.7	0 0 0	2 25.0 -2.4	0 0 0	0 0 0
	6: 2P-F	-12.1	14	2 14.3 -	2 14.3 -2.1	1 7.1 -1.8	4 28.6 -3.5	4 28.6 -4.1	1 7.1 -0.7	0 0 0	0 0 0
	7: 1P-A	-40.5	36	1 2.8 -	4 11.1 -5.1	2 5.6 -3.2	0 0 0	6 16.7 -6.6	7 19.4 -6.4	5 13.9 -10.3	11 30.6 -8.8

Tabla 5.18. Contribución energética y porcentual del complejo de Cu^{II} para las interacciones en el aducto. Columnas 5-12: el valor superior corresponde al número de interacciones de cada sección, el valor central indica el porcentaje correspondiente a dicho número de interacciones, y el valor inferior indica la contribución energética (en kcal/mol) de cada sección a la E_{int} E-M-L.

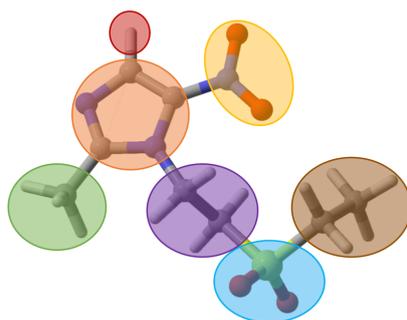


Figura 5.37. División del ligante tnz para la numeración de interacciones.

La sección de interacciones de la Tabla 5.18 muestra inicialmente el número total de ellas (#), seguida de las correspondientes al centro metálico "Cu" (aunque éstas no se consideran en el cálculo de la energía de interacción, si se consideran en los porcentajes), para después dividir la contribución del ligante tnz en los átomos que conforman cada segmento de la tabla de acuerdo con la Figura 5.37: en naranja se señala el "Ciclo", del cual derivan tres sustituyentes: con color rojo el " $-H_{\text{ciclo}}$ ", con verde el " $-\text{CH}_3_{\text{ciclo}}$ " y en amarillo " $-\text{NO}_2_{\text{ciclo}}$ "; continuando en morado la primera sección alifática " CH_2CH_2 ", seguido del sulfóxido " SO_2 " en color azul y finalmente la segunda sección alifática " CH_2CH_3 " en color café.

Cabe mencionar que en la tabla se suman todos los átomos de ambos ligantes tnz del complejo en cada segmento, con el fin de considerar las interacciones generadas en cada parte que conforma los ligantes e identificar cuál de ellas es la más importante, como en el caso del ADN. En estas columnas, el dato de la parte superior indica el número de interacciones para cada segmento; en la parte central se muestra el porcentaje de dichas interacciones, considerando como 100% el valor de la columna "#"; y en la parte inferior se muestra la contribución, en kcal/mol, a la energía de interacción de esa sección considerando como valor total la columna " $E_{\text{int}} \text{ EML}$ ". Por ejemplo, en el caso de la geometría 1 del complejo 1 el ciclo aromático, etiquetado como "Ciclo" y sin añadir los sustituyentes, contribuye en 2 de las 13 interacciones del complejo, lo que corresponde a un 15.4% de las interacciones y a -1.7 kcal/mol de un total de -12.6 kcal/mol.

Es importante recalcar que no siempre el mayor número de interacciones corresponde a la mayor contribución energética, debido a ello se hacen ambos análisis por separado.

Hablando del complejo más estable, el complejo 2, notamos que las interacciones están muy sesgadas hacia las partes alifáticas de los ligantes puesto que en todos los casos tienen los mayores porcentajes de interacciones, desde 25.6% hasta 35.1%. Energéticamente hablando ocurre lo mismo, ya que la mayor contribución energética proviene de las dos secciones alifáticas de los tnz, salvo el último caso en donde se ve que aporta más el grupo sulfóxido. Esto indica que los enlaces que más predominan son los enlaces de hidrógeno de las secciones alifáticas.

En el caso del complejo 3 se observa un comportamiento muy similar al complejo 2, pero en este caso además de la contribución importante de las secciones alifáticas también se observa una contribución importante, tanto numérica como energética, del sustituyente metilo del anillo aromático. Este resultado no suena tan disimilar al primer caso, puesto que el sustituyente metilo del anillo aromático también forma enlaces de hidrógeno con los átomos del ADN, añadiendo importancia a todas las secciones alifáticas del tnz.

Para el complejo 1, recordemos que es el menos estable, numéricamente el sustituyente metilo es el que más contribuye, aunque también se observa que el grupo nitro es importante. Energéticamente hablando, siguen predominando los enlaces de hidrógeno puesto que la mayor contribución energética proviene de la primer parte alifática del tnz y de los sustituyentes hidrógeno y metilo del ciclo aromático; sin embargo, en dos ocasiones también resalta la contribución energética del grupo nitro.

Este conjunto de resultados claramente resalta la importancia de las secciones alifáticas en el ligante del complejo, debido a que tanto numéricamente como energéticamente los enlaces de hidrógeno son el tipo de unión preferido para la interacción entre el ADN y esta familia de complejos de cobre(II), no importando el modo de unión o geometría que éstos adopten.

3. Cobre

Para analizar a profundidad lo que ocurre en el centro metálico de los complejos estudiados haremos uso de las isosuperficies, los contornos y la gráfica atómica obtenidos con la densidad electrónica mediante la Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas. En este caso únicamente nos centraremos en las dos geometrías más estables, que son la geometría 3 del complejo 2 (Figura 5.38, a la que nos referiremos como complejo 2 en esta sección) y la geometría 1 del complejo 3 (Figura 5.39, a la que nos referiremos como complejo 3 en esta sección), puesto que éstas se diferencian en la coordinación del cobre y el comportamiento de ambas se ve reflejado en el resto de las geometrías. En el material Anexo I se encuentran las geometrías, isosuperficies, contornos y gráficas atómicas de los 20 recortes.

En el complejo 2, el cobre(II) se coordina a dos oxígenos de grupos fosfato y adopta una geometría tetraédrica. Recibió la etiqueta "B" debido a que el primer tinidazol se intercala en la parte superior, mientras que el segundo se encuentra en la parte externa con una conformación extendida.

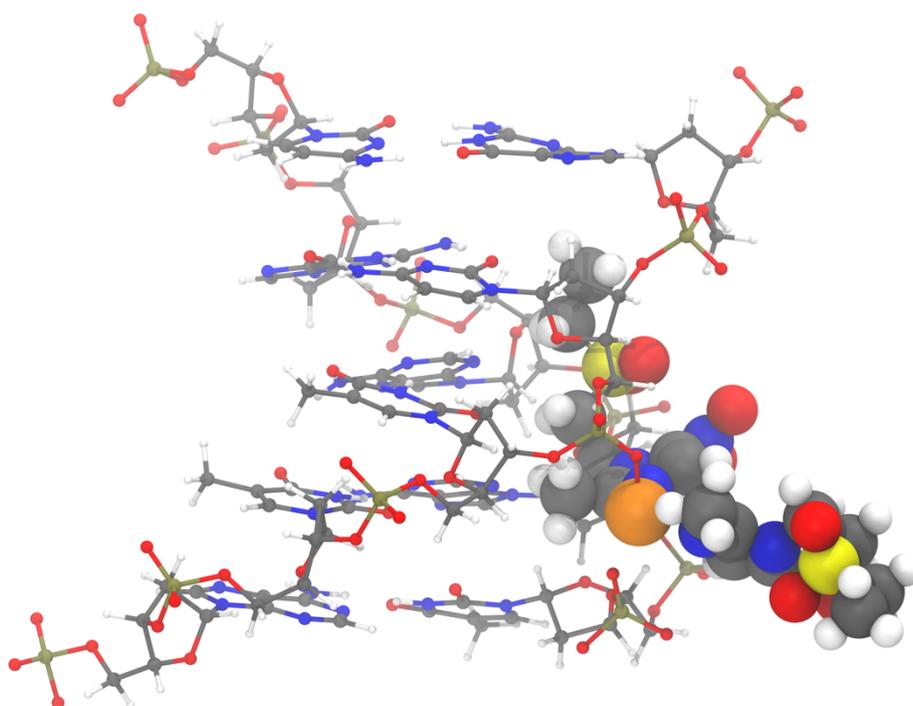


Figura 5.38. Geometría 3 del Complejo 2.

En el complejo 3, el cobre(II) se coordina únicamente con un oxígeno de grupo fosfato, esto genera que la base del tetraedro se aplane y se identifique una geometría trigonal con las posiciones axiales vacantes. También recibió la etiqueta “B” ya que el primer tinidazol se encuentra intercalado en la parte superior y el segundo se encuentra en la parte externa adoptando una conformación cerrada.

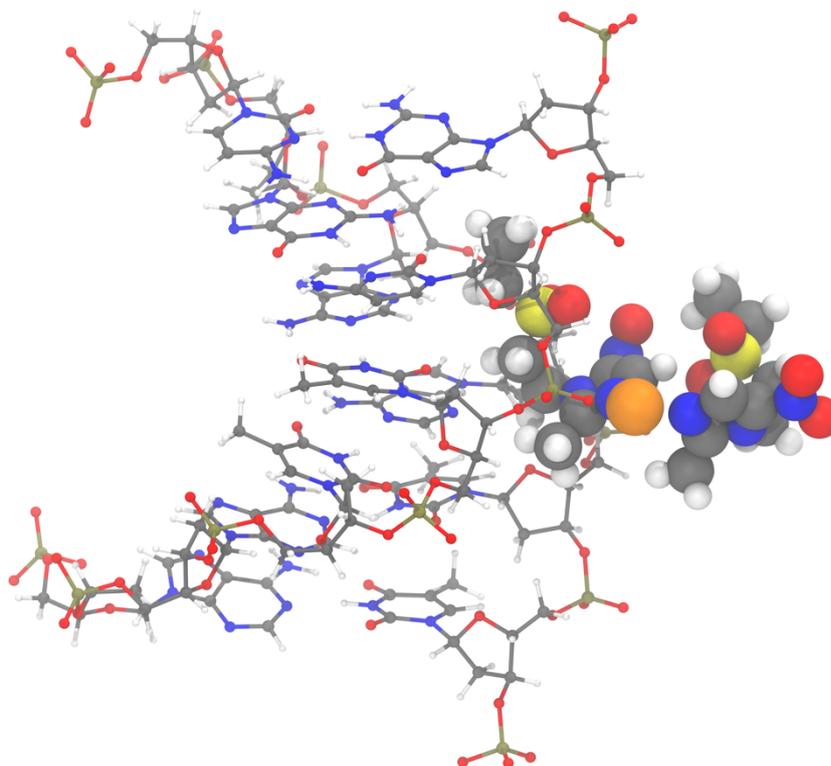


Figura 5.39. Geometría 1 del Complejo 3.

La Figura 5.40 muestra los contornos del Laplaciano de la Densidad Electrónica de los enlaces más importantes en el complejo (Cu-N) y en su interacción con los grupos fosfato (Cu-O) para el Complejo 2 y el Complejo 3.

En ambos complejos el contorno del Laplaciano de la Densidad de los átomos N1-Cu-N2 muestra que los enlaces se dan entre una concentración de densidad electrónica proveniente de los átomos de nitrógeno, que se dirige a los sitios de dilución de densidad electrónica del centro metálico. Sabemos que el complejo 2 interacciona con dos átomos de oxígeno, mientras que el complejo 3 únicamente con uno, por lo que los contornos de la parte derecha son O1-Cu-O2 y O1-Cu-N1, respectivamente. En estos casos la concentración de densidad electrónica en los oxígenos apunta directamente a una zona de concentración en el cobre, por tanto, se trata de una interacción de tipo iónica.

Lo observado en los contornos se confirma con las isosuperficies del Laplaciano de la Densidad de ambos complejos (mostradas en la Figura 5.41), las cuales tienen la forma típica de un átomo de cobre(II) al presentar cuatro huecos (o zonas de dilución) en una posición ecuatorial, como se observó en los contornos. En todos los casos, los átomos de nitrógeno apuntan directamente a los huecos, mientras que los átomos de oxígeno apuntan a zonas de concentración, es decir, a la superficie.

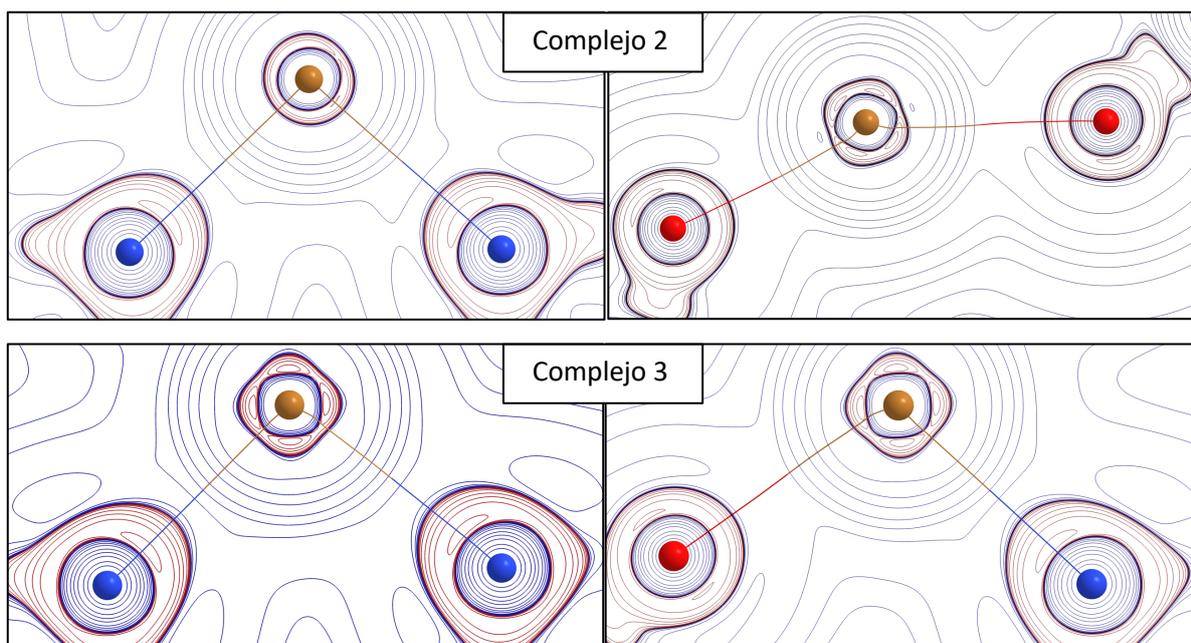


Figura 5.40. Contornos del Laplaciano de la Densidad electrónica para N1-Cu-N2 (izquierda), O1-Cu-O2 (derecha arriba) y O1-Cu-N1 (derecha abajo) en los complejos 2 y 3.

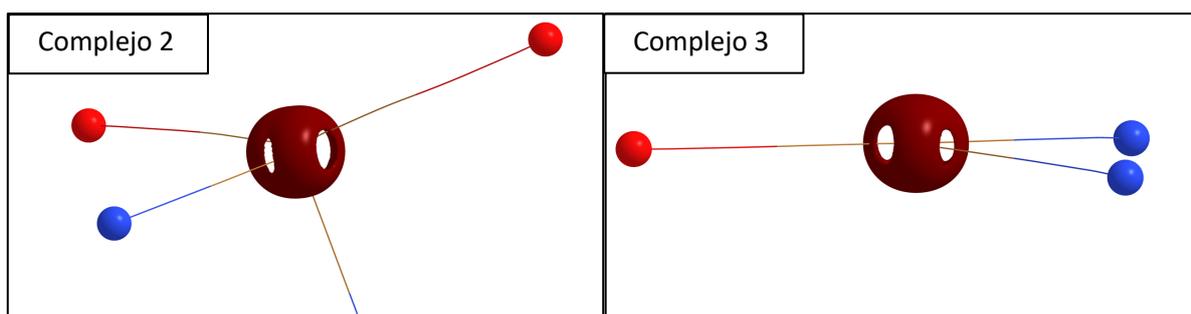


Figura 5.41. Isosuperficies del Laplaciano de la Densidad Electrónica del átomo de cobre en el complejo 2 (isovalor = -55 u.a.) y complejo 3 (isovalor= -50 u.a.).



Figura 5.42. Gráfica atómica del cobre(II) en el complejo 2 y complejo 3. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3,+3) en morado, (3,+1) en rojo y (3,-1) en amarillo.

Además, se obtuvieron las gráficas atómicas del cobre, es decir, el conjunto de puntos críticos del Laplaciano de la Densidad que se presentan en la Figura 5.42. Una gráfica atómica del cobre(II) típicamente tiene la forma de la presentada para el Complejo 3, entonces nos enfocaremos en su explicación; la gráfica atómica del Complejo 2 no logró obtenerse completa, aunque sigue cumpliendo la relación de Poincaré-Hopf. La gráfica atómica se identifica visualmente como un semi-cubo, debido a que se tienen 6 caras, sin embargo, lo apropiado es etiquetarla de acuerdo a su conjunto de puntos

críticos característico siendo de tipo [4,6,8] al tener 4 puntos críticos (3,+3) o de anillo (morados), 6 puntos críticos (3,-1) o de caja (amarillos), y 8 puntos críticos (3,+1) o de enlace (rojos).

Lo importante a resaltar en estos resultados, es que pudimos discernir entre la interacción Cu-N y Cu-O_{fosfato}, ya que, mientras que el primero es un enlace localizado, el otro es una interacción más de tipo iónica al identificarse que una región de concentración en el oxígeno interactúa con la región de concentración en el centro metálico.

5.3.5 Conclusiones

En esta sección se estudió la interacción entre los compuestos tetraédricos de cobre(II) basados en tinidazol y el Dodecámero de Dickerson-Drew como modelo de ADN, bajo la aproximación de Dinámica Molecular y un análisis de conectividad con la Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas.

El muestreo total señala que en la interacción Complejo-ADN el complejo 2 es el más estable, seguido del complejo 3 y que el menos estable es el complejo 1, y que hay una preferencia por los residuos de citosina.

Mediante una inspección visual del muestreo total se identificó la importancia de la geometría tetraédrica del complejo para su interacción con el ADN una vez que se pierden los halogenuros, ya que esto propicia la unión a los grupos fosfato del esqueleto mediante la coordinación de los átomos de oxígeno al cobre(II) en las posiciones de coordinación libres.

Los modos de unión del complejo en el ADN en su mayoría ocurren vía un solo enlace Cu-O, siendo pocos los casos en los que se une a dos grupos fosfato; y preferentemente por la intercalación parcial del complejo en el surco menor, en donde se observa un cambio de conformación en el ADN y no se da una inserción dentro de las bases nitrogenadas, aunque también puede darse una interacción únicamente con el esqueleto.

Esto permite proponer que dicha unión Cu-O, ya sea a un solo fosfato o a dos fosfatos, corresponde al primer sitio de reconocimiento molecular para los compuestos de cobre(II) basados en tinidazol.

Comparando el comportamiento de los compuestos tetraédricos con lo reportado anteriormente para las Casiopeínas® comprobamos que es de suma importancia esta primera interacción Cu-O, aunque se presenten geometrías diferentes, puesto que dicho enlace es el que sirve como ancla para que el resto de los complejos interactúe con el ADN.

Analizando qué ocurre en el ADN, obtenemos que la mayor contribución en la interacción con el complejo ocurre en los átomos que conforman el azúcar Desoxirribosa, es decir, los átomos del azúcar son los que más interacción tienen con cualquier átomo del complejo.

Respecto al complejo, identificamos que la mayor contribución en la interacción con el ADN se da debido a los enlaces que las secciones alifáticas del ligante forman con cualquier parte del dodecámero.

Es importante resaltar la función del átomo de cobre en la interacción puesto que al formar un enlace iónico con los átomos de oxígeno de los grupos fosfato, el metal actúa como un ancla para que los ligantes tinidazol interactúen con el resto del ADN, ya sea intercalado o con el esqueleto. El hecho de presentar una geometría tetraédrica propicia que la unión Cu-O sea lo suficientemente estable para permanecer unido el tiempo necesario para que el tinidazol interactúe con el ADN.

Los resultados obtenidos concuerdan con la hipótesis experimental de que la actividad de estos compuestos de cobre con el ADN se rige por interacciones electrostáticas y por interacción en el surco, resaltando además que el hecho de presentar una geometría tetraédrica propicia que la unión Cu-O sea lo suficientemente estable para permanecer unido el tiempo necesario para que el tinidazol interactúe con el ADN.

6. Conclusiones

Este trabajo nos ayudó a entender desde diversos puntos de vista el mecanismo por el cual pueden actuar los complejos de cobre(II) a nivel biológico. Por una parte, se estudió a detalle su actividad nucleasa oxidativa mediante la propuesta de la interacción con especies reductoras tioladas. Además, se identificó el conjunto de enlaces en estos complejos que son necesarios para que se dé una respuesta biológica. Y, finalmente, se logró identificar el primer sitio de reconocimiento para una nueva familia de compuestos de cobre(II), siendo esta la propuesta de primera interacción que puede conducir a la actividad nucleasa hidrolítica de ellos.

De forma más específica, en la primera parte se caracterizó mediante experimentos y cálculos computacionales un intermediario de reacción que promueve un proceso de transferencia electrónica necesario para la obtención de los productos de reacción propuestos anteriormente. Este intermediario de reacción surge de una primera interacción entre el cobre y el azufre, lo que genera un aducto que puede encontrarse en una geometría octaédrica o pirámide de base cuadrada. La transferencia electrónica se da cuando la cisteína comienza a alejarse en este aducto y busca la formación de un radical tío, que es el reactivo inicial en la obtención del enlace disulfuro. Además, se observa la reducción del centro metálico a un complejo de cobre(I) con geometría tetraédrica.

En la segunda parte se generaron dos modelos QSAR que resaltan la importancia de los enlaces C-N para la actividad biológica en líneas celulares cancerosas HCT-15 y HeLa de los 31 compuestos diferentes utilizados. Dichos enlaces forman parte principalmente de ligantes aromáticos. Los modelos obtenidos en ambas líneas celulares mostraron una descripción adecuada de la propiedad, y cumplen con los parámetros estadísticos de un buen modelo QSAR que puede ser útil en la predicción de la actividad de nuevas moléculas que se encuentren dentro de este dominio de aplicabilidad.

En la tercera parte determinamos el primer sitio de reconocimiento de estos compuestos de cobre(II) basados en tinidazol, no reportado anteriormente. Además, identificamos que en el blanco terapéutico (ADN en este caso) cobran mucha importancia las interacciones dadas por la Desoxirribosa. En el caso del complejo distinguimos que las interacciones se dan en mayor medida por las partes alifáticas del ligante tnz.

En general, este trabajo muestra un panorama amplio de las posibilidades de estudio en las interacciones ligante-blanco en Química Medicinal Computacional, dando importancia a las dos partes que contribuyen en dicha unión.

7. Referencias

- [1] O. M. de la Salud, "Cáncer," can be found under <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, **2021**.
- [2] J. Ferlay, M. Ervik, F. Lam, M. Colombet, L. Mery, M. Piñeros, "Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer," can be found under <https://gco.iarc.fr/today>, **2020**.
- [3] K. H. Thompson, in *Encycl. Inorg. Bioinorg. Chem.*, John Wiley & Sons Ltd, **2011**.
- [4] C. X. Zhang, S. J. Lippard, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 481–489.
- [5] Z. Guo, P. J. Sadler, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **1999**, *38*, 1512–1531.
- [6] B. Rosenberg, L. VanCamp, T. Krigas, *Nature* **1965**, *205*, 698–699.
- [7] B. Rosenberg, L. VanCamp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature* **1969**, *222*, 385–386.
- [8] B. Rosenberg, L. VanCamp, *Cancer Res.* **1970**, *30*, 1799–1802.
- [9] E. R. Jamieson, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467–2498.
- [10] D. Lebwahl, R. Canetta, *Eur. J. Cancer* **1998**, *34*, 1522–1534.
- [11] H. Bleiberg, *Br. J. Cancer* **1998**, *77*, 1–3.
- [12] E. Cvitkovic, *Br. J. Cancer* **1998**, *77*, 8–11.
- [13] M. J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 69–93.
- [14] M. J. McKeage, L. Maharaj, S. J. Berners-Price, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 127–135.
- [15] L. Messori, F. Abbate, G. Marcon, P. Orioli, M. Fontani, E. Mini, T. Mazzei, S. Carotti, T. O'Connell, P. Zanello, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3541–3548.
- [16] G. Marcon, S. Carotti, M. Coronello, L. Messori, E. Mini, P. Orioli, T. Mazzei, M. A. Cinellu, G. Minghetti, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1672–1677.
- [17] P. C. Bruijninx, P. J. Sadler, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 197–206.
- [18] H. K. Liu, P. J. Sadler, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 349–359.
- [19] D. S. Sigman, A. Mazumder, D. M. Perrin, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2295–2316.
- [20] S. S. Hindo, M. Frezza, D. Tomco, M. J. Heeg, L. Hryhorczuk, B. R. McGarvey, Q. P. Dou, C. N. Verani, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4353–61.
- [21] C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 815–862.
- [22] F. Tisato, C. Marzano, M. Porchia, M. Pellei, C. Santini, *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 708–749.
- [23] C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato, C. Santini, *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 185–211.
- [24] A. Erxleben, *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *360*, 92–121.
- [25] F. Tisato, C. Marzano, M. Porchia, M. Pellei, C. Santini, *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 708–749.
- [26] F. A. Cotton, G. Wilkinson, P. L. Gaus, *Basic Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, United States of America, **1976**.
- [27] I. Scheiber, R. Dringen, J. F. B. Mercer, *Met. Ions Life Sci.* **2013**, *13*, 359–387.

- [28] L. Ruiz-Azuara, M. E. Bravo-Gómez, *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 3606–3615.
- [29] J. Easmon, G. Pürstinger, G. Heinisch, T. Roth, H. H. Fiebig, W. Holzer, W. Jäger, M. Jenny, J. Hofmann, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2164–2171.
- [30] V. Ambike, S. Adsule, F. Ahmed, Z. Wang, Z. Afrasiabi, E. Sinn, F. Sarkar, S. Padhye, *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 1517–1524.
- [31] H. Tamura, H. Imai, J. Kuwahara, Y. Sugiura, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6870–6871.
- [32] M. Devereux, M. McCann, D. O. Shea, R. Kelly, D. Egan, C. Deegan, K. Kavanagh, V. McKee, G. Finn, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1023–1031.
- [33] H. Zhang, C.-S. Liu, X.-H. Bu, M. Yang, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1119–1125.
- [34] R. Chen, C. Sen Liu, H. Zhang, Y. Guo, X. H. Bu, M. Yang, *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 412–421.
- [35] D. T. Felson, J. J. Anderson, R. F. Meenan, *Arthritis Rheum.* **1990**, *33*, 1449–1461.
- [36] S. J. Berners-Price, P. J. Sadler, *Bioinorg. Chem.* **1988**, *70*, 27–102.
- [37] S. J. Berners-Price, R. K. Johnson, C. K. Mirabelli, L. F. Faucette, F. L. McCabe, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 3383–3387.
- [38] D. S. Sigman, D. R. Graham, V. D’Aurora, A. M. Stern, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 12269–12272.
- [39] S. Zhang, Y. Zhu, C. Tu, H. Wei, Z. Yang, L. Lin, J. Ding, J. Zhang, Z. Guo, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 2099–2106.
- [40] H. Zhou, C. Zheng, G. Zou, D. Tao, J. Gong, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2002**, *34*, 678–684.
- [41] M. Pitié, B. Meunier, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 3486–3489.
- [42] C. Deegan, M. McCann, M. Devereux, B. Coyle, D. A. Egan, *Cancer Lett.* **2007**, *247*, 224–233.
- [43] M. Devereux, D. O’Shea, M. O’Connor, H. Grehan, G. Connor, M. McCann, G. Rosair, F. Lyng, A. Kellett, M. Walsh, D. Egan, B. Thati, *Polyhedron* **2007**, *26*, 4073–4084.
- [44] L. Ruiz-Azuara, *Procedimiento Para La Obtención de Complejos Metálicos Como Agentes Anticancerígenos. Tipo II. Patente de Invención, SECOFI 18802. P. I.*, **1990**, Patente, 09/12/1993, No. 172248.
- [45] L. Ruiz-Azuara, *Process to Obtain New Mixed Copper Aminoacidate from Methylate Phenanthroline Complexes to Be Used as Anticancerigenic Agents. U. S. Patent Application Serial No. 07/628, 628.*, **1992**.
- [46] L. Ruiz-Azuara, *Mark Title Casiopeína®. Reg. 407543 SECOFI.*, **1992**, Re 2002, 2012.
- [47] L. Ruiz-Azuara, *Composición Parental de Casiopeína y Usos de La Misma. IMPI. No. Solicitud MX/a/2017/016444.*, **2017**.
- [48] I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramírez, C. Gómez-Ruiz, M. Tinoco-Méndez, A. Márquez-Quiñones, L. R. Lira, A. Marín-Hernández, L. Macías-Rosales, M. E. Bravo-Gómez, *Met. Based. Drugs* **2001**, *8*, 19–28.
- [49] R. Alemón-Medina, M. Breña-Valle, J. L. Muñoz-Sánchez, M. I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, *60*, 219–228.
- [50] F. Sánchez-Bartéz, Determinación de La Capacidad Genotóxica, Citotóxica y Citostática de Las Casiopeínas Igli, Ilgli y III-Ia En Linfocitos, Médula Ósea de Ratón y Linfocitos Humanos En Cultivo., Universidad Nacional Autónoma de México, **2006**.
- [51] L. Ruiz-Ramírez, M. E. de la Rosa, I. Gracia-Mora, Á. Mendoza, G. Pérez, G. Ferrer-Sueta, A.

- Tovar, M. Breña, P. Gutiérrez, M. P. Cruces Martínez, E. Pimentel, A. T. Natarajan, *J. Inorg. Biochem.* **1995**, *59*, 207.
- [52] F. Carvallo-Chaigneau, C. Trejo-Solís, C. Gómez-Ruiz, E. Rodríguez-Aguilera, L. Macías-Rosales, E. Cortés-Barberena, C. Cedillo-Peláez, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, V. Madrid-Marina, F. Constantino-Casas, *BioMetals* **2008**, *21*, 17–28.
- [53] C. Trejo-Solís, G. Palencia, S. Zúñiga, A. Rodríguez-Ropon, L. Osorio-Rico, S. T. Luvia, I. Gracia-Mora, L. Marquez-Rosado, A. Sánchez, M. E. Moreno-García, A. Cruz, M. E. Bravo-Gómez, L. Ruiz-Ramírez, S. Rodríguez-Enriquez, J. Sotelo, *Neoplasia* **2005**, *7*, 563–574.
- [54] L. Ruiz-Ramírez, I. Gracia-Mora, M. E. de la Rosa, H. Sumano, C. Gomez, F. Arenas, E. Gomez, E. Pimentel, M. Cruces, *J. Inorg. Biochem.* **1993**, *51*, 406.
- [55] R. Kachadourian, H. M. Brechbuhl, L. Ruiz-Azuara, I. Gracia-Mora, B. J. Day, *Toxicology* **2010**, *268*, 176–183.
- [56] R. Galindo-Murillo, L. Ruíz-Azuara, R. Moreno-Esparza, F. Cortés-Guzmán, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 15539.
- [57] R. Galindo-Murillo, J. C. García-Ramos, L. Ruiz-Azuara, T. E. Cheatham, F. Cortés-Guzmán, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 5364–5376.
- [58] F. H.B., D. T.L., *Clin. Ther.* **2005**, *27*, 1859–1884.
- [59] I. Alfaro-Fuentes, H. López-Sandoval, E. Mijangos, A. M. Duarte-Hernández, G. Rodriguez-López, M. I. Bernal-Uruchurtu, R. Contreras, A. Flores-Parra, N. Barba-Behrens, *Polyhedron* **2014**, *67*, 373–380.
- [60] I. Alfaro-Fuentes, R. Castro-Ramírez, N. Ortiz-Pastrana, R. M. Medina-Guerrero, L. C. Soler-Jiménez, I. Martínez-Rodríguez, M. Betancourt-Lozano, L. Ibarra-Castro, N. Barba-Behrens, E. J. Fajer-Ávila, *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *176*, 159–167.
- [61] R. Castro-Ramírez, N. Ortiz-Pastrana, A. B. Caballero, M. T. Zimmerman, B. S. Stadelman, A. A. E. Gaertner, J. L. Brumaghim, L. Korrodi-Gregório, R. Pérez-Tomás, P. Gamez, N. Barba-Behrens, *Dalt. Trans.* **2018**, *47*, 7551–7560.
- [62] G. Thomas, *Medicinal Chemistry: An Introduction*, John Wiley & Sons Ltd, England. Great Britain, **2007**.
- [63] F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Great Britain, **2007**.
- [64] Y. Zhao, N. E. Schultz, D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 364–382.
- [65] R. Galindo-Murillo, J. Hernandez-Lima, M. González-Rendón, F. Cortés-Guzmán, L. Ruíz-Azuara, R. Moreno-Esparza, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 14510–14515.
- [66] A. Tropsha, *Mol. Inform.* **2010**, *29*, 476–488.
- [67] C. F. Matta, *J. Comput. Chem.* **2014**, *35*, 1165–1198.
- [68] T. Scior, J. Medina-Franco, Q.-T. Do, K. Martinez-Mayorga, J. Yunes Rojas, P. Bernard, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 4297–4313.
- [69] P. Gramatica, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 694–701.
- [70] R. F. W. Bader, *Atoms in Molecules. A Quantum Theory.*, Oxford University Press, Ontario, Canada, **1994**.
- [71] P. Popelier, *Atoms in Molecules. An Introduction.*, Pearson Education Limited 2000, Singapur, **2000**.

- [72] C. F. Matta, R. J. Boyd, *The Quantum Theory of Atoms in Molecules. From Solid State to DNA and Drug Design.*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2007**.
- [73] D. S. Sigman, *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 180–186.
- [74] T. B. Thederahn, M. D. Kuwabara, T. A. Larsen, D. S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4941–4946.
- [75] P. De Hoog, M. J. Louwerse, P. Gamez, M. Pitié, E. J. Baerends, B. Meunier, J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 612–619.
- [76] K. Ngamchuea, C. Batchelor-McAuley, R. G. Compton, *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22*, 15937–15944.
- [77] A. Santoro, J. S. Calvo, M. D. Peris-Díaz, A. Krężel, G. Meloni, P. Faller, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2020**, *59*, 7830–7835.
- [78] A. L. Alonso-Saenz, Estudio de La Reactividad de Las Casiopeínas II-Gly y III-Ia Con Glutatión Reducido, Cisteína y 2-Mercaptoetanol, Universidad Nacional Autónoma de México, **2013**.
- [79] J. C. García-Ramos, Estudio de La Actividad Nucleasa de Quelatos Mixtos de Cu(II): Casiopeínas, Universidad Nacional Autónoma de México, **2015**.
- [80] P. J. Hay, W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 270–283.
- [81] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, D. J. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. Montgomery, J. A., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, **2009**.
- [82] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- [83] T. Yanai, D. P. Tew, N. C. Handy, *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *393*, 51–57.
- [84] A. D. Boese, N. C. Handy, *J. Chem. Phys.* **2002**, *116*, 9559–9569.
- [85] M. Ernzerhof, J. P. Perdew, *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 3313–3320.
- [86] J. Da Chai, M. Head-Gordon, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6615–6620.
- [87] D. E. Woon, T. H. Dunning, *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 1007–1023.
- [88] P. J. Hay, *J. Chem. Phys.* **1977**, *66*, 4377–4384.
- [89] M. Dolg, U. Wedig, H. Stoll, H. Preuss, *J. Chem. Phys.* **1987**, *86*, 866–872.
- [90] F. Weigend, R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3297–3305.
- [91] T. A. Keith, **2016**.
- [92] F. Neese, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2*, 73–78.
- [93] S. Stoll, A. Schweiger, *J. Magn. Reson.* **2006**, DOI 10.1016/j.jmr.2005.08.013.
- [94] K. K. Millis, K. H. Weaver, D. L. Rabenstein, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4144–4146.
- [95] P. C. Jocelyn, *Eur. J. Biochem.* **1967**, *2*, 327–331.

- [96] O. Iranzo, *Bioorg. Chem.* **2011**, *39*, 73–87.
- [97] M. E. Bravo-Gómez, J. C. García-Ramos, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 299–309.
- [98] X-Rite, “Pantone®,” can be found under <https://www.pantone.com/eu/es/color-finder>, **n.d.**
- [99] R. Castañeda Arriaga, Estudio Teórico de Mecanismos de Reacción y Cinética de Antioxidantes Sulfurados Frente a Radicales Oxigenados., Universidad Nacional Autónoma de México, **2015**.
- [100] W. L. Kwik, K. P. Ang, G. Chen, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1980**, *42*, 303–313.
- [101] L. Rivillas-Acevedo, R. Grande-Aztatzi, I. Lomelí, J. E. García, E. Barrios, S. Teloxa, A. Vela, L. Quintanar, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 1956–1972.
- [102] W. M. Ames, S. C. Larsen, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 8266–8274.
- [103] T. Gaillard, A. Trivella, R. H. Stote, P. Hellwig, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *150*, 301–307.
- [104] S. F. Parker, *Chem. Phys.* **2013**, *424*, 75–79.
- [105] G. J. Medina-Dickinson, Influencia Del Carácter Pi Del Ligante (N-N) En La Fuerza Del Enlace Cu-O En Compuestos Del Tipo [Cu(N-N)(O-O)], Universidad Nacional Autónoma de México, **1997**.
- [106] P. Zhang, W. Chan, I. L. Ang, R. Wei, M. M. T. Lam, K. M. K. Lei, T. C. W. Poon, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6453.
- [107] P. Zhang, W. Chan, I. L. Ang, R. Wei, M. M. T. Lam, K. M. K. Lei, T. C. W. Poon, *Molecules* **2019**, *24*, 747.
- [108] J. H. Van Drie, *Internet Electron. J. Mol. Des.* **2007**, *6*, 271–279.
- [109] M. E. Bravo-Gómez, S. Dávila-Manzanilla, J. Flood-Garibay, M. Á. Muciño-Hernández, Á. Mendoza, J. C. García-Ramos, R. Moreno-Esparza, L. Ruiz-Azuara, *J. Mex. Chem. Soc.* **2012**, *56*, 85–92.
- [110] J. C. García-Ramos, R. Galindo-Murillo, A. Tovar-Tovar, A. L. Alonso-Saenz, V. Gómez-Vidales, M. Flores-Álamo, L. Ortiz-Frade, F. Cortes-Guzmán, R. Moreno-Esparza, A. Campero, L. Ruiz-Azuara, *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20*, 13730–13741.
- [111] J. Serment-Guerrero, P. Cano-Sanchez, E. Reyes-Perez, F. Velazquez-Garcia, M. E. Bravo-Gomez, L. Ruiz-Azuara, *Toxicol. Vitro.* **2011**, *25*, 1376–1384.
- [112] O. Sánchez-Guadarrama, H. López-Sandoval, F. Sánchez-Bartéz, I. Gracia-Mora, H. Höpfl, N. Barba-Behrens, *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 1204–1213.
- [113] S. Betanzos-Lara, C. Gómez-Ruiz, L. R. Barrón-Sosa, I. Gracia-Mora, M. Flores-Álamo, N. Barba-Behrens, *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *114*, 82–93.
- [114] A. Khan Haleel, D. Mahendiran, U. M. Rafi, V. Veena, S. Shobana, A. K. Rahiman, *Inorg. Nano-Metal Chem.* **2018**, *48*, 569–582.
- [115] G. A. Petersson, A. Bennett, T. G. Tensfeldt, M. A. Al-Laham, W. A. Shirley, J. Mantzaris, *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 2193–2218.
- [116] Y. Jeanvoine, R. Spezia, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2010**, *954*, 7–15.
- [117] “Semichem, Inc. - The AMPAC People,” can be found under <http://www.semichem.com/codessa/>, **n.d.**
- [118] R. Todeschini, V. Consonni, A. Mauri, M. Pavan, in *Nature-Inspired Methods Chemom. Genet.*

- Algorithms Artif. Neural Networks* (Ed.: R. Leardi), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, **2003**, pp. 141–167.
- [119] R. Todeschini, V. Consonni, A. Mauri, M. Pavan, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *515*, 199–208.
- [120] O. R. Methods, R. A. Author, W. Source, M. Statistics, S. Url, U. T. C. R. Linked, **2016**, *14*, 1261–1295.
- [121] F. Lindgren, B. Hansen, W. Karcher, *J. Chemom.* **1996**, *10*, 521–532.
- [122] P. Gramatica, A. Sangion, *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 1127–1131.
- [123] P. Gramatica, E. Giani, E. Papa, *J. Mol. Graph. Model.* **2007**, *25*, 755–766.
- [124] P. Gramatica, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 694–701.
- [125] C. R. García-Jacas, K. Martínez-Mayorga, Y. Marrero-Ponce, J. L. Medina-Franco, *SAR QSAR Environ. Res.* **2017**, *28*, 41–58.
- [126] “AMBIT | Downloads | AMBIT2,” can be found under <http://ambit.sourceforge.net/downloads.html>, **n.d.**
- [127] A. Sreedhara, J. a. Cowan, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6*, 337–347.
- [128] M. A. R. Raycroft, C. T. Liu, R. S. Brown, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 3846–3854.
- [129] D. G. Díaz-Gómez, R. Galindo-Murillo, F. Cortés-Guzmán, *ChemPhysChem* **2017**, *18*, 1909–1915.
- [130] Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215–241.
- [131] V. A. Rassolov, J. A. Pople, M. A. Ratner, T. L. Windus, *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 1223–1229.
- [132] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. a. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. a. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, a. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, a. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, Williams, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. a. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. a. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, a. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, D. J. Fox, **2016**, Gaussian 16, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallin.
- [133] D. A. Case, T. E. Cheatham, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, R. J. Woods, *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668–1688.
- [134] D. A. Case, H. M. Aktulga, K. Belfon, I. Y. Ben-Shalom, S. R. Brozell, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham III, V. W. D. Cruzeiro, T. A. Darden, R. E. Duke, G. Giambasu, M. K. Gilson, H. Gohlke, A. W. Goetz, R. Harris, S. Izadi, S. A. Izmailov, C. Jin, K. Kasavajhala, M. C. Kaymak, E. King, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T. S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Tuchko, R. Luo, M. Machado, V. Man, M. Manathunga, K. M. Merz, Y. Miao, O. Mikhailovskii, G. Monard, H. Nguyen, K. A. O’Hearn, A. Onufriev, F. Pan, S. Pantano, R. Qi, A. Rahnamoun, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C. L. Simmerling, N. R. Skrynnikov, J. Smith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, H. Wei, R. M. Wolf, X. Wu, Y. Xue, D. M. York, S. Zhao, P. A. Kollman, **2021**.
- [135] H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 2179–2183.

- [136] R. Wing, H. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Nature* **1980**, *287*, 755–758.
- [137] R. Galindo-Murillo, J. C. Robertson, M. Zgarbová, J. Šponer, M. Otyepka, P. Jurečka, T. E. Cheatham, *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12*, 4114–4127.
- [138] M. Zgarbová, J. Šponer, M. Otyepka, T. E. Cheatham, R. Galindo-Murillo, P. Jurečka, *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 5723–5736.
- [139] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. Van Gunsteren, A. Dinola, J. R. Haak, *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684–3690.
- [140] E. Espinosa, E. Molins, C. Lecomte, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *285*, 170–173.
- [141] C. J. Cramer, *Essentials of Computational Chemistry. Theories and Models*, John Wiley & Sons Ltd, NJ, USA, **2004**.
- [142] G. Cuevas, F. Cortés-Guzmán, *Introducción a La Química Computacional*, Fondo De Cultura Económica, Ciudad de México, México, **2003**.
- [143] X. Fradera, M. A. Austen, R. F. W. Bader, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 304–314.
- [144] C. F. Matta, *Comput. Theor. Chem.* **2018**, *1124*, 1–14.
- [145] Y. G. Wang, N. H. Werstiuk, *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 379–385.
- [146] Y. G. Wang, C. Matta, N. H. Werstiuk, *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 1720–1729.
- [147] R. F. W. Bader, A. Larouche, C. Gatti, M. T. Carroll, P. J. MacDougall, K. B. Wiberg, *J. Chem. Phys.* **1987**, *87*, 1142–1152.

8. Anexos

I. Resultados de la Interacción de compuestos de cobre(II) tetraédricos con ADN

A continuación se presentan los detalles de los compuestos de cobre(II) basados en tinidazol que interactúan con el ADN. Para cada complejo primero se describen las geometrías completas y de corte; posteriormente se hace una descripción completa del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre(II), en forma de tabla, gráfica atómica, contornos e isosuperficies.

a) Complejo 1: $[\text{Cu}(\text{tnz})_2\text{Br}_2]$

1. Geometría 1: cobre coordinado a dos fosfatos y un ligante tnz orientado hacia arriba.

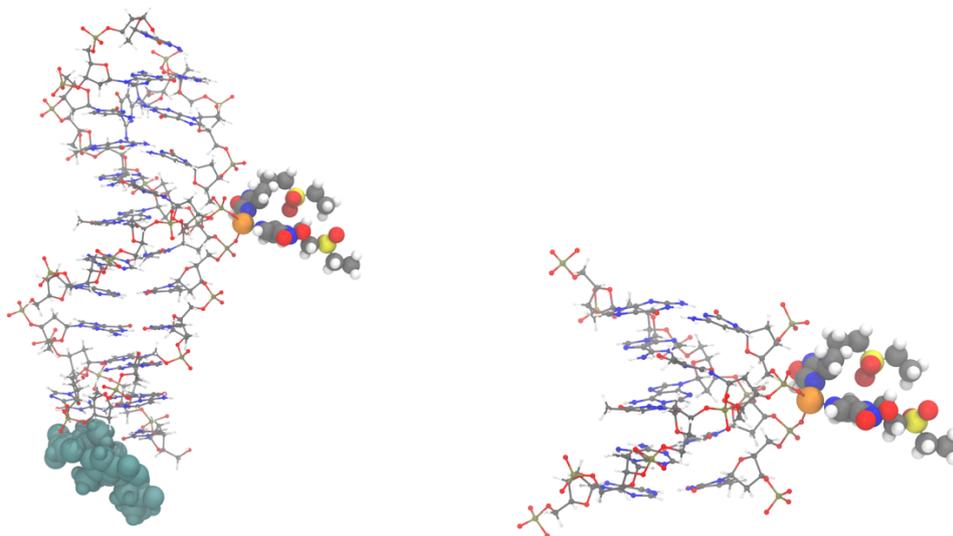


Figura A 1. Geometría total y corte 1 del Complejo 1.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15643.18118	-1.41E+09
2	(3,-1)	0.54129	5.302936	-28.13502
4	(3,-1)	0.54648	5.112586	-19.25602
5	(3,-1)	0.53801	5.462694	-34.40685
6	(3,+3)	0.511861	6.819522	-113.9751
8	(3,+1)	0.519551	6.548218	-82.08534
9	(3,-1)	0.543395	5.255014	-24.07614
10	(3,+1)	0.517236	6.714782	-90.31599
11	(3,+1)	0.516794	6.764568	-91.6685

12	(3,+1)	0.516543	6.741483	-93.1346
13	(3,+1)	0.520504	6.475716	-79.10925
14	(3,+3)	0.511681	6.793297	-115.1359
15	(3,+3)	0.512178	6.760145	-112.9869
16	(3,+1)	0.517243	6.692029	-90.65258
17	(3,+3)	0.510858	6.850409	-119.1351

Tabla A 1. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 1 del Complejo 1.

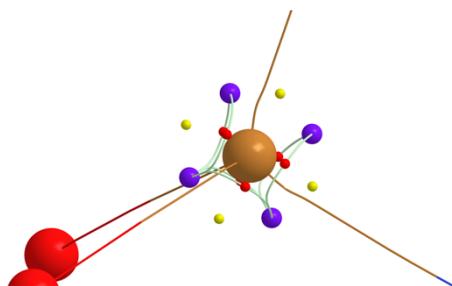


Figura A 2. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 1 del Complejo 1. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

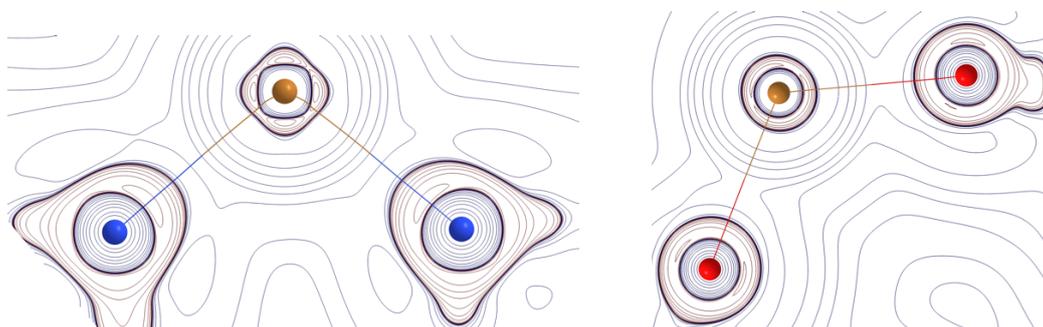


Figura A 3. Contornos del Laplaciano de la Densidad Electrónica para los enlaces N1-Cu-N2 y O1-Cu-O2 en la geometría 1 del Complejo 1.

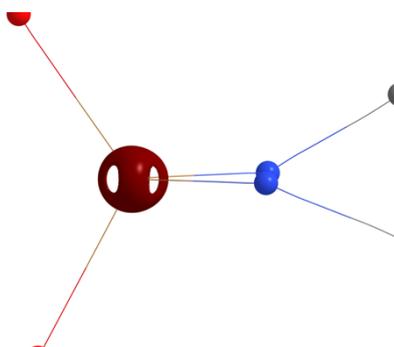


Figura A 4. Isosuperficie del Laplaciano de la Densidad Electrónica para el cobre en la geometría 1 del Complejo 1. Isovalor= -50 u.a.

2. Geometría 2: Cobre coordinado a dos fosfatos y con el segundo tinidazol orientado hacia abajo.

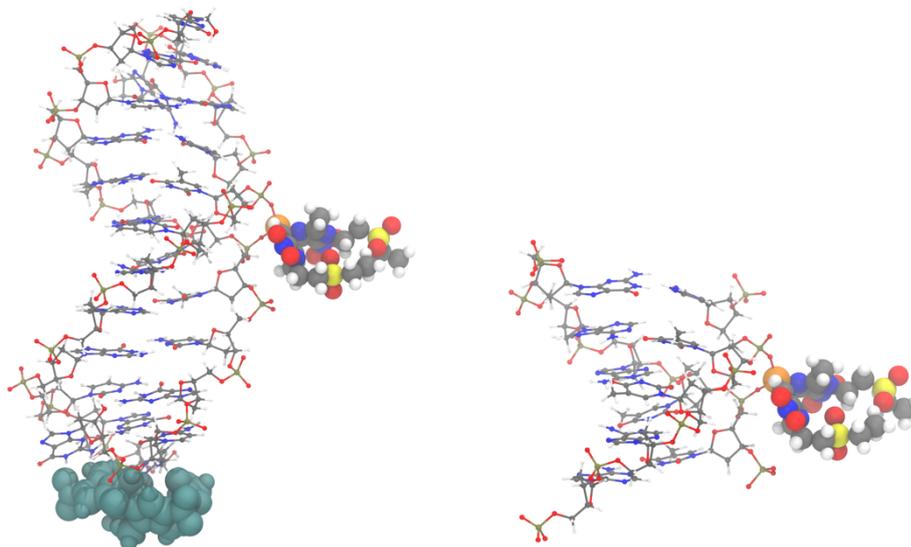


Figura A 5. Geometría total y corte 2 del Complejo 1.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15643.12379	-1.407E+09
2	(3,-1)	0.552157	4.871565	-11.307485
3	(3,-1)	0.548011	4.994204	-17.228726
4	(3,-1)	0.528175	6.028516	-56.531258
5	(3,-1)	0.533227	5.775004	-43.797481
6	(3,+1)	0.515343	6.714923	-98.829066
7	(3,+1)	0.521495	6.474918	-75.637907
8	(3,+1)	0.520264	6.523048	-79.742862
9	(3,+3)	0.511238	6.927329	-115.75386
10	(3,+1)	0.516286	6.646956	-95.674538
11	(3,+3)	0.512324	6.794176	-112.23592
12	(3,+1)	0.516717	6.601274	-94.026505
13	(3,+1)	0.517446	6.540881	-91.186006
14	(3,+3)	0.513687	6.757905	-106.25231
15	(3,+1)	0.514031	6.678485	-104.98701
16	(3,+3)	0.511278	6.885116	-116.00139

20	(3,+3)	0.513583	6.742891	-106.48951
----	--------	----------	----------	------------

Tabla A 2. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 2 del Complejo 1.

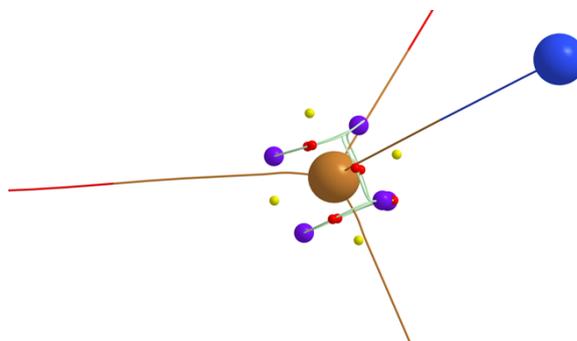


Figura A 6. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 2 del Complejo 1. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

3. Geometría 3: Cobre coordinado a dos fosfatos y ligantes tinidazol extendidos desde el centro.

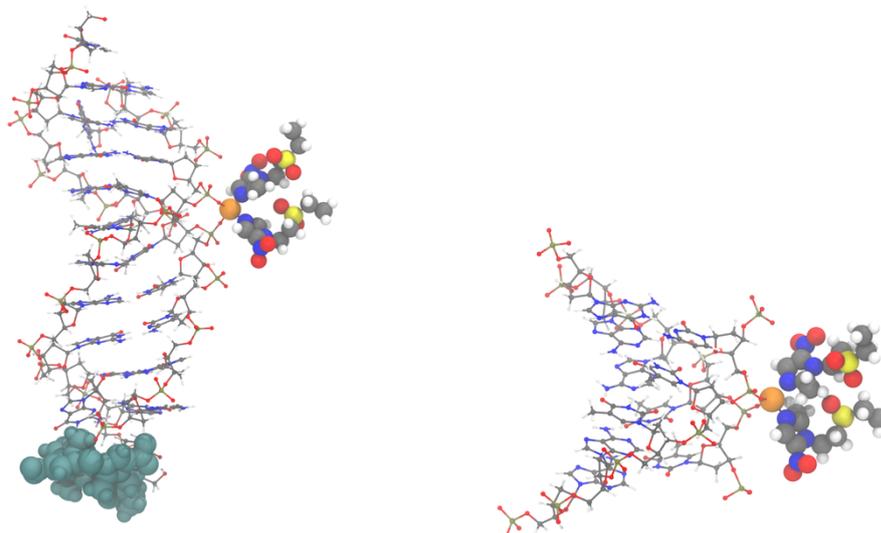


Figura A 7. Geometría total y corte 3 del Complejo 1.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15643.2767	-1.407E+09
2	(3,-1)	0.520583	6.546027	-78.738984
3	(3,+1)	0.520666	6.54034	-78.350703
4	(3,-1)	0.54428	5.197315	-22.684583
5	(3,-1)	0.544668	5.176894	-22.255689
6	(3,-1)	0.539452	5.42413	-31.3643
7	(3,+3)	0.511375	6.832749	-116.60159
8	(3,-1)	0.53829	5.484596	-33.665911

9	(3,+1)	0.520452	6.51115	-79.517528
10	(3,+1)	0.516787	6.693381	-92.595219
11	(3,+3)	0.511919	6.793807	-114.00131
12	(3,+3)	0.511597	6.81876	-115.28694
13	(3,+3)	0.510805	6.883722	-118.90145
15	(3,+1)	0.519576	6.541611	-82.551486
17	(3,+1)	0.518124	6.655778	-87.129574
21	(3,+1)	0.519008	6.581372	-84.334092

Tabla A 3. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 3 del Complejo 1.

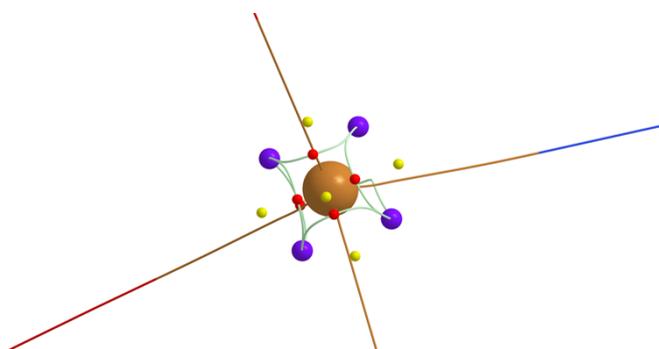


Figura A 8. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 3 del Complejo 1. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

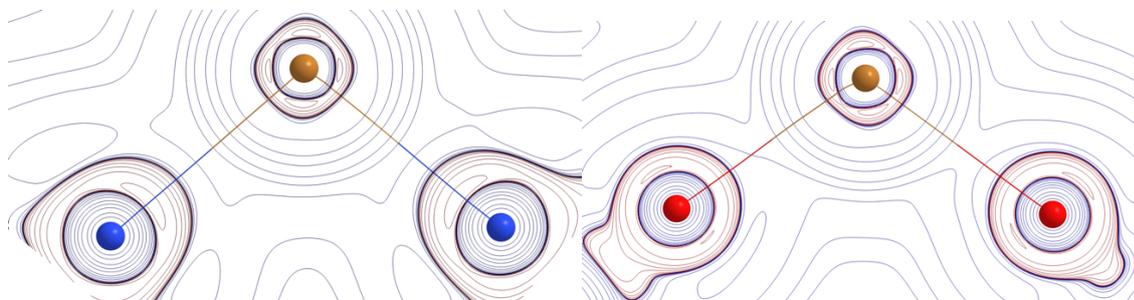


Figura A 9. Contornos del Laplaciano de la Densidad Electrónica para los enlaces N1-Cu-N2 y O1-Cu-O2 en la geometría 3 del Complejo 1.

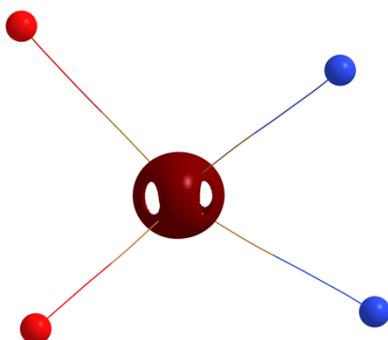


Figura A 10. Isosuperficie del Laplaciano de la Densidad Electrónica para el cobre en la geometría 3 del Complejo 1. Isovalor= -50 u.a.

4. Geometría 4: Cobre coordinado a un fosfato y ligantes centrados.

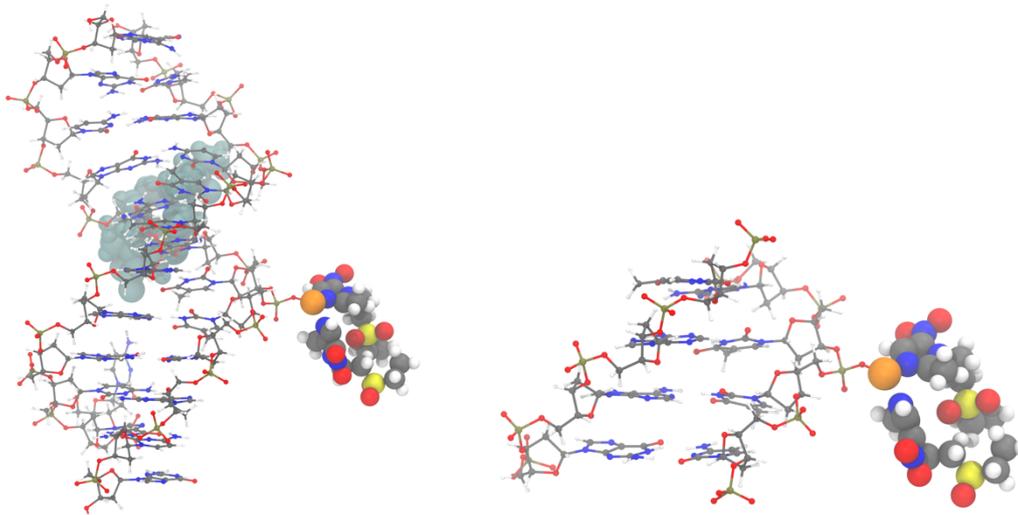


Figura A 11. Geometría total y corte 4 del Complejo 1.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15641.0825	-1.407E+09
2	(3,+1)	0.522151	6.261571	-76.121781
3	(3,+1)	0.521884	6.29713	-76.901033
4	(3,+1)	0.520317	6.452888	-81.428079
5	(3,+1)	0.520073	6.495309	-82.089483
6	(3,+3)	0.517596	6.588878	-91.011277
7	(3,+3)	0.519025	6.541304	-85.393803
8	(3,-1)	0.525787	6.075008	-64.571568
9	(3,+3)	0.518175	6.575602	-88.886941
10	(3,+3)	0.517949	6.59149	-89.528892
11	(3,+3)	0.521628	6.288617	-78.654091
12	(3,-1)	0.525649	6.094385	-64.831266
13	(3,-1)	0.523897	6.237031	-70.176305
15	(3,+1)	0.523196	6.265397	-72.72982
17	(3,+1)	0.524268	6.154129	-70.239435

Tabla A 4. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 4 del Complejo 1.

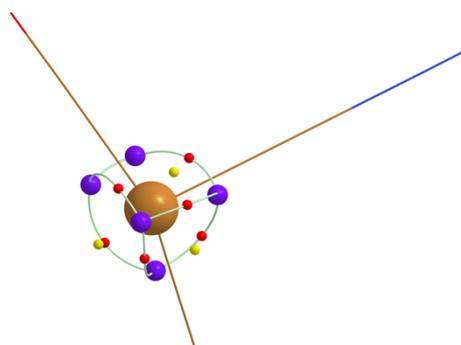


Figura A 12. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 4 del Complejo 1. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

5. Geometría 5: Complejo intercalado.

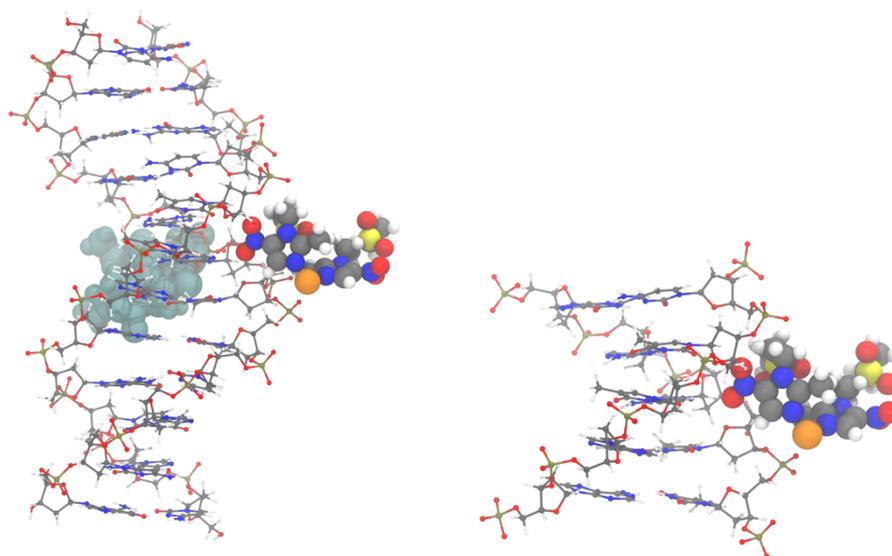


Figura A 13. Geometría total y corte 5 del Complejo 1.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15643.2489	-1.407E+09
2	(3,-1)	0.534094	5.695161	-42.213171
3	(3,-1)	0.546847	5.081692	-18.972116
4	(3,-1)	0.543915	5.19364	-23.403642
5	(3,+1)	0.515922	6.766753	-95.56237
6	(3,-1)	0.537839	5.508813	-34.487961
7	(3,+3)	0.510958	6.886664	-118.14859
8	(3,+1)	0.518925	6.503881	-86.065665
9	(3,+1)	0.517861	6.631079	-88.677133
10	(3,+1)	0.519541	6.610903	-81.746574
11	(3,+1)	0.521599	6.421618	-76.090649

12	(3,+3)	0.51203	6.806443	-113.25108
13	(3,+3)	0.511863	6.803888	-114.15906

Tabla A 5. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 5 del Complejo 1.

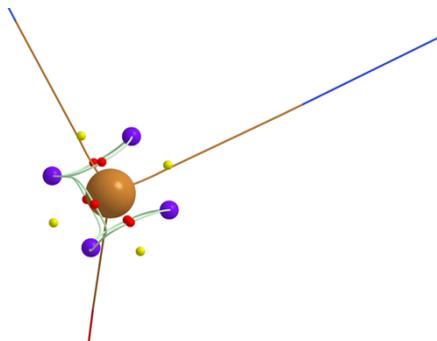


Figura A 14. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 5 del Complejo 1. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

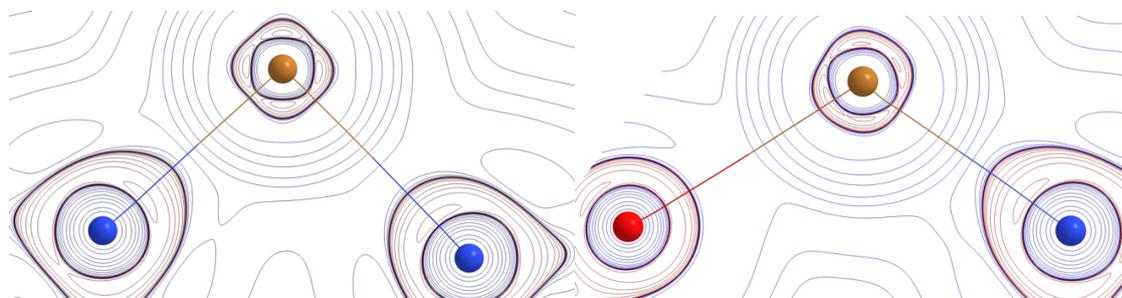


Figura A 15. Contornos del Laplaciano de la Densidad Electrónica para los enlaces N1-Cu-N2 y N1-Cu-O1 en la geometría 5 del Complejo 1.

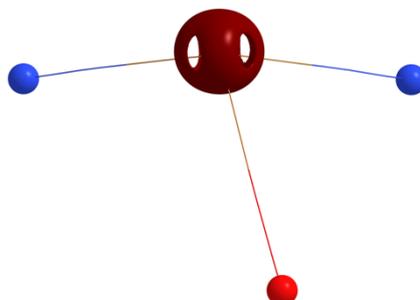


Figura A 16. Isosuperficie del Laplaciano de la Densidad Electrónica para el cobre en la geometría 5 del Complejo 1. Isovalor= -50 u.a.

6. Geometría 6: Cobre coordinado a un fosfato y el primer ligante tinidazol orientado hacia arriba.

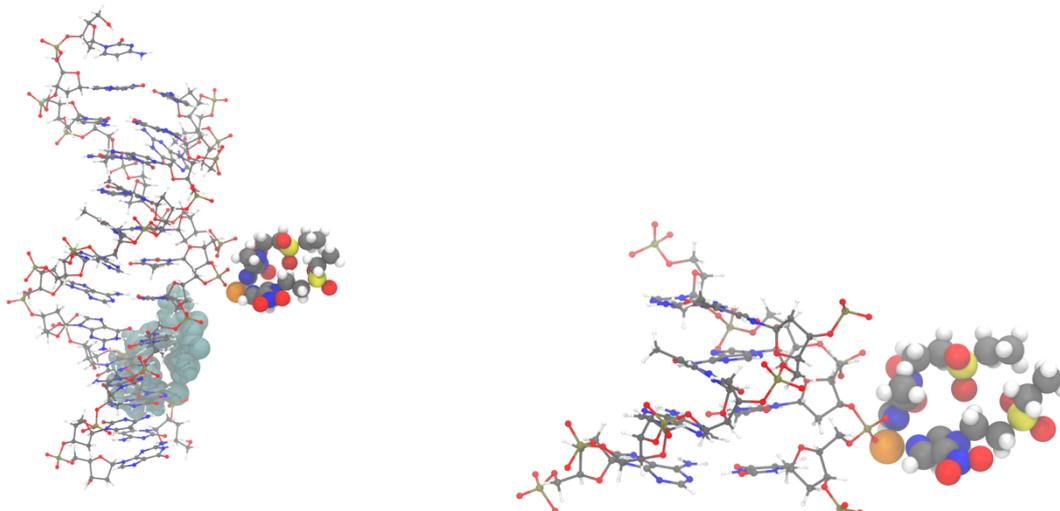


Figura A 17. Geometría total y corte 6 del Complejo 1.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15640.7672	-1.407E+09
3	(3,+3)	0.518375	6.565251	-88.174991
4	(3,-1)	0.526758	6.028823	-61.925236
5	(3,+1)	0.52229	6.263101	-75.567446
6	(3,-1)	0.526109	6.058075	-63.653933
7	(3,+3)	0.517852	6.595432	-90.009514
8	(3,-1)	0.52232	6.343568	-74.744884
9	(3,-1)	0.525417	6.107986	-65.344593
10	(3,+1)	0.521967	6.345754	-76.269421
11	(3,+3)	0.517649	6.606802	-90.78017
12	(3,-1)	0.522241	6.342365	-75.224771
13	(3,+1)	0.520103	6.467273	-82.198862
14	(3,+1)	0.523367	6.207434	-72.877324
15	(3,+3)	0.521029	6.309224	-80.705159
16	(3,+1)	0.52261	6.230946	-74.884996
17	(3,+1)	0.51999	6.480442	-82.537794
18	(3,+1)	0.521762	6.361596	-76.631314

Tabla A 6. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 6 del Complejo 1.

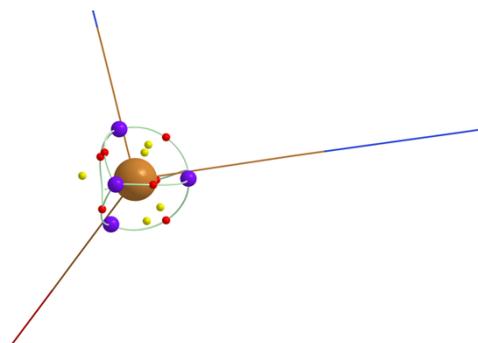


Figura A 18. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 6 del Complejo 1. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

7. Geometría 7: Cobre coordinado a un fosfato y el segundo tinidazol orientado hacia abajo.

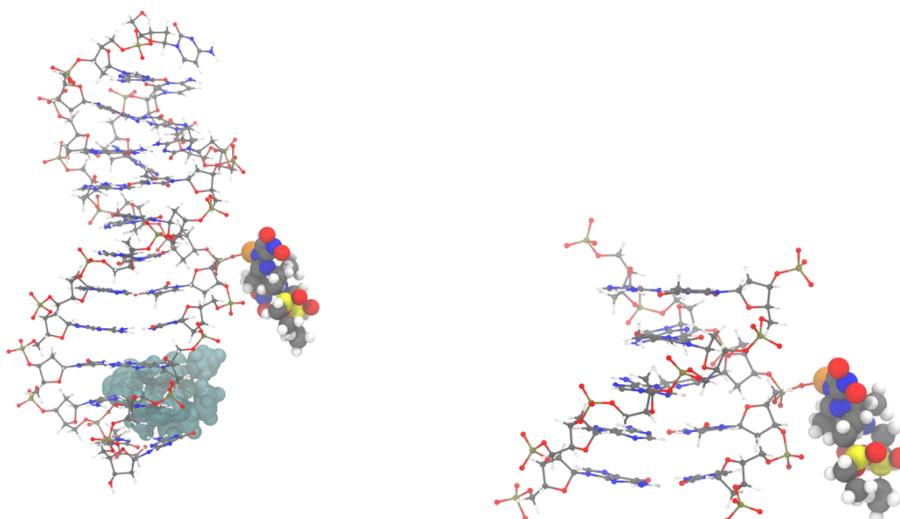


Figura A 19. Geometría total y corte 7 del Complejo 1.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15643.3929	-1.407E+09
2	(3,+1)	0.518738	6.587964	-85.566566
19	(3,+3)	0.511355	6.854881	-116.22307
20	(3,+1)	0.519317	6.610421	-82.546025
21	(3,-1)	0.535343	5.621629	-39.764024
22	(3,+3)	0.510828	6.908147	-117.96347
23	(3,-1)	0.546085	5.1191	-20.070427
24	(3,-1)	0.542911	5.241189	-25.07805
25	(3,+1)	0.519184	6.501427	-85.078506
26	(3,-1)	0.537399	5.532863	-35.281649
27	(3,+1)	0.521272	6.448502	-77.151173

28	(3,+3)	0.511591	6.823266	-115.23324
29	(3,+1)	0.518752	6.525468	-86.163309
30	(3,-1)	0.520851	6.541457	-77.2174
31	(3,+1)	0.517556	6.66427	-89.792724
32	(3,+3)	0.511132	6.868028	-117.39687
33	(3,+1)	0.520884	6.515485	-77.388953

Tabla A 7. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 7 del Complejo 1.

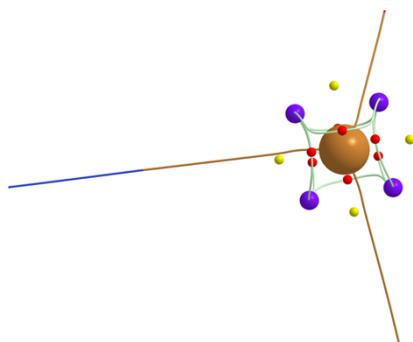


Figura A 20. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 7 del Complejo 1. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

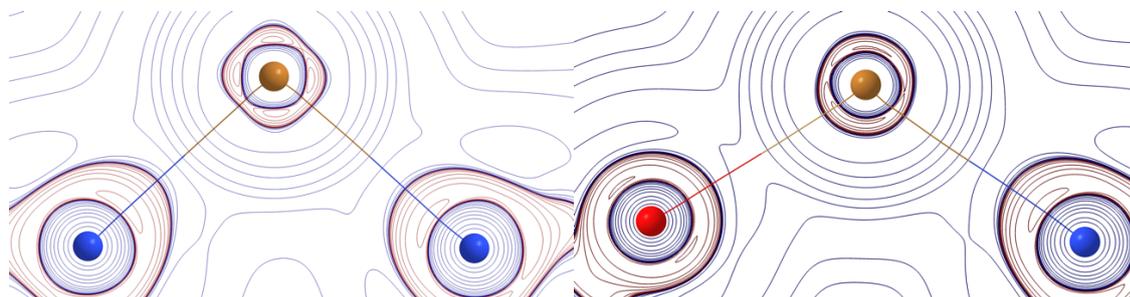


Figura A 21. Contornos del Laplaciano de la Densidad Electrónica para los enlaces N1-Cu-N2 y N1-Cu-O1 en la geometría 7 del Complejo 1.

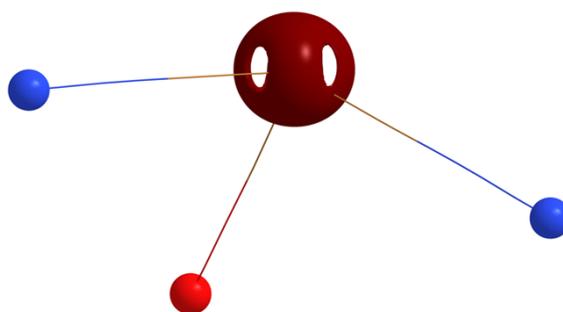


Figura A 22. Isosuperficie del Laplaciano de la Densidad Electrónica para el cobre en la geometría 7 del Complejo 1. Isovalor = -50 u.a.

8. Geometría 8: Ambos complejos interactúan con el ADN de manera cercana, uno de ellos interactúa con un fosfato y se intercala, y el otro se coordina a un fosfato y el primer ligante tinidazol se orienta hacia arriba.

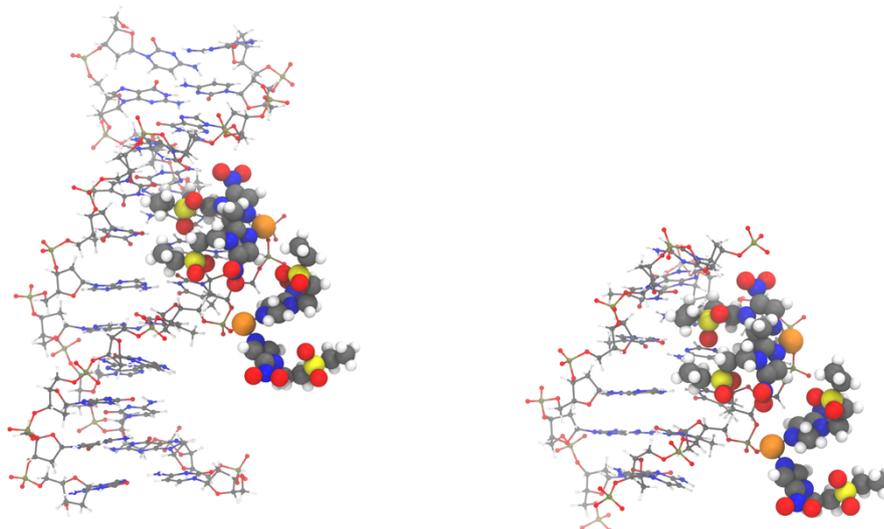


Figura A 23. Geometría total y corte 8 del Complejo 1.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15641.6966	-1.407E+09
3	(3,+1)	0.522372	6.255686	-75.874067
5	(3,+3)	0.518158	6.57385	-88.620198
6	(3,+1)	0.520479	6.440664	-81.071321
7	(3,+3)	0.516751	6.647881	-93.852389
8	(3,+3)	0.516546	6.665759	-94.564962
9	(3,+1)	0.523187	6.210041	-73.387392
10	(3,+1)	0.521521	6.381997	-77.520739
11	(3,-1)	0.524942	6.139132	-66.807408
12	(3,-1)	0.523556	6.267719	-70.743528
13	(3,-1)	0.52505	6.134681	-66.579612
14	(3,+1)	0.521591	6.38647	-77.450529
15	(3,-1)	0.526346	6.054409	-62.742691

Tabla A 8. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre (en el residuo 25) de la geometría 8 del Complejo 1.

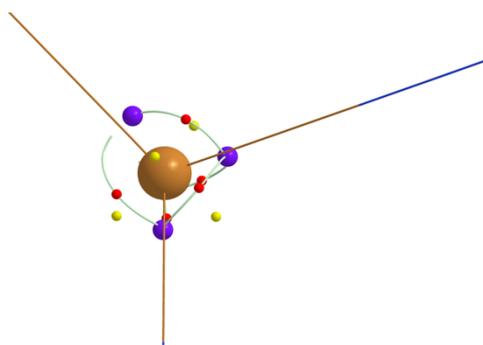


Figura A 24. Gráfica atómica del átomo de cobre (en el residuo 25) en la geometría 8 del Complejo 1. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15641.4103	-1.407E+09
3	(3,+1)	0.52279	6.206959	-74.866146
4	(3,+1)	0.522196	6.244925	-76.399614
5	(3,+1)	0.518967	6.542173	-85.688894
6	(3,+3)	0.517563	6.612136	-90.985286
8	(3,+1)	0.523063	6.203702	-73.91871
9	(3,-1)	0.522465	6.331872	-74.28572
10	(3,+3)	0.518995	6.536096	-85.84308
11	(3,+3)	0.517319	6.614535	-92.144909
12	(3,-1)	0.526871	6.016812	-61.339095
13	(3,+1)	0.520132	6.475479	-82.097219
14	(3,+3)	0.518041	6.586963	-89.252041
15	(3,+1)	0.519921	6.473407	-82.845821
16	(3,+3)	0.522183	6.237414	-77.123863
22	(3,-1)	0.826799	2.076205	12.195748

Tabla A 9. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre (en el residuo 26) de la geometría 8 del Complejo 1.

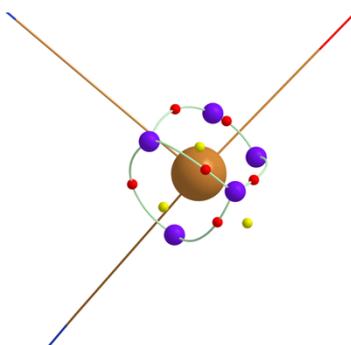


Figura A 25. Gráfica atómica del átomo de cobre (en el residuo 26) en la geometría 8 del Complejo 1. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

b) Complejo 2: [Cu(tnz)₂Cl₂] producto cinético

1. Geometría 1: Cobre coordinado a un fosfato, el primer ligante tinidazole intercalado en la parte superior y el segundo ligante tinidazol adopta una conformación cerrada.

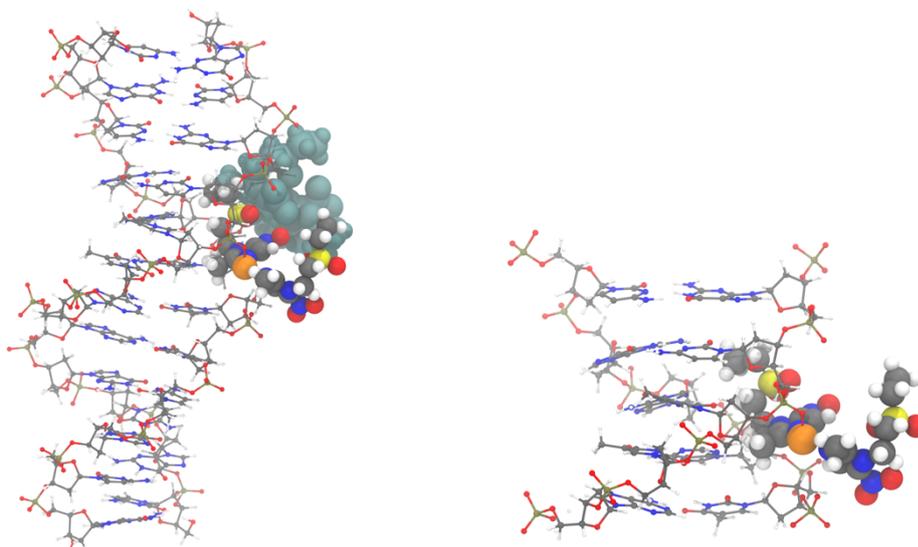


Figura A 26. Geometría total y corte 1 del Complejo 2.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15643.4956	-1.407E+09
3	(3,-1)	0.538612	5.468218	-32.917883
4	(3,+3)	0.511508	6.838762	-115.54537
5	(3,+1)	0.519359	6.507021	-84.345374
6	(3,-1)	0.535975	5.587656	-38.311229
7	(3,-1)	0.54253	5.262168	-25.749109
8	(3,+3)	0.510829	6.888993	-118.71654
9	(3,-1)	0.545302	5.152062	-21.355101

10	(3,+1)	0.51915	6.570505	-84.112198
11	(3,+1)	0.520809	6.476567	-78.689438
12	(3,+1)	0.520906	6.50387	-77.583337
13	(3,+3)	0.511026	6.894246	-117.08217
14	(3,+1)	0.518839	6.631707	-84.226064
15	(3,+1)	0.518898	6.533328	-85.37917
16	(3,+1)	0.517936	6.644352	-88.399803
17	(3,+3)	0.511579	6.820659	-115.372
18	(3,-1)	0.52093	6.53931	-77.056765

Tabla A 10. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 1 del Complejo 2.

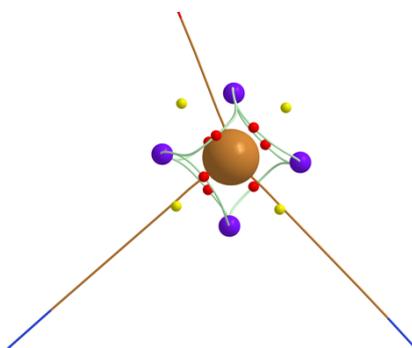


Figura A 27. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 1 del Complejo 2. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

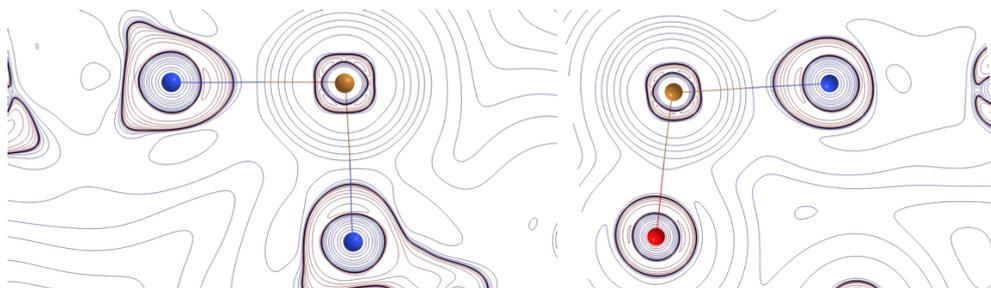


Figura A 28. Contornos del Laplaciano de la Densidad Electrónica para los enlaces N1-Cu-N2 y N1-Cu-O1 en la geometría 1 del Complejo 2.

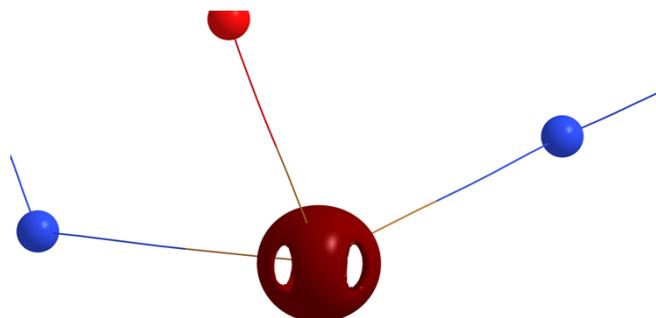


Figura A 29. Isosuperficie del Laplaciano de la Densidad Electrónica para el cobre en la geometría 1 del Complejo 2. Isovalor= -50 u.a.

2. Geometría 2: Cobre coordinado a un fosfato, el primer ligante tinidazole se intercala en la parte superior y el segundo ligante tinidazol adopta una conformación semi-cerrada.

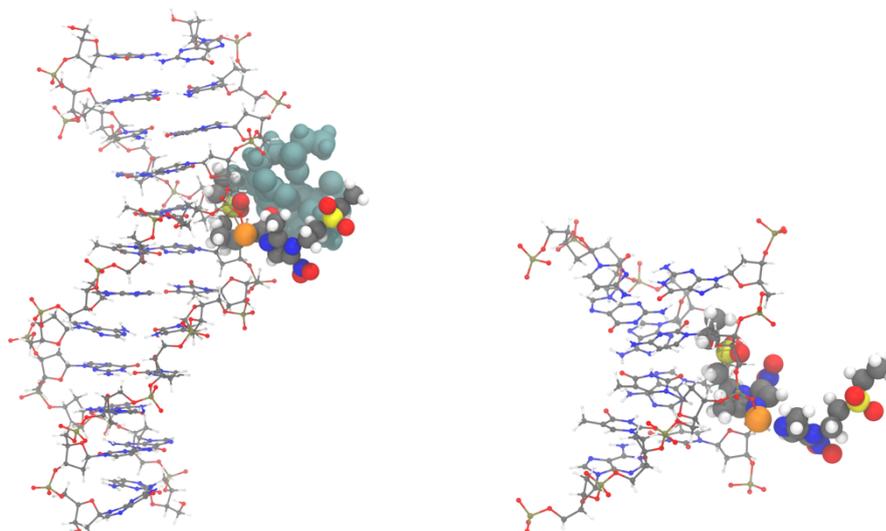


Figura A 30. Geometría total y corte 2 del Complejo 2.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15643.393	-1.407E+09
2	(3,-1)	0.542157	5.287999	-26.283948
3	(3,-1)	0.544537	5.185506	-22.673972
4	(3,-1)	0.537946	5.494967	-34.366427
5	(3,+1)	0.520025	6.541501	-80.568164
6	(3,-1)	0.537366	5.529256	-35.235284
7	(3,+3)	0.51088	6.892291	-118.33886
8	(3,+1)	0.519508	6.500255	-83.867161
10	(3,+3)	0.511371	6.852682	-116.20881
11	(3,+1)	0.518931	6.544349	-85.472238
12	(3,+1)	0.519245	6.560677	-83.915775
13	(3,+1)	0.519998	6.529548	-80.887071
14	(3,+3)	0.5122	6.777379	-112.76659
16	(3,+1)	0.521001	6.470005	-77.925135
17	(3,+3)	0.510781	6.897046	-118.28798

Tabla A 11. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 2 del Complejo 2.

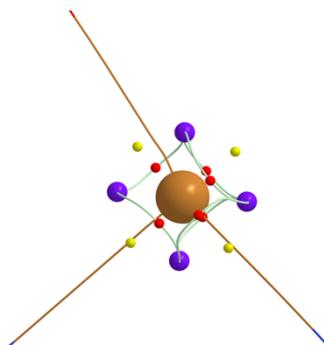


Figura A 31. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 2 del Complejo 2. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

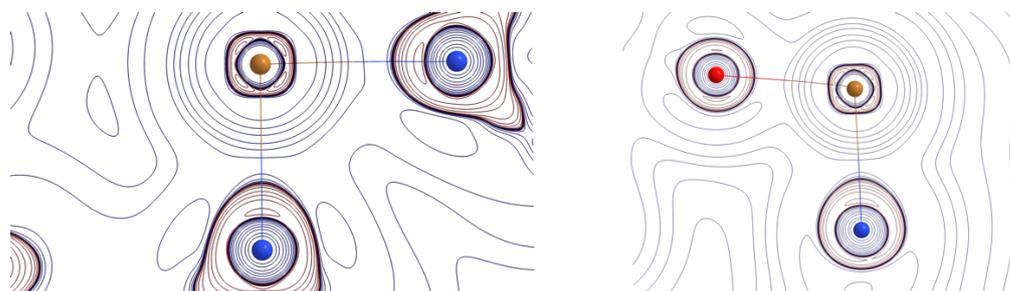


Figura A 32. Contornos del Laplaciano de la Densidad Electrónica para los enlaces N1-Cu-N2 y N1-Cu-O1 en la geometría 2 del Complejo 2.

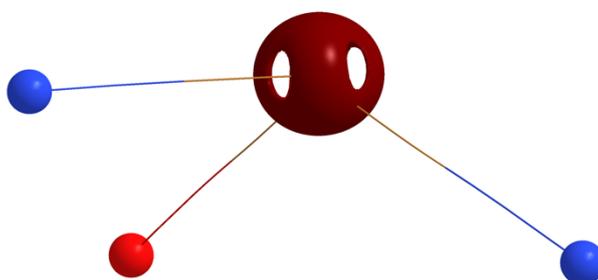


Figura A 33. Isosuperficie del Laplaciano de la Densidad Electrónica para el cobre en la geometría 2 del Complejo 2. Isovalor= -50 u.a.

3. Geometría 3: Cobre coordinado a dos fosfatos, el primer ligante tinidazol intercalado en la parte superior y el segundo ligante tinidazol adopta una conformación abierta.

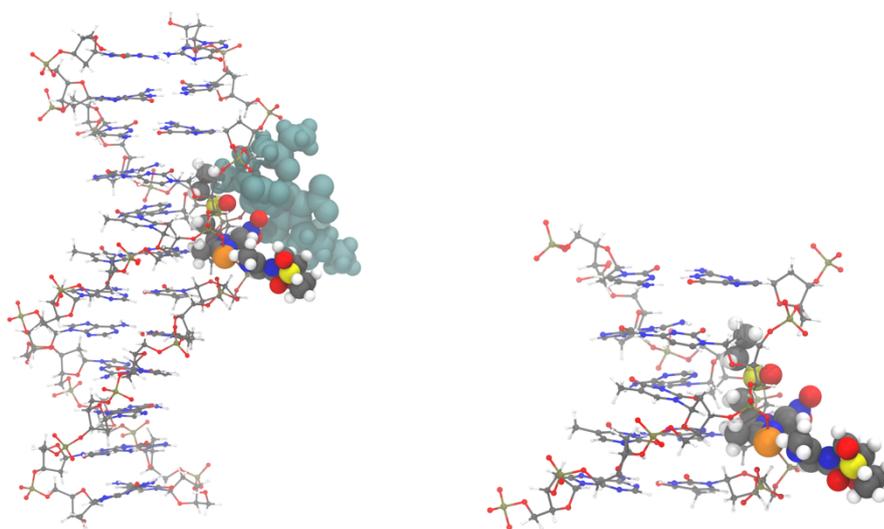


Figura A 34. Geometría total y corte 3 del Complejo 2.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15642.9104	-1.407E+09
15	(3,-1)	0.54959	4.967131	-14.528029
16	(3,-1)	0.548732	4.994854	-15.633015
17	(3,+1)	0.520057	6.563174	-80.029357
18	(3,+1)	0.515939	6.70008	-96.320838
19	(3,+1)	0.523858	6.312668	-68.594889
20	(3,-1)	0.530054	5.921216	-51.502132
21	(3,-1)	0.535005	5.664504	-40.116739
22	(3,+3)	0.511477	6.8666	-115.63494
23	(3,+3)	0.511616	6.850931	-114.85075
24	(3,+1)	0.516635	6.651993	-93.835521
25	(3,+1)	0.516238	6.643167	-95.716225
26	(3,+3)	0.511819	6.82158	-113.91978
27	(3,+1)	0.516274	6.646489	-95.265478
28	(3,+3)	0.512738	6.75675	-110.31984

Tabla A 12. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 3 del Complejo 2.

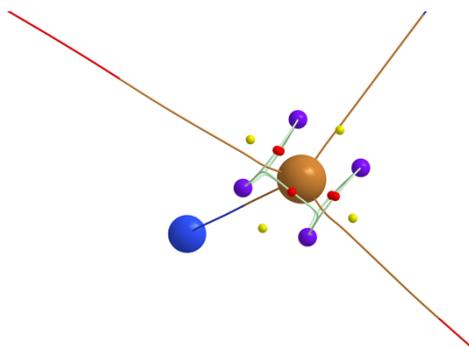


Figura A 35. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 3 del Complejo 2. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

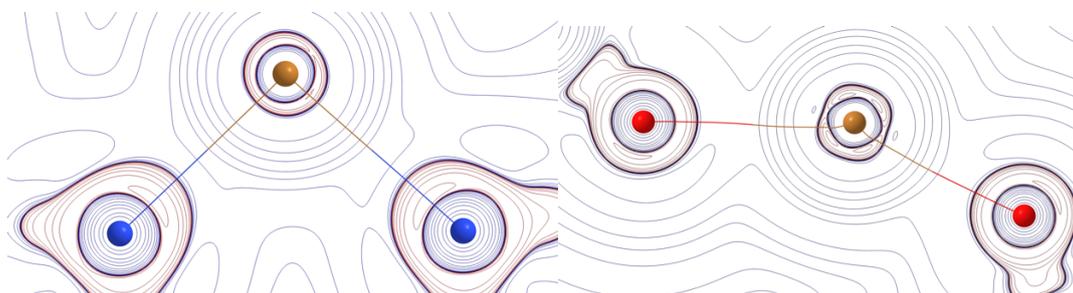


Figura A 36. Contornos del Laplaciano de la Densidad Electrónica para los enlaces N1-Cu-N2 y O1-Cu-O2 en la geometría 3 del Complejo 2.

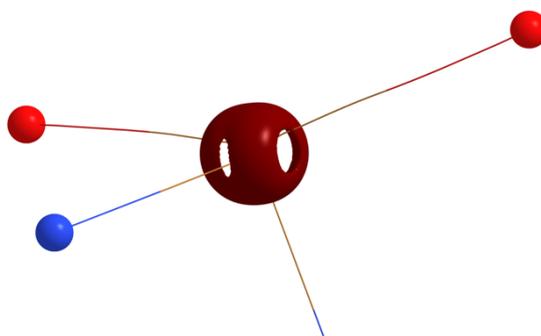


Figura A 37. Isosuperficie del Laplaciano de la Densidad Electrónica para el cobre en la geometría 3 del Complejo 2. Isovalor= -55 u.a.

4. Geometría 4: Cobre coordinado a un fosfato, el primer ligante tinidazol se intercala en la parte inferior y el segundo ligante tinidazol adopta una conformación cerrada.

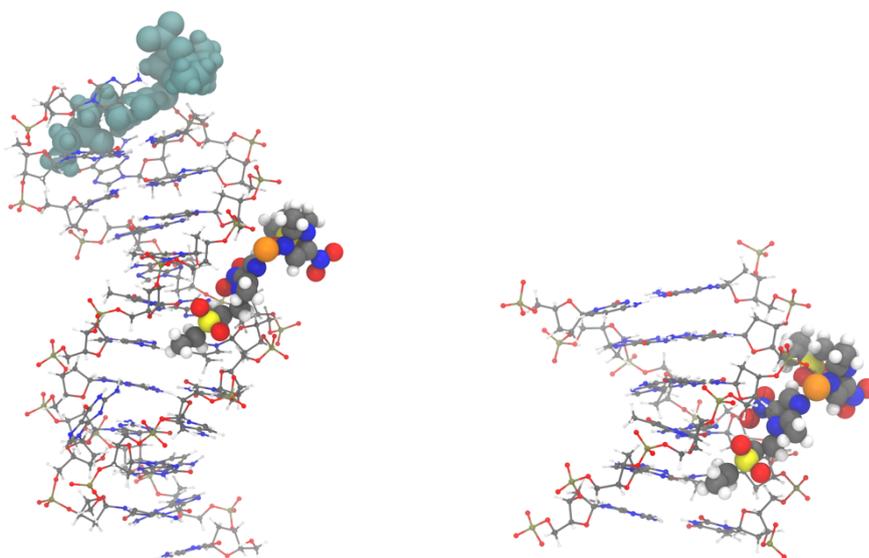


Figura A 38. Geometría total y corte 4 del Complejo 2.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15641.2973	-1.407E+09
3	(3,+1)	0.520119	6.456639	-82.330902
4	(3,+1)	0.524236	6.141634	-70.617376
5	(3,+3)	0.517445	6.6228	-91.254229
6	(3,+3)	0.518111	6.586221	-88.738163
7	(3,+1)	0.523279	6.19219	-73.574409
8	(3,-1)	0.524081	6.223482	-69.56037
9	(3,-1)	0.525506	6.097545	-65.254823
10	(3,+3)	0.517158	6.633433	-92.524675
11	(3,-1)	0.525427	6.10601	-65.344279
12	(3,+1)	0.521316	6.388532	-78.30653
13	(3,-1)	0.52527	6.118045	-65.692539

Tabla A 13. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 4 del Complejo 2.

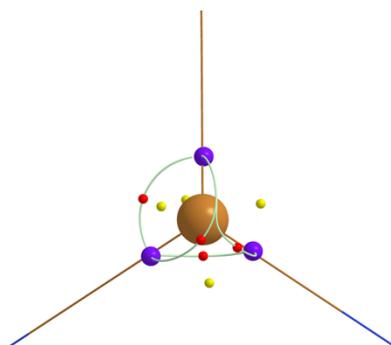


Figura A 39. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 4 del Complejo 2. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

5. Geometría 5: Cobre coordinado a un fosfato, el primer ligante tinidazol adopta una conformación abierta, y el segundo ligante tinidazol se intercala en la parte inferior.

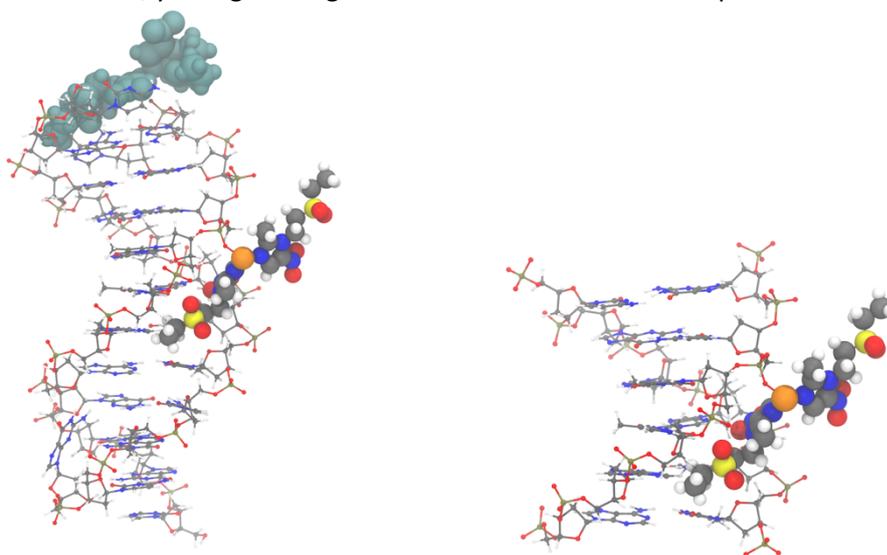


Figura A 40. Geometría total y corte 5 del Complejo 2.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15643.7517	-1.407E+09
15	(3,+3)	0.511164	6.868827	-116.93528
19	(3,-1)	0.538923	5.443643	-32.215325
20	(3,+1)	0.517679	6.675683	-88.794751
21	(3,-1)	0.540946	5.346964	-28.441027
22	(3,-1)	0.539101	5.419411	-31.948723
23	(3,-1)	0.541793	5.312253	-27.233346
24	(3,+1)	0.521048	6.430451	-77.666977
25	(3,+3)	0.511251	6.864184	-116.16645
26	(3,+1)	0.520589	6.450827	-80.010172

27	(3,+1)	0.520256	6.529669	-80.005113
28	(3,+3)	0.511315	6.830847	-116.41555
29	(3,+3)	0.510831	6.888389	-118.69771
30	(3,-1)	0.521474	6.446369	-76.253081
31	(3,-1)	0.521021	6.533468	-76.595591
32	(3,+1)	0.5197	6.555076	-81.922217
33	(3,+1)	0.519692	6.529327	-82.079381
34	(3,+1)	0.52031	6.467101	-80.546007
35	(3,+1)	0.520599	6.450942	-79.698149

Tabla A 14. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 5 del Complejo 2.

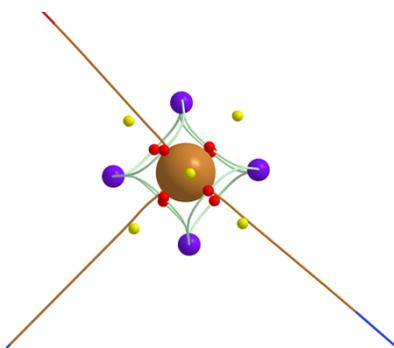


Figura A 41. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 5 del Complejo 2. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

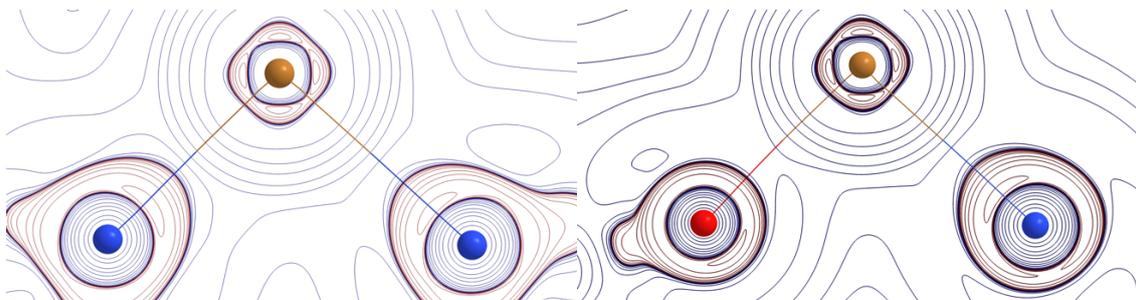


Figura A 42. Contornos del Laplaciano de la Densidad Electrónica para los enlaces N1-Cu-N2 y N1-Cu-O1 en la geometría 5 del Complejo 2.

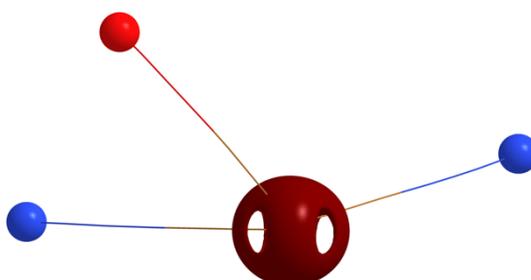


Figura A 43. Isosuperficie del Laplaciano de la Densidad Electrónica para el cobre en la geometría 5 del Complejo 2. Isovalor= -50 u.a.

c) **Complejo 3: [Cu(tnz)₂Cl₂] producto termodinámico**

1. Geometría 1: Cobre coordinado a un fosfato, primer ligante tinidazole intercalado en la parte superior, y segundo ligante tinidazol adopta una conformación cerrada.

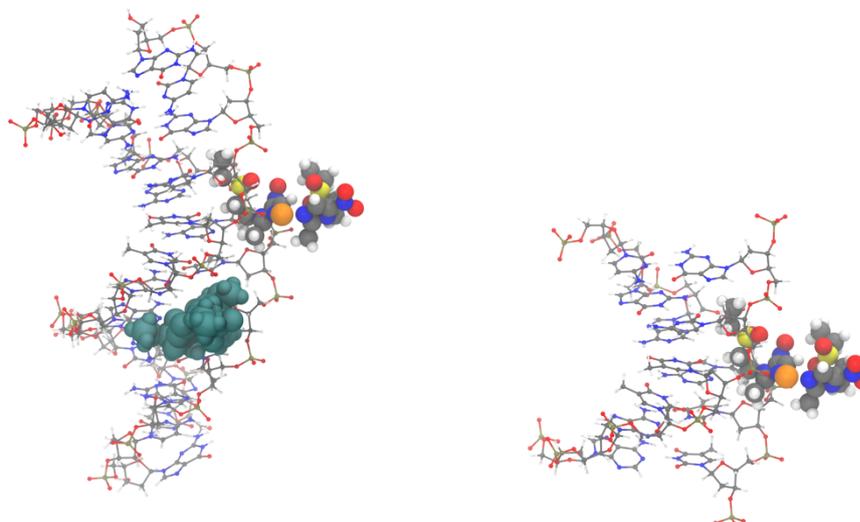


Figura A 44. Geometría total y corte 1 del Complejo 3.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15643.4363	-1.407E+09
10	(3,+1)	0.519487	6.512806	-83.413895
13	(3,+3)	0.511602	6.817124	-115.09082
19	(3,-1)	0.54235	5.289189	-25.638783
20	(3,-1)	0.541487	5.318385	-27.326481
21	(3,-1)	0.537588	5.509754	-34.744298
22	(3,+1)	0.521203	6.432902	-77.35772
23	(3,+1)	0.521528	6.421312	-76.508695
24	(3,+1)	0.521234	6.440055	-77.208426
25	(3,-1)	0.540727	5.372618	-28.879574
26	(3,+3)	0.511388	6.847076	-115.91628
27	(3,-1)	0.522854	6.397516	-71.422854
28	(3,+3)	0.511034	6.865277	-117.14645
29	(3,+3)	0.511717	6.820995	-114.60836
30	(3,+1)	0.521327	6.433804	-77.079943
31	(3,-1)	0.522709	6.410624	-71.770473

33	(3,+1)	0.519363	6.529212	-83.750269
35	(3,+1)	0.519812	6.491604	-82.356874
37	(3,+1)	0.519603	6.5032	-83.021522

Tabla A 15. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 1 del Complejo 3.

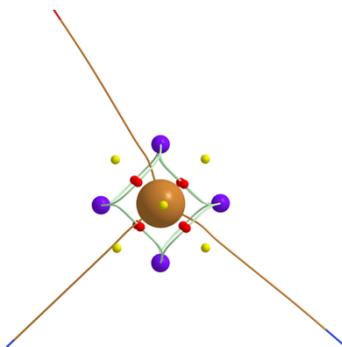


Figura A 45. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 1 del Complejo 3. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

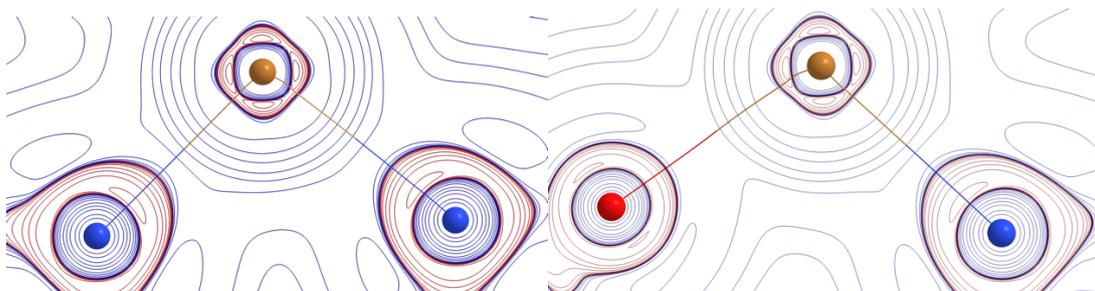


Figura A 46. Contornos del Laplaciano de la Densidad Electrónica para los enlaces N1-Cu-N2 y N1-Cu-O1 en la geometría 1 del Complejo 3.



Figura A 47. Isosuperficie del Laplaciano de la Densidad Electrónica para el cobre en la geometría 1 del Complejo 3. Isovalor = -50 u.a.

2. Geometría 2: Cobre coordinado a un fosfato, primer ligante tinidazol intercalado en la parte superior, y segundo ligante tinidazol adopta una conformación semi-cerrada.

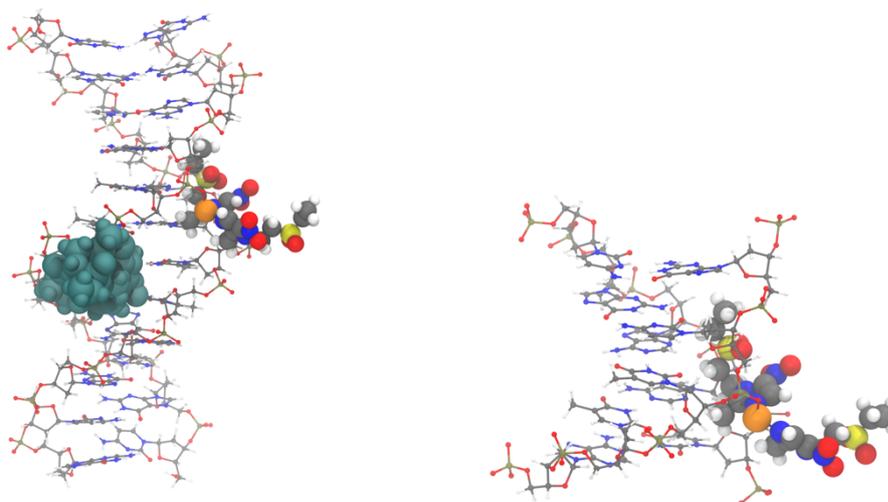


Figura A 48. Geometría total y corte 2 del Complejo 3.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15643.6661	-1.407E+09
5	(3,+1)	0.518257	6.657398	-86.886566
19	(3,-1)	0.541391	5.330465	-27.706398
20	(3,-1)	0.53968	5.397212	-31.010314
21	(3,-1)	0.539632	5.39231	-30.930516
22	(3,-1)	0.543034	5.264608	-24.763981
23	(3,+1)	0.519721	6.503553	-82.44656
24	(3,+3)	0.511272	6.842553	-116.85556
25	(3,+3)	0.511762	6.80425	-114.61572
26	(3,+3)	0.510363	6.928325	-120.04998
27	(3,+3)	0.511115	6.853569	-117.15472
28	(3,-1)	0.521149	6.478534	-77.255426
29	(3,+1)	0.520484	6.504539	-79.302374
30	(3,+1)	0.519887	6.541273	-81.289665
31	(3,+1)	0.520701	6.469907	-79.189268
32	(3,+1)	0.520253	6.478097	-81.028776
33	(3,-1)	0.52101	6.542273	-76.651848
34	(3,+1)	0.520846	6.45736	-78.30426

35	(3,+1)	0.518347	6.638582	-86.365137
----	--------	----------	----------	------------

Tabla A 16. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 2 del Complejo 3.

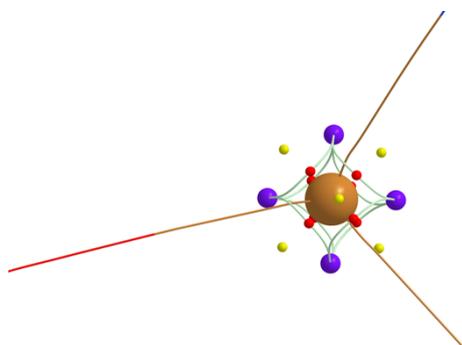


Figura A 49. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 2 del Complejo 3. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

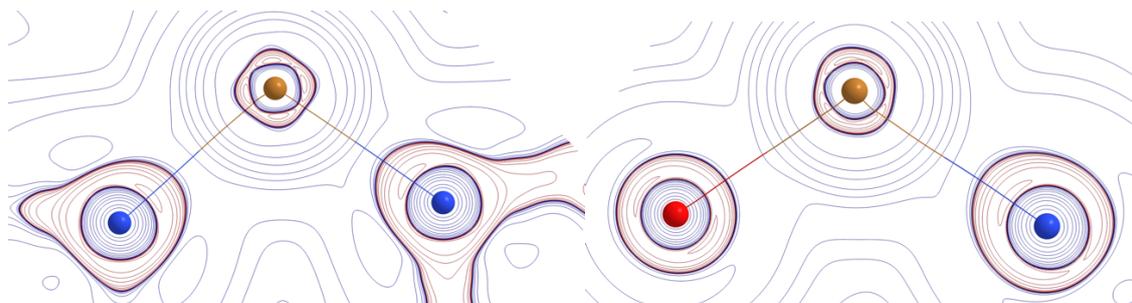


Figura A 50. Contornos del Laplaciano de la Densidad Electrónica para los enlaces N1-Cu-N2 y N1-Cu-O1 en la geometría 2 del Complejo 3.

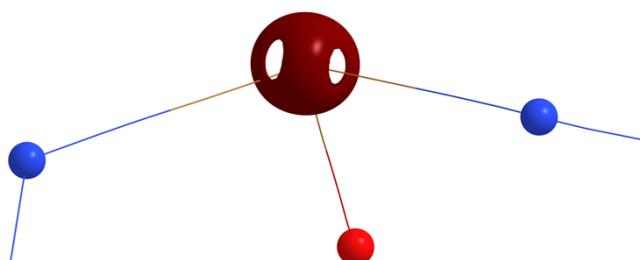


Figura A 51. Isosuperficie del Laplaciano de la Densidad Electrónica para el cobre en la geometría 2 del Complejo 3. Isovalor= -50 u.a.

3. Geometría 3: Cobre coordinado a un fosfato, primer ligante tinidazol intercalado en la parte superior, y segundo ligante tinidazol adopta una conformación abierta.

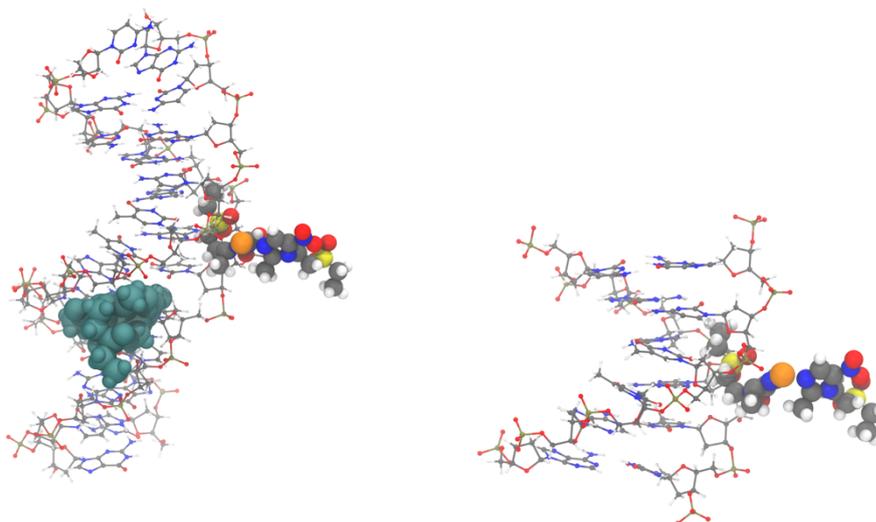


Figura A 52. Geometría total y corte 3 del Complejo 3.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15641.6657	-1.407E+09
4	(3,+3)	0.518104	6.526273	-89.653162
5	(3,+1)	0.524027	6.198239	-70.193978
6	(3,-1)	0.524973	6.159531	-65.64868
7	(3,-1)	0.525948	6.104416	-63.306793
8	(3,+3)	0.517989	6.525364	-89.969083
9	(3,-1)	0.527896	6.003425	-59.287308
10	(3,+1)	0.519825	6.509449	-82.572369
11	(3,+3)	0.517718	6.539967	-90.922332
12	(3,+3)	0.517558	6.573776	-91.389717
13	(3,+3)	0.518129	6.598776	-88.457226
14	(3,+1)	0.519926	6.484435	-82.311312
15	(3,-1)	0.52661	6.061372	-61.866382
16	(3,+1)	0.524381	6.17052	-69.357301
17	(3,+1)	0.520054	6.420211	-82.467743
18	(3,-1)	0.528112	5.986488	-58.828672
19	(3,+1)	0.519331	6.471509	-84.706638
20	(3,+1)	0.518776	6.489007	-86.806134

21	(3,+1)	0.519996	6.416995	-82.925187
----	--------	----------	----------	------------

Tabla A 17. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 3 del Complejo 3.

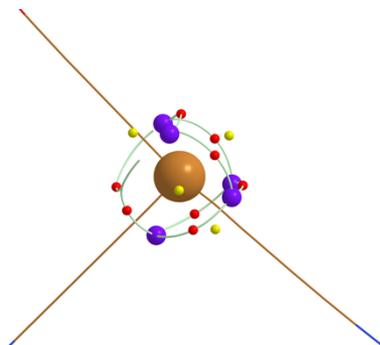


Figura A 53. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 3 del Complejo 3. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

4. Geometría 4: Cobre coordinado a un fosfato, el ligante tinidazol interacciona con el esqueleto en la parte superior.

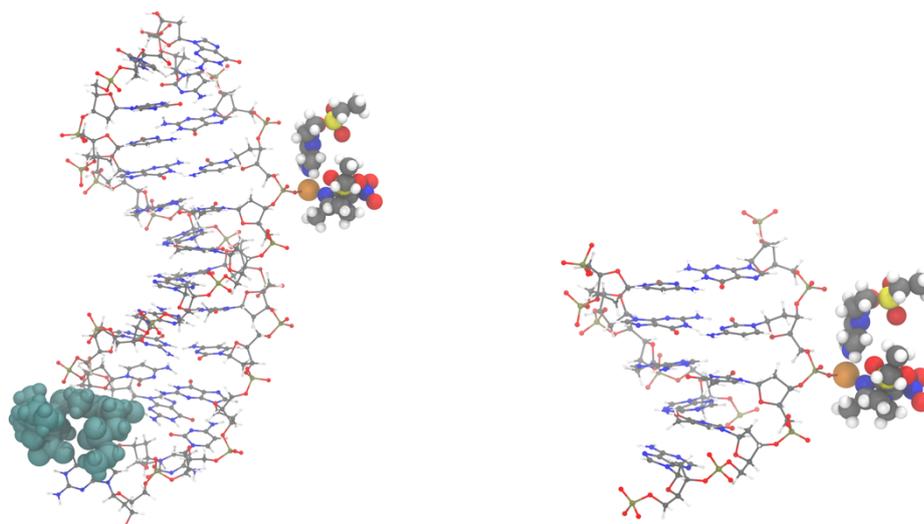


Figura A 54. Geometría total y corte 4 del Complejo 3.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15643.1347	-1.407E+09
15	(3,+1)	0.522327	6.38616	-73.617945
17	(3,-1)	0.550362	4.942114	-13.774212
18	(3,-1)	0.547516	5.03588	-17.704329
19	(3,-1)	0.53249	5.803206	-45.879691
21	(3,+1)	0.520467	6.549156	-78.49204
22	(3,+3)	0.512176	6.789461	-112.65115

23	(3,+3)	0.510592	6.923521	-118.99106
24	(3,-1)	0.535274	5.647875	-39.738826
25	(3,+1)	0.517395	6.579658	-91.222476
26	(3,+3)	0.511758	6.849448	-114.15003
27	(3,+3)	0.511206	6.873473	-116.90573
28	(3,+1)	0.516097	6.733285	-95.540056
29	(3,+1)	0.517924	6.540772	-89.799527
30	(3,+1)	0.517177	6.645764	-91.677838

Tabla A 18. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 4 del Complejo 3.

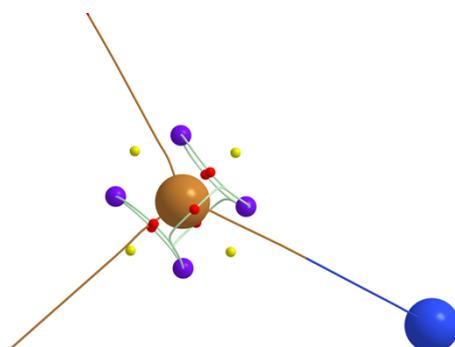


Figura A 55. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 4 del Complejo 3. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

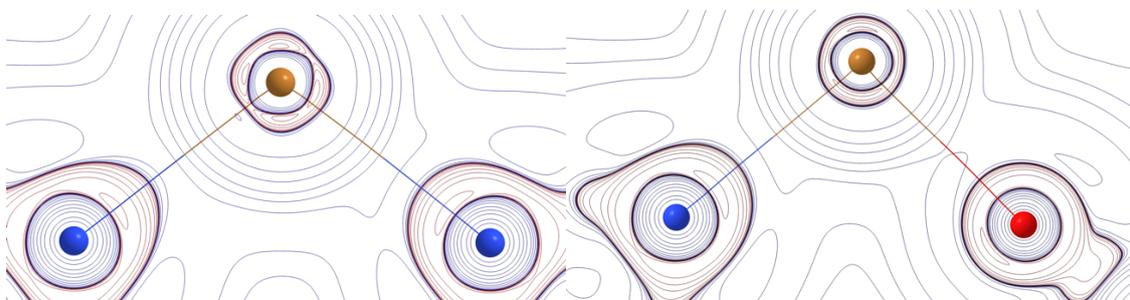


Figura A 56. Contornos del Laplaciano de la Densidad Electrónica para los enlaces N1-Cu-N2 y N1-Cu-O1 en la geometría 4 del Complejo 3.

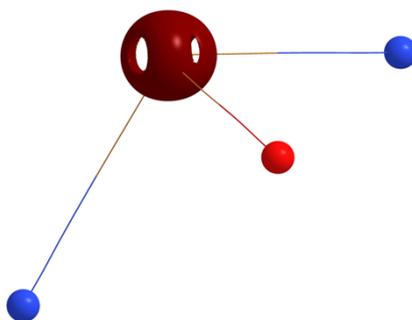


Figura A 57. Isosuperficie del Laplaciano de la Densidad Electrónica para el cobre en la geometría 4 del Complejo 3. Isovalor = -50 u.a.

5. Geometría 5: Cobre coordinado a un fosfato, el ligante tinidazole interacciona con el esqueleto en la parte inferior.

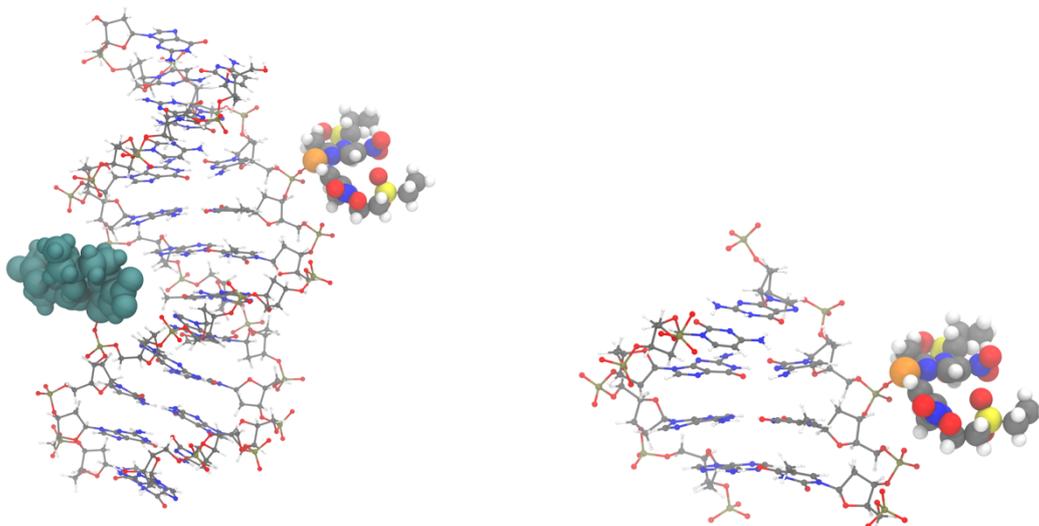


Figura A 58. Geometría total y corte 5 del Complejo 3.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DeISqRho
1	(3,+3)	0	15641.2304	-1.407E+09
17	(3,+3)	0.522342	6.240869	-76.560423
18	(3,+3)	0.517733	6.603952	-90.494728
19	(3,+3)	0.518495	6.565002	-87.705449
20	(3,+1)	0.520172	6.460133	-82.06891
21	(3,-1)	0.525243	6.110277	-65.869603
22	(3,+1)	0.521392	6.384396	-78.233997
23	(3,+1)	0.523152	6.207137	-73.698782
24	(3,+3)	0.51732	6.61768	-91.984422
25	(3,-1)	0.526357	6.053642	-62.697036
26	(3,-1)	0.523146	6.284432	-72.149021
27	(3,-1)	0.526274	6.054279	-62.957355
28	(3,+1)	0.522301	6.249074	-76.283608
29	(3,+1)	0.522514	6.230381	-75.579831
30	(3,+1)	0.520187	6.466363	-81.725004

Tabla A 19. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 5 del Complejo 3.

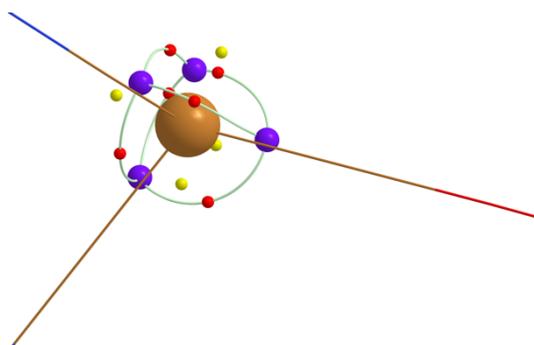


Figura A 59. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 5 del Complejo 3. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

6. Geometría 6: Cobre coordinado a dos fosfatos, el ligante tinidazol interactúa con el esqueleto en la parte inferior.

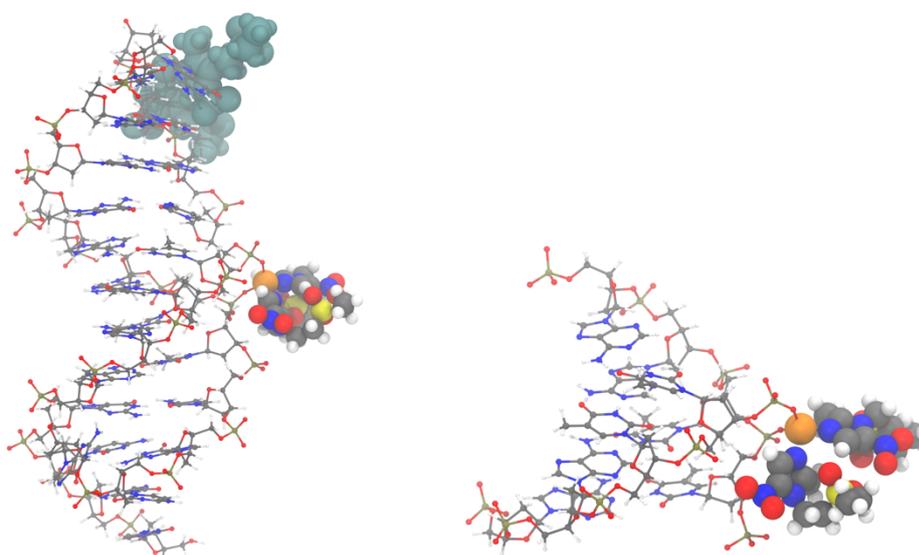


Figura A 60. Geometría total y corte 6 del Complejo 3.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15643.0761	-1.407E+09
6	(3,+1)	0.520993	6.518624	-77.232179
15	(3,-1)	0.547542	5.029365	-17.865662
16	(3,-1)	0.549922	4.959618	-14.163955
17	(3,-1)	0.534755	5.686552	-40.779772
18	(3,+3)	0.511418	6.860575	-116.01621
19	(3,+1)	0.520685	6.509657	-78.083197
20	(3,-1)	0.534588	5.675718	-41.287818
21	(3,+3)	0.511986	6.812384	-113.38827
22	(3,+3)	0.512335	6.771985	-112.42922

23	(3,+1)	0.516463	6.647925	-94.695242
24	(3,+1)	0.514454	6.799664	-101.95558
25	(3,+3)	0.511735	6.82256	-114.96
26	(3,+1)	0.517389	6.623696	-90.856338
27	(3,+1)	0.518373	6.558338	-86.87502

Tabla A 20. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 6 del Complejo 3.

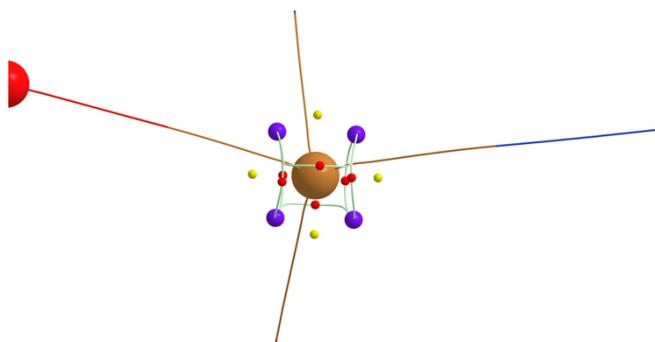


Figura A 61. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 6 del Complejo 3. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

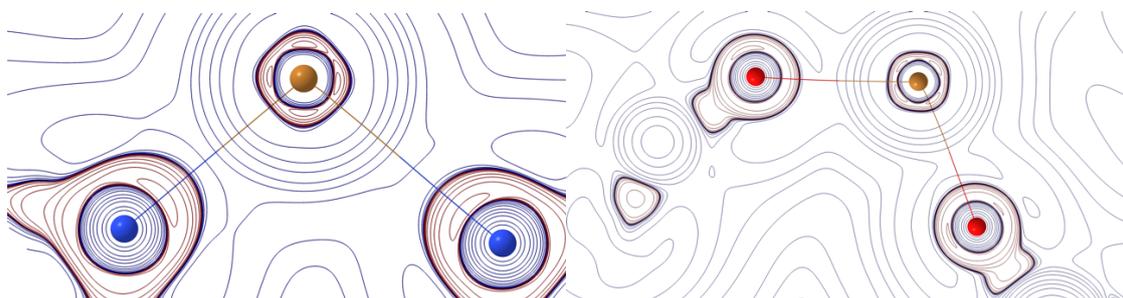


Figura A 62. Contornos del Laplaciano de la Densidad Electrónica para los enlaces N1-Cu-N2 y O1-Cu-O2 en la geometría 6 del Complejo 3.

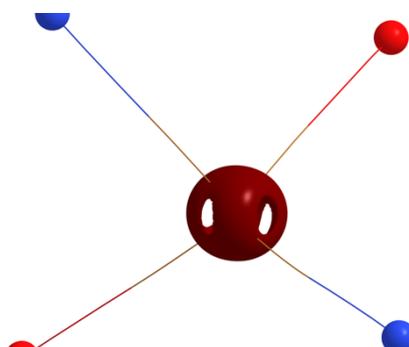


Figura A 63. Isosuperficie del Laplaciano de la Densidad Electrónica para el cobre en la geometría 6 del Complejo 3. Isovalor = -50 u.a.

7. Geometría 7: Cobre coordinado a un fosfato, ambos ligantes tinidazol intercalados.

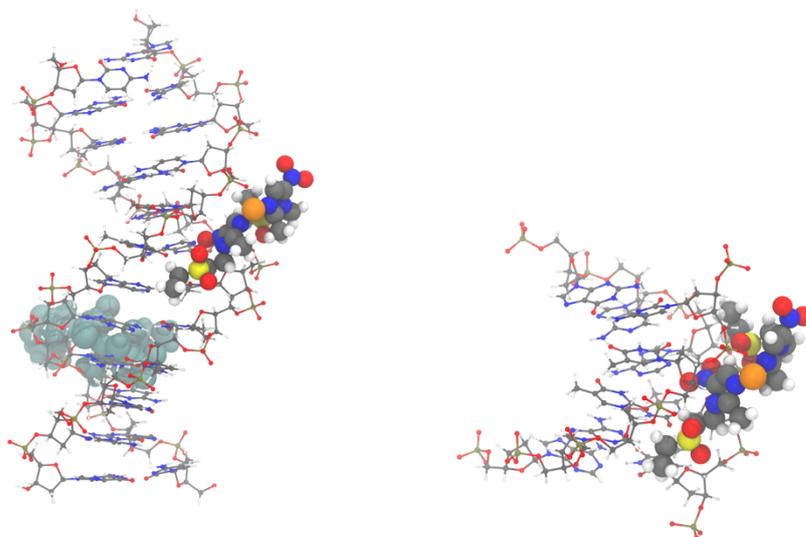


Figura A 64. Geometría total y corte 7 del Complejo 3.

# PC Lap	Tipo PC Lap	Distancia desde el núcleo	Rho	DelSqRho
1	(3,+3)	0	15643.0634	-1.407E+09
16	(3,-1)	0.54153	5.324739	-27.530932
17	(3,-1)	0.538674	5.449056	-32.76085
18	(3,-1)	0.541384	5.327135	-27.591573
19	(3,-1)	0.543941	5.216478	-23.509938
20	(3,-1)	0.520235	6.596348	-79.134348
21	(3,+1)	0.521655	6.426955	-75.387005
22	(3,+1)	0.519871	6.563331	-81.041241
23	(3,+1)	0.520391	6.48575	-80.187739
25	(3,+3)	0.511566	6.823624	-115.32856
26	(3,+3)	0.510858	6.87061	-118.3461
27	(3,+1)	0.519013	6.601634	-84.260607
28	(3,+1)	0.51982	6.488251	-82.391065
29	(3,+3)	0.510709	6.890205	-119.31342
30	(3,+3)	0.511803	6.813882	-114.23001
31	(3,+1)	0.519905	6.494246	-81.867382
32	(3,+1)	0.518207	6.661711	-86.670066
37	(3,-1)	0.521643	6.435593	-75.380588

38	(3,+1)	0.518653	6.63008	-85.529772
----	--------	----------	---------	------------

Tabla A 21. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica en la capa de valencia del cobre de la geometría 7 del Complejo 3.

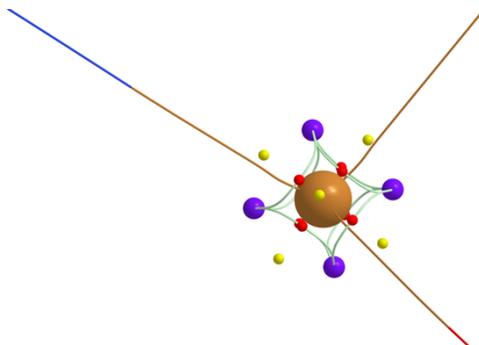


Figura A 65. Gráfica atómica del átomo de cobre en la geometría 7 del Complejo 3. Puntos críticos del Laplaciano de la Densidad Electrónica: (3, +3) en morado, (3, +1) en rojo y (3, -1) en amarillo.

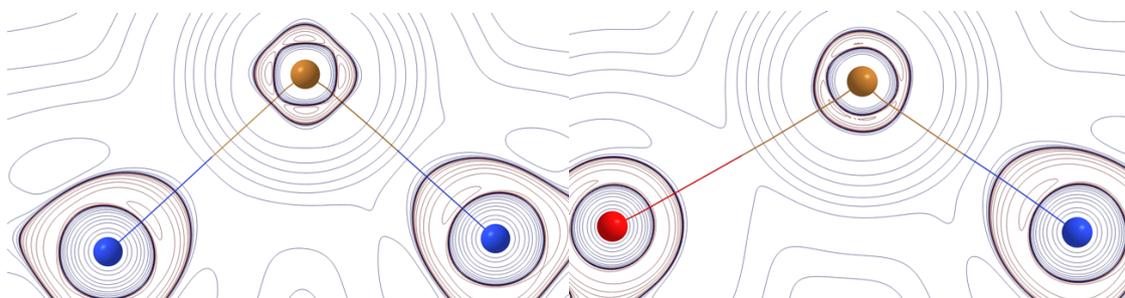


Figura A 66. Contornos del Laplaciano de la Densidad Electrónica para los enlaces N1-Cu-N2 y N1-Cu-O1 en la geometría 7 del Complejo 3.

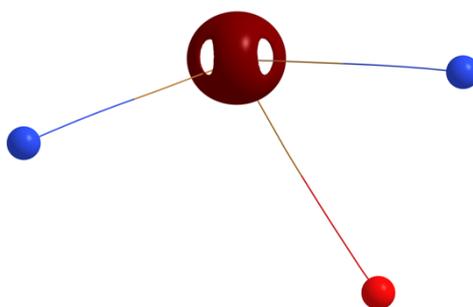


Figura A 67. Isosuperficie del Laplaciano de la Densidad Electrónica para el cobre en la geometría 7 del Complejo 3. Isovalor= -50 u.a.

II. Mecánica Molecular

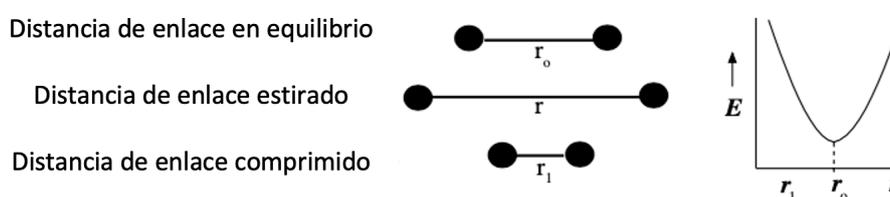
Bajo esta aproximación, la energía total de un sistema (E_{Total}) se expresa en forma de ecuaciones matemáticas llamadas Campos de Fuerza, dichas ecuaciones permiten predecir las energías relativas y las barreras de interconversión de diferentes conformaciones, y generalmente tienen la forma de la Ecuación A 1:

$$E_{Total} = \sum E_{stretching} + \sum E_{bend} + \sum E_{torsion} + \sum E_{vdW} + \sum E_{Coulombic} \quad \text{Ecuación A 1}$$

Donde $E_{stretching}$ es la energía de estiramiento de enlace, E_{bend} es la energía de enlace debida a los cambios de ángulos, $E_{torsion}$ es la energía de enlace debida a los cambios en la conformación del enlace, E_{vdW} es la contribución total a la energía debido a las fuerzas de van der Waals y $E_{Coulombic}$ son las fuerzas electrostáticas repulsivas y atractivas que operan en la molécula entre átomos con una carga parcial o completa; si es necesario, en algunas ocasiones se añaden términos, por ejemplo para enlaces de hidrógeno.^[62]

A continuación se describe la forma general de calcular cada una de las energías que conforman la Ecuación A 1, considerando a los enlaces como resortes mecánicos que obedecen la Ley de Hooke.^[62]

1. $E_{stretching}$: para un par de átomos enlazados de esta forma (A – B), y que presentan este movimiento de estiramiento y compresión:



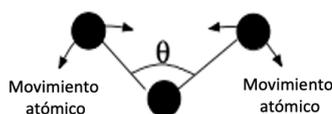
$$E_{stretching} = \frac{1}{2}k(r - r_0)^2 \quad \text{Ecuación A 2}$$

Donde r_0 es la distancia de enlace en el equilibrio o ideal, r es la distancia del enlace estirado, y k es la constante de fuerza del resorte, que es un indicativo de la fuerza del enlace (un valor mayor indica un enlace más fuerte).

En caso de tratarse de un enlace de tres átomos (A – B – C), la expresión sería:

$$E_{stretching} = E_{A-B} + E_{B-C} \\ = \frac{1}{2}k_{(A-B)}(r_{(A-B)} - r_{0(A-B)})^2 + \frac{1}{2}k_{(B-C)}(r_{(B-C)} - r_{0(B-C)})^2 \quad \text{Ecuación A 3}$$

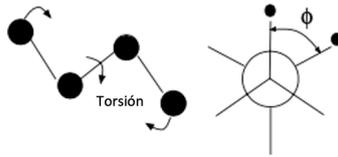
2. E_{bend} : en este caso, se considera el ángulo formado entre 3 átomos enlazados (A – B – C), de la forma siguiente:



$$E_{bend} = \frac{1}{2}k_{\theta}(\theta - \theta_0)^2 \quad \text{Ecuación A 4}$$

Donde θ_0 corresponde al ángulo de enlace ideal, es decir, el ángulo entre los átomos en la geometría de mínima energía.

3. $E_{torsion}$: en este caso se habla de la rotación alrededor del enlace formado entre los átomos B y C al estar unidos cuatro átomos (A – B – C – D), representado en la figura:

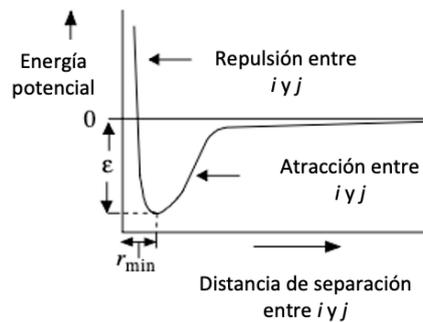


$$E_{torsion} = \frac{1}{2} k_{\phi} [1 + \cos m(\phi + \phi_{offset})]$$

Ecuación A 5

Donde k_{ϕ} es la barrera energética de la rotación del ángulo ϕ , m es la periodicidad de la rotación y ϕ_{offset} es el ángulo de torsión ideal relativo (el ángulo entre los átomos en la posición de mínima energía) a una disposición escalonada de los dos átomos.

4. E_{vdW} : las interacciones de tipo Van der Waals entre dos átomos (i y j) no enlazados, tiene un comportamiento de esta forma:

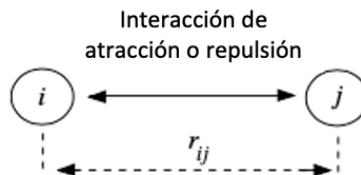


$$E_{vdW} = \epsilon \left[\left(\frac{r_{min}}{r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{min}}{r} \right)^6 \right]$$

Ecuación A 6

Donde r_{min} es la distancia entre dos átomos (i y j) cuando la energía tiene un valor mínimo (ϵ) y r es la distancia actual entre átomos. Esta ecuación se conoce como potencial de Lennard-Jones 6-12. El término elevado a la potencia 6 representa las fuerzas atractivas, mientras que el término elevado a la potencia 12 representa las fuerzas repulsivas de corto alcance entre los átomos.

5. $E_{Coulombic}$: en este caso se habla de interacciones electrostáticas de tipo coulómbicas entre los átomos i y j , provocadas debido a una re-distribución interna de los electrones que crea partes positivas y negativas en la molécula, dicho potencial coulómbico se representa de la forma:



$$E_{Coulombic} = \frac{q_j q_i}{D r_{ij}}$$

Ecuación A 7

Donde q_i y q_j son las cargas puntuales de los átomos i y j , respectivamente, r_{ij} es la distancia entre ambas cargas y D es la constante dieléctrica del medio que rodea las cargas.

En todos los casos, los valores de los parámetros usados desde la Ecuación A 2 hasta la Ecuación A 7 (r , r_0 , k , etcétera) son obtenidos a partir de datos experimentales, en caso de tenerlos disponibles, o de cálculos cuánticos con el nivel de teoría apropiado.

Es importante recalcar que dependiendo del sistema que se esté modelando otras ecuaciones pueden ser más apropiadas para describirlo, matemáticamente hablando, por lo cual será necesario usarlas. Un ejemplo de ello es añadir un término $\sum E_{Cross}$ en la Ecuación A 1 que cubra el acoplamiento entre los términos de la Ecuación A 2 hasta la Ecuación A 6 y relacione los cambios en distancias de enlace y ángulos de enlace. Usualmente se escriben como productos de la expansión de Taylor de primer orden en cada coordenada, por ejemplo, el término cruzado *stretching/bend* para una secuencia de átomos $A - B - C$ tendría la forma de la Ecuación A 8:^[63]

$$E_{stretching/bend} = k^{ABC}(\theta^{ABC} - \theta_0^{ABC})[(r^{AB} - r_0^{AB}) - (r^{BC} - r_0^{BC})] \quad \text{Ecuación A 8}$$

Bajo esta aproximación, la idea de que las moléculas estén compuestas por átomos estructuralmente similares en diferentes moléculas se implementa bajo tipos de átomos. Estos tipos de átomos van a depender del número atómico y del tipo de enlace químico involucrado. Por ejemplo, en el campo de fuerza MM2(91) hay 71 tipos de átomos diferentes, el tipo 1 corresponde a un carbono con hibridación sp^3 ; los tipos 2, 3 y 50 son carbonos con hibridación sp^2 pero se diferencian por el átomo vecino, el 2 corresponde a un carbono de tipo alqueno (doble enlace sencillo), el tipo 3 a un carbono unido a un oxígeno (un grupo carbonilo) y el tipo 50 se trata de un carbono que forma parte de un anillo aromático con enlaces deslocalizados.^[63]

III. Teoría de Funcionales de la Densidad

La base de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) es la prueba, reportada por Hohenberg y Kohn, de que la energía electrónica del estado basal se determina completamente por la densidad electrónica (ρ). A continuación, se detallan los teoremas que dieron origen a esta teoría.

Si comparamos este enfoque con la resolución de la ecuación de Schrödinger mediante la aproximación de la función de onda, sabemos que la función de onda de un sistema de N electrones va a contener $4N$ variables, tres que corresponden a las coordenadas espaciales y una más al espín electrónico. En contraste, la densidad electrónica es el cuadrado de la función de onda, integrado sobre $N - 1$ coordenadas electrónicas, y cada densidad de espín solo depende de las tres coordenadas espaciales, sin importar el número de electrones. Sabemos que, si el número de electrones aumenta, la complejidad de la función de onda también aumenta, pero exponencialmente; mientras que la densidad electrónica tiene el mismo número de variables independientemente del tamaño del sistema. El único inconveniente es que, aunque se ha probado que para cada densidad se tiene una energía, se desconoce el funcional que conecta a ambas. Por tanto, el objetivo de esta teoría es diseñar dichos funcionales que conecten la densidad electrónica con su energía.^[63]

Teorema de Existencia de Hohenberg-Kohn

Para resolver la ecuación de Schrödinger, necesitamos conocer el Hamiltoniano (H). La construcción del Hamiltoniano depende del número total de electrones y de las posiciones y números atómicos del núcleo, y con un observable como la densidad electrónica podemos lograr dicho objetivo de forma simple. Sabemos que, al integrar la densidad en todo el espacio, podemos obtener el número total de electrones (Ecuación A 9).

$$N = \int \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r}$$

Ecuación A 9

Además, debido a que los núcleos son cargas puntuales, sus posiciones corresponden a los máximos locales en la densidad electrónica. Finalmente, en el caso de los números atómicos, también podemos conocerlos a partir de la densidad, ya que para cada núcleo A localizado en un máximo de la densidad electrónica (\mathbf{r}_A) se tiene la Ecuación A 10:

$$\left. \frac{\partial \bar{\rho}(r_A)}{\partial r_A} \right|_{r_A=0} = -2Z_A \rho(\mathbf{r}_A)$$

Ecuación A 10

donde Z_A es el número atómico de A , r_A es la distancia radial desde A , y $\bar{\rho}$ es el promedio de densidad esférica. Sin embargo, esto no es un formalismo para calcular la energía. Por lo que, para establecer una dependencia entre la energía y la densidad del estado basal, Hohenberg y Kohn mostraron que la densidad determina el operador Hamiltoniano.

En el lenguaje de DFT, los electrones interactúan entre sí y con un potencial externo. Entonces, en el gas de electrones uniforme, el potencial externo es la carga positiva distribuida uniformemente, y en una molécula, el potencial externo es la atracción al núcleo. Si se tiene la densidad electrónica, se conoce el número de electrones y sólo se tiene que determinar el potencial. Para probar que la densidad electrónica del estado basal determina el potencial externo, Hohenberg y Kohn demostraron que la asunción contraria era un resultado imposible (*reductio ad absurdum*) de la siguiente forma.

Inicialmente se asume que dos potenciales externos diferentes pueden ser consistentes con la misma densidad electrónica de estado basal no degenerado (ρ_0). Estos potenciales se etiquetarán como v_a y v_b , y los Hamiltonianos en los que aparecen serán H_a y H_b , respectivamente. Cada Hamiltoniano se asocia una función de onda del estado basal Ψ_0 con su respectivo eigenvalor E_0 . El teorema variacional de la teoría de orbitales moleculares indica que el valor esperado de H_a sobre la $\Psi_{0,b}$ debe ser mayor que la energía del $E_{0,a}$:

$$E_{0,a} < \langle \Psi_{0,b} | H_a | \Psi_{0,b} \rangle$$

Ecuación A 11

La Ecuación A 11 puede ser reescrita de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} E_{0,a} &< \langle \Psi_{0,b} | H_a - H_b + H_b | \Psi_{0,b} \rangle \\ &< \langle \Psi_{0,b} | H_a - H_b | \Psi_{0,b} \rangle + \langle \Psi_{0,b} | H_b | \Psi_{0,b} \rangle \\ &< \langle \Psi_{0,b} | v_a - v_b | \Psi_{0,b} \rangle + E_{0,b} \end{aligned}$$

Ecuación A 12

Como los potenciales v son operadores de un electrón, la integral en la última línea de la Ecuación A 12 puede ser escrita en términos de la densidad del estado basal:

$$E_{0,a} < \int [v_a(\mathbf{r}) - v_b(\mathbf{r})] \rho_0(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + E_{0,b}$$

Ecuación A 13

Debido a que no se hace distinción entre a y b , se pueden intercambiar los índices de la Ecuación A 13 y llegar a la Ecuación A 14, que es igual de válida

$$E_{0,b} < \int [v_b(\mathbf{r}) - v_a(\mathbf{r})] \rho_0(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + E_{0,a}$$

Ecuación A 14

Ahora, si sumamos las desigualdades de la Ecuación A 13 y de la Ecuación A 14, tenemos:

$$\begin{aligned}
E_{0,a} + E_{0,b} &< \int [v_b(\mathbf{r}) - v_a(\mathbf{r})] \rho_0(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + \int [v_a(\mathbf{r}) - v_b(\mathbf{r})] \rho_0(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + E_{0,b} \\
&\quad + E_{0,a} \\
&< \int [v_b(\mathbf{r}) - v_a(\mathbf{r}) + v_a(\mathbf{r}) - v_b(\mathbf{r})] \rho_0(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + E_{0,b} + E_{0,a} \\
&< E_{0,b} + E_{0,a}
\end{aligned}$$

Ecuación A 15

En donde la suposición de que las densidades de los estados basales asociadas a las funciones de onda a y b son las mismas, nos permite eliminar las integrales que suman cero. Sin embargo, el resultado de que la suma de las energías es menor que la misma, es imposible, indicando que la suposición inicial es incorrecta. Entonces, la densidad del estado basal no degenerado debe determinar el potencial externo, y, por tanto, el Hamiltoniano, y a su vez, la función de onda. Es importante notar que el Hamiltoniano determina no solo la función de onda del estado basal, sino también la función de onda de los estados excitados, teniendo como resultado mucha información a partir de la densidad.^[141]

Teorema Variacional de Hohenberg-Kohn

En un segundo teorema, Hohenberg y Kohn demostraron que la densidad obedece el principio variacional al igual que la teoría de orbitales moleculares.

Para esto, primero se asume que tenemos una densidad bien comportada que integra al número adecuado de electrones, N . En ese caso, el primer teorema indica que esta densidad determina un candidato (*cand*) de función de onda y de Hamiltoniano. Entonces, se puede evaluar el valor de energía esperado de la siguiente forma:

$$\langle \Psi_{cand} | H_{cand} | \Psi_{cand} \rangle = E_{cand} \geq E_0$$

Ecuación A 16

Que debe ser mayor o igual a la energía real del estado basal por el principio variacional de la teoría de orbitales moleculares.

Así, en principio, podemos seguir eligiendo diferentes densidades y aquellas que den una energía menor que la calculada en la Ecuación A 16, estarán muy cercanas a la correcta.

Ya sabemos que la densidad determina el potencial externo, el cual determina el Hamiltoniano, y este determina la función de onda. Si tenemos el Hamiltoniano y la función de onda, podemos calcular la energía. Sin embargo, este procedimiento no simplificaría el uso de la teoría de orbitales moleculares. Por lo que, en el año 1965 Kohn y Sham sugirieron una propuesta para determinar la energía directamente sin pasar por la función de onda.^[141]

Hasta el momento, el procedimiento tiene dos desventajas: la primera es cómo elegir la densidad candidato adecuada, y la segunda es que si se pretende evitar la resolución de la ecuación de Schrödinger no se obtiene un avance al calcular la energía como el valor esperado del Hamiltoniano. La dificultad, por supuesto, se trata de la naturaleza del funcional. Para ello, Kohn y Sham propusieron la metodología de campo autoconsistente.

Metodología de Campo Autoconsistente de Kohn-Sham

Puesto que se busca simplificar la metodología, el problema ahora es el término correspondiente a la interacción electrón-electrón en el Hamiltoniano correcto. Kohn y Sham notaron que el problema se simplificaría si solo un operador Hamiltoniano fuera útil para un sistema de varios electrones no interactuantes. Tal Hamiltoniano puede ser expresado como una suma de operadores de un electrón,

que tiene funciones propias que son determinantes de Slater de las funciones propias individuales de un electrón, y tiene valores propios que son simplemente la suma de los valores propios de un electrón.

Entonces, se debe tomar como punto de partida un sistema ficticio de electrones que no interactúan y que tiene como densidad general de estado fundamental la misma densidad que algún sistema real de interés donde los electrones interactúan. A continuación, dividimos el funcional de la energía en componentes específicos para facilitar un análisis adicional, en particular:

$$E[\rho(\mathbf{r})] = T_{ni}[\rho(\mathbf{r})] + V_{ne}[\rho(\mathbf{r})] + V_{ee}[\rho(\mathbf{r})] + \Delta T[\rho(\mathbf{r})] + \Delta V_{ee}[\rho(\mathbf{r})] \quad \text{Ecuación A 17}$$

Donde los términos se refieren a la energía cinética de electrones no interactuantes (T_{ni}), la interacción núcleo-electrón (V_{ne}), la repulsión clásica electrón-electrón (V_{ee}), la corrección a la energía cinética derivada de la naturaleza interactuante de los electrones (ΔT), y todas las correcciones no clásicas a la energía de repulsión electrón-electrón (ΔV_{ee}).

Es importante notar que, para un sistema de electrones no interactuantes, la energía cinética es simplemente la suma de las energías cinéticas individuales. Con una expresión de orbital para la densidad, la Ecuación A 17 puede ser reescrita de la forma:

$$E[\rho(\mathbf{r})] = \sum_i^N \left(\langle \chi_i | -\frac{1}{2} \nabla_i^2 | \chi_i \rangle - \langle \chi_i | \sum_k^{\text{núcleos}} \frac{Z_k}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_k|} | \chi_i \rangle \right) + \sum_i^N \langle \chi_i | \frac{1}{2} \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' | \chi_i \rangle + E_{xc}[\rho(\mathbf{r})] \quad \text{Ecuación A 18}$$

Donde N es el número de electrones y la densidad para una función de onda determinante de Slater (que es una función propia exacta para un sistema no interactuante) es simplemente:

$$\rho = \sum_{i=1}^N \langle \chi_i | \chi_i \rangle \quad \text{Ecuación A 19}$$

En la Ecuación A 18 los términos difíciles, ΔT y ΔV_{ee} , se han sumado en el término E_{xc} , típicamente conocido como la energía de intercambio y correlación. Resaltando que este término incluye no solo los efectos del intercambio y la correlación de la mecánica cuántica, sino también la corrección de la energía clásica de auto-interacción y la diferencia de energía cinética entre el sistema no interactuante ficticio y el real.

Si encontramos los orbitales χ que minimicen E en la Ecuación A 18, de la manera habitual, encontramos que satisfacen las ecuaciones de pseudovalores propios:

$$h_i^{KS} \chi_i = \varepsilon_i \chi_i \quad \text{Ecuación A 20}$$

En donde el operador de un electrón Kohn-Sham (KS) se define como:

$$h_i^{KS} = -\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_k^{\text{núcleos}} \frac{Z_k}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_k|} + \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + V_{xc} \quad \text{Ecuación A 21}$$

y

$$V_{xc} = \frac{\delta E_{xc}}{\delta \rho} \quad \text{Ecuación A 22}$$

V_{xc} es una derivada funcional, mejor descrito como el operador de un electrón para el cual el valor esperado del determinante de Slater KS es E_{xc} .

Cabe resaltar que debido a que la energía que se está minimizando en la Ecuación A 17 es exacta, los orbitales χ deben proporcionar la densidad exacta, es decir, el mínimo debe corresponder a la realidad. Además estos orbitales son los que forman la función propia determinante de Slater para el Hamiltoniano separable que no interactúa, definido como la suma de los operadores de Kohn-Sham en la Ecuación A 21, por ejemplo:

$$\sum_{i=1}^N h_i^{KS} |\chi_1 \chi_2 \cdots \chi_N\rangle = \sum_{i=1}^N \epsilon_i |\chi_1 \chi_2 \cdots \chi_N\rangle \quad \text{Ecuación A 23}$$

Por lo que hay consistencia interna en el enfoque Kohn-Sham de postular un sistema que no interactúa con una densidad idéntica a la del sistema real. Por tanto, está justificado usar el primer término de la Ecuación A 18 para calcular la energía cinética de los electrones no interactuantes, que resulta ser una gran fracción de la energía cinética del sistema real.

Para la determinación de los orbitales KS, los expresamos dentro de un conjunto de funciones base $\{\phi\}$, y determinamos los coeficientes individuales de cada orbital mediante la solución de una ecuación secular completamente análoga a la empleada en la teoría Hartree-Fock, quedando de la forma:

$$K_{\mu\nu} = \left\langle \phi_\mu \left| -\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_k^{\text{núcleos}} \frac{Z_k}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_k|} + \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + V_{xc} \right| \phi_\nu \right\rangle \quad \text{Ecuación A 24}$$

En la medida en que se requiera la densidad para el cálculo de los elementos de la matriz secular, pero dicha densidad sea determinada utilizando los orbitales derivados de la solución de la ecuación secular (Ecuación A 19), el proceso Kohn-Sham debe realizarse como un procedimiento iterativo de campo autoconsistente (SCF).^[141]

En resumen, el proceso SCF de un cálculo con la Teoría de Funcionales de la Densidad debe seguir la secuencia mostrada en la Figura A 68, comenzando con la densidad de partida (ρ), con ella se estima V_{xc} inicial, el cual se usa en las ecuaciones de Kohn-Sham (Ecuación A 20) y permite obtener los orbitales KS (χ_i^{KS}). Una vez obtenidos los χ_i^{KS} , éstos son usados para conseguir una densidad electrónica, y con ello se inicia el ciclo de nuevo. Las iteraciones continúan hasta que no exista una diferencia en la densidad y en los orbitales KS. Y una vez que el cálculo converge, se puede calcular la energía, ya que se conoce ρ y el funcional aproximado E_{xc} .^[142]

La diferencia clave entre la teoría de Hartree-Fock y DFT, es que la segunda no contiene aproximaciones, por tanto, es exacta. Como hemos visto, lo único que necesitamos conocer es E_{xc} en función de la densidad. Es por ello que, desde la propuesta de Hohenberg y Kohn, se ha buscado proponer nuevos funcionales de la densidad.

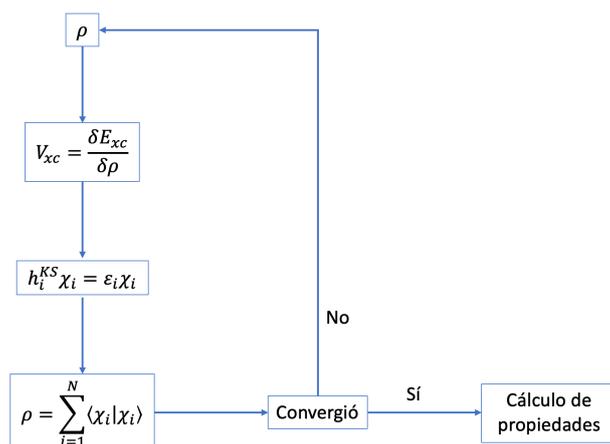


Figura A 68. Cálculo con Teoría de Funcionales de la Densidad. Replicada de [142].

IV. Relación Cuantitativa Estructura-Actividad

Generación del Modelo

El método más común es la Regresión Lineal Múltiple (MLR), que puede ser representado matemáticamente con una ecuación de línea recta de tipo:

$$y = mx + c$$

Donde los valores de m y c dan a la línea el mejor ajuste de los datos. La ecuación de regresión debe ir acompañada de datos adicionales que hablen sobre la precisión y difusión de los datos, como son el número de datos usados (n), la desviación estándar de los datos (s) y el coeficiente de regresión (R^2). El valor del coeficiente de regresión, que debe estar entre 0 y 1, es una medida de qué tan cerca se encuentran los datos o coinciden con la ecuación, de tal forma que un valor igual a 1 correspondería a una coincidencia perfecta.^[62] El valor de R^2 se calcula como la Ecuación A 25:

$$R^2 = 1 - \frac{RSS}{TSS} \quad \text{Ecuación A 25}$$

Donde RSS es la suma residual de cuadrados, y TSS es la suma total de cuadrados.

Dominio de Aplicabilidad

Bajo la aproximación *leverage* se puede verificar si un compuesto se encontrará dentro del DA (para ser considerado interpolado y con incertidumbre reducida, por tanto, confiable) o fuera del DA (para ser considerado extrapolado en el modelo y con gran incertidumbre, por tanto, no confiable). Es útil para evaluar el grado de extrapolación, lo que representa la "distancia o lejanía" de un compuesto del espacio experimental modelo (el centroide estructural del conjunto de entrenamiento) y es una medida de la influencia que tiene ese compuesto en el modelo: aquellos compuestos cercanos al centroide influyen menos en la construcción del modelo en comparación a los que se encuentran en los extremos.

Las predicciones se deben considerar como no confiables para compuestos que tengan un valor de *leverage* (h) alto, esto quiere decir que $h > h^*$, donde h^* es el valor crítico y se calcula $h^* = 3p'/n$, donde p' es el número de variables en el modelo más una, y n es el número de objetos usados para calcular el modelo. Cuando el valor de *leverage* (h) es menor que el valor crítico, la probabilidad de

concordancia entre los valores predichos y reales es tan alta como la de los compuestos del conjunto de entrenamiento. En contraste, un valor de *leverage* alto para un compuesto en el conjunto de prueba se encuentra estructuralmente lejano a los del grupo de entrenamiento, entonces debe considerarse fuera del DA del modelo.

Para visualizar el dominio de aplicabilidad de un modelo QSAR se utiliza una gráfica de los valores de *leverage* (h) en el eje x contra los valores de residuos estandarizados con validación cruzada (R) en el eje y, conocido como gráfico de Williams. Dicho gráfico permite identificar de manera simple e inmediata los *outliers*, que son los compuestos con valores de residuos estandarizados con validación cruzada mayores a tres unidades de desviación estándar ($> 3\sigma$), y los compuestos estructuralmente influenciados en el modelo ($h > h^*$).

Validación del modelo

La Validación Cruzada (VC o Q^2) es la técnica más común en la validación interna, e involucra diversas técnicas estadísticas en las que diferentes porciones de los compuestos son sacadas del conjunto de entrenamiento de forma iterativa para generar un nuevo modelo que permita verificar la predicción interna. Algunos de los métodos de VC más usados son:

- (a) Dejando Uno Fuera (*Leave-One-Out* o Q_{LOO}^2): implica hacer el número de iteraciones igual al número de datos (n), para que en cada una se tenga un solo dato de prueba y el resto de los datos sea de entrenamiento.

El error (MSE_i) es calculado como el promedio de los errores estándar (Ecuación A 26):

$$MSE_i = (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad \text{Ecuación A 26}$$

Donde \hat{y}_i es la predicción para y_i . Entonces, Q_{LOO}^2 se calcula de la siguiente forma:

$$Q_{LOO}^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n MSE_i \quad \text{Ecuación A 27}$$

- (b) Dejando Muchos Fuera (*Leave-Many-Out* o Q_{LMO}^2): en este caso los datos se dividen de forma aleatoria en un número k de subconjuntos conformados por más de un dato, en cada iteración cada subconjunto será el grupo de prueba y el resto de los datos será el de entrenamiento, hasta completar k iteraciones. Q_{LMO}^2 se calcula de la siguiente forma:

$$Q_{LMO}^2 = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^k MSE_i \quad \text{Ecuación A 28}$$

- (c) Bootstrapping (Q_{boot}^2): en un conjunto de datos de entrenamiento se extraen aleatoriamente cierto número de datos que son reemplazados, formando un nuevo conjunto de datos con el que se genera un modelo. Dicho remuestreo se realiza k veces.

En contraste al valor de R^2 , que incrementa conforme el número de descriptores aumenta, los valores de Q^2 generalmente aumentan solo cuando los descriptores añadidos son útiles para predecir compuestos excluidos. Los parámetros estadísticos obtenidos mediante VC deben ser lo más altos posible (en opinión de Gramatica^[69], al menos con un valor $Q^2 > 0.7$) en el modelo para proponer que el modelo es robusto y que puede tener un gran poder predictivo, sin embargo, eso no descarta que el modelo pueda sobreestimar el poder predictivo, y al realizar una validación externa se descarte dicha opción.

El proceso de validación externa depende en gran medida de la disponibilidad de bases de datos, ya que se debe aplicar la ecuación (descriptores y coeficientes) a un conjunto nuevo de compuestos que formen parte del dominio de aplicabilidad. Lo cual puede resolverse si antes de crear el modelo se separan adecuadamente los datos disponibles, considerando entonces un conjunto de entrenamiento para crear el modelo y un conjunto para la evaluación predictiva del modelo. Se recomienda que el modelo sea evaluado en al menos un 20% del número de datos con los cuales fue construido, pero no se descarta que el conjunto de predicción sea más grande que el conjunto de entrenamiento; en caso contrario, es decir, cuando se evalúe en muy pocos compuestos, los resultados pueden obtenerse por casualidad y no se podrán tener buenas conclusiones.

Uno de los métodos más usados para validación externa es Y-Scrambling, que consiste en intercambiar aleatoriamente los valores de respuesta (o propiedad) y verificar la validez del modelo. Este método es útil para probar la significancia del modelo, resaltando la presencia de modelos aparentes o no confiables y obteniendo correlaciones por casualidad. Otro parámetro muy útil es el cálculo de Errores Cuadráticos Medios (Root Mean Squared Errors o RMSE) en el conjunto de entrenamiento, en el conjunto de la validación cruzada y en el conjunto de predicción externa, ya que proporcionan una indicación más confiable de la idoneidad del modelo. Si los valores de RMSE son pequeños el modelo tiene gran habilidad de predecir, y si los valores son similares entre los conjuntos de entrenamiento, de VC y de predicción externa se habla sobre la generalizabilidad del modelo.

V. Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas

Topología de la Densidad Electrónica

La topología de la densidad electrónica^[72] nos permite identificar puntos críticos (CP, del inglés: *Critical Points*), que se definen como puntos en el espacio en los cuales la primera derivada de la densidad es igual a cero como muestra la Ecuación A 29:

$$\nabla\rho = \mathbf{i}\frac{d\rho}{dx} + \mathbf{j}\frac{d\rho}{dy} + \mathbf{k}\frac{d\rho}{dz} \rightarrow \begin{cases} = \vec{0} & \text{en los puntos críticos y en } \infty \\ \neq \vec{0} & \text{en todos los demás puntos} \end{cases} \quad \text{Ecuación A 29}$$

En donde el vector cero significa que cada derivada individual en el operador gradiente, ∇ , es cero y no sólo la suma. Una característica topológica de la densidad es que en la posición de cada núcleo se identifica un máximo local, dicho punto crítico es del tipo nuclear (NCP).

Para identificar los mínimos locales, máximos locales y puntos de silla es necesario calcular la segunda derivada de la densidad electrónica, y construir la matriz Hessiana (Ecuación A 30) que puede ser diagonalizada y obtener las curvaturas de la densidad respecto a los tres ejes (valores de λ en Ecuación A 31). Dichas curvaturas, o traza de la matriz Hessiana, es conocida como el Laplaciano de la Densidad ($\nabla^2\rho(\mathbf{r})$), que está dado por la Ecuación A 32:

$$A(\mathbf{r}_c) = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2\rho}{\partial x^2} & \frac{\partial^2\rho}{\partial x\partial y} & \frac{\partial^2\rho}{\partial x\partial z} \\ \frac{\partial^2\rho}{\partial y\partial x} & \frac{\partial^2\rho}{\partial y^2} & \frac{\partial^2\rho}{\partial y\partial z} \\ \frac{\partial^2\rho}{\partial z\partial x} & \frac{\partial^2\rho}{\partial z\partial y} & \frac{\partial^2\rho}{\partial z^2} \end{pmatrix}_{\mathbf{r}=\mathbf{r}_c} \quad \text{Ecuación A 30}$$

$$\Lambda = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 \rho}{\partial x'^2} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{\partial^2 \rho}{\partial y'^2} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{\partial^2 \rho}{\partial z'^2} \end{pmatrix}_{\mathbf{r}'=\mathbf{r}_c} = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3 \end{pmatrix}$$

Ecuación A 31

$$\nabla^2 \rho(\mathbf{r}) = \frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \rho}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \rho}{\partial z^2} = \lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3$$

Ecuación A 32

Cada punto crítico puede ser clasificado de acuerdo a su rango (ω) y firma (σ) de la forma $[\omega, \sigma]$. El rango es el número de curvaturas diferentes a cero en el CP, mientras que la firma es la suma algebraica de los signos de dichas curvaturas, es decir, cada curvatura contribuye con un valor ± 1 dependiendo si su valor es positivo o negativo. Esta clasificación da pie a identificar cuatro tipos de CP estables, que además se identifican con un elemento de la estructura química:

- (3,-3): con tres curvaturas negativas, la densidad es un máximo local y se trata de un punto crítico nuclear (NCP).
- (3,-1): con dos curvaturas negativas, la densidad es máximo en el plano definido por los eigenvectores correspondientes, pero es un mínimo en el tercer eje (perpendicular al plano); lo que corresponde a un punto crítico de enlace (BCP).
- (3,+1): con dos curvaturas positivas, la densidad es un mínimo en el plano definido por los eigenvectores correspondientes, y es un máximo en el tercer eje (perpendicular al plano), que se identifica como un punto crítico de anillo (RCP).
- (3,+3): con tres curvaturas positivas, la densidad es un mínimo local y se trata de un punto crítico de caja (CCP).

El número y tipo de puntos críticos en una molécula deben cumplir una relación topológica, conocida como relación de Poincaré-Hopf, que establece:

$$n_{NCP} - n_{BCP} + n_{RCP} - n_{CCP} = 1$$

Ecuación A 33

Donde n es el número de CP de cada tipo. El conjunto $\{n_{NCP}, n_{BCP}, n_{RCP}, n_{CCP}\}$ de un sistema se conoce como conjunto característico.

La topología ayuda a dividir el espacio molecular en regiones separadas para cada núcleo, denominadas cuencas atómicas (Ω). Dicho espacio se delimita por una superficie de flujo cero en el vector de campo gradiente de la densidad electrónica que cumple la condición representada en la Ecuación A 34:

$$\nabla \rho(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{n}(\mathbf{r}) = 0, \text{ para todas las } \mathbf{r} \text{ que pertenecen a la superficie } S(\Omega)$$

Ecuación A 34

En donde \mathbf{r} es la posición del vector y $\mathbf{n}(\mathbf{r})$ es el vector normal a la superficie $S(\Omega)$. Esta condición de frontera permite definir un átomo en una molécula, de acuerdo con esta teoría, como la unión de un núcleo y el espacio que abarca la cuenca asociada a dicho núcleo.

La representación gráfica del conjunto de trayectorias de enlace y puntos críticos en una molécula en equilibrio se conoce como gráfica molecular. En donde las trayectorias de enlace se definen como la línea de máxima densidad electrónica que une los núcleos de dos átomos químicamente unidos, y son un indicador de un enlace químico de cualquier tipo (débil, fuerte, interacciones de capa cerrada y

capa abierta). El punto con el menor valor de densidad electrónica a lo largo de la trayectoria de enlace corresponde al punto crítico de enlace (BCP), y además es el punto en el que la trayectoria de enlace intersecta la superficie de flujo cero que separa dos átomos enlazados.

Partición Atómica de Propiedades Moleculares

La división del espacio molecular en cuencas atómicas permite la partición de las propiedades electrónicas en las contribuciones atómicas. De tal forma que, el promedio de una propiedad O en una cuenca atómica Ω , $O(\Omega)$, se calcula como muestra la Ecuación A 35^[72]:

$$O(\Omega) = \langle \hat{O} \rangle_{\Omega} = \frac{N}{2} \int_{\Omega} d\mathbf{r} \int d\tau' [\Psi^* \hat{O} \Psi + (\hat{O} \Psi)^* \Psi] \quad \text{Ecuación A 35}$$

Donde \hat{O} es un operador de un electrón o la suma de operadores de un electrón. A continuación se describen las propiedades atómicas empleadas en este trabajo.

1) Población electrónica y carga

La población electrónica ($N(\Omega)$) total de un átomo en una molécula se obtiene cuando $\hat{O} = 1$ en la Ecuación A 35, de esta forma^[72]:

$$N(\Omega) = \int_{\Omega} \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad \text{Ecuación A 36}$$

Que también puede ser expresada en términos de las poblaciones de espín separadas de la siguiente forma:

$$N(\Omega) = \sum_i \left[\langle \psi_i(\mathbf{r}) | \psi_i(\mathbf{r}) \rangle_{\Omega}^{\alpha} + \langle \psi_i(\mathbf{r}) | \psi_i(\mathbf{r}) \rangle_{\Omega}^{\beta} \right] \quad \text{Ecuación A 37}$$

Mientras que la carga atómica, $q(\Omega)$, se obtiene al sustraer ($N(\Omega)$) de la carga nuclear (Z_{Ω})^[72]:

$$q(\Omega) = Z_{\Omega} - N(\Omega) \quad \text{Ecuación A 38}$$

2) Localización y Deslocalización Electrónica

La población electrónica, tanto atómica ($N(\Omega)$) como molecular (N), puede dividirse en dos contribuciones: localización electrónica ($\lambda(\Omega)$) y deslocalización electrónica ($\delta(\Omega_A, \Omega_B)$), las cuales se definen en la Ecuación A 39 y la Ecuación A 40, respectivamente.^[143]

$$\lambda(\Omega) = \sum_{ij} \eta_i^{1/2} \eta_j^{1/2} S_{ij}(\Omega)^2 \quad \text{Ecuación A 39}$$

$$\delta(\Omega_A, \Omega_B) = 2 \sum_{ij} \eta_i^{1/2} \eta_j^{1/2} S_{ij}(\Omega_A) S_{ij}(\Omega_B) \quad \text{Ecuación A 40}$$

La localización electrónica es una medida del número de electrones localizados en cualquier átomo, (Ω), mientras que la deslocalización electrónica corresponde al número de electrones compartidos entre dos átomos diferentes, (Ω_A y Ω_B), que no necesariamente se encuentran unidos. En la Ecuación A 39 y la Ecuación A 40, η_i y η_j son los números de ocupación en los orbitales φ_i y φ_j , y $S_{ij}(\Omega_A)$ es la integral de traslape entre φ_i y φ_j dentro de la cuenca del átomo Ω_A .

La deslocalización total de un átomo incluye dos contribuciones: para átomos unidos y átomos no unidos, como se observa en la Ecuación A 41. La deslocalización de no enlace puede ser interpretada como el índice de valencia libre clásico.^[144]

$$\delta(\Omega_A) = \frac{1}{2} \sum_{\Omega_A = \Omega_B} \delta(\Omega_A, \Omega_B) + \frac{1}{2} \sum_{\Omega_A \neq \Omega_B} \delta(\Omega_A, \Omega_B) \quad \text{Ecuación A 41}$$

$$= \delta_b(\Omega_A) + \delta_{nb}(\Omega_A)$$

Cabe mencionar que los índices de localización y deslocalización son exactos únicamente para un determinante de Slater y, en el caso de métodos correlacionados son una aproximación.^[145,146]

3) Momento dipolar

El momento dipolar atómico, $\mu(\Omega)$, se define como el promedio del espacio atómico del vector de posición electrónico, y nos ayuda a describir el modo en que la densidad electrónica se polariza. Está formado por dos contribuciones: la transferencia de carga (μ_{CT}) y las polarizaciones atómicas ($\mu(\Omega)$). Estas últimas son una medida del desplazamiento del centroide atómico de una carga negativa desde la posición de su núcleo y generalmente se opone a la transferencia de carga. También, se pueden definir contribuciones intra-atómicas e inter-atómicas (de enlace) al momento dipolar atómico, como se muestra en la Ecuación A 42.^[147]

$$\mu_{intra}(\Omega) = - \int_{\Omega} \mathbf{r}_{\Omega} \rho(\mathbf{r}) d\tau \quad \text{Ecuación A 42}$$

Article

Intermediate Detection in the Casiopeina–Cysteine Interaction Ending in the Disulfide Bond Formation and Copper Reduction

Lillian G. Ramírez-Palma^{1,2,†}, Adrián Espinoza-Guillén^{3,†} , Fabiola Nieto-Camacho³, Alexis E. López-Guerra³, Virginia Gómez-Vidales¹, Fernando Cortés-Guzmán^{1,2,*}  and Lena Ruiz-Azuara^{3,*} 

¹ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, C. U., México City 04510, Mexico; lila.gis.rp@gmail.com (L.G.R.-P.); gomvidal@unam.mx (V.G.-V.)

² Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEMex-UNAM, Carretera Toluca-Atzacomulco km 14.5, Toluca 50200, Mexico

³ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, C. U., México City 04510, Mexico; adrianeg24@gmail.com (A.E.-G.); fabille.nc@gmail.com (F.N.-C.); eduga_9@live.com.mx (A.E.L.-G.)

* Correspondence: fercor@unam.mx (F.C.-G.); lenar701@gmail.com (L.R.-A.)

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Ramírez-Palma, L.G.; Espinoza-Guillén, A.; Nieto-Camacho, F.; López-Guerra, A.E.; Gómez-Vidales, V.; Cortés-Guzmán, F.; Ruiz-Azuara, L. Intermediate Detection in the Casiopeina–Cysteine Interaction Ending in the Disulfide Bond Formation and Copper Reduction. *Molecules* **2021**, *26*, 5729. <https://doi.org/10.3390/molecules26195729>

Academic Editors: Višnja Stepanić, Marta Kučerová-Chlupáčová and Helen Osborn

Received: 10 July 2021
Accepted: 14 September 2021
Published: 22 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: A strategy to improve the cancer therapies involves agents that cause the depletion of the endogenous antioxidant glutathione (GSH), increasing its efflux out of cells and inducing apoptosis in tumoral cells due to the presence of reactive oxygen species. It has been shown that Casiopeina copper complexes caused a dramatic intracellular GSH drop, forming disulfide bonds and reducing Cu^{II} to Cu^I. Herein, through the determination of the [Cu^{II}]-SH bond before reduction, we present evidence of the adduct between cysteine and one Casiopeina as an intermediate in the cystine formation and as a model to understand the anticancer activity of copper complexes. Evidence of such an intermediate has never been presented before.

Keywords: copper complexes; glutathione depletion; cysteine; Casiopeina; intermediate; copper reduction

1. Introduction

The study of the oxidation of endogenous thiolated compounds, such as glutathione (GSH) and cysteine (Cys), is essential to understand the oxidative stress within the cells [1]. Glutathione (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine, GSH) is a tripeptide that participates in redox processes into the cells, where the Cys residues of GSH are easily oxidized to disulfide (GSSG) [2,3]. It also participates in cancer cell protection against xenobiotics, ionizing radiations, and oxidative stress. Its oxidation favors the opening of the mitochondrial permeability transition pore complex, facilitating the release of death-related molecular signals [4,5]. A strategy to improve cancer therapies' efficacy should involve cytosolic and mitochondrial GSH depletion through an increase of GSH efflux out of cells [4]. Kachadourian and coworkers tested, in human lung cancer cells (H157 and A549), one copper complex of the Casiopeina[®] family, showing that it induced a dramatic drop in the intracellular levels of GSH (Figure 1A) [6]. Additionally, there are reports of GSH depletion produced by copper complexes on cervix HeLa and neuroblastoma CHP-212. GSSG/GSH and cystine/cysteine's redox potentials are very similar, -263 and -220 mV vs. normal hydrogen electrode (NHE) respectively [7,8], with glutathione being a slightly better reducing agent (Figure 1C). The oxidation by copper(II) ions of cysteine-containing peptides such as glutathione and cysteine has been studied to understand this biometal's role in oxidative stress processes [9–12]. The copper favors the oxidation of thiols [11,13], where Cu^{II} reacts with thiols to form [Cu^{II}]-thiol adducts depending on their molar ratio. The [Cu^{II}]-thiol complex is reduced to Cu^I, and in turn, thiols are oxidized to the corresponding radicals. The CasIII-ia ([Cu(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)(acetylacetonate)]NO₃*(H₂O)₂,

Figure 1B) is a copper(II) complex from the Casiopeina family with a potential of 62 mV vs. NHE [14], which could mediate the oxidation of biological thiols (Figure 1C). Recently, a paper [15] demonstrated the formation of $O_2^{\cdot-}$ when bisdiimine copper(II) chelates were reduced by ascorbate. However, the pathway by which Cu^{II} is reduced to Cu^I has not yet been described; therefore, in this work, we present a strategy to understand this reduction process and determine the possible intermediate.

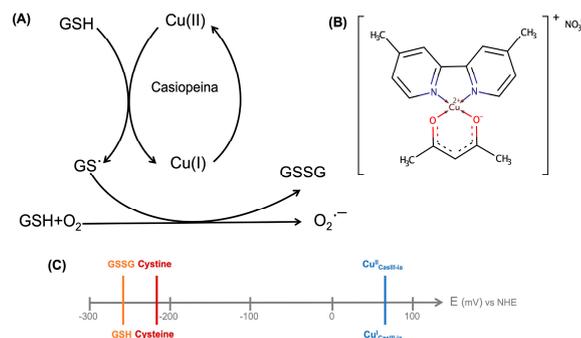


Figure 1. (A) The hypothesis of the interaction between the Casiopeina family and a thiolated reductor [6]. (B) CasIII-ia structure. (C) The redox potential of thiol-containing biomolecules and CasIII-ia.

These observations suggest the importance of copper complexes, such as the Casiopeinas, to oxidate thiol residues, inducing mitochondrial damage [6]. From the above considerations, in the present work, we study the specific interaction between cysteine and CasIII-ia to understand the pathway leading to a final reduction of the copper metal center and the disulfide bond formation. We focused on Cys, the reactive site of GSH, because it reacts slower than GSH in solution, and standard analytic techniques can detect its reactive intermediates. Additionally, we used mechanochemical methods to reduce the oxidation reaction rate. The family of Casiopeinas[®] [16] was designed considering three elements: copper(II) as a central metal and two mixed ligands with several substituents, providing to copper the possibility of producing cytotoxicity through different mechanisms of action [17]. Ligands modify the cationic copper's transport properties [18], the electronic properties of the central metal [19], and the molecular recognition of the complex [20]. The Casiopeina activity goes along with the cytotoxic effects, such as the generation of reactive oxygen species (ROS) [21,22], which can damage cellular components through oxidation and alter the oxidation-reduction balance cell or interfere with the mechanisms of cellular signaling related to the redox state [23]. There are reports about the antiproliferative and antineoplastic activities over murine and xenografted human tumors [24,25]. On the other hand, survival was evaluated in murine models: L1210 (leukemia), S180 (sarcoma), and B16 (melanoma) [26]. In non-tumor cells, the mean inhibitory concentration of this compound was 4.7, determined in lymphocytes, approximately 250 times higher than that observed in tumor lines, suggesting a selectivity towards tumoral cells [27]. Additionally, pharmacokinetic analyses performed with rat urine [28] and dog blood [29] samples have proved a high elimination rate of the Casiopeinas. All these results indicate an increase in the in vivo activity of the compound CasIII-ia, concerning the cisplatin activity as a positive control, evaluated in the same system. Our group has investigated the relationship between the metal complex and their activity. A QSAR study showed that the half-wave potential and aromatic ring in the molecule are relevant for the compounds' action [14].

Other derived models can predict mixed chelate copper complexes' degree of activity based on the chemical correlation between structure, EPR, and electrochemical behavior,

supported by DFT calculations [19]. We also developed a regression model to reproduce the antiproliferative activity involving the atomic delocalization and dipole moment changes within the ligands' C-N bonds [30]. These bonds are also determinant for the recognition site of copper complexes by the DNA backbone [20].

2. Results and Discussion

In solution, the endogenous reductant species, such as GSH, react very fast with Casiopeinas to be detected by standard analytical methods. For this reason, we decided to focus on the reactive site of GSH and Cys, and perform the reaction process in the solid state to observe the steps occurring in the Cys oxidation process. It has been reported that the Cys redox reaction barrier is smaller than the GSH one and also that the redox process is faster than any ligand exchange. In this way, Cys is an acceptable model of GSH for the process catalyzed by the CasIII-ia.

The CasIII-ia was prepared by the patent procedure [31–33]. To prove the inclusion of Cys in the copper coordination sphere and determine the features of the $[\text{Cu}^{\text{II}}]$ -Cys interaction, we performed powder X-ray diffraction (PXRD), electronic spectra (UV-Vis-NIR), infrared spectroscopy (FTIR), electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR), and mass spectra-direct analysis in real-time (MS-DART) analyses. To understand the structural evolution of the $[\text{Cu}^{\text{II}}]$ -Cys adduct, we carried out a DFT computational analysis for the copper reduction process.

The reaction between equimolar solutions of Cys (colorless) and CasIII-ia (blue) showed color changes from brown/green to blue color (see the Movie S1 in the Supplementary Materials), and the same observations were reported by Seko et al. [34] and Ugone et al. [35]. EPR spectra of fresh mixtures of two CasIII-ia and Cys stoichiometric solutions were recorded at 77 K. Figure 2 shows the copper electronic environment change of CasIII-ia when it interacts with Cys. Therefore, it is proposed that CasIII-ia generates a $[\text{Cu}^{\text{II}}]$ -Cys adduct before its reduction. However, the reaction's rapid kinetics avoids studying the $[\text{Cu}^{\text{II}}]$ -Cys adduct in solution using this technique. Then, we opted to change the conditions to reduce the reaction rate with a mechanochemical solid-state approach. CasIII-ia and Cys were milled until a homogenous solid mixture was obtained, EtOH was added, and was mixed until dryness. During the mechanical process, it was possible to observe a color change, from Pantone 2139c to Pantone 289c (Figure 3), that can be associated with Cys' coordination to CasIII-ia. It was impossible to isolate and purify the reaction intermediates; therefore, we used several techniques to identify them within the reaction mixture.

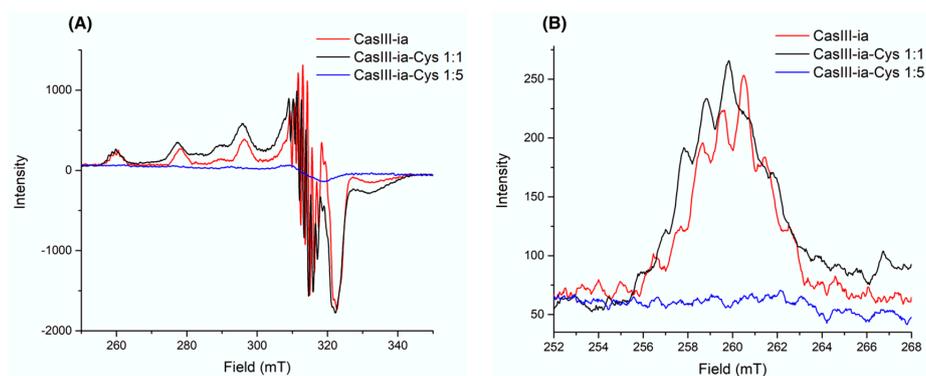


Figure 2. Experimental EPR spectra for CasIII-ia (1 mM) in red, CasIII-ia-Cys (1:1) in black, and CasIII-ia-Cys (1:5) in blue, in MeOH/H₂O (1:1) frozen solution at 77 K. (A) From 250 to 350 mT, and (B) from 252 to 268 mT.

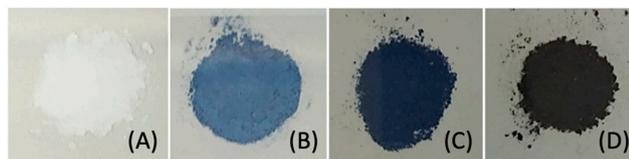


Figure 3. Reactant and intermediates of the mechanochemical solid-state reaction process: (A) cysteine (white), (B) CasIII-ia (Pantone 2139c), (C) intermediate 1 (Pantone 289c), and (D) intermediate 2 (Pantone 532c).

First, we analyzed the powder X-Ray diffraction patterns of the reactants and the reaction mixture. The crystal square pyramid structure of CasIII-ia has been reported in a previous description (CCDC 1440021). Supplementary Figure S1 shows the diffraction pattern of the reaction mixture and the two reactants. It is possible to observe that the crystalline arrangement is conserved. Some remnant signals can be associated with the Cys and the CasIII-ia; however, some signals are no longer present, such as the 7.9 intense signals in 2θ . On the other hand, new signals are presented, such as 11.24, 12.12, 17.18, 25.94, 32.58, 33.02, 37.92, and 38.58 (see Supplementary Materials for details). These peaks confirm a new species that still have copper(II) as a metal center.

The second evidence of the presence of a new copper(II) complex is the UV-Vis spectrum of the reaction mixture, as shown in Figure 4. The reaction mixture spectrum resembles that for CasIII-ia–Cys, with maxima at 395 and 598 nm. The latter can be associated with the electronic transitions of an elongated D_{4h} octahedral structure. The simulated spectra show that the signals of two possible CasIII-ia–Cys adduct arrangements, octahedral (axial Cys) and square planar pyramid (equatorial Cys), are very close to the experimental ones, 626 and 663 nm, respectively. The deconvolution of the two observed signals agrees with three theoretical excited states of octahedral and square planar pyramid geometries. These signals are mainly related to the transition to SOMO or LUMO molecular orbitals (for octahedral geometry: SOMO-20 \rightarrow SOMO, SOMO-16 \rightarrow SOMO, and SOMO-16 \rightarrow LUMO; for square planar pyramid: SOMO-18 \rightarrow SOMO, SOMO-18 \rightarrow LUMO, and SOMO-15 \rightarrow LUMO). Details are provided in the Supplementary Materials.

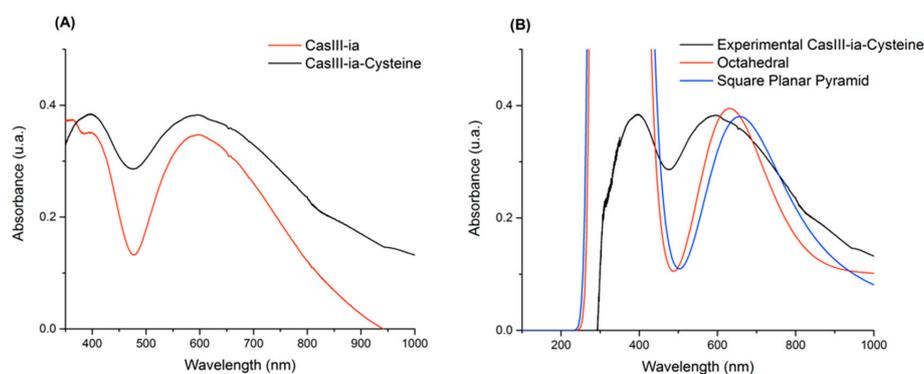


Figure 4. (A) UV-Vis spectra for CasIII-ia (red) and the reaction between CasIII-ia and cysteine (black). (B) UV-Vis spectra comparison between experimental reaction (black) and calculated geometries for the CasIII-ia–Cysteine system: octahedral (red) and square planar pyramid (blue).

The third evidence of the interaction between CasIII-ia and Cys is the EPR data. Figure 5 shows the experimental spectra and fitting models of CasIII-ia (A) and CasIII-ia–Cys (B). Table 1 presents experimental and computational values for the g and A tensors

of the spectra in Figure 5. We compared the observed spectra with DFT simulations of octahedral and square planar pyramid structures. CasIII-ia shows an axial symmetry spectrum associated with a square planar pyramid geometry. The reaction product is a 1:1 CasIII-ia/CasIII-ia-Cys mixture in the solid state. The linear combination of the axial and isotropic EPR profiles of CasIII-ia and CasIII-ia-Cys reproduce the experimental spectrum. The axial symmetry can be associated with geometry with a pseudo-Jahn-Teller effect, where a Cys occupies the axial position of CasIII-ia. The difference between the experimental and theoretical g values ranges from 0.004 to 0.10, and for A values, from 25 to 98 MHz. These differences agree with that obtained in other reports [36,37]. For the CasIII-ia-Cys, we compared the experimental data with two different geometries: octahedral and square planar pyramid. The difference between the experimental and theoretical data is 0.004 and 0.030 for g_{iso} , respectively. The A_{iso} value differences are 56 and 25 MHz, respectively. The best fit for g_{iso} corresponds to octahedral geometry, while for A_{iso} it is given by the square planar pyramid.

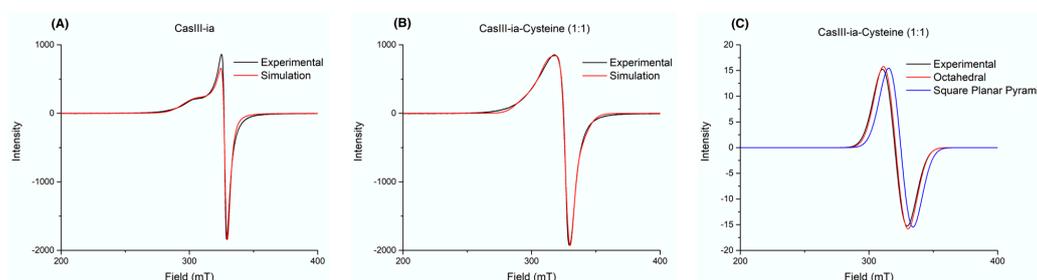


Figure 5. EPR spectra in the solid-state for (A) CasIII-ia and (B) CasIII-ia with cysteine reaction, and (C) comparison between experimental reaction and calculated geometries for the CasIII-ia-Cysteine system.

Table 1. Experimental and computational values for the g tensor and the A tensor (in MHz) parameters of spectra A and B in Figure 5.

CasIII-ia (A)			
	Experimental		Computational
$g_{xx} = g_{yy}$	2.0767		2.0466
g_{zz}	2.2517		2.1458
$A_{xx} = A_{yy}$	7.47		105.26
A_{zz}	117.4		−185.99
CasIII-ia-Cysteine 1:1 (B)			
	Experimental	Octahedral	Square Planar Pyramid
$g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$	2.10557	2.1010	2.0755
$A_{xx} = A_{yy} = A_{zz}$	48.797	104.57	23.85

The fourth evidence of the Cu–S interaction is the I.R. signals presented in the Supplementary Materials. Since cysteine is a molecule of biological interest, its solid-state vibrational spectra have been extensively studied, considering the polymorphisms that it can show [38] and the I.R. modifications with different protonation modes [39]. The Cys I.R. signals S–H (1063 cm^{-1}), C–S (692 cm^{-1}), and C–N (291 cm^{-1}) [38], agreeing with theoretical frequencies (1056.73 , 669.99 , and 278 cm^{-1} , respectively), yield the most significant changes when interacting with the copper complex. In the case of CasIII-ia, the Cu–O and C–N bonds' I.R. signals appear at 596 and 294 cm^{-1} (603.88 and 279.73 cm^{-1} theoretical values), respectively. The 1:1 solid reaction mixture, with drops of EtOH, produces an adduct which presents I.R. signal variations as evidence of the CasIII-ia–Cys interaction (Figure 6). Based

on computational information (179 and 194 cm^{-1} for octahedral and SPP theoretical values, respectively), we can assign the frequency at 187 cm^{-1} to the Cu–S interaction between CasIII-ia and Cys. It is possible to note signals associated with the metal–ligand interaction within CasIII-ia, such as Cu–O (594 cm^{-1}) and Cu–N (289 cm^{-1}). Cu–N weakened after Cys coordination from 294 to 289 cm^{-1} . The weakening of the C–S bond is shown by reducing the frequency from 692 to 685 cm^{-1} . One can observe a small S–H at 1063 cm^{-1} as evidence of unreacted Cys.

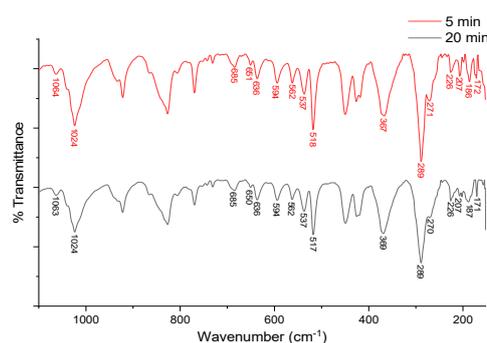


Figure 6. ATR-FTIR spectrum of CasIII-ia–Cys (1:1) mixture at 5 (red) and 20 (black) minutes.

After NaOH was added in an equimolar amount, S–H frequency, at 1063 cm^{-1} , disappeared, but the C–S and Cu–O vibrations remain. We confirmed that Cu–S interaction is associated with the 187 cm^{-1} frequency. These signals correlate with those exhibited by octahedral theoretical geometry. Details are provided in the Supplementary Materials.

Our last evidence is from the direct analysis in real-time mass spectrometry (DART-MS). Under positive ionization of the DART technique, it has been reported that the amino-acid presents protonation, radical, and adduct formation [40]. In the Cys case, it is possible to observe $[\text{Cys} + \text{H}]^+ = 122 \text{ m/Z}$ and $[2\text{Cys} + \text{H} + \text{H}] = 243 \text{ m/Z}$. The mechanochemical solid-state mixture was analyzed using DART-MS, whose spectrum is presented in Figure 7. It is possible to observe the signal associated with dimethylbipyridine ($\text{m/Z} = 185.1$), $\text{Cu}(\text{acetylacetonate})_2$ ($\text{m/Z} = 262$), and CasIII-ia ($\text{m/Z} = 346$). At 200 °C, we found a signal of $\text{m/Z} = 423$ corresponding to the CasIII-ia–Cys adduct, with a loss of carboxylic group. It has been reported that Cys loses CO in situations where the sulfur atom is involved in a bond or a strong interaction. The fragmentation pattern of Cys by DART-MS and cystine by TANDEM-MS both present the $[\text{Cistina-H}_2\text{O-CO} + \text{H}]$ ion with $\text{m/Z} = 195$ when the CO loss can be observed [41,42]. The presence of the signals at 346 and 348 for CasIII-ia, at 262 and 264 for $\text{Cu}(\text{acetylacetonate})_2$, and at 422.99 and 424.98 for the adduct agree with the isotopic distribution for ^{63}Cu and ^{65}Cu observed in a copper(II) species. The abundance of each peak can be related to the stability of the analyzed species [43]. In this way, the adduct is an unstable species compared with the CasIII-ia.

To understand the pathway leading to a final reduction of the copper metal center, we calculated the structures and their dynamics. The two possible molecular arrangements of the CasIII-ia–Cys adduct are the octahedral and the square planar pyramid (Figure 8). In the former, the sulfur atom occupies an axial coordination position at 2.82 Å Cu–S distance. The latter presents the sulfur atom located in an equatorial position, at 2.37 Å Cu–S distance. The square planar pyramid is 4.9 kcal/mol more stable than octahedral geometry.

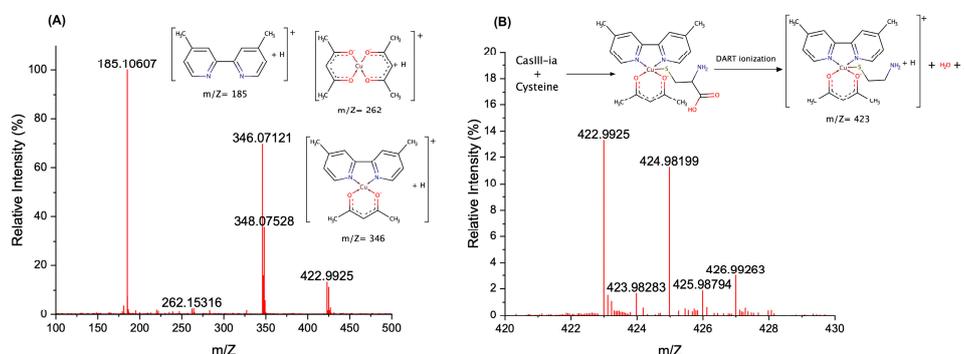


Figure 7. DART spectra of the mechanochemical solid-state mixture CasIII-ia-Cys at 200 °C. (A) From 100 to 500 m/z, and (B) from 420 to 430 m/z.

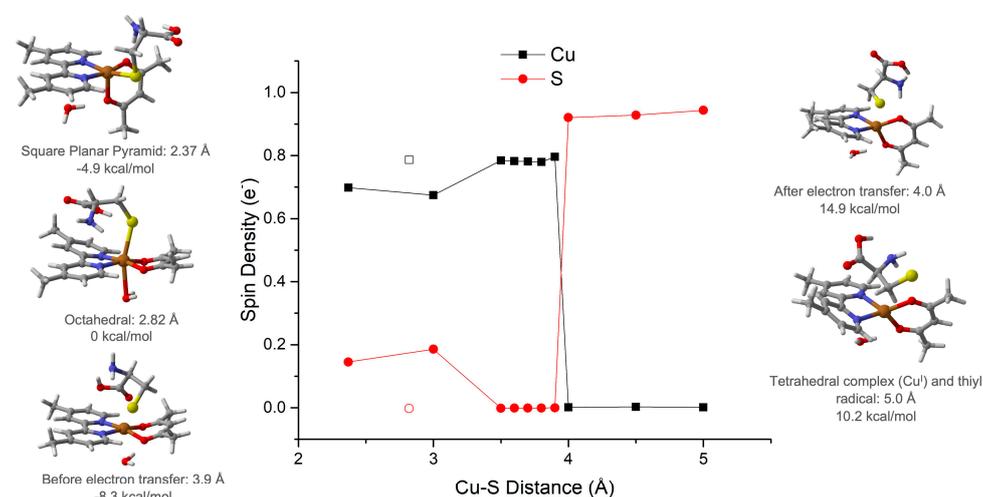


Figure 8. From square planar pyramidal Cu^{II} complex to tetrahedral Cu^{I} complex, electron transfer path. Spin density values for copper atom in black and for sulfur atom in red.

The reductive process's reaction path begins from the Cys coordination to CasIII-ia in the square planar pyramidal geometry, and it is presented in Figure 8, along with the atomic spin population. From the initial 2.37 Å, the Cu-S distance increases until 3.9 Å, where the electron is transferred from sulfur to the copper atom. It is possible to observe a spin population change from 0.78 to 0.001 e^- in the copper atom, which is transferred to the sulfur atom, which shows an increase from 0.00 to 0.94 e^- . In this process, the copper valence shell changes, and then the geometry of the complex becomes tetrahedral. Our group has previously reported the spin change effect on the metal valence shell and thus on the complex structure [44,45]. From this point, the thiyl radical is free to participate in the following reaction to form the disulfide bond. Details are provided in the Supplementary Materials.

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals

All reagents: acetylacetone (acacH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine (dmbpy) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), as the organic solvents, were used without further purification. L-cysteine (Cys) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was also used without further purification. The elemental analysis of the white crystalline powder for $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{S}$ was %C 29.82 (29.73), %H 5.92(5.82), %N 11.70 (11.56), %S 26.97 (26.46) (# calculated values). The far FTIR-ATR spectrum of a deep white powder of Cys showed characteristic bands at 1614 cm^{-1} CO_2 , 1063 cm^{-1} S-H, 692 cm^{-1} C-S, and 637 cm^{-1} CH- CO_2 .

3.2. CasIII-ia Synthesis

$[\text{Cu}(\text{4,4'-(dimethyl-2,2'-bipyridine)}(\text{acetylacetonate}))\text{NO}_3^*(\text{H}_2\text{O})_2]$ (CasIII-ia) CAS [223930-33-4], the copper(II) complex, was prepared following the reported patent [31–33]. The complex was isolated on MeOH/ H_2O solution, and a blue crystalline powder was obtained. The elemental analysis of the blue powder for $\text{CuC}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5^*(\text{H}_2\text{O})_2$ was %C 44.26 (45.89), %H 4.79(5.21), and %N 9.45 (9.44) (# calculated values). The far FTIR-ATR spectrum of a deep blue powder of CasIII-ia showed characteristic bands at 1616 cm^{-1} C=O (acac), 1373 cm^{-1} N-O (nitrate), 596 cm^{-1} Cu-O, and 294 cm^{-1} Cu-N.

3.3. Solid-State Reaction

CasIII-ia (30 mg, 0.0674 mmol) and cysteine (8.17 mg, 0.0674 mmol) were milled until a homogenous solid was obtained. EtOH (400 μL) was added and mixed until dryness.

3.4. Measurements

Powder X-ray diffraction (PXRD) data were collected under ambient conditions on a Rigaku ULTIMA IV diffractometer operated at 160 W (40 kV, 40 mA) for Cu $\text{K}\alpha_1$ ($\lambda = 1.5406\text{ \AA}$).

Electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) measurements were carried out in a JEOL JES-TE300 spectrometer operated at X-Band mode at a microwave frequency of 9.4 GHz and center field of 300 mT. Solid-state measurements were performed at room temperature, where the samples were placed in a quartz cell. The acquisition and manipulation of spectra were performed using the ES-IPRIT/TE program. The g and hyperfine tensors were determined by fitting the powder spectra using the EasySpin [46] simulation package (Version 5.2.28, easyspin.org, (accessed on 6 May 2020)) for MATLAB R2019b.

The solid-state electronic spectra (UV-Vis-NIR) for the samples were measured over the range $40,000\text{--}5000\text{ cm}^{-1}$ by the diffuse reflectance method on a Cary-5000 Varian spectrophotometer at room temperature.

The near-FTIR attenuated total reflectance (ATR) spectra were obtained over the range $4000\text{--}250\text{ cm}^{-1}$ on a Thermo Fisher Scientific Nicolet IS-50 spectrophotometer. The samples were examined as solid. The middle-FTIR spectra were obtained over the range $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ on a Nicolet spectrophotometer Nicolet AVATAR 320. The samples were analyzed as KBr disk.

The MS-DART spectra were acquired with a JEOL AccuTOF JMS-T100LC spectrometer. The samples were examined as solid. The values of the signals are expressed in mass/charge units (m/Z), followed by the relative intensity with reference to a 100% base peak.

The elemental analysis (EA) was carried out using The PerkinElmer® 2400 Series II CHNS/O Elemental Analyzer.

3.5. Computational Details

All structures were fully optimized at the DFT level in gas phase, with the m05-2x functional and the LanL2DZ basis set, as implemented in Gaussian 09 software [47]. Then, we performed frequency calculations to verify the equilibrium states and to obtain infrared spectra. We used the TD-DFT CAM-B3LYP/SDD theoretical level for the UV-Vis spectra,

with the SMD solvation model, with water as the solvent. For the electron transfer studies, we used the Quantum Theory of Atoms In Molecules [48], using the set of molecular orbitals of each molecule to compute the atomic properties of the electron density with the AIMAll software [49]. EPR parameters and g and A tensors of the optimized structures were calculated with ORCA software [50], using the B3LYP functional and the def2-SVP basis set.

The initial complex presented a square planar geometry with a water molecule in one axial site, as in the reported crystallographic geometry [51]. Then, a cysteine molecule was linked to the complex by the vacant axial site, yielding an octahedral geometry. A base in the environment removes the -SH proton, expelling the water molecule from the opposite side. We detected the electron transfer by the complex change to a tetrahedral geometry, which is the geometry preferred by a copper atom with a $1+$ oxidation state.

4. Conclusions

A strategy to improve cancer therapies' efficacy should involve cytosolic and mitochondrial GSH depletion through an increase of GSH efflux out of cells. There are reports of GSH depletion produced by copper complexes of the Casiopeina family. In this work, we presented experimental evidence of the formation of an adduct between cysteine and a Casiopeina complex. This adduct shows equilibrium between octahedral and square planar pyramidal structures. From this equilibrium, it is possible to identify an electron transfer path when the Cu-S distance increases to 3.9 Å, which produces a thiyl radical and a reduced tetrahedral copper(I) complex. The proposed mechanism is presented in Figure 9.

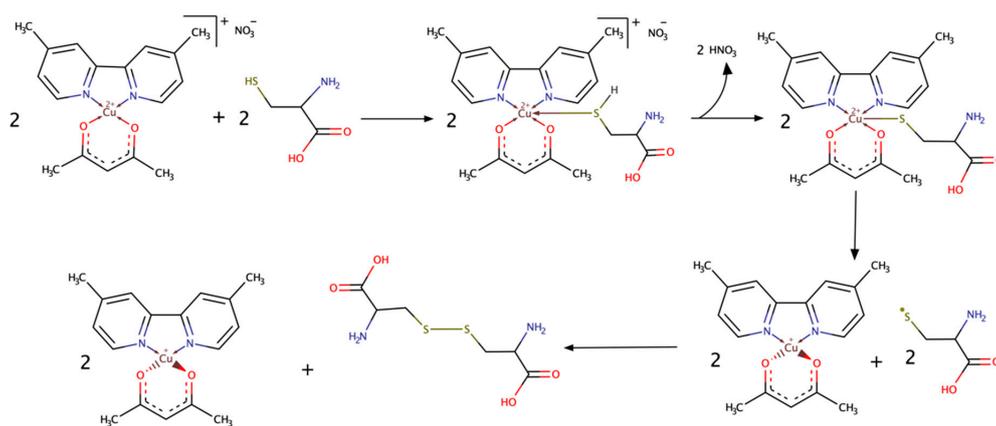


Figure 9. Proposed mechanism for the interaction between CasIII-ia and cysteine.

Supplementary Materials: The following are available online, Video S1: Reaction in solution. Experimental Details: Figure S1: Powder X-ray diffraction, Table S1: Powder X-ray diffraction (PXRD) data, Table S2: Experimental EPR parameters, Figure S2: Details of the CasIII-ia:Cysteine (1:1) EPR simulation, Figure S3: Deconvoluted UV-Vis spectra, Table S3: Comparison between deconvoluted and computational values for UV-Vis transitions, Figures S4–S7: Details of ATR-FTIR spectra, Table S4: Main absorption infrared signals, Figures S8 and S9: MS-DART spectra for reactants, computational calculations: optimized geometries, Figures S10–S14: UV-Vis spectra, Figures S15–S17: Infrared spectra, Tables S5–S8: Infrared signals, Table S9: Calculated EPR parameters, Figure S18: Spin density changes, Table S10: Spin density values for Cu and S atoms, Figure S19: Spin density changes in Cu-S bond distance scan, Figure S20: Geometries in the Cu-S bond distance scan, Figures S21 and S22: Copper Atomic graphs.

Author Contributions: L.G.R.-P.: methodology, formal analysis, investigation, data curation, writing—original draft preparation, and writing—review and editing; A.E.-G.: methodology, formal analysis, investigation, data curation, writing—original draft preparation, and writing—review and editing; F.N.-C.: investigation; A.E.L.-G.: investigation; V.G.-V.: methodology; F.C.-G.: conceptualization, writing—original draft preparation, writing—review and editing, supervision, project administration, and funding acquisition; L.R.-A.: conceptualization, writing—original draft preparation, writing—review and editing, supervision, project administration, and funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by UNAM (PAPIIT-IN212520, PAPIIT IN218013, and PAIP 5000-9047) and CONACYT (CB179119). F.N.-C. and A.E.L.-G. thank SNI (grant “Ayudantes de Investigador Nacional SNI III/Emérito”) and L.G.R.-P. thanks CONACyT for the fellowship (308338). We also thank DGTIC-UNAM (LANCAD-UNAM-DGTIC-194) for supercomputer time and USAII-UNAM for elemental analysis.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article and Supplementary Material.

Acknowledgments: The authors thank I.A. Ibarra-Alvarado and E. Sánchez-González for PXRD determinations, M. C. García for MS-DART determinations, and R. Patiño Maya for I.R. determinations.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

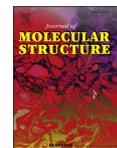
Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

References

1. Baba, S.P.; Bhatnagar, A. Role of thiols in oxidative stress. *Curr. Opin. Toxicol.* **2018**, *7*, 133–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Aquilano, K.; Baldelli, S.; Ciriolo, M.R. Glutathione: New roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*, 196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ulrich, K.; Jakob, U. The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *140*, 14–27. [[CrossRef](#)]
4. Ortega, A.L.; Mena, S.; Estrela, J.M. Glutathione in Cancer Cell Death. *Cancers* **2011**, *3*, 1285–1310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Bansal, A.; Simon, M.C. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *J. Cell Biol.* **2018**, *217*, 2291–2298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kachadourian, R.; Brechbuhl, H.M.; Ruiz-Azuara, L.; Gracia-Mora, I.; Day, B.J. Casiopeína IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology* **2010**, *268*, 176–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Millis, K.K.; Weaver, K.H.; Rabenstein, D.L. Oxidation/Reduction Potential of Glutathione. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4144–4146. [[CrossRef](#)]
8. Jocelyn, P.C. The Standard Redox Potential of Cysteine-Cystine from the Thiol-Disulphide Exchange Reaction with Glutathione and Lipoic Acid. *Eur. J. Biochem.* **1967**, *2*, 327–331. [[CrossRef](#)]
9. Ngamchuea, K.; Batchelor-McAuley, C.; Compton, R. The Copper(II)-Catalyzed Oxidation of Glutathione. *Chem.—Eur. J.* **2016**, *22*, 15937–15944. [[CrossRef](#)]
10. Kachur, A.V.; Koch, C.J.; Biaglow, J.E. Mechanism of copper-catalyzed autoxidation of cysteine. *Free Radic. Res.* **1999**, *31*, 23–34. [[CrossRef](#)]
11. Prudent, M.; Girault, H.H. The role of copper in cysteine oxidation: Study of intra- and inter-molecular reactions in mass spectrometry. *Metallomics* **2009**, *1*, 157–165. [[CrossRef](#)]
12. Carrasco-Pozo, C.; Aliaga, M.E.; Olea-Azar, C.; Speisky, H. Double edge redox-implications for the interaction between endogenous thiols and copper ions: In vitro studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9795–9803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Smith, R.C.; Reed, V.D.; Hill, W.E. Oxidation Of Thiols By Copper(II). *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* **1994**, *90*, 147–154. [[CrossRef](#)]
14. Bravo-Gómez, M.E.; García-Ramos, J.C.; Gracia-Mora, I.; Ruiz-Azuara, L. Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N–N)(acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N–N)(glycinato)]NO₃ complexes, (Casiopeínas[®]). *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 299–309. [[CrossRef](#)]
15. Santoro, A.; Calvo, J.S.; Peris-Díaz, M.D.; Krężel, A.; Meloni, G.; Faller, P. The Glutathione/Metallothionein System Challenges the Design of Efficient O₂-Activating Copper Complexes. *Angew. Chem.-Int. Ed.* **2020**, *59*, 7830–7835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ruiz-Azuara, L. México Título de Marca: Casiopeína. Reg. 407543 SECOFI, 1992.
17. Arredondo, M.; Núñez, M.T. Iron and copper metabolism. *Mol. Asp. Med.* **2005**, *26*, 313–327. [[CrossRef](#)]
18. Bravo-Gómez, M.E.; Dávila-Manzanilla, S.; Flood-Garibay, J.; Muciño-Hermández, M.Á.; Mendoza, Á.; García-Ramos, J.C.; Moreno-Esparza, R.; Ruiz-Azuara, L. Secondary Ligand Effects on the Cytotoxicity of Several Casiopeína’s Group II Compounds. *J. Mex. Chem. Soc.* **2012**, *56*, 85–92. [[CrossRef](#)]

19. García-Ramos, J.C.; Galindo-Murillo, R.; Tovar-Tovar, A.; Alonso-Saenz, A.L.; Gómez-Vidales, V.; Flores-Álamo, M.; Ortiz-Frade, L.; Cortes-Guzmán, F.; Moreno-Esparza, R.; Campero, A.; et al. The π -Back-Bonding Modulation and Its Impact in the Electronic Properties of CuII Antineoplastic Compounds: An Experimental and Theoretical Study. *Chem.—Eur. J.* **2014**, *20*, 13730–13741. [[CrossRef](#)]
20. Galindo-Murillo, R.; Ruiz-Azuara, L.; Moreno-Esparza, R.; Cortés-Guzmán, F. Molecular recognition between DNA and a copper-based anticancer complex. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 15539–15546. [[CrossRef](#)]
21. Klaunig, J.E.; Kamendulis, L.M. The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *44*, 239–267. [[CrossRef](#)]
22. Gaetke, L.M.; Chow, C.K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* **2003**, *189*, 147–163. [[CrossRef](#)]
23. Huang, R.; Wallqvist, A.; Covell, D.G. Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: Putative mode of action. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 1009–1039. [[CrossRef](#)]
24. Carvallo-Chaigneau, F.; Trejo-Solís, C.; Gómez-Ruiz, C.; Rodríguez-Aguilera, E.; Macías-Rosales, L.; Cortés-Barberena, E.; Cedillo-Peláez, C.; Gracia-Mora, I.; Ruiz-Azuara, L.; Madrid-Marina, V.; et al. Casiopeína III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *BioMetals* **2008**, *21*, 17–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bravo-Gómez, M.E.; Hernández de la Paz, A.L.; Gracia-Mora, I. Antineoplastic evaluation of two mixed chelate copper complexes (Casiopeínas[®]) in HCT-15 xenograft model. *J. Mex. Chem. Soc.* **2013**, *57*, 205–211. [[CrossRef](#)]
26. Ruiz-Azuara, L.; Bravo-Gómez, M.E. Copper Compounds in Cancer Chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 3606–3615. [[CrossRef](#)]
27. García-Ramos, J.C.; Gutiérrez, A.G.; Vázquez-Aguirre, A.; Toledano-Magaña, Y.; Alonso-Sáenz, A.L.; Gómez-Vidales, V.; Flores-Álamo, M.; Mejía, C.; Ruiz-Azuara, L. The mitochondrial apoptotic pathway is induced by Cu(II) antineoplastic compounds (Casiopeínas[®]) in SK-N-SH neuroblastoma cells after short exposure times. *BioMetals* **2017**, *30*, 43–58. [[CrossRef](#)]
28. Vértiz, G.; García-Ortuño, L.E.; Bernal, J.P.; Bravo-Gómez, M.E.; Lounejeva, E.; Huerta, A.; Ruiz-Azuara, L. Pharmacokinetics and hematotoxicity of a novel copper-based anticancer agent: Casiopeína III-Ea, after a single intravenous dose in rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2014**, *28*, 78–87. [[CrossRef](#)]
29. Cañas-Alonso, R.C.; Fuentes-Noriega, I.; Ruiz-Azuara, L. Pharmacokinetics of Casiopeína IIgly in beagle dog: A copper based compound with antineoplastic activity. *J. Bioanal. Biomed.* **2010**, *2*, 28–34. [[CrossRef](#)]
30. Ramírez-Palma, L.G.; García-Jacas, C.R.; García-Ramos, J.C.; Almada-Monter, R.; Galindo-Murillo, R.; Cortés-Guzmán, F. Pharmacophoric sites of anticancer metal complexes located using quantum topological atomic descriptors. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1204*, 127480. [[CrossRef](#)]
31. Ruiz-Azuara, L. Process to Obtain New Mixed Copper Aminoacidate from Methylate Phenanthroline Complexes to Be Used as Anticancerogenic Agents. U.S. Patent 5,576,326, 19 November 1996.
32. Ruiz-Azuara, L. Procedimiento para la Obtención de Complejos Metálicos como Agentes Anticancerígenos. Tipo II. Patente de invención SECOFI 18801, 1994.
33. Ruiz-Azuara, L. Composición Parental de Casiopeína y usos de la Misma. IMPI No. Solicitud MX/a/2017/016444, 2017.
34. Seko, H.; Tsuge, K.; Igashira-Kamiyama, A.; Kawamoto, T.; Konno, T. Autoxidation of thiol-containing amino acid to its disulfide derivative that links two copper(II) centers: The important role of auxiliary ligand. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1962–1964. [[CrossRef](#)]
35. Ugone, V.; Pisanu, F.; Sanna, D.; Garribba, E. Interaction of the potent antitumoral compounds Casiopeínas[®] with blood serum and cellular bioligands. *J. Inorg. Biochem.* **2021**, *224*, 111566–111576. [[CrossRef](#)]
36. Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Lomeli, I.; García, J.E.; Barrios, E.; Teloxa, S.; Vela, A.; Quintanar, L. Spectroscopic and Electronic Structure Studies of Copper(II) Binding to His111 in the Human Prion Protein Fragment 106-115: Evaluating the Role of Protons and Methionine Residues. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 1956–1972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ames, W.M.; Larsen, S.C. DFT calculations of the EPR parameters for Cu(II) DETA imidazole complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 8266–8274. [[CrossRef](#)]
38. Parker, S.F. Assignment of the vibrational spectrum of L-cysteine. *Chem. Phys.* **2013**, *424*, 75–79. [[CrossRef](#)]
39. Gaillard, T.; Trivella, A.; Stote, R.H.; Hellwig, P. Far infrared spectra of solid state L-serine, L-threonine, L-cysteine, and L-methionine in different protonation states. *Spectrochim. Acta-Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *150*, 301–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Sekimoto, K.; Sakakura, M.; Kawamukai, T.; Hike, H.; Shiota, T.; Usui, F.; Bando, Y.; Takayama, M. Ionization characteristics of amino acids in direct analysis in real time mass spectrometry. *Analyst* **2014**, *139*, 2589–2599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Zhang, P.; Chan, W.; Ang, I.L.; Wei, R.; Lam, M.M.T.; Lei, K.M.K.; Poon, T.C.W. Revisiting Fragmentation Reactions of Protonated α -Amino Acids by High-Resolution Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry with Collision-Induced Dissociation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Zhang, P.; Chan, W.; Ang, I.L.; Wei, R.; Lam, M.M.T.; Lei, K.M.K.; Poon, T.C.W. Gas-Phase Fragmentation Reactions of Protonated Cysteine using High-Resolution Tandem Mass Spectrometry. *Molecules* **2019**, *24*, 747. [[CrossRef](#)]
43. Nicolescu, T.O. Interpretation of Mass Spectra. In *Mass Spectrometry*; Aliofkhazraei, M., Ed.; In Tech Open: Rijeka, Croatia, 2017; pp. 30–40.

44. Gutiérrez-Arzaluz, L.; Ramírez-Palma, D.I.; Ramírez-Palma, L.G.; Barquera-Lozada, J.E.; Peon, J.; Cortés-Guzmán, F. Origin of the Photoinduced Geometrical Change of Copper(I) Complexes from the Quantum Chemical Topology View. *Chem.—Eur. J.* **2019**, *25*, 775–784. [[CrossRef](#)]
45. Ramírez-Palma, D.I.; Cortes-Guzman, F. From Linnett-Gillespie Model to the Polarization of the Spin Valence Shells of Metals in Complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 24201–24212. [[CrossRef](#)]
46. Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **2006**, *178*, 42–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.A.; et al. *Gaussian 09 (Revision E.01)*; Gaussian Inc.: Wallingford, CT, USA, 2009.
48. Bader, R. *Atoms in Molecules. A Quantum Theory*, 1st ed.; Oxford University Press: New York, NY, USA, 1990.
49. Keith, T.A. AIMAll (Version 16.01.09), TK Gristmill Software, Overland Park, KS, USA, 2016. Available online: aim.tkgristmill.com (accessed on 23 June 2021).
50. Neese, F. The ORCA program system. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2*, 73–78. [[CrossRef](#)]
51. García-Ramos, J.C.; Tovar-Tovar, A.; Hernández-Lima, J.; Cortés-Guzmán, F.; Moreno-Esparza, R.; Ruiz-Azuara, L. A new kind of intermolecular stacking interaction between copper (II) mixed chelate complex (Casiopeína III-ia) and adenine. *Polyhedron* **2011**, *30*, 2697–2703. [[CrossRef](#)]



Pharmacophoric sites of anticancer metal complexes located using quantum topological atomic descriptors

Lillian G. Ramírez-Palma^{a, b}, César R. García-Jacas^c, Juan C. García-Ramos^d,
Ricardo Almada-Monter^a, Rodrigo Galindo-Murillo^e, Fernando Cortés-Guzmán^{a, b, *}

^a Instituto de Química, Universidad Nacional, Autónoma de México, Av. Universidad 3000, C.U. México City, 04510, Mexico

^b Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEMex-UNAM, Carretera Toluca-Atlaquilco Km. 14.5, Toluca, 50200, Mexico

^c Cátedras CONACYT – Departamento de Ciencias de la Computación, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada, Baja California, 22860, Mexico

^d Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Zertuche y Blvd. de los Lagos s/n Fracc. Valle Dorado, Ensenada, Baja California, 22890, Mexico

^e Department of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, University of Utah, 2000 East 30 South Skaggs 201, Salt Lake City, UT, 84112, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 October 2019

Received in revised form

21 November 2019

Accepted 25 November 2019

Available online 29 November 2019

Keywords:

QSAR

QCT

QTAIM

Cooper complex

Cancer

Quantum topological

Atomic descriptors

ABSTRACT

In this paper, we present a new set of topological atomic descriptors (TAD) to identify pharmacophoric sites, using the anti-tumoral activities of metal copper (II) complexes. To this end, multiple linear regression-based models were built using TAD. These descriptors are related with the atomic electronic population, localization and delocalization, dipolar moment and quadrupole moment, and describe the way in which the atoms donate, accept or share electron density and how the electron density is polarized within an atomic domain. The regression models were built to reproduce the antiproliferative activity on two tumor human cells lines. Usually, the activity analysis of a metal complex focuses on the metal center features, but the ligands have a definitive role on the molecular recognition of the complexes by the biomolecules. In this case, the best models selected are those involving the changes of the delocalization and dipole moments of atoms within the C–N bonds of the ligands. These changes correlate with the antiproliferative activity and, thus, it allows to identify the C–N bonds as the pharmacophoric site of the copper complexes. These bonds are determinant for the recognition site of copper complexes by DNA backbone, as found in a previous molecular dynamics study performed by our group.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The concept of a pharmacophoric site within a molecule has a key role in medicinal chemistry and drug development [1]. This is defined as the spatial arrangement of functional groups within a molecule that is essential for its molecular recognition and biological activity [2]. There are mainly two ways to locate a pharmacophoric group within an active biological compound; a direct method when the ligand and the receptor information is readily available, and an indirect method, where a collection of molecules with experimental and biological activity are used to extract specific molecular features with the goal to identify structural patterns

associated with the biological activity [2]. Usually, the features used in the pharmacophore discovery are atoms or functional groups commonly found in molecules such as hydrophobic groups, aromatic rings and hydrogen bond acceptors or donors. The feature extraction step depends on which structure property is of interest with a medicinal chemistry point of view. Quantum structure level provides details about the electronic structure and specific chemical interactions involved in the molecular recognition and biological activity.

The general hypothesis of the Quantitative Structure–Activity Relationships (QSAR) is that changes in molecular structure are proportional to the changes of its activity, and that it is possible to obtain a model that relates descriptors of the chemical structures with their activity using statistical methodologies. A key step of a QSAR study is the selection of descriptors, which can support either a hypothetical mechanism or a known pharmacophore model [3]. We present in this work a novel way to identify a pharmacophoric

* Corresponding author. Instituto de Química, Universidad Nacional, Autónoma de México, Av. Universidad 3000, C.U. México City, 04510, Mexico.
E-mail address: fercor@unam.mx (F. Cortés-Guzmán).

site of a group of anticancer copper complexes using quantum topological atomic descriptors.

Quantum chemical topology (QCT) [4] is a procedure that represents molecules compactly and reliably, extracting relevant molecular information from their electron density and other similar scalar fields, which can provide important chemical information. QCT defines several bonding, atomic and interatomic properties that generates a layered set of descriptors of a molecule [5]. With that representation, it is possible to measure the similarity between chemical structures and to determine the reactive and active centers [6,7]. In this work we use these the atomic properties as defined by the gradient of the electron density within the Quantum Theory of Atoms in Molecules (QTAIM) [8], to describe the way in which an atom donates, accepts or share electron density and the way the electron density is polarized within an atomic domain. The descriptors are related with the atomic electronic population [9], localization and delocalization [10], dipolar moment and quadrupole moment as described within the QTAIM framework [11]. QTAIM atomic properties have been used to obtain models to predict pKa of acidic hydrogens [12,13], partial molar volumes and log P of amino acids [14], excitation energies of small molecules [15], interaction energies with DNA bases [16], among other applications. As far as we know, this is the first time that the topological atomic descriptors are used to understand and predict the biological activity of metal complexes.

Copper complexes have gained considerable interest as diagnostic agents and chemotherapeutic drugs over the last decade [17–21]. Their biological activity has been associated with the production of reactive oxygen species [22], the production of lipid peroxidation [23] and to directly cleave nucleic acids [24–26]. A set of copper compounds (CCs), denominated Casiopeínas, have shown promising biological activity to many tumors both in vitro, in cell and in vivo; and two of these complexes are currently in phase I clinical trial [27–31]. In a previous report [32], we studied the influence of the substituents on diimine ligand selected physico-chemical properties (i.e. half-wave potential, $E_{1/2}$) and their relationship with medial lethal dose or medial inhibitory concentration (IC_{50}) on several tumor cell lines. We produced models with a strong relationship between the IC_{50} and $E_{1/2}$, where it is possible to observe that the most active complexes are the weaker oxidants. We also found that the redistribution of the electron density along with the copper complex formation can explain the chemical and spectroscopic activities [33]. We have previously proposed that the formation of the copper complex reduces the electron population of the complex ligands, which increases the population on the metal center with a subsequent π back-bonding electron transfer. The reduction of the electron population of the ligands is a key factor that determines the recognition processes of copper complexes by DNA chains [34].

2. Methodology

The general formula of the Casiopeína family is $[Cu(N-N)(N-O)]NO_3$ and $[Cu(N-N)(O-O)]NO_3$ where the N–N ligand denotes the aromatic ligand, either 2,2'-bipyridine or 1,10-phenanthroline, whereas N–O represents a non-aromatic ligand, an essential amino acid or peptides; and O–O indicate either acetylacetonate or salicylaldehyde (Table 1) [35,36]. Activity assays for multiple cell lines show that Casiopeínas show a ~10-fold enhanced effect when they are compared with cisplatin [27,32,37]. Table 1 presents all the considered molecules for this study and their antiproliferative activity on tumor human cells lines [32,38]. For the HeLa cancer cell line, the most active molecules are those with methyl groups in positions 4 and 7 of the aromatic

ligand. In the case of the HCT-15 cell line, the aromatic ligands with methyl groups at the positions 3,4,7 and 8 give the highest activities. Complex 4 is the most active molecule for both tumor human cells lines. The less active complexes are those without substituents, with chlorine or nitro groups. When the non-aromatic ligand is either alanine, isoleucine, leucine, norleucine or valine amino acids; an increase of selectivity to HeLa is observed. We also included copper (II) complexes with benzimidazole [39], clotrimazole [40] and tetrazolo[1,5-a]pyrimidine [41], which have reported anticancer activity. The training set used in the present work is reported in Table 1.

2.1. Quantum topological atomic descriptors

Molecular and atomic electron populations, N and $N(A)$, can be split into two contributions, that is, electron localization ($\lambda(A)$) and delocalization ($\delta(A,B)$) according to Equations (1) and (2) [42]. The quantity of electron localization, $\lambda(A)$, provides a measure of the number of electrons localized on atom A, whereas the electron delocalization, $\delta(A,B)$, accounts for the number of electrons shared by two different atoms, A and B (not necessarily bonded). In these definitions, η_i and η_j denote the occupation numbers of natural orbitals φ_i and φ_j ; and $S_{ij}(A)$ is the overlap integral of φ_i and φ_j within the basin of atom A.

The localization and delocalization indices, equations (1) and (2) respectively, are exact only for a Slater determinant and are an approximation for correlated methods [43,44]. The total delocalization of an atom includes two contributions, the electron delocalization from bonded and non-bonded atoms respectively, as shown in equation (3). The non-bonded delocalization can be interpreted as the classical free valence index [45]. Furthermore, the way in which the electron density polarizes, is described by the molecular dipole moment, which can be split in two contributions: charge transfer (μ_{CT}) and atomic polarizations ($\mu(A)$). The latter provides a measure of the displacement of the atomic centroid of negative charge from the position of its nucleus and usually opposes μ_{CT} . Also, it is possible to define intra-atomic and inter-atomic (bond) contributions to the atomic dipole moment (Equation (4)) [11].

$$\lambda(A) = \sum_{ij} \eta_i^{1/2} \eta_j^{1/2} S_{ij}(A)^2 \quad (1)$$

$$\delta(A, B) = 2 \sum_{ij} \eta_i^{1/2} \eta_j^{1/2} S_{ij}(A) S_{ij}(B) \quad (2)$$

$$\delta(A) = \frac{1}{2} \sum_{A-B} \delta(A, B) + \frac{1}{2} \sum_{A \neq B} \delta(A, B) = \delta_b(A) + \delta_{nb}(A) \quad (3)$$

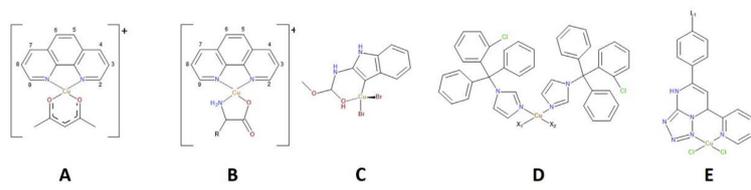
$$\mu_{intra}(A) = - \int_{\Omega} \mathbf{r} \rho(\mathbf{r}) d\tau \quad (4)$$

2.2. Modeling methodology

Geometry optimization of each molecule in Table 1 was performed at UM05-2x [46]/6-31++G(d,p) [47] theoretical level as implemented in Gaussian 09 program (D01 version) [48]. The set of Kohn-Sham orbitals of each molecule were used to obtain the electron density and to calculate the atomic properties with the AIMAll program [49]. The descriptors were computed with the program CODESSA [50]. The M05-2X functional has been successful

Table 1

Structures of the Casiopeínas® family. (A) Cu[(1,10-phenanthroline)(acetylacetonate)]⁺ and (B) Cu[(1,10-phenanthroline)(aminoacide)]⁺ and copper (II) complexes with benzimidazole, clotrimazole and tetrazolo[1,5-*a*]pyrimidine, along with their antiproliferative activity (IC₅₀, μM) on HeLa and HCT-15 tumor human cells lines. Values taken from references 29–32, and 39–41.



Structure Number	Training/test sets	Structure	IC ₅₀ (μM)	
			HeLa	HCT-15
1	Training	A	10.7	7.3
2	Training	4-Me-A	1.6	6.0
3	Training	5-Me-A	6.2	2.6
4	Training	4,7-diMe-A	1.4	2.1
5	Training	5,6-diMe-A	3.4	1.9
6	Training	3,4,7,8-tetraMe-A	1.9	1.4
7	Training	5-phenyl-A	3.9	2.5
8	Training	4,7-diphenyl-A	4.2	3.2
9	Training	5-Cl-A	4.5	12.9
10	Training	5-NO ₂ -A	21.3	35.0
11	Training	B, R = H	13.9	21.2
12	Training	4-Me-B, R = H	8.7	5.1
13	Training	5-Me-B, R = H	6.2	3.7
14	Training	4,7-diMe-B, R = H	5.5	2.0
15	Training	5,6-diMe-B, R = H	5.3	2.1
16	Training	3,4,7,8-tetraMe-B, R = H	1.8	1.8
17	Training	4,7-diphenyl-B, R = H	5.1	7.6
18	Training	5-Cl-B, R = H	14.3	22.3
19	Test	5-NO ₂ -B, R = H	44.8	47.3
20	Test	4,7-diMe-B, R = CH ₃	1.9	13.96
21	Test	4,7-diMe-B, R = -CH(CH ₃) ₂	1.5	4.59
22	Test	4,7-diMe-B, R = -CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	1.64	7.99
23	Test	4,7-diMe-B, R = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂	1.52	6.51
24	Test	4,7-diMe-B, R = -CH ₂ CH ₂ CH ₃	1.33	3.68
25	Training	C	95.59	26.72
26	Training	X ₁ = X ₂ = Cl-D	6.80	15.40
27	Training	X ₁ = X ₂ = Br-D	3.90	6.50
28	Training	X ₁ = Clotrimazole, X ₂ = NO ₂ -D	3.50	4.80
29	Test	L ₁ = H-E	0.69	0.45
30	Training	L ₁ = OH-E	0.57	0.36
31	Training	L ₁ = Cl-E	0.87	0.57
		Cisplatin	5.1	5.4

to model copper complexes [51], providing a suitable representation of the adenine–Casiopeína adducts and non-bonded interactions [16].

From the descriptor matrices obtained for the copper complexes, QSAR models were calculated with the Multiple Linear Regression (MLR) statistical procedure by using the MobyDigs software (version 1.0) [52]. Briefly, the MLR method is combined with the meta-heuristic Genetic Algorithm (GA), which is employed as the feature selection method [53]; in this way, the chemical space is explored with the purpose of building the best possible correlation models. The configuration parameters of the GA were set to their default values, except the population size that was fixed to 100. These values were chosen according to the analysis performed by Todeschini et al. [52].

The search process was carried out by using the RQK function [54], in order to avoid models with unwanted features, e.g., models with chance-correlation. RQK function uses the Q_{loo}^2 (“leave-one-out” cross validation) statistic as the fitness function, and satisfies four constraints: QUICK rule, asymptotic Q_{loo}^2 rule, redundancy rule

and overfitting rule. Only two and three variable models were built from 229 quantum topological atomic descriptors, according to the principle that each variable into a model must explain at least the variance of five cases (molecules), that is, the case-to-independent variables ratio must be 5:1.

To each generated QSAR model, the bootstrapping (Q_{boot}^2) and Y-scrambling ($a(Q^2)$) training validation procedures were applied, with the purpose of assessing the predictive ability and the possible chance-correlation based on the HCT-15 and HeLa biological activities. The bootstrapping method [55] randomly forms training sets with repeated molecules and the remaining cases not included are considered as the test set, while the Y-scrambling [56] randomly changes the real response variables (biological activities) to determine the goodness of the model. Both methods were repeated 5000 and 300 times, respectively. In addition of these two statistics, the standard deviation (*s*) was also used to assess the training quality. Lastly, the best models according to their training parameters were also evaluated using the external validation (Q_{ext}^2) on the corresponding test set [57].

Table 2

Statistical parameters and equations of the best models developed with respect to the HCT-15 and HeLa biological activities.

	Size	R ²	Q ² _{loo}	Q ² _{boot}	a(Q ²)	s	Q ² _{ext}	Models
HCT-15 activity								
Eq. (5)	3	0.7659	0.6959	0.5449	-0.273	4.827	0.8080	Activity = 17.933 - 85.3133 $\sum \mu_{intra}(N_{Cu-N}) + 14.9478 \sum \mu_{bond}(N) - 14.4042 \sum\delta_{non-bond}(H)$
HeLa activity								
Eq. (6)	2	0.9585	0.9012	0.8503	-0.204	4.858	0.7768	Activity = 66.1477 + 42.6102 $\sum \mu(C_{C-N}) - 8.7483 \sum \mu_{intra}(H_{C-H}) - 129.4397 \sum \mu_{intra}(N_{Cu-N}) $

3. Results

Even though there is no relationship between the solubility or the metabolism of the copper complexes with the set of atomic topological descriptors chosen, we were able to obtain predictive models of the anticancer activity using the presented methodology. Table 2 shows the statistical parameters and equations of the best regression models obtained for the HCT-15 and HeLa biological activities (see Supplementary Information 1). Equations (5) and (6) (see Table 2) describe the activity against the HCT-15 and HeLa tumors in terms of several descriptors that condense the information of the atomic properties. Equation (5) shows that the activity on HCT-15 can be described by $\sum|\mu_{intra}(N_{Cu-N})|$, $\sum|\mu_{bond}(N)|$ and $\sum\delta_{non-bond}(H)$ descriptors: the sum of the magnitudes of the intra-atomic bond components of the dipole moment of the nitrogen atoms and the sum of the total electron delocalization of hydrogen atoms with the non-bonded atoms. On the other hand, Equation (6) involves three descriptors, $\sum|\mu(C_{C-N})|$, $\sum|\mu_{intra}(H_{C-H})|$ and $\sum|\mu_{intra}(N_{Cu-N})|$. These three quantities describe the components of the dipole moment of carbon atoms in C-N bonds, hydrogen atoms in C-H bonds and nitrogen atoms in Cu-N bonds.

Overall, it can be observed that the Q²_{loo} and Q²_{boot} parameters determined for each model have values greater than 0.69 and 0.5, respectively, which is an indicative of the suitable predictive ability of the models developed. The a(Q²) coefficients have, in all cases, values inferior to 0.3, demonstrating a reduced tendency to chance-correlation. The Q²_{ext} values suggest that the models present good predictive power in the corresponding test set, given that all values are superior to 0.75 (75% of the total variance). For all the models, the outlier cases for response (i.e. those with standardized residuals superior to 3.0-times the Standard Deviation Error in Calculation (SDEC)), or for structure (i.e. structures with a leverage (h) superior to a warning leverage (h* - h > h*)) were recognized using a Williams graph (plot of residuals vs. leverages [52,58] (see Supplementary Information 2)). As a result, response outliers were not detected for any of the models built. However, as structure outlier, only compound number 25 was identified for the model

represented by the Equation (6) (HeLa activity). The identified outlier compound is the complex with 2-methylbenzimidazole, which has the larger IC₅₀ in both cell lines.

Lastly, an Applicability Domain (AD) analysis was performed with the purpose of knowing the behavior of the QSAR models developed to perform reliable predictions [59]. To this end, the idea of AD based on consensus [60] was used in this work, considering five approaches commonly employed in the literature (Range, Euclidean, City-block, Mahalanobis, Density) to define if the predictions achieved are reliable or not. If a compound is outside of the AD for at least two methods, then the respective prediction is classified as untrustworthy. The individual AD methods are available in the AMBIT program [61]. Table 3 shows the AD of the test compounds according to the five AD procedures above mentioned, as well as the outcomes of the consensus-based decision. As a result, it can be noted that all estimates performed by the QSAR models built in this work for the HCT-15 and HeLa biological activities are reliable according to the consensus-based outcomes. All in all, it can be concluded that, to estimate the biological activities for the HCT-15 and HeLa endpoints, the two models built constitutes prominent alternatives.

To give chemical meaning to the two models, we include a comparison between the results of our present work and a previous work involving the recognition of copper complexes with DNA. The coordination of the phenanthroline to the copper metal center produces a redistribution of the electron density, which induce changes in the way the nitrogen and carbon atoms delocalize and polarize within the C-N bonds. The delocalization between the C-N bond increases in average 11% after the coordination process, whereas, the magnitude of the atomic dipole moment decreases around 6%. These changes are recovered by the selected set of descriptors, which correlate with the antiproliferative activity and allow us to identify the C-N bond of the aromatic ligand as the pharmacophoric site of the copper metal complex. In the analysis of molecular dynamics simulation of copper complexes and DNA chains, we reported that the interaction between the deoxyribose of the backbone binds Casiopeínas through the polarized C-N bond

Table 3

Applicability domain based on consensus of the compounds belonging to the test set (see Table 1 for labels).

	Comp.	Applicability Domain Methods					Consensus
		Range	Euclidean	CityBlock	Mahalanobis	Density	
HCT-15 (Eq. (5))	19	IN	IN	IN	IN	OUT	IN
	20	IN	IN	IN	IN	IN	IN
	21	IN	IN	IN	IN	OUT	IN
	22	IN	IN	IN	IN	OUT	IN
	23	IN	IN	IN	IN	OUT	IN
	24	IN	IN	IN	IN	IN	IN
	29	IN	IN	OUT	IN	IN	IN
HeLa (Eq. (6))	19	IN	IN	IN	IN	IN	IN
	20	IN	IN	IN	IN	IN	IN
	21	IN	IN	IN	IN	IN	IN
	22	IN	IN	IN	IN	IN	IN
	23	IN	IN	IN	IN	IN	IN
	24	IN	IN	IN	IN	IN	IN
	29	OUT	IN	IN	IN	IN	IN

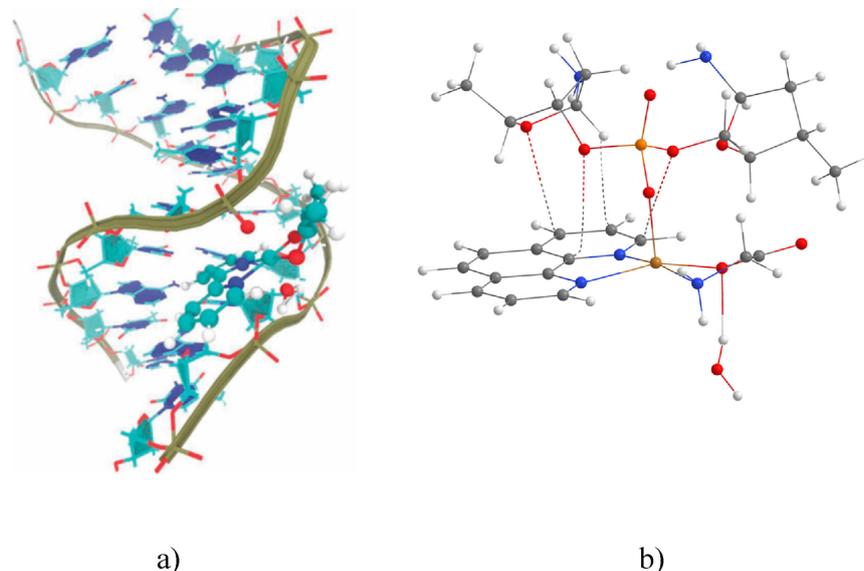


Fig. 1. a) Copper complex in the minor groove of DNA, b) Recognition site of copper complexes in DNA. The copper atom links to a phosphate's oxygen atom and the aromatic ligand interacts with the deoxyribose by means of C–H \cdots π , O \cdots π (C) and O \cdots π (N) interactions, which were defined by the presence of a bond path [8].

of phenanthroline. The C–N bond behaves as an acceptor in several weak interactions with oxygen atoms of the deoxyribose groups of the backbone of DNA chains. This interaction plays a key role in the recognition process of a copper complex with DNA, as shown the Fig. 1 [34]. It seems, that this recognition site is the first step of two processes, the intercalation between the nucleobases of the DNA and the hydrolysis of phosphates present in the backbone. There are several reported experimental evidences that the Casiopeínas interact and break DNA chains which could help explain the origin of their antineoplastic activity [29].

4. Conclusion

In this work, we identified the pharmacophoric site of the metal copper (II) complexes within the Casiopeína family using cheminformatics methods that employ quantum topological atomic descriptors. These descriptors condense the information of the atomic properties and their changes correlate with the biological activity of the metal complexes. Two models were developed that describe the activity based on the way in the way the electron density is polarized within an atomic domain. The best models to describe the activity against HCT-15 and HeLa, are those corresponding to the equations which involve the dipole moments of atoms within the C–N bonds. These bonds are essential to the recognition of the metal complex by the backbone of DNA chains. It is possible to define the polarized C–N bond as the pharmacophoric site of the Casiopeína family and guide the design for other the synthesis of novel copper complexes.

Author contribution

Lillian G. Ramírez-Palma

- Calculation of the electronic structure of copper complexes.
- Obtention of the local and integrated properties of the atoms in the copper complexes.
- Results analysis and discussion.
- Participation in the manuscript writing.

César R. García-Jacas

- Statistical analysis of the results and generation of the models.
- Results analysis and discussion.
- Participation in the manuscript writing.

Juan C. García-Ramos

- Selection of the set of molecules to be included in this study.
- Calculation of the electronic structure of copper complexes with amino acids.
- Generation of preliminary models.

Ricardo Almada-Monter

- Calculation of the electronic structure of copper complexes.
- Obtention of the local and integrated properties of the atoms in the copper complexes with non-planar geometry.

Rodrigo Galindo-Murillo

- Selection of the set of molecules to be included in this study.
- Results analysis and discussion.
- Participation in the manuscript writing.

Fernando Cortés-Guzmán

- Generation of the hypothesis.
- Selection of the set of molecules to be included in this study.
- Selection of the computational methodology.
- Selection of the Statistical methodology.
- Results analysis and discussion.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This work was supported by the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) [PAPIIT-IN208113]. We also thank DGTIC-UNAM (LANCAD-UNAM-DGTIC-194) for supercomputer time. CRGJ and JCGR acknowledge the support from DGAPA-UNAM for the postdoctoral fellowships. LGRP wants to thank CONACyT for the Ph.D. fellowship (Grant 308338). CRGJ acknowledges CONACyT the support to the endowed chair 501/2018 at CICESE.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127480>.

References

- [1] F. Zuccotto, Pharmacophore features distributions in different classes of compounds, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43 (2003) 1542–1552, <https://doi.org/10.1021/ci034068k>.
- [2] J.H. Van Drie, Monty kier and the origin of the pharmacophore concept, internet electron, *J. Mol. Des.* 11 (2012) 271–279, http://www.biochempress.com/av06_0271.html.
- [3] T. Scior, J. Medina-Franco, Q.-T. Do, K. Martinez-Mayorga, J. Yunes Rojas, P. Bernard, How to recognize and work around pitfalls in QSAR studies: a critical review, *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 4297–4313, <https://doi.org/10.2174/092986709789578213>.
- [4] P.J. Smith, P.L.A. Popelier, Quantum chemical topology (QCT) descriptors as substitutes for appropriate Hammett constants, *Org. Biomol. Chem.* 3 (2005) 3399–3407, <https://doi.org/10.1039/b507024d>.
- [5] C.F. Matta, Modeling biophysical and biological properties from the characteristics of the molecular electron density, electron localization and delocalization matrices, and the electrostatic potential, *J. Comput. Chem.* 35 (2014) 1165–1198, <https://doi.org/10.1002/jcc.23608>.
- [6] P.L.A. Popelier, Quantum molecular similarity. 1. BCP space, *J. Phys. Chem. A* 103 (1999) 2883–2890, <https://doi.org/10.1021/jp984735q>.
- [7] S.E. O'Brien, P.L.A. Popelier, Quantum molecular similarity. 3. QTMS descriptors, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41 (2001) 764–775, <https://doi.org/10.1021/ci0004661>.
- [8] R.F.W. Bader, C.F. Matta, F. Cortés-Guzmán, Where to draw the line in defining a molecular structure, *Organometallics* 23 (2004) 6253–6263, <https://doi.org/10.1021/pm049450g>.
- [9] R.F.W. Bader, C.F. Matta, Atomic charges are measurable quantum expectation values: a rebuttal of criticisms of QTAIM charges, *J. Phys. Chem. A* 108 (2004) 8385–8394, <https://doi.org/10.1021/jp0482666>.
- [10] R.F.W. Bader, A. Streitwieser, A. Neuhaus, K.E. Laidig, P. Speers, Electron delocalization and the fermi hole, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 4959–4965, <https://doi.org/10.1021/ja953563x>.
- [11] R.F.W. Bader, A. Larouche, C. Gatti, M.T. Carroll, P.J. MacDougall, K.B. Wiberg, Properties of atoms in molecules: dipole moments and transferability of properties, *J. Chem. Phys.* 87 (1987) 1142–1152, <https://doi.org/10.1063/1.453294>.
- [12] K.R. Adam, New density functional and atoms in molecules method of computing relative pKavalues in solution, *J. Phys. Chem. A* 106 (2002) 11963–11972, <https://doi.org/10.1021/jp026577f>.
- [13] C.A. Hollingsworth, P.G. Seybold, C.M. Hadad, Substituent effects on the electronic structure and pKa of benzoic acid, *Int. J. Quantum Chem.* 90 (2002) 1396–1403, <https://doi.org/10.1002/qua.10362>.
- [14] C.F. Matta, R.F.W. Bader, Atoms-in-molecules study of the genetically encoded amino acids. III. Bond and atomic properties and their correlations with experiment including mutation-induced changes in protein stability and genetic coding, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 52 (2003) 360–399, <https://doi.org/10.1002/prot.10414>.
- [15] E.I. Sánchez-Flores, R. Chávez-Calvillo, T.A. Keith, G. Cuevas, T. Rocha-Rinza, F. Cortés-Guzmán, Properties of atoms in electronically excited molecules within the formalism of TDDFT, *J. Comput. Chem.* 35 (2014) 820–828, <https://doi.org/10.1002/jcc.23559>.
- [16] R. Galindo-Murillo, J. Hernandez-Lima, M. González-Rendón, F. Cortés-Guzmán, L. Ruiz-Azuara, R. Moreno-Esparza, π -Stacking between Casiopeinas® and DNA bases, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 14510–14515, <https://doi.org/10.1039/c1cp20183b>.
- [17] P.C. Brujinicx, P.J. Sadler, New trends for metal complexes with anticancer activity, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12 (2008) 197–206, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.11.013>.
- [18] J.C. García-Ramos, R. Galindo-Murillo, F. Cortés-Guzmán, L. Ruiz-Azuara, Metal-based drug-DNA interactions, *J. Mex. Chem. Soc.* 57 (2013) 245–259, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-249X2013000300013&lng=es&nrm=iso&tng=en. (Accessed 2 December 2015).
- [19] C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato, C. Santini, Copper complexes as anticancer agents, *Anti Cancer Agents Med. Chem.* 9 (2009) 185–211, <https://doi.org/10.2174/187152009787313837>.
- [20] L. Ruiz-Azuara, M.E. Bravo-Gomez, Copper compounds in cancer chemotherapy, *Curr. Med. Chem.* 17 (2010) 3606–3615, <https://doi.org/10.2174/092986710793213751>.
- [21] C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, Advances in copper complexes as anticancer agents, *Chem. Rev.* 114 (2014) 815–862, <https://doi.org/10.1021/cr400135x>.
- [22] A. De Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Müller, L. Ruiz-Ramírez, J.A. Howarth, M. Dobrota, Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II, *Toxicology* 194 (2003) 103–113, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.08.009>.
- [23] M. Kuzuya, K. Yamada, T. Hayashi, C. Funaki, M. Naito, K. Asai, F. Kuzuya, Role of lipoprotein-copper complex in copper catalyzed-peroxidation of low-density lipoprotein, *Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid Metab.* 1123 (1992) 334–341, [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90015-N](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90015-N).
- [24] J.L. Sagripanti, P.L. Goering, A. Lamanna, Interaction of copper with DNA and antagonism by other metals, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110 (1991) 477–485, [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(91\)90048-J](https://doi.org/10.1016/0041-008X(91)90048-J).
- [25] A. Marín-Hernández, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramírez, R. Moreno-Sánchez, Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas®) on mitochondrial functions, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 1979–1989, [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00212-0](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00212-0).
- [26] X. Qin, Q. Huang, L. Zhu, H. Xiao, G. Yao, W. Huang, R. Zhu, J. Hu, Y. Zhu, Interaction with Cu²⁺ disrupts the RNA binding affinities of RNA recognition motif containing protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 444 (2014) 116–120, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.006>.
- [27] A.G. Gutiérrez, A. Vázquez-Aguirre, J.C. García-Ramos, M. Flores-Alamo, E. Hernández-Lemus, L. Ruiz-Azuara, C. Mejía, Copper(II) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line chp-212, *J. Inorg. Biochem.* 126 (2013) 17–25, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.05.001>.
- [28] C. Mejía, L. Ruiz-Azuara, Casiopeinas Igly and Illia induce apoptosis in medulloblastoma cells, *Pathol. Oncol. Res.* 14 (2008) 467–472, <https://doi.org/10.1007/s12253-008-9060-x>.
- [29] J. Serment-Guerrero, P. Cano-Sanchez, E. Reyes-Perez, F. Velazquez-García, M.E. Bravo-Gomez, L. Ruiz-Azuara, Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas®, *Toxicol. In Vitro* 25 (2011) 1376–1384, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.008>.
- [30] C. Trejo-Solis, G. Palencia, S. Zúñiga, A. Rodríguez-Ropon, L. Osorio-Rico, S.T. Luvia, I. Gracia-Mora, L. Marquez-Rosado, A. Sánchez, M.E. Moreno-García, A. Cruz, M.E. Bravo-Gómez, L. Ruiz-Ramírez, S. Rodríguez-Enriquez, J. Sotelo, Cas Igly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms, *Neoplasia* 7 (2005) 563–574, <https://doi.org/10.1593/neo.04607>.
- [31] F. Carvallo-Chaigneau, C. Trejo-Solis, C. Gómez-Ruiz, E. Rodríguez-Aguilera, L. Macías-Rosales, E. Cortés-Barberena, C. Cedillo-Peláez, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, V. Madrid-Marina, F. Constantino-Casas, Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo, *Biomaterials* 21 (2008) 17–28, <https://doi.org/10.1007/s10534-007-9089-4>.
- [32] M.E. Bravo-Gómez, J.C. García-Ramos, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, Anti-proliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)NO₃] and [Cu(N-N)(glycinato)NO₃] complexes, (Casiopeinas®), *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 299–309, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.10.006>.
- [33] J.C. García-Ramos, R. Galindo-Murillo, A. Tovar-Tovar, A.L. Alonso-Saenz, V. Gómez-Vidales, M. Flores-Alamo, L. Ortiz-Frade, F. Cortés-Guzmán, R. Moreno-Esparza, A. Campero, L. Ruiz-Azuara, The π -back-bonding modulation and its impact in the electronic properties of Cu(II) antineoplastic compounds: an experimental and theoretical study, *Chem. Eur J.* 20 (2014) 13730–13741, <https://doi.org/10.1002/chem.201402775>.
- [34] R. Galindo-Murillo, L. Ruiz-Azuara, R. Moreno-Esparza, F. Cortés-Guzmán, Molecular recognition between DNA and a copper-based anticancer complex, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 15539, <https://doi.org/10.1039/c2cp42185b>.
- [35] L. Ruiz-Azuara, Copper Aminoacidate Diimine Nitrate Compounds and Their Methyl Derivatives and a Process for Preparing Them. 07/628, 628, 5,576,326. United States Patent, 1996.
- [36] L. Ruiz-Azuara, Process to Obtain New Mixed Copper Aminoacidate Complexes from Phenylatephenanthroline to Be Used as Anticancerigenic Agents.,

- 07/628,843; RE 35,458, United States Patent, 1997.
- [37] R. Kachadourian, H.M. Breebuhl, L. Ruiz-Azuara, I. Gracia-Mora, B.J. Day, Casiopeína IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells, *Toxicology* 268 (2010) 176–183, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.12.010>.
- [38] M.E. Bravo-Gómez, S. Dávila-Manzanilla, J. Flood-Garibay, M.Á. Muciño-Hernández, Á. Mendoza, J.C. García-Ramos, R. Moreno-Esparza, L. Ruiz-Azuara, Secondary ligand effects on the cytotoxicity of several Casiopeína's group II compounds, *J. Mex. Chem. Soc.* 56 (2012) 85–92, <https://doi.org/10.29356/jmcs.v56i1.280>.
- [39] O. Sánchez-Guadarrama, H. López-Sandoval, F. Sánchez-Bartéz, I. Gracia-Mora, H. Höpfl, N. Barba-Behrens, Cytotoxic activity, X-ray crystal structures and spectroscopic characterization of cobalt(II), copper(II) and zinc(II) coordination compounds with 2-substituted benzimidazoles, *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 1204–1213, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.05.018>.
- [40] S. Betanzos-Lara, C. Gómez-Ruiz, L.R. Barrón-Sosa, I. Gracia-Mora, M. Flores-Alamo, N. Barba-Behrens, Cytotoxic copper(II), cobalt(II), and zinc(II) coordination compounds of clotrimazole, *J. Inorg. Biochem.* 114 (2012) 82–93, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.05.001>.
- [41] A. Khan Haleel, D. Mahendiran, U.M. Rafi, V. Veena, S. Shobana, A.K. Rahiman, Tetrazolo[1,5-a]pyrimidine-based metal(II) complexes as therapeutic agents: DNA interaction, targeting topoisomerase I and cyclin-dependent kinase studies, *Inorg. Nano-Metal Chem.* 48 (2018) 569–582, <https://doi.org/10.1080/24701556.2019.1571514>.
- [42] X. Fradera, M.A. Austen, R.F.W. Bader, The Lewis model and beyond, *J. Phys. Chem. A* 103 (1999) 304–314, <https://doi.org/10.1021/jp983362q>.
- [43] Y.G. Wang, N.H. Werstuijk, A practical and efficient method to calculate AIM localization and delocalization indices at post-HF levels of theory, *J. Comput. Chem.* 24 (2003) 379–385, <https://doi.org/10.1002/jcc.10188>.
- [44] Y.G. Wang, C. Matta, N.H. Werstuijk, Comparison of localization and delocalization indices obtained with Hartree-Fock and conventional correlated methods: effect of coulomb correlation, *J. Comput. Chem.* 24 (2003) 1720–1729, <https://doi.org/10.1002/jcc.10435>.
- [45] C.F. Matta, Molecules as networks: a localization-delocalization matrices approach, *Comput. Theor. Chem.* 1124 (2018) 1–14, <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2017.11.018>.
- [46] Y. Zhao, N.E. Schultz, D.G. Truhlar, Design of density functionals by combining the method of constraint satisfaction with parametrization for thermochemistry, thermochemical kinetics, and noncovalent interactions, *J. Chem. Theory Comput.* 2 (2006) 364–382, <https://doi.org/10.1021/ct0502763>.
- [47] G.A. Petersson, A. Bennett, T.G. Tensfeldt, M.A. Al-Laham, W.A. Shirley, J. Mantzaris, A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row elements, *J. Chem. Phys.* 89 (1988) 2193–2218, <https://doi.org/10.1063/1.455064>.
- [48] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, D.J. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. Montgomery, J.A. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Comperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, *Gaussian* 09, 2009.
- [49] AIMAll (Version 19.10.12), Todd A. Keith, TK Gristmill Software, 2019, Overland Park KS, USA, aim.tkgristmill.com.
- [50] Semichem, Inc. - The AMPAC people, (n.d.). <http://www.semichem.com/codessa/> (accessed June 18, 2018).
- [51] Y. Jeanvoine, R. Spezia, Cu₂⁺ binding chalcogen-chalcogen bridges: a problematic case for DFT, *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 954 (2010) 7–15, <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2010.05.001>.
- [52] R. Todeschini, V. Consonni, A. Mauri, M. Pavan, MobyDigs: software for regression and classification models by genetic algorithms, in: R. Leardi (Ed.), *Nature-Inspired Methods Chemom. Genet. Algorithms Artif. Neural Networks*, First, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2003, pp. 141–167.
- [53] R. Leardi, R. Boggia, M. Terlie, Genetic algorithms as a strategy for feature selection, *J. Chemom.* 6 (1992) 267–281, <https://doi.org/10.1002/cem.1180060506>.
- [54] R. Todeschini, V. Consonni, A. Mauri, M. Pavan, Detecting “bad” regression models: multicriteria fitness functions in regression analysis, *Anal. Chim. Acta* 515 (2004) 199–208, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.12.010>.
- [55] O.R. Methods, R.A. Author, W. Source, M. Statistics, S. Uri, U.T.C.R. Linked, Jackknife, Bootstrap and other resampling methods in regression analysis author (s): C. F. J. Wu published by : institute of mathematical statistics stable, JSTOR 14 (2016) 1261–1295. REFERENCES Linked references are available on <http://www.jstor.org/stable/2241454>.
- [56] F. Lindgren, B. Hansen, W. Karcher, Model validation by permutation Tests : *J. Chemom.* 10 (1996) 521–532, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-128X\(199609\)10:5<521::AID-CEM448>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-128X(199609)10:5<521::AID-CEM448>3.0.CO;2-J).
- [57] P. Gramatica, A. Sangion, A historical excursion on the statistical validation parameters for QSAR models: a clarification concerning metrics and terminology, *J. Chem. Inf. Model.* 56 (2016) 1127–1131, <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00088>.
- [58] P. Gramatica, E. Giani, E. Papa, Statistical external validation and consensus modeling: a QSPR case study for Kocprediction, *J. Mol. Graph. Model.* 25 (2007) 755–766, <https://doi.org/10.1016/j.jmkgm.2006.06.005>.
- [59] P. Gramatica, Principles of QSAR models validation: internal and external, *QSAR Comb. Sci.* 26 (2007) 694–701, <https://doi.org/10.1002/qsar.200610151>.
- [60] C.R. García-Jacas, K. Martínez-Mayorga, Y. Marrero-Ponce, J.L. Medina-Franco, Conformation-dependent QSAR approach for the prediction of inhibitory activity of bromodomain modulators, *SAR QSAR, Environ. Res.* 28 (2017) 41–58, <https://doi.org/10.1080/1062936X.2017.1278616>.
- [61] AMBIT | downloads | AMBIT2, (n.d.). <http://ambit.sourceforge.net/downloads.html> (accessed June 18, 2018).

