



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**Estudio de la interacción de iones Ca^{2+} con
antibióticos derivados de estreptomicina y con
antagonistas de tipo Dihidropiridínico mediante
enfoques Docking y QSAR utilizando DFT.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE:
DOCTOR EN QUÍMICA

P R E S E N T A:

ALDO CHRISTIAAN JARDÍNEZ VERA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JULIÁN CRUZ BORBOLLA.

Mineral de la Reforma Hidalgo 2016



M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
 DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 PRESENTE

Por este conducto le comunico que el Comité Revisor asignado al Alumno Aldo Christiaan Jardínez Vera del Doctorado en Química, con número de cuenta 133491, que presenta el manuscrito de tesis titulado "Estudio de la Interacción de iones Ca^{2+} con Antibióticos derivados de Estreptomocina y con Antagonistas de tipo Dihidropiridínico mediante enfoques Docking y QSAR utilizando DFT", después de revisar el trabajo antes referido, ha decidido autorizar la impresión del mismo hechas la correcciones que fueron acordadas.

A continuación se registran las firmas de conformidad de los integrantes del comité Revisor.

| | |
|------------|--------------------------------------|
| PRESIDENTE | Dr José Guadalupe Alvarado Rodríguez |
| SECRETARIO | Dra. Minarda de la O Arciniega |
| VOCAL | Dr. Julián Cruz Borbolla |
| SUPLENTE | Dr. José Manuel Vásquez Pérez |

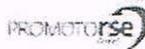
Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE
 "Amor, Orden y Progreso"

Mineral de la Reforma, Hgo. a 20 del mes de enero de 2016



Dr. Orlando Avila Pozos
 Director del ICBI



Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
 Colonia Carboneras
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
 Tel. +52 771 7172000 exts 2231, Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

DEDICATORIA

A mis padres Carmen y Tomás por el cariño y amor que me brindan, por todo el apoyo que me ofrecen incondicionalmente y por querer absorber cualquier dolor, para no verlo en sus hijos, porque me han enseñado a no rendirme saliendo adelante aun después de las confrontaciones que se presenten, que si caigo, me levante con más fuerza y humildad; me siento orgulloso de ser su hijo, este logro también es de ustedes.

A mis hermanos, Iván, Néstor y Arnold, por apoyarme, animarme; ser una fuente de ejemplo para mí, alentándome a continuar mis estudios y preocuparse por que día a día no me falte nada,

A mi Tercer Rey mago mi tía Laura por su preocupación apoyo y bendición.

*A mi Esposa, que me apoya y me brinda su amor, que procura siempre que tenga una sonrisa aun a pesar de los días tristes, que me anima a seguir por mis anhelos y comparte mis sueños. Por qué te admiro! Gracias mi hermosa **MOSA**.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar doy gracias a Dios y a la Virgen, por permitirme estar y llegar hasta donde hoy me encuentro, por guiarme, no desampararme, por colocar en mi camino a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron en la culminación de mi doctorado.

Gracias a mi padre, por darme carácter, enseñarme que muy a pesar de una necesidad propia, está la satisfacción de su familia, por estar presente, haciendo el esfuerzo y sacrificio para que tu esposa e hijos no les falte nada, gracias por el apoyo y consejos que me brindas, hoy no estaría donde estoy si no fuera por ti, gracias por todo papá, Te quiero...

Gracias a mi madre por ser cómplice en mi vida, sin lugar a dudas eres y serás mi mejor amiga, siempre estas cuando te necesito, nunca me abandonas, sobre todo por tus risas y lágrimas que siempre compartes conmigo, porque lo que más se, lo he aprendido de ti, por tus enseñanzas y cariños, hoy tengo un respaldo de vida que eres tú. Gracias mamá...

A mi esposa por tu amor y tu sonrisa hermosa, por compartir conmigo una eterna luna de miel, mi compañera de viaje, te amo corazón y a su familia que me han adoptado como suyo, gracias por su cariño, preocupación y apoyo (Lusy, Jan, Jovany, Noe, Payoleta y Tukitirry)

A mis hermanos, tía y amigos que saben que de ustedes aprendo, sonrió, me decepciono y me vuelvo a levantar, pero siempre están cuando los necesito, gracias hermanos los quiero...

Un agradecimiento especial el Dr, Julián Cruz Borbolla por abrirme la puerta a la investigación, y de su familia; por su paciencia, la amistad, la risa, por enseñarme el lado alegre de los Kómicos, es un honor trabajar con usted; por enseñarme a saber escuchar y aprender de los mejores. Estaré siempre agradecido por la confianza y apoyo brindado en el ámbito personal y académico, gracias por los gratos momentos en todos estos años de trabajar con usted... Gracias Doc,!!!

.... Saludos!!!

A mis sinodales El Dr. José Guadalupe Alvarado Rodríguez por su amistad, consejos, paciencia y las buenas pláticas, es un gusto contar con el apoyo de usted, gracias por las aportaciones a este trabajo. A la Dra. Minarda de la O. Arciniega, gracias por el apoyo, confianza y los valores; así mismo por sus valiosos comentarios, disponibilidad e infinita paciencia. Al Dr. José Manuel Vásquez Pérez por sus consejos y aportaciones a este trabajo, por la amistad y la buena compañía, el apoyo y confianza brindada a pesar del poco tiempo..... un buen amigo....Gracias!

Al Dr Alberto Vela, por brindarme la confianza de trabajar con él, por el apoyo, los consejos y los aportes a este trabajo, así como la oportunidad de haberme aceptado en su grupo de trabajo. Enriquecedora y excelente experiencia!!!... Gracias!!!

Al Dr Manuel Villanueva por los consejos y apoyo en mi estancia en Guanajuato, sin lugar a dudas una gran y excelente persona.

A mis compañeros de Posgrado de la UAEH (Rosa Luz, Erick, Joyce, Ángeles) a todos los que por buena dicha nos hemos cruzado en este camino de la investigación, a mis compañeros del Cinvestav, por las buenas charlas, risas, amistad y compañía (Marco, Carlitos, Aurelio, Rodrigo, Ulises, Ulises2, Jorge Luis, Kato, Manuel, Rafita).

Es un privilegio estar rodeado de personas asombrosas; las palabras faltan para describir la gran calidad humana que desbordan... Gracias: Dr Pepe Toño, por las risas y los ratos tan agradables, estimado Doctorsss, Dr. Añorve, por las buenas carcajadas y su amistad. Dr Villagómez, por la convivencia, amistad y las agradables charlas, Dr. Otazo, por su amistad y cariño, Dr César, por sus consejos y amistad. Dr. José Guadalupe por siempre se aprende algo nuevo, al Dr. Julián por enseñarme a no apostar una comida por un cálculo defectuoso.

Y muy especialmente a la Dra. que me solicitó una línea exclusiva: Muchísimas gracias Dr Vero por las risas, por gritarme desde lejos y regañarme por la falta de pilas y por reírse de mis peinados, pero sobre todo por su amistad apoyo y ayuda en todo momento... Gracias!

Finalmente a todas las personas que siempre les dio gusto de ver terminado esta etapa de mi vida y tuvieron los deseos para su conclusión, no los puedo mencionar a todos pero ustedes saben que están plasmados en cada palabra, pero que gracias a dios, me he encontrado rodeado de personas que brindan su aprecio de corazón, y de alguna manera me ayudaron y brindaron su apoyo, gracias por las palabras y ánimos en los momentos precisos.

Por el apoyo financiero, y los medios que en esta investigación permitieron la realización de esta tesis. Gracias CONACyT por el apoyo económico en mis estudios de Doctorado y la beca otorgada bajo el número de becario No. 385019

Gracias a la UNAM por los recursos de cómputo para la investigación de este trabajo y al Dr Pandiyan Thangarasu, por la gestión de los mismos para la conclusión de esta tesis.

Gracias al Cinvestav por los recursos de cómputo para la investigación de este trabajo y al Dr Alberto Vela, por la gestión de los mismos para la conclusión de esta tesis

Gracias a mis cháralitos que me dan el privilegio de reír....

Parte de los resultados plasmados en esta tesis ha sido presentado en diversos foros de:

14th deMon developers workshop.

Sede: The Melia Cabo Real in Los Cabos, México, from April 27th to April 30th, 2014, con presentación de cartel titulado:

“Theoretical study (QSAR) of dihydropyridines analogues with effective hypotensive applying DFT methods “

XII Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica.

Sede: Centro Académico Cultural (CAC) UNAM Campus Juriquilla. Querétaro, México, del 13 a 16 de Noviembre del 2013, con presentación de cartel titulado:

“Un estudio QSAR y Docking en análogos de 1,4-dihidropiridinas con propiedades de efecto hipotensor”

Sociedad Química de México, 30° Congreso Latinoamericano de Química, CLAQ-2012.

Sede: Hotel Marriott CASAMAGNA, en Cancún Quintana Roo México, 27 al 31 de Octubre del 2012, presentación de cartel titulado:

“Estudio Teórico de Rhodostreptomycin A y Rhodostreptomycin B y su interacción con iones Ca^{2+} y Mg^{2+} .”

XXXVII Congreso de Químicos Teóricos de Expresión Latina.

Sede: Hotel Barceló Maya Palace Deluxe, en Riviera Maya, México, 4-9 de Diciembre del 2011, presentación de cartel titulado:

“Propiedades estructurales y electrónicos de los Análogos de Nifedipina con potencial efecto Hipotensor con DFT”

El presente trabajo de tesis se realizó en el Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. Julián Cruz Borbolla, el apoyo financiero fue otorgado por una beca CONACyT, para realizar estudios de Doctorado en Ciencias Químicas, con el número de becario 385019.

Parte de este trabajo, se publicó en la revista Journal of Molecular Modeling en 2013 con el título:

“DFT and docking studies of rhodostreptomycins A and B and their interactions with solvated/nonsolvated Mg²⁺ and Ca²⁺ ions”

Y ha sido enviado otro artículo, para su consideración a la revista Journal of Chemical Information and Modeling en el 2016 bajo el título:

“Reduced Density Gradient as a novel approach for estimating QSAR descriptors and its application to 1, 4-dihydropyridines derivatives with potential antihypertensive effect.”

RESUMEN

En este trabajo se presenta el estudio de la interacción de iones Ca^{2+} con antibióticos derivados de estreptomicina y con antagonistas de tipo dihidropiridínico mediante enfoques Docking y QSAR utilizando la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT).

En el Capítulo 1 se analizan las interacciones de los antibióticos Rhodostreptomicina A (Rho A) y B (Rho B), tanto de sus formas neutras como protonadas y sus respectivos complejos formados frente a los iones H^+ y Ca^{2+} , tanto en fase gas como en fase solvente, a través de sus propiedades electrónicas y geométricas. Así mismo se presentan los resultados del Docking molecular entre los antibióticos Rho A y Rho B y iones de calcio hexahidratados.

En el Capítulo 2 se presentan los resultados del estudio QSAR con cuarenta derivados de 1,4-dihidropiridinas para predecir la actividad biológica ($\log \text{IC}_{50}$) aplicando DFT, para el cálculo de los descriptores cuánticos. Para este estudio se utilizó el gradiente de densidad reducida (*por sus siglas en inglés, RDG*) como un parámetro innovador que describe las interacciones de puente de hidrógeno en estos sistemas.

En el Capítulo 3 se realizó el diseño de un canal de calcio mediante homologación de un canal de potasio, utilizando dinámicas moleculares. Este canal funcionó como sitio receptor para los acoplamientos moleculares (Docking) con los derivados de 1,4-dihidropiridinas, determinando los sitios huésped-receptor a través de la constante de disociación, que permite relacionarla con la actividad biológica experimental.

ABSTRACT

In this work is presented the study of the interaction of Ca^{2+} ions with antibiotics streptomycin derivatives and dihydropyridine type antagonists through Docking and QSAR approaches using Density Functional Theory (DFT).

In Chapter 1 interactions between Rhodostreptomycin A and B antibiotics, in their neutral, protonated and their respective complexes formed with ions H^+ and Ca^{2+} , in gas phase and solvent phase, are analyzed through its electronic and geometric properties, as well as the results of molecular docking between antibiotics (Rho A and Rho B) and hexahydrate calcium ions are presented.

In Chapter 2, a QSAR study involving forty 1,4-dihydropyridine derivatives is performed to predict biological activity ($\log \text{IC}_{50}$), applying DFT, for the calculation of quantum descriptors. Reduced density gradient (RDG) was used in this study as an innovative parameter that describes hydrogen bonding interactions in these systems.

In Chapter 3, the design of a calcium channel was performed by homologation of a potassium channel, using molecular dynamics. This channel worked as receptor site for molecular docking with 1,4-dihydropyridine derivatives, determining the host-receptor sites through the dissociation constant, which allows us to relate the experimental biological activity to the dissociation constant.

ABREVIATURAS Y NOMENCLATURAS

a.u: Unidad atómica (hartrees).

Å: Ångström.

Ala: Alanina.

Arg: Arginina.

B3LYP: Funcional híbrido de Becke, tres parámetros, Lee, Yang y Parr.

DFT: Teoría de los Funcionales de la Densidad.

DGDZVP: Densidad Gaussiana Doble Zeta Valencia Polarizada.

DHP: Dihidropiridina.

Docking: Acoplamiento moleculares.

eV: Electronvolt.

Gly: Glicina

H pylori: Helicobacter pylori

HA: Hipertensión arterial.

His: Histidina.

HOMO: Orbital molecular más alto en energía ocupado.

HOMO-1: Orbital Molecular más Alto Ocupado penúltimo.

HOMO-2: Orbital Molecular más Alto Ocupado antepenúltimo.

Ila: Isoleusina.

INC: Interacciones no covalentes.

kcal/mol: kilocaloría por unidad de mol.

Leu: Leucina

LUMO: Orbital molecular más bajo en energía desocupado.

Met: Metionina.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBE: Funcional híbrido de Perdew, Burke y Ernzerhof.

PCE: Punto crítico de enlace.

Phe: Fenilalanina.

PM3: Método semiempírico, reparametrizado de AM1.

QSAR: Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad.

Rho A: Rhodostreptomicina A.

Rho A-Ca²⁺: Complejo Rhodostreptomicina A con el ion Ca²⁺.

Rho A-H⁺: Complejo Rhodostreptomicina A protonado.

Rho B: Rhodostreptomicina B.

Rho B-Ca²⁺: Complejo Rhodostreptomicina B con el ion Ca²⁺.

Rho B-H⁺: Complejo Rhodostreptomicina B protonado.

RMSD: Desviación de la raíz cuadrada media.

Ser: Serina

Thr: Treonina.

Val: Valina.

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| RESUMEN | vi |
| ABSTRACT | vii |
| ABREVIATURAS Y NOMENCLATURAS | viii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 3 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 6 |
| Capítulo I | 7 |
| Antibióticos derivados de Estreptomicina | 7 |
| 1.1. Antecedentes | 7 |
| 1.1.1 Antibióticos de última generación..... | 8 |
| 1.1.2. Biosíntesis..... | 9 |
| 1.1.3. Helicobacter pylori..... | 10 |
| 1.1.4. Métodos computacionales..... | 10 |
| 1.2. Justificación | 11 |
| 1.3. Objetivo | 12 |
| 1.4. Resultados y Discusión | 13 |
| 1.4.1 Propiedades estructurales de Rho A y Rho B..... | 14 |
| 1.4.1 Propiedades electrónicas de Rho A y Rho B..... | 16 |
| 1.4.2. Propiedades estructurales y electrónicas de Rho A-H ⁺ y Rho B-H ⁺ | 20 |
| 1.4.3. Reactividad química de Rho A y Rho B para coordinarse con iones Ca ²⁺ | 26 |
| 1.4.4. Acoplamiento Molecular (Docking)..... | 31 |
| 1.5. Conclusiones | 34 |
| Capítulo II | 35 |
| Estudio QSAR en antagonistas de tipo Dihidropiridínico | 35 |
| 2.1. Antecedentes | 35 |
| 2.1.1. Hipertensión..... | 35 |
| 2.1.2 Hipotensores..... | 36 |
| 2.1.3. Métodos computacionales QSAR..... | 38 |
| 2.2. Justificación | 39 |
| 2.3. Objetivo | 40 |
| 2.4 Resultados y Discusión | 40 |
| 2.4.1. Parámetros geométricos de las dihidropiridinas..... | 40 |
| 2.4.2. Parámetros electrónicos de las dihidropiridinas..... | 44 |

| | |
|---|----|
| 2.4.3. Obtención de Modelos QSAR de las dihidropiridinas. | 50 |
| 2.5. Conclusiones. | 57 |
| Capítulo III | 58 |
| Acoplamiento molecular en Dihidropiridinas | 58 |
| 3.1. Antecedentes. | 58 |
| 3.1.1. Afinidad de las dihidropiridinas al canal de calcio. | 59 |
| 3.1.2. Métodos computacionales Docking. | 61 |
| 3.2. Justificación. | 62 |
| 3.3. Objetivo. | 62 |
| 3.4. Resultados y Discusión. | 63 |
| 3.4.1. Construcción de la subunidad $\alpha 1$ | 63 |
| 3.4.2. Docking..... | 67 |
| 3.5. Conclusiones. | 72 |
| Apéndice A | 73 |
| Metodología | 73 |
| 1. Procedimiento computacional de los antibióticos Rho A y Rho B. | 73 |
| 2. Procedimiento de acoplamiento molecular computacional (Docking) de los antibióticos Rho A y Rho B. | 74 |
| 3. Metodología QSAR..... | 75 |
| 4. Metodología de la obtención del canal de Ca^{2+} | 77 |
| 5. Metodología Docking. | 78 |
| Apéndice B | 81 |
| Bibliografía | 83 |
| Publicaciones | 99 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructuras químicas de: a) Rhodostreptomicina A y b) Rhodostreptomicina B, en la cual se muestra la numeración esquemática para los átomos, anillos y centros de carbono estereogénicos. | 13 |
| Figura 2. Geometrías optimizadas de Rho A y Rho B. Y algunas longitudes de enlace, en Å, enfocados en la parte del aminoglucósido. | 15 |
| Figura 3. Enlace por puente de hidrógeno, en Å, formado entre el O4a-H···O8a. En la Figura el grupo R1 es la continuación de la cadena respecto al anillo 3 y R2, continuación para el anillo 4. | 16 |
| Figura 4. Orbitales Moleculares LUMO, HOMO, HOMO-1 y HOMO-2, para las moléculas de Rho A y Rho B, calculados con el nivel de teoría B3LYP/6-311G**..... | 19 |
| Figura 5. Sitios de la interacción de los iones, con las posiciones activas de las moléculas de Rho A y Rho B, usando B3LYP/6-311G**..... | 20 |
| Figura 6. Geometrías Optimizadas de las moléculas Rho A-H ⁺ y Rho B-H ⁺ usando B3LYP/6-311G**, y algunas distancias de enlace (en Å) que se muestran sobre el anillo de oxazolidinona (anillo 1). | 22 |
| Figura 7. Cargas de Mulliken para el sitio de la α-L Estreptosa de las moléculas Rho A-H ⁺ (a) y Rho B-H ⁺ (b), usando B3LYP/6-311G**..... | 23 |
| Figura 8. Orbitales moleculares LUMO, HOMO, HOMO-1 y HOMO-2 de las moléculas Rho A-H ⁺ y Rho B-H ⁺ , usando B3LYP/6-311G**..... | 25 |
| Figura 9. Geometrías analizadas de Rho A-Ca ²⁺ y Rho B-Ca ²⁺ , fueron calculadas con B3LYP/6-311G**, y algunas distancias de enlace (en Å) en el anillo de oxazolidinona (anillo 1). | 27 |
| Figura 10. Ángulos de enlace en grados que se producen mediante la interacción de Rho A (a) o Rho B (b) con los iones de Ca ²⁺ , y los ángulos en el sitio de las aminas en el anillo 4 de la Rho A-Ca ²⁺ , calculados con B3LYP/6-311G** | 28 |
| Figura 11. Algunas cargas de Mulliken en los complejos de a) Rho A-Ca ²⁺ y (b) Rho B-Ca ²⁺ , calculados con B3LYP/6-311G**..... | 29 |
| Figura 12. Interacción de los acoplamientos moleculares Docking de los iones metálicos Ca ²⁺ hexahidratados contra las moléculas de Rho, a la derecha se muestra las interacciones encontradas en color azul..... | 32 |

| | |
|---|----|
| Figura 13. Molécula de Nifedipina. | 38 |
| Figura 14. Estructura tipo Nifedipina. Al sustituir el grupo G unido al anillo aromático se obtienen diferentes análogos de 1,4-dihidropiridínicos. | 40 |
| Figura 15. Comparación de datos cristalográficos y datos estructurales calculados. Arriba: distancias de enlace entre los átomos C–N y C=C comparados con los correspondientes valores medios. Abajo comparación de los datos observados del ángulo de torsión N–C4–C1'–C2' en las geometrías optimizadas con el método PBE/DGDZVP (G=sustituyente en el anillo fenilo de la dihidropiridina). | 41 |
| Figura 16. Se muestran las interacciones C(4)–H•••O (distancia d_1) y C(2')–H•••N (distancia d_2) que se forman en la DHP para la molécula de Nifedipina (2). | 44 |
| Figura 17. Superficie de orbital molecular y la diferencia de energía ($\Delta E = E_{LUMO} - E_{HOMO}$) de las moléculas 1 y 2 (Nifedipina) en la parte superior y moléculas 26, 36 y 37 en la parte inferior. | 46 |
| Figura 18. Gráfico de las moléculas de los análogos de las 1,4-dihidropiridina. En la derecha se muestran los PCE calculados con la teoría AIM, a la izquierda se grafica el gradiente de densidad reducida a una isosuperficie de $s = 0.30$ a.u. | 49 |
| Figura 19. Gráfico de gradiente de densidad reducida vs la densidad electrónica de la molécula 40. a) Para la molécula entera; b) la ampliación para la interacción débil F•••H; c) además el aumento que muestra el detalle de la intensidad del pico; d) la estimación del valor de la interacción no covalente. | 50 |
| Figura 20. Gráfica de actividad biológica calculada obtenida por la ecuación uno, a) para las moléculas derivadas de dihidropiridina, usadas en la generación del modelo y b) los compuestos usados en la validación del modelo. | 56 |
| Figura 21. Esquema de un canal de calcio tipo-L. | 59 |
| Figura 22. Estructura de los canales de Ca^{2+} | 60 |
| Figura 23. Segmento (III)S6 y (IV)S6 del canal de calcio tipo-L. ¹⁶⁷ | 60 |
| Figura 24. La primera línea es la alineación de la secuencia de aminoácidos del canal de Potasio (1BL8), segunda línea secuencia de aminoácidos del canal de potasio (KcSA) que fueron utilizados para la generación de las mutaciones que corresponden a la tercera línea que se deben mutar para generar el nuevo canal de calcio de tipo-L (Cav1.2). | 64 |
| Figura 25. Canal de calcio subunidad α_1 | 64 |

- Figura 26. Del lado izquierdo la estructura inicial en color verde y en color azul la estructura resultante después de la mutación de la subunidad α_1 del canal de calcio tipo-L. 65
- Figura 27. Dominios (III)S6 y (IV)S6 de la subunidad α_1 del canal de calcio obtenido por las mutaciones de los aminoácidos. 67
- Figura 28. Distancias y energías de unión para las interacciones encontradas para la molécula 1 (Nifedipina), a) interacción entre oxígeno del grupo nitro del ligante y el hidrógeno del residuo Phe-1454, y b) interacción entre nitrógeno del anillo de la DHP del ligante y oxígeno del residuo Ile-1156. Se omiten los hidrógenos no polares, para una mejor visualización de las figuras..... 69
- Figura 29. Gráfico de los valores calculados teóricos de $\log (1/K_d)$ vs su valor de actividad biológica experimental $\log (1/IC_{50})$ 71

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Ángulos de enlace (en grados) en el anillo de la oxazolidinona (anillo 1) de Rho A y Rho B y sus complejos, obtenido mediante B3LYP/6-311G**. | 14 |
| Tabla 2. Datos teóricos de Rho A/B y sus complejos, usando B3LYP/6-311G** en fase gas y fase acuosa..... | 17 |
| Tabla 3. Cargas de Mulliken (electrones) para los átomos relevantes de nitrógeno, oxígeno y carbono en Rho A, Rho B y sus complejos, usando B3LYP/6-311G**..... | 18 |
| Tabla 4. Datos teóricos de energía para complejos no hidratados de Rho A y Rho B con Ca ²⁺ , calculados con B3LYP/6-311G**..... | 30 |
| Tabla 5. Datos teóricos de energía para complejos hidratados de Rho A y Rho B con Ca ²⁺ , calculados con B3LYP/6-311G**..... | 33 |
| Tabla 6. Distancias de enlace de H para las DHPs con sutituyente en la posición 2' en el anillo fenilo..... | 43 |
| Tabla 7. Descriptores cuánticos y moleculares (PBE/DGDZVP/GenA2)..... | 45 |
| Tabla 8. Modelos de Regresión Lineal Múltiple (<i>mi</i>)..... | 52 |
| Tabla 9. Mutaciones que sufren los aminoácidos de los dominios (III)S6 y (IV)S6 para el sitio receptor en el canal de calcio generado por Homología (Ccah)..... | 66 |
| Tabla 10. Distancias de enlace entre las interacciones de los análogos de DHPs y los aminoácidos de los dominios (III-IV) S6. Energías de unión (E.U.), constante de disociación calculada (K _d), el inverso de la constante de disociación (log (1/k _d) y valor de inhibición experimental (log (1/IC ₅₀) | 70 |
| Tabla 11. Descriptores cuánticos calculados con PBE/DGDZVP, para las moléculas DHPs 1-20..... | 81 |
| Tabla 12. Descriptores cuánticos calculados con PBE/DGDZVP, para las moléculas DHPs 21-40..... | 82 |

Capítulo I

Antibióticos derivados de Estreptomicina.

1.1. Antecedentes.

La historia de los antibióticos comienza en 1928 con el descubrimiento de la penicilina; la distribución y su empleo permitieron reducir la mortalidad por enfermedades infecciosas.¹⁻⁴ Lo anterior dio pauta al surgimiento de la “Edad de Oro” de los antibióticos que tuvo sus inicios en 1941 con la producción de penicilina.⁵ Desde entonces y hasta nuestros días se han desarrollado un elevado número de antibióticos, y para su generación es importante conocer los requisitos que se requieren en su producción, para la cual son utilizados diversos criterios como: potencial de inducción de resistencia, los posibles mecanismos de acción, efectos adversos, toxicidad, estructura, características farmacológicas, composición química, etc. Este último criterio suele ser el más utilizado en la literatura científica para la investigación y producción de estos antibióticos.⁶⁻⁸ El anterior, está fundamentado en la similitud molecular que pueden presentar algunas estructuras químicas con respuesta biológica, permitiendo seleccionar familias de moléculas con características fisicoquímicas y farmacológicas similares.⁹

En la actualidad existen áreas de investigación como la química y la biología que se enfocan en compuestos con similitudes estructurales químicas de interés por ejemplo; nutraceuticos, enzimas, agentes quelantes, feromonas, entre otros.¹⁰⁻¹⁴ Estos compuestos presentan una respuesta biológica o toxicológica en el ser humano y la mayoría de estos compuestos químicos son obtenidos a partir de procesos fitoquímicos, bioquímicos o por interacciones entre diferentes especies microbianas. Lo anterior ha impulsado el desarrollo y diseño de nuevos antibióticos, tomando una mayor importancia en años

recientes,¹⁵ debido a la creciente necesidad de combatir infecciones persistentes causadas por microorganismos con mayor resistencia desarrollada a los antibióticos tradicionales, por ejemplo el MRSA (Methycillin resistant *Staphylococcus aureus*) o el VREF (Vancomycin resistant *Enterococcus faecius*),¹⁶⁻¹⁹ que son considerados los responsables de infecciones intrahospitalarias. Esto ha obligado a producir nuevos antibióticos, clasificados como “de última generación” y que puedan presentar mayor tiempo de acción y más potencia a menores dosis de administración, para combatir enfermedades causadas por sustancias o agentes patógenos.

1.1.1 Antibióticos de última generación.

Ante la demanda de encontrar nuevos antibióticos, que ayuden a protegernos de infecciones bacterianas, con creciente resistencia a los tratamientos médicos tradicionales, surge la necesidad de renovar constantemente la sustancia activa de los antibióticos en circulación, generando una clasificación conocida como “antibióticos de última generación”, los que por una alteración o sustitución en su estructura química potencializan su actividad del antibiótico.²⁰⁻²³

Los antibióticos de última generación constituyen un área promisoría en la investigación, en la cual se combinan los trabajos de biosintetizar moléculas novedosas, por medio de ingeniería metabólica, transferencia genética y biología sintética.²⁴⁻²⁷

El surgimiento de biosintetizar moléculas ha contribuido al uso de estrategias como las Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad (*por sus siglas en inglés, QSAR*) y los acoplamiento moleculares (*Docking*) para la formulación de nuevos antibióticos y responden a las necesidades de innovar formulaciones y producción de alto volumen. Un ejemplo de los antibióticos de última generación es el *ceftobiprole*, que es un agente antimicrobiano considerado como un antibiótico de quinta generación, y se usa para

combatir infecciones por MRSA,^{28,29} permitiendo un tratamiento eficaz de infecciones por bacterias. La generación de estos antibióticos puede surgir desde una sola modificación en su estructura molecular. Por ejemplo, la metilación de la molécula de claritromicina genera un antibiótico más resistente a las condiciones ácidas del estómago,³⁰ estos resultados proyecta soluciones para combatir nuevas enfermedades producidas por cepas cada vez más resistentes.³¹

1.1.2. Biosíntesis.

Una forma de obtener productos de origen biológico es por medio de la biosíntesis, la cual se apoya de disciplinas tales como la genética, la biología sintética, la ingeniería de tejidos, biocatálisis, entre otras áreas relevantes.³²⁻³⁷ Lo anterior se basa en la transformación de sustratos bioquímicos mediante agentes biológicos, tales como: hongos, bacterias, plantas, células animales, etc.³⁸⁻⁴¹ Posteriormente, se aíslan y purifican los productos finales del metabolismo de estos agentes, los cuales permiten diseñar rutas más eficientes en la síntesis de complejos y de productos naturales.^{42,43}

La biosíntesis ha sido transformada y reorientada hacia esfuerzos de investigación y producción que permitan enfrentar exitosamente los retos que marcan la aparición de nuevas infecciones y enfermedades, tales como el cáncer gástrico ocasionado por *Helicobacter pylori*.⁴⁴⁻⁴⁸ Para combatir agentes patógenos causantes del cáncer gástrico, se realizó una serie de experimentos, en los cuales se aislaron dos antibióticos a partir de cultivos de *Streptomyces padanus* y *Rhodococcus fascians*. Mediante el producto de transferencia genética entre estas especies se dio origen a una nueva cepa llamada *Rhodococcus* 307CO, la cual es productora de los antibióticos denominados “Rhodoestreptomicina A” y “Rhodoestreptomicina B”. Estos antibióticos son dos isómeros de una nueva clase de aminoglucósidos, altamente solubles en agua, con

fórmula molecular $C_{22}H_{40}N_8O_{13}$.⁴⁹ Estos antibióticos resultan de interés para su estudio teórico ya que han exhibido cierta actividad antibiótica contra la bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), que es considerada el principal promotor del cáncer gastrointestinal.

1.1.3. *Helicobacter pylori*.

La bacteria *Helicobacter pylori* crece en la capa mucosa que recubre el interior del estómago humano,⁵⁰⁻⁵² y secretan una enzima llamada ureasa, la cual convierte la urea química en amoníaco.⁵⁰⁻⁵² La producción de amoníaco alrededor de *H. pylori* neutraliza la acidez del estómago, convirtiéndolo así en un medio de confort para la bacteria. Posteriormente penetra la capa de la mucosa, ya que es menos ácida en el espacio interior del estómago.^{53,54} La infección por esta bacteria es muy común en la población; la probabilidad de desarrollar cáncer de estómago aumentada en los seres humanos a la edad de 50 años, debido a su medio de contagio, ya que ésta puede sobrevivir en ambientes muy ácidos, como el del estómago (pH=1 a 3).⁵⁵

1.1.4. Métodos computacionales.

Existen métodos computacionales que apoyan el diseño y desarrollo de fármacos, entre ellos, las Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad (QSAR)⁵⁶⁻⁶¹ y los acoplamientos moleculares (Docking)^{62,63} entre el fármaco y el receptor. Éste último, incluye la caracterización detallada de las macromoléculas llamadas diana receptoras, que permiten el estudio de los mecanismos de acción frente a la resistencia bacteriana.⁶⁴⁻⁶⁷ Esta metodología ocupa códigos de generación algorítmica estructural y molecular por medio de conformaciones de un ligante al estar unido a un receptor, con el objetivo de formar un complejo estable (biofármaco), por afinidad de enlaces entre las dos moléculas a fin de predecir el comportamiento del fármaco en el sitio receptor.⁶⁸⁻⁷⁰ Estas técnicas

resultan promisorias para describir las propiedades estructurales y electrónicas de los fármacos estudiados en esta tesis.

Además con el fin de potencializar la capacidad antimicrobiana de las moléculas Rho A/B, se utilizan iones de Ca^{2+} que sirven para reformular el antibiótico,⁷¹⁻⁷³ mediante la coordinación con las moléculas de agua.⁷⁴⁻⁷⁶ Por ello, resulta relevante el análisis, de cada una de las características químicas de las moléculas por medio de la ayuda de la química computacional.⁷⁷⁻⁷⁹

1.2. Justificación.

El cáncer gástrico es una enfermedad en la que se encuentran células cancerosas (malignas) en los tejidos del estómago; una característica del cáncer es su rápida multiplicación que se extiende más allá de los límites habituales, invadiendo partes conjuntas del cuerpo y puede contagiar cualquier órgano, a través de la metástasis. En un informe mundial sobre el cáncer en el 2014, se menciona que ésta es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; la Organización Mundial de la Salud en el 2012 indicó que a nivel mundial, un total de 14 millones de casos y 8.2 millones de muertes están relacionadas con el cáncer.⁸⁰ Se espera que aumente el número de casos hasta en un 70 % en los próximos 20 años; actualmente el grupo poblacional más afectado por este mal lo conforman las personas entre 38 y 40 años de edad, cuando anteriormente el cáncer gástrico se presentaba con mayor frecuencia en los adultos mayores de 50 años.^{81,82}

Por ello, es importante estudiar y determinar los parámetros geométricos y electrónicos de antibióticos del tipo *Streptomyces* que sean cada vez más eficaces; lo anterior puede hacerse utilizando la Teoría de los Funcionales de la Densidad para entender su comportamiento frente a la bacteria *H. pylori*, esta última es considerada

como una de las posibles causas del surgimiento del cáncer gástrico. Un estudio teórico de este tipo permitirá conocer el comportamiento de las moléculas Rho A/B en su forma neutra, protonada y a entender la interacción frente a iones calcio Ca^{2+} y $[\text{Ca}-(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, con el objeto de alcanzar una mayor comprensión acerca de los posibles mecanismos moleculares que expliquen el comportamiento microbiano de un agente causal para este tipo de cáncer.

1.3. Objetivo.

Aplicar la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT) y metodologías de acoplamiento molecular (Docking), al estudio de las propiedades estructurales y electrónicas de los antibióticos “Rhodostreptomicina A” y “Rhodostreptomicina B” en su forma neutra como protonada para determinar la estabilidad de las interacciones frente a iones de Ca^{2+} y $[\text{Ca}-(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ que permitan explicar el posible mecanismo de inhibición al crecimiento del *Helicobacter pylori*.

1.4. Resultados y Discusión.

Los detalles computacionales se describen en el apéndice A. Los isómeros a estudiar en este trabajo se muestran en la Figura 1, donde se puede ver que las moléculas difieren en la configuración del átomo de carbono C4 del anillo 1. La Rhodostreptomicina A (a) presenta una configuración (*R*) sobre este átomo que tiene como sustituyente el grupo hidroxilo de la oxazolidinona, el compuesto Rhodostreptomicina B (b) presenta una configuración de tipo (*S*) en el mismo átomo. La actividad biológica experimental indica que Rho B es biológicamente más activa que Rho A, atribuido a la diferencia en estereoquímica.⁴⁹

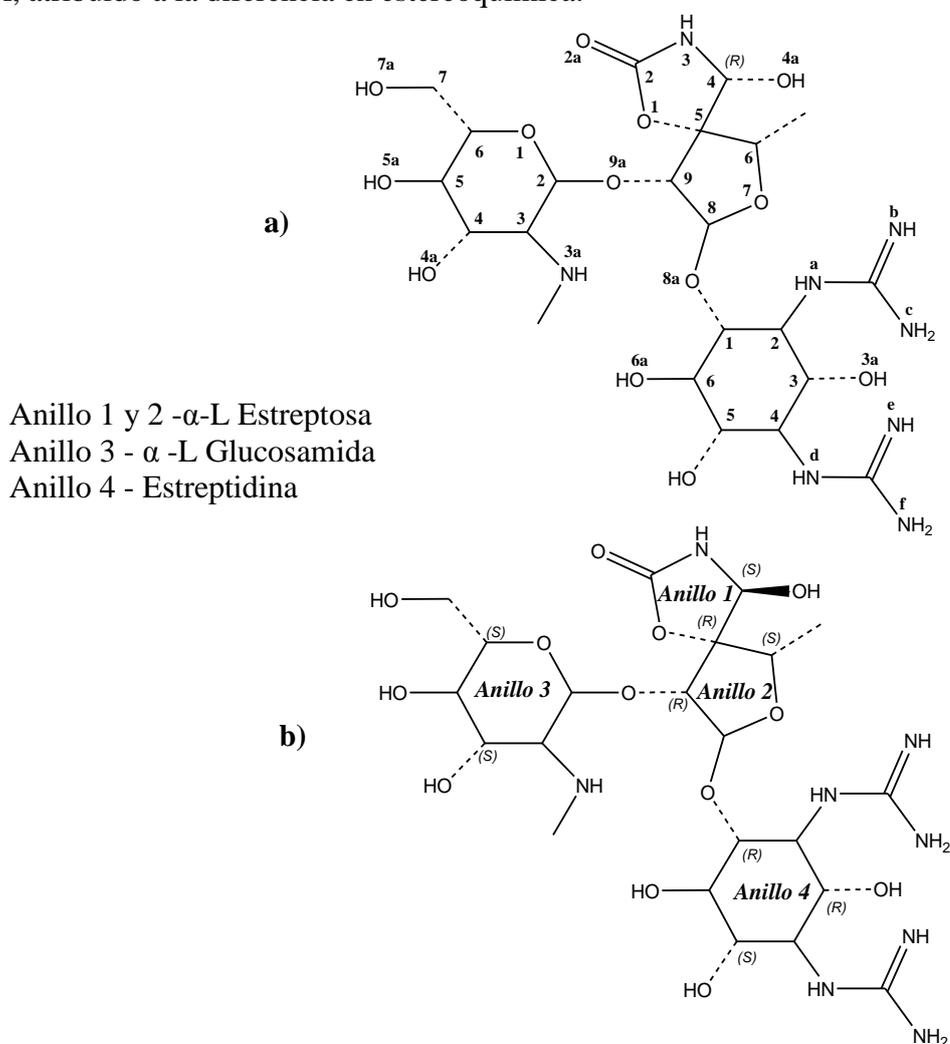


Figura 1. Estructuras químicas de: a) *Rhodostreptomicina A* y b) *Rhodostreptomicina B*, en la cual se muestra la numeración esquemática para los átomos, anillos y centros de carbono estereogénicos.

1.4.1 Propiedades estructurales de Rho A y Rho B.

En la Figura 2 se muestran las distancias de enlace del anillo de aminoglucósido, donde se puede observar que los valores de distancias son similares en ambos sistemas. En Rho A se observa una distancia de 1.36 Å y de 1.37 Å para Rho B. Los resultados del ángulo de enlace C2–N3–H fueron los siguientes 119.83° en Rho A y 118.31° en Rho B, y 122.20° en Rho A y 120.76° en Rho B para el ángulo H–N3–C4, observándose pequeñas diferencias de 1.52° y 1.44° entre Rho A y Rho B respectivamente, ver Tabla 1.

Tabla 1. Ángulos de enlace (en grados) en el anillo de la oxazolidinona (anillo 1) de Rho A y Rho B y sus complejos, obtenido mediante B3LYP/6-311G**.

| Ángulos | Rho A | Rho B | RhoA-H ⁺ | RhoB-H ⁺ | RhoA-Ca ²⁺ | RhoB-Ca ²⁺ |
|--------------|--------|--------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1) O2a–C2–N3 | 129.17 | 129.01 | 127.87 | 128.57 | 128.05 | 132.87 |
| 2) C2–N3–H | 119.83 | 118.31 | 118.77 | 120.87 | 117.95 | 120.70 |
| 3) H–N3–C4 | 122.20 | 120.76 | 123.22 | 124.85 | 123.00 | 124.03 |
| 4) N3–C4–O4a | 110.56 | 109.37 | 111.35 | 110.70 | 111.80 | 110.32 |

Una situación similar se observó para el ángulo de enlace N3–C4–O4 es de 110.56° en Rho A y 109.37° en Rho B, ver Tabla 1. Esta diferencia de 1.19° puede estar asociada a la presencia de puentes de hidrógeno que podrían dar lugar a una conformación estable del sistema. Los puentes de hidrógeno mostraron distancias de 1.67, 1.84 y 1.94 Å para la interacción O5a–H···O7a, O4a–H···O6a y O5b–H···N(e), respectivamente, en Rho A. Para Rho B los puentes de hidrógeno fueron de 1.69 y 1.95 Å para O5a–H···O7a y O5b–H···N(e) respectivamente, ver Figura 2. Estas interacciones podrían ser responsables de la estabilidad de la molécula ya que participan en la formación de nuevos anillos, ver Figura 3.

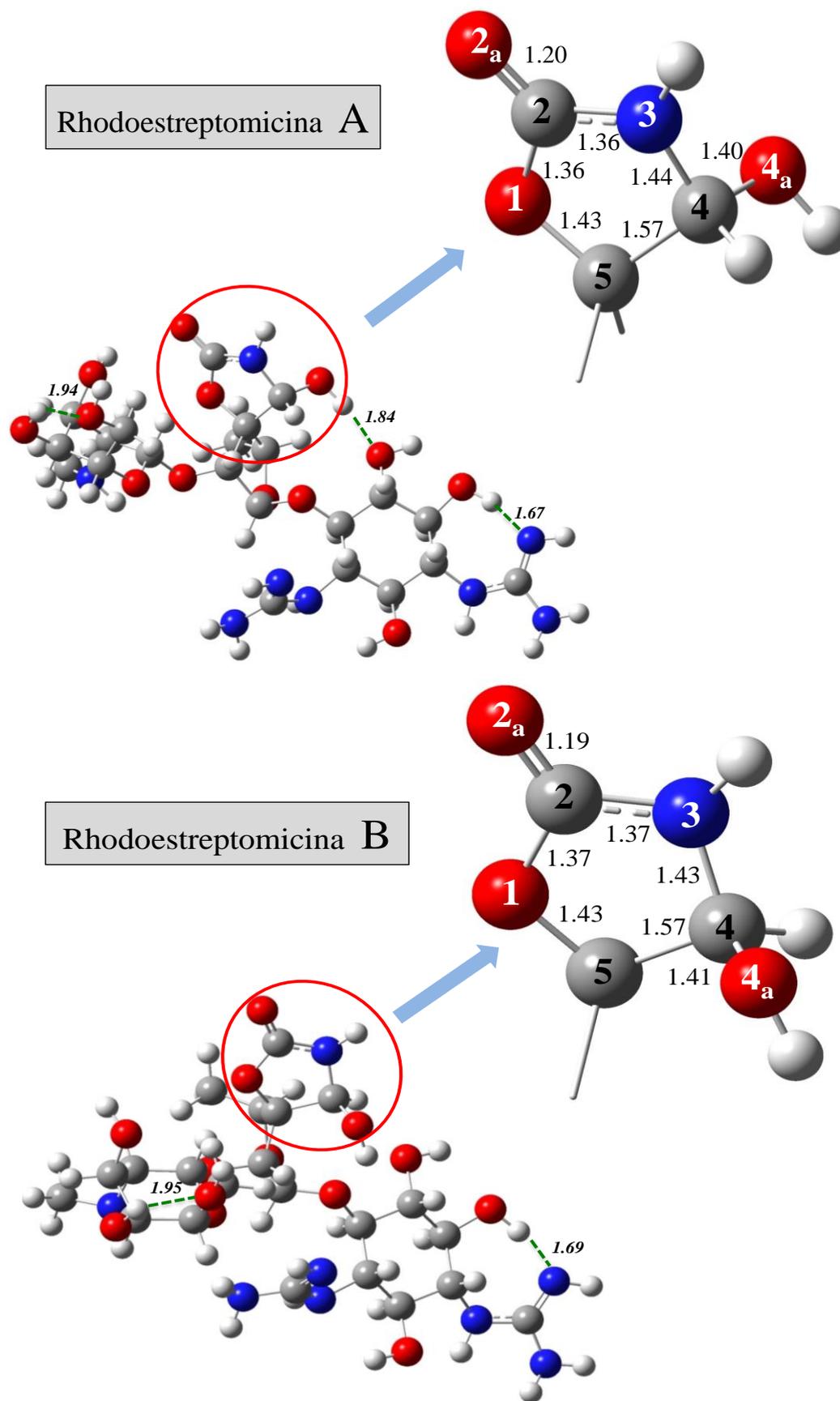


Figura 2. Geometrías optimizadas de Rho A y Rho B. Y algunas longitudes de enlace, en Å, enfocados en la parte del aminoglucósido.

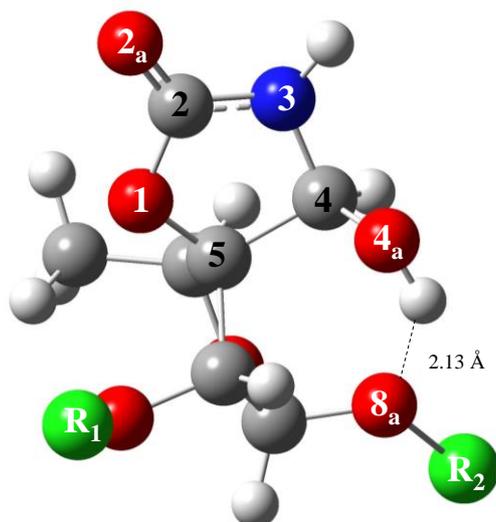


Figura 3. Enlace por puente de hidrógeno, en Å, formado entre el O4a-H...O8a. En la Figura el grupo R1 es la continuación de la cadena respecto al anillo 3 y R2, continuación para el anillo 4.

Además, se puede observar una pequeña diferencia de energía (ΔE) entre ambos isómeros de 2.41 kcal/mol en fase gas y de 2.50 kcal/mol en fase acuosa, siendo más estable Rho B con respecto a Rho A, ver Tabla 2.

1.4.1 Propiedades electrónicas de Rho A y Rho B.

Para describir la reactividad local de estos isómeros se calcularon algunas propiedades de reactividad global como la dureza (η),⁸³ momento dipolar, orbitales moleculares de frontera HOMO y LUMO, donde el parámetro de dureza se calculó con el teorema de Koopmans y su respectiva diferencia de energía (ΔE). Estos resultados se muestran en la Tabla 2. En esta Tabla se puede observar que la molécula Rho B presentó mayor valor de dureza respecto a Rho A, en su forma neutra tanto en fase gas como en fase acuosa, esto es, a mayor valor de dureza mayor reactividad química para llevar a cabo su protonación y su interacción con los iones calcio, las cuales serán discutidas más adelante.

Tabla 2. Datos teóricos de Rho A/B y sus complejos, usando B3LYP/6-311G** en fase gas y fase acuosa.

| Molécula | Fase Gas | | | | |
|-----------------------|--------------------|--------------------|-------------------|----------------------|--------------------------|
| | HOMO (kcal/mol) | LUMO (kcal/mol) | Dipolo (Debye) | Dureza (kcal/mol) | ΔE (kcal/mol) |
| Rho A | -134.12 | 1.34 | 12.87 | 67.73 | 2.41 |
| Rho B | -144.20 | 5.12 | 7.60 | 74.66 | |
| RhoA-H ⁺ | -186.64 | -65.86 | 15.56 | 60.39 | 2.76 |
| RhoB-H ⁺ | -191.53 | -57.53 | 5.75 | 67.00 | |
| RhoA-Ca ²⁺ | -238.43 | -156.93 | 26.23 | 40.75 | 19.60 |
| RhoB-Ca ²⁺ | -239.93 | -170.51 | 8.62 | 34.71 | |

| Molécula | Fase Acuosa | | | | |
|-----------------------|--------------------|--------------------|-------------------|----------------------|--------------------------|
| | HOMO (kcal/mol) | LUMO (kcal/mol) | Dipolo (Debye) | Dureza (kcal/mol) | ΔE (kcal/mol) |
| Rho A | -144.92 | 9.17 | 10.07 | 77.05 | 2.50 |
| Rho B | -145.07 | 16.53 | 11.21 | 80.80 | |
| RhoA-H ⁺ | -146.09 | 1.61 | 19.36 | 73.85 | 11.20 |
| RhoB-H ⁺ | -147.20 | -7.13 | 8.56 | 70.03 | |
| RhoA-Ca ²⁺ | -143.59 | -15.51 | 40.65 | 64.04 | 1.72 |
| RhoB-Ca ²⁺ | -148.01 | -15.43 | 23.57 | 66.29 | |

Las cargas de Mulliken permiten describir la reactividad de los átomos clasificándolos como sitios nucleofílicos o electrofílicos. En la Tabla 3 se muestran los valores para los átomos de oxígeno y nitrógeno, donde se puede notar que los valores oscilan desde -0.335 a -0.398 electrones para el átomo de oxígeno; para el átomo de nitrógeno N3 el valor fue de -0.414 en Rho A y de -0.410 electrones para Rho B. Con el análisis de estas cargas se puede sugerir que el anillo de aminoglucósido es una especie rica en electrones, esto es, el anillo 1 es el sitio idóneo con carácter de tipo nucleofílico que servirá para efectuar la formación de complejos estables con iones H⁺ y Ca²⁺.

Tabla 3. Cargas de Mulliken (electrones) para los átomos relevantes de nitrógeno, oxígeno y carbono en Rho A, Rho B y sus complejos, usando B3LYP/6-311G**.

| Átomo | Rho A | Rho B | RhoA-H ⁺ | RhoB-H ⁺ | RhoA-Ca ²⁺ | RhoB-Ca ²⁺ |
|-----------------------------------|--------|--------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| O1 | -0.335 | -0.343 | -0.306 | -0.328 | -0.305 | -0.439 |
| O2a | -0.370 | -0.342 | -0.310 | -0.291 | -0.273 | -0.260 |
| O4a | -0.398 | -0.398 | -0.486 | -0.426 | -0.543 | -0.568 |
| N3 | -0.414 | -0.410 | -0.449 | -0.416 | -0.462 | -0.356 |
| C2 | 0.485 | 0.464 | 0.485 | 0.481 | 0.494 | 0.456 |
| C4 | 0.263 | 0.257 | 0.334 | 0.322 | 0.326 | 0.269 |
| C5 | -0.098 | -0.080 | -0.145 | -0.100 | -0.097 | -0.186 |
| H ⁺ , Ca ²⁺ | | | 0.389 | 0.372 | 1.307 | 1.350 |

Los orbitales moleculares de frontera muestran que el orbital HOMO está localizado sobre los átomos de nitrógeno y oxígeno del anillo 1 (α -L *Estreptosa*), tanto para Rho A como para Rho B, ver Figura 4, sugiriendo que estos átomos (N3 y O4a) pueden actuar como sitios de carácter nucleófilo (base de Lewis) e interactuar con un catión (ácido de Lewis). Adicionalmente, el orbital molecular HOMO-1 se encontró a 0.02 eV para Rho A y 0.01 eV para Rho B debajo del HOMO, lo que indica que los átomos de nitrógeno (grupo Guanidina) de la Estreptidina (anillo 4) contribuyen con el par de electrones de carácter *p* y con el orbital π de los enlaces C-N y N=O, del sistema. El orbital HOMO-2 se localiza a 0.02 eV y 0.004 eV abajo del HOMO-1 en Rho A y Rho B, respectivamente como se muestra en la Figura 4. Además, una pequeña diferencia de energía entre orbitales HOMO y HOMO-1 favorece la formación de un complejo estable con iones Ca²⁺ debido al efecto cooperativista que pueden presentar estos orbitales.

El orbital LUMO está localizado en la zona de aminas del anillo cuatro; esta distribución podría aumentar el momento dipolar de las moléculas de Rho A y Rho B durante la interacción con los iones Ca²⁺. Esto probablemente sería importante para favorecer que estos antibióticos atraviesen la membrana externa de la bacteria.

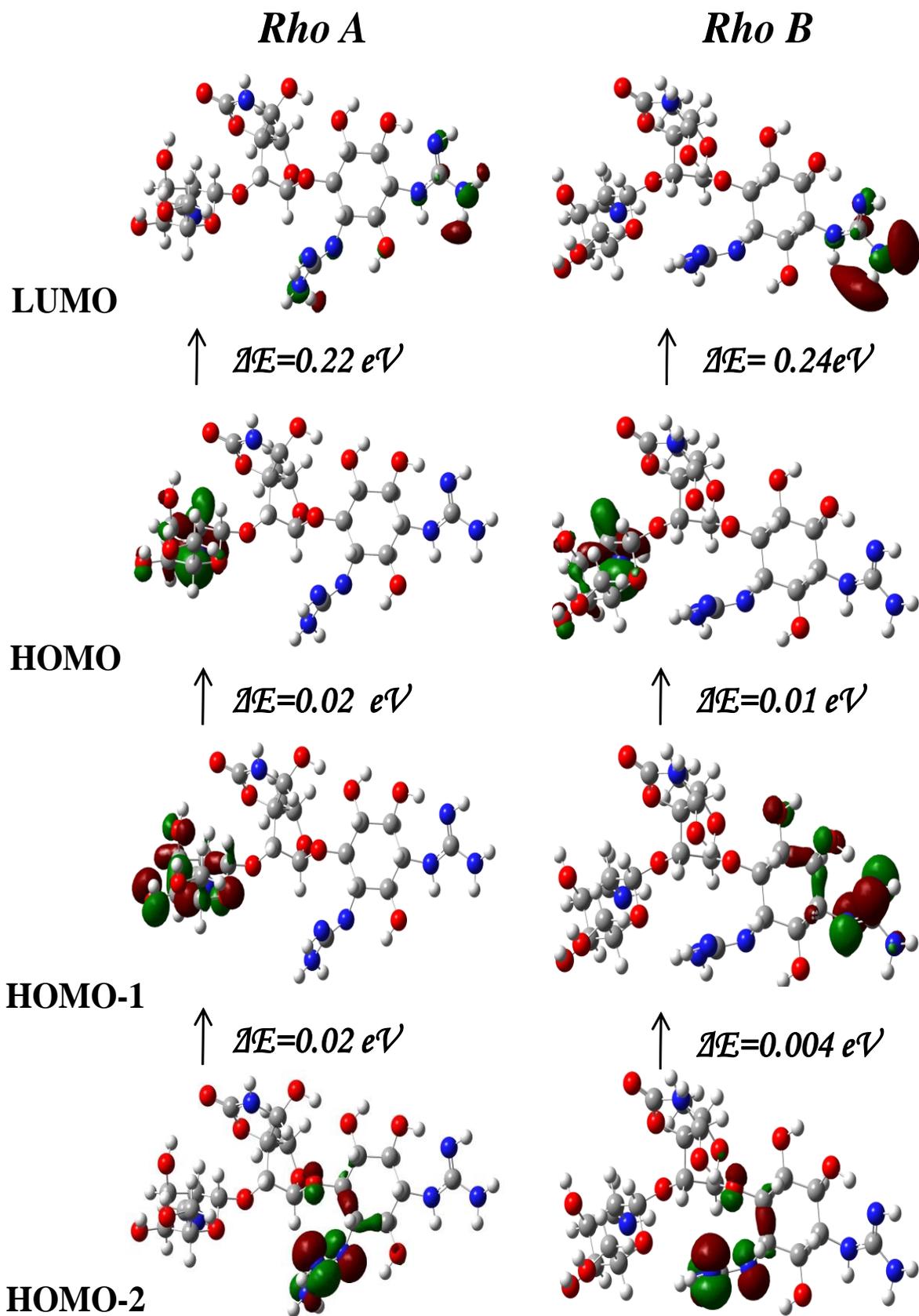


Figura 4. Orbitales Moleculares LUMO, HOMO, HOMO-1 y HOMO-2, para las moléculas de Rho A y Rho B, calculados con el nivel de teoría B3LYP/6-311G**.

1.4.2. Propiedades estructurales y electrónicas de Rho A-H⁺ y Rho B-H⁺.

Se realizó el mapeo de potencial electrostático sobre las moléculas de Rho A y Rho B. Con la finalidad de seleccionar los sitios de mayor probabilidad de protonación, en la Figura 5, se puede observar que el anillo 1 (α -L *Estreptosa*) presenta la más alta densidad de electrones, exhibiendo el mayor carácter nucleofílico. Esto es, la zona con mayor intensidad de color rojo. Por esta razón, se trabajaron las protonaciones de Rho A/B con el ion H⁺ en el anillo de oxazolidinona, donde se observaron diferentes modos posibles de interacción.

Estos sitios, como lo veremos más adelante fueron las posiciones donde se llevó a cabo la interacción con el ion de Ca²⁺, debido a que estos iones son abundantes en las células⁸⁴ y juegan un papel importante en procesos bioquímicos, como en el canal de calcio,⁸⁵ ver Figura 5.

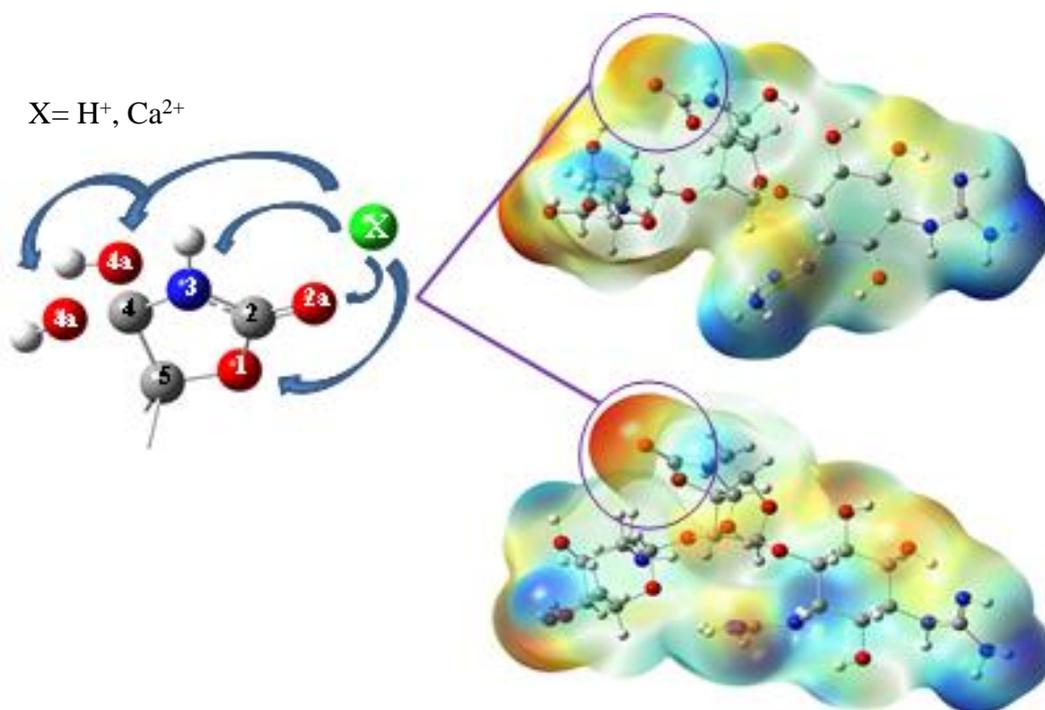


Figura 5. Sitios de la interacción de los iones, con las posiciones activas de las moléculas de Rho A y Rho B, usando B3LYP/6-311G**.

Las geometrías de las moléculas Rho A-H⁺ y Rho B-H⁺ fueron optimizadas, ver Figura 6, y los resultados indicaron que los parámetros geométricos para el anillo 1 (α -L *Estreptosa*) cambiaron considerablemente en la protonación de Rho A a Rho A-H⁺. Por ejemplo, la longitud de enlace C4-O4a se ve aumentada de 1.40 Å a 1.45 Å. Así mismo, se observó que el ion de hidrógeno migra para unirse con el átomo de oxígeno 6a, como resultado a este comportamiento se observó la formación de un puente de hidrógeno con una distancia de enlace de 1.73 Å. Por otro lado, Rho B no presenta una diferencia significativa en la longitud de sus enlaces entre la molécula neutra y su estructura protonada, la protonación se llevó a cabo sobre el átomo de oxígeno 4a del anillo de la oxazolidinona (anillo 1, α -L *Estreptosa*) Encontrando dos distancias de enlace de tipo O-H de 1.02 y 1.06 Å como se puede ver en la Figura 6.

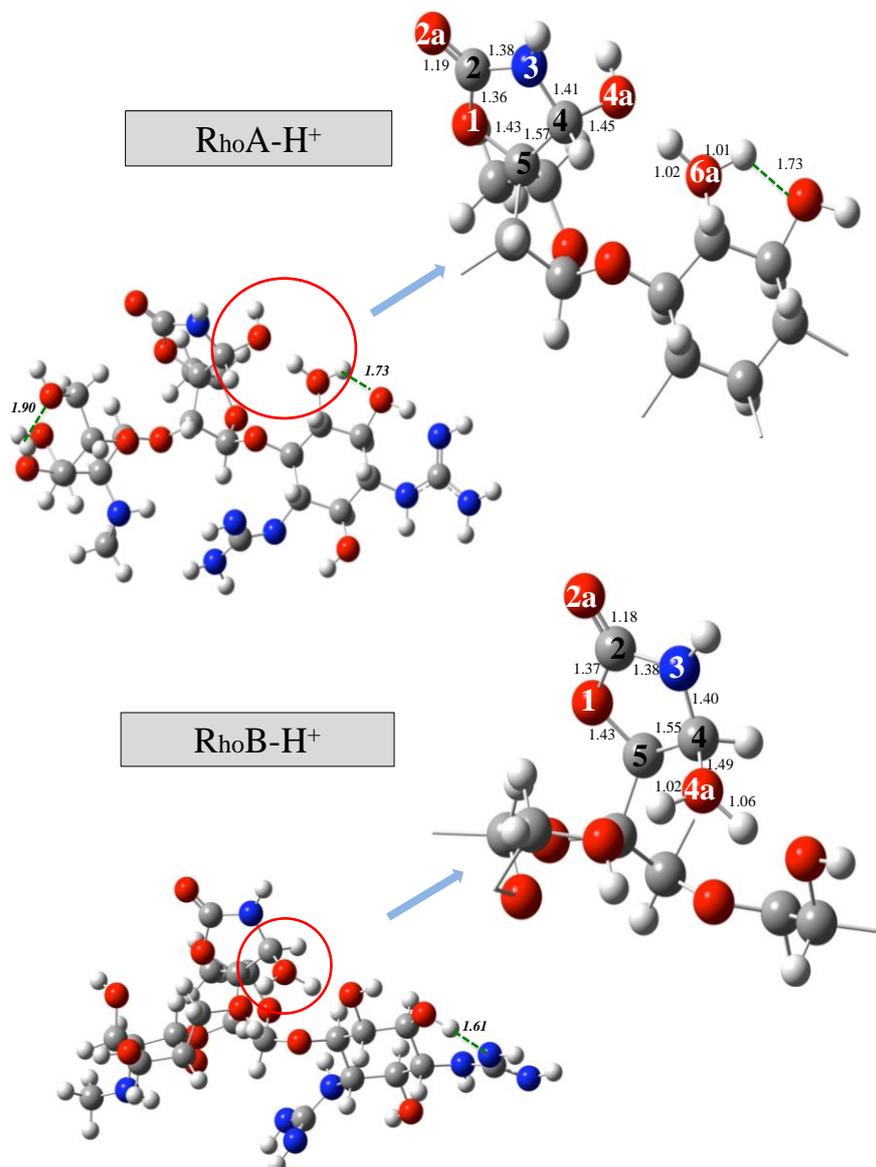


Figura 6. Geometrías Optimizadas de las moléculas Rho A-H⁺ y Rho B-H⁺ usando B3LYP/6-311G, y algunas distancias de enlace (en Å) que se muestran sobre el anillo de oxazolidinona (anillo 1).**

Para el análisis de las energías totales en las estructuras protonadas, se encontró que Rho B-H⁺ es más estable que Rho A-H⁺, con una diferencia de energía de 2.76 kcal/mol en fase gas, y aún más grande la diferencia de energía en fase acuosa (PCM) ya que fue de 11.20 kcal/mol (ver la Tabla 2). Este resultado está de acuerdo con las observaciones experimentales,⁴⁹ los cuales exhibieron que la actividad de la molécula de

Rho B es más potente que Rho A frente a *H. pylori*, indicando que la actividad biológica está asociada a la estereoquímica entre estas dos especies, lo que sugiere que la molécula de Rho B cuando se protona es estabilizada actuando de manera similar a un inhibidor de la bomba de protones. Esto es, la protonación es una característica que los fármacos presentan para reducir la producción de ácido gástrico y neutralizar la actividad iónica en el medio.⁸⁶

El análisis poblacional de Mulliken de Rho A-H⁺ y Rho B-H⁺, (ver Tabla 3, Figura 7) indica que los átomos de oxígeno y nitrógeno en el anillo 1(α -L *Estreptosa*) poseen densidades de carga mayores con respecto a los demás átomos. Por ejemplo, el átomo de oxígeno O4a de Rho A-H⁺ mostró un valor de -0.486 electrones y para Rho B-H⁺ de -0.426 electrones, mientras que para el átomo de N3 los valores fueron de -0.449 y -0.416 electrones para Rho A-H⁺ y Rho B-H⁺ respectivamente.

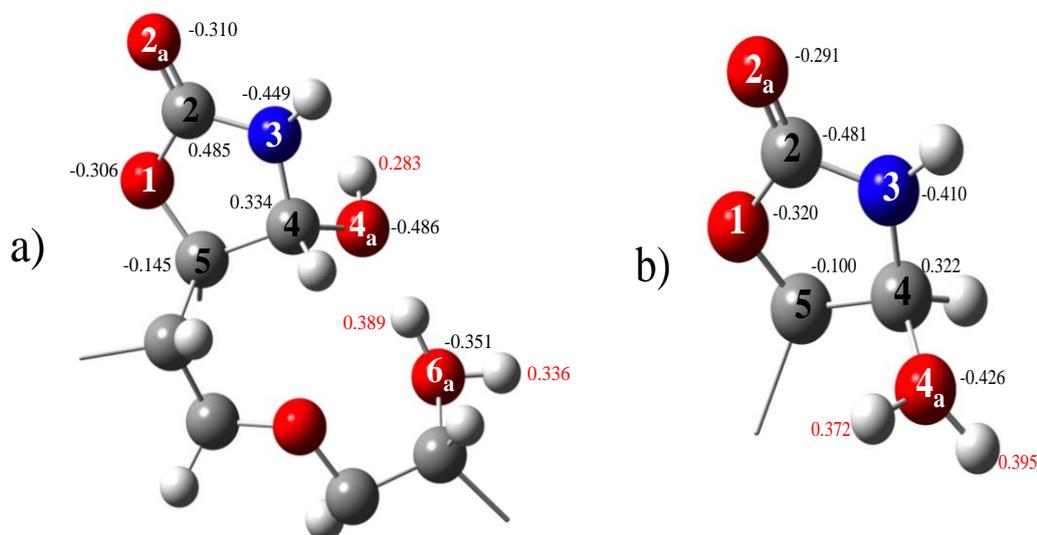


Figura 7. Cargas de Mulliken para el sitio de la α -L *Estreptosa* de las moléculas Rho A-H⁺ (a) y Rho B-H⁺ (b), usando B3LYP/6-311G.**

Los orbitales moleculares de las estructuras protonadas muestran que el HOMO se localizó sobre el átomo de N3a del anillo 3 (α -L Glucosamina), ver Figura 8. Estos orbitales muestran contribuciones de tipo *p*, ver Figura 8, exhibiendo pequeñas

contribuciones de tipo π orbital en los átomos de oxígeno (O4a, O5a) para la molécula Rho A-H⁺. Para Rho B-H⁺, el orbital molecular HOMO se encuentra localizado sobre los átomos N3, O4a y O5a del anillo 3 (α -L Glucosamina); este orbital presenta un carácter tipo p .

Los orbitales inferiores HOMO-1, presentan un carácter de tipo σ y π localizado sobre los átomos de oxígenos 4a y 5a en el anillo 3 (α -L Glucosamina) en la molécula de Rho A-H⁺. Para la molécula de Rho B-H⁺ este orbital presentó un carácter de tipo p sobre el grupo Guanidina en el anillo homocíclico 4 (*Streptidina*).

La diferencia de energía $\Delta E = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$ en las especies protonadas fue de 0.19 y 0.21 eV para Rho A-H⁺ y Rho B-H⁺ respectivamente; la diferencia de energía sugiere que Rho B es más activo que Rho A y podría ser más afín a la coordinación de los iones Ca²⁺,⁸⁷ ver Figura 8.

El orbital molecular LUMO se encuentra localizado, en el anillo 1, donde se lleva a cabo la protonación, esto es, sobre los oxígenos O6a para Rho A-H⁺ y O4a para Rho B-H⁺. Este orbital de tipo p se encuentra a 0.19 eV y 0.21 eV, por arriba del orbital HOMO tanto para Rho A-H⁺ y Rho B-H⁺ respectivamente. Esta distribución está relacionada con el aumento del momento dipolar para la molécula de Rho A-H⁺ y la disminución del momento dipolar para el sistema Rho B-H⁺, esto podría ser importante para favorecer que estos antibióticos soporten condiciones ácidas como es el ácido gástrico del estómago.^{88,89}

Las estructuras protonadas presentan puentes de hidrógeno intramoleculares con distancias de enlace de 1.90 Å para la interacción O5a-H \cdots O7a, en el anillo 3, y de 1.73 Å para la interacción O6a-H \cdots O5a, en el anillo 4 para Rho A-H⁺, y una interacción de

punto de hidrógeno en Rho B-H⁺ con distancia de 1.61 Å entre los átomos O5a-H...O5a del anillo 4, ver Figura 8.

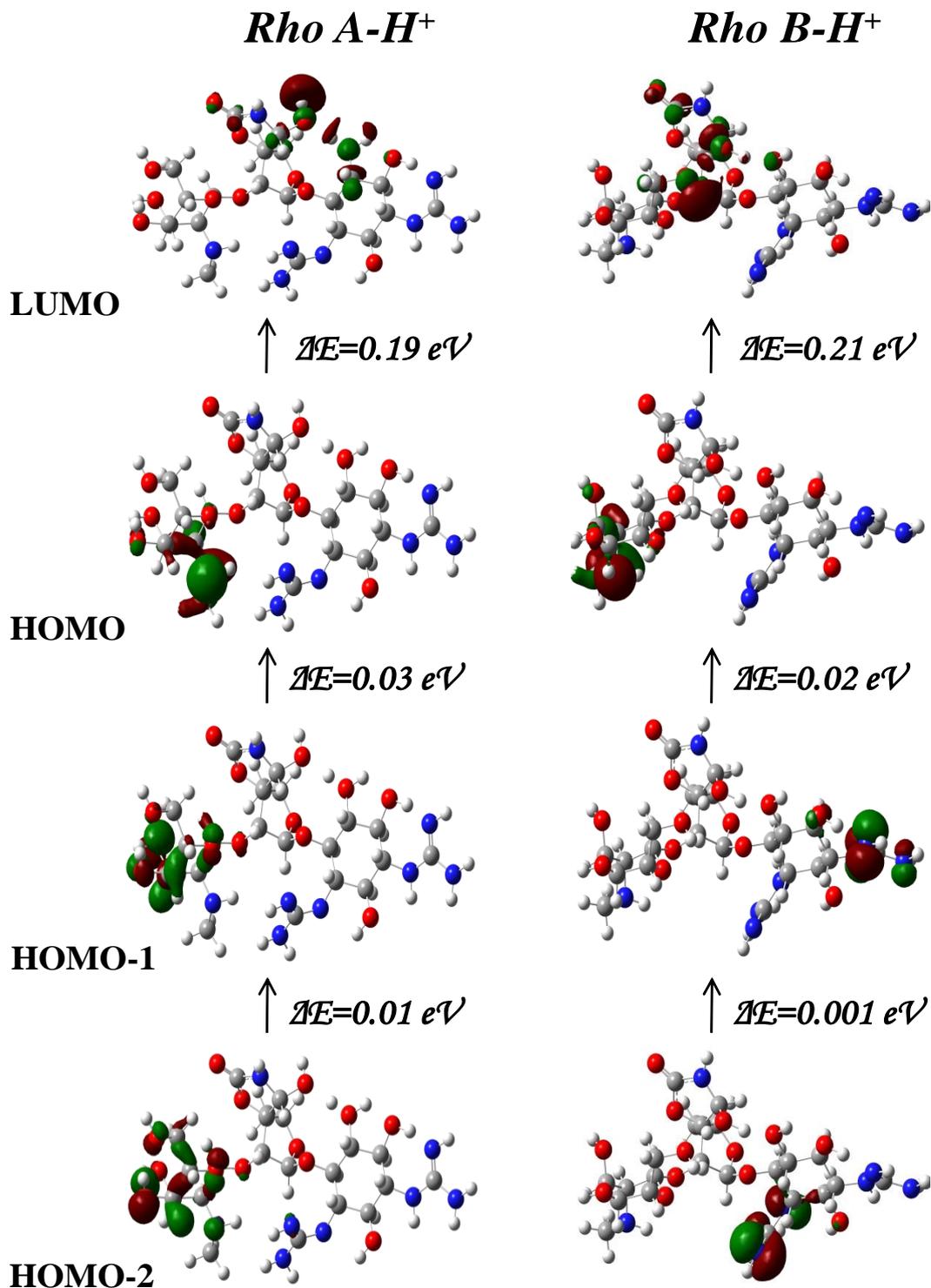


Figura 8. Orbitales moleculares LUMO, HOMO, HOMO-1 y HOMO-2 de las moléculas Rho A-H⁺ y Rho B-H⁺, usando B3LYP/6-311G**.

1.4.3. Reactividad química de Rho A y Rho B para coordinarse con iones Ca^{2+} .

Se conoce que la concentración de los iones Ca^{2+} en células bacterianas es de 5.0 g/kg.⁹⁰ Así, existe un exceso de iones Ca^{2+} en el ribosoma,⁹¹ en éste, los iones Ca^{2+} mantienen la estructura secundaria del r-ARN, además de estabilizar las interacciones electrostáticas entre las proteínas-ARN.⁹² Así se planteó realizar la coordinación de las moléculas de Rho A y Rho B con iones Ca^{2+} , los complejos fueron analizados utilizando métodos teóricos DFT.

En la Figura 5 se muestran los posibles modos de interacción entre el antibiótico y el Ca^{2+} . Los cálculos de optimización total mostraron que las coordinaciones con el ion calcio ocurren en el anillo de oxazolidinona (anillo 1) como se aprecia en la Figura 9. En esta Figura se puede observar que el átomo de Ca^{2+} se coordina a cuatro átomos de oxígeno en forma tetraédrica con distancias de enlace promedio de 2.33 Å Ca-O en RhoA- Ca^{2+} . Para RhoB- Ca^{2+} ocurre una tetracoordinación con distancias de enlace promedio de 2.35 Å.

Los ángulos de enlace O2a-C2-N3, C2-N3-H, H-N3-C4, y N3-C4-O4a en el anillo de oxazolidinona (anillo 1) muestran pequeños cambios después de la coordinación con los iones Ca^{2+} , ver Tabla 1.

Es importante resaltar que en Rho A al realizar la interacción con el ion de Ca^{2+} surge una deslocalización electrónica, la cual ocurre cuando el átomo de hidrógeno del oxígeno 6a migra al átomo de nitrógeno N(e) del grupo de la Guanidina (anillo homocíclico 4), como se observa en la Figura 10.

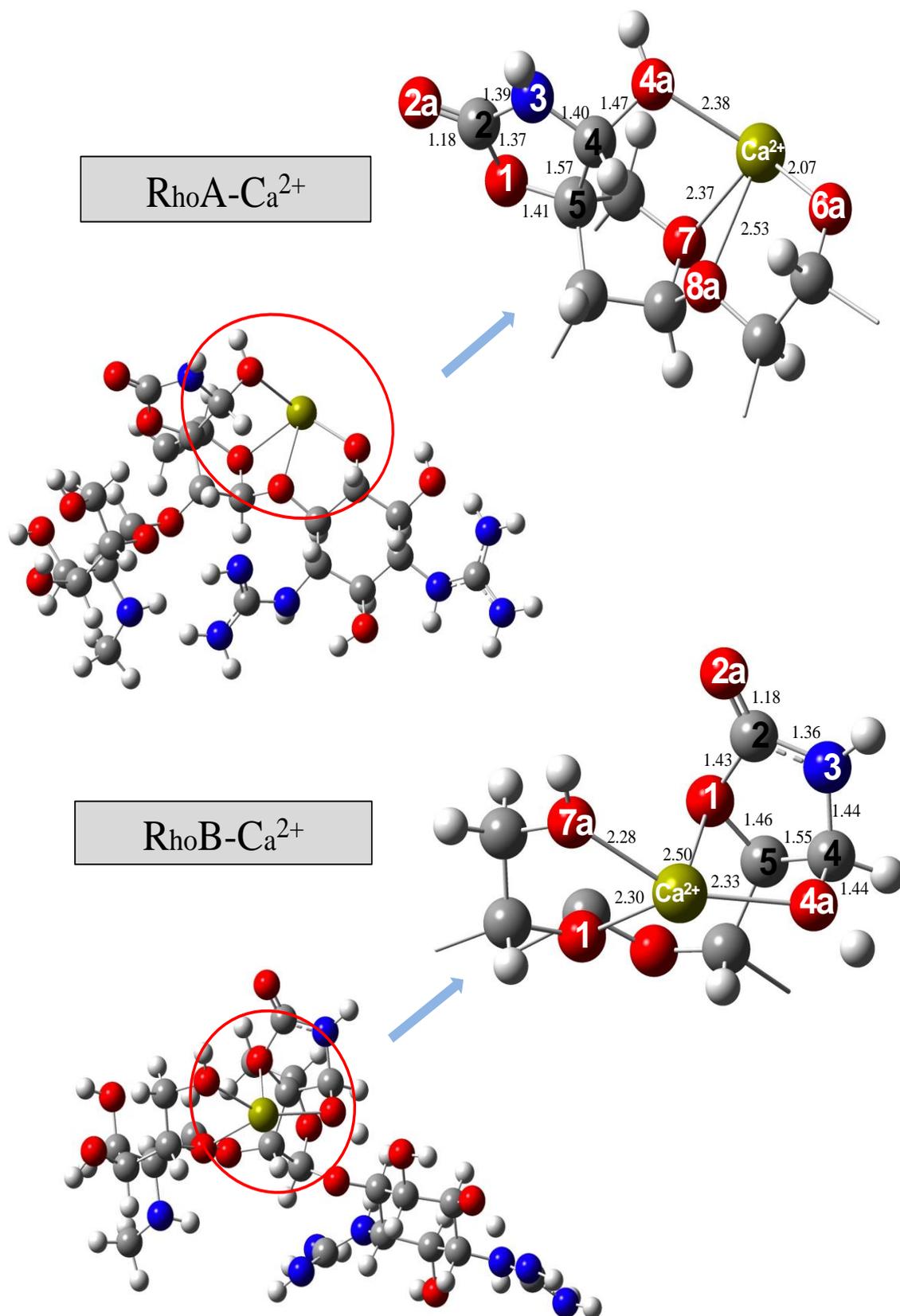


Figura 9. Geometrías analizadas de Rho A-Ca²⁺ y Rho B-Ca²⁺, fueron calculadas con B3LYP/6-311G**, y algunas distancias de enlace (en Å) en el anillo de oxazolidinona (anillo 1).

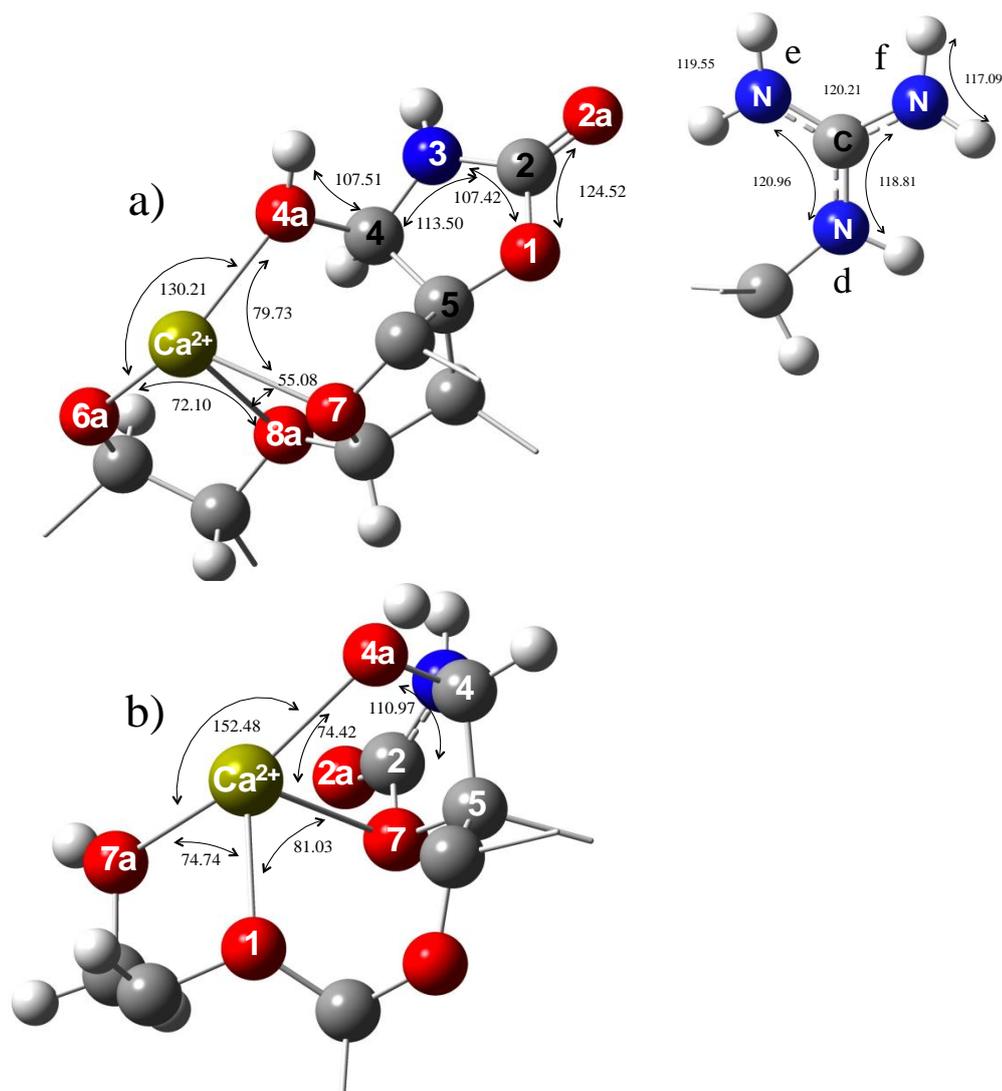


Figura 10. Ángulos de enlace en grados que se producen mediante la interacción de Rho A (a) o Rho B (b) con los iones de Ca^{2+} , y los ángulos en el sitio de las aminas en el anillo 4 de la Rho A- Ca^{2+} , calculados con B3LYP/6-311G**.

El análisis de Mulliken en el complejo Rho A- Ca^{2+} , ver Tabla 3, mostró que el ion Ca^{2+} cede carga electrónica al anillo de oxazolidinona (anillo 1) esto es, el átomo de oxígeno O4a aumenta su densidad electrónica de -0.398 a -0.543 y el átomo de oxígeno O2a pierde carga pasando de -0.370 a -0.273 electrones después de la coordinación de Rho A con el ion Ca^{2+} . Para el sistema Rho B- Ca^{2+} la densidad de carga del átomo de oxígeno O2a disminuye de -0.342 a -0.260 , lo mismo ocurre para el átomo de nitrógeno N3 el cual pierde densidad de carga cambiando de -0.410 a -0.326 electrones, como se puede observar en la Figura 11.

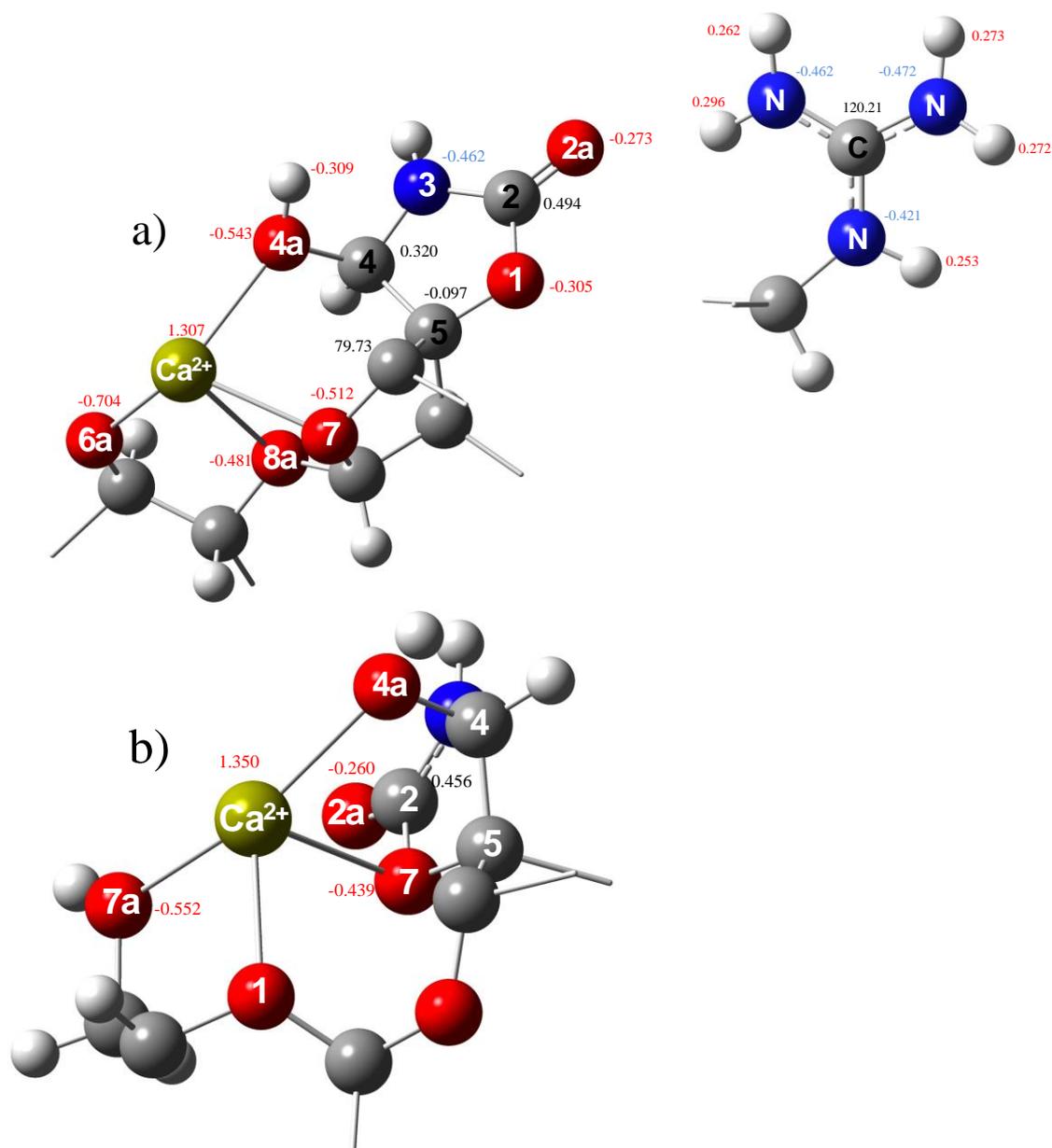


Figura 11. Algunas cargas de Mulliken en los complejos de a) Rho A-Ca²⁺ y (b) Rho B-Ca²⁺, calculados con B3LYP/6-311G**.

Los resultados de las energías totales indicaron que Rho A-Ca²⁺ es energéticamente más estable que Rho B-Ca²⁺, con una diferencia de 19.60 kcal/mol en fase gas y de 1.72 kcal/mol, en agua como disolvente, ver Tabla 2. Esta diferencia de energía se puede atribuir a la considerable fuerza de los enlaces entre los átomos de O-Ca y N-Ca⁹³ y la formación de otros enlaces de hidrógeno que se forman intramolecularmente.

Por otra parte, se calculó la energía de unión (ΔE) para estos sistemas utilizando las ecuaciones 1 y 2.

$$\Delta E = E_{\text{RhoA-Ca}^{2+}} - [E_{\text{RhoA}} + E_{\text{Ca}^{2+}}] \quad [1]$$

$$\Delta E = E_{\text{RhoB-Ca}^{2+}} - [E_{\text{RhoB}} + E_{\text{Ca}^{2+}}] \quad [2]$$

Los datos termodinámicos obtenidos (Tabla 4) predicen que Rho A forma un complejo más estable que Rho B con los iones Ca^{2+} con una diferencia de energía (ΔE) de 16.08 kcal/mol; estos resultados predicen que Rho A- Ca^{2+} favorecerán el desplazamiento en los canales de calcio en las membranas celulares.

Tabla 4. Datos teóricos de energía para complejos no hidratados de Rho A y Rho B con Ca^{2+} , calculados con B3LYP/6-311G**.

| Complejos | ΔE (kcal/mol) | ΔG (kcal/mol) | ΔH (kcal/mol) |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| RhoA- Ca^{2+} | -223.67 | -212.37 | -224.42 |
| RhoB- Ca^{2+} | -207.59 | -196.88 | -208.69 |

1.4.4. Acoplamiento Molecular (Docking).

Los acoplamientos moleculares (Docking) permiten explorar los sitios activos de una macromolécula o proteína (receptor), al interactuar con moléculas o antibióticos (ligante). En nuestro caso particular las moléculas de Rho A/B funcionarán como el sitio receptor y los iones Ca^{2+} y $[\text{Ca}-(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ serán los ligantes.

Se llevó a cabo el acoplamiento molecular sobre las superficies de Rho A y Rho B, con los iones de Ca^{2+} hexacoordinado con seis moléculas de agua.²⁷ Esta solvatación fue realizada considerando que el medio donde interactúan los fármacos es un ambiente acuoso,^{85,86} las interacciones de los iones metálicos hexahidratados con Rho A y Rho B se muestran en la Figura 12.

En esta Figura 12 se puede observar que las moléculas de agua forman puentes de hidrógeno creando especies de clatratos de agua, donde el ion Ca^{2+} es atrapado entre las moléculas de agua y el Rho en ambos sistemas. Los átomos de hidrógenos de las moléculas de agua que rodean al átomo de calcio son las que interactúan con los átomos de oxígeno y nitrógeno en ambos sistemas como se puede apreciar en la Figura 12, del lado derecho.

Es importante mencionar que durante la relajación de estos sistemas los átomos no presentan restricciones en el cálculo, esto es, las moléculas de agua en los ligantes se conservaron libres, con restricciones para no formar enlaces entre ellas.

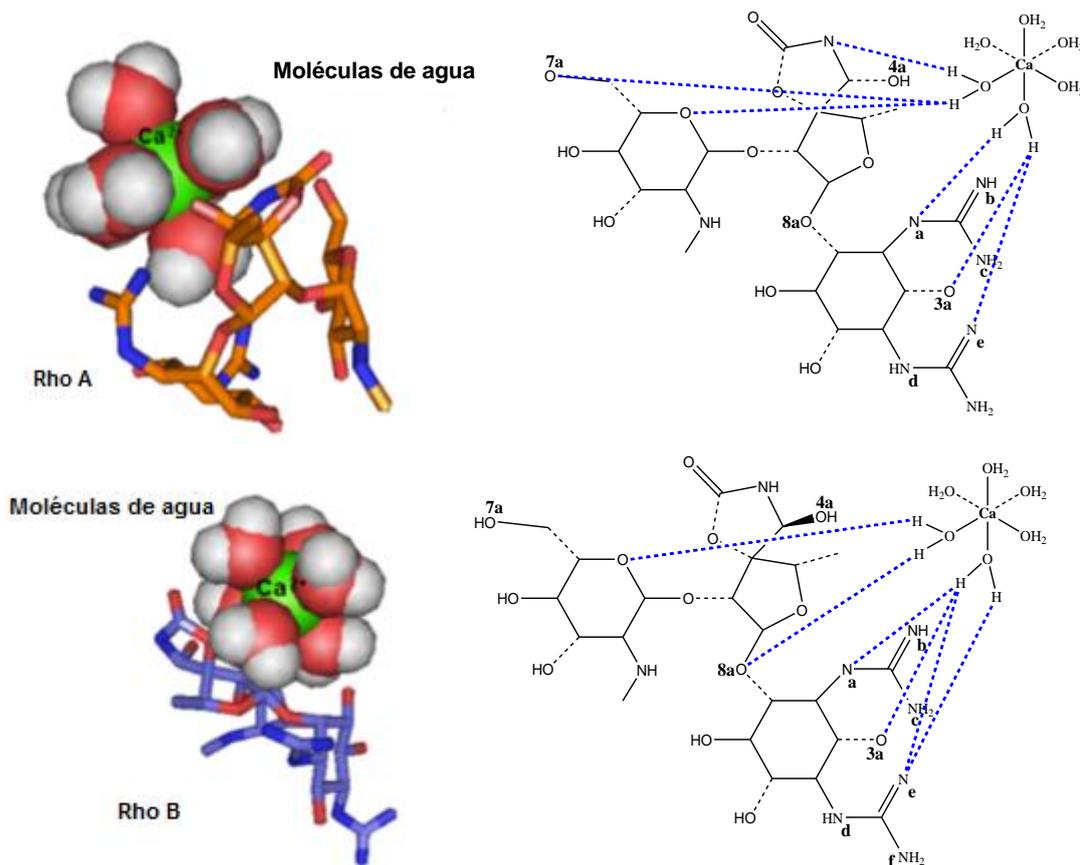


Figura 12. Interacción de los acoplamientos moleculares Docking de los iones metálicos Ca^{2+} hexahidratados contra las moléculas de Rho, a la derecha se muestra las interacciones encontradas en color azul.

El complejo de mínima energía de Rho A- $[Ca-(H_2O)_6]^{2+}$ mostró las siguientes interacciones: $H \cdots O7a = 1,725 \text{ \AA}$, $H \cdots O1$ (anillo 3) = $1,766 \text{ \AA}$, $H \cdots O3a = 1,720 \text{ \AA}$, $H \cdots N3 = 2,085 \text{ \AA}$, $H \cdots N(a) = 1,972 \text{ \AA}$, y $H \cdots N(e) = 1,634 \text{ \AA}$. Para Rho B- $[Ca-(H_2O)_6]^{2+}$ interacciones fueron $H \cdots O8a = 1,985 \text{ \AA}$, $H \cdots O1$ (anillo 3) = $1,774 \text{ \AA}$, $H \cdots O3a = 1,827 \text{ \AA}$, $H \cdots N(a) = 1,791 \text{ \AA}$, y dos interacciones entre $N(e) \cdots H = 1.649$ y 1.888 \AA . Estos resultados confirman que la estabilización de estos sistemas es de naturaleza electrostática y estos resultados están en concordancia con respecto a la estabilidad reportada en la formación de la tetraciclina.¹²

Los resultados de energía total indican que Rho A y Rho B forman complejos estables con el ion metálico de Ca^{2+} hexahidratado. Las energías de unión fueron de -70.54 kcal/mol para Rho A- $[\text{Ca}-(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ y -70.18 kcal/mol para Rho B- $[\text{Ca}-(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, ver Tabla 5. Esto podría estar relacionado con los efectos de los estereoisómeros y catiónicos, así como a la presencia de las moléculas de agua favoreciendo las interacciones de puentes de hidrógeno.

Finalmente, los datos termoquímicos calculados con B3LYP/6-311G** para estos complejos obtenidos fueron de $\Delta G = -50.75$ kcal/mol y $\Delta H = -72.21$ kcal/mol para la molécula de Rho A- $[\text{Ca}-(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, y para la molécula Rho B- $[\text{Ca}-(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ los valores son $\Delta G = -49.10$ kcal/mol y $\Delta H = -72.53$ kcal/mol, esto indica una afinidad del catión hexahidratado de Ca^{2+} hacia las moléculas de Rho A y Rho B. Ayudando el traslado de los antibióticos a los canales de calcio en las membranas celulares.

Tabla 5. Datos teóricos de energía para complejos hidratados de Rho A y Rho B con Ca^{2+} , calculados con B3LYP/6-311G**.

| Complejos | ΔE (kcal/mol) | ΔG (kcal/mol) | ΔH (kcal/mol) |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| RhoA- $[\text{Ca}-(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ | -70.54 | -50.75 | -72.21 |
| RhoB- $[\text{Ca}-(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ | -70.18 | -49.10 | -72.53 |

1.5. Conclusiones.

La comparación de energía total demostró que de los sistemas protonados, Rho B es más estable que Rho A, con una diferencia de 2.76 kcal/mol entre ellos. A su vez, estos sistemas se ven estabilizados por dos enlaces por puentes de hidrógeno. Este resultado es consistente con lo reportado experimentalmente, donde se reporta que Rho B, presenta mayor inhibición de crecimiento bacteriano debido a que, en un medio ácido, Rho B se encuentra en un estado protonado y es más estable que Rho A.

Los descriptores químicos Rho A y Rho B de las formas neutras y protonadas (HOMO, LUMO, ΔE , η , S) sugieren una reactividad química favorable de los sistemas Rho A/B para coordinarse con los iones H^+ y Ca^{2+} , donde Rho B- H^+ muestra una mayor estabilidad, y por lo tanto, es considerado como un posible regulador de acides estomacal, como lo hacen los agentes de la bomba de protones, frente a la bacteria de *H pylori*.

Los datos termoquímicos encontrados en estos compuestos arrojaron que los resultados de las energías de unión para las moléculas con iones hexahidratados fueron de $\Delta G = -50.75$ kcal/mol y $\Delta H = -72.21$ kcal/mol para Rho A- $[Ca-(H_2O)_6]^{2+}$, $\Delta G = -49.10$ kcal/mol y $\Delta G = -72.53$ kcal/mol para Rho B- $[Ca-(H_2O)_6]^{2+}$, Estos resultados no muestran una diferencia notable entre los compuestos de Rho A- $[Ca-(H_2O)_6]^{2+}$ y Rho B- $[Ca-(H_2O)_6]^{2+}$, sugiriendo que los dos sistemas de Rho A/B puedan presentar un comportamiento de afinidad similar cuando se coordinen con los iones hidratados de Ca^{2+} $[Ca-(H_2O)_6]^{2+}$.

Capítulo II

Estudio QSAR en antagonistas de tipo Dihidropiridínico.

2.1. Antecedentes.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la primera causa de muerte a nivel mundial, y una de las principales causas de discapacidad en la seguridad social. Una de ellas es la hipertensión arterial (HA); el mal control de ésta, además de las complicaciones que implica en sí misma, aumenta exponencialmente la probabilidad de sufrir algún tipo de infarto agudo de miocardio, angina de pecho, infarto cerebral y muerte, teniendo consecuencias en el ámbito económico y social.⁹⁴

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁹⁵ el riesgo de sufrir un accidente cerebro vascular (ACV) podría reducirse hasta en un 40% con un adecuado control de la HAA. Por otra parte, los datos obtenidos en encuestas indicaron que en el 91% de los casos el familiar que había padecido un ACV ya no pudo volver a trabajar. Además, en un 74% de los casos un familiar tuvo que dejar de trabajar para cuidar al paciente en recuperación.⁹⁶

2.1.1. Hipertensión.

La hipertensión arterial, se va a presentar cuando la sangre impulsada por el corazón ejerce demasiada fuerza contra las paredes de las arterias; frecuentemente se trata de una hipertensión esencial, primaria o idiopática (causa desconocida). La hipertensión secundaria es aquella debida a alguna causa fácilmente identificable, como pérdida de peso o retención de líquidos. Los individuos con HAA tienen más riesgo de sufrir una

apoplejía (ataque cerebral) o un ataque al corazón, pero el tratamiento de la hipertensión puede reducir este riesgo.⁹⁷

En un ACV se interrumpe el suministro de sangre hacia el cerebro y, cuando ello ocurre, las células que han dejado de ser irrigadas (transportadas) mueren por la falta de oxígeno y glucosa, esto origina una serie de síntomas variables en función del área afectada, es decir, se trata de un infarto cerebral.⁹⁸ Si la persona sobrevive a un ACV, puede quedar discapacitada a consecuencia del daño en el área del cerebro donde se interrumpió la circulación sanguínea.

En México el tema de tensión arterial alta (Hipertensión) es de relevancia en economía, ya que 40% de los encuestados manifiesta que de un 60% a 79% de los ingresos totales familiares es perdido debido a un ACV, un dato alarmante que revela el alto impacto económico que la hipertensión puede tener si no es tratada debidamente. Sobre este mismo tema las encuestas muestran que un 34% de encuestados expresaron que los gastos médicos anuales de un hogar se incrementaron de un 80% a 100% debido a un ACV.⁹⁹

2.1.2 Hipotensores.

Algunos compuestos que han sido utilizados como reguladores cardiovasculares, son:

- Diuréticos: Aumentan la excreción de sodio y agua a través de los riñones lo cual disminuye el volumen total de sangre. Los más empleados son la hidroclorotiacida, a base de tiacida, y la furesemida.¹⁰⁰
- Beta bloqueadores: Disminuyen la presión arterial al retardar el ritmo cardiaco y reducir la cantidad de sangre que se bombea con cada latido, por ejemplo, el

propranolol (inaleralici), el etnolol (tenormin) y el timolol (blocadren), entre otros.¹⁰¹⁻¹⁰³

- Vasodilatadores: Ensanchan o dilatan las arterias, por ejemplo, la hidralacina.^{104,105}
- Bloqueadores de los canales de calcio: evitan la entrada de calcio en las células de los músculos que controlan las paredes de las arterias; esto dilata los vasos sanguíneos y la sangre fluye a través de ellos con más facilidad. Entre los fármacos de esta categoría de encuentran el verapamil y el diltiazem.^{106,107}
- Antagonistas adrenérgicos periféricos: Bloquean la liberación de norepinefrina, una hormona que aumenta la presión arterial. La reserpina, es un fármaco principal de esta categoría.¹⁰⁸⁻¹¹⁰

Los compuestos de tipo 1,4-dihidropiridina (DHP) son moduladores de los canales de calcio tipo L dependientes de voltajes (canales Cav1, de acuerdo a la última nomenclatura propuesta por Alexander y colaboradores 2005). Las DHP son usadas como fármacos en trastornos cardiovasculares, inhibiendo la contracción muscular al bloquear el flujo de calcio, en los tejidos del musculo liso como el cardio. Estos fármacos también son conocidos como antagonistas de calcio o bloqueadores de los canales de calcio, el fármaco comúnmente utilizado para estos trastornos es el Nifedipino, (molécula de Nifedipina, ver Figura 13).

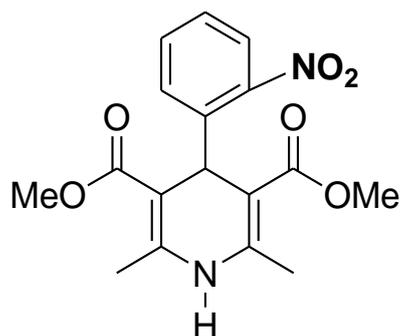


Figura 13. Molécula de Nifedipina.

Estudios previos han descrito que los cambios en las orientaciones y sustituciones en el anillo fenilo de la Nifedipina alteran la potencia,^{111,112} la cual está relacionada con la lipofilia, con los parámetros electrónicos y con las sustituciones que podría sufrir el anillo aromático.¹¹³

Por otra parte, el diseño basado en la estructura y el reconocimiento molecular juegan un papel importante ya que se ha demostrado que un gran número de estructuras tridimensionales de blancos biológicos pueden ser utilizadas para el diseño de moléculas pequeñas que se unen a ellas. Algunos fármacos comerciales han sido diseñados mediante gráficos moleculares, química computacional, base de datos moleculares, y la obtención de Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad (QSAR),¹¹⁴⁻¹¹⁶ permitiendo generar modelos que predicen actividad biológica.

2.1.3. Métodos computacionales QSAR.

Varios medicamentos comerciales han sido diseñados por medio de modelos moleculares a través de la química computacional y las Relaciones Cuantitativas Estructura Actividad (QSAR).^{115,116} Las interacciones no covalentes (INC) son acercamientos importantes presentes en un acoplamiento molecular entre un ligante biológico frente a un huésped receptor,¹¹⁵⁻¹¹⁸ donde, la aplicación del QSAR se usa como

una herramienta versátil en el estudio de cualquier sistema químico o biológico.^{111,112} Estudios de QSAR en análogos de 1,4-dihidropiridina han demostrado que la concentración media inhibitoria (IC_{50}) está influenciada por diversos factores como son las propiedades estructurales y electrónicas.¹¹⁹ Se ha propuesto que en la molécula de Nifedipina resalta la importancia de la rotación del anillo fenilo con respecto al anillo de DHP, los efectos de la constante de Hammett¹²⁰ y las contribuciones π que la convierten en un buen agente hipotensor.^{113,121-125}

Debido al efecto de la posición del grupo fenilo frente a su respuesta de la actividad biológica, se propone un modelo QSAR, en donde son importantes el efecto hipotensor que considera propiedades de interacciones no covalentes, usando el gradiente de la densidad reducida, $s(r)$,¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ así como descriptores moleculares químicos cuántico-moleculares calculados con la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT).

2.2. Justificación.

La hipertensión arterial, es una enfermedad considerada un problema de salud pública y es considerada la principal causa de muerte mundial según reportes emitidos por la Organización Mundial de la Salud en el 2013. Para el tratamiento de esta enfermedad son utilizadas las 1,4-dihidropiridinas como fármacos que actúan como bloqueadores de los canales de calcio, reduciendo la presión de la sangre en las arterias.

Estos aspectos nos impulsan a desarrollar un proyecto que permita entender las propiedades estructurales y electrónicas de los derivados de 1,4-dihidropiridinas y relacionarlo con el efecto hipotensor reportado experimentalmente, a través de modelos QSAR aplicando la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT).

2.3. Objetivo.

Encontrar las relaciones estructura actividad que puedan presentar los derivados de 1,4-dihidropiridina para proponer un modelo QSAR que permitirá predecir el efecto hipotensor, utilizando la Teoría de los Funcionales de Densidad para el cálculo de los descriptores cuánticos.

2.4 Resultados y Discusión.

Siguiendo la metodología que se detalla en el apéndice A. Se analizaron las moléculas de 1,4-dihidropiridinas que son análogos de Nifedipina y son mostrados en la Figura 14; estos compuestos y sus valores experimentales de $\log(1/IC_{50})$ se tomaron de la referencia de Corburn y colaboradores.¹¹¹ La actividad biológica de estos compuestos en éste estudio, fue relacionada con su actividad antagonista en el canal de calcio. En la Figura 14 se muestran la numeración de los átomos de la estructura de referencia.

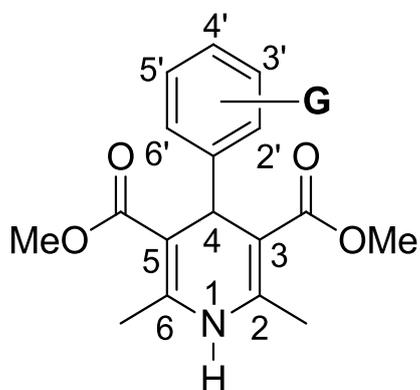


Figura 14. Estructura tipo Nifedipina. Al sustituir el grupo G unido al anillo aromático se obtienen diferentes análogos de 1,4-dihidropiridínicos.

2.4.1. Parámetros geométricos de las dihidropiridinas.

Con la finalidad de validar nuestros datos estructurales de las moléculas de DHPs, comparamos nuestros resultados con los datos cristalográficos para este tipo de

compuestos. Esto es, se realizó una búsqueda en la base de datos (Cambridge Structural Data Base), de moléculas con estructura similar a la Nifedipina, es decir, compuestos que contienen grupos metilo unidos a los átomos de carbono 2 y 6, grupos $-C(O)OMe$ en átomos de carbono 3 y 5, y un sustituyente fenilo sustituido unido a C4 (véase la Figura 15), La base de datos contiene actualmente 40 estructuras de Rayos X que coinciden con las moléculas de DHPs (CSD Versión 5.36, actualización en Mayo 2015; ConQuest versión 1.17).

Los parámetros geométricos de las estructuras optimizadas fueron comparados con los valores promedio de las cuarenta moléculas experimentales. Esto es, se compararon las distancias de enlace $C-N$ y $C=C$ del anillo de dihidropiridina (ver Figura 15 en la parte superior) con las distancias correspondientes de los datos cristalográficos.¹²⁶

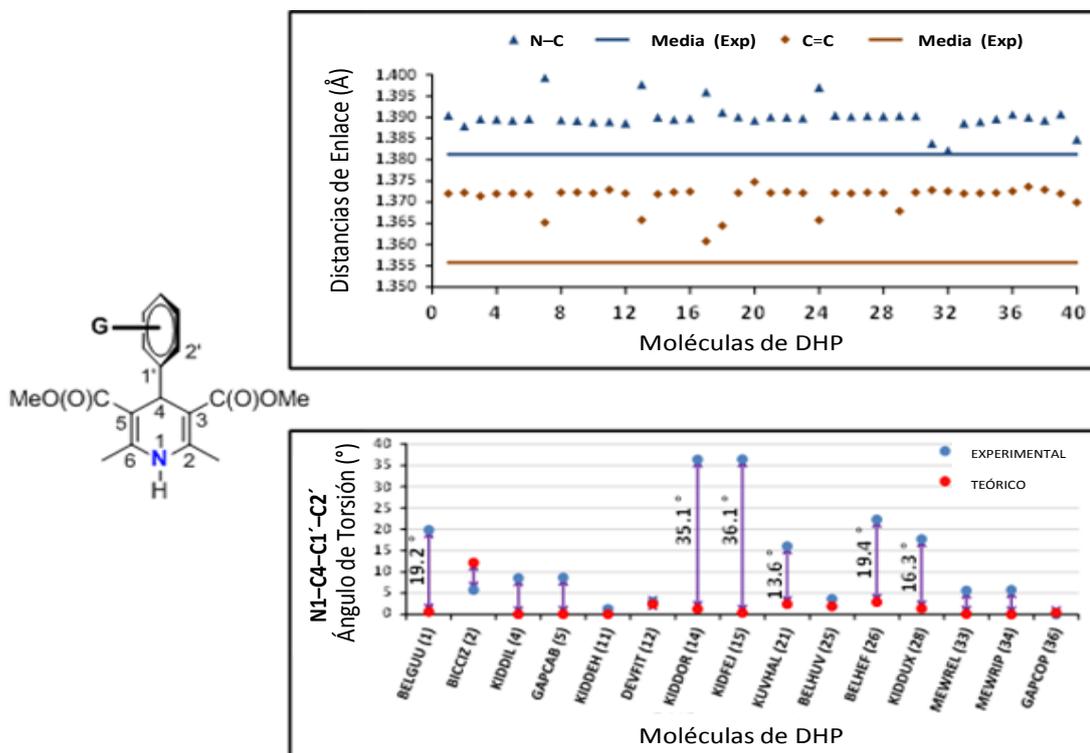


Figura 15. Comparación de datos cristalográficos y datos estructurales calculados. Arriba: distancias de enlace entre los átomos $C-N$ y $C=C$ comparados con los correspondientes valores medios. Abajo comparación de los datos observados del ángulo de torsión $N-C4-C1'-C2'$ en las geometrías optimizadas con el método PBE/DGDZVP (G =sustituyente en el anillo fenilo de la dihidropiridina).

Como se puede observar en la Figura 15, la distancia de enlace N–C y C=C no muestran cambios significativos entre los datos experimentales y nuestros resultados teóricos. Por ejemplo, las distancias promedio experimentales para los enlaces N1–C2 y C=C fueron de 1.38 y 1.35 Å respectivamente para todos los sistemas. Estos valores concuerdan con el valor promedio teórico calculado 1.38 y 1.35 Å, para las distancias N1–C2 y C=C respectivamente, corroborando que esta metodología PBE/DGDZVP es adecuada para estudiar este tipo de sistemas.

Los parámetros estructurales pueden jugar un rol importante en los efectos farmacológicos en estos derivados de DHPs, por lo tanto se analizó la posición del grupo fenilo unido al átomo C4, el cual se puede localizar en una posición ortogonal sin/antiperiplanar del grupo orto/meta del sustituyente **G** con respecto al átomo de H4, o las conformación cis/trans y cis/cis de los grupos éster adjuntos a los átomos de carbono sp² del anillo de DHP.¹³¹ Encontrando que la posición del sustituyente promueve la formación de interacciones tipo puentes de hidrógeno que le dan estabilidad a estos sistemas.

El ángulo de torsión N-C4-C1'-C2' (llamado τ) fue comparado con los datos obtenidos de DFT para quince compuestos, los datos obtenidos se muestran en la Figura 15. En esta Figura podemos observar que seis moléculas **1**, **14**, **15**, **21**, **26** y **28** presentan una desviación ($\tau_{\text{exp}} - \tau_{\text{calc}}$) mayor a 10°. Esta diferencia puede estar vinculada con la ausencia de sustituyentes en el fenilo en la posición orto, esto es, estas moléculas no tienen un átomo donador de electrones que pueda formar enlaces de hidrógeno con el protón del carbón C(2'), permitiendo una rotación libre alrededor del enlace C(4)–C(1').

Las moléculas que tienen sustituyente donador de electrones (**G** = **F**, **Cl**, **Br**, **N** y **O**) favorecen la formación de puentes de hidrógeno con el protón del carbón C4. Estas

interacciones C(4)–H•••G son descritas en la literatura como interacciones no covalentes o puentes de hidrógeno débiles.

En la Figura 16 se muestran los enlaces de hidrógeno no convencionales que se forman para la molécula de Nifedipina (compuesto **2**, G= NO₂) los cuales son C(4)–H•••O (*d1*) y C(2')–H•••N (*d2*) con distancias de enlace de 2.00 y 2.75 Å respectivamente. Estas interacciones están relacionadas con la estabilidad del sistema, participando en la formación de un anillo de seis miembros en las moléculas que incluyen átomos de **F**, **Cl**, **Br** y **O**. La distancia H•••N (*d2*) en estos sistemas mostró valores de 2.59 a 2.78 Å, y corresponde a enlaces de hidrógeno débiles,¹²⁷ ver Tabla 6.

Tabla 6. Distancias de enlace de H para las DHPs con sutituyente en la posición 2' en el anillo fenilo.

| Molécula | Átomo Aceptor | log(IC ₅₀) | (<i>d1</i>) C ₄ –H•••G | (<i>d2</i>) C ₂ –H•••N ₁ |
|----------|---------------|------------------------|-------------------------------------|--|
| 2 | O | 8.29 | 2.00 | 2.75 |
| 4* | F | 7.37 | 2.35 | 2.78 |
| 5 | Cl | 8.66 | 2.61 | 2.70 |
| 6 | Br | 8.12 | 2.68 | 2.68 |
| 7* | I | 7.33 | 2.77 | 2.59 |
| 8 | O | 7.24 | 2.27 | 2.71 |
| 9 | O | 6.96 | 2.29 | 2.73 |
| 12 | F | 8.82 | 2.10 | 2.62 |
| 31 | Cl | 8.12 | 2.57 | - |
| 32 | Cl | 8.72 | 2.49 | - |
| 33 | Cl | 7.72 | 2.57 | 2.66 |
| 34* | Cl | 6.40 | 2.62 | 2.67 |
| 36 | Cl | 7.52 | 2.62 | 2.60 |
| 37 | O | 7.00 | 2.56 | 2.78 |
| 39 | O | 3.00 | 2.30 | 2.66 |
| 40 | F | 8.36 | 2.28 | - |

*Compuestos usados para la validación del método.



Figura 16. Se muestran las interacciones $C(4)-H\cdots O$ (distancia d_1) y $C(2')-H\cdots N$ (distancia d_2) que se forman en la DHP para la molécula de Nifedipina (2).

2.4.2. Parámetros electrónicos de las dihidropiridinas.

Para analizar la reactividad química de las dihidropiridinas, se calcularon las cargas de Hirshfeld del anillo fenilo (q_{Ph} considerando los átomos $C1'$, $C2'$, $C3'$, $C4'$, $C5'$, $C6'$), y del anillo de dihidropiridina (q_{DHP} = átomos $N1$, $C2$, $C3$, $C4$, $C5$, $C6$), mediante la suma correspondiente de los átomos involucrados en los anillos. El análisis poblacional muestra que el anillo de fenilo de la molécula **1** tiene un valor de carga mayor ($q_{Ph} = -0.30 e$) con respecto a los demás derivados. Además, el análisis muestra que esta carga disminuye a medida que el número de sustituyentes en el anillo de fenilo aumenta. Por ejemplo, la presencia de un sustituyente en el átomo $2'$ provoca una disminución de carga en el anillo fenilo de -0.27 a $-0.14 e$, la presencia de cinco sustituyentes de flúor en la molécula **40** invierte el signo de la carga electrónica ($+0.20 e$), estos datos sugieren que los grupos $-G$, tienen un efecto importante en estos sistemas modificando la reactividad química en estos sistemas, ver Tabla 7.

Tabla 7. Descriptores cuánticos y moleculares (PBE/DGDZVP/GenA2).

| Molécula | log(1/IC ₅₀) | G | E _{HOMO} (eV) | E _{LUMO} (eV) | η (eV) | S (eV) | V (Å ³) | Q _{ph} (e) | Q _{DHP} (e) | NCI(H4-G) 1×10 ⁻³ | Log P | Hy | Calculado |
|----------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------|-----------|------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------|-------|--------------------------|
| | | | | | | | | | | | | | log(1/IC ₅₀) |
| 1 | 7.55 | H | -4.97 | -2.21 | 1.38 | 0.72 | 144.93 | -0.30 | -0.08 | 6.47 | 3.35 | -0.31 | 7.92 |
| 2 | 8.29 | 2'-NO ₂ | -5.17 | -3.21 | 0.98 | 1.02 | 158.17 | -0.14 | -0.09 | 15.89 | 0.82 | -0.24 | 7.46 |
| 3 | 7.80 | 2'-CN | -5.16 | -2.49 | 1.34 | 0.75 | 153.92 | -0.17 | -0.09 | 9.62 | 2.72 | -0.30 | 7.80 |
| 4* | 7.37 | 2'-F | -5.00 | -2.24 | 1.38 | 0.72 | 147.87 | -0.20 | -0.09 | 11.9 | 3.08 | -0.28 | 8.52 |
| 5 | 8.66 | 2'-Cl | -5.04 | -2.26 | 1.39 | 0.72 | 153.18 | -0.21 | -0.09 | 12.24 | 3.53 | -0.28 | 8.53 |
| 6 | 8.12 | 2'-Br | -5.05 | -2.27 | 1.39 | 0.72 | 155.27 | -0.18 | -0.08 | 12.65 | 3.62 | -0.28 | 8.52 |
| 7* | 7.33 | 2'-I | -5.18 | -1.97 | 1.61 | 0.62 | 158.77 | -0.17 | -0.12 | 14.47 | 3.45 | -0.28 | 8.72 |
| 8 | 7.24 | 2'-OMe | -4.82 | -2.08 | 1.37 | 0.73 | 158.27 | -0.24 | -0.09 | 14.24 | 2.67 | -0.30 | 7.57 |
| 9 | 6.96 | 2'-OEt | -4.82 | -2.07 | 1.38 | 0.73 | 166.74 | -0.24 | -0.09 | 14.23 | 3.02 | -0.32 | 7.15 |
| 10 | 8.35 | 2'-CH=CH ₂ | -4.97 | -2.25 | 1.36 | 0.74 | 158.91 | -0.24 | -0.08 | 7.06 | 3.43 | -0.34 | 7.05 |
| 11 | 8.22 | 2'-Me | -4.97 | -2.21 | 1.38 | 0.72 | 153.58 | -0.27 | -0.08 | 7.89 | 3.36 | -0.33 | 7.53 |
| 12 | 8.82 | 2'-CF ₃ | -5.07 | -2.38 | 1.35 | 0.74 | 162.61 | -0.23 | -0.09 | 17.22 | 3.82 | -0.26 | 8.90 |
| 13 | 7.46 | 3'-CN | -5.42 | -2.44 | 1.49 | 0.67 | 153.84 | -0.15 | -0.11 | 5.45 | 2.72 | -0.30 | 7.61 |
| 14 | 7.68 | 3'-F | -5.07 | -2.32 | 1.38 | 0.73 | 147.79 | -0.20 | -0.08 | 5.88 | 3.08 | -0.28 | 7.65 |
| 15 | 7.80 | 3'-Cl | -5.10 | -2.35 | 1.38 | 0.73 | 153.03 | -0.21 | -0.08 | 6.31 | 3.53 | -0.28 | 7.66 |
| 16 | 8.89 | 3'-Br | -5.10 | -2.35 | 1.38 | 0.73 | 155.12 | -0.13 | -0.08 | 6.43 | 3.62 | -0.28 | 7.58 |
| 17 | 7.38 | 3'-I | -5.22 | -2.13 | 1.55 | 0.65 | 158.61 | -0.16 | -0.11 | 4.35 | 3.45 | -0.28 | 7.11 |
| 18 | 5.22 | 3'-OAc | -5.01 | -2.25 | 1.38 | 0.72 | 167.80 | -0.14 | -0.11 | 3.75 | 2.59 | -0.28 | 5.44 |
| 19 | 6.72 | 3'-OMe | -4.91 | -2.12 | 1.40 | 0.72 | 158.05 | -0.24 | -0.08 | 6.61 | 2.67 | -0.30 | 6.48 |
| 20 | 5.20 | 3-OCOPh | -4.93 | -2.39 | 1.27 | 0.79 | 197.92 | -0.18 | -0.08 | 5.77 | 5.78 | -0.36 | 5.28 |
| 21 | 6.00 | 3'-OH | -5.00 | -2.25 | 1.38 | 0.73 | 149.44 | -0.24 | -0.08 | 6.41 | 2.26 | 0.32 | 7.01 |
| 22 | 5.70 | 3'-NH ₂ | -4.62 | -2.13 | 1.25 | 0.80 | 151.23 | -0.28 | -0.08 | 6.61 | 1.97 | 1.03 | 6.00 |
| 23 | 6.05 | 3'-NMe ₂ | -4.24 | -2.07 | 1.09 | 0.92 | 168.52 | -0.29 | -0.20 | 6.52 | 2.94 | -0.32 | 4.55 |
| 24 | 7.13 | 3'-CF ₃ | -5.30 | -2.16 | 1.57 | 0.64 | 162.34 | -0.22 | -0.11 | 5.05 | 3.82 | -0.26 | 7.33 |
| 25 | 6.96 | 3'-Me | -4.94 | -2.18 | 1.38 | 0.72 | 153.42 | -0.27 | -0.08 | 6.60 | 3.36 | -0.33 | 7.27 |
| 26 | 5.50 | 4'-NO ₂ | -5.36 | -3.31 | 1.03 | 0.98 | 157.95 | -0.14 | -0.08 | 6.31 | 0.82 | -0.24 | 6.24 |
| 27* | 5.46 | 4'-CN | -5.30 | -2.61 | 1.35 | 0.74 | 153.83 | -0.16 | -0.08 | 2.20 | 2.36 | -0.30 | 6.62 |
| 28 | 6.89 | 4'-F | -5.07 | -2.29 | 1.39 | 0.72 | 147.79 | -0.19 | -0.08 | 6.24 | 3.08 | -0.28 | 7.71 |
| 29* | 4.64 | 4'I | -5.36 | -3.31 | 1.03 | 0.98 | 158.63 | -0.15 | -0.09 | 3.62 | 0.82 | -0.24 | 5.74 |
| 30 | 4.00 | 4'-NMe ₂ | -4.22 | -2.00 | 1.11 | 0.90 | 168.48 | -0.28 | -0.07 | 6.18 | 2.94 | -0.32 | 4.46 |
| 31 | 8.12 | 2'-F,6'-Cl | -5.15 | -2.38 | 1.39 | 0.72 | 156.21 | -0.11 | -0.09 | 12.87 | 3.72 | -0.26 | 8.74 |
| 32 | 8.72 | 2',6'-Cl | -4.95 | -2.29 | 1.33 | 0.75 | 161.61 | -0.12 | -0.08 | 15.21 | 3.72 | -0.26 | 8.35 |
| 33 | 7.72 | 2',3'-Cl | -5.15 | -2.38 | 1.39 | 0.72 | 161.44 | -0.13 | -0.08 | 13.25 | 3.72 | -0.26 | 8.42 |
| 34* | 6.40 | 2,4-Cl | -5.16 | -2.39 | 1.39 | 0.72 | 161.35 | -0.12 | -0.09 | 12.05 | 3.72 | -0.26 | 8.24 |
| 35 | 7.03 | 3',5'-Cl | -5.22 | -2.48 | 1.37 | 0.73 | 161.20 | -0.12 | -0.08 | 6.00 | 3.72 | -0.26 | 7.36 |
| 36 | 7.52 | 2'-Cl, 5'-NO ₂ | -5.34 | -3.50 | 0.92 | 1.09 | 165.08 | -0.05 | -0.13 | 12.75 | 1.00 | -0.22 | 6.87 |
| 37 | 7.00 | 2'-OH, 5'-NO ₂ | -5.51 | -2.91 | 1.30 | 0.77 | 162.94 | -0.09 | -0.06 | 12.02 | -0.27 | 0.37 | 6.50 |
| 38 | 7.00 | 2',5'-Me | -4.94 | -2.19 | 1.38 | 0.73 | 162.12 | -0.23 | -0.08 | 8.19 | 3.37 | -0.34 | 6.91 |
| 39 | 3.00 | 2',4',5'-(OMe) | -4.49 | -2.07 | 1.21 | 0.83 | 184.74 | -0.07 | -0.10 | 13.72 | 1.30 | -0.29 | 4.12 |
| 40 | 8.36 | F ₅ | -4.96 | -2.24 | 1.36 | 0.74 | 159.72 | +0.21 | -0.10 | 14.00 | 3.26 | -0.26 | 8.03 |

*Compuestos usados en la validación del modelo.

El análisis de los orbitales moleculares HOMO, LUMO y su diferencia de energía $\Delta E = E_{LUMO} - E_{HOMO}$ son mostrados en la Figura 17 para los compuestos **1**, **2**, **26**, **36** y **37** que tienen como sustituyente el grupo NO₂. El orbital molecular HOMO para estos sistemas se localiza en el anillo de DHP sobre los enlaces C=C y sobre el par libre del átomo de nitrógeno, siendo estos orbitales de tipo π y p , exhibiendo pequeñas contribuciones de tipo π orbital en los átomos de carbono y oxígeno que pertenecen al grupo éster; esta parte de la molécula es el sitio reactivo que puede donar electrones actuando como nucleófilo.

El valor promedio de la energía del orbital HOMO fue de -5.03 eV ; este valor promedio es similar al que presenta la molécula de Nifedipina (**2**), siendo esta utilizada ampliamente como una referencia por su actividad antagonista. Los orbitales moleculares LUMO para los sistemas **2**, **26**, **36**, **37** se localizan sobre el fenilo y el sustituyente NO_2 , con contribuciones de tipo π ; esta región es susceptible a aceptar electrones.

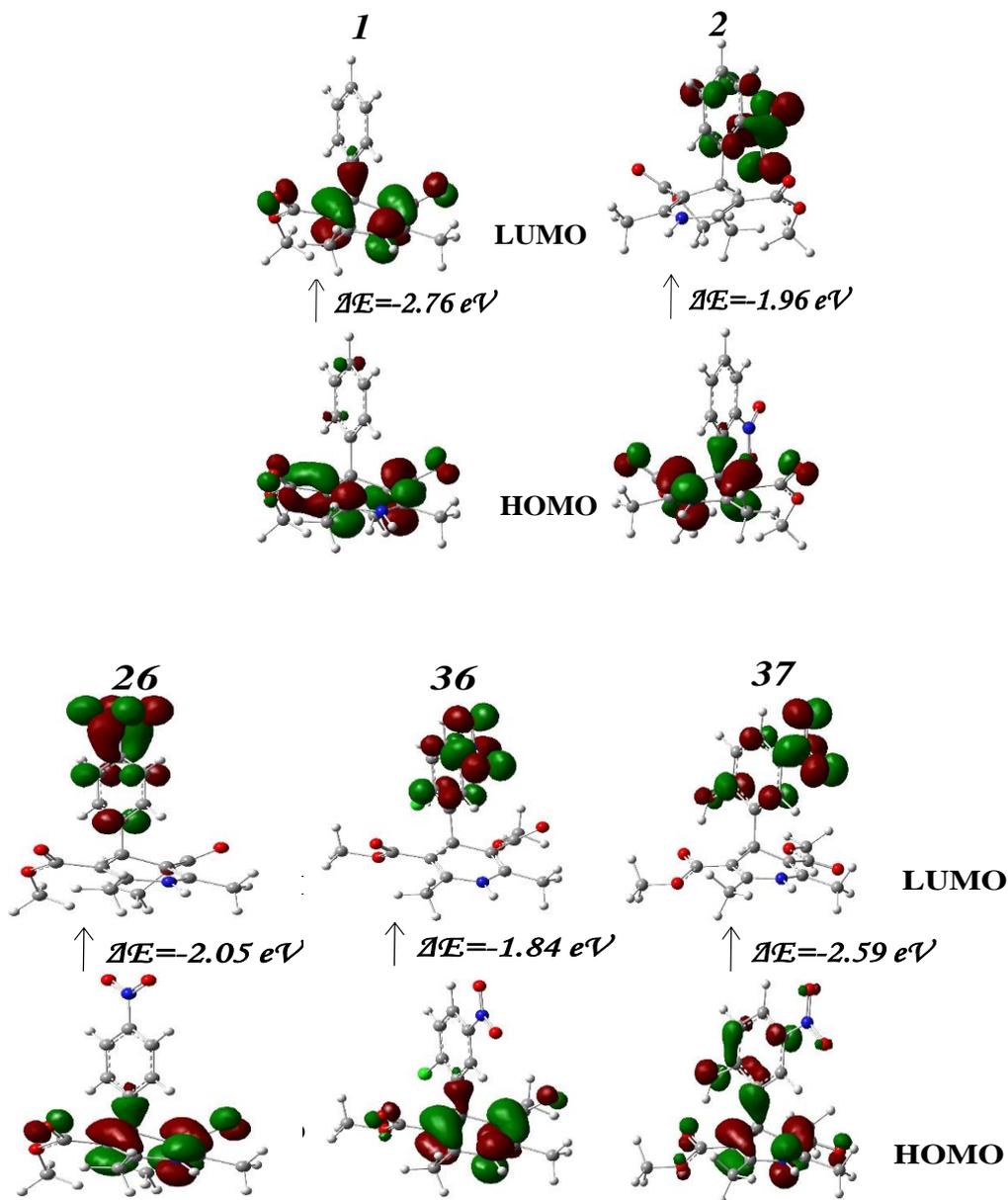


Figura 17. Superficie de orbital molecular y la diferencia de energía ($\Delta E = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$) de las moléculas **1** y **2** (Nifedipina) en la parte superior y moléculas **26**, **36** y **37** en la parte inferior.

El análisis de estas moléculas muestra que la presencia de grupos donadores de H, tales como N–H o C–H, así como la presencia de grupos sustituyentes del anillo fenilo con aceptores de H, como –NO₂, –F, –Cl, o –OR, forman interacciones débiles C(4)–H···G. Estas interacciones fueron caracterizadas con la teoría de átomos en moléculas (AIM), del análisis de la densidad electrónica.

Así, las interacciones C–H···G y N–H···G fueron caracterizadas mediante el análisis topológico de la densidad (ρ) y el laplaciano de la densidad electrónica ($\nabla^2\rho$) utilizando el análisis de la densidad electrónica, que permite identificar la presencia de distintos tipos de interacciones mediante el análisis de los puntos críticos de enlace, los cuales pueden confirmar la presencia de enlaces químicos.

El punto crítico de enlace (PCE) de la densidad y la correspondiente trayectoria de gradiente se obtuvo con el funcional PBE y la base orbital DGDZVP para todas las moléculas. Sin embargo, para la interacción C(4)–H···G en las moléculas **3** (G= –CN), **39** (G= –OMe) y **40** (G= –F), no se observa el punto crítico de enlace, a pesar de la disposición geométrica de estas moléculas, incluyendo el ángulo de torsión y la distancia de enlace H···G.

En la Figura 18 (lado izquierdo) se muestran los gráficos para los compuestos **2**, **39** y **40** calculados con el análisis de la densidad electrónica, en esta Figura en los círculos de color rojo no se aprecian algunos PC, ya que la teoría de Bader¹²⁸⁻¹³⁰ puede omitir esta información. Sin embargo, una metodología alterna que describe interacciones no covalentes es el gradiente de la densidad reducida (GDR).¹³¹⁻¹³³ Éste método se basa en analizar e identificar la densidad de electrones de interacciones débiles en sistemas moleculares; manifestándose como isosuperficies de baja densidad, esto es, donde la densidad decae exponencialmente en picos de energía dirigidos a valores de cero.¹³¹⁻¹³⁴

El gradiente de la densidad reducida solo requiere el conocimiento de la coordenada atómica (información geométrica molecular)¹³¹⁻¹³³ en lugar de trayectorias deslocalizadas y discontinuas entre pares de átomos como se basa la teoría de AIM,¹²⁸⁻¹³⁰ el análisis del gradiente de la densidad reducida actualmente es una herramienta aplicable a sistemas grandes entre proteínas y un fármaco o un catalizador y un sustrato.^{134,135}

En éste estudio, el gradiente de la densidad reducida se muestra en el gráfico del lado derecho de la Figura 18 para estas moléculas, donde se puede observar la interacción C(4)–H···G para las moléculas **39** y **40** (encerradas en un círculo). Identificadas las interacciones se procedió a calcular el valor numérico del gradiente de la densidad reducida.¹³¹⁻¹³⁶ En la Figura 19 se localizó el valor realizando una ampliación en el gráfico de densidad vs gradiente de densidad reducida en la interacción C(4)–H···G para todos los sistemas, este valor se denotó como *INC*(H4–G).

En la Figura 19a se muestra un gráfico de la densidad de gradiente reducida (*s*) vs la densidad electrónica (ρ) para la molécula **40**, en la Figura 19b se realiza un acercamiento debajo de los valores de densidad de 0.020 a.u., donde se puede observar un pico que indica una interacción no covalente F···H. En la Figura 19c se realiza una segunda aproximación a valores menores de 0.020 a.u., mostrando una imagen confiable de la interacción no covalente en espacio real¹⁵² y el gradiente expresado de la forma $|\nabla\rho|/\rho^n$, en la que se distinguen las interacciones no covalentes (caída de densidad exponencial) producida en sistemas intramoleculares con bajas densidades. Finalmente, en la Figura 19d se hace una extrapolación para estimar el valor de la densidad en la *INC*,¹⁵² éste valor y las correspondientes a las otras moléculas se enumeran en la Tabla 7. Los valores del gradiente reducido de las interacciones no covalentes entre los átomos C(4)–H···G, donde G= F, Cl, Br y O muestran valores de 0.0022 a 0.017 a.u., confirmando el enlace de hidrógeno débil en estos sistemas.

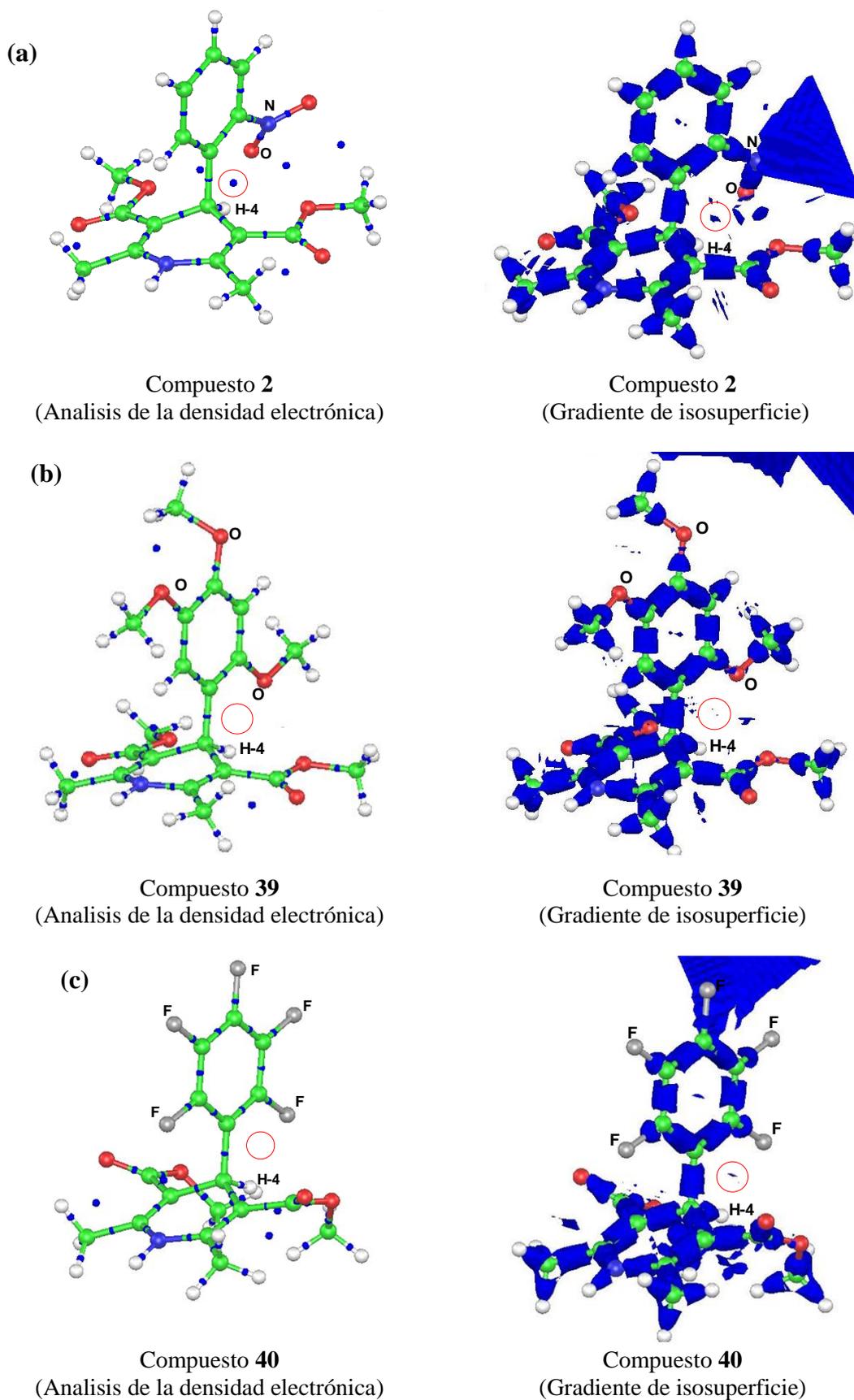


Figura 18. Gráfico de las moléculas de los análogos de las 1,4-dihidropiridina. En la derecha se muestran los PCE calculados con la teoría AIM, a la izquierda se grafica el gradiente de densidad reducida a una isosuperficie de $s = 0.30$ a.u.

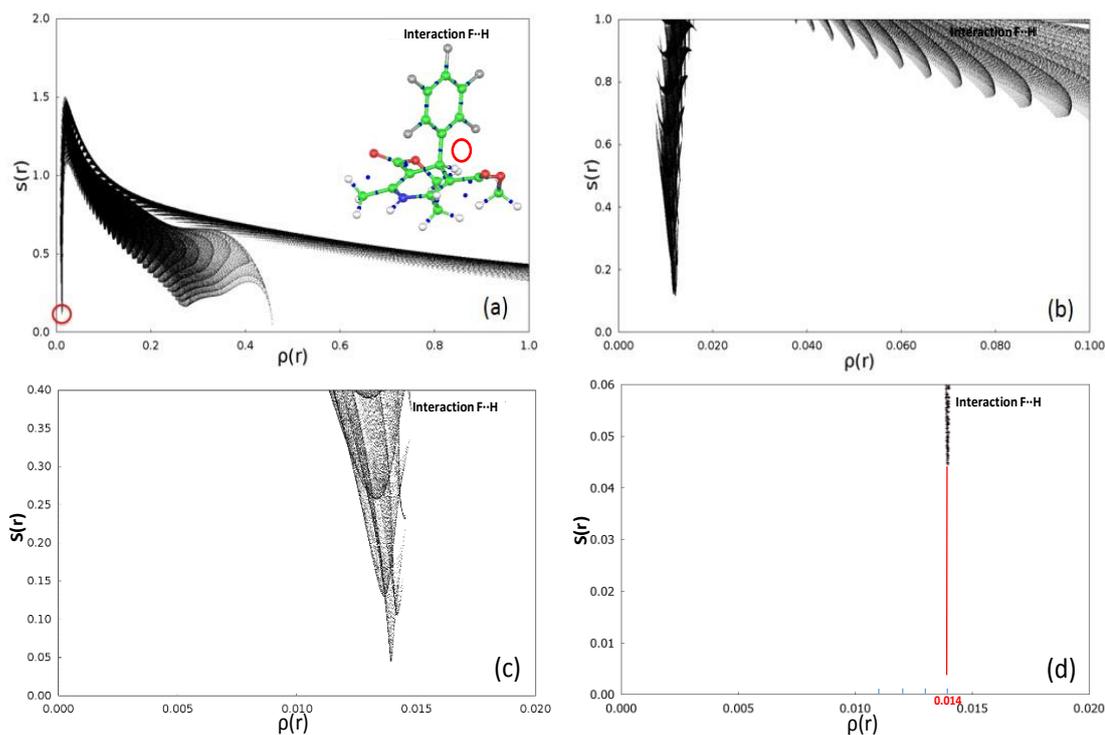


Figura 19. Gráfico de gradiente de densidad reducida vs la densidad electrónica de la molécula 40. a) Para la molécula entera; b) la ampliación para la interacción débil $F\cdots H$; c) además el aumento que muestra el detalle de la intensidad del pico; d) la estimación del valor de la interacción no covalente.

2.4.3. Obtención de Modelos QSAR de las dihidropiridinas.

Para generar los modelos matemáticos se utilizaron los descriptores cuánticos que son las cargas atómicas de Hirshfeld (q), la energía del orbital molecular más alto ocupado (E_{HOMO}), la energía del orbital molecular más bajo desocupado (E_{LUMO}), el momento dipolar (μ^{D}), el potencial de ionización (I), la afinidad electrónica (A), la dureza (η), la blandura (S),¹³⁷⁻¹⁴⁶ el potencial químico (μ)¹⁴⁷ y la electrofilicidad (ω).¹⁴⁸ Además de estos descriptores cuánticos se calcularon algunos descriptores moleculares como el volumen, ya que éste ha mostrado una relación directa con la actividad biológica.¹⁴⁹⁻¹⁵² Por esta razón, se calculó el volumen utilizando la densidad electrónica, específicamente con valores de 0.02 y 0.05 a.u. Para éste modelo se utilizó el volumen calculado con la densidad de 0.02 a.u., que fue el que mostró una tendencia lineal con respecto a la

actividad biológica. Los valores de estos parámetros se muestran en la Tabla 7 y en la Tabla del apéndice B.

Se empleó el análisis de regresión lineal múltiple en la búsqueda de modelos que permitieron predecir la actividad hipotensora, encontrando los parámetros involucrados en la inhibición de concentración media IC_{50} de los análogos de 1,4-dihidropiridina; estas cuantificaciones fueron validadas tanto interna como externamente, aplicando parámetros estadísticos,^{153-155,204} tales como el coeficiente de correlación cuadrada (R^2), el coeficiente de determinación ajustada ($R^2_{ajustada}$), la regla QUIK (DK) basado en el índice de la correlación multivariada K , la regla asintótica DQ, una regla externa Q^2_{boot} , y dos parámetros basados en la regla de las contribuciones variables ruidosas R^P (exceso de buenos predictores), y R^N (exceso de malos predictores).¹⁵³

Inicialmente, se seleccionaron los diez primeros modelos que presentan los valores mayores para R^2 ($R^2 > 56.00$, Tabla 8). En segundo lugar, se aplicó la regla de DK con el intervalo igual o mayor que 0.030, en la Tabla 8 se puede ver que todos los modelos cumplen esta regla, indicando que los modelos no muestran colinealidad predictiva.

Continuando con la búsqueda de un modelo se analizó el tercer parámetro que es la regla DQ, ésta determina la capacidad de predicción,^{156,157} mediante la siguiente expresión $Q^2_{LOO} - Q^2_{ASYM} < DQ$. Aplicando la regla; los modelos m_1 , m_4 , m_5 , m_6 , m_7 , m_8 , m_9 y m_{10} fueron rechazados, mientras que los modelos m_2 y m_3 si cumplen este criterio.

Tabla 8. Modelos de Regresión Lineal Múltiple (*mi*).

| Modelo | Variables del Modelo | R^{2a} | R_{adj}^{2b} | Q^{2c} | DK^d | DQ^e | R^{Pf} | $R^N > t^{Ng}$ | Q_{boot}^{2h} | Aceptado |
|----------|---------------------------------------|----------|----------------|----------|--------|--------|----------|-----------------|-----------------|-----------|
| m_1 | V, INC, LogP | 63.81 | 60.31 | 46.77 | 0.129 | -0.071 | 0.422 | -0.009 (-0.308) | 43.94 | no |
| m_2 | E_{HOMO} , V, q_{ph} , logP | 59.16 | 53.72 | 42.16 | 0.099 | -0.023 | 0.158 | -0.076 (-0.224) | 26.13 | no |
| m_3 | E_{HOMO} , V, INC, logP | 78.51 | 75.65 | 67.90 | 0.112 | -0.029 | 0.230 | 0.000 (-0.227) | 63.83 | si |
| m_4 | V, q_{ph} , INC, LogP | 66.96 | 62.55 | 44.38 | 0.081 | -0.106 | 0.324 | -0.086 (-0.226) | 39.69 | no |
| m_5 | E_{HOMO} , V, LogP, Hy | 57.82 | 52.19 | 39.09 | 0.119 | -0.035 | 0.150 | -0.007 (-0.224) | 0.00 | no |
| m_6 | E_{HOMO} , V, LogP | 56.28 | 52.05 | 39.03 | 0.151 | -0.052 | 0.199 | 0.000 (-0.307) | 30.56 | no |
| m_7 | E_{HOMO} , V, q_{DHP} , INC, LogP | 80.56 | 77.21 | 66.59 | 0.083 | -0.051 | 0.187 | -0.138 (-0.178) | 63.85 | no |
| m_8 | S, V, INC, LogP | 64.01 | 59.21 | 35.72 | 0.080 | -0.153 | 0.263 | 0.000 (-0.225) | 29.82 | no |
| m_9 | η , E_{HOMO} , V, INC | 61.16 | 55.98 | 34.08 | 0.128 | -0.130 | 0.116 | 0.000 (-0.224) | 30.42 | no |
| m_{10} | E_{HOMO} , V, INC, LogP, Hy | 79.01 | 75.39 | 65.96 | 0.114 | -0.035 | 0.178 | 0.000 (-0.177) | 42.08 | no |

 a) R^2 , b) $R_{ajustada}^2$, c) $Q^2 > 50\%$, d) $K_{XY} - K_X > DK = 0.030$, e) $Q_{Loo}^2 - Q_{ASYM}^2 > DQ = -0.030$,

 f) $t^P > R^P = 0.050$, g) $R^N > t^N(0.020)$, h) $Q_{boot}^2 > 50\%$.

Finalmente, se aplicó una validación externa $Q^2_{boot} > 50$, la que permite rechazar el modelo m_2 , ya que presentó un valor de 26.13 estando por debajo del valor de intervalo establecido. Así, solamente queda el modelo m_3 como el modelo que satisface todos los criterios mencionados.^{200,201}

El modelo QSAR seleccionado para predecir la actividad biológica de las treinta y cinco moléculas análogas de 1,4-dihidropiridina fue m_3 , que está representado por la ecuación 1. Este modelo muestra una correlación entre el valor $\log IC_{50}$ con los descriptores E_{HOMO} , \log de P , Volumen, y el valor de la densidad de la interacción no covalente $INC(H4-G)$.

$$\log (1/IC_{50}) = -1.95 E_{HOMO} + 0.57 \log de P - 0.07 V + 167.95 INC(H4-G) + 5.74 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

$\log (1/IC_{50})$ = Actividad biológica.

E_{HOMO} = Energía del Orbital molecular más alto ocupado (E_{HOMO}).

$\log de P$ = Coeficiente de partición.

V = Volumen

$INC(H4-G)$ = Densidad de la interacción no covalente del enlace $H \cdots G$.

Los datos estadísticos del modelo son $R^2 = 78.51$, $R^2_{ajustada} = 75.65$ y $Q^2 = 67.90$, la prueba F fue de 27.4 y para la prueba t -student es el valor de 0.99. Los valores obtenidos de las variables analíticas internas fueron $DK = 0.112$, $DQ = -0.029$, $R^P = 0.230$ y $R^N = 0.000$, la validación externa presentó el valor de $Q^2_{boot} = 63.83$. Todos estos datos

estadísticos confirman la aceptabilidad del modelo, esto es, el modelo es predictivo y cualitativo.

Con este modelo se puede sugerir que la actividad biológica de los análogos de 1,4-dihidropiridina está en función de la densidad de la interacción no covalente del enlace $H\cdots G$ ($INC(H4-G)$); este enlace es debido, a interacciones intermoleculares que proporcionan estabilidad a la molécula mediante la formación de anillos de 6 miembros. La energía del orbital molecular más alto ocupado (E_{HOMO}) indica la posibilidad de que estas moléculas puedan ceder electrones. El log de P permite cuantificar el grado de lipofilia de una molécula, permitiendo inferir cómo se comportará en el entorno de los fluidos biológicos del organismo y cómo será su paso mediante difusión pasiva a través de membranas biológicas. El volumen está relacionado con el tamaño de la molécula, el cual podría estar involucrado con la acción de bloqueo en el canal de calcio tipo-L.

Para la validación del modelo matemático QSAR fueron tomadas cinco moléculas análogas de 1,4-dihidropiridinas con las mismas características estructurales que presentaron las treinta y cinco moléculas, que fueron usadas para la búsqueda de los modelos, (con sustituyente **G** sobre el anillo fenilo),¹⁵⁸ a las cuales se les aplicó la metodología propuesta para este estudio obteniendo los respectivos descriptores químico-cuánticos moleculares y se insertaron los valores en la ecuación **1**, de esas cinco moléculas. La obtención de los valores calculados teóricos de $\log(1/IC_{50})$, se muestran en la Tabla 7.

Se graficó los valores de la actividad biológica obtenida ($\log(1/IC_{50})$ calculado) contra los valores experimentales ($\log(1/IC_{50})$ experimental) para la ecuación (**1**), Figura 20a, para las treinta y cinco moléculas análogas de dihidropiridina usadas para la generación del modelo. Se encontró que las moléculas **5** ($G=2'-Cl$), **12** ($G=2'-CF_3$) y

31 (**G**= 2'-F, 6'-Cl) son las de mayor actividad calculada y están en correspondencia con sus valores experimentales.

La Figura 20b, se muestra el gráfico de validación del modelo, con cinco moléculas obtenidas de la literatura¹¹¹ que fueron evaluadas de acuerdo con la metodología empleada en este estudio. Para ellas se obtuvieron los respectivos valores de los descriptores moleculares químicos-cuánticos y estos valores fueron insertados en la ecuación **1**. Los valores de log (IC₅₀) calculado se muestran en la Tabla 7 y en la Figura 20b.

Estos resultados mostraron un comportamiento de ajuste aceptable, obteniendo una tendencia de distribución cualitativa de la actividad biológica en estos sistemas. Esto es los valores obtenidos de los resultados teóricos, se encuentran en correspondencia con los valores experimentales. La capacidad predictiva de los datos estadísticos obtenidos fueron $R^2_{\text{ext}} = 95.05$, $R^2_{\text{ajustada}} = 93,40$, $F = 57.56$; estos resultados confirman la matemática del modelo QSAR que representan una alta eficiencia, para la predicción de la actividad antagonista para estos compuestos análogos de 1,4-dihidropiridina.

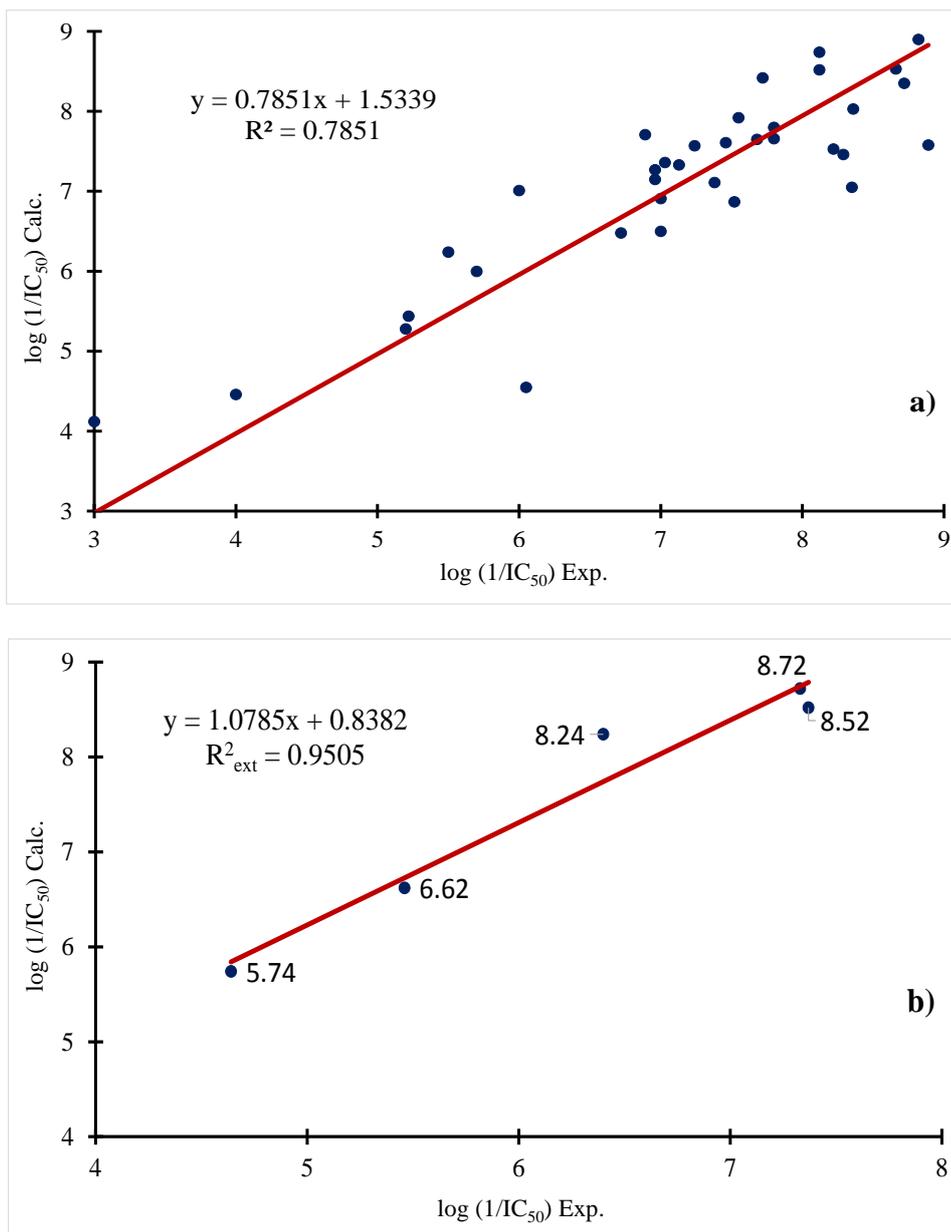


Figura 20. Gráfica de actividad biológica calculada obtenida por la ecuación uno, a) para las moléculas derivadas de dihidropiridina, usadas en la generación del modelo y b) los compuestos usados en la validación del modelo.

2.5. Conclusiones.

La actividad biológica de 1,4-dihidropiridinas que actúan como antagonistas de los canales de calcio(II) está correlacionada con la energía del orbital molecular más alto ocupado (E_{HOMO}); el volumen (V), el coeficiente de partición ($\log de P$) y la interacción no covalente $INC(H4-G)$ del enlace $C(4)-H\cdots G$, generando un modelo predictivo de actividad biológica hipotensora. Se encontró que las moléculas **5** ($G= 2'-Cl$), **12** ($G= 2'-CF_3$) y **31** ($G= 2'-F, 6'-Cl$) son las de mayor actividad calculada y están en correspondencia con los valores experimentales

Los datos estadísticos de las moléculas de validación externa para las cinco moléculas prueba, mostraron una tendencia de distribución cualitativa de sus valores de $\log (1/IC_{50})$ calculada, frente a la actividad biológica experimental, confirman la aceptabilidad del modelo predictivo.

El gradiente de la densidad reducida (GDR), es considerado como un novedoso descriptor que permite identificar interacciones débiles en los casos en donde la teoría de átomos en moléculas puede omitir, y este fue utilizado para las moléculas **3**, **39** y **40**, se analizaron y cuantificaron los valores de la densidad entre los pares de átomos de la interacción no covalente del enlace $C(4)-H\cdots G$, permitiendo introducir estos valores como ayuda en la obtención del modelo QSAR,

Capítulo III

Acoplamiento molecular en Dihidropiridinas

3.1. Antecedentes.

El canal iónico presenta una estructura macromolecular transmembrana provista de un poro y situada en la membrana plasmática de las células, que permiten la entrada de iones Ca^{2+} al citosol lo que produce el aumento en la concentración intracelular de este ion, produciendo una despolarización.¹⁵⁹ Lo anterior constituye una señal para la activación de muchas funciones celulares. Los canales de calcio están presentes en los sistemas cardiovasculares y nervioso central que son dependientes de los voltajes, considerados como proteínas oligoméricas, existiendo seis tipos de canales de Ca^{2+} denominados T, L, N, P, Q y R.^{160,161} Los canales de calcio tienen una subunidad principal α_1 , y subunidades auxiliares α_2 , $\alpha_1\delta$, β y γ . Siendo la subunidad α_1 la responsable de las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas de los canales. Mientras que las otras cuatro (α_2 , $\alpha_1\delta$, β y γ) presentan la función reguladora (activación e inactivación) de los canales.¹⁶² Los canales de calcio de tipo L se encuentran en los sistemas nervioso y cardiovascular; una particularidad farmacológica de estos canales es su sensibilidad hacia las dihidropiridinas.¹⁶³

Como se mencionó anteriormente la subunidad α_1 es la subunidad principal, conteniendo aproximadamente 200 residuos de aminoácidos; esta estructura es la que forma la estructura básica y aporta los aminoácidos que forman el poro y sensor de voltaje, presentando la activación e inactivación del poro, esto es, cuando se presenta una concentración mayor de iones Ca^{2+} en el exterior de la célula se genera una respuesta que

abrirá el poro de los canales de calcio y de modo inverso, cuando existe un exceso de iones Ca^{2+} en el citoplasma de la célula se genera una señal inmediata que causa el cierre del poro de los canales de calcio. Así mismo, la subunidad α_1 está compuesta por cuatro dominios (I, II, III, y IV) y cada uno de ellos se compone de seis segmentos transmembrana (S1-S6), ver Figura 21. Esta subunidad es importante, ya que es la base para la construcción del canal de calcio como se mostrará más adelante.

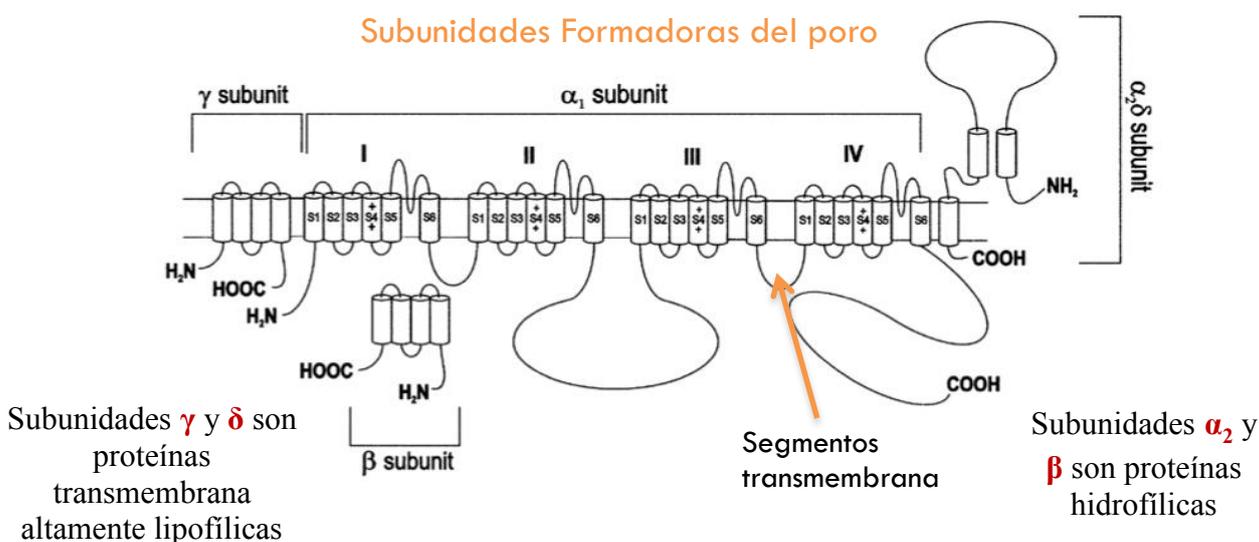


Figura 21. Esquema de un canal de calcio tipo-L.¹⁶⁴

3.1.1. Afinidad de las dihidropiridinas al canal de calcio.

Es conocido que la actividad de los canales de calcio está dada por la subunidad α_1 ya que contiene sitios de enlace para cationes multivalentes, sitios para péptidos y sitios receptores de pequeñas moléculas orgánicas, En la Figura 22 se muestra la representación esquemática completa de las partes que conforman los canales de calcio, así como las ubicaciones de las cinco subunidades y las principales funciones de estas subunidades en el canal de calcio tipo-L.¹⁶⁴ Se conoce que las dihidropiridinas actúan directamente

bloqueando la entrada del poro de los canales de calcio de tipo L, siendo las moléculas con sustituyentes nitro y cloro las que presentan una mayor actividad biológica.¹⁶⁵

- α_1 tiene las señales básicas de identificación del canal (la estructura pseudotetramérica).
 - El sensor de voltaje.
 - La región del poro.
 - El sitio de unión del Ca^{2+} .
 - Y los sitios de unión de dihidropiridinas y fenilalquilamidas.
- La subunidad γ transmembrana.
- Un dímero $\alpha_2\delta$ unido por un puente disulfuro.
- Una subunidad β intracelular.

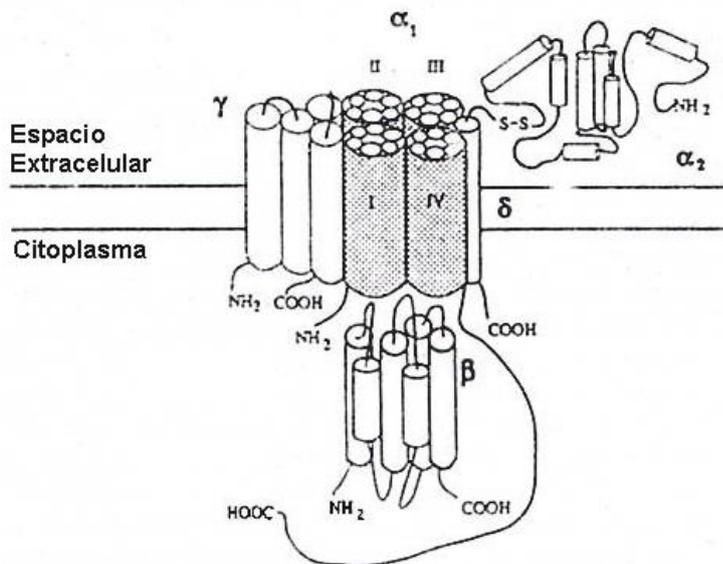


Figura 22. Estructura de los canales de Ca^{2+} .¹⁶⁶

Los fármacos que actúan como bloqueadores de los canales de calcio se unen específicamente a receptores acoplados alostéricamente a la subunidad α_1 del canal; dicha unión está modulada por los estados activo e inactivo de la cavidad del poro, teniendo mayor afinidad por el estado inactivado, que es el que predomina durante la despolarización, produciendo la estabilización de la célula y por lo tanto se genera un bloqueo que es voltaje-dependiente del flujo de Ca^{2+} . Peterson y colaboradores en 1996 indicaron que las dihidropiridinas se enlazan al segmento seis transmembranal de los dominios (III)S6 y (IV)S6,^{167,168} ver Figura 23. Estos fragmentos son los sitios receptores donde se realizarán los acoplamiento molecular con la DHPs.

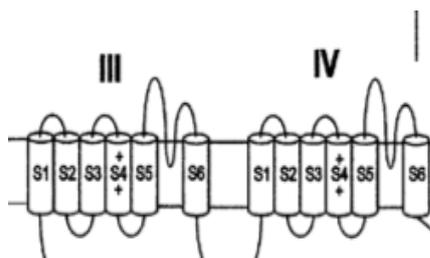


Figura 23. Segmento (III)S6 y (IV)S6 del canal de calcio tipo-L.¹⁶⁷

3.1.2. Métodos computacionales Docking.

Las técnicas modernas del modelado molecular son herramientas notables en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos potencialmente efectivos, ayudando a entender y predecir el comportamiento de sistemas moleculares. La información tridimensional de la estructura de algunas proteínas y sus funciones proporciona una gran posibilidad de entender las interacciones moleculares no covalentes entre un fármaco y una macromolécula biológica, ayudando de manera significativa en el diseño racional de nuevos activos.

Una herramienta que ayuda a facilitar el estudio de sistemas complejos son las metodologías Docking, llegando a ser fundamental para diversas áreas de investigación como son: la Química, la Biología y la Biomédica. Los fármacos o antibióticos llegan a presentar comportamientos de interacción con macromoléculas biológicas consideradas como dianas terapéuticas, membranas, enzimas, transportadores o canales iónicos. Así cuando un buen ajuste geométrico entre ligante y receptor es esencial para una alta actividad biológica, es decir, si se estudia el sitio de unión de la proteína y del ligando. Con un estudio Docking se identificarán los posibles efectos de la conformación del ligante, la flexibilidad del sitio de unión, las energías de distorsión, los efectos de solvatación y la entropía, entre otros, permitiendo la generación de nuevos fármacos con mayores propiedades de resistencia activa antimicrobiana.

El descubrimiento de fármacos nuevos para el tratamiento de enfermedades importantes como la hipertensión arterial constituye un reto en la investigación farmacéutica. Se ha demostrado que un gran número de estructuras tridimensionales de blancos biológicos pueden ser utilizadas para el diseño de moléculas pequeñas que se unen a ellas. Varios fármacos comerciales han sido diseñados mediante metodologías

computacionales que analizan las interacciones moleculares entre huésped-receptor, permitiendo tener un entendimiento detallado de las interacciones no covalentes.⁹⁹

3.2. Justificación.

Los análogos de 1,4-dihidropiridina son conocidos como bloqueadores de los canales de calcio y son ocupados en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Estas enfermedades son causantes de grandes niveles de mortalidad en todo el mundo y la eficiencia de los antagonistas bloqueadores se ha visto afectada debido a la creciente número de casos y a las complicaciones que esta enfermedad presenta, para lo cual es necesario la búsqueda de nuevas DHPs con mayores propiedades de acción y bloqueo, a menores concentraciones y a un mayor tiempo de vida útil.

Debido a esto, es importante tener como punto de apoyo a las técnicas computacionales para el diseño de moléculas y su estudio de la función, acción y mecanismo, que puedan ser utilizadas posteriormente como nuevos fármacos reductores de presión arterial (Hipotensivos). Por lo anterior, es importante el estudio de las interacciones entre los análogos de dihidropiridina con la subunidad α_1 del canal de tipo-L.

3.3. Objetivo.

Localizar las posibles interacciones que puedan presentar los fármacos análogos de 1,4-dihidropiridinas frente a la subunidad α_1 del canal de calcio tipo-L, mediante los acoplamiento molecular (Docking) para describir el posible comportamiento antagonista que presentan estas DHP como agentes bloqueadores de los canales de calcio.

3.4. Resultados y Discusión.

Los detalles computacionales se describen en el apéndice A. Para lo cual, se diseñó un sistema macromolecular como fuente receptora que es la subunidad α_1 del canal de calcio de tipo L, específicamente, se construyeron los dominios **(III)S6** y **(IV)S6**, para acoplarlos con las cuarenta moléculas de dihidropiridina (ligantes) en la búsqueda de sitio de unión fármaco receptor.

3.4.1. Construcción de la subunidad α_1 .

Para la construcción de la subunidad α_1 , se tomó la secuencia estructural de aminoácidos del canal de potasio (obtenida en la base de datos Protein Data Base, **1BL8**). Lo anterior se realizó debido a que, no se cuenta con una estructura confiable del canal de calcio tipo L. Utilizando la metodología reportada por Tikhonov *et al*¹⁶⁹ fue comparada una porción del canal de calcio tipo-L (**Cav1.2**), la cual se usó para obtener las mutaciones secuenciales que se necesitaron en la generación de la nueva subunidad α_1 del canal de calcio Figura 24.

Obtenida la secuencia de aminoácidos y adicionando átomos de hidrógeno en los extremos, se procede a la optimización de la estructura del canal, utilizando los parámetros de CHARMM, los cuales contienen información estructural y electrónica de los diferentes átomos en los aminoácidos; almacenando características específicas como la estructura, la topología y la conectividad.

```

Cav1.2-IS5-1o
IBL8_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      ALHWRAAGAATVLLVIVLLAGSYLAVLAERGAPGAQLITYPRALWWSVET 50
KcsA-M1-o                          --HWRAAGAATVLLVIVLLAGSYLAVLAE-----LITYPRALWWSVET 27
Cav1.2-IS5-1o                      --AMVPLLHIALLVLFVIIYAIIGLELF-----FDNILF--AMLTVFQC 27

IBL8_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      ATTVGYGDLYPVTLWGRCVAVVVMVAGITSFGLVTAALATWFGREQ 97
KcsA-M1-o                          -----
Cav1.2-IS5-1o                      -----

> Cav1.2-IP-1p
IBL8_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      ALHWRAAGAATVLLVIVLLAGSYLAVLAERGAPGAQLITYPRALWWSVET 50
KcsA-P-P                            -----LITYPRALWWSVET 14
Cav1.2-IP-1p                       -----FDNILF--AMLTVFQC 14

IBL8_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      ATTVGYGDLYPVTLWGRCVAVVVMVAGITSFGLVTAALATWFGREQ 97
KcsA-P-P                            ATTVGYGDL-----
Cav1.2-IP-1p                       ITMEGWTDV-----

>Cav1.2-IS6-1i
IBL8_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      ALHWRAAGAATVLLVIVLLAGSYLAVLAERGAPGAQLITYPRALWWSVET 50
KcsA-M2-i                          -----
Cav1.2-IS6-1i                      -----

IBL8_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      ATTVGYGDLYPVTLWGRCVAVVVMVAGITSFGLVTAALATWFGREQ 97
KcsA-M2-i                          -----WGRLVAVVVMVAGITSFGLVTAALATWFGV---- 29
Cav1.2-IS6-1i                      -----LP---WVYFVSLVIFGS-FFVLNLVLGVLSGEF----- 29
    
```

Figura 24. La primera línea es la alineación de la secuencia de aminoácidos del canal de Potasio (IBL8), segunda línea secuencia de aminoácidos del canal de potasio (KcSA) que fueron utilizados para la generación de las mutaciones que corresponden a la tercera línea que se deben mutar para generar el nuevo canal de calcio de tipo-L (Cav1.2).

Después de la minimización, se puede observar que ya no hay átomos traslapados, además, las cargas de los átomos y la temperatura del sistema se mantienen constantes a lo largo de todo el proceso, obteniendo la subunidad α_1 del canal de calcio de tipo-L con los cuatro fragmentos (I-IV)S6, ver Figura 25.

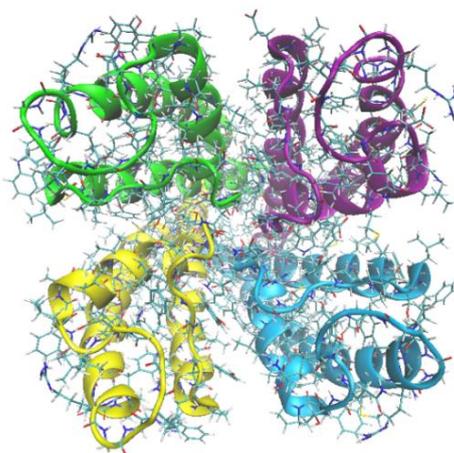


Figura 25. Canal de calcio subunidad α_1 .

La dinámica estructural del canal mutado, no mostró cambios significativos de la estructura cuaternaria de la subunidad, además la cavidad del poro no se vio alterada, y no se presentó ninguna ruptura en la cadena de aminoácidos, por lo que se consideró este canal adecuado para el estudio de los acoplamientos moleculares.

En la Figura 26 se observan los cilindros que representan hélices β mientras que los cordones que los unen representan la cadena peptídica. Una forma para determinar la estabilidad del nuevo canal de calcio es generar el gráfico de desviación de la raíz cuadrática media, (por sus siglas en inglés, *RMSD*) la cual nos indica que tan similares son las dos conformaciones de un mismo compuesto en el espacio durante un lapso de tiempo en la dinámica, ver la Figura 26.

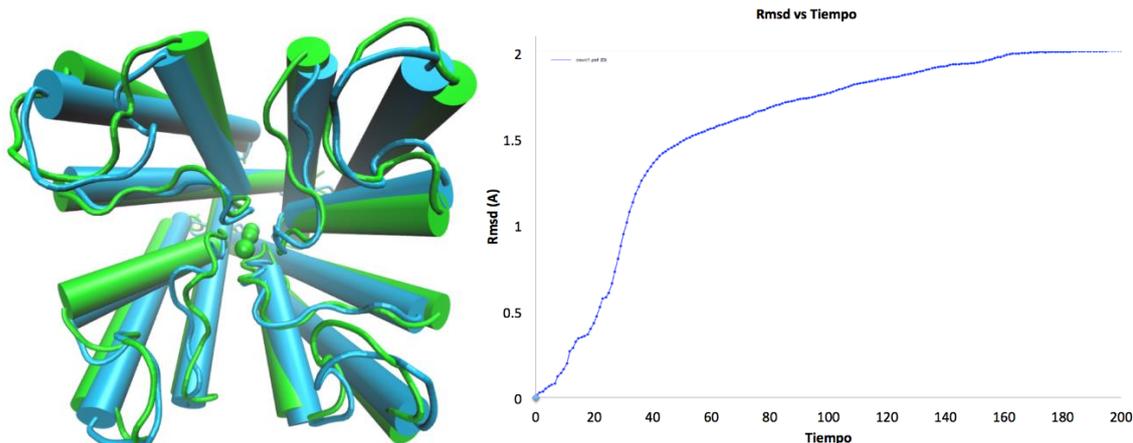


Figura 26. Del lado izquierdo la estructura inicial en color verde y en color azul la estructura resultante después de la mutación de la subunidad α_1 del canal de calcio tipo-L.

La subunidad α_1 del canal obtenido por homología se analizó y preparó para aislar las posiciones del sitio de unión, como se reporta en la literatura.²¹⁰ Se encontró que los segmentos (III)S6 y (IV)S6, son los encargados de llevar a cabo la acción del mecanismo de unión que presentan las DHPs como bloqueadores de canal de calcio. En la selección del número de aminoácidos se siguió la metodología propuesta por el modelo de Lipkind

y Fozzard 2001 y empleada por Grefory M, *et al.*, la cual consiste en identificar y mutar las alineaciones que se muestran en la Tabla 9, en los extremos donde se realizó un corte de los aminoácidos en los dominios **(III)S6** y **(IV)S6**, como se muestra en la Figura 27.

Tabla 9. Mutaciones que sufren los aminoácidos de los dominios **(III)S6** y **(IV)S6** para el sitio receptor en el canal de calcio generado por Homología (Ccah).

| Ccah | Alineamiento | |
|---------|--------------|----------|
| | IIIS6 | IVS6 |
| Trp-87 | Val-1143 | Phe-1454 |
| Gly | Glu | Ala |
| Arg | Ile | Val |
| Leu | Ser | Phe |
| Val | Ile | Tyr |
| Ala | Phe | Phe |
| Val | Phe | Ile |
| Val | Ile | Ser |
| Val | Ile | Phe |
| Met-96 | Tyr-1152 | Tyr-1463 |
| Val | Ile | Met |
| Ala | Ile | Leu |
| Gly | Ile | Cys |
| Ile-100 | Ile | Ala |
| Thr | Ala | Phe |
| Ser | Phe | Leu |
| Phe-103 | Phe | Ile-1470 |
| Gly | Met | Ile-1471 |
| Leu | Met | Asn |
| Val | Asn | Leu |
| Thr-107 | Ile | Phe |
| Ala | Phe | Val |
| Ala | Val | Ala |
| Leu | Gly | Val |
| Ala | Phe | Ile |
| Thr | Val | Met |

Una vez realizadas las mutaciones correspondientes se realizó una minimización sobre los segmentos **(III)S6** y **(IV)S6** de 1000 pasos para eliminar los traslapes que podrían presentar debido a los aminoácidos mutados, con la finalidad de suprimir los

efectos de contactos estéricos. Esta macromolécula es el sitio receptor donde se realizarán los acoplamiento molecular.

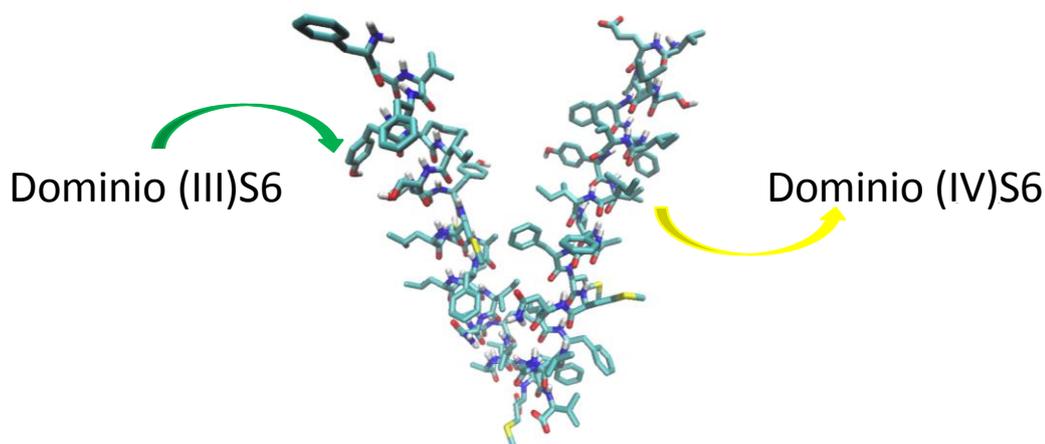


Figura 27. Dominios (III)S6 y (IV)S6 de la subunidad α_1 del canal de calcio obtenido por las mutaciones de los aminoácidos.

3.4.2. Docking.

Los resultados del análisis del Docking molecular permitirán determinar los posibles sitios de interacciones electrostáticas intermoleculares a través de la formación de puentes de hidrógeno entre las estructuras de los segmentos (III)S6 y (IV)S6 de la subunidad α_1 y los análogos de las 40 moléculas análogas de 1,4-dihidropiridinas.

El estudio de la interacción de los análogos de DHPs, inicio con el ingreso a la cavidad de la subunidad α_1 del canal, comenzando con una conformación arbitraria, tanto de orientación como de posición, y para el caso de la macromolécula, su estructura se mantuvo en una posición rígida en el espacio, bajo los parámetros establecidos de la metodología propuesta (ver anexo 5 del apéndice A), Por ejemplo, en el análisis de la molécula **2** (Nifedipina) mostró interacciones electrostáticas de enlaces por puentes de hidrógeno intermoleculares entre la molécula de Nifedipina y el residuo de **Phe-1454** (fenilalanina, del dominio (IV)S6). Esta interacción presentó una distancia de 1.80 Å y

se encuentra ubicada entre el átomo de oxígeno del grupo nitro del ligante y el átomo de hidrógeno del residuo Phe-1454, (N-O···H-N), como se puede notar en la Figura 28a. La energía de unión más baja calculada para esta interacción fue de -6.01 kcal/mol, la energía electrostática es de -2.18 kcal/mol y se obtuvo una constante de disociación del complejo enzima-inhibidor (K_d) de 39.03 micromolar. Indicando que este sitio posiblemente es el que presente la mayor afinidad hacia grupos antagonistas provocando un efecto bloqueador de los canales de calcio.

Se encontró otra interacción para este mismo ligante entre la molécula **2** contra el aminoácido de **Ile-1156** (isoleucina, del dominio **(III)S6**) esta interacción presentó una distancia de 2.10 Å, entre el átomo de nitrógeno del anillo de la DHP del ligante y el átomo de oxígeno del residuo Ile-1156 (N-H···O=C), esta última distancia es más grande con respecto a la distancia de 1.80 Å encontrada en el puente de hidrógeno intermolecular N-O···H-N, del aminoácido de fenilalanina contra la Nifedipina. La energía de unión obtenida para la molécula de Nifedipina y la porción del fragmento que contiene al aminoácido de isoleucina fue de -5.53 kcal/mol, este último valor es mayor energéticamente comparado con el encontrado cuando se une con afinidad hacia el aminoácido de fenilalanina, ver Figura 28b y Tabla 10.

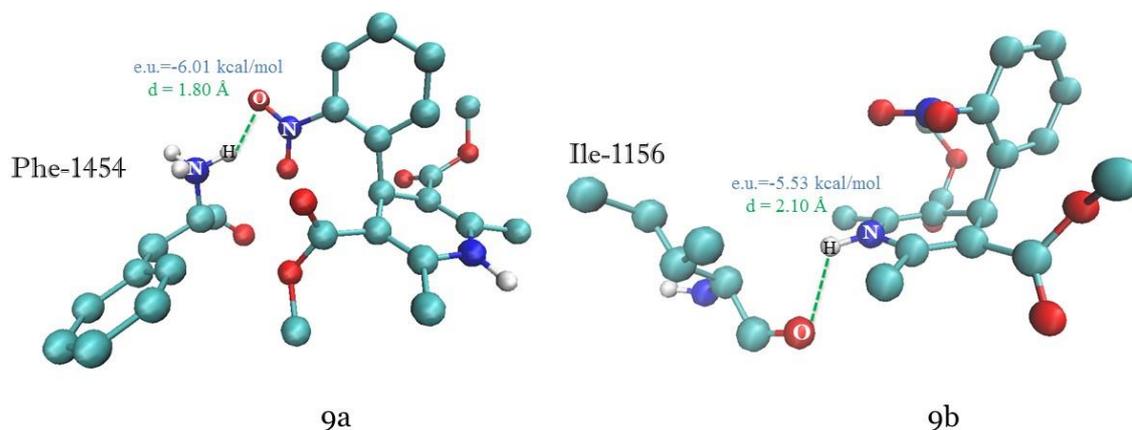


Figura 28. Distancias y energías de unión para las interacciones encontradas para la molécula **1** (Nifedipina), a) interacción entre oxígeno del grupo nitro del ligante y el hidrógeno del residuo Phe-1454, y b) interacción entre nitrógeno del anillo de la DHP del ligante y oxígeno del residuo Ile-1156. Se omiten los hidrógenos no polares, para una mejor visualización de las figuras.

Se puede observar que, los análogos que contiene en su estructura un sustituyente NO_2 y OH sobre el grupo **G**, muestran un acoplamiento entre los pares de átomos $\text{N}\cdots\text{O}\cdots\text{H}-\text{C}-\text{Phe1454}$, (fenilalanina-1454), con distancias promedio que van de 1.80 a 1.89 Å. Mientras que la mayoría de moléculas análogas de DHPs presentaron una preferencia de acoplamiento dirigido hacia el aminoácido de **isoleusina-1156**, con distancias de enlace que van desde 1.98 a 2.21 Å, siendo éste, otro sitio posible de unión para estos análogos de 1,4-dihidropiridina.

En la Tabla 10 se reporta el valor de la constante de disociación (K_d), para cada uno de los análogos que presentaron esta interacción. Esta constante de disociación se puede relacionar con el inverso de su valor logarítmico $\log(1/K_d)$ y a su vez, puede ser relacionado con el valor de $\log(1/IC_{50})$ experimental; con la intención de encontrar una relación que nos permita interpretar el comportamiento de afinidad de los análogos de DHPs calculados contra el sitio de unión afín de los dominios (III)S6 y (IV)S6. En la Tabla 10 se observa que las moléculas **1**, **2**, **6**, **10**, **13** y **33** fueron las que presentaron un

mayor valor de $\log(1/k_d)$ y estas a su vez, son las que presentan experimentalmente un alto poder hipotensor.¹⁵⁸

Tabla 10. Distancias de enlace entre las interacciones de los análogos de DHPs y los aminoácidos de los dominios (III-IV) S6. Energías de unión (E.U.), constante de disociación calculada (K_d), el inverso de la constante de disociación ($\log(1/k_d)$) y valor de inhibición experimental ($\log(1/IC_{50})$)

| Número | G | Interacción | Distancia | E.U (kcal/mol) | K_d M | $\log(1/k_d)$ | $\log(1/IC_{50})$ |
|--------|---------------------------|--------------------|-----------|-------------------|------------|---------------|-------------------|
| 1 | H | N1-H...O-C-Ile1156 | 2.17 | -5.85 | 5.16E-05 | 4.29 | 7.68 |
| 2 | 2'-NO ₂ | ON-O...H-C-Phe1454 | 1.80 | -6.01 | 3.90E-05 | 4.41 | 8.29 |
| 3 | 2'-CN | N1-H...O-C-Ile1156 | 2.11 | -5.54 | 8.65E-05 | 4.06 | 7.80 |
| 5 | 2'-Cl | N1-H...O-C-Ile1156 | 2.10 | -5.58 | 8.06E-05 | 4.09 | 8.66 |
| 6 | 2'-Br | N1-H...O-C-Ile1156 | 2.07 | -5.63 | 7.43E-05 | 4.13 | 8.12 |
| 8 | 2'-OMe | N1-H...O-C-Ile1156 | 2.12 | -5.4 | 1.10E-04 | 3.96 | 7.24 |
| 9 | 2'-OEt | N1-H...O-C-Ile1156 | 2.09 | -5.38 | 1.13E-04 | 3.95 | 6.96 |
| 10 | 2'-CH=CH ₂ | N1-H...O-C-Ile1156 | 2.12 | -5.77 | 5.85E-05 | 4.23 | 8.35 |
| 12 | 2'-CF ₃ | N1-H...O-C-Ile1156 | 2.08 | -5.17 | 1.62E-04 | 3.79 | 8.82 |
| 13 | 3'-Br | N1-H...O-C-Ile1156 | 2.13 | -6.5 | 1.71E-05 | 4.77 | 8.89 |
| 21 | 3'-OH | C-O...H-C-Phe1454 | 1.85 | -5.49 | 9.38E-05 | 4.03 | 6.00 |
| 26 | 4'-NO ₂ | N1-H...O-C-Ile1156 | 2.21 | -5.5 | 9.27E-05 | 4.03 | 5.50 |
| 31 | 2'-F, 6'-Cl | N1-H...O-C-Ile1156 | 1.98 | -5.57 | 8.20E-05 | 4.09 | 8.12 |
| 32 | 2',6'-Cl ₂ | N1-H...O-C-Ile1156 | 1.99 | -5.44 | 1.02E-04 | 3.99 | 8.72 |
| 33 | 2',3'-Cl ₂ | N1-H...O-C-Ile1156 | 2.12 | -5.86 | 5.06E-05 | 4.30 | 7.72 |
| 36 | 2'-Cl, 5'-NO ₂ | ON-O...H-O-Phe1454 | 1.89 | -5.22 | 1.49E-04 | 3.83 | 7.52 |
| 37 | 2'-OH, 5'-NO ₂ | ON-O...H-C-Phe1454 | 1.88 | -5.19 | 1.57E-04 | 3.80 | 7.00 |
| 40 | F ₅ | N1-H...O-C-Ile1156 | 2.17 | -5.65 | 7.21E-05 | 4.14 | 8.36 |

Los datos de la energía de unión encontrada para la interacción N1-H...O-C-Ile-1156 fue de -6.5 kcal/mol (molécula **16**) y el valor de la constante de disociación fue $K_d=4.77$, siendo el resultado más alto calculado para este tipo de interacción, Lo anterior

concuerta con los datos experimentales ya que esta molécula **16** fue la que reportó el mayor valor de respuesta biológica ($\log IC_{50} = 8.89$), ver Tabla 7.

El resultado del logaritmo inverso de la constante de disociación ($\log (1/K_d)$), se graficó en una relación directa con los valores de $\log (1/IC_{50})$, ver Figura 29, para encontrar una relación de tipo teórico vs experimental, que permita describir el comportamiento de acoplamiento entre las DHPs y los dominios del canal de calcio. Los resultados encontrados presentan una ligera tendencia cualitativa de los valores obtenidos de $\log (1/K_d)$ con referencia a su valor de actividad biológica experimental $\log (1/IC_{50})$.

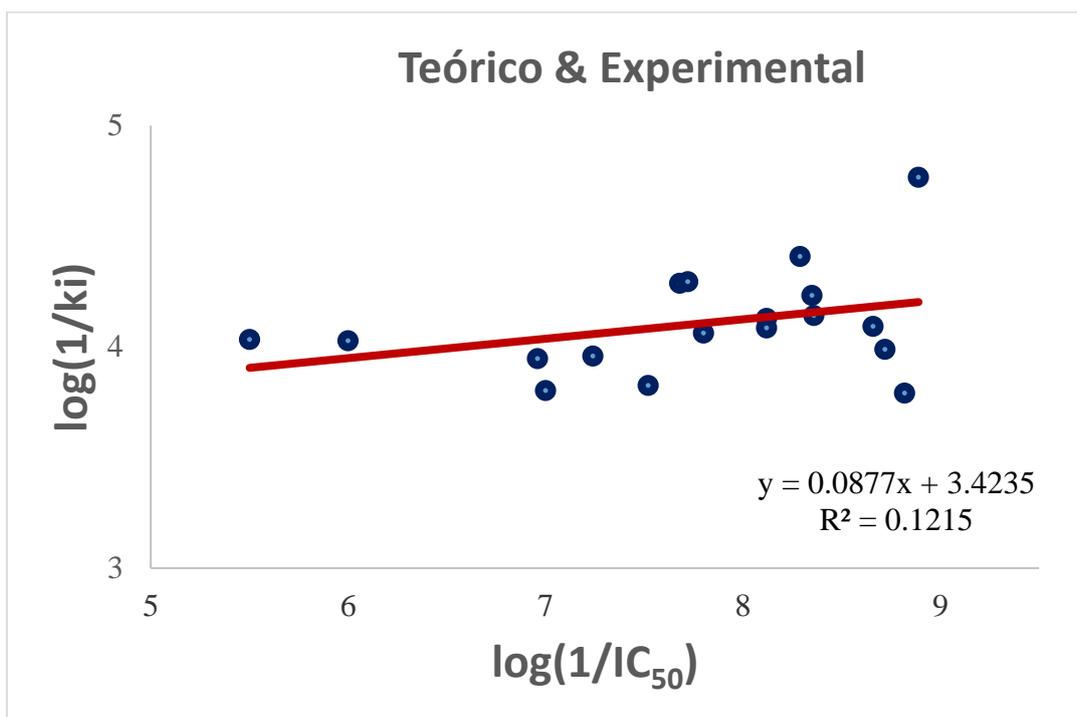


Figura 29. Gráfico de los valores calculados teóricos de $\log (1/K_d)$ vs su valor de actividad biológica experimental $\log (1/IC_{50})$.

3.5. Conclusiones.

El Docking molecular mostró que los análogos de 1,4-dihidropiridinas presentaron afinidad hacia el aminoácido de **fenilalanina-1454** del fragmento **IVS6** de la subunidad α_1 del canal de calcio tipo-L, exhibiendo interacciones electrostáticas por puente de hidrógeno entre los átomos de ligante $\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}-\text{Phe}-1454$.

Los acoplamiento moleculares revelaron que las DHPs muestran una segunda interacción, la cual tienden a unirse preferentemente con el aminoácido de **isoleucina-1156** del fragmento **(III)S6** de la subunidad α_1 del canal de calcio tipo-L generado por homología, encontrando interacciones electrostáticas por puente de hidrógeno entre los átomos de ligante $\text{H}\cdots\text{O}-\text{C}-\text{Ile}-1156$, siendo éste, el posible sitio de unión para estos análogos de 1,4-dihidropiridina.

El resultado del logaritmo inverso de la constante de disociación ($\log(1/K_d)$), permite hacer una relación directa contra el valor experimental, para entender el comportamiento del Docking. Considerando que todas las interacciones fueron trabajadas con una estructura de macromolécula en un estado rígido y un ligante flexible. La influencia de proporcionar flexibilidad a los aminoácidos de los fragmentos de la subunidad α_1 del canal de calcio tipo-L podrían generar interacciones de largo alcance que, en una estructura rígida, no es posible observar.

Apéndice A

Metodología

1. Procedimiento computacional de los antibióticos Rho A y Rho B.

Se realizó un análisis conformacional de los antibióticos Rhodostreptomicina (Rho A y Rho B) utilizando el método de mecánica molecular de campos de fuerza (MMFF) para localizar la estructura de mínima energía, una vez localizados los conformeros de mínima energía se procedió a realizar una primera optimización, con el método semiempírico PM3 utilizando el programa Spartan '08.¹⁷⁰

Posteriormente, con los resultados obtenidos con el método semiempírico, se efectuó una optimización total de las moléculas Rhodostreptomicina A y B en su forma neutra y protonada, usando el programa Gaussian 09'.¹⁷¹ Se investigó la interacción con los iones Ca^{2+} , aplicando la Teoría Funcionales de la Densidad, con la función de base 6-311G**¹⁷² para todos los átomos y el funcional híbrido de intercambio y correlación B3LYP.¹⁷³⁻¹⁷⁵ Este método proporciona una búsqueda adecuada de parámetros estructurales y electrónicos para los compuestos con Ca(II).¹⁷⁶ Se efectuó un análisis vibracional para todos los sistemas, encontrándose que las geometrías optimizadas corresponden a un mínimo en la superficie de energía potencial, ya que todas las frecuencias del sistema fueron positivas.

Todas las moléculas fueron calculadas tanto en fase gas como en un medio acuoso (con una constante dieléctrica $\epsilon = 78.39$), por medio del método continuo PCM.¹⁷⁷ Para

las energías de unión (E.U.) entre cada estructura de Rhodostreptomicina y Ca^{2+} se hicieron correcciones de energía de punto cero (ZPE).

2. Procedimiento de acoplamiento molecular computacional (Docking) de los antibióticos Rho A y Rho B.

En la búsqueda de los acoplamiento moleculares se utilizó el programa Autodock Tools 1.5.2,¹⁷⁸ el cual utiliza el Algoritmo Genético Lamarckiano para buscar las interacciones Rho-ligante, Los ligantes considerados en el estudio fueron los iones hexahidratados generados y optimizados mediante la Teoría de los Funcionales de la Densidad con la función de base 6-311G**¹⁷² para todos los átomos y el funcional híbrido de intercambio y correlación B3LYP,¹⁷³⁻¹⁷⁵ utilizando el programa Gaussian 09'.¹⁷¹ Se realizó un análisis vibracional de las estructuras, encontrándose que las geometrías optimizadas corresponden a un mínimo en la superficie de energía potencial, ya que todas las frecuencias del sistema fueron positivas. Los antibióticos Rho A y Rho B se tomaron como la molécula receptora y se modelaron como una estructura rígida frente a los iones de Ca^{2+} hexahidratados. Los parámetros del Docking utilizados en la generación de los archivos tanto de los ligandos y las moléculas receptoras fueron los valores por defecto que utiliza el programa Autodock Tools 1.5.2.¹⁷⁸

Para lo anterior se base en construir una malla (30×30×30) para realizar el Docking, que contiene las moléculas de Rho A o Rho B con un espaciamiento de 0.375 Å. Se aplicó el algoritmo genético, implementado en Autodock Tools, para buscar las interacciones entre el antibiótico y el ion de calcio. Todas las simulaciones se realizaron con una población inicial de 100 individuos colocados al azar y un máximo de 1×10^7 evaluaciones de energía. Se eligió la conformación con la energía libre de unión más negativa.

La visualización y revisión del complejo receptor-ligando se realizó a través del programa de interfaz gráfico que utiliza Autodock Tools 1.5.2¹⁷⁸ y Visual Molecular Dynamics (VMD) 1.8.6.^{207,179}

3. Metodología QSAR.

Se seleccionaron aleatoriamente treinta y cinco moléculas de un conjunto de cuarenta análogos de 1,4-dihidropiridinas (DHPs) cuya actividad biológica esta reportada,¹⁸⁰ las cinco restantes fueron utilizadas para la validación del método matemático. A continuación se generó la búsqueda conformacional de las cuarenta moléculas con mecánica molecular de campos de fuerza (MMFF) a través del programa Spartan '08.¹⁷⁰ Este método se apoya en la mecánica clásica y es de gran utilidad para verificar los conformeros correspondientes de una molécula, ya que no considera a los electrones del sistema. Este método es eficiente computacionalmente y pueden ser utilizados para hacer cálculos rápidos en moléculas muy grandes. Así mismo se efectuaron cálculos de primera optimización con el método semiempírico PM3, el cual incluye nuevas reparametrizaciones; una vez obtenidos los conformeros se procedió a realizar la optimización total de las moléculas análogas de Nifedipina, aplicando DFT, con el funcional de intercambio y correlación PBE¹⁸¹ con la base orbital DGDZVP¹⁸² y la base auxiliar Gen-A2 para todos los átomos utilizando el programa deMon2k.¹⁸³ Se realizó el cálculo de la segunda derivada corroborando que todas las estructuras corresponden a un mínimo en la superficie de energía potencial, ya que todas las frecuencias del sistema fueron positivas (NIMAG = 0).

Los descriptores cuánticos calculados fueron las cargas atómicas de Hirshfeld (q), la energía del orbital molecular más alto ocupado (E_{HOMO}), la energía del orbital molecular más bajo desocupado (E_{LUMO}), el momento dipolar (μ^{D}), el potencial de

ionización (I), la afinidad electrónica (A), la dureza (η), la blandura (S),¹⁸⁴⁻¹⁹³ el potencial químico (μ)¹⁹⁴ la electrofilicidad (ω)¹⁹⁵ y el volumen de isosuperficie (V). Algunos otros descriptores constitucionales, geométricos y topológicos fueron obtenidos con el programa Dragon'06,¹⁹⁶ entre ellos el coeficiente de partición de Ghose-Gripen-Viswanadhan (log de P),¹⁹⁷⁻¹⁹⁹ la refractividad molar Ghose-Crippen (RM),²⁰⁰ el factor Hidrofílico (Hy)²⁰¹ y la esfericidad (SPH).²⁰²

Para identificar las interacciones no covalentes (INC) entre el átomo de hidrógeno C(4)-H y los grupos sustituyentes **G** en el átomo C(2') del grupo fenilo [*INC(H4-G)*], fueron examinados los gráficos de gradiente de densidad reducida (*s*) en función de la densidad electrónica [ρ] graficada a 0.30 a.u., en la cual se generó una caja (Grid) a lo largo de la línea que une el átomo de (H4) con el átomo aceptor en la posición C2', cuyas dimensiones son $1.5 \times 1.0 \times 1.0 \text{ \AA}^3$ con un millón de puntos mapeados en la caja.²⁰³

Por otra parte, se buscaron las relaciones consistentes entre los descriptores químicos cuánticos-moleculares y la actividad biológica experimental respectiva de los compuestos análogos, mediante el uso de una regresión lineal múltiple,²⁰⁴ de acuerdo a la ecuación general:

$$\text{Actividad Biológica} = a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + \dots + a_mx_n + b$$

Donde % de Actividad es la variable dependiente y los parámetros x_i a x_n son los descriptores químicos cuánticos-moleculares para cada molécula y los a_1 a a_m son los coeficientes lineales obtenidos por las variaciones en los parámetros de ajuste de la actividad biológica, y **b** es una constante de regresión. El modelo matemático para predecir la actividad biológica de nuevas moléculas se obtuvo a través de técnicas estadísticas que utilizan algoritmos genéticos, utilizando el software Mobydigs.²⁰⁵ La actividad biológica que se ocupó en esta etapa está dada por valores de $\log 1/IC_{50}$.

4. Metodología de la obtención del canal de Ca^{2+} .

Para la obtención de un modelo confiable, se generó un canal de calcio(II), para acoplar los fármacos de análogos de DHPs, para lo cual se desarrollaron dinámicas moleculares con el software NAMD y como canal base se ocupó el de POTASSIUM CHANNEL (KCSA) FROM STREPTOMYCES LIVIDANS (**1BL8**),²⁰⁶ (4 cadenas, 119 aminoácidos), que fue obtenida del Protein Data Bank (PDB). Se realizó un pre-tratamiento utilizando el programa de presentación gráfica molecular VMD para configurar la simulación, se eliminaron las moléculas de agua y ligantes ajenos al canal. Una vez eliminadas las moléculas sobrantes, se adicionaron átomos de hidrógeno (polares), cargas parciales y parámetros de solvatación del canal, realizadas las modificaciones, se guardó un archivo en formato PNG.

Para la generación del canal de calcio(II), se crearon mutaciones correspondientes de los aminoácidos sobre el canal de potasio a través de un realineamiento estructural con la secuencia de aminoácidos del canal de calcio (Cav1.2) siguiendo la metodología propuesta por Tikhonov *et, al*¹⁶⁹. Posterior a esto y para configurar la simulación se utilizó el programa de presentación gráfica molecular VMD,²⁰⁷ para la corrida de las dinámicas moleculares se ocupó el programa NAMD²⁰⁸

Se realizó una minimización de 3,000 pasos sobre la estructura del canal para la eliminación de átomos traslapados producto de las mutaciones realizadas. Después se efectuó una equilibración especificando que átomos deben de estar fijos, esto es con la estructura principal inmóvil. La equilibración se llevó a cabo en dos pasos, el primer paso se solató en una caja, la estructura del canal con moléculas de agua. El segundo paso se procedió con un calentamiento de 1 grado cada 25 pasos, (donde cada paso equivale a 2 fs) con una temperatura inicial de 10.15 K y una final de 310.15 K, obteniendo así un

total de 15,000 pasos. Consecutivamente se realizó una segunda minimización de 3000 pasos debido a los posibles traslapes que se pudieron generar por producto de las modificaciones en la estructura por la equilibración.

Finalmente se desarrolló una dinámica molecular con valores de temperatura y presión constante, y solo el volumen fluctúa a lo largo de la dinámica, este procedimiento se plasmó por que se aprecia esferas de vacío debido a que las moléculas de agua llegan a espaciarse, modificando la densidad del sistema.

Para la dinámica molecular se ocuparon los parámetros de CHARMM los cuales contienen la información estructural y electrónica de todos los átomos. Las estructuras generadas se guardaron en archivos de tipo PSFG y PDB.

Posteriormente, una vez obtenido el canal por homología se analizó y preparó para obtener y separar los dominios (III)S6 y (IV)S6, la selección del número de aminoácidos se siguió la metodología propuesta por Lipkind y Fozzard 2001²⁰⁹ y empleada por Grefory M *et al.*²¹⁰ Donde los extremos de las cadenas se amidaron o acetilaron, según el caso y se realizó una minimización corta de 1000 pasos, para eliminar los nuevos traslapes generados, la cual se guardó como un archivo PDB para posteriormente ocuparlo en el Docking.

5. Metodología Docking.

En la búsqueda de los acoplamientos moleculares (Docking) se utilizó el programa Autodock Tools 1.5.2,¹⁷⁸ que utiliza el Algoritmo Genético Lamarckiano implementado en Autodock y se aplicó para buscar las interacciones entre ligante y receptor.

En este estudio se ocuparon las cuarenta moléculas análogas de 1,4-dihidropiridina, de las cuales fueron definidos los átomos de hidrógeno polares, se

adicionaron las cargas parciales a los átomos, se especificaron los átomos de carbono aromáticos, se declararon las porciones rígidas de las moléculas y se señalaron los enlaces que presentan libre rotación (mayor grado de libertad), esta información se escribió en un archivo PDBQT para cada uno de los ligantes.

Para la preparación de la macromolécula receptora se ocupó el canal de calcio(II) previamente optimizado, se adicionaron los átomos de hidrógeno, cargas parciales de Kollman y parámetros de solvatación, utilizando AutoDockTools. La estructura obtenida del canal de calcio en formato PDB no incluye átomos de hidrógeno en la estructura, por lo cual éstos se adicionan y se determinan los átomos de hidrógeno polares, es decir aquéllos unidos a átomos electronegativos que pueden participar en interacciones por puente de hidrógeno. Los átomos no polares se eliminaron de la estructura, pero se contemplan de manera implícita y su efecto fue sumado a los átomos a los que estaba unidos; la macromolécula es considerada como una estructura rígida frente a los ligantes análogos de DHPs. Para los parámetros del Docking utilizados en la generación de los archivos tanto de los ligantes y las moléculas receptoras se utilizaron los valores que por defecto utiliza el programa Autodock Tools 1.5.2.¹⁷⁸ Estas modificaciones se escribieron en un archivo PDBQT que almacenó la información de la estructura.

El cálculo de los mapas de afinidad atómica fue generado para la macromolécula en un archivo PDBQT utilizando el programa AutoGrid, generando un mapa de afinidad electrónica por cada tipo de átomo que contiene la estructura del ligante y del receptor [A, C, HD, N, NA, OA, SA, Br, Cl, I, F], se especificó el volumen, el cual fue dividido en secciones o puntos, construyendo una caja con un mallado de $126 \times 126 \times 126$, que contiene al canal de calcio(II) con un espaciamiento de 0.375 \AA , y se almacenó la información en un archivo GPF utilizado por AutoGrid para generar los mapas. Estos mapas son utilizados por AutoDock aplicando el algoritmo genético, implementado en

Autodock Tools, para buscar las interacciones entre análogo-canal Ca^{2+} . Los parámetros establecidos fueron de: 250,000 como máximo número de evaluaciones de energía; 27,000 como máximo número de generación con mutaciones de 0.2 y entrecruzamiento de 0.8. Todas las simulaciones se realizaron a 100 corridas para cada estudio, con una población inicial de 100 individuos colocados al azar. Se eligió la conformación más baja en energía libre de unión.

AutoDock genera un archivo de salida DLG, el cual almacena las conformaciones y energías libres de unión para cada una de las corridas elaboradas. La visualización y revisión del complejo receptor-ligando se realizó a través del programa de interfaz gráfico que utiliza Autodock Tools 1.5.2¹⁷⁸ y Visual Molecular Dynamics (VMD) 1.8.6. Las constantes de disociación fueron calculadas a partir de la ΔG de unión proporcionado por el programa usando la relación: $K_d = e^{-(\Delta G/RT)}$

Apéndice B

Tabla 11. Descriptores cuánticos calculados con PBE/DGDZVP, para las moléculas DHPs 1-20. Cargas de Hirshfeld (q), orbital molecular más alto en energía ocupado (EHOMO), orbital molecular más bajo en energía desocupado (ELUMO), momento dipolar (μ D), potencial de ionización (I), afinidad electrónica (A), dureza (η), blandura (S), potencial químico (μ), electrofiliidad (ω), volumen de isosuperficie (V), Densidad de la interacción no covalente (INC) del enlace C(4)-H---G. Algunos otros descriptores constitucionales, geométricos y topológicos fueron obtenidos con el software Dragon 06', el coeficiente de partición (log P), coeficiente de partición cuadrado (log P²), refractividad molar (MR), factor Hidrofílico (Hy), esfericidad molar (SPH) y la distancia de puente de hidrógeno intramolecular d1 y d2.

| Molécula | G | log(I/C ₅₀) | q _{Ph} | q _{DHP} | q _N | E _{HOMO} | E _{LUMO} | μ^D | I | A | η | S | μ | ω | V | INC(H4-G) | Log P | Log P ² | MR | Hy | SPH | (d1) | (d2) |
|----------|-----------------------|-------------------------|-----------------|------------------|----------------|-------------------|-------------------|---------|------|------|--------|------|-------|----------|----------------|------------------------|-------|--------------------|-------|-------|------|------|------|
| | | | e | e | e | eV | eV | Debye | eV | eV | eV | eV | eV | eV | Å ³ | 1x10 ^{-3 au.} | | | | | Å | Å | Å |
| 1 | H | 7.55 | -0.30 | -0.08 | -0.08 | -4.97 | -2.21 | 3.04 | 4.97 | 2.21 | 1.38 | 0.72 | -3.59 | 4.67 | 144.93 | 6.47 | 3.35 | 11.21 | 63.71 | -0.31 | 0.36 | - | 2.74 |
| 2 | 2'-NO ₂ | 8.29 | -0.14 | -0.09 | -0.08 | -5.17 | -3.21 | 8.92 | 5.17 | 3.21 | 0.98 | 1.02 | -4.19 | 8.96 | 158.17 | 15.89 | 0.82 | 0.67 | 68.72 | -0.24 | 0.41 | 2.23 | 2.75 |
| 3 | 2'-CN | 7.80 | -0.17 | -0.09 | -0.08 | -5.16 | -2.49 | 5.33 | 5.16 | 2.49 | 1.34 | 0.75 | -3.83 | 5.48 | 153.92 | 9.62 | 2.72 | 7.39 | 62.82 | -0.30 | 0.39 | - | 2.77 |
| 4 | 2'-F | 7.37 | -0.20 | -0.09 | -0.08 | -5.00 | -2.24 | 4.13 | 5.00 | 2.24 | 1.38 | 0.72 | -3.62 | 4.75 | 147.87 | 11.9 | 3.08 | 9.45 | 63.62 | -0.28 | 0.38 | 2.35 | 2.78 |
| 5 | 2'-Cl | 8.66 | -0.21 | -0.09 | -0.08 | -5.04 | -2.26 | 3.55 | 5.04 | 2.26 | 1.39 | 0.72 | -3.65 | 4.79 | 153.18 | 12.24 | 3.53 | 12.49 | 68.21 | -0.28 | 0.37 | 2.61 | 2.70 |
| 6 | 2'-Br | 8.12 | -0.18 | -0.08 | -0.08 | -5.05 | -2.27 | 4.93 | 5.05 | 2.27 | 1.39 | 0.72 | -3.66 | 4.82 | 155.27 | 12.65 | 3.62 | 13.09 | 71.02 | -0.28 | 0.37 | 2.68 | 2.68 |
| 7 | 2'-I | 7.33 | -0.17 | -0.12 | -0.09 | -5.18 | -1.97 | 7.28 | 5.18 | 1.97 | 1.61 | 0.62 | -3.58 | 3.98 | 158.77 | 14.47 | 3.45 | 11.89 | 75.81 | -0.28 | 0.30 | 2.77 | 2.59 |
| 8 | 2'-OMe | 7.24 | -0.24 | -0.09 | -0.08 | -4.82 | -2.08 | 3.82 | 4.82 | 2.08 | 1.37 | 0.73 | -3.45 | 4.34 | 158.27 | 14.24 | 2.67 | 7.11 | 70.13 | -0.30 | 0.43 | 2.27 | 2.71 |
| 9 | 2'-OEt | 6.96 | -0.24 | -0.09 | -0.08 | -4.82 | -2.07 | 4.05 | 4.82 | 2.07 | 1.38 | 0.73 | -3.45 | 4.32 | 166.74 | 14.23 | 3.02 | 9.09 | 74.88 | -0.32 | 0.44 | 2.29 | 2.73 |
| 10 | 2'-CH=CH ₂ | 8.35 | -0.24 | -0.08 | -0.08 | -4.97 | -2.25 | 3.18 | 4.97 | 2.25 | 1.36 | 0.74 | -3.61 | 4.79 | 158.91 | 7.06 | 3.43 | 11.74 | 72.97 | -0.34 | 0.43 | - | 2.72 |
| 11 | 2'-Me | 8.22 | -0.27 | -0.08 | -0.08 | -4.97 | -2.21 | 3.15 | 4.97 | 2.21 | 1.38 | 0.72 | -3.59 | 4.67 | 153.58 | 7.89 | 3.36 | 11.29 | 68.32 | -0.33 | 0.37 | - | 2.66 |
| 12 | 2'-CF ₃ | 8.82 | -0.23 | -0.09 | -0.08 | -5.07 | -2.38 | 8.43 | 5.07 | 2.38 | 1.35 | 0.74 | -3.73 | 5.16 | 162.61 | 17.22 | 3.82 | 14.56 | 69.25 | -0.26 | 0.46 | 2.07 | 2.76 |
| 13 | 3'-CN | 7.46 | -0.15 | -0.11 | -0.09 | -5.42 | -2.44 | 6.63 | 5.42 | 2.44 | 1.49 | 0.67 | -3.93 | 5.18 | 153.84 | 5.45 | 2.72 | 7.39 | 62.82 | -0.30 | 0.26 | - | 2.86 |
| 14 | 3'-F | 7.68 | -0.20 | -0.08 | -0.08 | -5.07 | -2.32 | 4.21 | 5.07 | 2.32 | 1.38 | 0.73 | -3.70 | 4.96 | 147.79 | 5.88 | 3.08 | 9.45 | 63.62 | -0.28 | 0.39 | - | 2.79 |
| 15 | 3'-Cl | 7.80 | -0.21 | -0.08 | -0.08 | -5.10 | -2.35 | 2.75 | 5.10 | 2.35 | 1.38 | 0.73 | -3.73 | 5.05 | 153.03 | 6.31 | 3.53 | 12.49 | 68.21 | -0.28 | 0.34 | - | 2.75 |
| 16 | 3'-Br | 8.89 | -0.13 | -0.08 | -0.08 | -5.10 | -2.35 | 4.01 | 5.10 | 2.35 | 1.38 | 0.73 | -3.73 | 5.05 | 155.12 | 6.43 | 3.62 | 13.09 | 71.02 | -0.28 | 0.34 | - | 2.77 |
| 17 | 3'-I | 7.38 | -0.16 | -0.11 | -0.09 | -5.22 | -2.13 | 4.26 | 5.22 | 2.13 | 1.55 | 0.65 | -3.68 | 4.37 | 158.61 | 4.35 | 3.45 | 11.89 | 75.81 | -0.28 | 0.33 | - | 2.93 |
| 18 | 3'-OAc | 5.22 | -0.14 | -0.11 | -0.09 | -5.01 | -2.25 | 5.06 | 5.01 | 2.25 | 1.38 | 0.72 | -3.63 | 4.77 | 167.80 | 3.75 | 2.59 | 6.71 | 69.94 | -0.28 | 0.46 | - | 2.83 |
| 19 | 3'-OMe | 6.72 | -0.24 | -0.08 | -0.08 | -4.91 | -2.12 | 3.35 | 4.91 | 2.12 | 1.40 | 0.72 | -3.52 | 4.43 | 158.05 | 6.61 | 2.67 | 7.11 | 70.13 | -0.30 | 0.16 | - | 2.73 |
| 20 | 3'-OCOPh | 5.20 | -0.18 | -0.08 | -0.08 | -4.93 | -2.39 | 2.89 | 4.93 | 2.39 | 1.27 | 0.79 | -3.66 | 5.27 | 197.92 | 5.77 | 5.78 | 33.38 | 73.58 | -0.36 | 0.71 | 2.67 | 2.83 |

Tabla 12. Descriptores cuánticos calculados con PBE/DGDZVP, para las moléculas DHPs 21-40. Cargas de Hirshfeld (q), orbital molecular más alto en energía ocupado (EHOMO), orbital molecular más bajo en energía desocupado (ELUMO), momento dipolar (μ D), potencial de ionización (I), afinidad electrónica (A), dureza (η), blandura (S), potencial químico (μ), electrofiliidad (ω), volumen de isosuperficie (V), densidad de la interacción no covalente (INC) del enlace C(4)-H---G. Algunos otros descriptores constitucionales, geométricos y topológicos fueron obtenidos con el software Dragon 06; el coeficiente de partición (log P), coeficiente de partición cuadrado (log P²), refractividad molar (MR), factor Hidrofílico (Hy), esfericidad molar (SPH) y la distancia de puente de hidrógeno intramolecular d1 y d2.

| Molécula | G | log(I/IC ₅₀) | q _{ph} | q _{DHP} | q _N | E _{HOMO} | E _{LUMO} | μ^D | I | A | η | S | μ | ω | V | INC(H4-G) | Log P | Log P ² | MR | Hy | SPH | (d1) | (d2) |
|----------|--------------------------|--------------------------|-----------------|------------------|----------------|-------------------|-------------------|---------|------|------|--------|------|-------|----------|----------------|--------------------------|-------|--------------------|-------|-------|------|------|------|
| | | | e | e | e | eV | eV | Debye | eV | eV | eV | eV | eV | eV | Å ³ | 1 × 10 ⁻³ au. | | | | | Å | Å | Å |
| 21 | 3'-OH | 6.00 | -0.24 | -0.08 | -0.08 | -5.00 | -2.25 | 3.09 | 5.00 | 2.25 | 1.38 | 0.73 | -3.63 | 4.78 | 149.44 | 6.41 | 2.26 | 5.10 | 65.38 | 0.32 | 0.39 | - | 2.75 |
| 22 | 3'-NH ₂ | 5.70 | -0.28 | -0.08 | -0.08 | -4.62 | -2.13 | 2.69 | 4.62 | 2.13 | 1.25 | 0.80 | -3.38 | 4.57 | 151.23 | 6.61 | 1.97 | 3.87 | 67.04 | 1.03 | 0.37 | - | 2.80 |
| 23 | 3'-NMe ₂ | 6.05 | -0.29 | -0.20 | -0.08 | -4.24 | -2.07 | 5.20 | 4.24 | 2.07 | 1.09 | 0.92 | -3.16 | 4.59 | 168.52 | 6.52 | 2.94 | 8.62 | 77.11 | -0.32 | 0.46 | - | 2.83 |
| 24 | 3'-CF ₃ | 7.13 | -0.22 | -0.11 | -0.09 | -5.30 | -2.16 | 8.90 | 5.30 | 2.16 | 1.57 | 0.64 | -3.73 | 4.43 | 162.34 | 5.05 | 3.82 | 14.56 | 69.25 | -0.26 | 0.26 | - | 2.80 |
| 25 | 3'-Me | 6.96 | -0.27 | -0.08 | -0.08 | -4.94 | -2.18 | 4.58 | 4.94 | 2.18 | 1.38 | 0.72 | -3.56 | 4.59 | 153.42 | 6.60 | 3.36 | 11.29 | 68.32 | -0.33 | 0.11 | - | 2.73 |
| 26 | 4'-NO ₂ | 5.50 | -0.14 | -0.08 | -0.08 | -5.36 | -3.31 | 13.14 | 5.36 | 3.31 | 1.03 | 0.98 | -4.34 | 9.17 | 157.95 | 6.31 | 0.82 | 0.67 | 68.72 | -0.24 | 0.31 | - | 2.75 |
| 27 | 4'-CN | 5.46 | -0.16 | -0.08 | -0.08 | -5.30 | -2.61 | 5.09 | 5.30 | 2.61 | 1.35 | 0.74 | -3.96 | 5.81 | 153.83 | 2.20 | 2.36 | 5.57 | 71.02 | -0.30 | 0.32 | - | 2.76 |
| 28 | 4'-F | 6.89 | -0.19 | -0.08 | -0.08 | -5.07 | -2.29 | 3.29 | 5.07 | 2.29 | 1.39 | 0.72 | -3.68 | 4.87 | 147.79 | 6.24 | 3.08 | 9.45 | 63.62 | -0.28 | 0.35 | - | 2.76 |
| 29 | 4'-I | 4.64 | -0.15 | -0.09 | -0.09 | -5.36 | -3.31 | 13.14 | 5.36 | 3.31 | 1.03 | 0.98 | -4.34 | 9.17 | 158.63 | 3.62 | 0.82 | 0.67 | 68.72 | -0.24 | 0.31 | - | 2.75 |
| 30 | 4'-NMe ₂ | 4.00 | -0.28 | -0.07 | -0.08 | -4.22 | -2.00 | 5.99 | 4.22 | 2.00 | 1.11 | 0.90 | -3.11 | 4.36 | 168.48 | 6.18 | 2.94 | 8.62 | 77.11 | -0.32 | 0.37 | - | 2.77 |
| 31 | 2'-F,6'-Cl | 8.12 | -0.11 | -0.09 | -0.07 | -5.15 | -2.38 | 4.39 | 5.15 | 2.38 | 1.39 | 0.72 | -3.77 | 5.12 | 156.21 | 12.87 | 3.72 | 13.83 | 72.70 | -0.26 | 0.39 | 2.57 | 2.69 |
| 32 | 2',6'-Cl | 8.72 | -0.12 | -0.08 | -0.07 | -4.95 | -2.29 | 1.49 | 4.95 | 2.29 | 1.33 | 0.75 | -3.62 | 4.93 | 161.61 | 15.21 | 3.72 | 13.83 | 72.70 | -0.26 | 0.54 | 2.49 | - |
| 33 | 2',3'-Cl | 7.72 | -0.13 | -0.08 | -0.08 | -5.15 | -2.38 | 4.39 | 5.15 | 2.38 | 1.39 | 0.72 | -3.77 | 5.12 | 161.44 | 13.25 | 3.72 | 13.83 | 72.70 | -0.26 | 0.39 | 2.57 | 2.69 |
| 34 | 2,4'-Cl | 6.40 | -0.12 | -0.09 | -0.08 | -5.16 | -2.39 | 2.91 | 5.16 | 2.39 | 1.39 | 0.72 | -3.78 | 5.14 | 161.35 | 12.05 | 3.72 | 13.83 | 72.70 | -0.26 | 0.37 | 2.62 | 2.80 |
| 35 | 3',5'-Cl | 7.03 | -0.12 | 0.08 | -0.08 | -5.22 | -2.48 | 2.63 | 5.22 | 2.48 | 1.37 | 0.73 | -3.85 | 5.41 | 161.20 | 6.00 | 3.72 | 13.83 | 72.70 | -0.26 | 0.36 | - | 2.77 |
| 36 | 2'-Cl,5'-NO ₂ | 7.52 | -0.05 | -0.13 | -0.09 | -5.34 | -3.50 | 9.98 | 5.34 | 3.50 | 0.92 | 1.09 | -4.42 | 10.62 | 165.08 | 12.75 | 1.00 | 1.00 | 73.21 | -0.22 | 0.14 | 2.61 | 2.62 |
| 37 | 2'-OH,5'-NO ₂ | 7.00 | -0.09 | -0.06 | -0.07 | -5.51 | -2.91 | 11.02 | 5.51 | 2.91 | 1.30 | 0.77 | -4.21 | 6.82 | 162.94 | 12.02 | -0.27 | 0.08 | 70.39 | 0.37 | 0.26 | 2.56 | 5.37 |
| 38 | 2',5'-Me | 7.00 | -0.23 | -0.08 | -0.08 | -4.94 | -2.19 | 4.35 | 4.94 | 2.19 | 1.38 | 0.73 | -3.57 | 4.62 | 162.12 | 8.19 | 3.37 | 11.37 | 72.93 | -0.34 | 0.11 | - | 2.63 |
| 39 | 2',4',5'-(OMe) | 3.00 | -0.07 | -0.10 | -0.08 | -4.49 | -2.07 | 2.43 | 4.49 | 2.07 | 1.21 | 0.83 | -3.28 | 4.45 | 184.74 | 13.72 | 1.30 | 1.70 | 82.98 | -0.29 | 0.20 | 2.29 | 2.70 |
| 40 | F ₅ | 8.36 | 0.21 | -0.10 | -0.07 | -4.96 | -2.24 | 1.16 | 4.96 | 2.24 | 1.36 | 0.74 | -3.60 | 4.76 | 159.72 | 14.00 | 3.26 | 10.63 | 68.11 | -0.26 | 0.44 | 2.58 | - |

Bibliografía

-
- [1] Vallano A., Izarra A.; Principios de terapéutica antimicrobiana. *Medicine*. **2006**, 49, 3196-3203.
- [2] Falagas M. E., Vergidis P.I.; Irrigation with antibiotic containing solutions for the prevention and treatment of infections, *Clin Micro Inf*. **2005**, 11, 62-67
- [3] Valdés L. D., Muguercia H., Herera M. L., Rivero E., Zamora R., Araújo L. J.; Penicilinas. *Acta médica*. **1998**, 8, 28-39.
- [4] Cué M., Morejón M.; Antibacterianos de acción sistémica. Parte I. *Antibióticos betalactámicos. Rev Cubana de Med Gen Integr [revista en Internet.]* **2009**, 144, 347-361.
- [5] Sande M., Mandell G. L.; Quimioterapia de las enfermedades: agentes antimicrobianos. En: Goodman Gilman A., Goodman L. S.; Las bases farmacológicas de la terapéutica. La Habana, Ed. Científico-Técnica, **1982**, 2, 1062-1165.
- [6] Izidor S., Bojana M., Katharina A., Bogdan S., Janko K., Stanislav G.; Development of New Cathepsin B Inhibitors: Combining Bioisosteric Replacements and Structure-Based Design To Explore the Structure–Activity Relationships of Nitroxoline Derivatives *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 521–533.
- [7] Wei Q. C., Gunter H. Petri K., Margit R., Markus H., Hubert H., Gert L.; Effects of Gigapascal Level Pressure on Protein Structure and Function, *J. Phys. Chem. B*, **2012**, 116, 1100–1110.
- [8] Fabrizio D. P., Antonio V., Abeer T., Roberta C., Maria A., B., Giuseppe B., Maria G., Claudio P., Nunziatina D. T., Alessandra B.; A Chemical–Biological Study Reveals C9-type Iridoids as Novel Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Inhibitors, *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 1583–1595.
- [9] Marín, M., Gudiol, F.; Antibióticos betalactámicos., *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, **2003**, 41, 42-55.
- [10] Dutch, D. S., Gary, S. K.; Biosynthesis and functioning of tetrahidrobiopteryn, *The J. Nut. Bio*, **2003**, 2, 411-423.
- [11] Tillman, J. A., Seybold, S. J., Jurenka, R. A., Blomquist, G. A.; Insect pheromones— an overview of biosynthesis and endocrine regulation, *Ins Bio Mol Bio*, **1999**, 29, 481-514.
- [12] Pirrung, M. C., Cao, J., Chen, J.; Ethylene biosynthesis: processing of a substrate analog supports a radical mechanism for the ethylene-forming enzyme, *Chem & Bio*, **1998**, 5, 49-57.

-
- [13] Piaggiesia A., Picciarellia P., Ceccarellia N., Lorenzi R.; Cytokinin biosynthesis in endosperm of *Sechium edule* Sw., *Plant Science*, **1998**,129, 131-140.
- [14] Kamiya Y., García M., J.; Regulation of gibberellin biosynthesis by light, *Cur Opt Plant Bio*, **1999**. 2, 398-403.
- [15] Nora G. P., Millera M. J., Möllmannb, U.; The synthesis and in vitro testing of structurally novel antibiotics derived from acylnitroso Diels–Alder adducts, *Bio & Med Chem Let*, **2006**, 16, 3966-3970.
- [16] Kennedy A. D., DeLeo F. R.; Epidemiology and Virulence of Community-Associated MRSA, *Clin Micro New*, **2009**, 31, 153-160.
- [17] Lafuente R. F., Rosel C. M., Piatkowska, B., Guisán, J. M.; Synthesis of antibiotics (cephaloglycin) catalyzed by penicillin G acylase: Evaluation and optimization of different synthetic approaches. *Enz Micro Tech*. **1995**, 19, 9-14.
- [18] Boruwa J., Kalita B., Barua N. C., Borah J. C., Mazumder S., Thakur D., Gogoi D. K., Bora T. C.; Synthesis, absolute stereochemistry and molecular design of the new antifungal and antibacterial antibiotic produced by *Streptomyces*, *Bio Med Chem Let*, **2004**, 14,3571- 3574.
- [19] Herrero I. A., Teshager T., Garde, J., Moreno M. A., Domínguez L.; Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) in pig faeces from slaughterhouses in Spain., *Prev Vet Med*, **2000**, 47, 255-262.
- [20] Heather C., Yuna M. W., Ellis J. H., Jorgensen; Activity of ceftobiprole against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recently recovered from US military trainees, *Diagn Micro Infec Dis*, **2007**, 59, 463–466
- [21] Paul H., Ingrid H. K., Peter A., Peter H., Malcolm G. P., Rudolf L.; In Vitro and In Vivo Properties of Ro 63-9141, a Novel Broad Spectrum Cephalosporin with Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococci*, *Anti Agents chem*, **2001**, 825–836
- [22] Graeme K. A., Pollack, Jr, C. V.; Antibiotic use in the emergency department. II. The aminoglycosides, macrolides, tetracyclines, sulfa drugs, and urinary antiseptics, *J Emerg Med*, **1996**, 14, 361-371.
- [23] Aronson J. K., Beta-lactam antibiotics, *Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions*, **2006**, 15, 478-502.
- [24] Hanson, D. A.; Kaspar, A. A.; Poulain, F. R, y Krensky, A. M., Biosynthesis of granulysin, a novel cytolytic molecule, *Mol Immun*, **1999**, 36, 413-422.
- [25] Clair, J. J., Foley, T. L., Schegg, T. R., Regan, C. M., Burkart, M. D., Manipulation of Carrier Proteins in Antibiotic Biosynthesis, *Chem Bio*, **2004**, 11, 195-201.

- [26] Hubbard, J., Burnham, M. K. R., Throup, J. P.; Pathogenicity and Histidine Kinases: Approaches toward the Development of a New Generation of Antibiotics, *Hist Kin Sig Trans*, **2007**, 3, 459-481.
- [27] Coleman, K., Extending the life of β -lactam antibiotics: New β -lactamase inhibitors, *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, **2006**, 3, 183-188.
- [28] Heather C. Yuna, Michael W. Ellisb, James H. Jorgensenc., Activity of ceftobiprole against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recently recovered from US military trainees, *Diag Micro Infect Dis*, **2007**, 59, 463-466.
- [29] Paul Hebeisen, Ingrid Heinze-Krauss, Peter Angehrn, Peter Hohl, Malcolm G.P. PAge and Rudolf L. Then.; In Vitro and In Vivo Properties of Ro 63-9141, a Novel Broad Spectrum Cephalosporin with Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococci*, *Ant Agents and Chem*, **2001**, 825-836.
- [30] Chemical Modification of Erythromycin. I. synthesis and antibacterial activity of 6-O-Methylerythromycins A. *The Journal of Antibiotics*, **1984**, V37, No. 2 187-189.
- [31] Marilyn C. Roberts.; Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes, *FEMS Microbiol Lett* **2008**, 282,147–159.
- [32] Coffey, A. G., Daly, C., Fitzgerald, G.; The impact of biotechnology on the dairy industry, *Bio Advan*, **1994**, 12, 625, 633.
- [33] Niwa, K. Nakamura, M., Ohmiya, Y.; Stereoisomeric bio-inversion key to biosynthesis of firefly d-luciferin, *Febs letters*, **2006**, 580, 5283-5287.
- [34] Zha, W. Rubin-Pitel, S. B., Shao, Z., Zhao, H.; Improving cellular malonyl-CoA level in *Escherichia coli* via metabolic engineering, *Met Engine*, **2009**, 11, 192-198.
- [35] Alper, H., Jin, Y. S., Moxley, J. F., Stephanopoulos, G.; Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*, *Meta Engin*, **2004**, 7, 155-164.
- [36] Mitnacht, S. Aasland, R., Weinzierl, R., Gardiner, M., Rees, M., Mole, S., Mitchison, H. S., Benton, R., Hukriede, Tsang, M., Jones, M., Ferea, T.; Genetics and development, *Currer Op Gen Develop*, **2001**, 11, 483-490-
- [37] Saito, H., Inoue, T.; Synthetic biology with RNA motifs, *The Inter J Biochem Cell Bio*, **2008**, 41, 398-404.
- [38] Habeck, M., Spying on nature's drug factories. *Drug Disc T.*, **2002**, 7, 1109-1110.
- [39] Hutchinson, C. R.; Combinatorial biosynthesis for new drug discovery, *Current Opin Micro*, **1999**, 1, 319-329.
- [40] Foubister, V.; Scientists expand the genetic code, *Drug Disc Tod*, **2003**, 8, 239-240.

- [41] Pirrung, M., Cao, J., y Chen, J.; Ethylene biosynthesis: processing of a substrate analog supports a radical mechanism for the ethylene-forming enzyme, *Chem & Bio*, **1997**, 5, 49-57.
- [42] Heinz G. Floss, Paul J. Keuer, John M. Beale,; Studies on the Biosynthesis of Antibiotics, *J Nat Prod*, **1986**, 49, 6, 957-970.
- [43] David G. I., Kingston, Michael X. Kolpak, Joseph W. LeFevre, and Ingrid Borup-Grochtmann, Biosynthesis of Antibiotics of the Virginiamycin Family Biosynthesis of Virginiamycin M₁, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 5, 106-5110.
- [44] Malfertheiner, P.; Fry, L., Mönkemüller, K., Can gastric cancer be prevented by Helicobacter pylori eradication, *Best Prac Res Clin Gastro*, **2006**, 20, 709- 719.
- [45] Lochhead, P., Emad M.; Helicobacter pylori infection and gastric cancer, *Best Prac Res Clin Gastro*, **2007**, 21, 281-297.
- [46] Janulaityte Günther, D. J., Kupcinkas, L., Pavidonisa, A. Valuckas, K. Andersen, L. P. Wadström, T.; *FEMS Immu Med Micro*, **2004**, 44, 191-195.
- [47] Machado, A. M. D., Figueiredo, C., Seruca R., Rasmussen L. J.; Helicobacter pylori infection generates genetic instability in gastric cells, *Bio Bio Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, **2010**, 4, 113-118.
- [48] Michie, C., Gastric cancer association with H. pylori strengthened, *Trends in Immu*, **2001**, 22, 596.
- [49] Kazuhiko, K., Ion, G.; Sambandan, T, G., Philip, A, L.; Joanna E. B., ChoKyun Rha., Anthony J. S., Rhodostreptomycins, Antibiotics Biosynthesized Following Horizontal Gene Transfer from Streptomyces padanus to Rhodococcus fascians. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 1126-1127.
- [50] Kuvat T. Momynaliev, Sergey V. Kashin, Vera V. Chelysheva, Oksana V. elezneva, Irina A. Demina, Marya V. Serebryakova, Dmitry Alexeev, Vladimir A. Ivanisenko, Ewgeniya man and Vadim M. Govorun. Functional Divergence of Helicobacter pylori Related to Early Gastric Cancer., *J. Proteome Res.* **2010**, 9, 1, 254–267
- [51] Atherton JC. The pathogenesis of Helicobacter pylori-induced gastro-duodenal diseases. *An Rev Path.* **2006**; 1:63–96
- [52] Silvia Martini, Claudia Bonechi, Claudio Rossi, and Natale Figura., Increased susceptibility to Resveratrol of Helicobacter pylori Strains Isolated from Patients with Gastric Carcinoma., *J. Nat. Prod.*, **2011**, 74, 10, 2257–226.
- [53] Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. *Clin Micro Rev* **2006**; 19, 3, 449–490.

- [54] Kusum Lata and Kausik Chattopadhyay, Helicobacter pylori TlyA Forms Amyloid-like Aggregates with Potent Cytotoxic Activity., *Biochemistry*, **2015**, 54, 23, 3649–3659.
- [55] Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Ehemann C, Zauber AG, Anderson RN, Jemal A, Schymura MJ, Lansdorp-Vogelaar I, Seeff LC, van Ballegooijen M, Goede SL, Ries LAG (2010) Annual report to the nation on the status of cancer, **1975–2006**, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer* 116:544–573.
- [56] Yacobi, I; Benhar, I; Targeted anti-bacterial therapy. *Infect Dis Drugs Targets*. **2007**, 7, 221-29.
- [57] Coates, A. R; Hu, Y. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections., *Bri J Pharm.*, **2007**, 152, 1147-1154.
- [58] Ceccarelli, M.; Ruggerone, P.; Physical insights into permeation of and resistance to antibiotics in bacteria. *Curr Drug Targets*. **2008**, 9, 779-788.
- [59] Lock, R. L; Harry, E. J. Cell-division inhibitors: new insights for future antibiotics. *Nat Rev Drug Disc*. **2008**, 7, 324-338.
- [60] Mátyus, E.; Kandt, C.; Tieleman, D. P.; Computer simulation of antimicrobial peptides., *Current Med Chem.*, **2007**, 14, 2789-2798.
- [61] Zacharias, M. Perspectives of drug design that targets RNA. *Curr Med Chem - Anti-Infect Agen*. **2003**, 2, 161-72.
- [62] Cheng, K.; Zheng, K. Z.; Qian, Y.; Shi, L.; Zhao, J., y Zhu, H. L., Synthesis, antibacterial activities and molecular docking studies of peptide and Schiff bases as targeted antibiotics, *Bio Med Chem*, **2009**, 17, 7861-7871.
- [63] Chad N. Hancock, Alba Macias, Eun Kyoung Lee, Su Yeon Yu, Alexander D. MacKerel, Jr., and Paul Shapiro, Identification of Novel Extracellular Signal-Regulated Kinase Docking Domain Inhibitors, *J. Med. Chem*. **2005**, 48, 4586-4595.
- [64] Asghar Davood, Ali reza Nematollahi, Maryam Iman, and Abbas Shafiee., Synthesis and Docking Studies of New 1,4-Dihydropyridines Containing 4-(5)-Chloro-2-ethyl-5-(4)-Imidazolyl Substituent as Novel Calcium Channel Agonist., *Arch Pharm Res*, **2009**, V. 32, 4, 481-487.
- [65] Gerhard H. Scholz, Silke Vieweg, Mathias Uhlig, Michael Thormann, Peter Klossek, Siegfried Goldmann, and Hans-Jo'rg Hofmann., Inhibition of Thyroid Hormone Uptake by Calcium Antagonists of the Dihydropyridine Class., *J. Med. Chem*. **1997**, 40, 1530-1538.
- [66] Ashini Bolia, Z. Nevin Gerek, and S. Banu Ozkan., BP-Dock: A Flexible Docking Scheme for Exploring Protein–Ligand Interactions Based on Unbound Structures. *J. Chem. Inf. Model.*, **2014**, 54, 3, 913–92.

- [67] Vaiana, A. C.; Westhof, E., y Auffinger, P., A molecular dynamics simulation study of an aminoglycoside/A-site RNA complex: conformational and hydration patterns, *Biochimie*, **2006**, 88, 1061-1073.
- [68] Carsten Detering and Gabriele Varani, Validation of Automated Docking Programs for Docking and Database Screening against RNA Drug Targets, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4188-4201.
- [69] Terry P. Lybrand, Ligand-protein Docking and Rational Drug Design, Current Option in Structural Biology, **1995**, 5, 224-226.
- [70] R. D. Taylor, P. J. Jewsbury and J. W. Essex, A review of protein-small molecule docking methods, *J Com A Mol Design*, 2002, 16, 151–166.
- [71] Sitaram, N.; Subbalakshmi, C., y Nagaraj, R., Indolicidin, a 13-residue basic antimicrobial peptide rich in tryptophan and proline, interacts with Ca²⁺-calmodulin, *Biochem Bio Res Com*, **2003**, 309, 879-884.
- [72] Kwon, H. J., y Lee, G. Y., A DFT Study on Magnesium Ion Affinity of Glycine, *J Kore Chem Soc*, **2008**, 52, 207-211.
- [73] Rasul, R.; Cole, N.; Balasubramanian, D.; Chen, R.; Kumar, N., y Willcox, P., Interaction of the antimicrobial peptide melimine with bacterial membranes, *Inter J Antim Agents*, **2010**, 35, 566-572.
- [74] Martin-Garcia JM, Ruiz-Sanz J, Luque I. Interfacial water molecules in SH3 interactions: a revised paradigm for polyproline recognition. *Biochem J* **2012**, 442:443–451
- [75] Gresh N, De Courcy B, Piquemal JP, Foret J, Courtiol-Legourd S, Salmon L. Polarizable water networks in ligand-metalloprotein recognition. Impact on the relative complexation energies of Zn-dependent phosphomannose isomerase with D-mannose 6-phosphate surrogates. *J Phys Chem B*. **2011**. 115, 8304–8316.
- [76] Samsonov SA, Teyra J, Pisabarro MT (2011) Docking glycosaminoglycans to proteins: analysis of solvent inclusion. *J Comput Aided Mol Des* 25:477–489.
- [77] Wong, C.; Hendrix, M.; Priestley, E. S., y Greenberg, W. A., Specificity of aminoglycoside antibiotics for the A-site of the decoding region of ribosomal RNA, *Chem Bio*, **1998**, 5, 397-406
- [78] Pei C. Hang, P. C., y Honek, J. F., Electronic structure calculations on the thiazole-containing antibiotic thiostrepton: molecular mechanics, semi-empirical and ab initio analyses, *Bio Med Chem Letts*, **2004**, 15, 1471-1474.
- [79] Tanaka, R.; Oyama, Y.; Imajo, S.; Matsuki, S., y Ishiguro, M., Structure-activity relationships of penem antibiotics: Crystallographic structures and implications for their antimicrobial activities, *Bio Med Chem*, **1997**, 5, 1389-1399.

- [80] WHO report Febrero 2015, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> Nota descriptiva N°297.
- [81] Hendrick Loei, Hwee Tong Tan, Teck Kwang Lim, Kiat Hon Lim, Jimmy Bok-Yan So Khay Guan Yeoh, and Maxey C. M. Chung., Mining the Gastric Cancer Secretome: Identification of GRN as a Potential Diagnostic Marker for Early Gastric Cancer, *J. Proteome Res.* **2012**, 11, 1759–1772
- [82] Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Ehemann C, Zauber AG, Anderson RN, Jemal A, Schymura MJ, Lansdorp-Vogelaar I, Seeff LC, van Ballegooijen M, Goede SL, Ries LAG. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer.* **2010**. 116, 544–573.
- [83] Becke, A.D.; *Phys. Rev. A.*, **1988**, 38, 3098.
- [84] Park, E.J.; brasuel, M.; Behrend, C.; Philbert, M. A.; Kopelman, R *Anal. Chem.* **2003**, 75, 3784-3791.
- [85] Skipper, N. T.; Soper, A. K.; Smaller, M.V. *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 942-945.
- [86] Han D, Namslauer A, Pawate A, Morgan JE, Nagy S, Vakkasoglu AS, Brzezinski P, Gennis RB (2006) Replacing asn207 by aspartate at the neck of the D channel in the aa 3 type cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* results in decoupling the proton pump. *Biochemistry* 45:14064–14074.
- [87] Yi Gao , Satya Bulusu , and Xiao Cheng Zeng Gold-Caged Metal Clusters with Large HOMO–LUMO Gap and High Electron Affinity *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127 (45), 15680–15681
- [88] Volka, J.; Gorelikb, S.; Granita, R.; Kohenb, R.; y Kanner, J., The dual function of nitrite under stomach conditions is modulated by reducing compounds, *Free Rad Bio Med*, **2009**, 47, 496-502.
- [89] Katzka, D.A.; Gideona, R. M; y Castell, D. O., Normal patterns of acid exposure at the gastric cardia: a functional midpoint between the esophagus and stomach, *The Am J Gastro*, **1998**, 93, 1236-1242.
- [90] Pan, T.; Long, D. M.; Uhlenbeck, C, *The RNA World*, **1993**, 271-302.
- [91] Bryan L. E. *Antim. Drug Resis* **1984**, 7, 191-240.
- [92] Tritton, T. R *Biochem* **1977**, 16, 4133- 4138.
- [93] Tillman, J.A.; Seybold, S.J.; Jurenka, R.A. y Blomquist, G.A., Insect pheromones an overview of biosynthesis and endocrine regulation, *Ins Biochem Mol Bio*, **1999**, 29, 481-514.

- [94] Agewall S., Fagerberg B., Berglund G., Schmidt C., Wendelhag I., Wikstrand J.; *The Risk Factor Intervention Study Group, Sweden. Multiple risk intervention trial in high risk y pertensive men: comparison of ultrasound intima-media thickness and clinical outcome during 6 years of follow-up.* *J Intern Med*, **2001** Apr; 249, (4), 305-14.
- [95] A global brief on Hypertension, Silent killer, global public health crisis, are available on the WHO., web site (www.who.int) or can, World Health Organization. **2013**, 40p.
- [96] MDS (2007) Revela encuesta el impacto económico de la hipertensión arterial en México disponible en: http://www.msd.com.mx/msdmexico/corporate/press/mx_hipertension/mx_tenoticia2.html (accesado en Febrero de **2011**).
- [97] Prabha M., Prabha V.; Antimicrobial Activity of Some derivatives of 1,4-Dihydropyridines., *J Chem*, **2013**, 1-4.
- [98] Peixun Liu and Wei Long.; Current Mathematical Methods Used in QSAR/QSPR Studies *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, 10, 1978-1998..
- [99] Böhm, H.-J.; Schneider G., Eds. Protein-Ligand Interactions From Molecular Recognition to Drug Design In *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, Mannhold, R.; Kubinyi, H.; Folkers, H., Eds.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2003**.
- [100] Felker M. et.al.; Diuretic Strategies in Patients with acute Decompensated Heart Failure. *The new England Journal of Med*, March **2011**; 364,(9),797-805.
- [101] William C. Cushman, Barry J. Materson, David W. Williams, Domenic J. Reda and for the Veterans Affairs Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents.; Pulse Pressure Changes With Six Classes of Antihypertensive Agents in a Randomized, Controlled Trial. *Hypertension*. **2001**, 38, 953-957.
- [102] Pérez Fernández G.A., García Jacomino H., Reyes Hernández L. M., Llanes Camacho M. C.; New considerations about classical aspects of the use of beta-blockers in arterial hypertension. *Mapfre Medicina*, **2004**, 15, (2), 141-147.
- [103] Thomas D. Giles, MD.; Rationale for Combination Therapy as Initial Treatment for Hypertension. *J Clin Hypert.* **2003**, 3, 4-11.
- [104] Melbourne Diabetic Nephropathy Study Group. Comparison between perindopril and nifedipine in hypertensive and normotensive diabetic patients with microalbuminuria. *Br Med J* **1991**; 302: 210-216.
- [105] Y Li., Y Saito., K Kuwahara., X Rong., I Kishimoto., M Harada., M Horiuchi., M Murray and K Nakao.; Vasodilator therapy with hydralazine induces angiotensin AT2 receptor-mediated cardiomyocyte growth in mice lacking guanylyl cyclase-A. *Brit J Pharma.*, **2010**, 159, 1133-1142

- [106] William J., Venkata C., Ram S.; Calcium Channel Blockers, Inc. *J Clin Hyper*, Sep **2011**; 13 (9), 687-689.
- [107] Carosati, E., Cruciani, G., Chiarini, A., Brudiesi, R., Ioan, P., Spisani, R., Spinelli, D., Cosimelli, B., Fusi, F., Frosini, M., Matucci, R., Gasparrini, F., Ciogli, A., Stephens, P.J. y Devlin, F.J.; Calcium Channel Antagonists Discovered by a Multidisciplinary Approach. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, (17), 5206-5216.
- [108] R, Rahimtoola, SH, Fasoli G et al. Nifedipine in asymptomatic patients with severe aortic regurgitation and normal left ventricular function. *The New England J Med.*, **1994**, 331, (11), 689-694.
- [109] Marie-Jeanne Deniard, Joelle Meignen, and Francis V. DeFeudis.; Reversal of Reserpine-Induced Ptosis in the Mouse by α -Adrenoceptor-Agonists, *Psychopharmacology*, **1983**, 80, 243-248.
- [110] W. Rascher, J.F.E. Mann, A. Sch6mig, R. Dietz, and J.B. Lith.; Effects of β -Adrenergic Blocking Agents on Peripheral Vascular Resistance., *Klin. Wochenschr.* **1978**, 56, (1), 87-90.
- [111] Coburn, R. A.; Wierzba, M.; Suto, M. J.; Solo, A. J.; Triggle, A. M.; Triggle, D. J.; 1,4 Dihydropyridine antagonist activities at the calcium channel: a quantitative structure activity relationship approach. *J Med Chem* **1988**, 31, 2103-2107.
- [112] Farzin, H.; Saadat, V.; Mehrnaz, J. Quantitative Structure-Activity Relationship Studies of 4-Imidazolyl- 1,4-dihydropyridines as Calcium Channel Blockers. *Iran. J. Basic. Med. Sci*, **2013**, 16(8), 910-916.
- [113] Hemmateenejad B, Miri R, Safarpour MA, Khoshneviszadeh M, Edraki N.; Conformational analysis of some new derivatives of 4-nitroimidazolyl-1,4-dihydropyridine-based calcium channel blockers. *J Mol Struct (Theochem)* **2005**, 717, 139-152.
- [114] Alexander Golbraikh and Alexander Tropsha.; QSAR Modeling Using Chirality Descriptors Derived from Molecular Topology., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, 43, 144-154.
- [115] Dragos Horvath* and Catherine Jeandenans.; Neighborhood Behavior of in Silico Structural Spaces with Respect to in Vitro Activity Spaces-A Novel Understanding of the Molecular Similarity Principle in the Context of Multiple Receptor Binding Profiles., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, 43, 680-690.
- [116] Alexander Hillebrecht and Gerhard Klebe.; Use of 3D QSAR Models for Database Screening: A Feasibility Study., *J. Chem. Inf. Model.*, **2008**, 48, 384-396.
- [117] M. A. Safarpoura, B. Hemmateenejad*, R. Mirib and M. Jamali.; *Quantum Chemical-QSAR Study of Some Newly Synthesized 1,4-Dihydropyridine Calcium Channel Blockers*, *QSAR Comb. Sci.*, **2003**, 22, 997-1005.

[118] Patrick Bultinck, Hans de Winter Wilfried Langenaeker and Jan P. Tollenaere.; Computational Medical Chemistry for Drug Discovery. Marcel Dekker, Inc , New York basel . **2004**.

[119] Yuji T.; Maria A. C.; Anderson C. G.; Comparison between Neural Networks (NN) and Principal Component Analysis (PCA): Structure Activity Relationships of 1,4-Dihydropyridine Calcium Channel Antagonists (Nifedipine Analogues). *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, 43, 540-544.

[120] Siegfried G.; Jürgen S. 1,4-Dihydropyridines: Effects of Chirality and Conformation on the Calcium Antagonist and Calcium Agonist Activities. *Angew. Chem. Inr. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1559-1578.

[121] Lina, D.; Moy, Cheong L.; Hla, W.; Michael, W.; Christopher, R. T.; Edward, E. K. Synthesis and Calcium Channel Antagonist Activity of Dialkyl 4- (Dihydropyridinyl) -1,4-dihydro-2,6-dimethyl-3,5-pyridinedicarboxylates. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 640-646.

[122] Iqbal, N.; Akula, M. R.; Vo, D.; Matowe, W. C.; McEwen, C. A.; Wolowyk, M. W.; Knaus, E. E. Synthesis, rotamer orientation, and calcium channel modulation activities of alkyl and 2-phenethyl-1,4-dihydro-2,6-dimethyl-3-nitro-4-(3-or-6-substituted-2-pyridyl)-5-pyridinecarboxylates. *J Med Chem.* **1998**, 41, 1827-1837.

[123] Vo, D.; Matowe, W. C.; Ramesh, M.; Iqbal, N.; Wolowyk, M.W.; Howlett, S. E, Haus, E. E. Syntheses, calcium channel agonistantagonist modulation activities, and voltage-clamp studies of isopropyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-3-nitro-4-pyridinylpyridine-5- carboxylate racemates and enantiomers. *J Med Chem*, **1995**, 38, 2851-2859.

[124] Rudong, S.; Susan, E.; Edward E.; Syntheses, Calcium Channel Agonist-Antagonist Modulation Activities, Nitric Oxide Release, and Voltage-Clamp Studies of 2-Nitrooxyethyl 1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-3-nitro-4-(2-trifluoromethylphenyl)pyridine-5-carboxylate Enantiomers., *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 955-961.

[125] Gaudio, M.; Korolkovas, A.; Takahata, Y. Conformational analysis of the 1,4_dihydropyridines linking the structural aspects to the biological binding event: a study of the receptor-site conformation. *J Mol Struc (Theochem)*, **1994**, 303, 255-263.

[126] The CSD codes of the forty molecules are BELGUU01, ASATOD, AYUQOB, BELGUU, BELHAB, BELHAB01, BELHEF, BELHIJ, BELHUV, BICCIZ01, BICCIZ02, BICCIZ03, DEVFIT, DUWBIG, GAPCAB, GAPCEF, GAPCIJ, GAPCOP, GENREX, GEPKAO, GIRXAH, GUYXED, HESGOC, HUDHEU, KIDDEH, KIDDIL, KIDDOR, KIDDUX, KIDFAF, KIDFEJ, KUVHAL, MEWREL, MEWRIP, MEWROV, NIRTAJ, NIRTAJ01, PEMLID, PIHTEH, PIHTOR, PIHTUX, PUJPUG, QUPRUP, SUZGEA, TUPGUH, TUPGUH01, XUVWER, XUVWIV.

[127] Gautam, R. D.; Thomas, S.; The weak Hydrogen Bond: in Structural Chemistry and Biology IUCr Monographs on Crystallography, **2001**, Oxford University Press.

- [128] Bader, R. F. W. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 893–928.
- [129] Bader, R. F. W. *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*. International Series of Monographs on Chemistry 22; *Oxford Science Publications: Oxford*, **1990**
- [130] Matta, C. F.; Boyd, R. J. In *The Quantum Theory of Atoms in Molecules*; Matta, C. F., Boyd, R. J., Eds.; Wiley-VCH: New York, 2007; pp 1-34.
- [131] Erin R.; Keinan, Shahr.; Paula, M. S.; Julia, C. G.; Aron, J. C.; Waitao Y. Revealing non-covalent interactions Johns, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18, 6498-6506.
- [132] Jose, L. G.; Jorge, M.; Trickey, S. B.; Rodrigo. A.; Alberto, V. Analysis of the generalized gradient approximation for the exchange energy, Book chapter in "Concepts and Methods in Modern Theoretical Chemistry, Volume: Electronic Structure and Reactivity. Series: Atoms, Molecules and Clusters." In honor of Professor B.M. Deb; S.K. Ghosh and P.K. Chattaraj eds. Taylor & Francis / CRC Press, **2013**.
- [133] Jorge, M.; José, L. G.; Rodrigo. A.; Alberto, V. The reduced density gradient in atoms. *Int. J. Quant. Chem.* **2012**, *112*, 3594
- [134] Keinan, S.; Ratner, M. A.; Marks, T. J. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *392*, 291–296.
- [135] G.R. Desiraju, *Crystal Engineering. The Design of Organic Solids*, Elsevier, Amsterdam, 1989.
- [136] Gabriele S.; Carlo G.; Leonardo Lo P. Non-covalent interaction via the reduced density gradient: Independent atom model vs experimental multipolar electron densities. *Comp. Theo. Chem.* **2012**, *998*, 148-163.
- [137] Parr, R. G.; Donnelly, R. A.; Levy, M.; Palke, W. E. *J. Chem. Phys.* **1978**, *68*, 3801.
- [138] Parr, R. G.; Pearson, R. G. Absolute Hardness: Companion Parameter to absolute Electronegativity. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7512.
- [139] Parr, R. G.; Szentpaly, L.V.; Liu, S. Electrophilicity Index. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1922-1924.
- [140] Pearson, R.G. Absolute electronegativity and Hardness: Application to Inorganic Chemistry, *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 734-740.
- [141] Pearson, R. G.; Maksic, Z. B. *Theoretical Models of Chemical Bonding Part II*, Springer, Berlin, **1990**, p. 45.
- [142] Chattaraj, P.K.; Parr, R.G.; Sen, K. D.; Mingos D. M. P. *Chemical Hardness, Structure and Bonding*, vol. 80, Springer, Berlin, **1993**, p. 11.
- [143] Parr, R. G.; Chattaraj, P. K. Principle of Maximum Hardness, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1854.

- [144] Zhou, Z.; Parr R. G. New Measures of Aromaticity: Absolute Hardness and Relative Hardness, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 7371-7379.
- [145] Zhou, Z.; Parr, R. G. Activation Hardness: New Index for Describing the Orientation of Electrophilic Aromatic Substitution. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5720-5724.
- [146] Thanikaivelan, P.; Subramanian, V.; Rao, J. R.; Nair, B. U. Application of quantum chemical descriptor in quantitative structure activity and structure property relationship. *Chem Phys Lett.* **2000**, 323, 59-70.
- [147] Pauling, I. The Nature of the Chemical Bond, Application of results obtained from the quantum mechanics and from a theory of paramagnetic susceptibility to the structure of molecules, 3rd edn. Cornell University Press, Ithaca, NY, **1960**, April 1931., 1367-1400
- [148] José, L. G; Andrés, C; Alberto, V. Electrodonating and Electroaccepting Powers. *J. Phys. Chem. A.* **2007**, 111, 1966-1970.
- [149] Siegfried, G.; Jürgen, S. 1,4-Dihydropyridines: Effects of Chirality and Conformation on the Calcium Antagonist and Calcium Agonist Activities, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991** 30, 1559-1578.
- [150] Mei, J. W.; Xiao, B. Z.; Dan, Wu.; Ying, Q. L.; Yan, Z.; Xiang, Nan.; Huanxiang, L.; Hai, T. Y.; Li, T.; Design, Synthesis, Crystal Structure, Insecticidal Activity, Molecular Docking, and QSAR Studies of Novel N3-Substituted Imidacloprid Derivatives, *J Agr Food Chem*, **2014**, 62, 5429–5442.
- [151] Bernard, L.; Marjorie, M.; Goodman, K. M.; Snader, R. T.; Edward, M.; Hantzsch T. Dihydropyridine Hypotensive Agents, *J Med Chem*, **1974**, 27, 9, 957-965.
- [152] Massoud, M.; Richards, W. G. QSAR of binding of dihydropyridine type calcium antagonists to their receptor on ileal smooth muscle preparations, *J. Pharm. Pharm*, **1986**, 38, 272-276.
- [153] Consonni, V.; Ballabio, D.; Todeschini, R. Evaluation of model predictive ability by external validation techniques. *J. Chemometrics*, **2010**, 24, 194–201.
- [154] Todeschini, R.; Consonni, V.; Mauri, A.; Pavan, M. Detectin “bad” regression models: multicriteria fitness functions in regression analysis. *Anal Chim Acta.* **2004**, 515, 199-208.
- [155] Consonni, V.; Ballabio, D.; Todeschini R. Comments on the Definition of the Q^2 Parameter for QSAR Validation. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, 49, 1669–1678.
- [156] Golbraikh, A.; Tropsha, A. Beware of Q^2 , *J. Mol. Graph Model.* **2002**, 20, 269-276.

- [157] Tropsha, A.; Gramatica, P.; Gombar, V. K.; The importance of being earnest: Validation is the absolute essential for successful application and interpretation of QSPR models. *QSAR. Comb. Sci.* **2003**, 22, 69-77.
- [158] Coburn, R. A.; Wierzba, M.; Suto, M. J.; Solo, A. J.; Triggle, A. M.; Triggle, D. J.; 1,4 Dihydropyridine antagonist activities at the calcium channel: a quantitative structure activity relationship approach. *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 2103-2107.
- [159] Hagiwara, S.; Ozawa, S.; Sand. O.; Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish, *J Gen. Physiol.*, **1975**, 65, 17.
- [160] Godfrain, T., Actions of nifedipine on calcium fluxes and contraction in isolated rat arteries. *Pharmacol. Exp. Ther* **1983**. 224, 443.
- [161] Llinas, R.; Yarom, Y. Specific blockade of the low threshold calcium channel by high molecular weight alcohols. *Soc Neurosci. Abstr*, **1986**, 12, 174.
- [162] Karp, Gerald., Biología celular y molecular, Mc Graw- Hill, interamericana, **2000**
- [163] Elmslie, K. S.; Calcium channel blockers in the treatment of disease, *Neurisci Res.*, **2004**, 78, 733.
- [164] Catterall, W. A.; Structure and regulation of voltage gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, **2000**, 16, 521.
- [165] Atwell, K. S.; Rovnyak, G. C.; Schwartz, J.; Moreland, S.; Hedberg, A.; Gougotas, J. Z.; Malley, M. F.; Floyd, D. M., Dihydropyrimidine calcium channel blockers: 2-heterosubstituted 4-aryl- 1,5-dihydro-6methyl-5pyrimidinecarboxylic acid esters as potent mimics of dihydropyridines. *J. Med. Chem.*, **1990**, 33, 2629.
- [166] Catterall, W. A. Functional Subunit Structure of Voltage-Calcium channels. *Science*, **1991**, 253, 1499.
- [167] Peterson, B. Z.; Tanada, T. N.; Catterall, W. A. Molecular determinants of high affinity dihydropyridine binding in L-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 5293.
- [168] Blaise Z. Peterson, Timothy N. Tanada and William A. Catterall, Molecular Determinants of High Affinity Dihydropyridine Binding in L-type Calcium Channels, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271:5293-5296
- [169] Denis, B. T.; and Boris, S. Z., Structural Model for Dihydropyridine Binding to L-type Calcium Channels. *J. Bio Chem.* **2009**. 284 (28) 19006-19017.
- [170] SPARTAN '08, Wavefunction, Inc. Japan Branch Officer, **2006-2008**.
- [171] Frisch MJ et al (**2011**) GAUSSIAN 09, revision B.01. Gaussian Inc., Wallingford.

- [172] K. Raghavachari, J. S. Binkley, R. Seeger, and J. A. Pople, Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 20. Basis set for correlated wave-functions, *J. Chem. Phys.*, **1980**, 72 650-54.
- [173] Lee C, Yang W, Parr RG, Development of the Colle–Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phy Rev B*, **1988**, 37, 785–789.
- [174] Miehlich B, Savin A, Stoll H, Preuss H, Results obtained with the correlation-energy density functionals of Becke and Lee, Yang and Parr. *Chem Phys Lett*, **1989**, 157:200–206.
- [175] Becke AD, Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys Rev A*, **1988**, 38, 3098–3100.
- [176] Courcy B, Pedersen LG, Parisel O, Gresh N, Silvi B, Pilmé J, Piquemal JP, Understanding selectivity of hard and soft metal cations within biological systems using the subvalence concept. 1. Application to blood coagulation: direct cation–protein electronic effects versus indirect interactions through water networks. *J Chem Theory Comput*, **2010**, 6, 1048.
- [177] Tomasi J, Mennucci B, Cammi R, Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem Rev*, **2005**, 105, 2999–3093.
- [178] Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem*, **1998**, 19, 1639–1662.
- [179] Humphrey W, Dalke A, Schulten K, VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graphics*, **1996**, 14, 33–38.
- [180] Coburn, R. A.; Wierzba, M.; Suto, M. J.; Solo, A. J.; Triggle, A. M.; Triggle, D. J.; 1,4 Dihydropyridine antagonist activities at the calcium channel: a quantitative structure activity relationship approach. *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 2103-2107.
- [181] J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, Phys. Rev. Lett. 77, 3865 **1996**; *ibid.* 78, 1396.
- [182] Calaminici, P.; Janetzko, F.; Köster, A. M.; Mejia, R.; B. Zúñiga, G. Density Functional Theory optimized basis sets for gradient corrected functionals: 3d transition metal systems. *J. Chem. Phys.* **2007**. 126, 044108.
- [183] A.M. Köster, G. Geudtner, P. Calaminici, M.E. Casida, R. Flores-Moreno, G.U. Gamboa, A. Goursot, F. Janetzko, J.U. Reveles, A. Vela, B. Zuniga-Gutierrez, S.B. Trickey and D.R. Salahub. deMon2k Users' Guide, Version 3.0, Cinvestav, Mexico-City, **2011**.
- [184] Parr, R. G.; Donnelly, R. A.; Levy, M.; Palke, W. E. *J. Chem. Phys.* **1978**. 68, 3801.

- [185] Parr, R. G.; Pearson, R. G. Absolute Hardness: Companion Parameter to absolute Electronegativity. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 7512.
- [186] Parr, R. G.; Szentpaly, L.V.; Liu, S. Electrophilicity Index. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1922-1924.
- [187] Pearson, R.G. Absolute electronegativity and Hardness: Application to Inorganic Chemistry, *Inorg. Chem.* **1988**, 27, 734-740.
- [188] Pearson, R. G.; Maksic, Z. B. Theoretical Models of Chemical Bonding Part II, Springer, Berlin, **1990**, p. 45.
- [189] Chattaraj, P.K.; Parr, R.G.; Sen, K. D.; Mingos D. M. P. Chemical Hardness, Structure and Bonding, vol. 80, Springer, Berlin, **1993**, p. 11.
- [190] Parr, R. G.; Chattaraj, P. K. Principle of Maximum Hardness, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1854.
- [191] Zhou, Z.; Parr R. G. New Measures of Aromaticity: Absolute Hardness and Relative Hardness, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 7371-7379.
- [192] Zhou, Z.; Parr, R. G. Activation Hardness: New Index for Describing the Orientation of Electrophilic Aromatic Substitution. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5720-5724.
- [193] Thanikaivelan, P.; Subramanian, V.; Rao, J. R.; Nair, B. U. Application of quantum chemical descriptor in quantitative structure activity and structure property relationship. *Chem Phys Lett.* **2000**, 323, 59-70.
- [194] Pauling, I. The Nature of the Chemical Bond, Application of results obtained from the quantum mechanics and from a theory of paramagnetic susceptibility to the structure of molecules, 3rd edn. Cornell University Press, Ithaca, NY, **1960**, April 1931., 1367-1400
- [195] José, L. G; Andrés, C; Alberto, V. Electrodonating and Electroaccepting Powers. *J. Phys. Chem. A.* **2007**, 111, 1966-1970.
- [196] Dragon 06'. R.Todeschini and V.Consonni, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, in the Series 'Methods and Principles in Medicinal Chemistry' edited by R. Mannhojd, H. Kubinyi, and H. Timmerman. Copyright © **2010**, Talete srl, Milano, Italy.
- [197] Ghose, A. K.; Crippen, G. M. Atomic Physicochemical Parameters for Three-Dimensional Structure-Directed Quantitative Structure-Activity Relationships I. Partition Coefficients as a Measure of Hydrophobicity, *J. Comput. Chem.* **1986**, 7, 565-577
- [198] Viswanadhan, V. N.; Ghose, A. K.; Revankar, G. R.; Robins, R. K. Atomic Physicochemical Parameters for Three Dimensional Structure Directed Quantitative Structure-Activity Relationships. 4. Additional Parameters for Hydrophobic and Dispersive Interactions and Their Application for an Automated Superposition of

Certain Naturally Occurring Nucleoside Antibiotics. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1989**, 29, 163-172.

[199] Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. Prediction of hydrophobic (lipophilic) properties of small organic molecules using fragmental methods: an analysis of ALOGP and CLOGP methods. *J. Phys. Chem.* **1998**, 102, 3762-3772.

[200] Ghose, A. K.; Crippen, G. M. Atomic physicochemical parameters for three-dimensional structure-directed quantitative structure-activity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions. *J. Comput. Sci.* **1987**, 27, 21-35.

[201] Todeschini, R.; Vighi, M.; Finizio, A.; Gramatica, P. 3D-modelling and prediction by WHIM descriptors. Part 8. Toxicity and physico-chemical properties of environmental priority chemicals by 2D-TI and 3D-WHIM descriptors. *SAR. QSAR. Environ. Res.* **1997**, 7, 173-193.

[202] Robinson, D. D.; Barlow, T. W.; Richards, W.G. Reduced dimensional representations of molecular structure. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1997**, 37, 939-942.

[203] Erin R.; Keinan, Shahr.; Paula, M. S.; Julia, C. G.; Aron, J. C.; Waitao Y. Revealing non-covalent interactions Johns, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 18, 6498-6506.

[204] Hansch, C.; Maloney, P. P.; Fujita, T.; Muir, R. M. Correlation of biological activity of phenoxyacetic acids with Hammett substituent constants and partition coefficients. *Nature.* **1962**, 194, 178-180.

[205] Mobydigs, R. Todeschini, D, Ballabio, V. Consionni, A. Mauri and M. Pavan Milano Chemometrics and QSAR Research Group. Copyright, **2004**, Talete srl, Milano, Italy.

[206] Doyle, D. A.; Morais, C. J.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M; Cohen, S. L.; Chain, B.T.; Mackinnin, R., The structure if the potassium channel; molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, **1998**, 250, 69-77.

[207] VMD (Visual Molecular Dinamics) <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd>

[208] NAMD (Scalable Molecular Dinamics) <http://Ks.uiuc.edu/Research/namd/>

[209] Gregory M. L. and Harry A. F. Molecular Modeling of Interactions of Dihydropyridines and Phenylalkylamines with the Inner Pore of the L-Type Ca²⁺ Channel, *Mol Pharmacol*, **2003**, 63, 499-511.

[210] Grefory M., L and Harry A. F. KcsA Crystal Structure as Framework for a Molecular Model of the Na⁺ Channel Pore, *Biochemistry* **2000**, 39, 8161-8170.