



Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación  
Facultad de Ciencias Básicas - Departamento de Química

Estudio de la reactividad química con métodos  
computacionales en sitio activo de la enzima Dlac con  
actividad biorremediadora

TESINA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN EDUCACIÓN EN  
QUÍMICA Y AL TÍTULO DE PROFESOR DE QUÍMICA CON MENCIÓN EN  
CIENCIAS NATURALES

AUTOR: SERGIO JIMÉNEZ MEZA

TUTOR: GERMÁN BARRIGA GONZÁLEZ

COTUTORA: NADIA GAVILÁN DE FÁTIMA

SANTIAGO DE CHILE 2024



Autorizado para Sibumce Digital -



**2024, Sergio Benjamín Jiménez Meza**

Se autoriza la reproducción total o parcial de este material, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, siempre que se haga la referencia bibliográfica que acredite el presente trabajo y a su autor.

***Dedico este trabajo a:***

*Mi madre, a mi tío Marcelo, y a mi padre, personas quienes siempre me han apoyado y han dado su mano para cumplir mis sueños, sin ellos no pensaría en un futuro.*

## Agradecimientos

El proceso de formación profesional hasta el momento es la etapa más importante de mi vida, en donde muchas personas entraron en mi vida como otras salieron. De aquí aprendí que crecer es un largo camino lleno de altos y bajos, repleto de felicidades, sonrisas, decepciones, penurias y llantos, y cada hecho que pasa por mi vida llena mi corazón de esperanzas y fortalezas.

Primero agradezco a las personas que siempre han estado a mi lado, son aquellas que me vieron crecer, que soportaron mis idioteces de niñez, rabietas de adolescencia y errores de juventud. Agradezco a mi madre, mi hermana, mi padre y mi tío Marcelo, personas quienes vieron como crecía, erraba, sufría, reía, disfrutaba o hacía estupideces. Fueron mis consejeros y consuelo, por ello les agradezco el apoyo en cumplir mi sueño de ser docente, aprendí a su lado que todo lo que pueda llegar a ser es porque sus manos han estado en mis hombros siempre, guiándome hacia un futuro donde pueda sonreír.

Parte importante para mí también lo son las amistades, donde conocí personajes que compartieron conmigo carcajadas, estrés, burradas y borracheras. Quisiera destacar al Harry y José, personajes que compartieron conmigo un tiempo irremplazable, llenando mi vida universitaria de alegría, apoyo y dedicación, siendo personas que hasta hoy en día comparten un cigarro hablando de lo que odiamos del mundo o dedicando tiempo a traspasarme sus conocimientos, gracias amigos por apoyar a un bruto cabeza de maní.

Conocer el amor y el desamor fue parte de este proceso, donde conocí personas que tocaron una fibra en mi corazón que no deseo olvidar nunca en mi vida, enseñándome que no solo existe la dedicación para fines académicos, si no que entre personas también lo debe haber. Pao, me enseñaste que por muy decepcionante que sea el mundo podemos con el, enseñándome como ser ligeramente independiente, dedicando tu tiempo y cariño en darle un empujón a la desarmada vida que llevaba en ese momento, gracias por estar a mi lado y mostrarme que no solo se tiene que hacer crecer el cerebro, sino que también el corazón.

Finalmente, a mis tutores el profesor Germán Barriga y la profesora Nadia Gavilán, docentes que si no hubieran dado su tiempo, paciencia, dedicación, pero por sobre todo paciencia, no conocería las maravillas que podemos aprender de química. Agradezco todos y cada uno de sus retos, correcciones, reuniones y consejos ya que sin ustedes no tendría esta tesina en mis manos, tampoco podría dedicarme a la profesión que mi madre me inspiró a seguir, agradezco todas las enseñanzas que me han dado y el tiempo dedicado. Gracias por ser quienes me guiaron en el cierre de mi carrera, por llevarme de viaje, por mostrarme mis

errores y por apoyar el inicio de lo que espero sea parte de un largo sueño para el cual algún día pueda decir que he cumplido. Deseo crecer y aprender más allá de lo que hoy he aprendido, llevando sus conocimientos a nuevas personas y recordándoles a ustedes como los docentes que me apoyaron y enseñaron a seguir mis sueños.

Todas y cada una de las personas que he conocido en esta etapa sé que tendrán su espacio en mi corazón estando en mis recuerdos para siempre.

Esta investigación/tesis fue apoyada por el sistema de cómputo de alto rendimiento del PIDi-UTEM (SCC PIDi-UTEM CONICYT - FONDEQUIP - EQM180180).

## Glosario

cDFT: Teoría conceptual de los funcionales de la densidad.

Dlac: Enzima proveniente del hongo *Cerrena* sp.

Dlac-OTC: Complejo Enzima-sustrato compuesto por enzima Dlac y antibiótico Oxitetraciclina (Sustrato).

DM: Docking Molecular.

E2PERT: Perturbaciones de segundo orden para la matriz de Fock.

OTC: Oxitetraciclina.

QC: Química Computacional.

TCs: Familia de antibióticos de Tetraciclinas.

$\mu$ : Potencial electrónico químico.

$\eta$ : Dureza.

S: Blandura.

$\omega$ : Electrofilicidad.

## Resumen

Desde 2004, Chile se consagra como potencia en la exportación de alimentos provenientes de la acuicultura, destacándose en la producción salmonera. Por la masiva demanda de alimentos, la industria adoptó altos estándares de cuidados en el proceso de producción, donde el control y mitigación de enfermedades bacterianas toma importancia llevando a la industria a abordar el uso de antibióticos en los cultivos, empleando el antibiótico oxitetraciclina en agua dulce. Si bien es eficaz, este genera repercusiones ambientales debido a la mala relación entre dosificación y metabolización utilizada. Siendo el impacto más grave a nivel ambiental y humano la resistencia bacteriana. Una solución encontrada por la comunidad científica a esta problemática son los métodos de biorremediación mediante enzimas lacasas, las que por sus propiedades oxidoreductoras son capaces de inhibir la oxitetraciclina del ambiente. En esta investigación se realizó un estudio de afinidad con Docking molecular entre la enzima Dlac de *Cerreña sp.* y oxitetraciclina que posteriormente fue llevado a un análisis de reactividad química utilizando la teoría conceptual de los funcionales de la densidad (DFT), permitiendo conocer las regiones reactivas para oxitetraciclina y el complejo Dlac-OTC. En paralelo, se analizó con NBO la presencia de interacciones intermoleculares que son formadas en el complejo Dlac-OTC, obteniendo las interacciones en el complejo Dlac-OTC y regiones de mayor reactividad.

**Palabras clave:** *DFT, NBO, Docking Molecular, reactividad, Dlac, Antibiótico, Biorremediación.*

## Abstract

Since 2004, Chile has established itself as a power in the export of food from aquaculture, standing out in salmon production. Due to the massive demand for food, the industry adopted high standards of care in the production process, where the control and mitigation of bacterial diseases becomes important, leading the industry to address the use of antibiotics in crops, using the antibiotic oxytetracycline in water sweet. Although it is effective, it generates environmental repercussions due to the poor relationship between dosage and metabolization used. The most serious impact at an environmental and human level is bacterial resistance. A solution found by the scientific community to this problem is bioremediation methods using laccase enzymes, which due to their oxidoreductive properties are capable of inhibiting oxytetracycline from the environment. In this research, an affinity study was carried out with molecular docking between the Dlac enzyme from *Cerrena* sp. and oxytetracycline, which was subsequently carried out to a chemical reactivity analysis using the conceptual theory of density functionals (DFT), allowing us to know the reactive regions for oxytetracycline and the Dlac-OTC complex. In parallel, the presence of intermolecular interactions that are formed in the Dlac-OTC complex was analyzed with NBO, obtaining the interactions in the Dlac-OTC complex and regions of greater reactivity.

**Keywords:** *DFT, NBO, Molecular Docking, reactivity, Dlac, Antibiotic, Bioremediation*

## Contenido

Agradecimientos.....	
Glosario.....	
Resumen.....	
Abstract.....	
Índice de Figuras.....	
Índice de Tablas.....	
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Acuicultura y Salmonicultura en Chile.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Contaminación por antibióticos.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Tetraciclinas (TCs).....</b>	<b>5</b>
<b>1.4. Oxitetraciclina (OTC).....</b>	<b>7</b>
<b>1.5. Métodos de Bioremediación Ambiental .....</b>	<b>7</b>
<b>1.6. Enzima Dlac del hongo <i>Cerrena sp</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>1.7. Química Computacional (QC).....</b>	<b>13</b>
<b>1.8. Docking molecular (DM).....</b>	<b>14</b>
<b>1.9. Teoría Conceptual de Funcionales de la Densidad (cDFT).....</b>	<b>14</b>
<b>1.9.1. Índices de reactividad .....</b>	<b>15</b>
<b>1.9.2. Índices globales.....</b>	<b>15</b>
<b>1.10. Orbitales Naturales de Enlace (NBO).....</b>	<b>17</b>
<b>2. Hipótesis.....</b>	<b>19</b>
<b>3. Objetivo General.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Objetivos Específicos .....</b>	<b>19</b>
<b>4. Metodología .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Búsqueda conformacional y optimización de geometría molecular para oxitetraciclina</b>	<b>20</b>
<b>4.2. Docking molecular .....</b>	<b>20</b>
<b>4.3. Construcción del Sitio Activo Reducido (RS).....</b>	<b>20</b>
<b>4.4. Determinación de Índices de Reactividad.....</b>	<b>20</b>
<b>4.4.1. Detalles Computacionales .....</b>	<b>20</b>
<b>4.4.2. Índices Locales (Funciones de Frontera) .....</b>	<b>21</b>
<b>4.4.3. Descriptor Dual de Reactividad.....</b>	<b>21</b>
<b>4.5. Metodología NBO.....</b>	<b>21</b>

<b>5. Resultados y Discusión</b> .....	22
<b>5.1. Obtención de molécula OTC optimizada</b> .....	22
<b>5.2. Docking Molecular (DM)</b> .....	23
<b>5.3. Construcción de Sitio Activo Reducido</b> .....	29
<b>5.4. Análisis de Reactividad Química</b> .....	29
<b>5.4.1. Índices Globales de Reactividad</b> .....	29
<b>5.4.2. Índices Locales de Reactividad</b> .....	31
<b>5.4.2.1. Reactividad Local condensada en OTC</b> .....	31
<b>5.4.2.2. Reactividad Local condensada en complejo Dlac-OTC</b> .....	33
<b>5.5. Análisis de NBO (Orbitales Naturales de Enlace)</b> .....	35
<b>5.5.1. Análisis NBO en complejo Dlac-OTC</b> .....	39
<b>5.5.2. Donación desde OTC a ALA 163</b> .....	41
<b>5.5.3. Donación Residuos a OTC</b> .....	42
<b>6. Conclusión</b> .....	45
<b>7. Referencias Bibliográficas</b> .....	47

## Índice de Figuras

Figura 1. Imágenes satelitales de las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes.....	2
Figura 2. Principales salmónidos extraídos en Chile.....	2
Figura 3. Usos de antibióticos en agua dulce (SERNAPESCA, 2022). ....	4
Figura 4. Estructura general de la familia de TCs.....	5
Figura 5. Estructura molecular de la oxitetraciclina (OTC). ....	7
Figura 6. Ilustración de potenciales contaminantes y efecto de la biorremediación con uso de enzimas lacasas (Arregui, 2019). ....	8
Figura 7. Ilustración de posiciones para átomos cobre de la enzima lacasa de <i>Bacillus subtilis</i> (PDB ID: 3ZDW), dónde el Cu <sub>1</sub> corresponde a tipo T1, Cu <sub>4</sub> corresponde a tipo T2, y los Cu <sub>2</sub> y Cu <sub>3</sub> al tipo T3, conformando el clúster trinuclear (TNC).....	10
Figura 8. Árbol filogenético de lacasas de diversos orígenes y sus aplicaciones (Arregui, 2019). ....	12
Figura 9. Estructura cristalográfica de Dlac. (A) Estructura de Dlac con sus tres dominios D1, D2 y D3 indicados en coloración gris, amarillo y azul, respectivamente. Los átomos de cobre se muestran como esferas color naranja (T1, T2, T3 y T3'). (B) Estructura del sitio activo de Dlac donde los átomos de Cobre T1, T2, T3 y T3' son coordinados por histidinas, cisteína, la presencia de oxígeno molecular y una molécula de agua (Wu et al., 2018). ....	13
Figura 10. Estructura optimizada de la oxitetraciclina, visualizando los anillos D (aromático), C y pliegue entre anillos B y A. Las coordenadas cartesianas son expuestas desde el centro de la molécula (determinado por el software).....	22
Figura 11. Estructura optimizada de la oxitetraciclina, Torsión entre anillos A y B. Las coordenadas cartesianas son expuestas desde el centro de la molécula (determinado por el software Gaussian 16')..	22
Figura 12. Caja de trabajo en Docking molecular, con centro sobre Cu T1. ....	23
Figura 13. Visualización de pose con menor energía e interacciones intermoleculares en el sitio activo de Dlac (conformación complejo Dlac-OTC). ....	25
Figura 14. Complejo Dlac-OTC con distancias de interacciones intermoleculares (medidas en Ångstrom, Å), posición “A”. dónde las interacciones intermoleculares son destacadas con coloración verde y las interacciones intramoleculares en OTC coloración amarilla. ....	26
Figura 15. Complejo Dlac-OTC con distancias de interacciones intermoleculares (medidas en Armstrong), posición “B”. identificando a las interacciones intermoleculares con coloración verde y las interacciones intramoleculares en OTC coloración amarilla. ....	27
Figura 16. Complejo OTC-Dlac distancias de interacciones intermoleculares (medidas en Armstrong), posición “C”. identificando a las interacciones intermoleculares con coloración verde y las interacciones intramoleculares en OTC coloración amarilla. ....	28
Figura 17. (A) Sitio activo de Dlac sin presencia de OTC. (B) Complejo Dlac-OTC (sitio activo reducido). ....	29
Figura 18. Sentido de transferencia de carga a partir del principio del potencial químico electrónico. Siendo la transferencia desde OTC (estructura en negro) a Dlac (Estructuras de residuos aminoácidos en gris). ....	30
Figura 19. Estructura molecular de OTC con numeración de átomos. ....	32
Figura 20. Descriptor Dual de oxitetraciclina ( $f +=$ lila, $f -=$ verde agua).....	33
Figura 21. Visualización de OTC en Chemcraft, presencia de puentes de hidrogeno intramoleculares (destacados de coloración azul). ....	35

Figura 22. Densidades NBO 45-47, donador de densidad pares electrónicos libres pertenecientes a O25.	36
Figura 23. Densidades NBO 48-50, siendo donores de densidades los pares electrónicos libres de O27	37
Figura 24. Densidades NBO 42, orbitales donores corresponden a LP de O15. ....	38
Figura 25. Complejo OTC-Dlac, visualización de interacciones intermoleculares a partir de método NBO. ....	40
Figura 26. MO NBO 102, Donación desde OTC a ALA163, LP sobre O102 de OTC. ....	42
Figura 27. MO NBO 73, donación de densidad desde LP de O15 perteneciente a Ala163. ....	43
Figura 28. MO NBO 79, donación de densidad desde O31 perteneciente a ASP206. ....	44

## Índice de Tablas

Tabla 1. Cosechas acumuladas a diciembre de 2023 (SUBPESCA, 2023) .....	1
Tabla 2. Producción de biomasa de salmónidos y uso de antibióticos (SERNAPESCA, 2022). .....	3
Tabla 3. Sustitución de cadenas radicales en estructura general de las TCs. ....	6
Tabla 4. Valoración energética de Docking Molecular. ....	23
Tabla 5. Determinación de la energía libre de enlace en Docking molecular.....	24
Tabla 6. Índices de reactividad globales para oxitetraciclina, sistema reducido sin ligando y Complejo Dlac-OTC.....	29
Tabla 7. Funciones de Fukui y descriptor dual para OTC. ....	31
Tabla 8. Funciones de Fukui y Descriptor Dual para Complejo Dlac-OTC. ....	34
Tabla 9. Perturbaciones del segundo orden de la matriz de fock en base NBO, NBO 45 - 47.....	36
Tabla 10. Ocupancia de los orbitales NBO 45 - 47.....	36
Tabla 11. Perturbaciones de segundo orden de la matriz de fock en base NBO, NBO 48 -50.....	38
Tabla 12. Ocupancia de los orbitales NBO 48 - 50.....	38
Tabla 13. Perturbaciones de segundo orden de la matriz de fock en base NBO, NBO 42. ....	39
Tabla 14. Ocupancia de densidades NBO 42.....	39
Tabla 15. Asignación de unidades a residuos aminoácidos presentes en el RS, desde NBO 6.0.....	39
Tabla 16. Perturbaciones de segundo orden de matriz de fock en base NBO, NBO 102 - 103 – 239.....	41
Tabla 17. Ocupancia de densidades NBO 102 - 103 – 239. ....	41
Tabla 18. Perturbaciones de segundo orden de matriz de fock en base NBO y ocupancia del NBO 73..	42
Tabla 19. Ocupancia interacción OTC-Ala163.....	42
Tabla 20. Perturbaciones de segundo orden de matriz de fock en base NBO y ocupancia NBO 79.....	43
Tabla 21. Ocupancia NBO 79 .....	43

# 1. Introducción

## 1.1. Acuicultura y Salmonicultura en Chile

Chile, desde el año 2004, es una nación potencia en la producción y exportación de productos provenientes de la explotación de sus zonas costeras, debido a que el país posee 4300 km de costa lineal y 83000 km de costa efectiva para la extracción de especies marinas que abordan un gran abanico de biodiversidad. Principalmente, la zona centro sur y sur de Chile presentan condiciones ideales para la industrialización y cultivos en masa de especies marinas.

Dentro de los productores pertenecientes a la acuicultura, está la pesquería artesanal e industrial, diferenciándose en el enfoque de su producción. La pesca artesanal destaca por estar enfocada a la venta en pequeña escala y dirigida a consumidores de las zonas aledañas. Mientras que las plantas industriales están enfocadas en la producción masiva y exportación de productos, generando un mayor margen de gastos en recursos naturales y ganancias económicas (Consejo del salmón, 2023). El departamento de análisis sectorial de la subsecretaría de pesca y acuicultura de Chile expusieron que las áreas de mayor cosecha acuícola fueron en la región de los Lagos, Aysén y Magallanes (Tabla 1).

*Tabla 1. Cosechas acumuladas a diciembre de 2023 (SUBPESCA, 2023)*

Regiones	Cosecha acuícola (ton)
Los Lagos	831.765
Aysén	516.001
Magallanes	130.138

*Nota: Los datos corresponden hasta el mes de noviembre de 2022.*

Si se observa a estas regiones en un mapa (), es apreciable que las regiones que corresponden a la mayor producción acuícola son aquellas que ostentan la mayor cantidad de kilómetros de costa, por ello, para el sector industrial estas regiones reflejan un alto interés para la ubicación de plantas de cultivo a gran escala.

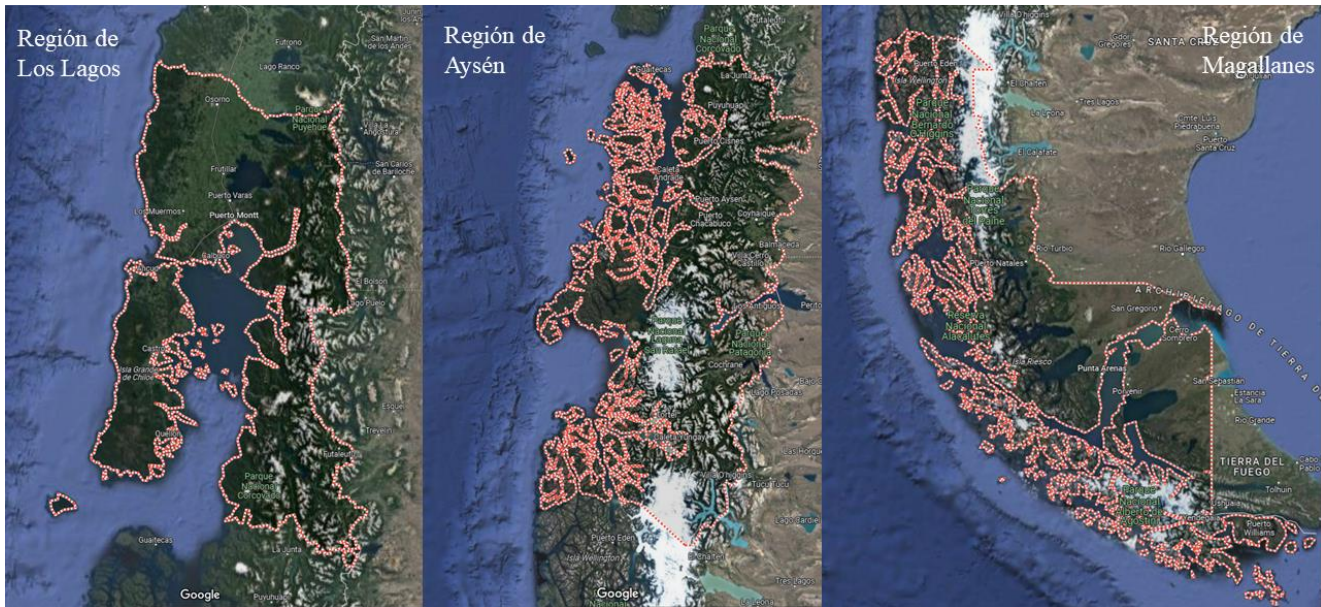


Figura 1. Imágenes satelitales de las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes.

La acuicultura cuenta con distintos tipos de ramas de producción, dependiendo del tipo de especie capturada. Por ello podemos encontrar producción de peces, moluscos y algas. Para el presente estudio se destaca la rama de la explotación de peces, específicamente la salmonicultura, la cual corresponde a especies que son pertenecientes a la familia *Salmonidae*.

La cosecha de especies salmónidas es uno de los principales productos exportados desde el sur de Chile, debido a su gran demanda a nivel mundial. Para diciembre del 2023 la cosecha total de peces fue de 1080,9 mil toneladas, siendo un 3,5% mayor a la registrada en 2022. De ese registro, se destaca que las principales especies producidas son el salmón del atlántico, el salmón Coho y la trucha arcoíris (SUBPESCA, 2023).



Figura 2. Principales salmónidos extraídos en Chile.

Chile, al ser uno de los principales países exportadores de productos extraídos de la salmonicultura, produciendo sobre las 800 toneladas de biomasa, desde el 2017 (Sernapesca, 2021) ha establecido altos estándares de cuidados para las plantas de cultivo, con la finalidad de mantener una alta y constante producción. En estos estándares se destaca el control y manejo de enfermedades bacterianas en las especie

cultivadas, siendo el método más utilizado, a nivel industrial, el uso de antibióticos de consumo oral (Tabla 2), administrado en el alimento de los salmónidos a lo largo del periodo de crecimiento (Önal, 2011; Parr & Pearson, 2002).

*Tabla 2. Producción de biomasa de salmónidos y uso de antibióticos (SERNAPESCA, 2022).*

Año	Consumo de Antibióticos (Ton)	Biomasa Cosechada (Ton)
2007	385,6	600.862
2008	325,6	630.647
2009	184,5	474.174
2010	143,2	466.857
2011	206,8	649.492
2012	337,9	826.949
2013	450,7	786.091
2014	563,2	955.179
2015	557,2	883.102
2016	382,5	727.812
2017	393,9	855.326
2018	322,7	923.900
2019	334,1	989.546
2020	379,6	1.075.869
2021	463,4	985.958
2022	341,5	1.066.645

SERNAPESCA, en octubre de 2022, entregó un informe registrando que, entre los años 2007 y 2022, en Chile se utilizaron sobre las 300 toneladas de antibióticos anualmente en los cultivos de salmónidos de agua dulce en plantas chilenas de producción nacional y exportación. A partir de la Tabla 1, se aprecia que la cantidad de antibióticos utilizados en la industria fluctúa en referencia a las cantidades de biomasa cosechada, es decir, a mayor biomasa mayor cantidad de antibióticos, pero esta proporción entre dosificación y cosecha en los años 2021, 2015, 2014, no fue coincidente con el resto del registro, encontrando un uso excesivo de antibióticos. Por su parte, para el año 2022 se expresa una disminución en el uso de éstos de forma excesiva, pero no deja de ser preocupante la dosificación en la biomasa cosechada.

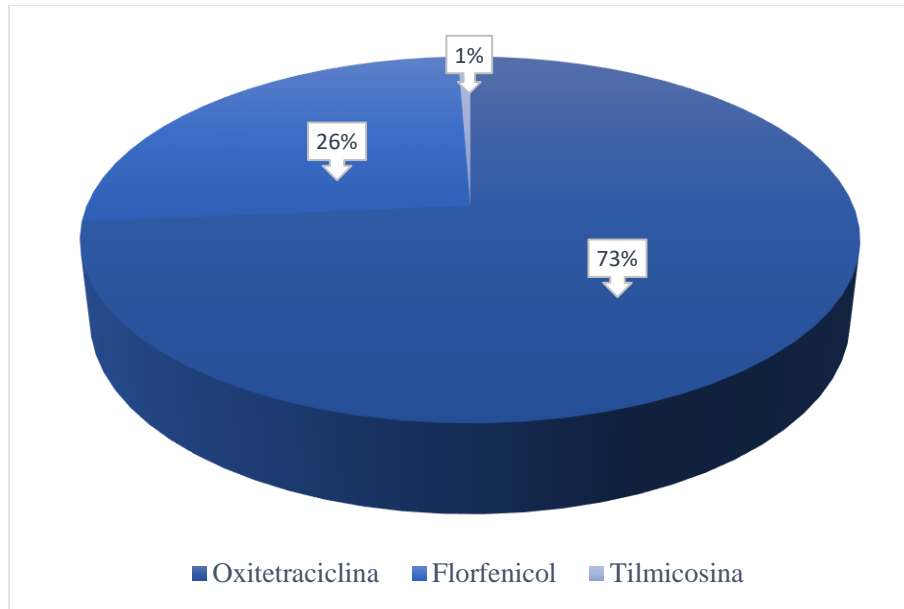


Figura 3. Usos de antibióticos en agua dulce (SERNAPESCA, 2022).

En la Figura 3 se identifican los principales antibióticos utilizados en cultivos de agua dulce, donde un 73,60% es atribuido a la oxitetraciclina (OTC), un 25,79% al florfenicol y un 0,61% a tilmicosina. Esto refleja una directa preferencia por la industria salmonera chilena al uso de la OTC como fármaco de primera línea, en cultivos de agua dulce, ya que este fármaco presenta una extensa vida útil a pH ácido y no subsiste en medios alcalinos como los del agua salada (mar).

## 1.2. Contaminación por antibióticos

Los antibióticos son fármacos muy utilizados a nivel mundial, tanto en medicina dirigida a seres humanos como en medicina veterinaria, ya que su función es la contención y eliminación de enfermedades de origen bacteriano. A pesar de los grandes beneficios que entregan a nivel medicinal, el uso masivo de estos fármacos posee efectos colaterales que impactan sobre la salud humana y el medioambiente, generando consecuencias, como la resistencia bacteriana, alergias y ecotoxicidad crónica. Dentro del contexto del uso de antibióticos en medicina veterinaria, se encuentra su uso en los procedimientos de cuidado de animales para consumo humano, en los que destaca la ganadería y la salmonicultura. (Łukaszewicz *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018)

Un factor considerable sobre el uso de fármacos en especies animales cultivadas para el consumo humano, es la relación de dosificación y metabolización del medicamento, pues comúnmente los antibióticos poseen bajos porcentajes de metabolización y altos en secreción, generando una inserción considerable de antibióticos a los ecosistemas que rodean las plantas de cultivo industrial ( Wang *et al.*, 2023).

### 1.3. Tetraciclinas (TCs)

Son un grupo de antibióticos naturales o semisintéticos con amplio espectro de actividad. Comenzaron a ser descubiertas a partir del año 1940, para esa década los estudios sobre las TCs se orientaban a la procedencia de estas y a su variedad. Ya posterior a 1950 se iniciaron estudios orientados a sus propiedades farmacológicas para aplicaciones medicinales y veterinarias, hallándose respuestas favorables para el tratamiento de diversos tipos de infecciones, especialmente las respiratorias, como neumonía por micoplasma, neumonía por clamidia y clamidia Psittaci. Para octubre de 1999, las TCs de primera generación comenzaron estudios de fase clínica, donde fueron parte de investigaciones que las consideraron como fármaco potencial en el tratamiento de la malaria por *Plasmodium falciparum* (Chopra & Roberts, 2001; Darken *et al.*, 1960; Eliopoulos *et al.*, 2003).

Como se mencionó con anterioridad al inicio de esta sección, los compuestos de la familia de las TCs comparten propiedades antibióticas y similitudes estructurales. Donde muestran estructura común constituida por una cadena central denominada naftaceno o tetraceno, conformado por cuatro anillos fusionados y sustituidos con diferentes grupos funcionales. A partir de las propiedades fisicoquímicas de las diferentes TCs, se comprende que poseen una alta solubilidad en ambientes acuosos, siendo estructuras hidrófilas muy estables en medios ácidos e inestables en medios alcalinos. Las TCs demuestran un periodo de vida media en ambientes acuosos que varía entre las 34 a 329 horas (Azanu *et al.*, 2018; Jafari Ozumchelouei *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2013; Sah, 2006; Suzuki & Hoa, 2012; H. Wang *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2017).

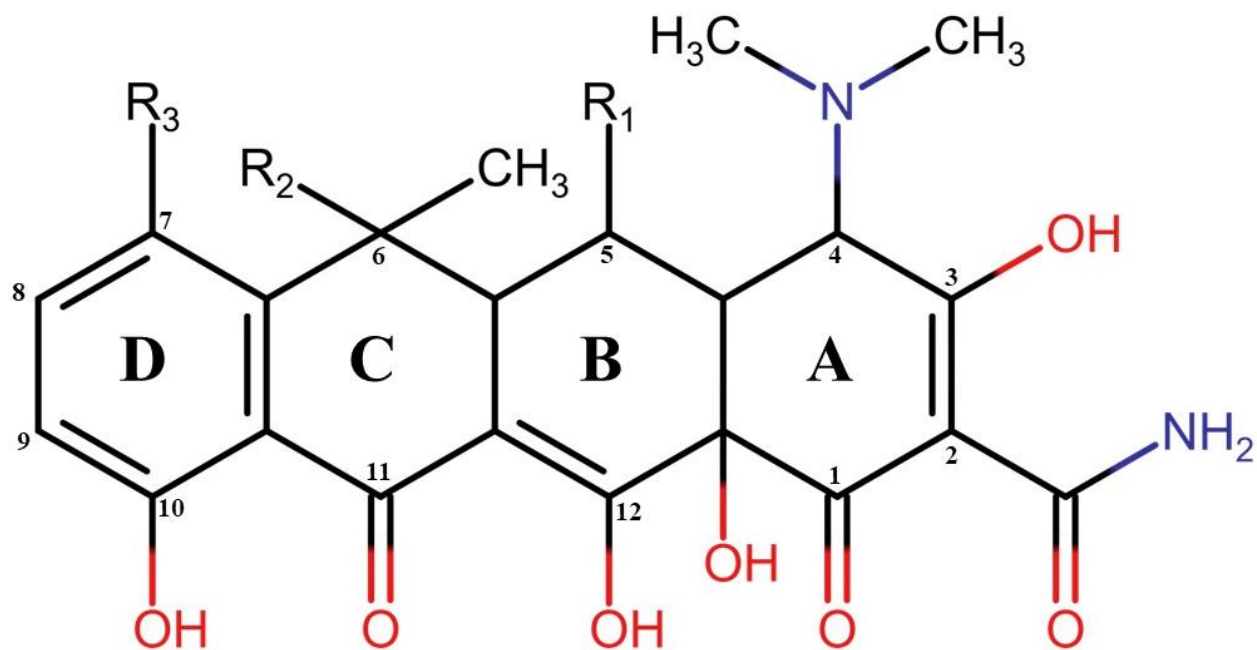


Figura 4. Estructura general de la familia de TCs.

Tabla 3. Sustitución de cadenas radicales en estructura general de las TCs.

Compuesto	$R_1$	$R_2$	$R_3$
Tetraciclina	<i>H</i>	<i>OH</i>	<i>H</i>
Oxitetraciclina	<i>OH</i>	<i>OH</i>	<i>H</i>
Clortetraciclina	<i>H</i>	<i>OH</i>	<i>Cl</i>

A lo largo de la historia, las TCs destacaron por tener un bajo costo de elaboración, amplio espectro de actividad, perfil de baja toxicidad y alta eficacia ante bacterias que atentan a la salud humana y animal, transformándolas en una opción viable para su fabricación en masa y su uso a nivel industrial en países de bajos presupuestos. Desde la década de 1950 a la actualidad, han sido utilizadas por muchos países en el área de la ganadería, acuicultura y salud veterinaria, en general, para el tratamiento y control de enfermedades gastrointestinales, respiratorias e infecciones de piel originadas por bacterias (Y. Chen *et al.*, 2012; Chopra & Roberts, 2001; Hariharan, 2007; Michalova *et al.*, 2004; Önal, 2011; Roberts *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2021).

A pesar de los beneficios que traen consigo las TCs, su uso a gran escala provoca un impacto ambiental que no es menospreciable, principalmente en el área de uso veterinario para la industria acuífera y ganadera, donde las dosificaciones utilizadas son del margen de toneladas. Este impacto ambiental proviene directamente de las proporciones de metabolización que poseen estos fármacos, siendo el porcentaje de excreción entre el 30% a 90% dependiendo de la especie, generando bioacumulaciones de antibióticos en los organismo marinos, como peces, moluscos, crustáceos y algas, además de suelos y aguas (X. Chen *et al.*, 2022; X. Wang *et al.*, 2023b).

La exposición prolongada de organismos, aguas y suelos a las TCs genera efectos adversos, los cuales pueden variar dependiendo de las concentraciones de los antibióticos en el ambiente. En la salud humana o animal, a concentraciones por bajo de los  $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ , puede generar enfermedades en articulaciones, nefropatía, alteración endocrina, alteraciones del sistema nervioso central, mutagenicidad, y/o fotosensibilidad. Por otro lado, a concentraciones que superen los  $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$  provoca resistencia y eliminación bacteriana. Finalmente dirigido al ambiente, los efectos secundarios se encuentran principalmente relacionados a la eliminación de comunidades bacterianas naturales, resistencia a antibióticos en microorganismos y bioacumulación (Daghrir & Drogui, 2013; Limbu *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2019; López Peñalver *et al.*, 2013; O'Neill, 2016; Wilson *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2010; Zainab *et al.*, 2020).

Se ha encontrado la presencia de antibióticos en aguas de ríos, lagos, napas subterráneas, agua potable, residuales, sedimentos y lodo que colinda con zonas industriales enfocados a la ganadería o acuicultura. La antibióticos son transportados por las corrientes fluviales naturales o artificiales generadas por las plantas de cultivo o de procesamiento de aguas (Moreno-González *et al.*, 2014; M. Zhang *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2016).

#### 1.4. Oxitetraciclina (OTC)

La oxitetraciclina (Figura 5) es un compuesto con propiedades antibacterianas perteneciente a la primera generación de TCs debido a su procedencia natural desde la bacteria *Streptomyces aureofaciens*, este fármaco es utilizado en el sector de medicina veterinaria, específicamente por la industria salmonera. (Darken *et al.*, 1960; Mog *et al.*, 2020; White *et al.*, 2005).

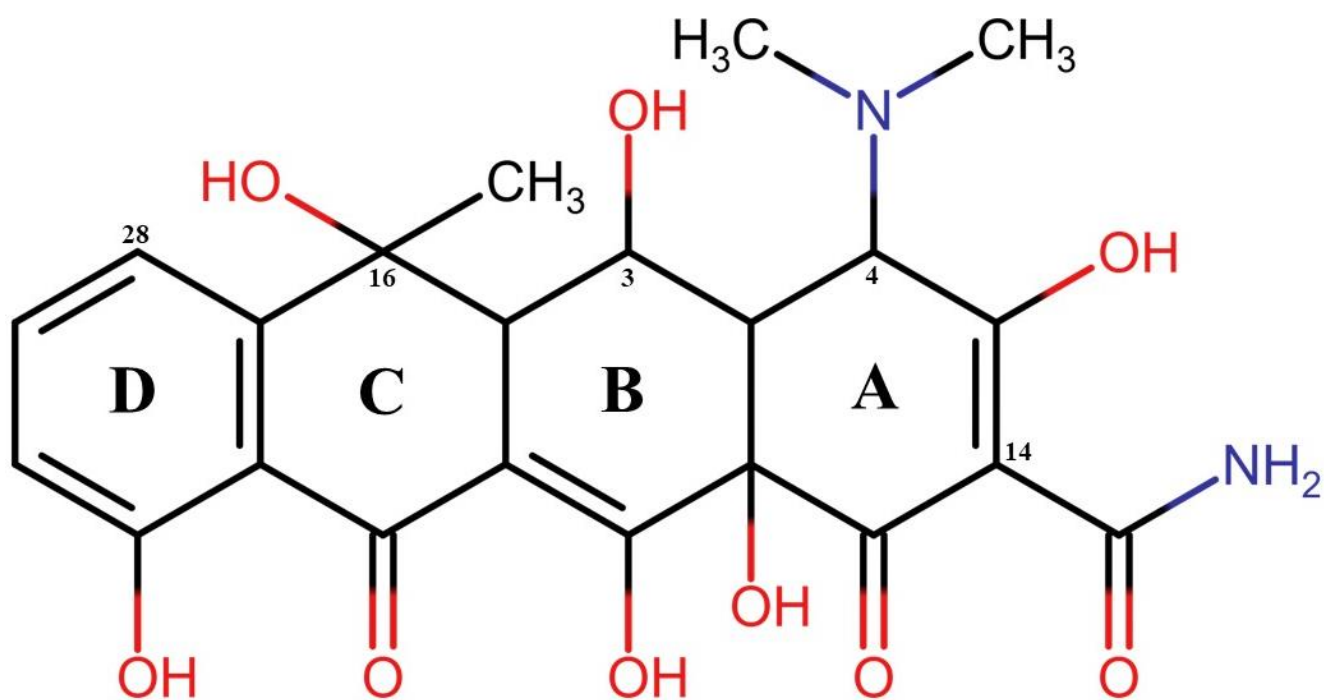


Figura 5. Estructura molecular de la oxitetraciclina (OTC).

Nota: La numeración mostrada es la que aplicó el software utilizado para calcular, no es la regularmente encontrada en la literatura.

Para la estructura de la OTC, las cadenas radicales  $R_1$ ,  $R_2$ , y  $R_3$  vistas en la Figura 4, fueron sustituidas por grupos hidroxilos para los  $R_1$  y  $R_2$ . en  $R_3$  un hidrógeno. Estas sustituciones son observables en la Figura 5.

#### 1.5. Métodos de Bioremediación Ambiental

El aumento de la presencia de contaminantes emergentes nocivos ha creado un constante flujo de crecimiento en el impacto ambiental en sectores industriales. Esta situación ha llevado a las áreas

investigativas a desarrollar nuevas técnicas de remediación que logren disminuir o erradicar el impacto ambiental con el menor efecto secundario posible (Mate & Alcalde, 2017).

Las técnicas de biorremediación son descritas como procesos sustentados en mecanismos biológicos que sean capaces de reducir, degradar, desintoxicar o transformar un compuesto contaminante a una presencia inofensiva para el medioambiente y organismos biológicos, por lo cual se han desempeñado como un método eficaz para tratar agentes contaminantes con un bajo impacto ambiental (Azubuike *et al.*, 2016a).

Actualmente, existen métodos de biorremediación que ya han sido implementados, pero debido a que estos métodos poseen la necesidad de agentes catalizadores u oxidantes que podrían generar efectos secundarios contaminantes, no son viables para una implementación constante y a gran escala, por lo que se ha desarrollado un interés en los métodos que involucran enzimas como mecanismos biorremediadores (Figura 6), ya que poseen un bajo costo de utilización, una alta eficacia y un mínimo o casi nulo efecto secundario. Debido a esto, el uso de enzimas con propiedades que faciliten el control y mitigación de agentes contaminantes han tomado una gran importancia en el campo de la búsqueda de biorremediadores (Azubuike *et al.*, 2016b; Mate & Alcalde, 2017; Wen *et al.*, 2019).

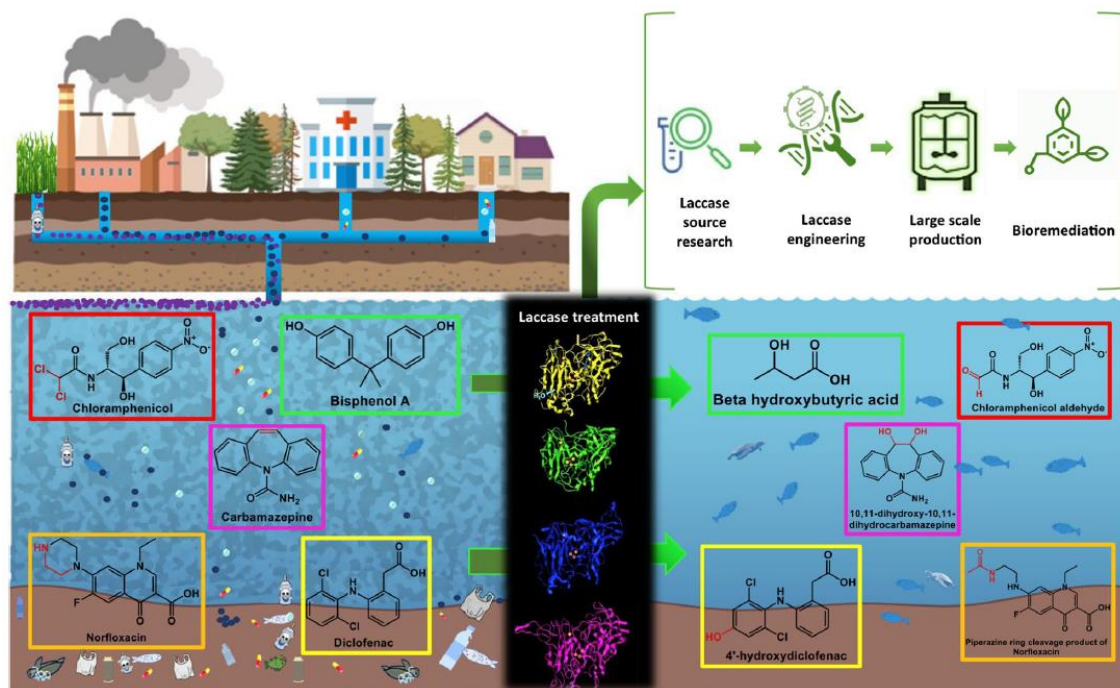


Figura 6. Ilustración de potenciales contaminantes y efecto de la biorremediación con uso de enzimas lacasas (Arregui, 2019).

La Figura 6 describe de manera general el tratamiento de contaminantes emergentes por medio de enzimas lacasas en ecosistemas aledaños a focos de contaminación por antibióticos, proceso denominado

biorremediación. Las lacasas fueron descubiertas en el año 1883 por el científico japonés Hikorokuro Yoshida desde la resina del árbol de la laca japones (*Rhus vernicifera*) pero no fue hasta el año 1896, que Bertrand y Laborde lograron la caracterización de la enzima, señalando la presencia de metales en su estructura, lo cual fue relacionado con el comportamiento oxidante que estas poseen. Los investigadores categorizaron estas enzimas como oxidasas, oxigenasas u oxidorreductasas, con capacidad de oxidar un amplio rango de sustratos como fenoles, anilinas, aminofenoles, diaminas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, plásticos y compuestos no fenólicos, utilizando el oxígeno molecular del entorno como receptor de electrones, reduciéndose a dos moléculas agua como subproducto (Galhaup & Haltrich, 2001; Guan *et al.*, 2018; Morozova *et al.*, 2007; Yoshida, 1883).

Una característica importante de las lacasas es que son enzimas multicobre (MCO), debido a la presencia de cuatro átomos de cobre coordinados en su estructura, donde cada uno cumple una función en particular en el mecanismo de acción de la enzima. Estos cobres pueden ser denominados tipo 1 (T1), tipo 2 (T2) y tipo 3 (T3) (Figura 7), dependiendo de su estado de oxidación y localización en la enzima. Para establecer la categorización de los cobres se emplean diferentes técnicas, tales como la Resonancia de Espín Electrónico (REE) y la espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV/Vis). Debido a las propiedades espectroscópicas de estos metales, se le adjudica el apodo de enzimas azules a las lacasas, ya que el cobre T1 expresa una coloración azul a 610 nm en una evaluación por UV-Vis (Gianfreda *et al.*, 1999; Mot & Silaghi-Dumitrescu, 2012; Thurston, 1994).

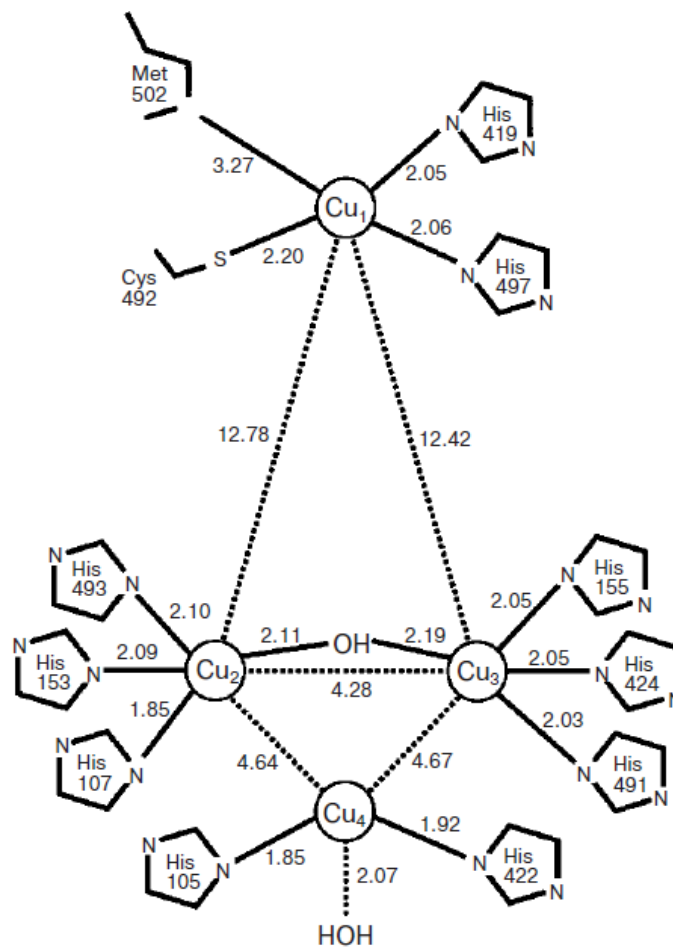


Figura 7. Ilustración de posiciones para átomos cobre de la enzima lacasa de *Bacillus subtilis* (PDB ID: 3ZDW), donde el  $Cu_1$  corresponde a tipo T1,  $Cu_4$  corresponde a tipo T2, y los  $Cu_2$  y  $Cu_3$  al tipo T3, conformando el clúster trinuclear (TNC).

Los cobres tienden a estar coordinados por grupos de residuos de histidinas acompañadas de un residuo de cisteína que interactúan con el cobre T1 (Figura 7). Esta condición es conservada dentro de las lacasas, ya que al ser enzimas de la misma familia presentan una identidad estructural entre ellas por sobre el 90%, no siendo muy variable la conformación estructural del sitio activo entre ellas. (Arregui *et al.*, 2019; Claus, 2004; Vernekar & Lele, 2009)

Respecto a la actividad catalizadora de las lacasas, es común considerarlas como enzimas sumamente versátiles por su baja especificidad, que se debe a su capacidad de oxidar a una gran diversidad de compuestos. Esto se demuestra mediante los potenciales redox que presentan estas enzimas ( $E^\circ$ ), los cuales se relacionan directamente con la energía requerida para la sustracción de un electrón procedente del sustrato. Por lo tanto, mientras mayor sea el potencial redox de la enzima, menor será su especificidad y mayor la variedad de compuestos que puede oxidar. El potencial redox de las enzimas lacasas es evaluado utilizando técnicas potenciométricas con medidores redox, con los cuales se ha descubierto que para estas

enzimas el cobre T1 actúa como el aceptor de electrones provenientes del sustrato entrante y que de este metal dependerá el potencial redox de la enzima.

Para orientarse en la estructura de estas enzimas, se utiliza la distribución de los cobres. Estos se encuentran ubicados en los dominios que constituyen la totalidad de la enzima. Según lo anterior, los átomos de cobre se localizan siguiendo la siguiente coordinación: El cobre mononuclear (Cu T1) se encuentra ubicado en el dominio 3, mientras que el complejo trinuclear (Cu T2 y Cu T3) se establece entre los dominios 1 y 3, por lo cual finalmente el dominio 2 adopta la función de estabilizar los dominios 1 y 3. (Arregui *et al.*, 2019; Chauhan *et al.*, 2017; Claus, 2004; Hakulinen & Rouvinen, 2015).

El mecanismo de reacción enzimático que poseen las lacasas solo requiere de oxígeno molecular del ambiente y un sustrato, el cual inicia con una reacción de oxidación generada por el traspaso de electrones hasta el Cu T1 que se ubica en cercanía del sustrato, para posteriormente realizar una transferencia de electrones desde el sustrato hasta el clúster trinuclear, de a un electrón a la vez. Finalmente, el mecanismo de acción culmina con reacción de reducción del oxígeno molecular el cual permite la producción de dos moléculas de agua, siendo protagonistas de esta actividad los cobres pertenecientes al clúster trinuclear (Cu tipo T2/T3) del sitio activo. El mecanismo de acción se ve representado en la Figura 7, donde en el clúster trinuclear se observa la presencia de una molécula de agua producto de la actividad de la enzima, demostrando el proceso, ya que al finalizar su acción son generadas dos moléculas de agua (Atalah *et al.*, 2019; Shraddha *et al.*, 2011; Vernekar & Lele, 2009).

Las enzimas lacasas se encuentran distribuidas en una amplia variedad de organismos, los cuales corresponden a plantas, insectos, bacterias y hongos. La clasificación de estas es a partir del potencial redox que poseen el cual es obtenido a partir de estudios potenciométricos, las enzimas son organizadas según su tipo de origen y por su potencial redox en orden creciente. Se ha demostrado que las lacasas de origen fúngico poseen potenciales redox más altos, comparadas con sus homólogas provenientes de plantas, insectos o bacterias. Debido a ello y a su bajo costo de cultivo e implementación a gran escala, las lacasas fúngicas se han transformado en candidatas ideales para métodos aplicados a la biorremediación (Figura 8) (Arregui *et al.*, 2019; Claus, 2004; Enguita *et al.*, 2003; Reinhammar, 1972; Riva, 2006; Shleev *et al.*, 2004).

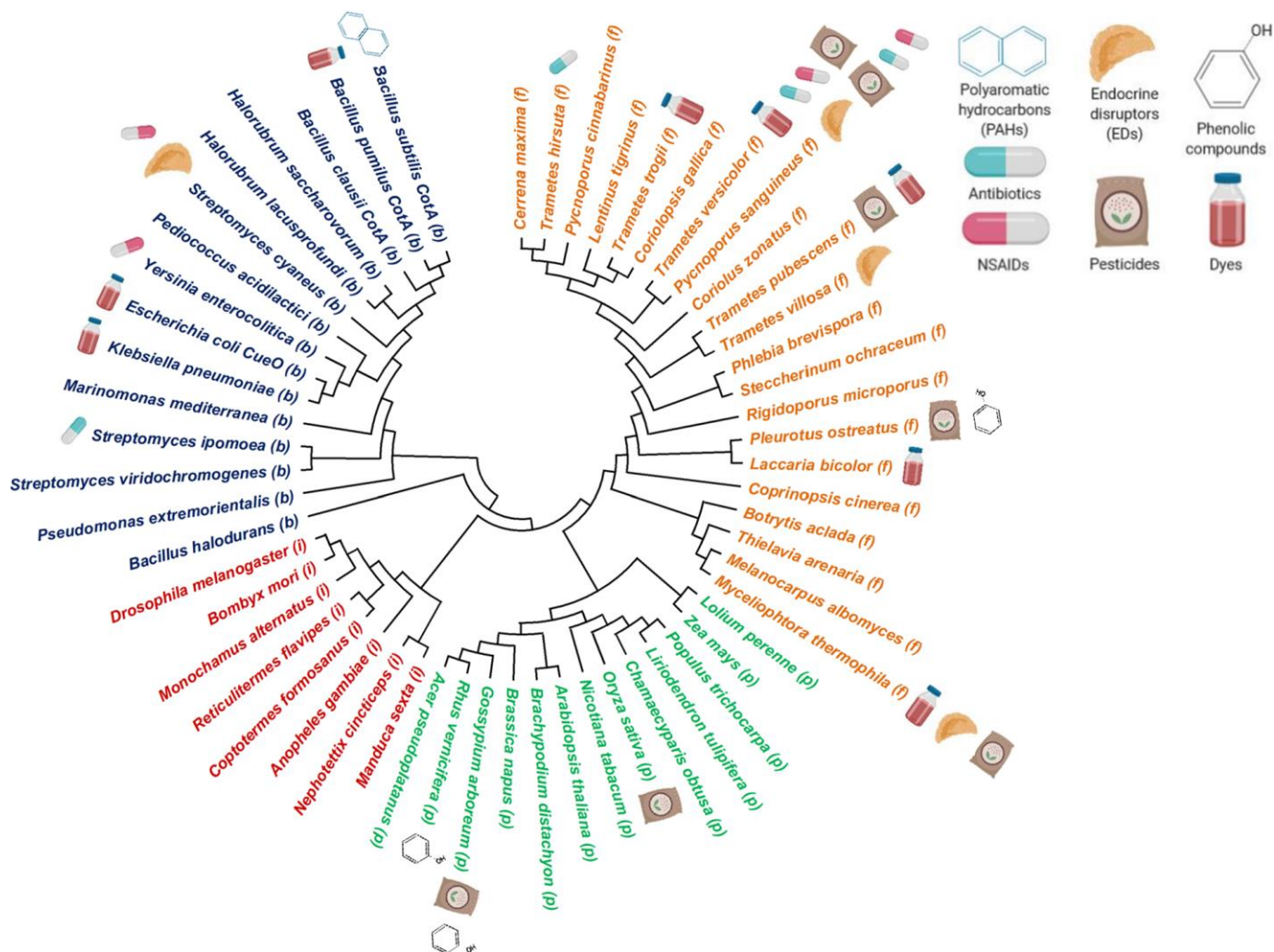


Figura 8. Árbol filogenético de lacasas de diversos orígenes y sus aplicaciones (Arregui, 2019).

Las lacasas fúngicas pueden ser obtenidas a partir hongos basidiomicetos, principalmente especies como *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostretatus*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Corpus cinerereus*, *Cerrena sp*, entre otros. Estas enzimas cumplen diferentes funciones como la esporulación, producción de pigmentos, creación de cuerpos fructíferos, defensas de estrés, patogénesis y degradación de lignina. Estas enzimas pueden encontrarse con estructuras monoméricas, homodiméricas o heterodiméricas, lo que afecta en un cambio de la masa molecular y variación entre los puntos isoelectrónicos de entre cada una, esto dependiendo del organismo del que provenga la enzima (Baldrian, 2006; Rivera-Hoyos *et al.*, 2013; Strong & Claus, 2011; Viswanath *et al.*, 2014).

## 1.6. Enzima Dlac del hongo *Cerrena sp*

*Cerrena sp.* son hongos pertenecientes al reino fúngico, a la división de los basidiomicetos y familia de las Poliporáceas. Parasitan árboles produciendo una condición conocida como podredumbre blanca (Yuan, 2014).

A partir de estos hongos es posible extraer a la enzima lacasa Dlac. En el caso del sitio activo de la Dlac, el cobre T1 es coordinado por His393, Cys449 e His454. Por otro lado, el cobre T2 están coordinados por His64 e His396, mientras que cada cobre T3 está coordinado por tres histidinas (His111, His398 y His448 para el cobre T3 e His66, His109 y His450 para el cobre T3'). En la Figura 9A, se visualiza la estructura de la enzima Dlac, mostrando la posición de los átomos de cobre y los dominios correspondientes. Además, la Figura 9B muestra la coordinación entre los cobres de la enzima con los aminoácidos correspondientes al sitio activo.

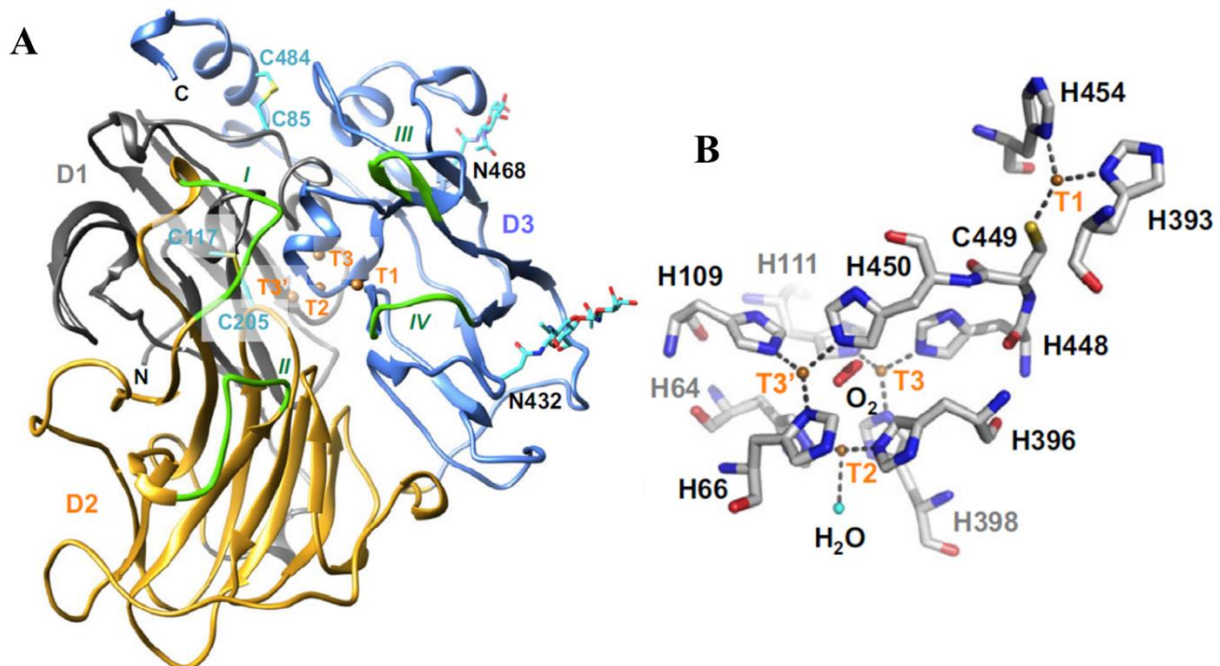


Figura 9. Estructura cristalográfica de Dlac. (A) Estructura de Dlac con sus tres dominios D1, D2 y D3 indicados en coloración gris, amarillo y azul, respectivamente. Los átomos de cobre se muestran como esferas color naranja (T1, T2, T3 y T3'). (B) Estructura del sitio activo de Dlac donde los átomos de Cobre T1, T2, T3 y T3' son coordinados por histidinas, cisteína, la presencia de oxígeno molecular y una molécula de agua (Wu et al., 2018).

## 1.7. Química Computacional (QC)

Debido a la actividad biológica que presenta la Dlac y al interés en su capacidad como agente biorremediador, necesario predecir como podría comportarse ante la presencia de la OTC como potencial sustrato. Desde esta inquietud es que la química computacional (QC) se presenta como una potencial herramienta de estudio ya que permite el análisis de sistemas moleculares con actividad biológica, además

esta disciplina de investigación ha expuesto grandes aportes en el área de desarrollo farmacéutico, esencialmente como metodologías participes en la construcción de fármacos y análisis de comportamiento en sistemas biológicos. Dentro de la QC encontramos técnicas como: métodos *ab initio*, métodos *in silico*, mecánica molecular, métodos empíricos, métodos semiempíricos, *Docking molecular*, reactividad química y dinámica molecular (Kortagere *et al.*, 2012; Suárez, 2012).

### **1.8. Docking molecular (DM)**

El *Docking molecular* permite la predicción del comportamiento de un complejo enzima-sustrato en conjunto con la determinación de valores energéticos e interacciones intermoleculares, que predicen la estabilización del sustrato en la enzima. (Go<sup>-</sup> & Scheraga, 1970; Morris *et al.*, 1998a).

En este estudio el DM se realizó como un acoplamiento rígido/flexible sustentado en el paradigma de ajuste inducido de Koshland, el que considera las capacidades de flexibilidad que presenta, el sustrato y la enzima, debido a su naturaleza de variable en función de las interacciones generadas. Sin embargo, debido al excesivo gasto computacional, se optimiza solo considerando al sustrato como un complejo flexible (Böhm, 1998; Goodsell & Olson, 1990; Koshland, 1963; Meng *et al.*, 2011).

Se utilizó el algoritmo genético lamarckiano (LGA) y una función de puntuación semi-empírico, combinación que permite calcular variables energéticas que incluye términos de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, entropía conformacional y desolvatación, apoyados con la función de puntuación empírica (Meng *et al.*, 2011; Trott & Olson, 2010).

### **1.9. Teoría Conceptual de Funcionales de la Densidad (cDFT)**

La Teoría conceptual de los Funcionales de la densidad (cDFT) es una herramienta sobresaliente en el estudio de la reactividad química en sistemas moleculares complejos, debido a que es un método capaz de determinar energías y propiedades del sistema, considerando su comportamiento electrónico. Este método implementa indicadores de reactividad globales y locales, los cuales exponen los cambios del sistema en estudio ante perturbaciones exteriores (Chamorro & Pérez, 2005).

Para comprender las perturbaciones que ocurren dentro del sistema molecular en estudio, se utiliza la aproximación por orbitales moleculares de frontera (FMO), es decir, los orbitales moleculares ocupados de mayor energía (HOMO) y los orbitales moleculares desocupados de menor energía (LUMO). Por medio del comportamiento de los FMO es posible describir el comportamiento químico de una molécula, el cual involucra transferencias de cargas, mecanismos de reacción y la distribución de los orbitales

LUMO y HOMO. El análisis de estos orbitales permite visualizar las zonas reactivas y la regioselectividad del sistema químico (Costa *et al.*, 2021; Pucci & Angilella, 2022; Yu *et al.*, 2022).

### 1.9.1. Índices de reactividad

Los índices de reactividad reflejan el comportamiento de un sistema molecular ante una perturbación externa. Este comportamiento puede ser abordado de manera global sobre el sistema molecular o localizado al átomo para un análisis más detallado de las perturbaciones ocurridas (Parr & Yang, 1995).

### 1.9.2. Índices globales

Los índices globales describen al sistema molecular completo, es decir, no discriminan a la composición por átomos de este, son descriptores de propiedades electrónicas que son relacionados a un comportamiento químico. El primero de ellos se encuentra sustentado en los formalismos de Parr y Yang en 1995, el Potencial Electrónico Químico ( $\mu$ ) expresa la viabilidad del intercambio de densidad electrónica del sistema molecular ante una perturbación externa. En términos energéticos basados en la aproximación FMO,  $\mu$  se define matemáticamente como

$$\mu \approx \frac{(E_{Homo} + E_{Lumo})}{2} \quad (1)$$

donde  $E_{Homo}$  indica la energía del orbital HOMO y  $E_{Lumo}$  la energía del orbital LUMO. Estas energías pueden asimilarse al potencial de ionización y a la afinidad electrónica, respectivamente (Domingo *et al.*, 2016).

Para evaluar la capacidad de transferencia de electrones del sistema molecular son utilizados los índices de dureza ( $\eta$ ) y blandura (S) (Parr & Pearson, 2002), donde  $\eta$ , indica la resistencia que posee una molécula para deformar su densidad electrónica, respecto al entorno que le rodea (Domingo *et al.*, 2016), la cual matemáticamente se describe mediante la ecuación

$$\eta = (E_{Lumo} - E_{Homo}) \quad (2)$$

Por su parte, S corresponde al inverso de la dureza, es decir, corresponde a cuán fácilmente puede ocurrir una transferencia de electrones en el compuesto o cuán polarizable es el sistema molecular (Eno *et al.*, 2022). Su expresión matemática es:

$$S = \frac{1}{\eta} \quad (3)$$

La electrofilicidad ( $\omega$ ) considera la tendencia de una especie a adquirir una cantidad excedente de densidad electrónica, relacionada al potencial químico electrónico ( $\mu$ ) y la dureza ( $\eta$ ), que describe la resistencia del sistema a intercambiar dicha densidad. Matemáticamente,  $\omega$  es representado por:

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (4)$$

### Índices locales

Los índices locales de reactividad se caracterizan por presentarse enfocados o condensados al átomo, es decir, en lugar de expresarse de forma generalizada al sistema molecular en estudio, se condensan a cada uno de los átomos que constituye el sistema, proporcionando información finita de la totalidad del complejo molecular.

### Funciones de Frontera o Funciones de Fukui

Las funciones de frontera o funciones de Fukui permiten establecer una descripción de reactividad por medio de la densidad electrónica de los orbitales de frontera cuando existe una alteración en la cantidad de electrones (perturbación externa) (Q. Zhang *et al.*, 2016). Esta función se constituye matemáticamente como:

$$f(r) = \left( \frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right)_{v(r)} \quad (4)$$

Esta función expresa el cambio de densidad electrónica en el punto  $r$  en respecto de la cantidad de electrones  $N$  a un potencial externo constante  $v(r)$  (Parr & Yang, 1984).

Al estar bajo el contexto de la aproximación FMO, las funciones de Fukui se expresan para la densidad de los orbitales HOMO y LUMO, dónde matemáticamente adoptan las siguientes estructuras:

$$f^- \approx |\phi^h(r)|^2 = \rho_{HOMO}(r) \quad (5)$$

$$f^+ \approx |\phi^l(r)|^2 = \rho_{LUMO}(r) \quad (6)$$

$f^-$  y  $f^+$  representan la densidad electrónica asociada a los orbitales moleculares HOMO y LUMO respectivamente.

Para obtener una descripción de la reactividad condensada al átomo dentro de un sistema molecular complejo de mayor afinidad, Yang y Mortier, en el año 1986, proporcionaron un método sencillo para describir la reactividad local, aplicando las aproximaciones por diferencias finitas sobre las funciones de

Fukui, donde se obtuvieron las funciones condensadas de Fukui, que describen las densidades electrónicas por cada átomo presente en el sistema estudiado (Jara & Alfonso, 2004). Estas funciones son expresadas de la siguiente forma:

$$f_x^- \approx [q_x(N) - q_x(N - 1)] \quad (7)$$

$$f_x^+ = [q_x(N + 1) - q_x(N)] \quad (8)$$

donde  $f_x^-$  y  $f_x^+$  son los índices de electrofilia y nucleofilia del átomo respectivamente,  $x$  representa cualquier átomo del sistema. Por lo tanto, estos índices expresan lo susceptible de cada átomo a un ataque de naturaleza nucleofílica o electrofílica (Jara & Alfonso, 2004).

Por otra parte, también encontramos al descriptor dual de reactividad establece la caracterización de electrofilia y nucleofilia en simultaneo respecto de la variación de la dureza y el potencial externo (Morell *et al.*, 2005).

En términos de FMO, el descriptor dual de reactividad se constituye como una operatoria derivada de las funciones de Fukui, la cual implementa la diferencia entre electrofilia y nucleofilia, lo que en términos matemáticos se expresa como:

$$f^2(r) \approx \rho_{LUMO}(r) - \rho_{HOMO}(r) \quad (9)$$

Considerando la base matemática del descriptor dual, se establece que los orbitales moleculares de frontera describen la reactividad local por medio de la energía de sus densidades electrónicas (Martínez-Araya, 2015).

El descriptor dual permite saber, simultáneamente, las preferencias de ataques nucleofílicos y electrofílicos. Por lo tanto, cuando  $f^2(r) > 0$  el sitio (r) posee una preferencia por un ataque nucleofílico. En cambio, cuando  $f^2(r) < 0$  el sitio (r) posee preferencias por un ataque electrofílico (Morell *et al.*, 2005)

### 1.10. Orbitales Naturales de Enlace (NBO)

El análisis de Orbitales Naturales de Enlace (NBO) utiliza una perspectiva desde las estructuras naturales de Lewis, que describen la mayor probabilidad porcentual de la densidad electrónica. Esto proporciona información relevante sobre los orbitales dadores (reales Lewis) y aceptores (orbitales virtuales no Lewis) de electrones, permitiendo una conexión al análisis de interacciones intra e intermoleculares (Glendening *et al.*, 2012). En el análisis NBO, la matriz de segundo orden de Fock permite evaluar las interacciones

entre los orbitales dadores (orbitales de Lewis) y orbitales aceptores (orbitales virtuales), siendo el resultado una pérdida del orbital de Lewis hacia el orbital virtual (Krishnan *et al.*, 2011). Para cada una de las interacciones dador (*i*) y aceptor (*j*) se presenta una energía de estabilización  $E2$  asociada a una deslocalización desde *i* a *j* (Venkat Rao *et al.*, 2018), lo que es expresado como

$$E2 = \Delta E_{ij} = \frac{q_i F(i,j)^2}{\varepsilon_j - \varepsilon_i} \quad (10)$$

Según lo establecido por la matriz de Fock,  $q_i$  corresponde a la ocupación del orbital donador, mientras que  $\varepsilon_j$  y  $\varepsilon_i$  corresponden a las energías de los orbitales donores y aceptores respectivamente, y  $F(i,j)$  es un operador que indica la contribución de las deslocalizaciones de la interacción (Govindarajan, 2014).

Según la ecuación 10, cuanto mayor sea el valor de  $E2$ , mayor es la intensidad de la interacción entre el orbital dador y el orbital aceptor, expresando una mayor tendencia al intercambio de carga que va a corresponder en una interacción de estabilización de los NBO (Krishnan *et al.*, 2011).

Las perturbaciones de segundo orden (E2PERT) describen las interacciones reales existentes entre átomos que componen un sistema molecular, indicando también el par electrónico que es involucrado en la constitución de la interacción. La matriz de fock utilizada corrige el error asociado a perturbaciones de bajo orden (Baja energía) permitiendo una mayor afinidad en la localización del movimiento de electrones en el sistema molecular (Glendening *et al.*, 2021).

Respectivamente la formulación matemática asociada al análisis E2PERT, establece que puede visualizarse en forma gráfica y matemática la interacción de un orbital donador ocupado con uno vacante desocupado (Aceptor) estableciendo una escala de energía respectiva para cada uno de los movimientos de electrones, es decir, se identifican perturbaciones energéticas de nivel bajo, medio y alto dependiendo de las condiciones a las que se disponga el estudio (Weinhold & Landis, 2012).

## 2. Hipótesis

La presencia de grupos funcionales nitrogenados y oxigenados presentes en la estructura de la oxitetraciclina (OTC) le permiten tener regiones de alta reactividad en donde se constituye la formación de interacciones intermoleculares que facilitan su estabilización en el sitio activo de la enzima Dlac de *Cerrena sp.*

## 3. Objetivo General

Estudiar, por medio de métodos de química computacional, la reactividad del antibiótico oxitetraciclina (OTC) antes y después de interactuar con la enzima Dlac proveniente del hongo *Cerrena sp.*

### 3.1. Objetivos Específicos

- Realizar búsqueda del conformero de mínima energía y optimización de geometría molecular para la molécula de oxitetraciclina (OTC), utilizando PCModel v10.0 y Gaussian '16.
- Obtener el complejo enzima-sustrato entre oxitetraciclina y Dlac, utilizando AutoDock 4.2.
- Construir un complejo Dlac-OTC a partir del resultado entregado del Docking molecular.
- Caracterizar la reactividad mediante índices globales y locales propios de la DFT de los sistemas moleculares correspondientes a OTC y el complejo Dlac-OTC.
- Comparar los efectos de reactividad de la oxitetraciclina por sí sola con el complejo Dlac-OTC.
- Describir la transferencia de cargas a partir del método NBO para la molécula de OTC y el complejo Dlac-OTC.

## 4. Metodología

### 4.1. Búsqueda conformacional y optimización de geometría molecular para oxitetraciclina

Inicialmente desde Drugbank se obtuvo la estructura molecular de la oxitetraciclina a la cual mediante PCModel v10.0 se realizó una búsqueda conformacional con un campo de fuerza MMFF94, el cual demuestra buen rendimiento en la evaluación de compuestos orgánicos. Posteriormente, se hizo una optimización de geometría molecular en Gaussian '16 revisión C.01 empleando el funcional híbrido B3LYP con conjunto de base 6-311+G (d,p), modelado en vacío.

### 4.2. Docking molecular

Se estableció la posición espacial de la OTC en el sitio activo de la Dlac por medio de DM utilizando la enzima Dlac de *Cerrena sp.* RSD1, obtenida desde Protein Data Bank (PDB) con código de acceso PDB ID 5Z1X. En el software AutoDock 4.2, la enzima fue reducida a un monómero y se eliminó la presencia de solvente, se adicionaron hidrógenos polares y no polares a la enzima para calcular las cargas de Gasteiger. Posteriormente, fue agregada la molécula de OTC optimizada previamente en Gaussian para determinar las cargas de Gasteiger en el sistema completo (Huey *et al.*, 2007).

En el sector del sitio activo de la enzima se estableció la grilla de docking ubicando su centro sobre la posición el Cu T1 (mononuclear), estableciendo el sector donde se ubicaría el sustrato. Finalmente, fue constituido un análisis de ranqueo de clústeres que establece una clasificación de las posiciones del sustrato en función de la energía de afinidad que presentan (Huey *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2009).

### 4.3. Construcción del Sitio Activo Reducido (RS)

Desde el modelamiento por DM, se seleccionó la pose de la menor energía de enlace, a la cual se evaluaron y visualizaron las interacciones intermoleculares existentes entre el sustrato y la enzima. En función de esto, se seleccionaron los residuos aminoacídicos del sitio activo de la enzima que interactúan con la OTC, al cual se le denominó sitio activo reducido. Cuando el sitio activo reducido está en presencia del sustrato se le denominó complejo Dlac-OTC.

### 4.4. Determinación de Índices de Reactividad

#### 4.4.1. Detalles Computacionales

El estudio de reactividad química comenzó con una caracterización de la OTC, el sitio reducido sin ligando y el complejo Dlac-OTC realizando cálculos energéticos con ausencia de solvente empleando el funcional híbrido  $\omega$ B97Xd y el conjunto base 6-31+G (d,p) en Gaussian '16 acompañado de Gabedit, funcional híbrido utilizado cual corrige las dispersión en las interacciones para sistemas orgánicos describiendo de

mejor manera la interacción de densidades. Estos cálculos facilitan la obtención de los índices globales y locales de reactividad de los sistemas estudiados (Alleouche, 2017; Frisch *et al.*, 2016).

#### 4.4.2. Índices Locales (Funciones de Frontera)

Para poder establecer el comportamiento nucleofílico y electrofílico de la OTC y el complejo Dlac-OTC, se realizó un análisis bajo el método DFT con una aproximación con Orbitales Moleculares de Frontera (FMO), lo cual determina el comportamiento electrónico en los sistemas moleculares. Para posteriormente ser evaluados mediante cubos de densidades, dichas operaciones fueron realizadas desde las utilidades de Gaussian '16. Luego, mediante el software Gabedit se tabularon las funciones de Fukui condensadas, que permiten la descripción de los índices de reactividad al átomo (Bulat *et al.*, 2004; Chamorro & Pérez, 2005; Fuentealba *et al.*, 2000).

#### 4.4.3. Descriptor Dual de Reactividad

Al obtener los valores de las funciones de Fukui es posible obtener el descriptor dual de reactividad el que indica la tendencia de los átomos a un comportamiento nucleofílico o electrofílico, estableciendo que cuando  $f^2(r) > 0$  el sitio (r) posee una preferencia por un ataque nucleofílico. En cambio, cuando  $f^2(r) < 0$  el sitio (r) posee preferencias por un ataque electrofílico, confirmando lo entregado por las funciones condensadas. Además, en complemento con Chemcraft, se obtuvieron los valores del dual por cada átomo (Morell *et al.*, 2005). referente al descriptor dual de reactividad.

#### 4.5. Metodología NBO

Bajo la implementación del programa computacional NBO versión 6.0, fue ejecutado un análisis de perturbaciones de Segundo Orden (E2PERT), el cual localiza las zonas de estabilización en los complejos moleculares identificando los orbitales donores y aceptores para el movimiento de electrones dentro de un sistema molecular. Estos factores de transferencia de cargas facilitan la identificación de las interacciones intermoleculares permitiendo la confirmación o desestimación de estas en un sistema enzima-sustrato. Además, en Chemcraft se visualizaron los orbitales en las regiones de los complejos moleculares que involucran dichas interacciones entre átomos donores y aceptores de carga (Glendening *et al.*, 2013; Kanagathara *et al.*, 2022).

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Obtención de molécula OTC optimizada

Se llevó a cabo la búsqueda conformacional de la OTC, la que culminó en el conformero de mínima energía, al cual se le realizó una optimización de geometría molecular, obteniendo:

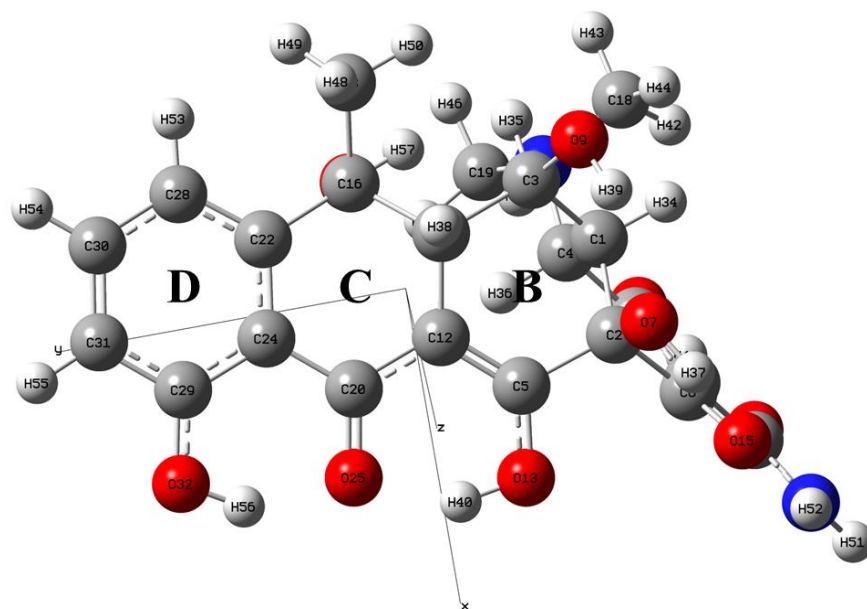


Figura 10. Estructura optimizada de la oxitetraciclina, visualizando los anillos D (aromático), C y pliegue entre anillos B y A. Las coordenadas cartesianas son expuestas desde el centro de la molécula (determinado por el software).

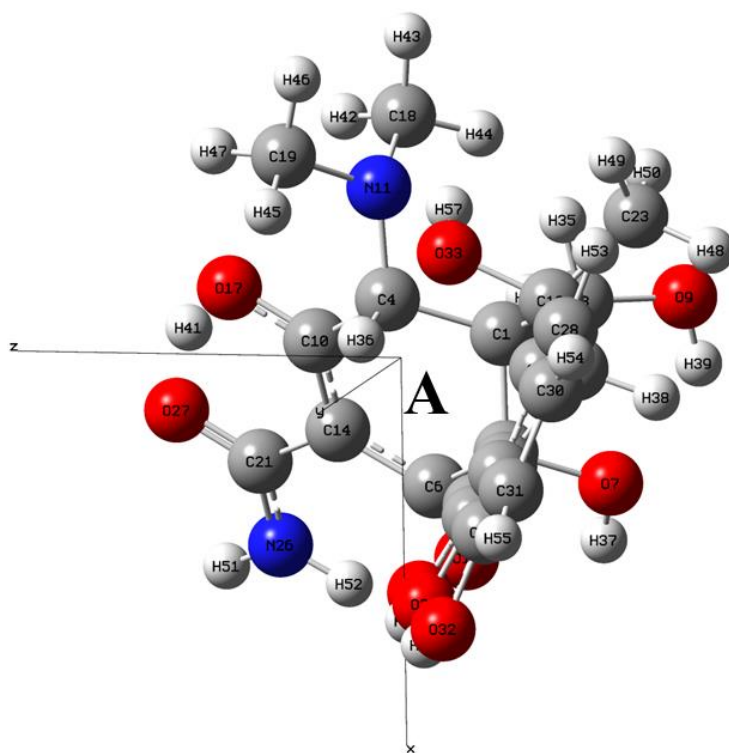


Figura 11. Estructura optimizada de la oxitetraciclina, Torsión entre anillos A y B. Las coordenadas cartesianas son expuestas desde el centro de la molécula (determinado por el software Gaussian 16').

Las Figuras 10 y 11 exponen los 4 anillos de la OTC, D, C, B y A, mostrando que la molécula posee una torsión entre el anillo A y B. Por otra parte, en la parte superior de los anillos D, C y B se observa la tendencia de los hidrógenos de los grupos hidroxilos sustituidos en los carbonos C5 y C29 para orientarse en dirección del grupo cetona compuesta por O25, manteniendo rígida la secuencia D, C, B hasta el pliegue.

## 5.2. Docking Molecular (DM)

En consistencia con el mecanismo de acción de la enzima Dlac, se centró la grilla de docking sobre el cobre T1 de la enzima, debido a que este centro metálico es quien realiza el transporte de electrones desde el sustrato hacia la enzima, en este caso, la oxitetraciclina. La posición espacial de la grilla o zona de encaje molecular es posible visualizarla en la Figura 12.

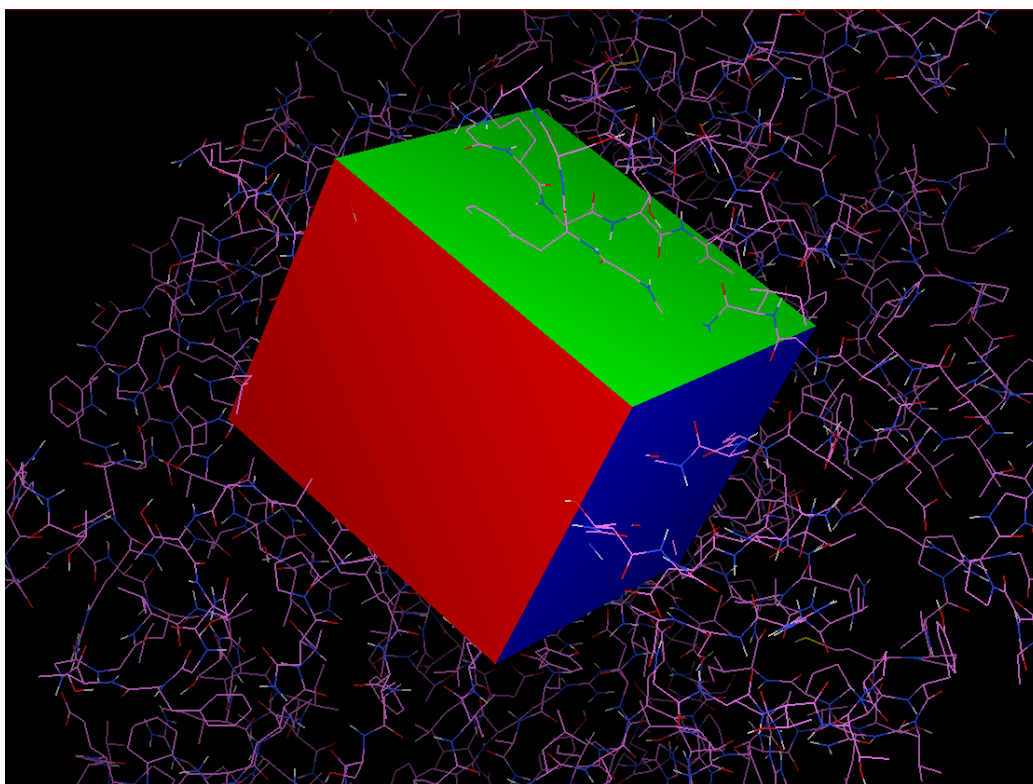


Figura 12. Caja de trabajo en Docking molecular, con centro sobre Cu T1.

A partir del modelamiento se obtuvo la posición de mínima energía de enlace. Esta posición expresa como se localizaría la OTC en el sitio activo de la enzima. Además, se obtuvo la energía libre ( $\Delta G^\circ$ ), la energía interna ( $u$ ) y la entropía ( $s$ ), además de la energía de afinidad entre el ligando y la enzima.

Tabla 4. Valoración energética de Docking Molecular.

Variable energética	Valor ( $Kcal \cdot mol^{-1}$ )
Energía Libre ( $\Delta G^\circ$ )	-1367,25
Energía Interna ( $u$ )	-3,01
Entropía ( $s$ )	4,58

Con respecto a estos valores (Tabla 1), la energía libre ( $\Delta G^\circ$ ) demostró un valor de  $-1367,25 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ , lo que significa que la OTC es estable en el sitio activo de la enzima y puede generar interacciones intermoleculares consistentes para la constitución del complejo enzima-sustrato. Por su parte, para la energía interna ( $u$ ) se encontró un valor adecuado en el exceso energético que posee la OTC al interactuar con la enzima para la formación del complejo lo que no genera efectos adversos, que dificulten la conformación del complejo. Por lo cual, es viable la formación del sistema Dlac-OTC.

Para la entropía ( $s$ ) se obtuvo el valor de  $4,58 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ , lo que indica que no existen torsiones en el complejo que afecten a la distribución de energía en el sistema. Por ello, a partir de la entropía podemos indicar que geoméricamente el complejo esta equilibrado o es estable.

La estimación de energía libre de enlace es la sumatoria de las variables energéticas: Energía intermolecular, Energías de van der Waals (vdW), puentes de hidrogeno (Hbond), energía del disolvente (Dsolv), energía electrostática, energía total interna, energía de torsión libre y energía del sistema no enlazante.

*Tabla 5. Determinación de la energía libre de enlace en Docking molecular*

<b>Variables Energéticas</b>	<b>Valor (<math>\text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}</math>)</b>
Energía Intermolecular	-6,38
vdW + Hbond + Dsolv	-5,80
Energía Electroestática	-0,58
Energía Total Interna	-1,62
Energía Libre de Torsión	+2,39
Energía del Sistema No Enlazante	-1,62
Energía de Enlace Libre	-3,99

Esta energía expresa la afinidad entre el sustrato entrante (OTC) y la enzima, además de la eficiencia que posee el sustrato al interactuar con esta misma. Para el caso de la formación del complejo Dlac-OTC, se estimó una energía de  $-3,99 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Tabla 2), lo cual es un valor que se asocia a una alta afinidad entre el sustrato y la enzima. Debido al método en que se determina el valor energético, este nos permitió comprobar que la presencia de las interacciones entre enzima-sustrato son afines y viables.

La constitución del complejo Dlac-OTC proporcionó la visualización de las interacciones formadas en el sistema (Figura 13). En función de las interacciones, fue posible identificar a los residuos aminoacídicos del sitio activo que son participes de la estabilización de la OTC en la enzima. Pudiendo obtener imágenes especulares de la posición de la OTC y las interacciones formadas, imágenes que fueron denominadas posiciones A, B, C.

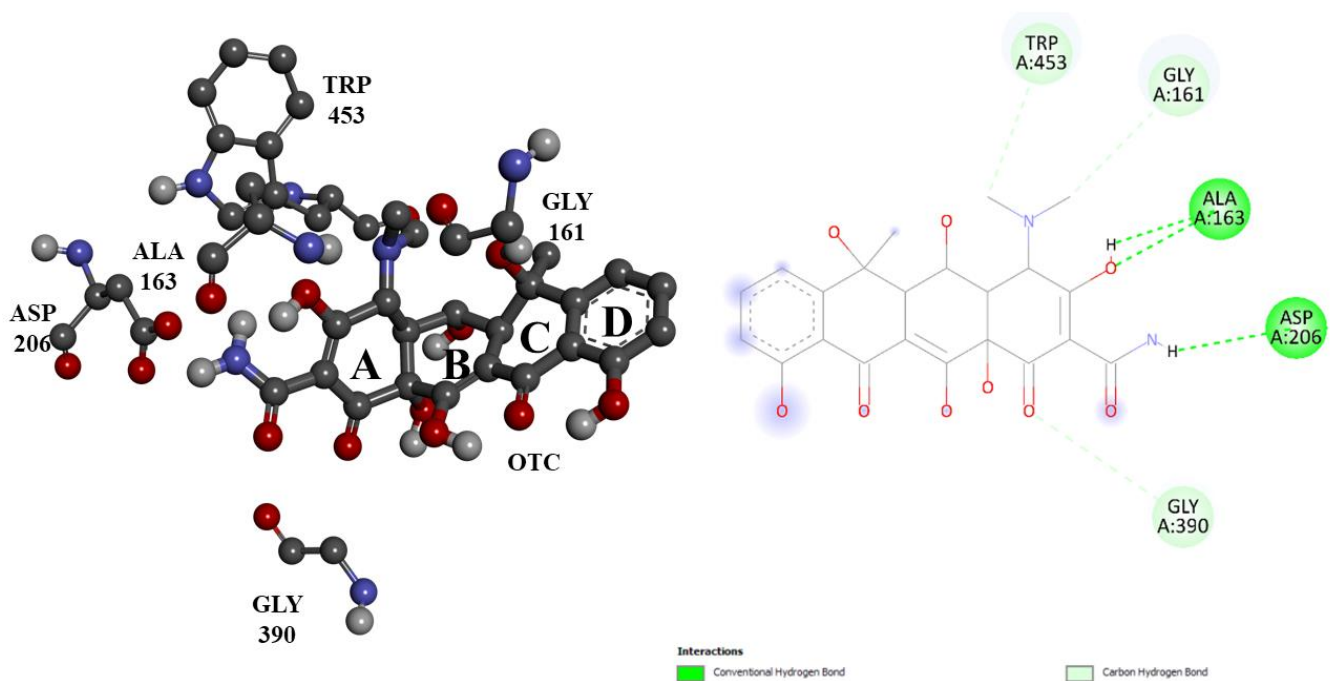


Figura 13. Visualización de pose con menor energía e interacciones intermoleculares en el sitio activo de Dlac (conformación complejo Dlac-OTC).

Como es posible observar en la Figura 13, los residuos aminoacídicos del sitio activo que presentaron interacciones con la OTC fueron Gly161, Ala163, Asp206, Gly390, Trp453, donde se formaron 3 interacciones de puentes de hidrógenos convencionales y tres puentes hidrógeno-carbono.

Para poder clasificar las interacciones, se utilizó como criterio de discriminación de Jeffrey postulado en 1997, en donde aquellas interacciones que posean una distancia menores a 2,5 Å son consideradas como fuertes o predominantes, las que se encuentren entre 2,5 Å y 3,2 Å son de carácter moderado, y sobre los 3,2 Å son consideradas débiles, en términos de energía (Dannenber, 1998; Jeffrey, 1997).

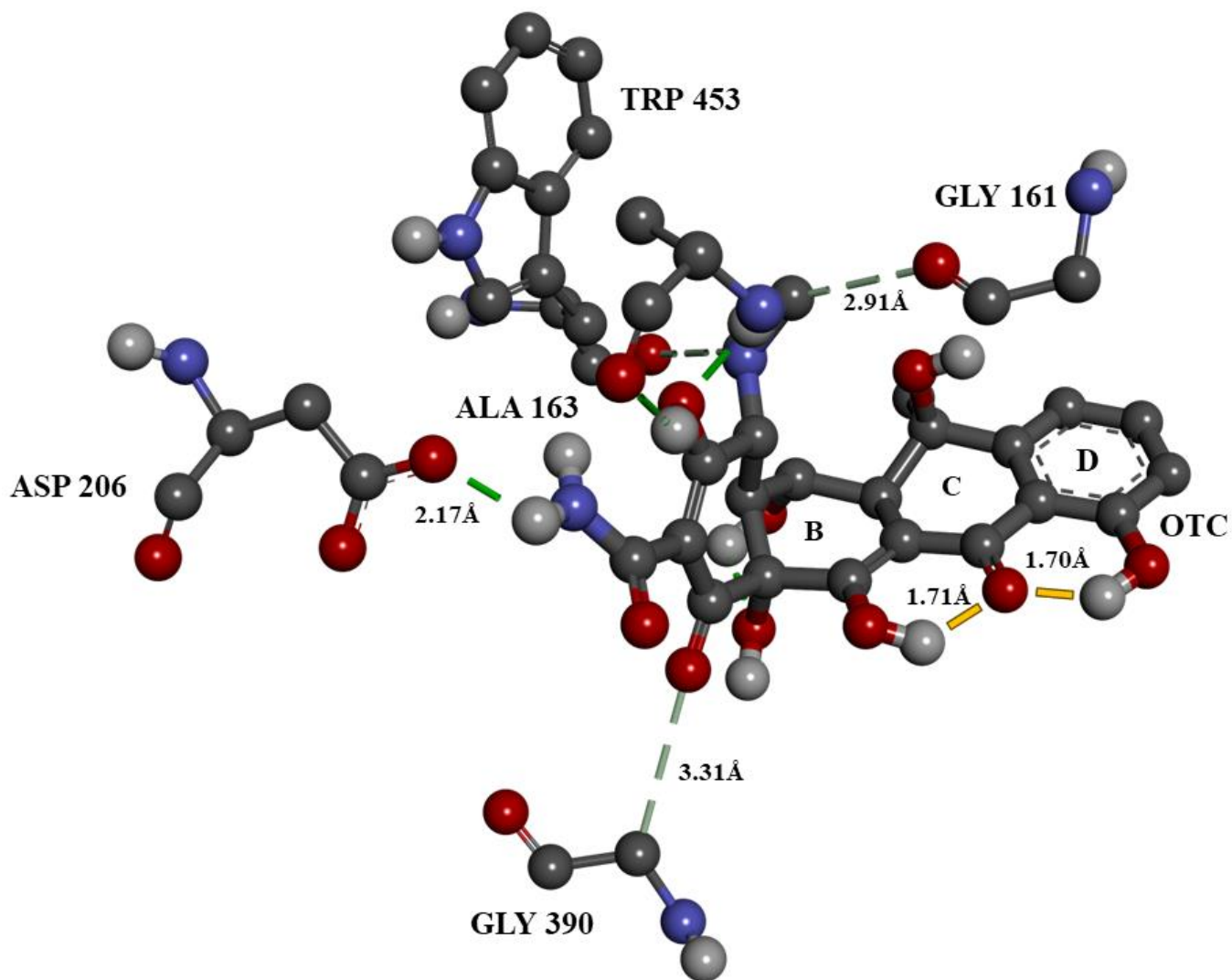


Figura 14. Complejo Dlac-OTC con distancias de interacciones intermoleculares (medidas en Ångstrom, Å), posición "A". dónde las interacciones intermoleculares son destacadas con coloración verde y las interacciones intramoleculares en OTC coloración amarilla.

A partir de la visualización de las interacciones en la posición "A" (Figura 14), es posible observar característicamente la presencia de dos interacciones intramoleculares (Destacadas de color amarillo) existentes entre los grupos oxigenados ubicados en los anillos B, C y D de la molécula de OTC los cuales poseen una distancia de 1,70 y 1,71 Å respectivamente, indicando que ambos puentes son interacciones fuertes o de alta energía. Por otra parte, la zona del anillo aromático (Anillo D) se encuentra ubicado hacia el exterior de la enzima; el sitio activo de la Dlac es un sitio hidrofóbico y por la naturaleza el anillo aromático se ubicaría correctamente lo más alejado posible del interior del sistema.

En la misma figura es observable la presencia de interacciones intermoleculares, destacándose en la figura la presencia de tres interacciones:

La primera, es una interacción oxígeno-carbono entre OTC y el aminoácido GLY390 de 3,31 Å, por lo que se categorizaría como una interacción débil.

La segunda a mencionar es una interacción oxígeno-hidrógeno entre OTC y ASP206 con una distancia de 2,17 Å, definida como una interacción fuerte.

Finalmente es posible visualizar una interacción oxígeno-carbono entre OTC y GLY161, con una distancia de 2,91 Å la que clasifica como moderada.

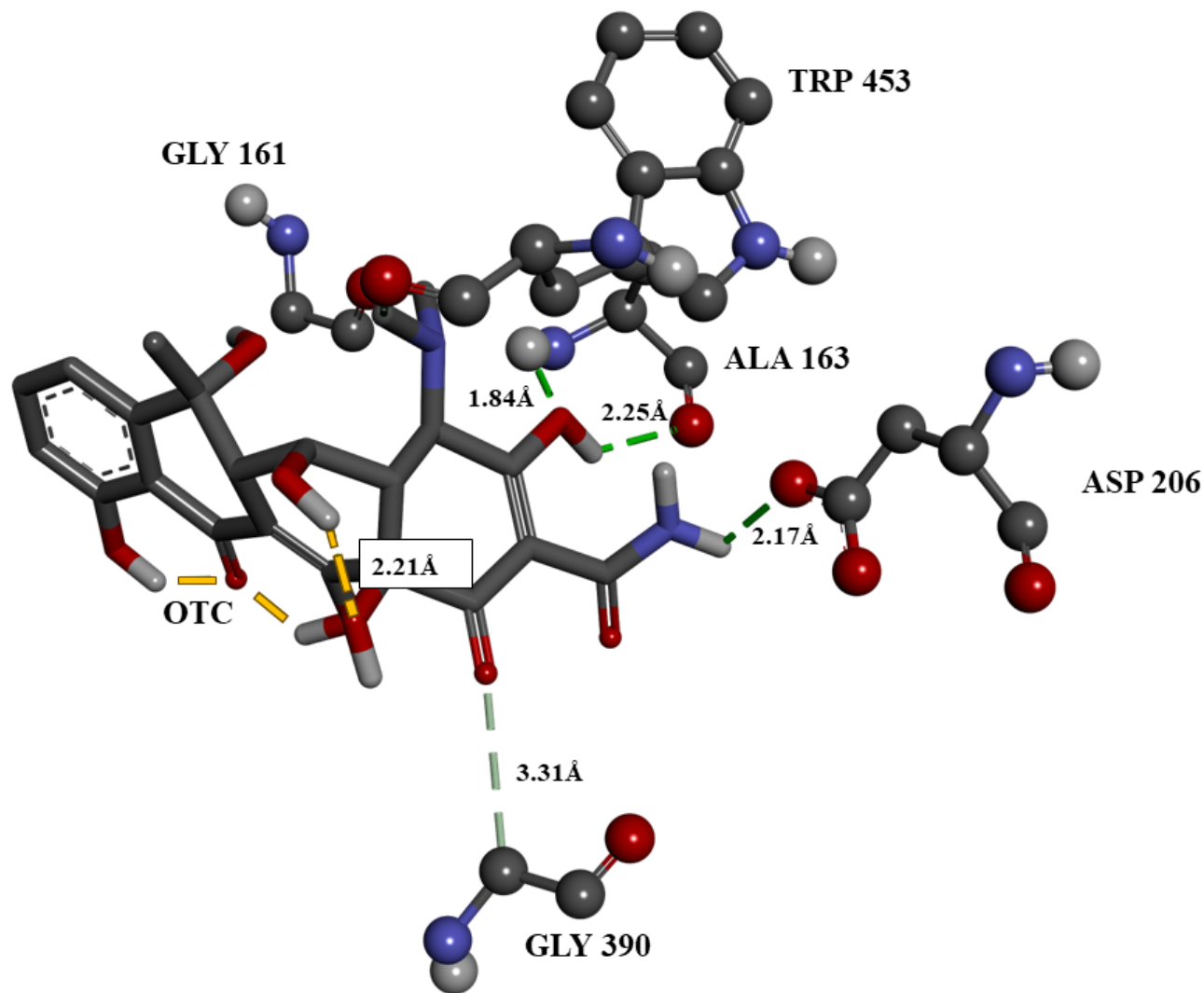


Figura 15. Complejo Dlac-OTC con distancias de interacciones intermoleculares (medidas en Armstrong), posición "B". identificando a las interacciones intermoleculares con coloración verde y las interacciones intramoleculares en OTC coloración amarilla.

Desde la visualización del complejo Dlac-OTC en la posición "B" (Figura 15), se observa a dos puentes de hidrógenos formados entre la OTC y ALA163, donde la primera interacción posee una distancia de 1,84 Å y la segunda de 2,25 Å, siendo entonces una interacción fuerte y moderada, respectivamente.

Además, es observable la presencia de una interacción intramolecular de la OTC situada sobre el anillo B (destacada de color amarillo), esta corresponde a una interacción de 2,21 Å categorizada como moderada y ocurre entre los grupos hidroxilos ubicados sobre el anillo B de la OTC.

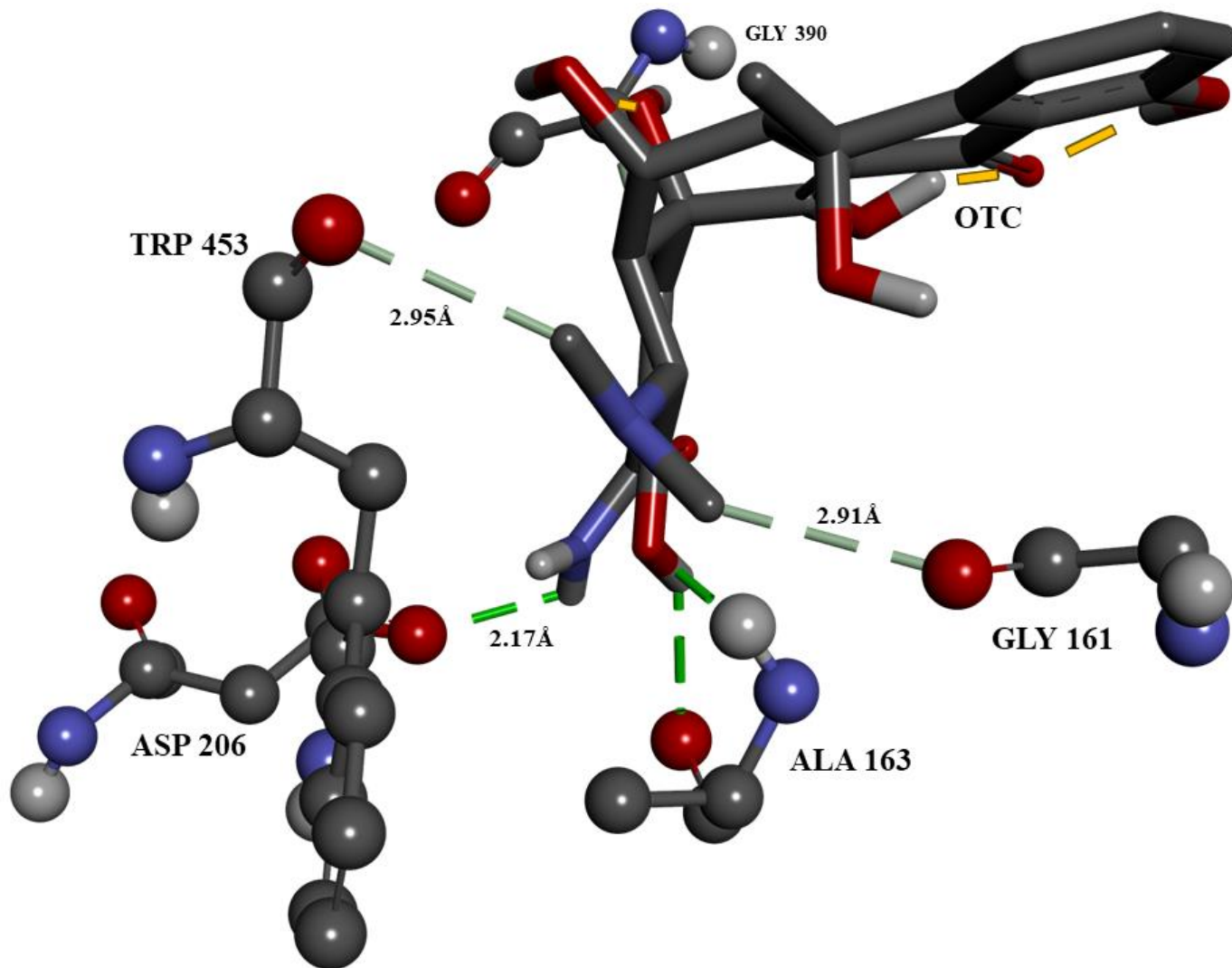


Figura 16. Complejo OTC-Dlac distancias de interacciones intermoleculares (medidas en Armstrong), posición “C”. identificando a las interacciones intermoleculares con coloración verde y las interacciones intramoleculares en OTC coloración amarilla.

En la Figura 16 es posible visualizar interacciones ya mencionadas en las perspectivas de posición “A” y “B” (Figuras 14 y 15), pero desde la posición “D” (Figura 16) se puede ver una interacción conformada entre OTC y TRP453, la cual es un puente de hidrogeno que posee una distancia de 2,95 Å, que clasificaría como una interacción de naturaleza moderada.

Por lo tanto, el complejo Dlac-OTC posee seis interacciones intermoleculares y tres interacciones intramoleculares en la estructura molecular de la OTC.

### 5.3. Construcción de Sitio Activo Reducido

Dado el tamaño del complejo Dlac-OTC, y considerando el tiempo de calculo que tomaría se decidió focalizar el estudio sobre la acción de la OTC en la enzima construyendo un sitio activo reducido a partir de las interacciones intermoleculares visualizadas y los residuos aminoacídicos involucrados en la constitución del complejo y se eliminó todo el excedente de la enzima que no presentaba interacción directa con la OTC, esta acción permitió la construcción de un complejo molecular más simple que permitiera optimizar los recursos computacionales (ver figura 18).

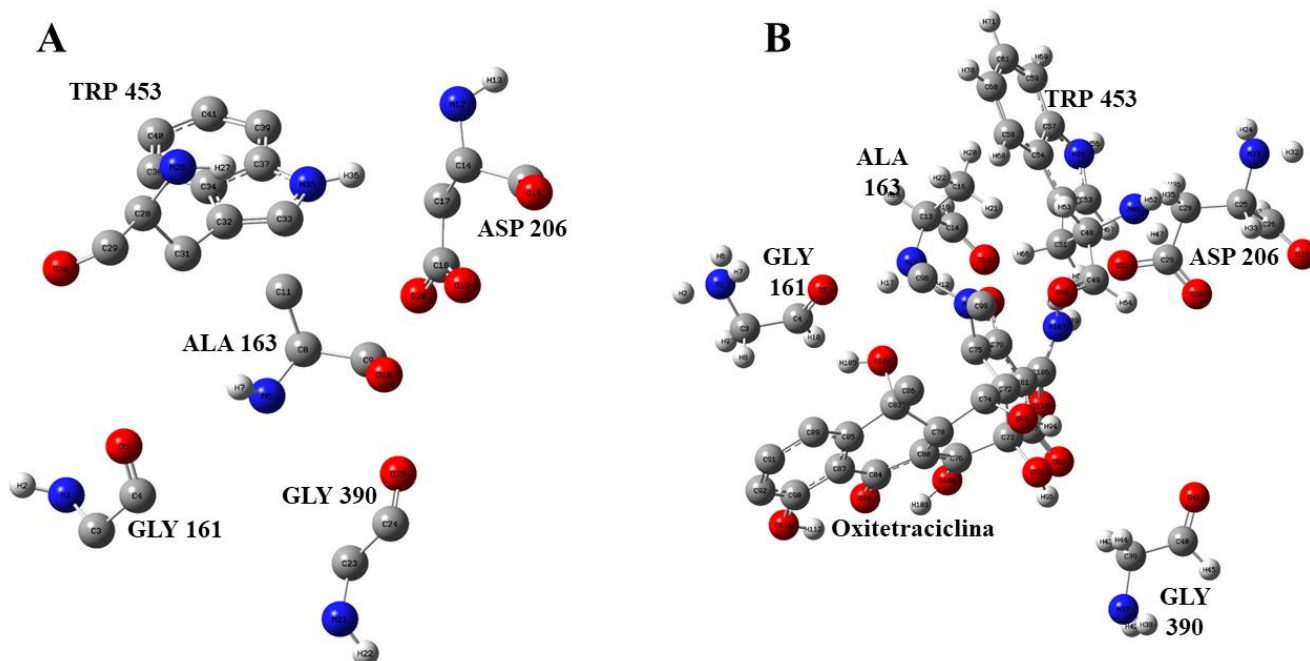


Figura 17. (A) Sitio activo de Dlac sin presencia de OTC. (B) Complejo Dlac-OTC (sitio activo reducido).

### 5.4. Análisis de Reactividad Química

#### 5.4.1. Índices Globales de Reactividad

Para poder establecer las variaciones en la reactividad global de los sistemas, se realizó la caracterización sobre la OTC, sitio activo sin sustrato y complejo Dlac-OTC lo que proporción información sobre la susceptibilidad de transferencia de carga (Electrones) entre sistemas.

Tabla 6. Índices de reactividad globales para oxitetraciclina, sistema reducido sin ligando y Complejo Dlac-OTC.

	Oxitetraciclina (OTC)	Sitio Reducido sin Ligando	Complejo Dlac-OTC
<b>Índice de Reactividad</b>		<b>Valor (eV)</b>	
Potencial Químico Electrónico ( $\mu$ )	-4,534497	-6,270201	-4,617940
Electrofilicidad ( $\omega$ )	2,614150	5,479650	3,863509
Dureza ( $\eta$ )	3,932763	3,587403	2,759844

Blandura ( $s$ )

0,254274  $eV^{-1}$

0,278753  $eV^{-1}$

0,362339  $eV^{-1}$

A partir de la información obtenida desde los índices globales (Tabla 3), se realizó una comparativa entre cada uno de los sistemas moleculares obtenidos, donde se encontró que la molécula de OTC presenta un  $\mu$  de -4,534497 eV y el sitio activo reducido sin ligando un  $\mu$  de -6,270201 eV. Con respecto a estos valores, aquel sistema que presente un  $\mu$  más alto transferirá carga a aquel de menor energía para ser estables, por lo cual, se establece una transferencia de carga desde la OTC al sitio activo. En la figura 18, por medio de la visualización de la estructura de OTC y del sitio reducido sin ligando, se ejemplifica el sentido de la transferencia. Por otra parte, en la Figura 17B, es posible observar la constitución completa del complejo Dlac-OTC con la pose que adquiere la OTC en el sitio activo.

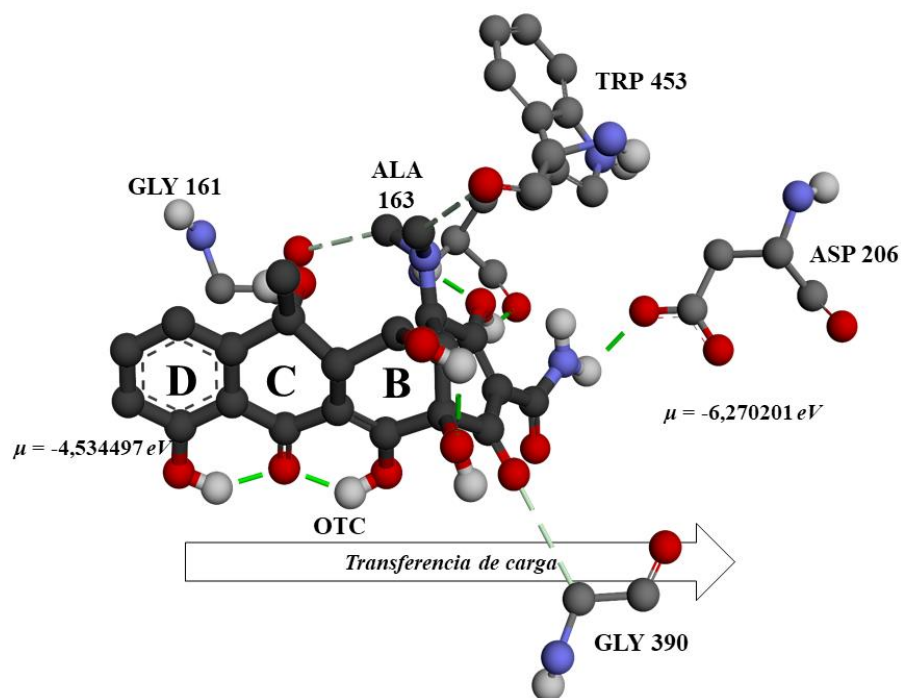


Figura 18. Sentido de transferencia de carga a partir del principio del potencial químico electrónico. Siendo la transferencia desde OTC (estructura en negro) a Dlac (Estructuras de residuos aminoacídicos en gris).

Por su parte, los valores de dureza ( $\eta$ ) señalan que el sitio reducido cuenta con un valor menor respecto a la OTC los que corresponden a 3,932763 eV y 3,587403 eV, respectivamente. Esto indica que tanto el sitio reducido como OTC poseen una tendencia a deformar su densidad y ser capaz de recibir o ceder una transferencia de carga.

La blandura ( $s$ ) expresó que el sitio reducido posee mayor blandura que la OTC, con valores de 0,278753  $eV^{-1}$  y 0,254274  $eV^{-1}$  respectivamente, indicando la tendencia del sitio a deformar su densidad electrónica (Modificar su carga). Finalmente, la Electrofilicidad ( $\omega$ ) muestra valores mayores para el sitio

reducido correspondiendo a 5,479650 eV y a 2,614150 eV para la OTC, expresando la tendencia del sitio reducido a modificar su densidad y mayor tendencia estabilizarse al recibir una perturbación externa, confirmando que el traspaso de carga es desde la OTC a la enzima, valores señalados en la Tabla 3.

### 5.4.2. Índices Locales de Reactividad

En los índices locales de reactividad expresaron mayor participación de los grupos oxigenados y nitrogenados de la OTC al entrar en presencia con Dlac ya que estos grupos son los encargados que generar las interacciones que estabilizan al sustrato en el sitio activo. Este análisis se llevó a cabo en paralelo con el método NBO. Por lo cual, para contrastar la reactividad local fue estudiada OTC y el complejo OTC-Dlac, permitiendo abordar el comportamiento de la OTC en presencia y ausencia de la enzima.

#### 5.4.2.1. Reactividad Local condesada en OTC

En el caso de la OTC, el estudio fue centrado discriminando respecto a su comportamiento en el sitio activo de la Dlac, utilizando como criterio la formación de interacciones intermoleculares, observado en la sección de docking molecular (Figuras 13 a 16), lo cual estableció una selección de átomos en la estructura de la OTC que fueron evaluados.

La OTC como estructura aislada de la enzima, reflejó que existiría más alta reactividad sobre los grupos nitrogenados y oxigenados de la molécula.

Tabla 7. Funciones de Fukui y descriptor dual para OTC.

Átomo	$f^-$	$f^+$	$f^2$	Susceptibilidad de ataque	Naturaleza del átomo
O13	0,026070	0,037538	0,01146	Nucleofílico	Electrófilo
O17	0,000892	0,012425	0,011533	Nucleofílico	Electrófilo
C20	0,291072	0,002298	-0,288774	Electrofilico	Nucleófilo
C21	0,261789	0,010152	-0,251637	Electrofilico	Nucleófilo
C24	0,151384	-0,008323	-0,159706	Electrofilico	Nucleófilo
O25	0,001555	0,003092	0,001537	Nucleofílico	Electrófilo
N26	0,0799947	0,038516	-0,041430	Electrofilico	Nucleófilo
O27	0,009124	0,001887	-0,007237	Electrofilico	Nucleófilo

Nota: los valores asociados a las funciones de Fukui son adimensionales.

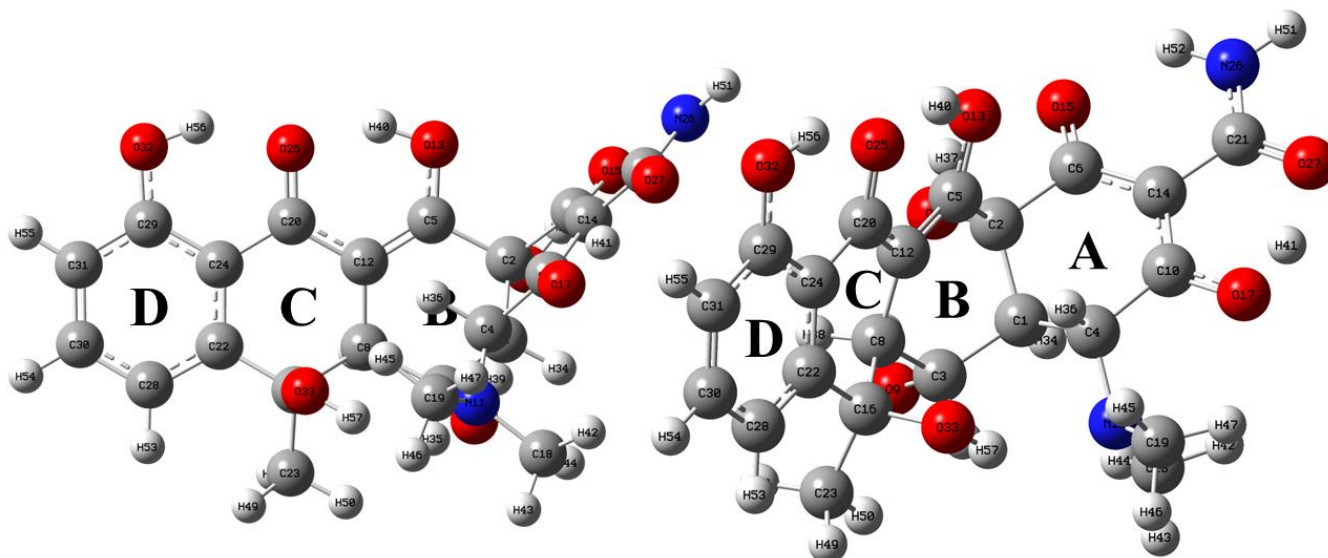


Figura 19. Estructura molecular de OTC con numeración de átomos.

Para poder confirmar los valores de las funciones de Fukui obtenidos, se utilizó conjuntamente el descriptor dual de reactividad postulado por Morell en 2005. Por lo tanto, dentro de la estructura de OTC (Tabla 7) encontramos que la principal característica de los grupos oxigenados es que poseen susceptibilidad a ataques nucleofílicos (para O13, O17, O25) (Figura 19), pero no siendo así para O25 quién demostró una susceptibilidad de ataque electrofílico. Por su parte, los carbonos asociados a las interacciones constituidas demostraron susceptibilidad de ataques electrofílicos describiendo tendencia a ceder electrones ante una perturbación externa. En el caso del nitrógeno N26 este presentó una susceptibilidad a ataques electrofílicos, lo que indica su tendencia a ceder electrones.

A su vez, los valores asociados al descriptor dual reflejaron la misma naturaleza que los resultados arrojados por las funciones  $f^-$  y  $f^+$  en cada uno de los átomos. Por ello, al seguir el principio establecido por Morell es confirmado que las susceptibilidades de ataques corresponden a lo arrojado por las funciones de Fukui.

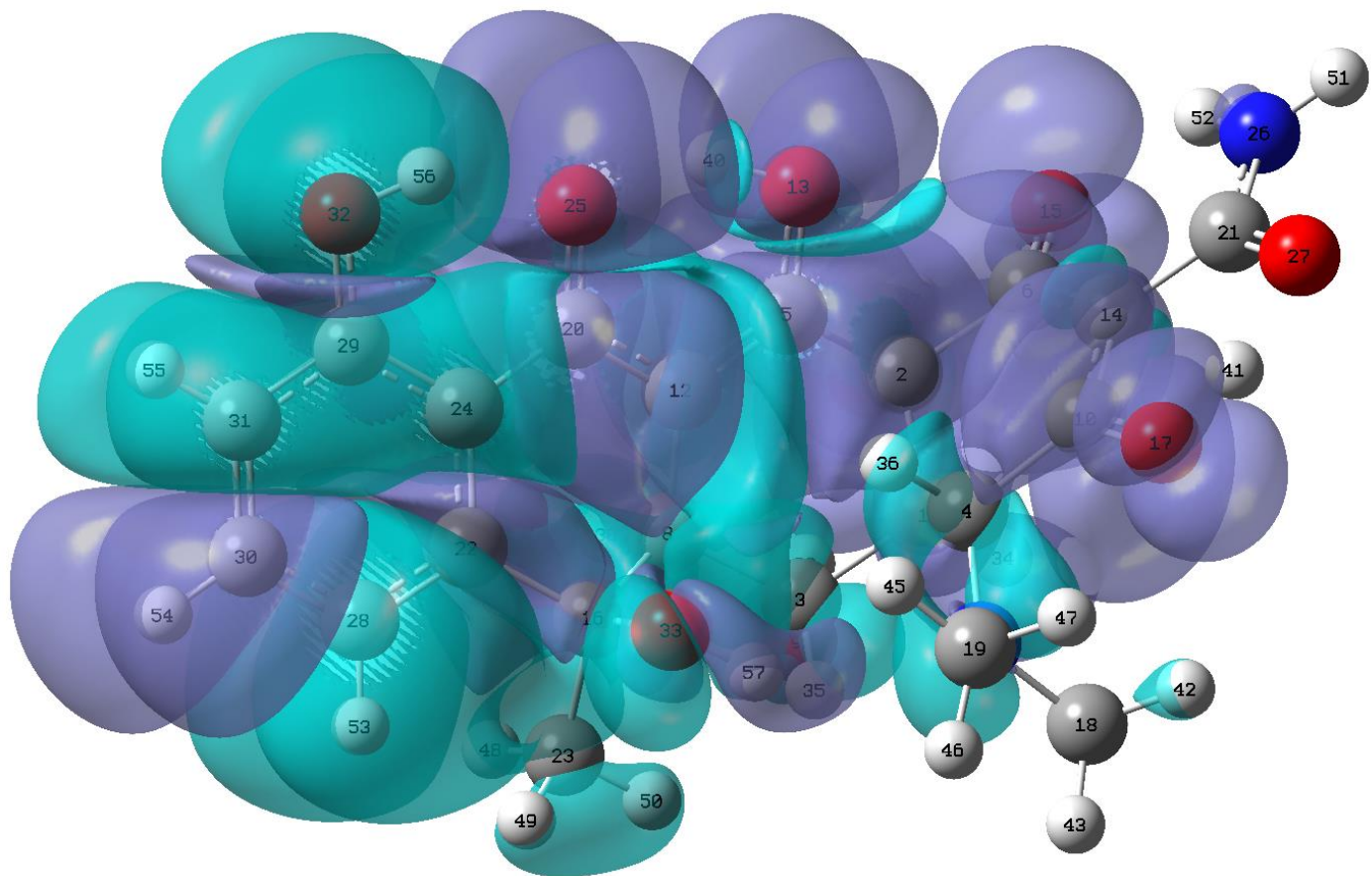


Figura 20. Descriptor Dual de oxitetraciclina ( $f^+$  = lila,  $f^-$  = verde agua).

Al visualizar las densidades del descriptor dual (Figura 20), es posible observar la presencia de las regiones electrofílicas y nucleofílicas de la OTC, donde cada una corresponde a los valores obtenidos y tabulados, asociando las regiones electrofílicas ( $f^+$ ) a la coloración lila y las regiones nucleofílicas ( $f^-$ ) a una coloración verde agua, además de esta forma es posible también ver la susceptibilidad a ataques nucleofílicos y electrofílicos, respectivamente de forma simultánea.

#### 5.4.2.2. Reactividad Local condensada en complejo Dlac-OTC

Para poder evaluar la reactividad de la OTC en el sitio activo de la Dlac se centró la atención en los mismos átomos que fueron analizados en la sección anterior (Reactividad de OTC, sección 6.4.2.1), esto con la finalidad de abordar los cambios o perturbaciones que sufrió la molécula al interactuar con la enzima. Por ello, al cambiar de sistema ocurrió un cambio de numeración de átomos en el sistema molecular (ya que fueron adicionados los del sitio activo reducido). Por ello, el sistema a evaluar bajo métodos DFT es el complejo Dlac-OTC.

Tabla 8. Funciones de Fukui y Descriptor Dual para Complejo Dlac-OTC.

<b>Átomos</b>						
N° átomos en OTC	N° átomos en Dlac-OTC	$f^-$	$f^+$	$f^2$	Susceptibilidad de ataque	Naturaleza de especie
O13	O100	0,178687	0,003201	-0,175486	Electrofilico	Nucleófilo
O17	O102	-0,002233	0,006004	0,008237	Nucleofilico	Electrófilo
C20	C84	0,728288	0,036323	-0,691966	Electrofilico	Nucleófilo
C21	C106	0,209490	0,009647	-0,199843	Electrofilico	Nucleófilo
C24	C87	1,338931	0,019580	-1,319351	Electrofilico	Nucleófilo
O25	O88	0,170182	0,003378	-0,166803	Electrofilico	Nucleófilo
N26	N107	0,000732	0,155053	0,154321	Nucleofilico	Electrófilo
O27	O110	0,002793	0,026415	0,023621	Nucleofilico	Electrófilo

Es observable que los átomos que se encuentran seleccionados para el estudio presentaron variaciones en los valores de sus funciones de Fukui y descriptor dual (Tablas 7 y 8). Este fenómeno era esperable, ya que al formar interacciones con la enzima adoptarían posiciones en donar o aceptar carga para la estabilización del complejo. Se obtuvo que los átomos más expuestos de la OTC (O13, O25, N26, O27) presentaron un cambio en su naturaleza, asociándose a la producción de una interacción con los residuos que se ubican en las cercanías de la OTC. Por otra parte, O17, C20, C21, C24 no presentaron un cambio en su naturaleza o comportamiento, lo cual indica que estos grupos están compensando el cambio de los átomos adyacentes con la finalidad de mantener la estructura estable.

Singularmente, existieron átomos como O25 que cambiaron su naturaleza expresando que, al existir la presencia de una interacción intermolecular en regiones adyacentes a él, este desplaza su densidad para compensar la carencia de carga que deja el traspaso de densidad hacia la enzima. Este fenómeno es importante porque gracias a este posicionamiento de la densidad de este oxígeno, es que se mantiene estable la estructura en esta región. Si lo comparamos con los resultados de docking molecular, en esa zona existen dos interacciones intramoleculares que son justificadas con el desplazamiento de las densidades de este oxígeno demostrando que la estabilidad de esa zona en la molécula se debe a la compensación realizada por este átomo.

### 5.5. Análisis de NBO (Orbitales Naturales de Enlace)

A partir de las estructuras de OTC y el complejo Dlac-OTC, se realizó un estudio NBO, en el cual se buscaron las energías de interacciones más altas y se realizó una comparativa de interacciones entre átomos, con la finalidad de comparar los resultados obtenidos del docking molecular con lo planteado por NBO.

Se comenzó con el análisis de la molécula de OTC aislada de la presencia de la Dlac, al igual que en la sección de reactividad vista con anterioridad.

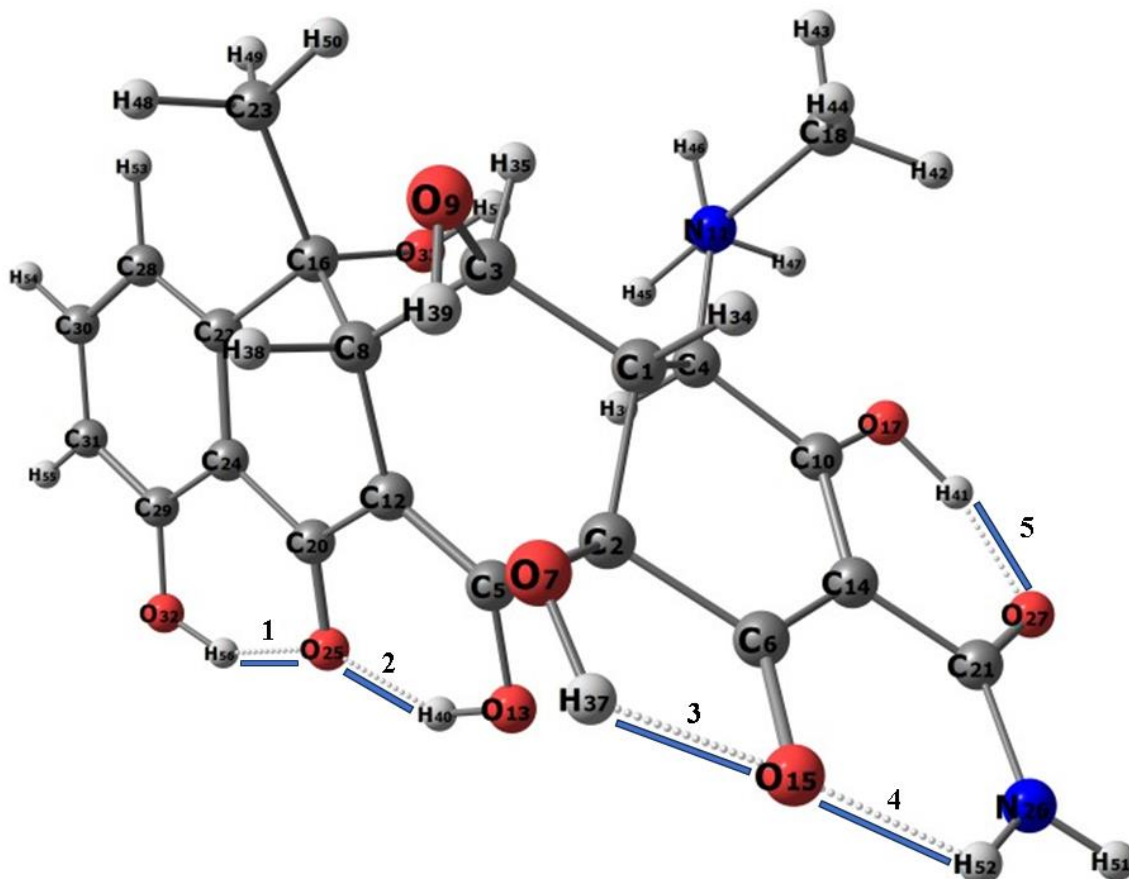


Figura 21. Visualización de OTC en Chemcraft, presencia de puentes de hidrogeno intramoleculares (destacados de coloración azul).

En la Figura 21, se muestra que a partir del método NBO sobre la estructura molecular de la OTC se reconocieron cinco puentes de hidrógeno intramoleculares. Los primeros puentes de hidrógenos abordados son los presentes en la zona inferior de los anillos, puentes que involucran a los átomos O25, O13, O32 y los hidrógenos H49 y H56.

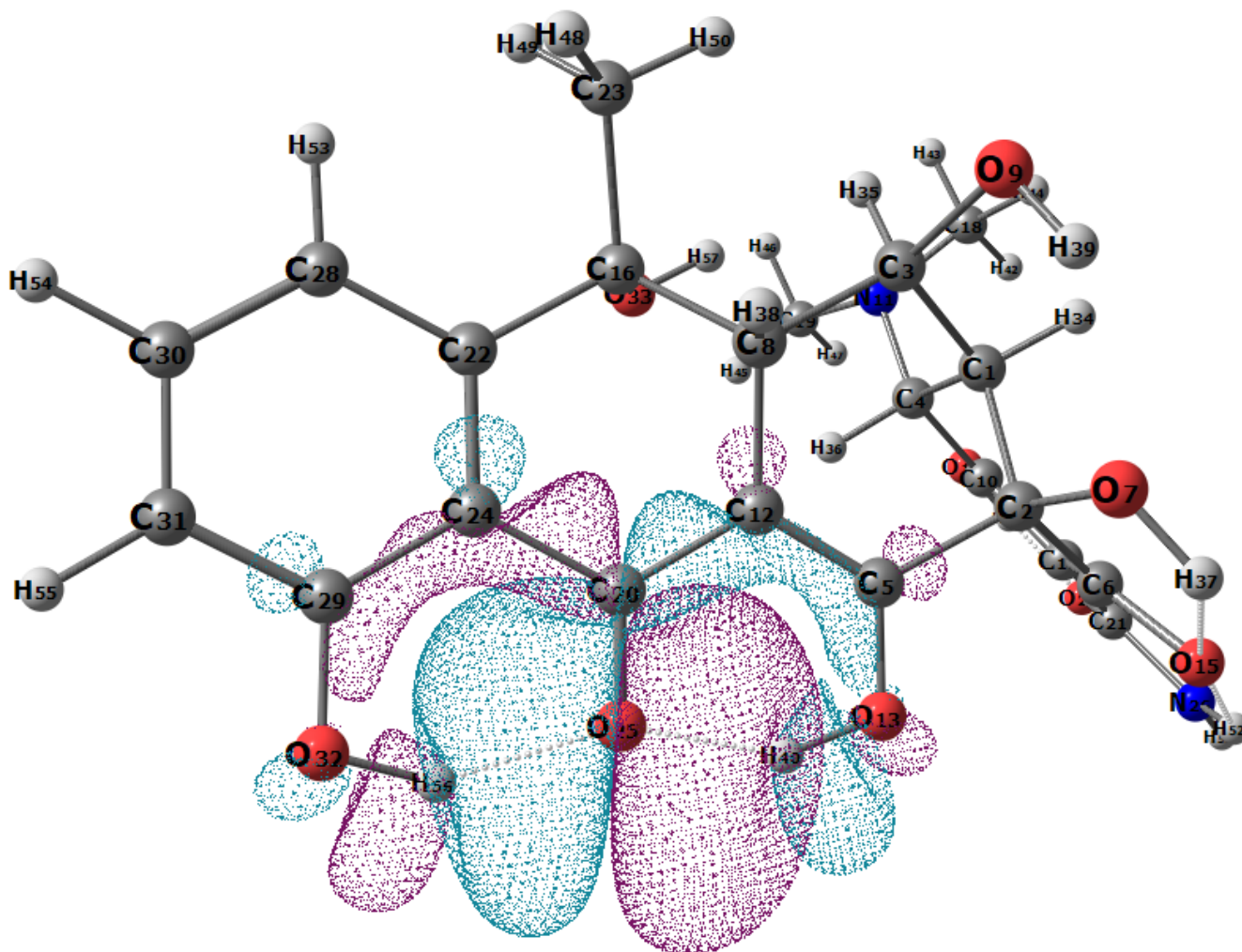


Figura 22. Densidades NBO 45-47, donador de densidad pares electrónicos libres pertenecientes a O25.

La composición de los puentes de hidrógenos intramoleculares formados por O25 se encuentra dispuesta como es reflejado en las Tablas 4 y 5:

Tabla 9. Perturbaciones del segundo orden de la matriz de fock en base NBO, NBO 45 - 47

Donor (L) NBO	Aceptor (NL) NBO	E2 ( $Kcal \cdot mol^{-1}$ )
45. LP (1) C24	167. BD* (2) C20-O25	142,90
47. LP (2) O25	153. BD* (1) O13-H40	25,26
47. LP (2) O25	188. BD* (1) O32-H56	12,34

Nota: la simbología corresponde; L: Lewis (Orbital Donor), NL: Non lewis (Orbital Aceptor), LP: Par Electrónico Libre, BD\*: Orbital Antienlazante

Tabla 10. Ocupancia de los orbitales NBO 45 - 47

Ocupancia	Orbitales
47. (1,86242) LP (2) O25	s (0,81%) p 99,99 (99,16%) d 0,05 (0,04%)

La Figura 22 muestra que la mayor densidad de las interacciones se sitúan sobre los pares electrónicos libres (LP) de O25 (Tabla 9), quienes para poder constituir los puentes de hidrogeno desplazan su densidad en dirección a los hidrógenos H40 y H56, esto debido a la presencia de los orbitales antienlazantes (BD\*) sobre O13-H40 y O32-H56 de la molécula (Tabla 9), Dicha densidad de pares libres observada tiene una ocupación del 99,16% de ellos, estos pares son ubicados sobre los orbitales p del átomo de oxígeno O25 (Tabla 10).

A su vez, para compensar la transferencia de densidad desde O25, el átomo de carbono C24 muestra una deslocalización de carga dirigida a los orbitales BD\* en C20-O25 (Tabla 9), desplazándola a la posición del O25, generando un flujo de transferencia de densidad para la estabilización de la región. El carbono C24 se permite esta capacidad de transferencia de carga porque pertenece al fragmento del anillo aromático, el cual mediante resonancia establece el un movimiento de carga completo.

El siguiente puente de hidrogeno se encuentra constituido por el átomo de oxígeno O27 hacia el hidrogeno H41, lo cual es visualizado en la Figura 22.

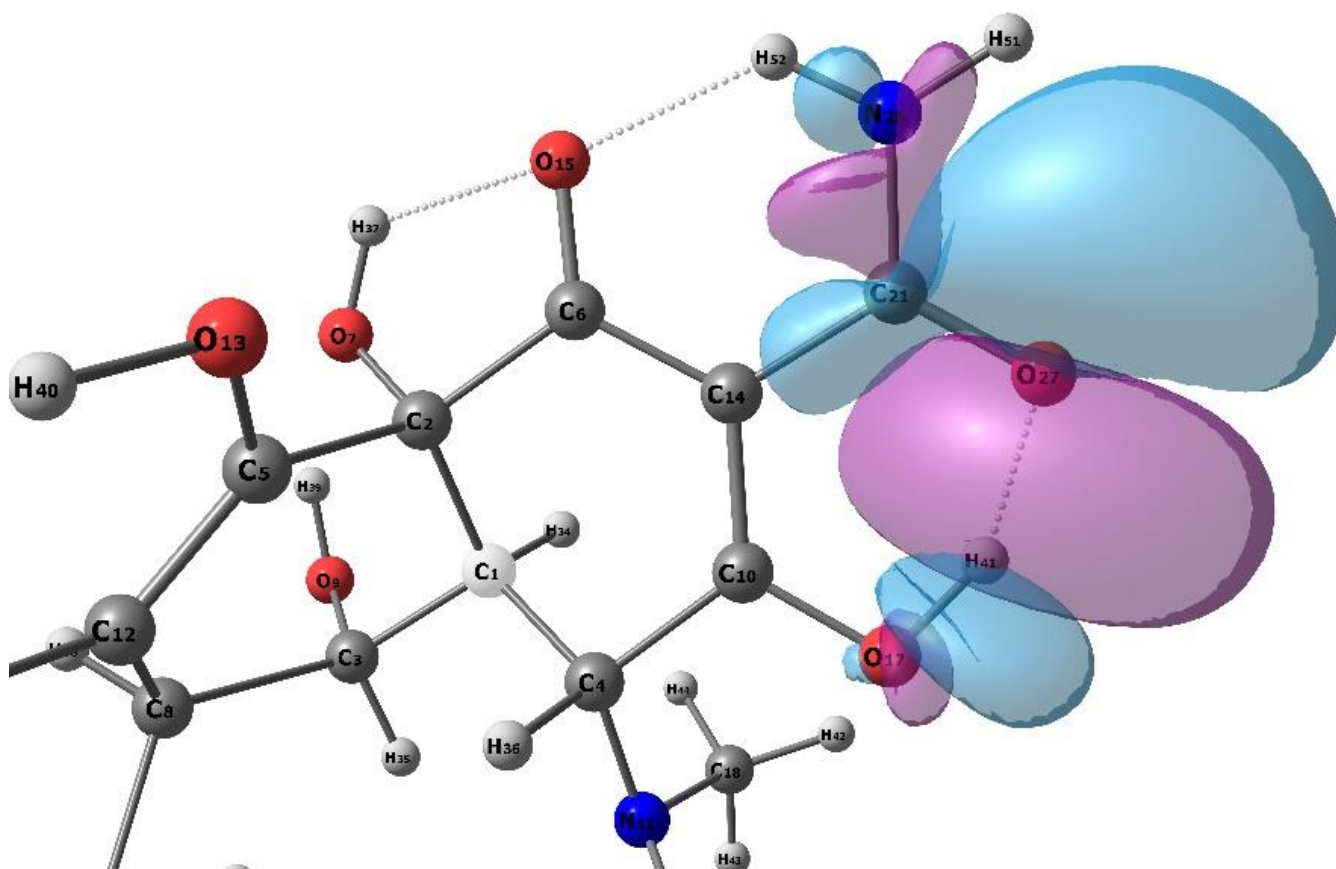


Figura 23. Densidades NBO 48-50, siendo donores de densidades los pares electrónicos libres de O27

Tabla 11. Perturbaciones de segundo orden de la matriz de fock en base NBO, NBO 48 -50

Donor (L) NBO	Aceptor (NL) NBO	E2 ( $Kcal \cdot mol^{-1}$ )
50. LP (2) O27	158. BD* (1) O17-H41	57,74
50. LP (2) O27	168. BD* (1) C21-N26	18,02
48. LP (1) N26	170. BD* (2) C21-O27	81,38

Tabla 12. Ocupancia de los orbitales NBO 48 - 50

Átomo en expresión NBO	Ocupancia de orbitales
48. (1,687660) LP (1) N26	s (0,01%) p 1,00 (99,98%) d 0,00 (0,02%)
50. (1,81137) LP (2) O27	s (8,87%) p 10,27 (91,07%) d 0,01 (0,06%)

El puente de hidrógeno cumple la función de estabilizar los orbitales antienlazante (BD\*) presentes entre O17-H41 y C21-N26 (Tabla 11). La estabilización está brindada por los pares electrónicos libres (LP) de O27 (Tablas 11 y 12), eso definido por la ocupación que posee la interacción, siendo en un 99,98% electrones de orbitales p. A su vez, con la finalidad de compensar el movimiento de densidad realizado por el LP de O27, N26 dispone de su LP para terminar de estabilizar la interacción entre ambas estructuras. El movimiento principal de las densidades asociadas a los pares electrónicos libres dispuestos por O27 se observa en la Figura 23, donde las densidades de mayor tamaño son dispuestas sobre el mismo átomo.

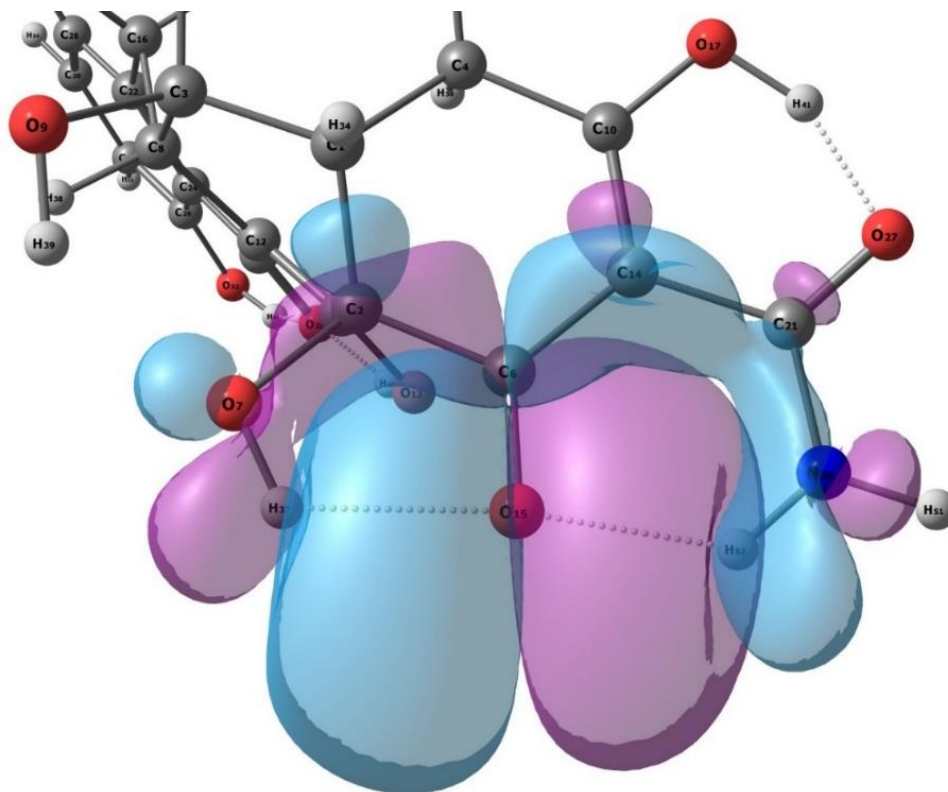


Figura 24. Densidades NBO 42, orbitales donores corresponden a LP de O15.

Tabla 13. Perturbaciones de segundo orden de la matriz de fock en base NBO, NBO 42.

Donor (L) NBO	Acceptor (NL) NBO	$E^2$ (Kcal · mol <sup>-1</sup> )
42. LP (2) O15	128. BD* (1) C2-C6	20,0
42. LP (2) O15	139. BD* (1) C6-C14	16,18

Tabla 14. Ocupancia de densidades NBO 42

Ocupancia	Ocupancia de orbitales
42. (1,87535) LP (2) O15	s (0,02%) p 99,99 (99,91%) d 2,89 (0,06%)

En la presencia de los puentes de hidrógenos constituidos sobre O15 (Figura 24) que en la Tabla 13 se describe que el segundo par electrónico libre del oxígeno se encuentra estabilizando dos orbitales antienlazantes ubicados sobre C2-C26 y C6-C14, por lo cual se puede decir que la presencia de los puentes constituidos por el primer par electrónico libre de O15 (Tabla 14), pero esto no puede ser establecido mediante tablas ya que la información entregada por el análisis NBO no detecta una interacción de ese par electrónico en sus resultados, siendo así complejo de describir esta interacción. Pero se puede predecir que el movimiento de carga busca compensar el desplazamiento de carga explicado con anterioridad entre O27 y N26, el cual desestabilizaría la región donde son ubicados los puentes de hidrógenos. Otro factor que podría mencionarse es que los puentes corresponden a un nivel energético fuera de lo establecido para el cálculo, impidiendo que aparezca en los resultados tabulados.

### 5.5.1. Análisis NBO en complejo Dlac-OTC

NBO al ser un método que involucra la transferencia de cargas en el presente estudio su resultado es comparado con lo obtenido de la visualización de interacciones desde DM, esto con el propósito de poder confirmar o desestimar la presencia de las interacciones en el complejo.

El complejo Dlac-OTC obtenido que se compone de cinco residuos aminoacídicos más la OTC los que software utilizado reconoció para referirse a cada uno ellos por separado como “unidad”. La organización por unidad proporcionada por el programa se encuentra presentada en la siguiente Tabla:

Tabla 15. Asignación de unidades a residuos aminoacídicos presentes en el RS, desde NBO 6.0.

Unidad	Segmento asociado
Unidad 1	Glicina 161 (Gly161)
Unidad 2	Alanina 163 (Ala163)
Unidad 3	Ácido Aspártico 206 (Asp206)
Unidad 4	Glicina 390 (Gly390)
Unidad 5	Triptófano 453 (Trp453)

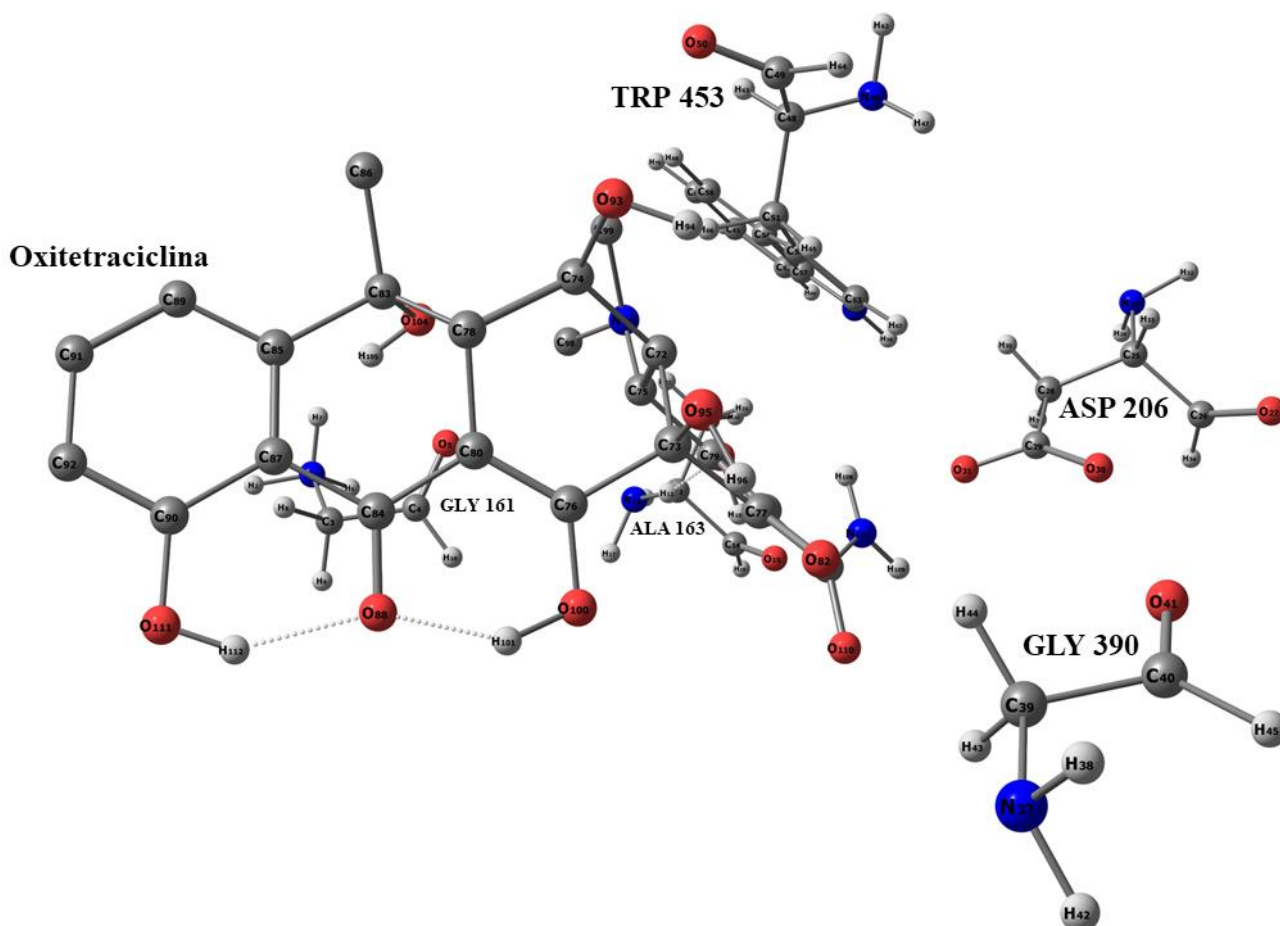


Figura 25. Complejo OTC-Dlac, visualización de interacciones intermoleculares a partir de método NBO.

Para lo que fueron los resultados de NBO sobre el complejo Dlac-OTC se utilizó como condición de discriminación un valor para  $E2$  superiores a  $1,00 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ , en función de esto hubieron interacciones existentes que no fueron identificadas en el sistema, lo cual puede asociarse a que las energías de las interacciones son de menor energía a lo requerido para la visualización de ellas, sus distancias sobrepasan lo que NBO puede captar o simplemente la interacción puede clasificarse como de otra naturaleza por ejemplo no covalente.

Si comparamos la visualización de los resultados obtenidos a partir del DM con los obtenidos mediante NBO, se nota una diferencia en la cantidad de interacciones intermoleculares identificadas por cada uno de los métodos. En el que para el método DM fueron identificadas 9 interacciones totales, entre inter e

intramoleculares para el sistema (Figura 13). Por otro lado, el método NBO visualizó únicamente una interacción intermolecular entre la OTC y Ala163 (Ver figura 26).

Dentro de lo que fue la organización por unidades que brindó el software para NBO, podemos distinguir secciones donde se selecciona una unidad como donora y otra como aceptora de pares electrónicos. Por ello se comienza considerando como donora a la molécula de OTC hacia los residuos de la enzima, para posteriormente analizar en sentido opuesto (residuos como donores y OTC como aceptora).

### 5.5.2. Donación desde OTC a ALA 163

Para lo que fue la donación de densidad o carga desde la OTC y como se mencionó con anterioridad, fue identificada una interacción de alta energía, la cual corresponde entre OTC y Ala 163:

Tabla 16. Perturbaciones de segundo orden de matriz de fock en base NBO, NBO 102 - 103 – 239.

Donor (L) NBO	Aceptor (NL) NBO	E2 (Kcal · mol <sup>-1</sup> )
102. LP (1) O102	259. BD* (1) N11-H12	19,44
103. LP (2) O102	259. BD* (1) N11-H12	11,98
239. BD (1) O102-H103	259. BD* (1) N11-H12	17,45

Tabla 17. Ocupancia de densidades NBO 102 - 103 – 239.

Ocupancia NBO	Ocupancia de orbitales
102. (1,94568) LP (1) O102	s (42,59%) p 1,35 (57,41%)
103. (1,83338) LP (2) O102	s (1,19%) p 83.01 (98,81%)
239. (1,95504) BD (1) O102-H103	(79,91%) 0,8939* O102 s (20,07%) p 3,98 (79,93%) (20,09%) 0,4482* H103 s (100,00%)

En el fragmento del sitio reducido expuesto en siguiente la Figura 26, se observa la formación de una interacción intermolecular entre OTC y Ala163. Esta interacción se formó para compensar al orbital antienlazante (BD\*) ubicado sobre el fragmento N11-H12 del residuo aminoacídico (Tabla 16 y 17). La compensación está brindada por los pares electrónicos libres (LP) de O102, lo que se ve resumido en la Tabla 11, donde se observa los LP (1) y LP (2), siendo esta la densidad cedida en dirección a la alanina (Figura 26). Por lo cual el puente de hidrogeno se forma debido a la interacción entre O102 (Pertenece a OTC) y H12 (Pertenece a Ala163).

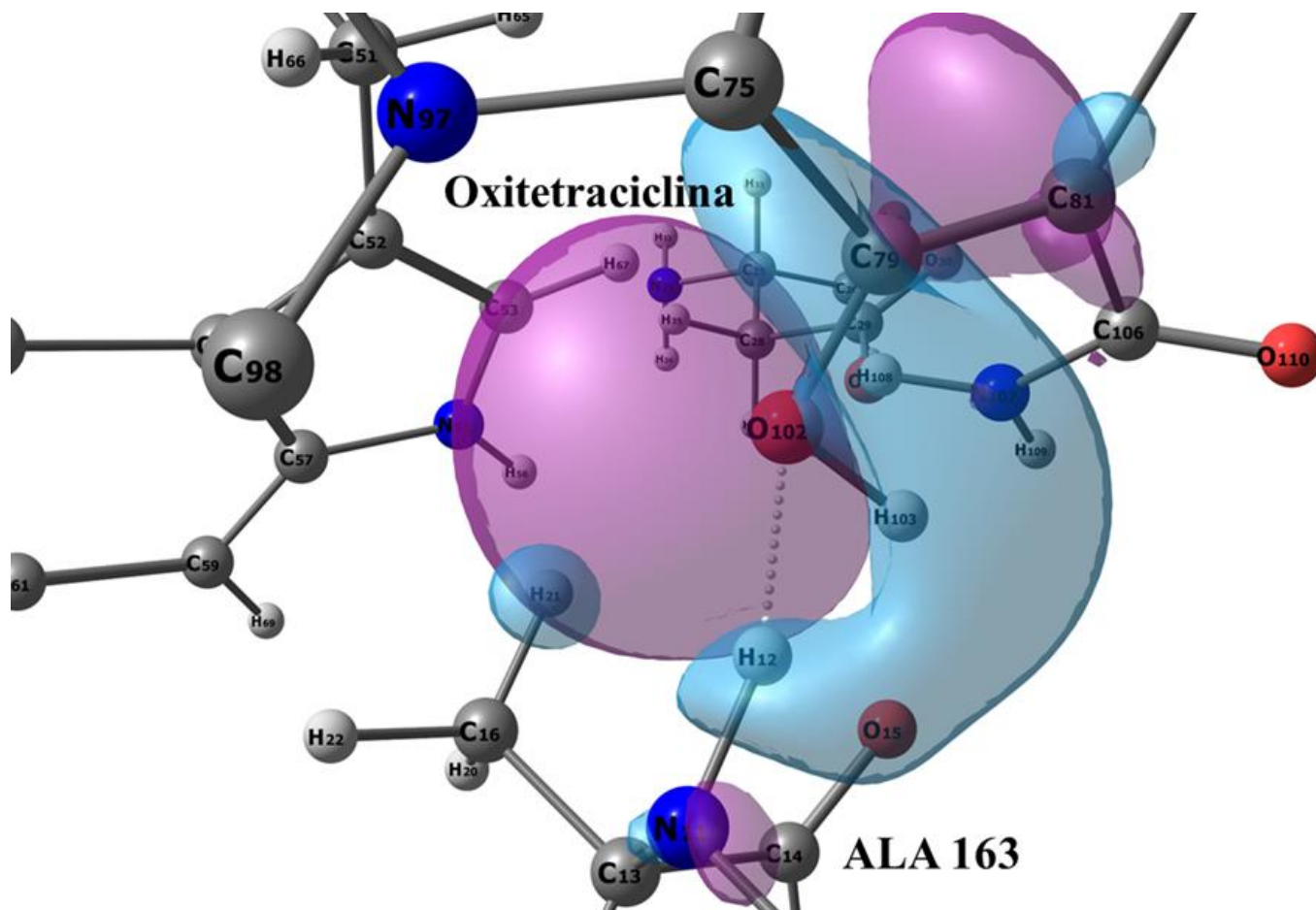


Figura 26. MO NBO 102, Donación desde OTC a ALA163, LP sobre O102 de OTC.

### 5.5.3. Donación Residuos a OTC

Posterior al análisis de la OTC como donante, se comprende que debe existir una estabilización por parte de la enzima al sustrato. Para ello, se analizaron los resultados donde las especies donoras eran los residuos aminoácidos presentes en el complejo Dlac-OTC. Se destacaron interacciones con los residuos aminoácidos Ala163 y Asp206.

En el caso de la Ala163, se observó que presenta una interacción muy cercana al puente de hidrogeno formado por la OTC con el mismo residuo aminoácido, debido a que involucra al mismo grupo funcional de la OTC y a la misma región de la Ala163.

Tabla 18. Perturbaciones de segundo orden de matriz de fock en base NBO y ocupancia del NBO 73.

Donor (L) NBO	Aceptor (NL) NBO	E2 (Kcal · mol <sup>-1</sup> )
73. LP (2) O15	377. BD* (1) O102-H103	6,17

Tabla 19. Ocupancia interacción OTC-Ala163

Átomo en expresión NBO	Ocupancia de orbitales
73. (1,89384) LP (2) O15	s (0,87%) p 99,99 (99,13%)

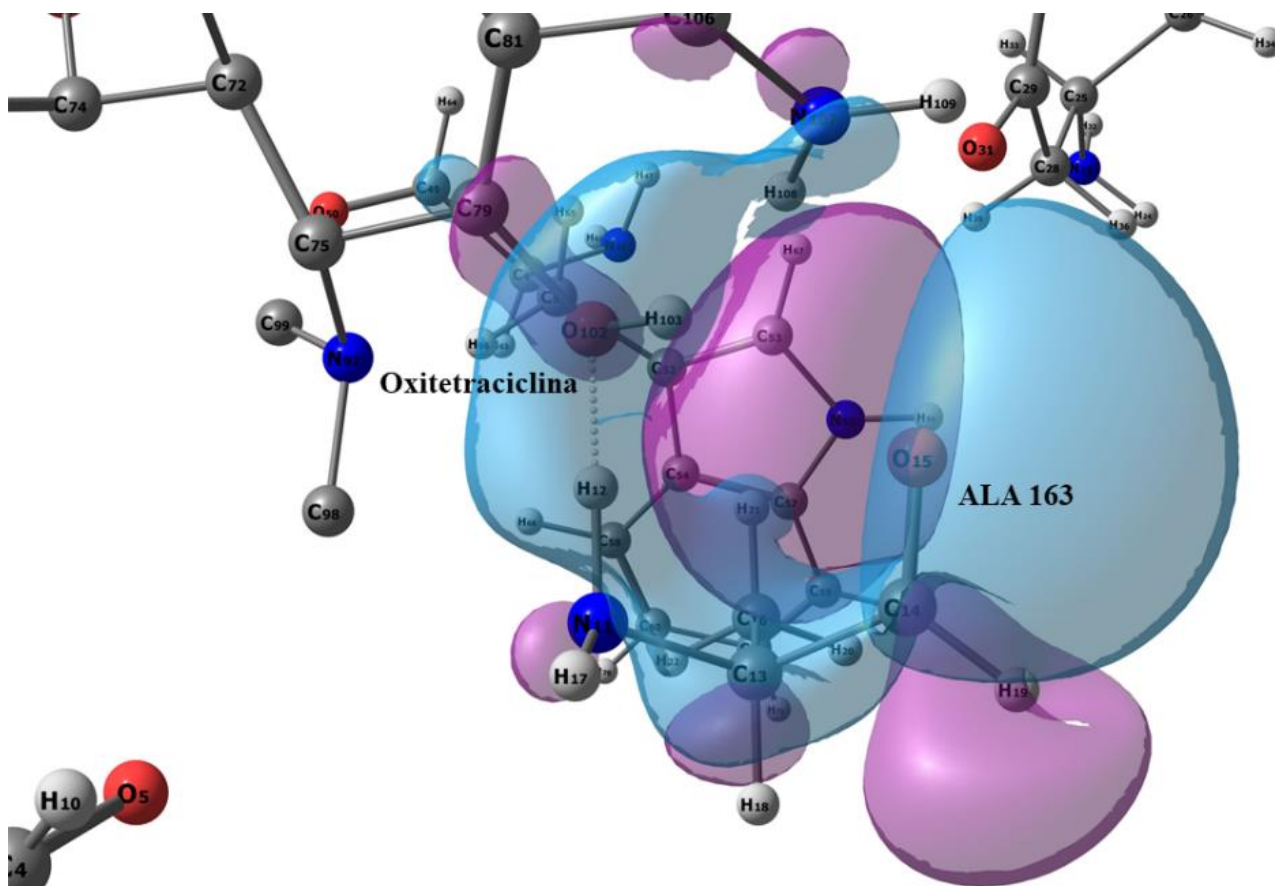


Figura 27. MO NBO 73, donación de densidad desde LP de O15 perteneciente a Ala163.

Tras la formación del puente de hidrógeno de la OTC a Ala163 asociado a O102 con H12-N11 (Figura 26), es posible visualizar una deslocalización de los átomos adyacentes a la terminación H12-N11 de la alanina. En este caso, el segundo par electrónico de O15 cede densidad en dirección a O102 y H103, lo cual se presenta en la Tabla 18 y 19 en la que se indica que el LP (2) de O15 se encuentra interactuando con BD\* de O102-H103, describiendo que el segundo par electrónico libre de O15 cede su densidad para compensar el antienlace generado por la interacción desde OTC a ALA163, de esta forma se genera una compensación de carga mediante la constitución de dos puentes de hidrógenos que permite la estabilización entre la OTC y el residuo aminoacídico ALA163.

Tabla 20. Perturbaciones de segundo orden de matriz de fock en base NBO y ocupancia NBO 79

Donor (L) NBO	Aceptor (NL) NBO	$E^2$ (Kcal · mol <sup>-1</sup> )
79. LP (1) O31	379. BD* (1) C106-N107	1,43

Tabla 21. Ocupancia NBO 79

Ocupancia	Ocupancia de orbitales
79. (1,96850) LP (1) O31	s (59,72%) p 0,67 (40,28%)

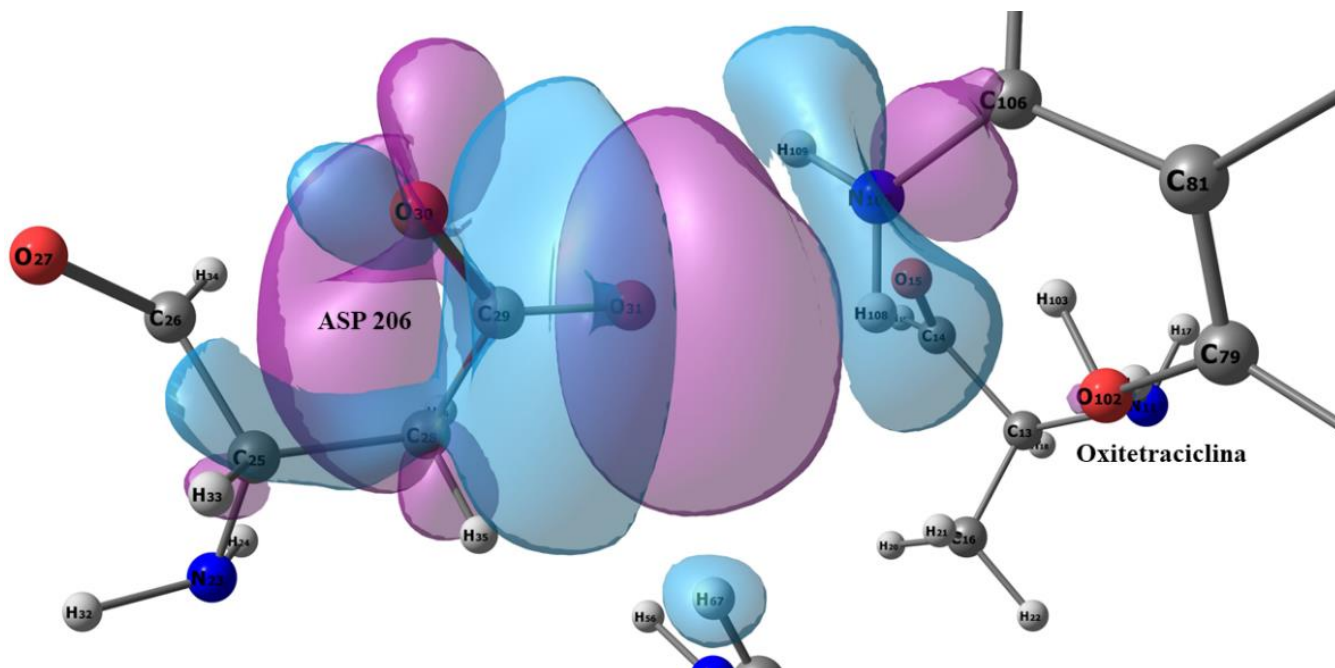


Figura 28. MO NBO 79, donación de densidad desde O31 perteneciente a ASP206.

La interacción resultante entre ASP206 y OTC presentada en la Figura 28, expone que O31 perteneciente a Asp206 cede densidad en dirección a la OTC, encontrándose la región receptora de la densidad carente de carga, debido a que átomos adyacentes a la posición donde fue cedida la densidad se encuentra transfiriendo carga a la enzima (puentes constituidos con Ala163). En la Tabla 20 y 21 se describe que el movimiento de densidad es generado por el primer par electrónico libre de O31 LP (1) de APS206 el cual se desplaza para estabilizar el orbital antienlazante generado entre el nitrógeno N107 y el carbono C106 de OTC. La formación de esta interacción apoya a la estabilización de la OTC en el sitio activo, debido a que genera una compensación a la deficiencia de carga que dejan las interacciones adyacentes en esa región de la molécula.

## 6. Conclusión

Fue posible investigar la reactividad química de la oxitetraciclina como sustrato de la enzima Dlac de *Cerreña sp.* Mediante métodos computacionales, obteniendo las siguientes conclusiones:

- Al obtener la estructura molecular optimizada de OTC, fue posible observar la formación de un pliegue entre los anillos B y A de la cadena tetracíclica central del antibiótico.
- A partir de la metodología DM, se estableció que la OTC presenta una afinidad y estabilidad viable para ser sustrato de la enzima Dlac, reconociendo la capacidad de interacción entre ambos complejos. Identificando que los residuos aminoacídicos GLY161, ALA163, Asp206, GLY390, TRP453 del sitio activo de Dlac formaron interacciones intermoleculares de importancia con OTC para estabilizarla al interior del sitio activo.
- Desde la identificación de los residuos aminoacídicos de importancia en presencia de la OTC y considerando sus coordenadas espaciales respecto a la pose de mayor afinidad obtenida, se construyó un sistema molecular de sitio reducido denominado complejo Dlac-OTC que permitió el estudio de reactividad química entre la OTC y la enzima Dlac.
- La caracterización de reactividad química sobre los sistemas moleculares estudiados brindó información sobre las regiones de mayor reactividad además de aportar la información necesaria para la confirmación de la transferencia de carga desde la OTC a la Dlac, fenómeno que pone en marcha el mecanismo de acción redox que caracteriza a la enzima. Por otra parte, se estableció que los átomos con mayor reactividad de la OTC presentaron interacciones intermoleculares con los residuos aminoacídicos de la Dlac.
- NBO por su lado expuso los flujos de cargas existentes en la formación de interacciones en el complejo Dlac-OTC, efecto que permitió observar la transferencia de cargas en el sistema en la constitución del complejo y en la pose de mayor afinidad entre OTC y Dlac. Aunque, también se presentaron interacciones que no pudieron ser observadas debido a la naturaleza del método NBO.

En síntesis, la presencia de los grupos oxigenados en la OTC le permite una alta estabilidad al presentarse en el sitio activo de la Dlac ya que estos grupos fueron los que transportaron carga desde la OTC a la enzima mediante la formación de interacciones intermoleculares, principalmente puentes de hidrogeno. Por su parte, los grupos nitrogenados expresaron mayor tendencia a estabilizar las transferencias de cargas dentro de la estructura de la OTC manteniendo la estructura estable ante las perturbaciones externas sufridas en presencia de la Dlac. Selectivamente las interacciones ocurrieron en las regiones de mayor

reactividad observadas en el análisis de la OTC por si sola, confirmando la importancia de los grupos oxigenados y nitrogenados en la estabilidad y afinidad entre Dlac y OTC.

## 7. Referencias Bibliográficas

- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., Herrera de los Santos, M., Levin, L., Rojo-Domínguez, A., Romero-Martínez, D., Saparrat, M. C. N., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2019). Laccases: Structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories*, *18*, 200. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>
- Atalah, J., Cáceres-Moreno, P., Espina, G., & Blamey, J. M. (2019). Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource Technology*, *280*, 478-488. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.008>
- Azanu, D., Styriahave, B., Darko, G., Weisser, J. J., & Abaidoo, R. C. (2018). Occurrence and risk assessment of antibiotics in water and lettuce in Ghana. *Science of The Total Environment*, *622-623*, 293-305. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.287>
- Azubuiké, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016a). Bioremediation techniques-classification based on site of application: Principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *32*(11), 180. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>
- Azubuiké, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016b). Bioremediation techniques—classification based on site of application: Principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *32*(11), 180. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, *30*(2), 215-242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>
- Böhm, H. J. (1998). Prediction of binding constants of protein ligands: A fast method for the prioritization of hits obtained from de novo design or 3D database search programs. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *12*(4), 309-323. <https://doi.org/10.1023/a:1007999920146>
- Bulat, F. A., Chamorro, E., Fuentealba, P., & Toro-Labbé, A. (2004). Condensation of Frontier Molecular Orbital Fukui Functions. *The Journal of Physical Chemistry A*, *108*(2), 342-349. <https://doi.org/10.1021/jp036416r>
- Chamorro, E., & Pérez, P. (2005). Condensed-to-atoms electronic Fukui functions within the framework of spin-polarized density-functional theory. *The Journal of Chemical Physics*, *123*(11), 114107. <https://doi.org/10.1063/1.2033689>
- Chauhan, P. S., Goradia, B., & Saxena, A. (2017). Bacterial laccase: Recent update on production, properties and industrial applications. *3 Biotech*, *7*(5), 323. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0955-7>
- Chen, X., Yang, Y., Ke, Y., Chen, C., & Xie, S. (2022). A comprehensive review on biodegradation of tetracyclines: Current research progress and prospect. *Science of The Total Environment*, *814*, 152852. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152852>
- Chen, Y., Li, H., Wang, Z., Tao, T., Wei, D., & Hu, C. (2012). Photolysis of Chlortetracycline in aqueous solution: Kinetics, toxicity and products. *Journal of Environmental Sciences*, *24*(2), 254-260. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60775-4](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60775-4)

Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232-260. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>

Citation | Gaussian.com. (s. f.). Recuperado 11 de diciembre de 2023, de [https://gaussian.com/citation\\_b01/](https://gaussian.com/citation_b01/)

Claus, H. (2004). Laccases: Structure, reactions, distribution. *Micron*, 35(1), 93-96. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2003.10.029>

Costa, R., Barros, G., Silva, J., Oliveira, K., Bezerra, D., Soares, M., & Costa, E. (2021). Experimental and theoretical study on spectral features, reactivity, solvation, topoisomerase I inhibition and in vitro cytotoxicity in human HepG2 cells of guadiscine and guadiscidine aporphine alkaloids. *Journal of Molecular Structure*, 1229, 14. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129844>

Daghrir, R., & Drogui, P. (2013). Tetracycline antibiotics in the environment: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 11(3), 209-227. <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0404-8>

Dannenberg, J. J. (1998). An Introduction to Hydrogen Bonding By George A. Jeffrey (University of Pittsburgh). Oxford University Press: New York and Oxford. 1997. ix + 303 pp. \$60.00. ISBN 0-19-509549-9. *Journal of the American Chemical Society*, 120(22), 5604-5604. <https://doi.org/10.1021/ja9756331>

Darken, M. A., Berenson, H., Shirk, R. J., & Sjolander, N. O. (1960). Production of Tetracycline by *Streptomyces aureofaciens* in Synthetic Media. *Applied Microbiology*, 8(1), 46-51.

Domingo, L. R., Rios-Gutierrez, M., & Perez, P. (2016). Applications of the Conceptual Density Functional Theory Indices to Organic Chemistry Reactivity. *MOLECULES*, 21(6), 748. <https://doi.org/10.3390/molecules21060748>

Eliopoulos, G. M., Eliopoulos, G. M., & Roberts, M. C. (2003). Tetracycline Therapy: Update. *Clinical Infectious Diseases*, 36(4), 462-467. <https://doi.org/10.1086/367622>

Enguita, F. J., Martins, L. O., Henriques, A. O., & Carrondo, M. A. (2003). Crystal Structure of a Bacterial Endospore Coat Component: A LACCASE WITH ENHANCED THERMOSTABILITY PROPERTIES \*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 19416-19425. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301251200>

Eno, E. A., Mbonu, J. I., Louis, H., Patrick-Inezi, F. S., Gber, T. E., Unimuke, T. O., Okon, E. E. D., Benjamin, I., & Offiong, O. E. (2022). Antimicrobial activities of 1-phenyl-3-methyl-4-trichloroacetyl-pyrazolone: Experimental, DFT studies, and molecular docking investigation. *Journal of the Indian Chemical Society*, 99(7), 100524. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100524>

Fischer, E. (1894). Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 27(3), 2985-2993. <https://doi.org/10.1002/cber.18940270364>

Fuentealba, P., Pérez, P., & Contreras, R. (2000). On the condensed Fukui function. *Journal of Chemical Physics*, 113(7), 2544-2551. <https://doi.org/10.1063/1.1305879>

- Galhaup, C., & Haltrich, D. (2001). Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *56*(1-2), 225-232. <https://doi.org/10.1007/s002530100636>
- Gianfreda, L., Xu, F., & Bollag, J.-M. (1999). Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediation Journal*, *3*(1), 1-26. <https://doi.org/10.1080/10889869991219163>
- Glendening, E. D., Landis, C. R., & Weinhold, F. (2012). Natural bond orbital methods. *WIREs Computational Molecular Science*, *2*(1), 1-42. <https://doi.org/10.1002/wcms.51>
- Glendening, E. D., Landis, C. R., & Weinhold, F. (2013). NBO 6.0: Natural bond orbital analysis program. *Journal of Computational Chemistry*, *34*(16), 1429-1437. <https://doi.org/10.1002/jcc.23266>
- Glendening, E. D., Landis, C. R., & Weinhold, F. (2021). 6 Natural bond orbital theory: Discovering chemistry with NBO7. En *6 Natural bond orbital theory: Discovering chemistry with NBO7* (pp. 129-156). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783110660074-006>
- Go<sup>-</sup>, N., & Scheraga, H. A. (1970). Ring Closure and Local Conformational Deformations of Chain Molecules. *Macromolecules*, *3*(2), 178-187. <https://doi.org/10.1021/ma60014a012>
- Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (1990). Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. *Proteins*, *8*(3), 195-202. <https://doi.org/10.1002/prot.340080302>
- Govindarajan, M. (2014). Vibrational Analysis using FT-IR, FT-Raman Spectra and HF - DFT Methods and NBO, NLO, NMR, HOMO-LUMO, UV and Electronic Transitions Studies on 2,2,4 Trimethyl Pentane. *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy*.
- Guan, Z.-B., Luo, Q., Wang, H.-R., Chen, Y., & Liao, X.-R. (2018). Bacterial laccases: Promising biological green tools for industrial applications. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *75*(19), 3569-3592. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2883-z>
- Hakulinen, N., & Rouvinen, J. (2015). Three-dimensional structures of laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(5), 857-868. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1827-5>
- Hammes, G. G. (2002). Multiple conformational changes in enzyme catalysis. *Biochemistry*, *41*(26), 8221-8228. <https://doi.org/10.1021/bi0260839>
- Hariharan, H. (2007). Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 4th ed. *The Canadian Veterinary Journal*, *48*(7), 744.
- Head, R. D., Smythe, M. L., Oprea, T. I., Waller, C. L., Green, S. M., & Marshall, G. R. (1996). VALIDATE: A New Method for the Receptor-Based Prediction of Binding Affinities of Novel Ligands. *Journal of the American Chemical Society*, *118*(16), 3959-3969. <https://doi.org/10.1021/ja9539002>
- How to cite Gabedit—Cite Bay.* (s. f.). Recuperado 11 de diciembre de 2023, de <http://citebay.com/how-to-cite/gabedit/>
- Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., & Goodsell, D. S. (2007). A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*, *28*(6), 1145-1152. <https://doi.org/10.1002/jcc.20634>

- Jafari Ozumchelouei, E., Hamidian, A. H., Zhang, Y., & Yang, M. (2020). Physicochemical properties of antibiotics: A review with an emphasis on detection in the aquatic environment. *Water Environment Research*, 92(2), 177-188. <https://doi.org/10.1002/wer.1237>
- Jara, B., & Alfonso, F. (2004). *Condensation of frontier molecular orbital Fukui functions*. <https://doi.org/10.1021/jp036416r>
- Jeffrey, G. A. (1997). *An Introduction to Hydrogen Bonding*. Oxford University Press.
- Kanagathara, N., Usha, R., Natarajan, V., & Marchewka, M. K. (2022). Molecular geometry, vibrational, NBO, HOMO–LUMO, first order hyper polarizability and electrostatic potential studies on anilinium hydrogen oxalate hemihydrate – an organic crystalline salt. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 52(2), 226-233. <https://doi.org/10.1080/24701556.2021.1891103>
- Kortagere, S., Lill, M., & Kerrigan, J. (2012). Role of Computational Methods in Pharmaceutical Sciences. En B. Reisfeld & A. N. Mayeno (Eds.), *Computational Toxicology: Volume I* (pp. 21-48). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-050-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-050-2_3)
- Koshland, D. E. (1963). CORRELATION OF STRUCTURE AND FUNCTION IN ENZYME ACTION. *Science (New York, N.Y.)*, 142(3599), 1533-1541. <https://doi.org/10.1126/science.142.3599.1533>
- Krishnan, A. R., Saleem, H., Subashchandrabose, S., Sundaraganesan, N., & Sebastain, S. (2011). Molecular structure, vibrational spectroscopic (FT-IR, FT-Raman), UV and NBO analysis of 2-chlorobenzonitrile by density functional method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(2), 582-589. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.11.027>
- Limbu, S. M., Chen, L.-Q., Zhang, M.-L., & Du, Z.-Y. (2021). A global analysis on the systemic effects of antibiotics in cultured fish and their potential human health risk: A review. *Reviews in Aquaculture*, 13(2), 1015-1059. <https://doi.org/10.1111/raq.12511>
- Lin, Y., Xu, S., & Li, J. (2013). Fast and highly efficient tetracyclines removal from environmental waters by graphene oxide functionalized magnetic particles. *Chemical Engineering Journal*, 225, 679-685. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.03.104>
- Liu, X., Zhang, G., Liu, Y., Lu, S., Qin, P., Guo, X., Bi, B., Wang, L., Xi, B., Wu, F., Wang, W., & Zhang, T. (2019). Occurrence and fate of antibiotics and antibiotic resistance genes in typical urban water of Beijing, China. *Environmental Pollution*, 246, 163-173. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.005>
- López Peñalver, J. J., Gómez Pacheco, C. V., Sánchez Polo, M., & Rivera Utrilla, J. (2013). Degradation of tetracyclines in different water matrices by advanced oxidation/reduction processes based on gamma radiation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(6), 1096-1108. <https://doi.org/10.1002/jctb.3946>
- Łukaszewicz, P., Białk-Bielińska, A., Dołzonek, J., Kumirska, J., Caban, M., & Stepnowski, P. (2018). A new approach for the extraction of tetracyclines from soil matrices: Application of the microwave-extraction technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(6), 1697-1707. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0815-7>

- Martínez-Araya, J. I. (2015). Why is the dual descriptor a more accurate local reactivity descriptor than Fukui functions? *Journal of Mathematical Chemistry*, 53(2), 451-465. <https://doi.org/10.1007/s10910-014-0437-7>
- Mate, D. M., & Alcalde, M. (2017). Laccase: A multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1457-1467. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12422>
- Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, 7(2), 146-157.
- Michalova, E., Pnovotna, & Schlegelova, J. (2004). Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Veterinárni Medicína*, 49(3), 79-100. <https://doi.org/10.17221/5681-VETMED>
- Mog, M., Ngasotter, S., Tesia, S., Waikhom, D., Panda, S., Sharma, S., & Varshney, S. (2020). Problems of antibiotic resistance associated with oxytetracycline use in aquaculture: A review. *JOURNAL OF ENTOMOLOGY AND ZOOLOGY STUDIES*, 8, 1075-1082.
- Moitessier, N., Englebienne, P., Lee, D., Lawandi, J., & Corbeil, C. R. (2008). Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: A long way to go. *British Journal of Pharmacology*, 153 Suppl 1(Suppl 1), S7-26. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707515>
- Morell, C., Grand, A., & Toro-Labbé, A. (2005). New Dual Descriptor for Chemical Reactivity. *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(1), 205-212. <https://doi.org/10.1021/jp046577a>
- Moreno-González, R., Rodríguez-Mozaz, S., Gros, M., Pérez-Cánovas, E., Barceló, D., & León, V. M. (2014). Input of pharmaceuticals through coastal surface watercourses into a Mediterranean lagoon (Mar Menor, SE Spain): Sources and seasonal variations. *Science of The Total Environment*, 490, 59-72. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.097>
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., & Yaropolov, A. I. (2007). «Blue» laccases. *Biochemistry. Biokhimiia*, 72(10), 1136-1150. <https://doi.org/10.1134/s0006297907100112>
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998a). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), 1639-1662. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B)
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998b). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), 1639-1662. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B)
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2785-2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Mot, A. C., & Silaghi-Dumitrescu, R. (2012). Laccases: Complex architectures for one-electron oxidations. *Biochemistry. Biokhimiia*, 77(12), 1395-1407. <https://doi.org/10.1134/S0006297912120085>

- Önal, A. (2011). Overview on liquid chromatographic analysis of tetracycline residues in food matrices. *Food Chemistry*, 127(1), 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.002>
- O'Neill, J. (2016). *Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations* (United Kingdom) [Report]. Government of the United Kingdom. <https://apo.org.au/node/63983>
- Parr, R. G., & Pearson, R. G. (2002, mayo 1). *Absolute hardness: Companion parameter to absolute electronegativity* (world). ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/ja00364a005>
- Parr, R. G., & Yang, W. (1984). Density functional approach to the frontier-electron theory of chemical reactivity. *Journal of the American Chemical Society*, 106(14), 4049-4050. <https://doi.org/10.1021/ja00326a036>
- Parr, R. G., & Yang, W. (1995). Density-Functional Theory of the Electronic Structure of Molecules. *Annual Review of Physical Chemistry*, 46(1), 701-728. <https://doi.org/10.1146/annurev.pc.46.100195.003413>
- Principales datos de la industria. (s. f.). *Consejo del Salmón*. Recuperado 29 de enero de 2024, de <https://www.consejodelsalmon.cl/informacion-de-la-industria/principales-datos-de-la-industria/>
- Pucci, R., & Angilella, G. G. N. (2022). Density functional theory, chemical reactivity, and the Fukui functions. *FOUNDATIONS OF CHEMISTRY*, 24(1), 59-71. <https://doi.org/10.1007/s10698-022-09416-z>
- Reinhammar, B. R. (1972). Oxidation-reduction potentials of the electron acceptors in laccases and stellacyanin. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 275(2), 245-259. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(72\)90045-x](https://doi.org/10.1016/0005-2728(72)90045-x)
- Riva, S. (2006). Laccases: Blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 24(5), 219-226. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.03.006>
- Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Álvarez, E. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Rodríguez-Vázquez, R., & Delgado-Boada, J. M. (2013). Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*, 27(3), 67-82. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001>
- Roberts, J. A., Norris, R., Paterson, D. L., & Martin, J. H. (2012). Therapeutic drug monitoring of antimicrobials. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 73(1), 27-36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2011.04080.x>
- Sah, H. (2006). Degradation patterns of tetracycline antibiotics in reverse micelles and water. *Biomedical Chromatography*, 20(11), 1142-1149. <https://doi.org/10.1002/bmc.662>
- Shleev, S. V., Morozova, O. V., Nikitina, O. V., Gorshina, E. S., Rusinova, T. V., Serezhenkov, V. A., Burbaev, D. S., Gazaryan, I. G., & Yaropolov, A. I. (2004). Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie*, 86(9), 693-703. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.08.005>

- Shraddha, U., Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., & Kumar, A. (2011). Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Enzyme Research*, 2011, e217861. <https://doi.org/10.4061/2011/217861>
- Strong, P. J., & Claus, H. (2011). Laccase: A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41(4), 373-434. <https://doi.org/10.1080/10643380902945706>
- Suárez, D. (2012). *Objetivos y características de la química computacional y su aplicación al estudio de los materiales de carbono*. <https://digital.csic.es/handle/10261/81892>
- Suzuki, S., & Hoa, P. T. P. (2012). Distribution of Quinolones, Sulfonamides, Tetracyclines in Aquatic Environment and Antibiotic Resistance in Indochina. *Frontiers in Microbiology*, 3, 67. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00067>
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140(1), 19-26. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-1-19>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Venkat Rao, Ch., Rama Sekhara Reddy, D., Jagadeeswara rao, D., Seeta Ramaiah, V., Eswar Srikanth, K., & Ramakrishna, Y. (2018). Vibrational and UV/Vis spectroscopic, NBO analysis of 1-(3-methylthiophen-2-yl)ethanone by ab initio DFT calculations. *Materials Today: Proceedings*, 5(13, Part 1), 26430-26439. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.08.097>
- Vernekar, M., & Lele, S. (2009). Laccase: Properties and Applications. *BioResources*, 4. <https://doi.org/10.15376/biores.4.4.1694-1717>
- Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A. P., & Narasimha, G. (2014). Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation. *Enzyme Research*, 2014, e163242. <https://doi.org/10.1155/2014/163242>
- Wang, H., Yuan, X., Wu, Y., Zeng, G., Dong, H., Chen, X., Leng, L., Wu, Z., & Peng, L. (2016). In situ synthesis of In<sub>2</sub>S<sub>3</sub>@MIL-125(Ti) core-shell microparticle for the removal of tetracycline from wastewater by integrated adsorption and visible-light-driven photocatalysis. *Applied Catalysis B: Environmental*, 186, 19-29. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2015.12.041>
- Wang, L., Weng, Z., Liang, Y., Wang, Y., Zhang, Z., & Di, R. (2008). Design and Implementation of Parallel Lamarckian Genetic Algorithm for Automated Docking of Molecules. *2008 10th IEEE International Conference on High Performance Computing and Communications*, 689-694. <https://doi.org/10.1109/HPCC.2008.50>
- Wang, X., Meng, F., Zhang, B., & Xia, Y. (2023a). Elimination of tetracyclines in seawater by laccase-mediator system. *Chemosphere*, 333, 138916. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138916>
- Wang, X., Meng, F., Zhang, B., & Xia, Y. (2023b). Elimination of tetracyclines in seawater by laccase-mediator system. *Chemosphere*, 333, 138916. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138916>

Weinhold, F., & Landis, C. R. (2012). *Discovering chemistry with natural bond orbitals*. Wiley. [http://www.123library.org/book\\_details/?id=53510](http://www.123library.org/book_details/?id=53510)

Wen, X., Zeng, Z., Du, C., Huang, D., Zeng, G., Xiao, R., Lai, C., Xu, P., Zhang, C., Wan, J., Hu, L., Yin, L., Zhou, C., & Deng, R. (2019). Immobilized laccase on bentonite-derived mesoporous materials for removal of tetracycline. *Chemosphere*, *222*, 865-871. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.020>

White, S. W., Zheng, J., Zhang, Y.-M., & Rock, C. O. (2005). The Structural Biology of Type Ii Fatty Acid Biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, *74*(1), 791-831. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133524>

Wilson, C. J., Brain, R. A., Sanderson, H., Johnson, D. J., Bestari, K. T., Sibley, P. K., & Solomon, K. R. (2004). Structural and Functional Responses of Plankton to a Mixture of Four Tetracyclines in Aquatic Microcosms. *Environmental Science & Technology*, *38*(23), 6430-6439. <https://doi.org/10.1021/es049766f>

Wu, M.-H., Lee, C.-C., Hsiao, A.-S., Yu, S.-M., Wang, A. H.-J., & Ho, T.-H. D. (2018). Kinetic analysis and structural studies of a high-efficiency laccase from *Cerrena* sp. RSD1. *FEBS Open Bio*, *8*(8), 1230-1246. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12459>

Xie, X., Zhou, Q., He, Z., & Bao, Y. (2010). Physiological and potential genetic toxicity of chlortetracycline as an emerging pollutant in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *29*(4), 922-928. <https://doi.org/10.1002/etc.79>

Xu, L., Zhang, H., Xiong, P., Zhu, Q., Liao, C., & Jiang, G. (2021). Occurrence, fate, and risk assessment of typical tetracycline antibiotics in the aquatic environment: A review. *Science of The Total Environment*, *753*, 141975. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141975>

Ye, J., Du, Y., Wang, L., Qian, J., Chen, J., Wu, Q., & Hu, X. (2017). Toxin Release of *Cyanobacterium Microcystis aeruginosa* after Exposure to Typical Tetracycline Antibiotic Contaminants. *Toxins*, *9*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/toxins9020053>

Yoshida, H. (1883). LXIII.—Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, *43*(0), 472-486. <https://doi.org/10.1039/CT8834300472>

Yu, J., Su, N. Q., & Yang, W. (2022). Describing Chemical Reactivity with Frontier Molecular Orbitals. *JACS Au*, *2*(6), 1383-1394. <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00085>

Yuan, H.-S. (2014). Molecular phylogenetic evaluation of *Antrodia* and morphologically allied genera in China. *Mycological Progress*, *13*(2), 353-364. <https://doi.org/10.1007/s11557-013-0921-7>

Zainab, S. M., Junaid, M., Xu, N., & Malik, R. N. (2020). Antibiotics and antibiotic resistant genes (ARGs) in groundwater: A global review on dissemination, sources, interactions, environmental and human health risks. *Water Research*, *187*, 116455. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116455>

Zhang, M., Liu, Y.-S., Zhao, J.-L., Liu, W.-R., He, L.-Y., Zhang, J.-N., Chen, J., He, L.-K., Zhang, Q.-Q., & Ying, G.-G. (2018). Occurrence, fate and mass loadings of antibiotics in two swine wastewater

treatment systems. *Science of The Total Environment*, 639, 1421-1431.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.230>

Zhang, Q., Zheng, F., Zhao, T., Qu, X., & Aires-de-Sousa, J. (2016). Machine Learning Estimation of Atom Condensed Fukui Functions. *MOLECULAR INFORMATICS*, 35(2), 62-69.  
<https://doi.org/10.1002/minf.201500113>

Zhao, W., Guo, Y., Lu, S., Yan, P., & Sui, Q. (2016). Recent advances in pharmaceuticals and personal care products in the surface water and sediments in China. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 10(6), 2. <https://doi.org/10.1007/s11783-016-0868-4>