

Uniendo química computacional y quimioinformática para el diseño de catalizadores más eficientes



Trabajo de fin de grado

Gonzalo Garcés Selvi

Director: Juan Vicente Alegre Requena

Departamento de Química Inorgánica

Resumen

En el presente trabajo se ha realizado un estudio teórico/computacional del ciclo catalítico de la oxidación del GSH a GSSG mediante un catalizador de Cu(II). Para ello se llevaron a cabo análisis de distintos conformeros para estudiar la cinética y termodinámica de la reacción para entender el mecanismo de la reacción llevada a cabo en el proceso.

Se utilizaron métodos de química cuántica y simulaciones moleculares, optimizando modelos moleculares mediante cálculos de estructura electrónica basados en DFT. Se calcularon las energías de los diferentes conformeros del GSH y se examinó su influencia en la estabilidad de los intermediarios y estados de transición. Los resultados proporcionaron una comprensión detallada del mecanismo de oxidación del GSH por Cu, identificando los pasos clave, los estados de transición preferenciales y factores que afectan la estabilidad de los intermediarios.

Los estudios cinéticos permitieron comprender qué posición de la molécula GSH (carboxilatos o azufre) sería más rápidamente atacada por el Cu. Mientras que los estudios termodinámicos permitieron comprender cuan de estables eran los complejos que se iban a formar, para comprender si la reacción avanzaría hacia el producto deseado o, sin embargo, llegaría a un pozo de energía el cual no se podría revertir.

Tras esto se realizó un estudio mecanístico analizando la unión de otra molécula de GSH al Cu y la formación del puente disulfuro para formar el GSSG, con formación de H_2O_2 , y pérdida de O_2 . Por último, se propone un ciclo catalítico acorde a los estudios realizados y los datos obtenidos.

Abstract

In this study, a theoretical/computational investigation of the catalytic cycle for the oxidation of GSH to GSSG using a Cu(II) catalyst was conducted. Different conformers were analyzed to study the kinetics and thermodynamics of the reaction and understand the reaction mechanism involved in the process.

Quantum chemistry methods and molecular simulations were employed, optimizing molecular models through DFT-based electronic structure calculations. Energies of different GSH conformers were calculated, examining their influence on the stability of intermediates and transition states. The results provided a detailed understanding of the GSH oxidation mechanism by Cu, identifying key steps, preferred transition states, and factors affecting intermediate stability.

Kinetic studies elucidated which position of the GSH molecule (carboxylates or sulfur) would be more readily attacked by Cu. Thermodynamic analyses helped assess the stability of the formed complexes, determining whether the reaction would proceed towards the desired product or encounter an energy barrier from which it could not revert.

A mechanistic study was conducted, analyzing the binding of another GSH molecule to Cu and the formation of a disulfide bridge to generate GSSG, accompanied by the formation of H_2O_2 and the release of O_2 . Finally, a proposed catalytic cycle was developed based on the conducted studies and obtained data.

Índice

1. Introducción	1
<i>1.1. Terapias anticancerígenas</i>	<i>1</i>
<i>1.2. Química computacional</i>	<i>3</i>
<i>1.3. Antecedentes</i>	<i>4</i>
2. Objetivos	5
3. Discusión de resultados	6
<i>3.1. Protocolo para la obtención de energías</i>	<i>6</i>
<i>3.2. Análisis de los conformeros más estables</i>	<i>8</i>
<i>3.3. Estudio cinético y termodinámico en la adición del cobre.....</i>	<i>9</i>
<i>3.4. Estudio de distribución de espín</i>	<i>14</i>
<i>3.5. Estudio mecanístico de la reacción.....</i>	<i>15</i>
4. Conclusiones.....	17
5. Métodos computacionales.....	18
6. Bibliografía	18

1. Introducción

El término cáncer se usa para definir a un conjunto de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, también se les conoce en algunas circunstancias como tumores o neoplasias malignas.^[1] La característica determinante del cáncer es la rapidez con la que se multiplican las células dañadas, las cuales pueden llegar a extenderse más allá de sus límites normales e incluso pueden llegar a infectar otras partes del organismo. A este proceso se le conoce como metástasis, y es la principal causa de muerte cuando se padece esta enfermedad.^[1]

Estas enfermedades derivan de la conversión de células normales a células tumorales, a través de un proceso que se da como resultado de la interacción entre factores genéticos y factores externos. Estos factores pueden ser radiaciones ultravioletas e ionizantes, agentes químicos como sustancias del humo del tabaco, o factores biológicos como bacterias y parásitos.^{[2],[3]} El riesgo de padecer cáncer aumenta a lo largo de la edad, debido en gran parte al deterioro de los mecanismos de reparación celular propios del envejecimiento.

Actualmente, el cáncer es la mayor causa de muerte en todo el mundo dejando casi 10 millones de defunciones en 2020.^[1] Esta cifra no deja de ascender alarmantemente y se pronostica que en 2040 pueden llegar a morir 16 millones de personas por esta causa. En España, se contabilizaron 113,662 muertes provocadas por cáncer en 2021,^[4] con una estimación de 160,000 para 2040.^[5] Entre todos los tipos de cáncer, los más letales fueron los de pulmón y los de mama, entre otros.^[1]

1.1. Terapias anticancerígenas

Conforme a lo expuesto en la sección anterior, es indudable que el cáncer está siendo uno de los grandes problemas del siglo XXI. Esto supone un gran desafío para la comunidad científica, la cual pretende encontrar soluciones para paliar tanto la mortalidad de la enfermedad como el sufrimiento que padecen una gran parte de los afectados. Diversos estudios recientes se centran en la molécula de glutatión (γ -glutamato-cisteína-glicina, GSH) como eje fundamental para impulsar nuevos tratamientos contra el cáncer (**Figura 1**).^[6] El GSH es un tripéptido no proteico que se encuentra en altas concentraciones en las células animales.^[7] Se trata del principal antioxidante de estas células, siendo clave en la protección celular contra las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), como pueden ser los radicales libres o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

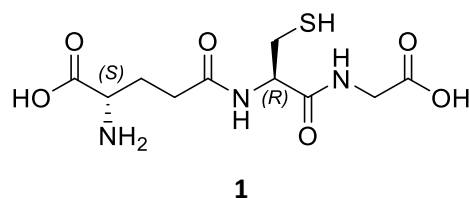


Figura 1. Estructura del GSH (**1**).

En las células tumorales el GSH está presente en altas concentraciones, lo cual se ha relacionado con una alta resistencia a distintos tipos de quimioterapia.^{[8],[9]} Esto convierte a los ROS en un arma de doble filo, ya que pueden actuar tanto, como armas contra las células cancerígenas, como ser inductores de enfermedades. Esto, se debe principalmente a que la

eliminación de los ROS evita que se produzca el estallido oxidativo en las células dañadas.^[10] Dependerá de la intensidad o duración de las señales redox, así como del comportamiento de los antioxidantes como el GSH, el que la célula sea inducida a la muerte o se estimule su crecimiento.^[8]

Lo citado anteriormente puede alterar la homeostasis redox pudiendo conducir la célula a la apoptosis. Este fenómeno representa una vía de destrucción o muerte celular programada por el mismo organismo para controlar su desarrollo y se desencadena a partir de señales celulares controladas genéticamente.^[11] La apoptosis juega un papel clave en el control de las células dañadas, evitando la aparición de enfermedades como el cáncer. Existen tres tipos de vías de apoptosis: la extrínseca, la intrínseca y la perforina. Mientras que la extrínseca induce la apoptosis de manera extracelular, la intrínseca la induce de manera intracelular. Esto se suele dar por las ROS como ya hemos nombrado, o por otros factores como daños en el ADN, grandes aumentos en la concentración de calcio citosólico o estrés celular.^{[12],[13]} Cuando una célula tiene dañado el mecanismo que conduce a la apoptosis, esta puede seguir dividiéndose y resultar en una formación tumoral.

Diversas terapias actuales, como la fotodinámica, sonodinámica y quimiodinámica,^{[7],[11]} basan sus tratamientos en la activación de las ROS. Estas técnicas precisan de un control de la concentración de GSH para controlar la cantidad de ROS en las células y asegurar que los tratamientos sean efectivos. Para ello, diferentes investigaciones desarrollan nanocatalizadores, los cuales pretenden reaccionar con el GSH y oxidarlo para dar lugar a su forma oxidada (GSSG, **Figura 2**). Este dímero se genera tras la formación de un puente disulfuro entre dos moléculas de GSH. Al oxidar el GSH las células dañadas no disponen de esta vía para destruir las ROS, favoreciendo la apoptosis.^[14]

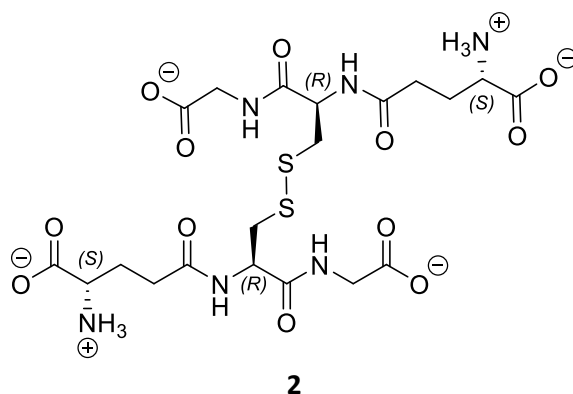


Figura 2. Forma de GSSG (**2**), con la formación de puente disulfuro.

El uso de metales de transición es particularmente interesante para inducir la oxidación del GSH.^{[7],[11]} El estudio que se aborda en este trabajo detalla el uso de nanopartículas de CuFe (**Figura 3**), donde cada metal juega un papel diferencial en el proceso catalítico. El propósito del cobre es el de oxidar el GSH a partir de Cu(II), reduciéndose a Cu(I), según proponen los experimentales. Por otro lado, el Fe se encarga de generar el oxígeno molecular necesario para inducir la oxidación del Cu(I) y regenerar el Cu(II) catalítico.^{[7],[11]}

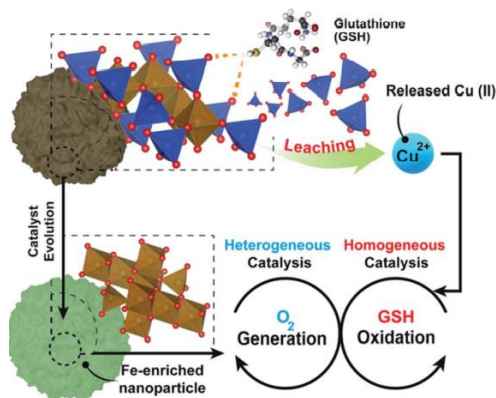


Figura 3. Visión simplificada del proceso fomentado por el nanocatalizador CuFe.

1.2. Química computacional

1.2.1. Definición

Este trabajo usa la química computacional para estudiar el mecanismo de reacción de la oxidación de la molécula de GSH. Esta disciplina es una rama de la química que utiliza modelos computacionales para estudiar procesos y propiedades químicas, y se utiliza ampliamente en el diseño de nuevos materiales y medicamentos.^[15] En algunos casos, los cálculos teóricos se usan como complementos de datos obtenidos experimentalmente, mientras que en otros casos se utilizan para predecir fenómenos. En el caso que nos ocupa, la química computacional se utiliza para comprender un mecanismo de reacción, ya que se sabe que algo sucede, pero no cómo sucede. Hay que tener en cuenta que el tiempo de cálculo aumenta rápidamente a medida que aumenta el tamaño del sistema que se desea estudiar, así como la sofisticación del método utilizado. Por lo tanto, es importante considerar los resultados deseados y la importancia del sistema analizado al elegir un método de cálculo u otro.

1.2.2. Historia

Los primeros cálculos teóricos de química cuántica fueron realizados por Walter Heitler y Fritz London en 1927. Sin embargo, no fue hasta la década de los 40 cuando el desarrollo de sistemas computacionales permitió obtener soluciones para ecuaciones de onda elaboradas en sistemas atómicos realistas. En la década de los 50 se llevaron a cabo los primeros cálculos atómicos semi-empíricos.^[16] Durante ese tiempo, se realizó el primer cálculo ab initio conocido como Hartree-Fock sobre moléculas diatómicas, el cual utilizó un conjunto de funciones de base de tipo determinante de Slater. También durante esa época se llevó a cabo el primer cálculo poliatómico utilizando funciones de base de tipo gaussiano y los primeros cálculos de interacción de configuraciones.^{[16],[17]}

En 1964 se introdujo el método Hückel, utilizado para calcular la energía de electrones de tipo π en sistemas conjugados de hidrocarburos, desde sistemas simples como el butadieno o el benceno hasta sistemas muy complejos como el ovaleno con 10 anillos fusionados.^[18] A principios de los años 70 se desarrolló Gaussian, el programa de química teórica que se ha empleado para el desarrollo de este Trabajo de Fin de Grado.

1.2.3. Teoría del funcional de la densidad (DFT)

El método de cálculo utilizado será la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT por sus siglas en inglés) para todo el desarrollo. Este método es variacional y se basa en una función de densidad electrónica. A diferencia de utilizar la función de onda, el DFT utiliza esta función de densidad para simular sistemas moleculares, lo que lo convierte en un método eficiente.^{[16],[19]} La principal desventaja es que las ecuaciones para la función de densidad no se conocen exactamente, por lo que se deben aproximar, lo que implica una pérdida de precisión en comparación con los cálculos en los que se utilizan funciones de onda.

El DFT se suele usar en sistemas moleculares de gran tamaño que resultan prohibitivos para otros métodos. Teniendo en cuenta los recursos que requiere y los resultados que proporciona, esta técnica es considerada habitualmente el método más efectivo. A pesar de sus limitaciones, el DFT puede proporcionar resultados muy precisos con un coste computacional notablemente bajo. En este trabajo, el DFT se usa para obtener tanto optimizaciones como frecuencias de los distintos sistemas con sus respectivos isómeros conformacionales. A partir de los cálculos realizados, se pueden interpretar los resultados para definir el mecanismo de reacción. Las energías calculadas por el método se utilizan para construir el diagrama energético del camino de reacción. De esta forma, es posible determinar distintos factores cinéticos y termodinámicos.^[20]

1.2.4. Estudios mecanísticos

La gran ventaja de la química computacional es el ahorro de tiempo y dinero que se puede lograr durante el desarrollo de una reacción. Para llevar a cabo una reacción con las condiciones óptimas en el laboratorio, se requiere un gran consumo de reactivos y tiempo. Es mucho más eficiente introducir la información deseada en el ordenador y obtener una predicción precisa de los resultados que podremos obtener.

Además, uno de los principales usos de la química computacional es comprender cómo ocurren las reacciones que se llevan a cabo en el laboratorio. Cuando realizamos una reacción experimental, podemos determinar lo que agregamos al medio de reacción y también averiguar los productos resultantes. Sin embargo, conocer lo que sucede durante el proceso y cómo se desarrolla la reacción puede ser difícil o, en ocasiones, solo una suposición. Hoy en día, gracias a la química computacional, es posible ejecutar cálculos computacionales que nos expliquen el transcurso de la reacción sin un gran consumo de recursos.

1.3. Antecedentes

En este trabajo nos centramos en un estudio experimental sobre nanocatalizadores de CuFe que realizó el grupo de investigación de Jesús Santamaría y José L. Hueso, del Campus Río Ebro. En el mecanismo que los autores propusieron (**Figura 4**), el Cu(II) se reduce a Cu(I) tras la unión de una molécula de GSH al cobre a través del azufre y, posteriormente, con la unión de otra molécula de GSH cuando se termina de oxidar el GSH a GSSG. Tras esto, el cobre es de nuevo oxidado a Cu(II) a partir del oxígeno molecular generado en el ciclo catalítico heterogéneo del hierro.^[12]

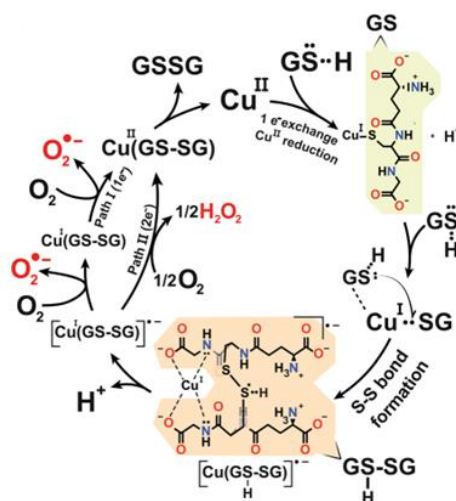


Figura 4. Ciclo catalítico propuesto por el grupo de investigación experimental.

Existe controversia respecto al mecanismo propuesto, puesto que estudios anteriores no relatan la reducción de $\text{Cu}(\text{II})$ a $\text{Cu}(\text{I})$ en ningún momento del proceso, sino que la reacción se lleva a cabo únicamente a través de radicales formados en el complejo de cobre con GSH. Además, encuentran la formación de un complejo termodinámico que inhibe la reacción.

2. Objetivos

El presente Trabajo de Fin de Grado va a ser de tipo teórico y se pretende estudiar las energías del camino de reacción propuesto para la oxidación de GSH a GSSG con CuFe explicado anteriormente (**Figura 4**). Esta investigación incluye una serie de cálculos con DFT y la generación de confórmeros de las distintas moléculas involucradas en el mecanismo de la reacción. Para ello se seguirá el plan de trabajo indicado a continuación:

- 1) Búsqueda de los isómeros conformacionales del GSH, y cribado de los 20 más estables para la realización de los cálculos.
- 2) Muestreo de los isómeros conformacionales del átomo de cobre unido a una molécula de GSH.
- 3) Cálculo de los perfiles de energía y de los caminos competitivos para explicar el mecanismo de reacción y las posibles causas de su inhibición.
- 4) Estudio que explique la razón por la que el cobre se une más rápidamente al azufre que a los átomos de oxígeno.

Tras la realización de este trabajo el alumno deberá de haber obtenido las competencias recogidas a continuación:

- Conocer y entender los siguientes métodos y programas computacionales: Gaussian, Visual Studio Code y DFT.

- Saber interpretar los resultados de los cálculos obtenidos a partir de los modelos computacionales utilizados.
- Saber redactar una Memoria de un trabajo de investigación, donde se recojan de la manera más rigurosa posible los resultados recabados, así como conclusiones del estudio realizado.
- Buscar y usar bibliografía sobre el tema a investigar.

3. Resultados y discusión

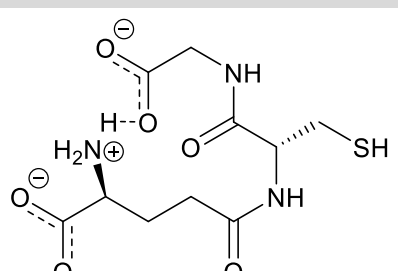
3.1. Protocolo para obtención de energías y geometrías

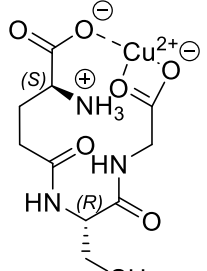
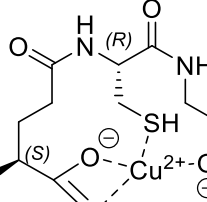
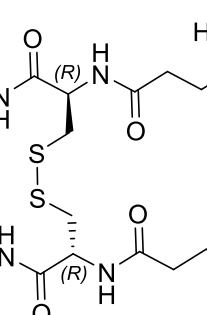
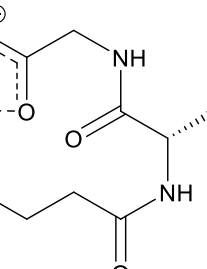
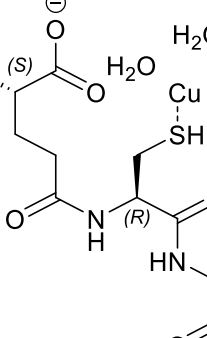
El primer paso consiste en encontrar todas las posibles conformaciones de los compuestos de GSH, tanto del GSH enlazado con el cobre a través del átomo de azufre ($S\cdots Cu$, compuesto cinético), como del GSH enlazado al cobre mediante átomos de oxígeno del carboxilato ($S\cdots O$, compuesto termodinámico). Para lograr esto, en primer lugar, dibujamos la molécula en Chemdraw y luego la copiamos como código SMILES que será usado como input del programa AQME^[21] en Visual Studio Code.

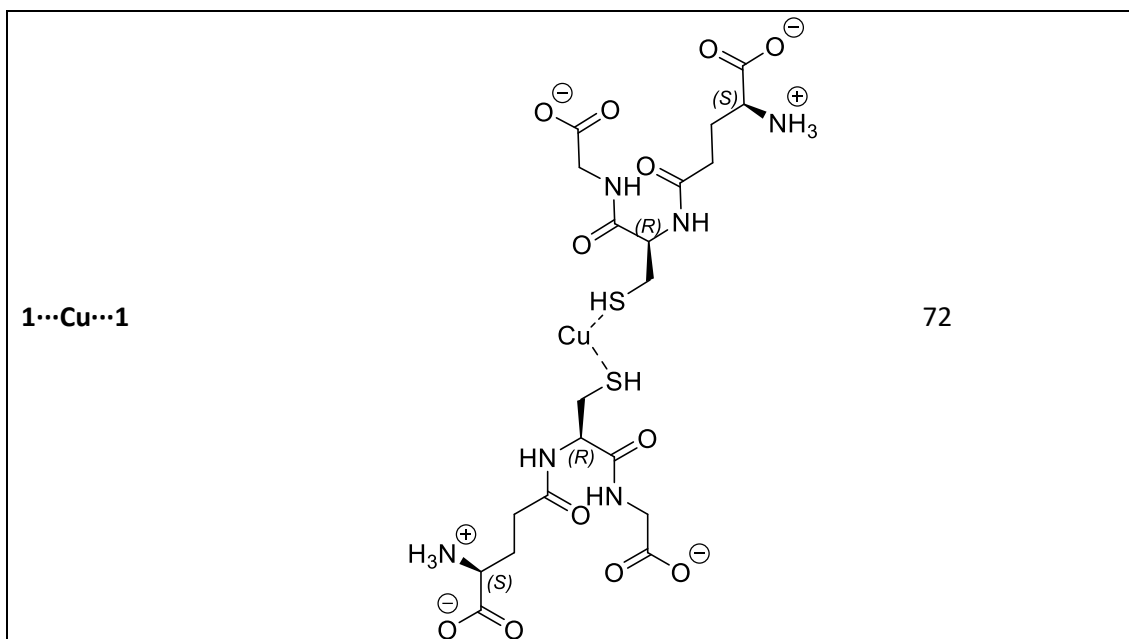
En un principio, obtuvimos confórmeros con el programa RDKit,^[22] que trabaja únicamente con campos de fuerza. Luego, con el objetivo de mejorar la precisión de los resultados, utilizamos CREST,^[23] un método más preciso que incorpora términos de química cuántica a niveles básicos. Dado que el número de conformaciones ascendía a más de 400, y considerando un tiempo de aproximadamente 20 horas para cada cálculo DFT de optimización con frecuencia, el tiempo necesario sería excesivamente alto. Por lo tanto, decidimos utilizar una ruta alternativa. Primero, calculamos la energía electrónica con DFT de las conformaciones, lo cual es un cálculo mucho más rápido que la optimización geométrica. A partir de estos resultados, seleccionamos las 20 conformaciones de menor energía para cada uno de los sistemas, las cuales fueron utilizadas para llevar a cabo las optimizaciones y cálculos de frecuencia.

Finalmente, después de repetir el proceso con las conformaciones de todas las moléculas involucradas en el mecanismo de la reacción, seleccionamos las conformaciones de menor energía de cada compuesto. Estas conformaciones serán usadas para visualizar las propiedades estructurales más importantes a lo largo del trabajo. La **Tabla 1** muestra el número de confórmeros de cada especie analizada. En total, se modelaron 684 confórmeros entre todos los sistemas de la reacción estudiada.

Tabla 1. Confórmeros obtenidos en cada uno de los compuestos estudiados.

Compuesto	Estructura	Confórmeros
1		303

1...Cu (O...Cu)		122
1...Cu (S...Cu)		57
2...Cu		30
1 + 3·H₂O		14
1...Cu + 3·H₂O		86



3.2. Análisis de los confórmeros más estables

Una vez obtenidos los confórmeros más estables, utilizamos GoodVibes para extraer las energías libres de Gibbs de cada uno de los compuestos estudiados. De esta manera, podremos ordenarlos de menor a mayor energía y nos quedaremos únicamente con el más estable de cada uno. Del confórmero más estable de GSH se pueden extraer varias conclusiones (**Figura 5**). En primer lugar, se observa que la molécula adopta una estructura plegada con el fin de aumentar su estabilidad. Esta estabilización se debe principalmente a la formación de un enlace de hidrógeno asistido por carga entre uno de los hidrógenos del catión amonio y el oxígeno del carboxilato. La longitud del enlace es bastante inferior a 2 Å, lo que sugiere que se trata de un enlace de hidrógeno fuerte. Esta es una de las principales razones por las que este confórmero es el más estable. En segundo lugar, se puede observar que, al plegarse, el azufre se encuentra alejado de los grupos carboxilato y del grupo amonio debido a la geometría que se forma con el pliegue.

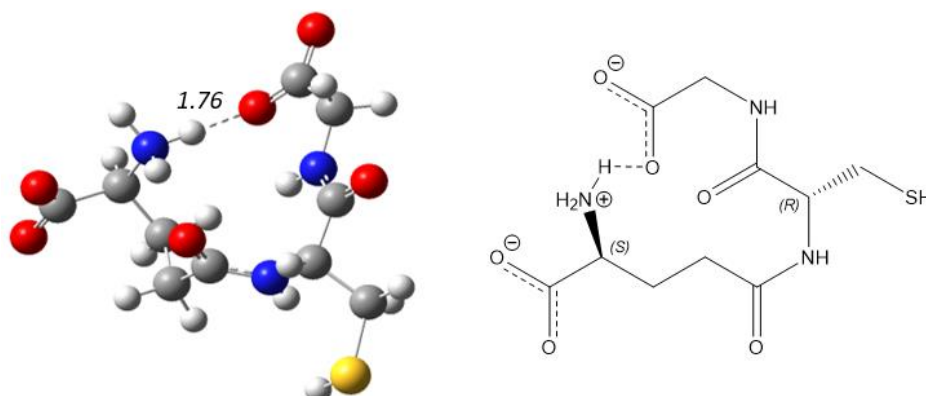


Figura 5. Estructura más estable del GSH con la longitud del enlace de hidrógeno, a la derecha la estructura en ChemDraw para su mejor visualización.

Como veremos más adelante, el complejo termodinámico, es decir, el más estable y de menor energía, contiene al cobre unido a dos grupos carboxilato. Esto es debido a que los enlaces que forman los oxígenos con el cobre son mucho más fuertes que los enlaces que forman los compuestos de azufre. La **Figura 6** nos muestra que cuando se forma el confórmero termodinámico el cobre se enlaza a tres de los cuatro oxígenos de los carboxilatos. Los tres enlaces muestran longitudes cercanas a 2 Å.

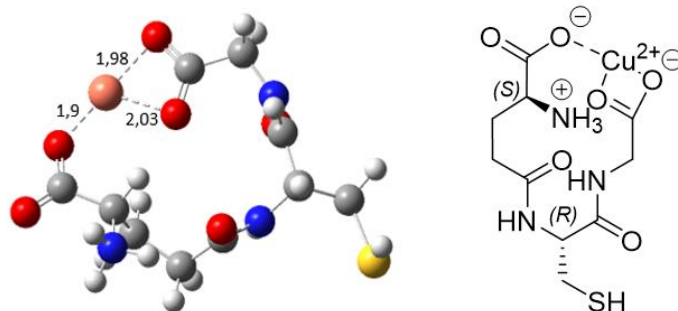


Figura 6. Complejo con el cobre enlazado a los carboxilatos.

Paralelamente, encontramos al complejo cinético que se forma con la coordinación del átomo de azufre y el cobre, que a la vez está unido a tres oxígenos de los carboxilatos como ocurriría previamente. Como se puede observar al comparar las representaciones de las **Figuras 6 y 7**, en esta ocasión el cobre no se une a los mismos oxígenos que en el compuesto termodinámico.

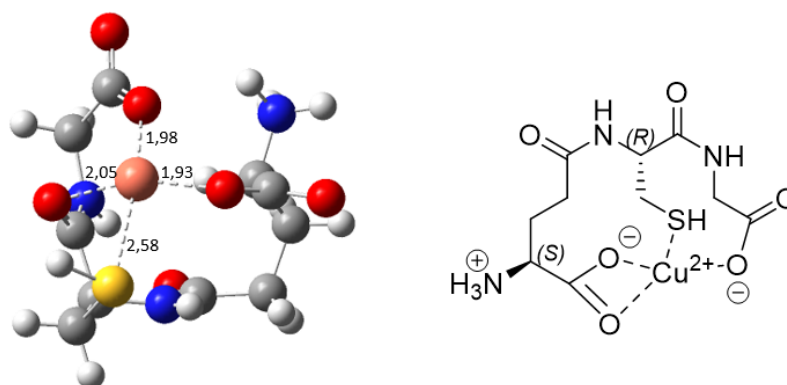


Figura 7. Complejo de cobre unido al GSH por el azufre y carboxilatos.

3.3. Estudio cinético y termodinámico en la adición de cobre

En este apartado se llevó a cabo un estudio cinético y termodinámico sobre la adición de cobre al GSH, con el objetivo de comprender i) por qué se une más rápido al azufre y ii) cuál es la especie estable que inhibe la reacción. Para lograr esto, se realizaron uniones de moléculas de agua a las diferentes posiciones enumeradas en el GSH de la **Figura 8**. Esta estrategia trata de ver la energía de interacción de las moléculas de agua del disolvente con los distintos grupos funcionales de la molécula. Cuanto mayor sea la energía de interacción, el intercambio de las moléculas de agua por el cobre será más lento.

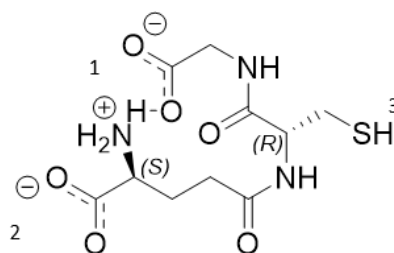


Figura 8. Posiciones donde se añadirá el agua en el GSH enumeradas.

La posición que muestra mayor energía de interacción con el agua es la posición uno, donde el agua está unida a un grupo carboxilato (energía de Gibbs relativa, ΔG , de 0.0 kcal/mol). Esta estabilidad provoca que sea la adición de cobre a esta posición sea más lenta (**Figura 9**). Por otro lado, en el extremo opuesto, tenemos la posición tres, donde hay una molécula de agua enlazada al azufre. Podemos observar que esta posición es la más inestable, con una diferencia de 2.6 kcal/mol en comparación con la posición más estable, lo que facilita que el agua en esta posición pueda ser extraída con mayor facilidad. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones experimentales, las cuales muestran una coordinación rápida del cobre con el grupo tiol.

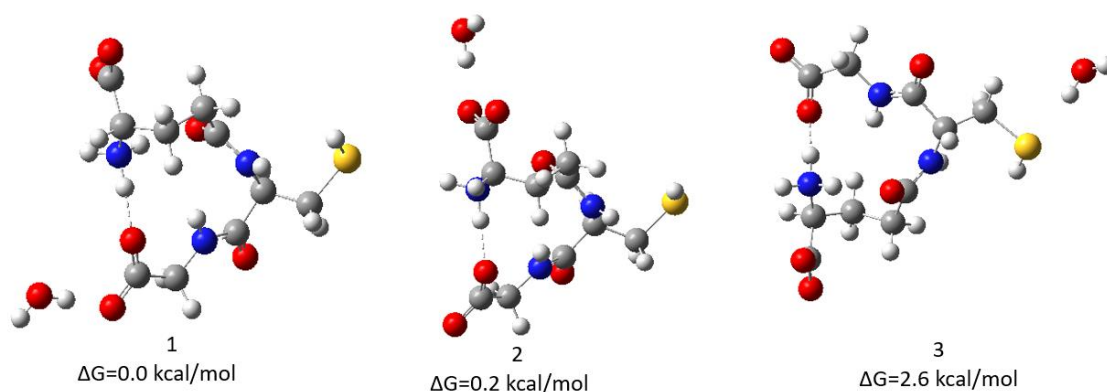


Figura 9. Conformaciones más estables de GSH incluyendo un agua en cada posición enumerada en la **Figura 8**, con sus energías relativas.

Llevamos a cabo otra aproximación similar con un compuesto que incorpora moléculas de agua en los tres puntos (**Figura 10**). En este caso, usamos una estrategia inversa para comparar la energía de las interacciones: en lugar de añadir una molécula de agua, se va a retirar. Al emplear tres moléculas de agua en lugar de una se pretenden simular las interacciones del GSH con el medio acuoso de una manera más precisa. En esta estrategia, primero, calculamos la energía del sistema con las tres aguas en las posiciones mostradas arriba. Seguidamente, quitamos una molécula de cada posición para medir su estabilidad. Como cabía esperar, el sistema donde se retira el agua que interacciona con el grupo tiol es el más estable, puesto que posee dos interacciones entre moléculas de agua y grupos carboxilato. Estos resultados sugieren de nuevo que la primera molécula de agua desplazada por el cobre sería aquella unida al grupo tiol.

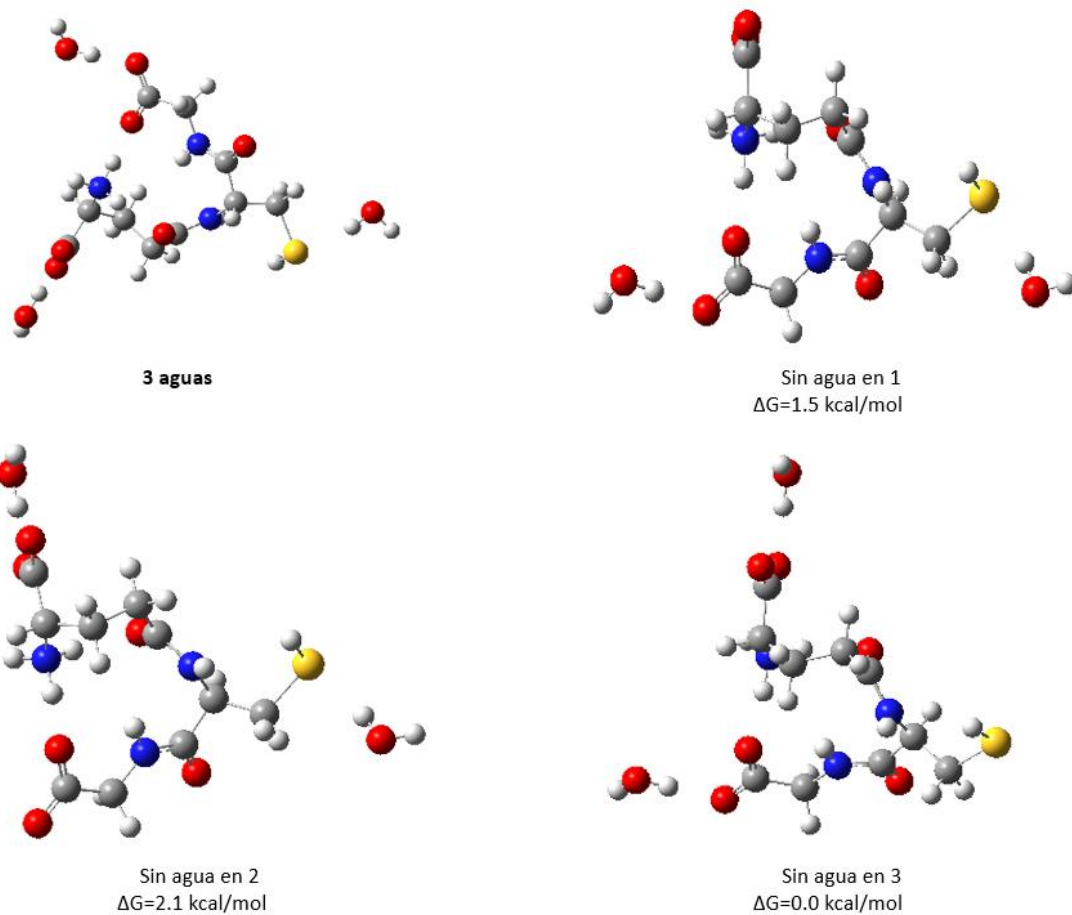


Figura 10. Conformaciones y energías relativas de la eliminación de agua.

Por último, usamos una última estrategia similar a la anterior, pero usando cuatro moléculas de agua para darle más realismo al sistema, ya que en un sistema real la molécula estaría completamente solvatada. Al igual que en las aproximaciones anteriores, retirar el agua de la posición del azufre es lo que menos energía conlleva para el sistema.

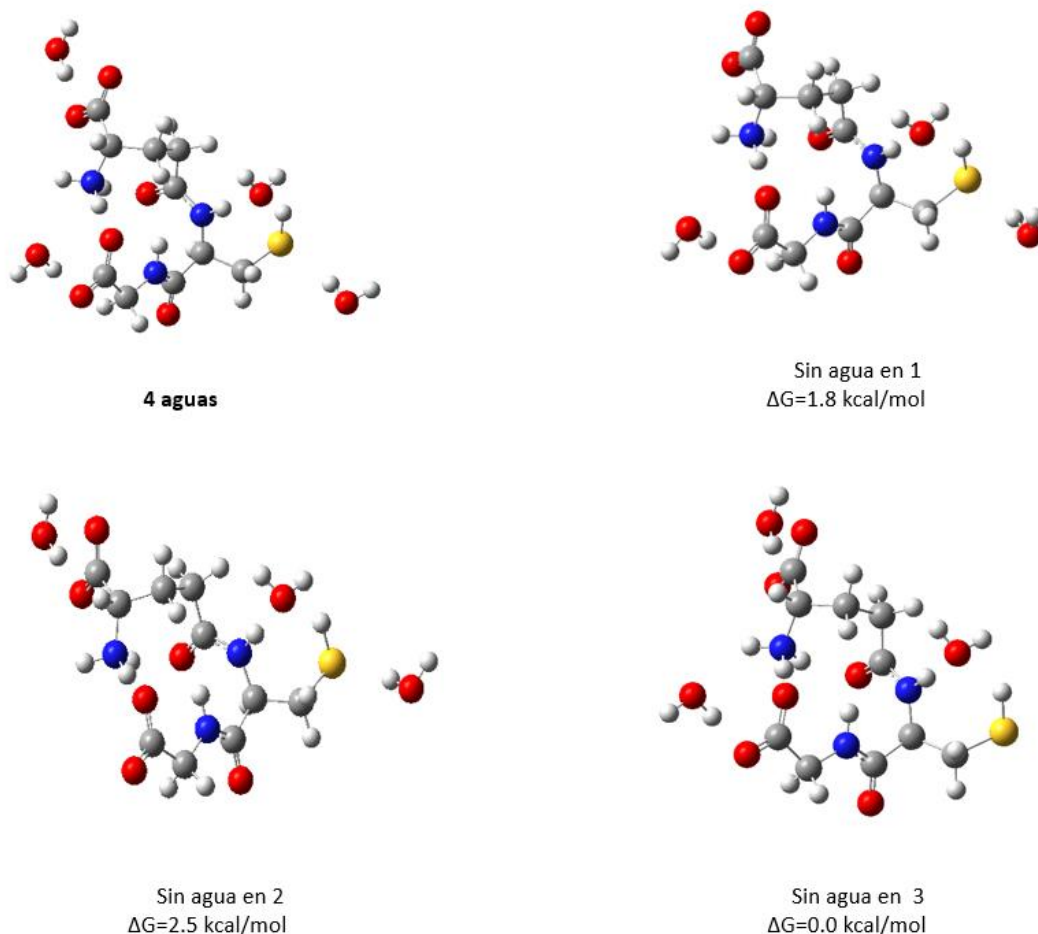


Figura 11. Energías relativas de la eliminación de una molécula de agua en cada posición.

Estas tres aproximaciones muestran resultados que se corresponden con las observaciones experimentales. En todos los casos, el cobre puede desplazar con más facilidad al agua que interacciona con el grupo tiol. Por lo tanto, la coordinación en esta posición da lugar a un complejo inicial cinético.

Cuando al compuesto cinético se le priva de oxígeno molecular, se comprobó experimentalmente que se forma otro complejo distinto el cual no presenta la coordinación entre el cobre y el grupo tiol. Para estudiar este complejo termodinámico, comparamos las energías relativas del GSH con el cobre coordinado al azufre y sin coordinar (**Figura 12**). Como indicaban los resultados experimentales, la energía relativa es mucho menor (18.5 kcal/mol) en el complejo que presenta el cobre unido a dos grupos carboxilato.

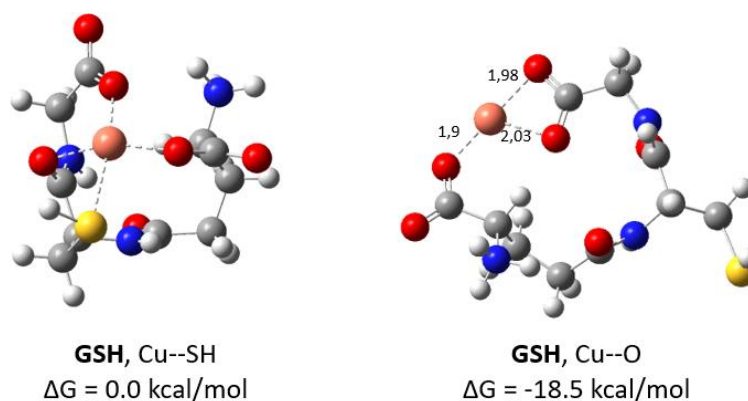


Figura 12. Energías relativas del GSH con distintas coordinaciones del cobre.

En un segundo estudio termodinámico, añadimos tres moléculas de H_2O al átomo de cobre enlazado a los complejos de GSH presentados en la **Figura 12**. De esta manera se pretende estudiar la estabilidad de la molécula con el cobre de una manera más parecida al sistema solvatado. Al igual que en el caso anterior, la diferencia de energía es de 17.4 kcal/mol, lo que nos quiere decir que el cobre unido al oxígeno es mucho más estable que unido al azufre (**Figura 13**).

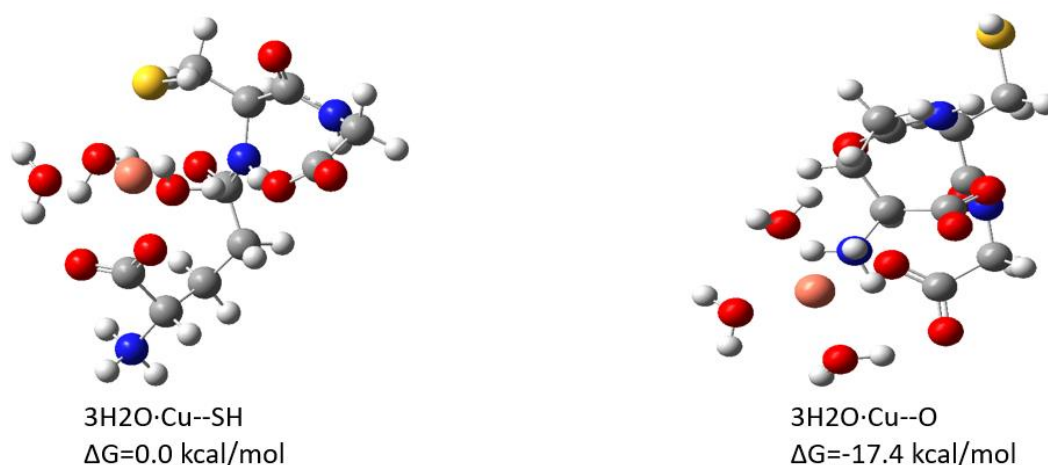


Figura 13. Comparación de las energías entre sistemas que presentan el cobre enlazado y sin enlazar al grupo tiol con tres moléculas de H_2O .

Para avalar nuestras afirmaciones nos apoyamos en un trabajo experimental desarrollado por Compton y colaboradores.^[7] En este trabajo, los autores observaron que tras la adición del cobre primero desaparece el enlace S-H, lo que podía relacionarse la aparición de GSSG o a la formación del complejo de cobre unido al azufre. Usando técnicas de ultravioleta-visible (UV-vis), pudieron observar que el complejo que se formaba era el de la coordinación del cobre con el grupo tiol. Tras dejar este compuesto un tiempo en ausencia de oxígeno, los autores observaron como el complejo de GSH reaparecía, dando lugar al complejo con el cobre enlazado únicamente a los carboxilatos.

Con los cálculos computacionales obtenidos en este proyecto se refuerza esta hipótesis experimental, sugiriendo que existen una reacción más rápida (hacia el complejo cinético) y otra más lenta (complejo termodinámico):



La existencia de distintos caminos resalta la importancia que tiene la cantidad de oxígeno disuelto en el medio, puesto que si el GSH no se oxida rápido se forman especies estables que inhiben su posterior oxidación.

3.4. Estudio de distribución de espín

El Cu(II) presenta una configuración electrónica d9, lo que implica la presencia de un electrón desapareado. Este electrón es visible en la distribución de espín de los resultados de Gaussian. Sin embargo, mientras que en algunos sistemas podemos encontrar al electrón localizado mayormente en el átomo de cobre (0.700 e, **Figura 14B**), en otros resultados no se pudo observar esta densidad electrónica en el cobre (0.001, **Figura 14A**). En su lugar, Gaussian la desplazaba hacia átomos lejanos al cobre. Esto claramente indicaba que algo no iba según lo previsto y que ese cálculo debía ser eliminado.

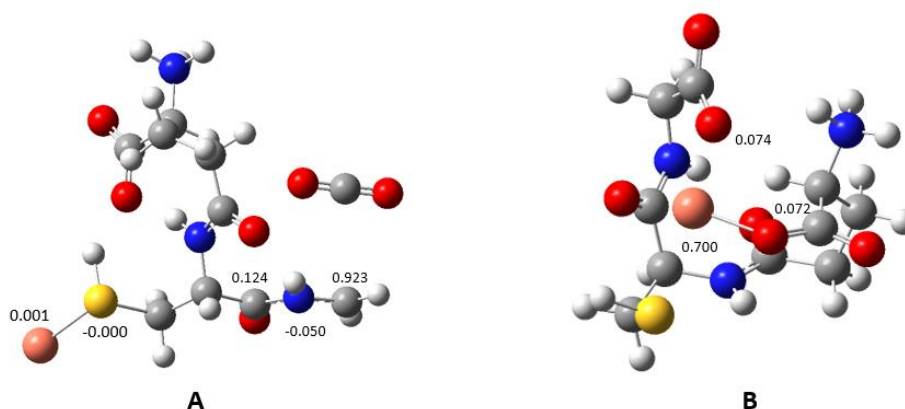


Figura 14. Molécula de GSH unida al cobre con la distribución de espín más importante enumerada.

Cuando se añade agua al cobre, es más inusual observar este factor no deseado en los cálculos, ya que Gaussian compensa mejor la distribución del electrón desapareado. En la **Figura 15** se muestra que es el confórmero de GSH más estable con moléculas de agua añadidas. Se puede observar que el espín desapareado se distribuye mayormente en el cobre (0.743 e), con algo de localización en el azufre y los oxígenos coordinados al cobre.

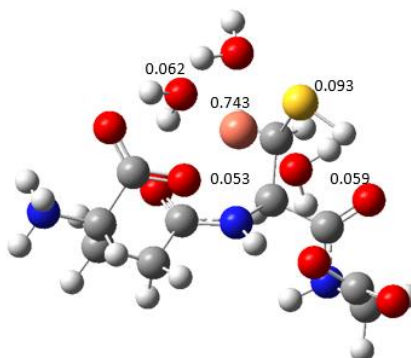


Figura 15. Molécula de GSH enlazada al cobre por el azufre y tres aguas.

3.5. Estudio mecanístico de la reacción

Como último paso del estudio de la reacción, analizamos los datos de la oxidación de GSH. Primero calculamos el intermedio con el cobre unido a los dos azufres previo a la formación del enlace disulfuro (**Figura 16**), y posteriormente nos centramos en la molécula oxidada de GSSG coordinada al cobre.

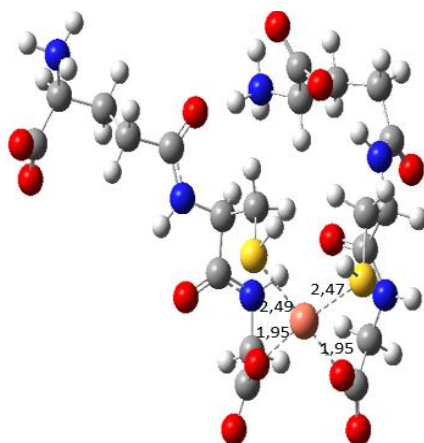


Figura 16. Dos moléculas de GSH, en el intermedio previo a la formación del enlace disulfuro.

El último paso de la oxidación incluye la formación de un enlace disulfuro entre ambas moléculas de GSH. Esta reacción conduce a la oxidación de la molécula. Además, se observa que el cobre se coordina con tres de los cuatro carboxilatos presentes en la molécula de GSSG (**Figura 17**). Específicamente, se une a tres oxígenos, uno de cada carboxilato. Esta observación contradice la suposición inicial realizada por el campo experimental, que sugería que el cobre se uniría a un carboxilato de cada molécula y a un nitrógeno de cada una, como se muestra en la **Figura 4**.

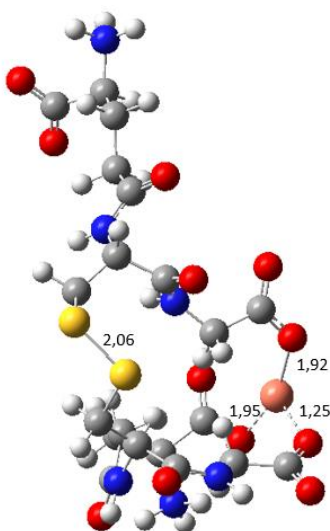


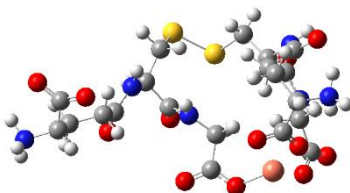
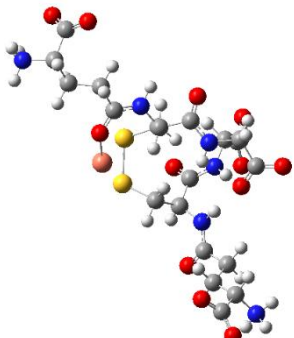
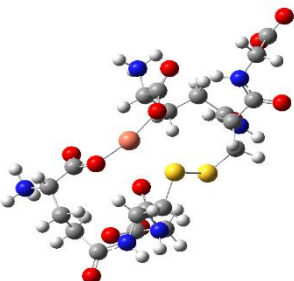
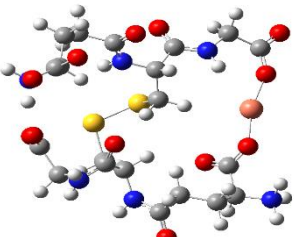
Figura 17. Dos moléculas de GSH enlazadas por el puente disulfuro.

A continuación, vamos a comparar las energías relativas de los conformeros de GSSG. De esta manera, podremos determinar cuál es más estable y así realizar los cálculos de energía para la reacción del último paso (**Tabla 2**). Encontramos tres tipos distintos de conformeros, siendo el más estable el que contenía el cobre unido a tres grupos carboxilato (**Tabla 3**).

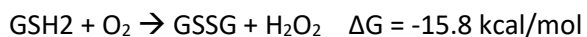
Tabla 2. Energías relativas de los conforméromos de GSSG encontrados.

Confórmero	Energías relativas (kcal/mol)
2 (O...Cu...O)	0.0
2 (Cu...SS)	18.1
2 (O...Cu...SS)	16.4

Tabla 3. Conforméromos más estables del GSSG.

Confórmero	Distribución espacial
2 (O...Cu...O)	
2 (Cu...SS)	
2 (O...Cu...SS)	
2 (O...Cu...O)	

Para poder completar la diferencia de energía libre de Gibbs (ΔG) de la reacción, calculamos las energías referidas a las moléculas de O_2 y del peróxido de hidrógeno. Con estos datos, obtuvimos una ΔG para la oxidación de -15.8 kcal/mol.



Como vemos el proceso de esta última reacción es un proceso termodinámicamente favorable debido a que su ΔG es negativa. Esto sugiere que el GSSG se acumula progresivamente

conforme el GSH se va oxidando. La ΔG es bastante grande, lo que sugiere que la reacción no es reversible. El ciclo catalítico completo al que ha llevado este estudio se presenta en la **Figura 18**.

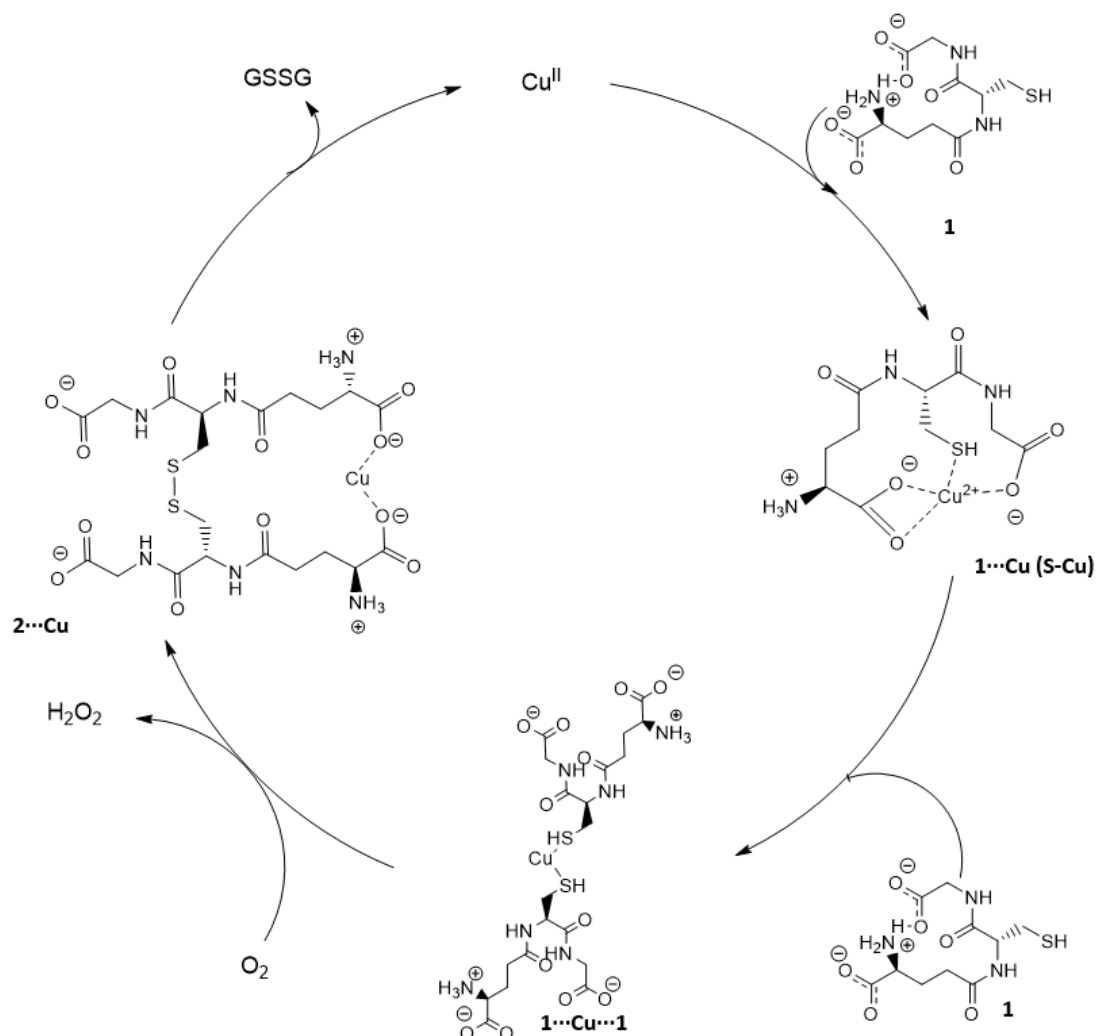


Figura 18. Mecanismo de la reacción en base los datos obtenidos durante el trabajo.

4. Conclusiones

- Se encontraron un número muy alto de confórmeros para los diversos sistemas estudiados. En algunas ocasiones hubo que descartar cálculos donde la densidad de espín no estaba localizada en el cobre.
- Hemos estudiado de manera teórica que el producto más rápido, es decir, el complejo cinético se forma cuando el cobre se une al azufre. Esto es debido a la facilidad para eliminar moléculas de agua que interaccionan con el grupo tiol en comparación con las que se unen a los carboxilatos.
- Se comprobó que el complejo inicial que inhibe la reacción resulta de la coordinación del cobre a varios grupos carboxilato, dejando al grupo tiol libre.
- Se adicionó moléculas de agua en los distintos cálculos para obtener una imagen más realista de lo que debería de ser un sistema en una célula en medio acuoso. Sin embargo, la adición de agua resultó llevar a resultados similares a los obtenidos sin moléculas de agua.

- La reacción de oxidación final en la que oxígeno oxida a GSH es una reacción termodinámicamente favorable ($\Delta G < 0$).
- Los resultados en todo momento han salido conforme a la hipótesis de partida, en ningún momento hemos encontrado resultados que se saliesen de la línea que manejábamos en cuanto al seguimiento que podía llevar la reacción.

5. Métodos computacionales

Gaussian 16 se usó para ejecutar todos los cálculos computacionales de energía electrónica, optimización y frecuencia. La combinación ω B97X-D /6-31+G(d,p) se utilizó para optimizar las geometrías de los puntos estacionarios. Este funcional tiene se usa comúnmente en sistemas con interacciones no covalentes, como los enlaces de hidrógeno. Para confirmar que las geometrías optimizadas eran mínimos de energía, se realizaron cálculos de frecuencia vibracional (sin frecuencias imaginarias). Además, se tuvieron en cuenta los efectos del solvente en todos los cálculos utilizando el modelo de solvatación SMD (solvente = agua). Los errores de superposición de bases (BSSEs) y los errores de incompletitud de bases (BSIEs) se redujeron utilizando correcciones a la energía electrónica con ω B97X-D/Def2-QZVPP.

6. Bibliografía

- [1] Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., & Piñeros, M. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- [2] Kushi, L. H., Doyle, C., McCullough, M., Rock, C. L., Demark-Wahnefried, W., Bandera, E. V., Gapstur, S. M., Patel, A. V., Andrews, K. R., & Gansler, T. (2012). American Cancer Society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention. *CA: A Cancer J. Clinic.*, 62(1), 30-67. <https://doi.org/10.3322/caac.20140>.
- [3] Parkin, D. M., Boyd, L., & Walker, L. C. (2011). The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *Brit. J. Cancer*, 105(S2), 77-81.
- [4] Instituto Nacional de Estadística (INE). Defunciones según la causa de muerte. [último acceso el 03/05/2023] Disponible en: <https://www.ine.es/jaxiT3/Datos.htm?t=6609>.
- [5] Ferlay, J., Laversanne, M., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., & Bray, F. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Accesible en: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>, último acceso [03/05/2023].
- [6] Lozano, G. M., Bejarano, I., Espino, J., González, D., Ortiz, Á., García, J. A., Rodríguez, A., & Pariente, J. A. (2009). Relationship between Caspase Activity and Apoptotic Markers in Human Sperm in Response to Hydrogen Peroxide and Progesterone. *J. Reprod. Develop.*, 55(6), 615-621.
- [7] Ngamchuea, K., Batchelor-McAuley, C., & Compton, R. G. (2016). The Copper(II)-Catalyzed Oxidation of Glutathione. *Chem. Eur. J.*, 22(44), 15937-15944.
- [8] Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., & Casini, A. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.*, 66(8), 1499-1503.

- [9] Kennedy, R. S., Konok, G. P., Bounous, G., Baruchel, S., & Lee, T. R. (1995). The use of a whey protein concentrate in the treatment of patients with metastatic carcinoma: a phase I-II clinical study. *PubMed*, 15(6B), 2643-2649.
- [10] Kachur, A. V., Koch, C. J., & Biaglow, J. E. (1998). Mechanism of Copper-Catalyzed Oxidation of Glutathione. *Free Rad. Res.*, 28(3), 259-269.
- [11] Ray, P. S., Huang, B., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.*, 24(5), 981-990.
- [12] Bonet-Aleta, J., Encinas-Gimenez, M., Urriolabeitia, E. P., Martin-Duque, P., Hueso, J. L., & Santamaria, J. (2022). Unveiling the interplay between homogeneous and heterogeneous catalytic mechanisms in copper-iron nanoparticles working under chemically relevant tumour conditions. *Chem. Sci.*, 13(28), 8307-8320.
- [13] Gonzalez, D., Bejarano, I., Barriga, C., Rodriguez, A. B., & Pariente, J. A. (2010). Oxidative Stress-Induced Caspases are Regulated in Human Myeloid HL-60 Cells by Calcium Signal. *Curr. Sign. Transduct. Ther.*, 5(2), 181-186.
- [14] Pastore, A., Piemonte, F., Locatelli, M., Russo, A., Gaeta, L., Tozzi, G., & Federici, G. (2001). Determination of Blood Total, Reduced, and Oxidized Glutathione in Pediatric Subjects. *Clinic. Chem.*, 47(8), 1467-1469.
- [15] Lewars, E. G. (2010). *Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics*. Springer Science & Business Media.
- [16] Smith, S. M., & Sutcliffe, B. T. (2007). The Development of Computational Chemistry in the United Kingdom. *En Reviews in Computational Chemistry*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470125878.ch5>.
- [17] Boys, S. F., Cook, G. B., Reeves, C., & Shavitt, I. (1956). Automatic Fundamental Calculations of Molecular Structure. *Nature*, 178(4544), 1207-1209.
- [18] Stewart, R., Davidson, E. R., & Simpson, W. R. (1965). Coherent X-Ray Scattering for the Hydrogen Atom in the Hydrogen Molecule. *J. Chem. Phys.*, 42(9), 3175-3187.
- [19] Parr, R. G., Yang, W., & Weitao, Y. Y. (1994). *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*. OUP USA.
- [20] Sholl, D., & Steckel, J. A. (2011). *Density Functional Theory: A Practical Introduction*. John Wiley & Sons.
- [21] Alegre-Requena, J. V., Sowndarya, S., Pérez-Soto, R., Alturaifi, T., & Paton, R. (2023). AQME: Automated Quantum Mechanical Environments for Researchers and Educators. *WIREs. Comput. Mol. Sci.*, DOI: 10.1002/wcms.1663.
- [22] Landrum, G. *RDKit*. <https://www.rdkit.org>.
- [23] Grimme, S. (2019) *J. Chem. Theor. Comput.* 15, 2847-2862.