

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Estudio teórico de la hidrólisis de antibióticos betalactámicos catalizada por un complejo organometálico biomimético dinuclear de Zn(II) de la betalactamasa Nueva Delhi 1 (NDM-1).

Juan Esteban Zurita Lema

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Biotecnología

Quito, 14 de mayo de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Estudio teórico de la hidrólisis de antibióticos betalactámicos catalizada por un complejo organometálico biomimético dinuclear de Zn(II) de la betalactamasa Nueva Delhi 1 (NDM-1).

Juan Esteban Zurita Lema

Nombre del profesor, Título académico

José Ramón Mora, PhD

Quito, 14 de mayo de 2021

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Juan Esteban Zurita Lema

Código: 00125756

Cédula de identidad: 1723871933

Lugar y fecha: Quito, 14 de mayo de 2021

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

La metalo-betalactamasa 1 de Nueva Delhi (NDM-1) se considera un problema de salud pública desde su primer informe clínico en 2009. La comunidad científica debate detalles del mecanismo de hidrólisis de la enzima. Investigadores reportaron en el 2001 datos experimentales sobre la hidrólisis de nitrocefina por un complejo organometálico biomimético dinuclear de Zn para NDM-1. Los datos pueden servir para crear modelos computacionales. Por ello, en este trabajo, se estudió dos mecanismos de reacción por métodos DFT, uno concertado y el otro por etapas. La reacción se compone por el ataque nucleofílico del grupo hidróxido en puente entre los átomos de Zn del sitio activo del complejo, hacia el grupo carbonilo del anillo betalactámico. Cálculos de optimización y de frecuencias se hicieron para los puntos estacionarios de la coordenada de reacción. Se usó el nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d,p). Los resultados se compararon con datos experimentales para validarlos. Además, se obtuvo un perfil de coordenadas intrínsecas de reacción (IRC de sus siglas en inglés), la fuerza de reacción, el flujo electrónico, la dureza química, el orden de enlace natural y la sincronicidad del sistema. También, se modeló la hidrólisis de ampicilina para comprender el efecto de los grupos vecinos cerca del anillo betalactámico sobre el mecanismo. Se descubrió que el mecanismo preferido era por etapas. Este resultado es consistente con los hallazgos experimentales en publicaciones anteriores. Los perfiles de dureza encontrados probablemente se vieron afectados por los efectos de los solventes y la baja sincronicidad de las reacciones. La barrera de activación del mecanismo está dominada por reordenamientos geométricos. La nitrocefina y la ampicilina poseen estados de transición tardíos. Este es un buen primer modelo que será usado como punto de partida para cálculos de metadinámica, que considera efectos anarmónicos, no considerados previamente por los métodos utilizados en este estudio.

Palabras clave: complejo organometálico, mecanismo de reacción, NDM-1, DFT

ABSTRACT

New Delhi metallo-beta-lactamase 1 (NDM-1) has been considered a public health problem since its first clinical report in 2009. Details of the enzyme's hydrolysis mechanism are still debated by the scientific community. Researchers reported in 2001 experimental data on nitrocefin hydrolysis through the Zn dinuclear biomimetic organometallic complex for NDM-1. This data can be used to create computational models. Therefore, in this work, two reaction mechanisms were studied by DFT methods, one concerted and the other stepwise. The reaction is composed by the nucleophilic attack of the bridging hydroxide group between the Zn atoms of the active site of the biomimetic complex, towards the carbonyl group of the beta-lactam ring. Optimization and frequency calculations were made on the stationary points of the reaction coordinate. The theory level B3LYP/6-31+G(d, p) was used. These results were compared with the experimental data to validate them. In addition, a reaction intrinsic coordinate profile (IRC), reaction force, electronic flux, chemical hardness, natural bond order, and system synchronicity were obtained. Also, ampicillin hydrolysis was modeled to understand the effect of neighboring groups near the beta-lactam ring on the mechanism. The preferred mechanism was found to be stepwise. This result is consistent with the experimental findings in previous publications. The chemical hardness profiles found were probably affected by the effects of solvents and the low synchronicity of the reactions. The activation barrier for the passage of the mechanism studied is dominated by geometric rearrangements. Nitrocefin and ampicillin have late transition states. This is a good first model that will be used as a starting point for metadynamic calculations, which consider anharmonic effects, not previously considered by the methods used in this study.

Key words: organometallic complex, reaction mechanism, NDM-1, DFT

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	11
Métodos.....	15
Selección de especies químicas	15
Optimización geométrica de los puntos estacionarios.....	15
Cálculo de parámetros cinéticos y termodinámicos de activación	16
Perfil de IRC de los estados de transición	16
Fuerza de reacción y flujo electrónico.....	16
Orden de Enlace Natural y parámetros geométricos	17
Resultados	18
Parámetros termodinámicos y cinéticos del modelo computacional.....	18
Parámetros estructurales	18
Análisis de Coordenada Interna de Reacción	19
Análisis de Orbital Natural de Enlace	20
Discusión.....	21
Validación del modelo computacional	21
Mecanismo Propuesto.....	22
Observaciones del Formalismo de Fuerza de Reacción	23
Comparación del complejo organometálico con enzima NDM-1	24
Conclusiones	25
Tablas	26
Figuras.....	30
Referencias Bibliográficas	36
Anexos	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros termodinámicos y cinéticos calculados a T=298.15 K para el ataque nucleofílico del grupo μ -OH del complejo al anillo betalactámico de los antibióticos nitrocefina y ampicilina, comparados con la medición experimental.....	26
Tabla 2. Parámetros estructurales para el reactivo (R), estado de transición (ET) e intermediario aniónico (I1) durante el ataque nucleofílico al grupo carbonilo del anillo betalactámico de ampicilina y nitrocefina de cálculos B3LYP/6-31+G(d,p).....	27
Tabla 3. Energías del Formalismo de Fuerza de Reacción calculadas para nitrocefina y ampicilina a partir del perfil de IRC de cada ET por etapas.....	28
Tabla 4. Análisis NBO para formación de intermediario aniónico de hidrólisis de nitrocefina y ampicilina a partir de cálculos en B3LYP/6-31+g(d,p).....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Paso de ruptura de anillo betalactámico para nitrocefina.	30
Figura 2. Paso de ruptura de anillo betalactámico para ampicilina.	31
Figura 3. Perfil de IRC, fuerza de reacción y flujo electrónico para nitrocefina.	32
Figura 4. Perfil de IRC, fuerza de reacción y flujo electrónico para ampicilina.	33
Figura 5. Nomenclatura de átomos en el centro de reacción.	34
Figura 6. Superposición de proteína y enzima NDM-1.	35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Coordenadas geométricas optimizadas del complejo organometálico y de los estados de transición de nitrocefina y ampicilina y detalles sobre dibujo de estructuras	41
Anexo 2. Detalles geométricos adicionales sobre las especies en reacción e híbridos de resonancia	45
Anexo 3. Ecuaciones.....	48
Anexo 4. Librería de funciones para procesamiento de datos en Python	50

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son metabolitos secundarios producidos por microorganismos que poseen funciones ecológicas y fisiológicas tales como señalización celular, virulencia, antibiosis y regulación de la expresión génica (Martinez, 2008; Yim et al., 2007). Además, son recursos importantes de la medicina moderna y la industria agrícola. Son tan efectivos para tratar infecciones bacterianas que se consideran uno de los agentes terapéuticos más importantes desarrollados por el ser humano (Fajardo et al., 2009). Sin embargo, el uso indiscriminado en la industria y la prescripción inapropiada de antibióticos ha generado microorganismos resistentes a múltiples antibióticos y una infección por estos patógenos puede resultar letal e imposible de tratar (Zaman et al., 2017).

La resistencia a antibióticos ocurre gracias a genes que codifican proteínas especializadas en degradar, neutralizar o transportar los antibióticos fuera de la célula (Davies & Davies, 2010). Además, los genes de resistencia son heredables entre especies distintas de bacterias debido a la transferencia horizontal de genes. De esta forma, muchas bacterias patógenas para el ser humano adquieren genes de resistencia del ambiente, incluso sin haber sido expuestas directamente al antibiótico (Huddleston, 2014).

Las bacterias multirresistentes poseen resistencia a más de un antibiótico, ya sea porque poseen varios genes que confieren diferentes tipos de resistencia o poseen genes que codifican enzimas con amplio espectro de catálisis. El segundo es el caso de la metalo-betalactamasa de Nueva Delhi 1 (NDM-1). Esta metaloenzima de Zn(II) es una betalactamasa de clase B, codificada por el gen *blaNDM-1*, que fue reportada por primera vez en un paciente en Nueva Delhi, India (Yong et al., 2009), tras haberse infectado por una cepa de *K. pneumoniae* resistente a varios antibióticos comunes y a carbapenemas, antibióticos de último recurso (Kumarasamy et al., 2010). Las estructuras de la apoenzima obtenidas por cristalografía de rayos X de 4 variantes en enterobacterias (PDB ID: 3RKJ, 3RKK, 3SBL, 3SFP) revelan que la

cavidad en el sitio activo es alargada y posee loops flexibles y con varios residuos catalíticos, y se piensa que esta es la propiedad que le permite a NDM-1 hidrolizar un amplio espectro de antibióticos betalactámicos (Kim et al., 2011, 2013).

Las metalo-betalactamasas catalizan la hidrólisis del enlace amida del anillo betalactámico, que consiste en un ataque nucleofílico al grupo carbonilo del anillo y luego la formación de un grupo carboxilo y un anión amida, seguido de varios pasos de protonación (Concha et al., 1996). Se ha propuesto varios mecanismos, pero existen desacuerdos sobre: 1) la importancia de los átomos de Zn durante la catálisis, 2) la identidad del nucleófilo, 3) el donador del átomo de hidrógeno al nitrógeno del grupo amida roto, 4) la forma de unión al sustrato, 5) y los intermediarios del mecanismo (Lisa et al., 2017).

El primer intermediario formado por la hidrólisis es aniónico y está coordinado a un átomo de Zn. Esto se evidencia en varios antibióticos como cefalexina, penicilina G, nitrocefina y meropenem (Das & Nair, 2017; Garrity et al., 2005; Wang et al., 1998). Sin embargo, no se conoce qué tipo de estado de transición (ET) es el que describe el intermediario de la manera más apropiada. Estudios con la enzima proponen que la formación del intermediario aniónico implica la existencia de una especie química previa a la ruptura del enlace amida con un carbono tetraédrico previo. Esto sugiere que el primer paso de la hidrólisis posee un mecanismo por etapas (Das & Nair, 2017; Feng et al., 2014; Kaminskaia et al., 2001; Kim et al., 2011, 2013; Massova & Mobashery, 1997; Wang et al., 1999), pero existen otros estudios teóricos que sugieren la existencia de un mecanismo concertado (Petrongolo & Ranghino, 1979; Tripathi & Nair, 2015). Varios de estos estudios modelan la reacción partiendo de los intermediarios para hacer estimaciones sobre barreras energéticas y otros parámetros termodinámicos, sin embargo, no hay estudios que partan desde varios ET como hipótesis para encontrar los intermediarios posibles y determinar el mecanismo correcto.

Las enzimas pueden ser sistemas muy complejos de estudiar. Existe aún una discusión extensa sobre el nivel de teoría apropiado para describir los mecanismos catalíticos. La teoría del estado de transición (TET), desarrollada por Henry Eyring, ha demostrado ser de gran utilidad para entender los cambios químicos de una reacción sobre su superficie de energía potencial (PES), incluso si los sistemas son tan complejos como un ET poliatómico (Laidler & King, 1983). Lo importante de la TET es que sus predicciones validarse mediante resultados de estudios experimentales, donde se reporte el perfil energético y la constante de velocidad de la reacción. Si las predicciones computacionales son altamente similares a los datos experimentales, se puede decir el modelo computacional captura el comportamiento de una reacción química y se puede utilizar para responder preguntas de investigación que de manera experimental sería difícil (Dutton et al., 2006; Olsson et al., 2006).

Un estudio experimental del 2001 logró caracterizar termodinámicamente y cinéticamente el intermediario aniónico observado durante la hidrólisis del antibiótico nitrocefina, a través de la síntesis de $[Zn_2L_1(\mu-NO_3)(NO_3)_2]$, un complejo organometálico dinuclear de Zn que mimetiza la acción catalítica de metalo-betalactamasas, como NDM-1 (Kaminskaia et al., 2001). Los datos de este estudio son una importante guía para desarrollar un modelo computacional que permita explorar el mecanismo de hidrólisis de antibióticos por metalo-betalactamasas, ya que se los puede usar para validar un modelo computacional del mecanismo propuesto. Esto motivó a usar este sistema químico en el presente estudio para caracterizar los mecanismos de hidrólisis y usarlo como punto de partida en modelos más complejos que utilicen la enzima NDM-1.

Varios estudios que caracterizan estados de transición de reacciones químicas orgánicas utilizan la técnica de IRC para obtener el camino de mínima energía desde reactivos a productos sobre la PES (Maeda et al., 2015). Hay varios descriptores que se derivan de un perfil de IRC. La fuerza de reacción, que, en analogía a mecánica clásica, calcula la fuerza del sistema desde

del perfil de IRC con respecto a la coordenada de reacción y la analiza para entender la importancia de rearrreglos geométricos y electrónicos en las barreras de activación (Chandra & Uchimaru, 2001; Morell et al., 2015; Rincon et al., 2020). El flujo electrónico y la dureza química permiten entender qué regiones del perfil de IRC tienden a ser más reactivos en función del potencial químico. En estudios varios se ha logrado utilizar estos descriptores para caracterizar y validar sistemas organometálicos como análogos apropiados para estudio de catálisis bioquímica (Terán et al., 2018) y ataque nucleofílico (Cuesta et al., 2020; J. Mora et al., 2018; J. R. Mora et al., 2017). Así, es interesante el uso de estas herramientas para la caracterización de modelos de reacciones de hidrólisis como la catalizada por NDM-1.

De esta manera, el objetivo principal de este trabajo de investigación es generar y validar un modelo computacional del primer paso del mecanismo de reacción de la hidrólisis de nitrocefina y ampicilina mediada por el complejo organometálico $[Zn_2L_1(\mu\text{-NO}_3)(\text{NO}_3)_2]$ utilizando métodos de la teoría del funcional de la densidad (DFT) y partiendo de dos ET como hipótesis: uno para el mecanismo concertado y otro para el mecanismo por etapas. El enfoque principal es sobre el ataque nucleofílico del grupo $\mu\text{-OH}$ del complejo organometálico al grupo carbonilo del anillo betalactámico de ambos antibióticos. Este modelo servirá en estudios futuros como punto de partida para responder hipótesis sobre pasos importantes en la catálisis de la enzima y ayudar a validar mecanismos propuestos en la literatura. Por último, se escribió un script en el lenguaje de programación Python para automatizar el procesamiento de datos.

MÉTODOS

Selección de especies químicas

Los complejos $[\text{Zn}_2\text{L}_1(\mu\text{-OH})(\text{nitrocefina})]^+$ y $[\text{Zn}_2\text{L}_1(\mu\text{-OH})(\text{ampicilina})]^+$ se estudiaron como ET. Se los construyó a partir de $[\text{Zn}_2\text{L}_1(\mu\text{-OH})]^{2+}$, $(\text{nitrocefina})^-$ y $(\text{ampicilina})^-$. La ampicilina fue incluida en el presente estudio como modelo alternativo que permitirá observar los efectos electrónicos de grupos funcionales adyacentes al anillo betalactámico sobre la cinética del modelo. La comparación de estos 2 modelos permitirá establecer la relación que existe entre la estructura del antibiótico y la barrera de activación del proceso de hidrólisis. Una descripción detallada se encuentra en el Anexo 1 y el Anexo 2.

Optimización geométrica de los puntos estacionarios

Para encontrar la estructura de equilibrio de los puntos estacionarios de la PES de los antibióticos se trabajó con el funcional híbrido B3LYP y el conjunto base 6-31+G(d,p). El funcional B3LYP ha mostrado ser adecuado para la realización de estudios teóricos de benchmarking en metaloenzimas de Zn (Rayón et al., 2008; Siegbahn & Borowski, 2006), mientras que el conjunto base permite modelar orbitales *d* en metales de transición y es lo suficientemente robusto para describir los orbitales en los átomos que reaccionan. Se usó el software Gaussian 16, que implementa el algoritmo de minimización de energía Berny GEDIIS para la localización de los ET (Li & Frisch, 2006). Se optimizaron varias estructuras de los ET hasta hallar una que posea solo una vibración imaginaria relacionada al ataque nucleofílico del grupo $\mu\text{-OH}$ al grupo carbonilo del anillo betalactámico del antibiótico. En base al ET encontrado (Anexo 1), se plantearon estructuras para los reactivos y productos y luego se las optimizó al mismo nivel de teoría. Todas las estructuras optimizadas se solvataron en DMSO con un modelo PCM/SMD. Después, se tomó la estructura del intermediario y se lo superpuso

con el centro catalítico de la enzima NDM-1 (PDB ID: 4HL2), para entender qué tan parecidas son las estructuras. Se usó el software Pymol con la opción *pair_fit*.

Cálculo de parámetros cinéticos y termodinámicos de activación

La estructura óptima de los ET obtenida se sometió a un cálculo de frecuencias en Gaussian 16 y a partir de los datos se calcularon varios parámetros con las ecuaciones del Anexo 3. De este análisis se obtuvo la entalpía de activación (ΔH^\ddagger) y la energía libre activación (ΔG^\ddagger). La entropía ΔS^\ddagger se calculó mediante la ecuación (1) y la constante de rapidez de la reacción para una reacción bimolecular $k(T)$ se calculó con la ecuación (2), donde k_B es la constante de Boltzman, h es la constante Planck, R es la constante universal de los gases y T es la temperatura del sistema, que siempre fue 298.15 K. Estos resultados fueron tabulados para los ET de nitrocefina y ampicilina. Además, con la ecuación (3) se calculó la energía de activación de la reacción E_a , a partir de la ecuación de Eyring.

Perfil de IRC de los estados de transición

Las estructuras optimizadas de los ET de nitrocefina y ampicilina se sometieron a un algoritmo de búsqueda de la IRC en Gaussian 16. Se utilizó el mismo nivel de teoría de la optimización B3LYP/6-31+G(d,p). El perfil de IRC retorna tres resultados principales. Primero, la energía total de cada punto a lo largo de la coordenada de reacción. Segundo, los valores de los orbitales moleculares de frontera HOMO y LUMO en cada punto mediante un análisis poblacional SCF. Tercero, las estructuras de los productos y los reactivos estimados por el IRC. Todos estos resultados se guardaron para procesamiento posterior.

Fuerza de reacción y flujo electrónico

La fuerza de reacción $F(\xi)$ se define como el negativo de la derivada de la energía total del sistema $E(\xi)$ con respecto a la coordenada de la reacción ξ , como se ve en la ecuación (4)

del Anexo 3. El flujo electrónico $J(\xi)$ se define como la derivada del potencial químico $\mu(\xi)$ con respecto a ξ , como se ve en la ecuación (5) del Anexo 3. La función $\mu(\xi)$ se la encontró para cada punto de la coordenada de reacción promediando los valores de HOMO y LUMO. La función de dureza $\eta(\xi)$ se la encontró mediante la ecuación (6) del Anexo 3.

Las derivadas (4) y (5) se deben calcular de forma numérica. Gaussian 16 produce datos sobre una partición de ξ no homogénea. Varios algoritmos de diferenciación numérica usan particiones de dominio homogéneas, es decir, con un paso constante. Para solucionarlo se hizo una regresión Gaussiana de las funciones $E(\xi)$ y $\mu(\xi)$ para interpolar valores en una partición homogénea de ξ . Luego, con la data procesada se utilizó el algoritmo de diferenciación numérica Savitzky-Golay para suavizar la derivada. Después, se buscó los tres puntos críticos del Formalismo de Fuerza de Reacción, ξ_1 , ξ_2 y ξ_3 , en la coordenada de reacción normalizada de $E(\xi)$. Luego, se calculó la integral de $F(\xi)$ en 4 intervalos: $[0, \xi_1]$, $[\xi_1, \xi_2]$, $[\xi_2, \xi_3]$ y $[\xi_3, 1]$. Las integrales se llamaron w_i , w_{ii} , w_{iii} y w_{iv} ya que son un análogo del trabajo. Finalmente, las funciones $E(\xi)$, $F(\xi)$, $J(\xi)$ y $\eta(\xi)$ se graficaron. El procesamiento se implementó en un script de Python usando las librerías SciPy, Pandas, Sklearn y Matplotlib (Anexo 4).

Orden de Enlace Natural y parámetros geométricos

Las estructuras del reactivo, ET y producto optimizados se utilizaron para hacer un análisis de orden de enlace natural, NBO por sus siglas en inglés. Este análisis produce varios descriptores de la reacción: la variación relativa del índice de enlace de cada par de átomos analizados δB_i , el promedio de la variación relativa del índice de enlace para todos los enlaces $\delta B_{\text{average}}$ y la sincronicidad de la reacción S_y . Las fórmulas implementadas para el cálculo se resumen en el Anexo 3.

RESULTADOS

Parámetros termodinámicos y cinéticos del modelo computacional

Estudios preliminares para encontrar el ET revelaron la necesidad de armar un sistema químico simplificado para evitar problemas con la convergencia de los algoritmos computacionales. Se retiró un grupo metilo del ligando L₁ del complejo [Zn₂L₁(μ-NO₃)(NO₃)₂] y varios grupos adyacentes al anillo betalactámico en nitrocefina y en ampicilina, como se puede ver en la Figura 3, de tal manera que se preserve el sitio activo a estudiar, pero se elimine grupos funcionales que no participan en la ruptura y formación de enlaces, y que no tengan efectos electrónicos importantes sobre los grupos que reaccionan. El ET simplificado para nitrocefina tiene 70 átomos y el ET simplificado para ampicilina tiene 75 átomos.

Después de procesar los datos del cálculo de frecuencias de los ET con las ecuaciones (1), (2) y (3), en la Tabla 1 se tabuló ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔG^\ddagger , E_a , $\log A$ y k . Además se incluyen en la Tabla 1 los resultados experimentales para compararlos con las predicciones teóricas del modelo (Kaminskaia et al., 2001). La energía libre de activación calculada es bastante cercana al valor experimental, pero se observa una subestimación de la entropía debido a los efectos de anarmonicidad. Además, la energía de activación de la ampicilina es mayor a la de la nitrocefina, resultado esperado debido a los efectos electrónicos de los grupos vecinos, los cuales serán explicados en detalles más adelante.

Parámetros estructurales

La Figura 6 muestra la numeración de los átomos estudiados en el centro de reacción y las longitudes de sus distancias atómicas y ángulos diedros se encuentran en la Tabla 2. Durante el progreso de la reacción de la nitrocefina, la distancia entre los átomos O₍₃₎ y C₍₄₎, donde ocurre el ataque nucleofílico al carbonilo del anillo betalactámico siempre se acorta hasta llegar a una distancia de 1.5 Å en el intermediario aniónico, típica de un enlace simple C-O. Además,

la distancia entre $C_{(4)}$ y $N_{(6)}$ permanece aproximadamente constante, ya que de reactivo a intermediario aniónico aumenta en solo 0.1 Å. En el intermediario, esta distancia es de 1.48 Å, muy cercana a la distancia de enlace simple entre C y N. La distancia entre $C_{(4)}$ y $O_{(5)}$ también aumenta, pero no lo suficiente como para considerarse un enlace simple, sino que sigue siendo cercana a la de un enlace doble. Se evidencia además un incremento de la distancia entre $Zn_{(1)}$ y $O_{(3)}$, pero un acercamiento entre $Zn_{(2)}$ y $O_{(3)}$. En la reacción de la ampicilina se evidencia el mismo patrón de cambio en las longitudes de enlaces, a excepción de que la distancia entre los átomos $O_{(3)}$ y $C_{(4)}$ aquí es de 1.55 Å, mayor que la observada para la nitrocefina.

Al superponer el antibiótico nitrocefina con la proteína NDM-1 se encontró un RMSD de 2.2 Å utilizando los átomos $Zn_{(1)}$, $Zn_{(2)}$, $O_{(3)}$, $O_{(5)}$, $N_{(6)}$ y átomos de nitrógeno en el ligando del complejo organometálico que equivalen a los nitrógenos de los residuos de histidina coordinados a los átomos de Zn en la enzima. Los análisis de parámetros estructurales del ET propuesto para el mecanismo concertado se encuentran en el Anexo 2.

Análisis de Coordenada Interna de Reacción

Como se muestra en la Figura 4, las funciones $E(\xi)$, $F(\xi)$, $J(\xi)$ y $\eta(\xi)$ para nitrocefina están marcadas en cuatro regiones por los tres puntos críticos del Formalismo de Fuerza de Reacción ξ_1 , ξ_2 y ξ_3 . En la curva de $F(\xi)$ en la Figura 4 se encuentran sombreadas de azul las áreas bajo la curva, que corresponden a los trabajos w_i , w_{ii} , w_{iii} y w_{iv} . La Figura 5 contiene el mismo análisis para ampicilina. Los valores de los trabajos para ambos antibióticos se encuentran en la Tabla 3. Para la nitrocefina, la contribución de la integral w_i a la barrera de activación es de 72.23 %, mientras que la contribución de la integral w_{ii} es de 27.76 %. Para la ampicilina, la contribución de la integral w_i a la barrera de activación es de 78.84 %, mientras que la contribución de la integral w_{ii} es de 21.16 %.

Para la nitrocefina, la curva de flujo electrónico $J(\xi)$ muestra un mínimo muy pronunciado cerca del punto ξ_2 , que corresponde al ET en la curva de $E(\xi)$, mientras que los valores de la función en ξ_1 y ξ_3 son aproximadamente iguales. Además, la curva de dureza química $\eta(\xi)$ se muestra con un máximo en ξ_2 y tiene mínimos locales en las regiones de los trabajos w_i y w_{iv} . Para la ampicilina, $J(\xi)$ muestra varios mínimos y máximos a lo largo de la coordenada de reacción, pero al contrario que la nitrocefina, posee un máximo local en ξ_2 . La curva $\eta(\xi)$ para ampicilina también muestra un máximo en ξ_2 y mínimos en las regiones de los trabajos w_i y w_{iv} .

Análisis de Orbital Natural de Enlace

En la Tabla 4 se encuentran tabulados los cálculos de NBO para las reacciones de ambos antibióticos para 5 enlaces. De acuerdo con el porcentaje de evolución del enlace $\% Ev$, en la nitrocefina, el enlace $Zn_{(2)} - O_{(3)}$ presenta un mayor progreso de la ruptura (95%), seguido de $Zn_{(1)} - O_{(3)}$ (70%). El enlace $C_{(4)} - N_{(6)}$ presenta el menor porcentaje de ruptura (40%). El resto de los enlaces poseen porcentajes de evolución mayores a 50%. El parámetro de sincronidad S_y es de 0.8517 y el promedio de las rupturas de enlace $\delta B_{average}$ es de 64 %. En el caso de la ampicilina, el enlace con mayor evolución es $Zn_{(1)} - O_{(3)}$ (73%), y a diferencia de la nitrocefina, la evolución del enlace $Zn_{(2)} - O_{(3)}$ es mucho menor (29%). El parámetro S_y es de 0.8599 y el promedio de las rupturas de enlace $\delta B_{average}$ es de 59 %.

DISCUSIÓN

Validación del modelo computacional

La baja entropía de los ET de ambos antibióticos evidenciada en la Tabla 1 es esperada, ya que los métodos no toman en cuenta la entropía de las colisiones del sistema. Sin embargo, la baja entropía no es un problema para encontrar un ET apropiado, ya que los algoritmos de optimización geométrica solamente necesitan la energía electrónica al usar DFT, debido al teorema de Hohenberg-Kohn. Además, la pérdida de entropía en parte podría explicar la baja en la energía de activación teórica, tomando como referencia el valor experimental (Levine, 2014). No se encontró reportes de la formación del intermediario aniónico con ampicilina, pero se decidió analizar este sistema para entender los efectos electrónicos de los grupos vecinos del centro reactivo del ET. En la Figura 6, entre los carbonos $C_{(7)}$ y $C_{(8)}$ adyacentes al anillo betalactámico de la nitrocefina hay un enlace doble. Es posible que mientras se forma el intermediario aniónico en la reacción por etapas, el par de electrones del enlace amida que se rompe pueda deslocalizarse hacia los orbitales p de los átomos $N_{(6)}$ y $C_{(7)}$, por tener hibridación sp^2 en el producto. Estas estructuras de resonancia podrían estabilizar la carga del anión.

Es posible compensar la pérdida en entropía al tomar en cuenta los movimientos anarmónicos del sistema. Los cálculos de frecuencias implementados solo consideran movimientos harmónicos del ET propuesto (Machida, 1983). Así, después de todas estas observaciones, se concluye que los modelos de nitrocefina y ampicilina son buenos puntos de partida para ganar información sobre el rol de los grupos adyacentes al centro de reacción.

Como se describe en el Anexo 2, los ángulos del $C_{(4)}$ para el reactivo corresponden a una hibridación sp^2 y para el intermediario aniónico corresponden a una hibridación sp^3 . Además, de acuerdo con los resultados del análisis NBO, se pudo observar que las dos reacciones son asincrónicas ya su índice de sincronidad es menor a 1 en aproximadamente el mismo valor. También se observó que, aunque ambos ET se parecen geoméricamente a los

productos y reactivos, son tardíos, ya que poseen un promedio de variación de índices de enlace mayor a 50%, pero el ET de la nitrocefina es mayor y se parece un poco más a los productos que el ET de la ampicilina (Moyano et al., 1989). Esto también es consistente con los cálculos de frecuencias, ya que nitrocefina tiene la menor barrera y posee el ET más evolucionado. Por estas observaciones se concluye que se ha modelado correctamente la formación del carbono tetraédrico (Anexo 2) en el intermediario aniónico después del ataque nucleofílico.

Mecanismo Propuesto

Se plantearon dos mecanismos de reacción para el ataque nucleofílico del grupo μ -OH del complejo organometálico al grupo carbonilo del anillo betalactámico de ambos antibióticos. El primer mecanismo es concertado, por lo que la ruptura del enlace amida y la formación del grupo carboxilo del anillo betalactámico no posee intermediarios. En este mecanismo la conversión de reactivos a productos es directa. El segundo mecanismo es por etapas, tal que después del ET se forma un intermediario con un carbono tetraédrico enlazado al grupo μ -OH entrante y aún formando la amida. Una comparación de los dos mecanismos para la nitrocefina se puede ver en la Figura 3 y para la ampicilina, en la Figura 4.

Se propusieron varios ET de cada antibiótico variando la pose con la que se coordinaba al complejo organometálico. Para el ET de los mecanismos concertados siempre se obtuvo dos frecuencias imaginarias asociadas a vibraciones lejanas al ataque nucleofílico. Este resultado indica que los ET propuestos para el mecanismo concertado no eran puntos de ensilladura de la PES y no eran ET reales. Los algoritmos de optimización son sensibles a la geometría inicial, y se piensa que se puede llegar a una estructura correcta al intentar con más variaciones de poses del antibiótico junto con el complejo. En busca de una explicación para no haber podido encontrar un ET para el mecanismo concertado se analizaron los parámetros estructurales de

uno de los intentos para nitrocefina (Anexo 2) y es posible que el impedimento estérico de los grupos adyacentes al anillo betalactámico haya evitado la formación correcta del ET.

Observaciones del Formalismo de Fuerza de Reacción

Los resultados de la Tabla 3 sugieren que las reacciones para ambos antibióticos, en sentido de formación del intermediario aniónico, están caracterizadas más por una reorganización geométrica de los reactivos que por una reorganización electrónica, ya que para la nitrocefina la contribución de w_i a la barrera de activación es de 72.23 %, mientras que la contribución de w_{ii} es de 27.76 %. Para la ampicilina, la contribución de w_i a la barrera de activación es de 78.84 %, mientras que la contribución de w_{ii} es de 21.16 %. La ampicilina necesita de una contribución ligeramente mayor. Estos resultados son consistentes con los cálculos de frecuencias de la Tabla 1. Además, de acuerdo con la curva del flujo electrónico en la Figura 4, para nitrocefina, las regiones de trabajo w_{ii} y w_{iii} son las negativas, y eso indica que alrededor del ET hay una ruptura de enlaces. Ahora, como se ve en la Figura 5, la ampicilina presenta un flujo electrónico con varios valles y picos, pero alrededor del ET la curva del flujo electrónico es positiva y esto está asociado a una formación de enlaces.

Un ET es metaestable, por lo tanto, se espera que la función de dureza química $\eta(\xi)$ exista un mínimo en ξ_2 , es decir, donde su gap HOMO-LUMO es menor y haya menor reactividad (Kaya & Kaya, 2015). De acuerdo con la Figura 4 y la Figura 5, $\eta(\xi)$ presenta un máximo alrededor de ξ_2 . Se ha reportado casos en la literatura donde el solvente con el que se trabaja influye en la dureza de las especies en reacción, hasta el punto de invertir el perfil. En fase gaseosa se ha reportado que el nucleófilo es muy inestable por la ausencia de solvente, incluso más inestable que el ET de la reacción (Chamorro et al., 2003; De Luca et al., 2002; Gómez et al., 2003). En este caso, el solvente utilizado es DMSO y el nucleófilo μ -OH posee una carga negativa. Una posible explicación para los perfiles $\eta(\xi)$ de ambos antibióticos es que

el modelo de solvatación con DMSO no estabiliza lo suficiente a la carga del nucleófilo. Esto hace que el producto y el intermediario acorten su gap HOMO-LUMO por la presencia de la carga negativa. Además, se ha reportado que reacciones asimétricas como esta presentan un perfil de dureza donde el ET no coincide con el mínimo de la curva, a diferencia de las reacciones simétricas (Chandra & Uchamaru, 2001).

Se consideró usar DMSO como solvente porque es utilizado en el estudio experimental del que se obtuvo datos para comparar con las predicciones del ET propuesto. El paso de la protonación de N₍₆₎ después de la ruptura del enlace amida es el paso limitante en DMSO y eso ayudaría a capturar y estabilizar el intermediario aniónico formado (Kaminskaia et al., 2001). Esta puede ser una explicación para haber obtenido el ET para el mecanismo por etapas preferentemente sobre el mecanismo concertado durante las simulaciones computacionales.

Comparación del complejo organometálico con enzima NDM-1

Para finalizar y evaluar el estado del modelo actual se tomó la estructura del intermediario y se lo superpuso con el centro catalítico de la enzima NDM-1. Se usó este criterio para entender qué tan parecidas son las estructuras del mecanismo mimético y el mecanismo real. El RMSD encontrado tuvo un valor de 2.2 Å. Eso quiere decir que la estructura del complejo organometálico se parece a la proteína lo suficiente y es un buen punto de partida para estudios más detallados con metodologías que estiman mejores parámetros entrópicos.

En varias enzimas se reporta la presencia de una molécula de agua en los reactivos como una fuente del protón del segundo paso de la reacción (Concha et al., 1996; Das & Nair, 2017; Garrity et al., 2005; Lisa et al., 2017; Wang et al., 1998). Además, se propone que una posición *cis* entre el sustrato y el grupo hidróxido puente es clave para que la reacción ocurra, mientras que en posición *trans*, se desactiva el nucleófilo (Kaminskaia et al., 2001). Estos pueden ser aspectos importantes que considerar en futuros modelos.

CONCLUSIONES

Los resultados teóricos son consistentes con un mecanismo de reacción por etapas, ya que fue posible modelar esta reacción desde el ET y por los resultados del orden de enlace natural, que revelan una ruptura de enlaces asincrónica, característica de una reacción por etapas. Los cálculos de IRC revelan un efecto de solvente importante, ya que al trabajar con DMSO, un compuesto con baja polaridad, las cargas del reactivo y de los intermediarios son más inestables que el ET, en el cual las cargas se encuentran dispersadas. Además, la mayor contribución a la barrera de activación ocurre por rearrreglos geométricos del sistema.

La superposición de la enzima y el intermediario indica que el modelo es un buen punto de partida para estudios más detallados con metodologías, como la metadinámica, que estiman mejor los parámetros entrópicos. La ventaja de este método es que permite parametrizar la optimización en términos de variables colectivas del sistema químico que no serían obvias de determinar a priori, como en los experimentos de optimización de ET mediante el algoritmo de Berny (Ensing et al., 2006; Li & Frisch, 2006). La aplicación de métodos *ab initio* de mecánica molecular con metadinámica ya se han utilizado para explorar el espacio de reacciones de glicosilación bajo los mecanismos S_N1 y S_N2 , y se ha logrado caracterizar los intermediarios y posibles ET extensamente (Fu et al., 2021).

Métodos alternativos como el Enlace de Valencia Empírico también han sido extensamente utilizados para entender el mecanismo de enzimas de manera satisfactoria y podrían ser de gran utilidad en futuros estudios, donde se pueda usar los resultados de este modelo para entender la correlación entre estructura y reactividad de los antibióticos mediante este método, especialmente en metaloenzimas, que han demostrado ser un reto para la química computacional y para la salud de las personas (Ju et al., 2018; Kamerlin & Warshel, 2011; Rolain et al., 2010).

TABLAS

Tabla 1. Parámetros termodinámicos y cinéticos calculados a T=298.15 K para el ataque nucleofílico del grupo μ -OH del complejo al anillo betalactámico de los antibióticos nitrocefina y ampicilina, comparados con la medición experimental.

Método	ΔH^\ddagger [kcal mol ⁻¹]	ΔS^\ddagger [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	ΔG^\ddagger [kcal mol ⁻¹]	E _a [kcal mol ⁻¹]	log A	k [s ⁻¹]
Experimento Nitrocefina	18.55	-14.99	23.02	19.14	10.0	8.4E-05
B3LYP 6-31+G Nitrocefina	6.03	-44.51	19.31	6.63	3.5	4.4E-02
B3LYP 6-31+G Ampicilina	10.68	-44.43	23.97	11.27	3.5	1.9E-05

Descripción: Se muestra 6 parámetros fisicoquímicos para los datos experimentales (Kaminskaia et al., 2001) utilizados en el estudio para validar el modelo teórico de la nitrocefina bajo el nombre *Experimental Nitrocefina* en la columna de Método. En las siguientes filas se coloca la información de los modelos teóricos de nitrocefina y ampicilina. Además, se especifica el que el nivel de teoría usado fue B3LYP/6-31+G.

Tabla 2. Parámetros estructurales para el reactivo (R), estado de transición (ET) e intermedio aniónico (II) durante el ataque nucleofílico al grupo carbonilo del anillo betalactámico de ampicilina y nitrocefina de cálculos B3LYP/6-31+G(d,p).

Nitrocefina					
Distancias atómicas [Å]					
	Zn ₍₁₎ - O ₍₃₎	Zn ₍₂₎ - O ₍₃₎	O ₍₃₎ - C ₍₄₎	C ₍₄₎ - O ₍₅₎	C ₍₄₎ - N ₍₆₎
R	1.87581	4.00636	3.98707	1.21334	1.38526
ET	1.95220	3.34370	1.86974	1.26008	1.42771
II	2.07898	3.16743	1.50413	1.31390	1.48986
Ángulos diedros [ángulos]					
		Zn ₍₂₎ -O ₍₃₎ -C ₍₄₎ -N ₍₆₎		Zn ₍₁₎ -O ₍₃₎ -C ₍₄₎ -O ₍₅₎	
ET		102.80895		27.44871	
Frecuencias imaginarias [cm ⁻¹]					
ET	-233.27				
Ampicilina					
Distancias atómicas [Å]					
	Zn ₍₁₎ - O ₍₃₎	Zn ₍₂₎ - O ₍₃₎	O ₍₃₎ - C ₍₄₎	C ₍₄₎ - O ₍₅₎	C ₍₄₎ - N ₍₆₎
R	1.87831	4.06784	3.50535	1.22444	1.36706
ET	1.94731	3.69548	1.82536	1.25755	1.4496
II	2.01003	3.61092	1.55467	1.29311	1.49535
Ángulos diedros [ángulos]					
		Zn ₍₂₎ -O ₍₃₎ -C ₍₄₎ -N ₍₆₎		Zn ₍₁₎ -O ₍₃₎ -C ₍₄₎ -O ₍₅₎	
ET		98.09974		-13.47077	
Frecuencias imaginarias [cm ⁻¹]					
ET	-210.39				

Descripción: Esta tabla consta de dos secciones, una para los parámetros de nitrocefina y debajo para la ampicilina. En ambos casos se muestra las distancias atómicas en Angstroms, dos ángulos diedros y la frecuencia imaginaria asociada al ET. La nomenclatura de los átomos se encuentra en la Figura 5.

Tabla 3. Energías del Formalismo de Fuerza de Reacción calculadas para nitrocefina y ampicilina a partir del perfil de IRC de cada ET por etapas.

Parámetros	Energía [kcal mol ⁻¹]	
	Nitrocefina	Ampicilina
w_i	7.2213	7.6910
w_{ii}	2.7760	2.0640
w_{iii}	0.6572	0.2511
w_{iv}	2.5083	0.5190
Barrera de activación directa	9.9973	9.7550
Barrera de activación inversa	3.1654	0.7701
Energía de reacción	13.163	10.525

Descripción: Componentes de la energía de reacción calculadas a partir del resultado del script escrito en Python del Anexo 4. Los parámetros w_i , w_{ii} , w_{iii} y w_{iv} corresponden a los trabajos de las cuatro regiones de la fuerza de reacción $F(\xi)$ alrededor del ET. La barrera de activación directa corresponde a la suma de w_i y w_{ii} , mientras que la barrera de activación inversa corresponde a la suma de w_{iii} y w_{iv} . La energía de reacción es la suma de los cuatro trabajos en la gráfica de $F(\xi)$. La energía se muestra en escala de kilocalorías por mol. La curva de $F(\xi)$ en la Figura 3 y la Figura 4 corresponden los trabajos mencionados de nitrocefina y ampicilina, respectivamente.

Tabla 4. Análisis NBO para formación de intermediario aniónico de hidrólisis de nitrocefina y ampicilina a partir de cálculos en B3LYP/6-31+g(d,p)

		Zn ₍₁₎ - O ₍₃₎	Zn ₍₂₎ - O ₍₃₎	O ₍₃₎ - C ₍₄₎	C ₍₄₎ - O ₍₅₎	C ₍₄₎ - N ₍₆₎	$\delta B_{average}$	S_y
N	R	0.4968	0.0103	0.0005	1.7335	1.1030	-	-
	ET	0.3165	0.0189	0.3830	1.3894	1.0223	-	-
	I1	0.2396	0.0193	0.7512	1.1790	0.9049	-	-
	% Ev	70.101	95.556	50.952	62.056	40.737	63.88	0.8517
A	R	0.4660	0.0125	0.0019	1.6022	1.1981	-	-
	ET	0.3112	0.0123	0.4075	1.4023	1.0015	-	-
	I1	0.2557	0.0118	0.6658	1.2450	0.9337	-	-
	% Ev	73.609	28.570	61.094	55.963	74.357	58.72	0.8559

Descripción: La descripción de los dos antibióticos (N: nitrocefina, A: ampicilina) se da en los reactivos (R), estado de transición (ET), producto (P), pero también en cada uno de los cinco enlaces mostrados en las columnas. Cada columna corresponde a la longitud en Angstroms del enlace correspondiente para R, ET y P de cada antibiótico. Las filas % Ev corresponden al porcentaje de evolución de cada enlace durante la reacción y son adimensionales. Las últimas dos columnas $\delta B_{average}$ y S_y corresponden a parámetros globales de la reacción y se usan para describir solamente el parámetro % Ev por cada antibiótico. Por ello las especies R, ET y P no poseen valores en $\delta B_{average}$ y S_y .

FIGURAS

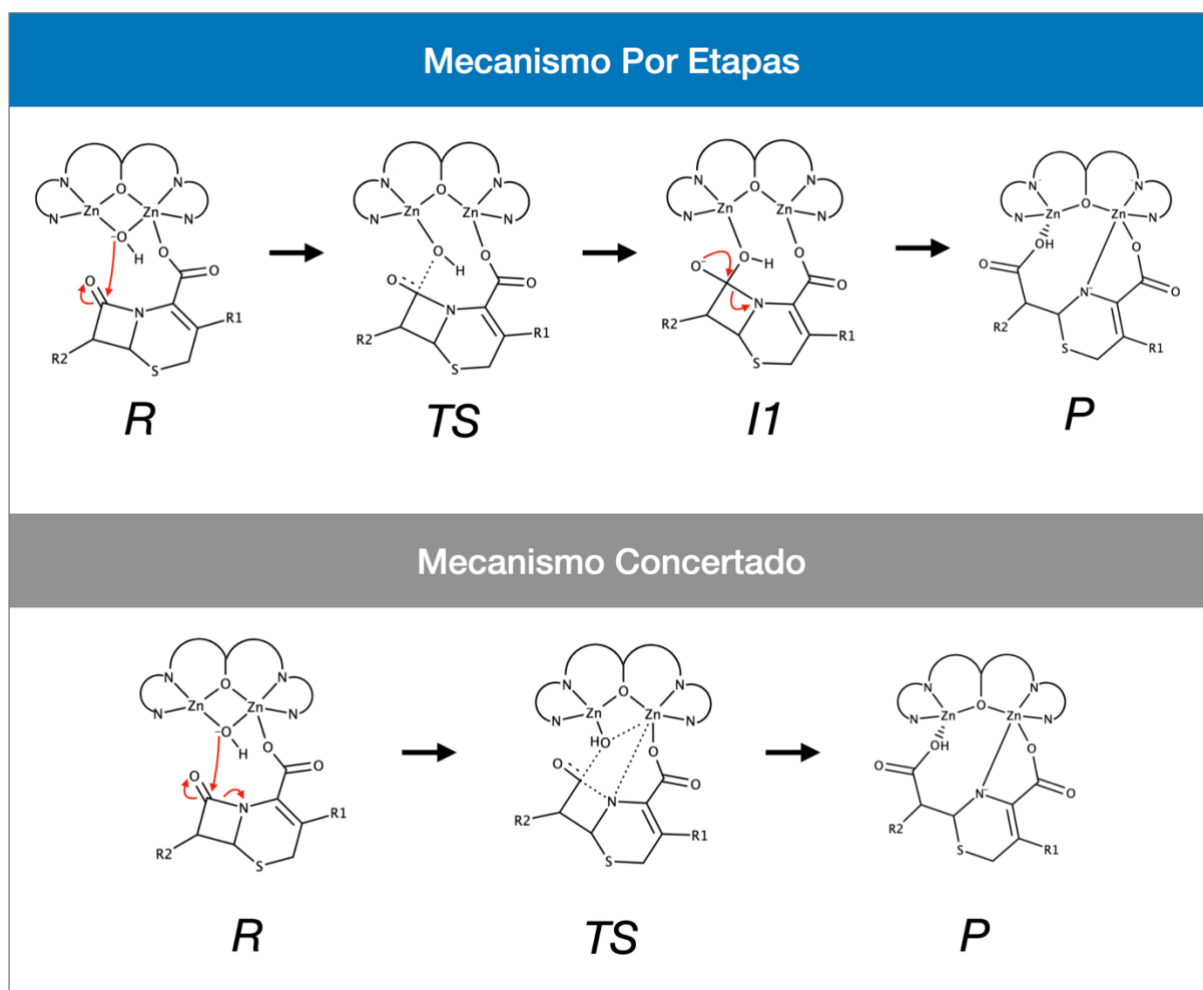


Figura 1. Paso de ruptura de anillo betalactámico para nitrocefina.

Descripción: Se puede ver cada mecanismo rotulado con un color diferente, el mecanismo por etapas es azul, mientras que el mecanismo concertado es gris. En cada uno se ve el movimiento de electrones que definen el mecanismo, con flechas rojas. En ambos mecanismos la reacción deriva en el producto (P) aniónico. El intermediario (I1) corresponde a la especie con carbono tetraédrico modelado.

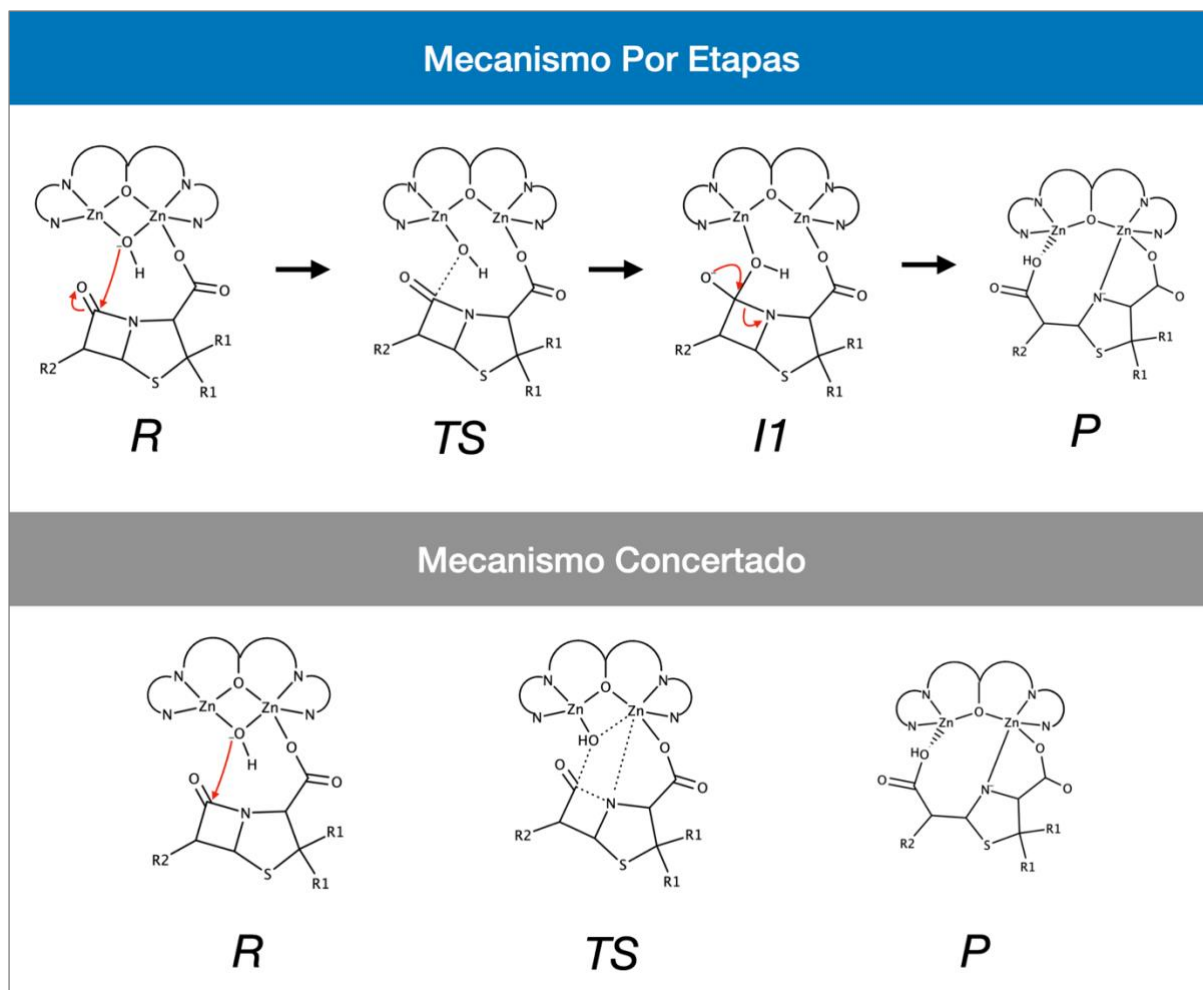


Figura 2. Paso de ruptura de anillo betalactámico para ampicilina.

Descripción: Se puede ver cada mecanismo rotulado con un color diferente, el mecanismo por etapas es azul, mientras que el mecanismo concertado es gris. En cada uno se ve el movimiento de electrones que definen el mecanismo, con flechas rojas. En ambos mecanismos la reacción deriva en el producto (P) aniónico. El intermediario (I1) corresponde a la especie con carbono tetraédrico modelado.

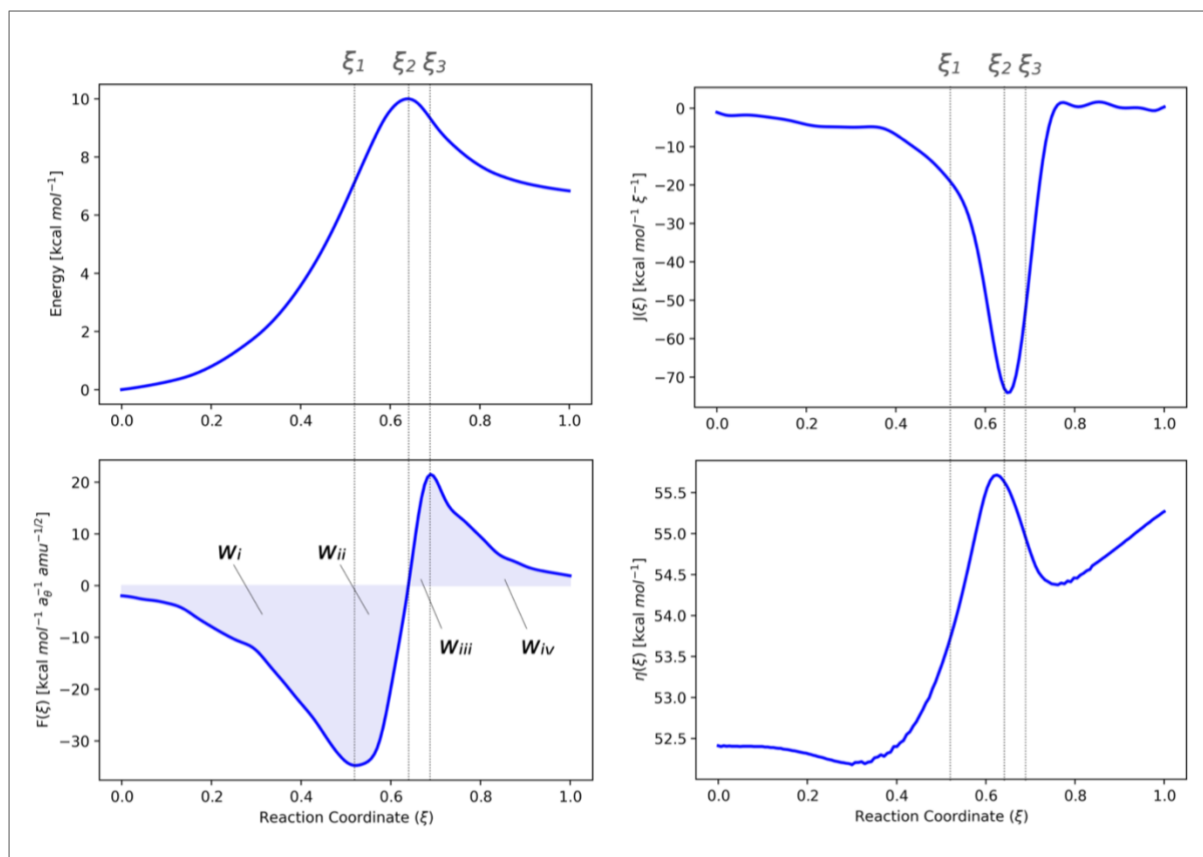


Figura 3. Perfil de IRC, fuerza de reacción y flujo electrónico para nitrocefina.

Descripción: La figura se divide en 4 curvas de izquierda a derecha y de arriba para abajo: energía de reacción $E(\xi)$, fuerza electrónica $F(\xi)$, flujo electrónico $J(\xi)$ y dureza química $\eta(\xi)$. Todas las funciones tienen dominio en la coordenada de reacción normalizada y están seccionadas por ξ_1 , ξ_2 y ξ_3 . La curva de $F(\xi)$ tiene cada región de trabajo coloreada en azul y seccionada por las líneas entrecortadas. Cada línea se define por ξ_1 , ξ_2 y ξ_3 . Notar que se cumple $0 < \xi_1 < \xi_2 < \xi_3 < 1$.

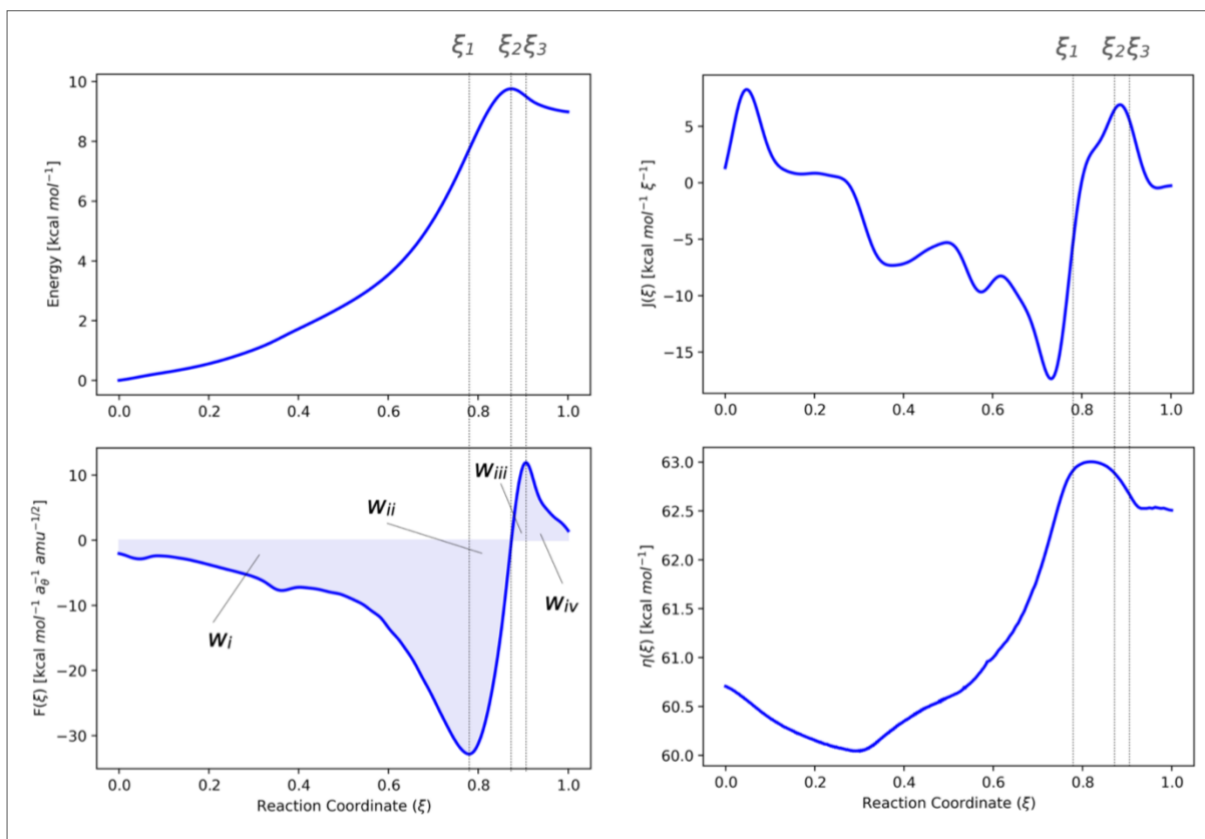


Figura 4. Perfil de IRC, fuerza de reacción y flujo electrónico para ampicilina.

Descripción: La figura se divide en 4 curvas de izquierda a derecha y de arriba para abajo: energía de reacción $E(\xi)$, fuerza electrónica $F(\xi)$, flujo electrónico $J(\xi)$ y dureza química $\eta(\xi)$. Todas las funciones tienen dominio en la coordenada de reacción normalizada y están seccionadas por ξ_1 , ξ_2 y ξ_3 . La curva de $F(\xi)$ tiene cada región de trabajo coloreada en azul y seccionada por las líneas entrecortadas. Cada línea se define por ξ_1 , ξ_2 y ξ_3 . Notar que se cumple $0 < \xi_1 < \xi_2 < \xi_3 < 1$.

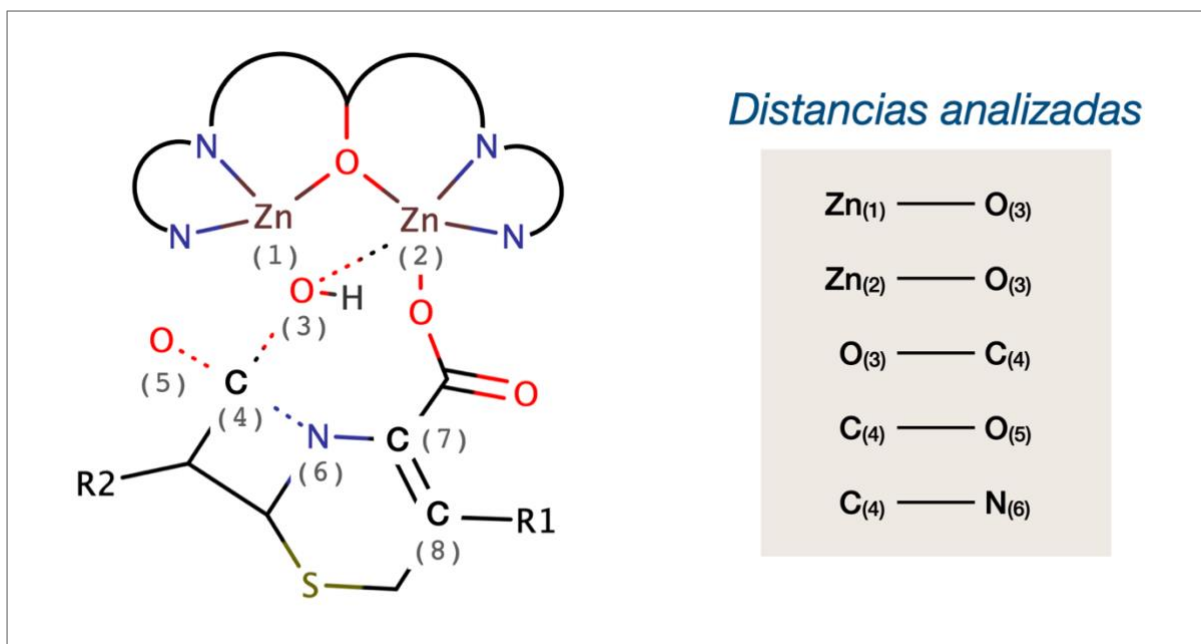


Figura 5. Nomenclatura de átomos en el centro de reacción.

Descripción: La estructura química representa las distancias atómicas analizadas en este estudio. Las distancias entre átomos dentro del recuadro dorado corresponden a las especificadas en la Tabla 1 y la Tabla 2. El resto del documento hace referencia a los átomos de acuerdo con la numeración mostrada.

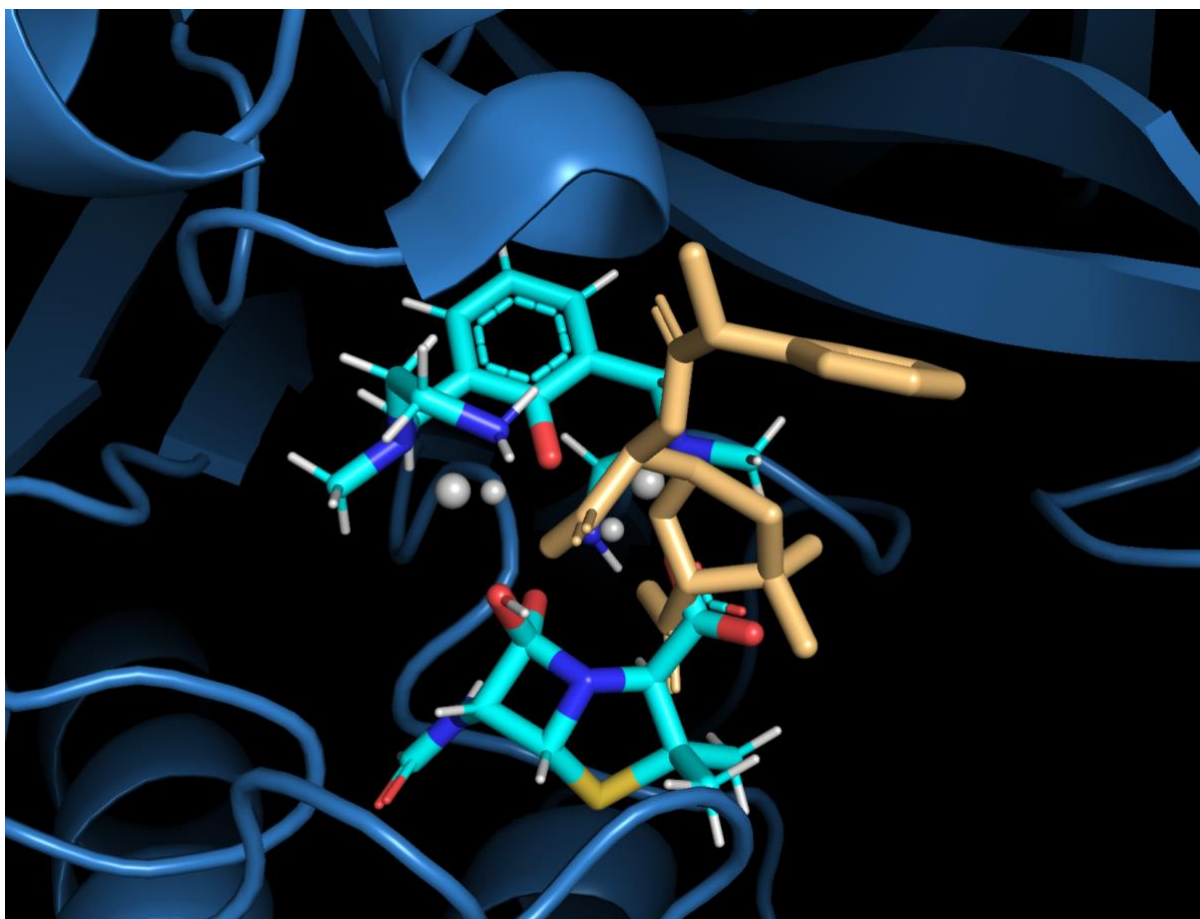


Figura 6. Superposición de proteína y enzima NDM-1.

Descripción: Se muestra la estructura del intermediario con carbono tetraédrico I1 con la estructura de la proteína NDM-1 (PDB ID: 4HL2). El programa Pymol se fue utilizado para generar las gráficas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chamorro, E., Chattaraj, P. K., & Fuentealba, P. (2003). Variation of the Electrophilicity Index along the Reaction Path. *The Journal of Physical Chemistry A*, *107*(36), 7068–7072. <https://doi.org/10.1021/jp035435y>
- Chandra, A. K., & Uchamaru, T. (2001). Hardness Profile: A Critical Study. *The Journal of Physical Chemistry A*, *105*(14), 3578–3582. <https://doi.org/10.1021/jp002733b>
- Concha, N. O., Rasmussen, B. A., Bush, K., & Herzberg, O. (1996). Crystal structure of the wide-spectrum binuclear zinc β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Structure*, *4*(7), 823–836. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00089-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00089-5)
- Cuesta, S. A., Mora, J. R., Zambrano, C. H., Torres, F. J., & Rincón, L. (2020). Comparative study of the nucleophilic attack step in the proteases catalytic activity: A theoretical study. *Molecular Physics*, *118*(14), e1705412. <https://doi.org/10.1080/00268976.2019.1705412>
- Das, C. K., & Nair, N. N. (2017). Hydrolysis of cephalexin and meropenem by New Delhi metallo- β -lactamase: The substrate protonation mechanism is drug dependent. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *19*(20), 13111–13121. <https://doi.org/10.1039/C6CP08769H>
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- De Luca, G., Sicilia, E., Russo, N., & Mineva, T. (2002). On the Hardness Evaluation in Solvent for Neutral and Charged Systems. *Journal of the American Chemical Society*, *124*(7), 1494–1499. <https://doi.org/10.1021/ja0116977>
- Dutton, P. L., Munro, A. W., Scrutton, N. S., & Sutcliffe, M. J. (2006). Introduction. Quantum catalysis in enzymes: Beyond the transition state theory paradigm. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *361*(1472), 1293–1294. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1879>
- Ensing, B., De Vivo, M., Liu, Z., Moore, P., & Klein, M. L. (2006). Metadynamics as a Tool for Exploring Free Energy Landscapes of Chemical Reactions. *Accounts of Chemical Research*, *39*(2), 73–81. <https://doi.org/10.1021/ar040198i>
- Fajardo, A., Linares, J. F., & Martínez, J. L. (2009). Towards an ecological approach to antibiotics and antibiotic resistance genes. *Clinical Microbiology and Infection*, *15*, 14–16. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02688.x>
- Feng, H., Ding, J., Zhu, D., Liu, X., Xu, X., Zhang, Y., Zang, S., Wang, D.-C., & Liu, W. (2014). Structural and Mechanistic Insights into NDM-1 Catalyzed Hydrolysis of Cephalosporins. *Journal of the American Chemical Society*, *136*(42), 14694–14697. <https://doi.org/10.1021/ja508388e>

- Fu, Y., Bernasconi, L., & Liu, P. (2021). Ab Initio Molecular Dynamics Simulations of the S_N1/S_N2 Mechanistic Continuum in Glycosylation Reactions. *Journal of the American Chemical Society*, *143*(3), 1577–1589. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c12096>
- Garrity, J. D., Bennett, B., & Crowder, M. W. (2005). Direct Evidence That the Reaction Intermediate of Metallo- β -lactamase L1 Is Metal Bound \dagger . *Biochemistry*, *44*(3), 1078–1087. <https://doi.org/10.1021/bi048385b>
- Gómez, B., Fuentealba, P., & Contreras, R. (2003). The maximum hardness and minimum polarizability principles as the basis for the study of reaction profiles. *110*, 421–427. <https://doi.org/10.1007/s00214-003-0497-4>
- Huddleston, J. R. (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: Potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and Drug Resistance*, *167*. <https://doi.org/10.2147/IDR.S48820>
- Ju, L.-C., Cheng, Z., Fast, W., Bonomo, R. A., & Crowder, M. W. (2018). The Continuing Challenge of Metallo- β -Lactamase Inhibition: Mechanism Matters. *Trends in Pharmacological Sciences*, *39*(7), 635–647. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.03.007>
- Kamerlin, S. C. L., & Warshel, A. (2011). The empirical valence bond model: Theory and applications. *WIREs Computational Molecular Science*, *1*(1), 30–45. <https://doi.org/10.1002/wcms.10>
- Kaminskaia, N. V., Spingler, B., & Lippard, S. J. (2000). Hydrolysis of β -Lactam Antibiotics Catalyzed by Dinuclear Zinc(II) Complexes: Functional Mimics of Metallo- β -lactamases. *Journal of the American Chemical Society*, *122*(27), 6411–6422. <https://doi.org/10.1021/ja9937041>
- Kaminskaia, N. V., Spingler, B., & Lippard, S. J. (2001). Intermediate in β -Lactam Hydrolysis Catalyzed by a Dinuclear Zinc(II) Complex: Relevance to the Mechanism of Metallo- β -lactamase. *Journal of the American Chemical Society*, *123*(27), 6555–6563. <https://doi.org/10.1021/ja002699e>
- Kaya, S., & Kaya, C. (2015). A new equation for calculation of chemical hardness of groups and molecules. *Molecular Physics*, *113*(11), 1311–1319. <https://doi.org/10.1080/00268976.2014.991771>
- Kim, Y., Cunningham, M. A., Mire, J., Tesar, C., Sacchettini, J., & Joachimiak, A. (2013). NDM-1, the ultimate promiscuous enzyme: Substrate recognition and catalytic mechanism. *The FASEB Journal*, *27*(5), 1917–1927. <https://doi.org/10.1096/fj.12-224014>
- Kim, Y., Tesar, C., Mire, J., Jedrzejczak, R., Binkowski, A., Babnigg, G., Sacchettini, J., & Joachimiak, A. (2011). Structure of Apo- and Monometalated Forms of NDM-1—A Highly Potent Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamase. *PLoS ONE*, *6*(9), e24621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024621>
- Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C. G., Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A. V., Maharjan, S., Mushtaq, S., Noorie, T., Paterson, D. L., Pearson, A., Perry, C., Pike, R., ... Woodford, N. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in

- India, Pakistan, and the UK: A molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 10(9), 597–602. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70143-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70143-2)
- Laidler, K. J., & King, M. C. (1983). Development of transition-state theory. *The Journal of Physical Chemistry*, 87(15), 2657–2664. <https://doi.org/10.1021/j100238a002>
- Levine, I. N. (2014). *Quantum chemistry* (Seventh edition). Pearson.
- Li, X., & Frisch, M. J. (2006). Energy-Represented Direct Inversion in the Iterative Subspace within a Hybrid Geometry Optimization Method. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2(3), 835–839. <https://doi.org/10.1021/ct050275a>
- Lisa, M.-N., Palacios, A. R., Aitha, M., González, M. M., Moreno, D. M., Crowder, M. W., Bonomo, R. A., Spencer, J., Tierney, D. L., Llarrull, L. I., & Vila, A. J. (2017). A general reaction mechanism for carbapenem hydrolysis by mononuclear and binuclear metallo- β -lactamases. *Nature Communications*, 8(1), 538. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00601-9>
- Machida, K. (1983). Anharmonic Potential Functions and Intrinsic Reaction Coordinates of Polyatomic Molecules. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 56(12), 3561–3565. <https://doi.org/10.1246/bcsj.56.3561>
- Maeda, S., Harabuchi, Y., Ono, Y., Taketsugu, T., & Morokuma, K. (2015). Intrinsic reaction coordinate: Calculation, bifurcation, and automated search. *International Journal of Quantum Chemistry*, 115(5), 258–269. <https://doi.org/10.1002/qua.24757>
- Martinez, J. L. (2008). Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Science*, 321(5887), 365–367. <https://doi.org/10.1126/science.1159483>
- Massova, I., & Mobashery, S. (1997). Molecular Bases for Interactions between β -Lactam Antibiotics and β -Lactamases. *Accounts of Chemical Research*, 30(4), 162–168. <https://doi.org/10.1021/ar960007e>
- Mora, J., Cervantes, C., & Marquez, E. (2018). New Insight into the Chloroacetanilide Herbicide Degradation Mechanism through a Nucleophilic Attack of Hydrogen Sulfide. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 2864. <https://doi.org/10.3390/ijms19102864>
- Mora, J. R., Nuñez, O., Rincón, L., & Torres, F. J. (2017). Understanding the role of Zn^{2+} in the hydrolysis of glycylserine: A mechanistic study by using density functional theory. *Molecular Physics*, 115(4), 403–412. <https://doi.org/10.1080/00268976.2016.1269961>
- Morell, C., Tognetti, V., Bignon, E., Dumont, E., Hernandez-Haro, N., Herrera, B., Grand, A., Gutiérrez-Oliva, S., Joubert, L., Toro-Labbé, A., & Chermette, H. (2015). Insights into the chemical meanings of the reaction electronic flux. *Theoretical Chemistry Accounts*, 134(11), 133. <https://doi.org/10.1007/s00214-015-1730-7>
- Moyano, A., Pericas, M. A., & Valenti, E. (1989). A theoretical study on the mechanism of the thermal and the acid-catalyzed decarboxylation of 2-oxetanones (β -lactones).

The Journal of Organic Chemistry, 54(3), 573–582.
<https://doi.org/10.1021/jo00264a014>

- Olsson, M. H. M., Mavri, J., & Warshel, A. (2006). Transition state theory can be used in studies of enzyme catalysis: Lessons from simulations of tunnelling and dynamical effects in lipoxygenase and other systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1472), 1417–1432.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1880>
- Petrongolo, C., & Ranghino, G. (1979). Ab initio Study of β -lactam antibiotics: III. Effect of the methoxy substitution on the amidic bond breaking of β -lactam. *Theoretica Chimica Acta*, 54(3), 239–243. <https://doi.org/10.1007/BF00578342>
- Rayón, V. M., Valdés, H., Díaz, N., & Suárez, D. (2008). Monoligand Zn(II) Complexes: Ab Initio Benchmark Calculations and Comparison with Density Functional Theory Methodologies. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4(2), 243–256.
<https://doi.org/10.1021/ct700229e>
- Rincon, L., Torres, F. J., Mora, J. R., Zambrano, C. H., & Rodriguez, V. (2020). A valence bond perspective of the reaction force formalism. *Theoretical Chemistry Accounts*, 139(1), 13. <https://doi.org/10.1007/s00214-019-2538-7>
- Rolain, J. M., Parola, P., & Cornaglia, G. (2010). New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): Towards a new pandemic? *Clinical Microbiology and Infection*, 16(12), 1699–1701. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03385.x>
- Siegbahn, P. E. M., & Borowski, T. (2006). Modeling Enzymatic Reactions Involving Transition Metals. *Accounts of Chemical Research*, 39(10), 729–738.
<https://doi.org/10.1021/ar050123u>
- Terán, J. E., Zambrano, C. H., Mora, J. R., Rincón, L., & Torres, F. J. (2018). Theoretical investigation of the mechanism for the reductive dehalogenation of methyl halides mediated by the CoI-based compounds cobalamin and cobaloxime. *Journal of Molecular Modeling*, 24(11), 316. <https://doi.org/10.1007/s00894-018-3844-z>
- Tripathi, R., & Nair, N. N. (2015). Mechanism of Meropenem Hydrolysis by New Delhi Metallo β -Lactamase. *ACS Catalysis*, 5(4), 2577–2586.
<https://doi.org/10.1021/acscatal.5b00242>
- Wang, Z., Fast, W., & Benkovic, S. J. (1998). Direct Observation of an Enzyme-Bound Intermediate in the Catalytic Cycle of the Metallo- β -Lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Journal of the American Chemical Society*, 120(41), 10788–10789.
<https://doi.org/10.1021/ja982621m>
- Wang, Z., Fast, W., & Benkovic, S. J. (1999). On the Mechanism of the Metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis* †. *Biochemistry*, 38(31), 10013–10023.
<https://doi.org/10.1021/bi990356r>
- Yim, G., Huimi Wang, H., & Davies FRS, J. (2007). Antibiotics as signalling molecules. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1483), 1195–1200. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2044>

- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 5046–5054. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>
- Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., & Hossain, N. (2017). A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>

ANEXOS

ANEXO 1. COORDENADAS GEOMÉTRICAS OPTIMIZADAS DEL COMPLEJO ORGANOMETÁLICO Y DE LOS ESTADOS DE TRANSICIÓN DE NITROCEFINA Y AMPICILINA Y DETALLES SOBRE DIBUJO DE ESTRUCTURAS

Para preparar las especies químicas se consideró medio acuoso y pH fisiológico. Al hidratarse, el complejo $[Zn_2L_1(\mu-NO_3)(NO_3)_2]$ se transforma en $[Zn_2L_1(\mu-OH)(H_2O)_2]^{2+}$. Los antibióticos a pH fisiológico tienen carga -1 debido a la deprotonación del grupo carboxilo adyacente al anillo betalactámico, que lo transforma en carboxilato. Evidencia de resonancia magnética nuclear de carbono ^{13}C NMR y emisión de espectro infrarrojo IR sugiere que todos los antibióticos betalactámicos tienen el mismo modo de coordinación con el complejo: mediante el grupo carboxilato aniónico de manera monodentada a un átomo de Zn (Das & Nair, 2017; Kaminskaia et al., 2000, 2001). Cuando el antibiótico se coordina con el complejo hidratado se forma $[Zn_2L_1(\mu-OH)(nitrocefina)(H_2O)]^+$, el complejo catalítico. Durante la ruptura del antibiótico, la molécula de agua del complejo catalítico sale, dejando solamente la especie $[Zn_2L_1(\mu-OH)(nitrocefina)]^+$ en solución. Entonces, se usa durante la simulación el complejo sin la molécula de agua coordinada al Zn. A continuación, se muestran las coordenadas de $[Zn_2L_1(\mu-OH)]^{2+}$ y también las estructuras del complejo coordinados a los antibióticos $[Zn_2L_1(\mu-OH)(nitrocefina)]^+$ y $[Zn_2L_1(\mu-OH)(ampicilina)]^+$.

COMPLEJO ORGANOMETALICO $[Zn_2L_1(\mu-OH)]^{2+}$:: COORDENADAS, MULTIPLICIDAD, CARGA

2 1			
C	-0.02257100	1.06608300	-0.02706800
C	1.00759000	1.78956800	0.61442400
C	0.95114300	3.19043300	0.61257200
C	-0.10315400	3.89681300	0.01953100
C	-1.11751100	3.15152400	-0.60088400
C	-1.09292600	1.75308600	-0.64572500
H	1.75027300	3.74377700	1.10254900
H	-1.94512300	3.67404800	-1.07780200
C	-0.15941300	5.40702500	0.06329700
H	-0.90563900	5.76160400	0.78648200
H	0.80692800	5.82985300	0.35577400
H	-0.43191100	5.82821900	-0.91115100
C	2.10268700	1.08773200	1.39222600
H	2.81155800	1.84067500	1.76263900
H	1.66964600	0.59173100	2.26871600
C	-2.14184100	0.99929500	-1.43700200
H	-1.67400200	0.52465900	-2.30703100
H	-2.88398800	1.71557500	-1.81551700
N	-2.86919800	-0.10102000	-0.71972000

N	2.87768900	0.02301000	0.67161700
C	-3.56743600	0.39441600	0.49768700
H	-4.50389700	0.89867700	0.22381500
H	-2.91852400	1.13090300	0.97966800
C	-3.85016200	-0.73630300	1.48649500
H	-4.31446600	-0.31754200	2.38496700
H	-4.53807500	-1.47214200	1.06313000
C	3.52200500	0.53429400	-0.56904800
H	4.43225800	1.09714300	-0.32343300
H	2.82138200	1.22188900	-1.05065500
C	3.85267900	-0.59944500	-1.54036600
H	4.26439400	-0.17285300	-2.46044200
H	4.59929200	-1.27739300	-1.12002000
C	-3.82583900	-0.72222000	-1.66681400
H	-4.35183000	-1.54672800	-1.18200400
H	-4.56151300	0.01489800	-2.01852200
H	-3.27793200	-1.11643800	-2.52632600
C	3.88469300	-0.53606500	1.60672000
H	4.43847900	-1.34309800	1.12365100
H	4.59102900	0.24130800	1.92968100
H	3.37494400	-0.94195500	2.48396000
N	-2.58142900	-1.44176500	1.81211100
H	-2.03593800	-0.89736800	2.48179700
H	-2.77547900	-2.33633100	2.25975500
N	2.62678500	-1.39656600	-1.81612000
H	2.03665100	-0.91396000	-2.49497000
H	2.87206500	-2.29244300	-2.23508500
O	0.01182900	-0.27197800	-0.05980700
Zn	-1.51465600	-1.61195000	0.02611100
Zn	1.59888100	-1.54271100	-0.00410600
O	0.10711900	-2.82556600	0.22757500
H	0.15448000	-3.70957300	-0.15743000

ESTADO DE TRANSICION PARA NITROCEFINA [Zn₂L₁(μ -OH)(nitrocefina)]⁺: COORDENADAS, MULTIPLICIDAD, CARGA

I 1			
S	5.38469700	0.23660300	0.69956300
O	1.21196200	0.03053400	0.88760100
O	0.96522500	-1.72329200	-1.41660200
O	3.39603100	4.39326600	1.37999600
O	2.34858400	-3.45485400	-1.83328500
N	3.03572100	-0.10683900	-0.67700200
N	3.09368200	2.13407000	1.68399500
C	4.04642200	0.89955200	-0.38798000
C	2.94219900	1.76697600	0.30414100
C	2.00284100	0.55160800	0.05645400
C	3.29687200	-1.44625300	-0.96988000
C	5.76415800	-1.18168900	-0.42477700
C	4.55516100	-1.93313600	-0.90047600
C	3.28386700	3.40717400	2.10907000
C	2.13275300	-2.30295000	-1.44061900
H	4.50406000	1.33313700	-1.28099000
H	2.69685000	2.65336900	-0.27624700
H	3.00328900	1.41725600	2.39529200
H	6.41569000	-1.84617100	0.15214900
H	6.35852500	-0.81042900	-1.26896200
C	-2.85459100	-0.25315100	0.21325100
C	-3.53356300	0.79163000	0.88892200
C	-4.88153700	0.62184400	1.23116900
C	-5.56382100	-0.55962000	0.93455500
C	-4.88040900	-1.59260200	0.28916800
C	-3.53574300	-1.45963900	-0.07797000
H	-5.39598200	1.42969700	1.74650900
H	-5.39480300	-2.52359800	0.06214100
C	-2.81366200	2.05347900	1.30541700
H	-3.50239300	2.69042600	1.87575800
H	-1.97084600	1.80785500	1.96036400
C	-2.82910400	-2.59157500	-0.78504000
H	-2.44436200	-2.25458300	-1.75387300
H	-3.54950300	-3.39900700	-0.97964800
N	-1.65738800	-3.14714000	-0.04240500
N	-2.23756700	2.85884100	0.17962700
C	-2.02310400	-3.63229500	1.31355500
H	-2.41616300	-4.65700400	1.26704500
H	-2.81441000	-2.99008800	1.70789600
C	-0.83018900	-3.56783800	2.26535300
H	-1.14656000	-3.88469300	3.26494100
H	-0.02459200	-4.23082400	1.93830900

C	-3.28040600	3.29146800	-0.79499900
H	-3.78189700	4.19893800	-0.43601100
H	-4.02779700	2.49695900	-0.86241000
C	-2.68473600	3.52388500	-2.18256200
H	-3.48831200	3.78355700	-2.87934500
H	-1.96546100	4.34681400	-2.17376400
C	-1.06628600	-4.24275700	-0.84038900
H	-0.21402600	-4.67237600	-0.31101600
H	-1.80879700	-5.03442800	-1.02066100
H	-0.70926300	-3.85045500	-1.79308600
C	-1.52548800	4.03215900	0.74566900
H	-1.08176200	4.62347500	-0.05743400
H	-2.21788300	4.66510600	1.31721000
H	-0.72725500	3.68621700	1.40658900
N	-0.29459500	-2.18454200	2.27372200
H	-0.91927000	-1.56622100	2.79311100
H	0.60518500	-2.14976000	2.75036400
N	-1.96113700	2.29865700	-2.61420000
H	-2.62435900	1.58576400	-2.92068800
H	-1.36293900	2.49928600	-3.41437200
O	-1.56168800	-0.10431400	-0.14931700
Zn	-0.13931500	-1.52781200	0.28884900
Zn	-0.89654700	1.66483000	-0.91092200
O	0.94239300	1.17849200	-1.35009600
H	0.89163000	0.32439900	-1.81798200
H	4.71018500	-2.95789500	-1.22353500
H	3.33108000	3.47801800	3.20789900
H	-6.60802100	-0.67654500	1.20890600

ESTADO DE TRANSICION PARA AMPICILINA [Zn₂L₁(μ-OH)(ampicilina)]⁺: COORDENADAS, MULTIPLICIDAD, CARGA

I 1			
S	-5.07334300	-0.42296300	0.62353100
O	-0.98906600	-0.37152500	0.96372800
O	-0.99595200	1.69385200	-1.37180000
O	-2.31720900	-4.43030500	2.50498500
O	-2.78246200	2.20350900	-2.61681500
N	-2.73712200	-0.54734100	-0.67488300
N	-2.94766600	-2.24353600	2.15462300
C	-3.78155500	-1.47407900	-0.15672800
C	-2.72220900	-2.18720400	0.73914500
C	-1.74476200	-1.07168100	0.24252700
C	-4.64034300	0.96616900	-0.59026100
C	-2.71674300	-3.34041500	2.91706500
C	-2.26510700	1.67187400	-1.62645700
H	-4.22785100	-2.10657800	-0.92595000
H	-2.47245800	-3.18582500	0.38866200
H	-3.24307400	-1.40208500	2.63690800
C	2.90309800	0.53074000	0.21361000
C	3.72026100	-0.47048600	0.79299300
C	5.01563000	-0.13221700	1.20915800
C	5.50821800	1.16705500	1.07843100
C	4.69069200	2.14849800	0.51311400
C	3.39598300	1.85053000	0.07379400
H	5.63995800	-0.90486200	1.65191000
H	5.06159100	3.16445700	0.40042200
C	3.20868200	-1.87094600	1.04894900
H	3.99928400	-2.45732700	1.53564800
H	2.35442100	-1.83870400	1.73465300
C	2.55857100	2.91535300	-0.59375300
H	2.26918500	2.57577400	-1.59408800
H	3.16746300	3.82280100	-0.71578600
N	1.28604000	3.28004700	0.10014200
N	2.73114000	-2.61183900	-0.16082800
C	1.50227400	3.82569300	1.46899000
H	0.70754200	4.55362700	1.65756800
H	2.45859100	4.36163300	1.53004800
C	1.43352700	2.75536300	2.56007700
H	2.28710500	2.07775400	2.51088600
H	1.45038200	3.24838700	3.53851400
C	3.78383200	-2.74749900	-1.20737100
H	4.45029700	-3.58809000	-0.97547000
H	4.38178900	-1.83227700	-1.20513900
C	3.16629200	-2.93074800	-2.59418600

H	3.96405100	-2.97722400	-3.34205300
H	2.59104400	-3.85794200	-2.65197500
C	0.58931600	4.28788900	-0.73154100
H	-0.37784200	4.52756000	-0.28447200
H	1.18336200	5.21070400	-0.81150900
H	0.41700900	3.88193500	-1.72878300
C	2.22643700	-3.94083800	0.25862100
H	1.84313300	-4.48651000	-0.60561100
H	3.02869600	-4.52844000	0.72575200
H	1.41450100	-3.81126300	0.97793000
N	0.20521500	1.94612700	2.38078700
H	0.23411200	1.10955800	2.96134800
H	-0.61341000	2.47609400	2.68144000
N	2.22987100	-1.80607500	-2.87631400
H	2.75243300	-0.97167200	-3.14677100
H	1.62630700	-2.03475800	-3.66517300
O	1.64365700	0.24986800	-0.19613300
Zn	0.02496000	1.42309100	0.34175400
Zn	1.20670400	-1.47016300	-1.09936900
O	-0.66069500	-1.98721100	-0.90574500
H	-1.13853300	-1.92420200	-1.74817800
H	-2.93572800	-3.15915700	3.98203700
H	6.51309900	1.41061100	1.41036200
C	-3.09329500	0.88411700	-0.57952000
H	-2.77067200	1.26282400	0.40128200
C	-5.29814800	0.67400800	-1.94526600
H	-6.38541900	0.62867000	-1.82952800
H	-5.04504800	1.46880900	-2.65072400
H	-4.95900000	-0.27452400	-2.37284500
C	-5.13627500	2.29573100	-0.01751800
H	-4.85110700	3.11170400	-0.69059900
H	-6.22777300	2.30191000	0.06760200
H	-4.70867200	2.49755200	0.96995000

ANEXO 2. DETALLES GEOMÉTRICOS ADICIONALES SOBRE LAS ESPECIES EN REACCIÓN E HÍBRIDOS DE RESONANCIA

Especies completas y simplificadas

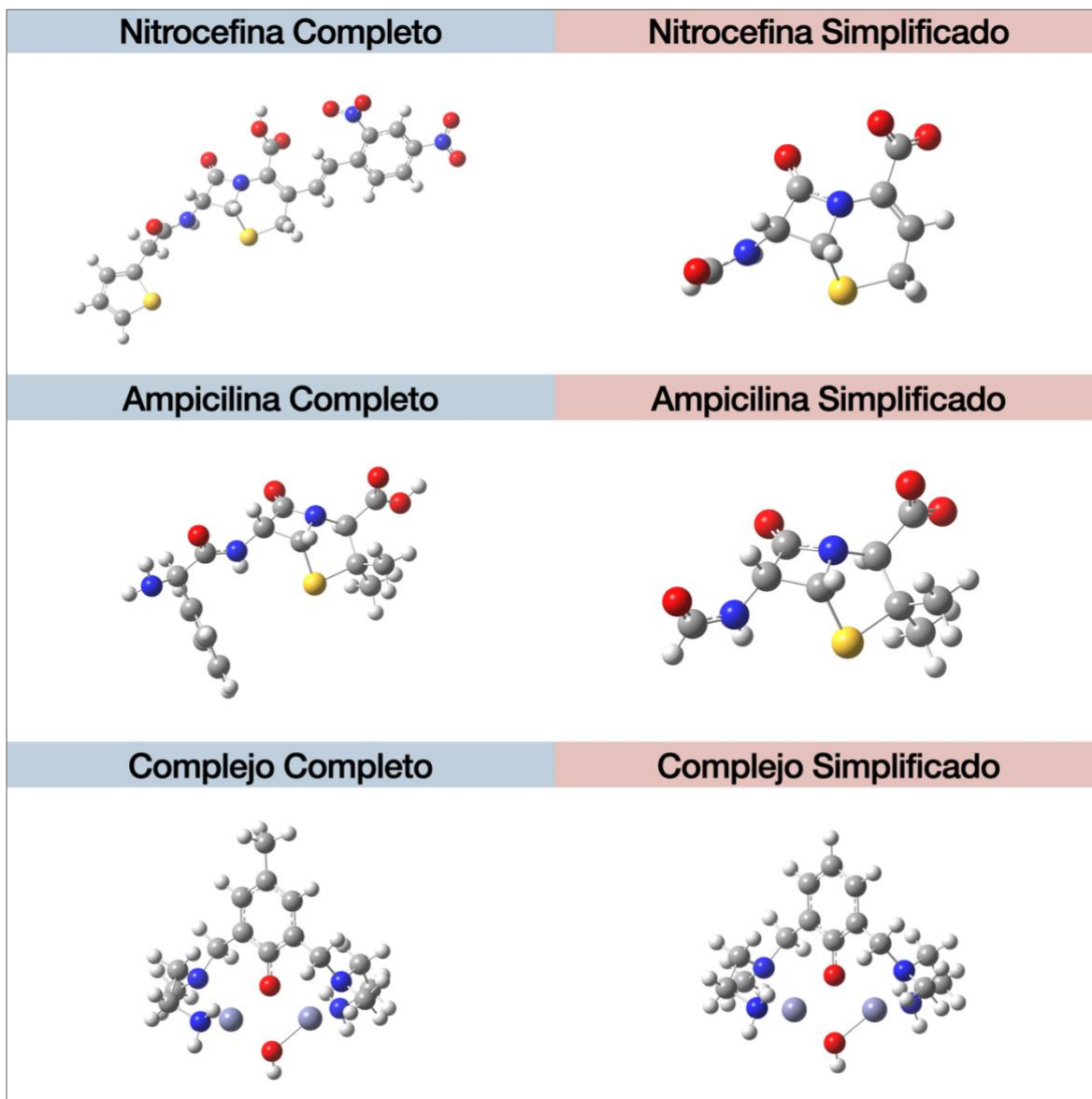


Figura C1. Estructuras simplificadas de los antibióticos y el complejo organometálico $[Zn_2L_1(\mu-OH)]^{2+}$ comparadas con las estructuras de las moléculas reales.

Descripción: Las estructuras simplificadas carecen de ciertos grupos adyacentes al centro de reacción para prevenir que los algoritmos de minimización tengan problemas de convergencia.

Estado de transición para el mecanismo concertado

En la Tabla C1 se muestra las distancias del ET para el mecanismo concertado previo a la optimización final. Se fijó la distancia $O_{(3)} - C_{(4)}$ para intentar acomodar la estructura y facilitar el ataque nucleofílico al carbono del grupo carbonilo, como se ve en la Figura C2. La optimización del ET sin fijar la distancia $O_{(3)} - C_{(4)}$ se desarmó, alejando en gran cantidad a los átomos $O_{(3)}$ y $C_{(4)}$, así evitando el ataque nucleofílico, como se ve en la Figura C2.

Tabla C1. Parámetros estructurales para el reactivo (R), estado de transición (ET) para mecanismo concertado e intermediario aniónico (I1) durante el ataque nucleofílico al grupo carbonilo del anillo betalactámico de nitrocefina de cálculos B3LYP/6-31+G(d,p).

Distancias atómicas [Å]					
	Zn ₍₁₎ - O ₍₃₎	Zn ₍₂₎ - O ₍₃₎	O ₍₃₎ - C ₍₄₎	C ₍₄₎ - O ₍₅₎	C ₍₄₎ - N ₍₆₎
ET	2.09461	2.34924	1.71198	1.24488	1.50442
Ángulos diedros [ángulos]					
		Zn ₍₂₎ -O ₍₃₎ -C ₍₄₎ -N ₍₆₎		Zn ₍₁₎ -O ₍₃₎ -C ₍₄₎ -O ₍₅₎	
ET		13.68530		126.63702	
Frecuencias imaginarias [cm ⁻¹]					
ET	-185.27	-120.59			

Descripción: ET propuesto para mecanismo concertado con enlaces fijos. Posee dos frecuencias imaginarias, entonces no se lo puede considerar ET real. No es un punto de ensilladura en la PES.

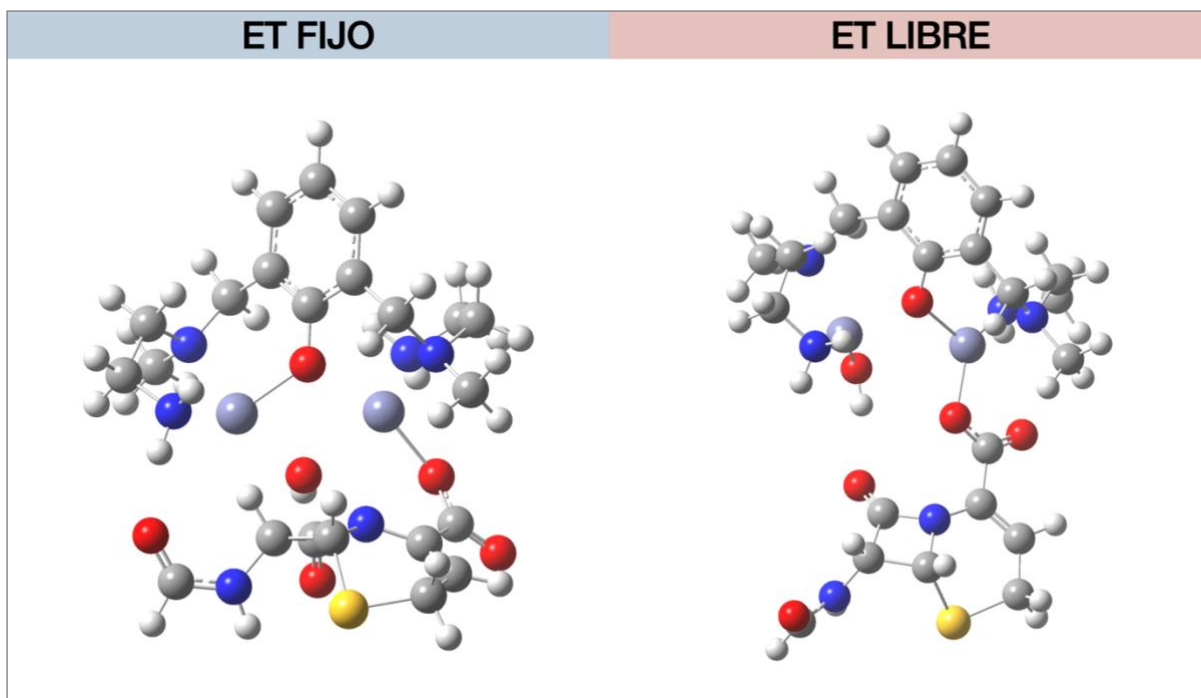


Figura C2. A la izquierda se encuentra el ET con enlaces fijos y a la derecha el ET con enlaces libres. La optimización de ET con enlaces libres aleja los átomos O₍₃₎ y C₍₄₎ lo suficiente como para evitar el ataque nucleofílico.

Carbono tetraédrico del intermediario I1 y estructuras de resonancia de I1

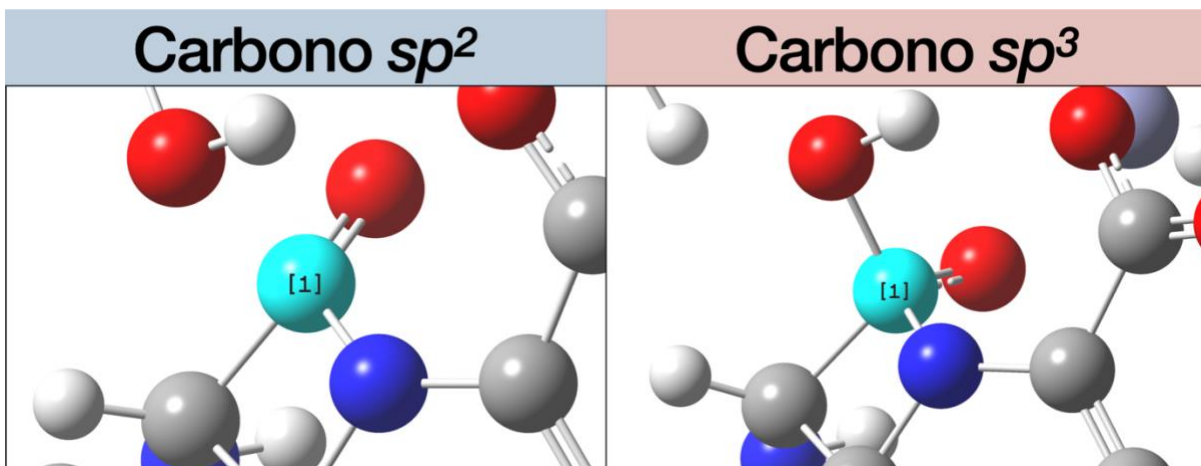


Figura C3. cambio de hibridación sp^2 a sp^3 del carbono después del ataque nucleofílico del hidróxido al carbono del carbonilo en el anillo betalactámico.

ANEXO 3. ECUACIONES

La ecuación (1) corresponde a la energía libre de activación. La ecuación (2) corresponde a la constante de velocidad de la reacción dependiente de la temperatura. La ecuación (3) corresponde a la energía de activación. La ecuación (4) corresponde a la fuerza de reacción, como la derivada de la energía de reacción en función de la coordenada de reacción. La ecuación (5) corresponde al flujo electrónico definido como el negativo de la derivada del potencial químico. La ecuación (6) corresponde a la dureza química definida como la diferencia de la energía del LUMO y el HOMO a lo largo de la coordenada de reacción. Solamente las ecuaciones (4), (5) y (6) se implementaron en el script de Python.

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (1)$$

$$k(T) = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger/RT} \quad (2)$$

$$E_a = \Delta H^\ddagger + RT \quad (3)$$

$$F(\xi) = -\frac{dE(\xi)}{d\xi} \quad (4)$$

$$J(\xi) = -\frac{d\mu(\xi)}{d\xi} \quad (5)$$

$$\eta(\xi) = \frac{1}{2}(LUMO - HOMO)(\xi) \quad (6)$$

La ecuación (7) corresponde a la sincronicidad de la reacción, que se calcula con las ecuaciones (8) y (9) para n enlaces involucrados en la reacción. La ecuación (8) corresponde a la variación del índice de enlace, donde B_i^{ET} , B_i^R y B_i^P son las distancias atómicas entre el par de átomos del enlace i para el reactivo (R), estado de transición (ET) y producto (P). La ecuación (9) corresponde al promedio de δB_i para todos los n enlaces. Finalmente, la ecuación (10) corresponde al porcentaje de evolución, que es nada más que (8) multiplicada por 100.

$$Sy = 1 - \left[\sum_{i=1}^n \frac{|\delta B_i - \delta B_{average}|}{\delta B_{average}} \right] / 2n - 2 \quad (7)$$

$$\delta B_i = \frac{B_i^{ET} - B_i^R}{B_i^P - B_i^R} \quad (8)$$

$$\delta B_{average} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \delta B_i \quad (9)$$

$$\%Ev = \delta B_i * 100 \quad (10)$$

ANEXO 4. LIBRERÍA DE FUNCIONES PARA PROCESAMIENTO DE DATOS EN PYTHON

Implementación de funciones

```
#!/usr/bin/env python3
# -*- coding: utf-8 -*-
"""
IMPLEMENTATION OF IRC, ELECTRONIC FLUX & REACTION FORCE

This script uses eflux_rxnforce.py to generate data and graphics for IRC .log
files from Gaussian. Graphics can be customized using matplotlib features.

Universidad San Francisco de Quito
"""
from eflux_rxnforce import merge, smooth, EFRF, plot_EFRF, barrier
import time

start = time.time()

# Data handling
r = ['nitro_IRC_F.log', 'nitro_IRC_F_cont.log', 'nitro_IRC_F_cont2.log']
p = ['nitro_IRC_R.log', 'nitro_IRC_R_cont.log', 'nitro_IRC_R_cont2.log']
df = merge(r, p)
df = smooth(df)
df = EFRF(df)
cv, l, Ef, Er, E, dots = barrier(df)
plot_EFRF(df)
df.to_csv('irc_eff.csv', index=False)
print(df.info())

# Time
print("\nTime spent: ', '%.2f'%float(time.time() - start), ' seconds')
```

Librería de funciones eflux_rxnforce.py

```
#!/usr/bin/env python3
# -*- coding: utf-8 -*-
"""
IRC, ELECTRONIC FLUX & REACTION FORCE

1. Merge forward and reverse IRC calculations
2. Normalize reaction coordinates
3. Displace energy values with respect to lowest reactant
4. Calculate: reaction force, electronic flux, activation barrier, hardness

Universidad San Francisco de Quito
"""
print(__doc__)
import pandas as pd
import scipy.signal as ss
import numpy as np
```



```

# HOMO & LUMO kept in Hartree
if ooc_eig in lines[i] and vrt_eig in lines[i+1]:
    homo_eigen = lines[i].split()
    del homo_eigen[:4]
    homo_eigen = homo_eigen[-1]
    lumo_eigen = lines[i+1].split()
    del lumo_eigen[:4]
    lumo_eigen = lumo_eigen[0]
    CKPNT_HOMO_LUMO += 1
break # necessary break

# Energy values extraction.
# Conversion to Cal/mol happens in merge()
for j in range(scd_lines[p], pivot_line[p]-1, -1):
    if scfdone in lines[j]:
        enrgy = lines[j].split()[4]
        break # necessary break

# Reaction coordinate extraction
for k in range(pivot_line[p], pivot_line[p]+1):
    pnt_num = int(lines[k].split()[2])
    rxn_coord_add = lines[k+2].split()[-1]
    if pnt_num == 0: rxn_coord = np.float64(0.0)
    else: rxn_coord += np.float64(rxn_coord_add)
    CKPNT_COORD += 1

# dataframe generation
new_data = {
    'file': ptfiler,
    'Point Number': pnt_num + 1,
    'Reaction Coordinate': rxn_coord,
    'Energy [kcal/mol]': enrgy,
    'HOMO': homo_eigen,
    'LUMO': lumo_eigen
}
df = df.append(new_data, ignore_index=True)

if CKPNT_HOMO_LUMO == CKPNT_COORD: pass
else: print('File {0} was not processed correctly'.format(ptfiler))

df = df.astype(convert_dict)
print(ptfiler, end = ', ')
return df

def EFRF(df):
    """
    Electronic Flux was calculated using the negative of the derivative of the
    chemical potential with respect to the reaction coordinate. Savitzky-Golay
    differentiation algorithm was used to smooth the chemical potential data
    and to prevent amplification of noise after calculating the numerical
    derivative. This algorithm uses a fixed step size, so we took an average
    of the step sizes in the reaction coordinate, and used it for
    differentiation.

```

Reaction Force was calculated using the derivative of the energy with respect to the reaction coordinate. We also used the Savitzky-Golay differentiation algorithm and an average stepsize.

```

'''
print("\n> Calculating energies ...", end = ' ')

# Average Step Size for numerical derivative
h = df[x_h].iloc[1] - df[x_h].iloc[0]

# Calculation of Electronic Flux using Savitzky-Golay differentiation
# Conversion to Cal/mol
df[efx] = - ss.savgol_filter(df[cpt_smooth],
                             window_length=5,
                             polyorder=2,
                             deriv=1,
                             delta=h)

# Calculation of Reaction Force using Savitzky-Golay differentiation
# Already in Cal/mol
df[rfo] = - ss.savgol_filter(df[gpr_smooth],
                             window_length=9,
                             polyorder=3,
                             deriv=1,
                             delta=h)

# Conversion to Cal/mol
# I = -HOMO; A = -LUMO
# eta = I - A = LUMO - HOMO
df[hrd] = 0.5 * (df['LUMO'] - df['HOMO']) * 627.5095

print('Done')
return df

def barrier(df):
    I = []
    nrg, rxf = df[gpr_smooth].to_numpy(), df[rfo].to_numpy()
    cv = [0, df.shape[0] - 1]

    # Search for TS position in Energy data
    for idx in range(nrg.shape[0] - 2):
        i, j = nrg[idx + 1] - nrg[idx] > 0, nrg[idx + 2] - nrg[idx + 1] > 0
        if i is not j: cv.append(idx + 1); break

    # Search for maxima and minima around TS in rxn force
    for idx in range(cv[2], 1, -1):
        i, j = rxf[idx + 1] - rxf[idx] > 0, rxf[idx + 2] - rxf[idx + 1] > 0
        if i is not j: cv.append(idx + 1); break

    for idx in range(cv[2], nrg.shape[0] - 2):
        i, j = rxf[idx + 1] - rxf[idx] > 0, rxf[idx + 2] - rxf[idx + 1] > 0
        if i is not j: cv.append(idx + 1); break

    cv = sorted(cv)

```

```

x = np.asarray(df[x_h]).T
y = np.asarray(df[rfo]).T

func = CubicSpline(x, y)

for k in range(len(cv)-1):
    l.append(quadrature(func, x[cv[k]], x[cv[k+1]], maxiter=300))

a, b, c, d = - l[0][0], - l[1][0], l[2][0], l[3][0]

Ef = a + b
Er = c + d
E = Ef + Er

dots = [x[i] for i in cv]

print("\n")
print("REACTION FORCE FORMALISM")
print("Energy Contributions", "\n")
print("{<10} {<16}".format('Region', 'Energy [kcal/mol]'))
print("-*28")
print("{<10} {<16}".format('w_i' , '%.4f%a))
print("{<10} {<16}".format('w_ii' , '%.4f%b))
print("{<10} {<16}".format('w_iii' , '%.4f%c))
print("{<10} {<16}".format('w_iv' , '%.4f%d))
print("-*28, \n")
print("Activation Barrier Forward : ', '%.4f%Ef, '\t', '[kcal/mol]')
print("Activation Barrier Reverse : ', '%.4f%Er, '\t', '[kcal/mol]')
print("Total Reaction Energy : ', '%.4f%E, '\t', '[kcal/mol]')

return cv, l, Ef, Er, E, dots

def merge(reactant, product):
    """
    Merges reverse and forward IRC paths in a pandas DataFrame. Calls 'extract'
    function. Both original and normalized reaction coordinate are kept in the
    final dataframe for future use.

    All energy data values are displaced with respect to the first energy value
    in the IRC path. This will keep the energy of the reactants at 0.

    Parameters
    -----
    reactant, product : lists of pd.DataFrame
        Two lists, one with names of the reactant IRC files and other with the
        names of the product IRC files. These lists must contain the names of
        the files in order they were produced.

    Returns
    -----
    df : pd.DataFrame
        Dataframe with extra column with normalized reaction coordinate.

    """
    print("\n> Merging the data ...")

```

```

print('Reading: ', end = ' ')
df_r, df_p = [], [] # list of reactant and product IRC dataframes

# Instantiation of dataframes per IRC file
for i in reactant: df_r.append(extract(i))
for i in product: df_p.append(extract(i))

# Correct energy values between IRC continuations
# (ya hace bien 18-mar-2021)
for i in range(1, len(product)):
    last = df_p[i-1].iloc[-1,3] - df_p[i].iloc[0,3]
    df_p[i][nrg] = df_p[i][nrg] + last
for i in range(1, len(reactant)):
    last = df_r[i-1].iloc[-1,3] - df_r[i].iloc[0,3]
    df_r[i][nrg] = df_r[i][nrg] + last

# Exclude extremes values in DataFrames. Correct reaction coordinate
for i in range(1, len(product)):
    df_p[i][crd] = df_p[i][crd] + df_p[i-1].iloc[-1, 2]
    df_p[i] = df_p[i].iloc[1:]
for i in range(1, len(reactant)):
    df_r[i][crd] = df_r[i][crd] + df_r[i-1].iloc[-1, 2]
    df_r[i] = df_r[i].iloc[1:]

# Merge DataFrames
df_p = pd.concat(df_p, ignore_index=True)
df_r = pd.concat(df_r, ignore_index=True).iloc[1:]
df_r[crd] = - df_r[crd]
df = pd.concat([df_r, df_p], ignore_index=True).sort_values(by = crd)
df = df.reset_index(drop=True)

# Chemical Potential estimation. Energy displacement
# Conversion to Cal/mol
df[cpt] = 0.5 * (df['HOMO'] + df['LUMO'])

# Energy
# Conversion to Cal/mol
min_x, max_x = df[crd].min(), df[crd].max()
df[nrc] = (df[crd] - min_x) / (max_x - min_x)
df[nrg] = df[nrg] - df[nrg].iloc[0]
df[nrg] = df[nrg] * 627.5095

print('\nDone')
return df

def smooth(df):
    """
    Smoothed energy data using Gaussian Process Regressor.
    """
    print('\n> Smoothing data values ...')

    x_ = np.atleast_2d(np.linspace(0, 1, df.shape[0])).T

# Energy Smoothing using Gaussian Process Regression

```

```

print('GP Energy')
X = np.atleast_2d(df[nrc]).T
y = np.asarray(df[nrg]).T
kernel = np.max(y)**2 * RBF(length_scale=0.5) \
    + WhiteKernel(noise_level=1, noise_level_bounds=(1e-10, 1e+1)) \
    + 1.0**2 * RBF(length_scale=0.1)
gp_e = GaussianProcessRegressor(kernel=kernel, random_state=0)
gp_e.fit(X, y)
y_ = gp_e.predict(x_)
df[x_h] = pd.Series(x_.reshape([1,x_.shape[0]])[0])
df[gpr_smooth] = pd.Series(y_.reshape([1,y_.shape[0]])[0])
print("Learned kernel: %s" % gp_e.kernel_)

# Chemical Potential Smoothing using Gaussian Process Regression
print('GP Chemical Potential')
y = np.asarray(df[cpt]).T
kernel = 2 * np.max(y)**2 * RBF(length_scale=0.5) \
    + WhiteKernel(noise_level=1, noise_level_bounds=(1e-10, 1e+1)) \
    + 1.0**2 * RBF(length_scale=0.05)
gp_e = GaussianProcessRegressor(kernel=kernel, random_state=0)
gp_e.fit(X, y)
y_ = gp_e.predict(x_)
df[cpt_smooth] = pd.Series(y_.reshape([1,y_.shape[0]])[0])

# Conversion to Cal/mol
df[cpt_smooth] = df[cpt_smooth] * 627.5095
print("Learned kernel: %s" % gp_e.kernel_)

print('Done')
return df

def plot_EFRF(df):
    """
    Plots for Energy, Electronic Flux, Reaction Force
    """
    print("\n> Plotting Electronic Flux, Energy, Reaction Force ...', end = ' ')

    # Energy Plot
    fig, ax = plt.subplots()
    #ax.scatter(df[nrc], df[nrg], linewidth=2.0, color='black')
    ax.plot(df[x_h], df[gpr_smooth], linewidth=2.0, color='blue')
    ax.ticklabel_format(useOffset=True)
    ax.ticklabel_format(useMathText=True)
    plt.xlabel(r'Reaction Coordinate  $\xi$ ')
    plt.ylabel('Energy [kcal  $\text{mol}^{-1}$ ]\')
    plt.savefig('./img/energy.png', dpi=600, bbox_inches='tight')
    #plt.savefig('./img/energy.tif', dpi=600)

    # Reaction Force Plot
    fig, ax = plt.subplots()
    ax.plot(df[x_h], df[rfo], linewidth=2.0, color='blue')
    ax.ticklabel_format(useOffset=True)
    ax.ticklabel_format(useMathText=True)
    plt.xlabel(r'Reaction Coordinate  $\xi$ ')

```



```

plt.ylabel(r'F($\xi$) [kcal $\text{mol}^{-1}$] $S_{a_{\theta}}^{-1}$ $S_{\mu}^{-1/2}$}')
plt.fill_between(df[x_h], df[rfo], color='lavender')
plt.savefig('./img/reaction_force.png', dpi=600, bbox_inches='tight')
#plt.savefig('./img/reaction_force.tif', dpi=600)

# Chemical Potential
fig, ax = plt.subplots()
#ax.scatter(df[nrc], df[cpt], linewidth=2.0, color='black')
ax.plot(df[x_h], df[cpt_smooth], linewidth=2.0, color='blue')
ax.ticklabel_format(useOffset=True)
ax.ticklabel_format(useMathText=True)
plt.xlabel(r'Reaction Coordinate $\xi$')
plt.ylabel(r'$\mu$($\xi$) [kcal $\text{mol}^{-1}$]')
plt.savefig('./img/chemical_potential.png', dpi=600, bbox_inches='tight')
#plt.savefig('./img/electronic_flux.tif', dpi=600)

# Electronic Flux Plot
fig, ax = plt.subplots()
ax.plot(df[x_h], df[efx], linewidth=2.0, color='blue')
ax.ticklabel_format(useOffset=True)
ax.ticklabel_format(useMathText=True)
plt.xlabel(r'Reaction Coordinate $\xi$')
plt.ylabel(r'J($\xi$) [kcal $\text{mol}^{-1}$] $\xi^{-1}$')
plt.savefig('./img/electronic_flux.png', dpi=600, bbox_inches='tight')
#plt.savefig('./img/electronic_flux.tif', dpi=600)

# Hardness
fig, ax = plt.subplots()
#ax.scatter(df[nrc], df[cpt], linewidth=2.0, color='black')
ax.plot(df[nrc], df[hrd], linewidth=2.0, color='blue')
ax.ticklabel_format(useOffset=True)
ax.ticklabel_format(useMathText=True)
plt.xlabel(r'Reaction Coordinate $\xi$')
plt.ylabel(r'$\eta$ ($\xi$) [kcal $\text{mol}^{-1}$]')
plt.savefig('./img/hardness.png', dpi=600, bbox_inches='tight')
#plt.savefig('./img/electronic_flux.tif', dpi=600)

print('Done')

```