

INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.

POSGRADO EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES

Nanocompuestos de titanatos de hidrógeno y quitosano como vehículos de inhibidores de *Pseudomonas aeruginosa*: estudio teórico-experimental.

Tesis que presenta

Verónica Castro Velázquez

Para obtener el grado de

Doctora en Nanociencias y Materiales

Director (Codirectores) de la Tesis:

Dr. Vicente Rodríguez González-
Co Director : Dr. Erik Díaz Cervantes

San Luis Potosí, S.L.P., Noviembre 2026

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Nanocompuestos de titanatos de hidrógeno y quitosano como vehículos de inhibidores de *Pseudomonas aeruginosa*: estudio teórico-experimental".** Presentada para obtener el Grado de Doctor(a) en Nanociencias y Materiales fue elaborada por **M. en C Verónica Castro Velázquez** y aprobada el **30 de mayo de 2025** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

_____

Dr. Vicente Rodríguez González
Director

_____

Dr. Erik Díaz Cervantes
Codirector de la tesis

_____

Dra. Ma. del Rosario Abraham Juárez
Miembro del Comité Tutoral

_____

Dr. Carlos Jesús Cortes García
Miembro del Comité Tutoral

_____

Dr. Haret Codratian Rosu Barbus
Miembro del Comité Tutoral



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Nuevos Materiales Nanoestructurados y Catálisis Heterogénea (LANOCAT) de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Vicente Rodríguez González y la codirección del Dr. Erik Díaz Cervantes

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No.951424) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Durante la realización del trabajo se usó la Infraestructura del Laboratorio Nacional de Nanociencias y Nanotecnología, LINAN.

Página en Blanco que se va a utilizar para colocar la copia del acta de examen.

Dedicatorias

A mi esposo que amo tanto.

Siempre, por siempre, para siempre jamás.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a mis asesores, Dr. Vicente Rodríguez y Dr. Erik Díaz Cervantes, por su invaluable tutoría y apoyo durante mi estancia doctoral.
También quiero expresar mi gratitud al Comité de Tesis, integrado por la Dra. Ma. del Rosario Abraham Juárez, Dr. Carlos Jesús Cortes García y Dr. Haret Codratian Rosu Barbus, por sus valiosas aportaciones y orientación.
Asimismo, expreso mi sincero agradecimiento a la Dra. Gladis Judith Labrada Delgado, coordinadora del Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN), así como a la M. en C. Ana Iris Peña, la M. en C. Beatriz Rivera, el Dr. Héctor Silva y el Dr. Ignacio Becerril Juárez, por su valioso apoyo técnico y colaboración en la caracterización estructural de los materiales estudiados en esta investigación.
También agradezco al M. en C. Irwin Allen Díaz Díaz, del Laboratorio de SMT, por su invaluable apoyo técnico en la resolución de problemas de software y hardware, lo cual fue fundamental para respaldar y recuperar información crítica en diversas etapas de mi doctorado.
Además, al entrenamiento y aportaciones del Dr. Víctor Olalde y su equipo del CINVESTAV en aplicaciones *in-vitro* con hongos. También a mis compañeros del Laboratorio de Nuevos Materiales Nanoestructurados y Catálisis Heterogénea (LANOCAT).

Agradezco especialmente a mi familia y seres queridos:

Agradezco de corazón, a mi esposo **Ernesto Gómez**, por su apoyo incondicional, escucha atenta y consejos sabios. Su amor y admiración me fortalecen cada día. Juntos demostramos que somos dos seres independientes que comparten una vida juntos, unidos en armonía y amor.
A mi mami **Guadalupe**, gracias por ser mi refugio, mi guía y mi fuente de amor. Tu presencia me hace sentir que papá sigue conmigo, guiándome y protegiéndome. Siempre seré su pequeño saltamontes, llenada de gratitud y amor por ti.
A mi amada hermana **Daniela**, agradezco profundamente tu apoyo incondicional, complicidad y aliento constante durante mi trayectoria doctoral. Tu papel como aprendiz, cómplice y mediadora fue invaluable. Gracias por demostrar tu admiración y cariño de manera tan genuina.
A mi hermana **Dulce**, mi 'Chocolate Amargo', gracias por estar siempre presente en mis momentos difíciles. Tu apoyo incondicional, aunque a veces te generara frustraciones, significó todo para mí. Tu mano tendida fue mi refugio, y tu amor, mi fortaleza.
También agradezco sinceramente a mis hermanas, **Beatriz**, **Guadalupe** y **Angélica** , por su incondicional apoyo, cariño y alegría. Su presencia en mi vida ha sido una fuente constante de felicidad y risas.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis ii
Créditos Institucionales iii
Agradecimientos vi
Lista de figuras ix
Anexos xii
Glosario xiv
Resumen xvi
Abstract xvii
1. Introducción 18
2. Marco teórico 20
3. Fundamentos de investigación 40
4. Justificación 41
5. Hipótesis 42
6. Objetivos 42
7. Métodos 44
8. Resultados: *in silico* 51
9. Resultados: caracterización de nanocompuestos 74
10. Resultados: absorción y liberación 81
11. Conclusiones y perspectivas 85
REFERENCIAS 87
ANEXOS 96

Lista de tablas

Tabla 1 Aplicaciones terapéuticas de TiO_2/Quitosano: Usos y propiedades 22
Tabla 2 Clasificación de heterocíclicos aromáticos según los heteroátomos. 33
Tabla 3 Técnicas Computacionales en Química y Biología 37
Tabla 4 Índices de reactividad 51
Tabla 5 Eficiencia del ligando (kcal/mol) para la proteína Hfq. 60
Tabla 6 Energías de interacción con el sistema Hfq-NT 61
Tabla 7 Eficiencia del ligando (kcal/mol), para la proteína LpxC 63
Tabla 8 Eficiencia del ligando (kcal/mol) para el sistema LpxC-NT 64
Tabla 9 Híbridos de benzofurano con mejor inhibición contra *P. aeruginosa* 71

Lista de figuras

Figura 1 Estructura química del terc-butil 4-[4-(2-etoxicarbonilbenzofurano-5-il)piperazina-1-carbonil]piperidina-1-carboxilato.Estructura con el mayor beneficio inhibitorio reportado contra GyrB de Mycobacterium tuberculosis, según (Renuka et al., 2014b). 25
Figura 2 Estructura química del compuesto etil 5-[4-(3-(metoximino)-2-oxoindolin-1-il)butoxi]-2-(4-metoxifenil)benzofurano-3-carboxilato, representante de los híbridos benzofurano-isatina-imina evaluados por su actividad antimicrobiana. 26
Figura 3 Estructura química del compuesto (E)-3-amino-N′-[(3,5-dimetil-1-fenil-1H-pirazol-4-il)metiliden]benzofurano-2-carbohidrazida, derivado híbrido diseñado para evaluar su potencial bioactividad. 27
Figura 4 Representación esquemática de la célula de *Pseudomonas aeruginosa* destacando proteínas clave en regulación y virulencia: Hfq, RpoS, LpxC y PepP.28
Figura 5 Estructuras químicas de los compuestos I-A ($C_{25}H_{22}N_4O_5$; 440.43 g/mol) e I-I ($C_{24}H_{17}N_4O_3F$; 428.41 g/mol). Ambos presentan núcleos aromáticos y heterocíclicos con sustituyentes polares y funcionales, relevantes para interacciones moleculares y posible actividad biológica. 47
Figura 6 Estructuras químicas de los compuestos II-A ($C_{23}H_{19}BrN_3O_3$; 465.31 g/mol) y II-C ($C_{23}H_{19}ClN_3O_3$; 420.86 g/mol), derivados de benzofurano con núcleo de N-acilhidrazona. Ambos presentan sustituyentes halogenados (Br y Cl) que pueden modificar sus propiedades electrónicas y bioactividad potencial. 48
Figura 7 Sitios reactivos detectados con funciones condensadas de Fukui 53
Figura 8 Cavidades en proteína pepP código PDB: 5WZE: A) Superficies de hidrofobicidad y B) Estructura secundaría. 54
Figura 9 Cavidades en proteína RpoS: A) Superficies de hidrofobicidad y B) Estructura secundaría. 55
Figura 10 Cavidades en proteína LpxC: A) Superficies de hidrofobicidad y B) Estructura secundaría 55
Figura 11 Cavidades en proteína Hfq: A)Superficies de hidrofobicidad y B) Estructura secundaría 55
Figura 12 Eficiencia del ligando, en kcal/mol, para la proteína pepP. 56
Figura 13 Eficiencia del ligando, en kcal/mol, para la proteína RpoS. 57
Figura 14 Eficiencia del ligando, en kcal/mol, para la proteína LpxC. 57
Figura 15 Eficiencia del ligando, en kcal/mol, para la proteína Hfq. 58
Figura 16 Acoplamiento de moléculas estudiadas en proteína Hfq. 59
Figura 17 Interacción de la I-E con el sistema Hfq-NT (Blanco-NT). A) Enlaces H, y B) interacciones electrostáticas. Las líneas punteadas azules representan las interacciones por puentes de hidrógeno, para las interacciones electrostáticas, las líneas punteadas verdes son las atractivas y las líneas punteadas rojas son las repulsivas. 62

Figura 18 Interacciones hidrofóbicas entre la proteína Hfq con a) I-A, y Hfq-NT con b) I-E. Las superficies azules representan sitios hidrófobos, y las superficies rojas son zonas hidrófilas. 62
Figura 19 Interacción de I-J, con el sistema LpxC-TNT (Blanco-TNT). A) Enlaces H, y B) interacciones electrostáticas. Las líneas punteadas azules representan las interacciones de H bond, para interacciones electrostáticas, las líneas punteadas verdes son las atractivas y las líneas punteadas rojas son las repulsivas. 65
Figura 20 Interacciones hidrofóbicas entre la proteína LpxC con A) I-I, y LpxC-NT con B) I-J. Las superficies azules representan sitios hidrófobos, y las superficies rojas son zonas hidrófilas. 65
Figura 21 Eficiencia del ligando en proteína Hfq (5I21); SN-C (ligando sin cofactor), interacción con NTQT (azul) y QTNT (naranja) cómo cofactores. Para a) Cavidad 25.600 A^3 y b) Cavidad 13.312 $Å^3$. 66
Figura 22 Eficiencia de inhibición en proteína LpxC (4J3D); SN-C (ligando sin cofactor), interacción con TNT-QT (azul) y QT-TNT (naranja) cómo cofactores. Para a) Cavidad 289.792 A^3 y b) Cavidad 145.498 $Å^3$. 67
Figura 23 Descripción de pose molécula Serie II-A: Interacción RpoS. A) Enlaces por puentes de H e interacciones electrostáticas. Las líneas punteadas azules representan las interacciones de H bond, para interacciones electrostáticas, las líneas punteadas verdes son las atractivas y las líneas punteadas rojas son las repulsivas. B Interacciones hidrofóbicas con (superficies azules representan sitios hidrófobos, y las superficies rojas son zonas hidrófilas). 69
Figura 24 Descripción de pose molécula Serie I-A: Interacción RpoS. A) Enlaces por puentes de H e interacciones electrostáticas. Las líneas punteadas azules representan las interacciones de H bond, para interacciones electrostáticas, las líneas punteadas verdes son las atractivas y las líneas punteadas rojas son las repulsivas. B Interacciones hidrofóbicas con (superficies azules representan sitios hidrófobos, y las superficies rojas son zonas hidrófilas). 69
Figura 25 Descripción de Serie I(MOL-A): A) Compuesto; B) Interacciones H-Bond; C) Interacciones electrostáticas; D) Superficie en cavidad 119.808 A^3. 70
Figura 26 Proteína pepP: cavidad 119.808 $Å^3$ análisis con Blanco-NT en Interacción H-Bond de compuesto serie I-A. 70
Figura 27 Superficie análisis en compuesto serie I-A. A) Blanco- serie (I-A), B) Blanco -TNT- serie (I-A) y C) Blanco-TNT-QT- serie (I-A) 70
Figura 28 Modelo farmacofórico para la proteína Hfq de *P. aeruginosa*. Las esferas verdes representan los fragmentos hidrófobos, las esferas púrpuras representan los fragmentos aromático-hidrófilos, las esferas azules representan los fragmentos hidrófilos y las esferas naranjas representan los fragmentos donantes de hidrógeno. 72
Figura 29 Modelo de farmacofórico para la proteína LpxC. Las esferas verdes representan los fragmentos hidrófobos, las esferas púrpuras representan los fragmentos aromático-hidrófilos, las esferas azules representan los fragmentos

hidrófilos y las esferas naranjas representan los fragmentos donantes de hidrógeno. 73
Figura 30 Imágenes SEM (200 nm y 1 μm) y tamaño de histogramas para a)NT hidrotermal, b) TQT-25%QT, c)TQT-50%QT y d) TQT-75%QT. 75
Figura 31 Espectros FTIR para a)T hidrotermal y precursor quitosano, b)TNT hidrotermal y precursor TiO_2 , c) todos los compuestos con partículas comparativas. 76
Figura 32 Patrones de XRD: a)QT hidrotermal, b)TiO_2, c)TNT hidrotermal, d)todos los compuestos zoom 7-12 (2θ), e)todos los compuestos zoom 16-24 (2θ), f)todos los compuestos zoom 24-26 (2θ) y g) todos los compuestos con partículas comparativas. 78
Figura 33 Isotermas por el método BET 79
Figura 34 Curva de calibración de compuesto I-A. 82
Figura 35Análisis de absorción de compuestos heterocíclicos, a) con nanopartículas de TQT-X% y b) representación de C/C_0 con nanopartículas de NTQT-25% 83

Anexos

A. Colaboraciones 98
B. Aminoácidos proteicos 100
C. Artículos publicados 102

Abreviaturas

RAM	Resistencia antimicrobiana
PDB	Protein Data Bank (por sus siglas en inglés)
DFT	Teoría de funcionales de la densidad (por sus siglas en inglés)
CMI	Concentración mínima inhibitoria
UV	Radiación ultravioleta
LPS	Lipopolisacárido
PES	Mínimo en la superficie de energía potencial
MVD	Molegro Virtual Docker
RMSD	Valores de la raíz de la desviación cuadrática media
PBS	Solución salina taponada con fosfato (por sus siglas en inglés)
LE	Eficiencia de ligando (por sus siglas en inglés)
VDW	Fuerzas de Van der Waals (por sus siglas en inglés)

Glosario

Bioactivo: sustancia química o material que tiene actividad biológica en un organismo.
Precursor: En química es una sustancia o material, necesaria para producir otra.
Hidrofilicidad: Capacidad del material para absorber agua.
Antimicrobianos: Sustancias químicas que se usan para prevenir o tratar la infección de microrganismos patógenos provocada en seres humanos, animales y plantas.
Antibacterianos: Sustancias químicas que bloquean, destruyen o impiden el crecimiento de las bacterias.
Antivirales: Sustancias usadas para tratar infecciones causadas por virus.
Antipalúdicos: Fármacos utilizados para tratar infecciones causadas por malaria.
Antiinflamatorios: Sustancia o tratamiento que reduce la inflamación.
Antioxidantes: Sustancias que ayudan a proteger las células de daños causados por los radicales libres.
Diana: Objetivo específico que se busca alcanzar.
Bacilar: Con forma de bastón o filamento. En forma de bacilos.
Flagelo: Extensión protoplasmática en forma de látigo que produce motilidad.
Flagelación monotríca: Que tiene un solo flagelo polar.
Aerobio: Necesita oxígeno para crecer y sobrevivir.
Proteasas: Enzimas que descomponen proteínas al cortar enlaces peptídicos.
Péptidos: Cadenas cortas de aminoácidos unidas por enlaces peptídicos.
Lipasas: Enzimas que descomponen lípidos (grasas), al hidrolizar enlaces entre ácidos grasos y glicerol.
Pili: Filamento delgado en las superficies de algunas bacterias, que se adhieren a superficies o intercambian material genético.
Fimbrias: Estructuras más cortas similares a los Pili.
Epiteliales: Relacionado con el epitelio, un tejido que cubre superficies internas y externas del cuerpo.
Sepsis: Respuesta inflamatoria del cuerpo a una infección generalizada, puede causar daños en órganos y ser potencialmente mortal.
Heteroátomo: Átomo diferente del carbono o hidrogeno, que se encuentra en una molécula orgánica.
Ligando: Molécula que se enlaza a un receptor.
Gasteiger: Hace referencia a cargas Gasteiger, un tipo de carga parcial atómica calculada en átomos en una molécula.
Cofactor: Molécula no proteica que se une a una enzima y es necesaria para su actividad biológica, puede ser un ion metálico o una molecular orgánica.
Macla: En cristalografía se refiere a la unión de dos partes del cristal que están orientadas de manera diferente pero simétrica, como si una fuera una imagen espejo o rotada de la otra, afectando la estructura y comportamiento del material.

Resumen

Nanocompuestos de titanatos de hidrógeno y quitosano como vehículos de inhibidores de Pseudomonas aeruginosa: estudio teórico-experimental.

Esta investigación doctoral, de carácter multidisciplinario, integra herramientas computacionales y experimentales para el diseño, síntesis, caracterización y evaluación de nanocompuestos basados en titanatos de hidrógeno y quitosano como sistemas transportadores de moléculas heterocíclicas con potencial actividad antimicrobiana frente a Pseudomonas aeruginosa.

En la etapa computacional, se empleó la teoría de funcionales de la densidad (DFT) para la optimización estructural y el análisis de las propiedades electrónicas de los sistemas moleculares estudiados. Se evaluaron veinte compuestos heterocíclicos derivados de benzofurano-isatina y benzofurano-N-acilhidrazona, sintetizados en el Laboratorio de Diseño Molecular de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Posteriormente, mediante estudios de acoplamiento molecular (docking), se analizaron sus interacciones con cuatro proteínas blanco de *P. aeruginosa*: Hfq, LpxC, RpoS y PepP. Los resultados permitieron identificar cuatro compuestos con afinidades moleculares predichas favorables, destacando su potencial como candidatos para futuras evaluaciones de actividad antimicrobiana.

En la etapa experimental, se sintetizaron nanocompuestos de titanatos de hidrógeno y quitosano mediante un tratamiento hidrotermal, variando la proporción en peso del polímero. Los materiales obtenidos se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (DRX) y análisis de área superficial específica y porosidad mediante el método BET. Estas técnicas permitieron identificar modificaciones morfológicas, estructurales y superficiales asociadas con la incorporación de quitosano, proporcionando información relevante sobre las propiedades de los nanocompuestos como posibles sistemas transportadores.

Finalmente, se evaluó el comportamiento de adsorción y liberación de los compuestos heterocíclicos seleccionados utilizando los materiales sintetizados. Los resultados evidenciaron diferencias en la interacción de las moléculas con los nanocompuestos, así como variaciones en su concentración durante los ensayos de liberación. Estas observaciones permitieron analizar la influencia de la composición del material sobre su comportamiento como vehículo de compuestos bioactivos.

En conjunto, esta investigación aporta una aproximación teórico-experimental para la selección racional de moléculas heterocíclicas con afinidad molecular predicha hacia proteínas de *P. aeruginosa* y la evaluación de nanocompuestos de titanatos de hidrógeno y quitosano como plataformas de transporte. Los resultados constituyen una base científica para el desarrollo de sistemas de liberación de compuestos bioactivos y futuras investigaciones orientadas a validar su actividad antimicrobiana.

PALABRAS CLAVE. DFT, acoplamiento molecular, nanocompuestos, compuestos heterocíclicos, titanatos de hidrógeno, quitosano, *Pseudomonas aeruginosa*, adsorción y liberación.

Abstract

Hydrogen Titanate–Chitosan Nanocomposites as Carriers of *Pseudomonas aeruginosa* Inhibitors: A Theoretical–Experimental Study

This multidisciplinary doctoral research integrates computational and experimental approaches for the design, synthesis, characterization, and evaluation of hydrogen titanate–chitosan nanocomposites as delivery systems for heterocyclic molecules with potential antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*.

In the computational stage, density functional theory (DFT) was employed for structural optimization and the analysis of the electronic properties of the molecular systems under investigation. Twenty heterocyclic compounds derived from benzofuran–isatin and benzofuran–N-acylhydrazone, synthesized at the Molecular Design Laboratory of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), were evaluated. Subsequently, molecular docking studies were performed to investigate their interactions with four *P. aeruginosa* protein targets: Hfq, LpxC, RpoS, and PepP. The results enabled the identification of four compounds exhibiting favorable predicted binding affinities, highlighting their potential as candidates for future antimicrobial activity assessments.

In the experimental stage, hydrogen titanate–chitosan nanocomposites were synthesized using a hydrothermal treatment, varying the weight fraction of chitosan. The resulting materials were characterized by scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), and Brunauer–Emmett–Teller (BET) surface area and porosity analysis. These techniques revealed morphological, structural, and surface modifications associated with chitosan incorporation, providing relevant information on the properties of the nanocomposites as potential delivery systems.

Finally, the adsorption and release behavior of the selected heterocyclic compounds was evaluated using the synthesized materials. The results revealed differences in the interactions between the molecules and the nanocomposites, as well as variations in compound concentrations during the release experiments. These observations provided insight into the influence of material composition on its behavior as a carrier of bioactive compounds.

Overall, this research provides an integrated theoretical–experimental approach for the rational selection of heterocyclic molecules with predicted binding affinities toward *P. aeruginosa* proteins and the evaluation of hydrogen titanate–chitosan nanocomposites as delivery platforms. The findings establish a scientific foundation for the development of bioactive compound delivery systems and future investigations aimed at validating their antimicrobial activity.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, hydrogen titanates, chitosan, nanocomposites, heterocyclic compounds, density functional theory, molecular docking, adsorption, drug release.

1. Introducción

En las últimas décadas, la resistencia antimicrobiana (RAM) representa una amenaza crítica para la salud pública global (Dadgostar, 2019; OMS, 2020). En el 2019, la RAM fue responsable de aproximadamente 1.2 millones de muertes directas, y se asoció con cerca de 4.95 millones de muertes a nivel mundial (K. W. K. Tang et al., 2023). Las proyecciones estiman que podría causar hasta 10 millones de muertes anuales para el año 2050 (Gigante et al., 2022).

Dentro del amplio espectro de patógenos resistentes, *Pseudomonas aeruginosa* destaca como un modelo bacteriano de alta relevancia. Se trata de una bacteria gramnegativa, oportunista, con gran capacidad de adaptación y resistencia intrínseca y adquirida a múltiples antimicrobianos (Lynch & Zhanel, 2022; Manuel et al., 2019). Esta especie es causante de infecciones nosocomiales graves y persistentes, gracias a su capacidad de formar biopelículas y producir enzimas que facilitan la invasión tisular (Ibrahim et al., 2020). Además, posee diversos mecanismos de resistencia, incluyendo mutaciones genómicas y adquisición de material genético externo (WHO, 2022), lo que la convierte en un blanco prioritario para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Jurado-Martín et al., 2021; Ríos-Hernández et al., 2021).

Una estrategia para combatir las infecciones causadas por *P. aeruginosa* es el uso de antibióticos como: tobramicina, ciprofloxacina, azitromicina y el meropenem (Mojsoska et al., 2021). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que esta bacteria se ha vuelto resistente a los compuestos bioactivos de estos fármacos (Mustafa, 2021). Por lo cual, se ha optado en desarrollar nuevos compuestos antimicrobianos basados en estructuras heterocíclicas que presenten propiedades bioactivas, haciendo modificaciones estructurales, para aumentar la bioactividad y la estabilidad molecular. Además, mejorar la mimetización con blancos biológicos, aumentando así su potencial inhibitorio (Arora et al., 2012; Hossain, 2018; Soria Arteche et al., 2020).

Para mejorar la eficacia antimicrobiana de compuestos bioactivos, también se ha intensificado la investigación al diseño de sistemas de transporte que mejoren la estabilidad y actividad de las moléculas con actividad antimicrobiana. Dentro de esta estrategia, el uso de materiales híbridos ha mostrado un notable potencial, gracias a sus propiedades fisicoquímicas, capacidad de carga y liberación controlada de principios activos (Martínez-Sánchez et al., 2019; Radwan-Pragłowska et al., 2020).

Estudios recientes han mostrado que la combinación de compuestos bioactivos con nanomateriales funcionales como titanato de hidrógeno, modificado con polímeros como el quitosano, ha demostrado mejorar la estabilidad térmica y la biodisponibilidad de fármacos sensibles, además de facilitar su transporte y liberación controlada en el sitio de acción (Wang et al., 2016).

La nanotecnología ha evolucionado de ser una ciencia experimental de laboratorio a incorporar herramientas computacionales avanzadas. Una de estas herramientas es la aproximación *in silico*, que permite simular interacciones moleculares y predecir la estabilidad de nuevos compuestos antes de su síntesis física (Scior et al., 2007a; Huggins et al., 2019). Estas simulaciones se han consolidado como una estrategia eficaz en el desarrollo racional de nuevos materiales, especialmente en el contexto de la búsqueda de terapias antimicrobianas innovadoras. En este proyecto, se empleará un enfoque *in silico* para analizar las interacciones moleculares entre compuestos heterocíclicos bioactivos, materiales de transporte (titanato de hidrógeno y quitosano) y proteínas blanco de *P. aeruginosa*, utilizada como modelo representativo.

2. Marco teórico

2.1. Materiales de transporte

En paralelo con la búsqueda de nuevas entidades bioactivas, se ha incrementado el interés en sistemas de liberación controlada de fármacos, capaces de mejorar la biodisponibilidad y selectividad terapéutica de dichos compuestos. Los materiales de transporte se diseñan para entregar fármacos o principios activos de manera controlada y dirigida a un sitio específico (F. Park, 2019), su aplicación no solo se limita al tratamiento de infecciones en seres humanos, sino que también se extiende en superficies inanimadas, plantas y otros entornos , con el fin de tratar o prevenir infecciones microbiológicas (Hu et al., 2021). Entre los materiales utilizados se incluyen polímeros, tanto naturales como quitosano, alginato y celulosa, así como sintéticos, poliéster y poliácida (David et al., 2019; Mohtashamian & Boddohi, 2017; Seedat et al., 2016). Además, se emplean nanopartículas, desde metálicas, como oro y plata, así como cerámicas tales como TiO_2 y ZnO (Correa et al., 2020; Malekzadeh et al., 2019; Wu et al., 2017).

El quitosano, un polímero natural, se caracteriza por su biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo que lo hace ideal para aplicaciones en nanopartículas, microesferas y membras. Por su parte, el TiO_2, en su forma de nanopartícula cerámica, destaca por su estabilidad química, biocompatibilidad y propiedades fotocatalíticas, siendo utilizado en su forma de nanopartículas y películas delgadas. Ambos materiales comparten ventajas, en la mejora de las propiedades tales como la acción antimicrobiana, liberación controlada, así como la estabilidad y durabilidad (Radwan-Pragłowska et al., 2020; Xing et al., 2021).

Materiales de transporte a base de TiO_2

El dióxido de titanio TiO_2, ha sido ampliamente estudiado como plataforma de administración de ingredientes bioactivos, gracias a sus propiedades fisicoquímicas, biocompatibilidad y estabilidad (Wang et al., 2016; H. Yang et al., 2006). Además, ha demostrado ser eficaz en la liberación dirigida de fármacos anticancerígenos, antimicrobianos y antiinflamatorios (Lai et al., 2016; Nurdin et al., 2023; K. Park & Dream, 2013; Rodríguez-González et al., 2020), y su capacidad para absorber luz UV y generar especies reactivas de oxígeno también lo ha hecho útil en aplicaciones fotodinámicas(Anus et al., 2022; Hernández-Del Castillo & Rodríguez-González, 2022; Nurdin et al., 2023).

No obstante, presenta limitaciones importantes, como su tendencia a agregarse en solución y su posible toxicidad a altas concentraciones (H. Yang et al., 2006). Para superar estos obstáculos, se han desarrollado modificaciones estructurales, como su conversión en titanatos de hidrógeno ($HTiO_3$ o

similares)(Rocha et al., 2024), los cuales poseen propiedades mejoradas para aplicaciones biomédicas.

Los titanatos de hidrógeno se obtienen comúnmente a partir del TiO_2 por tratamientos con soluciones alcalinas (como NaOH) seguidos de procesos de protonación mediante soluciones ácidas, lo cual permite la formación de nanotubos, nanocintas o nanoláminas con estructuras cristalinas definidas (Rocha et al., 2024; Sallem et al., 2017a). Estas formas nanométricas presentan una mayor área superficial, capacidad de intercambio iónico, y mejor dispersión en medios acuosos, lo que incrementa su eficiencia como transportadores de fármacos y permite reducir la cantidad de precursor necesario para alcanzar el mismo efecto terapéutico (Anbazhagan et al., 2016; Ranjous et al., 2019; Sandomierski et al., 2022).

Materiales de transporte a base de quitosano

El quitosano es un material ideal para aplicaciones en la entrega de moléculas bioactivas, ya que permite la liberación controlada y dirigida de moléculas terapéuticas (Herdiana et al., 2022). En particular, tiene la capacidad para formar complejos con ácidos nucleicos, lo que lo hace útil para aplicaciones de entrega de ARN y ADN (Santos-Carballal et al., 2018). No obstante, presenta algunas limitaciones, como su baja solubilidad en pH fisiológico (Shariatinia & Jalali, 2018). A pesar de esta desventaja, puede mejorar la eficiencia y selectividad de los tratamientos terapéuticos (Herdiana et al., 2022; Mosa & El-Abeid, 2023; Xing et al., 2021).

En cuanto a su comportamiento biológico, se ha reportado que, al ser una molécula cargada positivamente, el quitosano presenta una interacción eficaz con las membranas celulares, las cuales tienen carga negativa debido a los intercambios iónicos entre los medios intra y extracelular (Yan et al., 2021). Por esta razón, estas células tienden a absorber nanopartículas de quitosano (Mukhopadhyay et al., 2018; Ravi Kumar, 2000). Algunos tratamientos comerciales, emplean quitosano como vehículo de dosificación, aunque su funcionalidad puede verse afectada según la formulación. En particular, la cantidad de grupos amino con carga positiva (clave para que el quitosano interactúe con las membranas celulares) puede reducirse o incrementarse. Esta modificación influirá en la capacidad del quitosano para interactuar con las membranas celulares y su entorno, por lo que, lo que puede alterar su comportamiento biológico y, en algunos casos, inducir efectos tóxicos (Kim, 2018; Sudarshan et al., 1992).

En la siguiente, tabla 1, a continuación, se presentan investigaciones recientes sobre el uso de nanopartículas de TiO_2 y quitosano.

Tabla 1 Aplicaciones terapéuticas de Titanatos de hidrógeno/Quitosano: Usos y propiedades

Material	Área Terapéutica	Aplicaciones	Propiedades	Referencia
Titanatos de hidrógeno (TNT)	Oncología	Tratamiento del cáncer oral y de vejiga Transporte de quercetina (flavonoide anticancerígeno)	Supresión mitocondrial en células tumorales Intercambio iónico dirigido ($Na^+ \rightleftarrows Zn^{2+}$)	(Anbazhagan et al., 2016; Drury et al., 2014a, 2014b; Nakao, 2011a, 2011b; Ranjous et al., 2019a, 2019b; Sandomierski et al., 2022a, 2022b)
	Regeneración ósea y dental	Implantes en osteoporosis Entrega de bifosfonatos Liberación controlada de iones (Ca^{2+}, Sr^{2+}, Mg^{2+})	Formación de apatita ósea Alta bioactividad y adhesión celular	
	Liberación de fármacos / Terapias dirigidas	Vehículos funcionalizados para fármacos Modificación superficial con alta biocompatibilidad	Liberación controlada Alta estabilidad térmica y afinidad celular	
	Propiedades bioactivas	Antioxidante Antiinflamatorio Anti apoptótico (protege células sanas)	Reducción de estrés oxidativo Mejora de integridad celular	
Chitosan (QT)	Sistemas de liberación de fármacos controlados	Antibacteriano Anticancerígeno Hipocolesterolémico Cicatrizante	Alterar las membranas microbianas y el ADN para acción antimicrobiana con quitosano a 250 ppm y 5.3pH Efecto lítico del dodecil sulfato de sodio (SDS)	(Gao & Wu, 2022; Grimmelsmann et al., 2017; Lopes et al., 2020a, 2020b; Maleki & Milani, 2020; Şenel & Şahin, 2024)
	Ingeniería de tejidos	Andamios e hidrogeles	Favorecen la adhesión, proliferación celular para regeneración de tejidos	

	Cicatrización de heridas	Propiedades antimicrobianas y Agente hemostático	Se utiliza como aglutinante, coagulación sanguínea rápida	
	Aplicaciones contra el cáncer	Efectos inmunoestimulantes	Acción directa en sitios tumorales, lo que mejora la precisión y reduce los efectos secundarios	
	Aplicaciones antimicrobianas y antifúngicas	Recubrimientos antibacterianos ,Tratamientos antimicóticos	Debido a su propiedad antimicrobiana y antimicóticas se usa en dispositivos médicos	
Titanatos de hidrógeno con quitosano	Cicatrización de heridas	Promueven la proliferación celular	Incremento en la angiogénesis y adhesión celular	(Boudon et al., 2021; Jomaa et al., 2024; Najjari et al., 2022; Ranjous et al., 2019b)
	Administración de medicamentos	Liberación controlada con nano transportadores	Reducen toxicidad sistémica y mejoran la selectividad farmacológica	
	Ingeniería de tejidos	Materiales de andamiaje	Propiedades piezoeléctricas	

De los aspectos más relevantes de la tabla anterior, se destaca que la combinación de quitosano con materiales inorgánicos como titanatos de hidrógeno ha permitido desarrollar compuestos híbridos con propiedades mejoradas, en donde la sinergia entre los componentes orgánicos e inorgánicos ofrece estructuras estables, funcionales y con bajo impacto ambiental, posicionando a estos materiales como opciones versátiles y prometedoras en los campos de la energía y la medicina .

2.2. Compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos son moléculas de origen natural o sintético que presentan actividad biológica sobre organismos vivos, destacando su potencial para intervenir en procesos fisiológicos o patológicos. Particularmente, aquellos con actividad antibacteriana han cobrado gran interés debido a su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias o destruirlas, lo que los convierte en candidatos prometedores para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (Cowan, 1999; Silva et al., 2020).

Estos compuestos se encuentran frecuentemente en plantas, hongos, bacterias y otros organismos, y actúan mediante diversos mecanismos, como la alteración de la pared celular bacteriana, la inhibición de la síntesis de proteínas o ADN, o la generación de estrés oxidativo (Borges et al., 2016).

Un grupo particularmente importante de compuestos bioactivos con potencial farmacológico son los compuestos heterocíclicos, estructuras que contienen uno o más átomos distintos al carbono (como nitrógeno, oxígeno o azufre) dentro de un anillo cerrado. Estas estructuras son altamente versátiles y representan la base de numerosos fármacos debido a su capacidad para interactuar con dianas biológicas específicas. Diversos compuestos heterocíclicos han mostrado potentes actividades antibacterianas, ya sea por mecanismos clásicos (como inhibición de enzimas esenciales) o por la desestabilización de membranas bacterianas (Kumar et al., 2022).

Ejemplos comunes de compuestos bioactivos con actividad antibacteriana incluyen alcaloides, flavonoides, terpenoides, compuestos fenólicos y heterocíclicos nitrogenados como quinolinas, pirazoles, e imidazoles.

Moléculas bioactivas con base al núcleo del benzofurano

La identificación y caracterización de compuestos bioactivos, especialmente aquellos con estructuras heterocíclicas, constituyen una línea clave de investigación en farmacología por su potencial en el tratamiento de enfermedades infecciosas y crónicas (Newman & Cragg, 2020).

En este contexto, las moléculas que contienen el núcleo de benzofurano han captado una atención creciente en las últimas décadas debido a sus destacadas propiedades farmacológicas, como actividad antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante, antiviral y neuroprotectora (Bérubé, 2016; Khanam & Shamsuzzaman, 2015a). Este núcleo está presente en numerosos productos naturales y compuestos sintéticos con aplicaciones clínicas, lo que lo convierte en un andamiaje bioactivo valioso en el diseño de nuevas formas terapéuticas.

Una estrategia destacada en este ámbito es el diseño de moléculas híbridas, que consiste en combinar dos o más fragmentos bioactivos en una sola estructura molecular. Este enfoque permite mejorar la actividad biológica, selectividad y propiedades farmacocinéticas de los compuestos candidatos a fármaco (Gomaa et al., 2025). En particular, la combinación del núcleo de benzofurano con otros grupos farmacóforos como indoles, quinolinas, tiazoles, N-acilhidrazonas, triazoles o cromonas ha dado lugar a compuestos híbridos con efectos sinérgicos y perfiles farmacológicos mejorados (Budhwani et al., 2017; Khanam & Shamsuzzaman, 2015b; Liu et al., 2012; Nevagi et al., 2015). Algunos híbridos han mostrado inhibición de la enzima acetilcolinesterasa y capacidad antioxidante, posicionándolos como candidatos prometedores para el tratamiento del Alzheimer (Zha et al., 2016).

El núcleo de benzofurano se ha utilizado en el diseño molecular por su capacidad para inhibir la DNA girasa B (GyrB), un blanco bacteriano clave. (Renuka et al., 2014b) reportaron que un derivado de benzofurano (ver figura 1) mostró actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* con una CMI de 0.81 ± 0.24 µM y una afinidad de unión de -8.66 kcal/mol en estudios *in silico*. Esta actividad se atribuye a interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno (con arginina) e interacciones electrostáticas con residuos como isoleucina, valina, alanina y leucina, facilitando su unión eficaz al sitio activo de GyrB.

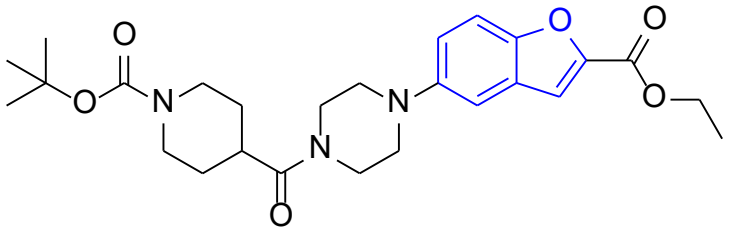


Figura 1 Estructura química del terc-butil 4-[4-(2-etoxicarbonilbenzofurano-5-il)piperazina-1-carbonil]piperidina-1-carboxilato.Estructura con el mayor beneficio inhibitorio reportado contra GyrB de Mycobacterium tuberculosis, según (Renuka et al., 2014b).

Un ejemplo destacado del aprovechamiento del núcleo de benzofurano fue reportado por Gao et al. (2019), quienes diseñaron e investigaron una serie de híbridos benzofurano-isatina-imina enlazados mediante cadenas alquílicas de

distintas longitudes. En total, sintetizaron y evaluaron 22 compuestos por su actividad in vitro frente a *Mycobacterium tuberculosis* (tanto cepas sensibles como multirresistentes), diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como por su citotoxicidad en células VERO. Todos los compuestos mostraron una actividad **anti-TB** relevante, con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que oscilaron entre 0.016 y 14.15 µg/mL, dependiendo de la cepa. Asimismo, se observó una actividad antibacteriana significativa, con CMI entre 0.06 y 64 µg/mL. La mayoría de los compuestos presentaron un perfil de citotoxicidad aceptable. Entre ellos, destacó el compuesto 7j (ver Figura 2), que resultó ser hasta 4.8 veces más potente que la rifampicina y 48 veces más que la isoniazida, además de mostrar una eficacia comparable a vancomicina y ciprofloxacino. Estos hallazgos respaldan el potencial del núcleo benzofurano como una plataforma estructural prometedora para el desarrollo de agentes antimicrobianos innovadores.

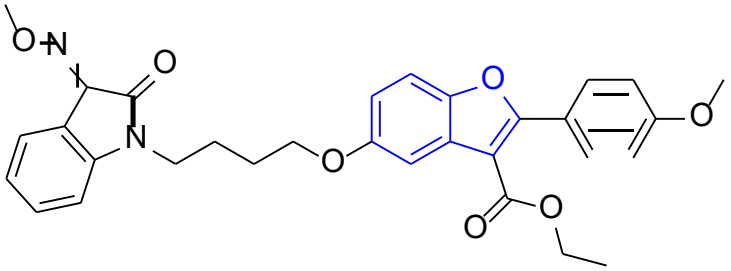


Figura 2 Estructura química del compuesto etil 5-[4-(3-(metoximino)-2-oxoindolin-1-il)butoxi]-2-(4-metoxifenil)benzofurano-3-carboxilato, representante de los híbridos benzofurano-isatina-imina evaluados por su actividad antimicrobiana.

Otro ejemplo relevante del aprovechamiento del núcleo de benzofurano es el desarrollo del compuesto LASSBio-2090 (ver Figura 3), un derivado benzofurano N-acilhidrazona diseñado por (Costa et al., 2020) y evaluado por su efecto terapéutico en un modelo de cardiomiopatía diabética. En ratas **Zucker** diabéticas obesas (ZDF), LASSBio-2090 demostró una acción significativa al corregir alteraciones metabólicas y cardiovasculares asociadas con la diabetes tipo 2. Su administración redujo los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos, mejoró la sensibilidad a la insulina, restauró la función **endotelial** y **ventricular** izquierda, y revirtió el remodelado **miocárdico** al inhibir la sobreexpresión de **TNF-α**. Estos hallazgos refuerzan el valor del núcleo benzofurano como plataforma estructural para el desarrollo de agentes terapéuticos dirigidos a enfermedades metabólicas y cardiovasculares complejas.

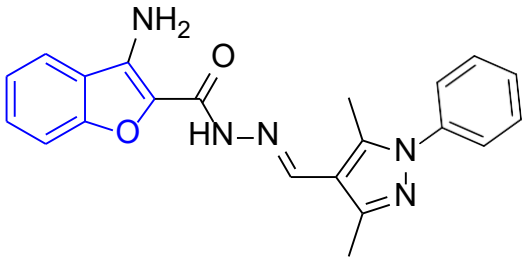


Figura 3 Estructura química del compuesto (E)-3-amino-N′-[(3,5-dimetil-1-fenil-1H-pirazol-4-il)metiliden]benzofurano-2-carbohidrazida, derivado híbrido diseñado para evaluar su potencial bioactividad.

Aunque estos resultados son prometedores, la mayoría de los estudios aún se encuentran en fases preliminares o *in vitro*, lo que resalta la necesidad de seguir explorando nuevas estructuras y evaluar su viabilidad farmacológica (Khodarahmi et al., 2015; Renuka et al., 2014a). Por ello, el diseño racional y la evaluación sistemática de híbridos de benzofurano siguen siendo áreas de investigación activa, con el objetivo de identificar compuestos con potencial terapéutico real y perfiles de seguridad adecuados para avanzar hacia ensayos clínicos.

2.3. Pseudomonas aeruginosa

Es una bacteria gram-negativa, flagelada y oportunista que se encuentra comúnmente en entornos acuáticos y terrestres (Lynch & Zhanel, 2022). Esta bacteria presenta características como morfología **bacilar**, tamaño de 2-5 µm de longitud y 0,5-1 µm de ancho, **flagelación monotríca** y metabolismo **aerobio** (Stella, 2010). En términos de patogenicidad, *P. aeruginosa* produce factores de virulencia como toxinas (exotoxina A, elastasa), **proteasas** y **lipasas**, y puede adherirse a superficies y tejidos mediante estructuras como **Pili** y **fimbrias** (Bassetti et al., 2018; Ramos & Filloux, 2007). Esto le permite invadir células **epiteliales** y tejidos subyacentes, causando enfermedades como neumonía, **sepsis**, infecciones del tracto respiratorio, infecciones cutáneas de heridas, infecciones oculares, entre otras (Manuel et al., 2019; Ołdak & Trafny, 2005; A. Tang et al., 2018). Debido a su capacidad para desarrollar resistencia a antibióticos, *P. aeruginosa* es un patógeno que afecta a pacientes con sistemas inmunológicos comprometidos y puede causar brotes epidémicos en hospitales y centros de atención médica(Jurado-Martín et al., 2021; Pragasam et al., 2018).

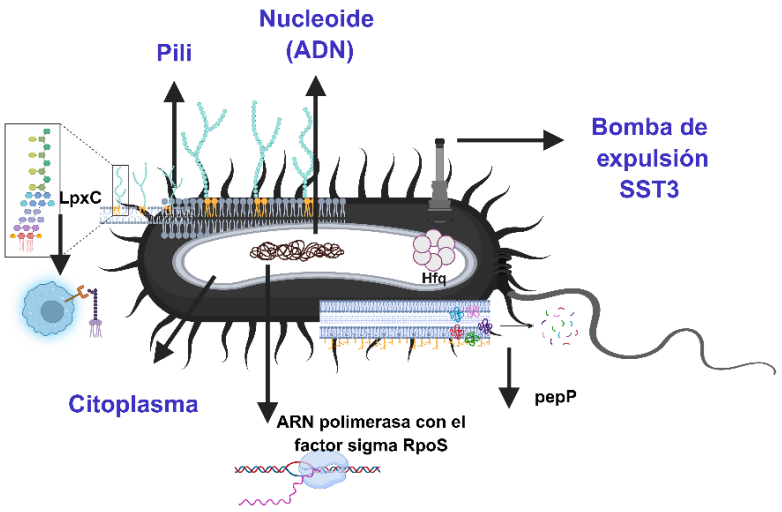


Figura 4 Representación esquemática de la célula de *Pseudomonas aeruginosa* destacando proteínas clave en regulación y virulencia: Hfq, RpoS, LpxC y PepP.

En la figura 4, se presenta un esquema de *Pseudomonas aeruginosa* resaltando la localización y función de cuatro proteínas relevantes. RpoS, localizada en el citoplasma, actúa como factor sigma en la regulación de genes en respuesta al estrés. Hfq, también en el citoplasma, facilita la interacción entre ARN mensajeros y pequeños ARN reguladores. LpxC se encuentra en la membrana interna, donde cataliza un paso clave en la biosíntesis del lípido A del LPS. Finalmente, PepP se localiza en el periplasma y puede ser secretada en vesículas de membrana externa (OMVs), participando en la degradación de péptidos y procesos de virulencia. En este proyecto, se evaluarán estas cuatro dianas moleculares clave de *P. aeruginosa* las cuales se describen a continuación:

UDP-3-O-(acil)-N-acetilglucosamina desacetilasa (LpxC)

La proteína LpxC es una enzima clave en la ruta biosintética del lípido A, un componente fundamental del lipopolisacárido (LPS) que conforma la membrana externa de bacterias Gram-negativas como P. aeruginosa. Esta enzima cataliza la desacetilación del precursor UDP-3-O-(acil)-N-acetilglucosamina, un paso crucial y altamente conservado en la biosíntesis del LPS. La LpxC requiere iones Zn^{2+} como cofactor para su actividad catalítica. Lo más relevante desde el punto de vista terapéutico es que no posee homología estructural con proteínas presentes en células de mamíferos, lo que la convierte en una diana atractiva para el desarrollo de inhibidores antibacterianos selectivos (Zhou & Barb, 2008; Coggins et al., 2003; Jackman et al., 2000; Zhou & Hong, 2021).

Factor de transcripción dependiente de ARN(Hfq)

La proteína Hfq fue originalmente identificada en *Escherichia coli* como un factor requerido para la replicación del bacteriófago Qβ, de ahí su nombre. Sin embargo, hoy se sabe que su función va mucho más allá: actúa como una proteína adaptadora de ARN que regula la expresión génica a través de la facilitación de interacciones entre ARN no codificantes (sRNA) y sus ARNm diana en bacterias Gram-negativas, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*. Su eliminación puede aumentar la sensibilidad de la bacteria a los rayos UV y disminuir su tasa de crecimiento (Santos et al., 2019). Su estructura y tamaño permiten su interacción con múltiples moléculas del ARN, facilitando la respuesta bacteriana frente a diversos estímulos.

Aminopeptidasa P (PepP)

La aminopeptidasa P (PepP) es una enzima tipo X-prolil peptidasa involucrada en la eliminación de residuos N-terminales precedidos por prolina. Presenta un sitio activo que contiene un clúster trimetálico de manganeso (Mn^{2+}), esencial para su función catalítica.

Esta enzima está estrechamente asociada con la virulencia de *P. aeruginosa*, ya que participa en procesos que facilitan la supervivencia y la capacidad infecciosa de la bacteria. La inhibición de PepP puede afectar significativamente la viabilidad bacteriana y limitar la progresión de la infección. Por estas razones, representa una diana prometedora para el desarrollo de inhibidores específicos contra infecciones bacterianas (Ozdemir & Soyer, 2020; Sonnabend et al., 2020).

ARN polimerasa factor sigma (RPoS)

El factor sigma S (RpoS) es una subunidad reguladora de la ARN polimerasa que permite a *P. aeruginosa* modificar su perfil de transcripción en respuesta a diferentes condiciones de estrés, como la escasez de nutrientes, cambios de temperatura, estrés oxidativo y formación de biofilms. Además, desempeña un papel esencial en la transición hacia fases de crecimiento lento o estacionario, así como en la expresión de genes implicados en la resistencia a antibióticos y en la persistencia intracelular (Robinson et al., 2020; Hall et al., 2018; X. Liu et al., 2019). Dado que RpoS regula redes génicas críticas para la supervivencia y patogenicidad, su inhibición podría comprometer la capacidad adaptativa del patógeno en entornos hostiles.

2.4. Aproximación con modelado *in silico*

El avance de las herramientas computacionales ha revolucionado el desarrollo de estrategias terapéuticas, especialmente mediante el uso del diseño *in silico*, que permite la identificación y optimización de compuestos bioactivos dirigidos contra múltiples patógenos multirresistentes de gran relevancia clínica. Esta metodología facilita el modelado estructural de proteínas bacterianas, la predicción de interacciones moleculares y la selección racional de inhibidores específicos,

reduciendo significativamente el tiempo y costo del desarrollo farmacológico (Lionta et al., 2014; Schneider, 2010). Paralelamente, la nanotecnología ha emergido como una disciplina clave para el desarrollo de sistemas avanzados de materiales de transporte, tales como nanopartículas y nanocápsulas, que permiten la liberación controlada y dirigida de compuestos bioactivos, aumentando su estabilidad, biodisponibilidad y eficacia (Rai et al., 2016; Pelgrift & Friedman, 2013). La combinación del diseño *in silico* con la nanotecnología proporciona un enfoque integral y prometedor para superar las barreras de resistencia bacteriana y optimizar tratamientos dirigidos, sentando las bases para terapias más efectivas y seguras contra infecciones bacterianas (Mendes et al., 2020).

2.5. Conceptos fundamentales

Este marco conceptual abarca los principales conceptos relacionados con los patógenos, y herramientas para el diseño de nuevos agentes antimicrobianos, integrando desde estrategias computacionales hasta experimentales que conforman la base de este trabajo de investigación

Patógenos

Los patógenos son microorganismos que causan enfermedades en humanos, animales y plantas. Estos microorganismos pueden ser bacterias, virus, hongos, protozoos o parásitos(Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

Bacterias Patógenas

Las bacterias son microrganismos procariotas unicelulares que presentan diversas formas morfológicas (esféricas, alargadas o espirales), pueden sobrevivir en condiciones extremas de temperatura y presión (Yaneth & Basaldúa, 2016). Desde el punto de vista taxonómico, se clasifican en dos grupos principales: Gram-positivos y Gram-negativos, según la técnica de tinción desarrollada por Hans Christian Gram en 1884 (Christian et al., 2018). Algunas de las bacterias patógenas más comunes incluyen(Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, 2014; World health Organization (OMS), 2021):

- *Pseudomonas aeruginosa* (infecciones respiratorias, urinarias y sanguíneas)
- *Staphylococcus aureus* (infecciones cutáneas y respiratorias)
- *Escherichia coli* (infecciones urinarias y gastrointestinales)
- *Salmonella spp*. (infecciones gastrointestinales)
- *Clostridium difficile* (infecciones gastrointestinales)

Control de Patógenos

Para controlar la propagación de patógenos, se utilizan diversas estrategias, incluyendo:

- Antibióticos (para bacterias)
- Antifúngicos (para hongos)
- Vacunas (para prevenir infecciones)
- Higiene y desinfección (para reducir la transmisión)
- Prácticas agrícolas sostenibles (para reducir la contaminación de suelos y agua)

Entre las distintas estrategias para el control de patógenos, los antibióticos (tema clave de esta tesis doctoral), han sido, históricamente, una de las herramientas más efectivas en el tratamiento de infecciones bacterianas.

Antibióticos

Son sustancias químicas diseñadas para prevenir, tratar o curar enfermedades producidas por infecciones bacterianas. Su acción se basa en la interacción con receptores celulares específicos, alterando procesos biológicos. Se clasifican según su mecanismo de acción (narrow-spectrum o broad-spectrum (en inglés)), estructura química o indicación terapéutica (Calvo & Martínez-Martínez, 2009; Lindmeier, 2018). Su acción puede ser bactericida (mata bacterias) o bacteriostática (inhibe su crecimiento).

Moléculas bioactivas

Principios activos que poseen propiedades terapéuticas. Estas moléculas interactúan con sistemas biológicos para producir efectos beneficiosos. La bioactividad depende de factores como solubilidad, estabilidad y capacidad para cruzar membranas celulares. Las sustancias activas se encuentran en fármacos, suplementos y productos naturales (Sherin Rebecca et al., 2021; Suwannarach et al., 2020).

Estructuras heterocíclicas

Las estructuras heterocíclicas son compuestos orgánicos que contienen átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre en su estructura cíclica. Estas estructuras son de particular interés en el desarrollo de compuestos bioactivos, especialmente en el ámbito de la medicina (Arora et al., 2012; Olivia Soria Arteche et al., 2020).

Los compuestos bioactivos validados constituyen el principio activo de un fármaco. Este principio activo es la sustancia o compuesto dentro de un medicamento o producto que ejerce una acción biológica o farmacológica sobre el organismo o el entorno, y es responsable de su efectividad para tratar enfermedades, controlar plagas o mejorar las condiciones de cultivo, entre otras aplicaciones (Khanam & Shamsuzzaman, 2015b).

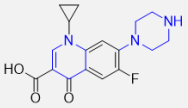
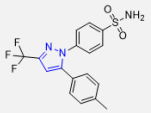
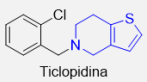
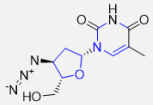
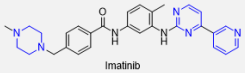
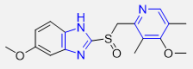
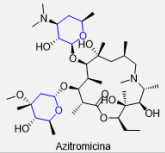
Estos compuestos poseen propiedades que los hacen altamente efectivos contra diversos patógenos, gracias a su capacidad para interferir en procesos biológicos esenciales de los microorganismos y otros organismos.

En este contexto, las estructuras heterocíclicas desempeñan un papel clave como agentes antimicrobianos, ya que pueden actuar mediante diferentes mecanismos, entre los cuales se encuentran:

1. **Bloqueo de la síntesis proteica:** Interfiere con la formación de proteínas esenciales para el desarrollo y viabilidad de los microorganismos.
2. **Alteración de la membrana celular:** Modifica la integridad y funcionalidad de la membrana, dificultando el trasporte de nutrientes y iones.
3. **Inhibición de la replicación del material genético (ADN):** Impide la replicación del ADN, lo que obstaculiza la proliferación microbiana.

Según los heteroátomos presentes y su disposición en el anillo, las estructuras heterocíclicas se clasifican en distintas categorías. La Tabla 2 muestra ejemplos de fármacos comerciales que las contienen, indicando los heterociclos presentes, una breve descripción de su estructura, su aplicación terapéutica y el mecanismo de acción que explica su efecto farmacológico. Esta información resalta la importancia de los heterociclos en el diseño de medicamentos y su relación con la función biológica y el uso clínico.

Tabla 2 Ejemplo de fármacos comerciales con heterocíclicos aromáticos.

Fármaco (estructura)	Heterociclos presentes	Descripción estructural clave	Aplicación terapéutica	Mecanismo de acción
 Ciprofloxacino	Quinolona, Piperazina	Núcleo de quinolona fusionado con benceno; flúor en posición 6; piperazina en posición 7 que mejora penetración en bacterias Gram negativas.	Antibacteriano	Inhibe la ADN girasa e impide la replicación del ADN
 Celecoxib	Pirazol, Benzosulfonamida	Núcleo de pirazol con dos anillos fenilo sustituidos y un grupo sulfonamida que confiere selectividad hacia la COX-2.	Antiinflamatorio	Inhibidor selectivo de la COX-2, reduce prostaglandinas
 Ticlopidina	Tiofeno, Piperidina	Anillo de tiofeno unido a piperidina; el tiofeno participa en la activación metabólica del fármaco.	Antiagregante plaquetario	Bloquea receptores de ADP en plaquetas
 Zidovudina	Pirimidina	Análogo de timidina con grupo azido en 3' que bloquea la elongación del ADN viral.	Antiviral (VIH)	Inhibe la transcriptasa inversa del VIH
 Imatinib	Pirimidina, Piperazina	Núcleo de fenilaminopirimidina unido a piperazina que interactúa con la cavidad de la tirosina quinasa BCR-ABL.	Anticancerígeno	Inhibe la tirosina quinasa BCR-ABL
 Omeprazol	Benzimidazol, Piridina	Anillo de benzimidazol fusionado con piridina y grupo sulfoxido; la piridina permite activación en medio ácido.	Antiulceroso	Inhibidor irreversible de la bomba de protones
 Azitromicina	Desosamina (aminoazúcar con heterociclo oxígeno), Macrólido lactónico	Macrólido de 15 átomos con lactona y azúcares ligados; el anillo lactónico facilita la unión al ribosoma bacteriano e inhibe la síntesis proteica.	Antibacteriano de amplio espectro	Inhibe la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, bloqueando la síntesis de proteínas.

Referencias: (Gigante et al., 2022; Heravi, 2020; Ołdak & Trafny, 2005; Olivia Soria Arteche et al., 2020; Rusu et al., 2023)

Biomateriales

Materiales biocompatibles diseñados para interactuar con sistemas biológicos (Hu et al., 2021). Estos materiales se utilizan en implantes, prótesis, dispositivos médicos y terapias regenerativas (Morato Ana, Narváez Isabel, 2004). Las propiedades físico-químicas, como resistencia y biodegradabilidad, son fundamentales para su aplicación(Board et al., 2011).

Simulación computacional

La simulación computacional es una herramienta fundamental en investigación científica y desarrollo de fármacos, permitiendo modelar y predecir comportamientos moleculares. Esta técnica facilita la comprensión de procesos biológicos complejos y optimiza el diseño de moléculas con propiedades específicas (Valles et al., 2014).

Diseño *in-silico*

El diseño *in-silico* consiste en la evaluación de modelos moleculares y diseño de compuestos utilizando software computacional. Esta técnica permite predecir propiedades y actividad biológica de moléculas, reduciendo costos y tiempos de investigación, para el descubrimiento de fármacos y optimización de moléculas usando simulación (Scior et al., 2007).

Optimización molecular

La optimización molecular es el proceso de minimizar la energía de una estructura molecular para obtener su conformación más estable. Esto se logra mediante el uso de software computacional como Gaussian, GAMESS o PSI4, que emplean métodos de mecánica cuántica y mecánica clásica para simular y optimizar las estructuras moleculares. La optimización molecular es fundamental en química computacional para predecir propiedades físicas y químicas, como la geometría molecular, la energía de enlace y la reactividad. Con esta técnica se mejoran las propiedades de una molécula mediante modificaciones químicas, enfocándose en mejorar la eficacia, reducir toxicidad y optimizar solubilidad. La optimización molecular es de gran importancia en la química farmacéutica para desarrollar fármacos seguros y efectivos (Huggins et al., 2019).

Funciones condensadas de Fukui

Las funciones condensadas de Fukui se utilizan ampliamente en la química computacional para predecir la reactividad local de una molécula sin necesidad de realizar cálculos completos de cada punto del espacio molecular(Sánchez-Márquez, 2019). Al enfocarse en los sitios nucleofílicos, electrófilos y radicalarios directamente sobre los átomos, estas funciones permiten reducir significativamente los costos computacionales asociados a métodos más detallados, como el análisis de orbitales frontera o el mapeo de potenciales de

reactividad(Yañez et al., 2021). Esta simplificación ha sido particularmente útil en el estudio de sistemas grandes o con múltiples centros reactivos, como biomoléculas o materiales funcionalizados, donde un enfoque tradicional resultaría ineficiente (SAHU et al., 2014).

En el contexto de la modelización molecular, el uso de estas funciones permite predecir la reactividad local de las moléculas de manera eficiente, sin necesidad de realizar cálculos exhaustivos de toda la estructura(Maheswari, 2024). Este enfoque es particularmente útil en la identificación zonas específicas de compuestos, donde se requiere evaluar una gran cantidad de candidatos en un corto periodo de tiempo. Por ejemplo, estudios recientes han utilizado las funciones de Fukui condensadas para evaluar la afinidad de inhibidores hacia proteínas diana, lo que ha facilitado la selección de compuestos prometedores en el diseño de fármacos antimicrobianos. Estos enfoques han mostrado que, al centrarse en sitios de alta reactividad, se puede reducir significativamente el tiempo computacional necesario para predecir la eficacia de los compuestos, acelerando así el proceso de descubrimiento de fármacos (El ouafy et al., 2020; Montes & Hormaza, 2008; Popa, 2007).

Docking Molecular

Es una técnica computacional que predice la interacción entre moléculas y receptores biológicos. Esta técnica es fundamental en el descubrimiento de fármacos, estudio de la unión proteína-**ligando** y diseño de inhibidores. Esta predicción permite identificar moléculas con potencial terapéutico (Ferreira et al. 2015)

Modelo farmacofórico

El modelo farmacofórico es una representación tridimensional de los requisitos estructurales para la actividad biológica. Esta técnica permite diseñar fármacos, predecir actividad biológica y estudiar la relación estructura-actividad. Los modelos farmacofóricos son esenciales en la química farmacéutica para desarrollar fármacos efectivos (Koes & Camacho, 2012; Schâfer-Korting, 2010), aunque su representación tridimensional es abstracta, identifica las características químicas esenciales que una molécula debería tener para interactuar con un blanco biológico especifico, como una enzima o receptor.

La optimización molecular, Docking molecular, modelado farmacofórico son técnicas computacionales, fundamentales para facilitar la investigación y desarrollar soluciones en campos como farmacología, biotecnología y nanotecnología. Los softwares utilizados se incluyen en la siguiente tabla 3.

Proteínas

Las proteínas son macromoléculas biológicas formadas por una o más cadenas lineales de aminoácidos, unidas entre sí mediante enlaces peptídicos. Estas cadenas se pliegan en estructuras tridimensionales específicas que determinan su función biológica. Debido a la diversidad de sus estructuras y propiedades químicas, las proteínas desempeñan funciones esenciales en los organismos vivos, como catálisis de reacciones (enzimas), transporte de moléculas, defensa inmunológica, regulación genética y estructuración celular. La secuencia y composición de aminoácidos en una proteína está codificada genéticamente y define sus niveles estructurales: primaria, secundaria, terciaria y, en algunos casos, cuaternaria.

Estructura de proteínas:

- *Primaria:* Secuencia de aminoácidos
- *Secundaria:* Hélices alfa y láminas beta
- *Terciaria:* Plegamiento tridimensional
- *Cuaternaria:* Asociación de subunidades

Aminoácidos

Los aminoácidos son compuestos orgánicos fundamentales que constituyen las unidades estructurales básicas de las proteínas. Cada aminoácido está formado por un grupo amino ($-NH_2$), un grupo carboxilo (-COOH), un átomo de hidrógeno y una cadena lateral variable (grupo R) unidos a un carbono central (carbono α). La naturaleza química de la cadena lateral determina las propiedades específicas de cada aminoácido y su comportamiento dentro de las proteínas. Existen 20 aminoácidos proteicos estándar, codificados genéticamente, que se combinan en distintas secuencias para formar proteínas con funciones biológicas específicas. Además de su papel estructural, los aminoácidos también participan en procesos metabólicos, en la regulación de señales celulares y como precursores de otras biomoléculas esenciales. Los aminoácidos representativos se muestran en la tabla de aminoácidos anexos C.

Tabla 3 Técnicas Computacionales en Química y Biología

Técnica	Descripción	Software	Autor
Optimización Molecular	Optimización de estructuras moleculares	GAUSSIAN	(M. J. Frisch et al., 2016)
		ORCA	(Neese et al., 2020)
		Q-CHEM	Morris (2019)
	Simulación de propiedades moleculares	GAMESS	Szabo y Ostlund (2012)
		NWCHEM	Gaussian, Inc. (2022)
		TURBOMOLE	(Franzke et al., 2023)
	Cálculo de propiedades moleculares	PSI4	Jensen (2013)
		MOLPRO	(Werner et al., 2012)
Docking Molecular	Simulación de interacciones moleculares	AUTODOCK	Morris (2019)
		DOCK	(Ryan G. Coleman Michael Carchia Teague Sterling Kyle Petkovic, 2013)
		GLIDE	(Friesner et al., 2004)
		SURFLEX-DOCK	(Spitzer & Jain, 2012)
	Predicción de interacciones moleculares	GOLD	checar
		FLEXX	(Kramer et al., 1999)
		AUTODOCK VINA	Trott y Olson (2010)
Modelado Farmacofórico	Modelado de estructuras moleculares	MOE	Chemical Computing Group
		PHASE	Schrödinger
	Análisis de estructuras moleculares	SYBYL	Tripos
		PHARMAGIST	(Schneidman-Duhovny et al., 2008)

La tabla anterior presenta una recopilación de técnicas y softwares empleados en el modelado molecular, la simulación de propiedades, el Docking molecular, y el modelado farmacofórico. Estas herramientas permiten optimizar estructuras, predecir interacciones moleculares y diseñar compuestos bioactivos. Programas como Gaussian, Orca, Auto dock y Moe, destacan por su uso frecuente en investigaciones académicas. Su elección depende de la técnica especifica y objetivo de estudio, desde calculo cuántico, predicción de actividad biológica o desarrollo de fármacos.

Caracterización de Materiales

La caracterización de materiales es una etapa esencial en el diseño y evaluación de sistemas con aplicaciones biomédicas, ambientales o industriales, ya que permite comprender sus propiedades fisicoquímicas, estructurales y morfológicas. Estas propiedades están directamente relacionadas con su funcionalidad, estabilidad y capacidad de interacción con otros compuestos, como fármacos, agentes antimicrobianos o biomoléculas. En este sentido, se aplican diversas técnicas analíticas que, desde un enfoque complementario, proporcionan información detallada sobre la estructura y comportamiento del material.

Fisisorción de Nitrógeno BET (Brunauer Emmett Teller)

Es un modelo físico-químico utilizado para analizar la adsorción de gases, comúnmente nitrógeno, en la superficie de un sólido a bajas temperaturas (77 K). A partir de la isoterma de adsorción, esta técnica permite calcular la superficie específica (m^2/g), el volumen de poro y el diámetro de poro, parámetros cruciales en materiales porosos como sílicas, óxidos metálicos o nanopartículas funcionalizadas. La información obtenida por BET es relevante para evaluar la capacidad de carga de compuestos bioactivos, así como para optimizar su liberación o interacción superficial (Krishnan et al., 2022; Thommes et al., 2020).

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El SEM permite visualizar la morfología superficial y el tamaño de partícula mediante un haz de electrones que barre la muestra, generando imágenes con alta resolución. Esta técnica es fundamental para analizar la homogeneidad, agregación de partículas y la textura superficial, especialmente en materiales con aplicaciones en transporte de fármacos, catálisis o interacción bacteriana (Wang et al., 2021).

Espectroscopía Infrarroja con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

La espectroscopía FTIR-ATR permite identificar los grupos funcionales presentes en un material al medir la absorción de radiación infrarroja por los

enlaces químicos. Esta técnica se utiliza para confirmar la composición química y la funcionalización superficial, así como para detectar interacciones entre el material y compuestos bioactivos, como enlaces hidrofóbicos o puentes de hidrógeno (Díaz-Rodríguez et al., 2021).

Espectroscopía UV-Visible (UV-Vis)

Esta técnica mide la absorción de radiación en las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético. Se emplea para determinar propiedades electrónicas, como el ancho de banda prohibido (band gap), y para monitorear la presencia, liberación o estabilidad de compuestos bioactivos. Es especialmente útil en sistemas sensibles a la luz o con propiedades semiconductoras (Jiang et al., 2020).

Difracción de Rayos X (DRX)

La DRX permite determinar la estructura cristalina del material, identificando las fases presentes, el grado de cristalinidad, y el tamaño de cristal. Esta técnica es clave para confirmar la integridad estructural tras procesos de síntesis, funcionalización o interacción con otros compuestos (Alzate-Sánchez et al., 2021).

3. Fundamentos de investigación

Planteamiento del problema

El uso indiscriminado y prolongado de antibióticos en la medicina humana, veterinaria y la agricultura ha provocado una aceleración en la aparición y propagación de bacterias resistentes a múltiples fármacos. Esta resistencia antimicrobiana representa una de las amenazas más graves para la salud pública global, ya que compromete la eficacia de los tratamientos actuales y dificulta el control de infecciones comunes.

Uno de los casos más alarmantes es el de *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno oportunista gramnegativo capaz de adquirir y desarrollar múltiples mecanismos de resistencia. Su capacidad para formar biopelículas, mutar rápidamente y evadir el sistema inmunológico convierte a esta bacteria en un modelo crítico para estudiar y abordar la resistencia antimicrobiana. Actualmente, muchos antibióticos convencionales han perdido efectividad frente a este microorganismo, lo que ha derivado en infecciones persistentes, mayor tasa de complicaciones y un aumento en la morbilidad y mortalidad, especialmente en pacientes inmunocomprometidos.

Esta situación genera diversas consecuencias adversas, entre ellas:

•Aumento de la morbilidad y mortalidad asociada a infecciones resistentes.
•Reducción de las opciones terapéuticas disponibles.
•Incremento en los costos de hospitalización, tratamientos prolongados y uso de medicamentos de última línea.
•Riesgo de propagación de cepas multirresistentes a nivel comunitario y hospitalario.

Ante esta problemática, se vuelve urgente desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan bloquear o inhibir eficazmente a microorganismos resistentes. En este contexto, los enfoques multidisciplinarios que integran la nanotecnología, la química de compuestos bioactivos y las simulaciones computacionales *(in silico*) ofrecen alternativas prometedoras. El diseño racional de nanocompuestos funcionales, que combinen propiedades bioactivas con capacidad de transporte y liberación dirigida, podría ofrecer una vía innovadora y eficaz para enfrentar la resistencia bacteriana y mejorar los resultados clínico.

Preguntas de investigación

El uso de herramientas *in silico*, como la teoría del funcional de la densidad (DFT) y el acoplamiento molecular es una alternativa innovadora que permite

optimizar compuestos bioactivos y predecir su interacción con proteínas blanco clave (Scior et al., 2007; Huggins et al., 2019). Asimismo, los nanocompuestos basados en titanato de hidrógeno y quitosano han demostrado propiedades prometedoras como sistemas de liberación controlada (Radwan-Pragłowska et al., 2020; Wang et al., 2016). Bajo este enfoque multidisciplinario, surgen las siguientes preguntas de investigación que guían esta tesis doctoral.

•¿Qué proteínas blanco de *Pseudomonas aeruginosa* están asociadas con mecanismos de resistencia y patogenicidad?
•¿Cuáles son las características estructurales y electrónicas óptimas que deben presentar los compuestos heterocíclicos bioactivos para interactuar eficazmente con las proteínas blanco seleccionadas?
•¿Qué parámetros computacionales (DFT y acoplamiento molecular) permiten predecir con mayor precisión la afinidad entre los compuestos diseñados y sus objetivos moleculares?
•¿Cómo influye la proporción de quitosano en la estabilidad, morfología y capacidad de carga del nanocompuesto híbrido con titanato de hidrógeno?
•¿Cuál es la eficiencia de encapsulación, absorción y liberación de los compuestos heterocíclicos en el biomaterial sintetizado?
•¿Qué nivel de actividad antimicrobiana presentan los nanocompuestos funcionales frente a Pseudomonas aeruginosa, y qué potencial tienen para ser aplicados en otros patógenos multirresistentes?

4. Justificación

La creciente resistencia bacteriana representa una amenaza crítica para la salud pública, ya que compromete la eficacia de los tratamientos disponibles y genera un impacto económico y clínico significativo. Frente a esta situación, se requieren estrategias innovadoras que superen las limitaciones de los antibióticos convencionales.

En este contexto, el uso de nanomateriales como vehículos para la administración de compuestos bioactivos ha emergido como una alternativa prometedora. En particular, nanocompuestos funcionales basados en titanato de hidrógeno y quitosano permiten la incorporación y liberación controlada de principios activos, como los derivados heterocíclicos tipo benzofurano, con potencial actividad antimicrobiana. Estos sistemas pueden optimizar la biodisponibilidad de los compuestos, mejorar su estabilidad y facilitar su acción dirigida sobre proteínas clave de microorganismos resistentes.

La comprensión detallada de las interacciones fisicoquímicas entre los compuestos bioactivos, los materiales de soporte y los blancos moleculares bacterianos es esencial para el diseño racional de nuevos tratamientos. Esto implica

estudiar los mecanismos de infección de patógenos, identificar proteínas esenciales como posibles sitios de acción e integrar compuestos capaces de interferir con dichos procesos, bloqueando o inhibiendo funciones vitales para la supervivencia microbiana.

La aproximación *in silico* se presenta como una herramienta poderosa para acelerar este proceso, ya que permite predecir y optimizar la interacción molecular antes de la síntesis física, reduciendo tiempos y costos. En este proyecto, se emplea *Pseudomonas aeruginosa* como modelo representativo de patógeno multirresistente, dada su elevada capacidad de adaptación y su relevancia clínica. No obstante, la metodología desarrollada será aplicable a otros microorganismos de interés en salud pública.

Finalmente, la presente investigación adquiere importancia al integrar conocimientos de biotecnología, química computacional y nanotecnología, con un enfoque multidisciplinario que responde a prioridades establecidas por organismos internacionales como la OMS. Además, promueve el desarrollo de tecnología nacional con potencial de transferencia y aplicación en el combate a la resistencia bacteriana.

5. Hipótesis

Los nanocompuestos formados por titanatos de hidrógeno y quitosano que transportan derivados de benzofuranos presentan una actividad antimicrobiana significativa contra *Pseudomonas aeruginosa*, debido a su capacidad de interacción eficiente con proteínas blanco del patógeno, lo que puede ser predicho y optimizado mediante aproximaciones *in silico*, facilitando su diseño racional como agentes terapéuticos frente a cepas multirresistentes.

6. Objetivos

Objetivo

Desarrollar, mediante simulaciones *in silico* y ensayos experimentales, nanocompuestos transportadores de compuestos heterocíclicos bioactivos basados en titanato de hidrógeno y quitosano, con el fin de evaluar su interacción con proteínas blanco de *Pseudomonas aeruginosa*, generando nanosistemas con potencial antimicrobiano frente a patógenos resistentes.

Objetivos específicos

Diseñar y optimizar, mediante simulaciones computacionales basadas en la teoría de funcionales de la densidad (DFT), moléculas heterocíclicas, nanoestructuras y biomateriales con potencial actividad antimicrobiana.

Analizar la sinergia entre compuestos heterocíclicos y nanocompuestos con proteínas blanco de *P. aeruginosa*, mediante estudios de acoplamiento molecular (Docking) fundamentados en principios de la mecánica clásica.

Sintetizar y caracterizar experimentalmente los nanocompuestos diseñados, con énfasis en la validación estructural, morfológica y fisicoquímica de los materiales obtenidos.

Evaluar la capacidad de carga, absorción y liberación de los compuestos heterocíclicos dentro del biomaterial formulado, determinando su eficacia como sistema de liberación controlada.

7. Métodos

En este capítulo se describen las metodologías empleadas para alcanzar los objetivos de la investigación, integrando enfoques computacionales y experimentales. La sesión computacional incluye la optimización geométrica, el análisis de funciones de Fukui, así como técnicas avanzadas de acoplamiento molecular y el modelado farmacofórico. Por otro lado, la metodología experimental contempla la síntesis de nanocompuestos con diferentes proporciones de quitosano, así como, su caracterización mediante técnicas espectroscópicas, difracción y microscopía, además de pruebas de adsorción y liberación, fundamentales para evaluar el desempeño del sistema desarrollado.

7.1. Metodología computacional

En esta sección se describen los métodos correspondientes al diseño computacional, cuyo objetivo es optimizar, identificar, acoplar y evaluar las propiedades de las moléculas propuestas en relación con los blancos objetivos de *P. aeruginosa*.

7.1.1. Optimización geométrica

Las estructuras moleculares fueron optimizadas, incluyendo las moléculas derivadas de benzofurano-isatinas y N-acilhidrazonas (ver figura A.1 y A2 en anexos), utilizando la teoría de funcionales de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés), mediante el software Gaussian (G09)(M. J. Frisch et al., 2016). Se empleo la aproximación de gradiente generalizado del funcional híbrido (M06-2x), propuesto por (Zhao & Truhlar, 2008), utilizando una base de Pople establecida con funciones polarizadas y difusas (6-31+g (d, p)). Las frecuencias de todas las moléculas optimizadas se calcularon para verificar que representan un mínimo en la superficie de energía potencial (**PES**, por sus siglas en inglés)(Rappoport & Furche, 2010).

7.1.2. Funciones condensadas de Fukui

Se utilizaron funciones condensadas de Fukui para calcular el índice de reactividad de las moléculas, así como para conocer los sitios reactivos (áreas donde las moléculas interactuarían más fácilmente con otra), ecuaciones 1-3. Estas funciones se basan en el formalismo del DFT conceptual (W. Yang et al., 1984); en el presente trabajo, los obtuvimos a partir del análisis de orbitales naturales (NBO, por sus siglas en inglés)(Fukui & Pullman, 1980; W. Yang et al., 1984). Con la finalidad de reducir tiempos de cómputo y establecer zonas estratégicas de interacción entre moléculas.

$$f_j f^+ \equiv qq_{jj}\,(NN+1) - qq_{jj}\,(NN) \quad \text{ecuación 1}$$

$$f_j f^{-} \equiv qq_{jj}(NN) - qq_{jj}(NN-1) \text{ ecuación 2}$$

$$f_{jj}^{0} \equiv \frac{[qq_{j\,j}(NN+1) - qq_{jj}(NN-1)]}{2} \text{ ecuación 3}$$

7.1.3. Acoplamiento molecular

Se utilizo el software Molegro Virtual Docker (MVD) (Bitencourt-Ferreira & de Azevedo, 2019), para el acoplamiento proteína-ligando. Las proteínas de interés se descargaron de la base de datos de proteínas PDB Protein Data Bank (por sus siglas en inglés), las moléculas de agua y los ligandos co-cristalizados se eliminaron en cada proteína, a excepción de su ligando de referencia para calibración y su cofactor responsable de su función catalítica. Como preparación para acoplamiento, los ligandos se optimizaron con Gaussian, posteriormente se asignaron cargas **Gasteiger** con el software Chimera (Pettersen EF, 2004). Respecto a la calibración de cada proteína, los valores de la raíz de la desviación cuadrática media (**RMSD**) deberán ser menores a 1 Å.

Se analizarán las interacciones de unión entre ligandos (moléculas estudiadas) y una diana macromolecular (típicamente proteínas), cuya estructura se conoce experimentalmente. La técnica consiste en localizar la unión más probable entre el ligando y el receptor con menor energía (cuanto menor sea la energía, más fuerte será la unión) y el sitio de unión molecular adecuado (Bitencourt-Ferreira & de Azevedo, 2019). Para la interpretación se evaluará, la eficiencia de ligando (**LE** por sus siglas en inglés), un parámetro que relaciona la afinidad del ligando con su tamaño molecular, y que permite comparar compuestos en términos de su eficiencia por átomo. También se analizarán las interacciones específicas que estabilizan el complejo ligando-receptor, tales como interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals (**VDW**), así como su contacto con aminoácidos mediante estas interacciones, entre otras. Estos parámetros son fundamentales para caracterizar la unión y el potencial terapéutico del compuesto evaluado.

Además, en este estudio, se analiza como el biomaterial a base de quitosano(QT) y el nano vector basado en titanato de hidrogeno (TNT), se introducen en el objetivo seleccionado, para comprender el mejor modo de unión de ambos compuestos al portar antibióticos. Se evalúa lo anterior acoplando primero el modelo de TNT, para luego asignarlo como un **"cofactor"** de la proteína (es decir, considerándolo como parte de la proteína) para que el software lo considerare parte del sistema completo. Después se acopla a QT, en dicho sistema proteína-TNT. Con ello, se puede corroborar cómo afecta la presencia de QT a este tipo de nano dispositivos y al aporte energético debido a la presencia de TNT.

Este proceso de convertir al NT en un "cofactor" también se aplicó a la molécula de QT, a la cual posteriormente se le acopló el TNT. Una vez formado el sistema proteína-TNT-QT o proteína-QT-TNT, se realizaron los acoplamientos moleculares (con los compuestos híbridos de benzofuranos) para evaluar el efecto del nanotransportador de tipo (TNT-QT o QT-TNT) sobre el blanco biológico de *P. aeruginosa*.

7.1.4. Modelo farmacofórico

Se propone un modelo de farmacofórico para cada diana estudiada, considerando las interacciones de acoplamiento. Este estudio se realizó utilizando el software ZincPharmer (Koes & Camacho, 2012). En el cual se carga la pose de uno de los ligandos, que presenten un mejor resultado de inhibición bacteriana describiendo las características de hidrofobicidad y sitios reactivos.

7.2.Metodología experimental

7.2.1. Síntesis de nanocompuesto (25,50 y 75% de QT)

Se preparó una solución básica disolviendo NaOH 10M en 100mL de agua destilada. En esta solución, se incorporaron los precursores de TiO_2 (P25) y quitosano de bajo peso molecular, en proporciones variables de quitosano (25%, 50% y 75% en peso) hasta lograr un peso total de 2 g. La mezcla se agito magnéticamente a 700 rpm con durante 10 minutos. Además, se realizaron síntesis individuales con 100% de titanatos de hidrógeno y 100% de quitosano, empleando cada componente como referencia. Posteriormente, la mezcla resultante se transfirió a un reactor de microondas y se sometió a las siguientes condiciones: 150 °C de temperatura,600rpm de agitación 195 W de potencia de durante 5 horas.

Una vez finalizada la síntesis, el nanocompuesto obtenido se lavó con agua destilada y se ajustó el pH a neutro utilizando HCl a 1M. El material sólido se separó utilizando una membrana de 0.45 um de Nylon, se secó a 70 °C durante 72 horas, y finalmente se pulverizó y almaceno para su uso posterior.

7.2.2. Caracterización

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La técnica se realizó en el espectrómetro IR-Tracer-100 Shimadzu en modo ATR. Las condiciones de análisis son en un rango de 400-4000 cm^{-1}, No. Escaneos 50 y una resolución de barrido en 4 cm^{-1}.

Difracción de rayos X (DRX)

Las fases cristalinas de los materiales sintetizados se caracterizaron mediante difracción de rayos X (DRX), utilizando un difractómetro equipado con radiación

Cu Kα (λ = 1.5406 Å), operando a 40 kV y 30 mA. El análisis se realizó en un rango de 2θ entre 5° y 70°, con una velocidad de barrido de 2°/min.

Los resultados se representaron como difractogramas, donde se identificaron las fases cristalinas mediante la comparación de los picos obtenidos con las tarjetas cristalográficas de referencia de la base de datos PDF (Powder Diffraction File) del Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD). La intensidad relativa de los planos cristalinos se graficó en función del ángulo 2θ, permitiendo así la asignación precisa de las fases presentes en los nanocompuestos analizados.

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

El análisis morfológico se llevó a cabo con el Microscopio Electrónico de Barrido Dual Beam (FIB/SEM) FEI-Helios Nanolab 600, en alto vacío y Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental ESEM FEI-QUANTA 200 a bajo vacío con detectores de electrones secundarios (SE) y retrodispersados (BSE).

Fisisorción de N_2 (BET)

Se determinó el área superficial y el volumen de poro en equipo de fisisorción Quantachrome modelo NOVA. El tiempo de desgasificación para todas las muestras fue de 18 horas a 150°C. Se analizaron 30 puntos en un rango de 0.005-0.999 en adsorción y 0.999 a 0.005 en desorción.

7.3.Pruebas de adsorción y liberación

Para los ensayos de adsorción y liberación, se seleccionaron dos compuestos representativos de cada una de las series evaluadas, los cuales fueron previamente diluidos en una solución hidroalcohólica al 80 % (etanol: agua) para mejorar la solubilidad de los compuestos.

Compuestos de la Serie I (benzofurano-isatina):

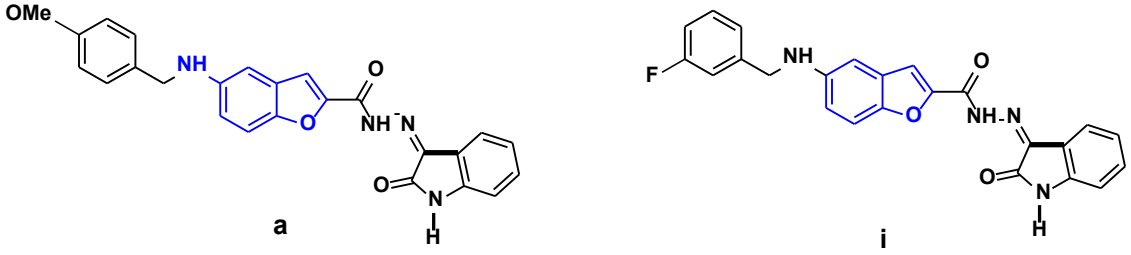


Figura 5 Estructuras químicas de los compuestos I-A ($C_{25}H_{22}N_4O_5$; 440.43 g/mol) e I-I ($C_{24}H_{17}N_4O_3F$; 428.41 g/mol). Ambos presentan núcleos aromáticos y heterocíclicos con sustituyentes polares y funcionales, relevantes para interacciones moleculares y posible actividad biológica.

Compuestos de la Serie II (benzofurano-N-acilhidrazona):

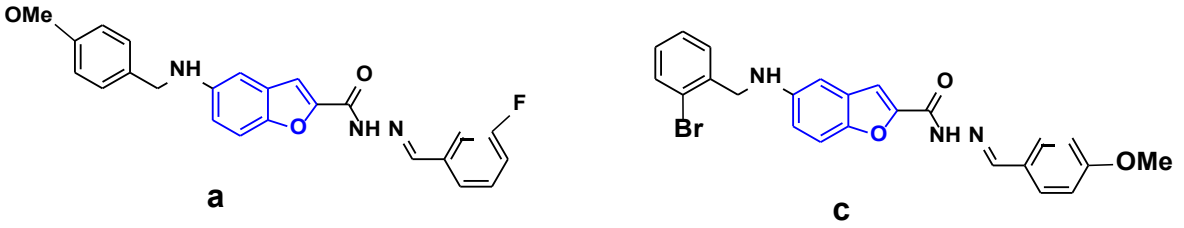


Figura 6 Estructuras químicas de los compuestos II-A ($C_{23}H_{19}BrN_3O_3$; 465.31 g/mol) y II-C ($C_{23}H_{19}ClN_3O_3$; 420.86 g/mol), derivados de benzofurano con núcleo de N-acilhidrazona. Ambos presentan sustituyentes halogenados (Br y Cl) que pueden modificar sus propiedades electrónicas y bioactividad potencial.

Los experimentos se realizaron empleando nanopartículas de titanatos de hidrógeno y quitosano (TQT-X%), con diferentes proporciones de quitosano (X = 25 %, 50 %, 75 %).

Preparación y medición por UV-Vis-NIR

La evaluación de la adsorción se efectuó mediante espectrofotometría UV-Vis-NIR, midiendo la absorbancia de las soluciones a una longitud de onda de 210 nm, que corresponde al máximo de absorción de los compuestos.

Para el estudio de liberación, las nanopartículas cargadas con los compuestos fueron suspendidas en una solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés), ajustada a un pH de 7.4. La liberación se monitoreó durante un periodo de 8 horas, realizando mediciones periódicas de la concentración liberada, también a 210 nm mediante UV-Vis-NIR.

Curva de calibración y cálculos

Para medir la concentración de los compuestos, se preparó una curva de calibración usando soluciones estándar de concentración conocida diluidas en el mismo solvente hidroalcohólico al 80 %. La absorbancia de cada estándar se midió a 210 nm y se graficó contra su concentración, utilizando la ecuación de la recta:

$$A = m \times C + b$$

En donde A es la absorbancia medida, C es la concentración del compuesto (mg/L), m es la pendiente de la curva (representa el cambio de absorbancia por unidad de concentración), y b es la ordenada al origen (absorbancia cuando la concentración es cero).

La concentración de los compuestos en las muestras de adsorción y liberación se calculó usando la ecuación inversa:

$$C = \frac{A - b}{mm}$$

El porcentaje de liberación en función del tiempo se determinó con la fórmula:

$$\% \, dddd \, LLLLLLddLLLLLLLLónn = \frac{CC_{tt}}{CC_0} \times 100$$

Donde C_t es la concentración liberada en el tiempo t y C_0 la concentración inicial adsorbida.

7.4.Alcances y Limitaciones

Alcances:

Esta investigación integró enfoques computacionales y experimentales para el diseño, síntesis y caracterización de nanocompuestos híbridos de titanato de hidrógeno y quitosano, con el propósito de evaluar su potencial como agentes antimicrobianos frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Mediante simulaciones *in silico*, se empleó la teoría del funcional de la densidad (DFT) para optimizar la estructura electrónica de compuestos heterocíclicos y biomateriales (Parr y Yang, 1989), así como técnicas de acoplamiento molecular (*docking*) para predecir la afinidad de interacción con proteínas blanco relevantes como Hfq, LpxC, RpoS y PepP. La selección de estas proteínas se fundamentó en estudios previos donde se demostró su implicación en mecanismos clave de patogenicidad y resistencia antimicrobiana (Sobke et al., 2022; Rajkumari et al., 2018).

Se sintetizaron nanocompuestos híbridos de titanato de hidrógeno y quitosano, y se caracterizaron experimentalmente mediante técnicas como espectroscopía infrarroja por reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (DRX) y análisis de fisisorción de nitrógeno (BET), lo cual permitió confirmar su estructura, morfología, cristalinidad y área superficial específica.

Se evaluó la capacidad de absorción y liberación de los compuestos bioactivos en los materiales obtenidos, observándose un comportamiento dependiente del porcentaje de quitosano en la matriz, lo que refuerza su potencial como sistema de liberación controlada.

Limitaciones:

El análisis se limitó a simulaciones computacionales y caracterización físico-química; no se realizaron ensayos *in vitro* ni estudios biológicos que permitieran validar experimentalmente la actividad antimicrobiana.

P. aeruginosa se empleó como modelo de bacteria multirresistente; sin embargo, los resultados deben validarse frente a otros patógenos clínicamente relevantes para confirmar su alcance terapéutico.

Las técnicas de caracterización empleadas permitieron describir aspectos estructurales y funcionales básicos; sin embargo, no se aplicaron otras herramientas complementarias como análisis térmico (TGA/DSC), espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) o espectroscopía Raman, que permitirían una caracterización profunda.

No se abordaron aspectos de biodisponibilidad, toxicidad o farmacocinética de los compuestos en sistemas biológicos, lo que será necesario para una futura validación preclínica y clínica.

8. Resultados: *in silico*

En esta sección se presentan los datos obtenidos mediante estudios *in silico*, enfocados en la evaluación estructural y funcional de compuestos derivados de benzofuranos y nanocompuestos, frente a posibles dianas terapéuticas de *Pseudomonas aeruginosa*. El capítulo comienza con los resultados de la optimización geométrica de las moléculas evaluadas y funciones condensadas de Fukui, etapa fundamental para asegurar la precisión en las simulaciones posteriores

A continuación, se describen los resultados del análisis de complemento molecular (Docking), en los que se identificaron las principales cavidades de interacción en proteína de blanco seleccionadas, tales como Hfq, LpxC, RpoS y pepP. Además, se analizan las interacciones moleculares entre los derivados de benzofurano (serie I y II) y estas proteínas, destacando las afinidades, los tipos de enlaces y los residuos clave involucrados en la unión. Finalmente, se propone un modelo farmacológico que resume las características estructurales esenciales para la actividad biológica de los compuestos más prometedores.

8.1. Optimización geométrica

Las moléculas estudiadas, incluyendo los híbridos de benzofurano con (isatina y N-acilhidrazonas), titanatos de hidrogeno, y quitosano fueron optimizadas siguiendo el método descrito en la sección de metodología computacional.

Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 4, y en la figura 7, se muestran los sitios reactivos de las primeras 6 moléculas diseñadas, además de quitosano (QS) y los híbridos de benzofuranos con isatinas (MOL-A a MOL-E). En este mapa, F^+ indica el sitio más adecuado para un ataque nucleófilo, F^- corresponde al sitio más adecuado para un ataque electrofílico, y F^0 señala el sitio más adecuado para un ataque por radical. Las zonas más susceptibles de ataques electrofílicos, nucleofílicos y radicales fueron determinadas utilizando las funciones condensadas de Fukui (F).

Tabla 4 Índices de reactividad

Compuesto	F^0		F^-		F^+	
QT	N_{44}	0.45	H_{56}	0.257	C_4	0.033
	N_{26}	0.446	H_{61}	0.257	H_{60}	0.008
	N_8	0.446	H_{64}	0.256	C_{28}	0.007
	O_{27}	0.402	H_{69}	0.248	H_{56}	0.007
	O_{45}	0.401	H_{59}	0.245	C_2	0.003
MOL-A	C_{18}	0.022	C_{29}	0.337	C_{20}	0.277

	C_{26}	0.015	C_{20}	0.331	C_{29}	0.256
	N_{21}	0.008	H_{24}	0.229	H_{24}	0.220
	C_{13}	0.007	H_{31}	0.222	H_{31}	0.201
	C_4	0.001	H_{11}	0.188	H_{11}	0.186
MOL-B	C_{17}	0.022	C_{28}	0.337	C_{19}	0.282
	C_{25}	0.015	C_{19}	0.336	C_{28}	0.256
	N_{20}	0.008	H_{23}	0.229	H_{23}	0.220
	C_{12}	0.007	H_{30}	0.222	C_5	0.202
	C_4	0.001	C_5	0.202	H_{30}	0.201
MOL-C	C_{17}	0.022	C_{28}	0.337	C_{19}	0.282
	C_{25}	0.014	C_{19}	0.336	C_{28}	0.256
	N_{20}	0.008	H_{23}	0.229	H_{23}	0.220
	C_{12}	0.007	H_{30}	0.222	H_{30}	0.202
	C_4	0.001	H_{10}	0.187	H_{10}	0.186
MOL-D	C_{17}	0.022	C_{28}	0.337	C_{19}	0.282
	C_{25}	0.015	C_{19}	0.336	C_{28}	0.257
	N_{20}	0.009	H_{23}	0.229	H_{23}	0.220
	C_{12}	0.007	H_{30}	0.222	H_{30}	0.201
	C_4	0.001	H_{10}	0.187	H_{10}	0.185
MOL-E	C_{17}	0.022	C_7	0.036	C_7	0.036
	C_{25}	0.015	C_4	0.017	C_{25}	0.017
	N_{20}	0.008	C_{12}	0.008	C_4	0.017
	C_{12}	0.007	C_{25}	0.002	C_{12}	0.014
	C_4	0.001	N_{22}	0.002	N_{20}	0.005

Los resultados obtenidos para el quitosano muestran que el átomo N_{44} presenta un ataque radical con un valor de 0.449, mientras que en el átomo H_{56} es más susceptible a un ataque electrofílico con un valor de 0.257. En el átomo C_4, la zona nucleofílica presenta un valor de 0.033, indicando la presencia de una región nucleofílica activa. Esto sugiere que el quitosano tiene zonas de electrones de valencia no apareados, altamente reactivas desde el punto de vista químico.

En cuanto a los híbridos de benzofuranos con isatina, MOL-A presenta un comportamiento electrofílico en el átomo C_{29} con un valor de 0.336 y nucleofílico en $C_{20,}$con un valor de 0.277, mientras que en el aspecto de un ataque radicalario es más baja, con un valor de 0.021. Para los compuestos MOL-B a MOL-E, los sitios reactivos se localizan principalmente en los átomos C_{28} y C_{19}, con valores de 0.337 y 0.282, respectivamente, para ataques electrofílicos (F^-) y nucleofílicos (F^+). El ataque radicalario es mínimo para todas estas moléculas , con un valor de 0.021.

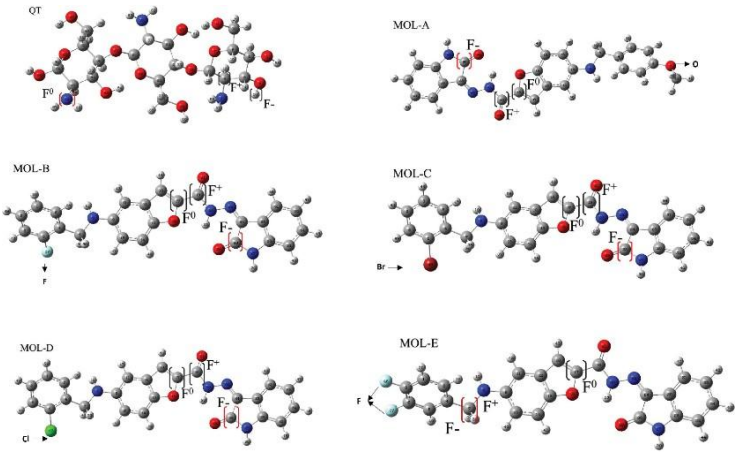


Figura 7 Sitios reactivos detectados con funciones condensadas de Fukui

La molécula A tiende a reaccionar con los radicales libres en el átomo C_{29}. Esta zona corresponde a la estructura de la isatina en la posición 2 con un grupo carbonilo secundario. El ataque nucleofílico ocurre en la posición C_{20} para esta molécula, correspondiente al carbonilo secundario unido a isatina y benzofurano. Este comportamiento es similar en moléculas (B-D).

8.2.Docking molecular

En los últimos años, el reposicionamiento de antibióticos se ha convertido en una estrategia clave para enfrentar la creciente amenaza de la resistencia antimicrobiana. En este contexto, el acoplamiento molecular (docking) se utiliza como una herramienta computacional eficaz para para evaluar de forma oportuna compuestos con potencial terapéutico. Entre estos, destacan los híbridos de benzofuranos, antes descritos, por sus propiedades bioactivas y su potencial como agentes antimicrobianos.

Asimismo, el uso de nanopartículas, basados en quitosano y titanatos de hidrogeno , ha demostrado mejorar la eficiencia de antibióticos existentes mediante la optimización de su liberación, estabilidad y biodisponibilidad (Shah et al. 2019). Gracias a su tamaño nanométrico, estas estructuras pueden modificar la farmacocinética y facilitar una entrega dirigida, incluso a sitios de difícil acceso, como tejidos infectados o biofilms bacterianos (Ołdak and Trafny 2005).

8.2.1. Pseudomona Aeruginosa

Para comenzar el análisis primero se obtuvieron las coordenadas cartesianas de los blancos biológicos (Hfq, LpxC, pepP y RpoS), con códigos PDB: 5WZE,7VF9,5I21 y 4J3D, respectivamente. Después se prepararon las proteínas y se analizaron las cavidades disponibles según la metodología planteada anteriormente, sección métodos 3.1.3.

8.2.2. Descripción de cavidades objetivo

Para comprender la viabilidad de estos compuestos y nanotransportadores en interacción con el blanco terapéutico, es fundamental analizar las cavidades disponibles en las proteínas objetivos. Estas regiones son esenciales para identificar sitios de unión potenciales, predecir la afinidad de los ligandos y diseñar estrategias de interacción más efectivas. Los resultados se describen a continuación:

En pepP (PDB:5WZE), se identificaron tres cavidades relevantes, con base en sus superficies hidrofóbicas y la presencia de aminoácidos capaces de interactuar el ligando de referencia (ALA_505) y el cofactor catalítico (Mg^{2+}). En la figura 8, se muestran dichas cavidades, las cuales fueron detectadas mediante atracciones Van der Waals. Los volúmenes calculados para estas superficies son de 7947. 780, 119.800 y 75.776 $Å^3$, respectivamente.

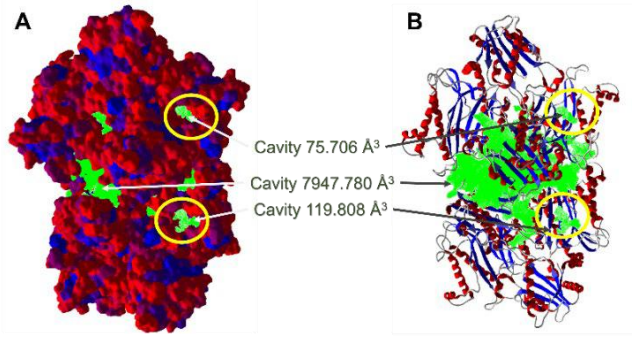


Figura 8 Cavidades en proteína pepP código PDB: 5WZE: A) Superficies de hidrofobicidad y B) Estructura secundaría.

Para la proteína RpoS (PDB:7VF9), las cavidades detectadas, están en función de sus superficies hidrofóbicas y aminoácidos, así como los cofactores (Zn^{2+}) y (Mg^{2+}), responsables de su función catalítica. En la figura 9, se representan las tres cavidades analizadas para RpoS, detectadas mediante atracciones Van der Waals. El volumen de cada superficie es de 305.660, 432.120 y 2322.940 $Å^3$.

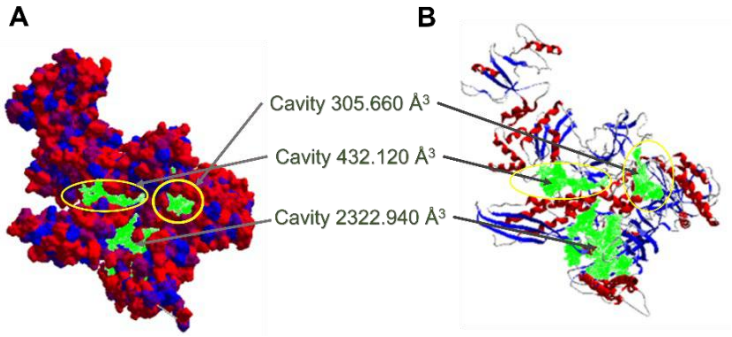


Figura 9 Cavidades en proteína RpoS: A) Superficies de hidrofobicidad y B) Estructura secundaría.

Para la enzima LpxC, las cavidades detectadas, están en función de sus superficies hidrofóbicas y aminoácidos, así como de su cofactor (Zn^{2+}), responsable de la función catalítica. En la figura 10, se representan las dos cavidades, detectadas mediante atracciones Van der Waals. El volumen de cada superficie es de 145.408 y 289.792 $Å^3$.

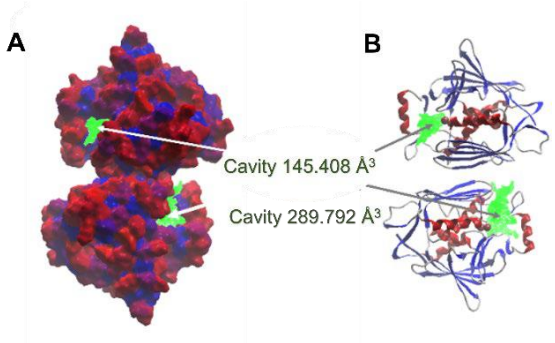


Figura 10 Cavidades en proteína LpxC: A) Superficies de hidrofobicidad y B) Estructura secundaría

La proteína Hfq, la cavidad objetivo, están en función de sus superficies hidrofóbicas y aminoácidos, así su como de cofactor (Cl^-). En la figura 11, se representa la cavidad, detectada mediante atracciones Van der Waals. El volumen de la superficie es de 25.600 $Å^3$.

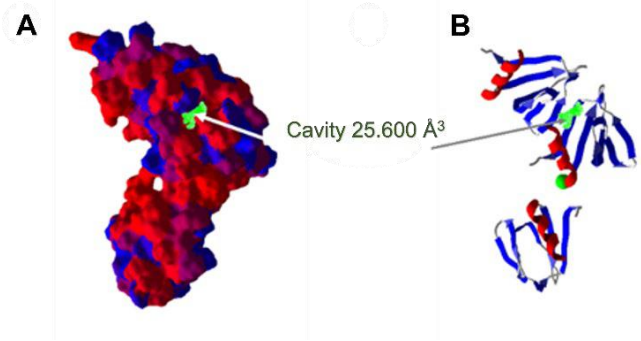


Figura 11 Cavidades en proteína Hfq: A)Superficies de hidrofobicidad y B) Estructura secundaría

8.2.3. Acoplamiento molecular con derivados de Benzofurano(serie I y II)

A continuación, se presenta un gráfico de barras y la tabla correspondiente a la eficiencia del ligando, en kcal/mol. Estos datos reflejan la interacción y el desempeño de los derivados de benzofurano en las distintas regiones de la proteína.

Para la proteína pepP, ver figura 12, los ligandos con mayor eficiencia son: II-A (-5.071 kcal/mol) para la cavidad 7947.780 Å^3, II-A (-5.501 kcal/mol) en la cavidad 119.808 Å^3 y II-J (-5.470 kcal/mol) en la cavidad 75.706 Å^3. En cuanto a la cavidad, la mayor eficiencia del ligando se observa en la cavidad 75.706 Å^3, donde los ligandos I-G (-5.097 kcal/mol), I-I (-5.111 kcal/mol), I-J (-5.026 kcal/mol) y II-A (-5.343 kcal/mol), II-F (-5.141 kcal/mol) y II-J (-5.470 kcal/mol) presentan los valores más negativos de energía de unión.

	Proteína pepP- PDB:5WZE		
Ligando	Cavidad 7947.780 Å^3	Cavidad 119.808 Å^3	Cavidad 75.706 Å^3
I-A	-4.797	-4.671	-4.845
I-B	-4.640	-4.777	-4.923
I-C	-4.798	-4.692	-4.993
I-D	-4.684	-4.847	-4.919
I-E	-4.787	-4.785	-4.897
I-F	-4.751	-5.074	-4.844
I-G	-4.864	-4.973	-5.097
I-H	-4.357	-4.210	-4.379
I-I	-4.539	-4.954	-5.111
I-J	-4.701	-5.115	-5.026
II-A	-5.071	-5.501	-5.343
II-B	-4.468	-4.662	-4.800
II-C	-4.974	-4.901	-4.914
II-D	-4.744	-4.846	-4.926
II-E	-4.513	-4.700	-4.988
II-F	-4.646	-4.977	-5.141
II-G	-4.375	-4.992	-4.824
II-H	-4.081	-4.127	-4.110
II-I	-4.862	-4.821	-4.807
II-J	-4.445	-4.921	-5.470

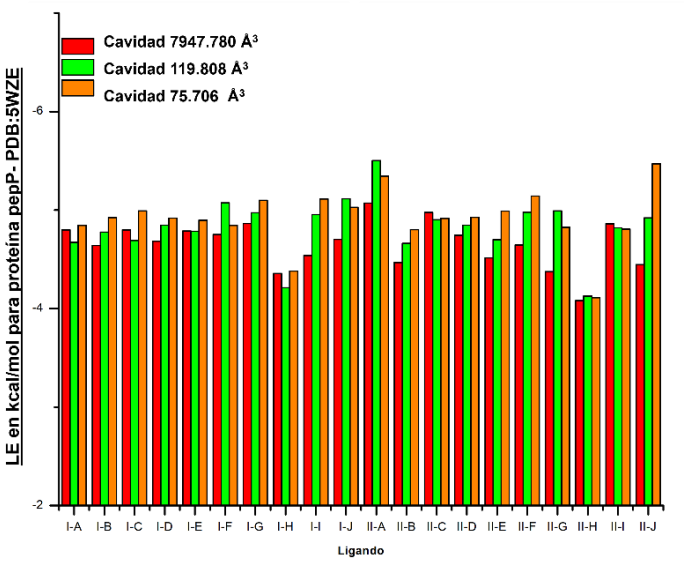


Figura 12 Eficiencia del ligando, en kcal/mol, para la proteína pepP.

Para la proteína RpoS, ver figura 13, los ligandos con mayor eficiencia son: I-I (-5.558 kcal/mol) para la cavidad 2322.940 Å^3, II-F (-5.761 kcal/mol) en la cavidad 432.128 Å^3 y II-F (-5.265 kcal/mol) en la cavidad 305.664 Å^3. En cuanto a la cavidad, con volumen de 432.128 Å^3, se observa la mayor eficiencia de ligandos con valores de unión mayores a -5.000 kcal/mol, excepto I-H (-4.939 kcal/mol) y II-H (-4.939 kcal/mol). Los ligandos con mayor eficiencia para esta cavidad son; II-A (-5.643 kcal/mol), II-E (-5.719 kcal/mol), II-F (-5.761 kcal/mol),y II-G (-5.686 kcal/mol).

Ligando	Proteína RpoS- PDB:7VF9		
	Cavidad 2322.94 Å^3	Cavidad 432.128 Å^3	Cavidad 305.664 Å^3
I-A	-5.247	-5.398	-4.752
I-B	-4.716	-5.302	-4.888
I-C	-4.830	-5.416	-4.900
I-D	-5.106	-5.397	-4.941
I-E	-5.043	-5.305	-4.625
I-F	-5.234	-5.550	-5.010
I-G	-5.443	-5.538	-4.744
I-H	-4.292	-4.939	-4.242
I-I	-5.558	-5.283	-4.933
I-J	-5.012	-5.454	-4.910
II-A	-5.174	-5.643	-5.115
II-B	-4.875	-5.436	-4.895
II-C	-4.708	-5.457	-4.973
II-D	-4.929	-5.390	-4.858
II-E	-4.993	-5.719	-5.110
II-F	-5.084	-5.761	-5.265
II-G	-5.024	-5.686	-5.204
II-H	-4.244	-4.973	-4.444
II-I	-4.986	-5.463	-5.254
II-J	-5.091	-5.636	-5.193

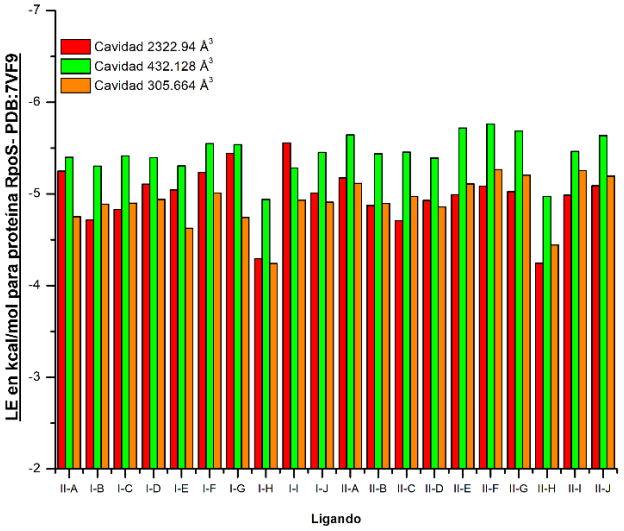


Figura 13 Eficiencia del ligando, en kcal/mol, para la proteína RpoS.

Para la proteína LpxC, ver figura 14, los ligandos con mayor eficiencia de unión a la proteína en cada cavidad son: I-I (-5.311 kcal/mol) para la cavidad 145.408 Å^3, y I-D (-4.373 kcal/mol) en la cavidad 289.792 Å^3. En cuanto a la cavidad, la mayor eficiencia se observa en la cavidad 145.408 Å^3, en donde todos los ligandos de la serie I excepto I-H (-4.457 kcal/mol) y II-H (-4.939 kcal/mol), presentan valores de unión mayores a -5.000 kcal/mol. Siendo I-F (-5.643 kcal/mol), II-E (-5.719 kcal/mol), II-F (-5.761 kcal/mol), y II-G (-5.686 kcal/mol), los de mayor eficiencia de unión.

Ligando	Proteína LpxC- PDB:4J3D	
	Cavidad 145.408 Å3	Cavidad 289.792 Å3
I-A	-5.033	-4.326
I-B	-5.128	-4.303
I-C	-5.261	-4.329
I-D	-5.220	-4.373
I-E	-5.014	-4.183
I-F	-5.114	-4.409
I-G	-5.268	-4.234
I-H	-4.457	-3.768
I-I	-5.311	-4.385
I-J	-5.290	-4.365
II-A	-4.171	-4.152
II-B	-4.181	-4.158
II-C	-4.178	-4.145
II-D	-4.255	-4.151
II-E	-4.233	-4.061
II-F	-4.106	-4.109
II-G	-4.260	-4.281
II-H	-3.747	-3.816
II-I	-4.206	-4.201
II-J	-4.353	-4.280

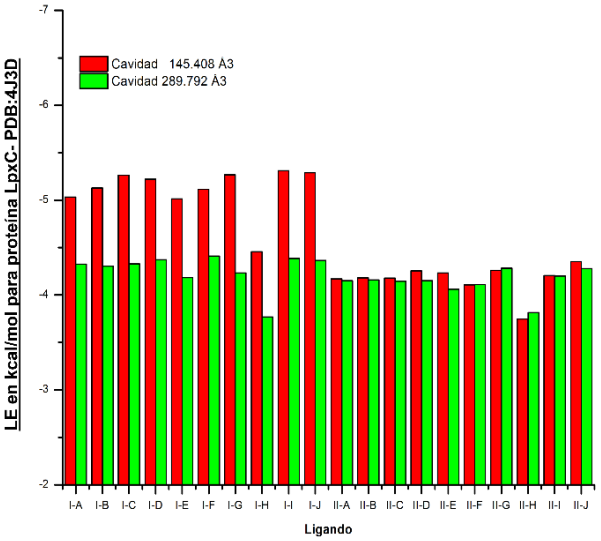


Figura 14 Eficiencia del ligando, en kcal/mol, para la proteína LpxC.

Para la proteína Hfq, ver figura 15, solo dispone de una cavidad con 25.600 Å^3 ,los ligandos con mayor eficiencia de unión a la proteína en cada cavidad son: II-A(-4.840), II-B (-4.667) y II-G (-4.601), presentan valores de unión mayores a -4.600 kcal/mol.

Ligando	Proteína Hfq- PDB:5I21
	Cavidad 145.408 Å^3
I-A	-4.104
I-B	-4.117
I-C	-4.233
I-D	-4.209
I-E	-4.107
I-F	-4.209
I-G	-4.103
I-H	-3.574
I-I	-4.128
I-J	-4.113
II-A	-4.840
II-B	-4.667
II-C	-4.590
II-D	-4.578
II-E	-4.541
II-F	-4.587
II-G	-4.601
II-H	-3.733
II-I	-4.423
II-J	-4.560

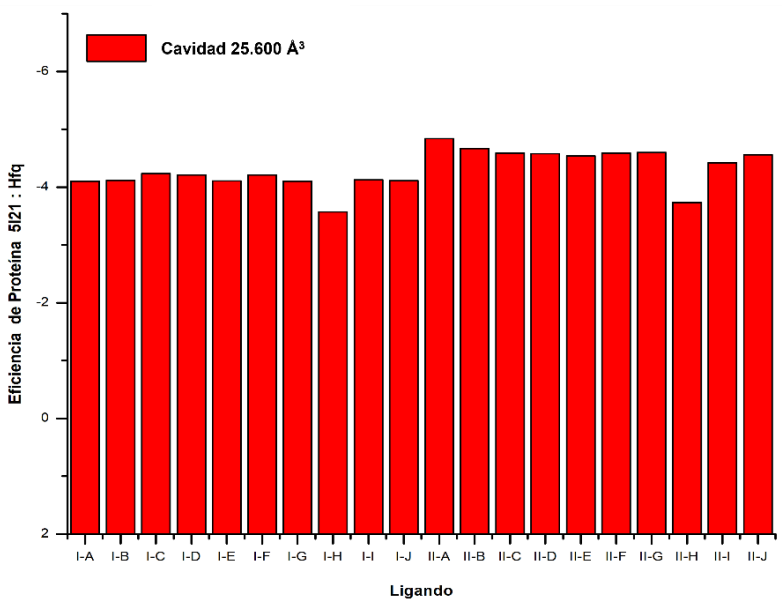


Figura 15 Eficiencia del ligando, en kcal/mol, para la proteína Hfq.

Los resultados del acoplamiento molecular con derivados de benzofurano (serie y II) revelan que los ligandos de la serie II, en especial II-A,II-F II-J, presentaron una mayor eficiencia de unión, con valores de LE más negativos en diversas cavidades de las proteínas evaluadas (pepP, RpoS, LpxC y Hfq). Las cavidades de volumen 75.706 Å³ en PepP y 432.128 Å³ en RpoS, mostraron ser las más favorables para la interacción ligando-proteína. La serie I también demostró eficacia en ciertas cavidades, particularmente en los ligandos como I-I y I-F. En general, se observó que la afinidad de los ligandos está relacionada con la geometría de las cavidades, siendo las de menor volumen las que permiten interacciones más estables.

8.2.4. Titanatos de Hidrógeno y Quitosano en la unión ligando-proteína

En esta sección se explora cómo dos materiales bioactivos, los titanatos de hidrógeno y el quitosano, influyen en la interacción entre proteínas y ligandos al actuar como cofactores de cada proteína. Se analiza su impacto en la afinidad de unión y se comparan los resultados con los obtenidos por ligandos diseñados y fármacos comerciales. El estudio se centra en las cuatro proteínas bacterianas antes descritas: Hfq, LPXC, RpoS y pepP, involucradas en procesos esenciales como la regulación genética, la síntesis de lípidos y el metabolismo de proteínas.

Se evalúan los cambios en la energía de interacción al incorporar estos cofactores, con el fin de determinar si mejoran la eficacia de los ligandos de la serie I y si existe una posible sinergia con otros compuestos bioactivos. Los resultados permiten comparar directamente el desempeño de los derivados funcionalizados frente a medicamentos convencionales, ofreciendo una perspectiva más amplia sobre su potencial terapéutico.

Para cada interacción se muestra el acoplamiento de todas las moléculas analizadas como ligandos: Serie I (A-J), moléculas de referencia de benzofuranos (BRA Y BRB)de (Budhwani et al., 2017) e isatinas (IRA y IRB)de (Zhang et al., 2020), los cofactores QT, TNT y las estructuras moleculares de fármacos comerciales ciprofloxacino y azitromicina (C-CIP Y C-AZI). Además, se describen las interacciones con el sistema de cofactores antes descrito y la influencia en su acoplamiento.

8.2.4.1. Interacciones con la proteína Hfq.

La Figura 16 muestra el acoplamiento de todas las moléculas analizadas con la proteína Hfq. Además, la Tabla 5 resume la eficiencia de unión de todos los ligandos. En la segunda columna de la tabla se muestra la eficiencia del ligando con relación a la proteína Hfq libre. La tercera columna refleja la eficiencia con el sistema proteína-cofactor(TNT) vinculado, es decir, en el acoplamiento entra la proteína Hfq y TNT antes de introducir las moléculas estudiadas. De la columna cuatro a la seis, se denota la influencia de QT, TNT-QT y QT-TNT cuando están acopladas al blanco.

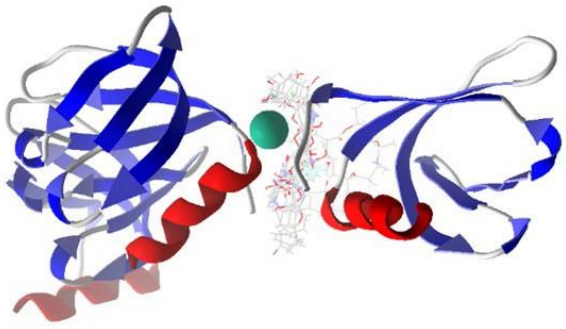


Figura 16 Acoplamiento de moléculas estudiadas en proteína Hfq.

En este orden, la Tabla 5 muestra que cuando se introduce QT en la proteína, ver columna cuatro, la eficiencia del ligando de los sistemas es mayor, lo que significa una menor interacción ligando-blanco. Sin embargo, cuando el QT se acopla primero en la proteína y después de que el TNT se introduce en el sistema proteína-TNT, ver columna seis, LE es más alto, lo que representa una interacción baja entre el ligando-blanco como se muestra en la columna cinco. Lo mismo ocurre cuando TNT se acopla primero y después de que QT se introduce en el sistema proteína-QT.

Tabla 5 Eficiencia del ligando (kcal/mol) para la proteína Hfq.

Nombre	Blanco	Blanco-TNT	Blanco-QT	Blanco-TNT-QT	Blanco-QT-TNT
BRA	-5.443	-5.234	-4.783	-3.868	-4.083
BRB	-5.138	-5.166	-4.340	-3.892	-4.355
C-AZI	-2.126	-2.088	-2.055	-1.703	-1.882
C-CIP	-3.744	-4.318	-3.830	-2.699	-3.670
IRA	-4.676	-5.051	-3.760	-3.116	-4.377
IRB	-5.317	-5.079	-4.403	-3.081	-4.369
I-A	-4.265	-4.067	-3.180	-3.117	-3.039
I-B	-4.123	-3.902	-3.328	-3.204	-3.079
I-C	-4.229	-3.919	-3.475	-3.406	-3.182
I-D	-4.211	-3.930	-3.473	-3.301	-2.949
I-E	-4.102	-4.321	-3.192	-3.165	-2.993
I-F	-4.127	-4.054	-3.327	-3.540	-3.081
I-G	-4.107	-4.045	-3.537	-3.571	-3.100
I-H	-3.690	-3.310	-2.678	-2.742	-2.679
I-I	-4.153	-4.078	-3.525	-3.538	-3.248
I-J	-4.102	-4.084	-3.446	-3.475	-3.284
TNT	-4.010	-	-4.121	-	-
QT	-3.454	-3.307	-	-	-

La Tabla 6 muestra las principales energías de interacción para el acoplamiento blanco-TNT. La molécula de la serie I-E, interactúa mejor que las otras moléculas con el cofactor NT con una LE final obtenida de -4.321 kcal/mol. En esta interacción no se observan interacciones por puentes de hidrogeno con el cofactor, además las VdW equivalen a -0.182 kcal/mol y las electrostáticas a -0.003 kcal/mol, estos valores son menores a los que presentan las demás estructuras.

Para C-CIP, este comportamiento energético también mejora la LE de -3.744 a -4.318 kcal/mol. Aunque en este caso si se presenta interacciones por puentes de hidrogeno con un valor energético de -3.900 kcal/mol. Las interacciones electrostáticas, así como las VdW se mantienen por debajo de las -2.000 kcal/mol.

La influencia de introducir el primer TNT en el blanco Hfq es beneficiosa para la interacción ligando-blanco, como con BRB, C-CIP, IRA e I-E, que LE disminuye, lo que significa una mejor interacción ligando-blanco.

Tabla 6 Energías de interacción con el sistema Hfq-TNT

Nombre	VdW	Electro	H bond	LE
C-AZI	-0.583	4.823	0.000	-2.088
QT	-1.041	-0.666	-7.032	-3.307
I-H	-1.936	-1.714	-7.976	-3.310
I-B	-2.333	-2.156	-5.590	-3.902
I-C	-2.270	-2.118	-5.668	-3.919
I-D	-2.092	-2.266	-7.381	-3.930
I-G	-2.250	-2.100	-5.966	-4.045
I-F	-2.129	-1.991	-7.209	-4.054
I-A	-2.058	-2.129	-7.354	-4.067
I-I	-2.260	-2.123	-3.981	-4.078
I-J	-0.173	-0.256	0.000	-4.084
C-CIP	-1.957	-1.214	-3.900	-4.318
I-E	-0.182	-0.003	0.000	-4.321
IRA	-0.634	-1.643	-5.000	-5.051
IRB	1.421	-1.135	-9.374	-5.079
BRB	-1.416	1.172	0.000	-5.166
BRA	-1.924	-0.219	-2.500	-5.234

* H bond significa las interacciones de enlace de hidrógeno, electro son las interacciones electrostáticas, VdW es la energía de Van der Waals, y LE es la eficiencia del ligando (LE = E / No átomos pesados).

En la figura 17A, se muestra las interacciones de enlace de hidrógeno entre I-E y Hfq-TNT (blanco-TNT), y la figura 17B muestra las interacciones electrostáticas. A pesar de que I-E no presenta una mejor interacción que las moléculas de referencia, BRA, BRB, IRA, e IRB, cuando se acopla con la presencia de TNT (Tabla 2, segunda columna), su eficiencia de ligando se incrementa por la influencia de TNT con mayores interacciones atractivas.

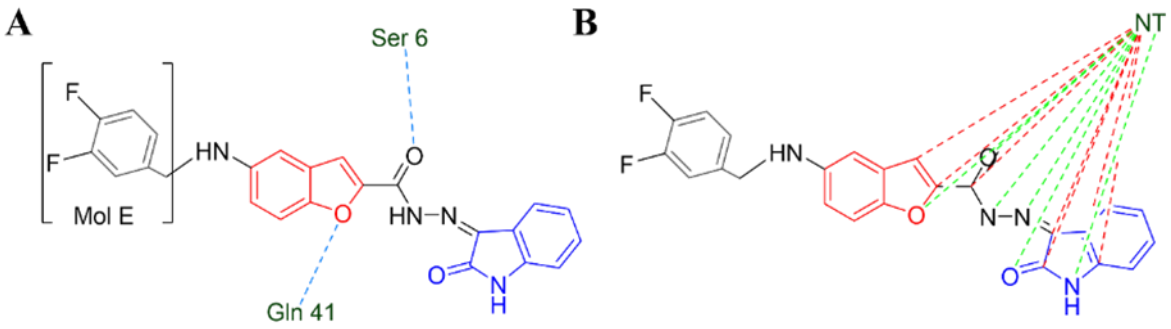


Figura 17 Interacción de la I-E con el sistema Hfq-NT (Blanco-NT). A) Enlaces H, y B) interacciones electrostáticas. Las líneas punteadas azules representan las interacciones por puentes de hidrógeno, para las interacciones electrostáticas, las líneas punteadas verdes son las atractivas y las líneas punteadas rojas son las repulsivas.

Las interacciones ligando-blanco superan los valores de los fármacos comerciales (C-AZI y C-CIP), con un valor de -4,321 kcal/mol. En cuanto a los resultados de la Tabla 6 y analizando las estructuras representadas en la (Figura A.1 Serie I),I-E presenta dos átomos de flúor sustituyendo la posición 1,2 de benceno, confiriendo esta posible mejor interacción. Tenga en cuenta que I-E interactúa específicamente con los residuos de Ser 6 y Gln 41 en términos de interacciones de enlaces de hidrógeno, consulte la figura 18A. En el caso de las interacciones electrostáticas, la Figura 18B muestra que el TNT promueve interacciones electrostáticas más atractivas con I-E, estableciendo además un mayor número de contactos con los átomos de oxígenos de la molécula.

En el caso de las superficies hidrofóbicas, se analizaron las moléculas I-A en el Hfq, ver Figura 18A, y la I-E en el sistema Hfq-TNT, ver Figura 18B.

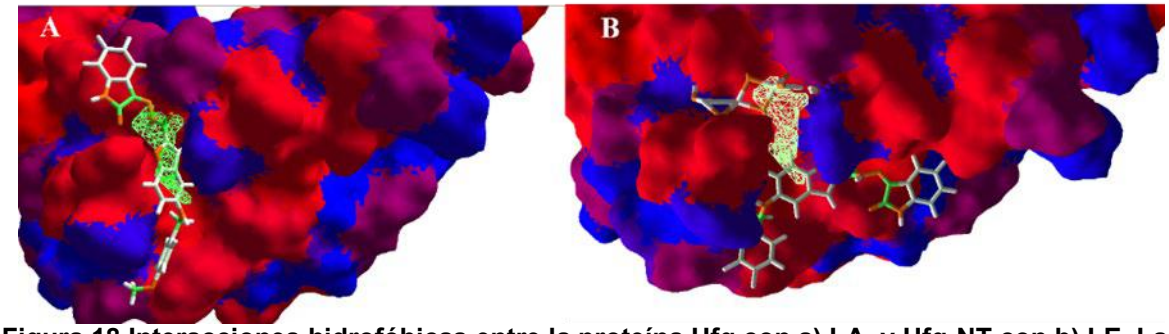


Figura 18 Interacciones hidrofóbicas entre la proteína Hfq con a) I-A, y Hfq-NT con b) I-E. Las superficies azules representan sitios hidrófobos, y las superficies rojas son zonas hidrófilas.

En cuanto a las interacciones hidrofóbicas, la molécula de diseño libre (I-A) se introduce en la cavidad, interactuando más con la zona hidrófila de I-A con las superficies hidrófilas de Hfq. En el caso de I-E (acoplado en el sistema Hfq-TNT), el TNT se introduce en el fondo de la cavidad, interactuando con una superficie

hidrófila de Hfq. Esta primera interacción promueve la molécula diseñada (I-E) fuera de la cavidad, específicamente en una superficie hidrófila (Figura 18B).

8.2.4.2. Interacciones con la proteína LPXC

Para la proteína LpxC, los valores de eficiencia se muestran en la Tabla 7. Se demuestra que la influencia de TNT es similar que con la proteína Hfq, en donde promueve un LE más alto en las moléculas BRA, I-A,I-B, I-C, I-E, I-F, I-G, I-J y QT que las moléculas diseñadas acopladas en el blanco libre (LpxC), ver Tabla 7 columna dos y tres.

Tabla 7 Eficiencia del ligando (kcal/mol), para la proteína LpxC

Nombre	Blanco	Blanco -TNT	Blanco-QT	Blanco-TNT-QT	Blanco -QT-TNT
BRA	-4.709	-4.919	-5.169	-5.107	-5.284
BRB	-4.834	-4.825	-4.847	-5.263	-4.664
C-AZI	-2.717	-2.487	-2.332	-2.526	-2.519
C-CIP	-4.273	-4.272	-3.838	-4.251	-4.155
IRA	-5.116	-4.868	-4.833	-4.745	-4.915
IRB	-5.101	-4.665	-4.787	-4.776	-4.745
JS_303	-4.794	-4.693	-4.460	-4.502	-3.921
I-A	-4.378	-4.635	-4.215	-4.645	-4.433
I-B	-4.638	-4.815	-4.322	-4.368	-4.067
I-C	-4.867	-4.903	-4.567	-4.563	-4.370
I-D	-4.883	-4.819	-4.403	-4.263	-4.320
I-E	-4.345	-4.491	-4.029	-4.407	-4.296
I-F	-4.399	-4.804	-4.390	-4.537	-4.441
I-G	-4.833	-4.863	-4.115	-4.543	-4.466
I-H	-4.061	-3.825	-3.700	-3.879	-3.681
I-I	-4.941	-4.831	-4.480	-4.508	-4.470
I-J	-4.836	-4.908	-4.418	-4.590	-4.211
TNT	-5.622	NA	-5.545	NA	NA
QT	-3.042	-3.363	NA	NA	NA

Analizando las interacciones específicas de las moléculas estudiadas con el LpxC-TNT (Tabla 8), el comportamiento es similar al de la proteína Hfq, las interacciones VdW, Electro, H bond, con el ligando-blanco completo, no son determinantes.

Tabla 8 Eficiencia del ligando (kcal/mol) para el sistema LpxC-NT

Nombre	VdW	Electro	H bond	LE
C-AZI	-0.424	12.283	0.000	-2.487
QT	-0.006	-0.323	0.000	-3.363
I-H	-0.003	-0.136	0.000	-3.825
C-CIP	-0.001	-1.088	0.000	-4.272
I-E	0.000	2.978	0.000	-4.491
I-A	-0.004	1.448	0.000	-4.635
IRB	0.000	0.219	0.000	-4.665
JS_303	-0.005	0.000	0.000	-4.693
I-F	-0.002	1.790	0.000	-4.804
I-B	-0.001	1.734	0.000	-4.815
I-D	-0.002	0.951	0.000	-4.819
BRB	0.000	0.232	0.000	-4.825
I-I	-0.001	1.607	0.000	-4.831
I-G	-0.002	1.368	0.000	-4.863
IRA	0.000	-1.603	0.000	-4.868
I-C	-0.001	1.184	0.000	-4.903
I-J	-0.001	0.788	0.000	-4.907
BRA	-0.003	-0.696	0.000	-4.919

Nótese en el caso del docking en LpxC, que el ligando con LE más alto es el I-I (LE de -4.941 kcal/mol), y en el caso del sistema LpxC-TNT, es I-I (LE de -4.908 kcal/mol). Lo anterior significa que la influencia del NT en el blanco es favorable a la interacción ligando-blanco. Teniendo en cuenta la estructura de I-J, ver figura A.1, no contiene grupos alógenos sustituyentes, esta modificación influye en el incremento de la LE. Las interacciones por puentes de hidrógeno y electrostáticas son determinantes, en la Figura 19A se muestra que Met 62 y Gly 192 interactúan a través de puentes de H con I-J, y el cofactor Zn+, influye en interacciones electrostáticas de I-J, ver Figura 19B.

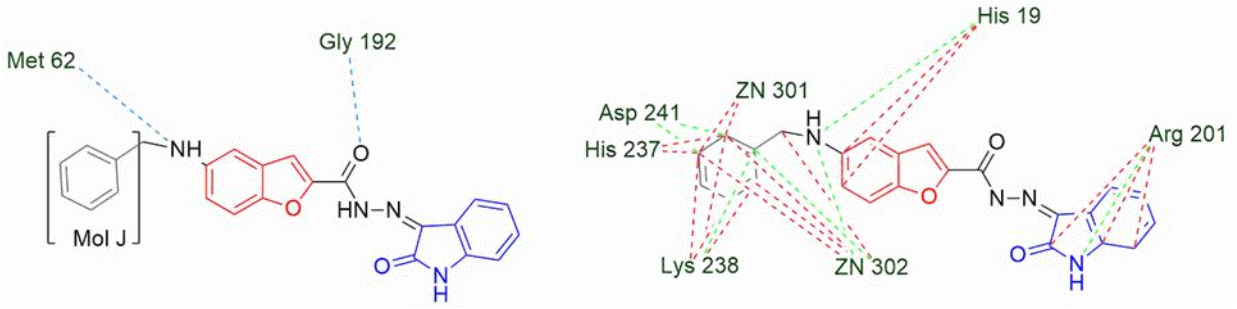


Figura 19 Interacción de I-J, con el sistema LpxC-TNT (Blanco-TNT). A) Enlaces H, y B) interacciones electrostáticas. Las líneas punteadas azules representan las interacciones de H bond, para interacciones electrostáticas, las líneas punteadas verdes son las atractivas y las líneas punteadas rojas son las repulsivas.

Además, analizando las superficies hidrofóbicas de LpxC, la Figura 20A muestra a la molécula I-I acoplado en la cavidad principal libre de LpxC, y la Figura 20B muestra la interacción de I-J con el sistema LpxC-TNT.

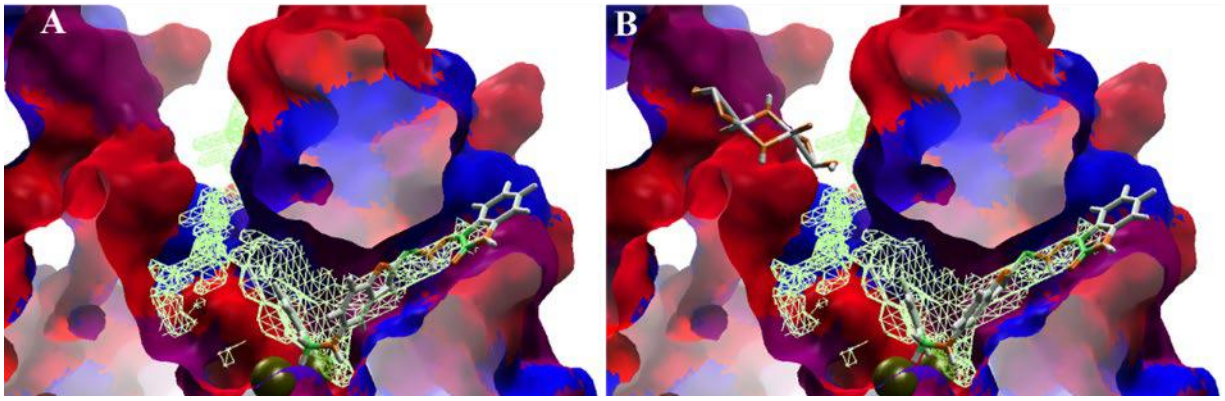


Figura 20 Interacciones hidrofóbicas entre la proteína LpxC con A) I-I, y LpxC-NT con B) I-J. Las superficies azules representan sitios hidrófobos, y las superficies rojas son zonas hidrófilas.

Además, analizando las superficies hidrofóbicas de LpxC, la Figura 21-A muestra a la molécula I-I acoplado en la cavidad principal libre de LpxC, que interactúa principalmente con las superficies hidrofóbicas de la proteína y cubre la superficie de la cavidad estudiada. La Figura 21B muestra la interacción de I-J con el sistema LpxC-NT, que expone la influencia de TNT en el sistema. Observe que TNT se introduce en la zona profunda de la cavidad, promoviendo una interacción similar, pero con mayor LE.

En la Figura 22 y 23, se muestran la comparación de la eficiencia del ligando obtenida en el análisis de la proteína Hfq y la enzima LpxC, estos gráficos nos permiten visualizar el comportamiento de inhibición bacteriana, según sea el modo de análisis. En la Figura 22A, se observa que esta eficiencia se ve influenciada por la modalidad de análisis en función de la superficie que posee, en decrecimiento de

la eficiencia de inhibición, caso contrario cuando la superficie es menor (22b), en donde la eficiencia se mantiene o se modifica despreciablemente para las moléculas (A, C, D y G) cuando en el sistema por cofactores TNT, entra primero.



Figura 21 Eficiencia del ligando en proteína Hfq (5I21); SN-C (ligando sin cofactor), interacción con NTQT (azul) y QTNT (naranja) cómo cofactores. Para a) Cavidad 25.600 A^3 y b) Cavidad 13.312 $Å^3$.

En la figura 22, se observa que el decrecimiento de la eficiencia de inhibición es un caso contrario a la proteína Hfq, ya que no es afectada solo por volumen de la superficie, si no que el comportamiento, está relacionado con el tamaño molecular final. En la Figura 22A, la eficiencia se mantiene o se modifica despreciablemente para las moléculas (A, E, F, D y G), cuando en el sistema por cofactores TNT o QT, entra primero. Es decir, no hay influencia en el orden de inhibición. Caso contrario Figura 22B, en donde el comportamiento de inhibición decrece cuanto QT entra primero.

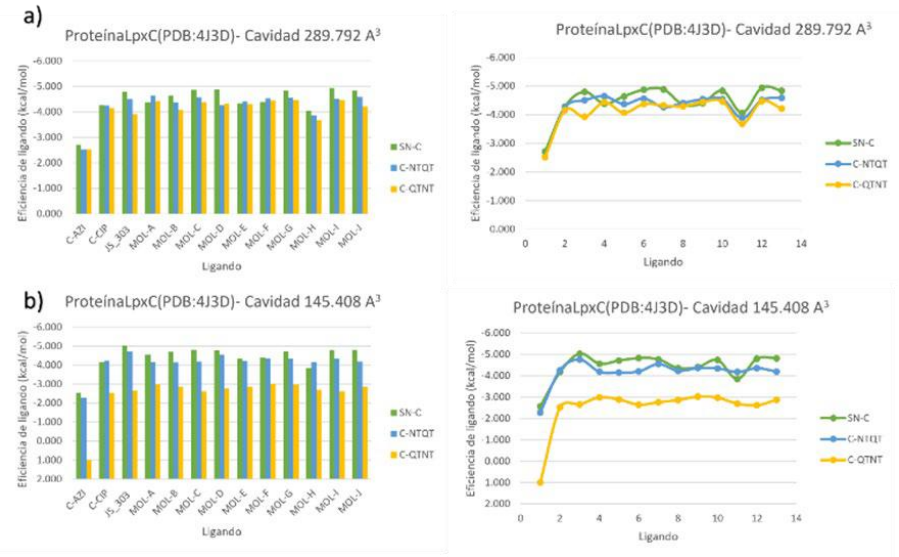


Figura 22 Eficiencia de inhibición en proteína LpxC (4J3D); SN-C (ligando sin cofactor), interacción con TNT-QT (azul) y QT-TNT (naranja) cómo cofactores. Para a) Cavidad 289.792 A^3 y b) Cavidad 145.498 Å^3.

Corroborando con los resultados experimentales de (Budhwani et al., 2017; Chemchem et al., 2020), se demuestra la eficiencia que tiene estás moléculas al inhibir la bacteria *P. aeruginosa*. Puntualizando para este análisis que la inhibición se lleva a cabo mediante el bloqueo de la replicación de la proteína Hfq y la enzima Lpxc, responsables del crecimiento y replicación bacteriana.

Existe una influencia en la suma de las energías dependiendo de la cavidad que se analice, sin embargo, está cavidad también posee fuertes energías de atracción o repulsión según sea la superficie en la que se esté realizando el análisis. Para la proteína LpxC, se observan zonas hidrofóbicas e hidrofílicas, permitiendo que el biomaterial propuesto TNT-QT, mejore la eficiencia debido a las fuerzas electrostáticas y puentes de hidrógeno que existen con QT. Sí bien TNT, no interactúa directamente con los ligandos, con las fuerzas electrostáticas mantienen los ligandos en la posición ideal. En comparación cuándo se encuentra como ligando directamente con la proteína con una eficiencia de -4.834 kcal/mol, las moléculas (A, C, D, G, I y J) presentan una fuerte interacción con los cofactores QT y TNT, por lo que su energía se mantiene por encima de -4.000 kcal/mol. La molécula I-H, parece no tener interacción con la proteína debido a los aminoácidos que interactúan mediante sus fuerzas de Van der Waals, estás no le han permitido mejorar la interacción a pesar de que tiene interacción con QT.

En la investigación de (Ołdak & Trafny, 2005), demostraron que el nivel de resistencia observado para las bacterias supervivientes aumenta durante la duración de la exposición al C-CIP, después de la exposición durante 4 días. Sin embargo, en (Imperi et al., 2014), sugieren que las propiedades antiinflamatorias

probablemente predominan en el tratamiento de infecciones que involucran patógenos resistentes al fármaco C-AZI, en el caso de infecciones pulmonares por *P. aeruginosa*, que presenta evidencia de actividad antimicrobiana *in vitro*, pero aún desconocen su contribución inhibitoria *in vivo* debido a la actividad antiinflamatoria análoga. Con lo anterior se puede sugerir que la inhibición para C-CIP, mejora con el uso de TNT-QT, como agente transportador, en el caso de C-AZI, esta inhibición no se da en los blancos moleculares propuestos.

La interacción con la proteína se presenta por interacciones electrostáticas con los aminoácidos. Las moléculas (B-J), tienen interacción con los aminoácidos Gln35, Ser65, Arg66, Arg69 y Pro67. La molécula I-A, además presenta interacción con Gln35.

Para la proteína Hfq las interacciones que tienen los ligandos con la proteína se son por puentes de hidrógeno, para la enzima LpxC se observa que las interacciones son electrostáticas positivas y negativas.

8.2.4.3. Interacciones con la proteína RpoS

Analizando las interacciones específicas de las moléculas estudiadas con el RpoS-Mol II-A (ver tabla en figura 22), la eficiencia es de -5.643 kcal/mol en una cavidad de 432.128 $Å^3$, mientras que en la proteína pepP, -5.501 kcal/mol en una cavidad de 119.808 $Å^3$. Esta eficiencia es mayor que las presentadas en las proteínas Hfq y LpxC, por lo que la posible inhibición puede darse más en la etapa de infección, es decir, en donde las bacterias comienzan a crear resistencia, al formar el biofilm y reforzar la pared celular.

En la figura 23 y 24, se presentan las interacciones electrostáticas, enlaces por puestes de H, pose en estructura secundaría, así como las superficies hidrofóbicas, de las series I y II (A).

La interacción con la proteína RpoS, se presenta por interacciones electrostáticas y puestes de H, con los aminoácidos. Para la molécula IIA (Figura 23A), la interacción por puentes de H es con el aminoácido Try 589, Tyr 183 y Asn 467, las interacciones electrostáticas son con: Glu 420, Asp 50, Glu 463, Arg 457 y Glu 466.

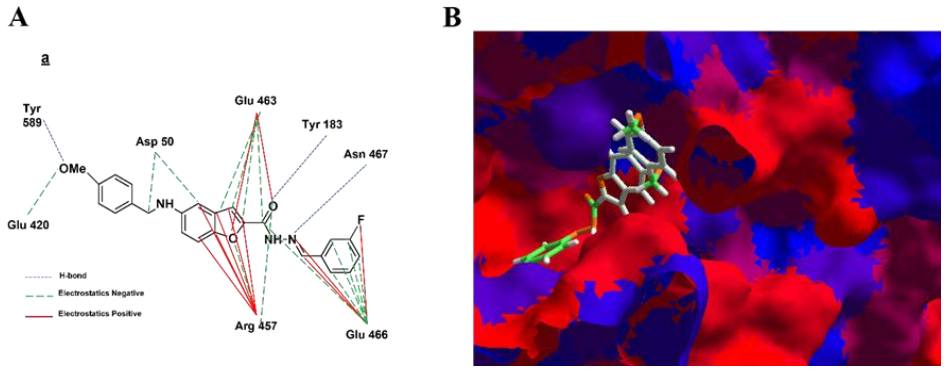


Figura 23 Descripción de pose molécula Serie II-A: Interacción RpoS. A) Enlaces por puentes de H e interacciones electrostáticas. Las líneas punteadas azules representan las interacciones de H bond, para interacciones electrostáticas, las líneas punteadas verdes son las atractivas y las líneas punteadas rojas son las repulsivas. B Interacciones hidrofóbicas con (superficies azules representan sitios hidrófobos, y las superficies rojas son zonas hidrófilas).

La interacción con la proteína RpoS, se presenta por interacciones electrostáticas y puestes de H, con los aminoácidos. Para la molécula IA (Figura 24B), la interacción por puentes de hidrogeno es con el aminoácido Gly 421, las interacciones electrostáticas con: Glu 420, Lys 588, Asp 50, Glu 463.

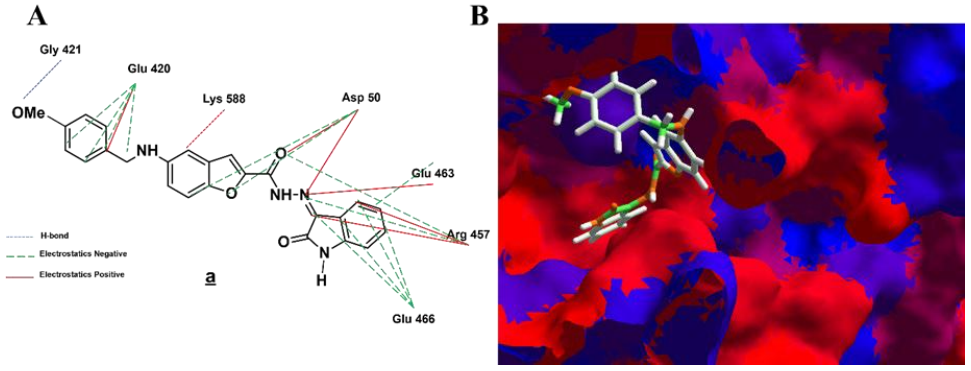


Figura 24 Descripción de pose molécula Serie I-A: Interacción RpoS. A) Enlaces por puentes de H e interacciones electrostáticas. Las líneas punteadas azules representan las interacciones de H bond, para interacciones electrostáticas, las líneas punteadas verdes son las atractivas y las líneas punteadas rojas son las repulsivas. B Interacciones hidrofóbicas con (superficies azules representan sitios hidrófobos, y las superficies rojas son zonas hidrófilas).

8.2.4.4. Interacciones con la proteína pepP

Para la proteína pepP, se ejemplifican los resultados con la molécula I-A. En la figura 25, se observa las interacciones de la molécula de la serie I-A, partiendo del compuesto simple (Fig.20A), interacciones por puentes de H (Fig.20b), interacciones electrostáticas (positivas y negativas) (Fig.20C), así como la superficie correspondiente a la cavidad analizada (Fig.20D).

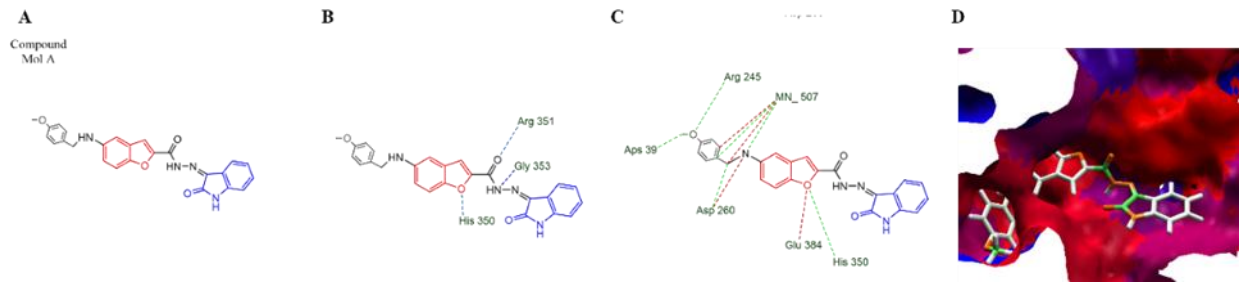


Figura 25 Descripción de Serie I(MOL-A): A) Compuesto; B) Interacciones H-Bond; C) Interacciones electrostáticas; D) Superficie en cavidad 119.808 A^3.

En la figura 26, se presentan las interacciones que presenta el compuesto de la serie I-A, así como la interacción con el cofactor TNT, los aminoácidos que intervienen son Asn 311 y Tyn 366.

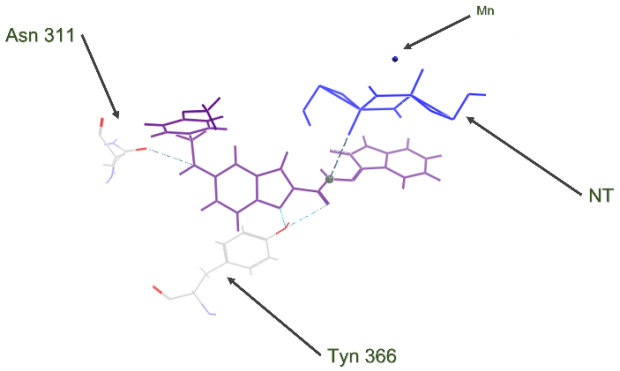


Figura 26 Proteína pepP: cavidad 119.808 Å^3 análisis con Blanco-NT en Interacción H-Bond de compuesto serie I-A.

En el análisis de superficies se presentan la cavidad a analizar, así como en análisis por cofactores, en la figura 27. La superficie de la proteína para esta cavidad es mayormente hidrofílica, el comportamiento de los ligandos es posicionarse en zona hidrófila e interacciona en sus extremos en zonas hidrofóbicas. La pose de la figura 27A, corresponde a la interacción directa con la proteína, la pose en la figura 27B, es cuando en la interacción, primero entra el cofactor TNT, este, toma posición de la molécula, en la pose figura 27 C, la molécula queda atrapada entre el cofactor TNT y el cofactor QT, abarcando mayor superficie en la proteína.

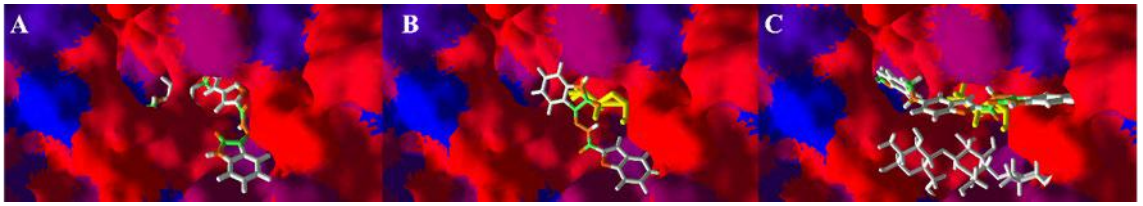


Figura 27 Superficie análisis en compuesto serie I-A. A) Blanco- serie (I-A), B) Blanco -TNT- serie (I-A) y C) Blanco-TNT-QT- serie (I-A)

Los ligandos de la serie IIA, en comparación con los de referencia con estructuras de benzofurano (BRA y BRB) (Budhwani et al. 2017; Guo 2019), presentan una mejor eficiencia de -5.824 kcal/mol y -5.72327kcal/mol, se nota un decrecimiento en la eficiencia en BRB cuando interacciona con el cofactor TNT, y un incremento de la eficiencia cuando se acopla QT al sistema, obteniendo un valor energético para (blanco-TNT-QT) de -6.0 27 kcal/mol.

En los ligandos de referencia con estructuras de isatina, se observa una eficiencia de -5.586 y -5.666 kcal/mol. La interacción con los cofactores decrece cuando en la combinación la molécula de QT entra primero. Comparando con otros nanomateriales, en la investigación de(Sadoq et al. 2023), la unión directa con la proteína mostró sitios de unión activos con nanopartículas de ZnO, revelando una afinidad de unión (-3,830 kcal/mol). Los resultados obtenidos revelan que la eficiencia incrementa con las moléculas de la serie I y II, además de la influencia del cofactor NT.

Tomando en cuenta los resultados experimentales, se puede notar que los mecanismos de inhibición bacteriana se establecen en las fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno y superficies hidrofóbicas para las moléculas de la serie I-(A,I y J). Las cuales presentaron una eficiencia de inhibición en MIC con 92% ,87% y 92% respectivamente ver Tabla A-1 en anexos A.

Los compuestos de derivados de benzofuranos con mayor eficiencia en la inhibición de las proteínas evaluadas se presentan en la tabla 9 , los mejores son: II-A contra RpoS (-5.64 kcal/mol), I-J contra RpoS (-5.54 kcal/mol), I-I contra RpoS (-5.28 kcal/mol), I-A contra RpoS (-5.4 kcal/mol) y II-E contra RpoS (-5.64 kcal/mol), todos ellos presentando una inhibición superior a -5.000 kcal/mol. Además, el compuesto I-I también mostró una inhibición alta contra LpxC (-5.31 kcal/mol). Estos resultados sugieren que estos compuestos tienen un potencial significativo en etapas de infección de avanzada, ya que, la proteína RpoS es una reguladora de la transcripción clave en *P. aeruginosa*, que se activa en respuesta a condiciones ambientales estresantes y desempeña un papel crucial en la formación de biofilms, estructuras complejas que permiten a la bacteria sobrevivir y persistir en entornos hostiles. Por otro lado, la proteína LpxC es esencial para la biosíntesis de lípidos de membrana en *Pseudomonas aeruginosa*, y su inhibición puede comprometer la integridad de la membrana bacteriana, afectando la viabilidad y patogenicidad de la bacteria. La inhibición de LpxC y RpoS podría ser una estrategia efectiva para controlar la infección y prevenir la formación de biofilms.

Tabla 9 Híbridos de benzofurano con mejor inhibición contra P. aeruginosa

	Inhibición LE (kcal/mol)

Serie I	LpxC	Hfq	pepP	repos
I-A	-5.033	-4.265	-4.845	-5.398
I-E	-5.014	-4.107	-4.897	-5.305
I-I	-5.311	-4.153	-5.111	-5.283
I-J	-5.290	-4.113	-5.026	-5.538
II-A	-4.171	-4.840	-5.343	-5.643
II-B	-4.181	-4.667	-4.800	-5.436
II-C	.4.178	-4.590	-4.914	-5.457
II-E	-4.233	-4.541	-4.988	-5.636

8.3.Modelo farmacofórico

Este estudio se basa en conocer las interacciones de ligandos con proteínas que conforman a la bacteria *P. aeruginosa*, con base a la información obtenida, se propone un modelo denotando los principales tipos de fragmentos requeridos para tratar de inhibir esta proteína, (ver la Figuras 28-29), las esferas verdes representan fragmentos hidrófobos, las esferas púrpuras fragmentos aromático-hidrófobos, la esfera azul fragmentos hidrófilos y las esferas naranjas fragmentos donantes de enlace de hidrógeno.

El modelo farmacofórico para la proteína Hfq de *P. aeruginosa* (Figura 39), requiere dos fragmentos hidrofóbicos en ambos sitios de la molécula diseñada (esferas verdes), seguidos de dos fragmentos aromático-hidrófobos (esferas púrpuras). La descripción del centro del modelo es necesaria para un fragmento hidrofílico (esferas azules) y otro fragmento donante de enlace de hidrógeno (esfera naranja).

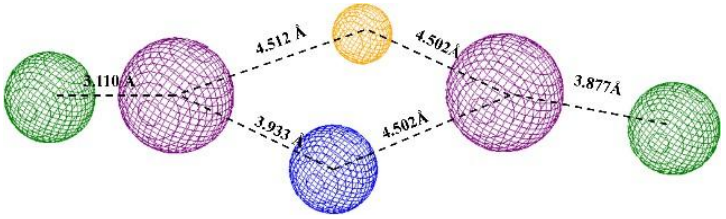


Figura 28 Modelo farmacofórico para la proteína Hfq de *P. aeruginosa*. Las esferas verdes representan los fragmentos hidrófobos, las esferas púrpuras representan los fragmentos aromático-hidrófilos, las esferas azules representan los fragmentos hidrófilos y las esferas naranjas representan los fragmentos donantes de hidrógeno.

En el caso del modelo farmacofórico para la proteína LpxC, ver Figura 24, los dos fragmentos primeros son similares al modelo Hfq, siendo dos sitios hidrófobos (esferas verdes) en los sitios de la molécula. Los siguientes

fragmentos son también dos sitios aromático-hidrófobos (esferas verdes). El lado izquierdo de la molécula necesita dos pequeños fragmentos hidrófilos, y el centro de la molécula debe necesitar dos fragmentos donantes de enlace de hidrógeno (esferas naranjas) y un sitio hidrófilo (esfera azul).

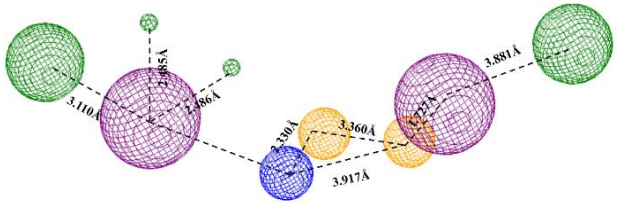


Figura 29 Modelo de farmacofórico para la proteína LpxC. Las esferas verdes representan los fragmentos hidrófobos, las esferas púrpuras representan los fragmentos aromático-hidrófilos, las esferas azules representan los fragmentos hidrófilos y las esferas naranjas representan los fragmentos donantes de hidrógeno.

9. Resultados: caracterización de nanocompuestos

Los resultados *in silico* sugieren que las cavidades de las proteínas LpxC, PepP y RpoS son las más prometedoras para interactuar con las nanopartículas, tanto por su tamaño como por su localización funcional. La proteína PepP posee cavidades de gran tamaño, lo que la convierte en un sitio accesible para compuestos voluminosos y funcionalizados. En cambio, RpoS, un regulador clave de la respuesta al estrés bacteriano, presenta cavidades con un perfil adecuado para la unión de inhibidores funcionales.

Los estudios de acoplamiento con híbridos de benzofurano muestran una mayor afinidad hacia las cavidades de RpoS y LpxC. Por otro lado, al usar las nanopartículas basadas en dióxido de titanio (TiO_2) y quitosano se observó un incremento interacciones con otros sitios de unión, especialmente en la proteína LpxC. En conjunto, estos hallazgos sugieren un potencial terapéutico al utilizar estas nanopartículas como vehículos de transporte para compuestos bioactivos. En donde el orden de interacción influirá directamente en la LE obtenida para cada zona de las cavidades analizadas con el sistema de cofactores.

Por lo anterior, en este capítulo se presenta los resultados de la caracterización de nanotubos de titanato de hidrógeno con quitosano (TNT y QT), sintetizados en un medio básico por el método hidrotermal. Tomando en cuenta los resultados *in silico*, se varió la cantidad de quitosano en la síntesis de nanocompuesto al (25,50,75 % en peso). El porcentaje de síntesis con quitosano se estimó a partir de 2g en total como precursor (QT y TiO_2).

9.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras, etiquetadas como TNT (titanato de hidrógeno puro), TQT-25%QT (25 % peso de quitosano), TQT-50%QT (50 % peso de quitosano) y TQT-75%QT (75 % peso de quitosano), fueron analizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con un voltaje de aceleración de 10 kV. Se utilizaron aumentos de 50x para obtener micrografías a 1 µm y 250x para imágenes a 100 nm. Las micrografías revelaron morfologías tubulares en todas las muestras (ver Figura 30), presentando variaciones significativas en el diámetro de los tubos según el porcentaje de quitosano presente.

Los resultados muestran que TNT (figura 30a), tiene diámetros de tubo entre 5-15 nm, con un pico máximo entre 9-10 nm, y tubos dispersos con distribución aleatoria. TQT-25%QT (figura 30b), tiene diámetros de tubo entre 6-32 nm, con un pico máximo entre 12-14 nm, y exhibe agregación vertical con una apariencia recubierta. TQT-50%QT (figura 30c) y TQT-75%QT (figura 30d) muestran diámetros de tubo

aumentados (8-38 nm y 6-38 nm, respectivamente) y agregación. Se observa la formación de tubos grandes en TQT-75%QT, en particular, las muestras TQT-50%QT y TQT-75%QT exhibieron diferencias distintivas. El TQT-50%QT mostró diámetros de tubo aumentados (8-38 nm) y agregación moderada con algún engrosamiento del tubo. En contraste, el TQT-75%QT mostró agregación lineal de tubos con tubos incrustados de tamaños entre 9-14 nm, formando tubos compuestos grandes sin engrosamiento significativo. Esta sorprendente diferencia sugiere que la concentración óptima de quitosano para lograr propiedades morfológicas específicas puede estar entre el 50-75%. La formación de tubos grandes en el TQT-75%QT sugiere aplicaciones potenciales en materiales compuestos con propiedades mejoradas, con titanatos superficiales expuestos, mientras que aumenta y mejora la disposición de los nanotubos.

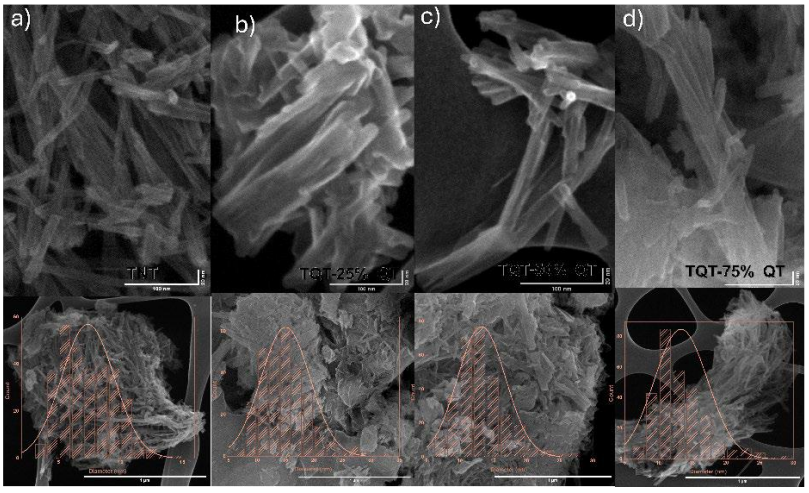


Figura 30 Imágenes SEM (200 nm y 1 µm) y tamaño de histogramas para a)NT hidrotermal, b) TQT-25%QT, c)TQT-50%QT y d) TQT-75%QT.

9.2. Espectroscopia infrarroja (FTIR)

Los espectros infrarrojos (ver figura 31) obtenidos revelan la presencia de grupos funcionales característicos del quitosano (figura 31a) y de los titanatos (figura 31b), añadiendo además los espectros de los precursores utilizados en la síntesis para comparar. En la región de 3000-3500 cm^{-1} se observan bandas correspondientes a los grupos hidroxilo (-OH) y amino ($-NH_2$) del quitosano. Adicionalmente, se detectan bandas a 1550-1650 cm^{-1} atribuidas a la vibración del grupo amida ($-CONH_2$) y a 1000-1100 cm^{-1} correspondientes a grupos éter (-COC-). En el caso de los titanatos se observan bandas a 400-700 cm^{-1} atribuidas a las vibraciones del grupo Ti-O y Ti-O-Ti. La comparación (figura 31c) de los espectros de compuestos TQT con diferentes porcentajes de quitosano (25%, 50% y 75%) muestra una mayor intensidad de las bandas correspondientes a los grupos funcionales de quitosano en los compuestos con mayor contenido de quitosano (Sallem et al., 2017).

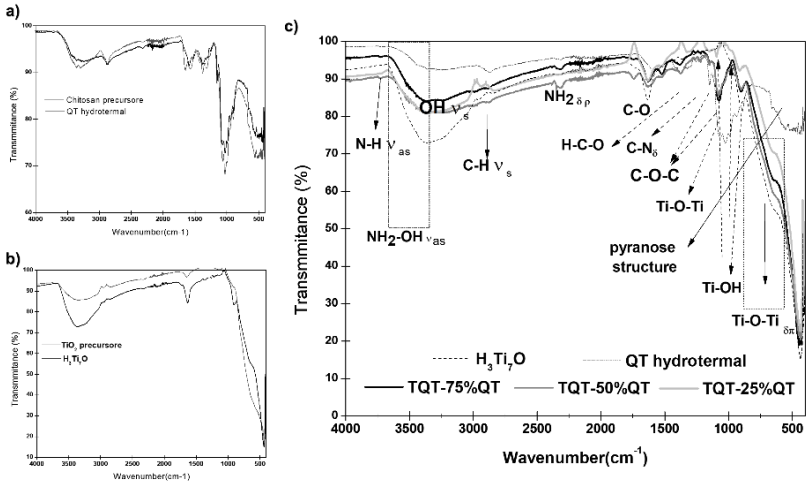


Figura 31 Espectros FTIR para a)T hidrotermal y precursor quitosano, b)TNT hidrotermal y precursor TiO_2 , c) todos los compuestos con partículas comparativas.

El aumento en la intensidad de las bandas correspondientes a los grupos funcionales del quitosano conforme aumenta su concentración, confirma una mayor incorporación del polímero en la matriz de los titanatos de hidrógeno. Esta interacción química, evidenciada por FTIR, junto con los cambios morfológicos observados en SEM, demuestra que el quitosano actúa no solo como recubrimiento, sino que también modifica la estructura superficial y la agregación de los nanotubos, potenciando las propiedades del nanocompuesto.

9.3. Difracción de rayos X (DRX)

Los patrones de difracción se muestran en la Figura 32, con los resultados de la síntesis hidrotermal de dióxido de titanio y quitosano, y sus compuestos. El patrón del quitosano sintetizado hidrotermalmente (figura 32a), comparado con su precursor y la tarjeta cristalográfica correspondiente (00-040-1518). Se observan dos picos cristalinos intensos en 2θ (10,10° y 19,95°), correspondientes a los planos cristalográficos (020) y (110), respectivamente. Sin embargo, se nota una reducción significativa en la intensidad de estos picos en comparación con el precursor, disminuyendo de 2500 a 1000 (reducción del 60%) para el pico de 10° y de 6000 a 1000 (reducción del 83%) para el pico de 20°. El patrón del precursor de dióxido de titanio (figura 32b), comparado con su tarjeta cristalográfica correspondiente (00-064-0863), indica una fase tetragonal con una estructura cristalina anatasa. El pico cristalino representativo se encuentra en 2θ (25,58°), correspondiente al plano cristalográfico (101). En comparación de la síntesis hidrotermal de dióxido de titanio (figura 32c), se forma una fase de titanato de hidrógeno. Esto se confirma mediante las tarjetas cristalográficas correspondientes, que indican la presencia de dos fases: una con un sistema cristalino ortorrómbico y fórmula $H_2Ti_2O_5$-H_2O, con planos cristalográficos representativos (200), (400) y (110) ubicados a 10°, 20° y 23,2° en 2θ, respectivamente; y otra con un sistema cristalino tetragonal y fórmula H_2TiO_3 ,

con un pico principal en 25° 2θ y plano cristalográfico (101). Además, el pico en 25° 2θ también puede corresponder a la fase anatasa del precursor dióxido de titanio (TiO_2).Los patrones comparados se muestran en (figuras 32d-f), quitosano hidrotermal (naranja), titanato de hidrógeno hidrotermal (negro) y materiales compuestos TQT 75% quitosano (azul), TQT 50% quitosano (verde oliva) y TQT 25% quitosano (rojo). La figura 32d, muestra un acercamiento en la región 7-12° en 2θ con aumento de intensidad por TQT (75% y 50%)-QT, la figura 32e, (16-24° 2θ) revela un plano que corresponde principalmente a la difracción de quitosano, con mayor intensidad para TQT (75% y 50%)-QT por influencia del quitosano. La figura 27d (24-26° 2θ) se centra en el plano cristalográfico (101), mostrando un pico prominente para TQT 50% (~8500 unidades), más intenso que otros compuestos (<2500 unidades). Además, se observa un desplazamiento en los picos de difracción de las muestras TQT con 50% y 75% de quitosano en comparación con el titanio de hidrógeno puro, lo que sugiere una modificación en la estructura cristalina. Este fenómeno puede explicarse por la formación de una **macla**, que ocurre cuando dos partes del cristal se unen de manera específica, casi como si fueran reflejos o espejos una de la otra, creando un patrón entrelazado dentro del material. En este caso, la interacción entre los titanatos y el quitosano podría favorecer la formación de estas maclas, alterando la distribución y orientación de los planos cristalinos. Ver región (5-80° 2θ) en la figura 32g.

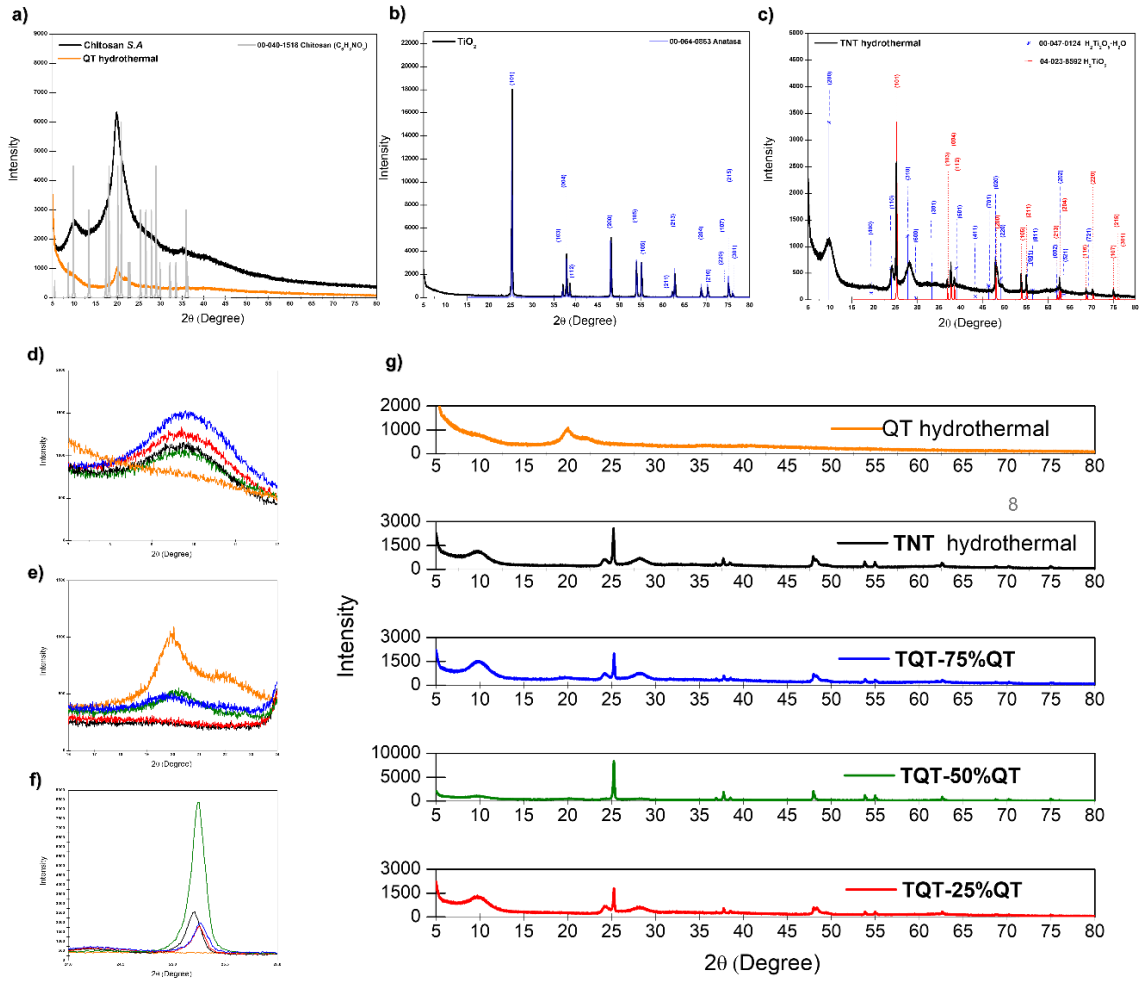


Figura 32 Patrones de XRD: a)QT hidrotermal, b)TiO_2, c)TNT hidrotermal, d)todos los compuestos zoom 7-12 (2θ), e)todos los compuestos zoom 16-24 (2θ), f)todos los compuestos zoom 24-26 (2θ) y g) todos los compuestos con partículas comparativas.

9.4. Fisisorción de nitrógeno con la técnica de BET (Brunauer , Emmett y Teller)

Los resultados de las isotermas BET (Ver figura 33 y tabla 3), técnicas de adsorción, mostraron que la muestra de TNT exhibe una alta área superficial de 331, m²/g, indicando una estructura porosa y una gran superficie disponible para interacciones. El volumen de poro es de 5,6 cc/g, lo que sugiere una porosidad moderada. La isoterma de adsorción-desorción corresponde al Tipo IV, característica de materiales mesoporosos con una distribución homogénea del tamaño de poro. La histéresis H3 indica que la muestra tiene una estructura porosa con poros en cuello de botella y desorción lenta. El material TNT-75%QT exhibe la superficie de 186,7 m²/g y un volumen de poro de 0,3 cc/g, con un diámetro de poro de 3,1 nm. Además, se observó una histéresis de tipo H2 en la isoterma de adsorción-desorción de N_2, lo que indica la presencia de mesoporos

con una distribución de tamaño de poro homogénea. La histéresis se produjo en un rango de presión relativamente estrecho, lo que sugiere una buena estabilidad del material.

Por el contrario, el material QT sintetizado por el método hidrotermal, tiene una superficie específica muy baja (0,2 m^2/g) y un volumen de poro mínimo (1,1 e^{-03} cc/g). Los materiales TNT-25%QT y TNT-50%QT tienen superficies específicas y volúmenes de poro intermedios, con valores de 131,2 m^2/g y 113,5 m^2/g, respectivamente.

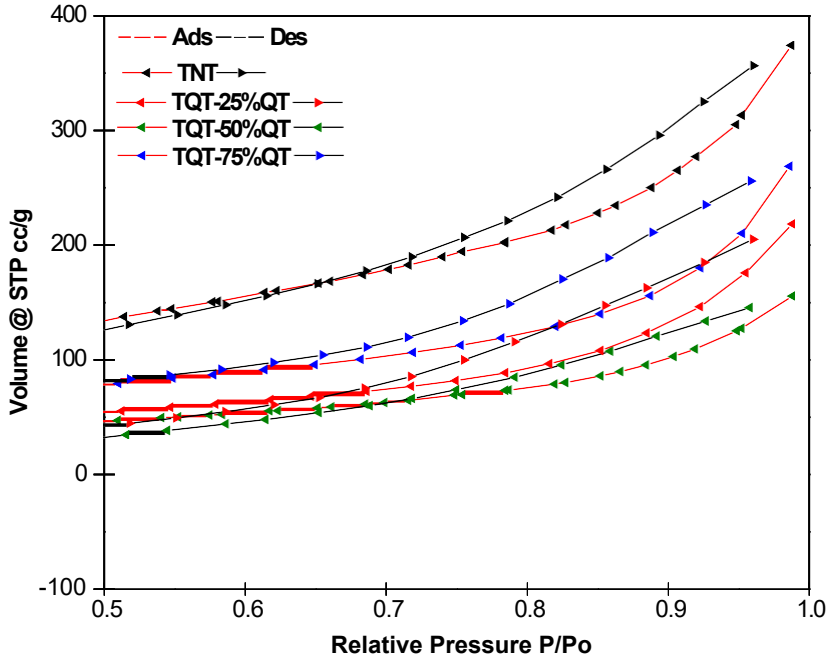


Figura 33 Isotermas por el método BET

9.5. Correlación entre caracterización y resultados *in silico*

Los estudios in silico permitieron identificar interacciones moleculares energéticamente favorables entre los compuestos heterocíclicos evaluados y las proteínas blanco de Pseudomonas aeruginosa, destacando PepP y RpoS por las características estructurales de sus cavidades de unión. Por otra parte, la caracterización experimental de los nanocompuestos de titanato de hidrógeno y quitosano (TQT) permitió identificar propiedades morfológicas, estructurales y superficiales relevantes para su posible aplicación como sistemas de transporte de estos compuestos bioactivos. Aunque ambas aproximaciones evalúan fenómenos distintos, su integración permite establecer una relación complementaria entre la selección computacional de los ligandos y las características fisicoquímicas de los materiales propuestos como vehículos.

En particular, las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) evidenciaron modificaciones en la morfología y agregación de los nanotubos conforme aumentó el contenido de quitosano durante la síntesis hidrotermal. El sistema TQT-75%QT presentó diámetros comprendidos entre 6 y 38 nm, así como una distribución agregada de estructuras tubulares. Estas características sugieren que la incorporación del polímero modifica la organización morfológica del material, lo que podría influir en la disponibilidad de sitios superficiales para la adsorción de moléculas heterocíclicas. Sin embargo, estas observaciones no permiten establecer una relación directa entre las dimensiones de los nanotubos y las cavidades proteicas evaluadas mediante docking, debido a que estas últimas corresponden a los sitios de interacción molecular de los ligandos.

Adicionalmente, los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) evidenciaron bandas características de los grupos hidroxilo (-OH) y amino ($-NH_2$) asociados con el quitosano, cuya intensidad aumentó conforme se incrementó su proporción en los nanocompuestos. La presencia de estos grupos funcionales resulta relevante debido a su capacidad potencial para establecer interacciones intermoleculares, incluyendo puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas, con los compuestos heterocíclicos transportados. Desde esta perspectiva, la funcionalización con quitosano podría favorecer procesos de adsorción y retención de las moléculas bioactivas, proporcionando una posible explicación fisicoquímica de su comportamiento como material transportador. No obstante, la naturaleza específica de estas interacciones requiere distinguirse de aquellas predichas entre los ligandos y las proteínas blanco mediante el acoplamiento molecular.

Por su parte, los patrones de difracción de rayos X (DRX) permitieron identificar fases cristalinas características de los titanatos de hidrógeno y modificaciones en los patrones de difracción relacionadas con la incorporación de quitosano. En particular, las variaciones de intensidad observadas en los

sistemas TQT-50%QT (~8500 unidades) y TQT-75%QT (~2500 unidades), así como los desplazamientos de algunos picos, sugieren cambios en la organización estructural de los materiales. Estas modificaciones podrían influir en las características superficiales de los nanocompuestos y, en consecuencia, en su comportamiento como vehículos de moléculas bioactivas. Sin embargo, los resultados de DRX no permiten determinar directamente la afinidad de los ligandos hacia las proteínas PepP, RpoS o LpxC, ya que dicha propiedad fue evaluada mediante los estudios computacionales.

Finalmente, los análisis de fisisorción de nitrógeno permitieron identificar diferencias importantes en las propiedades texturales de los materiales sintetizados. El TNT presentó un área superficial específica de 331,754 m^2/g, mientras que el sistema TQT-75%QT registró un valor de 186,701 m^2/g, con un diámetro de poro de 3,18 nm y un volumen de poro de 0,3766 cm^3/g. Estos resultados indican que la incorporación de quitosano modifica las características superficiales y porosas de los titanatos de hidrógeno. Tales propiedades son relevantes para evaluar su potencial como sistemas de adsorción y transporte de moléculas heterocíclicas, debido a que la superficie disponible, la porosidad y los grupos funcionales pueden influir en las interacciones entre el material y los compuestos transportados. Por otra parte, los volúmenes de las cavidades proteicas identificados mediante docking corresponden a un nivel de análisis molecular distinto y no deben interpretarse como una medida directa de compatibilidad dimensional con los nanotubos.

En conjunto, los resultados computacionales y experimentales proporcionan información complementaria para el desarrollo de nanocompuestos destinados al transporte de moléculas con potencial actividad antimicrobiana. Mientras que los estudios *in silico* permitieron seleccionar compuestos heterocíclicos con afinidades moleculares predichas favorables hacia proteínas relevantes de *P. aeruginosa*, las técnicas SEM, FTIR, DRX y BET permitieron caracterizar las propiedades morfológicas, químicas, estructurales y texturales de los materiales propuestos como vehículos. Esta aproximación multidisciplinaria establece una base para relacionar la selección racional de compuestos bioactivos con el diseño de materiales de transporte, cuya funcionalidad se complementa con los estudios experimentales de absorción y liberación presentados en el siguiente capítulo.

10. Resultados: absorción y liberación

10.1. Absorción

La selección de compuestos de las series isatinas y benzofuranos, evaluados con sistemas de titanato de hidrógeno funcionalizado con quitosano (TQT) al 25%, 50% y 75%, se fundamenta en su estructura química, peso molecular, composición atómica, y especialmente en los resultados obtenidos mediante estudios *in silico*. Los compuestos seleccionados demostraron ser prometedores en acoplamiento molecular, al mostrar afinidades de unión favorables con proteínas blanco bacterianas como PepP y RpoS, cuyas cavidades activas presentan geometrías y propiedades fisicoquímicas adecuadas para la interacción con estos ligandos. Esta capacidad predictiva refuerza su potencial para ser liberados en entornos biológicos relevantes.

En la serie I, se incluyeron los compuestos I-A ($C_{25}H_{22}N_4O_5$, PM: 440.43 g/mol) y I-I ($C_{24}H_{17}N_4O_3F$, PM: 428.41 g/mol), seleccionados por su alta afinidad hacia sitios activos en proteínas diana y por su riqueza en heteroátomos (N, O, F), lo que favorece múltiples tipos de interacciones (hidrógeno, π-π, dipolo-dipolo) con el sistema TQT.

De la serie II (benzofurano-N-acilhidrazona), se consideraron los compuestos II-A ($C_{23}H_{19}BrN_3O_3$, PM: 465.31 g/mol) y II-C ($C_{23}H_{19}ClN_3O_3$, PM: 420.86 g/mol), que no solo mostraron resultados positivos en los análisis computacionales, sino que también poseen propiedades estructurales (presencia de halógenos, flexibilidad molecular, tamaño medio) ideales para evaluar su interacción con superficies porosas funcionalizadas.

Se desarrollaron curvas de calibración específicas para cada compuesto analizado. Como ejemplo, en la Figura 34 se presenta la curva de calibración correspondiente al compuesto I-A.

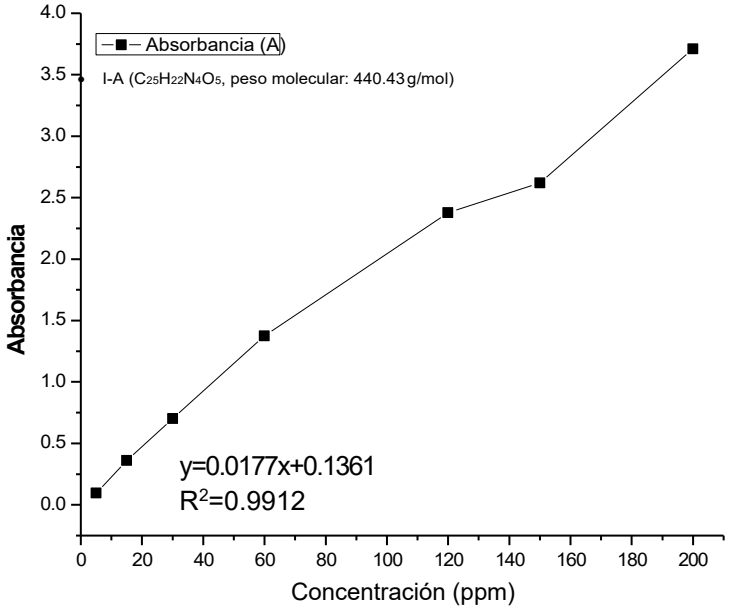


Figura 34 Curva de calibración de compuesto I-A.

La incorporación de estos compuestos en ensayos de adsorción y liberación permite estudiar cómo su comportamiento se ve influenciado por el grado de funcionalización del sistema TQT. El quitosano, al aportar grupos amino e hidroxilo, mejora la afinidad superficial y controla el perfil de liberación(Herdiana et al., 2022; Shariatinia & Jalali, 2018). Al variar el porcentaje de quitosano (25%, 50% y 75%), se busca optimizar las condiciones para una liberación sostenida y dirigida de moléculas bioactivas, maximizando la eficacia del sistema como potencial vehículo terapéutico.

La evaluación de adsorción y liberación de los compuestos antes descritos, con las nanopartículas de TQT-X%, se monitoreo con la banda de absorción a 210 nm.

La señal de adsorción disminuye cuando se cargan los compuestos con las nanopartículas. Esto se debe al comportamiento de adsorción que presentan las nanopartículas, en dependencia a su área superficial disponible(Sallem et al., 2017b). En la figura 35, se presenta el comportamiento de absorción hasta 8 horas a temperatura ambiente (ver figura 35 a), de igual forma, se obtuvieron la relación lineal (C/C0), para todos los compuestos, cuando se utiliza las nanopartículas de NTQT-25%. Ver figura 35b.

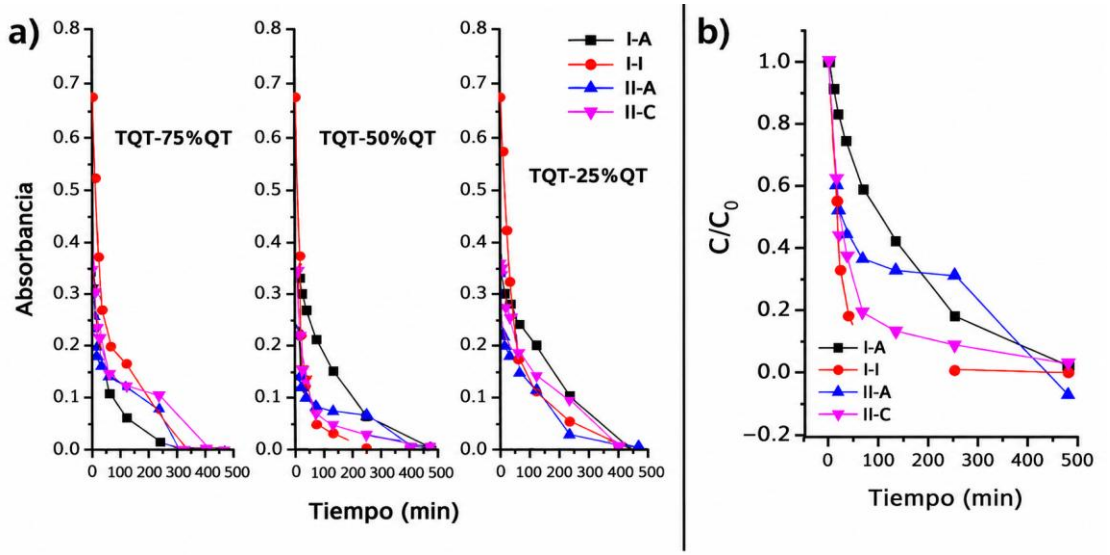


Figura 35. Análisis de absorción de compuestos heterocíclicos, a) con nanopartículas de TQT-X% y b) representación de C/C_0 con nanopartículas de NTQT-25%

En el análisis se expone que la cantidad de quitosano disponible infiere en la velocidad de absorción de los compuestos, es decir, cuando existe mayor cantidad de QT, el tiempo de absorción total comienza desde los 100 minutos. Mientras que a menor cantidad de QT este se desplaza hasta 200 minutos.

10.2. Liberación

La liberación de los compuestos heterocíclicos se evaluó en un medio de PBS, utilizando nanocompuestos de TQT-75%QT como sistemas transportadores. Durante el intervalo experimental se observó un incremento progresivo de la concentración de los compuestos en el medio, lo que permitió analizar su comportamiento de liberación. En la Figura 36 se presentan los perfiles de concentración en función del tiempo para los compuestos evaluados.

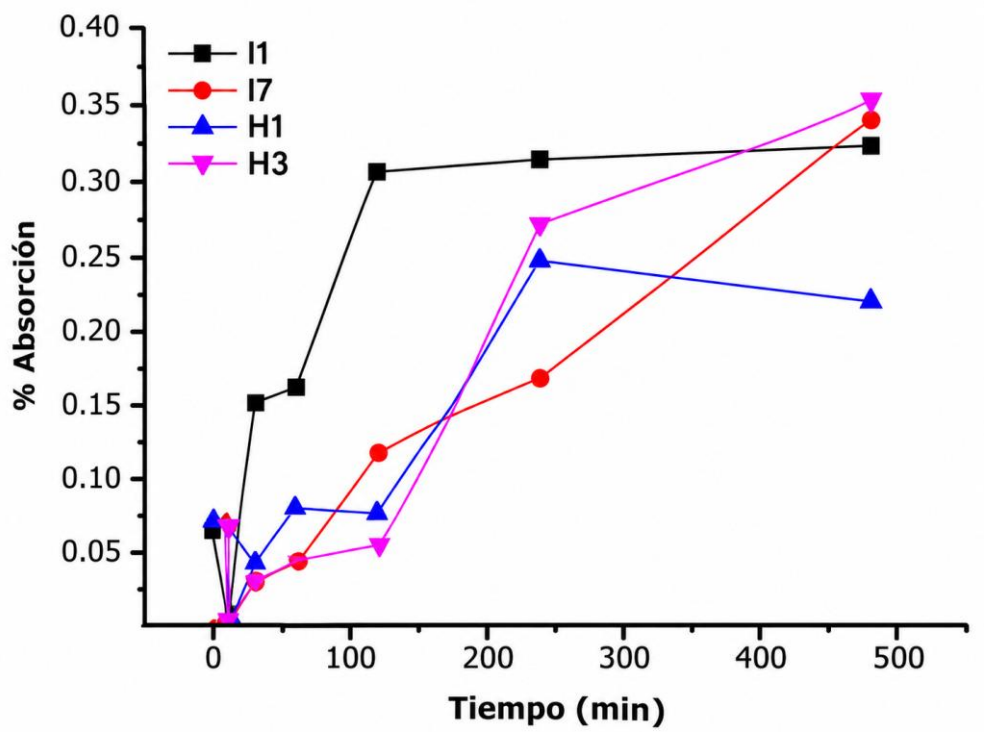


Figura36. Variación de la concentración de los compuestos heterocíclicos H1, H3, I1 e I7 en función del tiempo durante los ensayos de liberación en PBS, utilizando el nanocompuesto TQT-75%QT como material transportador.

11. Conclusiones y perspectivas

10.1 Conclusiones

Este estudio integró exitosamente herramientas computacionales y experimentales para el diseño, síntesis y evaluación de nanocompuestos basados en titanato de hidrógeno y quitosano, dirigidos a la liberación controlada de compuestos bioactivos con potencial antimicrobiano frente a Pseudomonas aeruginosa. A través de estudios *in silico*, se identificaron cuatro derivados de benzofurano con afinidades de unión de hasta –5.3 kcal/mol hacia proteínas blanco implicadas en la virulencia y resistencia bacteriana (Hfq, LpxC, RpoS y PepP).

Los nanocompuestos mostraron afinidades incluso mayores (hasta –5.6 kcal/mol), y su combinación con quitosano moduló las interacciones moleculares, sugiriendo un posible efecto sinérgico. La caracterización fisicoquímica confirmó la formación de materiales mesoporosos adecuados para carga y liberación de fármacos, destacando el compuesto TNT-75%QT por su alta superficie específica, volumen y tamaño de poro.

Los ensayos de liberación permitieron observar un incremento progresivo de la concentración de los compuestos heterocíclicos en el medio de PBS durante el intervalo experimental evaluado. Estos resultados muestran el potencial de los nanocompuestos de titanato de hidrógeno y quitosano como sistemas transportadores de moléculas bioactivas, cuya cinética y mecanismos de liberación podrán estudiarse con mayor profundidad en investigaciones posteriores.

En conjunto, los resultados confirman que los derivados de benzofurano poseen actividad molecular prometedora y que su vehiculización mediante nanocompuestos de titanato de hidrógeno y quitosano representa una estrategia eficaz y novedosa frente a infecciones resistentes. Este trabajo establece una base sólida para estudios posteriores en modelos biológicos más avanzados.

10.2 Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos se abren varias líneas de investigación que podrían ampliar y fortalecer el impacto de este estudio. En primer lugar, debido a que las pruebas *in vitro* con *Pseudomona aeruginosa*, implican riesgos biológicos significativos, es recomendable reducir los tiempos de exposición al patógeno, lo cual limita la aplicación directa de estos compuestos en estudios más complejos con microorganismo de alto riesgo. Por ello, se sugiere realizar ensayos adicionales *in silico* utilizando distintas cepas desde bacterianas hasta fúngicas, tanto de relevancia clínica como agrícola, para evaluar y validar los compuestos en contextos diversos. Asimismo, la integración de técnicas computacionales y experimentales vía prometedora para optimizar el diseño de nuevos materiales biomateriales o ligandos con características específicas que mejoren la efectividad antimicrobiana. Además, se plantea el desarrollo de sistemas de liberación controlada que potencien la efectividad y la estabilidad de los compuestos.

Como parte del trabajo futuro, se propone evaluar la actividad antimicrobiana real de los materiales frente a *Pseudomonas spp*., así como ampliar los ensayos a otros microorganismos patógenos, incluidos hongos. Además, resulta fundamental determinar el mecanismo de liberación de los compuestos activos y estudiar la toxicidad asociada a las nanoestructuras empleadas, con el fin de garantizar su seguridad y eficacia en aplicaciones biomédicas

Finalmente, la evaluación de modelos *in vivo* será fundamental para confirmarla seguridad y la eficacia de estos compuestos en organismos vivos, lo cual permitirá avanzar a si su aplicación es conveniente.

REFERENCIAS

Anbazhagan, E., Rajendran, A., Natarajan, D., Kiran, M. S., & Pattanayak, D. K. (2016). Divalent ion encapsulated nano titania on Ti metal as a bioactive surface with enhanced protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *143*, 213–223. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.009

Anus, A., Le, V. C. T., Sheraz, M., Kim, S., & Lee, W. R. (2022). Visible light-activated photocatalytic activity of TiO2–crystal violet based superhydrophobic paint against VOCs in indoor air†. *Environmental Science: Advances*, *2*(1), 69–77. https://doi.org/10.1039/d2va00120a

Arora, P., Arora, V., Lamba, H. S., & Wadhwa, D. (2012). Importance of heterocyclic chemistry: A review. *Int J Pharm Res Sci*, *3*(9), 2947–2954.

Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage Pseudomonas aeruginosa infections. *Drugs in Context*, *7*, 1–18. https://doi.org/10.7573/dic.212527

Bérubé, G. (2016). An overview of molecular hybrids in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *11*(3), 281–305. https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1135125

Bitencourt-Ferreira, G., & de Azevedo, W. F. (2019). *Molegro Virtual Docker for Docking* (pp. 149–167). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_10

Board, E., Abe, G. A., Long, L. T. E., & Vicent, T. M. (2011). *Chitosan for Biomaterials I*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23114-8

Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, M. T. (2014). Patogenia de la infección bacteriana. In McGraw Hill (Ed.), *Microbiología médica* (Vol. 26, Issue e).

Budhwani, S., Sharma, S., & Kalyane, N. (2017). Synthesis of aryl (5-substituted benzofuran-2-YL) carbamate derivatives as antimicrobial agents. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *10*(3), 377–381. https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i3.16332

Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *27*(1), 44–52. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001

Chemchem, M., Menacer, R., Merabet, N., Bouridane, H., Yahiaoui, S., Moussaoui, S., & Belkhiri, L. (2020). Green synthesis, antibacterial evaluation and QSAR analysis of some isatin Schiff bases. *Journal of Molecular Structure*, *1208*, 127853. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.127853

Christian, H., Gram, H. C., Staining, H., & Rodríguez, P. A. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 166–167.

Correa, M. G., Martínez, F. B., Vidal, C. P., Streitt, C., Escrig, J., & de Dicastillo, C. L. (2020). Antimicrobial metal-based nanoparticles: A review on their synthesis, types and antimicrobial action. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *11*, 1450–1469. https://doi.org/10.3762/BJNANO.11.129

REFERENCIAS

Costa, G. C., Montagnoli, T. L., Soares da Silva, J., de Alencar, A. K. N., Reina Gamba, L. E., Alves, B. E., Silva, M. M., Trachez, M. M., do Nascimento, J. H. M., Pimentel-Coelho, P. M., Mendez-Otero, R., Lima, L. M., Barreiro, E. J., Sudo, R. T., & Zapata-Sudo, G. (2020). New Benzofuran N-Acylhydrazone Reduces Cardiovascular Dysfunction in Obese Rats by Blocking TNF-Alpha Synthesis . *Drug Design, Development and Therapy*, *Volume 14*, 3337–3350. https://doi.org/10.2147/DDDT.S258459

David, E., Hernandez, D., & Reyes-romero, J. R. (2019). Characteristics of polymeric materials used in medicine. In *Materials for Biomedical Engineering: Thermoset and Thermoplastic Polymers* (Vol. 1). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816874-5.00014-1

El ouafy, H., Amini, L., Zouitina, S., Chraka, A., Moubarik, A., El Harfi, K., Mbarki, M., & El idrissi, M. (2020). Theoritecal Evaluation of Ibuprofen and Paracetamol by Fukui and Parr Fonctions Descriptors: DFT Study. *2020 IEEE 6th International Conference on Optimization and Applications (ICOA)*, 1–5. https://doi.org/10.1109/ICOA49421.2020.9094523

Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. In *Molecules* (Vol. 20, Issue 7, pp. 13384–13421). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/molecules200713384

Filgueira de Azevedo Jr Editor, W. (n.d.). *Docking Screens for Drug Discovery*. http://www.springer.com/series/7651

Franzke, Y. J., Holzer, C., Andersen, J. H., Begušić, T., Bruder, F., Coriani, S., Della Sala, F., Fabiano, E., Fedotov, D. A., Fürst, S., Gillhuber, S., Grotjahn, R., Kaupp, M., Kehry, M., Krstić, M., Mack, F., Majumdar, S., Nguyen, B. D., Parker, S. M., … Weigend, F. (2023). TURBOMOLE: Today and Tomorrow. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *19*(20), 6859–6890. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.3c00347

Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P., & Shenkin, P. S. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, *47*(7), 1739–1749. https://doi.org/10.1021/jm0306430

Fukui, K., & Pullman, B. (1980). Horizons of Quantum Chemistry. In *Horizons of Quantum Chemistry*. D. Reidel Publishing Company. https://doi.org/10.1007/978-94-009-9027-2

Gigante, V., Sati, H., & Beyer, P. (2022). Recent advances and challenges in antibacterial drug development. *ADMET and DMPK*, *10*(2), 147–151. https://doi.org/10.5599/admet.1271

Gomaa, H. A. M., Atta, A. M., Shaker, M. E., Alzarea, S. I., Alsahli, T. G., Alatwi, E., Musa, A., Mohamed, F. A. M., Alzahrani, H. A., Mohassab, A. M., Abdelmoez, A., Bräse, S., & Youssif, B. G. M. (2025). Design, synthesis, and biological

investigation of new thiazole-based derivatives as multi-targeted inhibitors endowed with antiproliferative, antioxidant, and antibacterial properties. *Frontiers in Chemistry*, *13*. https://doi.org/10.3389/fchem.2025.1595997

Heravi, M. M. (2020). *RSC Advances Prescribed drugs containing nitrogen heterocycles : an overview*. 44247–44311. https://doi.org/10.1039/d0ra09198g

Herdiana, Y., Wathoni, N., Shamsuddin, S., & Muchtaridi, M. (2022). Drug release study of the chitosan-based nanoparticles. In *Heliyon* (Vol. 8, Issue 1). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08674

Hernández-Del Castillo, P. C., & Rodríguez-González, V. (2022). Efficient Visible Photocatalytic Degradation of 4-CP Herbicide Using Immobilized TiO2:Ni on Glass Substrates. *Topics in Catalysis*, *65*(9–12), 1139–1148. https://doi.org/10.1007/s11244-022-01679-2

Hu, J., Yang, L., Cheng, X., Li, Y., & Cheng, Y. (2021). Aminoglycoside-Based Biomaterials: From Material Design to Antibacterial and Gene Delivery Applications. *Advanced Functional Materials*, *31*(36), 1–17. https://doi.org/10.1002/adfm.202103718

Huggins, D. J., Biggin, P. C., Dämgen, M. A., Essex, J. W., Harris, S. A., Henchman, R. H., Khalid, S., Kuzmanic, A., Laughton, C. A., Michel, J., Mulholland, A. J., Rosta, E., Sansom, M. S. P., & van der Kamp, M. W. (2019). Biomolecular simulations: From dynamics and mechanisms to computational assays of biological activity. *WIREs Computational Molecular Science*, *9*(3). https://doi.org/10.1002/wcms.1393

Imperi, F., Leoni, L., & Visca, P. (2014). Antivirulence activity of azithromycin in Pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in Microbiology*, *5*(APR). https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00178

Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). Pseudomonas aeruginosa: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 6, pp. 1–37). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms22063128

Khanam, H., & Shamsuzzaman. (2015a). Bioactive Benzofuran derivatives: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *97*, 483–504. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.039

Khanam, H., & Shamsuzzaman. (2015b). Bioactive Benzofuran derivatives: A review. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 97, Issue 1, pp. 483–504). Elsevier Masson SAS. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.039

Khodarahmi, G., Asadi, P., Hassanzadeh, F., & Khodarahmi, E. (2015). *Benzofuran as a promising scaffold for the synthesis of antimicrobial and antibreast cancer agents : A review*. *November*, 1–10. https://doi.org/10.4103/1735-1995.172835

Kim, S. (2018). Competitive Biological Activities of Chitosan and Its Derivatives: Antimicrobial, Antioxidant, Anticancer, and Anti-Inflammatory Activities. *International Journal of Polymer Science*, *2018*, 1–13. https://doi.org/10.1155/2018/1708172

REFERENCIAS

Koes, D. R., & Camacho, C. J. (2012). ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic Acids Research*, *40*(W1), W409–W414. https://doi.org/10.1093/nar/gks378

Kramer, B., Rarey, M., & Lengauer, T. (1999). Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, *37*(2), 228–241. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19991101)37:2<228::AID-PROT8>3.0.CO;2-8

Lai, Y.-K., Wang, Q., Huang, J.-Y., Li, H.-Q., Chen, Z., Zhao, A. Z.-J., Wang, Y., Zhang, K.-Q., Sun, H.-T., & Al-Deyab, S. S. (2016). TiO2 nanotube platforms for smart drug delivery: a review. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 11*, 4819–4834. https://doi.org/10.2147/IJN.S108847

Lindmeier, C. (2018). *Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo*. https://www.who.int/es/news/item/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows

Liu, J., Jiang, F., Jiang, X., Zhang, W., Liu, J., Liu, W., & Fu, L. (2012). Synthesis and antimicrobial evaluation of 3-methanone-6-substituted- benzofuran derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *54*, 879–886. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.05.013

Lynch, J. P., & Zhanel, G. G. (2022). Pseudomonas aeruginosa Pneumonia: Evolution of Antimicrobial Resistance and Implications for Therapy. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, *43*(02), 191–218. https://doi.org/10.1055/s-0041-1740109

M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, & X. Li. (2016). *Gaussian 09* (Revision A.02).

Maheswari, C. U. (2024). QM, Fukui function, molecular docking, molecular dynamics investigation on Human Estrogen Receptor (HER) with Clioquinol. *Chemical Physics Impact*, *8*, 100570. https://doi.org/10.1016/j.chphi.2024.100570

Malekzadeh, M., Yeung, K. L., Halali, M., & Chang, Q. (2019). Preparation and antibacterial behaviour of nanostructured Ag@SiO2-penicillin with silver nanoplates. *New Journal of Chemistry*, *43*(42), 16612–16620. https://doi.org/10.1039/c9nj03727f

Manuel, V., Zarza, P., Mordani, S. M., Maldonado, A. M., Hernández, D. Á., & Georgina, S. S. (2019). *Pseudomonas aeruginosa:patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria*. *36*(2), 180–189.

Mohtashamian, S., & Boddohi, S. (2017). Nanostructured polysaccharide-based carriers for antimicrobial peptide delivery. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, *47*(2), 85–94. https://doi.org/10.1007/s40005-016-0289-1

Mojsoska, B., Ghoul, M., Perron, G. G., Jenssen, H., & Alatraktchi, F. A. (2021). Changes in toxin production of environmental Pseudomonas aeruginosa

isolates exposed to sub-inhibitory concentrations of three common antibiotics. *PLOS ONE*, *16*(3), e0248014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248014

Montes, N., & Hormaza, A. (2008). Comparación de los índices locales de rectividad Fukui de una serie de aldehídos. *Rev Soc Quím Perú.* , *74*(4), 247–251.

Morato Ana, Narváez Isabel, T. C. (2004). El Futuro de los Biomateriales. © *Fundación OPTI y FENIN*.

Mosa, M. A., & El-Abeid, S. E. (2023). Chitosan-Loaded Copper Oxide Nanoparticles: A Promising Antifungal Nanocomposite against Fusarium Wilt Disease of Tomato Plants. *Sustainability*, *15*(19), 14295. https://doi.org/10.3390/su151914295

Mukhopadhyay, P., Maity, S., Mandal, S., Chakraborti, A. S., Prajapati, A. K., & Kundu, P. P. (2018). Preparation, characterization and in vivo evaluation of pH sensitive, safe quercetin-succinylated chitosan-alginate core-shell-corona nanoparticle for diabetes treatment. *Carbohydrate Polymers*, *182*, 42–51. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.098

Mustafa, B.-. (2021). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Pseudomonas aeruginosa and a Multi-Pronged Approach to Combat its Infection in Veterinary Science and Public Health: A Review. *International Journal of Agriculture and Biology*, *26*(01), 1–8. https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1801

Neese, F., Wennmohs, F., Becker, U., & Riplinger, C. (2020). The ORCA quantum chemistry program package. *The Journal of Chemical Physics*, *152*(22). https://doi.org/10.1063/5.0004608

Nevagi, R. J., Dighe, S. N., & Dighe, S. N. (2015). Biological and medicinal significance of benzofuran. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 97, Issue 1, pp. 561–581). Elsevier Masson SAS. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.085

Nurdin, M., Watoni, A. H., Yanti, N. A., Lilis, L., Maulidiyah, M., Irwan, I., Salim, L. O. A., & Arham, Z. (2023). *Antifungal properties of TiO2 nanoparticle as prevention wilt disease Fusarium oxysporum under UV light*. 030035. https://doi.org/10.1063/5.0125551

Ołdak, E., & Trafny, E. A. (2005). Secretion of proteases by Pseudomonas aeruginosa biofilms exposed to ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(8), 3281–3288. https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3281-3288.2005

Olivia Soria Arteche, Jaime Pérez Villanueva, JuanF. Palacios Espinosa, & JuanF. Cortés Benítez. (2020). *Bases De La Química Heterocíclica Aplicada a La Obtención De Compuestos Orgánicos De Interés Farmacéutico* (C. abierta al Tiempo, Ed.; 1ra ed.). UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.

Park, F. (2019). *ANTIMICROBIAL DRUGS ADVISORY COMMITTEE*.

Park, K., & Dream, A. E. (2013). Cancer Targeted Drug Delivery. In *Cancer Targeted Drug Delivery*. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7876-8

Pettersen EF, G. T. H. C. C. G. G. D. M. E. F. TE. J. (2004). UCSF Chimera. *Comput Chem*, *(13)*(1605-12.).

Popa, M. V. (2007). La cuantificación de los sitios activos en las bases de DNA y RNA utilizando las funciones Fukui condensadas. *Revista Mexicana de Física*, *53*(4), 241–253.

Pragasam, A. K., Veeraraghavan, B., Nalini, E., Anandan, S., & Kaye, K. S. (2018). An Update on Antimicrobial Resistance and the Role of Newer Antimicrobial Agents for Pseudomonas aeruginosa. *Indian Journal of Medical Microbiology*, *36*(3), 303–316. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_18_334

Radwan-Pragłowska, J., Janus, Ł., Piatkowski, M., Bogdał, D., & Matysek, D. (2020). 3D hierarchical, nanostructured chitosan/PLA/HA scaffolds doped with TiO2/Au/Pt NPs with tunable properties for guided bone tissue engineering. *Polymers*, *12*(4). https://doi.org/10.3390/POLYM12040792

Ramos, J.-L., & Filloux, A. (2007). *Pseudomonas A model System in biology* (Vol. 5). Springer.

Ranjous, Y., Regdon, G., Pintye-Hódi, K., & Sovány, T. (2019). Standpoint on the priority of TNTs and CNTs as targeted drug delivery systems. *Drug Discovery Today*, *24*(9), 1704–1709. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.019

Rappoport, D., & Furche, F. (2010). Property-optimized Gaussian basis sets for molecular response calculations. *Journal of Chemical Physics*, *133*(13). https://doi.org/10.1063/1.3484283

Ravi Kumar, M. N. V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, *46*(1), 1–27. https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00038-9

Renuka, J., Reddy, K. I., Srihari, K., Jeankumar, V. U., Shravan, M., Sridevi, J. P., Yogeeswari, P., Babu, K. S., & Sriram, D. (2014a). Design , synthesis , biological evaluation of substituted benzofurans as DNA gyrase B inhibitors of Mycobacterium tuberculosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.06.041

Renuka, J., Reddy, K. I., Srihari, K., Jeankumar, V. U., Shravan, M., Sridevi, J. P., Yogeeswari, P., Babu, K. S., & Sriram, D. (2014b). Design, synthesis, biological evaluation of substituted benzofurans as DNA gyraseB inhibitors of Mycobacterium tuberculosis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *22*(17), 4924–4934. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.06.041

Rocha, J. M., Lima, E. C., da Silva Ferreira, N., Andrade, P. S., Sales, G. e S., Costa, L. N., França, A. A. C., Nobre, F. X., da Costa, F. F., da Silva, R. M. P., & Matos, J. M. E. de. (2024). Titanate nanotubes from titanium dioxide powder with polymorphic mixture for rhodamine B degradation. *Optical Materials*, *149*, 114998. https://doi.org/10.1016/j.optmat.2024.114998

Rodríguez-González, V., Obregón, S., Patrón-Soberano, O. A., Terashima, C., & Fujishima, A. (2020). An approach to the photocatalytic mechanism in the TiO2-nanomaterials microorganism interface for the control of infectious processes.

Applied Catalysis B: Environmental, *270*. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2020.118853

Rusu, A., Moga, I.-M., Uncu, L., & Hancu, G. (2023). The Role of Five-Membered Heterocycles in the Molecular Structure of Antibacterial Drugs Used in Therapy. *Pharmaceutics*, *15*(11), 2554. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112554

Ryan G. Coleman Michael Carchia Teague Sterling Kyle Petkovic. (2013). *UCSF DOCK* (3.8). https://dock.compbio.ucsf.edu/DOCK3.8/index.html.

SAHU, V., SHARMA, P., & KUMAR, A. (2014). IMPACT OF GLOBAL AND LOCAL REACTIVITY DESCRIPTORS ON THE HETERO-DIELS-ALDER REACTION OF ENAMINOTHIONE WITH VARIOUS ELECTROPHILES. *Journal of the Chilean Chemical Society*, *59*(1), 2327–2334. https://doi.org/10.4067/S0717-97072014000100019

Sallem, F., Boudon, J., Heintz, O., Séverin, I., Megriche, A., & Millot, N. (2017a). Synthesis and characterization of chitosan-coated titanate nanotubes: Towards a new safe nanocarrier. *Dalton Transactions*, *46*(44), 15386–15398. https://doi.org/10.1039/c7dt03029k

Sallem, F., Boudon, J., Heintz, O., Séverin, I., Megriche, A., & Millot, N. (2017b). Synthesis and characterization of chitosan-coated titanate nanotubes: towards a new safe nanocarrier. *Dalton Transactions*, *46*(44), 15386–15398. https://doi.org/10.1039/C7DT03029K

Sánchez-Márquez, J. (2019). New advances in conceptual-DFT: an alternative way to calculate the Fukui function and dual descriptor. *Journal of Molecular Modeling*, *25*(5), 123. https://doi.org/10.1007/s00894-019-4000-0

Sandomierski, M., Jakubowski, M., Ratajczak, M., & Voelkel, A. (2022). Drug distribution evaluation using FT-IR imaging on the surface of a titanium alloy coated with zinc titanate with potential application in the release of drugs for osteoporosis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *281*, 121575. https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121575

Santos-Carballal, B., Fernández Fernández, E., & Goycoolea, F. (2018). Chitosan in Non-Viral Gene Delivery: Role of Structure, Characterization Methods, and Insights in Cancer and Rare Diseases Therapies. *Polymers*, *10*(4), 444. https://doi.org/10.3390/polym10040444

Schâfer-Korting, M. (2010). Handbook of Experimental Pharmacology:Drug delivery. In *Tissue Engineering* (Vol. 197). Springer Heidelberg Dordrecht London New York. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3

Schneidman-Duhovny, D., Dror, O., Inbar, Y., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2008). PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. *Nucleic Acids Research*, *36*(Web Server), W223–W228. https://doi.org/10.1093/nar/gkn187

Scior, T., Martínez Morales, E., & Salinas Stefanón, E. (2007). Los modelos in silico, una herramienta para el conocimiento farmacológico. *Elementos*, *14*(68), 45–48.

Seedat, N., Kalhapure, R. S., Mocktar, C., Vepuri, S., Jadhav, M., Soliman, M., & Govender, T. (2016). Co-encapsulation of multi-lipids and polymers enhances the performance of vancomycin in lipid-polymer hybrid nanoparticles: In vitro and in silico studies. *Materials Science and Engineering C*, *61*, 616–630. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.053

Shariatinia, Z., & Jalali, A. M. (2018). Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *115*, 194–220. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.034

Sherin Rebecca, F., Pon Nivedha, R., & Sharmila, R. (2021). *Molecular docking analysis of bioactive compounds from Mollugo cerviana (L.) SER with DHFR for antifungal activity Declaration on official E-mail*. https://doi.org/10.6026/97320630017944

Spitzer, R., & Jain, A. N. (2012). Surflex-Dock: Docking benchmarks and real-world application. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *26*(6), 687–699. https://doi.org/10.1007/s10822-011-9533-y

Stella, M. (2010). PSEUDOMONAS AERUGINOSA. *CO DE INEp*, 1–3.

Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., & Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, *6*(3), 257–272. https://doi.org/10.1080/08905439209549838

Suwannarach, N., Kumla, J., Sujarit, K., Pattananandecha, T., Saenjum, C., & Lumyong, S. (2020). Natural bioactive compounds from fungi as potential candidates for protease inhibitors and immunomodulators to apply for coronaviruses. *Molecules*, *25*(8), 1–21. https://doi.org/10.3390/molecules25081800

Tang, A., Caballero, A. R., Marquart, M. E., Bierdeman, M. A., & O'callaghan, R. J. (2018). Mechanism of pseudomonas aeruginosa small protease (PASP), a corneal virulence factor. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *59*(15), 5993–6002. https://doi.org/10.1167/iovs.18-25834

Tang, K. W. K., Millar, B. C., & Moore, J. E. (2023). Antimicrobial Resistance (AMR). *British Journal of Biomedical Science*, *80*. https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387

Valles, A., Rosales, L., Serrato, L., & Farías, L. (2014). Métodos y Usos de la Química Computacional Computational Chemistry Methods and its Applications. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila Métodos*, *6*(11), 16–21.

Wang, Q., Huang, J. Y., Li, H. Q., Chen, Z., Zhao, A. Z. J., Wang, Y., Zhang, K. Q., Sun, H. T., Al-Deyab, S. S., & Lai, Y. K. (2016). Tio2 nanotube platforms for smart drug delivery: A review. *International Journal of Nanomedicine*, *11*, 4819–4834. https://doi.org/10.2147/IJN.S108847

Werner, H., Knowles, P. J., Knizia, G., Manby, F. R., & Schütz, M. (2012). Molpro: a general-purpose quantum chemistry program package. *WIREs Computational Molecular Science*, *2*(2), 242–253. https://doi.org/10.1002/wcms.82

REFERENCIAS

World health Organization (OMS). (2021). *Bacterias y súper bacterias ponen en riesgo la salud humana*. https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-bacterias-super-bacterias-ponen-riesgo-salud-humana

Wu, F., Xu, T., Zhao, G., Meng, S., Wan, M., Chi, B., Mao, C., & Shen, J. (2017). *Mesoporous Silica Nanoparticles-Encapsulated Agarose and Heparin as Anticoagulant and Resisting Bacterial Adhesion Coating for Biomedical Silicone*. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00567

Xing, Y., Yi, R., Yang, H., Xu, Q., Huang, R., Tang, J., Li, X., Liu, X., Wu, L., Liao, X., Bi, X., & Yu, J. (2021). Antifungal Effect of Chitosan/Nano-TiO2 Composite Coatings against Colletotrichum gloeosporioides, Cladosporium oxysporum and Penicillium steckii. *Molecules*, *26*(15), 4401. https://doi.org/10.3390/molecules26154401

Yan, D., Li, Y., Liu, Y., Li, N., Zhang, X., & Yan, C. (2021). Antimicrobial Properties of Chitosan and Chitosan Derivatives in the Treatment of Enteric Infections. *Molecules*, *26*(23), 7136. https://doi.org/10.3390/molecules26237136

Yaneth, I., & Basaldúa, C. (2016). *LAS BACTERIAS, ESTUDIO Y CAMBIOS A LO LARGO DE LA HISTORIA* (Vol. 17). http://www.revista.unam.mx/vol.17/num5/art38

Yañez, O., Báez-Grez, R., Inostroza, D., Pino-Rios, R., Rabanal-León, W. A., Contreras-García, J., Cardenas, C., & Tiznado, W. (2021). Kick–Fukui: A Fukui Function-Guided Method for Molecular Structure Prediction. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *61*(8), 3955–3963. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00605

Yang, H., Zhang, K., Shi, R., Li, X., Dong, X., & Yu, Y. (2006). Sol-gel synthesis of TiO2 nanoparticles and photocatalytic degradation of methyl orange in aqueous TiO2 suspensions. *Journal of Alloys and Compounds*, *413*(1–2), 302–306. https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2005.06.061

Yang, W., Parr, R. G., & Pucci, R. (1984). Electron density, Kohn–Sham frontier orbitals, and Fukui functions. *The Journal of Chemical Physics*, *81*(6), 2862–2863. https://doi.org/10.1063/1.447964

Zhang, Y. Z., Du, H. Z., Liu, H. L., He, Q. S., & Xu, Z. (2020). Isatin dimers and their biological activities. In *Archiv der Pharmazie* (Vol. 353, Issue 3). Wiley-VCH Verlag. https://doi.org/10.1002/ardp.201900299

Zhao, Y., & Truhlar, D. G. (2008). The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical Chemistry Accounts*, *120*(1–3), 215–241. https://doi.org/10.1007/s00214-007-0310-x

ANEXOS

A. Colaboraciones

Grupo de investigación del Laboratorio de Diseño Molecular, dirigido por Dr. Carlos de Jesús Cortes profesor Investigador Tiempo Completo en la UMSNH.

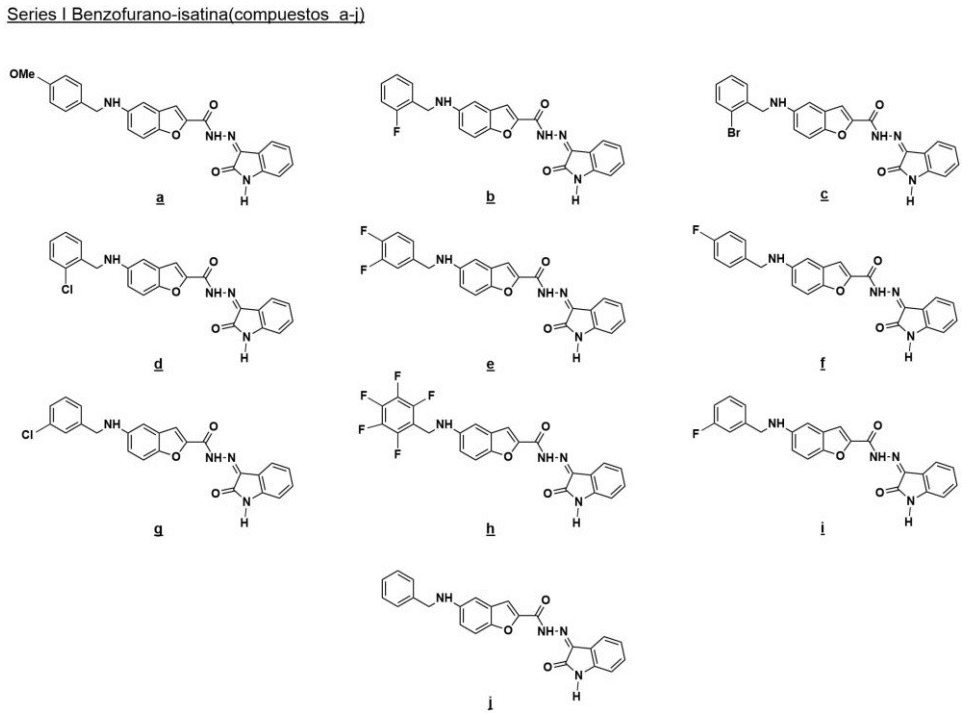


Figura A.1 Serie I: moléculas de benzofurano-isatina.

Series II Benzofurano-N-acilhidrazona (compuestoa a-j)

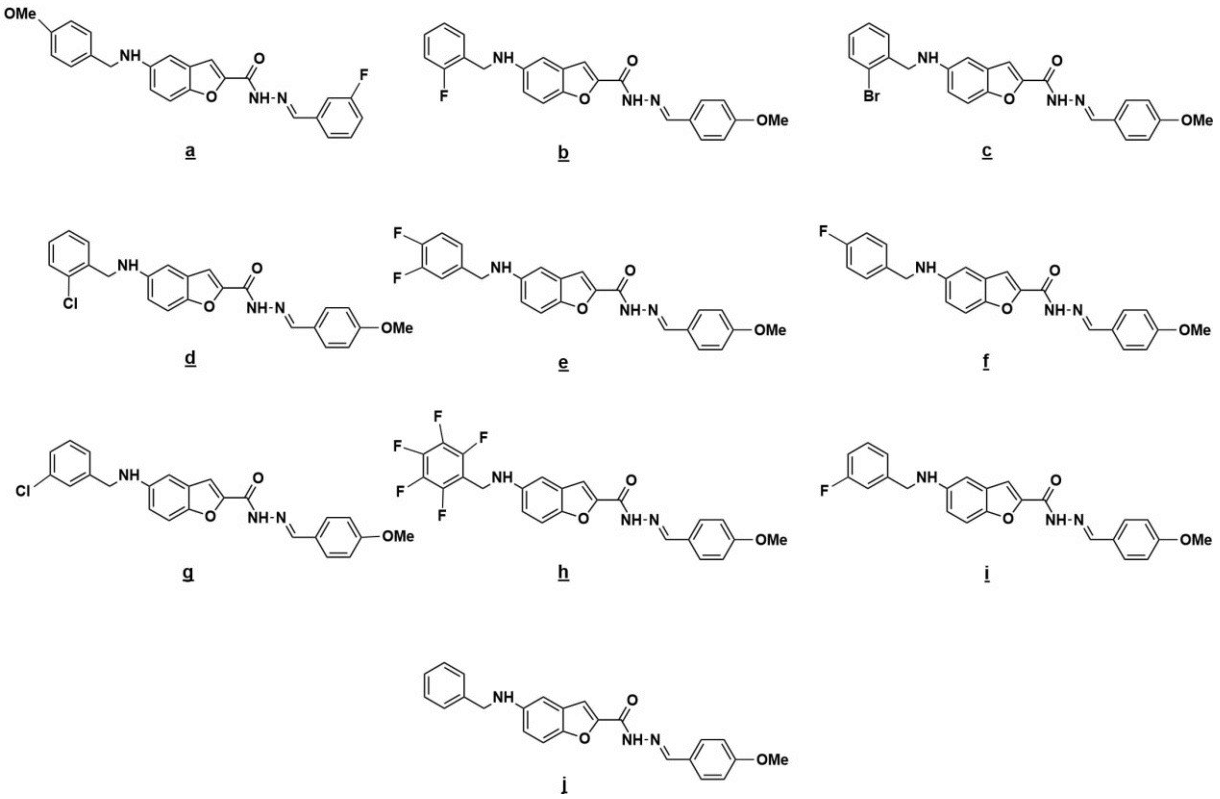


Figura A.2 Serie II: benzofurano- N-acilhidrazonas.

A continuación, se presenta la tabla con la actividad inhibitoria (Tabla 7), compartida por Grupo de investigación del Laboratorio de Diseño Molecular Dirigido: Dr. Carlos de Jesús Cortes Investigador Tiempo Completo en la UMSNH.

Tabla A-1 Actividad inhibitoria de *P. eruginosa*

SERIE I (ISATINA-BENZOFURANO)		SERIE II(N-ACILHADRAZONAS)		
R	% inhibición	R^1	R^2	% inhibition
(7a) 4-Ome	**92.6±6.3**	**(8a)** 4-Ome	3-F	**88±10.5**
(7b)2-F	56.5±9.5	**(8b) 2-F**	**4-OMe**	**90.0±5.5**
(7c) 2-Br	14.0±5.0	**(8c) 2-Br**	**4-OMe**	**90.0±8.4**
(7d) 2-Cl	19.9±4.6	**(8d)** 2-Cl	4-OMe	52.0±10.5
(7e) 3,4-DiF	18.3±7.3	**(8e)** 3,4-DiF	4-OMe	80.7±12.4
(7f) 4-F	78.5±12.4	**(8f) 4-F**	**4-Ome**	**88.0±8.5**
(7g) 3-Cl	42.4±19.3	**(8g)** 3-Cl	4-OMe	82.3±6.8
(7h) PentaF	24.3±6.8	**(8h)** PentaF	4-OMe	61.4±9.8
(7i) 3-F	**87.0±11.5**	**(8i)** 3-F	4-OMe	59.4±15.6
(7j) H	**92.0±7.5**	**(8j)** H	4-OMe	74.01±11.4

- Grupo de investigación del LANOCAT. DR. Pavel César Hernández-Del Castillo (Redacción de artículos enfocados en propiedades foto catalíticas de los compuestos sintetizados).

- Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Laboratorio de Bioquímica ecológica, CINVESTAV Unidad Irapuato.

- Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Mexico

B. AMINOÁCIDOS PROTEICOS

Los aminoácidos son las unidades fundamentales de las proteínas, biomoléculas esenciales para la vida. Existen veinte aminoácidos proteicos codificados por el código genético, cada uno con propiedades fisicoquímicas únicas que determinan su función dentro de las proteínas y su capacidad para interactuar con otras moléculas. Estas interacciones pueden incluir enlaces iónicos, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, aromáticas o incluso enlaces covalentes como los puentes disulfuro.

Comprender las funciones específicas y formas de interacción de los aminoácidos no solo es clave para el estudio de la bioquímica y biología molecular, sino también para áreas aplicadas como el diseño de fármacos, ingeniería de proteínas, y la biotecnología.

A continuación, se presenta una tabla con los 20 aminoácidos proteicos, sus funciones biológicas más representativas y las principales formas en que interactúan con otras moléculas.

Tabla B-1 Aminoácidos proteicos, funciones principales e interacciones moleculares

Aminoácido	Función principal	Interacciones más comunes
Alanina (Ala, A)	Estructura de proteínas; intermediario en metabolismo energético	Interacciones hidrofóbicas (núcleo de proteínas)
Arginina (Arg, R)	Regulación de funciones celulares; precursor de óxido nítrico	Interacciones iónicas; puentes de hidrógeno; enlaces con ADN/ARN
Asparagina (Asn, N)	Glicosilación de proteínas; reconocimiento molecular	Puentes de hidrógeno (grupo amida)
Ácido aspártico (Asp, D)	Participación en sitios catalíticos enzimáticos; señalización celular	Interacciones iónicas (grupo carboxilo); actúa como ácido
Cisteína (Cys, C)	Formación de puentes disulfuro; regulación redox	Enlaces covalentes (puentes disulfuro); unión a metales pesados
Glutamina (Gln, Q)	Transporte de nitrógeno; fuente energética para células en división	Puentes de hidrógeno (grupo amida); interacciones con bases nitrogenadas
Ácido glutámico (Glu, E)	Neurotransmisor (glutamato); metabolismo del nitrógeno	Interacciones iónicas (grupo carboxilo negativo); donador de protones

Glicina (Gly, G)	Flexibilidad estructural; inhibidor del sistema nervioso central	No tiene cadena lateral compleja; permite giros en proteínas
Histidina (His, H)	Participación en catálisis enzimática; regulación de pH	Interacciones iónicas; coordinación de metales; base débil (grupo imidazol)
Isoleucina (Ile, I)	Componente estructural de proteínas; metabolismo muscular	Interacciones hidrofóbicas
Leucina (Leu, L)	Estimula síntesis proteica (vía mTOR); energía	Interacciones hidrofóbicas
Lisina (Lys, K)	Interacción con ADN; modificación postraduccional	Interacciones iónicas; acetilación; ubiquitinación
Metionina (Met, M)	Inicia la síntesis proteica; donador de grupos metilo	Interacciones hidrofóbicas; metilación (SAM)
Fenilalanina (Phe, F)	Precursor de catecolaminas (dopamina, adrenalina)	Interacciones aromáticas; hidrofóbicas
Prolina (Pro, P)	Estabilidad de estructuras; presente en colágeno	Introduce giros; rigidez estructural; no forma puentes de H con facilidad
Serina (Ser, S)	Participa en catálisis; fosforilación; rutas metabólicas	Puentes de hidrógeno; sitio común de fosforilación
Treonina (Thr, T)	Metabolismo energético; señalización	Puentes de hidrógeno; fosforilación
Triptófano (Trp, W)	Síntesis de serotonina; absorción UV; fluorescencia	Interacciones π-π (anillo aromático); puentes de hidrógeno
Tirosina (Tyr, Y)	Precursor de hormonas; señalización celular	Fosforilación; interacciones aromáticas y puentes de hidrógeno
Valina (Val, V)	Energía muscular; estructura de proteínas	Interacciones hidrofóbicas

C. Artículos publicados

In-silico* assay of a dosing vehicle based on chitosan-TiO_2 and modified benzofuran-isatin molecules against *Pseudomonas aeruginosa

Verónica Castro-Velázquez, Erik Díaz-Cervantes, Vicente Rodríguez-González, Carlos J Cortés-García

PeerJ Physical Chemistry 5, e27-2023

Adsorption and photocatalytic-conjugated activity of a chitosan-functionalized titanate coating for the removal of the drug clonazepam from drinking water

PCHD Castillo, V Castro-Velázquez, V Rodríguez-González

Environmental Science and Pollution Research, 1-16, 2023

Unraveling the role of chitosan in enhancing the photodegradation of ciprofloxacin by using chitosan-titanates composites: Experimental and in-silico approach

V Castro-Velázquez, PC Hernández-Del Castillo, E Díaz-Cervantes, V Rodríguez-GonzálezJournal of Environmental Management 375, 124265,2025

Synthesis of Benzofuran-Based Hybrid Molecules: Molecular Docking and Antibacterial Activity Against Pseudomonas aeruginosa

Carlos J Cortés-García, Aidme I Mercado-Madrigal, Viridiana Alejandre-Castañeda, Jose Alberto Patiño-Medina, Verónica Castro-Velázquez, Vicente Rodríguez-González, Martha Isela Ramírez-Díaz, Alejandro Islas-Jácome, Mónica A Rincón-Guevara, Luis Chacón-García, Victor Meza-Carmen, Erik Díaz-CervantesJournal of Heterocyclic Chemistry 61 (11), 1653-1667,2024

Para conocer la liga de acceso de cada publicación utilice este código QR.