



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias

## **TRABAJO DE FIN DE GRADO**

Grado en Química

Curso 2018-2019

**Edulcorantes artificiales: relaciones estructura-dulzor**

*Autor: Raquel Cadenas Maroto*

*Tutor/es: Iker León*

*José Luis Alonso*



## AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar la ocasión para agradecer el apoyo de mis tutores Iker León y José Luis Alonso, por la dedicación y ayuda que me han prestado en la realización de este trabajo. Asimismo, no me puedo olvidar en este momento de mis padres, María Jesús y Jose Alberto, por dotarme de los medios necesarios para finalización de mi carrera y por consiguiente la finalización de este trabajo, así como por su apoyo diario y comprensión.

Finalmente, quisiera agradecer el apoyo de mis compañeras de facultad en Valladolid, por los cuatro años acompañándonos y ayudándonos. También deseo dar las gracias a mis amigas de Valladolid, que siempre han estado ahí para lo que he necesitado, apoyándome y dándome buenos consejos.

## INDICE

1. Resumen .....	4
2. Introducción.....	6
2.1. Sabores ácido y salado.....	7
2.2. Sabor umami .....	7
2.3. Sabor amargo .....	8
2.4. Sabor dulce.....	8
2.4.1. Teoría de Shallenberger y Acree.....	9
2.4.2. Teoría de Shallenberger-Acree-Kier.....	11
3. Justificación.....	12
4. Objetivos .....	14
5. Metodología.....	15
5.1. Estrategia general.....	15
5.2. Cálculos teóricos.....	15
5.2.1. Mecánica Molecular .....	15
5.2.2. Métodos DFT y <i>ab initio</i> .....	16
5.2.2.1. Teoría del Funcional de la Densidad.....	17
5.2.2.2. Métodos <i>ab initio</i> .....	20
5.2.2.3. Funciones de base.....	21
5.3. Consideraciones de cara al procedimiento experimental posterior..	22
5.3.1. Vaporización de la muestra: la ablación láser .....	22
5.3.2. Expansión supersónica .....	22
5.3.3. Región de interés .....	23
5.4. Información obtenida de un espectro de rotación .....	24
5.4.1. Constantes rotacionales.....	24
5.4.2. Momentos dipolares .....	24
6. Resultados y Discusión .....	26
6.1. Búsqueda conformacional de la perillartina .....	26
6.2. Energías y parámetros rotacionales de los confórmeros .....	28
6.3. Consideraciones a tener en cuenta .....	29
6.4. Relación entre la estructura y el dulzor.....	32
7. Conclusiones.....	35
8. Bibliografía .....	36
9. Listado de tablas y figuras.....	39

## 1. RESUMEN

El presente trabajo se centra en entender la relación existente entre la estructura de los edulcorantes y su dulzor, en concreto para la perillartina, un edulcorante 2000 veces más dulce que la sacarosa. Para llevar a cabo dicho estudio, se ha consultado bibliografía acerca de las relaciones estructura-dulzor y se han caracterizado las estructuras más relevantes de la perillartina mediante herramientas relacionadas con la espectroscopia rotacional. Este trabajo se centra en los cálculos teóricos, cuyas conclusiones serán muy relevantes de cara al estudio experimental e identificación. Las conclusiones extraídas dan constancia de que se detectarán, al menos, dos conformeros de la perillartina. Existen otros dos conformeros que podrían ser identificados y validarán los distintos métodos computacionales empleados. Una vez se realice el experimento se podrán contrastar las interacciones entre el edulcorante y el receptor y evaluar su importancia. Así bien, la posibilidad de predecir si ciertos edulcorantes provocan sensación de dulzor en seres humanos, e incluso llevar a cabo la síntesis química de edulcorantes artificiales con una estructura determinada, supondría grandes avances en el mercado.

Palabras Clave: estructura, dulzor, espectroscopia rotacional, perillartina

### ABSTRACT

The present work focuses on understanding the relationship between the structure and sweetness of sweeteners, concretely for perillartine, which is 2000 times sweeter than saccharose. To carry out this study the bibliography about structure-sweetness' relationship has been collected and the structures of perillartine have been characterized using tools related to rotational spectroscopy. This work is focused in the theoretical methods, leading to a series of conclusions that will be fundamental for its posterior experimental studies and the identification of conformers. The results in this work show that, at least, two conformers should be detected in the experiment. Furthermore, another two conformers are also candidates to be detected, and will benchmark the different computational methods used. The conclusions extracted, together with posterior experiments, will allow to highlight the importance of the interactions between



sweetener and receptor. Thus, the possibility of predicting when some sweeteners will provoke sweetness' sensation in humans, and to even carry out the chemical synthesis of artificial sweeteners with a determinate structure, could suppose great advances in the market.

Keywords: structure, sweetness, rotational spectroscopy, perillartine

## 2. INTRODUCCION

El sabor ha sido descrito a lo largo de muchos años como un fenómeno que se produce debido a productos químicos. Dicha concepción del gusto es muy simple, y hoy en día combinando los conocimientos que tenemos acerca de procesos biológicos y químicos podemos describir el sentido del gusto con detalle. El proceso sensorial se inicia por la presencia de un estímulo físico o químico que actúa sobre determinados receptores sensoriales. Los alimentos están formados por diversas moléculas, algunas de las cuales son reconocidas por estos receptores. Cuando estas moléculas son reconocidas se producen estímulos que perciben los ojos, oídos, piel y músculos, nariz y boca, cuyos receptores inician los impulsos que viajan hasta el cerebro donde se interpretan convirtiéndolos en la verdadera sensación. Para la mayoría de los animales, el dulce, moderadamente salado o ciertos estímulos provocados por aminoácidos desencadenan un comportamiento apetitivo, mientras el amargo o sustancias ácidas normalmente son rechazados. La capacidad de los animales para distinguir entre algo nutricional frente a algo potencialmente letal puede significar la diferencia entre la vida y la muerte. Por ello, la evolución ha hecho que dicha percepción o la correlación de las impresiones sensoriales determinen el que un alimento se acepte o se rechace. [1,2]

Dentro de los 5 principales sistemas sensoriales, el gusto es una de las experiencias más duraderas y satisfactorias del cuerpo. Excepto el dolor, ningún otro sistema sensorial está tan completamente desarrollado al nacer. Curiosamente, entre los sentidos del hombre, el del gusto es el menos entendido, aunque se ha avanzado bastante en la dilucidación de su funcionamiento. Basándonos en la bibliografía, el desarrollo de la química del gusto sucede en paralelo con el avance en la química. Hasta 1843 no se desarrolla una primera teoría química del sabor, llamada teoría de la ionización de Faraday y Arrhenius, donde se realiza una primera clasificación del sabor. En ella se establece que los sabores ácido y salado son causados por sustancias que se ionizan en disolución. Mas tarde, Cohn establece que los sabores dulce y agrio no son causados por sustancias que se ionizan, sino que el sabor es fruto de la existencia de determinados grupos funcionales en un compuesto. De acuerdo

con esto, hay una cosa clara: el sabor ácido o salado de las sustancias no se explica de la misma forma que el sabor amargo o dulce. Hoy en día, se sabe que el sentido del gusto implica la activación sensorial multimodal para detectar e identificar muchos sabores. Se han identificado cinco sabores primarios: dulce, salado, ácido, amargo y umami, los cuales a menudo se combinan para formar gustos complejos. Ahora se piensa que cada papila gustativa tiene sensibilidad para todas las sensaciones gustativas primarias. El cerebro detecta el tipo de sabor por la relación de estimulación de diferentes papilas gustativas. [3,4]

### **2.1. Sabores ácido y salado**

Los canales de sodio y potasio están involucrados en la respuesta de las células gustativas al sabor salado y al sabor ácido. Las sustancias sápidas saladas como el cloruro sódico o el cloruro de litio causan una despolarización de las células gustativas mediante la entrada de iones de sodio por los canales de sodio, los cuales pueden considerarse como los receptores del salado de las células gustativas. El sabor ácido, es únicamente función de la concentración de iones hidrogeno, y desde el punto de vista del sabor, se trata de una interacción asimétrica con el receptor del gusto ya que el anión que le acompaña no participa en dicha sensación. En el caso del sabor salado, interaccionan con el receptor tanto el anión como el catión, se trata de una interacción simétrica.

### **2.2. Sabor umami**

Algunos aminoácidos intervienen también en la sensación sávida de los alimentos, por ejemplo, el glutamato ha sido involucrado en la sensación sávida conocida como umami. Utilizando técnicas de clonación molecular se han identificado receptores metabotrópicos para el glutamato (mGluR4) que se expresan exclusivamente en células de las yemas gustativas y se ha demostrado su influencia en la transducción de la sensación sávida de este aminoácido.

### **2.3. Sabor amargo**

Mientras que en el caso del sabor salado los responsables son tanto el anión como el catión a partes iguales, ambos interaccionando con el receptor del gusto, [5] la transducción del sabor amargo es menos conocida. No obstante, se ha comprobado que algunas sustancias amargas provocan un incremento de los



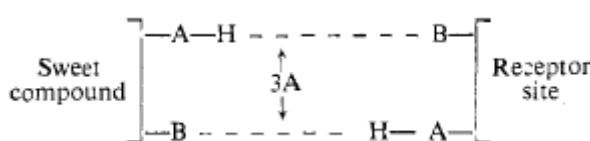
niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular vía receptores asociados a proteínas G que activan la fosfolipasa C induciendo la formación de inosín trifosfato (ITP), segundo mensajero causante de la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que es lo que en última instancia determina la despolarización celular. La explicación del amargor de ciertas sales metálicas sería idéntica a la de la salinidad si no fuera por el énfasis en el anión en un caso, o el catión en el otro. Ambas interacciones son asimétricas. No parece haber ningún producto formado. Ejemplos de combinaciones amargas desiguales son KCl para el ion cloro y NaI para el ion sodio. Al igual que con la acidez y la salinidad, es difícil concebir un receptor topológico para el sabor amargo de las sales, y el amargor de alta potencia no parece ocurrir entre las sales (sustancias inorgánicas).

#### 2.4. Sabor dulce

En 1914 se introdujo para el dulzor el concepto de glucógeno, que es la parte del compuesto responsable del sabor dulce y posteriormente, Oertly y Myers (1919) propusieron que el glucógeno tenía dos funciones químicas complementarias pero diferentes. Mas tarde, Kodama descubrió la existencia en el glucógeno de un grupo químico donador de hidrógenos, el cual se relacionó con la teoría de los enlaces de hidrogeno desarrollada en 1920. A lo largo de los años se han desarrollado numerosas teorías, pero no es hasta 1967 cuando se introduce la primera teoría molecular del sabor dulce. Esta primera teoría unificada formulada por Shallenberger y Acree relaciona la presencia de pares particulares de grupos funcionales, uno actuando como dador de protones (AH) en la interacción con el receptor y el otro como aceptor (B). Estos dos grupos forman lo que se conoce como "glucophore", que es la parte del edulcorante que interacciona con el receptor. La percepción de los sabores se debe a una respuesta inducida por los quimiorreceptores presentes en las papilas gustativas que reconocen estructuras moleculares específicas. Más tarde, Kier propuso un tercer sitio de anclaje,  $\gamma$ , formando el conocido "triángulo del dulzor". Este nuevo sitio podía interaccionar con el receptor a través de fuerzas de Van der Waals o hidrofóbicas. Posteriormente, han surgido numerosas teorías, pero todas ellas convergen en la idea inicial de Shallenberger, en la que para que una molécula sea dulce necesita establecer dos enlaces de hidrógeno con el receptor. A continuación, se detallan las teorías más aceptadas hoy en día:

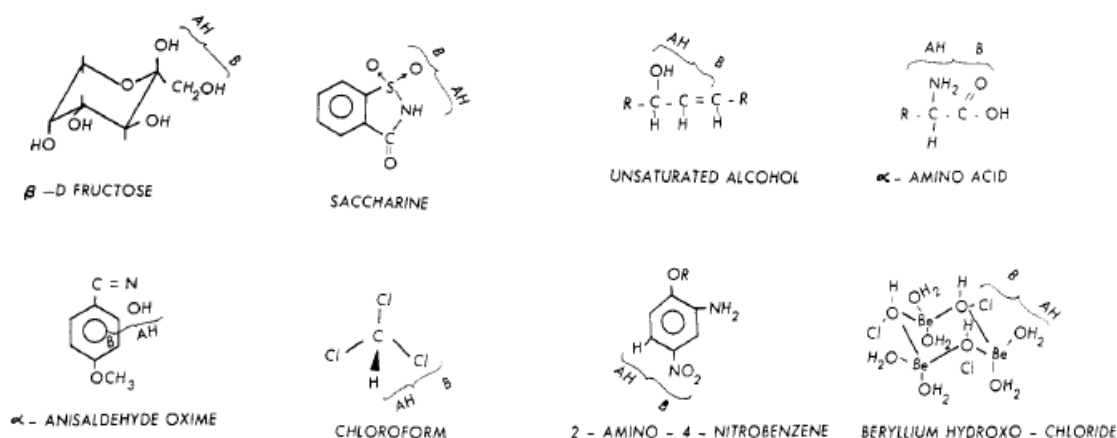
### 2.4.1 Teoría de Shallenberger y Acree

De acuerdo con la teoría de Shallenberger y Acree, el sabor dulce de un compuesto es fruto de una interacción concertada que conlleva la formación de dos enlaces de hidrogeno simultáneos tal y como se ilustra en la Figura 1. Estos enlaces de hidrogeno se producen entre la unidad AH/B del edulcorante (molécula responsable del sabor dulce) y la unidad AH/B del receptor del gusto. AH es un grupo donador de protones, que se comporta como un ácido “duro”, y B es un grupo aceptor de protones, el cual se comporta como una base “dura”. La distancia entre H y B debe ser aproximadamente de 3 Å.



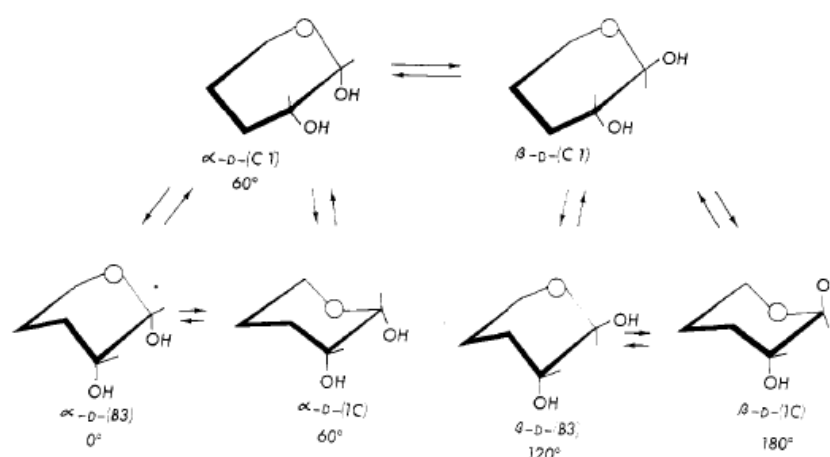
**Figura 1.** Esquema propuesto por la teoría de Shallenberger y Acree. Recuperado de ref [8].

Hay que tener en cuenta que estas interacciones no involucran una transferencia de protones ni una interacción electrostática, sino que están basadas en las dispersiones de London, principal elemento de los enlaces de hidrogeno. Este es el requisito principal para que una molécula pueda presentar dulzor. Tal y como se muestra en la Figura 2, existe una gran variedad de compuestos que presentan dicho sistema AH/B [6,7].



**Figura 2.** Algunos ejemplos de moléculas que presentan el esquema AH/B. Recuperado de ref [8].

Para entender por qué ciertas moléculas con los mismos grupos funcionales y distinta simetría no presentan dulzor, se han llevado a cabo numerosos estudios de grupos de moléculas. Un ejemplo muy estudiado es el de los azúcares. La forma de los anillos furanoides y piranoides determina la estereoestructura de los grupos OH, y por tanto dicta que cierta molécula pueda interactuar adecuadamente con el receptor y ser dulce. Shallenberger estableció que, para que dichos compuestos presenten sabor dulce, los grupos OH vecinales deben disponerse en posición gauche o staggered ( $60^\circ$ ). Si se encuentran en posición anti, se hallarían demasiado lejos como para formar enlaces de hidrógeno; si se encuentran en posición eclipsada, lo más seguro es que se formen enlaces de hidrógeno intramoleculares, imposibilitando la interacción con el receptor. La Figura 3 muestra un ejemplo de las distintas configuraciones para la D-glucopiranososa [8,9].

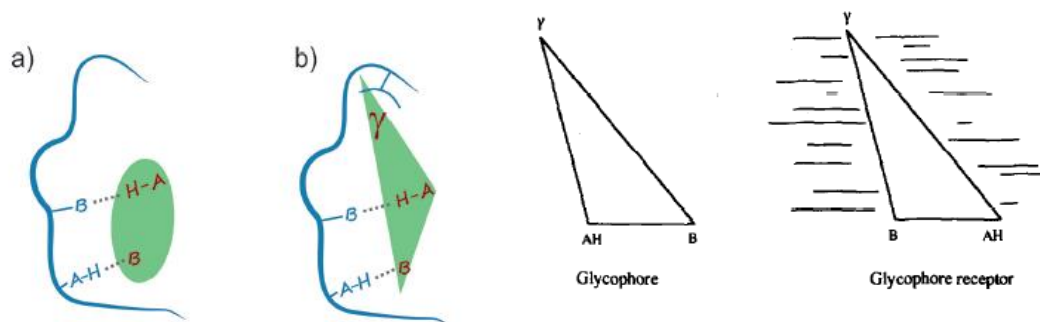


**Figura 3.** Glycol de la D-glycosa en varias de sus conformaciones del anillo. Recuperado de ref [8].

La aplicación de la teoría de Shallenberger y Acree se llevó a cabo para el estudio de más grupos de moléculas, tales como derivados de isovanililo, sulfamatos y otros edulcorantes sintéticos. En el estudio de distintos grupos de moléculas surgió la necesidad de incluir una tercera dimensión en el modelo dual de AH/B, puesto que se encontraron diferencias en el dulzor de compuestos con la misma forma molecular pero distinta configuración espacial. Dicha dimensión fue incluida al modelo de Shallenberger y Acree por Kier (1972) [5,6-8,10-11], que se detalla a continuación.

## 2.4.2 Teoría de Shallenberger-Acree-Kier

Esta teoría sostiene que el sabor dulce se debe a la interacción de dos sistemas AH/B, entre edulcorante y el receptor, formándose dos enlaces de hidrógeno simultáneos, añadiendo una tercera dimensión espacial constituida por un grupo hidrofóbico G. Se forma así lo que se conoce como el “triángulo de dulzor”[10]. La Figura 4 resume el modelo:



**Figura 4.** Esquema que resume la teoría de Shallenberger-Acree-Kier. Recuperado de refs [5] y [10].

De acuerdo con esta teoría, en algunos casos la orientación espacial del grupo hidrofóbico imposibilita la interacción con el receptor, por lo que en dicho caso la molécula no sería “dulce”. Esto ha sido observado en algunos compuestos derivados de isovanililo, creyéndose la razón por la cual algunos compuestos presentaban dulzor y otros no. Sin embargo, posteriormente se demostró que el sitio G hidrofóbico tan solo mejoraba el sabor dulce de los compuestos, no siendo un requisito de dulzor.[11]

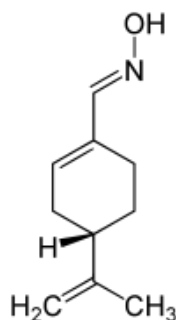
### 3. JUSTIFICACION

Entender la relación estructural entre el edulcorante y el receptor es fundamental. No solo ayudaría a comprender mejor los mecanismos envueltos en dicho proceso, sino que ayudarían a mejorar o diseñar nuevas sustancias que respondan mejor al gusto de los consumidores. Este conocimiento es vital para toda empresa que quiera ser competitiva en el mercado actual. Como meta final el objetivo de esta ciencia es predecir el futuro comportamiento del producto en el mercado. Para ello, es necesario llegar a una combinación de datos experimentales que ayuden a comprender dicha interacción del glucóforo. Desgraciadamente, la información experimental que existe se reduce a estudios en fases condensadas y no ofrece el nivel de detalle requerido para la identificación inequívoca de estos glucóforos responsables del dulzor.

Durante esta última década, el Grupo de Espectroscopia Molecular (GEM) [12] ha desarrollado una nueva instrumentación que ha hecho posible los primeros estudios estructurales de moléculas de interés biológico en fase gas.[13] Entre las técnicas desarrolladas cabe destacar las que combinan la ablación láser, expansiones supersónicas y técnicas de microondas con transformada de Fourier denominadas LA-MB-FTMW y LA-CP-FTMW.[14-16] Gracias a ellas, ha sido posible la vaporización de estas biomoléculas, cuyo calentamiento conduciría a la descomposición térmica de las sustancias, y sus primeros estudios estructurales en condiciones de práctico aislamiento en fase gas. La espectroscopía de microondas nos proporciona las constantes de rotación, las constantes de acoplamiento de cuadrupolo nuclear (si existen) y las componentes del momento dipolar eléctrico de una estructura. La diferente orientación de los grupos funcionales en los conformeros produce cambios en la distribución de carga eléctrica que se reflejan en los valores de las componentes de momento dipolar en los ejes principales de inercia. Los valores de las constantes de rotación (A, B y C) dependen de la distribución de masa de la molécula y son, por tanto, la herramienta fundamental en el análisis estructural. La comparación de las constantes de rotación teóricas y experimentales posibilita la identificación de los conformeros observados. Es decir, las técnicas desarrolladas en el GEM permiten la asignación inequívoca del número de

confórmeros presentes de una molécula, y su determinación estructural con gran precisión. Esto ayudará a entender la relación estructural entre el edulcorante y el receptor. Por ejemplo, el grupo GEM ha publicado recientemente el estudio de las ketohexosas,[17] cuya estructura está de acuerdo con la teoría Shallenberger-Agree-Kier.

Para este proyecto, haremos una determinación teórica de los confórmeros posibles de la perillartina y evaluaremos la viabilidad de su estudio experimental en un futuro. Sorprendentemente, la perillartina (cuya estructura se muestra en la Figura 5) es un edulcorante aproximadamente 2000 veces más dulce que la sacarosa. La perillartina es la  $\alpha$ -syn-oxima del perillaldehído, que se extrae de una planta de origen asiático llamada Perilla Frutescens.[3]



**Figura 5.** Representación esquemática de Perillartina.

La perillartina es una molécula muy interesante desde el punto de vista de un edulcorante, puesto que consta de varias características estructurales específicas: el grupo funcional aldoxima, el synisomerismo de la oxima, la insaturación olefínica conjugada con la oxima, la sustitución en carbono  $\alpha$  y la transposición del doble enlace con respecto a la oxima y el sustituyente beta. Se consideró significativo que la función oxima se puede incluir como responsables de la dulzura entre los sistemas AH-B sugeridos por Shallenberger y Agree (1967), así como también está relacionado con la disposición *syn* del grupo oxima. [3]

#### 4. OBJETIVOS

- Realizar una búsqueda conformacional de la molécula perillartina y hallar los confórmeros más relevantes, con el fin de determinar su panorama conformacional.
- Resumir todos los parámetros espectroscópicos (constantes de rotación, constantes del cuadrupolo nuclear, momentos dipolares, energías relativas). Estos valores nos permitirán abordar el estudio experimental de este sistema posteriormente: determinar qué estructuras podrían detectarse en fase gas y su abundancia esperada; qué región espectral es la más conveniente; qué transiciones son permitidas.
- Identificar los posibles puntos de anclaje o interacción de la perillartina y verificar cómo encajan en relación a la teoría del dulzor mencionada en la introducción.
- Aportar con todo ello una evidencia más sobre la relación estructura-propiedad del dulzor.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Estrategia general

La espectroscopia rotacional nos permite la caracterización estructural de las moléculas. La estrategia general consiste en dos líneas de trabajo, cuyos resultados se comparan en una etapa final. La primera línea de trabajo consiste en la determinación de parámetros moleculares mediante cálculos computacionales, utilizando métodos DFT o *ab initio*. Esta es la parte que se abordará en el presente trabajo. La segunda línea de trabajo consistiría en llevar a cabo el procedimiento experimental para obtener el espectro rotacional de la molécula de interés. Ambas líneas se combinarán para determinar el número de conformeros de dicho sistema y su identificación, mediante una comparación entre los parámetros moleculares y los experimentales. A continuación, vamos a explicar en qué consiste cada línea de trabajo.

### 5.2. Cálculos teóricos

La primera línea de trabajo se centra en la optimización de los posibles conformeros de la molécula de interés, a fin de hallar su energía y sus parámetros rotacionales. Para ello, se usarán dos estrategias: primero se determinarán todos los posibles conformeros; segundo se optimizarán los conformeros más relevantes mediante cálculos DFT o *ab initio*.

#### 5.2.1 Mecánica molecular

El número posible de conformeros de una molécula con muchas torsiones, como por ejemplo los aminoácidos, puede llegar a ser muy elevado. La obtención de estos conformeros puede llevarse a cabo por intuición química en el caso de moléculas simples, pero en muchos casos muchas geometrías son imposibles de anticipar, además de que llevaría mucho tiempo construir cada geometría una a una. Afortunadamente, hoy en día existen varios softwares que permiten una búsqueda conformacional mediante Mecánica Molecular (MM).[18,19] Para este trabajo de fin de grado utilizaremos el programa Maestro.[20] Estos métodos implican el uso de mecánica clásica/mecánica newtoniana para describir el sistema. A groso modo, se considera un conjunto de osciladores armónicos,



simulando dos esferas o cargas puntuales de cierta masa unidos por enlaces. La nube de electrones de los orbitales más externos se simula mediante ciertos potenciales, tales como el potencial de Lennar-Jones, mientras que las interacciones son estimadas usando la ley de Coulomb. Esto permite la obtención de una función energética que describe la energía potencial del sistema en función de las posiciones de los átomos. Existen distintos tipos/métodos tales como los AMBER, MMFF, MMFFs, .... Para este trabajo utilizaremos el método MMFFs que suele describir bien las moléculas biológicas.

Otro paso importante es el de localizar todas las conformaciones más estables definidas por una compleja hipersuperficie de energía potencial. Esto se hace mediante un script de búsqueda conformacional que genera un conjunto de configuraciones del sistema molecular mediante búsquedas deterministas para cubrir las áreas del espacio conformacional de forma sistemática, dinámica molecular, sampleo de modos de baja frecuencia para encontrar nuevas estructuras, y métodos estocásticos (Monte Carlo) para añadir un componente aleatorio (desplazamientos en las posiciones de los átomos al azar) y no estancarse en los mismos mínimos. Se analiza la energía de cada estructura nueva generada (después de seguir un proceso de minimización de energía) y se va agrupando según sean las mismas estructuras o no. Las estructuras más estables adquieren mayor peso en la siguiente búsqueda, o generación ya que está basado en un algoritmo genético, y se generan nuevas estructuras mediante los métodos descritos. El componente aleatorio asegura el no estancarse en las mismas estructuras permitiendo una "mutación". Este método es de los más eficaces hoy en día y, de hecho, se usa también para macromoléculas de un tamaño considerable.

### 5.2.2 Métodos DFT y *ab initio*

El método de MM es muy útil para la obtención de los distintos confórmeros. Sin embargo, debido a su tratamiento clásico las estructuras obtenidas no son completamente fiables y la evaluación de la energía tiene un error muy grande. Por ello, en una segunda etapa, las estructuras de los confórmeros obtenidos mediante MM se optimizan usando metodologías de la química cuántica. Las diferentes metodologías de la química cuántica se diferencian en cómo abordan

el planteamiento del Hamiltoniano y/o en el cálculo de los elementos del determinante secular. En nuestro caso, en un primer paso, utilizamos métodos de teoría de densidad funcional (DFT),[21-23] tales como B3LYP, con un conjunto de bases, en concreto la 6-311G++(d,p). Los métodos DFT no suelen ser los más precisos en un gran número de sistemas, pero son métodos computacionales muy rápidos y bastante acertados en cuanto a la energía. Por ello, sirven para hacer un “screening” previo de las estructuras más relevantes y lanzar solamente estas mediante métodos *ab initio*,[24-26] que son más exactos, pero mucho más lentos. De esta manera, en el último paso, se seleccionan aquellos conformeros con energías inferiores a aproximadamente  $1500\text{ cm}^{-1}$ , respecto a la energía del mínimo global. Estas estructuras se optimizan mediante cálculos *ab initio*. En este trabajo usaremos el método perturbativo Moller-Pleset (MP2) con una base 6-311++G(d,p), puesto que este nivel de cálculo proporciona unos parámetros estructurales muy precisos. Los cálculos se hicieron usando el software Gaussian 09 y 16.[27] A continuación, se van a resumir los fundamentos de los cálculos DFT y *ab initio*, así como los de la base escogida para los cálculos.

### 5.2.2.1. Teoría del Funcional de la Densidad

Se basa en el Teorema de Hohenberg-Kohn, el cual establece que la energía del estado fundamental de un sistema es un funcional de la densidad electrónica,  $E=E(\rho)$ . Esto quiere decir que la densidad electrónica de carga determina las propiedades de un sistema polieletrónico. Así bien, se sustituye la función de onda  $\psi$  que depende de  $3N$  dimensiones por  $\rho$ , que solo depende de 3.

La densidad electrónica asociada a la energía del estado fundamental es la densidad del estado fundamental, ya que otra densidad proporciona otra energía más alta.

Como la forma del funcional de la densidad electrónica se desconoce, se recurre a aproximaciones más o menos elaboradas al funcional exacto de la densidad que se quiere obtener. La mayoría de funcionales difieren en el tratamiento de la contribución de intercambio y de correlación. En

nuestro caso utilizamos el funcional B3LYP, un funcional híbrido que da información de la densidad, su gradiente y además añade parte de la contribución de intercambio Hartree-Fock (HF).

### *Dispersiones de Grimme*

El carácter local o semilocal de los funcionales de densidad convencionales conduce necesariamente a descuidar las interacciones de correlación de largo alcance que capturan fuerzas atractivas de Van der Waals[30]. Inicialmente propuesto por Yang y desarrollado de manera asidua por Grimme, el método de dispersión+ DFT agrega a la base funcional un término principal adaptado a escala, amortiguado y ajustado a la conocida serie de energía de dispersión  $E_{disp} = -C_6 / R^6 - C_8 / R^8 - C_{10} / R^{10} - \dots$ . La variante DFT-D2 toma la forma explícita a continuación. Aquí, los coeficientes de dispersión,  $C_6^{ij}$ , obtenidos de la media geométrica de los valores elementales tabulados, se suman en las distancias interatómicas,  $R_{ij}$ , moduladas por una función de amortiguación,  $f_{damp}(R_{ij})$ , que activa gradualmente la corrección de la dispersión (a un tipo caracterizado por  $\alpha_6$ ) sobre una distancia caracterizada por la suma de los dos radios vdW atómicos,  $R_{vdW}$ , mientras que un término de escala global,  $s_6$ , se optimiza para ser único para cada funcional  $E_{xc}$ . ( $\alpha_6$  a veces también se permite que varíe).

$$E_{disp}^{D2} = -s_6 \sum_{i,j>i}^{Nat} \frac{C_6^{ij}}{(R_{ij})^6} f_{damp}(R_{ij})$$

$$f_{damp}(R_{ij}) = \frac{1}{1 + e^{-\alpha_6(\frac{R_{ij}}{R_{vdW}} - 1)}}$$

Grimme presentó recientemente un método refinado[31], DFT-D3, que incorpora un término  $R^{-8}$  adicional en la serie de dispersión y ajusta la fórmula de combinación  $C_6^{ij}$  y la función de amortiguación. Los  $C_6^i$  atómicos

individuales se interpolan a partir de varios valores de referencia basados en números de coordinación extraídos de la estructura molecular, en lugar de ser asignados únicamente por la identidad atómica como en DFT-D2, y por lo tanto incorporan cierta conciencia del entorno químico en una corrección heurística en gran medida. La dispersión -D3 tiene la siguiente forma, donde  $s_{r,6}$  y  $s_8$  son los parámetros habituales de no unidad ajustados para funciones individuales.

$$E_{disp}^{D3ZERO} = - \sum_{n=6,8} s_n \sum_{i,j>1}^{Nat} \frac{C_n^{ij}}{(R_{ij})^n} f_{damp}(R_{ij})$$

$$f_{damp}(R_{ij}) = \frac{1}{1 + 6 \left( \frac{R_{ij}}{s_{r,n} R_0^{ij}} \right)^{-\alpha_n}}$$

Se introdujo un esquema de amortiguamiento modificado para DFT-D3 utilizando la forma de amortiguamiento racional de Becke y Johnson. Los parámetros ajustados para funciones individuales ahora son  $s_6$ ,  $s_8$ ,  $a_1$  y  $a_2$ .

$$E_{disp}^{D3BJ} = - \sum_{n=6,8} s_n \sum_{i,j>1}^{Nat} \frac{C_n^{ij}}{(R_{ij})^n + (f_{damp})^n}$$

$$f_{damp} = a_1 \sqrt{\frac{C_8^{ij}}{C_6^{ij}}} + a_2$$

### 5.2.2.2. Métodos *ab initio*

Se plantea un Hamiltoniano efectivo y las integrales se evalúan haciendo uso únicamente de los valores de constantes universales, no haciendo uso de información experimental. En nuestro caso, hemos utilizado el método perturbativo de Moller-Plesset de segundo orden (MP2). Este método se encuentra dentro del grupo de métodos post-Hartree-Fock y consiste en tratar la correlación electrónica como una perturbación sobre la función HF. De esta forma:

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \lambda \hat{H}'$$

$$\text{Donde: } \hat{H}_0 = \sum_i \hat{h}_{ii}$$

$$\hat{H}' = \hat{V}_{ee}$$

$V$  es una pequeña perturbación y  $\lambda$  es un parámetro adimensional. Las funciones de onda y energías se obtienen como expansiones que incorporan las correcciones de orden  $n$ :  $\psi(n)$ ,  $E(n)$

$$\Psi = \lambda_0 \Psi^{(0)} + \lambda_1 \Psi^{(1)} + \lambda_2 \Psi^{(2)} + \dots = \sum_k \lambda_k \Psi^{(k)}$$

$$E = \lambda_0 E^{(0)} + \lambda_1 E^{(1)} + \lambda_2 E^{(2)} + \dots = \sum_k \lambda_k E^{(k)}$$

Al truncar estas series se obtienen los distintos niveles de aproximación de perturbaciones, en nuestro caso se utiliza la teoría de perturbaciones de segundo orden (MP2).

### 5.2.2.3. Funciones de base

Los orbitales moleculares los expresamos como combinación lineal de funciones de base  $\chi$  (orbitales atómicos).

$$\phi = \sum_i c_i \chi_i$$

Donde  $c_i$  son los coeficientes de expansión del orbital molecular y  $\chi_i$  son las funciones de base centradas en los átomos.

Para reducir el coste de los cálculos los orbitales atómicos se desarrollan en términos de funciones gaussianas, que tienen la siguiente forma:

$$\chi = NY(\theta, \gamma)R(r) \left\{ \begin{array}{l} N: \text{constante de normalización} \\ Y(\theta, \gamma): \text{parte angular} \\ R(r): \text{parte radial} \end{array} \right.$$

En nuestro caso tanto para el método B3LYP como para MP2 se utiliza como base la 6-311G++(d,p). Se trata de una base extendida de valencia en la que cada orbital interno se describe con una única función que es contracción de 6 funciones gaussianas; cada orbital de valencia es triple-zeta, consta por tanto de tres funciones, una de ellas contracción de tres gaussianas y las otras dos corresponden a una única gaussiana primitiva. Para poder describir los cambios de densidad electrónica de un átomo en un entorno molecular es necesario añadir funciones de polarización. Así a la base 6-311G++(d,p) se añade un conjunto de funciones d para cada átomo pesado y un conjunto de funciones p para cada átomo de hidrógeno. En algunos sistemas también se añaden funciones difusas, que se extienden a regiones espaciales más alejadas de los núcleos. Para nuestra base, la 6-311G++(d,p), se añaden funciones difusas s y p para los átomos pesados y además funciones difusas s para los átomos de hidrógeno.

### **5.3. Consideraciones de cara al procedimiento experimental posterior**

A pesar de que este trabajo no se centra en el trabajo experimental, se va a resumir el procedimiento habitual. La razón es que, de cara a entender ciertos aspectos en la determinación de las estructuras relevantes, es necesario entender ciertas características. Por ejemplo, es necesario entender que se necesita de la ablación láser para llevar a fase gas la perillartina, así como entender las propiedades de las expansiones supersónicas.

#### **5.3.1 Vaporización de la muestra: la ablación láser**

La espectroscopia de microondas con transformada de Fourier combinada con jets supersónicos (MB-FTMW) nos permite explorar el espectro rotacional de cada conformación presente en el jet supersónico como si fueran especies químicas diferentes, siempre que no tengan momento dipolar cero. El principal inconveniente que presentan estas técnicas para las biomoléculas es vaporizar la muestra sin descomponerla, ya que poseen altos puntos de ebullición y bajas presiones de vapor. En la última década la ablación laser emerge como una técnica excepcional que cubre este inconveniente asociado a la vaporización de muestras sólidas. El grupo GEM se ha convertido un experto en este campo y ha demostrado como el uso de pulsos láser permite la vaporización de cualquier tipo de muestras. Gracias a esta técnica se han estudiado aminoácidos, bases nitrogenadas, carbohidratos, neurotransmisores, drogas y péptidos, entre otras moléculas de interés biológico.

#### **5.3.2 Expansión supersónica**

El estudio conformacional de las biomoléculas debe realizarse en condiciones de aislamiento para eliminar la influencia de las interacciones intermoleculares con el entorno. El desarrollo de las técnicas espectroscópicas combinada con jets supersónicos ha supuesto grandes avances en el estudio de moléculas en un entorno libre de colisiones. Un jet supersónico es generado por la expansión adiabática de un gas a alta presión frente a un alto vacío, ambos conectados mediante un pequeño orificio llamado nozzle. Al pasar el gas de una zona de elevada presión a una zona de baja presión se produce un enfriamiento de este y como consecuencia un aumento elevado de la velocidad (velocidades

supersónicas). El pulso de gas se realiza con un gas portador, en general un gas noble, y una pequeña porción de muestra.

En el primer paso de la expansión suceden colisiones entre la muestra y el gas portador que comienzan a enfriar las moléculas para adquirir la velocidad del gas portador. Como consecuencia de este enfriamiento, los niveles rotacionales y vibracionales de la muestra pasan al nivel fundamental, y por tanto se encuentra en un entorno libre de colisiones, que podría ser considerado aislado. De esta forma, solo están poblados los niveles rotacionales y vibracionales más bajos, por lo que se simplifica notablemente el espectro y se aumenta su intensidad.

### 5.3.3 Región de interés

En el grupo GEM existen distintos sistemas y técnicas experimentales que combinan la ablación láser de la muestra, su expansión supersónica y técnicas de microondas con transformada de Fourier. Existen distintos espectrómetros en función del rango de frecuencias que se desee medir dependiendo de la molécula a analizar. Por ello, los resultados de este trabajo serán muy útiles para determinar qué espectrómetro será el más conveniente.

El futuro estudio experimental comenzará con un sistema LA-CP-FTMW[16], puesto que nos proporcionará un espectro de varios GHz de rango, facilitando la identificación de los conformeros. Así pues, las constantes rotacionales nos permitirán saber en qué frecuencias aparecerán las transiciones de interés y, en base a ello, elegir qué sistema utilizaremos. Los momentos dipolares nos darán información de que patrones habremos de buscar en el espectro.

En algunos casos la técnica LA-CP-FTMW, cuya sensibilidad y resolución no es su fuerte, algunas moléculas con un momento dipolar muy bajo no son detectables. Además, en el caso de biomoléculas que contienen átomos como el  $^{14}\text{N}$  o que necesiten de más datos para su identificación, se necesitan sistemas de resolución mayor. En ese caso, se usaría el espectrómetro laser ablation molecular beam Fourier transform microwave (LA-MB-FTMW),[14-15] que permite una sensibilidad y resolución mayor, a coste de perder espaciado espectral en cada adquisición. Puesto que la perillartina tiene un núcleo  $^{14}\text{N}$ , habrá una segunda etapa experimental con el fin de identificar las constantes de



acoplamiento del cuadrupolo. Los valores teóricos de este trabajo serán importantes de cara a su asignación.

#### 5.4. Información obtenida de un espectro de rotación

Como acabamos de mencionar, los valores de las constantes de rotación y los momentos dipolares serán necesarios para la asignación conformacional una vez se haga el experimento. Con estos parámetros podremos determinar la estructura de la molécula. Esto es muy importante puesto que, de acuerdo con las teorías del dulzor vistas anteriormente, relacionaremos la estructura de dicha molécula con el dulzor. Así pues, a continuación, se describirán los fundamentos de las constantes de rotación y de los momentos dipolares.

##### 5.4.1 Constantes de rotación

La frecuencia de las transiciones de un espectro rotacional corresponde a la diferencia de energía entre dos niveles rotacionales de la molécula. Estos niveles de energía son los valores propios de los operadores Hamiltonianos, los cuales son normalmente expresados en términos de operadores de momento angular. Los valores propios resultantes están constituidos por la combinación lineal de tres constantes rotacionales (A, B y C), estando directamente relacionadas con la distribución de las masas del sistema molecular. Estas constantes son inversamente proporcionales a los momentos de inercia ( $I_a$ ,  $I_b$ ,  $I_c$ ), cuya fórmula es igual al sumatorio de la masa multiplicada por la distancia a los ejes elevada al cuadrado ( $I_\alpha = \sum m_i r_{i,\alpha}^2$ ). Estos parámetros son específicos de cada molécula, por lo que el conocimiento de estos nos lleva a predecir las transiciones rotacionales del espectro, así como identificar la estructura de las especies analizadas.

##### 5.4.2 Momentos dipolares

La intensidad de las transiciones rotacionales está relacionada con el momento dipolar de la molécula, particularmente con la proyección de este a lo largo de los ejes a, b y c. La intensidad de la transición es directamente proporcional a la integral momento de transición, definida como  $\langle \psi_1 | \mu_{a,b,c} | \psi_2 \rangle$ , donde  $\psi_1$  y  $\psi_2$  son los estados inicial y final y  $\mu_{a,b,c}$  es la proyección del momento dipolar. Así, una transición está permitida cuando el producto directo de la representación

irreducible simétrica de los elementos de la integral momento de transición, contiene la representación totalmente simétrica. Esto conlleva a las siguientes reglas de selección para la espectroscopia rotacional que se derivan de esta expresión:

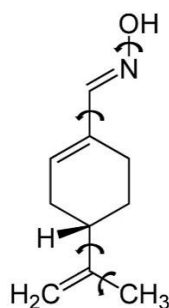
$\Delta J = -1, 0, 1$	Ramas P, Q, R
$\Delta K_a = 0; \Delta K_c = \pm 1$	tipo a
$\Delta K_a = \pm 1; \Delta K_c = \pm 1$	tipo b
$\Delta K_a = \pm 1; \Delta K_c = 0$	tipo c

Así bien, las transiciones de tipo a dependen de la proyección del momento dipolar a lo largo del eje a, y las tipo b y c de las proyecciones del momento dipolar a lo largo del eje b y c respectivamente. La energía con la que se polarizan las transiciones es inversamente proporcional a los momentos dipolares. Bajos momentos dipolares implican energías de polarización más elevadas para observar líneas. De acuerdo con esto, la intensidad de las transiciones, su tipo y la variación en la energía de polarización nos proporciona información sobre las tres componentes del momento dipolar del sistema, lo que es útil para la identificación conformacional o su confirmación.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSION

### 6.1. Búsqueda conformacional de la perillartina

Como se puede ver en la Figura 6, la perillartina posee varias torsiones posibles que dará lugar a varios conformeros. La búsqueda conformacional se realizó usando como parámetros un campo de fuerzas MMFFs, y una búsqueda conformacional mediante una combinación de muestreo de bajas frecuencias, torsiones y el método de Monte Carlo. Los resultados fueron 17 conformeros.

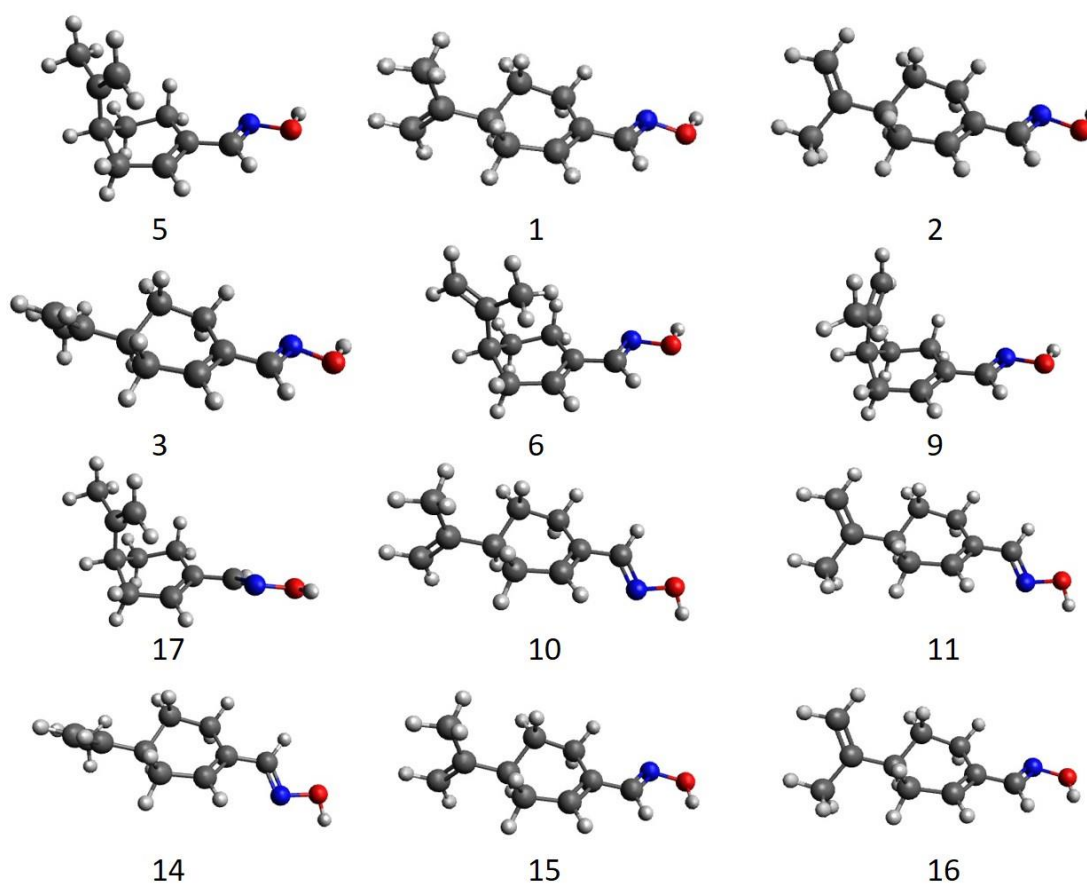


**Figura 6.** Estructura molecular de la perillartina, donde se muestran las torsiones posibles.

Seguidamente, se procedió a optimizar las estructuras de los conformeros obtenidos, para ver qué estructuras son decisivas. Así pues, la optimización de las estructuras mediante métodos DFT usando el nivel de cálculo B3LYP y la base 6-311++G(d,p) mediante Gaussian 09, dieron lugar a doce estructuras. La reducción del número de conformeros es una consecuencia de los criterios de los métodos de Mecánica Molecular. Algunas de las estructuras que, a priori eran estructuralmente y/o energéticamente distintas, han convergido a la misma geometría. Es decir, siete de las estructuras han resultado duplicadas. Estas 12 estructuras fueron lanzadas mediante cálculos *ab initio*, más concretamente usando el método MP2 con la base 6-311++G(d,p). Las estructuras obtenidas se muestran en la Figura 7. La numeración sigue el orden energético que resultó del cálculo MM.

Los 12 conformeros de la perillartina se pueden catalogar dependiendo de la orientación de los grupos alilo y oxima. Así, las seis estructuras más estables mantienen el grupo oxima en una configuración *trans* con respecto al doble enlace del anillo. Entre ellas, las estructuras 5, 6 y 9 mantienen el grupo alilo fuera del plano del anillo, es decir, en posición *axial*, mientras que en las

estructuras 1, 2 y 3 los grupos alilo y oxima se encuentran en el mismo plano, en posición *ecuatorial*. Las estructuras 17, 10, 11, 14 poseen el grupo oxima en posición *cis* con respecto al doble enlace del anillo, lo cual crea impedimentos estéricos obligando al grupo oxima a girar fuera del plano. Como se puede ver en la Tabla 1, esto conlleva a una desestabilización de en torno a  $1000\text{ cm}^{-1}$ . Finalmente, las estructuras 15 y 16 mantienen el grupo hidroxilo dentro del grupo oxima en una posición *sin*, en vez de la *anti* observada en las estructuras anteriores, lo que crea una desestabilización de en torno a  $2000\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 7.** Los 12 conformeros de menor energía de la perillartina predichos por los cálculos MP2/6-311++G(d,p).

## 6.2. Energías y parámetros rotacionales de los confórmeros

Las constantes rotacionales, las constantes de acoplamiento cuadrupolar nuclear del  $^{14}\text{N}$ , las componentes de los dipolos eléctricos, y las correspondientes energías de cada confórmero son recogidas en la Tabla 1. El primer dato importante nos lo da la evaluación de las energías con respecto al mínimo global. Esto se conoce como las energías relativas  $\Delta E$ , siendo  $\Delta E=0$  para la estructura estable, o mínimo global. En condiciones normales de presión y temperatura, los confórmeros de la perillartina se están continuamente interconvirtiendo unos en los otros y, por tanto, pueden coexistir varias de las estructuras. Tras producirse el jet supersónico, tiene lugar el *enfriamiento* de las moléculas y, por tanto, quedan *atrapados* únicamente aquellos confórmeros que se encuentren más bajos en energía. De acuerdo a la experiencia del grupo, las estructuras más importantes son aquellas por debajo de en torno a  $500\text{ cm}^{-1}$ , puesto que aquellas por encima de dicho valor no estarán lo suficientemente pobladas para su detección. Como puede observarse en la Tabla 1, la perillartina muestra solamente cuatro estructuras por debajo de  $500\text{ cm}^{-1}$ : las estructuras 5, 1, 2 y 3.

**Tabla 1.** Parámetros espectroscópicos calculados y energías relativas al nivel MP2/6-31++G(d,p) correspondientes a los confórmeros de la Perillartina.

MP2/6-311G++(d,p)	5	1	2	3	6	9
A/MHz	1749,63	2877,66	2907,84	2793,84	1851,72	1635,54
B/MHz	496,62	375,51	379,86	383,11	490,04	508,40
C/MHz	475,73	361,85	351,94	354,34	475,21	497,07
$\mu_a/D$	1,14	-0,84	-0,88	0,85	-0,66	-1,06
$\mu_b/D$	0,07	-0,11	0,23	-0,31	0,41	0,45
$\mu_c/D$	-0,58	-0,36	0,16	-0,13	0,04	0,28
$\chi_{aa}/\text{MHz}$	4,41	4,56	4,51	4,58	4,31	4,20
$\chi_{bb}/\text{MHz}$	-3,34	-5,52	-4,99	-5,26	-0,63	-1,51
$\chi_{cc}/\text{MHz}$	-1,06	0,96	0,48	0,69	-3,68	-2,69
$\Delta E_{\text{MP2}} / \Delta E_{\text{B3LYP}}(\text{cm}^{-1})$	0/557	99/0	267/121	359/175	538/1079	713/1192
$\Delta E_{\text{suma}}(\text{cm}^{-1})$	0	40	208	295	583	790
$\Delta G(\text{cm}^{-1})$	37	0	135	223	676	859

MP2/6-311G++(d,p)	17	10	11	14	15	16
A/MHz	1808,86	2806,06	2742,6	2768,44	2870,03	2900,43
B/MHz	490,88	375,21	383,67	378,41	375,84	380,14
C/MHz	477,81	361,45	352,06	356,52	362,05	352,19
$\mu_a/D$	-1,18	0,82	0,77	0,85	-1,69	-1,79
$\mu_b/D$	-0,43	0,25	-0,19	0,40	2,69	2,90
$\mu_c/D$	-0,11	-0,23	0,24	0,21	-0,66	-0,66
$\chi_{aa}/\text{MHz}$	4,40	4,54	4,57	4,54	4,54	4,51
$\chi_{bb}/\text{MHz}$	-0,10	-5,50	-5,43	-2,45	-5,66	-5,21
$\chi_{cc}/\text{MHz}$	-4,30	0,97	0,86	-2,09	1,12	0,69
$\Delta E_{\text{MP2}} / \Delta E_{\text{B3LYP}}(\text{cm}^{-1})$	1138/1860	1307/1345	1459/1433	1578/1529	1916/-	2089/2023
$\Delta E_{\text{suma}}(\text{cm}^{-1})$	1114	1224	1374	1489	1751	1923
$\Delta G(\text{cm}^{-1})$	1102	1150	1274	1377	1718	1856

[<sup>a</sup>]A, B, y C representan las constantes rotacionales (en MHz);  $\mu_a$ ,  $\mu_b$ , y  $\mu_c$  son los valores absolutos de las componentes del momento dipolar eléctrico (en D);  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$ , y  $\chi_{cc}$ , son los elementos diagonales del tensor cuadrupolar nuclear del  $^{14}\text{N}$  (en MHz); [<sup>b</sup>]Energías relativas (en  $\text{cm}^{-1}$ ) con respecto al mínimo global calculado mediante MP2/6-311++G(d,p) (o B3LYP donde se mencione). [<sup>c</sup>]Energías de Gibbs (en  $\text{cm}^{-1}$ ) calculadas a 298 K.

### 6.3. Consideraciones a tener en cuenta

Como acabamos de mencionar, las estructuras 5, 1, 2 y 3 son candidatas a ser detectadas. Sin embargo, hay que mencionar dos hechos interesantes y relevantes. A pesar de que los métodos B3LYP y MP2 proporcionan resultados similares, el orden energético de la estructura 5 varía considerablemente. Mientras que la estructura 5 es la más estable al usar MP2, con B3LYP pasa a estar por encima de la estructura 3, a unos  $550 \text{ cm}^{-1}$  por encima del mínimo global, la estructura 1. Por ello tras obtener estos resultados se realizaron de nuevo los cálculos B3LYP pero esta vez usando las dispersiones de Grimme (fuerzas dispersivas de largo alcance) para ver si variaban algo los resultados. Se obtuvieron los siguientes parámetros espectroscópicos:

**Tabla 2.** Parámetros espectroscópicos calculados y energías relativas al nivel B3LYP/6-311++G(d,p) con dispersiones de Grimme correspondientes a los conformeros de la Perillartina.

B3LYP- GD3BJ /6-311G++(d,p)	1	2	5	3	6	9
A/MHz	2903,73	2930,08	1833,65	2831,43	1934,72	1718,20
B/MHz	373,70	378,10	477,90	381,85	473,45	486,10
C/MHz	360,14	350,25	461,11	350,83	461,19	471,83
$\mu_a/D$	-0,98	-1,05	1,39	1,02	-0,71	-1,32
$\mu_b/D$	0,01	0,38	0,21	-0,28	0,55	0,60
$\mu_c/D$	-0,43	0,19	-0,68	-0,17	-0,04	0,42
$\chi_{aa}/\text{MHz}$	4,93	4,87	4,74	4,96	4,66	4,40
$\chi_{bb}/\text{MHz}$	0,01	0,39	0,24	-0,29	0,55	0,64
$\chi_{cc}/\text{MHz}$	0,91	0,40	-0,52	0,70	-4,07	-0,55
$\Delta E_{\text{B3LYP}}(\text{cm}^{-1})$	0	108,95	112,82	184,66	600,66	810,77
$\Delta E_{\text{ZPE}}(\text{cm}^{-1})$	0	104,35	160,89	173,69	685,15	929,07
$\Delta G(\text{cm}^{-1})$	0	98,20	203,91	120,36	780,18	1026,30

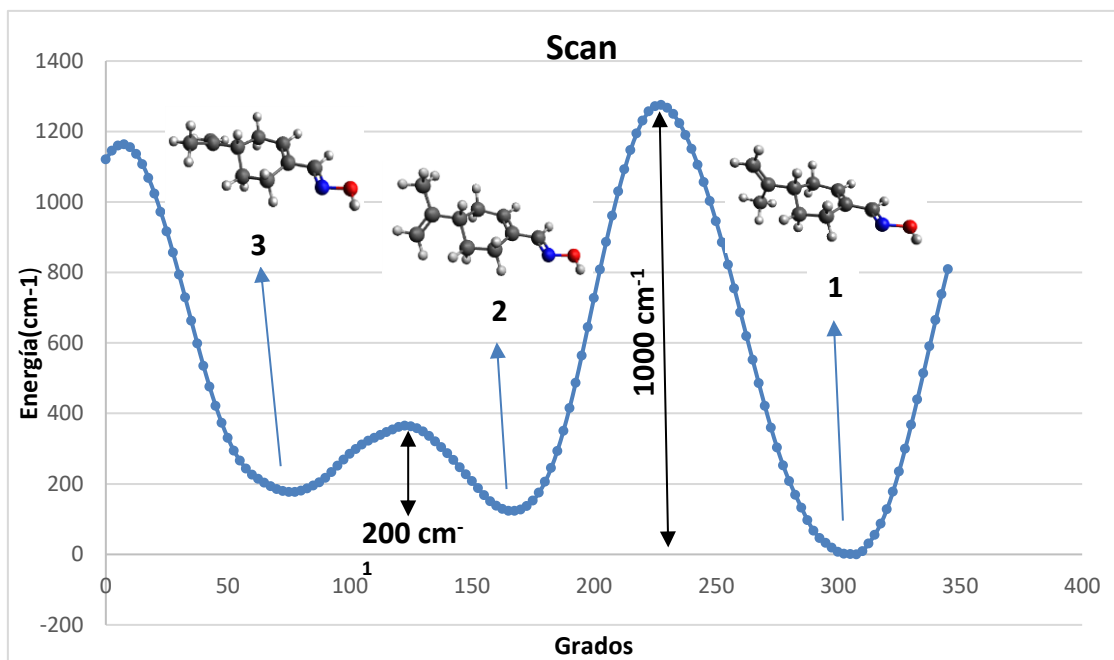
B3LYP- GD3BJ /6-311G++(d,p)	10	11	17	14	15	16
A/MHz	2852,15	2792,86	1923,78	2843,64	2896,20	2922,84
B/MHz	371,94	379,90	468,01	376,10	374,07	378,42
C/MHz	358,22	348,87	457,91	350,32	360,38	350,50
$\mu_a/D$	0,95	0,93	-1,44	1,03	-1,76	-1,88
$\mu_b/D$	0,22	-0,26	-0,62	0,43	2,76	2,99
$\mu_c/D$	-0,35	0,26	0,12	0,19	-0,69	-0,65
$\chi_{aa}/\text{MHz}$	4,89	4,94	4,63	4,88	4,84	4,81
$\chi_{bb}/\text{MHz}$	0,21	-0,26	-0,62	0,43	2,75	2,99
$\chi_{cc}/\text{MHz}$	0,70	0,97	-2,14	-1,17	1,32	0,76
$\Delta E_{\text{B3LYP}}(\text{cm}^{-1})$	1364,49	1452,02	1418,33	1564,06	1850,01	1963,15
$\Delta E_{\text{suma}}(\text{cm}^{-1})$	1290,53	1376,52	1391,99	1480,88	1732,81	1840,68
$\Delta G(\text{cm}^{-1})$	1201,86	1293,78	1361,70	2458,13	1735,88	1834,97

<sup>a]</sup>A, B, y C representan las constantes rotacionales (en MHz);  $\mu_a$ ,  $\mu_b$ , y  $\mu_c$  son los valores absolutos de las componentes del momento dipolar eléctrico (en D);  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$ , y  $\chi_{cc}$ , son los elementos diagonales del tensor cuadrupolar nuclear del  $^{14}\text{N}$  (en MHz) <sup>[b]</sup>Energías relativas (en  $\text{cm}^{-1}$ ) con respecto al mínimo global calculado mediante B3LYP-GD3BJ/6-311++G(d,p). <sup>[c]</sup>Energías de Gibbs (en  $\text{cm}^{-1}$ ) calculadas a 298 K.

Como podemos observar utilizando estas dispersiones el conformero más estable es el 1, siendo las estructuras 1,2 y 3 candidatas a aparecer en el espectro al igual que la 5, que se encuentra entre medias. Esto quiere decir que, una vez realizada la experimentación, habría que tener en cuenta que la estructura 5 podría ser la más abundante o, por el contrario, apenas estar lo suficientemente poblada para su observación. Es un hecho muy emocionante

puesto que el experimento revelará la verdad. Además, este hecho pone en evidencia los problemas actuales de los distintos métodos de cálculo. Por eso, para distintos sistemas, a veces funciona mejor un método u otro (B3LYP, B3LYP-GD3BJ, MP2, ...).

El segundo hecho importante es que, la diferencia entre las estructuras del mismo grupo, como por ejemplo las estructuras 5, 6 y 9, o las estructuras 1, 2 y 3, radica en la rotación del grupo alilo con respecto al eje que une el anillo. Es decir, los distintos conformeros se interconvierten mediante el giro del ángulo diedro C=C-C<sub>anillo</sub>-C<sub>anillo</sub>. Por supuesto, la diferencia energética entre ellos es debido a los distintos impedimentos estéricos entre las distintas posiciones. Esto es otro hecho importante puesto que se ha demostrado que, en las expansiones supersónicas, cuando existe una barrera de interconversión menor que 400 cm<sup>-1</sup>, las estructuras pueden relajarse a la más estable.[28] Para comprobar si ocurre este hecho, hemos realizado un scan de la superficie de energía potencial girando el diedro C=C-C<sub>anillo</sub>-C<sub>anillo</sub>. Los resultados se muestran en la Figura 8.



**Figura 8.** Superficie de energía potencial de la estructura 1 a lo largo de la coordenada C=C-C<sub>anillo</sub>-C<sub>anillo</sub> usando B3LYP/6-311++G(d,p).

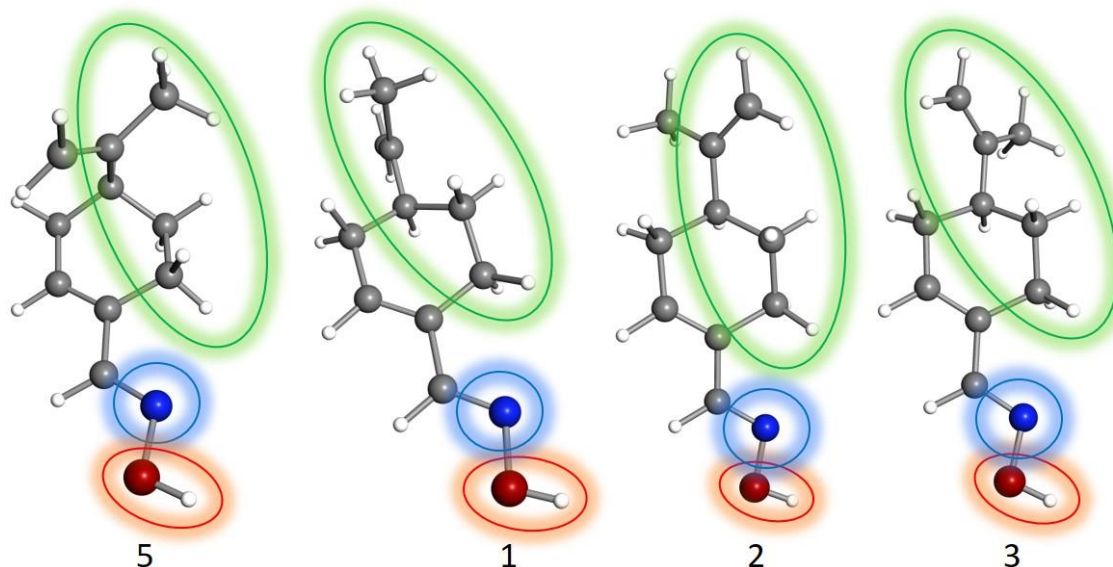


De acuerdo con la gráfica, se observan 3 mínimos de energía potencial para la perillartina. Dichos mínimos corresponden a los confórmeros 1, 2 y 3. En un principio, cabría esperar que el espectro de rotación contuviese transiciones rotacionales debidas a los confórmeros 1, 2 y 3. Sin embargo, al existir una barrera de interconversión de  $200\text{ cm}^{-1}$  entre las estructuras 2 y 3, siendo inferior a  $400\text{ cm}^{-1}$ , es muy probable que el confórmero 3 se interconvierta al 2.

Con todo ello, una vez se obtenga el espectro de rotación, se deberán de asignar los confórmeros 1 y 2. Por otro lado, se intentará asignar el confórmero 3 pero, si no se ven indicios de su existencia, probablemente sea por su interconversión al confórmero 2. Con el confórmero 5 se procederá como con este último, puesto que puede ser que no se pueble si las predicciones energéticas de B3LYP fuesen más fiables que las del método MP2.

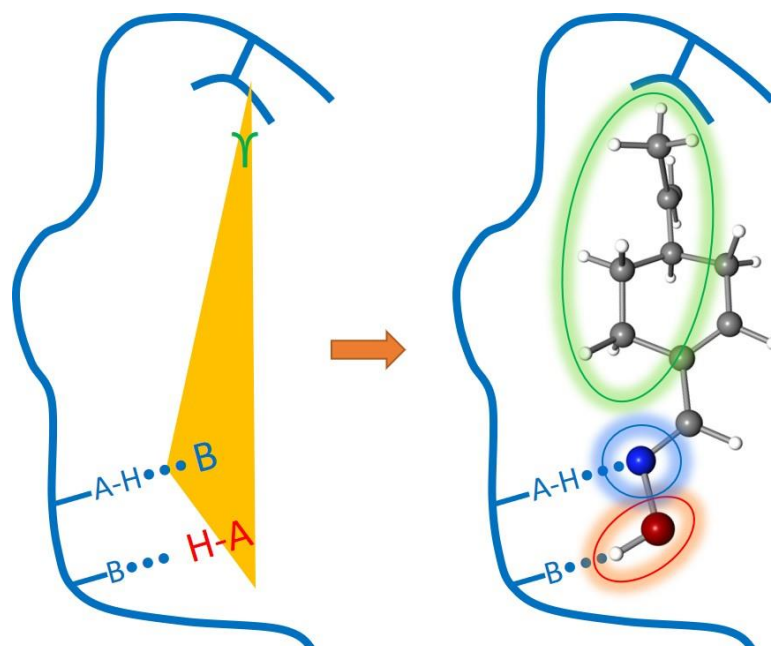
#### 6.4. Relación entre la estructura y el dulzor

La estructura de la perillartina es muy interesante. Como hemos podido ver, las estructuras más estables son aquellas con el grupo oxima en una posición *anti*. Esto permite al nitrógeno actuar como un aceptor de hidrógeno, mientras que el grupo hidroxilo puede actuar como donador de protones en el mismo lado. Además, todo el lateral del anillo, así como el grupo alilo, crea un contorno hidrofóbico y actúa como el tercer punto de anclaje, encajando perfectamente con la teoría del triángulo del dulzor propuesto por Shallenberger-Acree-Kier. Se puede observar la presencia de estos grupos para las 4 estructuras más estables de la perillartina en la figura 9.



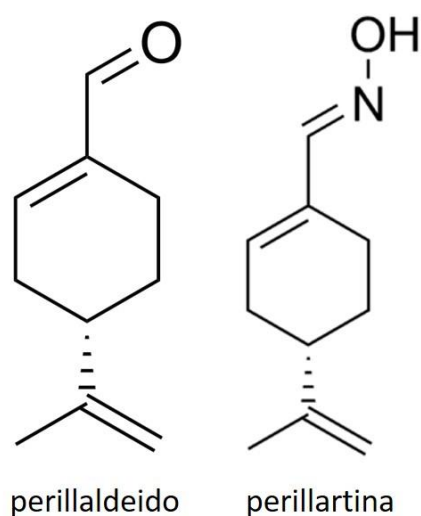
**Figura 9.** Estructura de los conformeros más estables de la perillartina, donde se señalan los puntos de anclaje y el contorno hidrofóbico descritos anteriormente.

A continuación, en la Figura 10 se muestra una comparación entre los puntos propuestos por dicha teoría, junto con el conformero 1 de la perillartina. Tal y como puede observarse, la perillartina encaja perfectamente en dicho triángulo. Es más, puesto que muchos de los conformeros pueden igualmente adaptarse a dicho triángulo, podría ser una de las explicaciones del alto dulzor que presenta la perillartina: en disolución y a temperaturas y presiones estándares, la perillartina se interconvierte entre muchos de los conformeros. Debido a que, para que un edulcorante encaje con el receptor, no solo ha de tener los puntos de contactos correctos, sino que además ha de acercarse en una trayectoria correcta, para que el receptor la *atrape*. Si disponemos de varias posibilidades (conformeros), la probabilidad de ser atrapada debería de aumentar.



**Figura 10.** Estructura del conformero 1 de la perillartina, junto con el esquema del triángulo del dulzor propuesto en la teoría de Shallenberger-Acree-Kier.

Finalmente, y para validar más la teoría del triángulo del dulzor propuesto por Shallenberger-Acree-Kier, la Figura 11 muestra una comparación entre la perillartina y el perillaldehído. Mientras que la perillartina es un edulcorante aproximadamente 2000 veces más dulce que la sacarosa, el perillaldehído es apenas dulce y se usa como odorante.[29] Este hecho parece estar de acuerdo con la teoría de Shallenberger-Acree-Kier que, al perder un tercer punto de contacto, la molécula pierde enormemente sus propiedades del dulzor.



**Figura 11.** Comparación de las estructuras del perillaldehído y de la perillartina.

## 7. CONCLUSIONES

Se ha realizado una búsqueda conformacional de la perillartina. El método de mecánica molecular ha arrojado 17 conformeros iniciales. La posterior optimización de estas estructuras mediante los métodos DFT y *ab initio* ha dado lugar a 12 conformeros por debajo de  $2000\text{ cm}^{-1}$  respecto a la estructura más estable. De entre estas estructuras, cuatro de ellas son lo suficientemente estables energéticamente ( $500\text{ cm}^{-1}$ ) como para ser detectadas en una expansión supersónica.

Posteriormente, se ha realizado un escaneo de la energía de superficie potencial de las estructuras más estables, para probar si existe interconversión de unos conformeros en otros. Se concluye que dicha interconversión es posible para dos de las estructuras más estables, aunque solo una pudiera interconvertir durante la expansión supersónica.

Se ha valorado la viabilidad del estudio experimental de la perillartina: hay varios conformeros candidatos a ser detectados en fase gas; los momentos dipolares de las estructuras candidatas son no-nulos por lo que pueden detectarse experimentalmente. Las transiciones son de tipo *a*, cuyos patrones son los más sencillos de ser identificados.

De acuerdo con esto, los resultados teóricos de este trabajo serán fundamentales como base de la experimentación posterior. Ya sabemos qué estructuras hay que buscar y cuáles son sus parámetros rotacionales.

Se han identificado los puntos de contacto (glucóforos) de la perillartina, y se han arrojado indicios de que la perillartina cumple con los tres puntos de contactos propuestos por la teoría del triángulo del dulzor (Shallenberger-Acree-Kier). Así pues, este trabajo constituye un primer paso en la identificación de los conformeros más estables de la perillartina y da constancia de la importancia de las interacciones edulcorante-receptor.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- [1] Robert H. Goldsmith A Tale of Two Sweeteners St. Mary's College of Maryland St. Mary's City ,MD 20686, Journal of Chemical Education, November 1987, 64, 11, 954-955.
- [2] Robert S .Shallenberger Taste Recognition Chemistry Cornell University, Geneva, Ny (USA) IUPAC 1997.
- [3] B. Crammer and R. Ikan Properties and Syntheses of Sweetening Agents Chemical Society Review January 1977.
- [4] R.S. Shallenberger Taste Chemistry Springer US Chapman & Hall 1993.
- [5] R. S. Shallenberger The AH, B glycochore and general taste chemistry, Cornell University, Geneva, New York USA Food Chemistry, August 1995, 56, 209-214 .
- [6] Walter Guild, Jr.Penn Yan Academy Penn Yan Theory of sweet taste, New York 14527, 49, 3, 171-173.
- [7] William J. Spillane,," Caroline A. Ryder, M. Rachel Walsh, Patrick J. Curran, Danny G. Concagh & Siobhan N. Wall Sulfamate sweeteners ,Chemistry Department, University College, Galway, Ireland Food Chemistry, 1996, 56, 255-261.
- [8] R. S. Shallenberger and T. E. Acree Molecular Structure and Sweet Taste, JULY-AUG. 1969, 17, 4, 701-703.
- [9] Robert J. Woods, Walter A. Szarek,\* and Vedene H. Smith, An Investigation of the Relationship between Sweetness and Intramolecular Hydrogen-Bonding Networks in Hexuloses Using the Semiempirical Molecular Orbital Method, AM 1 ,Jr Queen's University, Kingston, Ontario 1989, J. Am. Chem. SOC. 1990, 112, 4132-4141.
- [10] Celia Bermudez, Isabel Peña, Santiago Mata, and Jose L. Alonso, Sweet Structural Signatures Unveiled in Ketohexoses Chem. Eur. J. 2016, & 22, 1 – 10.

[11] A. Amoldi, A. Bassoli & L. Merlini, Progress in isovanillyl sweet compounds, Dipartimento di Scienze Molecolari Agroalimentari, Università di Milano, Via Celoria 2, 20133 Milano, Italy, Food Chemistry, 1996, 56, 3, 247-253.

[12] <http://www.gem.uva.es/>

[13] J. L. Alonso and J. C. López, in Gas-Phase IR Spectroscopy and Structure of Biological Molecules, eds. A. M. Rijs and J. Oomens, Topics in., 2015, vol. 364, pp. 335–402

[14] C. Bermúdez, S. Mata, C. Cabezas and J. L. Alonso, Tautomerism in Neutral Histidine, Angew. Chemie - Int. Ed., 2014, 53, 11015–11018

[15] I. León, E. R. Alonso, S. Mata, C. Cabezas, M. A. Rodríguez, J.-U. Grabow and J. L. Alonso, Phys. Chem. Chem. Phys., 2017, 19, 24985.

[16] S. Mata, I. Peña, C. Cabezas, J. C. López and J. L. Alonso, A broadband Fourier-transform microwave spectrometer with laser ablation source: The rotational spectrum of nicotinic acid, J. Mol. Spectrosc., 2012, 280, 91–96.

[17] C. Bermúdez, I. Peña, S. Mata and J. L. Alonso, Sweet Structural Signatures Unveiled in Ketohexoses, Chem. Eur. J., 2016, 22, 16829–16837.

[18] A. Warshel and M. Karplus, J. Am. Chem. Soc. 1972, 94, 5612–5625.

[19] M. Karplus, M. Levitt and A. Warshel, “The Nobel Prize in Chemistry 2013,” can be found under [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2013/](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2013/), 2013.

[20] Schrödinger Release 2018-2: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018, 2018.

[21] A. D. Becke, J. Chem. Phys. 1992, 96, 2155–2160.

[22] A. D. Becke, J. Chem. Phys. 1992, 97, 9173–9177.

[23] A. D. Becke, J. Chem. Phys. 1993, 98, 5648.

- [24] R. G. Parr, D. P. Craig and I. G. Ross, *J. Chem. Phys.* 1950, 18, 1561–1563.
- [25] R. G. Parr, *Int. J. Quantum Chem.* 1990, 37, 327–347.
- [26] R. A. Friesner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005, 102, 6648–6653.
- [27] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, et al., *Gaussian 09, Revis. D.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT 2009.
- [28] T. F. Miller, D. C. Clary and A. J. H. M. Meijer, *Collision-Induced Conformational Changes in Glycine. J. Chem. Phys.* 2005, 122, 244323–224113.
- [29] C. H. Hocart, *Comprehensive Natural Products II, Chemistry and Biology* 2010, 4, 631–671.
- [30] S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, and H. Krieg, “A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu,” *J. Chem. Phys.*, vol. 132, no. 15, 2010
- [31] S. Grimme, S. Ehrlich, and L. Goerigk, “Effect of the damping function in dispersion corrected density functional theory,” *J. Comput. Chem.*, vol. 32, no. 7, pp. 1456–1465, May 2011.

## 9. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

### 9.1. Listado de tablas

Tabla	Descripción	Página
1	<i>Parámetros espectroscópicos calculados y energías relativas al nivel MP2/6-31++G(d,p) correspondientes a los conformeros de la Perillartina.</i>	28
2	<i>Parámetros espectroscópicos calculados y energías relativas al nivel B3LYP/6-31++G(d,p) con dispersiones de Grimme correspondientes a los conformeros de la Perillartina.</i>	30



## 9.2. Listado de figuras

Figura	Descripción	Página
1	<i>Esquema propuesto por la teoría de Shallenberger y Acree.</i>	9
2	<i>Algunos ejemplos de moléculas que presentan el esquema AH/B.</i>	9
3	<i>Glycol de la D-glycosa en varias de sus conformaciones del anillo.</i>	10
4	<i>Esquema que resume la teoría de Shallenberger-Acree-Kier.</i>	11
5	<i>Representación esquemática de Perillartina.</i>	13
6	<i>Estructura molecular de la perillartina, donde se muestran las torsiones posibles.</i>	26
7	<i>Los 12 conformeros de menor energía de la perillartina predichos por los cálculos MP2/6-311++G(d,p).</i>	27
8	<i>Superficie de energía potencial de la estructura 1 a lo largo de la coordenada C=C-C<sub>anillo</sub>-C<sub>anillo</sub> usando B3LYP/6-311++G(d,p).</i>	31
9	<i>Estructura de los conformeros más estables de la perillartina, donde se señalan los puntos de anclaje y el contorno hidrofóbico descritos anteriormente.</i>	33
10	<i>Estructura del conformero 1 de la perillartina, junto con el esquema del triángulo del dulzor propuesto en la teoría de Shallenberger-Acree-Kier.</i>	34
11	<i>Comparación de las estructuras del perillaldehído y de la perillartina.</i>	34