



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

Grado en Química

**Estudio estructural de la N-Acetilgalactosamina**

*Autor:*

*Raúl Aguado Vesperinas*

*Tutor/es:*

*José Luis Alonso*

*Iker León*

# Índice

<b>Abstract .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>2</b>
1.1 El papel de la N-acetilgalactosamina en los procesos de metastatización .....	2
1.2 Otros procesos mediados por N-Acetilgalactosamina .....	4
1.3 Relación estructura-reactividad.....	4
<b>2. Metodología .....</b>	<b>6</b>
2.1 Metodología teórica .....	6
2.2 Metodología experimental .....	10
2.2.1 <i>Chirped-pulse Fourier Transform Microwave Spectrometer (CP-FTMW)</i> ...	15
2.2.2 <i>Molecular beam Fourier Transform Microwave Spectrometer (MB-FTMW)</i> .....	16
2.2.3 Introducción de muestra mediante chorro supersónico .....	17
2.2.4 Ablación láser .....	19
<b>3. Presentación y discusión de resultados .....</b>	<b>20</b>
<b>4. Conclusiones .....</b>	<b>32</b>
<b>5. Líneas futuras de investigación.....</b>	<b>33</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>33</b>
<b>Material complementario .....</b>	<b>36</b>
<b>Apéndice I: Screening de confórmeros .....</b>	<b>37</b>
<b>Apéndice II: Mapas de interacciones intramoleculares no covalentes .....</b>	<b>49</b>

**ABSTRACT**

La N-acetilgalactosamina es una biomolécula que actúa en procesos de comunicación intercelular y posee gran importancia en el desarrollo de procesos tumorales. Se sabe que las interacciones de la N-acetilgalactosamina con diferentes biomoléculas dentro del cuerpo humano, son clave en la metástasis de diversos tipos de cáncer. A lo largo del este trabajo, se presenta un estudio de la estructura de esta biomolécula, el cual tiene como objetivo el esclarecimiento de su intra e intermolecularidad. Estos datos acerca de las interacciones que puede establecer la N-acetilgalactosamina, podrían servir como punto de partida para una mejor comprensión de los mecanismos a través de los cuales esta molécula participa en los procesos de metástasis. Para ello, se empleará la espectroscopía de rotación de alta resolución, la cual permite determinar con una elevada precisión la estructura de la molécula.

**ABSTRACT**

Biomolecule N-Acetylgalactosamine participates on intercellular communication and has an important role on tumor development. It is known that interactions between N-acetylgalactosamine and several other biomolecules are crucial on tumoral development processes. Along this work, the structure of N-acetylgalactosamine, is being studied in order to obtain a deeper comprehension of the interactions the biomolecule can stablish, which can lead to a better understanding of the mechanisms of metastasis development processes. To carry out this work, N-acetylgalactosamine will be studied using high resolution rotational spectroscopy: a technique that allows to obtain any structural parameter of the molecule with an extraordinarily high precision.

## 1. Introducción

### 1.1. El papel de la N-acetilgalactosamina en los procesos de metastatización

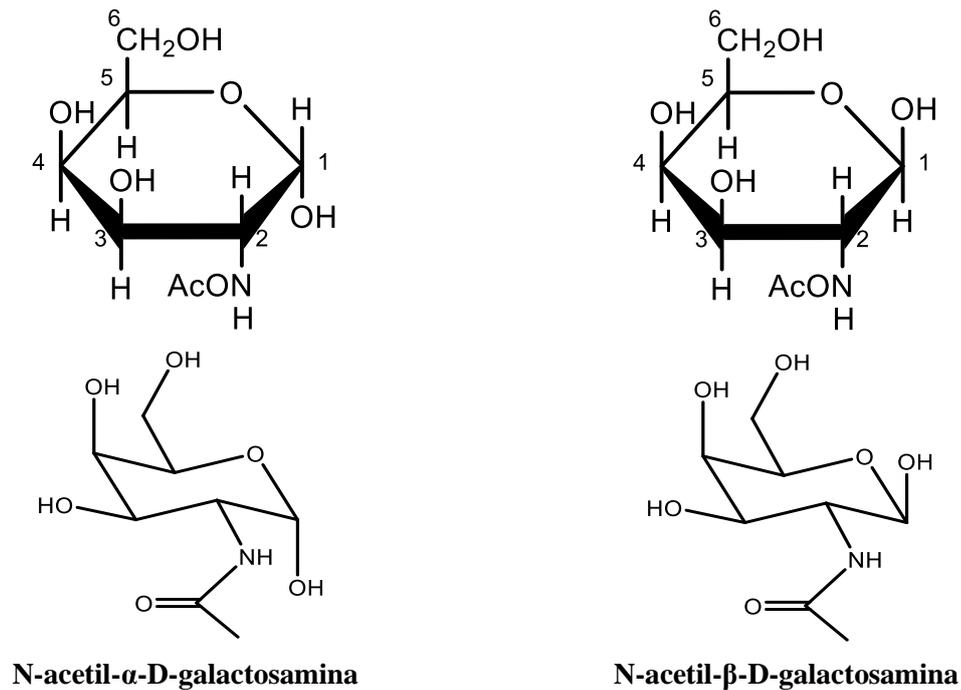
El término “cáncer” abarca un amplio grupo de enfermedades caracterizadas por una división descontrolada de un grupo de células del organismo. Actualmente, el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial: en 2018 se registraron 18.078.957 nuevos casos, de los cuales 9.555.027 casos terminaron con la vida de los pacientes. Asimismo, se estima que su incidencia siga aumentando a lo largo del presente siglo, de forma que se convierta en la principal causa de mortalidad.<sup>(1,2)</sup>

Uno de los escenarios con más alta mortalidad se da cuando se produce una metástasis, es decir, un proceso de propagación de un tumor desde el punto en el que se ha desarrollado hasta cualquier otra parte del organismo. Estos procesos de diseminación son la principal causa de muerte por cáncer, ya que complican en gran medida el tratamiento.

La metástasis ocurre con la separación de un grupo de células del tumor principal y su introducción en el sistema circulatorio. Este tipo de células son denominadas CTCs (del inglés *Circulating tumor cells*) y pueden distribuirse tanto a tejidos cercanos al tumor principal (mediante los vasos linfáticos) como a tejidos alejados del tumor (mediante los vasos sanguíneos). En este proceso de metástasis existe un paso clave que determina si el tumor se extenderá y en qué zona del organismo lo hará: la adhesión de la célula cancerosa a la capa de células que recubren los diferentes órganos del cuerpo (o endotelio). Este proceso está mediado por la unión de lectinas (una familia de proteínas que se unen a azúcares con una alta especificidad) a ciertos carbohidratos de la membrana celular, entre los cuales se encuentra la N-Acetilgalactosamina.<sup>(3)</sup>

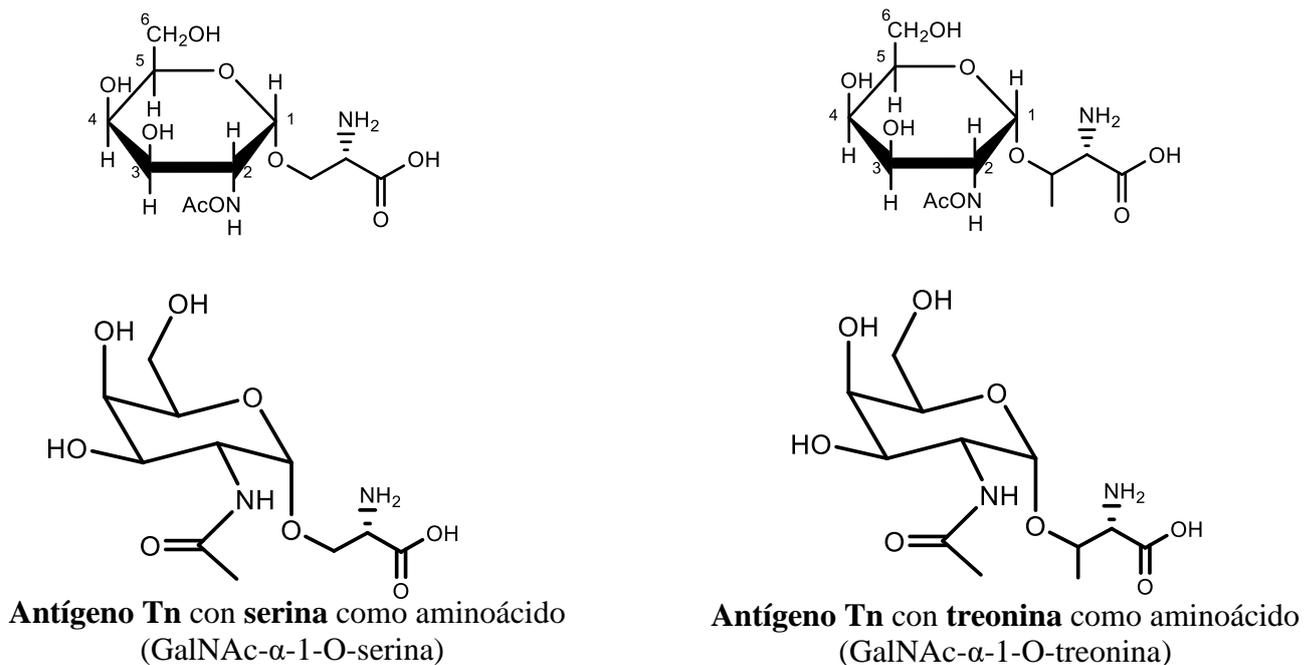
La N-acetilgalactosamina (contraído como NAcGal, con fórmula molecular  $C_8H_{15}NO_6$ ) es una biomolécula incluida dentro de los amino-azúcares, es decir, glúcidos en los que uno de sus grupos hidroxilo ha sido reemplazado por un grupo amino. En concreto, la NAcGal deriva de la galactosamina, el amino-azúcar análogo a la galactosa, apareciendo con el grupo amino acetilado. La galactosamina, a su vez, es el aminoalcohol derivado de la galactosa, el cual es uno de los ocho monosacáridos esenciales. Se trata de una aldosa de seis carbonos y en los organismos vivos aparece siempre en forma D (D-galactosa).<sup>(4)</sup>

Al igual que otros monosacáridos, la galactosa –y, por tanto, la galactosamina y la NAcGal– puede existir tanto en forma lineal como en forma ciclada. En el proceso de ciclación, el ataque nucleófilo del grupo hidroxilo en  $C_5$  al aldehído en  $C_1$ , genera un hemiacetal, lo que conduce a la formación de un nuevo centro quiral en  $C_1$ .<sup>(5)</sup> Así, la posición del grupo hidroxilo de  $C_1$  en la forma cíclica (encima o debajo del plano que forman los cinco carbonos y el oxígeno del ciclo) da lugar a dos especies anoméricas diferentes denominadas  $\beta$  y  $\alpha$ , respectivamente. En la *figura 1* pueden observarse las formas químicas cicladas para cada una de las especies anoméricas de la N-acetilgalactosamina.



**Figura 1. Formas cíclicas de la N-acetil -D-galactosamina:** en la parte superior de la imagen se muestran las proyecciones de Haworth mientras que en la parte inferior se muestran las proyecciones en silla

La presencia de NAcGal en la membrana de las células, sin embargo, no es trivial. Este monosacárido constituye uno de los *building blocks* fundamentales en la construcción de mucinas, unas glicoproteínas de membrana que intervienen en el reconocimiento intercelular (tema que se desarrollará más adelante en este trabajo). Las mucinas son construidas mediante adición de monosacáridos a grupos hidroxilo de los aminoácidos (serina o treonina) de ciertas proteínas de alto peso molecular, mediante procesos de O-glicosilación. Cuando el monosacárido unido al aminoácido serina o treonina es la N-acetilgalactosamina, el sistema molecular se denomina antígeno Tn.<sup>(6)</sup> Este enlace se da a través del carbono anomérico (C<sub>1</sub>) y siempre es de carácter  $\alpha$ .



**Figura 2. Formas cíclicas del antígeno Tn:** en la parte superior de la imagen se muestran las proyecciones de Haworth mientras que en la parte inferior se muestran las proyecciones en silla cuando el antígeno está formado por serina y por treonina como aminoácidos

Sin embargo, en las células cancerosas, esta glicosilación se da de manera incorrecta, dando lugar a heteroproteínas erróneas que contienen una elevada cantidad de moléculas de NAcGal, lo que lleva a la sobreexpresión del antígeno Tn en la membrana celular. Esta sobreexpresión se ha asociado mediante estudios clínicos al desarrollo de procesos de metastatización en un amplio rango de cánceres, algunos con una amplia incidencia entre la población, como son el cáncer de mama, el cáncer colo-rectal, el cáncer de próstata y el melanoma maligno.<sup>(7)</sup>

Asimismo, se cree que no solo las interacciones proteína-Tn intervienen en los procesos de metástasis, sino que las interacciones homotípicas Tn-Tn y del antígeno Tn con uno de sus derivados, Sialil-Tn (interacciones denominadas CCI del inglés *Carbohydrate-Carbohydrate Interactions*) podrían iniciar las vías oncogénicas en diferentes células, promoviendo la carcinogénesis y la agregación de células cancerosas.<sup>(6)</sup>

### **1.2. Otros procesos mediados por N-Acetilgalactosamina**

Las CCI no solo tienen lugar en procesos de desarrollo de tumores malignos. Este tipo de interacciones aparecen también en procesos de comunicación entre células, los cuales son procesos de elevadísima importancia a nivel de la biología molecular. Tal es su importancia que se ha desarrollado el concepto de *glicosinapsis* para describir las CCI que participan en estos procesos. Se trata de un concepto similar a la sinapsis neuronal y análogo a la sinapsis inmunológica. La glicosinapsis representa un microdominio de la membrana celular en la cual aparecen expuestos numerosos carbohidratos, ya sean unidos a proteínas (antígeno Tn y derivados), a esfingolípidos (formando glucoesfingolípidos) o a otras moléculas (diferentes receptores transmembrana complejos).<sup>(6,8)</sup> Las interacciones carbohidrato-carbohidrato entre estos sistemas moleculares de la membrana celular con otros análogos que se encuentren en otras células pueden desencadenar reacciones dentro de la célula que afecten a su fenotipo, es decir, estas interacciones pueden conducir a modificaciones estructurales o funcionales de la célula. Es por esto que los procesos de comunicación entre células son de gran importancia.

Asimismo, la N-acetilgalactosamina está siendo estudiada como un ligando muy selectivo en quimioterapia contra carcinomas hepatocelulares (HCC de su denominación inglesa *Hepatocellular Carcinoma*). Se ha demostrado que aquellos dendrímeros (polímeros de construcción arborescente que permiten formar sistemas huésped-anfitrión) que presentan NAcGal como ligando poseen una gran afinidad por las células hepáticas. Esto supone que pueden desarrollarse moléculas capaces de transportar los medicamentos citotóxicos empleados para destruir tumores hasta las células diana sin dañar ninguna otra célula. Además la diferente funcionalización de la NAcGal que actúa como ligando en el dendrímero, permite modular la internalización y difusión de la carga medicinal en el interior de la célula.<sup>(9)</sup> Todo esto permitiría obtener una quimioterapia mucho más eficaz y mucho menos perjudicial para la vida de los pacientes.

### **1.3. Relación estructura-reactividad**

Es bien sabido que la estructura de un compuesto está fuertemente vinculada con su reactividad. La disposición de los átomos dentro de la molécula condiciona tanto las fuerzas intermoleculares como las intramoleculares y, por tanto, la estabilidad del compuesto. Las interacciones intermoleculares en compuestos biológicos y en mayor medida en aquellos que actúan en procesos de comunicación o adhesión celular como es el caso que ocupa este trabajo, son de una gran importancia. Estas interacciones intermoleculares en el medio biológico, que para el caso de la

NAcGal quedan prácticamente reducidas a los puentes de hidrógeno, están condicionadas por la posición de los átomos o funciones que puedan establecerlas.

En cuanto a la estructura de la N-acetilgalactosamina, existen muy pocos estudios acerca de su estructura, que únicamente ha sido estudiada mediante técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) o espectroscopía de infrarrojo (FTIR) en el marco de estudios bioquímicos más extensos sobre los procesos metabólicos de los que forma parte este compuesto.<sup>(10,11)</sup> Asimismo, los datos estructurales de la N-acetilgalactosamina no aparecen en el BMRB (*Biological Magnetic Resonance Data Bank*) –un banco de datos estructurales de biomoléculas– a pesar de que sí pueden encontrarse datos de la galactosa o la N-acetilglucosamina. Estos estudios mediante las técnicas de infrarrojo y resonancia magnética nuclear solo dan una descripción aproximada de la estructura de la molécula. Sin embargo, para el estudio de las interacciones intermoleculares de este compuesto es necesario un conocimiento riguroso de su estructura: la caracterización de la estructura de esta molécula es de una gran importancia de cara a una mejor comprensión de las interacciones de la NAcGal con sus *targets* a nivel biológico, lo que podría permitir el desarrollo de mecanismos más eficaces para evitar la propagación de los cánceres.

La espectroscopía de rotación es una técnica espectroscópica que permite la obtención de la estructura molecular –tanto distancias como ángulos de enlace– con una altísima precisión. Además, los avances que se han ido sucediendo en este tipo de espectroscopía a lo largo de los últimos años, los cuales han permitido la combinación de la técnica con la ablación láser como método de introducción de muestra, permiten la caracterización de la estructura de biomoléculas solidas a temperatura ambiente (e, incluso, térmicamente inestables) como la que ocupa este estudio.<sup>(12)</sup> Dado que la N-acetilgalactosamina posee un punto de fusión de 172° C, no puede ser llevada a fase gas mediante calefacción, por lo que la ablación laser es necesaria para poder transferir muestra a fase gas, de forma que pueda ser analizada.

Sin embargo, la N-acetilgalactosamina, como se ha visto a lo largo de esta introducción, aparece en los procesos tumorales como parte del antígeno Tn. El presente trabajo se basará, pues, en el estudio de la estructura de la biomolécula N-acetilgalactosamina con el fin de poder identificar las interacciones intra e intermoleculares que pueden establecerse. Esta información puede ser de gran ayuda a la hora de comprender más profundamente como la molécula interacciona en el organismo con otras biomoléculas.

Cabe destacar que esta metodología reduccionista, basada en reducir la actividad de una biomolécula completa a sus átomos bioactivos a través de moléculas de menor tamaño que mimeticen las interacciones de la biomolécula original no es algo novedoso y ya ha sido empleada en otra ocasión por el grupo GEM<sup>(13)</sup>, estudio que ha servido de referencia para este trabajo.

Además, la espectroscopía de rotación ha sido empleada por este mismo grupo en el estudio de otros monosacáridos, y algunos de sus derivados, con muy buenos resultados.<sup>(5,14,15)</sup>

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Metodología teórica

Antes de llevar a cabo la experimentación, deben realizarse una serie de cálculos teóricos que tienen como objetivo obtener una predicción de todos los conformeros posibles para el sistema que está siendo estudiado y las propiedades de interés espectroscópico de éstos, es decir, constantes de rotación, momento dipolar, momento de cuadrupolo nuclear -si lo hubiera- y energías relativas.

Para esto se emplean diferentes métodos computacionales, cada uno de ellos orientado a una función diferente. A lo largo de este apartado se llevará a cabo una pequeña revisión de todos los cálculos empleados en las predicciones de la estructura de la N-Acetilgalactosamina, comentando las bases cuánticas y computacionales de cada uno de los procesos.

Un aspecto importante en numerosos sistemas moleculares (sobre todo en sistemas orgánicos o bioquímicos como el que ocupa este estudio) es la existencia de diferentes isómeros conformacionales (o conformeros) del compuesto estudiado. Se trata de diferentes estereoisómeros que pueden interconvertirse a través de rotaciones de enlaces. El análisis conformacional consiste en explorar todos los conformeros posibles para la molécula que se está estudiando. Sin embargo, cuantos más átomos poseen los sistemas moleculares bajo estudio más difícil se hace la búsqueda conformacional, ya que el número de torsiones de enlaces posibles es cada vez mayor. Por esto, es necesario emplear cálculos computacionales cuyo objetivo sea encontrar todos los conformeros estables posibles para una estructura dada.

Esta búsqueda se lleva a cabo a través de un análisis de la hipersuperficie de potencial del sistema. Esta hipersuperficie es la representación  $(n+1)$ -dimensional de la energía de un sistema molecular en función de  $n$  parámetros geométricos propios del sistema que está siendo estudiado, como pueden ser distancias y ángulos de enlace o ángulos diedros. Esta hipersuperficie es irregular: presenta mínimos (valles en la superficie) que se corresponden con los conformeros más estables de la molécula. Así, el análisis de la hipersuperficie de potencial debe ir encaminado a obtener todos los mínimos.

Para realizar este análisis, se emplean los métodos computacionales de mecánica molecular, los cuales consideran la molécula como un conjunto de esferas unidas por muelles y tratan estos sistemas según la mecánica clásica, simplificando en gran medida los cálculos. No se tienen en cuenta, por tanto, las energías electrónicas ni los efectos cuánticos que puedan tener lugar en la molécula, dando lugar a una aproximación muy básica del sistema con un coste computacional mínimo. Esta aproximación, aunque simple, supone un muy buen punto de partida para métodos computacionales más complejos que permitan refinar las estructuras obtenidas, como se verá más adelante.

A la hora de aplicar un método de mecánica molecular, deben definirse todos los tipos de átomos presentes en la molécula, así como las longitudes y ángulos de enlace y las constantes de fuerza de los muelles que simulan los enlaces, etc. Todos estos parámetros son denominados “campo de fuerzas”. Existen diferentes campos de fuerzas, cada uno diseñado para ser aplicado en unos sistemas moleculares concretos bajo unas determinadas condiciones.

En el caso que ocupa a este trabajo, se van a emplear los campos de fuerza MMFF y AMBER:

- **Merck Molecular Force Field (MMFF):** este campo de fuerzas ha sido desarrollado para ser empleado en estudios farmacéuticos y bioquímicos, principalmente en aquellos

procesos en los que intervienen interacciones entre proteínas o ácidos nucleicos. Sin embargo, ha sido empleado con buenos resultados en sistemas englobados en la química orgánica<sup>(16)</sup>

- **Optimized Potentials for Liquid Simulations (OPLS):** se trata de un campo de fuerza que ha sido ampliamente utilizado en el estudio de biomoléculas, generalmente en fases líquidas. Sin embargo, esto no limita su uso para la búsqueda conformacional en sistemas carentes de disolvente, como el caso que ocupa este estudio. OPLS utiliza la aproximación *united atoms*, es decir, no incluye explícitamente los átomos de hidrogeno no polares, en lugar de ello aumenta el radio de los átomos enlazados a éstos.

Una vez realizada la búsqueda conformacional, los conformeros obtenidos deben ser refinados mediante métodos computacionales más complejos que la mecánica molecular. Estos métodos van a tratar los sistemas moleculares desde el punto de vista de la química cuántica, teniendo en cuenta efectos cuánticos o interacciones intramoleculares que no han sido consideradas por la mecánica molecular. En este trabajo, se emplearán dos métodos computacionales diferentes para refinar las estructuras, que se diferencian en la forma de tratar la densidad electrónica: el método del funcional de la densidad (DFT por Density Functional Theory) y el método de Møller-Plesset de segundo orden (MP2). A continuación, se detallarán ambos métodos.

La teoría del funcional de la densidad es un método computacional basado en la obtención de las diferentes propiedades de un sistema electrónico a través del uso de funcionales, es decir, funciones cuyo dominio es un conjunto de funciones. Esta teoría toma como punto central de los cálculos la densidad electrónica ( $\rho$ ).

Según el trabajo desarrollado por Pierre Hohenberg y Walter Kohn, para todo sistema electrónico bajo la influencia de un potencial local, existe una relación entre este potencial ( $v$ ), la densidad electrónica y la función de onda que describe el sistema ( $\Psi$ ):

$$v(r) \Leftrightarrow \rho(r) \Leftrightarrow \Psi$$

Esto implica que la función de onda es un funcional de la densidad ( $F[\rho(r)]$ ), que puede ser dividido en dos términos: uno que proporciona la energía cinética y otro que proporciona la repulsión electrónica. Sin embargo, no existe ninguna forma sistemática de generar formas explícitas de este funcional.<sup>(17)</sup>

Este problema fue resuelto por Kohn y Sham, quienes encontraron una manera de aproximar el funcional de la densidad. El método Kohn-Sham define el funcional como:

$$F[\rho] = T[\rho] + V_{ee}[\rho] \quad (1)$$

siendo  $T[\rho]$  la suma de energías cinéticas de cada uno de los electrones del sistema y  $V_{ee}[\rho]$  la energía de interacción entre esos electrones, que puede ser dividida en dos términos: un término que aproxima la interacción electrón-electrón a una interacción culombiana y un término que corresponde al funcional de intercambio y correlación electrónica.<sup>(18)</sup>

Así, el método Kohn-Sham entiende que los electrones del sistema no interaccionan entre sí, pero que están sometidos a un distinto potencial efectivo ( $v_{eff}(r)$ ). Este método parte de una densidad electrónica inicial, que se va refinando de manera iterativa hasta que cumple las ecuaciones de Kohn-Sham, momento en el que el sistema alcanza la autoconsistencia.

La principal ventaja de la Teoría del funcional de la densidad es que estas ecuaciones que debe satisfacer la densidad electrónica son mucho más fáciles de resolver que las ecuaciones de otros métodos complejos –lo que se traduce en un menor coste computacional– si bien es cierto, que los resultados son, en general, menos precisos que para estos métodos. Sin embargo, los resultados de cada método computacional dependen en gran medida del sistema molecular que se esté estudiando y sus propiedades químicas.

El método DFT es un buen primer paso en el refinamiento de estructuras moleculares, sin embargo, el hecho de que la teoría del funcional de la densidad solo pueda aplicarse de forma aproximada (ya que no puede calcularse con exactitud el funcional de intercambio y correlación electrónica) hace que, en ocasiones, sean necesarios cálculos de mayor nivel, en especial para el cálculo de las constantes de rotación de los diferentes conformeros refinados mediante DFT, tarea para la cual el método MP2 aporta mejores resultados.

El método de perturbaciones de Møller-Plesset de segundo orden o MP2, se trata de un método *ab-initio*, es decir, este método trata de resolver la ecuación de Schrödinger sin asumir ninguna clase de parámetros externos y basándose en un hamiltoniano efectivo. Dentro de los métodos *ab-initio*, el método de perturbaciones de Møller-Plesset se incluye dentro de los métodos post-Hartree-Fock, es decir, se basa en el método de Hartree-Fock (HF) e incluye la correlación electrónica haciendo uso de un procedimiento perturbativo.

Los métodos HF se basan en la resolución de la ecuación de Schrödinger electrónica:

$$\hat{H}_{elec} \Psi_{elec} = E_{elec} \cdot \Psi_{elec} \quad (2)$$

El hamiltoniano electrónico puede dividirse en dos partes: una monoeléctronica, que considera la energía potencial de cada electrón por separado y una parte bielectrónica obtenida como resultado del sumatorio de las energías de interacción entre pares de electrones, extendido a todos los electrones del sistema molecular.

$$\text{Parte monoeléctronica: } \hat{h}_{ii} = -\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_A \frac{Z_A}{r_{i,A}} \quad (3)$$

$$\text{Parte bielectrónica: } \hat{V}_{ee} = \sum_i \sum_{j>i} \frac{1}{r_j} \quad (4)$$

Esta parte bielectrónica, por ser muy complicada de calcular, se sustituye por una interacción promediada de cada electrón con el resto de electrones, asumiendo una distribución de carga inicial determinada que se mejorará mediante un proceso iterativo. Para calcular estas interacciones, el sistema se describe mediante una función de onda ( $\Psi$ ), que se expresa como un producto de funciones monoeléctronicas ( $\phi$ ), que se corresponden con los orbitales moleculares. Estos orbitales moleculares, son, a su vez, combinaciones lineales de funciones de base ( $\chi$ ), que se corresponden con orbitales atómicos.

Se puede escribir, por tanto:

$$\phi = \sum_i c_i \cdot \chi_i \quad (5)$$

donde  $\chi_i$  es una de las funciones de base y  $c_i$ , el coeficiente de combinación lineal. El sumatorio se extiende a todas las funciones de base.

Si la función de onda se construye como un determinante de Slater a partir de spin-orbitales, es decir, a partir de productos de orbitales por funciones de spin electrónico (que pueden ser  $\alpha$  o  $\beta$ ), entonces satisface el principio de antisimetría de Pauli.<sup>(19)</sup>

Así, para un sistema de  $n$  electrones:

$$\Psi = \frac{1}{\sqrt{n!}} \cdot \begin{vmatrix} \phi_1(1)\alpha & \phi_1(1)\beta & \dots & \phi_{n/2}(1)\alpha & \phi_{n/2}(1)\beta \\ \phi_1(2)\alpha & \phi_1(2)\beta & \dots & \phi_{n/2}(2)\alpha & \phi_{n/2}(2)\beta \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \phi_1(n)\alpha & \phi_1(n)\beta & \dots & \phi_{n/2}(n)\alpha & \phi_{n/2}(n)\beta \end{vmatrix} \quad (6)$$

Lo cual puede escribirse de forma condensada como:

$$\Psi = |\phi_1 \quad \bar{\phi}_1 \quad \dots \quad \phi_{n/2} \quad \bar{\phi}_{n/2}| \quad (7)$$

El método de Hartree-Fock parte de un conjunto de orbitales inicial, que se va mejorando a partir de un procedimiento iterativo hasta alcanzar la autoconsistencia del sistema. El problema se reduce a encontrar el conjunto de orbitales que dé lugar a un valor de energía más próximo a la energía real del sistema.

Según el principio variacional, cualquier energía calculada mediante un método teórico va a ser mayor que la energía real del sistema:

$$E_{calc} > E_{real} \quad (8)$$

Así, para resolver el problema debe minimizarse la expresión de la energía:

$$\frac{\langle \Psi | \hat{H}_{elec} | \Psi^* \rangle}{\langle \Psi | \Psi^* \rangle} = E_{calc} \quad (9)$$

Igualando la derivada de la energía respecto de las funciones monoeléctricas se obtiene:

$$\hat{F} \phi_i = \epsilon_i \cdot \phi_i \quad (10)$$

donde  $\hat{F}$  es el operador de Fock, una variante del hamiltoniano, efectiva para orbitales  $\phi_i$ .

El método de Hartree-Fock queda, por tanto, reducido a buscar aquellos valores de  $\phi_i$  que satisfagan la Ecuación 20. Sin embargo, el método de Møller-Plesset va más allá: tiene en cuenta además la correlación electrónica, la cual trata como una perturbación de la función de onda obtenida mediante el método H-F (que se denominará como  $\Psi^{HF}$ ). La función de onda del sistema es definida por el método de perturbaciones de Møller-Plesset como una expansión de diferente orden sobre la función  $\Psi^{HF}$ :

$$\Psi = \lambda_0 \cdot \Psi^{HF} + \lambda_1 \cdot \Psi^1 + \lambda_2 \cdot \Psi^3 + \dots + \lambda_n \cdot \Psi^n \quad (11)$$

siendo  $n$  el orden de la expansión,  $\lambda_n$  un parámetro real que controla el tamaño de la perturbación y  $\Psi^n$  la perturbación introducida.

Tanto el método de perturbaciones de Møller-Plesset como el método DFT, necesitan una base de cálculo para representar las funciones de onda y poder llevar a cabo los cálculos mecanocuánticos. El método DFT, además de la base de cálculo, necesita un funcional.

El funcional que va a utilizarse en este trabajo es el popular B3LYP (Becke, 3-parameter- Lee-Yang-Parr). Se trata de un funcional híbrido que permite aproximar la energía de correlación e

intercambio electrónico combinando el valor exacto de la energía de intercambio expresado en forma de orbitales de Kohn-Sham y calculado mediante una aplicación local de la teoría DFT con la energía de intercambio electrónico, aproximada mediante la teoría Hartree-Fock.<sup>(20)</sup> La calidad de los resultados obtenidos mediante este funcional, aunque depende del sistema bajo estudio y la base de cálculo elegida, ha llegado a ser muy similar a la obtenida mediante el método MP2.<sup>(21,22)</sup>

Junto con este potencial híbrido B3LYP, se usa como base de cálculo (también para cálculos MP2), la base 6-311++G(d,p). Las bases de cálculo son conjuntos de funciones matemáticas empleadas para representar las funciones de onda electrónicas. En este caso, la base empleada es una base de cálculo de valencia desdoblada (o *split-valence*), denominada 6-311G. Esta denominación hace referencia a las características de la base: cada orbital interno se encuentra descrito mediante 6 funciones gaussianas, contraídas en una sola función, asimismo, cada uno de los orbitales de valencia, los cuales intervienen en el establecimiento de intra e intermolecularidades y, por tanto, deben estar mejor descritos que los electrones del core, se encuentran descritos por una función triple-zeta, es decir, por una función que resulta de la contracción de tres gaussianas y otras dos funciones que son gaussianas primitivas

Los signos de adición (++) indican que la base incluye funciones difusas en todos los átomos. Las funciones difusas se denominan así debido a que se extienden a regiones más alejadas de los núcleos que las funciones estándar. Estas funciones se consideran de gran importancia a la hora de evaluar interacciones como los puentes de hidrógeno. Dado que en este trabajo se busca analizar las posibles interacciones entre moléculas, es necesaria una correcta descripción de la distribución electrónica en la molécula y, por tanto, se ha recurrido a una función difusa para todos los átomos, incluyendo los más ligeros (helio e hidrógeno).<sup>(23)</sup>

La nomenclatura (d,p) indica que la base de cálculo incluye también funciones de polarización, las cuales son de gran importancia cuando se trabaja con sistemas que poseen enlaces polares ya que permiten describir de una manera más precisa la polarización de carga. Esto, por tanto, va a ser de gran utilidad en la descripción de las interacciones a las que pueda dar lugar la N-acetilgalactosamina.

Para el estudio computacional de la molécula se ha empleado también una corrección denominada dispersión de Grimme (o D3). Esta corrección es introducida a la vista de que algunos funcionales (incluyendo el funcional B3LYP) no describen de una forma correcta las interacciones de Van der Waals. El uso de la dispersión de Grimme cuando se está trabajando con B3LYP como potencial en DFT, corrige esta limitación y permite obtener resultados más próximos a los valores experimentales.

## 2.2. Metodología experimental

Una vez realizados todos los cálculos computacionales necesarios para tener una predicción de los compuestos más estables, se debe llevar a cabo el experimento. Se realizará un espectro de rotación y se estudiarán los datos experimentales obtenidos, comparando los parámetros moleculares (constantes de rotación, componentes del momento dipolar y las constantes de acoplamiento cuadrupolar nuclear) de las especies del espectro experimental con las predicciones computacionales, logrando así identificar cada uno de los conformeros detectados.

Las moléculas de cualquier sistema químico, en especial aquellos en fase gaseosa, se encuentran en un continuo movimiento. Este movimiento puede ser de traslación a lo largo del espacio, de vibración de los enlaces o de rotación alrededor de algún eje. Tanto la vibración como la rotación están cuantizadas, es decir, solo son posibles ciertos niveles de energía tanto rotacional como vibracional. La espectroscopía de rotación se basa en la interacción de la radiación electromagnética con la materia y cómo ésta es capaz de provocar transiciones entre los niveles energéticos permitidos para de rotación.

Los niveles energéticos permitidos, sean de rotación, vibración, electrónicos... vienen dados por la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo. Esta ecuación predice qué funciones de onda pueden formar estados estacionarios. Matemáticamente la ecuación se escribe de la siguiente forma:

$$\hat{H} \Psi = E \cdot \Psi \quad (12)$$

donde:

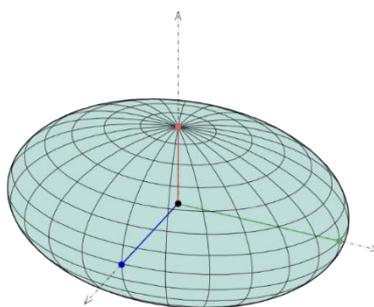
- $\hat{H}$ : es el operador hamiltoniano.
- $\Psi$ : es la función de onda de un determinado nivel energético, denominada normalmente función propia o eigenfunción del estado estacionario
- $E$ : es la energía del estado estacionario. Se denomina valor propio o eigenvalor

El operador hamiltoniano ( $\hat{H}$ ) es un operador fundamental en la mecánica cuántica, ya que corresponde al observable “energía”, es decir, la suma de las energías cinética y potencial del sistema bajo estudio. El operador hamiltoniano puede adaptarse a diferentes situaciones y tipos de sistemas.

En el estudio de sistemas en rotación, el parámetro más importante es el momento de inercia ( $I$ ) que puede ser calculado, respecto de un eje elegido arbitrariamente, como sigue:

$$I = \sum_i^{\text{átomos}} m_i \cdot r_i^2 \quad (13)$$

donde  $m_i$  es la masa del átomo  $i$  y  $r_i$  es la distancia perpendicular del átomo  $i$  al eje de rotación elegido. Así, cada molécula tendrá un momento de inercia en cada uno de los ejes, en función de la distribución de sus átomos en el espacio y su simetría, lo que dará lugar a una serie de niveles de rotación únicos para cada molécula y para cada eje de inercia.



**Figura 3. Rotor asimétrico:**

en la imagen se muestra un rotor asimétrico, en el cual, aparecen marcados los ejes de inercia

A lo largo de este trabajo, se estudia la rotación de una molécula asimétrica como es la N-acetilgalactosamina. Esta molécula pertenece al grupo puntual de simetría  $C_1$ , por lo que, al girar alrededor de cualquiera de sus ejes de inercia, conforma un rotor asimétrico caracterizado por poseer tres momentos de inercia diferentes:

$$I_c \neq I_b \neq I_a$$

A continuación, se presenta el desarrollo del Hamiltoniano para la rotación de una molécula asimétrica, como es la N-acetilgalactosamina:

$$\hat{H}_r = \frac{\hat{L}_x^2}{2I_x} + \frac{\hat{L}_y^2}{2I_y} + \frac{\hat{L}_z^2}{2I_{zz}} \quad (14)$$

donde:

- El subíndice  $r$  indica que se trata del hamiltoniano de rotación ( $\hat{H}_r$ )
- $I_x, I_y$  e  $I_z$ : son las componentes del momento de inercia.
- $\hat{L}_x^2, \hat{L}_y^2$  y  $\hat{L}_z^2$ : son los operadores del momento angular en cada uno de los tres ejes cartesianos

Además, todo rotor asimétrico puede caracterizarse empleando un parámetro de asimetría, denominado parámetro de asimetría de Ray, que cuantifica lo lejos que se encuentra la molécula de cualquiera de los dos rotores simétricos (oblate y prolate). El parámetro puede ser calculado mediante la expresión matemática siguiente:

$$\kappa = \frac{(2B - A - C)}{A - C} \quad (15)$$

donde  $A, B$  y  $C$  son los ejes principales de inercia.

En esta expresión, por tanto, se pueden definir el límite prolate ( $A > B = C$ ), designado por  $\kappa = -1$  y el límite oblate ( $A = B > C$ ), designado por  $\kappa = +1$ .

De esta manera, en todo rotor asimétrico, cada nivel de energía está vinculado a un valor de  $J$  y dos valores de  $K$ : uno en el límite prolate ( $K_{-1}$ ) y otro en el límite oblate ( $K_1$ ).<sup>(24)</sup>

La espectroscopía de rotación se basa, como ya se ha comentado, en el estudio de la forma en la que la radiación electromagnética interacciona con la materia, induciendo cambios en los niveles de rotación del sistema molecular que está siendo estudiado. Cuando este sistema es irradiado con una radiación de energía  $E = h \cdot \nu$ , y el valor de esta energía coincide con la separación energética entre dos niveles, se dice que se cumple la condición de resonancia de Plank-Bohr. Entonces, el sistema absorbe un cuanto de radiación con la que está siendo irradiado y esta absorción conduce a la transición de una molécula desde el nivel energético inferior hasta el superior. La absorción de radiación electromagnética, así como la emisión de energía que se produce cuando la molécula regresa al estado energético inicial, se pueden detectar mediante un espectrómetro y se registran como líneas en el espectro.

Sin embargo, estas transiciones entre niveles de rotación no ocurren de forma azarosa, sino que existen unas reglas que determinan qué transiciones pueden producirse (transiciones permitidas) y qué transiciones no van a poder producirse (transiciones prohibidas). Estas reglas de selección, que varían en función del tipo de rotor que se esté estudiando, son el conjunto de condiciones que se deben cumplir para que el valor de la integral de transición sea diferente de cero. Esta integral

proporciona la probabilidad (relacionada directamente con la intensidad) de una transición entre un estado de partida ( $\Psi''$ ) y un estado de llegada ( $\Psi'$ ) y puede ser calculada como sigue:

$$\mu_r = \int \Psi' \mu \Psi'' d\tau \quad (16)$$

La regla de selección más importante en espectroscopía de rotación es que la molécula debe presentar un momento dipolar permanente ( $\mu \neq 0$ ). Para moléculas asimétricas, deben considerarse las componentes del momento dipolar en los tres ejes de inercia principales. Ésto es importante porque la rotación alrededor de un determinado eje de inercia tiene unos requerimientos en cuanto a la simetría de las funciones de onda de los estados fundamental y excitado diferentes a las de cualquiera de los otros dos ejes. Ésto implica, por tanto, que deben estudiarse de forma separada las rotaciones alrededor de los tres ejes de inercia. Pueden darse, por tanto, transiciones tipo *a*, tipo *b* o tipo *c*, en función del eje de inercia alrededor del cual se dé la rotación.

Otra regla de selección hace referencia a la variación que puede tener el número cuántico *J*, que puede ser, como máximo, de un nivel ( $\Delta J = 0, \pm 1$ ). Si *J* no varía ( $\Delta J = 0$ ), entonces debe hacerlo  $K_1$  o  $K_{-1}$  (en caso contrario no habría transición). Sin embargo, si *J* varía ( $\Delta J = \pm 1$ ),  $K_1$  y  $K_{-1}$  pueden variar o no hacerlo. Cada una de estas posibilidades da lugar a una transición diferente: se denominan transiciones de la rama *P* a aquellas en las que  $\Delta J = -1$ ; las transiciones en las que  $\Delta J = 1$  se denominan rama *R* y aquellas en las que *J* no varía, se denominan rama *Q*.

Por último, están restringidos también los cambios en  $K_1$  o  $K_{-1}$ . Para una transición tipo “a” están permitidos los cambios en  $K_1$ , mientras que, para una transición tipo *c* el cambio permitido es en  $K_{-1}$ . Para las transiciones tipo *b* se pueden dar cambios en  $K_1$  y en  $K_{-1}$  de manera simultánea.

Los cambios en  $K_1$  o  $K_{-1}$  pueden encontrarse resumidos en la Tabla 1.

Momento dipolar	$\Delta K_{-1}$	$\Delta K_1$
$\mu_a \neq 0$	$0, \pm 2, \dots$	$\pm 1, \pm 3, \dots$
$\mu_b \neq 0$	$\pm 1, \pm 3, \dots$	$\pm 1, \pm 3, \dots$
$\mu_c \neq 0$	$\pm 1, \pm 3, \dots$	$0, \pm 2, \dots$

en  $K_1$  o  $K_{-1}$ : en la Tabla se muestran los diferentes cambios posibles para los valores de  $K_1$  y  $K_{-1}$  en función del momento dipolar

Todas estas reglas de selección implican que son posibles solo ciertas transiciones, esto se traduce en que en los espectros aparecen patrones reconocibles que se pueden asignar a cada uno de los tipos de transiciones permitidas.

Hasta ahora, se ha supuesto la rotación de las moléculas bajo el modelo del rotor rígido. Este modelo supone la molécula como un conjunto de esferas, correspondientes a los átomos que la conforman, unidas a través de enlaces sólidos e indeformables.

Sin embargo, los enlaces en las moléculas no son indeformables, pueden sufrir modificaciones en su longitud debido a la aplicación de diferentes fuerzas, una de ellas es la fuerza centrífuga. Cuando cualquier partícula experimenta un movimiento circular (sea o no acelerado) experimenta una fuerza que tiende a separarla del eje de rotación. Esta fuerza es proporcional a la distancia que separa a la partícula del eje y a su velocidad angular. Así, parte de la energía de rotación de

cualquier molécula se emplea en modificar las distancias de enlace. Para tener esto en cuenta en las ecuaciones de energía se introduce un término de corrección denominado distorsión centrífuga.

Sin embargo, para el sistema molecular que ocupa este trabajo van a estudiarse las transiciones de baja frecuencia y el efecto de la distorsión centrífuga es, en general, despreciable.

Asimismo, se ha considerado que el sistema bajo estudio posee únicamente núcleos que poseen un momento de spin nuclear nulo (hidrogeno, carbono, oxígeno...), al menos en sus isotopos más abundantes, lo que significa que poseen una distribución esférica de la carga nuclear. Sin embargo, existen ciertos núcleos, algunos predominantes en las biomoléculas como el nitrógeno, que poseen un momento de spin nuclear ( $I$ ) diferente de cero. Cuando este momento es mayor que  $1/2$ , entonces el núcleo estudiado posee un momento de cuadrupolo nuclear ( $Q$ ), que puede interactuar con el gradiente del campo eléctrico molecular ( $\partial^2 V / \partial^2 z$ ) en la posición del espacio que ocupa el núcleo.<sup>(25)</sup>

De forma cuantitativa, el momento de cuadrupolo nuclear es un parámetro que describe la simetría de la distribución de la carga eléctrica de un núcleo. Un momento cuadrupolar distinto de cero implica que la distribución de carga del núcleo estudiado no es esférica, pudiendo describir un oblate, un prolate, o bien, ser completamente asimétrica.

Matemáticamente, el momento cuadrupolar puede expresarse en función del momento de spin nuclear y de su proyección en el eje  $z$ :

$$Q = \frac{3 \cdot K^2 - I \cdot (I + 1)}{(I + 1)(2 \cdot I + 3)} \cdot Q_0 \quad (17)$$

donde  $Q_0$  se corresponde con la forma clásica de calcular el momento cuadrupolar:

$$Q_0 = \int \rho \cdot (3z^2 - r^2) \cdot dV \quad (18)$$

siendo  $\rho$  la densidad de carga.

Este momento suele ser expresado como un tensor:

$$q_{ij} = \begin{pmatrix} q_{xx} & q_{xy} & q_{xz} \\ q_{xy} & q_{yy} & q_{yz} \\ q_{xz} & q_{yz} & q_{zz} \end{pmatrix} \quad (19)$$

La existencia de núcleos con un momento de cuadrupolo nuclear no nulo se pone de manifiesto en los espectros de rotación, en los que el acoplamiento entre el momento de cuadrupolo nuclear y la rotación molecular dan lugar a un desdoblamiento de las líneas espectrales de rotación, dando lugar a la estructura hiperfina de rotación. El número de componentes en las que se desdoble cada una de las líneas originales del espectro dependerá del valor del momento de spin nuclear del núcleo que este generando el desdoblamiento. Asimismo, la magnitud de este desdoblamiento, es decir, la distancia entre las diferentes componentes en las cuales se desdobra cada una de las líneas originales, dependerá del momento de cuadrupolo nuclear y del gradiente del campo eléctrico.

El análisis de esta estructura hiperfina y de la magnitud del desdoblamiento permite obtener las constantes de acoplamiento cuadrupolar nuclear ( $\chi_{ij}$ ), que se agrupan en el tensor de acoplamiento cuadrupolar nuclear:

$$\chi_{ij} = e \cdot Q \cdot q_{ij} = \begin{pmatrix} \chi_{xx} & \chi_{xy} & \chi_{xz} \\ \chi_{xy} & \chi_{yy} & \chi_{yz} \\ \chi_{xz} & \chi_{yz} & \chi_{zz} \end{pmatrix} \quad (20)$$

Para este estudio, las constantes de interés son  $\chi_{xx}$ ,  $\chi_{yy}$  y  $\chi_{zz}$ , es decir, aquellas en los ejes principales de inercia, ya que la N-acetilgalactosamina solo presenta un núcleo de nitrógeno como único núcleo con momento de spin nuclear no nulo. El nitrógeno posee un momento cuadrupolar bajo, por lo que las componentes no diagonales no van a ser significativas.

Desde el punto de vista instrumental, para llevar a cabo los espectros de rotación experimentales se van a emplear dos tipos de espectrómetros diferentes: por un lado, un espectroscopio de banda ancha (CP-FTMW) capaz de abarcar un amplio rango de frecuencias y por otro lado un espectroscopio de alta resolución (MB-FTMW) que permita resolver el desdoblamiento cuadrupolar que se da en los picos descubiertos mediante el anterior.

### 2.2.1. *Chirped-pulse Fourier Transform Microwave Spectrometer (CP-FTMW)*

El espectrómetro de pulso *chirp* o CP-FTMW por sus siglas en inglés, es un tipo de espectrómetro de banda ancha, es decir, capaz de obtener espectros en un rango de frecuencias más amplio que los espectrómetros tradicionales.

Los espectrómetros de alta resolución (los cuales se comentarán en el siguiente apartado) emplean un resonador de Fabry-Perot. Este componente limita el ancho de banda que puede estudiarse, generalmente a regiones de menos de 1 MHz, ya que para regiones mayores el tiempo de adquisición sería demasiado largo.<sup>(26)</sup> Sin embargo, el estudio de los espectros rotacionales requiere la capacidad de analizar un ancho de banda mayor de lo que permiten los espectrómetros con un resonador Fabry-Perot, en especial en el estudio de biomoléculas que, como el caso que ocupa este trabajo, poseen un número elevado de átomos.

Los espectrómetros de pulso *chirp* son uno de los últimos avances de la espectroscopía rotacional de alta sensibilidad. Permiten barrer un amplio ancho de banda con una alta resolución y sensibilidad. El funcionamiento de este tipo de espectrómetros se basa en la generación de un pulso *chirp*, es decir, un pulso de barrido lineal entre dos frecuencias determinadas. Este pulso, debidamente amplificado, es capaz de polarizar macroscópicamente las moléculas del compuesto que se desea analizar, de forma que éstas generan una respuesta a la excitación, la cual se detecta y amplifica.

El funcionamiento del espectrómetro de *chirp* es el siguiente: la muestra, en estado gaseoso, es introducida en el interior de un tanque de sometido a alto vacío ( $10^{-3}$ - $10^{-7}$ hPa), mediante una válvula pulsada que genera una expansión supersónica. Simultáneamente, un generador de onda arbitraria (AWG) que opera a  $24 \text{ Gsamples} \cdot \text{s}^{-1}$  (24 mil millones de muestras por segundo) crea un barrido de frecuencias comprendido en el rango de las microondas (concretamente entre 0 y 12GHz) que, una vez amplificado e introducido en el tanque de expansión supersónica mediante una antena, provoca una polarización macroscópica de las moléculas de muestra. Tanto la válvula como el generador de onda arbitraria son activados un de forma coordinada mediante un generador de *delay* (*digital delay generator*). Cuando el

pulso de radiación cesa, el sistema comienza a relajarse, de forma que emite espontáneamente energía hasta alcanzar de nuevo el estado de equilibrio. Esta emisión de radiación se denomina señal de decaimiento o FID (del inglés *Free Induction Decay*) y es registrada mediante una segunda antena, colocada frente a la primera. La señal de decaimiento se amplifica y se recoge en el dominio del tiempo mediante un osciloscopio digital que opera a  $50 \text{ Gsamples}\cdot\text{s}^{-1}$ . Tras ser recogida, el osciloscopio transforma la señal al dominio de la frecuencia mediante un proceso de transformación de Fourier. Para lograr los mejores resultados posibles, así como una buena reproducibilidad, todas las fuentes de radiación se encuentran sincronizadas a un estándar de rubidio de 10 MHz.<sup>(26)</sup>

### **2.2.2. *Molecular beam Fourier Transform Microwave Spectrometer (MB-FTMW)***

Como ya se ha comentado, los espectrómetros de pulso *chirp* permiten barrer un amplio ancho de banda con alta resolución y sensibilidad. Sin embargo, la resolución obtenida mediante estos dispositivos no es lo suficientemente alta para poder observar el desdoblamiento espectral causado por el acoplamiento cuadrupolar y poder identificar correctamente las transiciones dentro de la estructura hiperfina de rotación. Para poder resolver esta estructura debe emplearse un tipo de espectrómetros con una mayor resolución: los espectrómetros de haz molecular o MB-FTMW por sus siglas en inglés.

La diferencia de estos espectrómetros frente los de pulso *chirp* reside en que estos últimos no emplean un resonador de Fabry-Perot, mientras que los espectrómetros de haz molecular sí.

El resonador de Fabry-Perot se encuentra en el interior del tanque de expansión supersónica y mantenido también en alto vacío. Este dispositivo está compuesto por dos espejos esféricos y altamente reflectantes colocados enfrentados. Uno de los espejos está fijo en una de las paredes del tanque de expansión supersónica mientras que el otro espejo es móvil, pudiendo así modificar la distancia entre ambos. El movimiento de este espejo está controlado electrónicamente y permite seleccionar con altísima precisión la frecuencia de polarización a la que va a ser sometida la muestra. La radiación se introduce en el resonador a través de una antena, la cual está situada en el espejo fijo. La radiación viaja desde la antena emisora hasta el espejo contrario y se refleja, interfiriendo con la onda incidente. Si la condición de resonancia se cumple, es decir, si la distancia entre los espejos del resonador es igual a un múltiplo entero de la semilongitud de onda de la radiación, entonces la interferencia es constructiva, generándose una onda estacionaria en la cavidad de una intensidad mucho mayor que la emitida en primer lugar por la antena, por lo que en este caso no son necesarios amplificadores tan potentes como en el caso de la espectroscopía CP-FTMW.

El funcionamiento del espectrómetro de haz molecular es el siguiente: el resonador de Fabry-Perot se encuentra en el interior del tanque de expansión supersónica, como ya se ha comentado. El resonador está compuesto de dos espejos esféricos de 54 cm de diámetro con un radio de curvatura de 90cm. Uno de los espejos es fijo y el otro, se encuentra montado sobre un motor, lo que permite controlar la frecuencia de resonancia de la cavidad. En el interior de la cavidad existen dos antenas, dispuestas una en cada uno de los espejos y cada una con una función: mientras que la antena que se encuentra en el espejo fijo se emplea para polarizar y detectar la radiación de microondas, la antena que se encuentra en el espejo móvil se emplea para la correcta selección de frecuencia, ya que permite monitorizar la potencia transmitida. El factor Q de esta cavidad (un factor que mide la relación entre la energía almacenada y la energía disipada por la cavidad en un ciclo completo) es de,

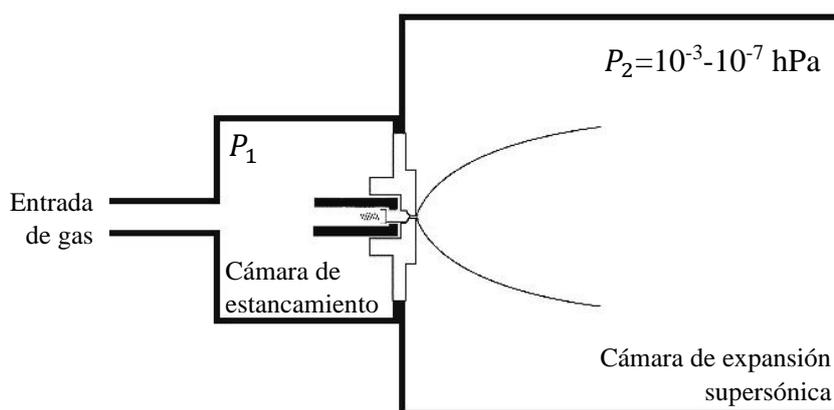
aproximadamente,  $10^4$  operando a 12GHz. La muestra es introducida en esta cavidad mediante una válvula pulsada que se encuentra en el espejo fijo, de forma que el haz molecular que se crea al introducir la muestra es paralelo al eje del resonador. Esta disposición supone una mejora de la sensibilidad y la resolución respecto de una configuración en la que el haz molecular es perpendicular al eje del resonador. La radiación de microondas, emitida por un sintetizador, se modula, se amplifica y se emite con un ligero retraso respecto de la introducción de la muestra. La emisión molecular se recibe y amplifica mediante un receptor superheterodino, que emplea la mezcla de frecuencias para convertir la señal recibida a una frecuencia intermedia fija (en este caso, 7 MHz) y amplificarla, de forma que puede ser registrada mediante un registrador de transitorios. Al igual que en el caso de CP-FTMW, en este espectrómetro todas las fuentes de radiación se encuentran sincronizadas a un estándar de rubidio de 10 MHz.<sup>(27,28)</sup>

### 2.2.3. Introducción de muestra mediante chorro supersónico

Ambas dos técnicas, como se desprende de los anteriores párrafos, emplean sistemas de introducción de muestra mediante chorro supersónico. Se trata de un método de introducción de muestra que presenta numerosas ventajas para la espectroscopía de rotación. A lo largo del siguiente apartado se desarrollará cómo se puede crear un chorro supersónico y se explicara por qué una expansión supersónica es realmente útil en la espectroscopía de rotación.

Esta metodología permite estudiar muestras a una temperatura muy baja y en unas condiciones de aislamiento virtual, lo cual es muy importante de cara al estudio de sistemas moleculares.

Para generar un chorro (o *jet*) supersónico es necesario disponer de dos cavidades contiguas: una cámara de estancamiento, donde se mezclan la muestra y el gas portador y otra, de mayor tamaño, en la que tiene lugar el chorro supersónico. Ambas dos cavidades se encuentran conectadas a través de una válvula controlada electrónicamente y entre ellas existe una muy alta diferencia de presiones, lo que se logra extrayendo continuamente el aire de la cámara de expansión mediante bombas de vacío.



**Figura 4. Esquema de una cámara de expansión supersónica:**

en la imagen se puede observar un sencillo esquema en el que se representa la cámara de expansión supersónica, que se encuentra comunicada con la cámara de estancamiento.

Sea  $P_1$  la presión de la cámara de estancamiento y  $P_2$  la presión de la cámara de expansión; el *jet* generado al abrir la válvula será supersónico si se cumple lo siguiente:

$$\frac{P_1}{P_2} > G \quad (21)$$

donde  $G$  es un valor crítico que puede ser calculado como sigue:

$$G = \left(\frac{\gamma + 1}{2}\right)^{\gamma/(\gamma-1)} ; \quad \gamma = \frac{C_p}{C_v} \quad (22)$$

siendo  $C_p$  y  $C_v$  las capacidades caloríficas a presión y volumen constante, respectivamente.

Cuando se satisface la condición de la Ecuación 22 y la válvula que separa ambos espacios se abre (por un espacio de tiempo muy breve), un chorro de gas fluye desde la cámara de estancamiento hacia la cámara contigua, expandiéndose y siendo acelerado por la diferencia de presiones hasta alcanzar una velocidad mayor que la del sonido. Este jet así generado, es una expansión adiabática de gas, por lo que puede emplearse la aproximación isentrópica para caracterizarlo. Según esta aproximación el gas en expansión se considera ideal y se desprecian los efectos de transporte, los efectos de la viscosidad, la conducción del calor y la difusión de especies químicas dentro del jet. También se considera que la  $C_p$  y  $\gamma$  se mantienen constantes.<sup>(29)</sup>

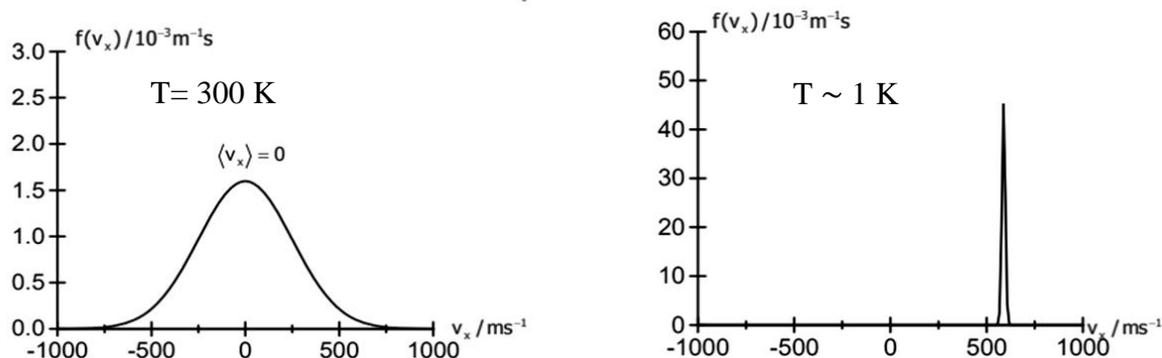
La magnitud termodinámica más relevante –y, por tanto, la que va a emplearse para caracterizar el *jet*– es la entalpía por unidad de masa ( $h$ ).

Sea la  $h_1$  la entalpía del gas (mezcla del gas portador y la muestra) que se encuentra en la cámara de estancamiento, entonces la entalpía del gas durante la expansión ( $h$ ) está relacionada con  $h_1$  según la siguiente expresión:

$$h_1 = h + \frac{v^2}{2} \quad (23)$$

donde  $v$  es la velocidad de flujo y  $h_1$  se considera constante durante la expansión.

Como se desprende de la Ecuación 24, parte de  $h_1$  se convierte en energía cinética debido a la aceleración causada por la diferencia de presiones, de modo que la entalpía del gas durante la expansión disminuye en gran medida, dando lugar a un enfriamiento del gas. Además, en este proceso, el gas pasa de tener un movimiento agitado y aleatorio a tener un movimiento direccional. Todo esto provoca un enfriamiento traslacional traducido en cambio drástico de la distribución de velocidades del gas, como puede apreciarse en la Figura 4.



**Figura 5. Distribución de velocidades de un gas a diferentes temperaturas:**  
en estos gráficos se muestra la distribución de velocidades del argón a 300 K (izquierda) y a 1 K (derecha)

Este enfriamiento traslacional lleva a unas condiciones sub-Doppler, es decir, al disminuir la velocidad de las partículas, el efecto Doppler es menor y, por tanto, la sensibilidad alcanzada mediante las técnicas que emplean este sistema de introducción de muestra es mucho mayor. Además, el *jet*, como se ha comentado, posee un movimiento direccional, lo que implica que todas las moléculas del gas en la expansión van a tener una misma dirección y no van a colisionar entre ellas. Esto produce dos efectos: por un lado, las moléculas se encuentran en un estado de aislamiento virtual, lo que permite caracterizarlas como si se tratara de una sola molécula aislada en el vacío; por otro lado, la ausencia de colisiones elimina el ensanchamiento de banda por presión (no se dan colisiones entre las moléculas, pero tampoco entre moléculas y la pared de la cámara) y esto conduce a un aumento aun mayor de la resolución.

#### 2.2.4. Ablación *laser*

Como se ha visto, la expansión supersónica es un método de introducción de muestra muy útil ya que permite trabajar en unas condiciones de alta resolución. Sin embargo, como se desprende del anterior apartado, la muestra a introducir debe ser gaseosa para que pueda ser mezclada en la cámara de estancamiento con el gas portador a fin de crear la expansión supersónica. Sin embargo, la mayor parte de las biomoléculas son sólidos a temperatura ambiente, presentando puntos de fusión relativamente altos que no pueden ser logrados mediante un calefactor (en concreto, la N-acetilgalactosamina presenta un punto de fusión de 173 °C).<sup>(30)</sup> Es necesario, por tanto, un método para conseguir transferir parte de la muestra sólida a fase gas de forma que pueda ser sometida a una expansión supersónica.

Para solucionar esta problemática se emplea la ablación láser (LA, por sus siglas en inglés). Este proceso consiste en disparar un pulso láser contra la muestra, de forma que ésta absorbe la energía. Esta gran cantidad de energía absorbida provoca la volatilización de parte de la muestra, de forma que puede ser mezclada con un gas portador (generalmente argón o neón) en la cámara de estancamiento e introducida a la expansión supersónica.

Para poder emplear la ablación láser junto con la expansión supersónica se debe disponer de un sistema formado por un láser, una serie de espejos y lentes y un soporte para la muestra. El láser empleado será un láser Nd-YAG (*Neodymium-doped yttrium aluminium garnet*) en el que la cavidad láser está constituida por un granate de itrio y aluminio dopado con neodimio. Para conseguir la mayor potencia posible, este láser es empleado con pulsos de picosegundos ( $10^{-12}$  segundos).

La potencia es calculada como sigue:

$$P = \frac{E}{T} \quad (24)$$

donde  $E$  es la energía de la radiación láser emitida y  $T$  es la duración del pulso. Por tanto, si la duración del pulso es muy pequeña, dado que la energía emitida por el láser es constante, la potencia instantánea de cada pulso será muy alta, de forma que pueda darse la volatilización de la muestra. Por otra parte, los espejos y las lentes permiten dirigir y focalizar el haz láser sobre la muestra de una manera precisa. Existen también una serie de cristales con propiedades no lineales que permiten modificar la frecuencia de la radiación láser. El uso de este tipo de cristales permite seleccionar los diferentes armónicos de la radiación láser: un cristal que doble la frecuencia del láser proporciona el segundo armónico de la radiación, un cristal que triplique la frecuencia de operación proporciona el tercer armónico, etc. Esta posibilidad de seleccionar el armónico deseado de la radiación láser es muy útil en la ablación láser ya que, para que se dé la ablación de la muestra, como ya se ha comentado, ésta debe absorber la energía emitida por el láser. La capacidad de poder seleccionar la frecuencia (y, por tanto, la longitud de onda) de la radiación láser permite emitir el pulso de ablación en una longitud de onda a la que la muestra absorba la mayor cantidad de radiación posible, aumentando la volatilización de la muestra.

Finalmente, el soporte de la muestra se encuentra unido a un motor, que permite rotar y mover la muestra mientras está siendo sometida a la ablación. De esta manera, se consigue la mejor reproducibilidad y calidad posible de los resultados, ya que el láser no impacta continuamente en la misma posición, cada impacto se da en un nuevo punto de la superficie de la muestra.

La manera de introducir la muestra en el sistema de ablación es mediante la fabricación de un cilindro que encaja perfectamente en el soporte motorizado. Para ello las muestras se pulverizan perfectamente mediante un mortero de ágata y se mezclan con la mínima cantidad posible de aglomerante. Tras esto, se introducen en un molde cilíndrico y prensan con la ayuda de una prensa hidráulica. Una vez se ha obtenido el cilindro, se introduce en un desecador durante, al menos, un mes, con el fin de extraer cualquier molécula de agua que pueda estar presente en la muestra y que contaminaría el espectro, además de que debilitaría la muestra a la hora de colocarla en el soporte. En el caso que ocupa a este trabajo, la N-acetilgalactosamina se trata de un compuesto sensible a la luz y a la temperatura por lo que los cilindros de muestra, una vez fabricados, deben ser colocados en el desecador con una mezcla de pentóxido de fosforo e hidróxido sódico (que actúan como agentes desecantes), protegidos de la luz y en un frigorífico.

### 3. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Una vez explicado todo el marco teórico y experimental que encuadra este trabajo, se procede a comentar los resultados experimentales obtenidos mediante el empleo de las técnicas que han sido comentadas a lo largo de las anteriores páginas.

El primer paso en el desarrollo experimental de este trabajo consiste en la obtención de todos los posibles conformeros de la N-acetilgalactosamina. Dado que se trata de un sistema molecular complejo, ya que existen numerosos enlaces que permiten torsiones alrededor de su eje, la

obtención de los conformeros no es un proceso trivial. Por tanto, se ha recurrido a la mecánica molecular para el análisis conformacional de la molécula.

Para este análisis se ha recurrido a la herramienta Macromodel, que conforma el entorno gráfico del *software* de modelización molecular de Schrödinger, Inc. Este *software* permite el análisis de la hipersuperficie de potencial de un determinado sistema molecular en base a los parámetros introducidos por el usuario. La N-acetilgalactosamina se analiza empleando primero OPLS y luego MMFFs como campos de fuerzas, en ambas ocasiones con los siguientes parámetros:

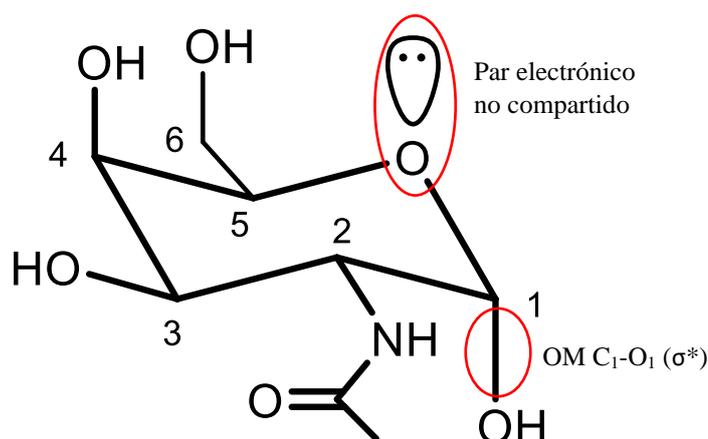
- **Ventana energética para los conformeros hasta 30 KJ·mol<sup>-1</sup>:** esto implica que el programa solo guardará como estructuras estables aquellos mínimos de la SEP que no disten más de 30 KJ·mol<sup>-1</sup> de la estructura más estable encontrada. La selección de una ventana energética adecuada es crucial para no perder ningún mínimo real de la hipersuperficie de potencial, así como para no obtener demasiadas estructuras, muchas de las cuales no serían visibles en un espectro experimental, dada su alta energía.
- **Selección de MT/LLMOD como método de muestreo:** MT/LLMOD son las siglas en inglés de *Mixed Torsional/ Large-scale Low-Mode*, el cual es uno de los métodos de muestreo disponibles en Maestro. Para descubrir las diferentes estructuras que pueblan la hipersuperficie de potencial, el método MT/LLMOD selecciona el conformero introducido por el usuario y genera los diferentes modos de vibración de la estructura en función de los parámetros del campo de fuerzas. A partir de los modos normales calculados, se generan estructuras moléculas diferentes a la inicial y cada una de estas estructuras es luego analizada para comprobar que satisface el resto de condiciones y parámetros del análisis conformacional.<sup>(31)</sup>

Es decir, tras realizar el análisis de la hipersuperficie de potencial mediante los campos de fuerzas OPLS y MMFFs, se obtienen numerosos conformeros, todos ellos mínimos de esta superficie y que, por tanto, se consideran conformeros estables. Éstos van a ser refinados mediante cálculos de mecánica cuántica, en este caso, mediante la teoría del funcional de la densidad (DFT). Los resultados obtenidos mediante la teoría del funcional de la densidad, como ya se ha comentado con anterioridad en este trabajo, son mucho más precisos que los obtenidos mediante mecánica molecular, ya que la DFT permite una mejor comprensión de las interacciones intramoleculares.

Las interacciones intramoleculares son fenómenos muy importantes a la hora de la estabilización de los diferentes conformeros. Además de estas interacciones, algunas moléculas orgánicas y biomoléculas presentan ciertos efectos que aumentan la estabilidad de ciertos conformeros a través de diferentes interacciones intramoleculares: se trata del efecto *gauche* y efecto anomérico.<sup>(5,14,32)</sup>

El efecto *gauche* es una situación atípica dentro de la química orgánica en la el conformero más estable de una molécula no es aquel que posee una conformación anti, sino aquel cuya disposición de sustituyentes es *gauche*, es decir. En esta disposición *gauche* los sustituyentes se encuentran formando un ángulo de torsión de, aproximadamente, 60°, en lugar de los 180° de ángulo de torsión que formarían en disposición anti.<sup>(33)</sup> Este efecto está controlado, principalmente por un fenómeno de hiperconjugación. En el caso que ocupa el presente estudio, este fenómeno implica una cesión de carga del orbital C-H enlazante (donador de electrones) al orbital C-O antienlazante (fuerte aceptor de electrones) del carbono contiguo, lo cual lleva a una estabilización de la estructura. Dado que en la NAcGal existen varios grupos hidroxilo en cuyo carbono vecinal existe un enlace C-H, este fenómeno dará lugar a una importante estabilización de los conformeros.

El efecto anomérico es un fenómeno característico de los azúcares y sus derivados que se manifiesta, sin embargo, en todo aquel sistema que posea un ciclo con un heteroátomo. En este tipo de sistemas, los sustituyentes polares unidos a los carbonos contiguos al heteroátomo presentan una preferencia por la posición axial, en lugar de la ecuatorial, posición que conduce al menor impedimento estérico y que, por tanto, es la posición esperada en la conformación silla de estos monosacáridos. La estabilización de los derivados de azúcares por este efecto es resultado, de nuevo, de un fenómeno de hiperconjugación, esta vez entre un par electrónico no compartido del oxígeno del heterociclo y el orbital molecular antienlazante del enlace  $C_1-O_1$ . Esta hiperconjugación está favorecida cuando ambos orbitales se encuentran en una disposición antiperiplanar (1,2-diaxial),<sup>(34)</sup> lo que fuerza la disposición axial del OH anomérico, como puede comprobarse en la Figura 8.



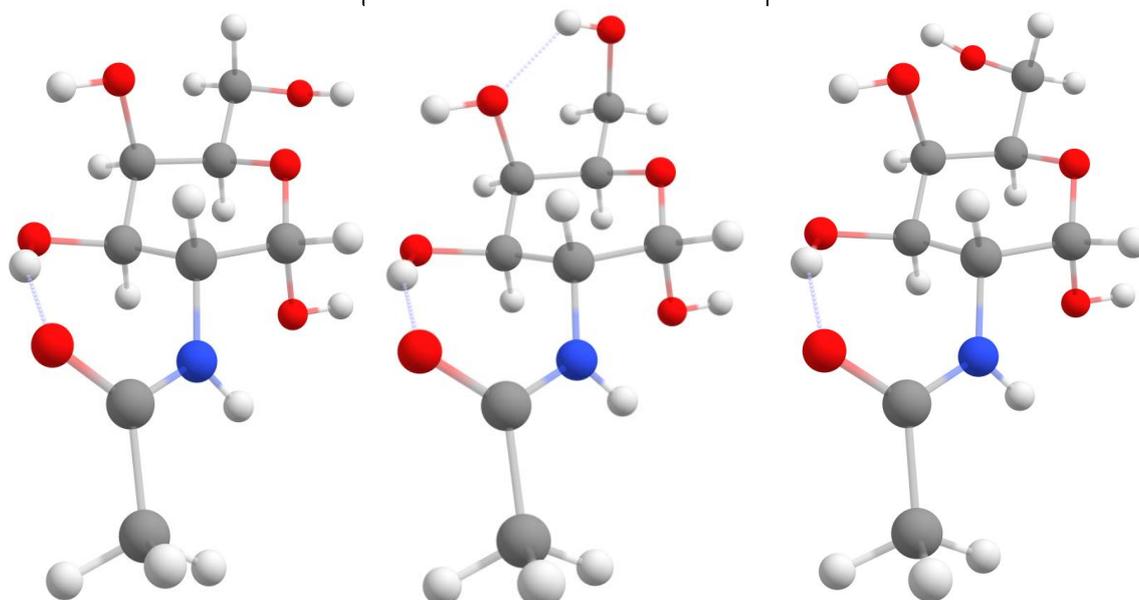
**Figura 7. Efecto anomérico en la NacGal:**

hiperconjugación del par electrónico no compartido del oxígeno y el orbital molecular antienlazante del enlace  $C_1-O_1$  del grupo hidroxilo en  $C_3$

En el carbono 5, también contiguo al heteroátomo, el grupo hidroximetil se encuentra en disposición ecuatorial. Esto se debe a diversos factores: 1) este grupo funcional es más voluminoso que el grupo hidroxilo, por lo que el impedimento estérico va a cobrar una mayor significancia; 2) el átomo unido al carbono  $C_5$  es otro carbono, lo que implica que la carga va a estar aproximadamente igual repartida a lo largo del enlace  $C_5-C_6$  (el efecto del OH, unido a  $C_6$  no es significativo), por lo que el orbital molecular antienlazante del enlace no va a comportarse como un aceptor electrónico, como ocurre en el caso del enlace  $C_1-O_1$ ; 3) el hidroxilo unido al carbono  $C_6$ , como ya se ha comentado, establece interacciones intramoleculares con el grupo OH del carbono  $C_4$  que estabilizan la molécula y que únicamente son posibles si la disposición del grupo hidroximetil es ecuatorial.

Para la N-acetilgalactosamina, la búsqueda conformacional y el refinamiento de estructuras posterior, tras la eliminación de estructuras duplicadas, conduce a 48 conforméromos diferentes. Para el estudio de éstas, se elabora una tabla en la que aparecen todas las estructuras obtenidas, ordenadas en orden creciente de energía. Esta tabla se puede encontrar en el *Apéndice I* de la sección de *Material Complementario*. Mientras, en la Tabla 2 se pueden encontrar los nueve primeros conforméromos más estables. Se han seleccionado únicamente nueve conforméromos debido a que, el último presenta ya una diferencia energética de más de  $900\text{cm}^{-1}$  respecto del conforméromo I (el más estable de todos los predichos), lo que implica que los siguientes conforméromos en energía no van a ser, en ningún caso, observables en el espectro experimental, ya que en la expansión supersónica se formarán preferentemente aquellos conforméromos más estables.

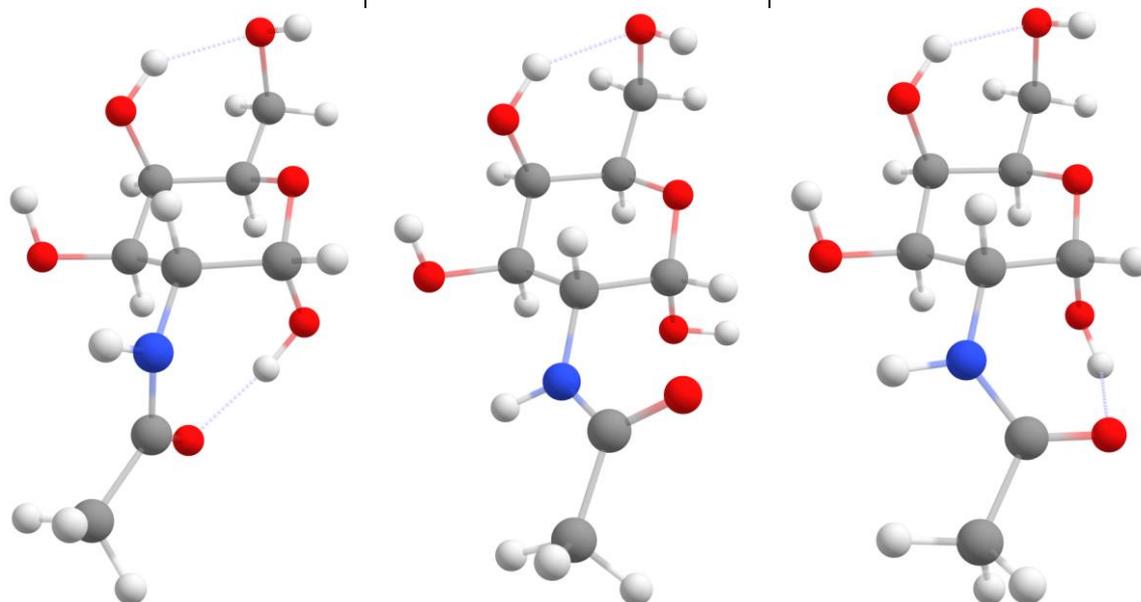
Parámetro	Confórmero I	Confórmero II	Confórmero III
$A^{[a]}$	1200.6	1179.9	1209.5
$B^{[a]}$	361.2	372.4	363.6
$C^{[a]}$	299.9	314.2	302.9
$\mu_a^{[b]}$	2.2	3.1	3.0
$\mu_b^{[b]}$	4.6	4.4	4.5
$\mu_c^{[b]}$	0.6	2.2	0.5
$\chi_{aa}^{[c]}$	2.424	2.478	2.346
$\chi_{bb}^{[c]}$	0.587	0.871	0.579
$\chi_{cc}^{[c]}$	-3.011	-3.349	-2.925
$\Delta E^{[d]}$	0	98	163
$\Delta E_{ZPE}^{[e]}$	0	140	244
$\Delta G^{[f]}$	0	212	237



<sup>[a]</sup>:  $A$ ,  $B$  y  $C$  son las constantes rotacionales, medidas en MHz. <sup>[b]</sup>:  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  designan las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debye ( $1 \text{ D} \approx 3.33564 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}$ ). <sup>[c]</sup>:  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: Energías relativas excluyendo (<sup>[d]</sup>) e incluyendo (<sup>[e]</sup>) la energía en el punto cero (ZPE), respectivamente. <sup>[f]</sup>: Energía libre de Gibbs relativa calculada a 298K. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: todas las energías aparecen expresadas en  $\text{cm}^{-1}$

**Tabla 2. Confórmeros más estables de la NAcGal:** en la tabla se muestran los nueve confórmeros más estables para la N-acetilgalactosamina

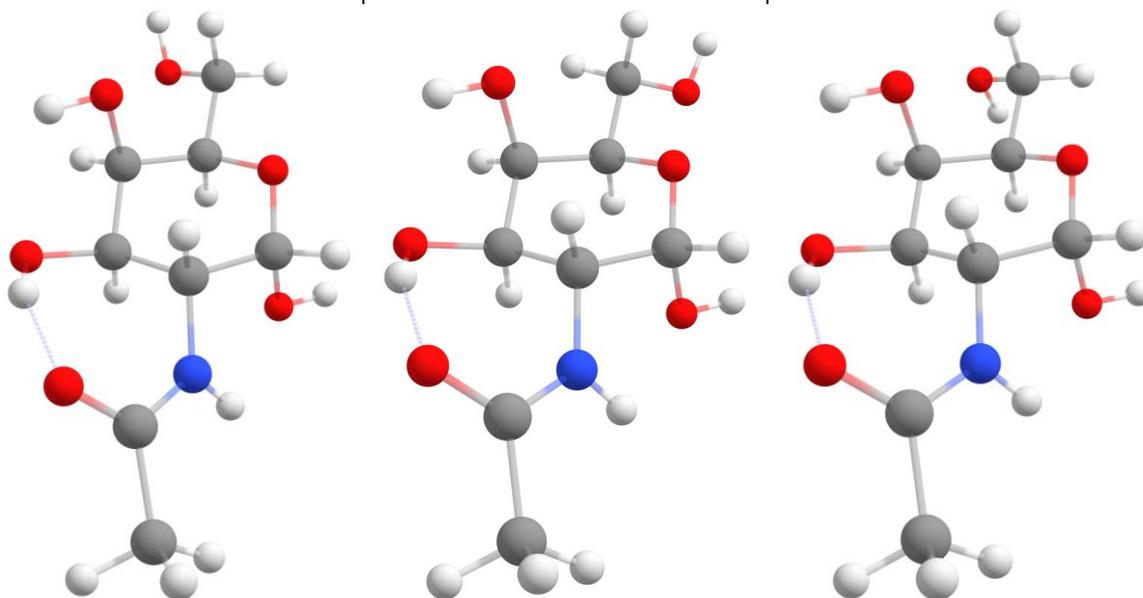
Parámetro	Confórmero IV	Confórmero V	Confórmero VI
$A^{[a]}$	1226.4	1071.4	1162.1
$B^{[a]}$	388.2	376.3	382.1
$C^{[a]}$	333.4	332.5	317.1
$\mu_a^{[b]}$	0.8	1.1	0.0
$\mu_b^{[b]}$	1.2	0.7	1.3
$\mu_c^{[b]}$	2.4	2.7	0.1
$\chi_{aa}^{[c]}$	2.417	2.572	2.471
$\chi_{bb}^{[c]}$	-2.389	-0.384	1.686
$\chi_{cc}^{[c]}$	-0.028	-2.188	-4.157
$\Delta E^{[d]}$	113	498	312
$\Delta E_{ZPE}^{[e]}$	309	499	502
$\Delta G^{[f]}$	456	364	607



<sup>[a]</sup>:  $A$ ,  $B$  y  $C$  son las constantes rotacionales, medidas en MHz. <sup>[b]</sup>:  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  designan las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debye ( $1 \text{ D} \approx 3.33564 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}$ ). <sup>[c]</sup>:  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: Energías relativas excluyendo (<sup>[d]</sup>) e incluyendo (<sup>[e]</sup>) la energía en el punto cero (ZPE), respectivamente. <sup>[f]</sup>: Energía libre de Gibbs relativa calculada a 298K. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: todas las energías aparecen expresadas en  $\text{cm}^{-1}$

**Tabla 2 (continuación). Confórmeros más estables de la NAcGal:** en la tabla se muestran los nueve confórmeros más estables para la N-acetilgalactosamina

Parámetro	Confórmero VII	Confórmero VIII	Confórmero IX
$A^{[a]}$	1215.3	1209.5	1214.9
$B^{[a]}$	358.8	358.9	357.3
$C^{[a]}$	303.0	298.3	302.2
$\mu_a^{[b]}$	0.6	0.1	1.6
$\mu_b^{[b]}$	4.5	3.7	6.2
$\mu_c^{[b]}$	0.1	0.5	1.7
$\chi_{aa}^{[c]}$	2.296	2.390	2.304
$\chi_{bb}^{[c]}$	0.531	0.721	0.536
$\chi_{cc}^{[c]}$	-2.827	-3.111	-2.840
$\Delta E^{[d]}$	676	737	942
$\Delta E_{ZPE}^{[e]}$	548	617	882
$\Delta G^{[f]}$	350	531	831



<sup>[a]</sup>:  $A$ ,  $B$  y  $C$  son las constantes rotacionales, medidas en MHz. <sup>[b]</sup>:  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  designan las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debye ( $1 \text{ D} \approx 3.33564 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}$ ). <sup>[c]</sup>:  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: Energías relativas excluyendo (<sup>[d]</sup>) e incluyendo (<sup>[e]</sup>) la energía en el punto cero (ZPE), respectivamente. <sup>[f]</sup>: Energía libre de Gibbs relativa calculada a 298K. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: todas las energías aparecen expresadas en  $\text{cm}^{-1}$

**Tabla 2 (continuación). Confórmeros más estables de la NAcGal:** en la tabla se muestran los nueve confórmeros más estables para la N-acetilgalactosamina

Como puede apreciarse en las representaciones moleculares que incluye la Tabla 2, la disposición de los sustituyentes en los diferentes confórmeros es ligeramente distinta en cada uno de ellos, lo que da lugar a diferentes interacciones intramoleculares entre los diferentes grupos funcionales y, por tanto, a las diferencias de estabilidad entre confórmeros. A grandes rasgos, los diferentes confórmeros predichos para la N-acetilgalactosamina pueden dividirse en tres familias, en función de la posición del grupo N-acetilo respecto del resto de la molécula. Mientras dos de estas familias pueden observarse en la Tabla 2 (una familia, donde destaca el Confórmero I, que posee el grupo N-acetilo dispuesto de forma que el oxígeno del carbonilo interacciona con el hidroxilo del carbono  $C_3$  y otra familia, que incluye, por ejemplo el Confórmero IV, que posee el grupo N-acetilo orientado hacia  $C_1$ ), la tercera de las familias posee el grupo N-acetilo de tal forma, que el plano que forma este grupo funcional es perpendicular al plano que forma el heterociclo.

Destaca sobre el resto la interacción del oxígeno del grupo carbonilo con cualquiera de los hidroxilos vecinales. Esta fuerte interacción atractiva es la más intensa de todas las que se dan en

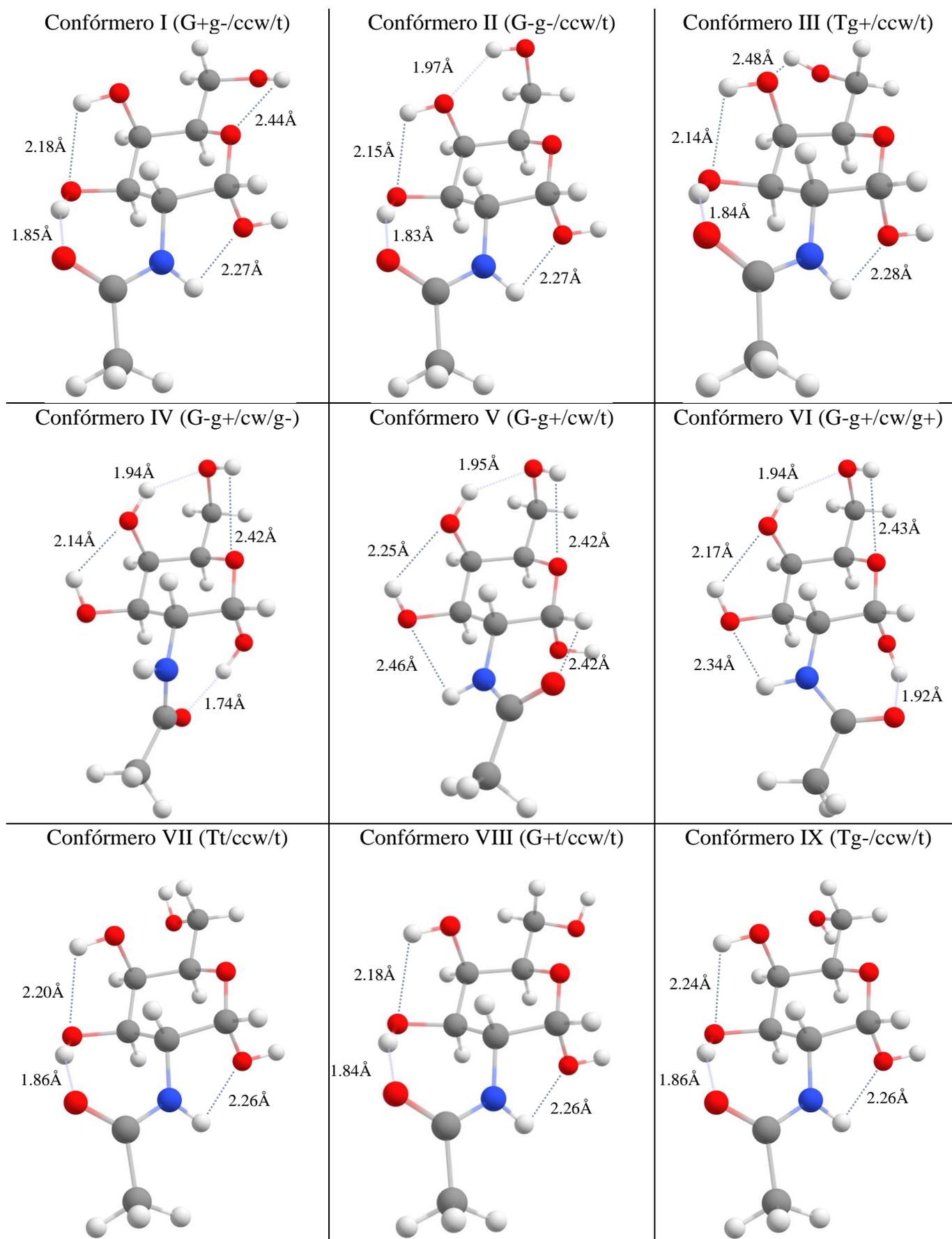
la molécula, lo cual es debido a diversos factores: el efecto mesómero -M del oxígeno y su alta de este átomo implica que la carga parcial negativa en este átomo será mayor y, por tanto, dará lugar a una interacción más fuerte que en el caso de las interacciones entre grupos hidroxilo. Otra interacción importante es la del grupo hidroxilo situado en el carbono C<sub>6</sub>, el cual puede estar orientado hacia el grupo hidroxilo del carbono C<sub>4</sub> o hacia el oxígeno del heterociclo. Estas interacciones –sobre todo la que se establece con el grupo OH situado en el carbono C<sub>4</sub>– son, como se desprende de la Tabla 2, importantes en cuanto a la estabilización de las estructuras.

Estas dos interacciones, además de jugar un papel sustancial en la estabilidad de la molécula, condicionan la posición del hidroxilo situado en C<sub>3</sub>, el cual puede interactuar con el grupo N-acetilo o con el grupo hidroxilo situado en C<sub>4</sub>, lo que también afecta a la estabilidad de las estructuras. Además, el nitrógeno del grupo N-acetilo puede interactuar con el grupo hidroxilo vecinal al N-acetilo, que no posee interacción con el oxígeno carbonílico.

Como se desprende de la Tabla 2, la estructura más estable posee el grupo N-acetilo orientado hacia el carbono C<sub>3</sub> y el grupo hidroxilo situado en el carbono C<sub>6</sub>, hacia el oxígeno del heterociclo. Sin embargo, a una ligera diferencia energética, lo suficientemente pequeña para que sean visibles experimentalmente, se encuentran otros conformeros que presentan el grupo N-acetilo y/o el grupo hidroxilo situado en el carbono C<sub>6</sub>, orientados en la dirección opuesta, lo que hace suponer un espectro experimental en el que se observen numerosas transiciones, pertenecientes a un alto número de conformeros diferentes.

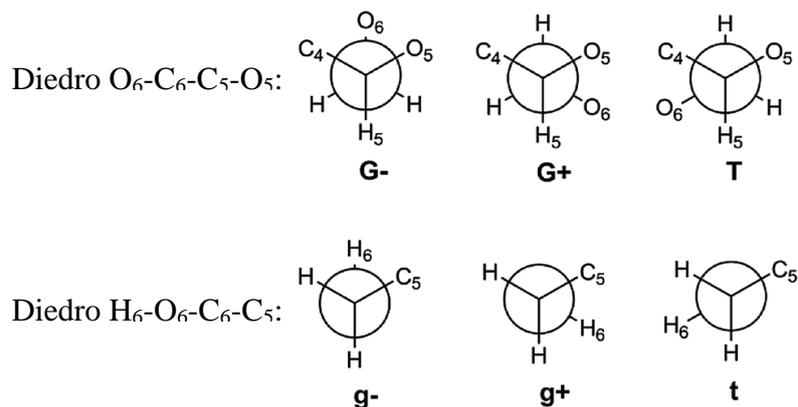
Estas interacciones electrostáticas entre grupos hidroxilo pueden llegar a combinarse formando un enlace de hidrógeno cooperativo que recorre la molécula. Esto ha sido observado en el monosacárido glucosa, estudiado por el grupo GEM con una metodología referible a la de este trabajo.<sup>(5)</sup> Este tipo de interacciones cooperativas provocan una gran estabilización del conformero en cuestión y no solo se dan entre grupos hidroxilo: el estudio mediante espectroscopia de rotación de la glucosamina en comparación a la glucosa reveló que el nitrógeno del grupo amino, como átomo de alta electronegatividad, podía participar en estas interacciones de una forma análoga a como lo hace el oxígeno.<sup>(32)</sup> La molécula de galactosa –la cual difiere de la glucosa en la estereoquímica del carbono C<sub>4</sub>– ha sido también estudiada mediante esta metodología, comprobándose que sus conformeros de menor energía se encuentran también estabilizados por enlaces de hidrógeno cooperativos.<sup>(14)</sup> Sin embargo, es de esperar que la N-acetilgalactosamina no se estabilice de manera completamente análoga, dado que el grupo N-acetilo romperá la intramolecularidad ya que posee un grupo carbonilo, aceptor de puentes de H y un grupo amino, que actúa como donante de puentes de H. No obstante, la disposición de los grupos hidroxilo situados en C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y C<sub>6</sub> sugiere que puede llegar a darse un enlace de hidrógeno cooperativo entre los ellos.

Para poder corroborar estas conjeturas acerca de la intramolecularidad de la N-acetilgalactosamina, se emplea un programa informático denominado NCIPlot,<sup>(35)</sup> que permite visualizar las interacciones intramoleculares no covalentes de un sistema molecular a partir de su función de onda. En la Tabla 3 se pueden encontrar las interacciones esquematizadas para cada una de los nueve conformeros más estables, obtenidas a partir de los mapas de interacciones no covalentes incluidos en el *Apéndice II* de la sección *Material Complementario*.



**Tabla 3. Enlaces de H cooperativos:** en la tabla se muestran, de forma esquemática, los enlaces de hidrógeno cooperativos que existen en los nueve confórmeros de la Tabla 2 y las distancias que separan los átomos participantes. En el *Apéndice II* se incluyen las representaciones de interacciones no covalentes de los cuales se ha extraído la información para estas figuras

En la Tabla 3, los confórmeros aparecen nombrados de dos maneras diferentes: en primer lugar, aparecen en orden decreciente de estabilidad, al igual que en la Tabla 2; asimismo, aparecen caracterizados según una nomenclatura que permite definir su estructura en función de tres ángulos diedros y de la orientación de los puentes de hidrógeno cooperativos. La primera letra (G+, G- o T) describe el ángulo de torsión del diedro O<sub>6</sub>-C<sub>6</sub>-C<sub>5</sub>-O<sub>5</sub> (siendo O<sub>5</sub> el oxígeno perteneciente al ciclo), la segunda letra (g+, g- o t) describe el ángulo de torsión del diedro H<sub>6</sub>-O<sub>6</sub>-C<sub>6</sub>-C<sub>5</sub>. A continuación y separado por una barra, se indica el sentido del enlace de hidrógeno cooperativo de la molécula: en el sentido de las agujas del reloj (cw) o en sentido contrario (ccw). Por último, tras otra barra se indica el ángulo de torsión del diedro H<sub>1</sub>-O<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>.



**Figura 8. Nomenclatura de los diedros:**

en la figura pueden observarse las proyecciones de Newman para cada una de las posibles conformaciones del grupo hidroximetil alrededor de los enlaces C<sub>6</sub>-C<sub>5</sub> (arriba) y O<sub>6</sub>-C<sub>6</sub> (abajo).

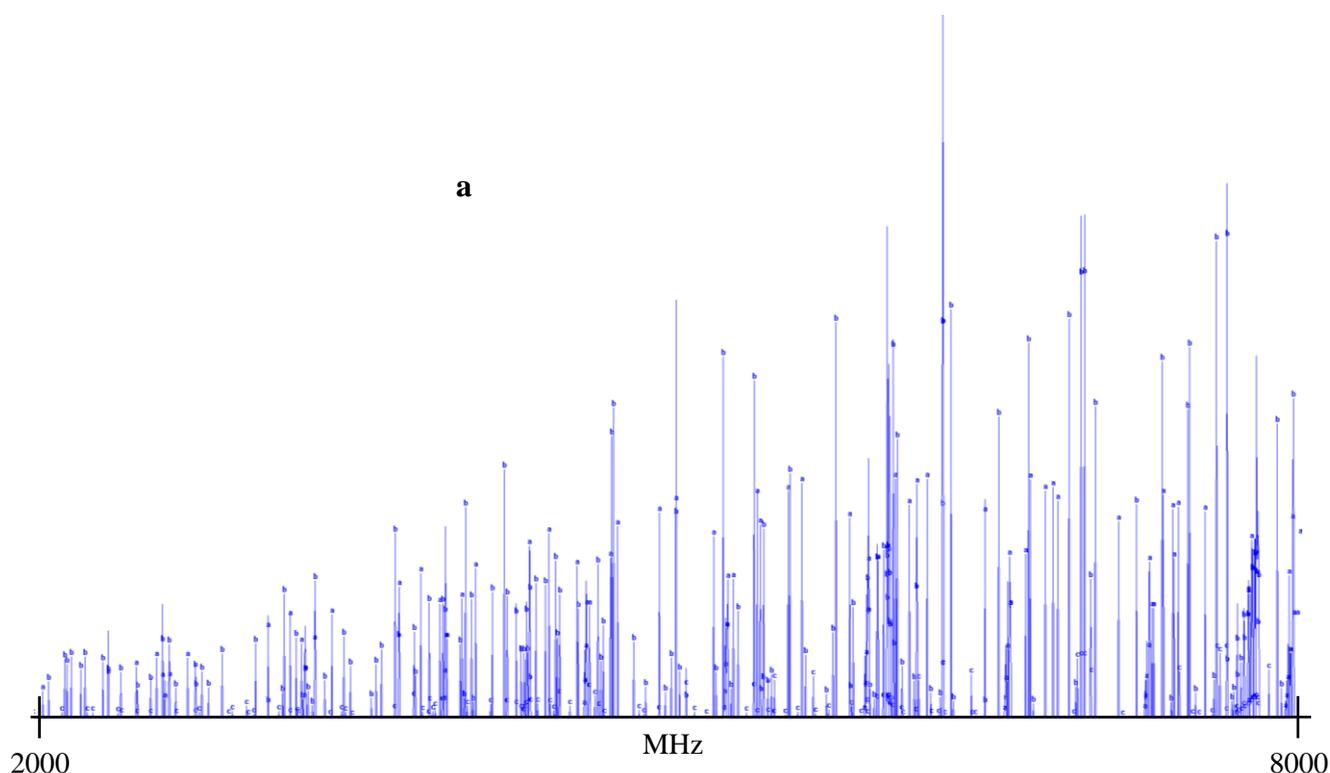
Como se desprende de la Tabla 3 y según había sido propuesto anteriormente, el grupo N-acetilo rompe la intramolecularidad de la N-acetilgalactosamina. Sin embargo, sus funciones carbonilo (confórmeros I, II, III, VII, VIII y IX) y amina (confórmeros V y VI) pueden dar lugar a puentes de hidrógeno cooperativos con los hidroxilos en C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y C<sub>6</sub>. Se aprecia también en la tabla que la disposición del grupo N-acetilo condiciona el sentido del enlace de hidrógeno cooperativo de la molécula: los confórmeros I, II, III, VII, VIII y XI poseen un sentido antihorario de estas interacciones, forzado por el grupo N-acetilo. De manera análoga pero en sentido contrario, ocurre con los confórmeros IV, V y VI, los cuales poseen un enlace de hidrógeno cooperativo que se da en sentido horario.

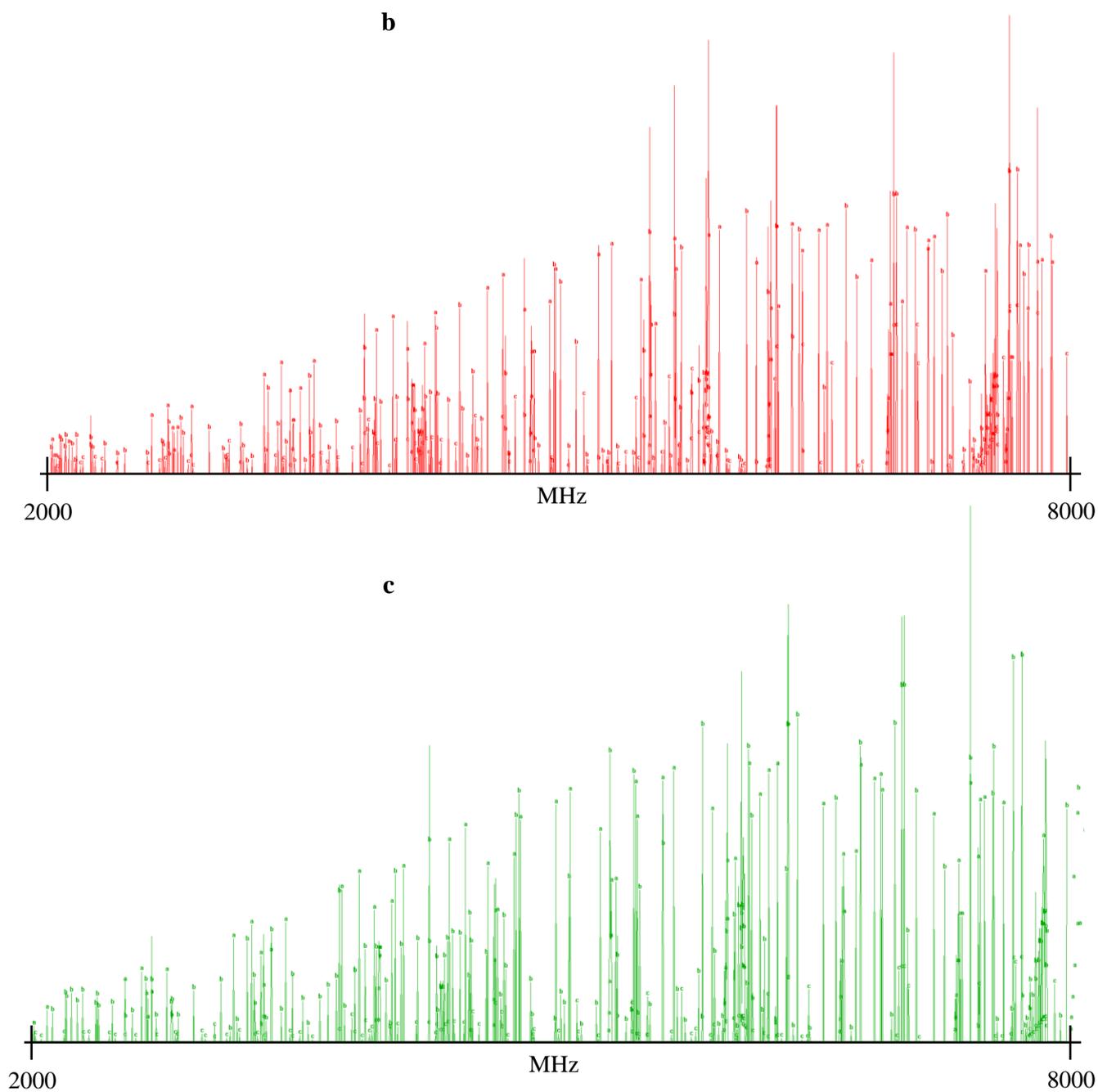
Además de estos fenómenos de cooperación entre enlaces de hidrógeno, las diferentes estructuras son estabilizadas también por efecto gauche y efecto anomérico, según se ha comentado al inicio de este apartado. Como puede comprobarse en las Tablas 2 y 3, el grupo hidroxilo situado en el carbono C<sub>1</sub> aparece en todas las estructuras en posición axial debido al efecto anomérico. Otro efecto de peso en la estabilidad de las estructuras pero que resulta más complicado de identificar es el efecto *gauche*, que conduce a una situación en la que dos sustituyentes se encuentran formando un ángulo de torsión de, aproximadamente, 60°, en lugar del ángulo de 180° que conformaría la situación más estable de no ser por este efecto. Se trata de una situación controlada, principalmente, por un fenómeno de hiperconjugación, en este caso de un orbital C-H enlazante a un orbital C-O antienlazante, como ya se ha comentado. Por lo tanto, los grupos susceptibles de sufrir este efecto en la molécula que ocupa este trabajo son los grupos hidroxilo. Concretamente, este efecto se ha identificado en los hidroxilos situados en los carbonos C<sub>1</sub>, C<sub>4</sub> y

C<sub>6</sub>, siempre que la interacción con otro grupo funcional (el grupo N-acetilo, por ejemplo) fuerce una geometría diferente y más estable.

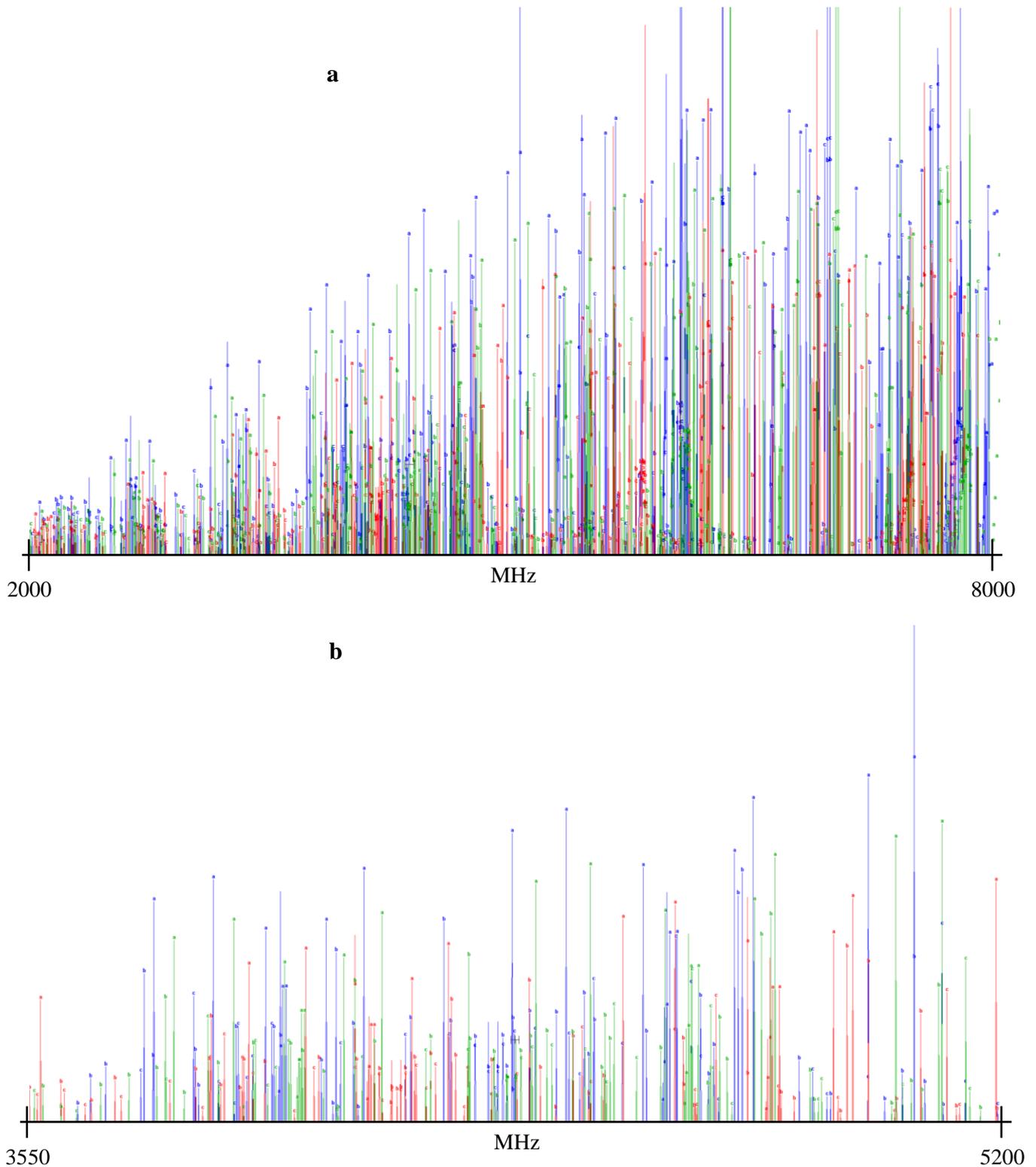
A lo largo de los anteriores párrafos se han analizado las estabilidades de los nueve conformeros más estables, todos por debajo de los 1000cm<sup>-1</sup> respecto de la energía del conformero I. Por encima de esta diferencia energética, las estructuras no serán visibles en los espectros experimentales: la alta energía respecto del conformero de mayor estabilidad provoca que la estructura se forme de forma considerablemente menor, así, sus estados rotacionales estarán poco poblados y las transiciones producidas entre ellos, no serán visibles. Respecto de las estructuras restantes (incluidas como en el *Apéndice I*) se observa que, conforme la diferencia energética con el conformero I se incrementa, la disposición espacial de los sustituyentes se aleja de estas estructuras más estables: los sustituyentes polares se colocan más lejos entre sí, o en disposiciones que no favorecen la interacción electrostática, lo que causa la desestabilización de la molécula. Las estructuras más altas en energía, incluso, poseen conformaciones de bote torsionado para el ciclo, una estructura que conforma un mínimo real de la hipersuperficie de potencial, pero caracterizada por ser mucho menos estable que la conformación silla.

Para concluir el estudio estructural de la N-acetilgalactosamina, se adjuntan en la Figura 10 las simulaciones de los espectros que se obtendrían al estudiar la N-acetilgalactosamina mediante LA-CP-FTMW. Estas simulaciones se realizan para los tres conformeros más estables, que serán aquellos visibles experimentalmente, dada la pequeña diferencia energética entre ellos (menor de 300 cm<sup>-1</sup>), que permitirá su formación en la expansión supersónica





**Figura 9. Simulación de los espectros rotacionales de los tres conformeros más estables de la NAcGal:** en azul (Figura 9a) se observa el espectro simulado para el conformero I, en rojo (Figura 9b) se incluye el espectro simulado para el conformero II y, finalmente, el espectro para el conformero III aparece en verde (Figura 9c). Todos ellos simulados en el rango 2000-8000 MHz



**Figura 10. Simulación del espectro experimental esperado para la N-acetilgalactosamina:**  
en la Figura 10a se observa el espectro completo en la región 2000-8000 MHz; en la figura 10b se observa una ampliación de la región comprendida entre 3550 y 5200 MHz. El color usado para cada conformero se mantiene igual que en la Figura 9

En la figura 9 pueden observarse por separado los espectros simulados para cada uno de los tres conformeros más estables de la N-acetilgalactosamina. La gran cantidad de las transiciones que forman este espectro, dificulta en gran medida la identificación de ciertos patrones característicos, que aparecen repetidos a lo largo del espectro, como son los patrones originados

por las transiciones tipo “a”, los cuales son agrupaciones de líneas espectrales, de anchura  $(B - C) \cdot (J'' + 1)$ , que aparecen separados una distancia igual a  $B + C$  (siendo  $B$  y  $C$  las constantes rotacionales). En la figura 10b, se ofrece una ampliación de la región 3550-5200 MHz, en la que se puede apreciar mejor la complejidad del espectro experimental.

#### 4. CONCLUSIONES

No existiendo ninguna publicación en la que se investigue acerca de esta temática, el presente trabajo supone el primer estudio acerca de la estructura de la N-acetilgalactosamina. Esta molécula, al igual que otros monosacáridos y derivados (glucosa, galactosa, glucosamina...) presenta una destacable flexibilidad, habiéndose predicho 9 conformeros con una energía inferior a los  $1000 \text{ cm}^{-1}$ .

La flexibilidad de este sistema molecular le permite establecer interacciones intramoleculares cooperativas entre los diferentes grupos funcionales, lo que aumenta la estabilidad de estas nueve estructuras. Las mencionadas interacciones cooperativas se pueden clasificar en función de su dirección (en sentido de las agujas del reloj o en sentido contrario), lo que viene determinado por qué hidroxilo interacciona con el grupo N-acetilo: la interacción de este grupo con el grupo hidroxilo situado en  $C_1$  fuerza una interacción cooperativa en el sentido de las agujas del reloj, mientras que si el grupo N-acetilo interacciona con el hidroxilo situado en el carbono  $C_3$ , la interacción tiene el sentido contrario.

La interacción más destacable, debido a su intensidad, es la que tiene lugar entre el oxígeno del grupo N-acetilo y cualquiera de los grupos hidroxilo vecinales es muy fuerte y estabiliza en gran medida a la molécula, lo cual está justificado debido a la electronegatividad del oxígeno y su efecto -I y -M, que le permite adquirir una importante carga parcial positiva que conduce a fuertes enlaces de hidrógeno con centros de baja densidad electrónica, como son los hidrógenos hidroxílicos vecinales. Estas interacciones, en los conformeros más estables, además de estabilizar en gran medida la molécula, fuerzan la geometría del sustituyente vecinal que, a su vez, fuerza la disposición del resto de sustituyentes mediante otras interacciones electrostáticas, de carácter más débil. De esta manera, se pueden llegar a establecer las interacciones cooperativas anteriormente mencionadas.

Además, la molécula de N-acetilgalactosamina aparece estabilizada también por los efectos anomérico y gauche tal y como se ha justificado en el apartado anterior. Esto responde al comportamiento de azúcares y sus derivados analizados con anterioridad mediante una metodología referible a la empleada en este trabajo.

Finalmente, cabe destacar que de este estudio se desprende que los grupos que participan en las interacciones intramoleculares más fuertes son  $C_2$ ,  $C_3$ . Esto va a condicionar la capacidad y forma en la que la N-acetilgalactosamina establece interacciones con otras moléculas, lo que es de gran importancia en el medio biológico. Como se ha desarrollado en la introducción, la capacidad de la N-acetilgalactosamina para establecer interacciones intermoleculares en el medio biológico es un factor de gran importancia en el desarrollo de procesos tumorales. Asimismo, la N-acetilgalactosamina, aparece en estos procesos formando parte del antígeno Tn, es decir, unida a un aminoácido serina o treonina a través del grupo hidroxilo del carbono  $C_1$ . A la vista de todo

esto, se puede predecir que las interacciones intermoleculares se establecerán a través de los grupos hidroxilo situados en los carbonos C<sub>4</sub>.

Asimismo, las tres estructuras más estables obtenidas presentan una interacción entre el carbonilo del N-acetilo y el hidroxilo situado en C<sub>3</sub>, de forma que, el OH situado en C<sub>1</sub> únicamente presenta una interacción débil con el NH del mismo grupo. Ésto que, *a priori*, puede parecer carente de significado, es un detalle muy importante de cara al rol biológico de la N-acetilgalactosamina: el hidroxilo situado en C<sub>1</sub>, lugar de anclaje del aminoácido durante la síntesis del antígeno Tn, sufre una muy pequeña interacción con el grupo NH, de forma que se encuentra disponible para formar el enlace O-glicosídico y formar así el antígeno. Mientras, las estructuras que poseen el grupo N-acetilo orientado a C<sub>1</sub> y que, por tanto, requerirían una alta inversión energética para romper dicha intramolecularidad y poder formar el enlace con el aminoácido a la hora de formar el antígeno, son menos estables y tendrán mucha menor presencia en el medio fisiológico.

## 5. Líneas futuras de investigación

En estudios posteriores se llevará a cabo la obtención del espectro experimental. Se llevarán a cabo dos experimentos: un espectro de banda ancha (LA-CP-FTMW) que permita una visión general de la forma del espectro, así como la asignación de las principales transiciones y un espectro de alta resolución (LA-MB-FTMW), que permita resolver la estructura hiperfina de rotación y asignar la totalidad de las transiciones.

Además, los cálculos obtenidos mediante DFT deben ser refinados de nuevo mediante el método MP2, mas preciso en el cálculo de constantes de rotación. Asimismo, sería interesante investigar acerca de la relajación conformacional que pueda ocurrir a través de un giro del grupo hidroximetilo.

## 6. Bibliografía

1. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. **Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study**. *Lancet Oncol*. 2012 Aug;13(8):790–801.
2. International Agency for Research on Cancer. **Estimated number of new cases in 2018, all cancers, both sexes, all ages** [Internet]. 2018. Available from: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-sunburst?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populationns=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&group\\_cancer=](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-sunburst?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populationns=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=)
3. Pacis RA, Pilat MJ, Yamazaki K, Pienta KJ. **Differential carbohydrate expression in tumorigenic vs. non-tumorigenic prostate cell lines**. *Int J Oncol*. 1995;7(6):1349–54.
4. McMurry J. **Biomoléculas: Carbohidratos**. In: Cervantes González SR. *Química Orgánica*. 7th ed. Cengage Learning; p. 995–8.

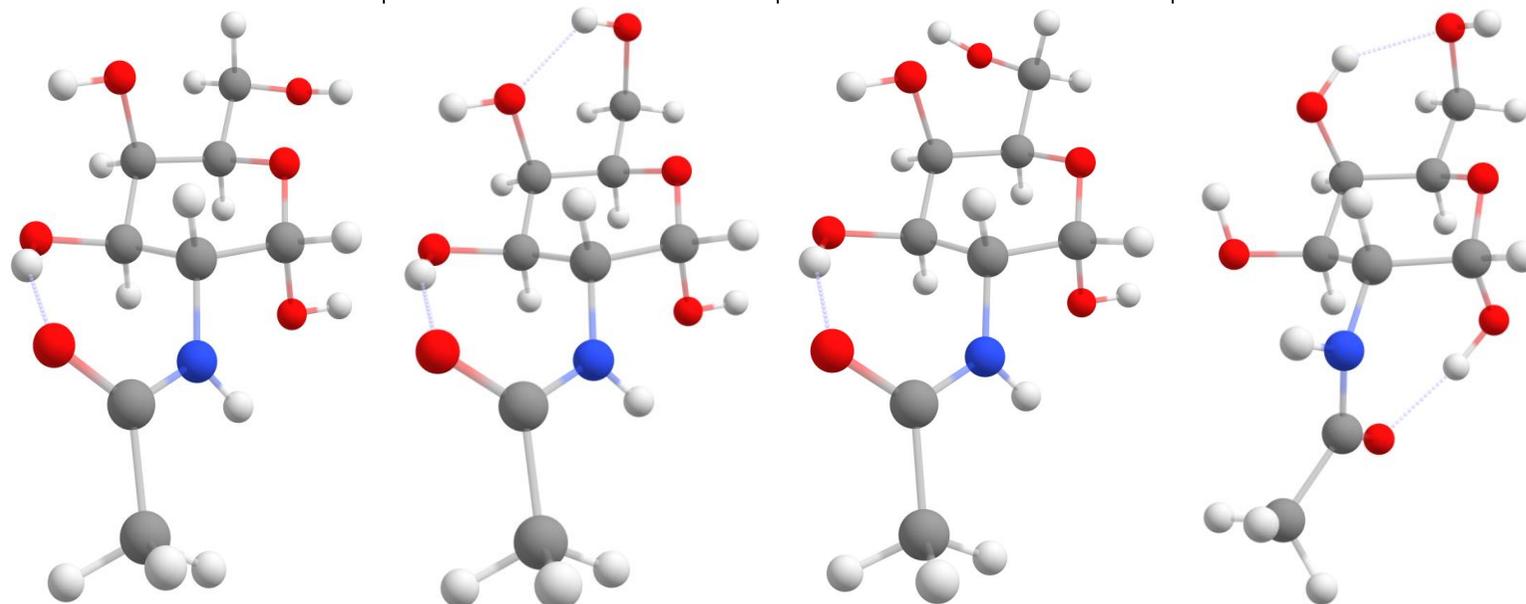
5. Alonso JL, Lozoya MA, Peña I, López JC, Cabezas C, Mata S, et al. **The conformational behaviour of free d-glucose - At last.** Chem Sci. 2014;5(2):515–22.
6. Sletmoen M, Gerken TA, Stokke BT, Burchell J, Brewer CF. **Tn and STn are members of a family of carbohydrate tumor antigens that possess carbohydrate-carbohydrate interactions.** Glycobiology. 2018;28(7):437–42.
7. Bapu D, Runions J, Kadhim M, Brooks SA. **N-acetylgalactosamine glycans function in cancer cell adhesion to endothelial cells: A role for truncated O-glycans in metastatic mechanisms.** Cancer Lett. 2016;375(2):367–74.
8. Hakomori SI. **The glycosynapse.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(1):225–32.
9. Kuruvilla SP, Tiruchinapally G, Kaushal N, ElSayed MEH. **Effect of N-acetylgalactosamine ligand valency on targeting dendrimers to hepatic cancer cells.** Int J Pharm. 2018;
10. Khajehpour M, Dashnau JL, Vanderkooi JM. **Infrared spectroscopy used to evaluate glycosylation of proteins.** Anal Biochem. 2006;348(1):40–8.
11. Roy D, Athey TBT, Auger JP, Goyette-Desjardins G, Van Calsteren MR, Takamatsu D, et al. **A single amino acid polymorphism in the glycosyltransferase CpsK defines four Streptococcus suis serotypes.** Sci Rep. 2017;7(1).
12. Kolesníková L, León I, Alonso ER, Mata S, Alonso JL. **Laser Ablation Assists Cyclization Reactions of Hydantoic Acid: A Proof for the Near-Attack Conformation Theory?** J Phys Chem Lett. 2019;10(6):1325–30.
13. Loru D, Peña I, Alonso JL, Eugenia Sanz M. **Intramolecular interactions in the polar headgroup of sphingosine: Serinol.** Chem Commun. 2016;52(18):3615–8.
14. Peña I, Cabezas C, Alonso JL. **Unveiling epimerization effects: a rotational study of  $\alpha$ -d-galactose.** Chem Commun. 2015;51(50):10115–8.
15. Cabezas C, Peña I, Daly AM, Alonso JL. **Erythrose revealed as furanose forms.** Chem Commun. 2013;49(92):10826–8.
16. Halgren T a. **Merck Molecular Force Field.** J Comput Chem. 1996;17(5–6):490–519.
17. Sancho García JC. **La teoría del funcional densidad y las ecuaciones variacionales de Kohn-Sham: aportacion de nuevos aspectos sobre sus posibilidades y limitaciones.** Universidad de Alicante; 2001.
18. Hohenberg P, Kohn W. **Inhomogeneous electron gas.** Phys Rev. 1964;136:864–71.
19. Hartree W. **Self-consistent field, with exchange for beryllium.** Proc R Soc London Ser A - Math Phys Sci. 1935;150(869):9–33.
20. Becke AD. **A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories.** J Chem Phys. 1993;98(2):1372–7.
21. Kim K, Jordan KD. **Comparison of density functional and MP2 calculations on the water monomer and dimer.** J Phys Chem. 1994;98(40):10089–94.
22. Matta CF. **How dependent are molecular and atomic properties on the electronic structure method? Comparison of Hartree-Fock, DFT, and MP2 on a biologically relevant set of molecules.** J Comput Chem. 2009;NA-NA.

23. Papajak E, Zheng J, Xu X, Leverentz HR, Truhlar DG. **Perspectives on Basis Sets Beautiful: Seasonal Plantings of Diffuse Basis Functions.** J Chem Theory Comput. 2011 Oct 11;7(10):3027–34.
24. Cooke SA, Ohring P. **Decoding pure rotational molecular spectra for asymmetric molecules.** J Spectrosc. 2013;1(1).
25. Xu Y, Jäger W. **Microwave Rotational Spectroscopy.** Encycl Inorg Bioinorg Chem. 2011;
26. Mata S, Peña I, Cabezas C, López JC, Alonso JL. **A broadband Fourier-transform microwave spectrometer with laser ablation source: The rotational spectrum of nicotinic acid.** J Mol Spectrosc. 2012;280(1):91–6.
27. Alonso JL, Lorenzo FJ, López JC, Lesarri A, Mata S, Dreizler H. **Construction of a molecular beam Fourier transform microwave spectrometer used to study the 2,5-dihydrofuran-argon van der Waals complex.** Chem Phys. 1997;218(3):267–75.
28. Frenzel LE. **Principles of Electronic Communication Systems.** Vol. 28, Electronics and Power. 2015. 504–538 p.
29. Miller DR. Free jet sources. In: Scoles G. **Atomic and Molecular Beam Methods.** 1st ed. Oxford Univ. Press; 1988.
30. Alfa Aesar. **NACGal safety data Sheet.** 2011.
31. Shelley J. **Conformational Searching using MacroModel and ConfGen.** Schrödinger Inc., editor.
32. Peña I, Kolesniková L, Cabezas C, Bermúdez C, Berdakin M, Simão A, et al. **The shape of d-glucosamine.** Phys Chem Chem Phys. 2014;16(42):23244–50.
33. Wolfe S. The Gauche Effect. **Some Stereochemical Consequences of Adjacent Electron Pairs and Polar Bonds.** Acc Chem Res. 1972;5(3):102–11.
34. Alonso ER, Peña I, Cabezas C, Alonso JL. **Structural Expression of Exo-Anomeric Effect.** J Phys Chem Lett. 2016;7(5):845–50.
35. Contreras-García J, Johnson ER, Keinan S, Chaudret R, Piquemal J-P, Beratan DN, et al. **NCIPLOT: A Program for Plotting Noncovalent Interaction Regions.** J Chem Theory Comput. 2011 Mar 8;7(3):625–32.

# **Material Complementario**

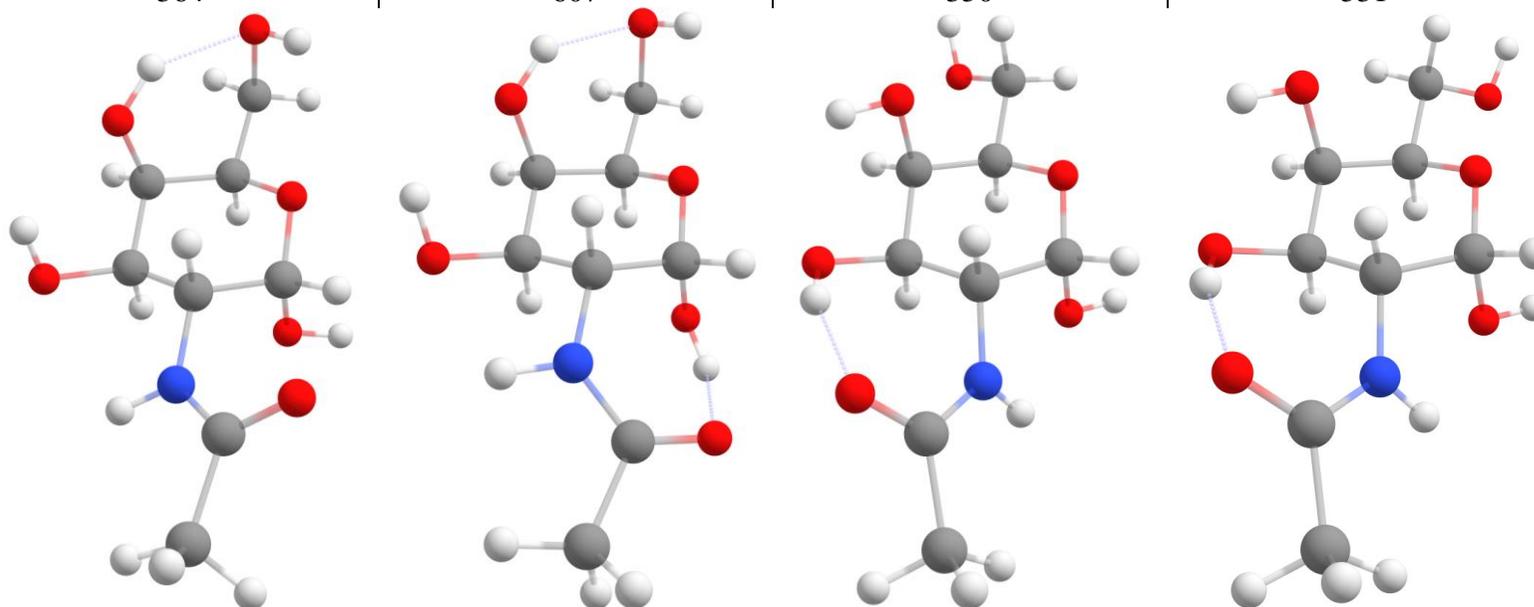
## Apéndice I: Screening de conforméros

Parámetro	Conformero I	Conformero II	Conformero III	Conformero IV
$A^{[a]}$	1200.6	1179.9	1209.5	1226.4
$B^{[a]}$	361.2	372.4	363.6	388.2
$C^{[a]}$	299.9	314.2	302.9	333.4
$\mu_a^{[b]}$	2.2	3.1	3.0	0.8
$\mu_b^{[b]}$	4.6	4.4	4.5	1.2
$\mu_c^{[b]}$	0.6	2.2	0.5	2.4
$\chi_{aa}^{[c]}$	2.424	2.478	2.346	2.417
$\chi_{bb}^{[c]}$	0.587	0.871	0.579	-2.389
$\chi_{cc}^{[c]}$	-3.011	-3.349	-2.925	-0.028
$\Delta E^{[d]}$	0	98	163	113
$\Delta E_{ZPE}^{[e]}$	0	140	244	309
$\Delta G^{[f]}$	0	212	237	456



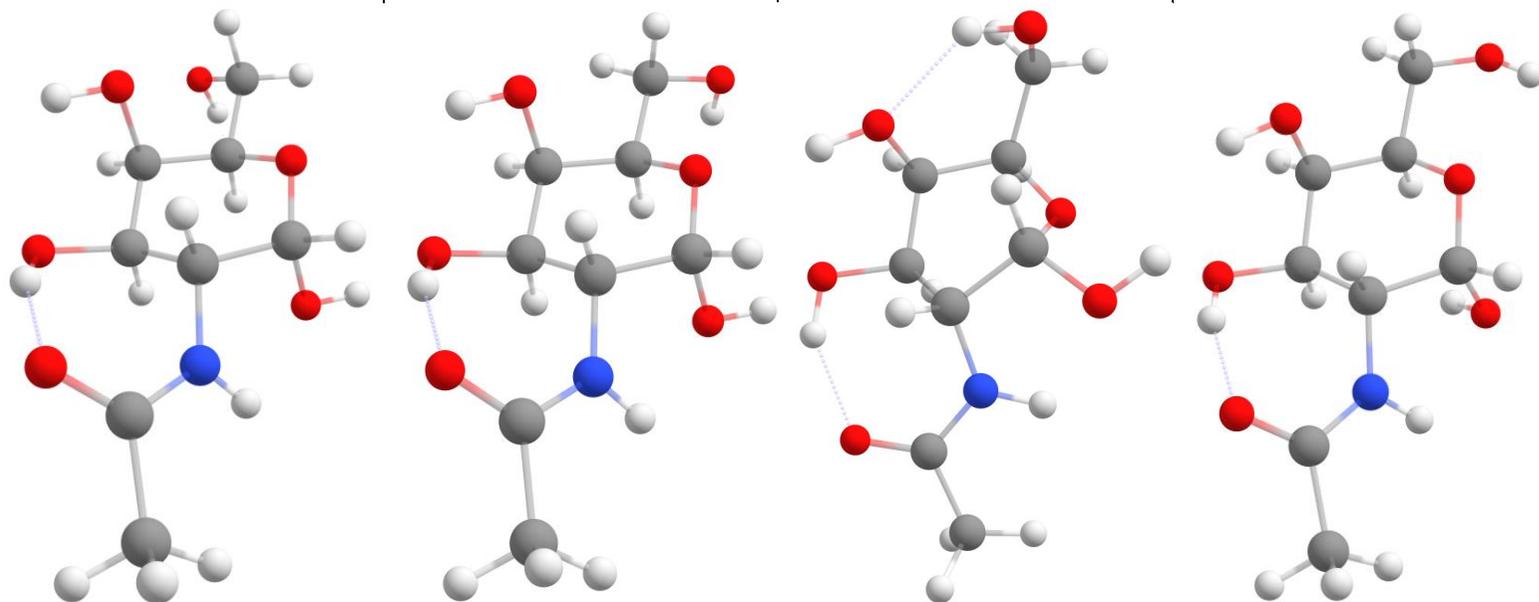
<sup>[a]</sup>:  $A$ ,  $B$  y  $C$  son las constantes rotacionales, medidas en MHz. <sup>[b]</sup>:  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  designan las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debye ( $1 \text{ D} \approx 3.33564 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}$ ). <sup>[c]</sup>:  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: Energías relativas excluyendo ([d]) e incluyendo ([e]) la energía en el punto cero (ZPE), respectivamente. <sup>[f]</sup>: Energía libre de Gibbs relativa calculada a 298K. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: todas las energías aparecen expresadas en  $\text{cm}^{-1}$

Parámetro	Confórmero V	Confórmero VI	Confórmero VII	Confórmero VIII
$A^{[a]}$	1071.4	1162.1	1215.3	1209.5
$B^{[a]}$	376.3	382.1	358.8	358.9
$C^{[a]}$	332.5	317.1	303.0	298.3
$\mu_a^{[b]}$	1.1	0.0	0.6	0.1
$\mu_b^{[b]}$	0.7	1.3	4.5	3.7
$\mu_c^{[b]}$	2.7	0.1	0.1	0.5
$\chi_{aa}^{[c]}$	2.572	2.471	2.296	2.390
$\chi_{bb}^{[c]}$	-0.384	1.686	0.531	0.721
$\chi_{cc}^{[c]}$	-2.188	-4.157	-2.827	-3.111
$\Delta E^{[d]}$	498	312	676	737
$\Delta E_{ZPE}^{[e]}$	499	502	548	617
$\Delta G^{[f]}$	364	607	350	531



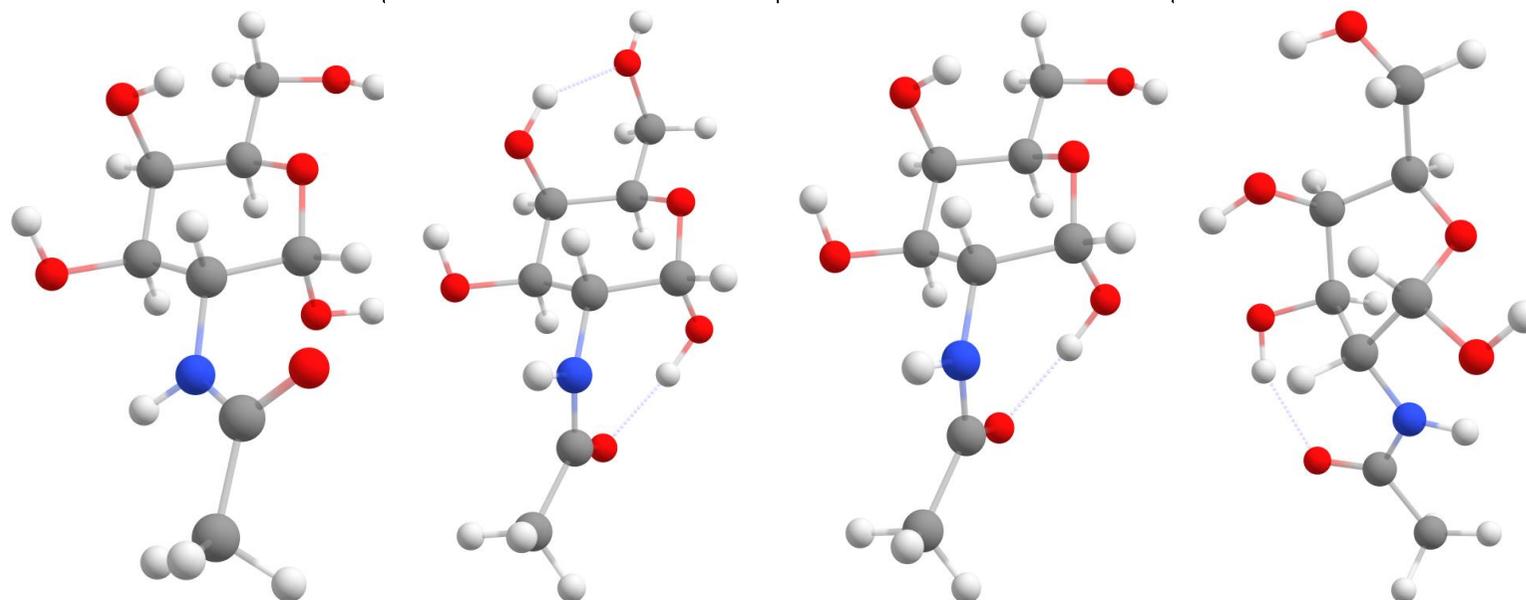
<sup>[a]</sup>:  $A$ ,  $B$  y  $C$  son las constantes rotacionales, medidas en MHz. <sup>[b]</sup>:  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  designan las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debye ( $1 \text{ D} \approx 3.33564 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}$ ). <sup>[c]</sup>:  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: Energías relativas excluyendo (<sup>[d]</sup>) e incluyendo (<sup>[e]</sup>) la energía en el punto cero (ZPE), respectivamente. <sup>[f]</sup>: Energía libre de Gibbs relativa calculada a 298K. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: todas las energías aparecen expresadas en  $\text{cm}^{-1}$

Parámetro	Confórmero IX	Confórmero X	Confórmero XI	Confórmero XII
$A^{[a]}$	1214.9	1209.2	1104.3	1183.8
$B^{[a]}$	357.3	357.2	401.5	362
$C^{[a]}$	302.2	297.3	328.8	298.8
$\mu_a^{[b]}$	1.6	-1.5	-0.6	-2.8
$\mu_b^{[b]}$	6.2	4.2	1.8	2.7
$\mu_c^{[b]}$	1.7	2.6	1.5	1.4
$\chi_{aa}^{[c]}$	2.304	2.404	2.143	2.421
$\chi_{bb}^{[c]}$	0.536	0.714	1.399	0.964
$\chi_{cc}^{[c]}$	-2.840	-3.118	-3.542	-3.385
$\Delta E^{[d]}$	942	1041	863	1090
$\Delta E_{ZPE}^{[e]}$	882	950	1005	1028
$\Delta G^{[f]}$	831	891	1109	1017



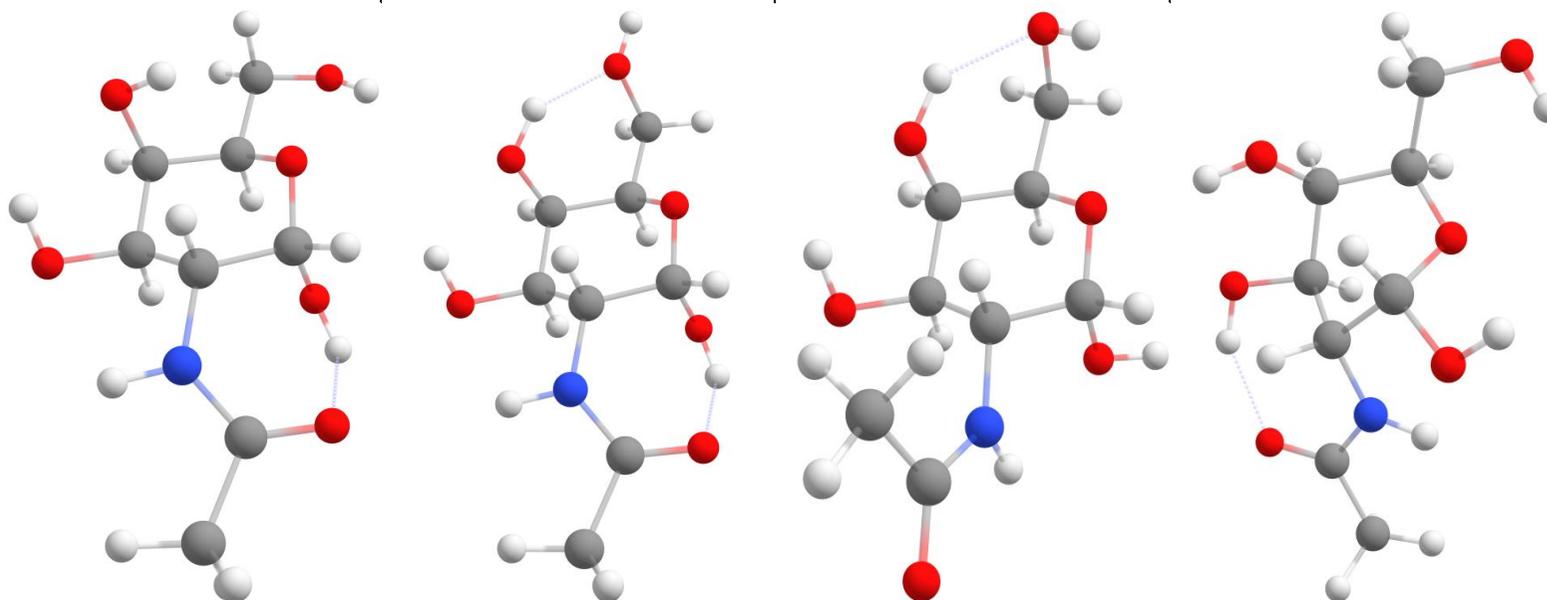
<sup>[a]</sup>:  $A$ ,  $B$  y  $C$  son las constantes rotacionales, medidas en MHz. <sup>[b]</sup>:  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  designan las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debye ( $1 \text{ D} \approx 3.33564 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}$ ). <sup>[c]</sup>:  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: Energías relativas excluyendo (<sup>[d]</sup>) e incluyendo (<sup>[e]</sup>) la energía en el punto cero (ZPE), respectivamente. <sup>[f]</sup>: Energía libre de Gibbs relativa calculada a 298K. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: todas las energías aparecen expresadas en  $\text{cm}^{-1}$

Parámetro	Confórmero XII	Confórmero XIV	Confórmero XV	Confórmero XVI
$A^{[a]}$	1045.5	1237.1	1097.6	1123.4
$B^{[a]}$	371.7	385.2	395	380.1
$C^{[a]}$	312.2	330.2	326.5	312.8
$\mu_a^{[b]}$	-1	1.5	-3.5	-1.5
$\mu_b^{[b]}$	-0.3	1.5	-2.6	3.2
$\mu_c^{[b]}$	1.4	1.5	-3.4	-0.2
$\chi_{aa}^{[c]}$	2.422	2.376	2.471	1.846
$\chi_{bb}^{[c]}$	-1.444	-2.309	-2.193	1.472
$\chi_{cc}^{[c]}$	-0.978	-0.067	-0.278	-3.318
$\Delta E^{[d]}$	1296	1187	1153	1223
$\Delta E_{ZPE}^{[e]}$	1199	1232	1254	1336
$\Delta G^{[f]}$	943	1290	1299	1358



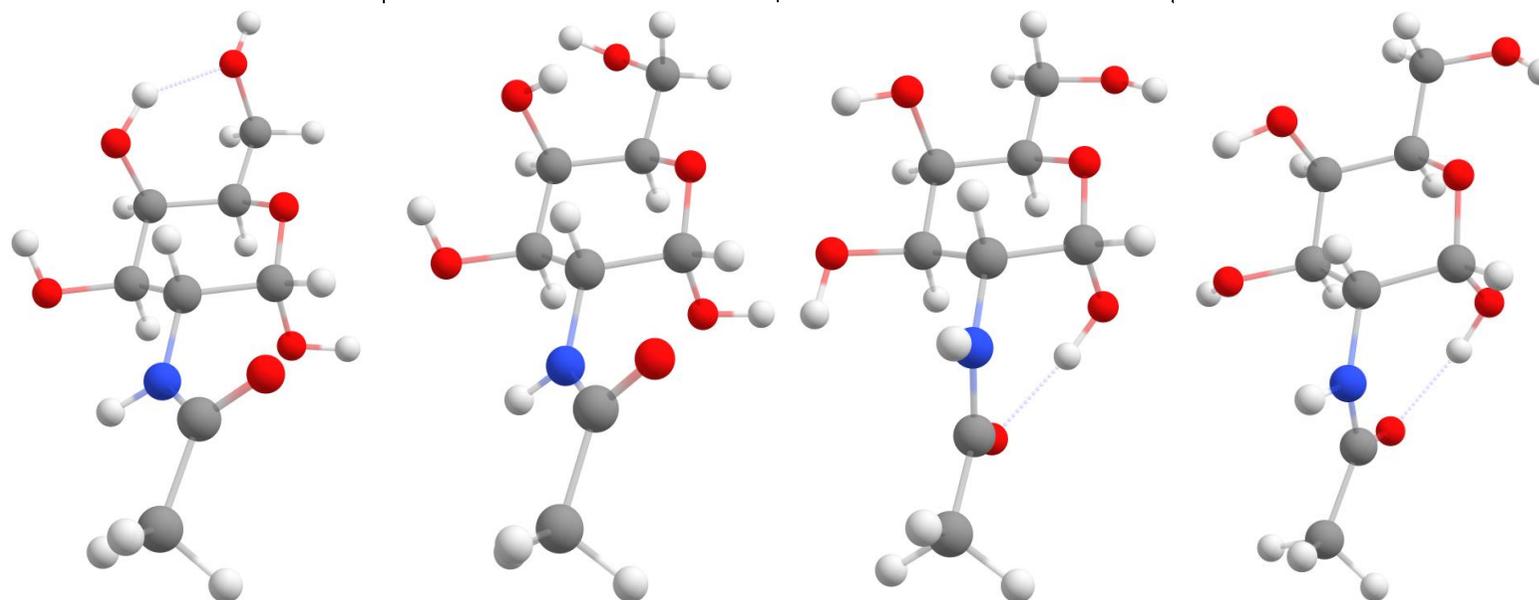
<sup>[a]</sup>:  $A$ ,  $B$  y  $C$  son las constantes rotacionales, medidas en MHz. <sup>[b]</sup>:  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  designan las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debye ( $1 \text{ D} \approx 3.33564 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}$ ). <sup>[c]</sup>:  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: Energías relativas excluyendo (<sup>[d]</sup>) e incluyendo (<sup>[e]</sup>) la energía en el punto cero (ZPE), respectivamente. <sup>[f]</sup>: Energía libre de Gibbs relativa calculada a 298K. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: todas las energías aparecen expresadas en  $\text{cm}^{-1}$

Parámetro	Confórmero XVII	Confórmero XVIII	Confórmero XIX	Confórmero XX
$A^{[a]}$	1045.7	1187.2	1115.1	1038.5
$B^{[a]}$	389.6	377	372.5	385.3
$C^{[a]}$	305.5	312.8	326.5	315.8
$\mu_a^{[b]}$	-2.5	2.5	6.4	-1.1
$\mu_b^{[b]}$	2.9	1.4	2.2	3
$\mu_c^{[b]}$	1.1	-0.4	-1.2	-0.3
$\chi_{aa}^{[c]}$	2.314	2.425	2.831	1.696
$\chi_{bb}^{[c]}$	1.611	1.68	-0.661	1.609
$\chi_{cc}^{[c]}$	-3.926	-4.105	-2.171	-3.305
$\Delta E^{[d]}$	1271	1404	1373	1495
$\Delta E_{ZPE}^{[e]}$	1362	1434	1452	1495
$\Delta G^{[f]}$	1382	1441	1552	1459



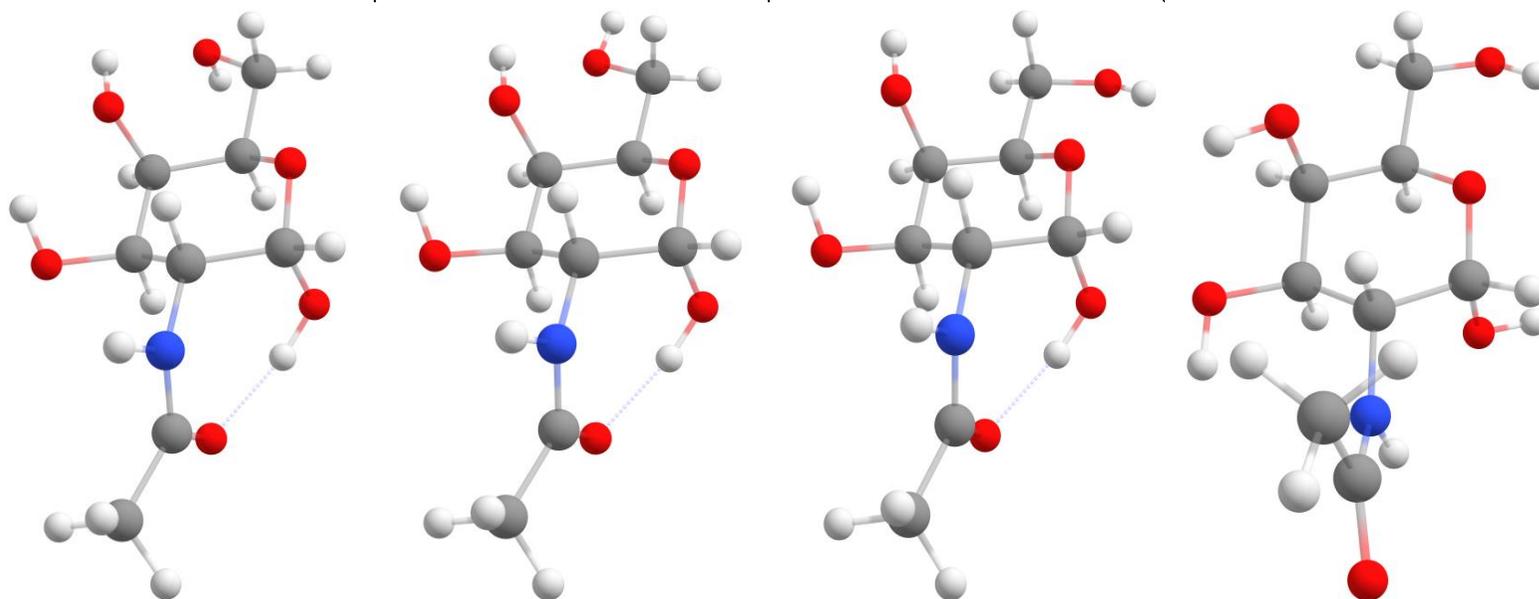
<sup>[a]</sup>:  $A$ ,  $B$  y  $C$  son las constantes rotacionales, medidas en MHz. <sup>[b]</sup>:  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  designan las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debye ( $1 \text{ D} \approx 3.33564 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}$ ). <sup>[c]</sup>:  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: Energías relativas excluyendo (<sup>[d]</sup>) e incluyendo (<sup>[e]</sup>) la energía en el punto cero (ZPE), respectivamente. <sup>[f]</sup>: Energía libre de Gibbs relativa calculada a 298K. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: todas las energías aparecen expresadas en  $\text{cm}^{-1}$

Parámetro	Confórmero XXI	Confórmero XXII	Confórmero XXIII	Confórmero XXIV
$A^{[a]}$	1105.2	1191.9	1137.7	1146.7
$B^{[a]}$	369.9	351.4	384	385
$C^{[a]}$	325.9	309.4	321	321.8
$\mu_a^{[b]}$	3.7	-0.7	-6.3	-5.5
$\mu_b^{[b]}$	-0.5	-0.2	-3.2	-4.1
$\mu_c^{[b]}$	-2.7	1.1	-2.2	-1
$\chi_{aa}^{[c]}$	2.554	2.548	2.232	2.374
$\chi_{bb}^{[c]}$	-0.579	-1.585	-3.109	-2.685
$\chi_{cc}^{[c]}$	-1.975	-0.963	0.878	0.311
$\Delta E^{[d]}$	1671	1609	1675	1627
$\Delta E_{ZPE}^{[e]}$	1514	1539	1580	1581
$\Delta G^{[f]}$	1284	1221	1465	1512



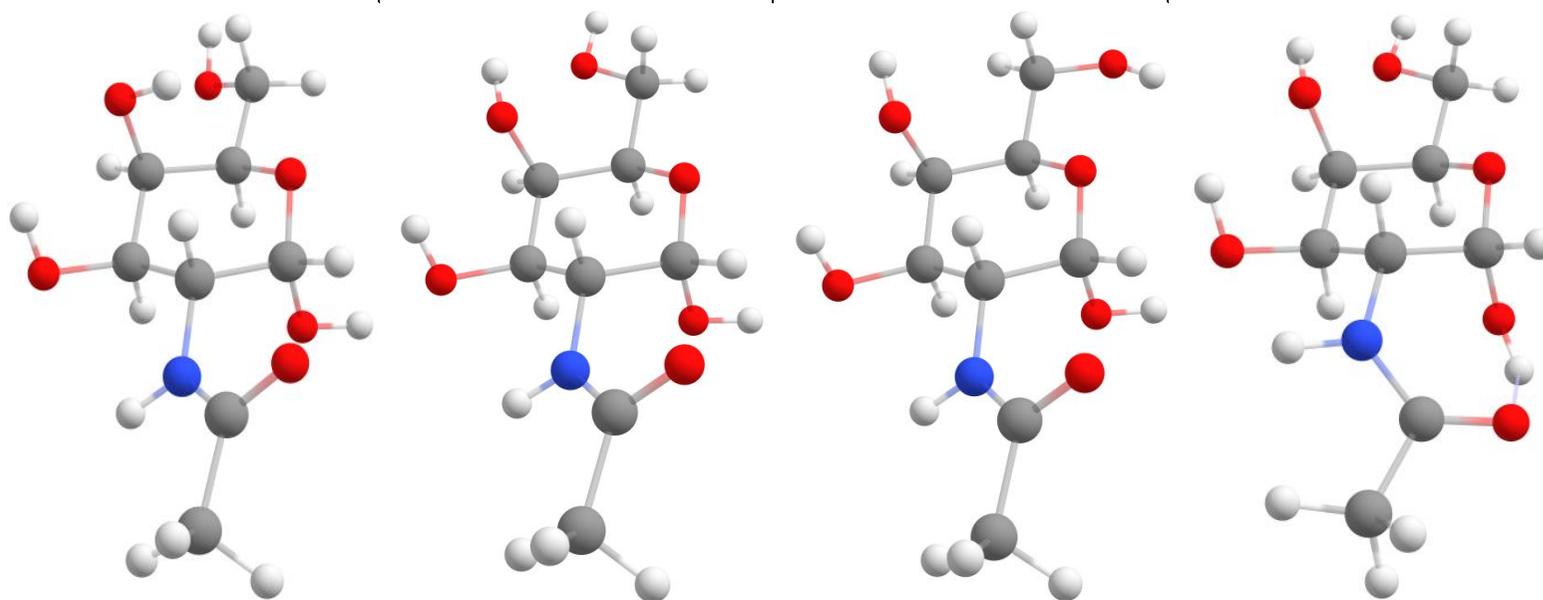
<sup>[a]</sup>:  $A$ ,  $B$  y  $C$  son las constantes rotacionales, medidas en MHz. <sup>[b]</sup>:  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  designan las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debye ( $1 \text{ D} \approx 3.33564 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}$ ). <sup>[c]</sup>:  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: Energías relativas excluyendo (<sup>[d]</sup>) e incluyendo (<sup>[e]</sup>) la energía en el punto cero (ZPE), respectivamente. <sup>[f]</sup>: Energía libre de Gibbs relativa calculada a 298K. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: todas las energías aparecen expresadas en  $\text{cm}^{-1}$

Parámetro	Confórmero XXV	Confórmero XXVI	Confórmero XXVII	Confórmero XXVIII
$A^{[a]}$	1226.7	1227.7	1128.8	1096.8
$B^{[a]}$	375.5	377.5	389.3	355.9
$C^{[a]}$	323.9	325	323.1	311.7
$\mu_a^{[b]}$	-0.3	1.3	-2.1	0.9
$\mu_b^{[b]}$	2	2.1	-4	-0.2
$\mu_c^{[b]}$	1.4	2.7	-2.8	-0.2
$\chi_{aa}^{[c]}$	2.3	2.288	2.424	2.561
$\chi_{bb}^{[c]}$	-2.438	-2.429	-2.373	-2.576
$\chi_{cc}^{[c]}$	0.138	0.142	-0.051	0.015
$\Delta E^{[d]}$	1513	1528	1647	1721
$\Delta E_{ZPE}^{[e]}$	1586	1611	1632	1646
$\Delta G^{[f]}$	1582	1625	1616	1484



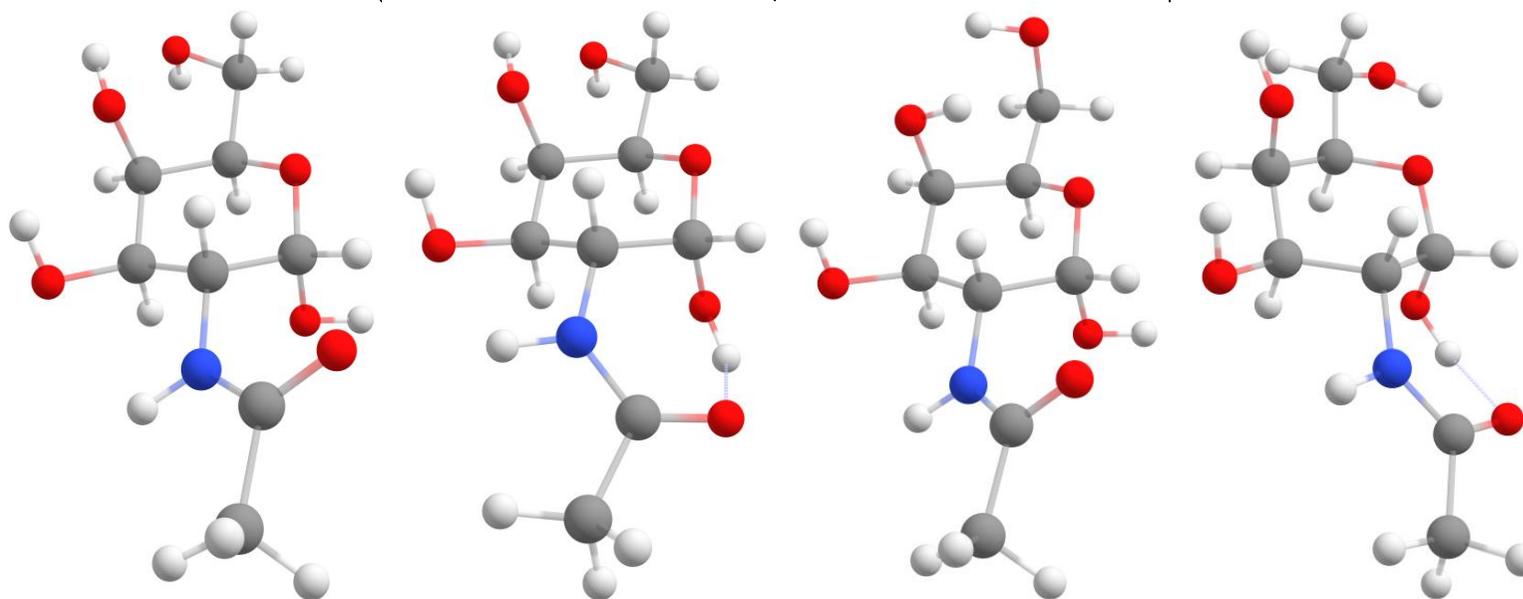
<sup>[a]</sup>:  $A$ ,  $B$  y  $C$  son las constantes rotacionales, medidas en MHz. <sup>[b]</sup>:  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  designan las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debye ( $1 \text{ D} \approx 3.33564 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}$ ). <sup>[c]</sup>:  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: Energías relativas excluyendo (<sup>[d]</sup>) e incluyendo (<sup>[e]</sup>) la energía en el punto cero (ZPE), respectivamente. <sup>[f]</sup>: Energía libre de Gibbs relativa calculada a 298K. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: todas las energías aparecen expresadas en  $\text{cm}^{-1}$

Parámetro	Confórmero XXIX	Confórmero XXX	Confórmero XXXI	Confórmero XXXII
$A^{[a]}$	1183.6	1179.6	1035.6	1240.7
$B^{[a]}$	351.4	356.2	373.1	365.1
$C^{[a]}$	309.6	311.7	312.5	303.5
$\mu_a^{[b]}$	1.3	3.4	0.6	2.3
$\mu_b^{[b]}$	-0.9	-0.1	-2.1	2.1
$\mu_c^{[b]}$	-0.8	-1.4	1.5	0.8
$\chi_{aa}^{[c]}$	2.487	2.528	2.46	2.316
$\chi_{bb}^{[c]}$	-1.667	-0.805	-0.983	1.69
$\chi_{cc}^{[c]}$	-0.82	-1.724	-1.477	-4.006
$\Delta E^{[d]}$	1840	1778	1882	1625
$\Delta E_{ZPE}^{[e]}$	1663	1673	1698	1718
$\Delta G^{[f]}$	1339	1428	1416	1718



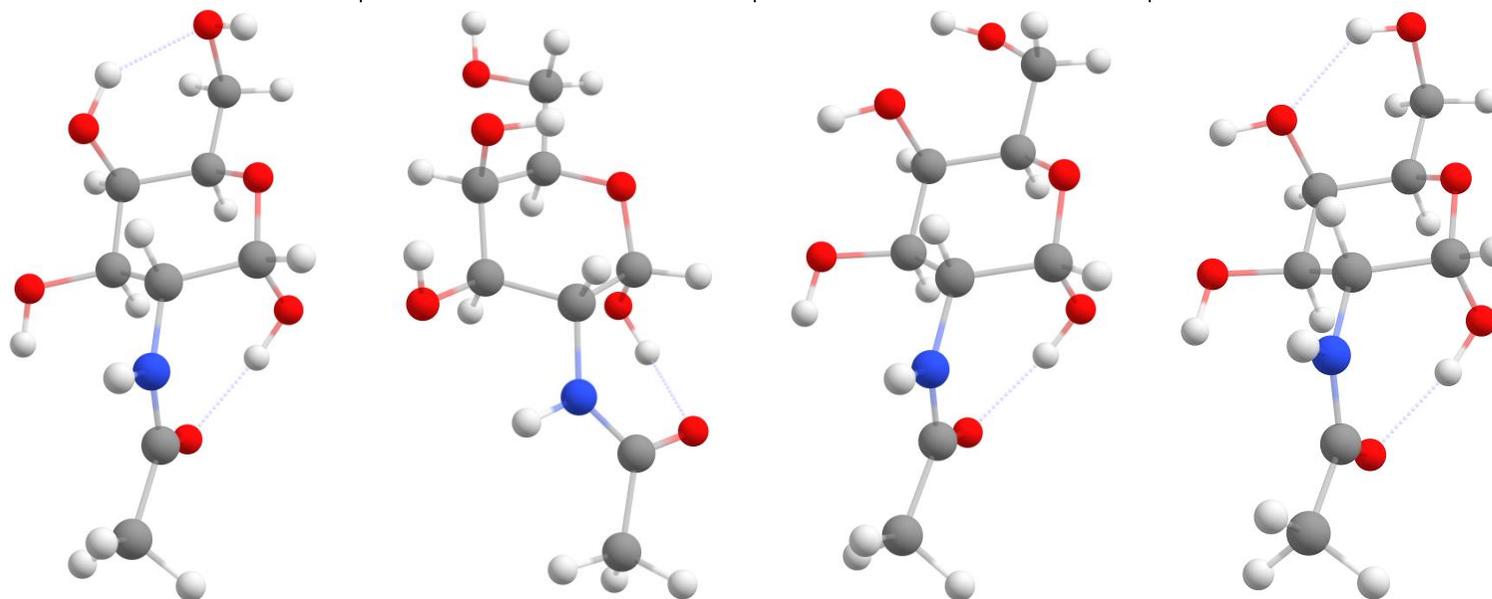
<sup>[a]</sup>:  $A$ ,  $B$  y  $C$  son las constantes rotacionales, medidas en MHz. <sup>[b]</sup>:  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  designan las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debye ( $1 \text{ D} \approx 3.33564 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}$ ). <sup>[c]</sup>:  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: Energías relativas excluyendo (<sup>[d]</sup>) e incluyendo (<sup>[e]</sup>) la energía en el punto cero (ZPE), respectivamente. <sup>[f]</sup>: Energía libre de Gibbs relativa calculada a 298K. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: todas las energías aparecen expresadas en  $\text{cm}^{-1}$

Parámetro	Confórmero XXXIII	Confórmero XXXIV	Confórmero XXXV	Confórmero XXXVI
$A^{[a]}$	1178.4	1238.3	1117.7	1052.3
$B^{[a]}$	354.8	363.6	364.1	388.7
$C^{[a]}$	310.5	302.5	322.8	304.9
$\mu_a^{[b]}$	2.3	0.9	-0.4	-0.8
$\mu_b^{[b]}$	0.1	2.2	-1	4.3
$\mu_c^{[b]}$	-3.1	-0.7	3.4	0.7
$\chi_{aa}^{[c]}$	2.539	2.322	2.596	2.341
$\chi_{bb}^{[c]}$	-0.735	1.698	-1.333	1.689
$\chi_{cc}^{[c]}$	-1.804	-4.019	-1.263	-4.03
$\Delta E^{[d]}$	1850	1651	1852	1791
$\Delta E_{ZPE}^{[e]}$	1729	1732	1780	1791
$\Delta G^{[f]}$	1459	1710	1546	1759



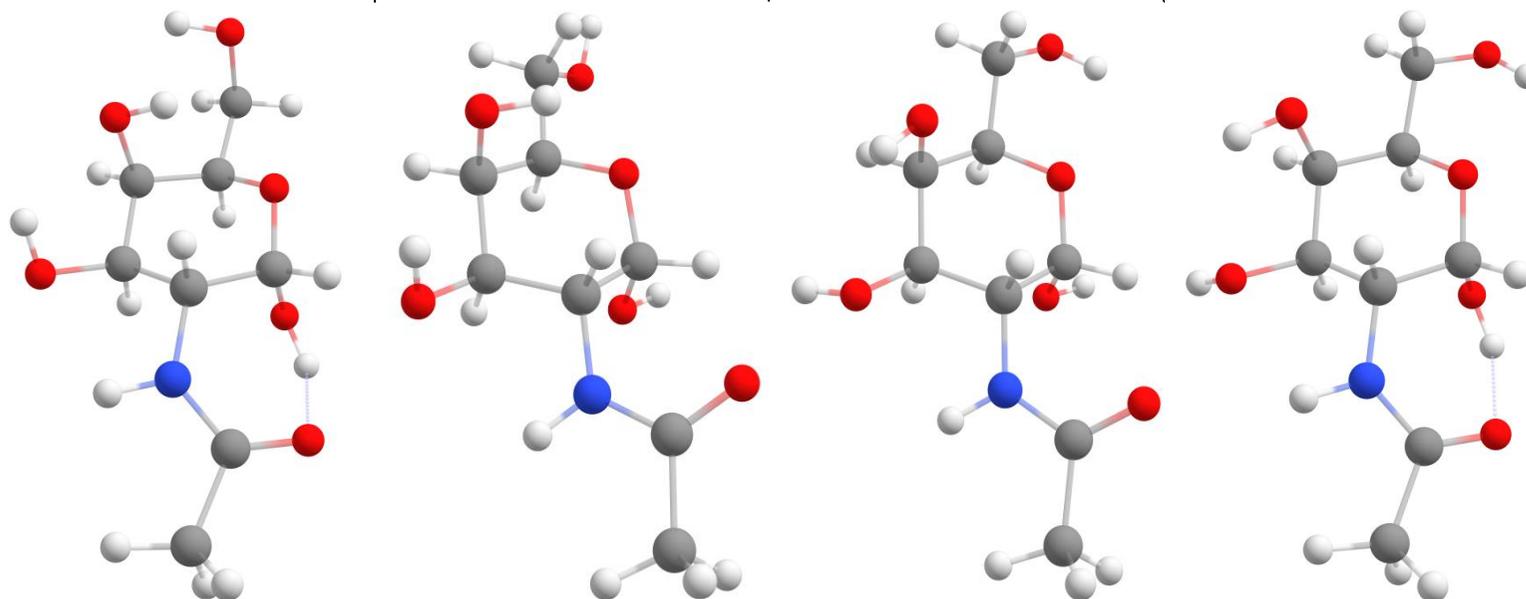
<sup>[a]</sup>:  $A$ ,  $B$  y  $C$  son las constantes rotacionales, medidas en MHz. <sup>[b]</sup>:  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  designan las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debye ( $1 \text{ D} \approx 3.33564 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}$ ). <sup>[c]</sup>:  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: Energías relativas excluyendo (<sup>[d]</sup>) e incluyendo (<sup>[e]</sup>) la energía en el punto cero (ZPE), respectivamente. <sup>[f]</sup>: Energía libre de Gibbs relativa calculada a 298K. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: todas las energías aparecen expresadas en  $\text{cm}^{-1}$

Parámetro	Confórmero XXXVII	Confórmero XXXVIII	Confórmero XXXIX	Confórmero XL
$A^{[a]}$	1241.4	1181.1	1243.9	1235.8
$B^{[a]}$	383.4	364.5	370.6	378.8
$C^{[a]}$	334	305.6	322.2	328.9
$\mu_a^{[b]}$	-2.9	0.1	-5.5	-6
$\mu_b^{[b]}$	0.3	1.6	-3.7	-3.9
$\mu_c^{[b]}$	1.3	1.4	-2.6	-0.9
$\chi_{aa}^{[c]}$	2.293	2.197	2.255	2.291
$\chi_{bb}^{[c]}$	-3.09	1.519	-3.328	-3.32
$\chi_{cc}^{[c]}$	0.797	-3.716	1.074	1.03
$\Delta E^{[d]}$	1819	1828	1915	1968
$\Delta E_{ZPE}^{[e]}$	1837	1844	1886	1911
$\Delta G^{[f]}$	1832	1799	1754	1875



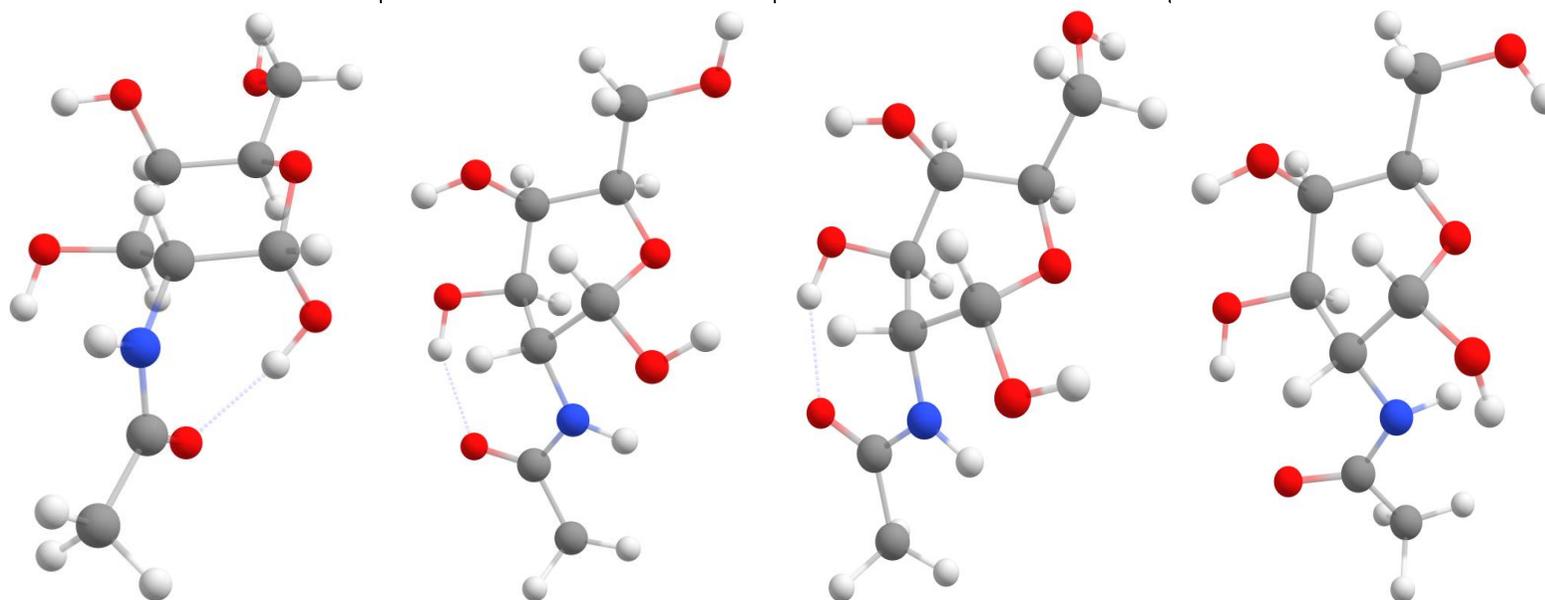
<sup>[a]</sup>:  $A$ ,  $B$  y  $C$  son las constantes rotacionales, medidas en MHz. <sup>[b]</sup>:  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  designan las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debye ( $1 \text{ D} \approx 3.33564 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}$ ). <sup>[c]</sup>:  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: Energías relativas excluyendo (<sup>[d]</sup>) e incluyendo (<sup>[e]</sup>) la energía en el punto cero (ZPE), respectivamente. <sup>[f]</sup>: Energía libre de Gibbs relativa calculada a 298K. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: todas las energías aparecen expresadas en  $\text{cm}^{-1}$

Parámetro	Confórmero XLI	Confórmero XLII	Confórmero XLIII	Confórmero XLIV
$A^{[a]}$	1189.4	1064	1042.6	1066.7
$B^{[a]}$	372.9	365.3	371.8	385.8
$C^{[a]}$	309.8	310.4	312.6	304.4
$\mu_a^{[b]}$	-1.5	1.6	-1.7	-4
$\mu_b^{[b]}$	3.3	-0.4	-3.3	5.4
$\mu_c^{[b]}$	-0.7	1.2	4	-1.2
$\chi_{aa}^{[c]}$	2.474	2.354	2.483	2.407
$\chi_{bb}^{[c]}$	1.664	-2.146	-1.015	1.768
$\chi_{cc}^{[c]}$	-4.137	-0.208	-1.468	-4.175
$\Delta E^{[d]}$	1808	2189	2189	2035
$\Delta E_{ZPE}^{[e]}$	1935	1956	1992	2027
$\Delta G^{[f]}$	2004	1578	1697	2005



<sup>[a]</sup>:  $A$ ,  $B$  y  $C$  son las constantes rotacionales, medidas en MHz. <sup>[b]</sup>:  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  designan las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debye ( $1 \text{ D} \approx 3.33564 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}$ ). <sup>[c]</sup>:  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: Energías relativas excluyendo (<sup>[d]</sup>) e incluyendo (<sup>[e]</sup>) la energía en el punto cero (ZPE), respectivamente. <sup>[f]</sup>: Energía libre de Gibbs relativa calculada a 298K. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: todas las energías aparecen expresadas en  $\text{cm}^{-1}$

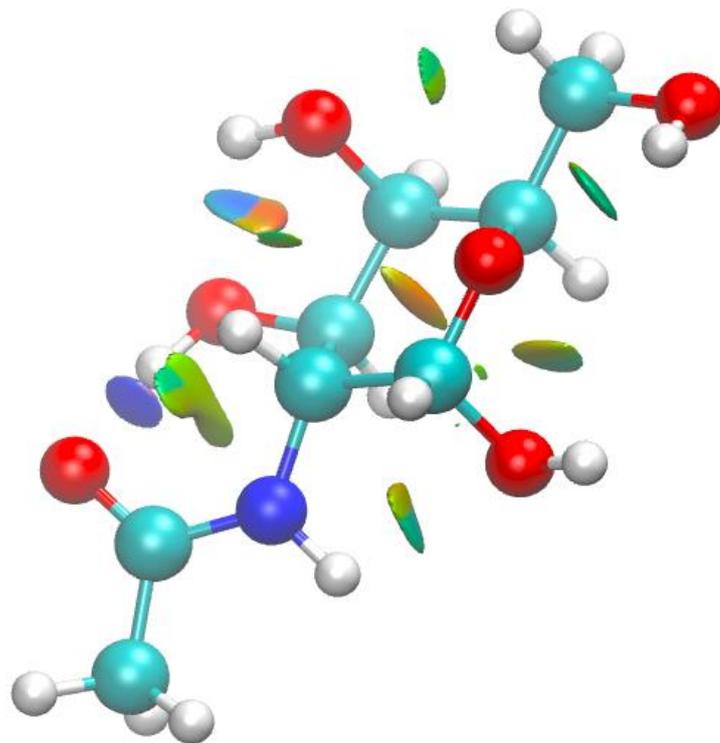
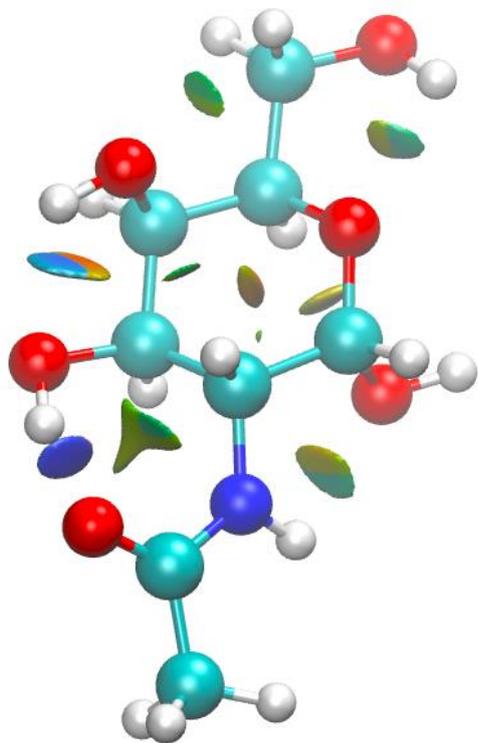
Parámetro	Confórmero XLV	Confórmero XLVI	Confórmero XLVII	Confórmero XLVIII
$A^{[a]}$	1201.5	1057.7	1072.7	983.2
$B^{[a]}$	372	380.4	373.9	391.7
$C^{[a]}$	326.9	312.8	315.1	327.7
$\mu_a^{[b]}$	-3.3	1.4	-0.5	-3.3
$\mu_b^{[b]}$	-3.1	2.3	4	1.2
$\mu_c^{[b]}$	-2.2	-0.5	1.8	2
$\chi_{aa}^{[c]}$	2.251	1.734	1.481	1.953
$\chi_{bb}^{[c]}$	-3.211	1.563	1.451	-0.571
$\chi_{cc}^{[c]}$	0.96	-3.297	-2.932	-1.383
$\Delta E^{[d]}$	2303	2239	2392	2913
$\Delta E_{ZPE}^{[e]}$	2109	2143	2324	2858
$\Delta G^{[f]}$	1886	2056	2202	2756



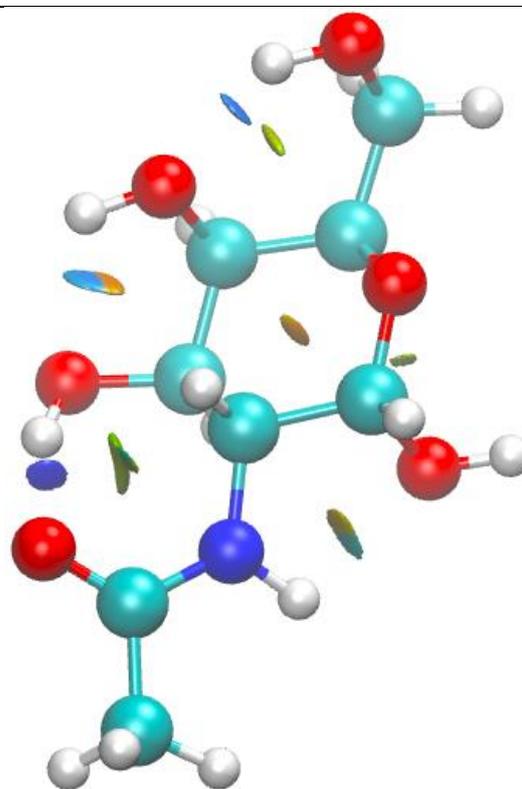
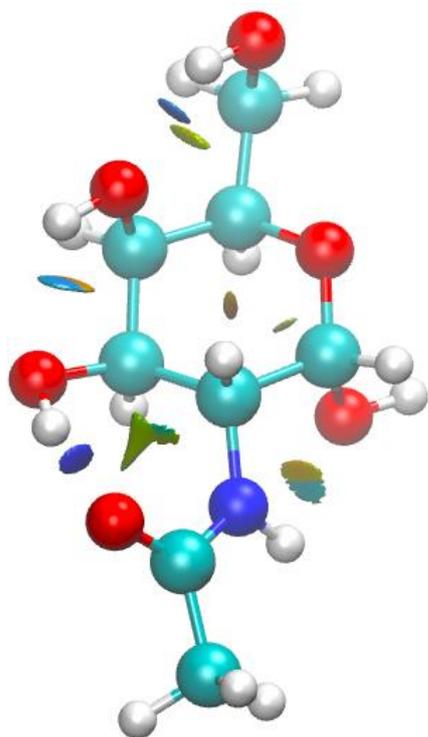
<sup>[a]</sup>:  $A$ ,  $B$  y  $C$  son las constantes rotacionales, medidas en MHz. <sup>[b]</sup>:  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  designan las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debye ( $1 \text{ D} \approx 3.33564 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}$ ). <sup>[c]</sup>:  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: Energías relativas excluyendo (<sup>[d]</sup>) e incluyendo (<sup>[e]</sup>) la energía en el punto cero (ZPE), respectivamente. <sup>[f]</sup>: Energía libre de Gibbs relativa calculada a 298K. <sup>[d]</sup> <sup>[e]</sup>: todas las energías aparecen expresadas en  $\text{cm}^{-1}$

## Apéndice II: Mapas de interacciones intramoleculares no covalentes

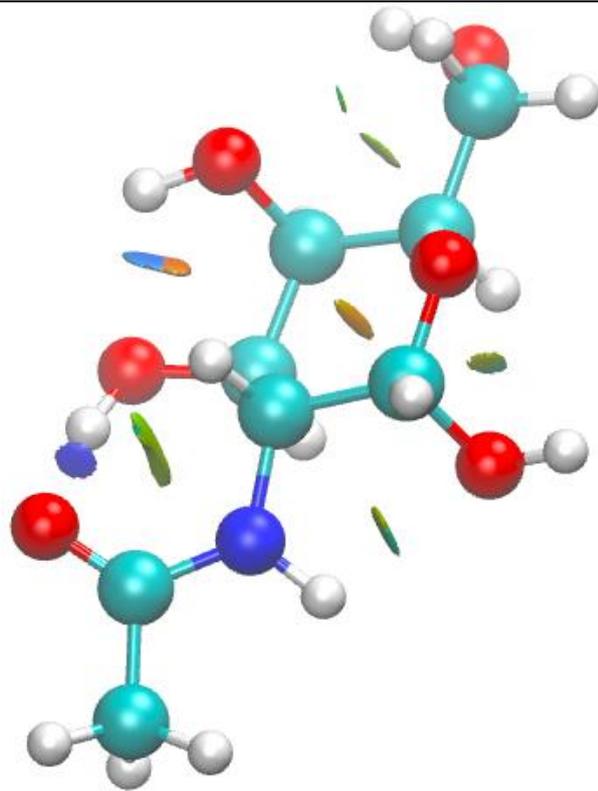
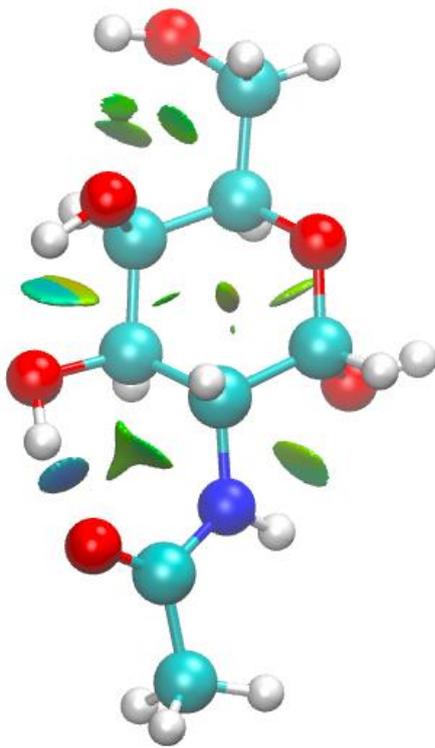
Confórmero I



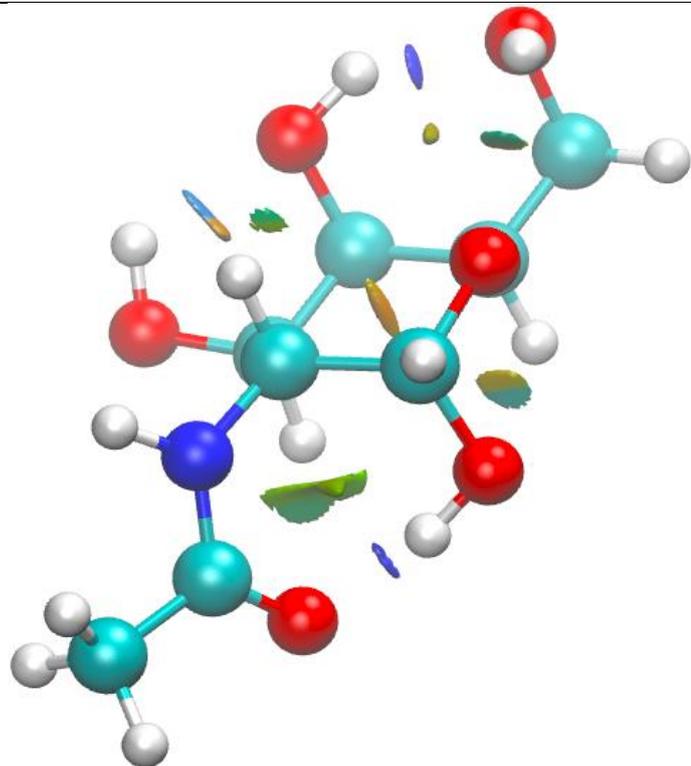
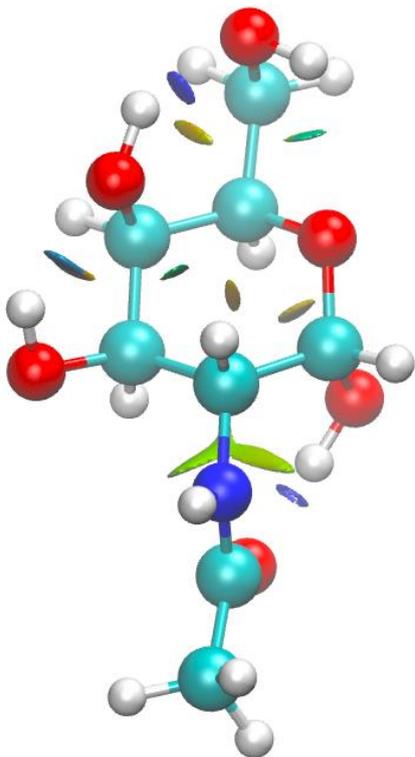
Confórmero II



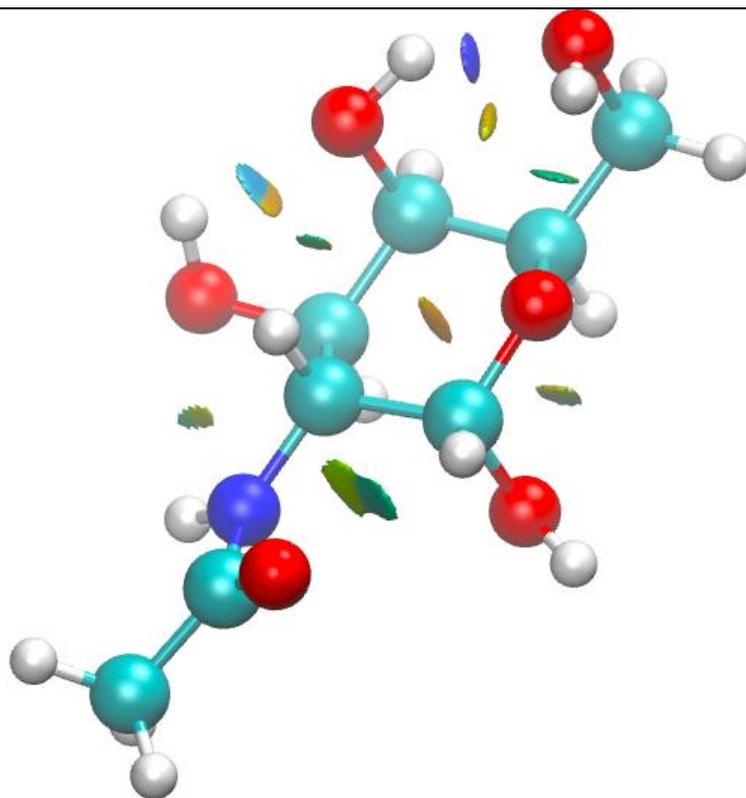
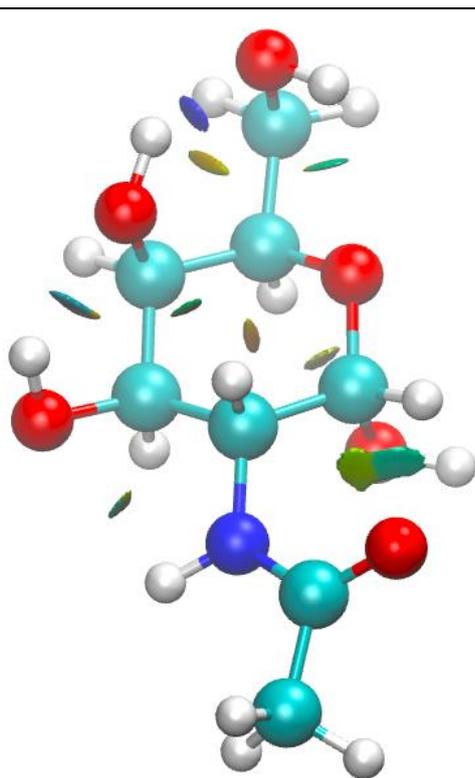
Confórmero III



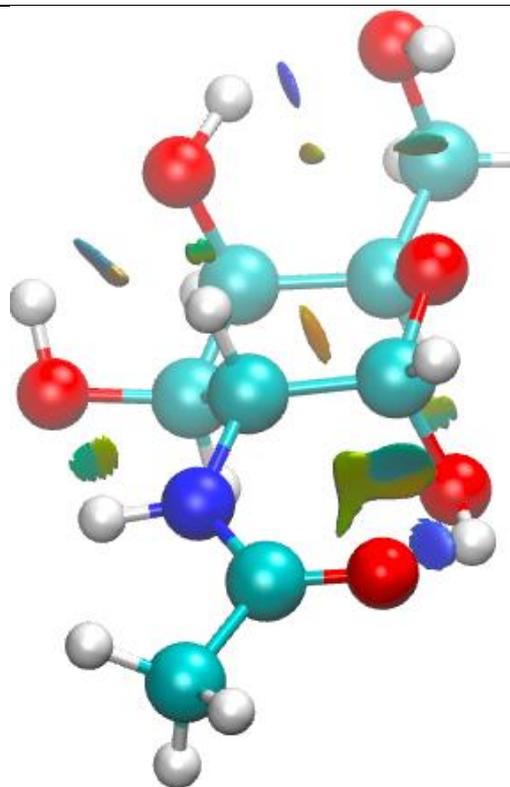
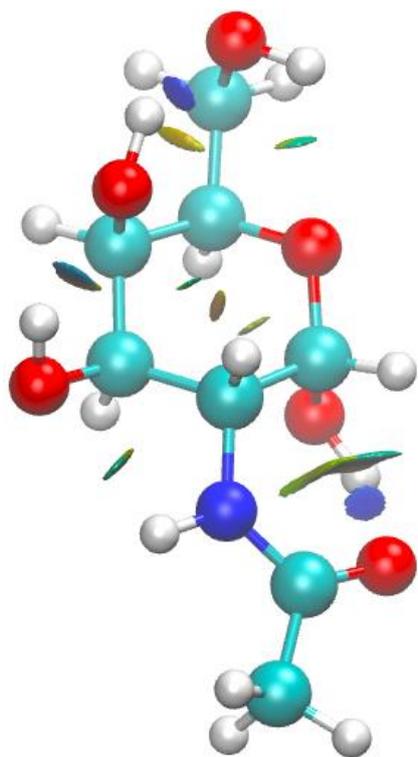
Confórmero IV



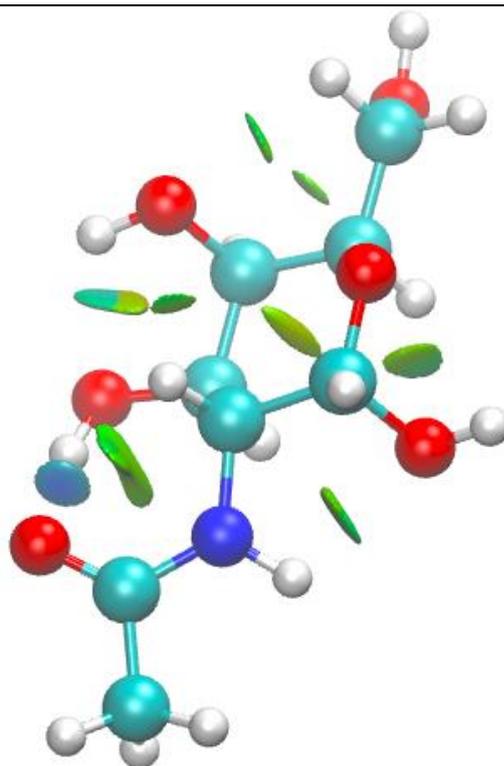
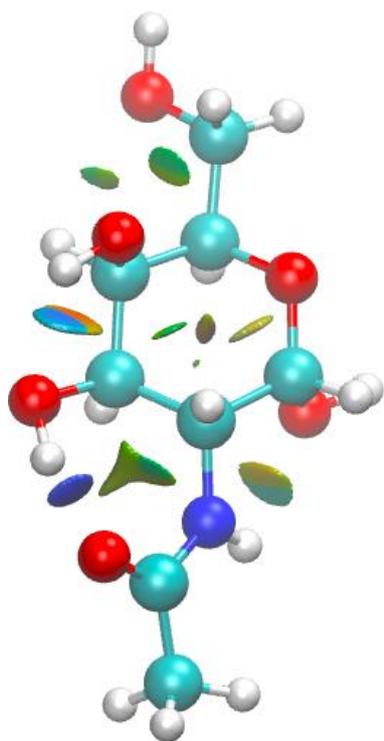
Confórmero V



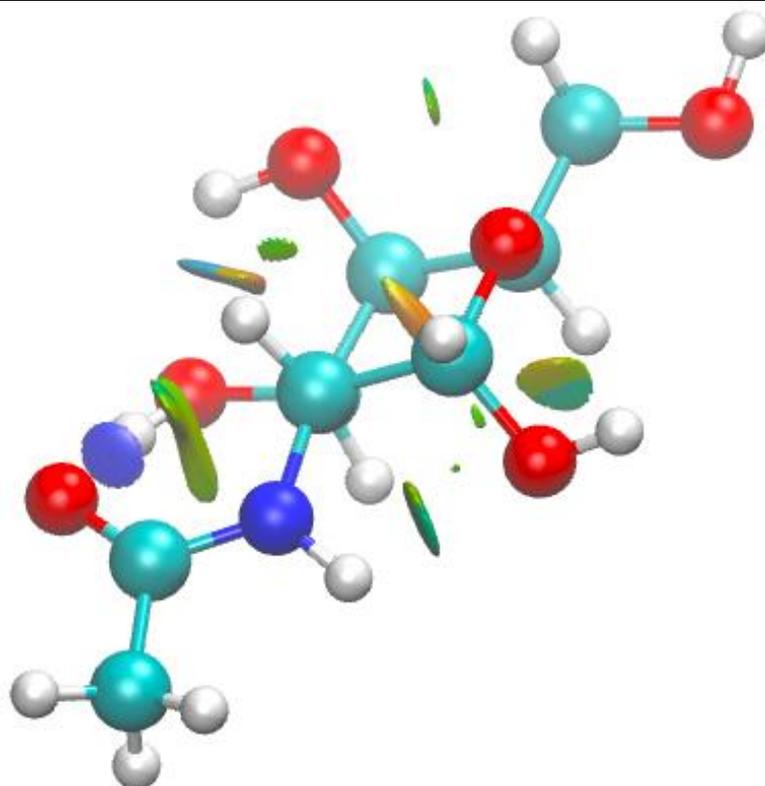
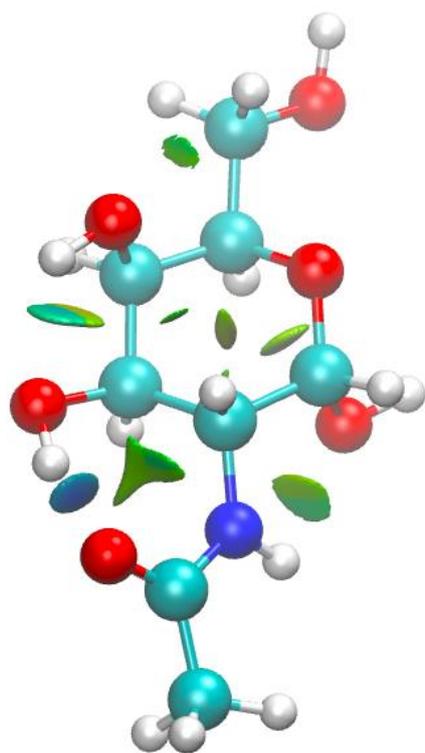
Confórmero VI



Confórmero VII



Confórmero VIII



Confórmero IX

