



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias

Trabajo Fin de Máster

Máster en Técnicas Avanzadas en Química. Análisis y Control  
de Calidad Químicos.

**“ESTUDIO COMPUTACIONAL DEL ÁCIDO PANTOTÉNICO  
O VITAMINA B5”**

*Autor: Ismael González Hervás*

*Tutor/es: Iker León Ona  
José Luis Alonso Hernández*



1. RESUMEN/ABSTRACT .....	7
2. INTRODUCCIÓN .....	9
3. JUSTIFICACIÓN .....	13
4. OBJETIVOS .....	15
5. METODOLOGÍA .....	17
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
7. CONCLUSIONES.....	39
8. BIBLIOGRAFÍA .....	40
9. ANEXO .....	42



## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría, aprovechando la ocasión, agradecer a José Luis Alonso e Iker León la oportunidad que me ha sido brindada de trabajar con ellos y poder aprender de todos sus conocimientos, la dedicación y atención prestada, y todos los consejos que he recibido por su parte.

Agradecer también a todos los miembros del GEM su compañía durante estos meses y su ayuda ante cualquier situación, en especial a Raúl, compañero de fatigas fuera y dentro del laboratorio.

Mención a todos mis colegas de la facultad, tanto del máster como de la carrera, por sus consejos y ayudas continuas.

No puedo olvidarme de mis padres, Fuen y Julio, que han sido capaces de otorgarme todos los medios necesarios para estudiar tanto la carrera en su día, como el Máster que me ha dado la oportunidad de realizar este trabajo, así como su apoyo en todas y cada una de mis decisiones.

Por último, pero no menos importante, a David, Arancha, Jose, Lara y Víctor, por estar ahí en los días buenos, pero sobre todo en los malos.



## 1. RESUMEN/ABSTRACT

En el presente estudio realizado sobre la molécula del ácido pantoténico, con un importante interés biológico, se ha llevado a cabo una búsqueda conformacional y posterior optimización mediante métodos computacionales, Mecánica Molecular primero, y diferentes métodos *ab initio* y Teoría del Funcional de la Densidad después. A partir de los datos obtenidos y su posterior ajuste, se predijo el espectro de rotación de la molécula.

También se predijo la mejor zona del espectro de frecuencias donde realizar la experimentación en investigaciones futuras.

Una vez llevado a cabo todo ese proceso, se indagará mediante diversas fuentes bibliográficas, en las posibles interacciones que tienen lugar y que dan lugar a las diferencias de energía que se han podido comprobar entre los conformeros obtenidos.

### ABSTRACT

In this work made about the panthotenic acid, a molecule which has a particular biological interest, we carried out a conformational landscape and geometry optimization using computational methods. First of all, molecular mechanics was used in order to find the conformers, and different methods (*ab initio* and DFT) were performed for the optimization. Afterwards, the data obtained were used to predict the rotational spectra, which will be very helpful in the next steps of the experimentation.

This prediction was performed to know the best frequency area where the experimentation would be more succesfully.

Once this process was over, we will try to understand using bibliography references, the interactions that can take place in a intramolecular way because they could be related with the different energies obtained in the conformational landscape.



## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 ANTECEDENTES

El ácido pantoténico (Figura 1), más conocido como vitamina B5, es una molécula que se enmarca en la categoría de vitaminas hidrosolubles. Este tipo de vitaminas son biomoléculas que tienen un papel activo dentro del organismo de los seres humanos.

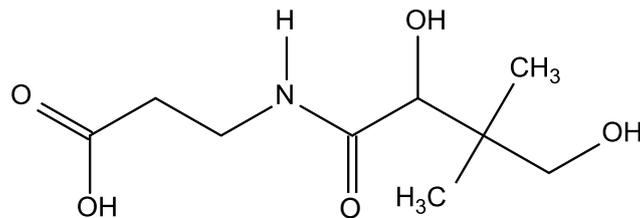


Figura 1. Estructura del ácido pantoténico, de fórmula molecular  $C_9H_{17}NO_5$

Fue descubierta en 1933, por Roger J. Williams como uno de los cofactores de crecimiento que mejores resultados daba en levaduras. Durante los sucesivos años intentó sintetizarla en el laboratorio de forma artificial, cosa que consiguió en 1940. [1,2]

En ese mismo año, dos grupos de investigación diferentes, [3,4] reconocieron el requerimiento de una sustancia nueva en la dieta de forma independiente, a la que denominaron *antidermatitis factor* y *liver filtrate factor* respectivamente, concluyendo en que se trataban ambas sustancias de la misma y se correspondía con el ácido pantoténico, al que se le daría el nombre de vitamina B5. Durante los años siguientes, el ácido pantoténico fue objeto de estudio dentro de la biología hasta entender su importancia, que se comentará posteriormente.

Además, en 1945 se descubrió la coenzima A por Fritz Lipmann [5,6], con la vitamina B5 como uno de sus componentes. A raíz de esto, diferentes estudios mostraron la existencia de la vitamina B5 en un numeroso y variado grupo de animales y plantas, otorgándole una gran importancia a su presencia en la dieta.

### 2.2 IMPORTANCIA BIOLÓGICA

Dentro de la importancia de la vitamina B5, hay que destacar que es esencial en la síntesis previa de la coenzima A (CoA), cuya estructura se muestra en la Figura 2.

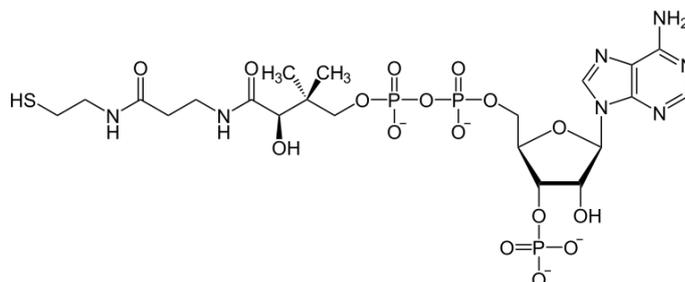
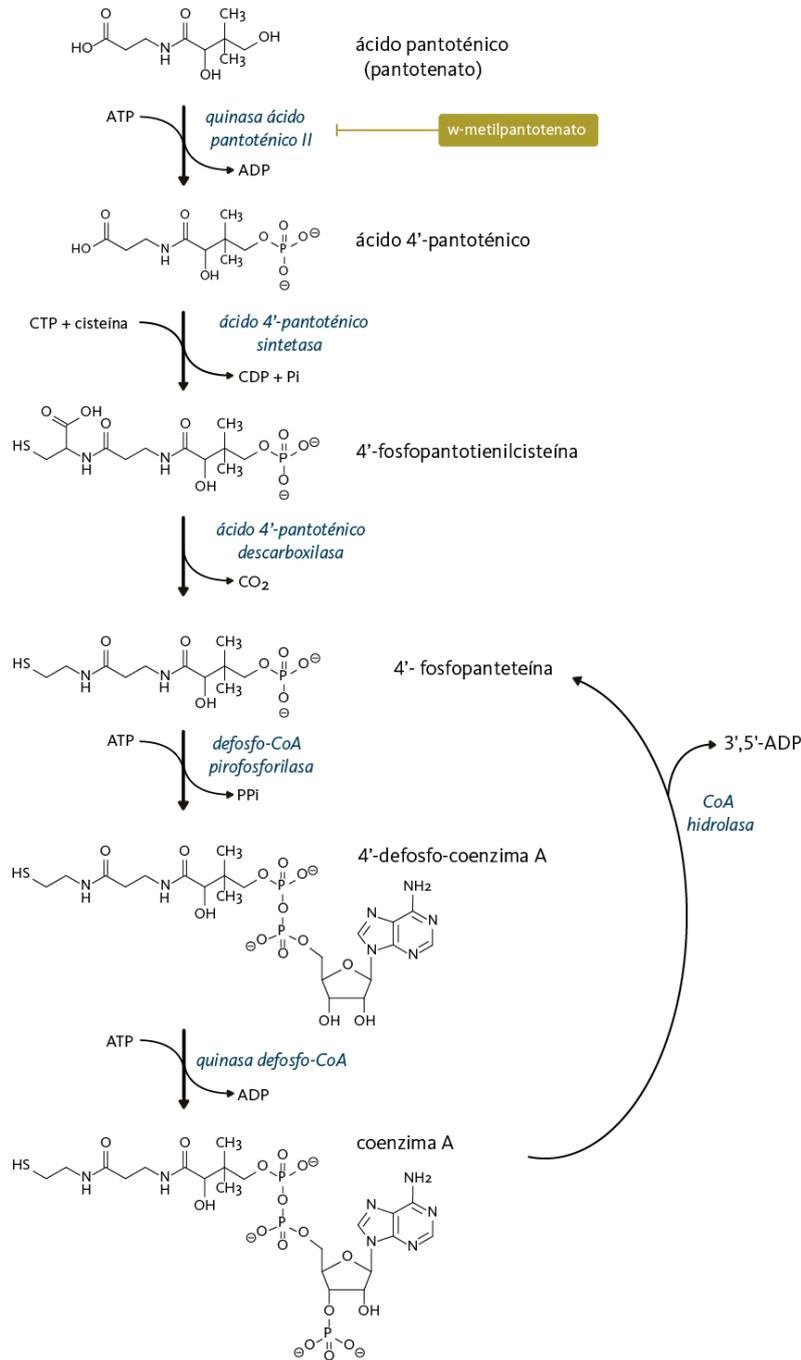


Figura 2. Estructura de la Coenzima A

La CoA se sintetiza en un proceso relativamente complejo catalizado por enzimas a partir de la vitamina B5, adenosín difosfato (ADP) y cisteamina, en un proceso que se describe en la Figura 3.



**Figura 3.** Síntesis de la CoA a partir de ácido pantoténico

En primer lugar, la vitamina B5 pasa a ácido 4-fosfopantoténico en una reacción con ATP catalizada por la enzima PANKII de fosforilación. De esta forma y mediante diferentes reacciones catalizadas cada una por su propia enzima específica se acaba obteniendo la CoA. Esta a su vez reacciona con grupos acilo dando lugar a diferentes derivados, como el acetil-CoA, que son requeridos para reacciones que generan energía a partir de realizar diferentes procesos de degradación de grasas y proteínas.

Además, la CoA puede tener diferentes papeles en el organismo dentro del metabolismo de diferentes sustancias o la respiración celular ya que sirve de precursor al ciclo de Krebs, ruta metabólica en la que se obtiene energía para las células del organismo, además de precursores de aminoácidos útiles en otras rutas metabólicas.

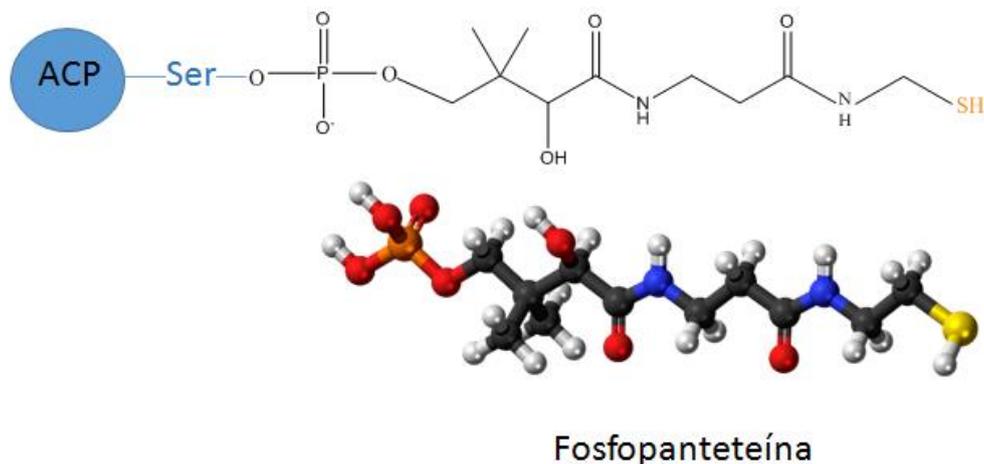
Es interesante comentar que solamente el isómero dextrorrotatorio de la vitamina B5 posee esta actividad biológica, y su forma levógira puede actuar como contrapartida del isómero D, por lo que su presencia en el organismo no es trivial.

Dentro de su papel biológico, a parte de su rol principal como precursor de la coenzima A, la vitamina B5 permite la formación de la molécula 4'-fosfopanteteína, la cual tiene importancia biológica en la activación de proteínas y enzimas esenciales en procesos biológicos. He aquí algunos ejemplos:

- Proteína transportadora de grupos acilo (ACP) [7]:

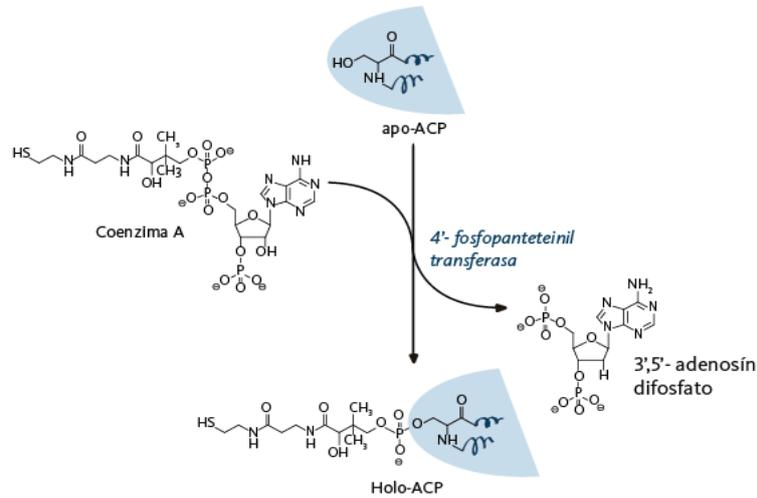
Es sabido que los ácidos grasos tienen una importancia vital en las diferentes funciones fisiológicas. Por ello el cuerpo humano ha desarrollado algunas vías de síntesis que se llevan a cabo con la participación de la ácido-graso-sintasa o FAS como catalizador del proceso.

La FAS a nivel molecular se trata de un complejo multienzimático que necesita la ACP como proteína transportadora. Esta proteína tiene como grupo prostético dentro de su estructura un derivado de la vitamina B5 que se obtiene como parte de la síntesis de la CoA, la 4'-fosfopanteteína (Figura 4), unido mediante un resto de serina a la ACP.



*Figura 4. Estructura de la 4'-fosfopanteteína y esquema de su unión a la ACP*

El grupo prostético se une a la ACP mediante un proceso de activación donde se hidroliza la CoA en ADP y 4'fosfopanteteína. De esta forma se puede realizar la transferencia del grupo prostético al centro activo de la proteína, obteniendo así lo que se denomina Holo-ACP, molécula biológicamente activa, tal y como se describe en la Figura 5:

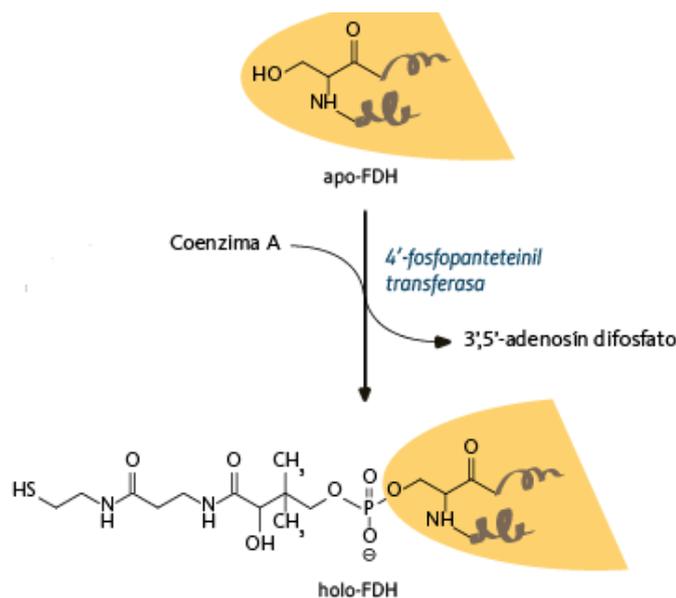


**Figura 5.** Activación biológica de la proteína transportadora de grupos acilo (ACP)

Como grupo prostético su función se basa en transferir la cadena de ácidos grasos que se está sintetizando a los diferentes centros enzimáticos de la FAS de manera secuencial para ir obteniendo las diferentes uniones entre carbonos.

- 10-formiltetrahidrofolato deshidrogenasa [8,9,10]:

Dentro del metabolismo de ácidos nucleicos y aminoácidos, destaca la acción de esta enzima, conocida abreviadamente como FDH, que cataliza la síntesis de cofactores esenciales para estos tipos de procesos. Al igual que en el caso anterior, la FDH necesita una activación mediante un grupo prostético, también la 4'-fosfopanteteína obtenida de la hidrólisis de la CoA como derivada de la vitamina B5, que se muestra en la Figura 6:



**Figura 6.** Activación biológica de la FDH

### 3. JUSTIFICACIÓN

El apartado anterior muestra la tremenda importancia de la vitamina B5 fundamental para la síntesis de otras moléculas esenciales para el correcto desempeño de distintas funciones biológicas. Muchas de las reacciones de la vitamina B5 ocurren debido a reacciones de alguno de sus grupos funcionales. Por ejemplo, ya se comentó que la vitamina B5 pasa a ácido 4-fosfopantoténico en una reacción con ATP catalizada por la enzima PANKII de fosforilación. Esta fosforilación ocurre en el grupo hidroxilo.

Así, resultaría interesante conocer las interacciones intramoleculares que llevan al ácido pantoténico a presentar esa estructura y servir de precursor para la síntesis de moléculas biológicamente tan importantes como las comentadas anteriormente.

Además, ya se ha comentado previamente la necesidad de tener en cuenta el isómero dextrógiro de la vitamina B5 dentro del marco de su actividad biológica, dado que el otro isómero sería capaz de contrarrestar los efectos de esta. Además, tanto la molécula en sí como algunos de sus derivados están inmiscuidos en procesos biológicos catalíticos que llevan asociados reacciones de síntesis, por lo que conocer la estructura podría ser de gran ayuda a la hora de dilucidar una posible relación estructura-reactividad, que ayudaría a entender la importancia de la presencia de la vitamina B5 en la dieta.

Por ello, es esencial tener un conocimiento preciso de la estructura de la vitamina B5, tanto como para conocer cómo afecta la isomería a la actividad biológica, como poder describir las posibles interacciones que tenga la propia molécula o comprender su reactividad.

De cara al estudio que se pretende realizar, el Grupo de Espectroscopía Molecular (GEM), unidad asociada al CSIC, ha desarrollado técnicas muy potentes de análisis estructural para macromoléculas biológicas enmarcadas en diferentes campos. Estas técnicas instrumentales permiten la transferencia de moléculas termolábiles que se encuentran en fase sólida a fase gas mediante ablación láser. De esta forma es posible realizar diferentes análisis conformacionales para la misma molécula a partir de espectros obtenidos por espectroscopía de rotación, dando información sobre la estabilidad de estos conformeros, abundancia de estos e incluso parámetros estructurales con una gran precisión.

Hay que destacar que en el grupo se han realizado estudios sobre otras macromoléculas biológicas, como aminoácidos [11], cetoheptosas y polialcoholes en la línea de la teoría del dulzor [12,13] y otras sustancias como la sacarina [14]. También se han llevado a cabo análisis estructurales de otras vitaminas como el ácido ascórbico [15], además de que también se han trabajado análisis conformacionales de algunas drogas y neurotransmisores, por lo que se puede decir que la experiencia en moléculas de entidad biológica es amplia.

De esta forma se plantearán a continuación una serie de objetivos con el propósito de obtener ciertos conocimientos sobre la estructura de la vitamina B5 en base a la espectroscopía de rotación.



## 4. OBJETIVOS

El propósito principal del trabajo que se presenta será realizar un estudio sobre la viabilidad de un experimento de espectroscopía de rotación de la molécula de la vitamina B5. Para ello, se presenta un trabajo de marco teórico y modelado utilizando diferentes métodos computacionales.

El principal objetivo será el empleo de métodos computacionales que permitirán conocer las disposiciones que adopta la molécula sin interacciones. Con ello se podrán obtener parámetros estructurales, momentos dipolares y constantes rotacionales que permitan establecer la estabilidad de los conformeros y predecir el espectro de rotación de la molécula. Esto nos permitirá evaluar la viabilidad de futuros experimentos basados en espectroscopía de rotación.

Para ello, uno de los primeros pasos será obtener todos los posibles conformeros mediante mecánica molecular.

Posteriormente, estos cálculos se realizarán en metodologías *ab initio* y DFT.

Los datos obtenidos se usarán para predecir las regiones de frecuencias de interés para una futura labor de experimentación, y, además, establecer que instrumentación sería la idónea a utilizar.

Además, se analizará la estabilidad de las distintas especies, sus constantes de rotación, así como sus momentos dipolares para evaluar la dificultad de experimentos futuros.

Además, una vez obtenidos todos los resultados, se finalizará el análisis teórico de la estructura que permitirá hacer una idea del panorama conformacional de la vitamina B5, así como de las posibles interacciones que pueden existir de forma intramolecular.



## 5. METODOLOGÍA

Los estudios estructurales de este tipo de moléculas normalmente se dividen en dos líneas diferenciadas de trabajo que se ponen en común al finalizar ambas etapas por separado. Por un lado, se realizará un análisis computacional de la vitamina B5 con el fin de obtener una visión general y en perspectiva del panorama conformacional. De esta forma se pueden obtener los conformeros más relevantes, las predicciones de las energías y los parámetros espectroscópicos más relevantes utilizando diferentes métodos computacionales. Por otro lado, restaría el procedimiento experimental del trabajo, que consiste en la obtención del espectro rotacional de la molécula y su posterior ajuste y análisis. Una vez realizados ambos trabajos, se ponen en común todos los resultados obtenidos con el fin de determinar el número de conformeros existentes para la molécula, así como poder realizar una comparación de parámetros espectroscópicos y estructurales que permitan la correcta asignación de los diferentes conformeros.

En el presente trabajo fin de máster, se ha realizado solamente la primera vía de trabajo, aunque también se comentarán ciertos detalles de la experimentación.

### 6.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

En una primera etapa se realiza una búsqueda conformacional de la molécula de interés, con el objetivo de encontrar los conformeros más probables, para posteriormente optimizar sus geometrías y obtener sus energías y parámetros estructurales y rotacionales. Esto permitirá obtener los conformeros que resulten ser más relevantes y los datos más relevantes para poder realizar la asignación experimental.

Teniendo como objetivo la búsqueda conformacional de una molécula, se podría plantear usar conocimientos de química para intuir las conformaciones más estables. El problema de esta metodología es que, a la hora de realizar este proceso para moléculas con muchas torsiones, se correría el riesgo de no considerar todos los conformeros que tiene la molécula, además de todo el tiempo que conllevaría.

Gracias a las metodologías que existen hoy en día en Química Computacional este problema queda solventado. Dentro de dicho campo hay diferentes métodos bien diferenciados entre aquellos que se basan en el uso de tratamientos puramente clásicos los que tratan de resolver la ecuación de Schrödinger.

#### 6.1.1. MÉCANICA MOLECULAR. SUPERFICIES DE ENERGÍA POTENCIAL. MMFFs. [16]

Cualquier molécula está sujeta a modificaciones espaciales de sus parámetros estructurales, lo que causa que exista para cada molécula un abanico enorme de posibles conformaciones. Todas estas disposiciones estarán definidas por una energía, la cual dará una idea de la estabilidad de cada una de ellas. Si se realiza la representación de estas energías se obtiene la denominada Superficie de Energía Potencial (SEP).

Para los casos sencillos de moléculas diatómicas, la superficie se ve reducida a una curva de potencial dado que solo existe como único grado de libertad la longitud del enlace. Para casos más complejos, lo que se obtiene es una SEP en la que se representan cada uno de los

confórmeros y los estados de transición que existen entre ellos. Haciendo uso de estos conocimientos se pueden obtener los confórmeros más estables, que se corresponden con las estructuras de equilibrio que se encuentran en los pozos de la SEP.

La energía que se obtiene mediante estos métodos es la energía mecánica involucrada en la deformación de las moléculas. Los átomos se consideran masas esféricas y los enlaces que los unen como tensores, y las interacciones entre estas masas se describen mediante funciones de potencial derivadas de la mecánica. Es cierto que hay que tener en cuenta que este método realiza una serie de aproximaciones, por lo que el valor de la energía no tendrá mucha precisión, pero a cambio, y ya que el coste computacional es relativamente bajo en comparación con otros métodos más avanzados para moléculas grandes, permite realizar una búsqueda conformacional rápida como primer acercamiento al análisis estructural.

Dentro de esta metodología, para obtener la estructura y toda la información requerida, se necesitan una serie de parámetros cuyos valores se han obtenido de forma empírica. Este conjunto de parámetros obtenidos de forma experimental se define como campo de fuerzas (FF, *FORCE FIELD*), y es una serie de valores para las posiciones relativas de los átomos, las constantes  $k$ , según la ley de Hooke, de los enlaces que los unen al ser considerados como muelles, diferentes ángulos de giro o torsión, etc. Uno de los más extendidos debido a su bajo coste computacional, y una gran reproducibilidad en sistemas con diferentes grupos funcionales es el MERCK MOLECULAR FORCE FIELD (MMFFs) [17], que es con el que se ha realizado el primer “*screening*” de confórmeros del presente trabajo. Al margen de este, existen muchos otros que en función del campo de aplicación tienen una serie de ventajas o desventajas (AMBER, OPLS, MMFF, BIOCHARMM, etc)

Este campo de fuerzas es uno de los más utilizados a la hora de evaluar moléculas orgánicas presentes en principios activos de diferentes compuestos presentes en la industria farmacéutica, así como de moléculas de cierta importancia biológica. MMFFs considera ampliamente las interacciones no enlazantes, dando la energía como una suma de diferentes contribuciones obtenidas de forma experimental mediante expresiones relativamente complejas. Las contribuciones pueden diferenciarse de la siguiente forma [18]:

- La tensión de enlace según la ley de Hooke
- La deformación de los ángulos de la molécula
- Los movimientos de tensión de la molécula
- Los plegamientos de la molécula fuera del plano
- Las diferentes torsiones que puede sufrir la molécula
- Una serie de términos cruzados que describen diferentes acoplamientos entre enlaces, ángulos o torsiones
- Las interacciones de Van der Waals que existen entre sus átomos no enlazados
- Las interacciones electrostáticas según el potencial de Coulomb

### 6.1.2. MÉTODOS MECANOCUÁNTICOS

Esta metodología se basa en la resolución de la ecuación de Schrödinger, la cual solo posee solución exacta para sistemas monoeléctricos, lo que implica que para moléculas poliatómicas con elevado número de electrones es necesario realizar la aproximación de Born-Oppenheimer, la cual considera que la masa de los núcleos es infinitamente mayor que la de los electrones, lo cual permite suprimir los términos nucleares considerándolos

constantes al calcular las derivadas, y parametrizar el término de atracción electrónica entre núcleos y electrones. [19]

De este modo, se pueden diferenciar los métodos mecanocuánticos en función de las aproximaciones realizadas.

- MÉTODOS SEMIEMPÍRICOS [17]

Son métodos que modifican los cálculos de HF mediante parámetros obtenidos de forma empírica con el fin de mejorar los cálculos computacionales. Toman en consideración tres aproximaciones principales:

- Despreciar los electrones internos: dada su despreciable contribución en la actividad química es posible sustituir su contribución en el Hamiltoniano por una función previamente parametrizada.
- Uso de un conjunto de funciones base mínimo para la descripción de los electrones de valencia.
- Uso de la aproximación *modified neglect of differential overlap (MNDO)*. Mediante esta aproximación pueden aproximarse las integrales de dos electrones.

- MÉTODOS BASADOS EN LA FUNCIÓN DE ONDA [16]

Este tipo de métodos están basados en la resolución de la ecuación de Schrödinger sin incluir ningún tipo de información experimental. Las simplificaciones que utiliza son fundamentalmente matemáticas, basadas en las aproximaciones para ecuaciones diferenciales, por lo que son capaces de aportar información muy precisa sobre los efectos cuánticos relevantes.

El principal modelo utilizado por la mayoría de los métodos es el de Hartree-Fock (HF). Se basa en la resolución del Hamiltoniano con un solo determinante de Slater:

$$\hat{H}_{elec}\Psi_{elec} = E_{elec}\Psi_{elec}$$

El hamiltoniano electrónico puede dividirse en dos partes, la energía potencial de cada electrón en sí mismo, que constituye la parte monoeléctrica, y una parte bielectrónica, más complicada de calcular, que se obtiene como la suma de las energías entre pares de electrones para todos los electrones presentes.

$$\hat{H}_{elec} = \sum_i \hat{h}_{ii} + \hat{V}_{ee} \left\{ \begin{array}{l} \hat{h}_{ii} = -\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_A \frac{Z_A}{r_{iA}} \quad \text{parte monoeléctrica} \\ \hat{V}_{ee} = \sum_i \sum_{j>i} \frac{1}{r_{ij}} \quad \text{parte bielectrónica} \end{array} \right.$$

Para poder calcular la parte bielectrónica, se utiliza la aproximación de Born-Oppenheimer, según la cual, fuerzas electrostáticas en los electrones y núcleos son del mismo orden de magnitud, y los cambios que ocurren en sus momentos como resultado de estas fuerzas tienen que ser también los mismos, por lo que se puede suponer que el momento de los electrones y núcleos son de magnitud semejante. Como los núcleos tienen mucha mayor masa que los electrones, podemos considerar que tienen velocidades mucho más pequeñas, por lo que podemos asumir que los núcleos son estacionarios respecto a los electrones y

resolver la ecuación Schrödinger primero para el estado base (Aproximación de orden cero de Born-Oppenheimer, llamada aproximación adiabática) y luego calcular la energía del sistema en esa configuración y resolver la ecuación en un primer orden de perturbación para el movimiento nuclear.

Mediante esta aproximación, los electrones percibirán cada uno el potencial del resto, como si de un potencial medio se tratase, cuyo valor se va mejorando mediante iteraciones. De esta forma se sustituye la parte bielectrónica por una interacción de cada electrón con el resto de los electrones.

Para calcular estas interacciones, el sistema será tratado como una única función de onda ( $\Psi$ ) que se expresa a su vez como producto de funciones monoeléctricas ( $\phi$ ), cada una de las cuales se corresponde con los orbitales moleculares, que a su vez, como se comentará posteriormente, son también combinaciones lineales de funciones de base correspondientes a orbitales atómicos.

Si la función de onda se construye como un determinante de Slater 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.

Así, para un sistema de  $n$  electrones:

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

A la hora de realizar el cálculo de energías, se tiene en cuenta el principio variacional, por el cual, toda energía calculada será igual o mayor a la real. De esta manera y minimizando la energía todo lo posible para evitar el error todo lo que se pueda:

$$\frac{\langle \Psi | \hat{H}_{elec} | \Psi' \rangle}{\langle \Psi | \Psi' \rangle} = E_{calc}$$

Si se deriva la energía respecto de las funciones monoeléctricas, e igualando, se obtiene el operador de Fock, variante del hamiltoniano original y que reduce el problema de la parte bielectrónica a encontrar los valores  $\phi_i$  que satisfagan la siguiente ecuación:

$$\hat{F}\phi_i = \epsilon_i\phi_i$$

Sin embargo, la principal fuente de error del método de HF proviene de tener en cuenta la correlación electrónica de una manera promediada, por lo que se sugirió utilizar una serie de correcciones para poder hallar la denominada energía de correlación. Este conjunto de métodos se denominan métodos post-HF, que cuentan con distintas metodologías que incluyen cálculos variacionales, de agregados acoplados o pertenecientes a la teoría de perturbaciones.

En este trabajo se ha utilizado el método MP2, el cual se detallará brevemente a continuación:

- MÉTODOS PERTURBATIVOS DE MOLLER-PLESSET [17]

Este método utiliza trata la correlación electrónica como una perturbación sobre la función de onda de HF obtenida previamente. Para ello considera el operador Hamiltoniano no perturbado y se le añade una perturbación posteriormente, que se corresponde como un pequeño cambio en las condiciones del sistema. Esta se representa mediante el operador  $\hat{V}$ . A raíz de esto se obtiene que:

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

Teniendo en cuenta que  $\hat{H}_0$  se trata del hamiltoniano sin perturbar y  $\lambda$  es el parámetro de perturbación. A partir de esto se pueden expresar las funciones de onda y las energías modificadas mediante las siguientes expresiones obtenidas mediante un desarrollo de Taylor en función del parámetro de perturbación  $\lambda$ .

$$E^n = E_0^n + \lambda E_1^n + \lambda^2 E_2^n + \dots = \sum_k \lambda_k E^k$$

$$\Psi^n = \Psi_0^n + \lambda \Psi_1^n + \lambda^2 \Psi_2^n + \dots = \sum_k \lambda_k \Psi^k$$

Realizando este tratamiento, se obtiene que la energía original antes de la perturbación (HF) se obtendría como suma de correcciones de orden uno y cero. A partir de ahí se podrían ir introduciendo correcciones como se ha visto, pudiendo llegar a distintos órdenes. En concreto en este trabajo se ha utilizado la teoría de perturbaciones segundo orden o MP2.

- TEORÍA DEL FUNCIONAL DE LA DENSIDAD, DFT [20]

Se basa en el Teorema de Hohenberg-Kohn, de forma que considera que la energía total del estado fundamental de un sistema de N electrones se puede describir mediante un funcional de densidad electrónica.

El Teorema de Hohenberg-Kohn se divide en dos principios principales respectivamente. En primer lugar, cada observable de un sistema mecanocuántico estacionario, donde se incluye también la energía, se puede calcular a partir de la densidad electrónica de solo el estado fundamental. En segundo lugar, se afirma que la densidad electrónica de este estado fundamental es aquella que es capaz de hacer mínimo el valor del funcional de energía, concepto similar al principio variacional. De esta forma, se pueden determinar las características y propiedades de un sistema polieletrónico.

Para poder realizar esto de forma adecuada, lo que se hace es utilizar la expresión general de HF para la energía total, a la cual se le añade un término adicional de intercambio-correlación, obteniéndose la siguiente expresión, completamente basada en diferentes funcionales cuyo sumatorio evidencia todas las interacciones de las distintas partículas de la molécula:

$$E[\rho] = T_s[\rho] + E^H[\rho] + E_{en}[\rho] + E_{nn}[\rho] + E_{xc}[\rho]$$

donde cada término hace referencia a la energía cinética de los electrones sin tener en cuenta su propia interacción, la energía de Hartree, la energía que se corresponde a la interacción electrón núcleo, energía correspondiente a la interacción entre los núcleos y el funcional de intercambio-correlación respectivamente. [21]

Existen varios tipos de funcionales para intercambio-correlación, sirviendo como aproximaciones mejores o peores en función del nivel de detalle con el que miden la densidad electrónica. Los más importantes son LDA, GGA, Meta-GGA o DFT-Híbridos.

En este caso se utilizó el funcional B3LYP, tipo GGA, que combina funcionales para correlación e intercambio. Se parte del funcional de intercambio de Becke, que contribuye con tres términos a la expresión, y por otro lado del funcional no local de correlación desarrollado por Lee, Yang y Parr. [22]

### 6.1.3. BASES DE CÁLCULO [16,23]

A la hora de resolver la ecuación de Schrödinger, se requiere expresar los orbitales moleculares,  $\phi$ , como combinación lineal de orbitales atómicos:

$$\phi = \sum C_i X_i$$

A su vez, se pueden expresar los orbitales atómicos como una contribución normalizada de las partes angular y radial de la ecuación que se muestra a continuación:

$$X = NY(\theta, \gamma)R(r)$$

Donde N se trata de la constante de normalización, Y es la parte angular definida por dos parámetros y R es la parte radial. Esta última puede describirse mediante funciones de tipo Slater o de tipo gaussianas (abreviadas STO y GTO respectivamente). Entre estos dos tipos de funciones existen una serie de ventajas y desventajas de ambos, ya que, por ejemplo, las funciones de tipo Slater necesitan menor número de funciones que las de tipo Gaussian para describir la misma cantidad de datos, pero a cambio el cálculo integral del que se precisa en las STO es mucho más costoso, cosa que con las GTO no ocurre.

A la hora de utilizar estas funciones de base, conviene hacerlo en lo que se denomina su forma contraída. La contracción de funciones es un proceso mediante el cual se reduce el número de funciones de base mediante la combinación lineal de las funciones originarias o primitivas que dan lugar a una serie de funciones contraídas que son las que se tienen en cuenta a la hora de realizar los cálculos.

$$R(r) = \sum_j c_j e^{-\zeta_j r^2}$$

Las funciones de base pueden tener distintos tamaños:

- Base mínima: aquella que utiliza una única función por cada orbital atómico ocupado en el estado fundamental
- Doble-zeta: aquella que utiliza dos funciones por cada orbital atómico ocupado en el estado fundamental
- Triple-zeta: aquellas que utilizan tres funciones por cada orbital atómico ocupado en el estado fundamental

Teniendo en cuenta el tamaño de la base y la forma de abordar los orbitales atómicos, se pueden clasificar las bases de diferentes formas. Hay un conjunto de bases que son las más comúnmente utilizadas y que se conocen como bases de Pople:

- Conjuntos de bases mínimas: son bases en las que se utilizan únicamente una función base para los orbitales de valencia y los internos (*core*). Un ejemplo de este tipo de base es la STO-nG que agrupa como combinación lineal una serie de n funciones gaussianas que intentan simular el comportamiento de un orbital tipo Slater.
- *Split valence basis* (Bases de valencia desdoblada): son bases que tratan de describir los enlaces químicos obviando los electrones del *core* ya que al ser internos van a tener menos relevancia que los electrones de valencia. Se pueden usar diferentes tamaños de bases. Para nombrar este tipo de bases se utilizan un conjunto de caracteres. Por ejemplo, la base de cálculo que se ha utilizado en este trabajo, tanto para método MP2 como para B3LYP:



El primer número se refiere a la base mínima, que en este caso es una función combinada de seis gaussianas que simula el comportamiento de los orbitales internos. Este se separa de los siguientes por un guion que sirve para diferenciar las funciones dedicadas a los orbitales internos de las respectivas para los orbitales de valencia. En este caso se trata de una función triple zeta que contrae tres gaussianas (3) y añade dos gaussianas primitivas por separado (11). Las funciones difusas, se suelen denotar como sendos signos "+". Estas funciones difusas pueden utilizarse para átomos pesados, o átomos concretos más ligeros. Sirven para extender el uso de las funciones de base a regiones espaciales de mayor tamaño, incluso alejadas de los núcleos. Por último, también se han añaden funciones de polarización. Su finalidad es aumentar la capacidad de las funciones de base en las regiones de valencia con el fin de poder describir de manera precisa la distorsión de los orbitales atómicos. Se tratan de combinaciones de orbitales de un número cuántico angular mayor para crear un efecto de cambio de densidad electrónica mediante factores arbitrarios comprendidos entre 0 y 1 que se designan mediante  $\lambda$ . En concreto, en este caso se utilizan combinaciones de los orbitales *p* de átomos pesados como funciones que describen orbitales tipo *d*. De manera análoga se realiza una combinación similar de los orbitales *s* del átomo de hidrogeno con funciones destinadas a describir orbitales tipo *p*. Estas funciones de polarización se designan como las letras entre paréntesis que coinciden con los orbitales descritos por las funciones que se combinan con los orbitales reales.[7]

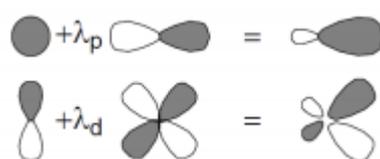


Figura 6. Efecto de las funciones de polarización

## 6.2. FUNDAMENTOS DE LA ESPECTROSCOPIA DE ROTACION [24,25].

A la hora de realizar determinación de estructuras de moléculas de cierto tamaño, una de las técnicas más robustas que existen es la espectroscopía en la región de microondas o también conocida como espectroscopía de rotación. Esta técnica permite diferenciar entre las numerosas conformaciones distintas que pueda tener una molécula dada. El único requerimiento para que una molécula se pueda estudiar en espectroscopía de rotación es que su momento dipolar sea no nulo. Las transiciones que se observan una vez obtenido el espectro rotacional de una molécula, se relacionan directamente con la absorción o emisión de energía de las moléculas cuando modifican sus niveles de energía. De hecho, ya que se trata de una interacción radiación materia, se inducen cambios en los niveles de rotación de la molécula, de forma que cuando se incide una radiación con una energía  $h \cdot \nu$ , el valor de esta energía coincide con la separación energética entre dos niveles (condición de resonancia de Planck-Bohr). Los valores propios del Hamiltoniano adecuado que definen los niveles de energías vienen dados por combinación lineal de las denominadas constantes rotacionales, A, B y C, que se obtienen mediante la siguiente expresión:

$$A, B, C = \frac{h}{8\pi^2 I_{a,b,c}}$$

Donde  $h$  se trata de la constante de Planck. Se observa que estas constantes rotacionales son inversamente proporcionales a los momentos de inercia de los adecuados ejes arbitrarios. Estos ejes se corresponden con la división de la molécula en las tres dimensiones del espacio, y en función de su longitud se puede realizar una clasificación de las moléculas. Estos momentos de inercia se pueden obtener mediante una ecuación obtenida a partir de:

$$I_{a,b,c} = \sum m_i r_i^2$$

Teniendo  $m_i$  como la masa de cada átomo y  $r$  la distancia desde el átomo al eje correspondiente. Conociendo estos parámetros, que para cada molécula son únicos y específicos, se puede realizar una predicción relativamente precisa de donde se van a obtener las transiciones en el espectro, así como el rango de frecuencias donde serán más intensas.

Esta intensidad de las transiciones está estrechamente relacionada con el momento dipolar de la molécula. Como ya se ha comentado anteriormente, ha de ser no nulo para que la molécula sea activa en espectroscopía de microondas. La relación entre intensidad de la transición y el momento dipolar viene dada por la integral momento de transición, definida en la siguiente expresión:

$$\langle \psi_1 | \mu_{a,b,c} | \psi_2 \rangle$$

Donde se representan como  $\psi_x$  las funciones de onda de los estados de partida y llegada de la transición.

Sin embargo, no todas las transiciones son posibles, por lo que existe un criterio para establecer las que si lo están basado en las reglas de selección. Se cumple que el producto de la representación irreducible de la integral momento de transición contiene la especie totalmente simétrica. Las reglas de selección pueden describirse por la variación en los números cuánticos del momento angular, J, y la proyección del momento angular sobre el eje z de la molécula, K:

$\Delta J = -1, 0, 1$  proporcionando así las ramas P, Q o R respectivamente.

Dentro de los tipos de transiciones, también existen una serie de reglas de selección [26]:

- Tipo a:  $\Delta K_a = 0, \Delta K_c = \pm 1$
- Tipo b:  $\Delta K_a = \pm 1, \Delta K_c = \pm 1$
- Tipo c:  $\Delta K_a = \pm 1, \Delta K_c = 0$

De esta forma, se puede predecir el espectro rotacional de una molécula y realizar una primera asignación de las transiciones en función de su tipo ya que dependen de la proyección del momento dipolar a lo largo de los respectivos ejes. Además, el conjunto de transiciones permitidas que cumplan estas reglas de transición pueden dar lugar a patrones reconocibles que faciliten la asignación de las transiciones en función de su tipo.

Recogiendo todos estos datos, se puede obtener una cantidad de información importante que posibilita la identificación y/o confirmación de los diferentes conformeros de una molécula y su caracterización estructural.

### **6.3. FUNDAMENTOS EXPERIMENTALES [24,25,27]**

Dentro de la espectroscopía de rotación hay diferentes técnicas que pueden ser utilizadas para obtener el espectro. Aunque este TFM no contiene ninguna labor instrumental, se ha creído conveniente resaltar los aspectos más relevantes de algunas técnicas para poder entender los parámetros a obtener en este trabajo. Para esta molécula a la hora de llevar a cabo la experimentación, se han de conocer la instrumentación disponible en el GEM:

#### **6.3.1 JETS SUPERSÓNICOS**

Con el paso de los años se han diseñado diferentes técnicas en esta línea de trabajo, y hoy en día se ha extendido el uso de jets supersónicos. En el jet se produce una expansión adiabática de un gas portador, usualmente un gas noble como neón o helio, frente al alto vacío al que se somete al interior del tanque, conectados mediante un orificio o *nozzle*. Con este proceso denominado expansión supersónica, el paso del gas de alta presión a la baja presión del tanque consigue obtener un enfriamiento de las moléculas de la muestra, introducida en pequeña proporción con el gas portador, reduciendo sus grados de libertad traslacionales, rotacionales y vibracionales [8]. En este punto se obtiene una mayor población del nivel fundamental que aumenta la intensidad de las transiciones y simplifica los espectros. Además, las condiciones dentro del jet son idóneas para la posible aparición de *clusters* moleculares.

Debido a las propiedades de la expansión supersónica, únicamente se poblarán los conformeros más estables, los cuales serán el foco principal de este trabajo.

#### **6.3.2 ABLACIÓN LÁSER**

El único inconveniente que presenta este tipo de instrumentación es la necesidad de trabajar en fase gas, por lo que muchas de las muestras tienen que ser vaporizadas correctamente. La mayoría de las biomoléculas tienen una presión de vapor demasiado baja, por lo que vaporizarlas no es sencillo, debido a su inestabilidad térmica o incluso su degradación al aplicarles distintos métodos de calefacción. Para solucionar este problema, en los últimos años, se ha desarrollado un acoplamiento entre jets supersónicos y un proceso previo a la

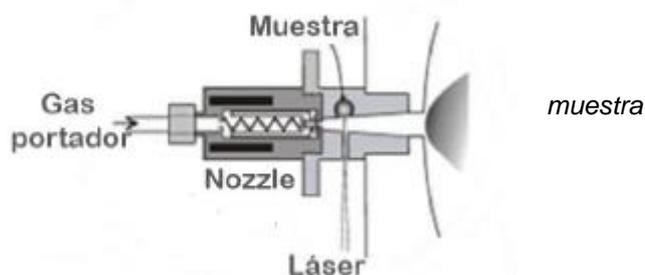
introducción de la muestra de ablación láser. Mediante el uso de un láser de Nd-YAG de picosegundos se vaporiza la muestra mediante el uso de radiación haciendo que una serie de moléculas pasen a fase gas sin deteriorar o descomponer químicamente el compuesto a analizar.

La vitamina B5 tiene un punto de fusión de 183.8 °C por lo que en el futuro será necesario el empleo de la ablación láser.

### 6.3.3 TÉCNICAS BASADAS EN LA TRANSFORMADA DE FOURIER

En el grupo de investigación GEM se han desarrollado dos técnicas de espectroscopía de rotación bien diferenciadas, el espectrómetro denominado como “Laser Ablation Chirped Pulse Fourier Transform Microwave” (LA-CP-FTMW) por un lado, y por otro un sistema conocido como “Laser Ablation Molecular Beam Fourier Transform Microwave” (LA-MB-FTMW). Ambos han demostrado ser muy útiles en el análisis conformacional de biomoléculas y utilizan la transformada de Fourier para poder recoger los espectros en el dominio de la frecuencia.

Figura 7. Sistema de introducción de al jet con ablación láser.



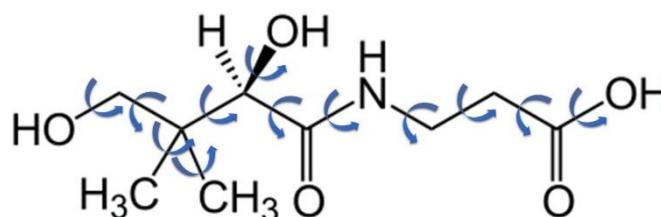
Hay que destacar las diferencias entre el espectrómetro LA-CP-FTMW que permite estudiar rangos bastante amplios buscando muchas transiciones y diferentes tipos de conformeros en un mismo espectro rotacional. En casos en los que se requiriese de mayor precisión o sensibilidad, en especial en aquellas especies químicas que tienen núcleos de nitrógeno, el siguiente paso sería usar el espectrómetro LA-MB-FTMW, sistema de mayor resolución, con el fin de obtener también los parámetros de la estructura hiperfina.

En este trabajo se obtendrán las estructuras más relevantes y, como se ha dicho arriba, se seleccionarán las más estables. De estas estructuras, se extraerán los valores de las constantes rotacionales las cuales nos permitirán conocer la zona espectral de interés, además de los momentos dipolares que han de ser no-nulos. Además, estos valores junto con las reglas de selección nos permitirán entrever si podremos realizar una distinción de los conformeros. Si esta distinción no fuese posible, en los experimentos futuros se requerirá de la técnica LA-MB-FTMW por lo que en este trabajo se calcularán los valores de las constantes de cuadrupolo también.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 BÚSQUEDA CONFORMACIONAL

Como se ha mencionado anteriormente, el presente trabajo se centra en la biomolécula de la vitamina B5. Su fórmula molecular es  $C_9H_{17}NO_5$  y tiene 31 átomos en total. A la hora de reorganizarse en tres dimensiones, se espera un número elevado de conformeros debido a la gran cantidad de enlaces simples que se pueden observar en su estructura, que le otorga una gran flexibilidad.



**Figura 7.** Todas las posibles torsiones de la estructura de la molécula de la vitamina B5.

Debido a esto, se ha recurrido en primer lugar a métodos de mecánica molecular para dilucidar las estructuras posibles que puede adoptar la molécula en base a todas las torsiones descritas en la Figura 7.

En primer lugar, se realiza la construcción de la molécula mediante el programa Maestro de Schrödinger [28], pudiendo visualizar las torsiones de la molécula que se han reflejado en la Figura 7. Se lanza un cálculo empleando métodos de mecánica molecular, concretamente el descrito anteriormente como campo de fuerzas de Merck (MMFF) con una energía umbral de 30 KJ/mol por encima del cual ya no se tendrán en cuenta las estructuras por inestabilidad. De esta forma se obtuvieron un total de 150 conformeros que, una vez finalizada la búsqueda, se obtienen como ficheros diferenciados en los que se describen las coordenadas de los átomos, parámetros relativos a la energía y características propias de cada uno de los conformeros.

A continuación, se utilizará otro programa, el Gaussian 16 [29], para realizar la optimización de las estructuras mediante cálculos mecanocuánticos. Primeramente se optimizaron las estructuras mediante un nivel de cálculo DFT, con el funcional B3LYP y la base de cálculo 6-311++G(d,p). Tras la optimización, el número de estructuras se reducen a un total de 119 estructuras diferentes. Esto significa que, de las 150 originales obtenidas por mecánica molecular, 31 estructuras han convergido a otras iguales.

La Tabla 1 recoge los parámetros más relevantes de las 10 estructuras más estables, cuyas estructuras e interacciones intramoleculares se describen a continuación.

**Tabla 1.** Parámetros rotacionales calculados teóricamente y energías relativas correspondientes a los 10 confórmeros más estables de la vitamina B5. Todos los cálculos se han realizado a nivel B3LYP/6-311++G(d,p).

ESTRUCTURA	4	118	7	31	130	143	59	27	150	52
CONFÓRMERO	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
A(MHz)	1003	993	894	944	889	969	857	1019	1197	1032
B(MHz)	391	412	417	409	358	480	407	347	288	317
C(MHz)	346	387	348	333	343	449	356	289	265	289
$\mu_A$ (D)	3.35	2.72	4.65	3.63	3.14	0.96	1.44	5.01	2.10	0.41
$\mu_B$ (D)	0.48	0.44	2.19	2.00	0.82	1.95	2.42	2.21	2.28	2.23
$\mu_C$ (D)	0.18	0.24	0.72	0.43	1.71	0.40	0.37	1.39	0.80	0.82
$\chi_{aa}$	2.4644	2.5551	2.1816	2.4725	2.2571	2.5435	2.038	2.0967	0.7579	0.4256
$\chi_{bb}$	-2.5217	-2.7582	-0.5058	-0.2132	-0.4289	-2.4763	-0.5926	0.4426	1.4956	1.2856
$\chi_{cc}$	0.0573	0.203	-1.6758	-2.2593	-1.8282	-0.0672	-1.4455	-2.5393	-2.2535	-1.7112
$\Delta E$ (cm <sup>-1</sup> )	0	33	334	470	804	463	895	873	950	973
$\Delta E_{ZPE}$ (cm <sup>-1</sup> )	0	79	165	463	590	637	656	673	690	691
$\Delta G$ (cm <sup>-1</sup> )	2	285	149	383	211	1342	434	546	245	339

A, B y C son las constantes rotacionales medidas en MHz.  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  se corresponden con los valores de las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debyes (recordar que  $1 D \approx 3.33564 \cdot 10^{-34} C \cdot m$ ).  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son los elementos de la diagonal principal de la matriz tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear.  $\Delta E$  representa la energía relativa.  $\Delta E_{ZPE}$  se trata de la energía relativa incluyendo la ZPE. Por último, la  $\Delta G$  es la energía libre de Gibbs calculada a 298 K. Todas las energías están expresadas en cm<sup>-1</sup>.

## 6.2. ANÁLISIS ESTRUCTURAL

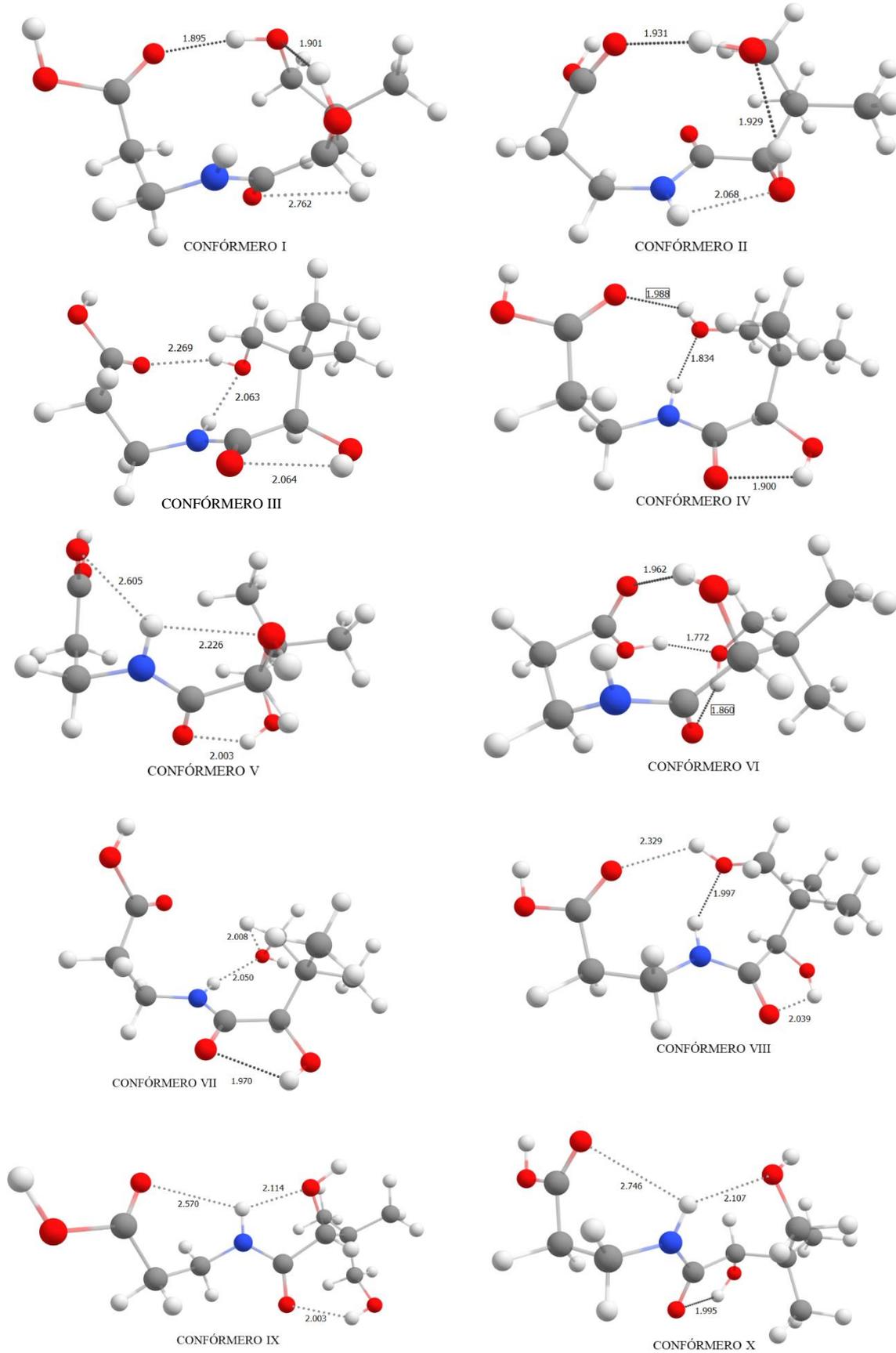
La Figura 8 muestra las estructuras de los diez confórmeros más bajos en energía, junto con las interacciones intramoleculares y sus respectivas distancias de enlace. Se observa que entre los confórmeros más estables se pueden diferenciar algunas estructuras en función del número de enlaces de hidrógeno que se pueden desarrollar entre los átomos electronegativos y los diferentes átomos de hidrógeno de la molécula.

Los enlaces de hidrógeno, como es sabido, son enlaces de índole electrostático entre un átomo electronegativo y un átomo de hidrógeno unido a su vez a otro átomo electronegativo. En función de las distancias entre los átomos que forman este enlace, estos enlaces de hidrógeno serán más o menos débiles.

Los confórmeros I y II son muy similares y se ven estabilizados por una secuencia de enlaces de hidrógeno OH...OH...O=C, , con unas distancias de enlace en los enlace menores a 2 amstrongs. Estos enlaces son entonces relativamente fuertes confiriendo una alta estabilidad al confórmero. Adicionalmente, el grupo amina interacciona débilmente con el hidróxilo, además de que la cetona interacciona muy débilmente con un CH. La suma de todas estas interacciones hace que los confórmeros I y II se estabilicen enormemente.

En cuanto al confórmero III, es similar a los confórmeros anteriores pero la amina ocupa el lugar del primer hidroxilo dando una secuencia de enlaces de hidrógeno NH...OH...O=C. Ahora, es el grupo hidroxilo sobrante interacciona con el grupo CO. Todas estas interacciones confieren una alta estabilidad al confórmero quedando solamente a 150 cm<sup>-1</sup> por encima del mínimo global.

El resto de los confórmeros bien poseen enlaces de hidrógeno menos direccionales, menos enlaces de hidrógeno, además de impedimentos estéricos desestabilizando las estructuras.

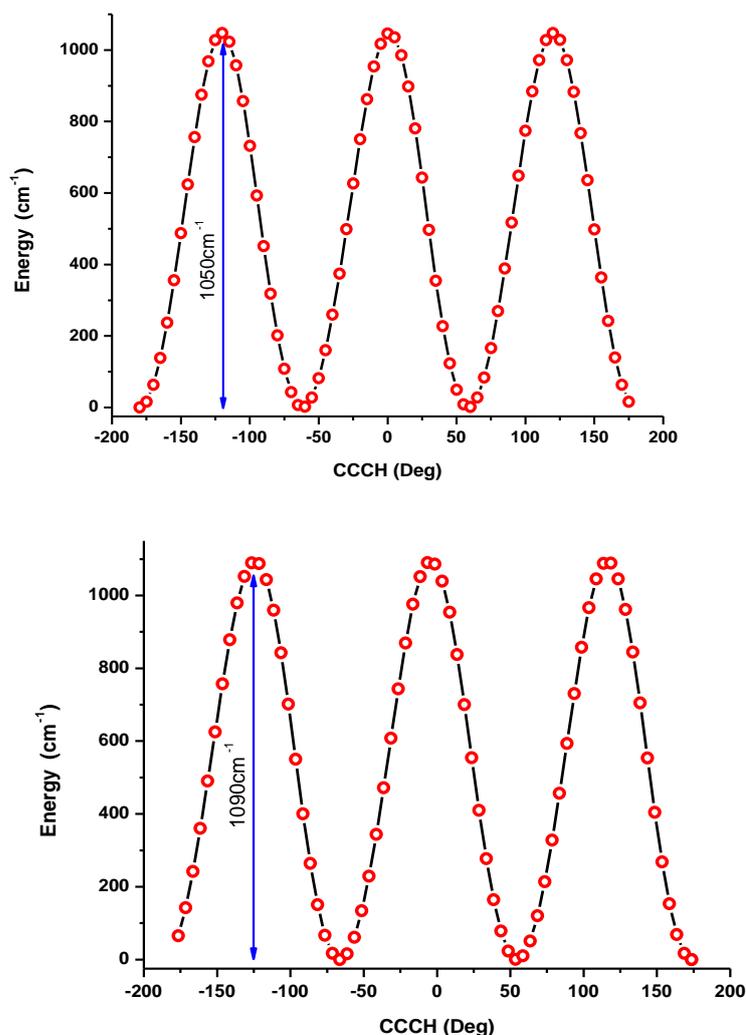


**Figura 8.** Estructura de los diez confórmers más estables de la vitamina B5, optimizadas mediante métodos DFT, haciendo uso del funcional B3LYP.

### 6.3. ROTACIÓN INTERNA [31]

Otro factor adicional que no hemos de olvidar es la presencia de una posible rotación interna debido a la rotación de los grupos metilos. Cada hidrógeno puede adoptar una posición equivalente a la de los otros, de forma que habría tres mínimos equivalentes. Esto da lugar a una función de energía potencial en tres partes, con tres mínimos y tres máximos equivalentes. Como la barrera de potencial es suficientemente pequeña, la rotación da lugar a desdoblamiento hiperfino en el espectro de rotación. Los niveles rotacionales se dividen en un nivel no degenerado de componente A y un nivel doblemente degenerado de componente E [32].

Para estimar la altura de la barrera se realizó un estudio de la superficie de energía potencial relajada (PES). La PES proporciona la energía de la molécula al producirse la torsión del grupo metilo. Como puede verse en la Figura 9, la altura de las barreras de cada metilo de la vitamina B5 es de 1050 y 1090  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Como dato indicativo, la rotación interna se produce cuando la altura de la barrera es inferior a unos 300-400  $\text{cm}^{-1}$ . Por tanto, la barrera obtenida es demasiado alta y no se prevee un desdoblamiento de las transiciones rotacionales.



**Figura 9.** Superficie de energía potencial de la rotación de los metilos de la vitamina B5.

#### **6.4. FACTIBILIDAD EXPERIMENTAL**

En primer lugar, analizaremos la posibilidad de realizar una futura labor experimental mediante un experimento de LA-CP-FTMW.

- En primer lugar, la vitamina B5 es un sólido con un punto de fusión de 183.8 °C. Por ello, será fundamental el empleo de la ablación láser. Además, debido al elevado número de enlaces la fragmentación podría ser masiva por lo que el uso de un láser de picosegundos dará mejores resultados [30].

- Como puede verse en los valores de las energías relativas calculados mediante DFT y mostrados en la Tabla 1, tendremos tres estructuras por debajo de 500 cm<sup>-1</sup>, que serán las especies predominantes tras la expansión supersónica. Además, estas tres especies no difieren mucho en cuanto a la energía relativa, por lo que se espera tener una proporción considerable de las tres. Los cálculos a nivel MP2 están de acuerdo con este hecho por lo que se confirma la posible presencia de tres conformeros principales. Estos datos se pueden observar en la Tabla 3 del Anexo.

- Las constantes rotacionales de las estructuras predominantes son considerablemente distintas entre los distintos conformeros, por lo que serán suficientes para su identificación. Es decir, el uso del LA-MB-FTMW en principio, no será necesario.

- Las reglas de selección indican que todos los conformeros relevantes podrán interactuar con la radiación electromagnética. Es decir, los momentos dipolares son no nulos. Además, los valores son considerablemente altos por lo que se espera que las transiciones sean intensas.

- Todos los conformeros presentan un momento dipolar alto en la componente *a*. Esto es un aliciente puesto que este tipo de transiciones presentan los patrones más sencillos de localizar (ver más abajo).

- La altura de la barrera de la rotación de los metilos es considerablemente alta y no se espera el fenómeno de la rotación interna, lo cual complicaría la asignación experimental además de hacer que las transiciones sean más débiles al dividirse en dos componentes. Por ello, este es otro punto a favor de la realización de un experimento futuro.

- El espectrómetro LA-CP-FTMW más conveniente a la hora de realizar el experimento será en la zona de 2-8 GHz debido a las bajas constantes rotacionales.

Con todo ello, la posibilidad de obtener un espectro rotacional con éxito, además de poder identificar los conformeros más estables es muy alta. Esta información es muy importante debido al coste de la muestra (en torno a 500 euros para un único experimento).

## 6.5. PREDICCIÓN DEL ESPECTRO EXPERIMENTAL

Finalmente, a la hora de realizar el experimento mediante la instrumentación adecuada es conveniente tener realizadas una serie de predicciones de los confórmeros más abundantes que en un principio serían los más probables de visualizar. Gracias a estas simulaciones, la asignación de señales y la búsqueda de patrones se convertirá en una tarea relativamente más sencilla.

A la hora de realizar la simulación se seleccionan los tres confórmeros más estables, que por ende serán los más poblados y abundantes. Se han utilizado los datos rotacionales obtenidos mediante los métodos DFT, mediante el uso del funcional B3LYP. Los parámetros rotacionales más relevantes de la anterior Tabla 1 se rescatan y se recogen en la Tabla 2 para una mayor facilidad de seguimiento del trabajo.

**Tabla 2.** Parámetros rotacionales de los confórmeros más estables del ácido pantoténico calculados por métodos DFT con el funcional B3LYP.

CONFÓRMERO	I	II	III
A(MHz)	1003	993	894
B(MHz)	391	412	417
C(MHz)	346	387	348
$\mu_A$ (D)	3.35	2.72	4.65
$\mu_B$ (D)	0.48	0.44	2.19
$\mu_C$ (D)	0.18	0.24	0.72

A, B y C son las constantes rotacionales medidas en MHz.  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  se corresponden con los valores de las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debyes ( $1 D \approx 3.33564 \cdot 10^{-34} C \cdot m$ ).

Vistos estos parámetros, se abre una perspectiva muy interesante en cuanto a espectroscopía de rotación se refiere, ya que el ácido pantoténico, al igual que la mayoría de moléculas, se trata de un trompo asimétrico, cuyo orden de los momentos de inercia sigue el patrón  $I_A < I_B < I_C$ .

El cálculo de niveles de rotación de este tipo de moléculas no es un asunto trivial, ya que hay que realizar un tratamiento mediante el cual se puede aproximar el rotor asimétrico a cualquiera de los dos trompos simétricos (oblate ( $I_A \approx I_B < I_C$ ) o prolata ( $I_A < I_B \approx I_C$ )) con el fin de cuantificar lo cerca o lejos que se encuentran de la simetría, calculándose mediante el parámetro de asimetría de Ray.

$$K = \frac{2B - A - C}{A - C}$$

Mediante esta expresión se pueden establecer los límites oblate y prolata en función del valor de  $K$ , ya que para moléculas oblate, sabiendo que  $A = B > C$ , se obtiene un valor de  $K$  de 1, mientras que para moléculas tipo prolata, teniendo en cuenta que  $A > B = C$ , el valor de  $K$  sería de -1.

Mediante esta descripción, los niveles de energía de todo rotor asimétrico están descritos por un único valor de  $J$  y dos valores de  $K$  relativos a los límites prolata y oblate,  $K_{-1}$  y  $K_1$

Realizando los cálculos con los datos obtenidos, se tienen los siguientes valores para los confórmeros a simular:

Confórmero I: -0.86

Confórmero II: -0.92

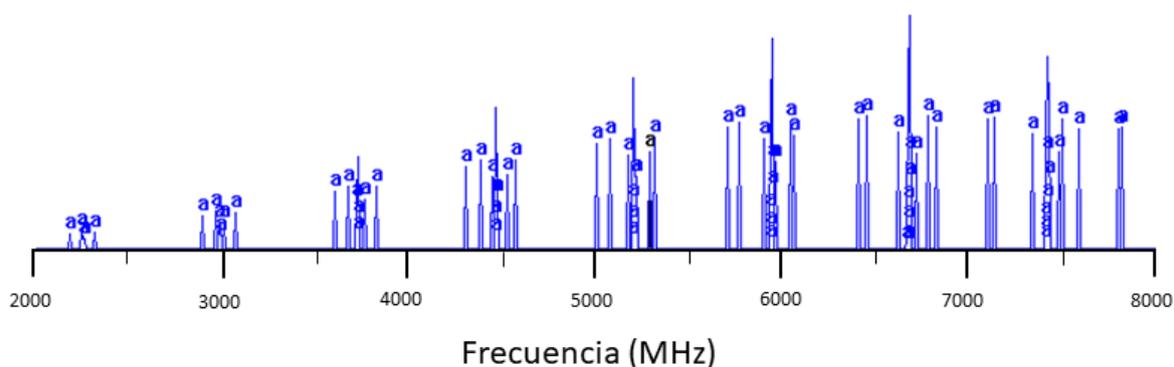
Confórmero III: -0.55

Que nos indican que los dos primeros confórmeros son muy cercanos a trompos tipo prolata, mientras que el último se aleja un poco más del límite, aunque sigue siendo prolata.

A la hora de abordar las simulaciones, se ha decidido hacer una simulación computacional de cada uno de los confórmeros por separado, seleccionando en ciertas ocasiones algunas transiciones concretas.

### - CONFÓRMERO I

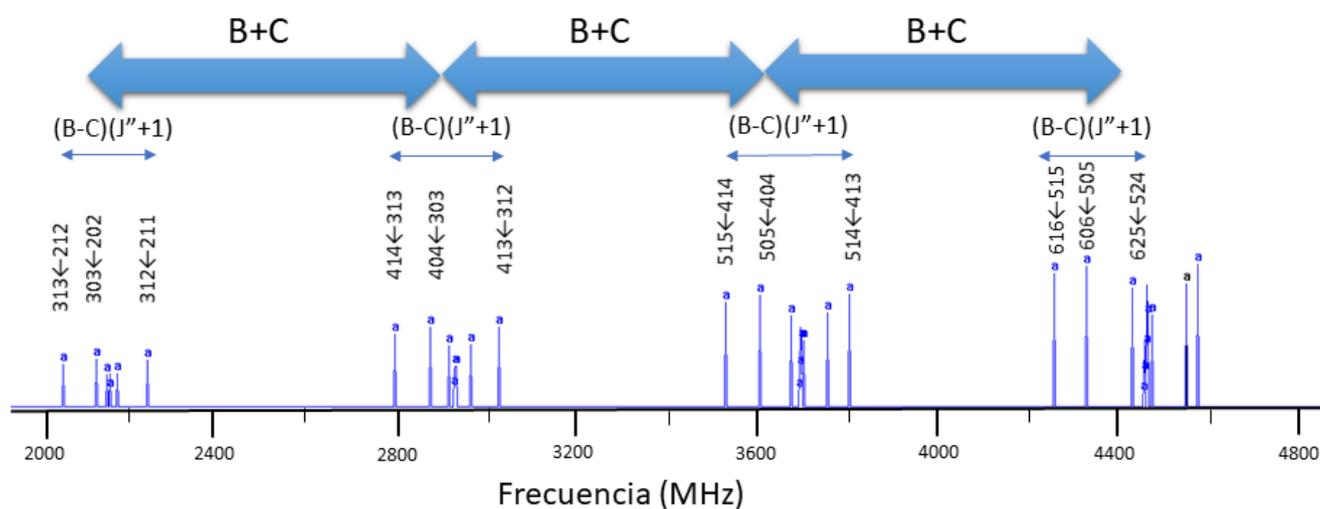
Atendiendo a los momentos dipolares, el confórmero I tiene un momento dipolar alto en el eje a. Así, su espectro rotacional tendrá una relativamente fácil asignación de las transiciones rotacionales. El espectro predicho para las transiciones de tipo a se muestra a continuación en la Figura 10:



**Figura 10.** Predicción del espectro rotacional de las transiciones tipo a del confórmero I de la vitamina B5 en la zona de 2000-8000 MHz.

A la hora de llevar a cabo la experiencia en el laboratorio y como ya se ha mencionado antes, se observa en las predicciones que las transiciones más intensas pueden encontrarse en la región de 2000 a 8000 MHz dentro del espectro de frecuencias, por lo que se puede realizar el experimento en el instrumento LA-CP-FTMW del que se dispone en el GEM.

Se pueden observar perfectamente los patrones de las transiciones tipo a, ya que se tratan de una serie de patrones separados por una distancia aproximadamente igual a la suma de las otras constantes rotacionales ( $B + C$ ), tal y como se muestra en la Figura 11. En caso de realizar el experimento, este confórmero sería fácilmente asignable debido a esas distancias aproximadamente fijas que son conocidas.



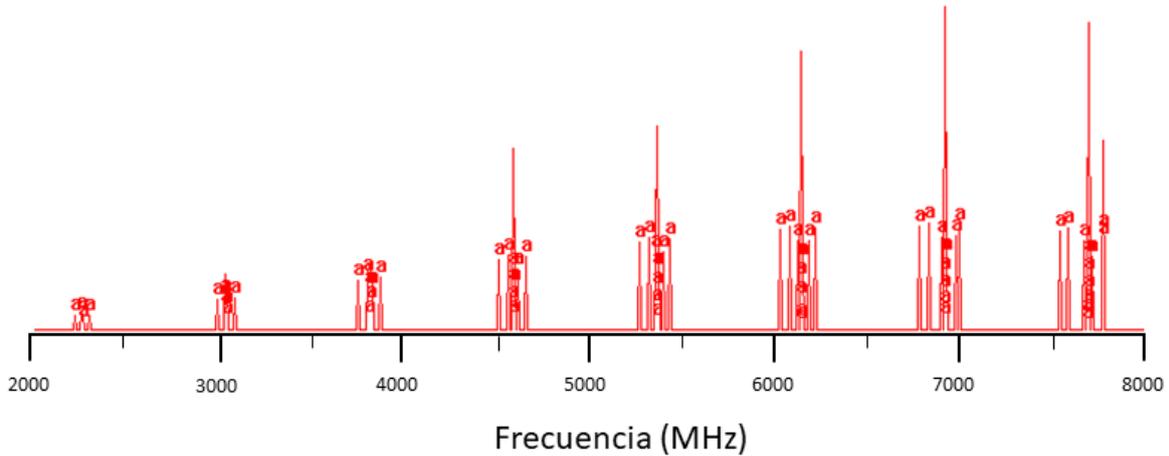
**Figura 11.** Asignación de algunas transiciones tipo *a* del espectro rotacional del conformero *I* de la vitamina B5 en una ampliación entre 2000 y 4800 MHz

Se confirman los patrones tipo *a*, separados por  $\sim 737$  MHz ( $B + C$ ), que serían fácilmente reconocibles una vez llevada a cabo la experiencia mediante el *software* adecuado para realizar la asignación.

Debido a la sencillez del patrón tipo *a* y la mayor población esperada, se comenzaría a buscar este conformero. Si se encontrase, se confirmaría el éxito del experimento y se quitarían las líneas asignadas del espectro original para simplificar la búsqueda del segundo conformero.

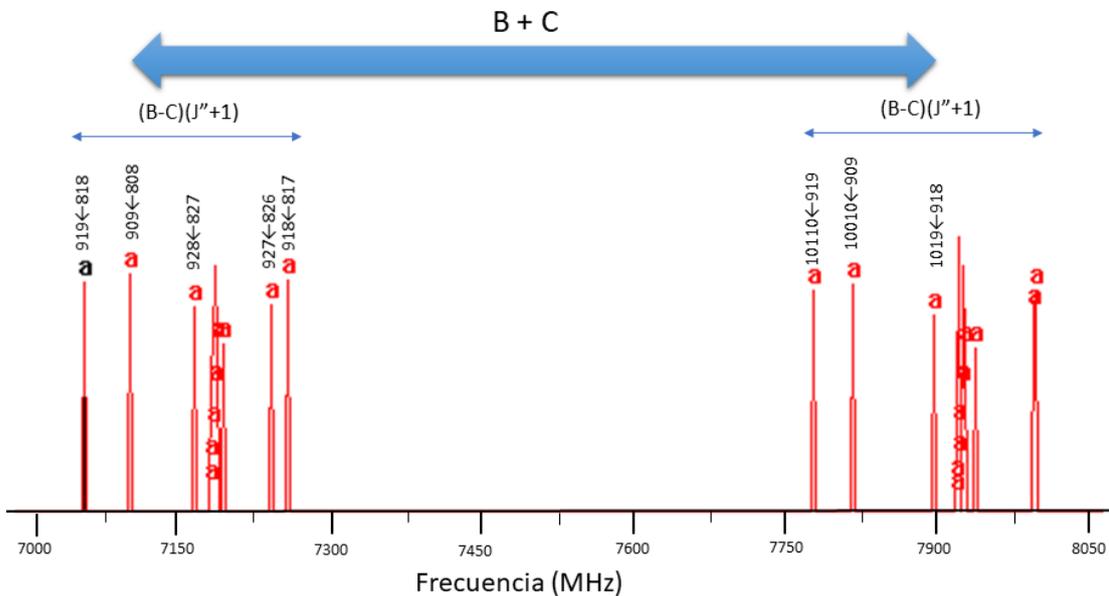
- **CONFÓRMERO II**

Al igual que en el caso del confórmero anterior, se observa que los momentos dipolares del confórmero II pronostican una mayor facilidad de asignación a las transiciones tipo a debido a su *a priori*, mayor intensidad. Así, se ha realizado también la predicción única de las transiciones tipo a cuyo espectro calculado se muestra en la Figura 12.



**Figura 12.** Predicción del espectro rotacional de las transiciones tipo a del confórmero II de la vitamina B5 en la zona de 2000-8000 MHz.

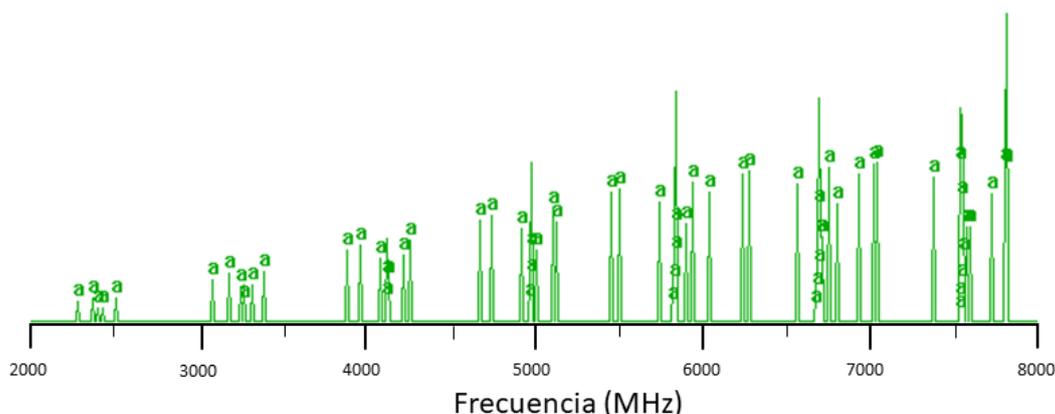
Al igual que en el caso del primer confórmero, se observan unos patrones tipo a muy definidos, separados una distancia de 799 MHz, similar a la suma de *B + C* y como se muestra en la Figura 13, por lo que se podría realizar también la asignación.



**Figura 13.** Asignación de algunas transiciones tipo a del espectro rotacional del confórmero II de la vitamina B5 en una ampliación entre 7000 y 8000 MHz

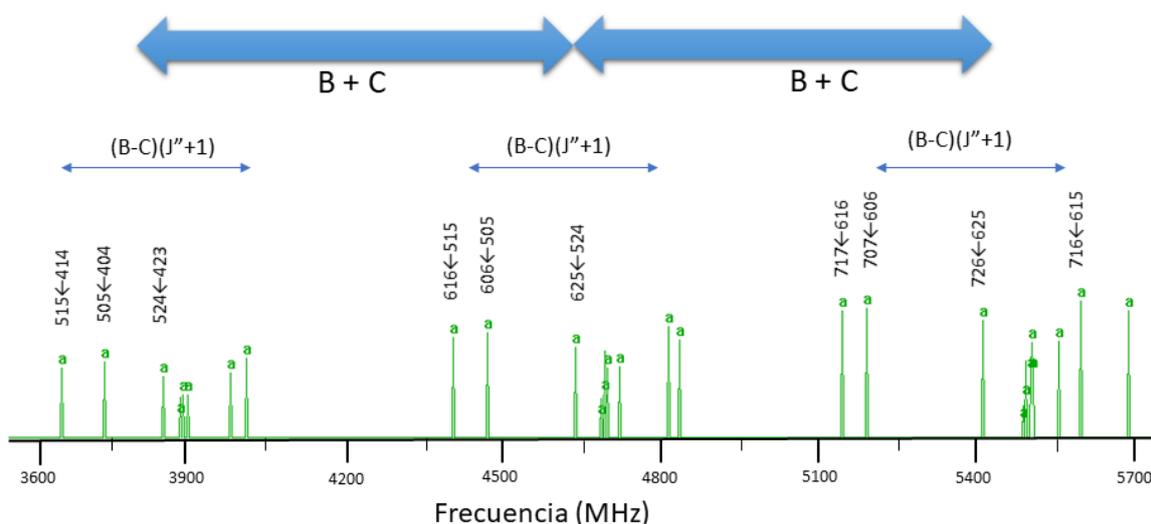
- **CONFÓRMERO III**

A diferencia de los anteriores confórmers, en este caso se presentan momentos dipolares significativos en *a* y *b*. Debido a esto, se obtiene una dificultad añadida a la hora de realizar la asignación. En cualquier caso, nuevamente se comenzaría buscando el patrón de tipo *a* tal y como se muestra en la Figura 14.



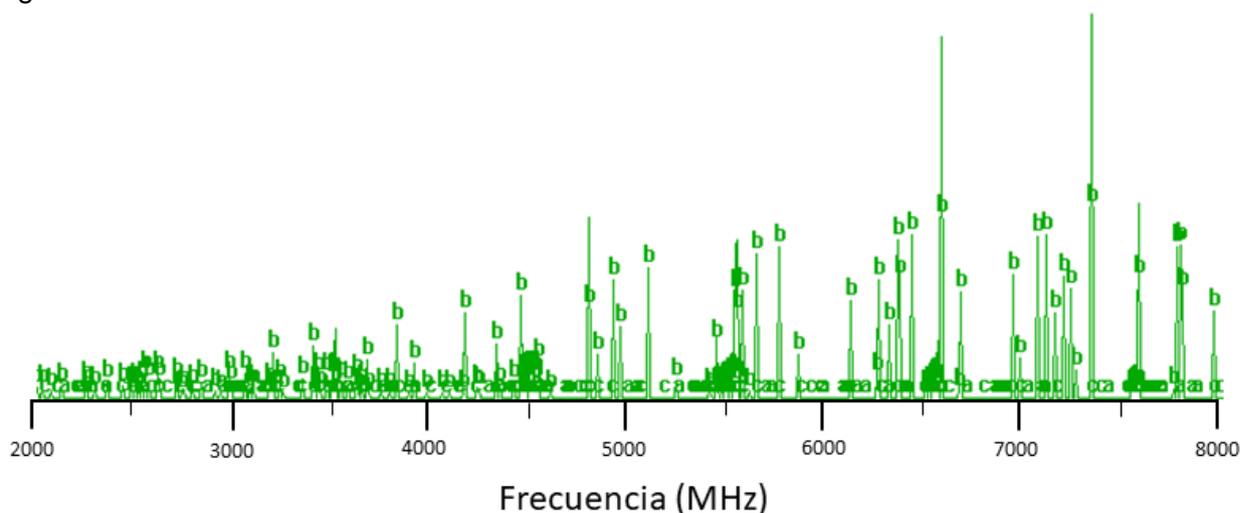
**Figura 14.** Predicción del espectro rotacional de las transiciones tipo *a* del confórmero III de la vitamina B5 en la zona de 2000-8000 MHz.

Debido a la facilidad para encontrar los patrones de transiciones tipo *a*, sería oportuno comenzar la asignación con ese tipo de transiciones, prosiguiendo una vez asignadas con las *b*, tal y como se muestra en la Figura 15. El patrón de tipo *a* se corresponde con la suma de *B* + *C*, 765 MHz.



**Figura 15.** Asignación de algunas transiciones tipo *a* del espectro rotacional del confórmero III de la vitamina B5 en una ampliación entre 3600 y 5700 MHz

Aunque sean fácilmente reconocibles, las transiciones de tipo *a* estarán entremezclados con transiciones de tipo *b*, que serán cuatro veces menos intensas. El espectro rotacional del conformero III teniendo en cuenta únicamente las transiciones de tipo *b* se muestra en la Figura 16.



**Figura 16.** Predicción del espectro rotacional de las transiciones tipo *b* del conformero III de la vitamina B5 en la zona de 2000-8000 MHz.

En caso de haber eliminado de un futuro espectro experimental las líneas correspondientes a los tres primeros conformeros y se sigan viendo transiciones lo suficientemente intensas, se procedería también con la asignación de conformeros de menor estabilidad.

## **6.6. RELACIÓN ESTRUCTURA-PROPIEDAD**

A pesar de que relacionar las estructuras obtenidas de forma aislada con las reacciones que ocurren en fases condensadas es difícil, se realizará una posible interpretación de los resultados obtenidos.

Las estructuras más estables poseen el grupo hidróxilo terminal cercano a los metilos fuertemente enlazado. Como habíamos dicho anteriormente, una de las interacciones más estabilizantes es el refuerzo de la secuencia  $\text{OH}\cdots\text{OH}\cdots\text{O}=\text{C}$ , quedando este hidroxilo terminal en medio de esta cadena, fuertemente protegido. Efectivamente, el primer paso para la síntesis de la CoA a partir de la vitamina B5 es fosforilar este hidróxilo. Curiosamente, se necesita una encima para poder llevar a cabo dicha fosforilación, posiblemente debido a la imposibilidad de que este hidroxilo reaccione con su entorno. Es más, el hidróxilo terminal del lado opuesto es el que queda sin interacción en las estructuras más estables y sería el grupo a atacar si la reacción no se llevara a cabo mediante una encima.

Con todo ello, es muy posible que en fases condensadas el primer paso sea “romper” esa fuerte unión para poder fosforilar el hidróxilo deseado y no el opuesto, lo que daría lugar a otra serie de reacciones no deseadas.



## 7. CONCLUSIONES

Se ha realizado una búsqueda conformacional del ácido pantoténico, obteniendo 150 estructuras diferentes por debajo de 31 KJ/mol. De los conformeros obtenidos se han estudiado más en profundidad los diez más estables. La menor energía de estos conformeros respecto del resto de estructuras se debe a fuerzas dispersivas, presencia de enlaces de hidrógeno y ausencia de impedimentos estéricos de los grupos metilo presentes en la molécula.

Se ha ahondado, una vez obtenidos los cálculos y los diferentes conformeros, en la posibilidad de la existencia de una relación estructura-reactividad en cuanto a la importancia biológica del ácido pantoténico se refiere, como precursor de la Coenzima A, ya que la disposición del grupo hidroxilo de forma libre favorece la síntesis de la CoA.

Además, se tanteó la posible interconversión continua en medios biológicos de las dos estructuras más estables, en base a las distancias de los enlaces de hidrógeno y demás parámetros estructurales

Se ha utilizado como métodos de cálculo para el estudio computacional del ácido pantoténico, métodos DFT y *ab initio*, aunque los métodos MP2 correspondientes a estos últimos solo se realizaron para cinco estructuras debido al coste computacional y en materia de tiempo que suscitan. Dentro de los métodos DFT se ha utilizado el funcional B3LYP, que ha demostrado ser una herramienta eficiente en cuanto a tiempo se refiere y de coste computacional mucho más bajo que los métodos *ab initio*.

Por último, el principal objetivo de este trabajo era realizar un estudio sobre la viabilidad de una posible experimentación que pudiera llevarse a cabo con la instrumentación disponible en el GEM que, una vez expuestos todos los datos descritos anteriormente, se concluye de manera afirmativa.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Roger J. Williams, Carl M. Lyman, Goerge H. Goodyear, John H. Truesdail, Duncan Holaday. *Panhotenic Acid, A Growth Determinant of Universal Biological Occurrence*. *J. Am. Chem. Soc.* 1933, 55, 7, 2912–2927.
2. Roger J. Williams, Harry H. Weinstock, Ewald. Rohrmann, John H. Truesdail, Herschek K. Mitchell, Curtis E. Meyer. *Panhotenic Acid III. Analysis and Determination of Constituent Groups*. *J. Am. Chem. Soc.* 1939, 61, 2, 454–457
3. A G Hogan, L R Richardson. *Differentiation of the Antidermatitis Factor*. *Science*. 1936, 83, 17-8.
4. Thomas H. Jukes. *Panhotenic Acid and the Filtrate (Chick Anti-Dermatitis) Factor*. *J. Am. Chem. Soc.* 1939, 61, 975-976
5. Fritz Lipmann. *On Chemistry and Function of Coenzyme A*. *Bacteriology Reviews*. 1953, 17, 1–16.
6. Nathan O. Kaplan, Fritz Lipmann. *The Assay and Distribution of Coenzyme A*. *J Biol Chem*. 1948, 174, 37-44
7. Bunkoczi G, Pasta S, Joshi A, et al. *Mechanism and substrate recognition of human holo ACP synthase*. *Chem Biol*. 2007, 14, 1243-1253.
8. Donato H, Krupenko NI, Tsybovsky Y, Krupenko SA. *10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase requires a 4'-phosphopantetheine prosthetic group for catalysis*. *J Biol Chem*. 2007, 282, 34159-34166.
9. Strickland KC, Hoeflerlin LA, Oleinik NV, Krupenko NI, Krupenko SA. *Acyl carrier protein-specific 4'-phosphopantetheinyl transferase activates 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase*. *J Biol Chem*. 2010, 285, 1627-1633
10. Strickland KC, Krupenko NI, Dubard ME, Hu CJ, Tsybovsky Y, Krupenko SA. *Enzymatic properties of ALDH1L2, a mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase*. *Chem Biol Interact*. 2011, 191, 129-136.
11. Carlos cabezas, Marcelino Varela, Isabel Peña, Santiago Mata, Juan C. López, José L. Alonso. *The conformational locking of asparagine*. *Chem. Commun*. 2012, 48, 5934
12. C. Bermúdez, I. Peña, S. Mata and J. L. Alonso, *Sweet Structural Signatures Unveiled in Ketohexoses*, *Chem. - A Eur. J.*, 2016, 22, 16829–16837.
13. E. R. Alonso, I. León, L. Kolesniková and J. L. Alonso, *The Structural Signs of Sweetness in Artificial Sweeteners: A Rotational Study of Sorbitol and Dulcitol*, *ChemPhysChem*, 2018, 19, 3334–3340.
14. E. R. Alonso, *Biomolecules and interstellar molecules: structure, interactions and spectroscopic characterization*, Tesis Dr.
15. Isabel Peña, Adam M. Daly, Carlos Cabezas, Santiago Mata, Celina Bermúdez, Amaya Niño, Juan C. López, Jens-Uwe Grabow, José L Alonso. *Disentangling the Puzzle of Hydrogen Bonding in Vitamin C*. *J. Physic. Chem. Lett*. 2013, 4, 65-69.
16. T. Engel, P. Reid and W. Hehre, in *Química Física*, Pearson Educación S.A., 2006, pp. 597–656.
17. K. I. Ramachandran, G. Deepa and K. Namboori, *Computational Chemistry and Molecular Modeling*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008.
18. A. D. McNaught and A. Wilkinson, in *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, Research Triagle Park, NC, 2nd edn., 1997.
19. C. J. Cramer, *Essentials of Computational Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, 2004.

20. P. Hohenberg and W. Kohn, *Inhomogeneous Electron Gas*, Phys. Rev., 1964, 46, 864–871.
21. M. Bockstedte, A. Kley, J. Neugebauer and M. Scheffler, *Density-functional theory calculations for poly-atomic systems: electronic structure, static and elastic properties and ab initio molecular dynamics*, Comput. Phys. Commun., 1997, 107, 187–222.
22. Density Functional (DFT) Methods, <http://gaussian.com/dft>, (accessed 12 June 2021).
23. J. Foresman and Æ. Frisch, *Explor. Chem. with Electron. Struct. Methods*, 1996, 302.
24. J. L. Alonso and J. C. López, in *Encyclopedia of Signaling Molecules*, 2015, pp. 2–4.
25. P. Atkins and J. de Paula, *Química Física*, Editorial Médica Panamericana, 8th edn., 2008.
26. S. A. Cooke, P. Ohring. *Decoding Pure Rotational Molecular Spectra for Asymmetric Molecules*. J. Spec. 2012, 2013, 1-10
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, 267–275.
28. Maestro | Schrödinger, <https://www.schrodinger.com/maestro>, (accessed 1 July 2021).
29. Gaussian.com | Expanding the limits of computational chemistry, <https://gaussian.com/>, (accessed 4 July 2021).
30. Santiago Mata, Isabel Peña, Carlos Cabezas, Juan C. López, José Luis Alonso. *A Broadband Fourier-Transform Microwave Spectrometer with Laser Ablation Source: The Rotational Spectrum of Nicotinic Acid*. J. Mol. Spectroscopy. 2012, 280, 91-96.
31. C. C. Lin and J. D. Swalen, *Internal Rotation and Microwave Spectroscopy*, Rev. Mod. Phys., 1959, 31, 841–892.
32. V. D. G. Lister, J. N. Macdonald and N. L. Owen., *Internal Rotation and Inversion. An Introduction to Large Amplitude Motions in Molecules*. Academic Press, London 1978., *Angew. Chemie*, 1979, **91**, 450–451.

## 9. ANEXO

### OPTIMIZACIÓN DE LAS ONCE ESTRUCTURAS MÁS ESTABLES MEDIANTE MP2

**Tabla 3.** Parámetros rotacionales calculados teóricamente y energías relativas correspondientes a los 11 conformeros más estables de la vitamina B5. Todos los cálculos se han realizado a nivel MP2/6-311++G(d,p).

ESTRUCTURA CONFÓRMERO	7 I	4 II	118 III	130 IV	59 V	83 VI	52 VII	27 VIII	150 IX	31 X
A(MHz)	886	987	1011	870	862	1167	1027	1025	1169	953
B(MHz)	433	410	418	378	420	302	325	343	301	418
C(MHz)	363	367	391	366	362	280	298	290	279	340
$\mu_A$ (D)	4.26	2.89	2.47	2.84	1.47	3.50	0.27	4.25	1.71	3.35
$\mu_B$ (D)	2.15	0.62	0.51	0.34	2.56	1.81	2.26	2.60	2.30	1.99
$\mu_C$ (D)	0.57	0.44	0.15	2.06	0.11	0.38	0.78	1.77	0.94	0.54
$\chi_{aa1}$	1.9853	2.2491	2.4170	2.0751	1.9066	0.3091	0.2900	1.7515	0.4581	2.2758
$\chi_{bb1}$	-0.6745	-2.6481	-1.7303	-1.4822	-0.5570	1.3926	1.1624	0.5343	1.3746	-0.2091
$\chi_{cc1}$	-1.3108	0.3990	-0.6867	-0.5929	-1.3496	-1.7017	-1.4523	-2.2857	-1.8327	-2.0667
$\Delta E$ (cm-1)	97	0	123	473	679	712	835	806	841	785
$\Delta E_{ZPE}$ (cm-1)	0	41	193	360	506	615	638	669	733	810
$\Delta G$ (cm-1)	61	0	421	79	277	329	323	372	448	816

A, B y C son las constantes rotacionales medidas en MHz.  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  se corresponden con los valores de las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debyes (recordar que  $1 D \approx 3.33564 \cdot 10^{-34} C \cdot m$ ).  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son los elementos de la diagonal principal de la matriz tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear.  $\Delta E$  representa la energía relativa.  $\Delta E_{ZPE}$  se trata de la energía relativa incluyendo la ZPE. Por último, la  $\Delta G$  es la energía libre de Gibbs calculada a 298 K. Todas las energías están expresadas en  $cm^{-1}$ .