



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Estudio estructural de la N-acetilcisteína

Autor: Elena Rábano Pérez

Tutor/es: Iker León

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	5
2. INTRODUCCIÓN	6
2.1 Estrés oxidativo	6
2.2 N-acetilcisteína (NAC).....	7
2.2.1 NAC como antioxidante directo.....	8
2.2.2 NAC como antioxidante indirecto.....	9
2.2.3 NAC y la ruptura puentes disulfuro.....	10
2.3 Ventajas de NAC frente a cisteína	12
2.4 Papel de NAC frente al COVID	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. OBJETIVOS.....	15
5. METODOLOGÍA.....	17
5.1 Metodología computacional.....	17
5.1.1 Mecánica molecular	17
5.1.2 Métodos mecanocuánticos	23
5.2 Espectroscopía de rotación	32
5.2.1 Fundamentos.....	32
5.2.2 Expansión supersónica y ablación láser	34
5.2.3 Rotación interna	35
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1 Búsqueda conformacional	37
6.2 Análisis de las interacciones predominantes	39
6.3 Predicción del espectro	41
6.4 Tratamiento de la muestra y realización del espectro.....	42
6.5 Asignación del espectro.....	44
6.6 Comparativa de campos de fuerzas, niveles de teoría y bases de cálculo.	47
6.7 Estabilidad estructural de la NAC frente a la cisteína	49
7. CONCLUSIONES	51
8. BIBLIOGRAFÍA.....	52
9. ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ECUACIONES	56
10. ANEXOS	58
10.1 Resultados búsqueda conformacional.....	58
10.2 Comparativa niveles de cálculo	64

1. RESUMEN/ABSTRACT

En este trabajo de fin de grado se estudia el panorama conformacional de la N-acetilcisteína, un fármaco antioxidante comúnmente utilizado como mucolítico.

Mediante la utilización de métodos computacionales se buscan las estructuras más relevantes. Para comenzar, se identifican los posibles conformeros con mecánica molecular. A continuación, las estructuras se optimizan con métodos del Teorema del Funcional de la Densidad. Esto nos permite obtener las estructuras más estables y realizar la predicción de sus espectros de rotación, con los que poder comparar el espectro experimental, para proceder a su asignación.

Experimentalmente, se obtiene el espectro rotacional de la N-acetilcisteína y se encuentra una especie predominante, que se corresponde con el conformero predicho como más estable para la molécula. Finalmente, su estructura se compara con la de la cisteína para ver la diferencia entre ambos antioxidantes y así poder discutir si existe alguna correlación con el papel biológico tan dispar que ejerce cada una de estas moléculas.

Palabras clave: (Antioxidante, Química Computacional, Espectroscopia de Rotación, Conformeros)

ABSTRACT

In this project the conformational landscape of N-acetylcysteine, an antioxidant drug commonly used as a mucolytic, is studied.

Using computational methods, we search for the most relevant structures. To begin with, possible conformers are identified with molecular mechanics. The structures are then optimised using Density Functional Theorem methods. This allows us to obtain the most stable structures, and make a prediction of the rotational spectra, with which we can compare the experimental spectrum, in order to proceed to their assignment.

On the experimental side, the rotational spectrum of N-acetylcysteine is obtained, and a single species is found, which turns out to be the predicted most stable conformer. Finally, its structure will be compared with that of cysteine to evaluate potential differences between the two antioxidants, so to discuss any correlation with their drastic different biological role.

Keywords: (Antioxidant, Computational Chemistry, Rotational Spectroscopy, Conformers)

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Estrés oxidativo

Los radicales libres son átomos o moléculas altamente reactivos con uno o más electrones desapareados en su capa externa y pueden formarse cuando el oxígeno interactúa con ciertas moléculas. Estos radicales se pueden producir en las células al perder o aceptar un solo electrón, por lo que se comportan como oxidantes o reductores.¹

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio que favorece los sistemas oxidativos frente a los antioxidantes, lo que da lugar, sobre todo, a derivados tóxicos como especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Ambas son subproductos de varios procesos celulares, incluido el metabolismo aeróbico. Las ROS en concreto, son especies químicas oxigenadas como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilos ($OH^{\cdot-}$). Éstos aparecen como subproductos del metabolismo normal del oxígeno y, por tanto, desempeñan un papel importante en la comunicación entre las células.

El desequilibrio que favorece a los radicales libres frente a los antioxidantes es perjudicial para la salud humana. El estrés oxidativo provoca una generación excesiva de ROS, que se unen a varios componentes celulares, como el ADN (ácido desoxirribonucleico), el ARN (ácido ribonucleico), los lípidos y las proteínas, alterando el sistema de defensa antioxidante, la homeostasis redox, e interfiriendo con la señalización celular. En caso de estrés oxidativo, las células utilizan muchas moléculas antioxidantes agrupadas en sistemas enzimáticos y no enzimáticos a fin de regular el desequilibrio:

- Enzimáticos: existen tres grandes tipos de enzimas antioxidantes, como las superóxido dismutasas (SOD) las glutatión peroxidasas (GPxs), y las catalasas (CAT).
- No enzimáticos: el glutatión (γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina, GSH) es el más importante de los sistemas endógenos no enzimáticos. La función tiol de GSH le confiere un papel de agente reductor hacia ciertas ROS.²

2.2 N-acetilcisteína (NAC)

La N-acetilcisteína (NAC), es un precursor del glutatión reducido (GSH) derivado de la L-cisteína (Figura 1), conocido desde hace mucho tiempo por sus propiedades antioxidantes.

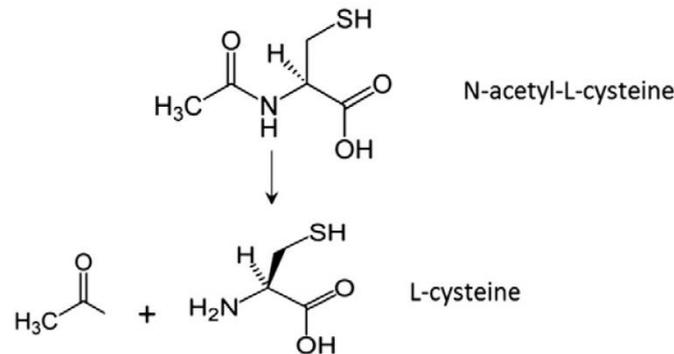


Figura 1. Desacetilación de la NAC para dar cisteína. Fuente: *A review on the possible molecular mechanism of action of N-acetylcysteine against insulin resistance and type-2 diabetes development.*

La NAC se compone de cisteína y un grupo acetilo unido al grupo amino. Es un polvo cristalino blanco con un olor ligeramente ácido y un sabor amargo. Es estable con luz ordinaria y temperaturas de hasta 120°C. Además, se conoce que ejerce sus efectos antioxidantes de múltiples formas.³ Uno de sus usos más habituales es su empleo en la prevención y el tratamiento adyuvante en afecciones con producción de moco espeso y tenaz, como neumonía, fibrosis quística, bronquitis crónica y complicaciones pulmonares posoperatorias, pues la NAC es un potente mucolítico. No solo es responsable de controlar el estado redox mediante la reposición de las reservas de tiol, sino que también es un precursor de cisteína, lo que lo convierte en un antioxidante duradero.³ A la amplia aplicación de la NAC se suma que, como molécula tiol, es bastante estable y está disponible comercialmente a bajo precio.

Esta molécula tiene además una variedad de beneficios clínicos, utilizándose para el tratamiento de la tos, la sequedad ocular y la influenza. También se usa comúnmente como un antídoto para la sobredosis de acetaminofén y como un medio para reducir la tolerancia a los nitratos. Este medicamento ha sido recomendado por la Organización Mundial de la Salud como antídoto en intoxicaciones desde la década de 1960. La NAC también es un ingrediente común que se encuentra en ciertos cosméticos y suplementos vitamínicos.

La actividad antioxidante in vivo de la NAC y su diversidad como fármaco está relacionada con al menos tres mecanismos diferentes. En particular, de interés para este trabajo son:

- Efecto antioxidante directo sobre determinadas especies oxidantes.

- Un efecto antioxidante indirecto como resultado de la capacidad de la NAC para actuar como un precursor de Cys, que es un componente básico y el paso limitante de la velocidad en la síntesis de glutatión, siendo GSH un antioxidante directo bien conocido y un sustrato de varias enzimas antioxidantes.
- Un efecto de ruptura de los disulfuros y la capacidad de restaurar los depósitos de tiol, que a su vez regulan el estado redox.⁴

2.2.1 NAC como antioxidante directo

Los grupos tiol, típicamente se refieren a la forma R-SH de los restos químicos y están sujetos a deprotonación (pérdida de H⁺) para formar tiolatos cargados (RS⁻); aunque ambas formas tienen pares solitarios de electrones y son nucleofílicas, un tiolato es mucho más reactivo que un tiol neutro, por ello posee distintas propiedades y reactividades en comparación con los tioles. La relación de equilibrio entre las formas tiol y tiolato varía con el pH y es característica de grupos tiol específicos ubicados dentro de un entorno proteico distinto.⁵

La actividad antioxidante se lleva a cabo por reacción del tiolato con las especies reactivas. Las constantes de velocidad de reacción de la NAC y de los compuestos endógenos que contienen tiol, como antioxidantes siguen el orden general: Cys > GSH > NAC.⁶ Por tanto, asumiendo las mismas concentraciones, la NAC es el antioxidante más débil, pues como habíamos mencionado la actividad antioxidante del SH se debe al anión tiolato, cuya concentración relativa está regulada por la acidez del tiol. En otras palabras, la acidez (K_a) del grupo tiol regula el equilibrio y, por tanto, la cantidad relativa de S⁻ con respecto a SH. En consecuencia, el pK_a de los tioles mencionados anteriormente sigue el mismo orden: cisteína (8,30) > GSH (8,83) > NAC (9,52).⁴ Debido a ello, la NAC solo pueda actuar cuando su concentración relativa es más alta que la de GSH y la del aminoácido Cys libre. Esta situación puede darse en algunas situaciones y condiciones patológicas, como en los fluidos pulmonares expuestos a un proceso inflamatorio / oxidativo.

Esto se explica por la baja acidez del tiol de la NAC como consecuencia de la acetilación del grupo amino, lo que hace que el equilibrio entre la forma antioxidante (tiolato) y el tiol, se desplace en gran medida hacia este último, que es el inactivo.⁶ Si, por un lado, la NAC es el antioxidante más débil entre los compuestos de tiol endógenos, por otro lado, es más estable en solución acuosa.⁴

2.2.2 NAC como antioxidante indirecto

El glutatión es un tripéptido sintetizado y mantenido a altas concentraciones (mM) en las células. La NAC aumenta el GSH porque es un precursor de Cys, que es el factor limitante de la velocidad en la biosíntesis de glutatión celular (Figura 2).⁴

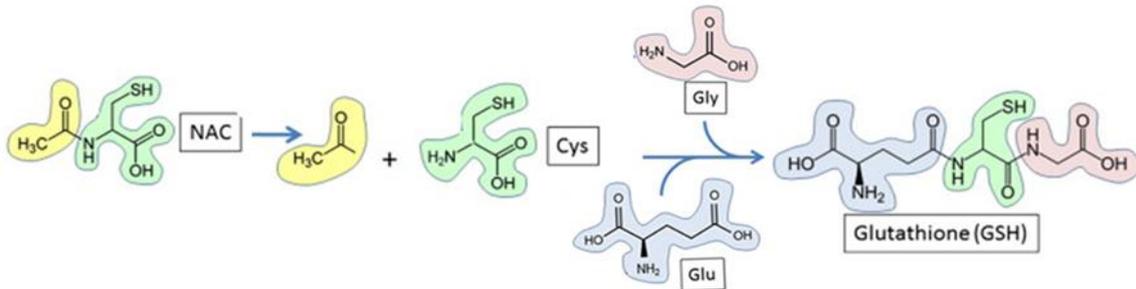


Figura 2. Obtención de glutatión a partir de NAC. Fuente: Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits

El GSH es esencial para mantener el equilibrio redox intracelular y el estado de tiol esencial de las proteínas, pues es el tiol no proteico dominante en células de mamíferos. Las células mantienen un entorno reductor mediante la presencia de biomoléculas como el glutatión, que reducen las ROS a moléculas menos dañinas como el agua y el oxígeno molecular.

La síntesis de GSH se produce en el citosol y está estrechamente regulada. Como se muestra en la Figura 3, el glutatión existe en dos estados: oxidado (GSSG) y reducido (GSH). Existe predominantemente como GSH, con concentraciones de 5 a 10 mM en las células hepáticas; la cantidad de GSSG, sin embargo, es menos del 1% de la de GSH.^[8] El GSH sufre intercambio de tiol-disulfuro en una reacción catalizada por tiol-transferasa de la siguiente manera:

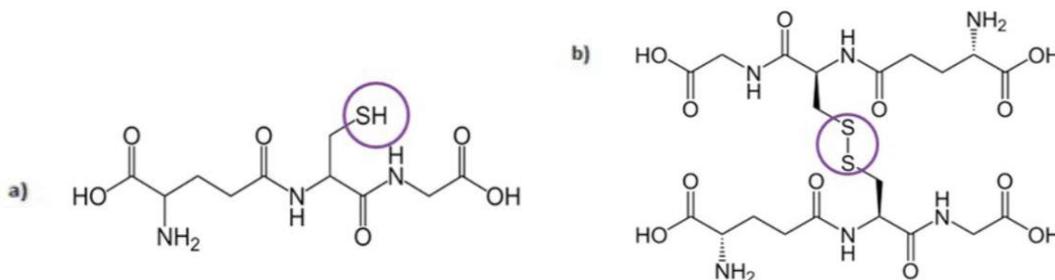


Figura 3. Estructura química de las distintas formas de glutatión. a) Glutatión reducido (GSH), su grupo activo es el grupo SH. b) Glutatión oxidado, formado por dos moléculas de GSH unidas por un enlace disulfuro. (GSSG)

Dado que esta reacción es reversible, el equilibrio está determinado por el estado redox de la célula, que depende de las concentraciones de GSH.⁷

El estrés oxidativo severo puede superar la capacidad de la célula para reducir GSSG a GSH, lo que conduce a la acumulación de GSSG.⁷ En este caso de sucederse, la NAC es capaz de dar lugar a cisteína, precursor de esta molécula, reponiendo en parte los niveles de GSH.

2.2.3 NAC y la ruptura puentes disulfuro

En individuos sanos, la secreción de moco no es excesiva y las células ciliadas del epitelio eliminan el moco continuamente y luego lo impulsan hacia la laringe para deglutir. Sin embargo, un aumento en la secreción de moco de las vías respiratorias puede ser problemático, especialmente si la velocidad de secreción excede la velocidad a la que puede eliminarse mediante la acción ciliar normal.⁸

Los polímeros de mucina son las principales proteínas formadoras de gel en el moco del pulmón sano. El bajo módulo de elasticidad de los geles de moco de las vías respiratorias sanas indica una baja densidad de enlaces cruzados de mucina. Los geles de moco ligeramente reticulados se transportan fácilmente por la escalera mecánica mucociliar, pero el moco patológico en la enfermedad pulmonar no se transporta fácilmente y se acumula para causar obstrucción del flujo de aire, atelectasia e infección pulmonar. El moco patológico es típicamente muy elástico y se cree que ocurre como consecuencia de la inflamación de las vías respiratorias. Los conceptos actuales sobre cómo se vinculan la inflamación de las vías respiratorias y la patología del moco de las vías respiratorias enfatizan los cambios en la concentración de mucina o ADN como un mecanismo de aumento de la elasticidad del moco.⁹

Los polímeros de mucina se caracterizan por dominios ricos en cisteína en sus extremos N y C que median la extensión del polímero mediante el enlace disulfuro de extremo a extremo de los monómeros de mucina. Las mucinas también se caracterizan por abundantes regiones ricas en cisteína en los dominios internos. En la enfermedad pulmonar caracterizada por afecciones inflamatorias, el estallido oxidativo provoca la oxidación de los tioles de cisteína internos que, por un lado, pueden contribuir a los efectos antioxidantes de las mucinas, pero, por otro lado, podrían modificar las propiedades biofísicas de las mucinas al generar cruces disulfuro (mediante enlaces entre dominios de cisteína internos), tal y como se muestra en la Figura 4. El moco resultante está fuertemente reticulado lo que provoca que no se transporte fácilmente y se acumule pudiendo causar obstrucción del flujo de aire, atelectasia e infección pulmonar.⁴ Para llevar a cabo la despolimerización de las glicoproteínas de mucina es posible

utilizar mucolíticos, fármacos que disminuyen la viscosidad del moco. Entre ellos se encuentra la N-acetilcisteína.

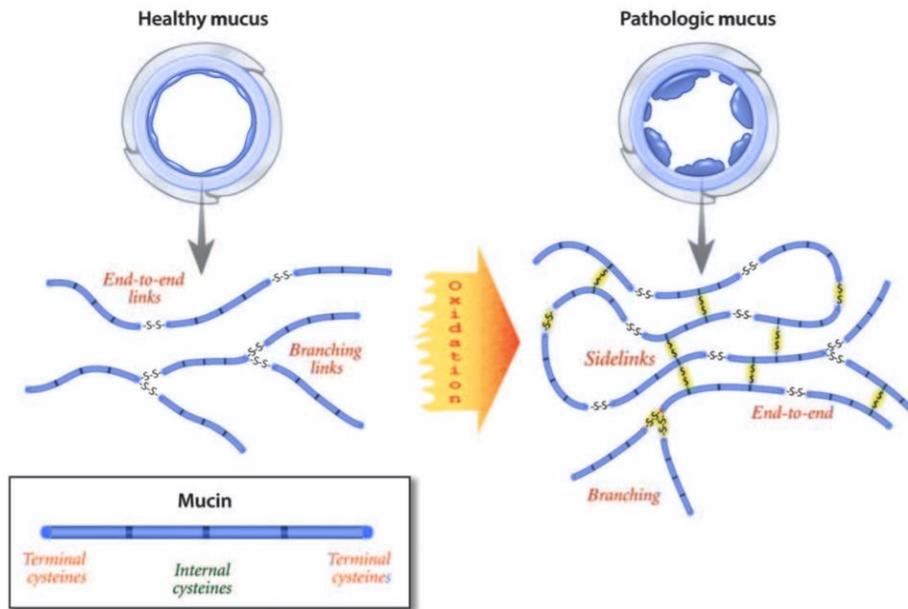


Figura 4. El estrés oxidativo causa una excesiva formación de enlaces disulfuro en la mucosa. Fuente: Oxidation increases mucin polymer cross-links to stiffen

La administración de la NAC en aerosol puede disociar enlaces disulfuro de mucina y otros componentes de gel reticulados con enlaces disulfuro para reducir la viscosidad.⁸ La NAC es un agente reductor eficaz de los disulfuros de proteínas a través del mecanismo clásico de intercambio tiol-disulfuro (Figura 5). Está implicado un mecanismo de reacción SN², mediante el cual, en una única etapa de reacción, el anión tiolato de la NAC (RS⁻) es un nucleófilo que ataca a uno de los átomos de azufre del disulfuro para producir un nuevo enlace disulfuro mientras se libera un nuevo tiolato libre (Figura 6). Las evidencias teóricas y experimentales sugieren un estado de transición lineal similar al trisulfuro, con la carga negativa deslocalizada en los tres átomos de azufre y en su mayoría abundante en los átomos de azufre terminales.¹⁰

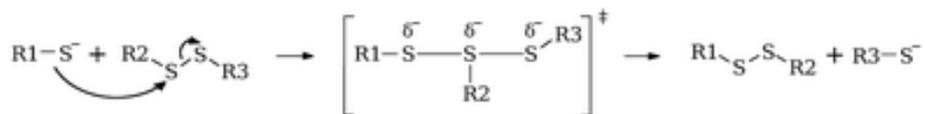


Figura 5. Intercambio tiol disulfuro.

Al considerar este modelo de reacción, la velocidad de la reacción de intercambio tiol-disulfuro está fuertemente relacionada con la nucleofilia del tiolato, y esto explica la mayor capacidad reductora de disulfuro de la NAC en comparación con Cys y GSH, reflejando el orden de nucleofilia de los tioles: NAC > GSH > Cys.

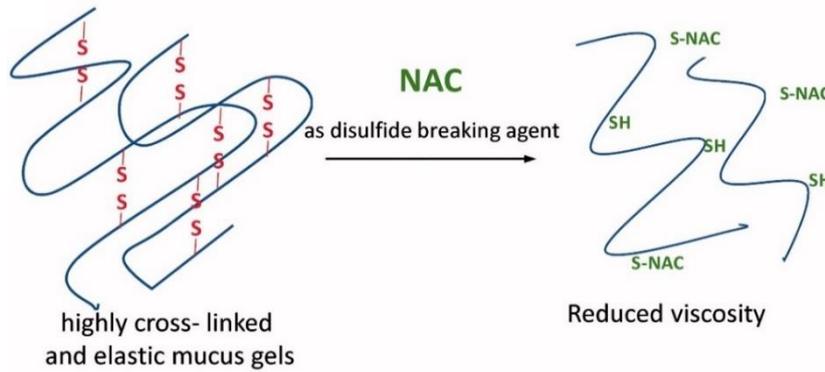


Figura 6. La NAC rompe los puentes disulfuro. Fuente: *N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphidebreaking agent: the reasons why*

2.3 Ventajas de NAC frente a cisteína

Los apartados anteriores tienen algo en común: la importancia de las moléculas con grupos tioles. Aún más dentro de esta categoría cada molécula, incluso siendo muy parecidas, como la NAC y la cisteína (Figura 7), tiene propiedades muy distintas.

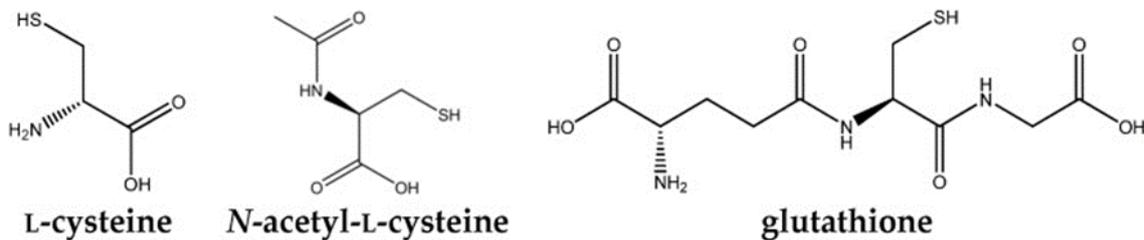


Figura 7. NAC, cisteína y GHS, oxidantes a través de un grupo tiol. Fuente: *Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine*

Al ser un tiol (R-SH), la NAC puede ser oxidada por varios radicales y sirve como nucleófilo. En comparación con la cisteína (Cys), NAC tiene menor toxicidad y susceptibilidad a la oxidación (y dimerización), además de tener una mayor solubilidad en agua. El aminoácido Cys se oxida fácilmente, generando el disulfuro inactivo dando lugar a la cistina (dímero de dos cisteínas unidas por sus grupos funcionales tiol a través de un puente disulfuro) (Cys-Cys). La cistina predomina fuera de la célula mientras que la cisteína, predomina dentro de la célula. La cisteína se autooxida fácilmente a cistina en el líquido extracelular y la cistina, una vez que ingresa a la célula, se reduce rápidamente a cisteína.⁷

Como ya habíamos dicho, el GSH, que es el principal encargado de la acción antioxidante, debe sintetizarse dentro de la célula, por lo que la cisteína debe encontrarse allí. Una forma más rápida que la introducción del dímero de cisteína, es el uso de la NAC. Originalmente se creía que la NAC podría tener la capacidad de entrar en la célula a través de membranas sin

transportadores de aminoácidos debido a la carga reducida impartida por el resto acetilo. Sin embargo, algunas de sus formas no se absorben bien y la actividad de transporte de células y tejidos es baja. Otra teoría sería la desacetilación extracelular de la NAC, Cys se libera y se introduce en las células a través de transportadores de aminoácidos.¹¹ Además, la NAC es una molécula pequeña y podría competir con moléculas reductoras más grandes en espacios estéricamente menos accesibles.¹²

2.4 Papel de NAC frente al COVID

Además de la importancia de la NAC en los procesos ya descritos, la NAC también ha sido estudiada como posible fármaco frente al COVID. El equilibrio celular antioxidante-oxidante desproporcionado tienen una función importante en la patogénesis de las infecciones virales respiratorias, como las infecciones por SARS-CoV, las cuales conducen a la síntesis de radicales libres, consumiendo así los suministros de GSH.³ En pacientes infectados por virus como el COVID-19, numerosos estudios han demostrado la deficiencia de los sistemas protectores antirradicales intracelulares y plasmáticos que alteran las funciones inmunitarias, así como deficiencia de formas reducidas de GSH y de aminoácidos azufrados (cisteína).

Durante la infección viral, una agresión oxidativa altera la estructura y función de los linfocitos circulantes (tipo de célula inmunitaria), pues el GSH intracelular, que suele ser elevado en los linfocitos, parece estar disminuido en pacientes infectados.² La administración oral de NAC podría ser un fármaco viable para tratar la infección por COVID-19 por su papel en la síntesis de GSH y sus propiedades antioxidantes, mejorando la respuesta de los linfocitos y modulando la inflamación, aunque aún no se ha demostrado que disminuya las tasas de mortalidad.¹³

Además, la NAC podría prevenir la infección: El SARS-CoV-2 tiene una proteína llamada espiga (proteína S) que reconoce a la ACE2, una proteína de la membrana plasmática, como su receptor para ingresar a las células (Figura 8).¹⁴ Un intento de impedir la unión de la proteína espiga con el receptor ACE2 humano podría ser una estrategia factible para inhibir la infección del huésped con el SARS-CoV-2. En general, la estructura terciaria/cuaternaria de una proteína puede perturbarse reduciendo los enlaces de disulfuro entre los residuos de cisteína que proporcionan la arquitectura estructural a la molécula. La reducción de los enlaces disulfuro expuestos en la superficie de la proteína de espiga puede lograrse mediante el mecanismo de intercambio tiol/disulfuro a través del grupo tiol libre (-SH) de un reductor como la NAC.

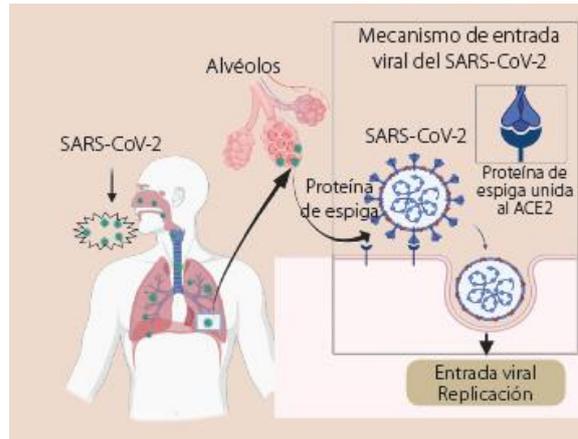


Figura 8. La proteína de espiga se une al ACE2 para entrar en las células. Fuente: COVID-19 y su asociación con los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y los antagonistas de los receptores para angiotensina II

La NAC podría formar un conjugado covalente con una proteína sólo a través del proceso de intercambio tiol/disulfuro entre su grupo sulfhidrilo libre y los residuos de cisteína unidos por disulfuro en la proteína. Tras la reducción del enlace disulfuro a través de NAC, la proteína espiga se despliega de forma significativa (ver Figura 9). La ruptura del enlace disulfuro entre los residuos de cisteína de la proteína espiga por la acción de la NAC, podría perjudicar por tanto la unión y, en consecuencia, inhibir la infección del SARS-CoV-2. En uno de los últimos estudios realizados se observó el cambio conformacional de la proteína de espiga en el aumento de la distancia entre el C- y el N-terminal de la nucleocápside del coronavirus, de 9,9 Å, según la estructura cristalina del complejo, a 130,2 Å. Esto dio lugar a una perturbación significativa de la orientación estereoespecífica de los residuos que interactúan en el dominio de unión de la proteína espiga con los del receptor ACE2, lo que finalmente podría reflejarse en una afinidad de unión disminuida de la proteína espiga con el receptor ACE2.¹⁵

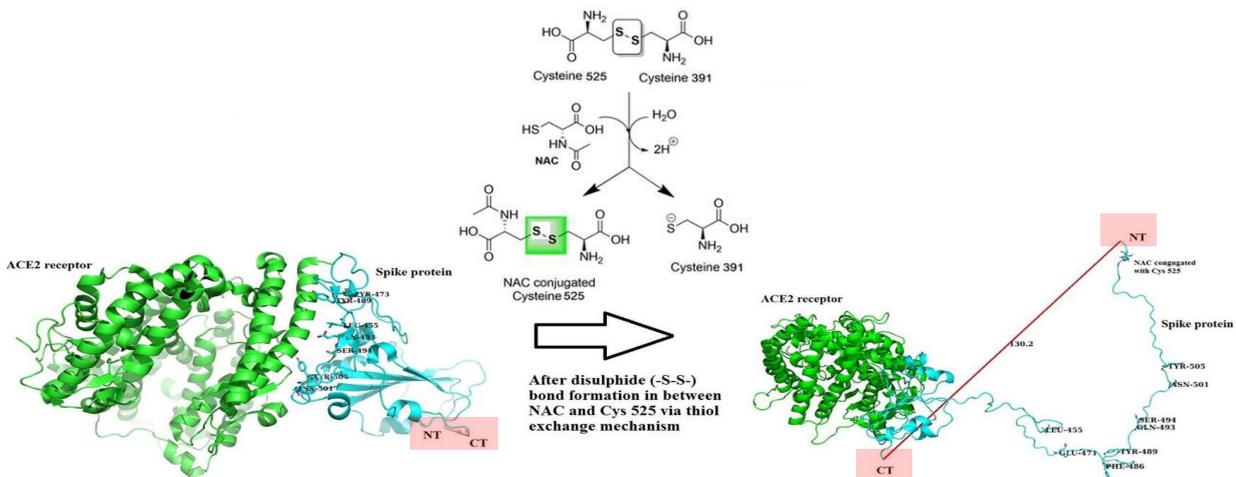


Figura 9. Diferencia en la interacción proteína-proteína entre el receptor ACE2(verde) y la proteína de espiga (azul) antes y después de la conjugación con NAC a través del mecanismo de intercambio de tiol. La línea roja muestra la distancia entre el terminal C y el terminal N (rosa) de la proteína de espiga, antes (9 Å) y después (130,2Å) de la conjugación NAC. Fuente: N-acetyl cysteine: A tool to perturb SARS-CoV-2 spike protein conformation.

3. JUSTIFICACIÓN

Como se ha mostrado en el apartado anterior en la actualidad existen múltiples enfermedades asociadas al estrés oxidativo, (diabetes, Alzheimer, covid19...). Curiosamente, muchas de ellas muestran cómo la excesiva formación de enlaces disulfuro juegan un papel central. Los fármacos antioxidantes ayudan a tratar estas enfermedades, por lo que conocer como es la estructura que interacciona con las especies oxidantes puede ser clave en la comprensión de sus mecanismos de reacción.

Comprender como actúan estos fármacos es clave para poder diseñar nuevos antioxidantes. Para ello, es fundamental determinar la estructura. Además, conocer la estructura permite realizar estudios posteriores, como por ejemplo en medios acuosos o formando complejos con unidades clave en las proteínas que actúan de receptor.

El grupo de espectroscopía molecular (GEM) ha desarrollado técnicas que permiten la transferencia de moléculas termolábiles que se encuentran en fase sólida a fase gas. De esta forma, es posible observar los conformeros más estables en el espectro obtenido mediante espectroscopía de rotación, para poder determinar su estructura y poder extraer información relevante debido a la relación estructura-propiedad.

4. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es obtener el espectro de rotación de la molécula de N-acetilcisteína y realizar su asignación, a fin de determinar y dilucidar la estructura y las disposiciones que adopta la molécula en un entorno libre de interacciones. Esto nos permitirá determinar cuáles serán sus conformeros más abundantes y poder entender las fuerzas intermoleculares que los gobiernan.

Dar una información inicial de la molécula que sirva de base para posibles estudios posteriores, como por ejemplo en disolución o formando complejos.

Obtener mediante métodos computacionales los conformeros más estable, sus componentes del momento dipolar y sus constantes de rotación. Esto permitirá, además, predecir el espectro rotacional de los conformeros de interés, facilitando la posterior interpretación del espectro obtenido experimentalmente.

Corroborar las predicciones hechas por métodos computacionales mediante su comparación con los resultados experimentales.

Realizar una comparación de los resultados proporcionados por distintos campos de fuerzas. Permitiendo dilucidar cuales de los campos de fuerzas utilizados son los más adecuados para el estudio de moléculas con grupos funcionales similares a los de la N-acetilcisteína.

Comparar la N-acetilcisteína con otro antioxidante, en concreto la cisteína, para ver las diferencias estructurales y discutir su posible implicación en sus diferentes roles biológicos.



5. METODOLOGÍA

Tal y como se mostrará en la parte de resultados, la NAC es una molécula que presenta varios conformeros. Por ello, será necesaria una búsqueda conformacional previa. Además, el análisis de las energías y los parámetros espectroscópicos más relevantes serán de gran ayuda para la identificación conformacional del trabajo experimental. Los resultados experimentales, por comparación con los teóricos, nos permitirán determinar cuáles son los conformeros que presenta la molécula realmente. Por ello, en esta sección se resumen los aspectos más importantes de las metodologías empleadas.

5.1 Metodología computacional

La búsqueda de los distintos conformeros estructurales de una molécula se podría realizar basándose en la intuición química. No obstante, esto conllevaría un enorme gasto de tiempo para una molécula compleja, además de que probablemente no se considerarían todos los conformeros o podría dar lugar a errores.

Afortunadamente, el desarrollo de los métodos computacionales facilita enormemente esta labor. La química computacional emplea los distintos conceptos para caracterizar moléculas. Los métodos basados en la química cuántica son los más precisos, pero hoy en día solo permiten el estudio de moléculas sencillas. Esto se debe a que este tipo de cálculos conllevan mucho tiempo de procesamiento de datos y requieren de ordenadores muy potentes. Para poder estudiar moléculas de mayor tamaño necesitamos entonces una simplificación o un modelo menos riguroso. La mecánica molecular es un segundo método que permite el estudio de moléculas de gran tamaño, incluyendo macromoléculas como las proteínas.¹⁶

5.1.1 Mecánica molecular

La mecánica molecular (MM), a diferencia de los métodos cuánticos, se establece en un modelo mecano clásico simple de la estructura molecular. En este modelo, las moléculas son consideradas como un conjunto de átomos en el espacio, unidos entre sí mediante enlaces y dirigidos por un conjunto de funciones de potencial mecano-clásicas.¹⁷

La mecánica molecular permite estudiar las moléculas a través de un modelo de bolas (átomos) y muelles (enlaces), que verifican la ley de elasticidad de Hooke.

Gracias a esta aproximación la energía de una molécula en su estado fundamental puede estudiarse como una función de las coordenadas de los núcleos atómicos. Esta función es conocida como Campo de Fuerzas o Force Field (FF). Además, los cambios que se producen en la energía potencial de un sistema pueden representarse como una superficie, denominada superficie de energía potencial (SEP o PES, como es comúnmente empleado en inglés).¹⁸

5.1.1.1. SUPERFICIES DE ENERGÍA POTENCIAL

Las disposiciones que puede adoptar una molécula en el espacio son infinitas. Basta con que la molécula realice pequeños cambios en las medidas de sus parámetros geométricos para obtener nuevas disposiciones, cada una de ellas de una determinada energía. Para especificar esta variación de la energía debida a los cambios en la estructura definimos las PES, una relación matemática que une la estructura molecular y la energía resultante.

Consideremos el caso más sencillo. En una molécula diatómica solo tenemos un grado de libertad (la longitud de enlace) por lo que la superficie de energía potencial podemos representarla mediante un gráfico bidimensional (energía frente a longitud de enlace). Sin embargo, para moléculas poliatómicas, la superficie tiene tantas dimensiones como grados de libertad haya dentro de la molécula. Esto daría lugar a una hipersuperficie de energía potencial, como se muestra en la Figura 10. Los mínimos de energía de esta superficie se corresponderían con las estructuras estables, los conformeros o isómeros estructurales de la molécula bajo investigación. Entre cada conformero hay diferentes caminos de interconversión, pasando por un estado de transición, que sería un máximo en energía.¹⁹

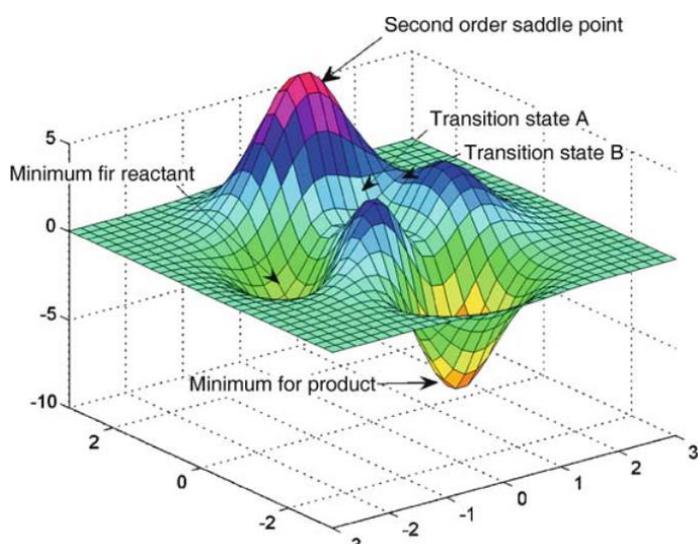


Figura 10. Superficie de energía potencial (SEP). Fuente: Computational Chemistry and Molecular Modeling

Una estructura de equilibrio está en un punto de una superficie de energía potencial en el que son cero todas las primeras derivadas de la energía con respecto a las coordenadas geométricas individuales y cuya representación diagonal de la matriz de derivadas segundas de la energía, tiene todos los elementos positivos. En términos simples, una estructura de equilibrio corresponde al fondo de un pozo en la superficie de energía potencial global. La optimización de la geometría consiste en calcular, para la geometría inicial, la energía y sus primeras derivadas con respecto a todas las coordenadas geométricas, y utilizar esta información para proyectar una nueva geometría. Este proceso se repite hasta alcanzar la energía más baja o la geometría optimizada.

El proceso de identificar los confórmeros de más baja energía llega a ser difícil conforme el número de grados de libertad conformacional se incrementa, a causa del gran número de disposiciones que es preciso examinar. Para ello serán necesarias técnicas de muestreo para reemplazar los procedimientos sistemáticos en las moléculas complejas. Los más comunes son los llamados métodos de Monte Carlo (que generan al azar las diferentes conformaciones de la muestra) y las técnicas de la dinámica molecular (que siguen el movimiento entre los diferentes confórmeros con el tiempo).²⁰ La primera suele ir acompañada de varias estrategias como lo son el realizar torsiones, frecuencias de bajo modo, ...

5.1.1.1 CAMPOS DE FUERZAS

En la mecánica molecular las interacciones entre las masas se describen mediante funciones de potencial derivadas de la mecánica clásica. La expresión de la energía potencial de una determinada geometría es la suma de: la tensión de enlaces, la torsión alrededor de los enlaces simples y ángulos de flexión, y las fuerzas intermoleculares tales como los enlaces de hidrógeno o de van der Waals.

Como ya habíamos dicho anteriormente, la mecánica molecular realiza una simplificación al no considerar los electrones. Es de esperar que entonces el método no proporcione valores de la energía precisos. A pesar de esto es perfectamente válido para realizar estudios de macromoléculas tales como las proteínas o, en el caso de moléculas pequeñas tales como ligandos, para una primera búsqueda conformacional. Esto permite evaluar la energía de los puntos de la superficie de energía potencial en un tiempo reducido y con un coste computacional muchísimo menor que otros métodos. Para hacerse una idea, para moléculas

con muchas torsiones, esta metodología permite buscar más de 10000 estructuras en pocas horas.

Lo primero que necesitamos para realizar una búsqueda conformacional es la estructura de la molécula, es decir, las posiciones relativas en el espacio de los átomos que la componen, además de una serie de datos como las constantes de fuerza (k) de los distintos enlaces, los posibles ángulos de giro y torsiones, disolvente (si es el caso), etc... Para obtener las constantes de fuerza de los enlaces recurrimos (o el software en este caso) a la base de datos del programa utilizado, las cuales han sido halladas de forma experimental o mediante cálculos *ab initio*. La base de datos de compuestos empleada durante la parametrización es esencial para una correcta búsqueda conformacional, además de para modelar distintas propiedades. El conjunto de parámetros obtenidos empíricamente para describir las interacciones entre átomos y las funciones de potencial empleadas forman el **campo de fuerzas (FF, force field)** en el que se fundamentan esta clase de métodos.

La energía del campo de fuerzas se escribe como una suma de términos, cada uno de los cuales describe la energía necesaria para distorsionar una molécula de una manera específica, como variar la distancia de enlace, variar el ángulo, o realizar una torsión entorno a un enlace. Algunos de estos términos están descritos en la Figura 11.

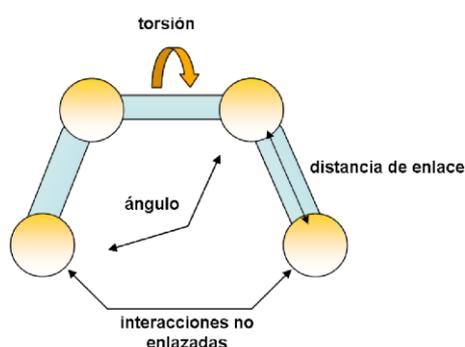


Figura 11. Términos fundamentales de un campo de fuerzas. Fuente: *Dinámica molecular*, Juan A. Bueren-Calabuig

A la hora de escoger utilizar un campo de fuerzas u otro debemos conocer sus características más trascendentales, puesto que existen muchos campos de fuerza dependiendo del uso. Se diferencian en tres aspectos principales:

1. ¿Cuál es la forma funcional de cada término energético? Como hemos visto la energía del campo de fuerza es la suma de varias contribuciones. Dependiendo del tipo de campo de fuerza elegido la función que describe cada término energético varia.

2. ¿Cuántos términos cruzados se incluyen?

Los términos cruzados aparecen al considerar que los enlaces, ángulos de enlace y diedros en una molécula no están aislados, sino que pueden estar influenciados por los átomos y grupos químicos vecinos. Están representados por funciones que dependen de dos o más coordenadas de movimiento, por lo que los funcionales que los describen son combinaciones de los funcionales para los términos por separado. Por lo tanto, sus expresiones son más complejas. Incluir más términos cruzados conlleva por tanto un mayor gasto computacional.¹⁷

3. ¿Qué tipo de información se utiliza para ajustar los parámetros?

Hay dos tendencias generales. Si el campo de fuerza está diseñado principalmente para tratar grandes sistemas, como las proteínas o el ADN, las formas funcionales se mantienen tan simples como sea posible. Esto significa que sólo se utilizan funciones armónicas para E_{enlace} y $E_{\text{torsión}}$ (o se omiten estos términos, obligando a que todas las longitudes y ángulos de enlace sean constantes), no se incluyen términos cruzados y el potencial de Lennard-Jones se utiliza para E_{vdw} . Estos campos de fuerza se denominan a menudo "armónicos", "diagonales" o "Clase I".

La otra rama se concentra en reproducir moléculas de tamaño pequeño y mediano con un alto grado de precisión. Estos campos de fuerza incluirán una serie de términos cruzados, utilizarán al menos expansiones cúbicas o cuádricas de E_{enlace} y $E_{\text{torsión}}$, y posiblemente un potencial de tipo exponencial para E_{vdw} . Estos campos de fuerzas se denominan a menudo campos de fuerza de "Clase II".

Se han introducido mejoras al permitir que los parámetros dependan de los tipos de átomos vecinos, por ejemplo, para modelar la hiperconjugación, e incluir efectos de polarización electrónica. Estos último son los campos de fuerza de "Clase III".

Como hemos visto podemos escoger entre varios campos de fuerzas de distintas características. Dentro de los campos de fuerzas más comunes nos encontramos:

- La familia MM, se utilizan para cálculos computacionales de moléculas pequeñas, existiendo distintas variaciones dentro de este tipo que se designan con números (por ejemplo, MM2, MM3...).
- Los AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement), se utilizan en el estudio de algunos sistemas orgánicos, además de proteínas y ácidos nucleicos. Son de clase I.
- Los CHARMM (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics), son campos de fuerzas parametrizados con datos experimentales y utilizados tanto para moléculas pequeñas como complejos solvatados de macromoléculas biológicas. Son de clase I.
- El MMFF (Merck Molecular Force Field), es uno de los campos de fuerza más extendidos por su gran reproducibilidad en sistemas con varios grupos funcionales. Es de clase II.
- Los OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations) simula las propiedades del estado líquido, se utiliza para el agua y líquidos orgánicos. Otorgan especial importancia en la derivación de las interacciones no enlazadas por comparación con la termodinámica del estado líquido.²¹ Son de clase I.

En este trabajo se han utilizado los campos de fuerza AMBER, MMFFs y OPLS.

5.1.1.2 COMPARACIÓN CAMPOS DE FUERZA

Para un mayor detalle de las ecuaciones empleadas por los distintos campos de fuerza y los términos que contribuyen a la energía, véase el Material adicional. A continuación, se muestra un resumen de la comparativa de los términos del funcional, como podemos ver en la Figura 12.

Force field	Types	E_{str}	E_{bend}	E_{oop}	E_{vdw}	E_{el}	E_{cross}	Molecules
AMBER	41	P2	P2	imp.	12-6 12-10	charge	none	proteins, nucleic acids, carbohydrates
MMFF	99	P4	P3	P2	14-7	charge	sb	general
OPLS	41	P2	P2	imp.	12-6	charge	none	proteins, nucleic acids, carbohydrates

Figura 12. Comparativa de los campos de fuerzas empleados en este trabajo. Pn es el polinomio de grado n utilizado.

- Como vemos, AMBER y OPLS utilizan términos en sus funcionales muy semejantes, además de no tener en cuenta la energía debida a términos cruzados (CROSS), ni la del doblado fuera del plano (OOP, *Out of plane*) pues esta última da lugar a un ángulo de torsión inadecuado (imp.: improper torsional angle). Las moléculas a las que se aplican estos dos campos son también las mismas: proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos.
- El campo de fuerza MMFFs es muy distinto a estos otros dos. Presenta polinomios de mayor grado para describir los términos de las energías además de tener en cuenta la energía debida a términos cruzados, (sb: stretch–bend, es decir términos cruzados de enlace y torsión) y la energía de doblado fuera del plano. Además, este campo tiene una aplicación general, dando buenos resultados para un mayor tipo de moléculas.

5.1.2 Métodos mecanocuánticos

Los métodos de la mecánica cuántica se fundamentan en la resolución de la ecuación de Schrödinger, la cual sólo puede resolverse de manera exacta para átomos o moléculas que contienen un electrón. Esto se debe a que en sistemas polielectrónicos las partículas no se mueven de forma independiente, sino que existe correlación electrónica, por lo que deben considerarse varias aproximaciones para resolver la ecuación de Schrödinger. Las aproximaciones consisten en:

- Aproximación de Born-Oppenheimer

La función de onda molecular total $\Psi(R,r)$ depende de las posiciones de los núcleos y de las posiciones de los electrones. Dado que los electrones son mucho más ligeros que los núcleos, y por lo tanto se mueven mucho más rápidamente, pueden responder de forma instantánea a cualquier cambio en las posiciones relativas de los núcleos. Esto permite separar las variables nucleares de las variables electrónicas. De esta forma podemos dividir la función de onda total, en una función de onda electrónica $\psi(r)$ y en una función de onda nuclear $\Phi(R)$. Esto significa que las posiciones de los núcleos pueden fijarse (se suprimen los términos nucleares considerándolos constantes al calcular las derivadas, y se parametriza el término de atracción electrónica entre núcleos y electrones), de manera que sólo sea necesario resolver la parte electrónica.

- Aproximación de Hartree-Fock

La función de onda electrónica $\psi(r)$ depende de las coordenadas de todos los electrones en la molécula. Hartree propuso la idea de que se puede separar en un producto de funciones que dependen sólo de un electrón. De esta forma aplicaba la aproximación de la partícula independiente para los electrones, así el término de un electrón se considera independiente del resto, permitiendo dividir el operador Hamiltoniano en operadores individuales para cada electrón.²⁰

Esta función de onda resolvería la ecuación de Schrödinger de forma exacta si no fuera por el término de repulsión electrón-electrón del hamiltoniano. Hartree describió este término como una expresión que describe la repulsión que un electrón siente desde la posición media de los otros electrones. En otras palabras, el término de la repulsión electrón-electrón se sustituye por un campo de energía potencial producido por las posiciones medias de los electrones restantes. Es una modificación en la que se describe la función de onda de varios electrones como un producto antisimetrizado (determinante de Slater) de funciones de onda de un electrón.²²

- Aproximación de los electrones independientes

Otra aproximación consiste en considerar los electrones independientes asumiendo que el comportamiento de los orbitales moleculares resulta de la combinación lineal de los orbitales atómicos que lo forman. De esta forma cada electrón estará en un orbital distinto. Así, la función de onda del sistema se puede escribir como el producto de las funciones de onda de cada partícula.

- Aproximación de la separación de orbitales π

Para poder caracterizar la contribución π de un enlace, se puede considerar la separación de las contribuciones σ y π .

5.1.2.1 MÉTODOS BASADOS EN LA FUNCIÓN DE ONDA

Tras plantear la ecuación de Schrödinger y aplicar la aproximación de Born-Oppenheimer, se divide el Hamiltoniano electrónico en distintos términos, de los cuales, el correspondiente a la repulsión interelectrónica no tiene solución exacta.

El método HF ignora la repulsión interelectrónica, también conocida como correlación de electrones. La energía de correlación de electrones se define como la diferencia entre la energía exacta y la energía en el límite de HF.²²

Método de Hartree-Fock

Se emplea entonces el modelo de Hartree-Fock. El concepto en el que se fundamenta la teoría Hartree-Fock (HF) reside en que cada electrón percibe al resto como un campo promedio, lo que permite un enorme progreso en la realización de los cálculos de orbitales moleculares.

El principal defecto del método HF es que no trata correctamente la correlación de electrones: se considera que cada electrón se mueve en un campo electrostático representado por las posiciones medias de los otros electrones, considerando que de hecho los electrones se evitan unos a otros mejor de lo que predice este modelo, ya que cualquier electrón A realmente ve cualquier otro electrón B como una partícula en movimiento y los dos se ajustan mutuamente (correlacionan) sus movimientos para minimizar su energía de interacción. Por esta razón, la energía calculada resulta siempre mayor que la verdadera energía que posee el sistema, debiendo procurar minimizar el resultado para cometer el menor error posible. Para ello se plantea el determinante secular cuya resolución puede realizarse por distintos métodos.^{23,20}

En el método de Hartree-Fock, la función de onda molecular total se aproxima como un determinante de Slater compuesto de orbitales de espín ocupados (cada orbital de espín es un producto de un orbital espacial convencional y una función de espín).

Para poder utilizarlos en cálculos prácticos, los orbitales espaciales se aproximan como una combinación lineal (una suma ponderada) de funciones de base. Estos se identifican generalmente con orbitales atómicos, pero pueden ser realmente cualquier función matemática que da una función de onda razonable.²³

Métodos Post Hartree-Fock

Los métodos post-HF realizan el cálculo de la energía de correlación. De nuevo, se encuentran distintas metodologías como variacionales, perturbativos y de agregados acoplados. Para este trabajo se ha empleado el método MP2 que detallaremos a continuación.

MÉTODOS PERTURBATIVOS MOLLER-PLESSET

El tratamiento Møller-Plesset (MP) de la correlación de electrones se fundamenta en la teoría de las de perturbaciones de varios cuerpos (MBPT, many-body perturbation theory) la cual trata la correlación electrónica como una perturbación en la función de onda de HF. Fue descrito por Møller y Plesset en 1934 y desarrollado en un método computacional molecular práctico por Binkley y Pople en 1975. La idea básica detrás de la teoría de la perturbación es que si sabemos cómo tratar un sistema simple (a menudo idealizado) entonces una versión más compleja (y a menudo más realista) de este sistema, si no es demasiado diferente, puede ser tratado matemáticamente como una versión alterada de la simple.

Inicialmente considera el operador Hamiltoniano \hat{H} no perturbado, al cual posteriormente se le añade una pequeña perturbación \hat{V} que representa una pequeña modificación en el sistema. El operador Hamiltoniano en este caso vendría dado por la expresión (1):

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \lambda \hat{V} \quad (1)$$

donde \hat{H}_0 es el Hamiltoniano anterior a la introducción de la perturbación que se resuelve de forma exacta o aproximada, λ es el parámetro de perturbación que mide la magnitud de la perturbación, y \hat{V} es el operador de perturbación.

Asumiendo que el factor de corrección es pequeño comparado con el Hamiltoniano inicial, la función de onda modificada y la energía pueden expresarse en forma de la expresión de Taylor en función del parámetro de perturbación.

$$E^n = E_0^n + \lambda E_1^n + \lambda^2 E_2^n + \dots \quad (2)$$

$$\Psi^n = \Psi_0^n + \lambda \Psi_1^n + \lambda^2 \Psi_2^n + \dots \quad (3)$$

En este trabajo utilizaremos el método MP2, el cual es el primer nivel de MP que va más allá del tratamiento de la HF. Al introducir a la energía HF un término de corrección se produce una disminución de la energía producida al permitir que los electrones se eviten unos a otros mejor que en el tratamiento de HF.

La esencia del método Møller-Plesset (MP2, MP3, etc.) es que el término de corrección maneja la correlación de electrones mediante la promoción de electrones de MO ocupados a no ocupados (virtuales), dando a los electrones, en cierto sentido, más espacio para moverse y

así hacer más fácil para que se eviten unos a otros; la disminución de la repulsión interelectrónica resulta en una menor energía electrónica.

Como acabamos de ver, los cálculos MP2 utilizan los MOs Hartree-Fock (sus coeficientes y energías). El método HF da los mejores MOs ocupados obtenibles a partir de un conjunto de bases dado y una función de onda total monodeterminante c , pero no optimiza los orbitales virtuales (después de todo, en el procedimiento HF comenzamos con un determinante que consiste sólo en los MOs ocupados).^{23,19}

5.1.2.2 TEORÍA DEL FUNCIONAL DE LA DENSIDAD (DFT).

El método de la teoría del funcional de la densidad intenta abordar tanto la inexactitud de la HF como las altas demandas computacionales de los métodos post-HF. Para ello reemplaza la función de onda electrónica de muchos cuerpos por la densidad electrónica como la cantidad básica, basándose en que la energía total del estado fundamental de un sistema con N electrones se puede describir mediante un funcional de densidad electrónica.²⁴

La teoría funcional de la densidad se basa en dos teoremas de Hohenberg y Kohn (1964). El primer teorema establece que la densidad de electrones del estado fundamental determina de forma única la función de onda electrónica y, por tanto, todas las propiedades del estado fundamental de un sistema electrónico. El segundo teorema establece que la energía de una distribución de electrones puede describirse como un funcional de la densidad de electrones, y este funcional es un mínimo para la densidad del estado fundamental, es decir, al igual que con la teoría de orbitales moleculares (MO, *molecular orbitals*) la densidad electrónica cumple el principio variacional. Esto significa que, dada una densidad específica de electrones, su energía será mayor o igual a la energía exacta. Por lo tanto, el problema de resolver la ecuación de Schrödinger de muchos cuerpos se pasa por alto, y ahora el objetivo pasa a ser minimizar una densidad funcional.^{24,19}

En el enfoque Kohn-Sham la energía de un sistema se formula como una desviación de la energía de un sistema idealizado con electrones no interactuantes. A partir de la ecuación de energía, al minimizar la energía con respecto a los orbitales de Kohn-Sham las ecuaciones de Kohn-Sham se pueden derivar, de manera análoga a las ecuaciones de Hartree-Fock.

Encontrar buenas funcionalidades es el principal problema en DFT. Se discuten varios niveles de DFT y nuevas funcionalidades²³

Sin embargo, los teoremas de Hohenberg y Kohn no proporcionan una expresión para el funcional de la energía y la utilidad de los cálculos DFT depende del uso de aproximaciones adecuadas. Para ello, el funcional se describe como la energía total según la expresión de Hartree añadiendo un término adicional, el de intercambio-correlación. Ésta es la expresión de Kohn-Sham (4) que consta de varios términos, todos ellos funcionales de la densidad electrónica, que comprenden el sumatorio de las interacciones de las distintas partículas dentro de la molécula:

$$E[\rho] = T_s[\rho] + E^H[\rho] + E_{en}[\rho] + E_{nn}[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (4)$$

donde $T_s[\rho]$ es la energía cinética de los electrones sin interacción entre ellos, $E^H[\rho]$ es la energía de Hartree, $E_{en}[\rho]$ la energía de interacción electrón-núcleo, $E_{nn}[\rho]$ la energía de interacción núcleo-núcleo y $E_{xc}[\rho]$ el funcional de intercambio-correlación.²⁵

Existen varios tipos de funcionales de intercambio-correlación que sirven como aproximaciones detallando en mejor o peor medida la forma de la densidad electrónica. Para un mayor detalle en la clasificación, véase el Material adicional.

Los funcionales que se van a utilizar en este trabajo son de tipo GGA híbrido B3LYP^{18,26}

FUNCIONAL B3LYP

Son métodos híbridos que combinan funcionales para la correlación y para el intercambio. En este caso concreto, se tiene el funcional de intercambio de Becke (B) que añade tres parámetros a la expresión y el de correlación no local de Lee, Yang y Parr (LYP), que, a diferencia de otros, no es una corrección del funcional LSDA (*Local Spin Density Approximation*), sino que está diseñado para proporcionar la energía de correlación por sí mismo.²⁷

DISPERSIONES DE GRIMME Y DE BECKE JOHNSON

Las interacciones de dispersión pueden ser definidas empíricamente como la parte atractiva del potencial de interacción de tipo van der Waals (vdW) entre átomos y moléculas que no están directamente unidos entre sí. En la actualidad ha quedado muy claro en la química y la

física de grandes sistemas, que la inclusión de estas interacciones en las simulaciones teóricas es indispensable para alcanzar la llamada precisión química.²⁸

Dispersión de Grimme: El método de dispersión de Grimme modifica la teoría del funcional de la densidad de Kohn-Sham, aportando una mayor precisión, un mayor rango de aplicación y menor empirismo. Las innovaciones más importantes con respecto de los métodos anteriores son los coeficientes de dispersión específicos para pares de átomos y radios de corte, ambos obtenidos mediante primeros principios.

Su principal deficiencia es que la corrección no es dependiente o no afecta a la estructura electrónica. No obstante es muy empleado y es válido para complejos de van der Waals e interacciones intramoleculares que suelen tener lugar en problemas conformacionales.²⁹ Sus principales propiedades y ventajas son las siguientes:

- Menor empirismo: los principales parámetros se obtienen de primeros principios.
- La energía de dispersión calculada para átomos con interacciones débiles es casi exacta.
- Suministra una descripción sólida para todos los elementos químicamente relevantes.
- Los coeficientes de dispersión de pares de átomos y radios de corte se computan explícitamente.
- Los coeficientes de dispersión dependientes del índice de coordinación (geometría) son independientes de la conectividad de los átomos, siendo este el factor que más contribuye a la mejora de la exactitud. Estos coeficientes son calculados mediante métodos *ab initio* de gran precisión.
- Proporciona similar o mejor exactitud para moléculas ligeras y una mejora importante para sistemas metálicos.

Becke-Johnson (BJ): Con la finalidad de mejorar las interacciones no covalentes, este modelo crea coeficientes de dispersión C6 interatómicos e intermoleculares notablemente precisos, así como geometrías y energías de enlace de complejos.

El modelo DFT es tan bueno como el modelo explícitamente dependiente de los orbitales moleculares, añadiendo mejoras computacionales evidentes. Con las dispersiones BJ se

obtienen mejores resultados y efectos de dispersión intramoleculares más claros, tratándose de un método más preciso especialmente para problemas de correlación electrónica de medio alcance.^{30,31}

$$E_{disp} = - \sum_{ij} \frac{C_{6ij}}{\left(k \frac{C_{6ij}}{E_{Cij}}\right) + R_{ij}^6} \quad (5)$$

donde E_{Cij} es la suma de los valores absolutos de las energías de correlación de los átomos i y j libres, k es un parámetro universal que limita la energía de dispersión de cada par ij . R_{ij} es la distancia entre los átomos.

5.1.2.3 BASES DE CÁLCULO

Para poder resolver la ecuación de Schrödinger electrónica debemos definir los orbitales moleculares. Esto puede hacerse mediante la función de onda o el funcional de la densidad electrónica, obteniendo así un conjunto de funciones base. La expresión de la función de onda ϕ se puede construir como una combinación lineal de los orbitales atómicos χ , donde el conjunto de N funciones χ_i son el conjunto de funciones base. Esta construcción se conoce como combinación lineal de orbitales atómicos (LCAO).

$$\phi = \sum C_i \chi_i \quad (6)$$

Estos orbitales atómicos pueden expresarse como:

$$\chi = N Y(\theta, \gamma) R(r) \quad (7)$$

Siendo N es el coeficiente de normalización, $Y(\theta, \gamma)$ la parte angular que comúnmente se describe con armónicos esféricos y $R(r)$ la parte radial.

Para describir esta parte radial $R(r)$ pueden utilizarse dos tipos de funciones, las de tipo Slater (STO, Slater type orbitals) y las funciones gaussianas (GTO, Gaussian type orbital). En nuestro caso utilizaremos las GTO. La expresión común para este tipo de funciones es:

$$R(r) = r^{(2n-2-l)} e^{-\zeta r^2} \quad (8)$$

Aunque son convenientes desde el punto de vista computacional, las GTO tienen características específicas que disminuyen su utilidad como funciones base.

Una cuestión clave es la forma de la porción radial del orbital, que queda mejor descrita con las funciones STO. Las GTO difieren en su forma de las STO, especialmente en el núcleo, donde la STO tiene una cúspide mientras que la GTO es continuamente diferenciable (Figura 13).

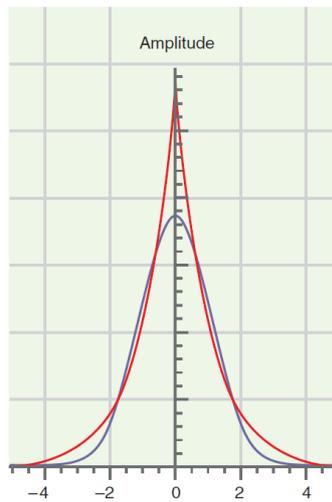


Figura 13. En rojo podemos ver la STO, en azul la GTO. Fuente: *Quantum Chemistry & Spectroscopy* de Thomas Engel. Para combinar la mejor característica de los GTO (eficiencia computacional) con la de los STO (forma radial adecuada), la mayoría de los primeros conjuntos de bases desarrollados con GTO se utilizan como bloques de construcción para aproximarse a las STO.

Cuando una función de base se define como una combinación lineal de gaussianas, se denomina función de base "contraída", y las gaussianas individuales a partir de las cuales se forma se denominan gaussianas "primitivos". El "grado de contracción" se refiere al número total de primitivas utilizadas para hacer todas las funciones contraídas. Así la contracción de funciones combina distintas funciones gaussianas, ecuación (9), para crear una nueva del mismo tipo, pero con distinta forma.

$$R(r) = \sum_j C_j e^{-\zeta r^2} \quad (9)$$

Hehre, Stewart y Pople (1969) fueron los primeros en determinar sistemáticamente los coeficientes y exponentes de contracción óptimos para imitar las STO con las GTO contraídas para un gran número de átomos de la tabla periódica.

El conjunto de bases mínimo tiene una función base para cada orbital formalmente ocupado o parcialmente ocupado del átomo. El conjunto de bases mínimo suele ser inadecuado, ya que no permite que los electrones del núcleo se acerquen lo suficiente al núcleo y que los

electrones de valencia se deslocalicen. Una solución es ampliar el tamaño del conjunto de bases, creando bases de valencia desdoblada (múltiple zeta) en las que se representa por una parte el núcleo con una función base que es contracción de distintas funciones gaussianas, y por otra los orbitales de valencia con varias funciones.^{32,33} En este trabajo se han utilizado bases de Pople y bases de Ahlrichs. Para un mayor detalle, consultar el Material adicional.

5.2 Espectroscopía de rotación

Para poder comprender la parte experimental debemos conocer qué datos extraer del estudio computacional. Para ello debemos definir la espectroscopía de rotación, así como de qué depende la obtención del espectro de la molécula o qué información nos proporciona. Además, puesto que este trabajo se desarrolla mediante expansión supersónica y ablación láser, comentaremos sus aspectos más relevantes.

5.2.1 Fundamentos

En un espectro rotacional las señales observadas son debidas a la absorción o emisión de energía por parte de las moléculas al cambiar su nivel de energía de rotación. Estos niveles 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:

$$\hat{H} * \Psi = E * \Psi \quad (10)$$

Siendo Ψ 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; \hat{H} es el operador hamiltoniano, el cual corresponde al observable “energía”, es decir, la suma de las energías cinética y potencial del sistema bajo estudio. En el estudio de sistemas en rotación, el parámetro más importante para la energía es el momento de inercia (I) dado por la expresión:

$$I_{A,B,C} = \sum m_i r_i^2 \quad (11)$$

donde m_i es la masa de cada átomo y r la distancia desde el átomo considerado al eje correspondiente.

El problema de rotación se trata matemáticamente en términos de un sistema de eje fijo de molécula con su origen en el centro de masa de la molécula y sus ejes orientados a lo largo de los ejes inerciales principales. Estos ejes son designados por a , b , y c . Las constantes rotacionales A , B y C , podemos definirlas según la ecuación (12), siendo inversamente proporcionales a los momentos de inercia I_a , I_b e I_c , respectivamente.

$$B = \frac{h}{8\pi^2 I_B} \quad (12)$$

siendo h es la constante de Plank e I es el momento de inercia en el eje B. La fórmula es análoga para las constantes rotacionales A y C .

Estos parámetros son específicos de cada estructura, ya que dependen de la distribución espacial de las masas, por lo que permiten realizar una predicción de las transiciones rotacionales, que por comparación con la obtención experimental nos permitirá identificar los conformeros analizados.

Debemos analizar a su vez la intensidad de las transiciones, la cual está relacionada con la proyección del momento dipolar de la molécula a lo largo de los ejes, μ_a , μ_b y μ_c , debido a que la intensidad de la transición es proporcional a la integral momento de transición $\langle \psi_1 | \mu_{a,b,c} | \psi_2 \rangle$, donde ψ_1 y ψ_2 es la función de onda de los estados inicial y final respectivamente.³⁴

Además, las intensidades dependen de la población del estado inferior de una transición. Para obtener la población N_J del nivel J relativa a N_0 se aplica la ley de distribución de Boltzmann:

$$\frac{N_J}{N_0} = (2J + 1) \exp\left(-\frac{E_r}{kT}\right) \quad (13)$$

donde $(2J+1)$ es la degeneración del nivel J .

Como se menciona en el siguiente apartado, en este trabajo las transiciones que tendrán lugar vendrán dadas desde estados iniciales bajos, pues serán los únicos con la suficiente población para dar una intensidad de línea adecuada. Esto es debido a que se ha utilizado expansión supersónica, en la que se producen colisiones entre la muestra y el gas portador de forma que se enfrían las moléculas para adquirir la velocidad del gas portador. A causa de este



enfriamiento, los niveles rotacionales y vibracionales de la muestra pasan al nivel fundamental.³⁵

Para que una molécula proporcione un espectro de rotación debe tener un momento dipolar permanente, siendo este el requisito principal. Además, debemos tener en cuenta que no todas las transiciones están permitidas, hay unas reglas de selección que deben cumplir. Para describir las reglas de selección hay que tener en cuenta la variación en los números cuánticos del momento angular, J , y la proyección del momento angular sobre el eje z de la molécula, K .³⁶

$\Delta J = -1, 0, 1$: Proporciona las ramas P , Q y R .

- Las transiciones de tipo a poseen las siguientes reglas de selección: $\Delta K_a = 0$; $\Delta K_c = \pm 1$.
- Las de tipo b : $\Delta K_a = \pm 1$; $\Delta K_c = \pm 1$.
- Y las de tipo c : $\Delta K_a = \pm 1$; $\Delta K_c = 0$.

De esta forma, las transiciones de cada tipo dependen de la proyección del momento dipolar a lo largo del eje que les corresponde. En conclusión, tanto la intensidad de las transiciones como si estas son de tipo a , b o c , proporcionan información sobre las componentes del momento dipolar de la estructura molecular, permitiendo un apoyo extra en la identificación de los conformeros, además de las constantes de rotación.³⁵

5.2.2 Expansión supersónica y ablación láser

Para realizar el estudio conformacional de nuestra molécula mediante técnicas espectroscópicas debemos tener dos precauciones, que la molécula no se descomponga a la hora de volatilizar la muestra, y que la molécula no presente interacciones con el entorno, es decir condiciones de aislamiento. Estas dos condiciones se desarrollan a continuación.

Se denomina **ablación láser** a la eyección de material desde una superficie sólida como resultado de la irradiación producida por medio de un rayo láser. La ablación con láser puede proceder fototérmicamente, utilizando energía fotónica para calentar la superficie, o fotoquímicamente, utilizando energía fotónica sin calentamiento para romper los enlaces químicos dentro de la superficie. Esta segunda opción es de especial importancia a la hora de

estudiar compuestos biológicos, pues se descomponen con el calor. Así la ablación láser permite volatilizar parte de las moléculas neutras mediante pulsos de radiación, que de otra forma no podrían llevarse a fase gas, sin deteriorarlas.³⁷

Para poder realizar el estudio conformacional de una molécula no deben darse interacciones de la molécula con el entorno, pues influiría en las conformaciones. Necesitamos entonces condiciones de aislamiento. Para ello se dispone de aparatos que permiten introducir la muestra a través de un **jet supersónico**. Esto consiste en la expansión adiabática de un gas portador, el cual contiene una pequeña proporción de la muestra a elevada presión en un recinto de alto vacío al pasar por un pequeño orificio llamado Nozzle, originando su expansión supersónica.³⁴ Las moléculas de la muestra soportan un fuerte enfriamiento de los grados de libertad rotacionales, vibracionales y traslacionales. Este hecho proporciona una serie de ventajas, como una mayor población del nivel fundamental que aumenta la intensidad de las transiciones fundamentales, haciendo además que el espectro se simplifique. Además, se produce un gran incremento de la velocidad (alcanza velocidades supersónicas) y la direccionalidad de esta. Una vez lograda la expansión supersónica se crea una zona libre de colisiones en la que el entorno en el que se encuentran las moléculas es el propicio para este tipo de espectroscopía.³⁸

5.2.3 Rotación interna

La rotación interna consiste en una vibración en la que varias disposiciones (n) son equivalentes entre sí, conectándose mediante el movimiento realizado por la molécula, siendo el ángulo de rotación interna (α) la coordenada que describe dicho movimiento.

La función del potencial es simétrica y periódica con el ángulo α , siendo el máximo de potencial la barrera que impide el movimiento. En algunos casos esta barrera es baja, por lo que el sistema puede pasar de un mínimo a otro por medio del efecto túnel. Este suceso causa que los niveles cercanos a la barrera se dividan en n componentes. En el caso de la NAC puede observarse rotación interna debido a la rotación del grupo metilo (Figura 14). 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 equivalentes y tres máximos equivalentes.

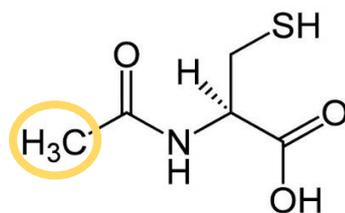


Figura 14. N-acetilcisteína. Destacado el grupo metilo que ocasiona la rotación interna.

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, como se observa en la Figura 15.³⁹ En el espectro cada transición rotacional aparece desdoblada en dos componentes, haciendo más compleja su resolución.^{40,41}

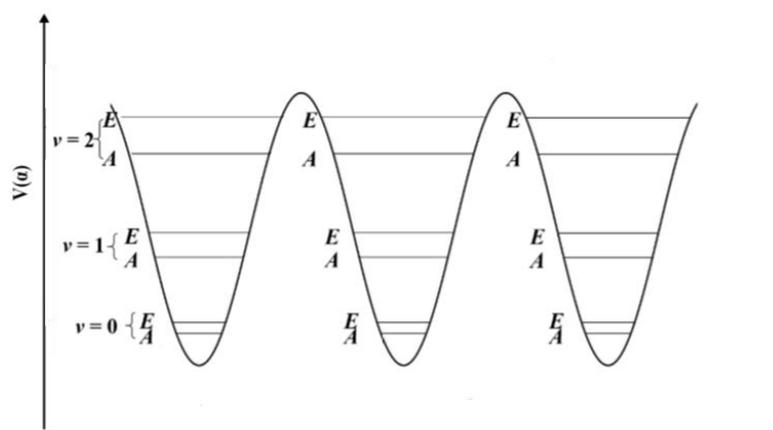


Figura 15. Función del potencial proporcionado por la rotación interna de un grupo metilo al cambiar el ángulo α .

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Búsqueda conformacional

Aunque la labor experimental se desarrolló a la par que la computacional, primero se introducirá la parte computacional para facilitar la lectura.

En este trabajo se ha estudiado la molécula N-acetilcisteína de fórmula molecular: $C_5H_9NO_3S$, con un total de 18 átomos en su estructura. Como puede verse en la Figura 16, se trata de una estructura con bastantes enlaces simples por lo que cabe esperar que pueda dar lugar a múltiples conformeros debido a sus posibles torsiones.

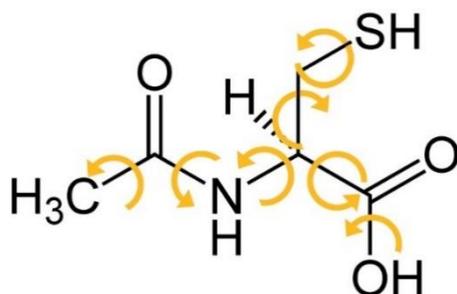


Figura 16. Posibles torsiones N-acetilcisteína

Debido al elevado número de torsiones, en primer lugar, se llevaron a cabo cálculos de mecánica molecular, para dilucidar las posibles estructuras que posee la molécula, para después proceder a optimizarlas. El primer paso fue la construcción de la molécula con el programa Maestro de Schrödinger. Posteriormente se procede a lanzar un cálculo de mecánica molecular empleando distintos campos de fuerza. Debido a que la molécula posee distintos grupos funcionales, será muy útil para evaluar la eficacia de cada campo de fuerza. Se emplearon los siguientes:

- El campo de fuerzas de MMFFs.
- El campo de fuerzas de AMBER
- Los campos de fuerzas: OPLS, OPLS 2005 y OPLS3.

En todos los casos se estableció un umbral de energía de 30 KJ/mol por encima del cual no se consideran dichas estructuras. Se realizará un análisis más detallado sobre las diferencias observadas con cada campo de fuerza en la sección 6.6, una vez se haya realizado la asignación experimental, a fin de contrastar los resultados.

Para una mayor facilidad de lectura y organización se usará el AMBER como referencia, al ser una metodología que, se adelanta, ha encontrado la estructura más estable, además de ser la que más conformeros ha proporcionado. En total se obtuvieron 70 estructuras las cuales se re-optimizaron mediante DFT, con el funcional B3LYP y la base cálculo de Ahlrichs, concretamente, el Def2tzvp. A pesar de comenzar con 70 estructuras iniciales, varias convergieron a la misma, obteniendo 50 estructuras distintas. En la Figura 17 se muestran las ocho estructuras más estables y las dos más inestables. La Tabla 1 recoge sus parámetros espectroscópicos más relevantes. El resto de las estructuras se muestran en el Anexo 10.1.

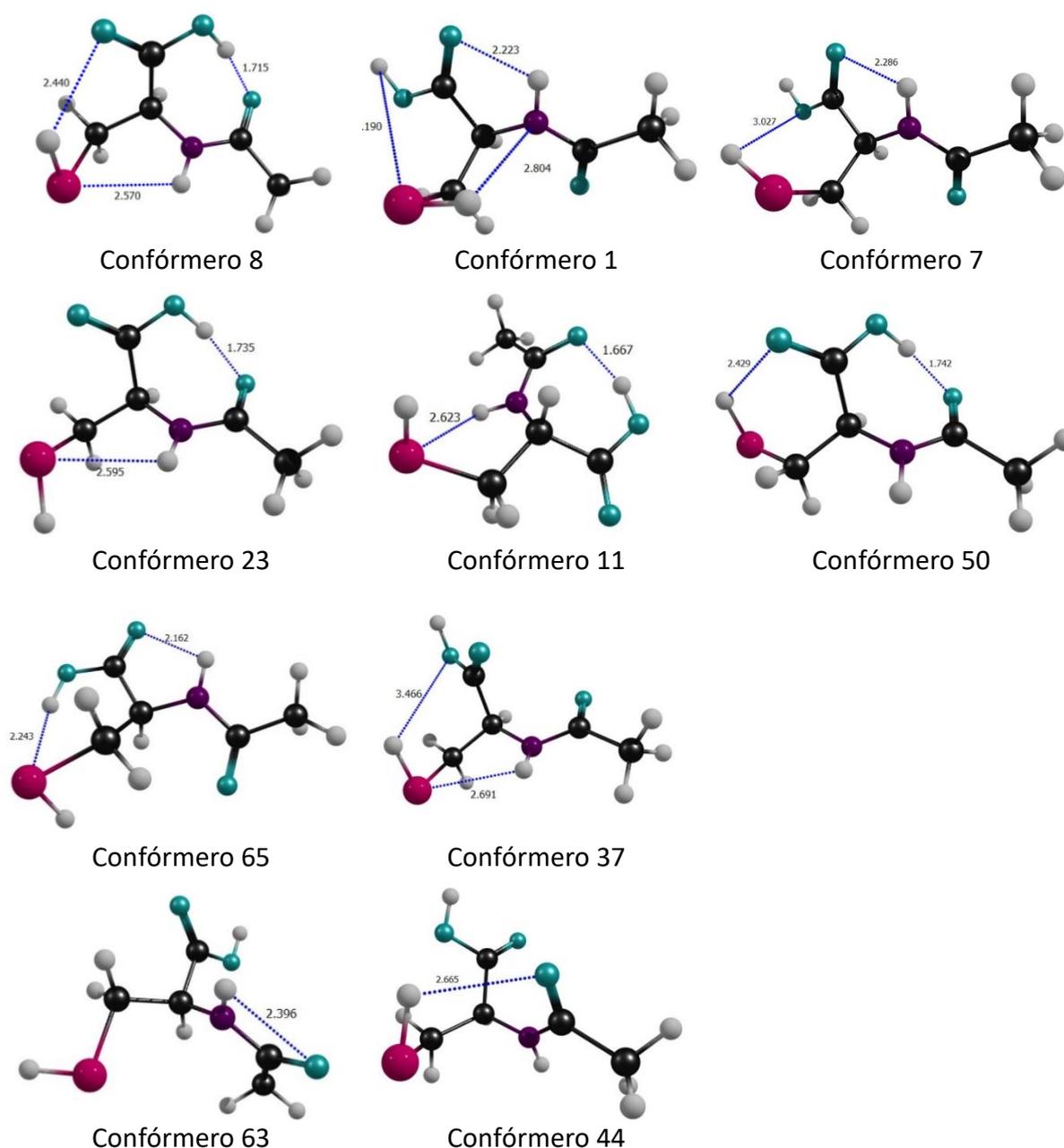


Figura 17. Confórmeros más estables de la N-acetilcisteína (8 primeros) y los dos más inestables (2 últimos).

Confórmero	8	1	7	11	23	50	65	37	63	44
A(MHz)	1500.5	1436.2	1424.1	1188.0	1517.9	1870.3	1494.2	1413.8	1224.1	1036.5
B(MHz)	844.0	783.4	785.3	938.2	839.5	669.0	769.4	819.2	1131.2	1002.9
C(MHz)	604.5	636.4	637.9	563.7	606.7	556.8	537.4	630.4	752.7	603.5
μ_A (D)	-1.1	0.8	2.0	1.5	-1.2	-3.0	-0.8	2.2	0.0	0.1
μ_B (D)	4.4	-1.4	-1.4	5.0	5.6	4.6	1.2	0.9	0.7	-3.2
μ_C (D)	-1.1	1.0	0.8	-0.1	-1.8	1.8	0.7	0.0	-3.2	-2.9
ΔE (cm ⁻¹)	0.0	775.1	963.2	867.2	1006.2	1031.9	1156.7	1242.8	3338.5	3423.0
ΔE_{ZPE} (cm ⁻¹)	0.0	552.5	709.7	762.7	940.8	959.0	1010.3	1018.5	3110.0	3176.7
ΔG (cm ⁻¹)	0.0	140.6	203.9	567.4	824.5	858.3	769.3	410.5	2866.2	2576.9

Tabla 1. Parámetros espectroscópicos calculados y energías relativas calculadas con optimización a nivel B3LYP-GD3/Def2tzvp. Se muestran los 8 confórmeros más estables de la NAC. Los dos más inestables aparecen a la derecha.

6.2 Análisis de las interacciones predominantes

Como puede verse en la Figura 17, el confórmero más estable, la estructura 8, presenta una serie de interacciones mediante varios enlaces de hidrógeno intramoleculares que estabilizan mucho a la molécula. El H carboxílico queda estabilizado por el oxígeno de la amida, el H unido al nitrógeno de la amida queda estabilizado por el azufre, y el H del grupo sulfhidrilo interactúa con el oxígeno del carboxilo. Además, la estructura se dispone de manera que sus H más ácidos quedan protegidos en una especie de ciclo de interacciones electrostáticas que refuerzan la interacción, también conocido como red cooperativa de enlaces de hidrógeno. Además, la proximidad de los grupos hace posible que la distancia de enlace sea mucho menor, dando un mejor solapamiento de los orbitales que forman el enlace.

El siguiente confórmero más estable es la estructura 1. Podemos ver que, al igual que en el confórmero anterior, la estructura presenta tres enlaces de hidrógeno intramoleculares que estabilizan los hidrógenos más ácidos. La diferencia con la estructura 8 son los grupos entre los que se producen las interacciones. El H carboxílico queda estabilizado por el azufre, el H de la amida interactúa con el oxígeno del carboxilo, y el H del grupo sulfhidrilo interactúa con el nitrógeno. No obstante, la disposición de la estructura 8 permite una mayor flexibilidad de la molécula en las interacciones de hidrógeno lo cual permite que sean más direccionales

y disminuir las distancias de enlace, estabilizando la molécula enormemente. De hecho, entre el mínimo global y la siguiente estructura más energética hay más de 500 cm^{-1} de diferencia.

A partir de la tercera estructura, el número de enlaces de hidrógeno intramoleculares comienza a disminuir. Como puede verse en la Figura 17, la molécula adopta muchísimas posibilidades con distintas combinaciones de enlaces de hidrógeno. Por ejemplo, la tercera estructura más estable, la estructura 7, se estabiliza mediante dos enlaces de hidrógeno, obteniendo una situación de mayor energía. Por tanto, estos conformeros sería raro encontrarlos en el espectro experimental.

Los conformeros más inestables encontrados son las estructuras 63 y el 44. En ambos podemos ver que solo se estabilizan por un enlace de hidrógeno cuya interacción es además débil. Asimismo, adopta orientaciones en las que existen impedimentos estéricos justificando así su enorme desestabilidad.

Este estudio conformacional muestra una fuerte correlación entre el número de enlaces intramoleculares y la estabilización de los conformeros. Además, las estructuras obtenidas nos permiten realizar una serie de observaciones generales:

- El grupo NH y el grupo CO forman el grupo amida, prefieren disponerse en trans que en *cis*.
- El H ácido del grupo carboxilo, el más ácido de la molécula, se estabiliza mayormente al interactuar con el oxígeno del grupo amida por dos razones:
 - En primer lugar, porque se consigue una mayor estabilización cuando el átomo que interactúa con el H es más electronegativo. En la NAC el átomo más electronegativo es el oxígeno, por lo que los conformeros más estables tendrán una interacción del H del ácido carboxílico con el grupo *ceto* de la amida.
 - En segundo lugar, la geometría de la molécula es la adecuada para que pueda disponerse de tal modo que la distancia del enlace de hidrogeno sea corta y por tanto fuerte.

Una excepción a este hecho es el segundo conformero, donde el H del ácido carboxílico interactúa con el azufre, aunque esta interacción no sea preferida se ve compensada por la

estabilización que se forma mediante un ciclo de interacciones que refuerza los enlaces de hidrógeno.

-En ninguno de los conformeros proporcionados se ha observado la interacción del H del ácido carboxílico con el nitrógeno. Esto es debido a que H del ácido carboxílico, al ser el más ácido de la molécula, se ve muy poco estabilizado al interactuar con el N, más electropositivo que el O y el S. Los conformeros con esta interacción han quedado fuera del umbral que ha considerado el programa de 30 kJ/mol.

-El H ácido del tiol también se estabiliza más al interactuar con oxígenos, más electronegativos que el nitrógeno, concretamente con los del ácido carboxílico pues se encuentran más cerca que el oxígeno del grupo amida. Una excepción es el segundo conformero más estable, donde el H ácido interactúa con el nitrógeno, viéndose esta interacción solo en los conformeros de mayor energía.

6.3 Predicción del espectro

Para saber el rango de medida y poder realizar la asignación del espectro de manera más sencilla, será conveniente realizar una predicción previa.

Como el estudio se llevó a cabo mediante expansión supersónica, la distribución conformacional deberá reflejar las poblaciones relativas si las barreras de interconversión entre conformeros son lo suficientemente altas. Asimismo, los conformeros más abundantes y poblados serán los más estables. Debido a ello la predicción se realiza comenzando por el conformero de menor energía, es decir, el conformero 8.

Para realizar la predicción, se necesitan los datos de las constantes rotacionales del conformero a analizar, las cuales se calculan durante la optimización geométrica. Los valores de las constantes rotacionales, junto con los momentos dipolares, son claves para interpretar los espectros experimentales. Para calcular las frecuencias a las que aparecerán las distintas transiciones rotacionales y su intensidad se ha empleado en este trabajo el programa JB95. Fijándonos en las componentes del momento dipolar eléctrico (Tabla 1), podemos observar que el momento dipolar de tipo b es considerablemente mayor que a y c , por lo que en nuestro espectro predominarán las transiciones de tipo b . La Figura 18 muestra dicha predicción,

únicamente para las transiciones tipo *b*, las más intensas. Además, podemos ver que la mejor zona para obtener el espectro rotacional es de 6 a 15 GHz; por lo que usaremos el espectrómetro LA-CP-FTMW optimizado en la zona de 6 a 18 GHz.

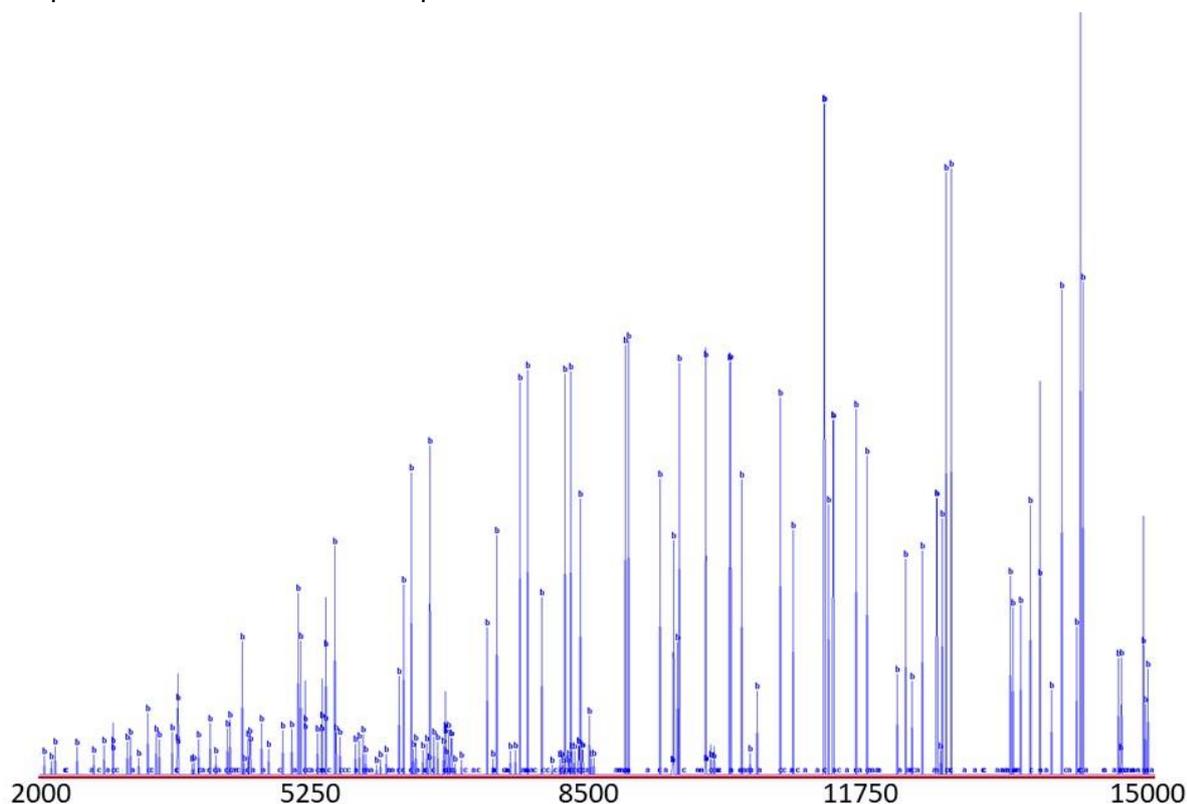


Figura 18. Transiciones de tipo *b* en la predicción del espectro de la N-acetilcisteína.

6.4 Tratamiento de la muestra y realización del espectro

La N-acetilcisteína es un polvo blanco. El primer paso fue proceder a su pulverización con un mortero de ágata hasta conseguir un polvo fino. A continuación, se mezcla con un aglomerante comercial para formar una pasta uniforme. Su función es evitar que el polvo se desprenda y acelerar el proceso de secado. Posteriormente, la mezcla formada por la muestra y el aglomerante se coloca en un molde y se somete a presión con una prensa hidráulica para obtener una barra de muestra compactada, tal y como se muestra en la Figura 19. Esta barra será la que introduzcamos en el espectrómetro para obtener el espectro rotacional.



Figura 19. Barra de muestra compactada de la NAC.

Así, una vez compactada la muestra, se introduce en el espectrómetro LA-CP-FTMW. El espectro rotacional obtenido para la NAC se muestra en la Figura 20. Como puede verse, el espectro consta de muchas transiciones rotacionales, posiblemente debido a uno o más conformeros de la N-acetilcisteína, posibles fragmentos y otras especies conocidas (agua, ...).

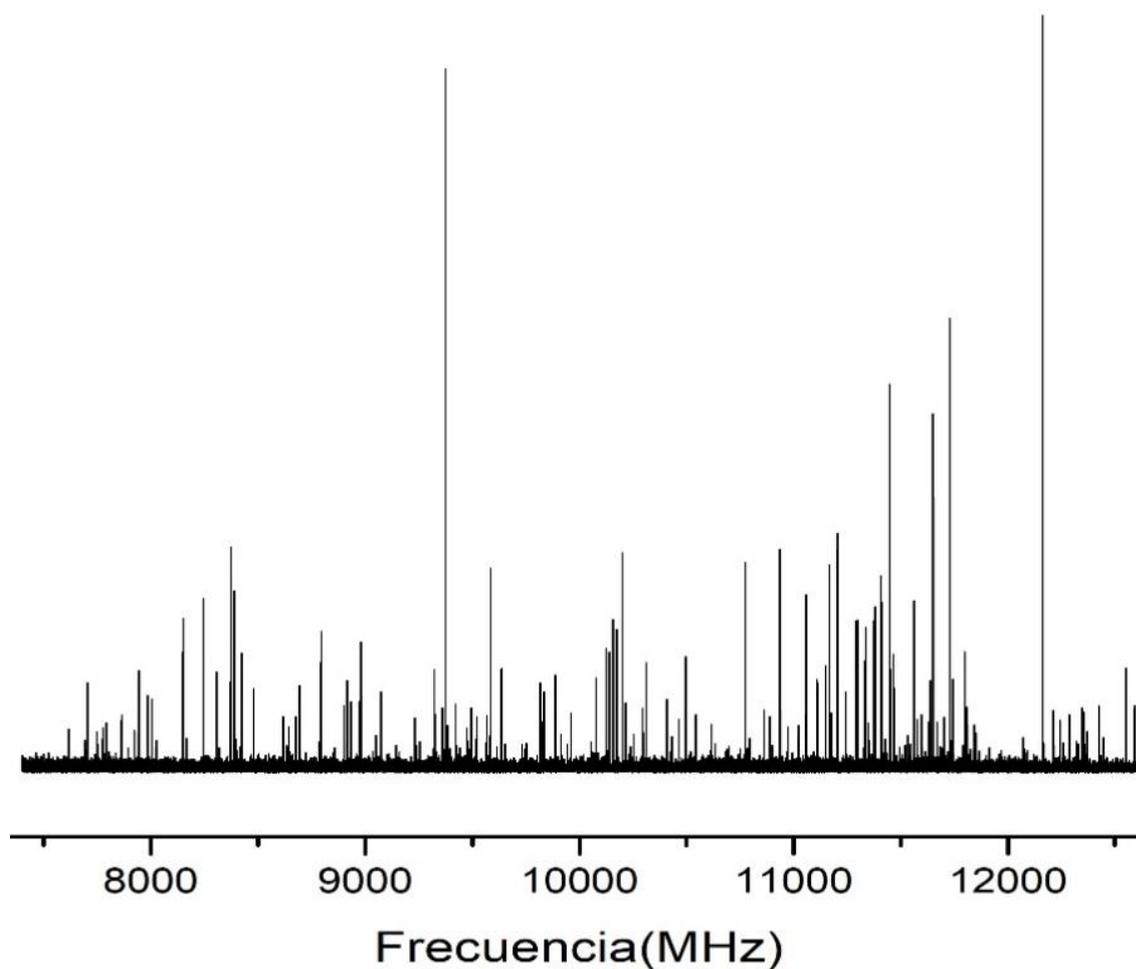


Figura 20. Espectro experimental de la NAC.

6.5 Asignación del espectro

Para asignar el espectro se utilizaron los programas JB95, antes mencionado, el programa ascp_l y el programa sview_l. Estos softwares permiten la comparación del espectro obtenido experimentalmente con la predicción, además de tener un paquete de análisis y ajuste, haciendo posible buscar y asignar los conformeros presentes en el experimento.

En primer lugar, se buscaron las transiciones de tipo α , por ser más fácil de localizar. No obstante, resultó en un intento fallido. Así, en segundo lugar, se procedió con las líneas de tipo b que deberían de ser las más abundantes. Tras varios intentos se consiguió realizar un ajuste con unas pocas líneas, obteniendo unas constantes rotacionales nuevas. Estos valores se emplearon para realizar un ajuste más preciso y poder incorporar nuevas líneas al ajuste. En el espectro completo se asignaron un total de 27 transiciones. En la Figura 21 podemos ver una ampliación de la zona 9300- 10500 MHz donde podemos ver algunas de las transiciones asignadas para ver la buena concordancia. Las 27 líneas asignadas, todas de tipo b , se muestran en la Tabla 2. Tras el ajuste y con una predicción muy buena, se buscaron líneas de tipo a o c pero no se observó ninguna, posiblemente debido a su bajo momento dipolar, de acuerdo con los valores predichos.

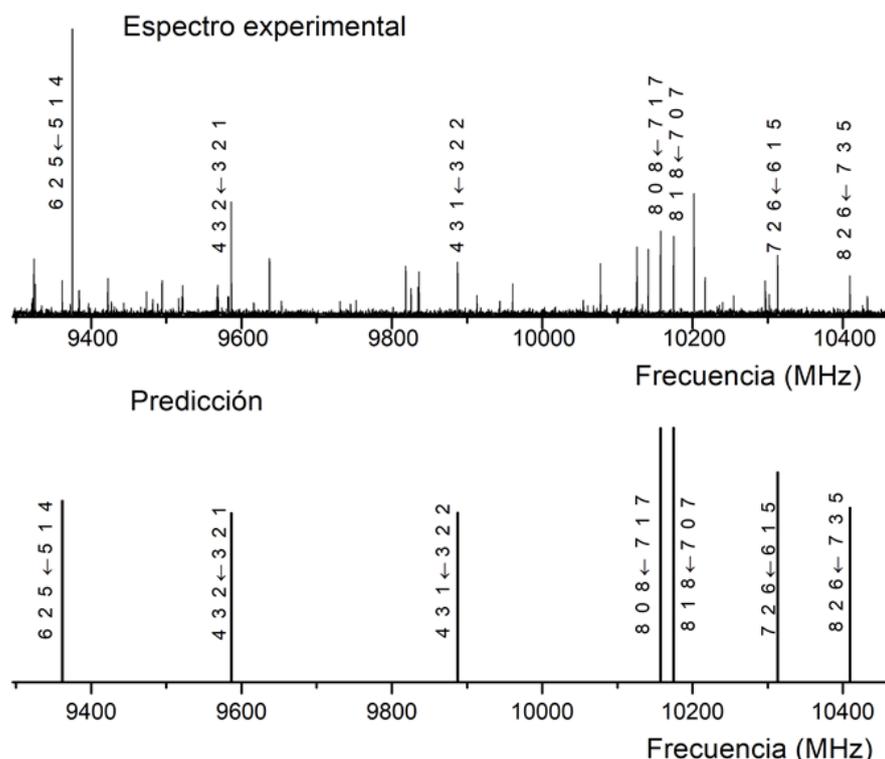


Figura 21. Algunas de las transiciones asignadas en el espectro experimental junto con su predicción.

Transiciones asignadas				Frecuencia (MHz)	Transiciones asignadas				Frecuencia (MHz)
6 0 6	←	5 1 5		7692.11185	5 3 3	←	4 2 2	10774.4494	
6 1 5	←	5 2 4		7925.13314	8 1 7	←	7 2 6	10890.5771	
3 3 1	←	2 2 0		8245.91637	4 4 1	←	3 3 0	11290.29967	
3 3 0	←	2 2 1		8306.55949	4 4 0	←	3 3 1	11298.76706	
5 2 4	←	4 1 3		8424.76919	8 2 7	←	7 1 6	11331.86076	
7 0 7	←	6 1 6		8932.80189	9 0 9	←	8 1 8	11374.95724	
6 2 5	←	5 1 4		9361.45311	9 1 9	←	8 0 8	11381.81368	
7 1 6	←	6 2 5		9473.59934	6 3 4	←	5 2 3	11799.38927	
4 3 2	←	3 2 1		9586.33033	9 1 8	←	8 2 7	12213.03182	
4 3 1	←	3 2 2		9887.65521	9 2 7	←	8 3 6	12242.99089	
8 0 8	←	7 1 7		10157.45304	9 2 8	←	8 1 7	12426.3723	
8 1 8	←	7 0 7		10174.82792	10 0 10	←	9 1 9	12589.47014	
7 2 6	←	6 1 5		10313.14018	10 1 10	←	9 0 9	12592.11012	
8 2 6	←	7 3 5		10409.27015					

Tabla 2. Transiciones asignadas y su frecuencia experimental.

Las constantes rotacionales obtenidas tras el ajuste se muestran en la Tabla 3, junto con una comparación de los valores calculados para las dos estructuras más estables. Como puede verse, la especie encontrada experimentalmente corresponde a la estructura 8. Además, puede verse una excelente concordancia entre los valores experimentales y los predichos, por lo que puede decirse que el método de B3LYP-GD3/Def2tzvp proporciona muy buenos resultados.

	Experimental	Teórico B3LYP/Def2tzvp	
		Estructura 8	Estructura 1
A(MHz)	1508.75897	1500.48	1427.17
B(MHz)	843.62143	843.99	781.99
C(MHz)	606.35637	604.50	635.08

Tabla 3. Comparación de las constantes rotacionales obtenidas experimentalmente con las calculadas para las dos estructuras más estables.

Tras acabar la identificación y asignación del confórmero, se sustrajeron las líneas correspondientes con el fin de identificar otros confórmeros. No obstante, no fue posible la identificación de más confórmeros, posiblemente debido a la baja población esperada para el siguiente confórmero más estable, situado a 550 cm^{-1} , que además tiene un momento dipolar muy bajo (1.4 D).

Otro factor adicional que no hemos de olvidar es la presencia de más transiciones rotacionales que las predichas arriba, debido al efecto de la rotación interna, la cual provoca que haya dos estados distintos. Para confirmar si la molécula tiene rotación interna (o si la barrera es

apreciable o no), 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 (Figura 22), obteniéndose gráficas de energía potencial cuya forma es periódica, y cuyo máximo indica la barrera de energía potencial necesaria para la rotación. Como puede verse en la Figura 23, la altura de la barrera energética en nuestro caso es de 140 cm^{-1} . Como dato indicativo, la rotación interna se produce cuando la altura de la barrera es inferior a unos $300\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$. Por tanto, la barrera obtenida es baja y se producirá un desdoblamiento de las transiciones rotacionales. Así, cada línea asignada debería de tener su par. No obstante, la separación de las líneas no es constante, sino variable, y tendrán una separación grande debido a la barrera tan baja. Esto hace que su asignación no sea una tarea sencilla y quede fuera de los objetivos de este trabajo, por lo que no se ha llevado a cabo.

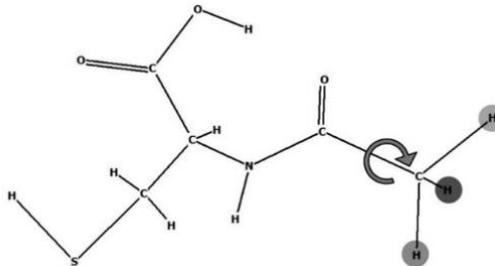


Figura 22. Libre giro del carbono metílico.

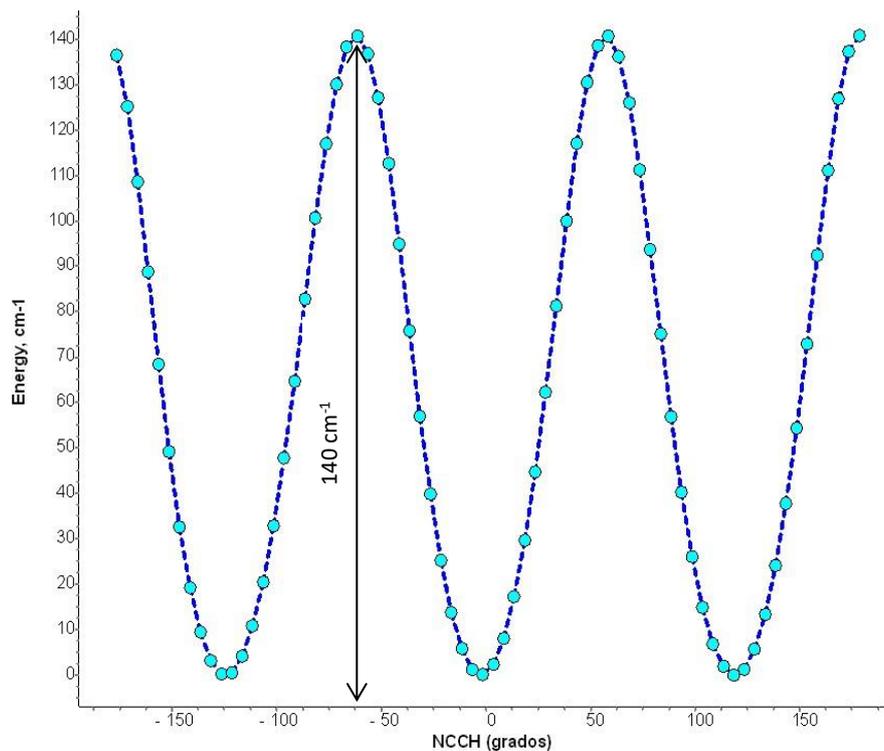


Figura 23. Superficie de energía potencial relajada de la torsión del grupo metilo que dar lugar a rotación interna.

6.6 Comparativa de campos de fuerzas, niveles de teoría y bases de cálculo.

En este trabajo se han utilizado distintos campos de fuerzas con el fin de asegurar la obtención de los confórmeros más estables de la N-acetilcisteína. Así, una vez realizada la asignación experimental, en este estudio se han encontrado observaciones muy importantes.

La primera observación que se realiza es que la búsqueda conformacional aporta un diferente número de confórmeros en función del campo de fuerzas utilizado, tal y como se muestra en la Tabla 4. Cada uno de los resultados proporcionados por las búsquedas conformacionales está descrito en un fichero que proporciona las coordenadas de los átomos, parámetros energéticos y otras propiedades de cada confórmero.

	MMFFs	AMBER	OPLS	OPLS2005	OPLS3
nº de confórmeros	26	70	17	36	49

Tabla 4. Número de confórmeros aportado por cada campo de fuerzas.

Se observa que los campos de fuerzas AMBER y OPLS3 son los que obtienen un mayor número de confórmeros. Puesto que se han usado los mismos criterios de convergencia, esto ha de ser debido a que cada campo de fuerzas tiene en cuenta distintos valores de estabilización para las interacciones entre los átomos de los distintos grupos funcionales de la molécula.

Está claro que AMBER ha proporcionado unos resultados excelentes en la molécula de la N-acetilcisteína. No obstante, en cuanto al campo de fuerzas MMFFs, el confórmero más estable es el segundo obtenido por AMBER. Es decir, no proporcionó el confórmero más estable lo cual hubiese tenido resultados desastrosos en su búsqueda experimental (no se hubiese encontrado nada). Teniendo en cuenta que el MMFFs es muy empleado, este trabajo hace hincapié en la importancia de utilizar una metodología correcta para el problema a tratar.

Por otro lado, las estructuras de los confórmeros obtenidos por los campos de fuerzas se optimizan posteriormente con distintos niveles de cálculo mediante el software Gaussian 16. Se probaron:

- Un nivel de cálculo DFT, el funcional B3LYP y una base extendida, 6-311++G(d,p), añadiendo las dispersiones de Grimme y Becke Johnson.
- Un nivel de cálculo post-HF, con el método MP2.

- El nivel de cálculo DFT descrito durante este trabajo, el funcional B3LYP con una base cálculo de Ahlrichs, concretamente: Def2tzvp, añadiendo las dispersiones de Grimme y Becke Johnson.

Los resultados se muestran en el Anexo 10.2, mientras que la Tabla 5 muestra una comparativa para el confórmero más estable observado experimentalmente.

	Experimental	B3LYP-GD3/Def2tzv	MP2/6-311++G (d, p)	B3LYP/6-311++G(d, p)
A(MHz)	1508.75897	1500	1507	1494
B(MHz)	843.62143	844	843	839
C(MHz)	606.35637	604	606	602
μ_A (D)	No observado	-1.1	-0.9	-1.1
μ_B (D)	Observado	4.4	-4.3	-4.4
μ_C (D)	No observado	-1.1	1.0	1.2

Tabla 5. comparativa mediante el empleo de distintas metodologías para el confórmero más estable de la NAC.

Podemos ver que todos los niveles de cálculo y las distintas bases aportan resultados similares en cuanto a las constantes rotacionales y momentos dipolares, con B3LYP/6-311++G (d, p) alejándose un poco más. Por otro lado, la metodología MP2 proporciona los resultados más precisos estructuralmente, pero, sin embargo, no energéticamente. El nivel de cálculo MP2/6-311++G da como confórmero más estable la estructura 1 (ver anexo 10.2), estructura que no ha sido encontrada experimentalmente, mientras que la estructura 8 aparece predicha a 345 cm^{-1} , es decir, con una población baja. Esto deja de manifiesto que no existe actualmente una metodología que proporcione todas las “respuestas”, en este caso, estructura y energía. Curiosamente, el nivel de cálculo B3LYP/6-311++G (d, p), establece la estructura 1 por encima de la estructura 8 a 314 cm^{-1} , es decir, lo opuesto a MP2. Por lo tanto, el nivel de cálculo B3LYP-GD3/Def2tzv es el que obtuvo mejores resultados, pues el confórmero 8 se ha observado experimentalmente con unas constantes rotacionales muy próximas a las obtenidas experimentalmente, mientras que la estructura 1 no ha sido hallada a pesar de los esfuerzos, tal y como predice esta metodología.

Finalmente, mencionar que todas las metodologías empleadas predicen una estabilización entrópica (ver la energía libre de Gibbs en el Anexo 10.2) de la estructura 1 frente a la estructura 8.

6.7 Estabilidad estructural de la NAC frente a la cisteína

Habiendo obtenido la estructura del conformero más estable de la NAC, se comparará su estructura con la de la cisteína. Las estructuras experimentales de la cisteína han sido ya caracterizadas⁴². En cualquier caso, los cálculos de la cisteína se han repetido utilizando la misma metodología que para la NAC (B3LYP-GD3/Def2tzvp). La Figura 24 recoge el conformero obtenido en este estudio junto con las dos estructuras más estables detectadas de la cisteína. Como se puede observar, la estructura más estable y observada de la NAC y la estructura 22 de la cisteína son muy similares.

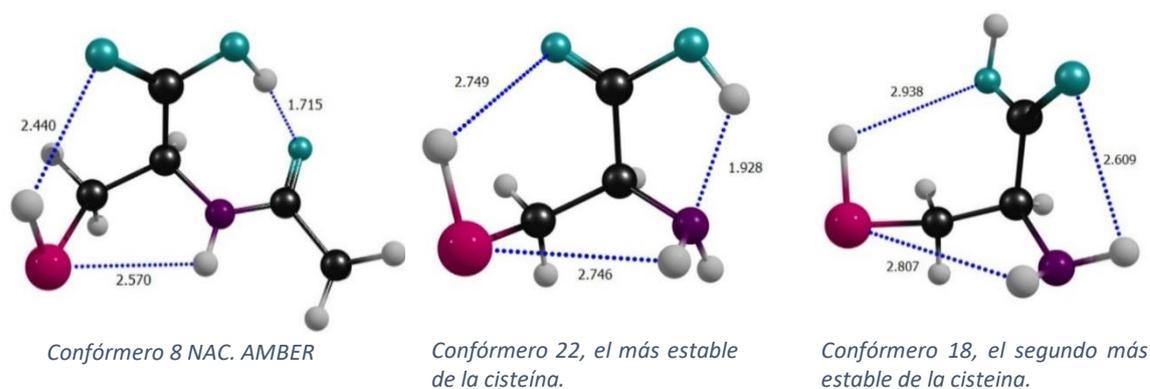


Figura 24. Comparación del conformero más estable de NAC junto con los dos conformeros más estables de la cisteína.

Podemos observar que introducir el grupo acetato a la cisteína para formar la NAC, proporciona mayor estabilidad a todos los enlaces de hidrógeno de la molécula, pues en la estructura 22 al eliminar la interacción entre el H ácido del ácido carboxílico y el nitrógeno la molécula cambia de disposición de tal forma que el resto de las interacciones, que sí se mantienen respecto a la cisteína, se ven reforzadas al disminuir la distancia del enlace de hidrógeno. Además, ahora el H del ácido carboxílico, que es el H de mayor acidez de la molécula, interactúa con un oxígeno en vez de con un nitrógeno. Como el oxígeno es más electronegativo el enlace de hidrógeno es más fuerte, provocando una mayor estabilización.

Para corroborar la existencia de estas interacciones se realiza un NCI Plot (Non-Covalent Interactions) a los dos conformeros más estables de la cisteína y al conformero de la NAC. La comparación se muestra en la Figura 25. El H del tiol en ambos casos queda estabilizado por un oxígeno, dando lugar a una interacción débil representada en verde. El programa utilizado

representa las interacciones más fuertes en azul, por lo que podemos confirmar que en la NAC el tiol está más estabilizado.

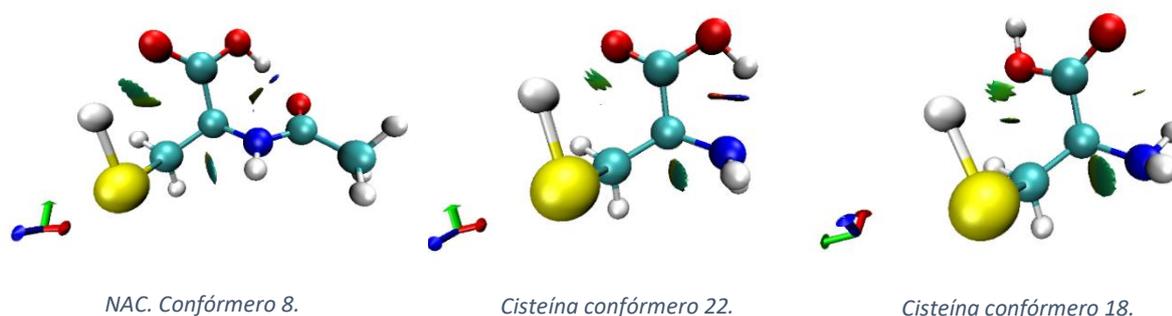


Figura 25. Comparación del análisis de interacciones no covalentes (NCI Plot) de los conformeros más estables de cisteína y NAC. Las superficies en azul corresponden a fuerzas atractivas, las repulsiones se muestran en rojo y en tonos verdes se representan las interacciones débiles.

Aunque especulativo, podemos acabar el trabajo con una posible relación entre estas diferencias observadas en las estructuras de las dos biomoléculas y el papel que desempeñan biológicamente. Como ya hemos mencionado, el conformero más estable de NAC tiene sus tres H ácidos protegidos. Esta estabilidad en concreto del H del grupo tiol sería la responsable de que la NAC no dimerice creando puentes disulfuro en disolución tal y como hace la cisteína cuyo grupo tiol tiene una interacción muy débil, enlace intramolecular más fácil de “romper”. El hecho de que la NAC no se dimerice¹² es importante, pues si esto ocurriera la actividad antioxidante de la NAC quedaría inactiva. Por otro lado, se sabe que la cisteína dimeriza en el entorno extracelular, a través del grupo tiol. Una hipótesis para explicar este hecho es considerar la mayor distancia del enlace de hidrógeno, que provoca que el enlace sea más débil, y por tanto más susceptible a deprotonación, que es de 2.749 Å para el conformero 22 frente a 2.440 Å para la NAC.

7. CONCLUSIONES

El estudio del panorama conformacional de la N-acetilcisteína dio como resultado 50 conformeros estables por debajo de 30 KJ/mol para el campo de fuerzas AMBER. Entre los conformeros obtenidos, se pueden diferenciar tres grupos. El primer grupo engloba a aquellos conformeros que presentan tres enlaces de hidrógeno, estabilizando por tanto todos sus hidrógenos ácidos, estas son las estructuras más estables. Después, el segundo grupo está formado por aquellos conformeros que solo estabilizan dos de sus tres hidrógenos ácidos. Finalmente, el tercer grupo contiene aquellos conformeros que solo poseen un enlace de hidrógeno en su estructura, los más inestables. Esta búsqueda conformacional determinó el conformero más estable de la NAC.

Se ha obtenido el espectro rotacional de la NAC y se ha encontrado un conformero. La asignación del espectro experimental confirmó el conformero obtenido como el más estable.

Los campos de fuerzas AMBER, OPLS, OPLS2005 y OPLS3 fueron capaces de encontrar la estructura observada experimentalmente, mientras que MMFFs no. La metodología MP2 predice la estructura observada considerablemente alta en energía, mientras que la teoría DFT da resultados correctos.

Los cálculos computacionales indican que la NAC presenta rotación interna, pudiendo explicar el elevado número de líneas no asignadas.

La comparación del conformero más estable de la NAC, con el de cisteína al mismo nivel de cálculo, permitió plantear hipótesis sobre la mayor estabilidad de la NAC ante la oxidación y la dimerización, pudiendo ser debida a la mayor fuerza de enlace intramolecular del H del grupo tiol de la NAC.

8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Liguori, I.; Russo, G.; Curcio, F.; Bulli, G.; Aran, L.; Della-Morte, D.; Gargiulo, G.; Testa, G.; Cacciatore, F.; Bonaduce, D.; Abete, P. Oxidative Stress, Aging, and Diseases. *Clin. Interv. Aging* **2018**, Volume 13 (29), 757–772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>.
- (2) Bakadia, B. M.; Boni, B. O. O.; Ahmed, A. A. Q.; Yang, G. The Impact of Oxidative Stress Damage Induced by the Environmental Stressors on COVID-19. *Life Sci.* **2021**, 264 (September 2020), 118653. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118653>.
- (3) Dominari, A.; Hathaway III, D.; Kapasi, A.; Paul, T.; Singh Makkar, S.; Castaneda, V.; Gara, S.; Mohan Singh, B.; Agadi, K.; Butt, M.; Retnakumar, V.; Chittajallu, S.; Taugir, R.; Khawar Sana, M.; Razzack, S.; Moallem, N.; Alvarez, A.; Talalaev, M. Bottom-up Analysis of Emergent Properties of N-Acetylcysteine as an Adjuvant Therapy for COVID-19. <https://doi.org/10.5501/wjv.v10.i2.34>.
- (4) Aldini, G.; Altomare, A.; Baron, G.; Vistoli, G.; Carini, M.; Borsani, L.; Sergio, F. N-Acetylcysteine as an Antioxidant and Disulphide Breaking Agent: The Reasons Why. *Free Radic. Res.* **2018**, 52 (7), 751–762. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1468564>.
- (5) Poole, L. B. The Basics of Thiols and Cysteines in Redox Biology and Chemistry. *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc. 2015, pp 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.013>.
- (6) Altomare, A.; Baron, G.; Brioschi, M.; Longoni, M.; Butti, R.; Valvassori, E.; Tremoli, E.; Carini, M.; Agostoni, P.; Vistoli, G.; Banfi, C.; Aldini, G. N-Acetyl-Cysteine Regenerates Albumin Cys34 by a Thiol-Disulfide Breaking Mechanism: An Explanation of Its Extracellular Antioxidant Activity. *Antioxidants* **2020**, 9 (5), 367. <https://doi.org/10.3390/antiox9050367>.
- (7) Lu, S. C. Regulation of Glutathione Synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*. Pergamon February 1, 2009, pp 42–59. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005>.
- (8) Balsamo, R.; Lanata, L.; Egan, C. G. Mucoactive Drugs. *European Respiratory Review*. European Respiratory Society June 1, 2010, pp 127–133. <https://doi.org/10.1183/09059180.00003510>.
- (9) Yuan, S.; Hollinger, M.; Lachowicz-Scroggins, M. E.; Kerr, S. C.; Dunican, E. M.; Daniel, B. M.; Ghosh, S.; Erzurum, S. C.; Willard, B.; Hazen, S. L.; Huang, X.; Carrington, S. D.; Oscarson, S.; Fahy, J. V. Oxidation Increases Mucin Polymer Cross-Links to Stiffen Airway Mucus Gels. *Sci. Transl. Med.* **2015**, 7 (276), 276ra27–276ra27. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010525>.
- (10) Putzu, M.; Gräter, F.; Elstner, M.; Kubař, T. On the Mechanism of Spontaneous Thiol-Disulfide Exchange in Proteins. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, 20 (23), 16222–16230. <https://doi.org/10.1039/c8cp01325j>.
- (11) de Andrade, K. Q.; Moura, F. A.; dos Santos, J. M.; de Araújo, O. R. P.; Santos, J. C. de F.; Goulart, M. O. F. Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine. *International Journal of Molecular*

- Sciences*. MDPI AG December 18, 2015, pp 30269–30308.
<https://doi.org/10.3390/ijms161226225>.
- (12) Samuni, Y.; Goldstein, S.; Dean, O. M.; Berk, M. The Chemistry and Biological Activities of N-Acetylcysteine. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2013, pp 4117–4129. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.016>.
- (13) Suhail, S.; Zajac, J.; Fossum, C.; Lowater, H.; McCracken, C.; Severson, N.; Laatsch, B.; Narkiewicz-Jodko, A.; Johnson, B.; Liebau, J.; Bhattacharyya, S.; Hati, S. Role of Oxidative Stress on SARS-CoV (SARS) and SARS-CoV-2 (COVID-19) Infection: A Review. *Protein Journal*. Springer December 1, 2020, pp 644–656.
<https://doi.org/10.1007/s10930-020-09935-8>.
- (14) Montaña, L. M.; Flores-Soto, E. COVID-19 y Su Asociación Con Los Inhibidores de La Enzima Convertidora de Angiotensina y Los Antagonistas de Los Receptores Para Angiotensina II. *Rev. la Fac. Med.* **2020**, *63* (4), 30–34.
<https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2020.63.4.05>.
- (15) Debnath, U.; Mitra, A.; Dewaker, V.; Prabhakar, Y. S.; Tadala, R.; Krishnan, K.; Wagh, P.; Velusamy, U.; Subramani, C.; Agarwal, S.; Vrati, S.; Baliyan, A.; Kurpad, A. V.; Bhattacharyya, P.; Mandal, A. N-Acetyl Cysteine: A Tool to Perturb SARS-CoV-2 Spike Protein Conformation. **2021**. <https://doi.org/10.26434/CHEMRXIV.12687923.V2>.
- (16) Beatriz de Pascual-Teresa. Nobel de Química 2013: Combinación de Métodos de Mecánica Molecular y Mecánica Cuántica Para Entender y Predecir Procesos Químicos Comple. *An. Real Acedamia Farm.* **2014**, *80*, 408–432.
- (17) Andrés Bort, J. M. (ed. .; Alvariño Herrero, J. M.; Andrés Bort, J. M.; Borondo Rodríguez, F.; Caballol Lorenzo, R.; Frau Munar, J. *Química Teórica y Computacional*, 1st ed.; Castelló de la Plana, U. J. I. S. de C. i P., Ed.; 2001.
- (18) Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry*; John Wiley & Sons Ltd, 2004.
[https://doi.org/10.1016/0025-5408\(96\)80018-3](https://doi.org/10.1016/0025-5408(96)80018-3).
- (19) Ramachandran, K. I.; Deepa, G.; Namboori, K. *Computational Chemistry and Molecular Modeling*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008.
- (20) Engel, T.; Reid, P.; Hehre, W. *Química Física*; Pearson, 2006.
- (21) Ponder, J. W.; Case, D. A. Force Fields for Protein Simulations. *Adv. Protein Chem.* **2003**, *66*, 27–85.
- (22) Bachrach, S. M. *Computational Organic Chemistry*, Second.; Wiley, 2014.
- (23) Lewars, E. G. Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics. *Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics*. 2011, pp 1–664.
<https://doi.org/10.1007/978-90-481-3862-3>.
- (24) Orio, M.; Pantazis, D. A.; Neese, F. Density Functional Theory. *Photosynthesis Research*. 2009, pp 443–453. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9404-8>.
- (25) Bockstedte, M.; Kley, A.; Neugebauer, J.; Scheffler, M. Density-Functional Theory

- Calculations for Poly-Atomic Systems: Electronic Structure, Static and Elastic Properties and Ab Initio Molecular Dynamics. *Comput. Phys. Commun.* **1997**, *107* (1–3), 187–222. [https://doi.org/10.1016/s0010-4655\(97\)00117-3](https://doi.org/10.1016/s0010-4655(97)00117-3).
- (26) Singh, David J., Nordstrom, L. Density Functional Theory and Methods. In *Planewaves, Pseudopotentials and the LAPW Method*; Springer US, 1994; pp 5–21. https://doi.org/10.1007/978-0-387-29684-5_2.
- (27) Density Functional (DFT) Methods.
- (28) Grimme, S. Density Functional Theory with London Dispersion Corrections. *Ltd. WIREs Comput Mol Sci* **2011**, *1*, 211–228. <https://doi.org/10.1002/wcms.30>.
- (29) Grimme, S.; Antony, J.; Ehrlich, S.; Krieg, H. A Consistent and Accurate Ab Initio Parametrization of Density Functional Dispersion Correction (DFT-D) for the 94 Elements H-Pu. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132* (15), 1–20. <https://doi.org/10.1063/1.3382344>.
- (30) Becke, A. D.; Johnson, E. R. A Density-Functional Model of the Dispersion Interaction. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123* (15), 154101. <https://doi.org/10.1063/1.2065267>.
- (31) Grimme, S.; Ehrlich, S.; Goerikg, L. Effect of the Damping Function in Dispersion Corrected Density Functional Theory. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32* (7), 1456–1465. <https://doi.org/10.1002/jcc>.
- (32) James B. Foresman; AEleen Frisch. *Exploring Chemistry With Electronic Structure Methods: A Guide to Using Gaussian: Foresman, James B., Frisch, AEleen: 9780963676931: Amazon.Com: Books*.
- (33) Engel, T. Quantum Chemistry. Pearson 2013, p 533.
- (34) Alonso, J. L.; López, J. C. Microwave Spectroscopy of Biomolecular Building Blocks. In *Encyclopedia of Signaling Molecules*; 2015; pp 2–4. https://doi.org/10.1007/128_2014_601.
- (35) Hollas, J. M. Modern Spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*. Wiley and sons 1988, p 449. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(88\)80069-2](https://doi.org/10.1016/0584-8539(88)80069-2).
- (36) Atkins, P.; de Paula, J. *Química Física*, 8th ed.; Editorial Médica Panamericana, 2008.
- (37) Teresa Flores Reyes; Luis Ponce. Solución Láser Para Un Problema Espinoso, La Ablación Láser Como Método Para Remover Las Espinas Del Fruto de Tuna. *GmbH & Co.* 2011, p 126.
- (38) Stefano Rampino. Schematic diagram of a supersonic expansion from a nozzle. The change... | Download Scientific Diagram.
- (39) Pinacho Morante, P. Microsolvation of Biomolecular Models by Microwave Spectroscopy: Structure and Cooperative Effects. *Tesis Dr.* **2016**.
- (40) Lin, C. C.; Swalen, J. D. Internal Rotation and Microwave Spectroscopy. *Rev. Mod. Phys.* **1959**, *31* (4), 841–892.

- (41) Lister, V. D. G.; Macdonald, J. N.; Owen., N. L. Internal Rotation and Inversion. An Introduction to Large Amplitude Motions in Molecules. Academic Press, London 1978. *Angew. Chemie* **1979**, *91* (5), 450–451. <https://doi.org/10.1002/ange.19790910533>.
- (42) Goldsztejn, G.; Mundlapati, V. R.; Brenner, V.; Gloaguen, E.; Mons, M.; Cabezas, C.; León, I.; Alonso, J. L. Intrinsic Folding of the Cysteine Residue: Competition between Folded and Extended Forms Mediated by the-SH Group. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22* (36), 20284–20294. <https://doi.org/10.1039/d0cp03136d>.

9. ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ECUACIONES

Figura 1. Desacetilación de la NAC para dar cisteína. Fuente: A review on the possible molecular mechanism of action of N-acetylcysteine against insulin resistance and type-2 diabetes development.	7
Figura 2. Obtención de glutatión a partir de NAC. Fuente: Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits	9
Figura 3. Estructura química de las distintas formas de glutatión. a) Glutatión reducido (GSH), su grupo activo es el grupo SH. b) Glutatión oxidado, formado por dos moléculas de GSH unidas por un enlace disulfuro. (GSSG)	9
Figura 4. El estrés oxidativo causa una excesiva formación de enlaces disulfuro en la mucosa. Fuente: Oxidation increases mucin polymer cross-links to stiffen	11
Figura 5. Intercambio tiol disulfuro.....	11
Figura 6. La NAC rompe los puentes disulfuro. Fuente: N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphidebreaking agent: the reasons why	12
Figura 7. NAC, cisteína y GHS, oxidantes a través de un grupo tiol. Fuente: Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine.....	12
Figura 8. La proteína de espiga se une al ACE2 para entrar en las células. Fuente: COVID-19 y su asociación con los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y los antagonistas de los receptores para angiotensina II.....	14
Figura 9. Diferencia en la interacción proteína-proteína entre el receptor ACE2(verde) y la proteína de espiga (azul) antes y después de la conjugación con NAC a través del mecanismo de intercambio de tiol. La línea roja muestra la distancia entre el terminal C y el terminal N de la proteína de espiga (rosa), antes (9 Å) y después (130,2Å) de la conjugación NAC. Fuente: N-acetyl cysteine: A tool to perturb SARS-CoV-2 spike protein conformation.	14
Figura 10. Superficie de energía potencial (SEP). Fuente: Computational Chemistry and Molecular Modeling	18
Figura 11. Términos fundamentales de un campo de fuerzas.Fuente: Dinámica molecular, Juan A. Bueren-Calabuig.....	20
Figura 12. Comparativa de los campos de fuerzas empleados en este trabajo. Pn es el polinomio de grado n utilizado.....	22
Figura 13. En rojo podemos ver la STO, en azul la GTO. Fuente: Quantum Chemistry & Spectroscopy de Thomas Engel	31
Figura 14. N-acetilcisteína. Destacado el grupo metilo que ocasiona la rotación interna.....	36
Figura 15. Función del potencial proporcionado por la rotación interna de un grupo metilo al cambiar el ángulo α	36
Figura 16. Posibles torsiones N-acetilcisteína	37
Figura 17. Confórmeros más estables de la N-acetilcisteína (8 primeros) y los dos más inestables (2 últimos).	38
Figura 18. Transiciones de tipo b en la predicción del espectro de la N-acetilcisteína.....	42
Figura 19. Barra de muestra compactada de la NAC.....	43
Figura 20. Espectro experimental de la NAC.....	43
Figura 21. Algunas de las transiciones asignadas en el espectro experimental junto con su predicción.	44
Figura 22. Libre giro del carbono metílico.....	46
Figura 23. Superficie de energía potencial relajada de la torsión del grupo metilo que dar lugar a rotación interna.	46

Figura 24. Comparación del confórmero más estable de NAC junto con los dos confórmeros más estables de la cisteína.49

Figura 25. Comparación del análisis de interacciones no covalentes (NCI Plot) de los confórmeros más estables de cisteína y NAC. Las superficies en azul corresponden a fuerzas atractivas, las repulsiones se muestran en rojo y en tonos verdes se representan las interacciones débiles.50

Tabla 1. Parámetros espectroscópicos calculados y energías relativas calculadas con optimización a nivel B3LYP-GD3/ Def2tzvp. Se muestran los 8 confórmeros más estables de la NAC. Los dos más inestables aparecen a la derecha.39

Tabla 2. Transiciones asignadas.45

Tabla 3. Comparación de los parámetros espectroscópicos proporcionados para las dos estructuras más estables con los resultados experimentales.45

Tabla 4. Número de confórmeros aportado por cada campo de fuerzas.47

Tabla 5. comparativa para el confórmero más estable.48

Ecuación 1. Operador Hamiltoniano.26

Ecuación 2. Energía en forma de expresión de Taylor en función del parámetro de perturbación.26

Ecuación 3. Función de onda modificada en forma de expresión de Taylor en función del parámetro de perturbación.26

Ecuación 4. Expresión de Kohn-Sham.28

Ecuación 5. Energía dispersiones Becke-Johnson (BJ).30

Ecuación 6. Expresión función de onda como combinación lineal de orbitales atómicos (LCAO).30

Ecuación 7. Expresión orbitales atómicos.30

Ecuación 8. Parte radial funciones gaussianas (GTO).30

Ecuación 9. Contracción de funciones combinando distintas funciones gaussianas.31

Ecuación 10. Ecuación de Schrödinger independiente del tiempo.32

Ecuación 11. Energía es el momento de inercia (I).32

Ecuación 12. Expresión constante rotacional B.33

Ecuación 13. Ley de distribución de Boltzmann33

10. ANEXOS

10.1 Resultados búsqueda conformacional

Datos proporcionados por el nivel de cálculo **B3LYP-GD3/Def2tzv**.

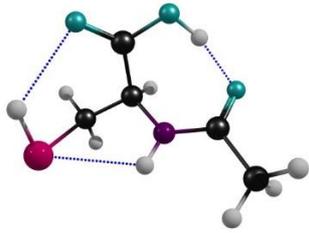
Confórmero	8	1	7	11	23	50	65	37	6	24	15
A(MHz)	1500	1436	1424	1188	1518	1870	1494	1414	1448	1136	1139
B(MHz)	844	783	785	938	839	669	769	819	782	1019	1018
C(MHz)	604	636	638	564	607	557	537	630	607	631	635
μ_A (D)	-1.1	0.8	2.0	1.5	-1.2	-3.0	-0.8	2.2	0.2	-4.7	-4.9
μ_B (D)	4.4	-1.4	-1.4	5.0	5.6	4.6	1.2	0.9	0.6	1.1	2.2
μ_C (D)	-1.1	1.0	0.8	-0.1	-1.8	1.8	0.7	0.0	2.4	2.7	2.2
χ_{aa1}	2	2	2	1	2	2	3	2	2	-2	-2
χ_{bb1}	0	-3	-4	1	0	-2	1	0	-3	1	1
χ_{cc1}	-2	1	2	-2	-2	0	-3	-2	0	1	1
ΔE (cm-1)	0	775	963	867	1006	1032	1157	1243	1286	1270	1304
ΔE_{zpe} (cm-1)	0	553	710	763	941	959	1010	1018	1061	1218	1248
ΔG (cm-1)	0	141	204	567	824	858	769	411	417	986	995

Confórmero	56	2	9	13	4	33	68	29	34	39	3
A(MHz)	1393	1241	1529	1440	1062	1386	1838	1227	1699	1226	1240
B(MHz)	794	877	706	763	953	804	669	962	730	964	868
C(MHz)	638	598	557	539	588	610	563	627	612	628	606
μ_A (D)	-0.8	2.4	-0.4	0.4	1.6	-2.3	-3.0	-1.1	-4.4	0.2	1.2
μ_B (D)	-1.6	0.7	-2.0	-3.3	1.2	2.8	5.7	2.2	3.8	1.2	1.6
μ_C (D)	3.4	-1.3	0.7	1.2	-2.5	1.9	1.1	-3.7	-2.7	-4.0	-3.8
χ_{aa1}	2	1	2	2	2	2	2	-3	2	-2	1
χ_{bb1}	-4	-1	-1	0	-3	-2	-3	2	-4	2	-2
χ_{cc1}	2	0	-1	-3	1	0	1	1	2	0	1
ΔE (cm-1)	1515	1571	1707	1689	1745	1666	1745	1957	1862	2137	2158
ΔE_{zpe} (cm-1)	1254	1316	1453	1455	1477	1515	1615	1703	1765	1863	1884
ΔG (cm-1)	705	852	837	937	805	1065	1405	1302	1480	1381	1298

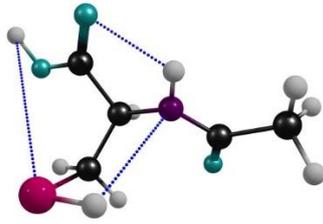
Confórmero	36	43	14	20	66	25	53	48	16	30	27
A(MHz)	1205	1789	1078	1202	1545	1449	1208	1344	1215	1219	1126
B(MHz)	977	733	954	899	695	752	971	815	900	899	900
C(MHz)	627	604	579	594	563	545	630	611	588	588	598
μ_A (D)	0.1	-3.0	-1.6	2.7	-1.2	-1.6	1.4	-3.4	2.1	2.1	3.3
μ_B (D)	0.3	0.7	-0.5	0.0	-2.0	-4.3	-0.3	3.4	1.4	1.4	-2.1
μ_C (D)	-2.3	-3.8	4.6	-2.5	3.7	3.0	-2.4	1.8	4.1	4.1	2.1
χ_{aa1}	-3	2	0	1	2	2	-3	2	1	1	1
χ_{bb1}	1	-4	-3	-1	-2	0	2	-3	1	1	-2
χ_{cc1}	2	2	2	0	-1	-2	1	0	-1	-2	1
ΔE (cm-1)	2124	2137	2272	2287	2288	2342	2445	2401	2567	2567	2454
ΔE_{ZPE} (cm-1)	1906	1908	1989	1993	1997	2060	2172	2195	2254	2257	2269
ΔG (cm-1)	1496	1598	1219	1406	1346	1469	1699	1654	1569	1596	1943

Confórmero	32	67	54	26	70	47	45	51	46	62	64
A(MHz)	1417	1771	1497	1234	1420	1676	1223	1106	1398	1779	1316
B(MHz)	763	734	789	911	786	662	1142	902	761	730	852
C(MHz)	634	606	607	592	636	573	753	607	630	605	641
μ_A (D)	2.5	-0.9	1.1	-3.2	-0.7	1.5	-2.0	2.5	3.5	-2.8	-2.1
μ_B (D)	-0.4	0.7	-2.7	0.9	-0.4	-0.7	-0.1	-1.1	-1.3	1.7	-2.0
μ_C (D)	-4.1	-2.0	-2.3	-3.0	0.6	-1.8	-4.2	-0.3	-4.3	-4.7	-2.4
χ_{aa1}	2	2	2	0	2	2	1	0	2	2	2
χ_{bb1}	-4	-4	-1	-2	-3	-5	-3	-2	-4	-4	-4
χ_{cc1}	2	2	-1	2	1	2	2	2	2	2	2
ΔE (cm-1)	2532	2519	2556	2602	2773	2684	2760	2748	2884	2910	2880
ΔE_{ZPE} (cm-1)	2295	2305	2390	2402	2467	2513	2532	2547	2608	2609	2649
ΔG (cm-1)	1978	1989	2044	2011	2023	2141	2364	2052	2129	2166	2217

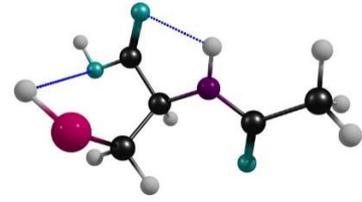
Confórmero	58	55	69	60	63	44
A(MHz)	1386	1376	1513	1406	1224	1036
B(MHz)	908	775	684	743	1131	1003
C(MHz)	727	634	570	550	753	603
μ_A (D)	-5.6	0.9	2.1	3.8	0.0	0.1
μ_B (D)	1.5	-0.8	0.9	0.2	0.7	-3.2
μ_C (D)	-4.8	-1.7	-2.9	-1.6	-3.2	-2.9
χ_{aa1}	2	2	3	3	1	-4
χ_{bb1}	-4	-5	-3	-1	-3	2
χ_{cc1}	1	2	0	-2	2	2
ΔE (cm-1)	2764	2904	2978	3084	3338	3423
ΔE_{ZPE} (cm-1)	2669	2691	2751	2843	3110	3177
ΔG (cm-1)	2416	2256	2170	2324	2866	2577



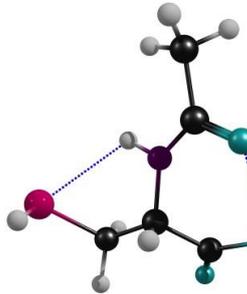
Conformero 8



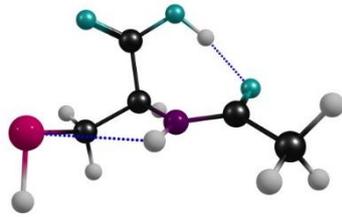
Conformero 1



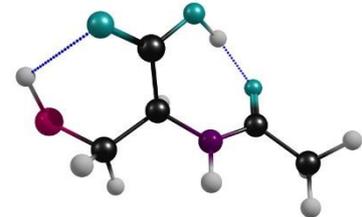
Conformero 7



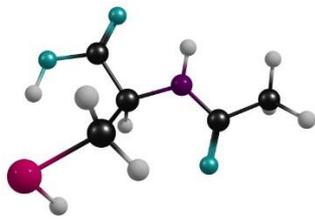
Conformero 11



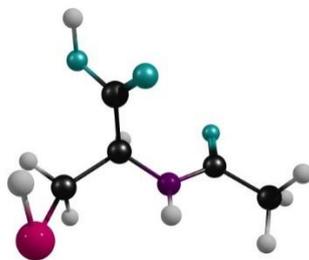
Conformero 23



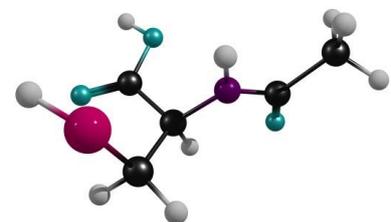
Conformero 50



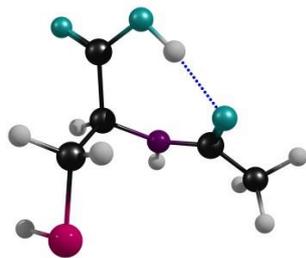
Conformero 65



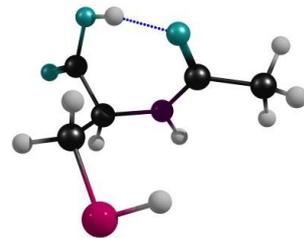
Conformero 37



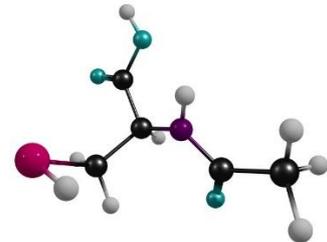
Conformero 6



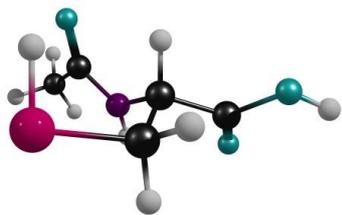
Conformero 24



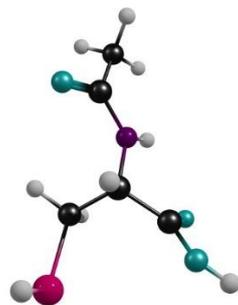
Conformero 15



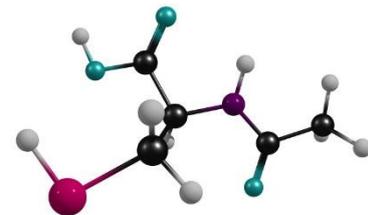
Conformero 56



Conformero 2

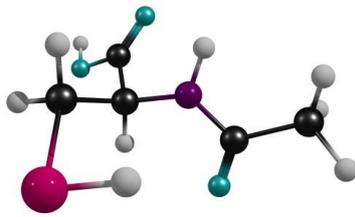


Conformero 9

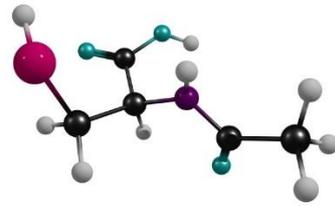


Conformero 13

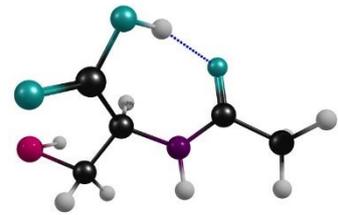




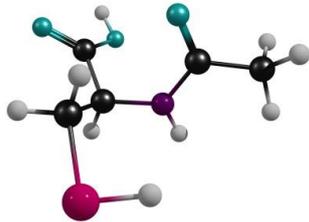
Confórmero 4



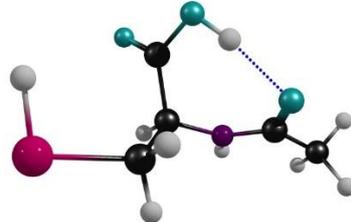
Confórmero 33



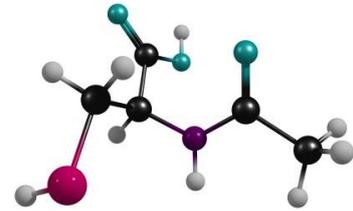
Confórmero 68



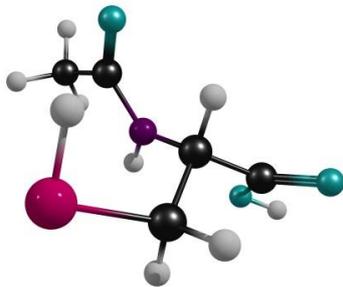
Confórmero 29



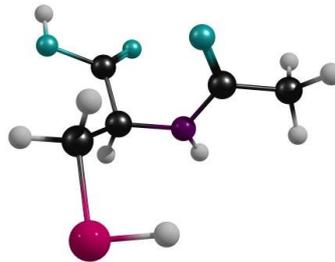
Confórmero 34



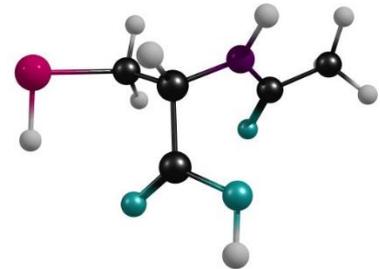
Confórmero 39



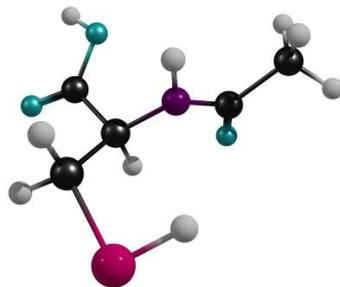
Confórmero 3



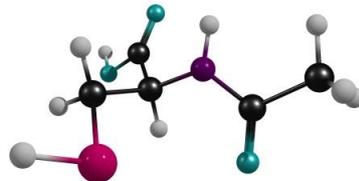
Confórmero 36



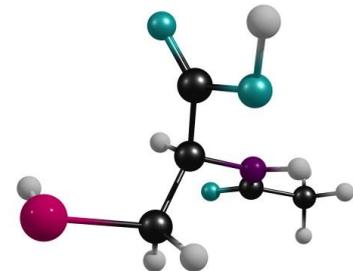
Confórmero 43



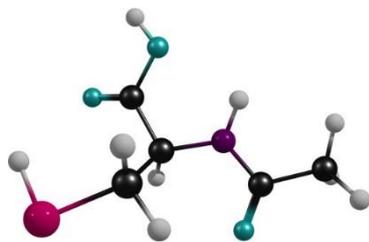
Confórmero 14



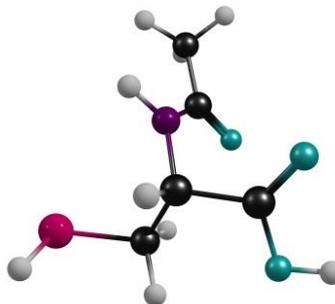
Confórmero 20



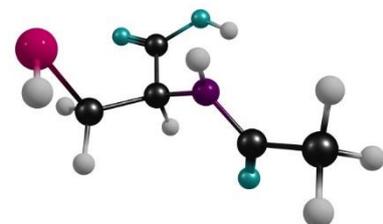
Confórmero 66



Confórmero 25

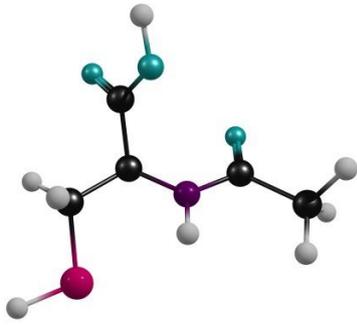


Confórmero 53

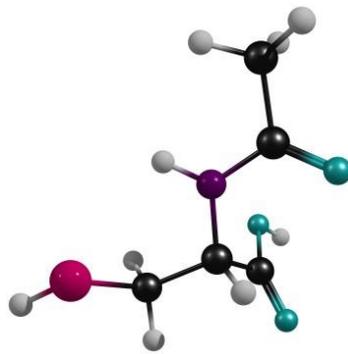


Confórmero 48

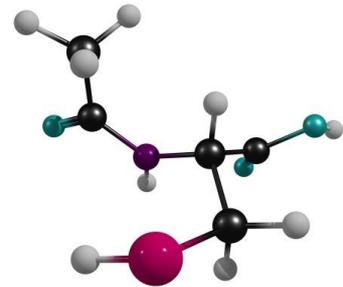




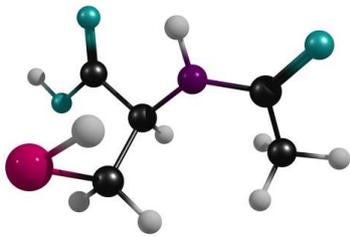
Confórmero 16



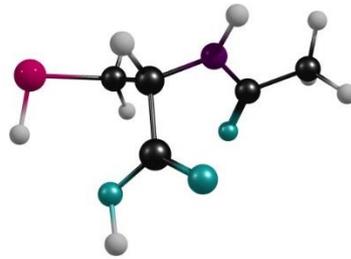
Confórmero 30



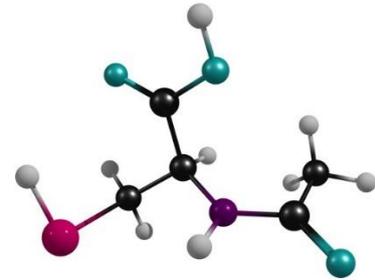
Confórmero 27



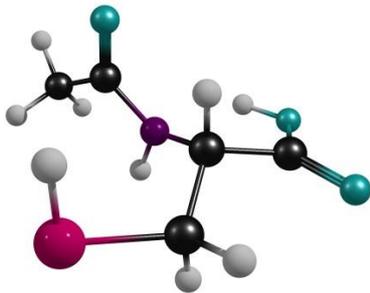
Confórmero 32



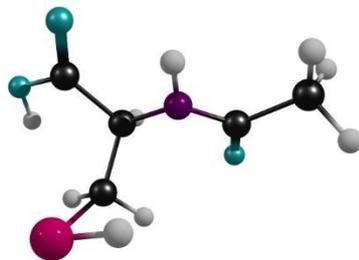
Confórmero 67



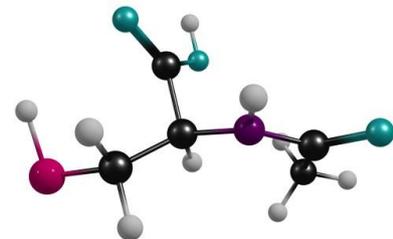
Confórmero 54



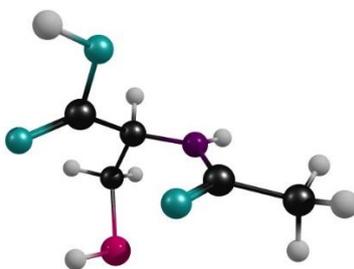
Confórmero 26



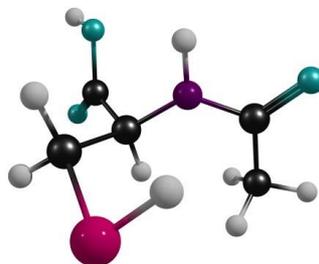
Confórmero 70



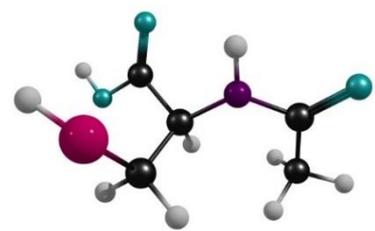
Confórmero 47



Confórmero 45

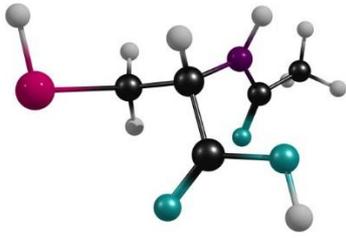


Confórmero 51

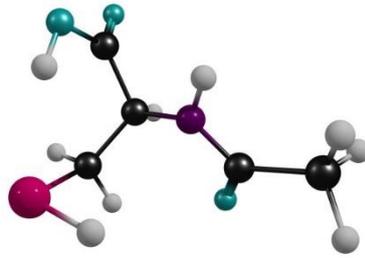


Confórmero 46

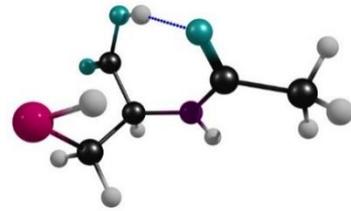




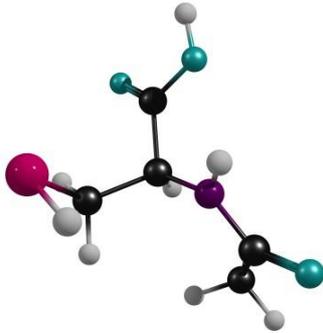
Confórmero 62



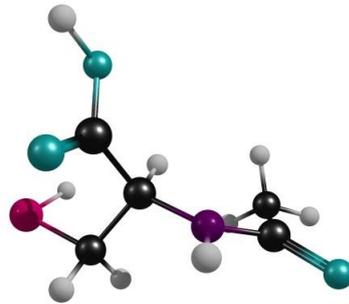
Confórmero 64



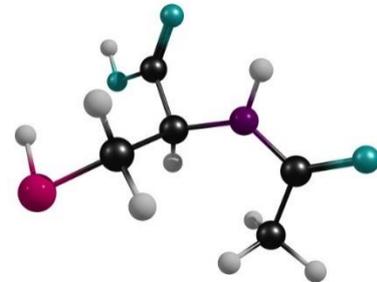
Confórmero 58



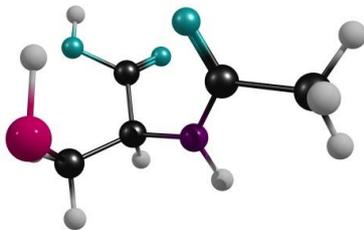
Confórmero 55



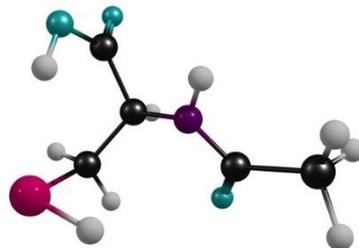
Confórmero 69



Confórmero 60



Confórmero 63



Confórmero 44



10.2 Comparativa niveles de cálculo

Datos proporcionados por el nivel de cálculo **MP2/6-311++G (d, p)**.

Confórmero	1	5	8	61	56	6	2	4	31	9	36
A(MHz)	1467	1453	1507	1476	1417	1526	1225	1055	1272	1526	1246
B(MHz)	775	781	843	829	789	787	884	966	950	712	971
C(MHz)	641	647	606	647	643	630	601	592	636	565	634
μ_A (D)	-0.5	-2.0	-0.9	-2.1	0.7	0.6	-2.4	-1.3	1.4	-0.6	-0.3
μ_B (D)	-1.2	-1.1	-4.3	-0.7	1.3	-1.2	-0.9	-1.6	-2.0	1.9	0.3
μ_C (D)	-1.2	-1.0	1.0	0.1	3.3	-2.2	-1.2	-2.5	-3.5	-0.8	-2.3
χ_{aa1}	2	2	2	2	2	2	1	2	-3	2	-3
χ_{bb1}	-3	-4	0	0	-4	-2	-1	-3	1	-1	1
χ_{cc1}	1	2	-2	-2	2	-1	0	1	1	-1	2
ΔE (cm-1)	0	282	111	363	688	638	909	912	936	976	1030
ΔE_{ZPE} (cm-1)	0	216	345	392	645	662	900	903	923	959	1066
ΔG (cm-1)	0	88	719	279	463	526	861	721	1027	362	1161

Confórmero	13	49	11	39	33	43	65	66	15	23	3
A(MHz)	1429	1872	1175	1242	1400	1843	1478	1534	1168	1532	1273
B(MHz)	774	671	948	976	804	735	781	708	1008	836	848
C(MHz)	540	564	573	639	618	615	542	569	641	609	621
μ_A (D)	-0.3	2.7	1.5	0.6	-2.5	3.0	1.1	1.2	-5.1	-1.2	-1.2
μ_B (D)	3.4	-4.5	-4.8	1.0	-2.6	-0.4	1.3	2.0	-1.6	-5.6	-0.7
μ_C (D)	1.2	1.9	-0.1	-3.7	-1.7	-3.5	-0.7	3.4	-2.2	1.7	-3.7
χ_{aa1}	2	2	1	-2	2	2	2	2	-2	2	0
χ_{bb1}	1	-3	0	2	-2	-4	1	-2	1	0	-2
χ_{cc1}	-3	0	-1	0	0	2	-3	-1	1	-2	2
ΔE (cm-1)	1179	962	996	1232	1122	1237	1165	1302	1099	1167	1338
ΔE_{ZPE} (cm-1)	1109	1109	1138	1212	1224	1238	1260	1265	1301	1310	1313
ΔG (cm-1)	822	1352	1285	1273	1189	1411	1298	1055	1453	1534	1248

Confórmero	24	10	53	25	20	67	52	68	32	45	57
A(MHz)	1171	1140	1219	1495	1217	1826	1262	1856	1443	1231	1076
B(MHz)	1006	906	990	721	896	738	886	671	756	1153	931
C(MHz)	639	591	639	564	599	613	601	572	637	761	602
μ_A (D)	-4.8	1.4	1.6	0.9	-2.7	1.1	1.6	2.8	-2.2	-1.9	-3.3
μ_B (D)	-0.4	0.0	-0.4	3.2	-0.1	-0.4	0.8	-5.5	-0.5	0.2	1.6
μ_C (D)	-2.7	-4.6	-2.3	4.0	-2.5	-1.9	4.2	1.0	3.9	4.0	2.1
χ_{aa1}	-2	0	-3	2	1	2	0	2	2	1	1
χ_{bb1}	1	-2	2	-1	-1	-4	0	-3	-4	-3	-3
χ_{cc1}	1	2	0	-1	0	2	0	1	2	2	1
ΔE (cm ⁻¹)	1167	1447	1514	1529	1612	1550	1667	1633	1719	1810	1769
ΔE_{ZPE} (cm ⁻¹)	1355	1430	1465	1470	1568	1580	1654	1718	1751	1765	1824
ΔG (cm ⁻¹)	1522	1005	1443	1153	1413	1705	1584	1855	1926	1955	1887

Confórmero	34	62	26	48	40	51	46	47	55	70	69
A(MHz)	1716	1854	1267	1346	1540	1045	1434	1733	1396	1447	1502
B(MHz)	736	733	901	840	786	942	752	659	772	778	697
C(MHz)	628	618	598	631	625	613	633	583	639	641	576
μ_A (D)	4.3	2.7	3.4	-4.0	1.3	-2.5	-3.4	1.7	-0.9	1.0	2.1
μ_B (D)	-3.6	-1.4	-0.6	-1.7	2.5	1.1	-1.4	0.6	-0.7	0.6	-0.9
μ_C (D)	-2.8	-4.5	-2.8	-1.8	2.1	-0.1	4.2	1.7	1.8	0.5	2.8
χ_{aa1}	2	2	0	2	2	0	2	2	2	2	3
χ_{bb1}	-4	-4	-2	-4	-1	-2	-4	-4	-4	-3	-2
χ_{cc1}	2	2	2	1	-1	2	2	2	2	1	0
ΔE (cm ⁻¹)	1676	1975	1875	1915	1917	2006	2139	2084	2120	2352	2258
ΔE_{ZPE} (cm ⁻¹)	1826	1897	1950	1978	2007	2037	2096	2139	2179	2246	2291
ΔG (cm ⁻¹)	1994	1897	2018	1898	2093	1950	2019	2163	2185	2201	2278

Confórmero	63	64	44	58
A(MHz)	1259	1337	1045	1389
B(MHz)	1117	860	989	913
C(MHz)	758	652	614	731
μ_A (D)	0.3	-2.6	0.6	5.4
μ_B (D)	0.0	1.3	3.3	1.4
μ_C (D)	3.1	2.1	3.0	4.9
χ_{aa1}	1	2	-4	2
χ_{bb1}	-3	-3	2	-4
χ_{cc1}	2	1	2	1
ΔE (cm ⁻¹)	2280	2560	2734	2858
ΔE_{ZPE} (cm ⁻¹)	2304	2560	2759	2988
ΔG (cm ⁻¹)	2542	2502	2556	3105

Datos proporcionados por con el nivel de cálculo **B3LYP/6-311++G(d, p)**.

Confórmero	8	1	7	37	11	42	50	56	65	23	2
A(MHz)	1494	1427	1415	1427	1179	1451	1864	1386	1486	1502	1232
B(MHz)	839	782	783	795	933	777	665	793	767	836	875
C(MHz)	602	635	636	621	562	606	555	637	536	603	595
μ_A (D)	-1.1	-0.7	-2.0	-2.3	1.6	-0.3	-3.0	0.9	0.9	-1.1	-2.4
μ_B (D)	-4.4	-1.4	-1.4	-0.8	-5.0	-0.7	-4.7	1.7	1.3	-5.8	-0.8
μ_C (D)	1.2	-1.1	-0.9	0.2	0.1	2.4	-1.9	3.4	-0.7	1.9	-1.3
χ_{aa1}	2	2	2	2	1	2	2	2	3	2	1
χ_{bb1}	0	-3	-4	-1	1	-3	-2	-4	1	0	-1
χ_{cc1}	-2	1	2	-2	-2	0	0	2	-3	-2	0
ΔE (cm-1)	0	519	763	1000	924	1036	1010	1217	1142	1145	1373
ΔE_{ZPE} (cm-1)	0	314	516	777	817	827	938	971	1013	1061	1130
ΔG (cm-1)	76	0	106	203	692	298	915	538	874	1001	761

Confórmero	15	24	4	13	9	33	28	36	43	39	3
A(MHz)	1136	1135	1051	1425	1515	1379	1218	1194	1783	1219	1234
B(MHz)	1010	1010	955	767	705	801	962	979	730	961	862
C(MHz)	632	629	585	534	554	609	625	624	602	625	606
μ_A (D)	-5.0	-4.8	-1.5	-0.3	-0.6	-2.4	1.1	0.0	3.1	0.3	-1.2
μ_B (D)	-2.3	-1.0	-1.3	3.5	2.0	-2.8	-2.2	0.3	-0.6	1.2	-1.5
μ_C (D)	-2.2	-2.8	-2.6	1.3	-0.7	-1.8	-3.7	-2.4	-3.7	-4.0	-3.8
χ_{aa1}	-2	-2	2	3	2	2	-3	-3	2	-3	1
χ_{bb1}	1	1	-4	1	-1	-2	2	1	-4	2	-2
χ_{cc1}	1	1	1	-3	-1	0	1	2	2	0	2
ΔE (cm-1)	1221	1229	1498	1472	1514	1429	1651	1781	1836	1885	1921
ΔE_{ZPE} (cm-1)	1169	1178	1256	1261	1278	1305	1416	1581	1623	1629	1653
ΔG (cm-1)	1016	1024	721	888	763	960	1118	1272	1411	1288	1139

Confórmero	68	34	66	14	25	20	53	67	48	16	32
A(MHz)	1818	1687	1529	1072	1435	1190	1197	1764	1328	1178	1407
B(MHz)	667	729	694	956	755	896	973	732	815	907	762
C(MHz)	562	614	560	576	540	592	627	603	610	587	632
μ_A (D)	3.0	4.4	1.3	-1.8	1.8	-2.7	1.4	1.0	-3.6	-1.6	-2.4
μ_B (D)	-5.8	-3.9	2.0	-0.6	4.5	0.1	-0.4	-0.6	-3.4	0.9	-0.4
μ_C (D)	1.2	-2.7	3.6	4.6	2.9	-2.6	-2.5	-2.1	-1.8	-4.4	4.2
χ_{aa1}	2	2	2	0	3	1	-3	2	2	0	3
χ_{bb1}	-3	-4	-2	-3	0	-1	2	-4	-3	0	-5
χ_{cc1}	1	2	-1	2	-3	0	1	2	0	0	2
ΔE (cm ⁻¹)	1792	1806	1999	2001	2078	2126	2163	2179	2246	2379	2313
ΔE_{ZPE} (cm ⁻¹)	1656	1714	1734	1736	1812	1835	1903	1981	2049	2080	2089
ΔG (cm ⁻¹)	1521	1529	1208	1107	1306	1311	1520	1755	1582	1408	1858

Confórmero	27	26	40	45	47	51	62	70	46	55	64
A(MHz)	1115	1226	1499	1220	1685	1089	1766	1413	1387	1367	1315
B(MHz)	900	908	786	1135	658	903	727	784	759	775	850
C(MHz)	596	590	605	750	570	607	603	634	627	634	641
μ_A (D)	-3.4	3.4	1.1	-2.0	1.5	-2.5	2.9	0.9	-3.6	-0.9	-2.3
μ_B (D)	2.1	-0.8	2.9	0.1	0.8	1.3	-1.7	0.4	-1.4	-0.8	1.9
μ_C (D)	2.2	-3.0	2.5	4.3	1.8	-0.2	-4.7	0.6	4.5	1.9	2.4
χ_{aa1}	1	0	2	1	3	0	2	2	3	3	2
χ_{bb1}	-2	-2	-1	-3	-5	-2	-4	-3	-5	-5	-4
χ_{cc1}	1	2	-1	2	2	2	2	1	2	2	2
ΔE (cm ⁻¹)	2274	2353	2349	2500	2477	2521	2695	2707	2730	2679	2752
ΔE_{ZPE} (cm ⁻¹)	2094	2184	2201	2278	2313	2326	2404	2408	2456	2472	2534
ΔG (cm ⁻¹)	1835	1904	1962	2191	2043	1905	2034	2078	2056	2146	2207

Confórmero	69	60	58	63	44
A(MHz)	1495	1376	1376	1221	1038
B(MHz)	684	760	906	1125	996
C(MHz)	568	544	723	750	600
μ_A (D)	2.1	4.1	5.8	0.1	0.4
μ_B (D)	-1.0	-0.1	1.3	0.6	3.3
μ_C (D)	3.0	1.5	4.9	3.3	3.0
χ_{aa1}	3	3	2	1	-4
χ_{bb1}	-3	0	-4	-3	2
χ_{cc1}	0	-3	1	2	2
ΔE (cm ⁻¹)	2825	2888	2749	3039	3223
ΔE_{ZPE} (cm ⁻¹)	2606	2655	2659	2820	2982
ΔG (cm ⁻¹)	2111	2321	2513	2678	2469