



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

Grado en Química.

### **CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE FÁRMACOS TRIFUNCIONALES.**

*Autor: Diego Herreras Silva.*

*Tutor/es: Iker León Ona; Elena Rita Alonso Alonso.*

## ÍNDICE.

<b>Resumen.</b> .....	3
<b>Abstract.</b> .....	3
<b>I. Introducción.</b> .....	4
<b>I. 1. Rol ejercido por la L-penicilamina sobre la vitamina B<sub>6</sub>.</b> .....	4
<b>I. 2. Rol ejercido por la D-penicilamina en la enfermedad de Wilson.</b> .....	5
<b>I. 3. Rol ejercido por la penicilamina en la cistinuria.</b> .....	7
<b>I. 4. Otras aplicaciones de la molécula de D-penicilamina.</b> .....	8
<b>II. Justificación.</b> .....	9
<b>III. Objetivos.</b> .....	10
<b>IV. Metodología.</b> .....	11
<b>IV. 1. Modelado computacional.</b> .....	11
<b>IV. 1. 1. Mecánica molecular.</b> .....	11
<b>IV. 1. 2. Métodos resueltos en la función de onda.</b> .....	13
<b>IV. 1. 3. Teoría del funcional de la densidad (DFT).</b> .....	14
<b>IV. 1. 4. Funciones de base.</b> .....	15
<b>IV. 2. Fundamentos teóricos de la espectroscopía de rotación.</b> .....	16
<b>IV. 3. Metodología experimental.</b> .....	18
<b>IV. 3. 1. Ablación láser.</b> .....	18
<b>IV. 3. 2. Expansión supersónica.</b> .....	18
<b>IV. 3. 3. Sistema experimental.</b> .....	20
<b>V. Resultados y discusión.</b> .....	22
<b>V. 1. Preparación de la muestra.</b> .....	22
<b>V. 2. Búsqueda conformacional.</b> .....	22
<b>V. 3. Obtención y análisis del espectro.</b> .....	25
<b>V. 4. Asignación conformacional.</b> .....	28
<b>V. 5. Interacciones intramoleculares existentes en los rotámeros.</b> .....	30
<b>V. 6. Implicación biológica.</b> .....	31
<b>VI. Conclusiones.</b> .....	33
<b>VII. Bibliografía.</b> .....	34
<b>Anexo A. Estructuras optimizadas de la molécula de D-penicilamina a nivel MP2/6-311++G(d,p).</b> .....	38

## **Resumen.**

La D-penicilamina es un fármaco trifuncional con el que es posible tratar una gran variedad de enfermedades. En el presente trabajo se aborda, por primera vez, el estudio de su estructura tridimensional con el fin de poder entender en mayor manera cómo ejerce su potencial actividad biológica. Mediante el uso de una técnica de ablación láser, se ha transferido la muestra sólida de penicilamina a fase gas, para después ser expandida supersónicamente e interrogada con una radiación en el rango de frecuencias de microondas, con la técnica conocida como Laser Ablation Chirped Pulse Fourier Transform Microwave (LA-CP-FTMW) de espectroscopia de rotación, desarrollada en el Grupo de Espectroscopia Molecular (GEM) de la Universidad de Valladolid. El espectro de rotación de la D-penicilamina ha sido obtenido experimentalmente, siendo capaces de identificar dos conformeros dominantes que se corresponden con las dos estructuras predichas más estables de la molécula. Paralelamente, se han empleado métodos computacionales (mecánica molecular y cálculos mecanocuánticos), con el fin de buscar las estructuras más relevantes, o más estables, y así tener una predicción de los parámetros rotacionales que sirvan de guía en la asignación del espectro experimental. Finalmente, se ha llevado a cabo un análisis de las fuerzas intermoleculares de los dos conformeros para poder discutir si existe alguna correlación entre la estructura y el papel biológico que ejerce la penicilamina.

## **Abstract.**

D-penicillamine is a drug widely used to treat many diseases. In the present work, we characterize the three-dimensional structure of penicillamine as a first approach to shed light on its biological activity. Using a laser ablation source, we have transferred solid D-penicillamine to the gas phase by Laser Ablation (LA) and probed it employing Chirped Pulsed Fourier Transform Microwave (CP-FTWM) spectroscopy in the isolated conditions of a supersonic jet. This technique has been designed and developed by Grupo de Espectroscopia Molecular (GEM) in the University of Valladolid. On the one hand, we use computational methods (both molecular mechanics and quantum chemical calculations), to search for the most relevant structures. This allows us to obtain the most stable structures and make a prediction of the rotational spectra in order to proceed with their assignment. At the same time, the experimental rotational spectrum of D-penicillamine is obtained, and two conformers are found which correspond to the predicted most stable conformers. Finally, a characterization of the intermolecular forces is carried out to discuss any correlation with the biological role of penicillamine.

## I. Introducción.

La D-penicilamina, cuya estructura se muestra en la Figura 1, se trata de un fármaco sin actividad antimicrobiana con el que es posible tratar una gran variedad de enfermedades. Como se puede observar, es una molécula trifuncional, ya que posee un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo tiol en su forma neutra. Además, el compuesto presenta un centro quiral, lo cual es de elevada importancia de cara a su potencial actividad biológica. Curiosamente, tanto la forma dextrógira como la forma levógira presentan importantes actividades biológicas.

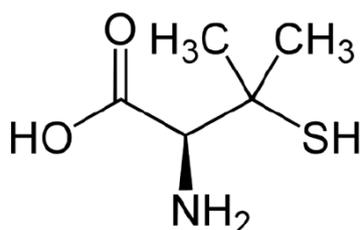


Figura 1. - Esquema de la forma neutra de la D-penicilamina.

Desde su primera aplicación en el campo de la hepatología<sup>1</sup> han surgido muchas indicaciones para el uso de la D-penicilamina, algunas de las cuales se muestran a continuación.

### I. 1. Rol ejercido por la L-penicilamina sobre la vitamina B<sub>6</sub>.

La vitamina B<sub>6</sub> se trata, realmente, de un compendio de tres formas químicas (piridoxina, piridoxal y piridoxamina), las cuales se muestran en la Figura 2.

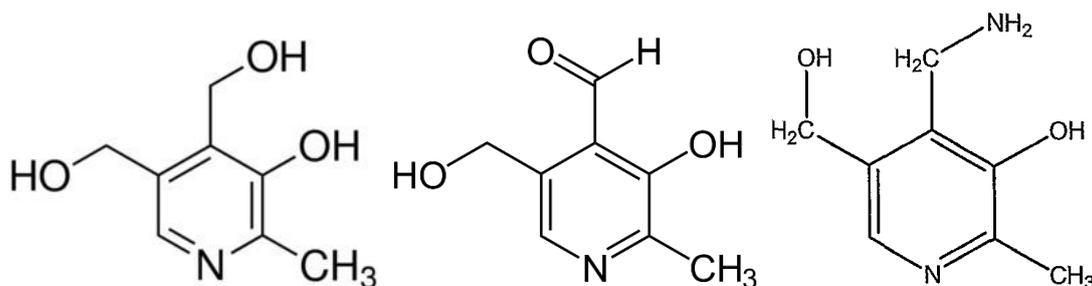


Figura 2. – Formas químicas de la vitamina B<sub>6</sub>. De izquierda a derecha: piridoxina, piridoxal y piridoxamina.

La función biológica que desempeñan radica en su actuación como coenzimas en diversos procesos vitales. No obstante, ni la piridoxina, ni el piridoxal y ni la piridoxamina son capaces de llevar a cabo esta función. Para ello, se han de fosforilar previamente a sus formas ester-5'-fosfato, con ayuda de enzimas quinasas. Así, la forma predominante de la vitamina B<sub>6</sub> en el plasma es la piridoxal 5'-fosfato (60%), interviniendo en reacciones como la descarboxilación de L-aminoácidos, la transaminación de aminoácidos a cetoácidos, etc<sup>2</sup>.

Como se ha mencionado anteriormente, la penicilamina se trata de una molécula quiral, por lo que se puede presentar en su forma D o en su forma L. La configuración de su estereocentro es

crucial para que desempeñe su función como fármaco, ya que se ha demostrado que la forma L presenta elevada toxicidad al poder interactuar con la vitamina B<sub>6</sub><sup>3</sup>. Para comprender el por qué ocurre esto, se ha estudiado la interacción que se establece a través del piridoxal y la molécula de penicilamina<sup>4</sup>.

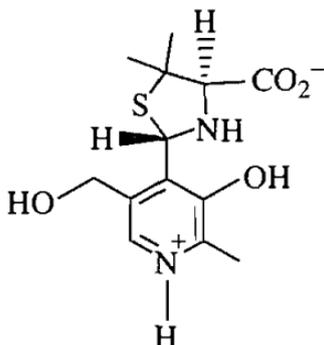


Figura 3. – Producto de la reacción de la molécula de L-penicilamina con piridoxal.

Como se puede observar en la Figura 3, esta interacción radica en los grupos amino y tiol de la molécula de penicilamina, la cual sugiere que el grupo tiol inhibe el efecto de la molécula de piridoxal.

## I. 2. Rol ejercido por la D-penicilamina en la enfermedad de Wilson.

La enfermedad de Wilson es un trastorno hereditario autosómico recesivo que afecta al transporte del cobre en el individuo debido a mutaciones en el gen ATP7B. Como consecuencia, se produce un aumento de los niveles normales de cobre, acarreado una serie de síntomas que afectan, principalmente, al hígado y al cerebro, aunque pueden afectar también a los ojos (anillos de Kayser-Fleischer<sup>5</sup>) y a otros órganos, tales como el corazón<sup>6</sup>.

Es bien sabido que el cobre se trata de un metal que presenta cierta toxicidad, ya que interviene en la formación de radicales que implican daños oxidativos, además de poderse insertar en determinadas metaloproteínas e incluso inhibir las enzimas ATPasas. No obstante, entra en juego como cofactor en procesos como la fosforilación oxidativa o el transporte de oxígeno, por lo que es crucial en ciertos procesos vitales<sup>7</sup>. La cantidad de cobre necesaria para un correcto funcionamiento del organismo es aportada a través de la dieta. Una vez que el metal es transportado al hígado, el gen ATP7B regula la cantidad de cobre que se almacena uniéndose a metalotioneínas, la que se excreta a través de los canalículos biliares y la que se convierte en ceruloplasmina a partir de la unión del metal con apoceruloplasmina. Este enzima tiene como función transportar el cobre presente en el plasma sanguíneo hacia órganos periféricos. Así, al ocurrir la mutación característica de la enfermedad de Wilson, se reducirá la conversión de apoceruloplasmina en ceruloplasmina. Además, el cobre no se excretará adecuadamente a través de los canalículos biliares. Como consecuencia, se producirán daños en los hepatocitos, pudiéndose generar un derrame del metal en la sangre, lo que implica un exceso del mismo en los órganos anteriormente mencionados<sup>8</sup>.

De esta manera, para su tratamiento se emplean agentes quelantes, tales como trietilentetramina, sales de zinc, etc. Estos interaccionarán convenientemente con el cobre, generando el complejo de coordinación correspondiente, el cual es excretado fácilmente al exterior del organismo<sup>9</sup>, lo que conlleva a que se reduzca el exceso de metal. Por ejemplo, el ligando quelato trietilentetramina (TETA), cuya forma se muestra en la Figura 4, se compone de cuatro átomos de nitrógeno, por lo que es un ligando tetradentado.

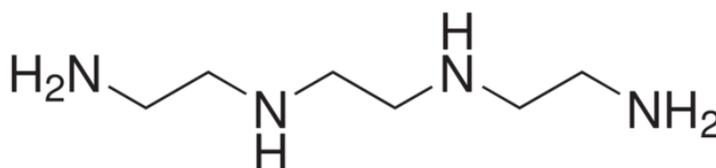


Figura 4.- Esquema del ligando trietilentetramina.

Debido sus características estructurales, el ligando TETA es altamente selectivo a la interacción con iones de cobre (II), generándose el correspondiente complejo de coordinación piramidal cuadrado distorsionado, cuya base está conformada por los cuatro átomos de nitrógeno del ligando TETA y en su cúspide se encuentra un átomo de cloro. En esta disposición todos los electrones de la capa d más externa del metal se encuentran interaccionando con otros átomos, por lo que su posible actividad tóxica queda suprimida<sup>10</sup>.

No obstante, el compuesto con el que se consiguió por primera vez un tratamiento exitoso de la enfermedad de Wilson es la D-penicilamina<sup>11</sup>. Se ha sugerido un mecanismo de actuación en la que además de actuar únicamente como quelato (como es el caso del ligando TETA) actúa como reductor<sup>12</sup>. El medicamento es capaz de generar un complejo de coordinación en el que el cobre coordinado se encuentra parcialmente como cobre (II) y como cobre (I), cuya fórmula química es:  $[Cu^II_6Cu^I_8(D-pen)_{12}Cl]^{-5}$ . En él, el cobre (II) se encuentra en equilibrio con el medio circundante, pero quelatado a través de los átomos dadores de nitrógeno y azufre que presenta la molécula del fármaco, inhibiendo su inherente toxicidad. Por su parte, el cobre (I) es eliminado del equilibrio. De esta manera, al ocurrir este proceso de reducción, se reduce la afinidad de interacción del cobre con los átomos de nitrógeno dadores de proteínas, debido a su disposición espacial. Como consecuencia, el exceso de cobre es fácilmente excretado al exterior del organismo gracias al ser el complejo generado completamente soluble en agua, al presentar doce grupos carboxilato (-COO<sup>-</sup>). No obstante, podría ocurrir una oxidación de cobre (I) a cobre (II). Gracias a los grupos metilo que presenta el medicamento, la situación es inviable debido a impedimentos estéricos. Además, como en el caso del ligando TETA, la estructura complejada presenta un átomo de cloro, lo que sugiere que este influye de cierta manera importante en el proceso.

### I. 3. Rol ejercido por la penicilamina en la cistinuria.

La cistinuria es una enfermedad hereditaria en la que, como consecuencia de mutaciones en los genes SLC3A1 y SLC7A9, se ve afectado el transporte de algunos aminoácidos y de la cistina a nivel tubular renal y en algunos casos intestinal<sup>13</sup>. Esta viene caracterizada por grandes concentraciones de cisteína en la orina, lo que conlleva la formación de cálculos de cistina (cuya forma se muestra en la Figura 5, mediante el proceso de dimerización de este aminoácido a través de un puente disulfuro).

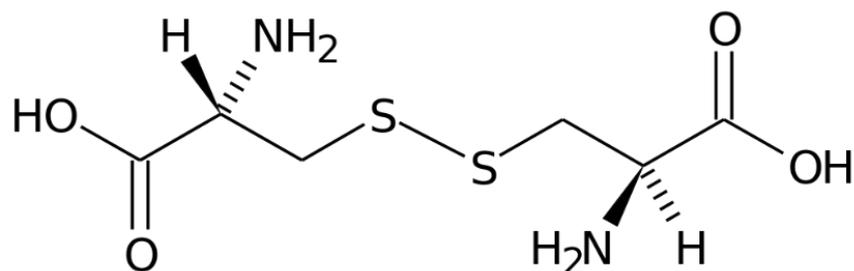


Figura 5. – Forma química de la cistina.

Como se muestra en la Figura 6, la cisteína tiene una gran similitud estructural con la penicilamina, variando únicamente en la introducción de dos grupos metilo en el carbono unido al grupo tiol por parte de esta última. Debido a este hecho, se produce una competencia entre ambas moléculas, lo que permite a la penicilamina establecer complejos con la cistina que son 50 veces más solubles que ésta, de forma que puede prevenir la formación de los cálculos característicos de esta enfermedad<sup>14</sup>.

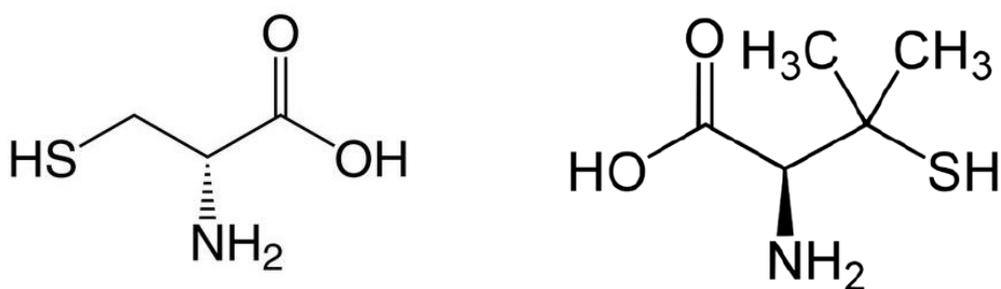


Figura 6. – Similitudes estructurales existentes entre la molécula de cisteína (izquierda) y D-penicilamina (derecha).

#### **I. 4. Otras aplicaciones de la molécula de D-penicilamina.**

Además de para tratar la enfermedad de Wilson, la D-penicilamina se usa también para el tratamiento de la intoxicación por metales. Su estructura química y solubilidad conllevan a que se combine con metales tales como el cobre, cadmio, plomo, oro, mercurio y arsénico formando complejos que son menos tóxicos para el organismo<sup>15</sup>.

La D-penicilamina también posee propiedades inmunológicas debidas a la alteración de receptores de la membrana de los linfocitos T. Esto se lleva a cabo mediante la interacción del grupo tiol y la generación de peróxidos<sup>16</sup>. Además, posee la capacidad de disociar macroglobulinas, por lo que se usa como tratamiento contra la artritis reumatoide.

Otra de sus utilidades conlleva el tratamiento de la esclerosis sistémica<sup>17</sup>. La penicilamina tiene la capacidad de bloquear grupos aldehído implicados en la formación de las uniones cruzadas en el colágeno, provocando su desestabilización.

Además, la D-penicilamina se emplea en otros tratamientos tales como retinopatía<sup>18</sup> o el tratamiento anticanceroso<sup>19,20</sup>.

## II. Justificación.

Hasta la fecha, la molécula de D-penicilamina ha sido estudiada empleando resonancia magnética nuclear (RMN), difracción de rayos X, espectroscopía de infrarrojo, Raman e incluso espectrometría de masas<sup>21</sup>. Por una parte, el RMN aporta únicamente información sobre la disposición relativa de sus grupos funcionales. Por otro lado, con la difracción de rayos X es posible conseguir la estructura tridimensional del sólido, empleando monocristales de D-penicilamina, los cuales no son estables. Por esta razón, se empleó una mezcla racémica de los isómeros D y L, consiguiéndose monocristales estables, lo que conduce a la elucidación de las distancias y ángulos de enlace de este sólido. En ella, surgen interacciones tales como enlaces de hidrógeno intermoleculares que pueden distorsionar la estructura intrínseca de la molécula. Por otra parte, al llevar a cabo su estudio empleando Raman e infrarrojo, se obtiene un espectro del que surgen bandas características debidas a las vibraciones de los enlaces que componen la molécula. A fin informativo es complementario a los resultados que es posible obtener en estudios de RMN o difracción de rayos X. No obstante, no proporciona una información precisa a la hora de la determinación de la estructura tridimensional de la molécula. Las mismas conclusiones se pueden obtener del estudio de espectrometría de masas en el que se obtiene únicamente la masa molecular de la sustancia y de los posibles fragmentos que puede generar.

Así, todos los estudios anteriores acerca de la elucidación de la estructura molecular de la D-penicilamina implican fases condensadas. En ellas, como se ha mencionado anteriormente, existen otras series de interacciones que pueden perturbar su estructura. El presente trabajo aborda por primera vez el estudio de la estructura tridimensional de la forma neutra del fármaco en fase gas, en ausencia de todas las posibles interacciones intermoleculares existentes en el en retículo del cristal o por interacciones con el disolvente: son únicamente las interacciones intramoleculares las que controlan las conformaciones más estables de la D-penicilamina. El único impedimento que se presenta es conseguir volatilizar la muestra, la cual se trata de un sólido cuyo punto de fusión es de 210 °C y que descompone al aumentar la temperatura, por lo que no es posible llevarla a fase gas empleando únicamente calefacción. Por esta razón, se hace necesario el uso de un láser, que es capaz de ablacionar adecuadamente la muestra, la cual es posteriormente sembrada en la expansión supersónica que tiene lugar en el experimento en el que se ha empleado la técnica espectroscópica LA-CP-FTMW. Esta técnica, implementada en el Grupo de Espectroscopía Molecular (GEM) permite obtener, de una manera muy precisa y fiable, las distancias, ángulos de enlace y panorama conformacional del fármaco.

### **III. Objetivos.**

El objetivo general de este trabajo es desvelar el panorama conformacional de la molécula de D-penicilamina, obteniendo sus estructuras más estables en forma neutra y en condiciones de aislamiento en fase gas, lo que permitirá obtener un mejor entendimiento de su relación estructura-propiedad.

Para ello, se persiguen los siguientes objetivos concretos:

- Realizar un modelado computacional de la D-penicilamina, en primer lugar, mediante mecánica molecular y posteriormente mediante cálculos mecanocuánticos, que servirá de base para su tratamiento experimental.
- A través de la técnica espectroscópica LA-CP-FTMW, conseguir su espectro rotacional de banda ancha de seis a catorce gigahercios.
- Asignar las líneas espectrales a cada conformero predicho en el modelado computacional para obtener las estructuras de los conformeros más estables de la D-penicilamina.
- Realizar un análisis de las fuerzas intramoleculares de los conformeros obtenidos a fin de entender sus implicaciones biológicas.

## IV. Metodología.

El presente trabajo se ha desarrollado en el grupo GEM. En él se han estudiado una gran diversidad de biomoléculas aisladamente en fase gas, empleando las técnicas espectroscópicas *Laser Ablation Molecular Beam Fourier Transform Microwave Spectroscopy* (LA-MB-FTMW) y *Laser Ablation Chirped Pulse Fourier Transform Microwave Spectroscopy* (LA-CP-FTMW) desarrolladas por el Grupo de Espectroscopia Molecular de la Universidad de Valladolid. Para ello, de forma general, se lleva a cabo la siguiente estrategia:

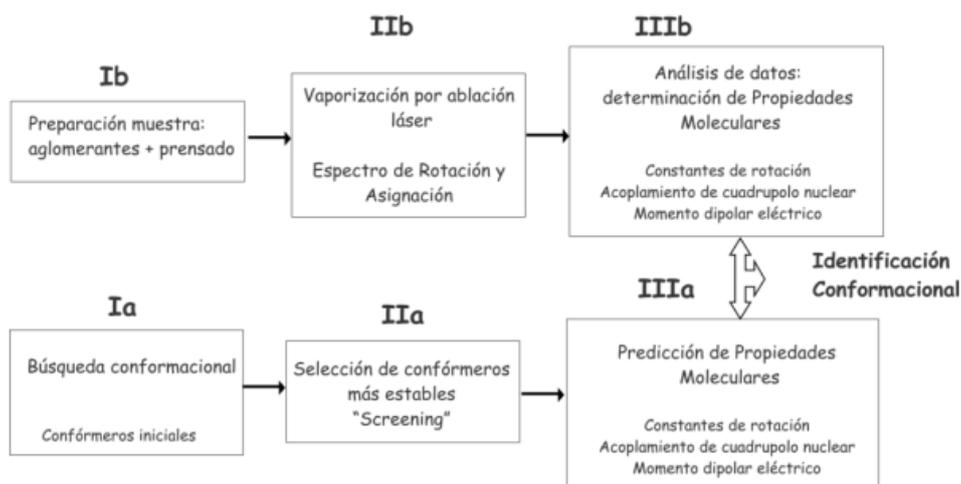


Figura 7. - Estrategia utilizada en el estudio estructural de biomoléculas.

Así, se siguen dos vertientes en paralelo. Por una parte, se lleva a cabo el modelado computacional, en el que se comienza realizando una búsqueda conformacional de la biomolécula empleando mecánica molecular (Ia). Una vez se encuentran todos sus posibles conformeros, se realizan una serie de cálculos computacionales, empleando diversas metodologías (IIa), lo que permite conseguir una predicción teórica de sus propiedades moleculares (IIIa). Por otra parte, se realiza el procedimiento experimental. En él, se lleva a cabo la preparación de la muestra (Ib). Posteriormente, se introduce la muestra preparada en el instrumento correspondiente, obteniéndose el espectro de rotación de la molécula (IIb). De esta manera, con la ayuda de los parámetros predichos computacionalmente, es posible asignar las señales observadas en el espectro a cada una de sus estructuras (IIIb), desvelando el panorama conformacional de la biomolécula.

### IV. 1. Modelado computacional.

#### IV. 1. 1. Mecánica molecular.

Este método se enmarca en una connotación clásica ya que no considera la ecuación de onda del sistema, ni el hamiltoniano electrónico, ni la densidad electrónica de la molécula. Es decir, no implica ninguna contribución electrónica. En ella, se considera a los átomos que constituyen la molécula como esferas y a los enlaces que se establecen entre ellos como muelles. De esta

manera, teniendo en cuenta las constantes de fuerza de los enlaces, se construye una función de energía potencial la cual es función de las posiciones atómicas<sup>22</sup>. Esta se denomina energía estérica (“*steric energy*”,  $V$ ) y viene dada a través de la expresión:  $V = V_{str} + V_{bend} + V_{oop} + V_{tors} + V_{cross} + V_{vdW} + V_{es}$ . Como se observa, es suma de una serie de términos<sup>23</sup>:

- $V_{str}$ : es la contribución a la energía estérica debida al “*stretching*” de los enlaces que componen la molécula.
- $V_{bend}$ : es la contribución a la energía estérica debida al “*bending*” de los enlaces que componen la molécula.
- $V_{oop}$ : es la contribución a la energía estérica debida al “*bending*” que ocurre fuera del plano de la serie de enlaces que componen la molécula.
- $V_{tors}$ : es la contribución a la energía estérica debida a las posibles torsiones que puedan darse en la molécula.
- $V_{cross}$ : es la contribución a la energía estérica debida a términos cruzados. Es decir, da cuenta de las interacciones que puedan darse entre los “*stretching*”, “*bending*” y torsiones de la molécula.
- $V_{vdW}$ : es la contribución a la energía estérica debida a las posibles interacciones de van der Waals que pueda tener la molécula frente a otros átomos o moléculas, la cual se compone de un término atractivo (fuerzas dispersivas de London) y uno repulsivo (repulsión de Pauli). Este término también puede dar cuenta de los enlaces de hidrógeno.
- $V_{es}$ : es la contribución a la energía estérica debida a interacciones electrostáticas, de la que da cuenta la ley de Coulomb.

No obstante, para calcular la energía estérica adecuadamente se ha de especificar un determinado campo de fuerzas. Estos se tratan del conjunto de expresiones analíticas para cada uno de los términos de  $V$ , así como un conjunto de posibles valores que puedan tener cada uno de los parámetros que conforman estas expresiones analíticas (por ejemplo, para  $V_{str}$  se toman distancias de enlace, para  $V_{bend}$  ángulos de enlace, etc.). Así, se parte de información experimental o cálculos *ab initio* para escoger unos valores iniciales de estos parámetros. A continuación, estos se modifican para minimizar la desviación entre las propiedades predichas de ese determinado campo de fuerzas frente a las propiedades obtenidas experimentalmente o través de cálculos *ab initio* de un determinado set de moléculas, que se conocen como “training sets”. No obstante, al intentar mejorar una de estas contribuciones modificando sus parámetros característicos, los otros términos del sumatorio pueden verse afectados negativamente por esta modificación. De esta manera, la parametrización en el método de mecánica molecular es un proceso iterativo (se intenta minimizar  $V$  lo más posible hasta que no se observe una mejora significativa). En este trabajo se han empleado los campos de fuerzas MMFFs (Merck Molecular Force Field) y AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement)<sup>22</sup>.

El campo de fuerza AMBER, que se usa principalmente para el estudio de sistemas de pequeño tamaño, se puede englobar dentro de los campos de fuerza conocidos como clase I, ya que las funciones necesarias para llevar a cabo la exploración de la hipersuperficie de energía potencial se simplifican lo más posible: se emplean únicamente funciones armónicas para las energías de enlace y de torsión, se omiten términos cruzados y se emplea el potencial de Lennard-Jones para el tratamiento de la energía de van der Waals.

Por su parte, el campo de fuerza MMFFs se enmarca en los campos de fuerza conocidos como clase II, ya que considera expansiones de segundo o tercer orden para las energías de enlace y torsión, introducen términos cruzados y emplean un potencial de tipo exponencial para hallar la energía de van der Waals. Se emplea fundamentalmente para el tratamiento de sistemas complejos como proteínas.

Así, mediante estos campos de fuerza es posible explorar en su totalidad la hipersuperficie  $(n + 1)$ -dimensional (donde  $n$  son los parámetros geométricos del sistema) de energía potencial de la molécula, encontrando todos sus mínimos locales, cada uno de las cuales se corresponde con una estructura conformacional. Como es lógico, al aumentar los grados de libertad moleculares se hace más complejo encontrar todos los posibles confórmeros del sistema, por lo que se opta por la inclusión de métodos de muestreo, tales como el método Monte Carlo, en el que ocurren desplazamientos al azar de los átomos<sup>24</sup>.

La principal ventaja de esta metodología es su bajo coste computacional frente a otros métodos mecano-cuánticos, al poderse evaluar analíticamente la expresión de  $V$ .

#### **IV. 1. 2. Métodos resueltos en la función de onda.**

Todas las propiedades de un sistema molecular vienen descritos a través de su correspondiente función de onda. Así, al resolver la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo ( $\hat{H}\Psi = E\Psi$ , siendo  $\hat{H}$  el operador Hamiltoniano,  $E$  la energía del sistema y  $\Psi$  su función de onda) es posible obtener la información de interés del sistema. El operador hamiltoniano es suma de dos contribuciones:

$$\hat{H} = \hat{H}_{ELEC} + \hat{H}_N$$

siendo  $\hat{H}_{ELEC}$  el hamiltoniano electrónico y  $\hat{H}_N$  el hamiltoniano nuclear.

Con el fin de simplificar el tratamiento, se recurre a la aproximación de Born-Oppenheimer, que permite tratar únicamente el hamiltoniano electrónico y sumar a posteriori el hamiltoniano nuclear, ya que considera que, los núcleos, debido a su mayor masa, se mueven en un potencial creado gracias al movimiento electrónico<sup>25</sup>.

Aún con esta aproximación, la resolución exacta del hamiltoniano electrónico es imposible debido al término de repulsión interelectrónico. De esta manera se recurre a diversas metodologías las cuales abordan de manera muy distinta la resolución de este hamiltoniano.

En concreto, en este trabajo se ha optado por el método de perturbaciones de Møller-Plesset de segundo orden (MP2), el cual se enmarca en los métodos Post-Hartree-Fock<sup>26,27</sup>. El método Hartree-Fock trata la correlación electrónica forma promediada, lo que puede conducir a importantes errores en magnitudes relativas. Estas son sumamente importantes al observar el panorama conformacional de la molécula objeto de estudio (estabilidades relativas). Así, el método MP2 incorpora esta correlación a través del método de variaciones, tratándola como una perturbación sobre la función Hartree-Fock:

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

siendo  $\hat{H}_0$  el hamiltoniano anterior a la perturbación,  $\lambda$  es el parámetro que mide la magnitud de la perturbación y  $\hat{V}$  es el operador de la perturbación. Como consecuencia, las funciones de onda y energías se expanden, incluyendo las correcciones de segundo orden:

$$\Psi = \Psi_0^n + \lambda \Psi_1^n + \lambda^2 \Psi_2^n$$

De esta manera, basándose en un hamiltoniano efectivo, se trata de resolver la ecuación de Schrödinger acudiendo únicamente a constantes universales y suponiendo una notable mejora sobre el método Hartree-Fock al uso.

#### **IV. 1. 3. Teoría del funcional de la densidad (DFT).**

Este método sustituye a la función de onda del sistema ( $\Psi$ ) dependiente de  $3N$  coordenadas por la densidad electrónica, que depende únicamente de 3 coordenadas, lo que se fundamenta en el teorema de Hohenberg-Kohn. Este afirma que la energía del estado fundamental del sistema es un funcional de la densidad electrónica:  $E = E[\rho]$ <sup>28</sup>. Así, la *Density Functional Theory* (DFT) trata de calcular las propiedades del estado fundamental del sistema a partir de su densidad electrónica. El mayor inconveniente del tratamiento es que la forma del funcional es desconocida.

Como primera aproximación, la densidad electrónica se puede tratar empleando el método variacional, por lo que se busca minimizar la energía funcional de forma iterativa partiendo de una densidad inicial (teorema de Kohn-Sam):

$$E[\rho] = T[\rho] + V_{ee}[\rho]$$

donde  $T[\rho]$  es el sumatorio de las energías cinéticas de cada uno de los electrones que forman parte del sistema y  $V_{ee}[\rho]$  su energía de interacción<sup>29</sup>.

Esta no es la única forma de hallar el funcional de la densidad. Uno de los funcionales más utilizados y el empleado en este trabajo es el funcional híbrido B3LYP el cual consta de tres parámetros y combina funcionales para la correlación y para el intercambio<sup>30,31</sup>.

Para obtener una mayor precisión en los resultados se usan dispersiones empíricas, que constan de la parte atractiva del potencial de van der Waals entre átomos y moléculas no unidos entre

sí. En este trabajo se ha empleado la dispersión de Grimme, en la que tanto los radios de corte como los coeficientes de dispersión (independientes de la conectividad de los átomos, pero dependientes de la geometría) se obtienen a través de primeros principios<sup>32,33</sup>. El mayor inconveniente de esta dispersión es que la corrección realizada no es dependiente de la estructura electrónica.

#### **IV. 1. 4. Funciones de base.**

Para llevar a cabo los cálculos computacionales, se hace necesario el empleo de funciones de base, las cuales describen, como combinación lineal, a los orbitales moleculares que caracterizan al sistema. Estas funciones poseen tres partes:

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

siendo  $N$  la constante de normalización;  $Y(\theta, \gamma)$  la parte angular y  $R(r)$  la parte radial.

En ambos métodos empleados en este trabajo se ha optado por la función de base 6-311++G(d,p)<sup>34</sup>.

Se trata de una función de valencia desdoblada (split-valence) en la que se emplean funciones gaussianas, las cuales son de la forma:

$$R_n(r) = r^{(2n-2-l)} e^{-\zeta r^2}$$

La bondad de estas bases radica en una mejor descripción de los electrones de valencia que de los electrones del core, ya que, al fin y al cabo, los electrones de valencia tendrán un mayor peso en las interacciones que pueda establecer la molécula. Así, en la función escogida para este trabajo, los orbitales internos vienen descritos por una única función, la cual es contracción de seis funciones gaussianas. Por su parte, los orbitales de valencia están constituidos por una función triple-zeta, esto es, vienen descritos por tres funciones: la primera de ellas se trata de una contracción de tres funciones gaussianas, mientras que las dos funciones restantes son gaussianas primitivas.

Por otra parte, se añaden funciones difusas que se extienden a regiones espaciales más alejadas de los núcleos. De esta manera, poseen el mismo número cuántico angular que los orbitales de valencia, pero con menores exponentes. Así, en la función empleada para los cálculos computacionales llevados a cabo en este trabajo, se han añadido funciones difusas para átomos pesados y una función difusa de tipo  $s$  para cada átomo de hidrógeno.

Además, a la base se le añade funciones de polarización, que tienen como objeto una mejor descripción de los cambios de densidad electrónica que ocurren en la molécula. Así, para cada átomo pesado (C, O, N, S) se añade un conjunto de funciones  $d$  y para cada átomo de hidrógeno se añade un conjunto de funciones  $p$ . Estas funciones de polarización son especialmente importantes para tratar enlaces polares, átomos hipervalentes o cuando se emplean métodos que implican correlación electrónica, como es este caso.

## IV. 2. Fundamentos teóricos de la espectroscopía de rotación.

La espectroscopía estudia la interacción resonante entre la radiación electromagnética y la materia. Este trabajo se ha llevado a cabo empleando radiación de microondas, la cual produce transiciones entre los niveles de rotación de la molécula objeto de estudio<sup>34-36</sup>.

Toda transición involucra un estado energético de partida y un estado energético de llegada. Si se atiende a la mecánica cuántica, estos estados energéticos vienen dados a través de la resolución de la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo:  $\hat{H}\Psi = E\Psi$ , donde  $\hat{H}$  el operador Hamiltoniano,  $E$  la energía del sistema y  $\Psi$  su función de onda. Para describir estas transiciones se toma el modelo del rotor rígido y, en ocasiones, dependiendo de la molécula a estudiar y del rango del espectro, se acude al modelo del rotor semirrígido. En este trabajo ha sido suficiente el empleo del modelo del rotor rígido para obtener resultados concluyentes. Al estar tratando con una molécula asimétrica, el operador hamiltoniano se expresa matemáticamente como:

$$\hat{H} = \frac{\hat{L}_x^2}{2I_x} + \frac{\hat{L}_y^2}{2I_y} + \frac{\hat{L}_z^2}{2I_z}$$

donde  $\hat{L}$  es el operador del momento angular e  $I$  es el momento de inercia. Los parámetros espectroscópicos son las constantes de rotación, las cuales son inversamente proporcionales a estos momentos de inercia:

$$B = \frac{h}{8\pi^2 I_B}$$

por lo que son directamente dependientes de la estructura molecular.

Así, la condición necesaria (pero no suficiente) para que se dé una transición es la condición de Planck-Bohr: la separación energética entre los estados energéticos implicados ha de coincidir con la energía de la radiación incidente. No obstante, no todas las transiciones que cumplan la condición de resonancia están permitidas. Así, existen unas determinadas reglas de selección, regidas por la integral de momento de transición. Esta da la probabilidad de que ocurra la transición entre un estado de partida ( $\Psi''$ ) y un estado de llegada ( $\Psi'$ ) y viene dada por la expresión:

$$\int \Psi' \mu \Psi'' d\tau$$

Por tanto, ha de ser distinta de cero para que la transición esté permitida y sea observable en el espectro. En espectroscopía rotacional la regla de selección fundamental es que la molécula a estudiar posea momento dipolar permanente. El momento dipolar total molecular consta de tres componentes, cada una de las cuales se asocia a un eje de inercia principal. Así, para moléculas asimétricas existirán tres tipos de componentes rotacionales (a, b y c), las cuales se han de estudiar separadamente. Por ejemplo, si el momento dipolar en el eje a es nulo, no se observarán transiciones de tipo a en el espectro. Además, se han de considerar las variaciones

en los números cuánticos que involucra cada transición. En trompos asimétricos, existen tres números cuánticos:  $J$ ,  $K_1$ ,  $K_{-1}$ . Por una parte, el cambio en el número cuántico  $J$  ha de ser o bien nulo o bien de más menos una unidad ( $\Delta J = 0$ ;  $\Delta J = \pm 1$ ). Así, si  $\Delta J = 1$ , se habla de que las transiciones conforman la rama R, mientras que, si  $\Delta J = -1$ , se habla de la rama P. Además, si  $\Delta J = 0$ , se habla de la rama Q. Por otra parte, los números cuánticos  $K_1$  y  $K_{-1}$  hacen referencia a los trompos simétricos prolata ( $A > B = C$ ) y oblate ( $A = B > C$ ), límites entre los que se enmarcan los trompos asimétricos. Así, con el parámetro de asimetría de Ray

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

es posible saber cuan prolata ( $k = -1$ ) o cuan oblate ( $k = 1$ ) es la molécula. Como se ha comentado, existen tres tipos de transiciones rotacionales (a,b,c), las cuales implican unas variaciones concretas en los valores de  $K_1$  y  $K_{-1}$ . En el caso de las transiciones tipo a, son permitidas variaciones en  $k_1$ . Por su parte, para las transiciones tipo b pueden variar los valores de  $K_1$  y  $K_{-1}$  simultáneamente. Finalmente, en las transiciones tipo c, existe un cambio en  $K_{-1}$ .

Además de las reglas de selección, contribuye a la intensidad de las transiciones del espectro la ley de distribución de Boltzmann, ya que esta depende de la población que posea el estado de partida. Para estados rotacionales viene dada a través de la expresión:

$$\frac{N_J}{N_0} = \frac{g_J}{g_0} e^{-\Delta E/kT} = (2J + 1)e^{-BJ(J+1)/kT}$$

donde interviene la degeneración de los niveles rotacionales, su separación energética, la constante de Boltzmann y la temperatura.

En este trabajo se ha tratado una molécula la cual posee un núcleo de nitrógeno ( $^{14}\text{N}$ ), es decir, posee un núcleo con distribución no simétrica de carga, es decir, su momento de spin nuclear es no nulo ( $I \neq 0$ ). En los casos en los que  $I > 1/2$ , el momento de cuadrupolo nuclear del átomo, el cual es una magnitud tensorial

$$q_{ij} = \begin{pmatrix} q_{xx} & q_{xy} & q_{xz} \\ q_{yx} & q_{yy} & q_{yz} \\ q_{zx} & q_{zy} & q_{zz} \end{pmatrix}$$

será capaz de interactuar con el gradiente del campo eléctrico molecular en la posición espacial del núcleo. Como consecuencia, en los espectros de rotación se observará lo que se conoce como estructura hiperfina, la cual produce un desdoblamiento en las líneas espectrales, dependiente de la interacción anteriormente mencionada. El parámetro espectroscópico que es capaz de caracterizar este fenómeno son las constantes de cuadrupolo nuclear, las cuales forman parte del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear:

$$\chi_{ij} = e Q q_{ij} = \begin{pmatrix} \chi_{xx} & \chi_{xy} & \chi_{xz} \\ \chi_{yx} & \chi_{yy} & \chi_{yz} \\ \chi_{zx} & \chi_{zy} & \chi_{zz} \end{pmatrix}$$

Al poseer la D-penicilamina un único núcleo de nitrógeno serán significativas únicamente las constantes que forman parte de la diagonal principal del tensor de cuadrupolo nuclear.

### **IV. 3. Metodología experimental.**

#### **IV. 3. 1. Ablación láser.**

Como se ha mencionado en el fundamento teórico, la radiación de microondas es capaz de provocar transiciones rotacionales en los sistemas moleculares. La espectroscopia de rotación se lleva a cabo en condiciones de aislamiento en fase gas, en un ambiente libre de perturbaciones del medio tal y como ocurre en fases condensadas. Por tanto, es necesario llevar a las moléculas que se encuentren en fase sólido/líquido a fase gas, vaporizándolas. Este hecho es uno de los mayores inconvenientes a la hora de llevar a cabo estudios de biomoléculas ya que, en la mayoría de las ocasiones su estado natural es sólido con altos puntos de fusión. Esto hace que los métodos convencionales de calentamiento para su paso a fase gas no sean viables, debido además a que normalmente provocan su descomposición térmica.

En el Grupo de Espectroscopia Molecular (GEM) se ha desarrollado una nueva técnica que supera todas estas barreras que impiden estudiar biomoléculas o moléculas con alto punto de fusión por medio de espectroscopia de microondas, acoplado un láser de Nd:YAG de picosegundos a los instrumentos de la técnica de espectroscopia de microondas de rotación. Mediante pulsos láser la muestra es ablacionada, absorbiendo la energía, volatilizándose y mezclándose con el gas portador en la cámara de estancamiento, lugar de donde parte la expansión supersónica. Dos parámetros fundamentales que influyen en el proceso son la potencia y la longitud de onda a la que opera el láser. La potencia del láser se define como la energía por unidad de tiempo que posee cada pulso del láser:  $P = E/T$ . De esta manera, al ser la energía del láser constante, variando la duración del pulso se puede controlar la potencia de este. Además, es de importancia una adecuada focalización del láser. Por otra parte, el armónico al que opera el láser se selecciona a través de cristales que poseen ciertas propiedades características. En este trabajo se ha empleado el tercer armónico de un láser de Nd:YAG, por lo que se ha empleado un cristal que triplica la frecuencia a la que opera el láser. Este armónico es la frecuencia en la que la muestra absorbe la mayor cantidad de radiación, por lo que la cantidad de muestra volatilizada aumentará. Resumiendo, se ha usado un láser con una duración de 20ps y 10 mJ por pulso a 355 nm.

#### **IV. 3. 2. Expansión supersónica.**

La mezcla de moléculas y gas portador sufre una expansión supersónica para posteriormente ser excitadas por la radiación de microondas. La expansión supersónica se origina por una elevada diferencia de presiones entre la cámara de estancamiento donde se encuentra inicialmente la mezcla de muestra y gas portador ( $P_0 \approx 1 - 5 \text{ bar}$ ) y el tanque a alto vacío ( $P_0 \approx 10^{-7} - 10^{-8} \text{ bar}$ ), produciéndose un haz supersónico. El alto vacío se obtiene mediante bombas de vacío, combinando bombas rotativas y difusoras. Ambos compartimentos, la zona

de estancamiento y el tanque a alto vacío, se encuentran separados por un diminuto orificio denominado tobera.

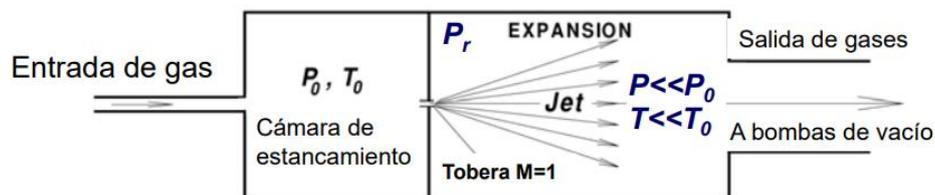


Figura 8. - Diagrama del proceso de expansión supersónica.

Para que ocurra expansión supersónica se ha de satisfacer la condición:  $P_0/P_r > G$ , siendo  $G$  su valor crítico, el cual toma la expresión

$$G = \left(\gamma + 1/2\right)^{\left(\gamma/\gamma-1\right)}$$

donde  $\gamma = C_p/C_v$  y  $P_0$  la presión existente en la cámara de estancamiento y  $P_r$  la presión en el tanque donde se lleva a cabo la expansión. Cuando esto ocurre, es posible aplicar la aproximación isentrópica, considerando el gas de la expansión como ideal con un flujo continuo isentrópico y compresible y despreciables los efectos de la viscosidad y conducción del calor, además de  $C_p$  o  $\gamma$  constantes. Así, la magnitud más importante de la expansión es la entalpía por unidad de masa al venir el flujo controlado por un gradiente de presiones:

$$h + V^2/2 = h_0$$

Teniendo en cuenta esta expresión, la entalpía del gas en la cámara de estancamiento se convierte en energía cinética: al expandirse el gas, la entalpía decrecerá, el gas se enfriará y la velocidad media aumentará.

Como se ha comentado anteriormente un factor que influye en la intensidad de las transiciones rotacionales es la ley de distribución de Boltzmann, la cual rige las poblaciones de los estados energéticos de cada confórmero. Así, aplicando la aproximación del equilibrio local, se puede considerar que cada grado de libertad (traslacional, rotacional y vibracional) posee una distribución de Boltzmann. Al enfriarse el gas se consigue que disminuyan las temperaturas características de cada grado de libertad de la molécula, por lo que, únicamente se poblarán los estados que impliquen números cuánticos rotacionales bajos. Este hecho conlleva una gran simplificación en los espectros. Además, cabe destacar que se alcanza resolución sub-doppler, ya que el enfriamiento traslacional se traduce en una estrecha distribución de velocidades, consiguiendo que las líneas observadas en el espectro sean muy estrechas.

Por otra parte, la expansión supersónica es un proceso direccional. De esta manera las moléculas no colisionarán entre sí, por lo que se encuentran virtualmente aisladas y se evitará el ensanchamiento de línea por presión.

### IV. 3. 3. Sistema experimental.

El espectro de banda ancha de la D-penicilamina se obtiene en el instrumento LA-CP-FTMW<sup>37</sup> (*Laser Ablation - Chirped Pulse - Fourier Transform Microwave Spectroscopy*), cuya imagen se muestra en la Figura 9 y cuyo funcionamiento y condiciones del experimento llevado a cabo en este trabajo se detallan a continuación.

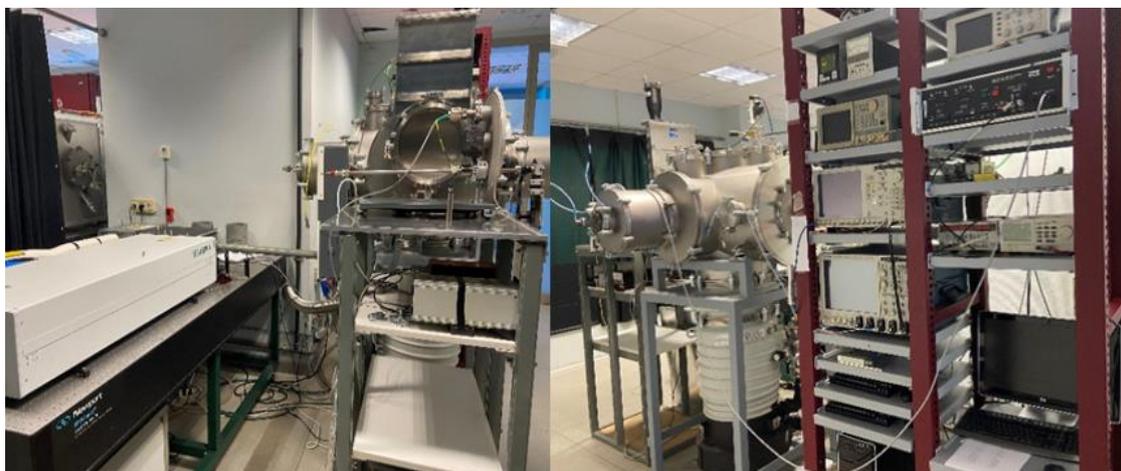


Figura 9. - Instrumento LA-CP-FTMW.

En primer lugar, la muestra objeto de estudio (convenientemente preparada) se deposita en una pieza metálica donde se producirá su volatilización, empleando el tercer armónico (355 nm) de un láser de ND:YAG (10 mJ) de picosegundos (20 ps de anchura de pulso). Para aprovechar al máximo la muestra, se conecta un motor al sistema, que la permite desplazarse y rotar. Así, una vez en fase gas, el fármaco se siembra en un gas portador (neón, 10 bar). Estas moléculas se expanden supersónicamente a través de un diminuto orificio denominado tobera o nozzle. Acto seguido, se polariza macroscópicamente a las moléculas de D-penicilamina, produciéndose el fenómeno de interacción radiación-materia, al someterlas a la radiación de microondas (amplificada convenientemente), que viaja entre dos antenas que contiene el tanque donde ocurre la expansión. En este caso, se trata de una radiación pulsada de banda ancha (“chirped pulse”), que se consigue digitalmente mediante un generador de onda arbitraria (“arbitrary waveform generator”), la cual abarca de tres a siete gigahercios. Mediante un doblador se obtendrá una radiación de seis a catorce gigahercios, frecuencias que abarca el espectro final. Tras un retardo determinado, se realiza la detección de los FID (“free induction decay”) moleculares, previamente amplificados, que se registran en un osciloscopio en el dominio del tiempo. Seguidamente, este realiza la transformada de Fourier, convirtiendo esta señal al dominio de frecuencias. Toda la secuencia de pulsos se recoge en la Figura 10.

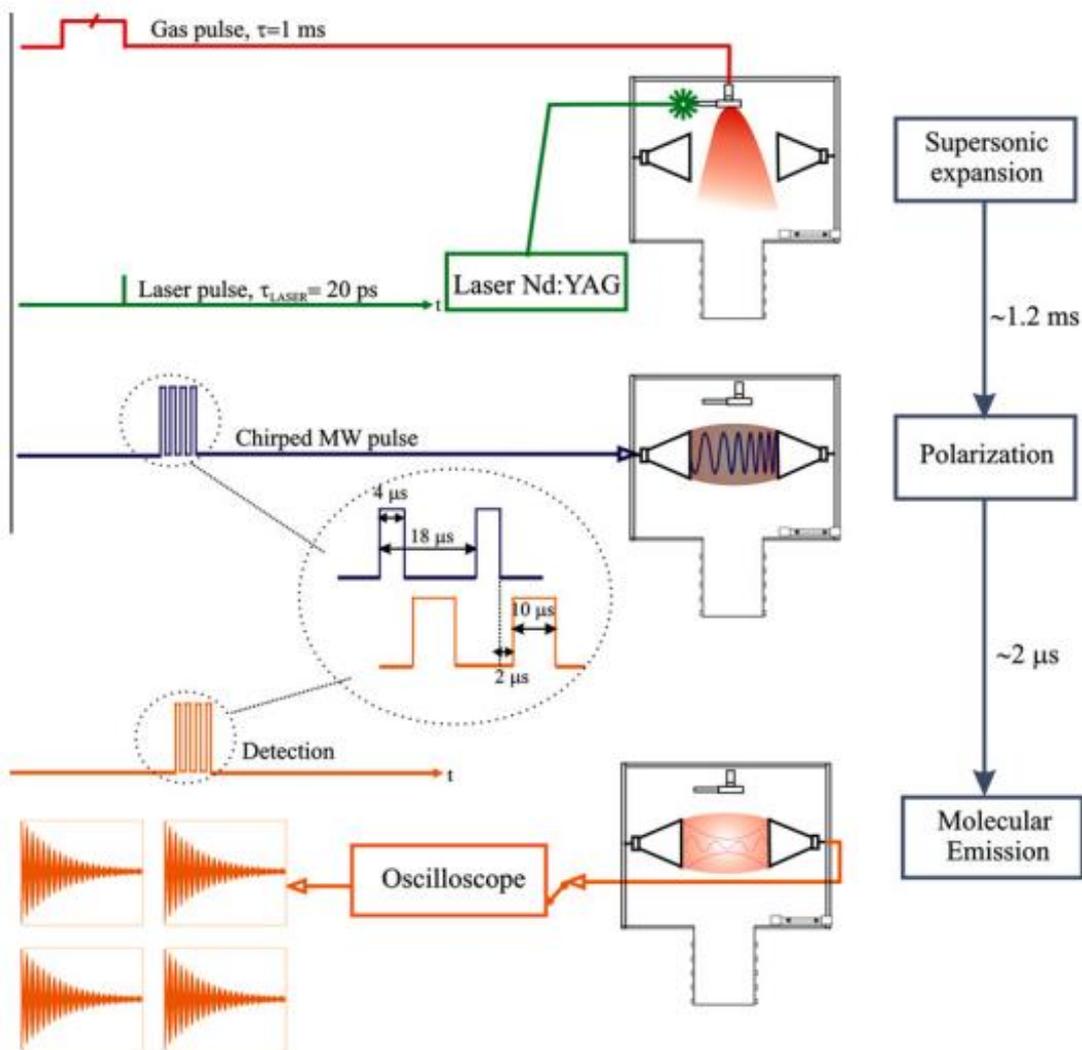


Figura 10. - Secuencia de pulsos que tienen lugar en el experimento<sup>38</sup>.

## V. Resultados y discusión.

### V. 1. Preparación de la muestra.

Antes de llevar a cabo el experimento en el instrumento en el que se obtendrá el espectro de rotación de la D-penicilamina es necesario realizar una adecuada preparación de la muestra. El fármaco se trata de un sólido pulverulento de elevado punto de fusión (210 °C), que descompone con la temperatura. Por tanto, para vaporizarlo, será necesario emplear un láser. En primer lugar, se pesan del orden de 0.7 g de D-penicilamina comercial. Con el fin de disminuir el tamaño del grano, el sólido se pulveriza en un mortero de ágata. A continuación, se mezcla con un aglomerante industrial (“peoval”, en este caso). La mezcla se deposita en un troquel en el cual, en uno de sus extremos, se introduce un tornillo que actúa como soporte. Finalmente, con ayuda de una prensa hidráulica, se le aporta la suficiente presión para que la muestra se compacte adecuadamente. Así, una vez extraída del troquel es sometida a un tiempo de secado en un desecador.

### V. 2. Búsqueda conformacional.

La forma neutra de la molécula de D-penicilamina posee un grupo amino y un grupo carboxilo, por lo que es posible catalogarla como un pseudoaminoácido. Este tipo de biomoléculas se caracterizan por poseer una gran flexibilidad, lo que se traduce en un gran número de torsiones, tal y como se muestra en la Figura 11.

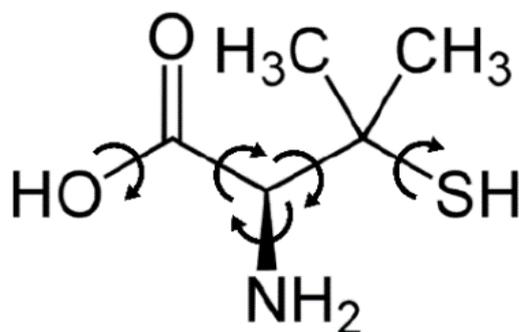
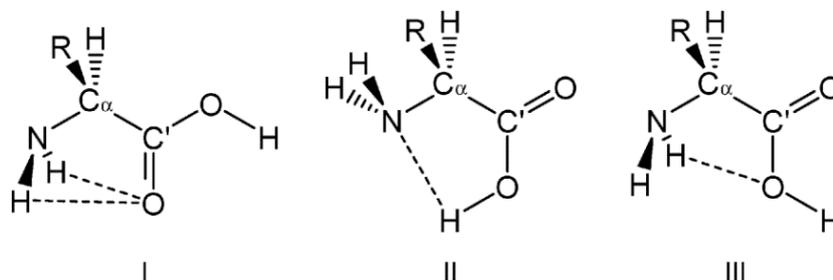


Figura 11. - Posibles torsiones de la forma neutra de la molécula de D-penicilamina.

Por tanto, es de esperar que la D-penicilamina posea una gran cantidad de confórmeros, los cuales se ven dominados por los diferentes tipos de interacciones intramoleculares de enlace de hidrógeno que pueden establecerse en la molécula. En este trabajo se empleará la nomenclatura definida en trabajos anteriores<sup>39</sup>. Así, un confórmero de tipo I es aquel en el que se establece una interacción intramolecular entre los protones que conforman el grupo amino y el oxígeno  $sp^2$  del grupo carboxilo ( $N-H \cdots O=C$ ), quedando este último en una disposición *cis*. Por otra parte, los confórmeros de tipo II, son aquellos en los que se forma un enlace de hidrógeno entre el protón del ácido carboxílico y el átomo de nitrógeno que conforma el grupo amino ( $O-H \cdots NH_2$ ), lo que conduce a una disposición *trans* del mismo. Finalmente, en un

confórmero de tipo III se genera un enlace de hidrógeno entre un protón del grupo amino y el oxígeno  $sp^3$  del ácido carboxílico ( $N-H \cdots O-H$ ), resultando en una disposición *cis*.



**Figura 12.** - Diferentes tipos de interacciones intramoleculares de enlace de hidrógeno que definen el panorama conformacional de la forma neutra de aminoácidos.

Así, se opta por explorar la superficie de energía potencial de la D-penicilamina empleando mecánica molecular con dos campos de fuerza diferentes: MMFFs y AMBER. Con esta metodología es posible encontrar todos sus mínimos locales, cada uno de los cuales se corresponde con una estructura conformacional. De esta manera, con el campo de fuerza MMFFs se han obtenido cuarenta y tres confórmeros y, con el campo de fuerza AMBER treinta y seis. Como era previsible, la intuición química es insuficiente para desvelar todos los posibles confórmeros de la molécula, o resultaría ser una labor muy costosa.

Una vez obtenidas todas las posibles estructuras conformacionales de la D-penicilamina, se procede a la optimización de su estructura molecular empleando un cálculo computacional *ab initio* de alto nivel, concretamente a nivel MP2/6-311++G(d,p), lo cual es necesario para obtener valores de energía y parámetros estructurales más precisos, además de eliminar estructuras redundantes. Gracias a que el experimento se lleva a cabo en condiciones de aislamiento y bajo condiciones de expansión supersónica, únicamente las estructuras más estables, generalmente por debajo de  $500\text{ cm}^{-1}$ , estarán lo suficientemente pobladas.

Así, siguiendo esta metodología, se obtuvieron un total de cuarenta y tres estructuras distintas. El anexo A recoge todas las estructuras, mientras que la Figura 13 muestra las estructuras más estables.

Por otra parte, en la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para las estructuras más estables a nivel MP2/6-311++G(d,p), los cuales serán de gran ayuda para el análisis del espectro y la asignación conformacional.

**Tabla 1.** – Los parámetros espectroscópicos más relevantes de cara al experimento de los diez conformeros más estables de la D-penicilamina a nivel MP2/6-311++G(d,p), en orden creciente de energías (a, b, c, etc.).

	la	lb	lc	ld	llla
<sup>[a]</sup> A(MHz)	2117	1818	2137	1800	2130
B(MHz)	975	1074	966	1084	969
C(MHz)	895	1029	894	1018	895
<sup>[b]</sup> k	-0.87	-0.89	-0.88	-0.83	-0.88
<sup>[c]</sup> $\mu_a$ (D)	2.1	1.8	0.1	-1.1	-2.1
$\mu_b$ (D)	-0.2	-1.8	1.9	1.5	-1.4
$\mu_c$ (D)	-0.4	0.0	0.0	1.6	1.4
<sup>[d]</sup> $\chi_{aa}$	-4.46	-2.14	-0.59	-3.96	-4.43
$\chi_{bb}$	2.74	1.98	2.33	2.80	2.67
$\chi_{cc}$	1.72	0.17	-1.74	1.16	1.76
<sup>[e]</sup> $\Delta E$ (cm <sup>-1</sup> )	0.00	255.01	398.47	446.93	424.87
<sup>[f]</sup> $\Delta E_{ZPE}$ (cm <sup>-1</sup> )	0.00	129.90	365.77	374.50	390.85
<sup>[g]</sup> $\Delta G$ (cm <sup>-1</sup> )	0.00	55.06	334.60	311.29	317.99
	le	lllb	lllc	lf	lg
<sup>[a]</sup> A(MHz)	1695	1818	1929	1773	1710
B(MHz)	1222	1077	1037	1125	1194
C(MHz)	965	1030	972	1045	964
<sup>[b]</sup> k	-0.30	-0.88	-0.86	-0.78	-0.38
<sup>[c]</sup> $\mu_a$ (D)	0.8	1.0	2.1	-0.3	1.3
$\mu_b$ (D)	0.5	-0.4	-0.7	-0.1	0.8
$\mu_c$ (D)	-1.6	0.3	0.9	-2.9	-0.4
<sup>[d]</sup> $\chi_{aa}$	-2.96	-2.25	-1.32	-0.92	-2.85
$\chi_{bb}$	1.46	1.93	-1.54	3.08	1.37
$\chi_{cc}$	1.51	0.33	2.85	-2.17	1.48
<sup>[e]</sup> $\Delta E$ (cm <sup>-1</sup> )	510.07	575.45	565.05	571.59	615.61
<sup>[f]</sup> $\Delta E_{ZPE}$ (cm <sup>-1</sup> )	422.72	447.06	452.90	478.53	562.28
<sup>[g]</sup> $\Delta G$ (cm <sup>-1</sup> )	387.16	293.87	263.71	462.29	460.22

<sup>[a]</sup>A, B, y C representan las constantes rotacionales (en MHz); <sup>[b]</sup>k es el parámetro de asimetría de Ray; <sup>[c]</sup> $\mu_a$ ,  $\mu_b$ , y  $\mu_c$  son los valores de las componentes del momento dipolar eléctrico (en Debyes); <sup>[d]</sup> $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son los valores que toman los elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear; <sup>[e]</sup>  $\Delta E$  se trata de la energía electrónica relativa (en cm<sup>-1</sup>); <sup>[f]</sup> $\Delta E_{ZPE}$  es la energía relativa en el punto cero (en cm<sup>-1</sup>); <sup>[g]</sup> $\Delta G$  se corresponde con la energía de Gibbs relativa calculada a 298 K respecto al mínimo global (en cm<sup>-1</sup>).

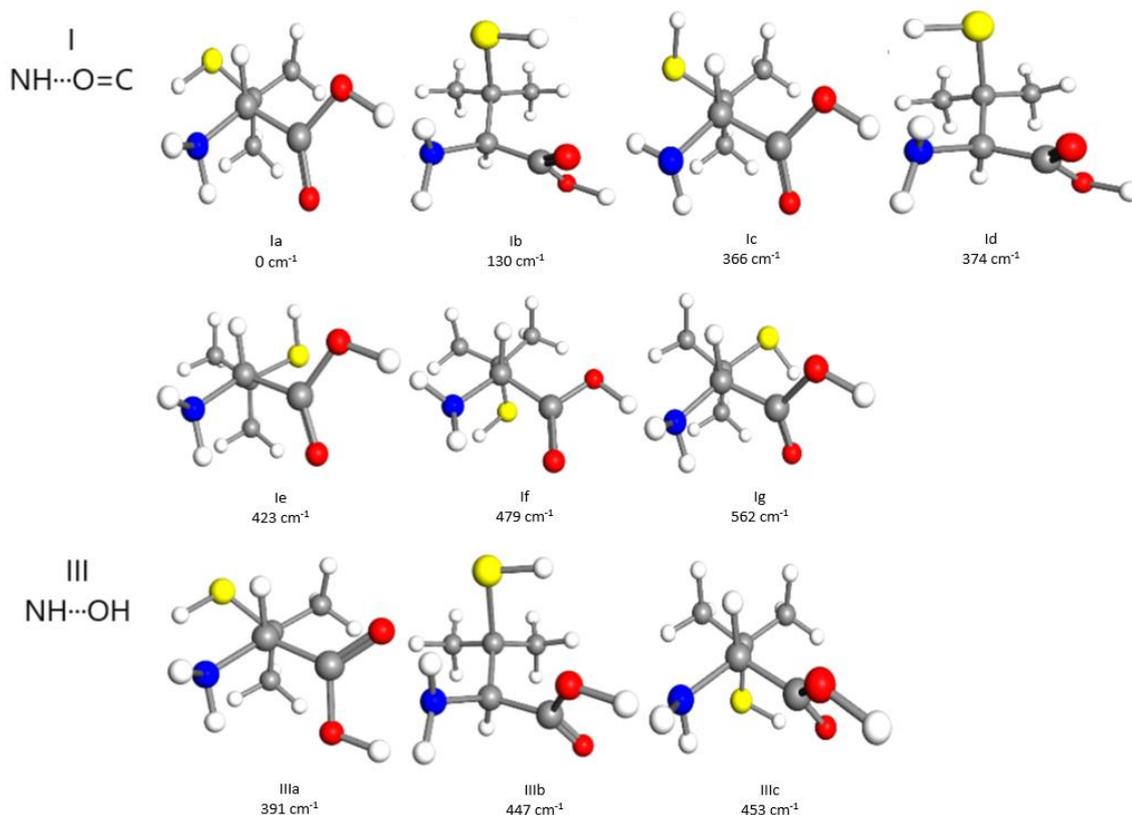


Figura 13. – Estructuras más estables de la molécula de D-penicilamina.

Como es posible extraer de la Figura 13, las disposiciones preferidas de la molécula de D-penicilamina corresponden a los tipos I y III, los cuales conllevan una disposición cis del ácido carboxílico. Es preciso mencionar que la molécula no posee ninguna conformación de tipo II como estructura más estable. En este caso, la disposición del ácido carboxílico es trans, por lo que es posible que los grupos metilo que posee la molécula ejerzan impedimentos estéricos que no permitan una adecuada estabilización de la misma.

### V. 3. Obtención y análisis del espectro.

Tras un periodo de tiempo en el que se deja reposar a la barra de muestra, se procede a la realización del experimento utilizando el espectrómetro LA-CP-FTMW mencionado en la metodología. La Figura 14 muestra el espectro rotacional de banda ancha obtenido en el rango comprendido entre 6-14 gigahercios de la molécula de D-penicilamina. Como puede verse, el espectro consta de una gran cantidad de transiciones rotacionales por lo que se puede concluir que la obtención del espectro ha sido todo un éxito.

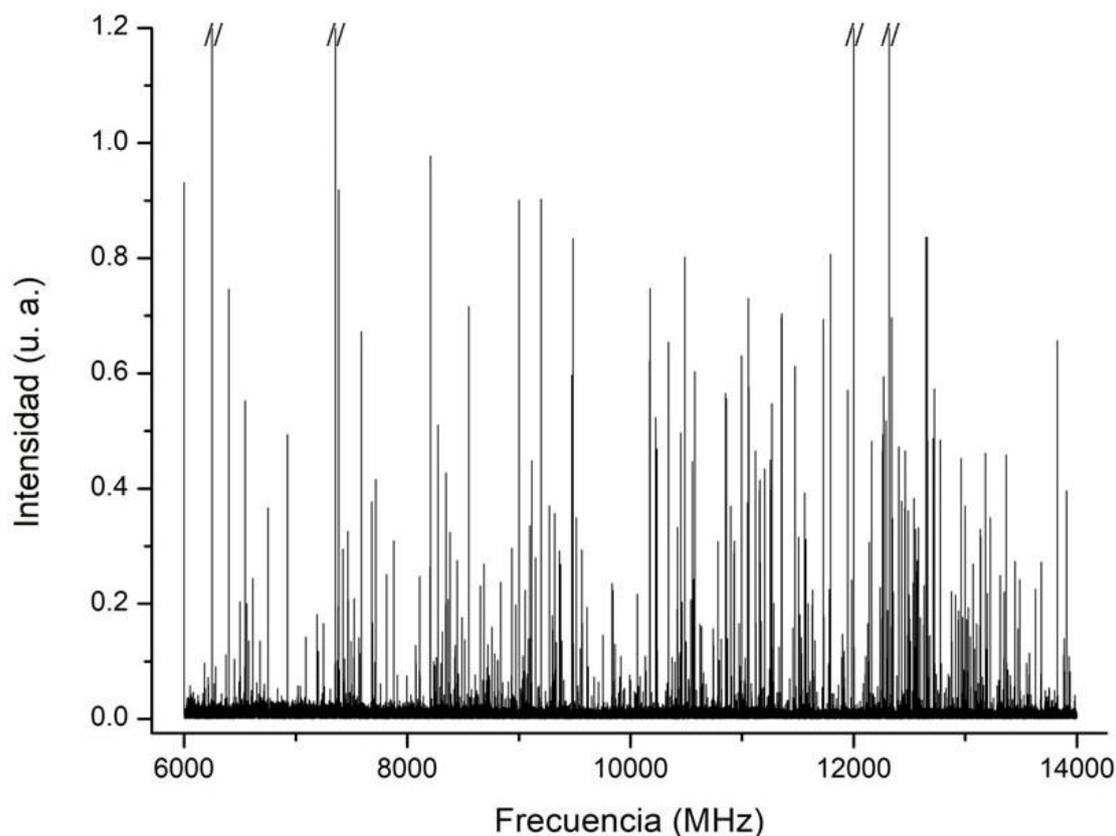


Figura 14. - Espectro rotacional de banda ancha de la molécula de D-penicilamina en el rango 6-14 GHz.

Una vez obtenido el espectro rotacional de la D-penicilamina se procede a su asignación, tomando como punto de partida los resultados obtenidos en el modelado teórico.

En primer lugar, es preciso remarcar que no todas las líneas del espectro se corresponden con transiciones rotacionales de la molécula. Generalmente, existen líneas electrónicas (fácilmente reconocibles al tratarse de números enteros, como 12000 o 12500 MHz), transiciones rotacionales debidas a otras moléculas generadas por fotofragmentación, o de moléculas que sencillamente se encuentran en el tanque o en la línea de gas o su trayecto. Por ejemplo, el espectro obtenido en este trabajo presenta las transiciones rotacionales características del dímero del agua a 7354.8 y 12321.0 MHz. Por ello, inicialmente se sustraen dichas líneas del espectro.

En primer lugar, se opta por la búsqueda del conformero Ia, ya que se trata del conformero más estable predicho por los cálculos *ab initio* previamente realizados. Además, si se atiende a los valores de cada una de las componentes del momento dipolar, es de esperar observar las transiciones tipo a ( $\mu_a \approx 2D$ ), que son las más sencillas de asignar, ya que poseen una progresión muy característica: aparecen como grupos de líneas con un espaciado a una frecuencia de, aproximadamente,  $\nu = (B + C)(J + 1)$ , siendo J el número cuántico de rotación y B y C las constantes rotacionales. De esta manera, empleando los programas JB95<sup>40</sup> y AABS<sup>41</sup> se encontró un rotámero con dichas características, pudiendo obtener sus constantes rotacionales  $A=2121$  MHz,  $B=971$  MHz y  $C=886$  MHz. Este ajuste se realizó utilizando un modelo de rotor rígido. Cabe

mencionar que las líneas asignadas presentan una estructura hiperfina, es decir, estaban divididas a su vez en pequeñas líneas llamadas componentes, características de moléculas que, por ejemplo, posean un núcleo de  $^{14}\text{N}$  ( $I=1$ ). Este hecho confirma que las líneas asignadas pertenecen a la D-penicilamina, por lo que partiendo de un ajuste en el que únicamente se habían introducido centros de frecuencias, se lleva a cabo un segundo ajuste, introduciendo las componentes de la estructura hiperfina característica de la molécula. Así, se obtiene un ajuste concluyente, en el que se obtienen los valores de las constantes de acoplamiento de cuadrupolo del rotámero, además de conseguir un refinamiento en sus constantes rotacionales. Los parámetros espectroscópicos obtenidos experimentalmente se recogen en la Tabla 2. Es preciso remarcar que no se observó ninguna transición de tipo  $b$  o  $c$ .

El siguiente conformero más estable en energía se trata del conformero Ib. En este caso, el conformero presenta un momento dipolar tanto en la componente  $a$  ( $\mu_a \approx 1.8\text{D}$ ) como en la componente  $b$  ( $\mu_b \approx -1.8\text{D}$ ), mientras que se anula en la componente  $c$  ( $\mu_c \approx 0\text{D}$ ). Así, la asignación conformacional, empleando también el modelo del rotor rígido, se presenta de forma más compleja que en el caso anterior. Como estrategia general, se asignan las transiciones tipo  $a$  en primer lugar, ya que al hacerlo quedan determinadas las constantes rotacionales  $B$  y  $C$ . Así, “únicamente” se ha de variar el valor de la constante rotacional  $A$  para llevar a cabo la asignación de todas las componentes tipo  $b$ . Finalmente, se asignaron también los valores de las constantes de acoplamiento cuadrupolares. De esta manera, quedan determinados todos los parámetros espectroscópicos que permiten la identificación inequívoca de un segundo rotámero. Para este rotámero se encontraron líneas de tipo  $a$  y  $b$ , pero ninguna de tipo  $c$ . La Tabla 2 muestra las constantes de rotación, así como los valores de las constantes de acoplamiento de cuadrupolo obtenidas.

**Tabla 2.** – Rotámeros encontrados en el espectro rotacional tras llevar a cabo su análisis.

	Rotámero 1	Rotámero 2
$^{[a]}A(\text{MHz})$	2121.305 (150)	1825.59969 (127)
$B(\text{MHz})$	970.91932 (184)	1067.11394 (59)
$C(\text{MHz})$	885.96970 (183)	1024.26115 (59)
$^{[b]}\chi_{aa}$	-4.268 (85)	-2.027 (37)
$\chi_{bb}$	2.312 (719)	1.781 (59)
$\chi_{cc}$	1.956 (719)	0.246 (59)

$^{[a]}A$ ,  $B$ , y  $C$  representan las constantes rotacionales (en MHz);  $^{[b]}\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son los valores que toman los elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear.

La Figura 15 muestra algunas de las líneas asignadas para los distintos rotámeros. Como puede observarse, ambos presentan transiciones rotacionales con una intensidad similar.

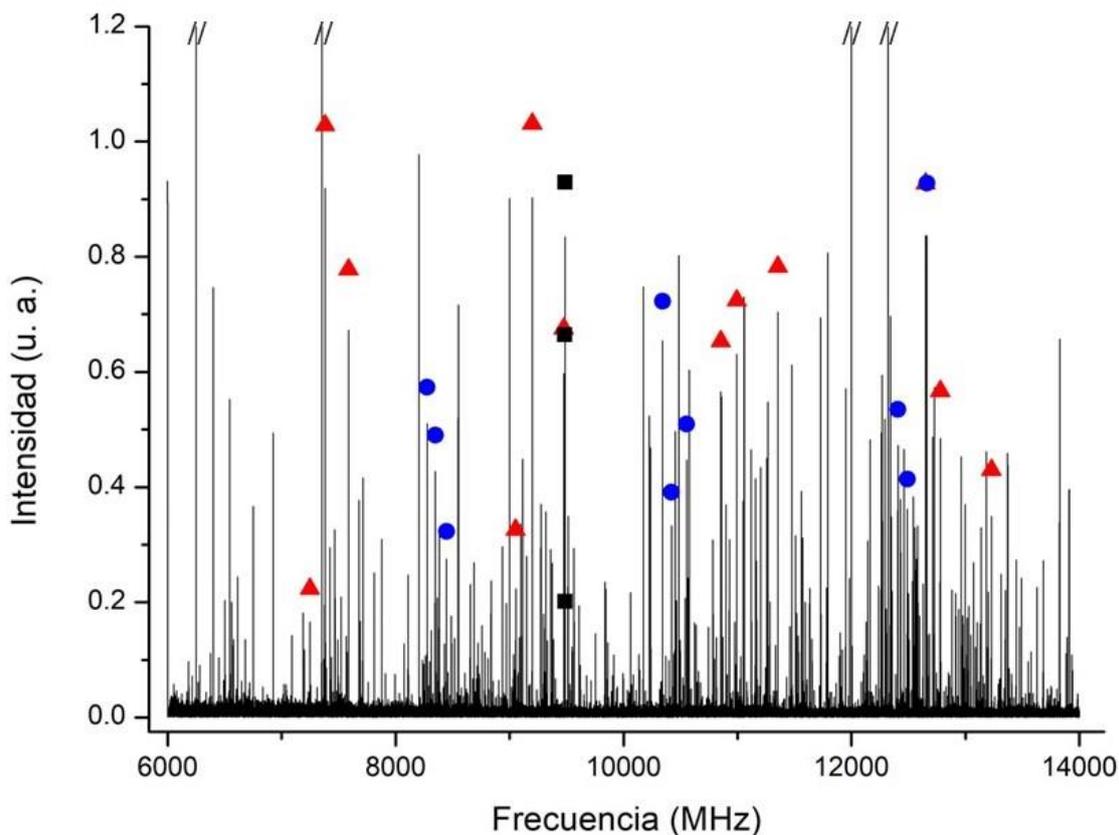


Figura 15. - Líneas más significativas de los rotámeros 1 (triángulo rojo) y 2 (círculo azul). Se ejemplifican ciertas líneas que aparecen en el espectro las cuales no pertenecen a ningún conformero de la molécula de D-penicilamina (cuadrado negro).

#### V. 4. Asignación conformacional.

El espectro rotacional de la D-penicilamina muestra inequívocamente la presencia de dos rotámeros. En primer lugar, al comparar los valores de las constantes espectroscópicas determinadas experimentalmente para el rotámero 1 (ver Tabla 2) con los valores predichos para las estructuras de la D-penicilamina (ver Tabla 1), no es factible llevar a cabo una asignación inmediata de su estructura. Por una parte, las constantes rotacionales de las especies Ia, Ic y IIIa muestran unos valores similares a los experimentales, por lo que, en primera instancia, se puede concluir que el rotámero 1 se trata de uno de estos tres conformeros. Así, se hace necesario recurrir a los valores de las constantes de acoplamiento de cuadrupolo, pudiéndose descartar la estructura Ic al no poseer valores concordantes. Finalmente, para la distinción entre las estructuras Ia y IIIa, se ha de recurrir a las reglas de selección. Si se atiende al conformero Ia, su estructura muestra únicamente momento dipolar en la componente a, por lo que únicamente presentará transiciones tipo *a*. Por su parte, el conformero IIIa viene descrito por una estructura que presenta valores no nulos en todas las componentes de su momento dipolar, por lo que serán observables transiciones rotacionales de tipo *a*, *b* y *c*. Por tanto, al observar únicamente transiciones de tipo *a*, el conformero que corresponde al rotámero 1 es la especie Ia. El resultado es concordante con los cálculos ya que estos predicen a la especie Ia como la más estable. La Tabla 3 muestra la comparativa final entre el rotámero 1 y la estructura asignada.

**Tabla 3.** - Comparativa entre los resultados predichos a través de la metodología “ab initio” y los resultados experimentales para el confórmero Ia.

	Confórmero Ia (predicho)	Rotámero 1 (experimental)
<sup>[a]</sup> A(MHz)	2117	2121.305 (150)
B(MHz)	975	970.91932 (184)
C(MHz)	895	885.96970 (183)
<sup>[b]</sup> χ <sub>aa</sub>	-4.46	-4.268 (85)
χ <sub>bb</sub>	2.74	2.312 (719)
χ <sub>cc</sub>	1.72	1.956 (719)

<sup>[a]</sup>A, B, y C representan las constantes rotacionales (en MHz); <sup>[b]</sup>χ<sub>aa</sub>, χ<sub>bb</sub> y χ<sub>cc</sub> son los valores que toman los elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear.

Una vez asignado el primer confórmero, se procede a la asignación de la segunda especie. Al igual que ocurre con el rotámero 1, la identificación no es inmediata y requiere de un análisis detallado. Al comparar las constantes rotacionales del rotámero 2 (ver Tabla 2) con las constantes predichas para cada confórmero (ver Tabla 1), las constantes rotacionales de las especies Ib, Id y IIIb poseen valores similares, por lo que, al igual que en el caso anterior, se tienen tres estructuras como posibles candidatas. Es posible descartar la estructura Id gracias a sus valores de las constantes de acoplamiento de cuadrupolo. Para la distinción entre las estructuras Ib y IIIb, se ha de recurrir una vez más a las reglas de selección. Por una parte, el confórmero Ib posee una estructura con momento dipolar tanto en la componente a como en la componente b, por lo que esta especie presentará tanto transiciones tipo *a* como *b*. Por otra parte, el confórmero IIIb presentará únicamente transiciones tipo *a*, al poseer únicamente momento dipolar en la componente a. Al observar tanto transiciones de tipo *a* como de tipo *b*, el confórmero que corresponde al rotámero 2 es la especie Ib, siendo esta la segunda especie más estable. En la Tabla 4, se realiza la comparativa entre los valores predichos y experimentales para el segundo rotámero y la estructura asignada.

**Tabla 4.** - Comparativa entre los resultados predichos a través de la metodología “ab initio” y los resultados experimentales para el confórmero Ib.

	Confórmero Ib (predicho)	Rotámero 2 (experimental)
<sup>[a]</sup> A(MHz)	1818	1825.59969 (127)
B(MHz)	1074	1067.11394 (59)
C(MHz)	1029	1024.26115 (59)
<sup>[b]</sup> χ <sub>aa</sub>	-2.14	-2.027 (37)
χ <sub>bb</sub>	1.98	1.781 (59)
χ <sub>cc</sub>	0.17	0.246 (59)

<sup>[a]</sup>A, B, y C representan las constantes rotacionales (en MHz); <sup>[b]</sup>χ<sub>aa</sub>, χ<sub>bb</sub> y χ<sub>cc</sub> son los valores que toman los elementos diagonales del tensor de acoplamiento de cuadrupolo nuclear.

## V. 5. Interacciones intramoleculares existentes en los rotámeros.

La Figura 16 muestra el panorama conformacional de la molécula de D-penicilamina. Las estructuras que se corresponden con los rotámeros identificados experimentalmente se encuentran enmarcadas.

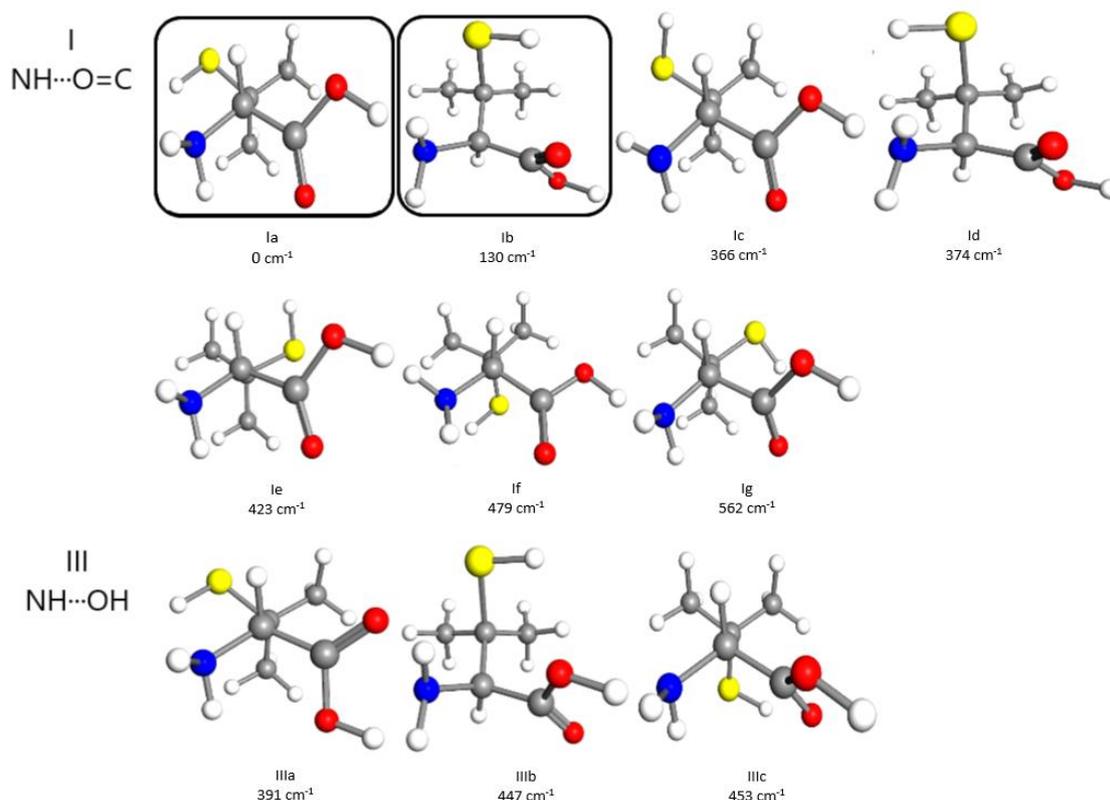


Figura 16. - Panorama conformacional de la molécula de D-penicilamina. Se remarcan los conforméromos identificados.

Ambas se tratan de estructuras conformacionales tipo I, por lo que las interacciones que premian sobre el resto, son los enlaces de hidrógeno entre el grupo amino y el carboxilo ( $\text{N-H}\cdots\text{O}=\text{C}$ ) de forma bifurcada, quedando este último en una disposición cis. Estas interacciones estabilizan a la molécula haciendo que aparezcan como las estructuras más estables.

No obstante, existen otra serie de interacciones, las cuales diferencian claramente ambos conforméromos. En el caso del conforméromo Ia, además se establece una interacción entre el protón que forma parte del grupo tiol y el nitrógeno del grupo amino ( $\text{S-H}\cdots\text{N-H}$ ). Así, se establece una interconexión entre los tres grupos funcionales que posee el fármaco, lo que explica su elevada estabilidad. En el caso del conforméromo Ib se produce la interacción entre uno de los protones del grupo amino con el azufre del grupo tiol, cuyo protón interactúa con el oxígeno  $\text{sp}^2$  del grupo carboxilo ( $\text{S-H}\cdots\text{O}=\text{C}$ ).

Finalmente, para evaluar las interacciones no covalentes mediante una representación visual, se ha realizado un NCIPLOT<sup>42,43</sup>. Estas surgen tras llevar a cabo un cálculo de las funciones de onda

de cada una de las estructuras optimizadas de los dos conformeros detectados, de donde es posible obtener la densidad electrónica de la molécula y su gradiente. Así, la fuerza de las interacciones intramoleculares que se establecen en cada conformero viene dada por el color que toma esta representación. El orden de colores que se emplea se conoce como BGR. Así, el color azul denota una interacción atractiva no covalente fuerte, el color verde denota interacciones moderadas/débiles y el color rojo fuerzas repulsivas. En ambos conformeros, como se puede observar en la Figura 17, las interacciones que se establecen entre los tres grupos funcionales son todas moderadas o débiles, no habiendo ninguna interacción fuerte. No obstante, el elevado número de interacciones que presentan las estructuras conlleva a una estabilización molecular importante. Por tanto, es coherente que ambas estructuras sean propias de los conformeros más estables, situando a la siguiente estructura más estable a unos  $\sim 400\text{ cm}^{-1}$ , y que ambos sean los rotámeros detectados en el espectro rotacional.

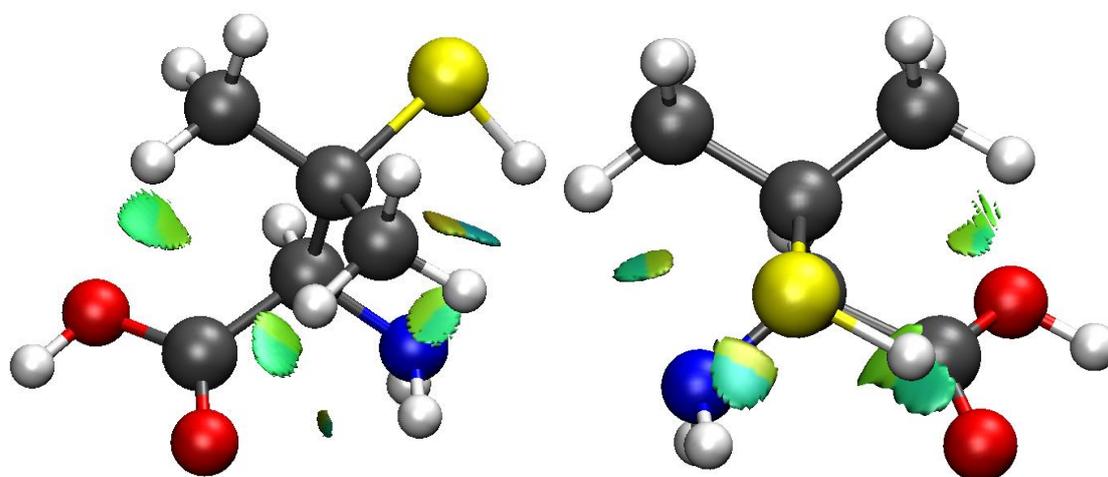


Figura 17. – NCIPLOT de los dos conformeros más estables detectados en el espectro rotacional de la D-penicilamina.

## V. 6. Implicación biológica.

Como se ha comentado en el punto anterior, a pesar de que la D-penicilamina sea un compuesto estable, ninguno de sus dos conformeros más relevantes presenta una interacción intramolecular fuerte. Por ejemplo, debido a que el grupo tiol presenta una interacción intramolecular (enlace de hidrógeno) moderado/débil, será energéticamente poco costoso romper esta intramolecularidad, lo que permitirá su interacción con otras moléculas o macromoléculas a su alrededor, lo cual podría explicar varias de las situaciones expuestas en la introducción, y, por tanto, su papel biológico. Algunos de estos casos podrían ser:

- Como se ha mencionado anteriormente (Figura 3), la L-penicilamina reacciona con la vitamina B<sub>6</sub> mediante la unión covalente entre los grupos amino y tiol de la molécula de L-penicilamina con la parte terminal de la vitamina, inhibiendo su efecto.
- Además, se había comentado que la penicilamina compite con la cisteína mediante la formación de puentes disulfuro (Figura 6) previniendo la formación de cálculos de

cistina en la cistinuria. Nuevamente, la capacidad de los grupos tioles para interactuar con el entorno parece tener un rol importante.

- También se había mencionado que la D-penicilamina se usa para tratar la artritis reumatoide debido a que posee propiedades inmunológicas. Esto parece ser consecuencia de las alteraciones entre la penicilamina y los receptores de la membrana de los linfocitos T, a través de sus grupos tiol.

Finalmente, además de la importancia del grupo tiol, el elevado número de grupos funcionales y posibles interacciones que presenta la penicilamina también podría explicar su alta capacidad para generar complejos de coordinación con los metales pesados, o con el cobre en la enfermedad de Wilson.

## VI. Conclusiones.

En el presente trabajo se ha llevado a cabo, por primera vez, el estudio rotacional de la molécula de D-penicilamina en fase gas empleando la técnica espectroscópica LA-CP-FTMW.

Tras llevar a cabo el modelado computacional “in vacuo” de la molécula empleando mecánica molecular y la metodología “ab initio”, registrar su espectro rotacional y realizar una asignación conformacional, se han desvelado inequívocamente dos confórmeros del fármaco, por comparación directa entre los parámetros espectroscópicos predichos y experimentales, que ofrecen un gran grado de correlación. Estas dos estructuras fueron predichas como las más estables y son ambas de tipo I, al darse la interacción de enlace de hidrógeno del protón del grupo amino con el oxígeno  $sp^2$  del grupo cis-carboxilo.

Además, se ha realizado un análisis de las fuerzas intramoleculares que gobiernan a los dos confórmeros. La serie de conexiones que se establecen en ellos apoya a su función como agente quelante o capacidad de coordinación con metales pesados.

Por otra parte, es de gran importancia la presencia de los dos grupos metilo que posee el medicamento, ya que es posible que aporten el suficiente impedimento estérico para que únicamente existan las conformaciones de tipo I y III como las formas más estables de la molécula, ambas caracterizadas por la disposición cis del grupo carboxilo. Además, este hecho se correlaciona con el mecanismo de actuación propuesto en la bibliografía<sup>12</sup>, en el que impiden la reoxidación de cobre (I) a cobre (II).

Finalmente, los resultados apuntan a que la no-capacidad de los grupos tioles en la penicilamina para formar enlaces intramoleculares fuertes pudiera ser la razón de las varias funciones biológicas que desempeña la penicilamina, permitiendo la interacción de estos grupos con el entorno en enfermedades tales como la cistinuria, la artritis reumatoide o la deficiencia de vitamina B<sub>6</sub> inducida por su forma L.

## VII. Bibliografía.

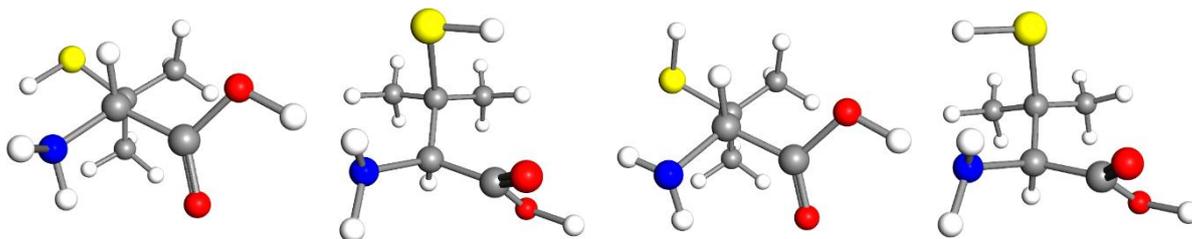
1. Walshe J. *The discovery of the therapeutic use of D-penicillamine*. *J. Rheumatol*, 1981; 8 Suppl 7:3-8.
2. Spinneker, A., Sola, R., Lemmen, V., Castillo, M. J., Pietrzik, K., & González-Gross, M.. (2007). Vitamin B6 status, deficiency and its consequences: an overview. *Nutrición Hospitalaria*, 22(1), 7-24.
3. Kuchinskas, E. J., Horvatht, A. & du Vigneaud, V. *An Anti-Vitamin B, Action of L-Penicillamine*. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* vol. 68 (1957).
4. Faggiani, R., Howard-Lock, H. E., Lock, C. J. L. & Orgias, R. *2R,4S-2-(2'-Methyl-3'-hydroxy-5'-hydroxymethylenepyridine-C4')-5,5-dimethylthiazolidine-4-carboxylic acid, the product of the reaction of D-penicillamine and vitamin B6*. *Can. J. Chem* vol. 69 (1991).
5. Liu, M., Cohen, E. J., Brewer, G. J. & Laibson, P. R. Kayser-Fleischer ring as the presenting sign of Wilson disease. *American Journal of Ophthalmology* **133**, 832–834 (2002).
6. Członkowska, A. *et al.* Wilson disease. *Nature Reviews Disease Primers* vol. 4 (2018).
7. Harrison, M. D. & Dameron, C. T. *Molecular Mechanisms of Copper Metabolism and the Role of the Menkes Disease Protein COPPER METABOLISM IN HUMANS*. *J BIOCHEM MOLECULAR TOXICOLOGY* vol. 13 (1999).
8. Das, S. K. & Ray, K. Wilson's disease: An update. *Nature Clinical Practice Neurology* vol. 2 482–493 (2006).
9. Franz, K. J. *et al.* Chelation therapy in Wilson's disease: from D-penicillamine to the design of selective bioinspired intracellular Cu (I) chelators. *Dalton Transactions* **41**, 6359–6370 (2012).
10. Cooper, G. J. S. Therapeutic Potential of Copper Chelation with Triethylenetetramine in Managing Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease. *Drugs* 2011 71:10 **71**, 1281–1320 (2012).
11. Walshe, J. M. The conquest of Wilson's disease. *Brain* vol. 132 2289–2295 (2009).
12. Birker, P. J. M. W. L. & Freeman, H. C. *Structure, Properties, and Function of a Copper(I)-Copper(II) Complex of D-Penicillamine: Pentathallium(I)  $\mu$ 8-Chloro-dodeca(D-penicillaminato)-octacuprate(I)hexacuprate(II) n-Hydrate*. *Journal of the American Chemical Society* vol. 12 (1977).
13. Stein, W. H. Excretion of amino acids in cystinuria. *Proc Soc Exp Biol Med* **78**, 705–708 (1951).
14. Rosenberg, L. E. & Hayslett, J. P. Nephrotoxic Effects of Penicillamine in Cystinuria. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **201**, 698–699 (1967).

15. Peterson, R. G. & Rumack, B. H. D-Penicillamine therapy of acute arsenic poisoning. *The Journal of Pediatrics* **91**, 661–666 (1977).
16. Bialy-Golan, A. & Brenner, S. Penicillamine-induced bullous dermatoses. *J Am Acad Dermatol* **35**, 732–742 (1996).
17. Sapadin, A. N. & Fleischmajer, R. Treatment of scleroderma. *Archives of Dermatology* **138**, 99–105 (2002).
18. Phelps, D. L., Lakatos, L. & Watts, J. L. D-Penicillamine for preventing retinopathy of prematurity in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* CD001073 (2000).
19. Brewer, G. J. Anticopper therapy against cancer and diseases of inflammation and fibrosis. *Drug Discov Today* **10**, 1103–1109 (2005).
20. Goodman, V. L., Brewer, G. J. & Merajver, S. D. Copper deficiency as an anti-cancer strategy. *Endocrine-Related Cancer* **11**, 255–263 (2004).
21. Elaine Howard-Lock, H., James, C., Lock, L. & Smalley, P. S. *The crystal structure of racemic DL-penicillamine and a spectroscopic study of D-(-)-penicillamine. Journal of Crystallographic and Spectroscopic Research, liol vol. 13* (1983).
22. 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.
23. Falat, T. & Platek, B. Growth of intermetallic compound between indium-based thermal interface material and copper substrate: Molecular dynamics simulations. *Materials Science- Poland* **33**, 445–450 (2015).
24. Engel, T.; Reid, P.; Hehre, W. *Química Física*; Pearson, 2006.
25. Fabáni, E. S. *Cálculos Computacionales de Estructuras Moleculares*. 2012, 1–98.
26. Ramachandran, K. I.; Deepa, G.; Namboori, K. *Computational Chemistry and Molecular Modeling*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008.
27. 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.
28. Orio, M.; Pantazis, D. A.; Neese, F. *Density Functional Theory. Photosynthesis Research*. 2009, pp 443–453.
29. 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.
30. Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry*; John Wiley & Sons Ltd, 2004.

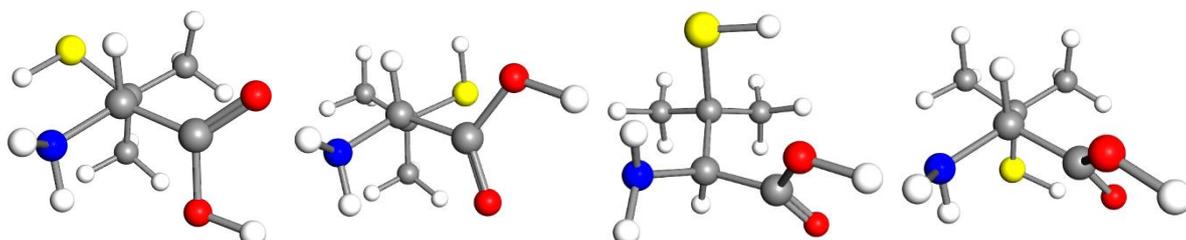
31. Singh, David J., Nordstrom, L. Density Functional Theory and Methods. In Planewaves, Pseudopotentials and the LAPW Method; Springer US, 1994; pp 5–21.
32. Grimme, S. Density functional theory with London dispersion corrections. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **1**, 211–228 (2011).
33. 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. *Journal of Chemical Physics* **132**, (2010).
34. Atkins, P.; de Paula, J. Química Física, 8th ed.; Editorial Médica Panamericana, 2008.
35. Alonso, J. L. & López, J. C. Microwave spectroscopy of biomolecular building blocks. *Topics in Current Chemistry* **364**, 335–402 (2015).
36. Hollas, J. M. Modern Spectroscopy. Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy. Wiley and sons 1988.
37. Alonso, J. L. & López, J. C. Microwave spectroscopy of biomolecular building blocks. in *Topics in Current Chemistry* vol. 364 335–402 (Springer Verlag, 2015).
38. Mata, S., Peña, I., Cabezas, C., López, J. C. & Alonso, J. L. A broadband Fourier-transform microwave spectrometer with laser ablation source: The rotational spectrum of nicotinic acid. *Journal of Molecular Spectroscopy* **280**, 91–96 (2012).
39. Alonso, J. L., Pérez, C., Eugenia Sanz, M., López, J. C. & Blanco, S. Seven conformers of L-threonine in the gas phase: A LA-MB-FTMW study. *Physical Chemistry Chemical Physics* vol. 11 617–627 (2009).
40. JB D. F. Plusquellic Jb95 Spectral fitting program; NIST: Gaithers-burg, MD. <http://physics.nist.gov/jb95>
41. Z. Kisiel, in: J. Demaison et al. (Eds.), Spectroscopy from Space, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2001, pp.91-106.
42. E. R. Johnson, S. Keinan, P. Mori-Sánchez, J. Contreras-García, A. J. Cohen and W. Yang, Revealing noncovalent interactions, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 6498–6506.
43. J. Contreras-García, E. R. Johnson, S. Keinan, R. Chaudret, J. P. Piquemal, D. N. Beratan and W. Yang, NCIPLLOT: A program for plotting noncovalent interaction regions, *J. Chem. Theory Comput.*, 2011, **7**, 625–632.

## Anexo A. Estructuras optimizadas de la molécula de D-penicilamina a nivel MP2/6-311++G(d,p).

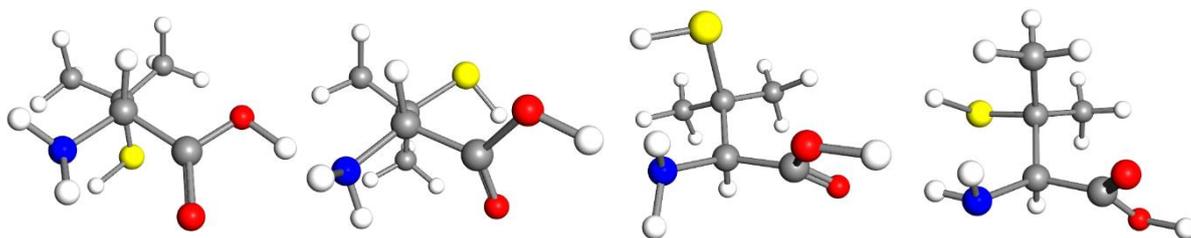
Confórmero	1	2	3	4
A(MHz)	2117	1818	2137	1800
B(MHz)	975	1074	966	1084
C(MHz)	895	1029	894	1018
$\mu_a$ (D)	2.1	1.8	0.1	-1.1
$\mu_b$ (D)	-0.2	-1.8	1.9	1.5
$\mu_c$ (D)	-0.4	0.0	0.0	1.6
$\chi_{aa}$	-4.46	-2.14	-0.59	-3.96
$\chi_{bb}$	2.74	1.98	2.33	2.80
$\chi_{cc}$	1.72	0.17	-1.74	1.16
$\Delta E(\text{cm}^{-1})$	0.00	255.01	398.47	446.93
$\Delta E_{\text{ZPE}}(\text{cm}^{-1})$	0.00	129.90	365.77	374.50
$\Delta G(\text{cm}^{-1})$	0.00	55.06	334.60	311.29



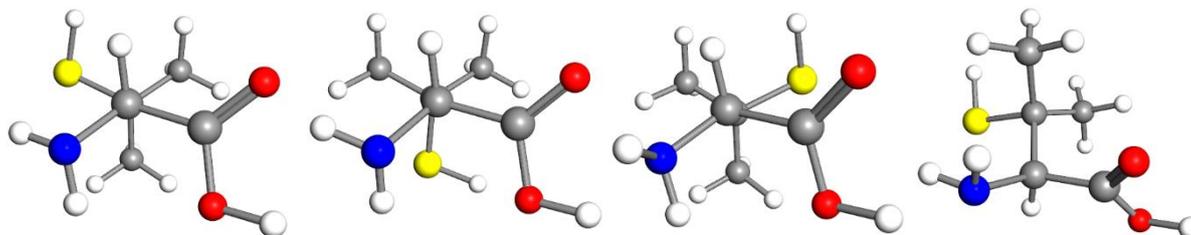
Confórmero	5	6	7	8
A(MHz)	2130	1695	1818	1929
B(MHz)	969	1222	1077	1037
C(MHz)	895	965	1030	972
$\mu_a$ (D)	-2.1	0.8	1.0	2.1
$\mu_b$ (D)	-1.4	0.5	-0.4	-0.7
$\mu_c$ (D)	1.4	-1.6	0.3	0.9
$\chi_{aa}$	-4.43	-2.96	-2.25	-1.32
$\chi_{bb}$	2.67	1.46	1.93	-1.54
$\chi_{cc}$	1.76	1.51	0.33	2.85
$\Delta E(\text{cm}^{-1})$	424.87	510.07	575.45	565.05
$\Delta E_{\text{ZPE}}(\text{cm}^{-1})$	390.85	422.72	447.06	452.90
$\Delta G(\text{cm}^{-1})$	317.99	387.16	293.87	263.71



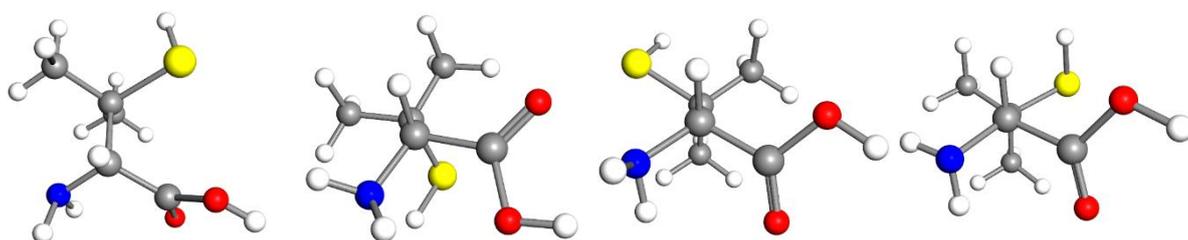
Confórmero	9	10	11	12
A(MHz)	1773	1710	1803	2138
B(MHz)	1125	1194	1084	962
C(MHz)	1045	964	1023	889
$\mu_a$ (D)	-0.3	1.3	-0.6	-0.3
$\mu_b$ (D)	-0.1	0.8	-0.8	0.9
$\mu_c$ (D)	-2.9	-0.4	1.0	0.8
$\chi_{aa}$	-0.92	-2.85	-3.63	-1.32
$\chi_{bb}$	3.08	1.37	2.72	2.33
$\chi_{cc}$	-2.17	1.48	0.90	-1.01
$\Delta E$ (cm <sup>-1</sup> )	571.59	615.61	673.36	779.18
$\Delta E_{ZPE}$ (cm <sup>-1</sup> )	478.53	562.28	606.64	677.79
$\Delta G$ (cm <sup>-1</sup> )	462.29	460.22	482.42	562.12



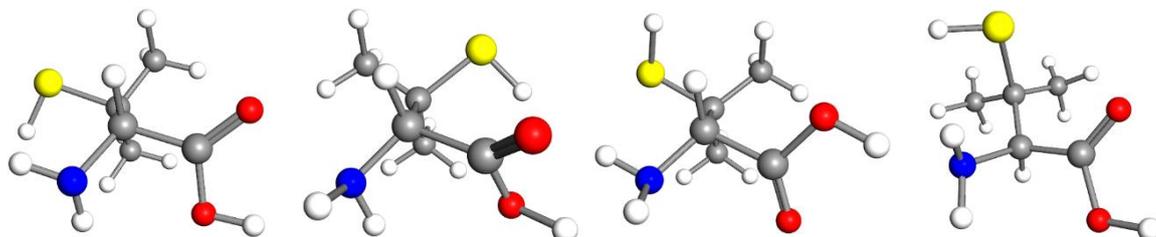
Confórmero	13	14	15	16
A(MHz)	2147	1823	1706	2112
B(MHz)	965	1072	1208	973
C(MHz)	891	1026	971	905
$\mu_a$ (D)	0.2	-1.2	0.6	-0.6
$\mu_b$ (D)	0.3	0.1	1.7	1.7
$\mu_c$ (D)	1.8	-0.2	0.6	1.3
$\chi_{aa}$	-0.92	-3.77	-2.79	-0.50
$\chi_{bb}$	2.32	2.27	1.24	2.28
$\chi_{cc}$	-1.41	1.51	1.55	-1.78
$\Delta E$ (cm <sup>-1</sup> )	751.52	893.55	842.92	808.52
$\Delta E_{ZPE}$ (cm <sup>-1</sup> )	680.19	719.94	750.96	763.75
$\Delta G$ (cm <sup>-1</sup> )	591.74	586.94	706.63	724.90



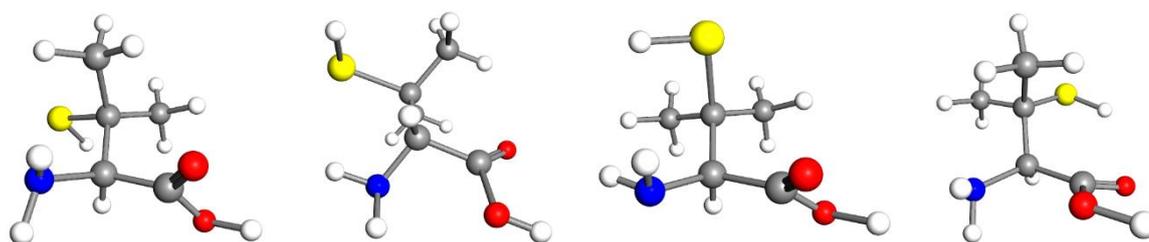
Confórmero	17	18	19	20
A(MHz)	1695	1772	2126	1707
B(MHz)	1247	1118	977	1211
C(MHz)	959	1064	894	962
$\mu_a$ (D)	0.1	0.6	-1.6	-1.3
$\mu_b$ (D)	0.4	2.0	1.6	0.7
$\mu_c$ (D)	-0.5	-1.8	-0.2	-1.0
$\chi_{aa}$	-3.04	0.11	-4.65	-2.70
$\chi_{bb}$	1.47	2.93	2.90	2.98
$\chi_{cc}$	1.57	-3.05	1.75	-0.28
$\Delta E(\text{cm}^{-1})$	892.59	894.07	924.02	1006.82
$\Delta E_{\text{ZPE}}(\text{cm}^{-1})$	774.52	802.33	859.94	871.19
$\Delta G(\text{cm}^{-1})$	686.51	798.16	752.61	795.25



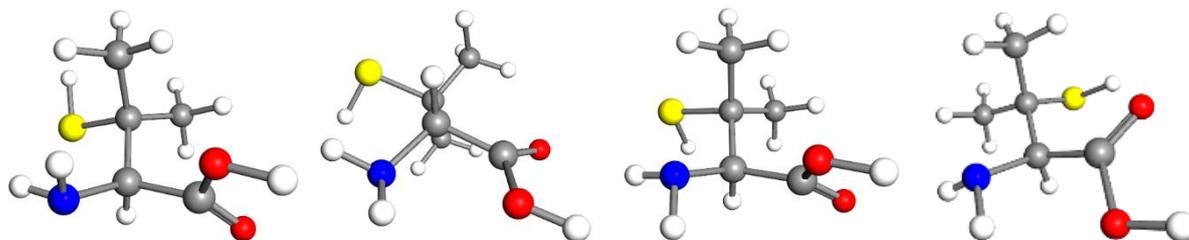
Confórmero	21	22	23	24
A(MHz)	2155	1724	2147	1922
B(MHz)	976	1182	969	1043
C(MHz)	879	966	891	975
$\mu_a$ (D)	0.3	0.8	0.6	1.3
$\mu_b$ (D)	-0.6	1.5	-1.5	-1.7
$\mu_c$ (D)	2.5	1.9	-2.0	-0.6
$\chi_{aa}$	-1.75	-2.67	1.78	-2.09
$\chi_{bb}$	2.29	1.09	2.83	-0.63
$\chi_{cc}$	-0.54	1.58	-4.61	2.72
$\Delta E(\text{cm}^{-1})$	1041.72	1005.21	1149.60	1149.85
$\Delta E_{\text{ZPE}}(\text{cm}^{-1})$	925.84	940.03	1015.06	1019.04
$\Delta G(\text{cm}^{-1})$	766.06	875.94	872.19	791.67



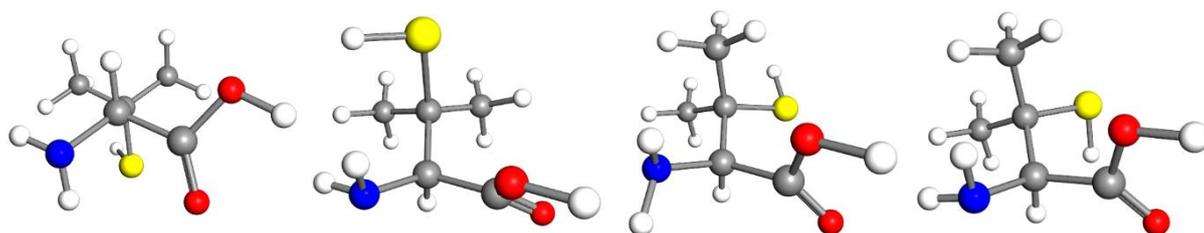
Confórmero	25	26	27	28
A(MHz)	2118	2222	1789	1786
B(MHz)	966	966	1081	1178
C(MHz)	894	835	1030	916
$\mu_a$ (D)	1.9	-1.0	1.2	-2.4
$\mu_b$ (D)	1.5	-0.8	1.8	1.6
$\mu_c$ (D)	-0.8	-1.8	1.0	1.0
$\chi_{aa}$	-4.59	1.43	-2.37	-2.14
$\chi_{bb}$	2.81	2.05	2.79	0.56
$\chi_{cc}$	1.78	-3.47	-0.43	1.58
$\Delta E(\text{cm}^{-1})$	1104.89	1137.71	1191.50	1224.74
$\Delta E_{\text{ZPE}}(\text{cm}^{-1})$	1019.74	1029.07	1066.84	1112.59
$\Delta G(\text{cm}^{-1})$	938.31	973.77	947.01	984.63



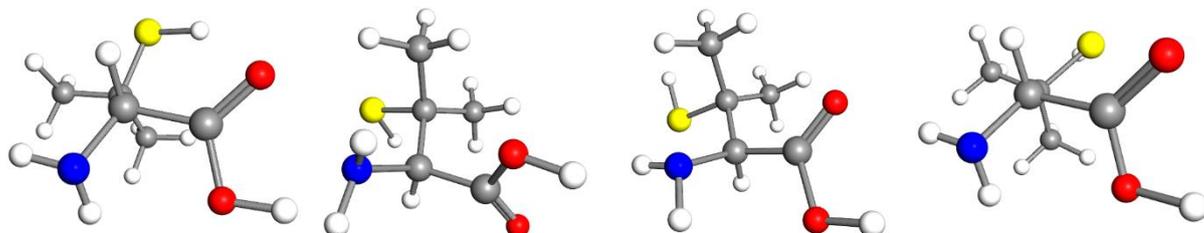
Confórmero	29	30	31	32
A(MHz)	2121	2231	2174	1886
B(MHz)	969	980	979	1119
C(MHz)	904	822	879	885
$\mu_a$ (D)	-0.6	-1.5	0.6	-1.8
$\mu_b$ (D)	0.2	-1.1	-0.2	1.6
$\mu_c$ (D)	3.2	-0.5	-0.5	-0.9
$\chi_{aa}$	-0.89	1.45	1.74	1.73
$\chi_{bb}$	2.26	2.65	2.91	2.84
$\chi_{cc}$	-1.36	-4.10	-4.65	-4.57
$\Delta E(\text{cm}^{-1})$	1201.97	1213.93	1244.76	1217.01
$\Delta E_{\text{ZPE}}(\text{cm}^{-1})$	1114.40	1120.43	1121.41	1132.96
$\Delta G(\text{cm}^{-1})$	1025.30	1025.18	890.52	1104.20



Confórmero	33	34	35	36
A(MHz)	1786	1786	1706	1713
B(MHz)	1092	1084	1223	1202
C(MHz)	1051	1035	966	965
$\mu_a$ (D)	-1.7	1.7	-0.1	1.4
$\mu_b$ (D)	2.6	-0.6	2.0	2.1
$\mu_c$ (D)	0.0	0.7	1.5	1.0
$\chi_{aa}$	-3.22	-3.04	-2.91	-3.15
$\chi_{bb}$	2.26	2.73	1.36	2.97
$\chi_{cc}$	0.97	0.31	1.55	0.17
$\Delta E(\text{cm}^{-1})$	1339.00	1352.42	1351.93	1404.52
$\Delta E_{\text{ZPE}}(\text{cm}^{-1})$	1169.56	1205.15	1219.15	1244.96
$\Delta G(\text{cm}^{-1})$	989.59	939.36	1098.44	1162.88



Confórmero	37	38	39	40
A(MHz)	1799	2130	2194	1719
B(MHz)	1172	955	972	1213
C(MHz)	920	899	843	957
$\mu_a$ (D)	0.4	1.9	0.4	-1.9
$\mu_b$ (D)	2.3	-0.1	-0.4	2.5
$\mu_c$ (D)	1.6	1.1	-0.6	1.9
$\chi_{aa}$	-2.25	-4.53	1.30	-2.89
$\chi_{bb}$	2.86	2.71	1.78	3.04
$\chi_{cc}$	-0.61	1.82	-3.09	-0.15
$\Delta E(\text{cm}^{-1})$	1330.56	1468.32	1623.16	1834.91
$\Delta E_{\text{ZPE}}(\text{cm}^{-1})$	1272.40	1360.12	1475.01	1649.89
$\Delta G(\text{cm}^{-1})$	1284.25	1240.95	1357.59	1471.02



Confórmero	41	42	43
A(MHz)	1856	1784	1778
B(MHz)	1126	1129	1116
C(MHz)	903	1036	1059
$\mu_a$ (D)	-0.8	0.9	-0.1
$\mu_b$ (D)	2.3	1.3	0.2
$\mu_c$ (D)	-1.9	1.8	-1.9
$\chi_{aa}$	1.79	0.18	0.12
$\chi_{bb}$	2.89	2.95	2.59
$\chi_{cc}$	-4.67	-3.14	-2.71
$\Delta E(\text{cm}^{-1})$	1865.89	1857.83	1904.91
$\Delta E_{\text{ZPE}}(\text{cm}^{-1})$	1719.28	1720.00	1753.04
$\Delta G(\text{cm}^{-1})$	1566.53	1588.10	1635.84

