



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Título del Trabajo

**CONFORMACIÓN Y ESTRUCTURA DE MOLÉCULAS DE INTERÉS
BIOLÓGICO: CONFORMACIÓN DE LA ASTRAGALINA**

Autor: MARTA M^a LAGUNA ORTEGA

Tutor/es: JUAN CARLOS LÓPEZ ALONSO

SUSANA BLANCO RODRÍGUEZ

Índice

1.	Resumen/ Abstract:	5
2.	Introducción:	7
3.	Objetivos y plan de trabajo:	11
4.	Fundamento teórico:	13
4.1	Introducción:.....	13
4.2	Ecuación de Schrödinger.....	13
4.3	Aproximación de Born-Oppenheimer:	13
4.4	Métodos de cálculo:	15
4.4.3	Métodos Semiempíricos:.....	20
4.4.4	Teoría Funcional de la Densidad (DFT):	20
4.5	Métodos de Búsqueda de Confórmeros: CREST:	22
5	Resultados:	25
5.1	Procedimiento:	25
5.2	RESULTADOS:.....	25
5.3	Simulación del espectro de microondas:	35
5.4	Estudio de las interacciones intramoleculares:	40
6	Conclusiones:.....	49
7	Anexo: Espectros de microondas:.....	51
8	Bibliografía:.....	57

1. Resumen/ Abstract:

Diversos estudios han demostrado que los polifenoles en general, y en particular los flavonoides, presentan actividad farmacéutica y beneficios para la salud debido a su capacidad de actuar como antialérgicos, antibacterianos, antiinflamatorios, antivirales y actividad antioxidante. Los flavonoides presentan estructuras químicas diversas, muchos de los que se encuentran en forma de glicósidos estando presentes en frutas y verduras, por lo que están incorporados en la dieta humana. Se dividen en varias clases, siendo las más generales flavonas, flavonoles y flavanonas.

La astragalina (kaempferol-3-O- β -glucósido), es un flavonoide natural que presenta multitud de propiedades farmacológicas incluyendo actividad antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena así como también características cardio y neuro protectoras.

En este trabajo se ha realizado el estudio teórico de la astragalina utilizando métodos ab initio y DFT, con objeto de caracterizar los conformeros más estables. Como objetivo principal se ha estudiado la estabilidad de los diferentes conformeros y los factores que contribuyen a esta.

Various studies have shown that polyphenols in general, and flavonoids in particular, have pharmaceutical activity and health benefits due to their ability to act as antiallergic, antibacterial, anti-inflammatory, antiviral and antioxidant activity. Flavonoids have diverse chemical structures, many of which are found in the form of glycosides being present in fruits and vegetables, which is why they are incorporated into the human diet. They are divided into several classes, the most general being flavones, flavonols and flavanones.

Astragalin (kaempferol-3-O- β -glucoside) is a natural flavonoid that has many pharmacological properties including antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, neuroprotective and cardioprotective property.

In this work, a theoretical study of astragalin has been carried out using ab initio and DFT methods, to characterize the most stable conformers. The stability of the different conformers and the factors that contribute to it have been studied as the main objective.

2. Introducción:

En 1930 una nueva sustancia fue aislada de las naranjas, en ese tiempo se creyó que era un nuevo tipo de vitaminas y fue designada como vitamina P, más tarde se esclareció que esta sustancia era un flavonoide y hoy en día se conocen más de 4000 variedades de flavonoides.

Los flavonoides¹ consisten en un gran grupo de compuestos polifenólicos, que poseen estructura de benzo- γ -pirona y se encuentran en las plantas, aunque también se pueden sintetizar por vía de los fenilpropanoides. Los flavonoides son sintetizados por las plantas en respuesta a agresiones externas como una infección provocada por microbios y sus actividades biológicas dependen de su estructura y grupos funcionales. La naturaleza química de los flavonoides depende de su estructura, del grado de hidroxilación, sustitución y conjugación, además del grado de polimerización. Estas sustancias han resultado muy interesantes sobre todo por su potencial como antioxidantes. Los grupos funcionales hidroxilo determinan esta actividad antioxidante frente a radicales libres o quelando iones metálicos. Como componentes de la dieta, los flavonoides tienen propiedades beneficiosas para la salud debido a su capacidad antioxidante, esto ocurre tanto en sistemas in vivo como in vitro.

Los flavonoides se encuentran en todas las plantas, se localizan especialmente en las vacuolas de las células de la piel de las frutas y hortalizas, aportando sabor y color. Podemos dividir los flavonoides en dos grupos principales: antocianinas y antoxantinas, que se agrupan a su vez en diferentes subclases dependiendo de la estructura y propiedades. Las diferentes subclases de los flavonoides son: Flavonas, flavonoles, flavanonas, catequinas, isoflavonas y antocianidinas.²

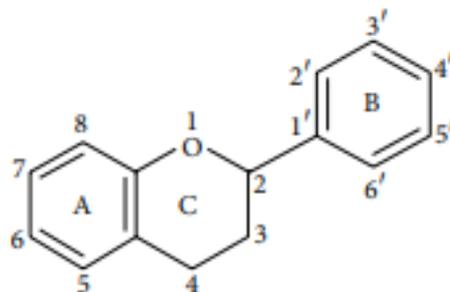


Figura 1: Estructura básica flavonoide

Los flavonoides tienen una estructura de anillos formada por 15 carbonos (ver figura 1). Consta de dos anillos aromáticos A y B que contienen normalmente grupos hidroxilo y carbonilo. Las diferentes clases difieren en el nivel de oxidación y sustitución del anillo C, mientras que las subclases se clasifican por la sustitución de los anillos A y B. Existen multitud de compuestos individuales en cada una de las subclases. Los flavonoides se presentan como agliconas, glucósidos y derivados metilados. La estructura básica de los flavonoides corresponde con una aglicona. La posición del sustituyente benzenoide B divide a los flavonoides en dos clases: Flavonoides (posición 2), isoflavonoides (posición 3) y neoflavonoides (posición 4). Los flavonoles difieren de las flavanonas en el grupo hidroxilo en la posición 3 y el doble enlace de los carbonos C2-C3. Los flavonoides suelen ser hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 2, 3', 4' y 5'. Cuando se forman los glucósidos, en enlace glucosídico se forma normalmente en las posiciones 3 o 7 y el carbohidrato suele ser normalmente L-ramnosa, D-glucosa, galactosa o arabinosa.³

Los estudios espectroscópicos sobre los flavonoides han revelado que la mayoría de las flavonas y flavonoles poseen dos bandas principales de absorción en el UV-Vis: la banda I (sobre 320-385 nm) representa la absorción del anillo B, mientras que la banda II (sobre 250-285 nm) corresponde a la absorción del anillo A. Los grupos funcionales sobre el esqueleto del flavonoide pueden causar un cambio en la absorción, como la banda a 367 nm en el kaempferol (grupos hidroxilos 3, 5, 7 y 4'). La ausencia de del grupo hidroxilo en la posición 3 de los flavones hace que se puedan distinguir de los flavonoles. Las flavanonas tienen un anillo heterocíclico saturado C sin conjugación entre los anillos A y B. Las flavanonas muestran una banda II de absorción muy fuerte con un máximo entre 270 y 295 nm, y solo un pico de la banda I entre 326-327 nm. La banda II tiene dos picos en compuestos con el anillo B monosustituido, pero más de un pico cuando en anillo B esta di, tri u o- sustituido.⁴

La mayoría de los flavonoides que están presentes en plantas se encuentran como glicósidos, por lo que tienen que ser convertidos en agliconas para que puedan ser absorbidos de manera más sencilla en el intestino delgado. Un mecanismo alternativo es que los glicósidos son hidrolizados por una enzima denominada lactasa floricina hidrolasa (LPH), liberando la aglicona que puede ser absorbida en el intestino delgado. Los glicósidos que no son sustratos de esta enzima son transportados al colon donde existen bacterias que pueden hidrolizar estos flavonoides glicósidos, además de degradar simultáneamente la aglicona. Los flavonoides oligoméricos se hidrolizan a monómeros y dímeros mediante las condiciones ácidas en el estómago.⁵

Dentro de las subclases de los flavonoides, el kaempferol (figura 2) y sus derivados, corresponde al grupo de los flavonoles, que a su vez corresponde al grupo de las antoxantinas. Kaempferol-3-O-β-glucosa (figura 3), también conocido como astragalina, es uno de los flavonoides encontrados en multitud de plantas. En muchos estudios se ha demostrado que la astragalina posee muchas funciones biológicas, como ser un buen antioxidante, antiinflamatorio, anticáncer...⁶

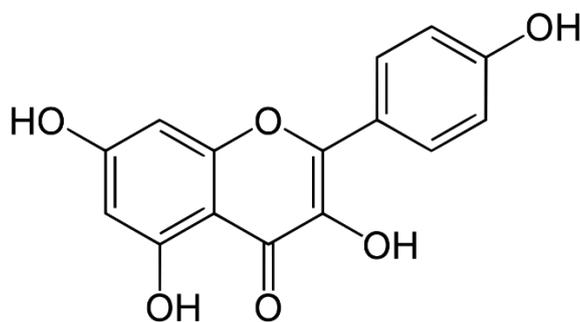


Figura 2:Esquema estructural Kaempferol

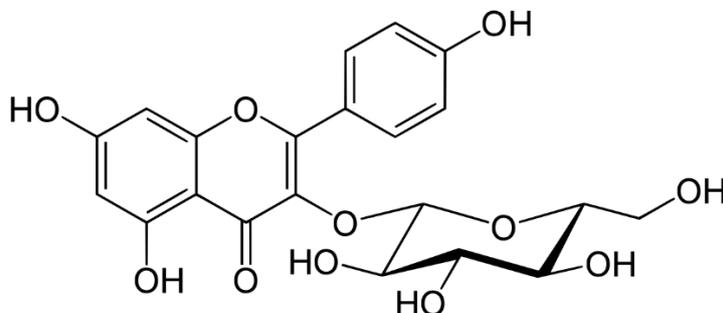


Figura 3: Esquema estructural Astragalina

La astragalina se puede encontrar en multitud de plantas, aunque también se puede obtener mediante la glicosilación del kaempferol en la posición 3 C-O.

Existe evidencia de que el consumo de compuestos fenólicos presentes en productos naturales disminuye el riesgo de padecer problemas de salud debido a la capacidad antioxidante de estos compuestos.

La absorción de los flavonoides presentes en los alimentos depende de sus propiedades fisicoquímicas como su tamaño molecular, configuración, lipofilia, solubilidad y pKa. Los flavonoides pueden ser absorbidos en el intestino delgado o llegar al colon antes de la absorción, dependiendo de la estructura del flavonoide, si es o no un glicósido o aglicona. Las plantas sintetizan gran variedad de productos naturales, conocidos como metabolitos secundarios, los cuales tienen un papel importante en la defensa ante microorganismos y también tienen importantes beneficios para animales y humanos. La glicosilación es la modificación de los productos generados por las plantas durante su biosíntesis, enlazándolos a un azúcar. La glicosilación mejora la solubilidad y la estabilidad, además facilita el almacenamiento en las células de las plantas y es un factor importante para determinar la bioactividad de los productos. Los flavonoides constituyen un grupo muy grande de productos naturales donde también se pueden encontrar formas glicosiladas, como en el caso de la quercetina, que puede estar unido a varios azúcares en diferentes posiciones, llegando a existir 300 glicósidos diferentes de la quercetina con diferentes actividades.⁴

Los antioxidantes actúan como fuentes de hidrógeno y se oxidan en lugar del ácido graso, protegiendo las células contra el daño de los radicales libres. Los antioxidantes más conocidos son las vitaminas C y E, sin embargo, los flavonoides también poseen capacidad antioxidante, dependiendo de la estructura y cantidad y posición de los grupos hidroxilo. Como norma general, a mayor número de grupos hidroxilo en el flavonoide, mayor capacidad antioxidante.⁷

Diversos estudios han demostrado que la razón estructural más importante para la actividad antioxidante en los flavonoides es la orientación de la unión del grupo 3',4'-dihidroxi al anillo B. La astragalina solo posee una sustitución del grupo 4'-hidroxi al anillo B, por lo que su actividad antioxidante no es especialmente alta en comparación a otros flavonoides.⁸

Como la astragalina proviene de la unión del kaempferol a una molécula de glucosa, la actividad biológica no será la misma. Diversos estudios mostraron los efectos inhibitorios de la astragalina y kaempferol en la producción de 4-hidroxi-estradiol en la catálisis del citocromo CYP1B1. La inactivación metabólica del estradiol incluye la conversión de los estrógenos de baja actividad, como el estriol, el cual se puede excretar mediante la orina y otros compuestos que se eliminan en los riñones. CYP1B1 actúa como una enzima muy importante en el metabolismo del estradiol, y el esteroide que esta enzima produce, tiene un fuerte efecto tumoral. El estradiol se utiliza como sustrato para estudiar el efecto inhibitorio de la astragalina y kaempferol en CYP1B1, ya que esta enzima forma enlaces de hidrogeno con el estradiol.

Al estar unida a una molécula de glucosa, el efecto inhibitorio de la astragalina se comprueba que es menor que el del kaempferol, ya que afecta a la unión al sitio activo de CYP1B1, ya que las posiciones 4'-OCH₃ en el anillo B y 5,7-dihidroxi en el anillo A de los flavonoides tienen un papel fundamental en inhibir la actividad de las enzimas. Este es uno de los ejemplos que atribuye a la astragalina su potencial de quimiopreención del cáncer.⁹

También existen estudios en los que se demuestra que la astragalina y sus diferentes glucósidos tienen gran potencial para inhibir la formación de melanina, siendo muy utilizados como agentes cosméticos debido a

sus características químicas. En primer lugar, inhiben la actividad de la colagenasa, su actividad antioxidante reduce la acción de los radicales libres y, por último, controla la pigmentación de la piel causada por la melanina. La formación de melanina es el factor más importante al determinar el color de la piel de los mamíferos, y la inhibición de la formación de melanina conduce a menor oscurecimiento de la piel, es por eso por lo que estos compuestos son ingredientes en productos cosméticos para el blanqueamiento de la piel. MMP-1 es una colagenasa que hidroliza las proteínas de la matriz dérmica como el colágeno, esto es lo que posiblemente produzca el daño en la piel y la formación de arrugas. Los agentes que inhiben la actividad de la colagenasa tienen efectos beneficiosos para mantener la piel sana previniendo la degradación de la matriz dérmica. Los glucósidos de la astragalina muestran un efecto inhibitorio en la producción de MMP-1. El envejecimiento celular es provocado por el ataque de especies reactivas de oxígeno a macromoléculas biológicas, provocando daños oxidativos. La astragalina y sus glucósidos pueden revertir este proceso gracias a su función antioxidante. Un alto grado de polimerización de la astragalina y los glucósidos está directamente relacionado con la mejora de la actividad antioxidante.¹⁰

La astragalina también es conocida por poseer protección contra la radiación UV. La radiación UV puede causar daños en ADN, provocando quemaduras solares, edemas, cáncer de piel y otras afecciones. La radiación UV de la luz solar también puede provocar daños en macromoléculas en la capa epidérmica de los animales, provocando mutaciones en los genes y cambios en el sistema inmunológico. Las quimiocinas se ven alteradas tras la exposición a la radiación, estas estimulan la activación de neutrófilos que posteriormente conducen al estrés oxidativo. La astragalina puede ser utilizada como barrera ante los daños provocados por la radiación, evitando la alteración de las quimiocinas en la piel.¹¹

Para conocer bien las funciones de los sistemas moleculares es necesario tener un conocimiento lo más profundo posible de las propiedades de este. Así, lo más fundamental es conocer la estructura de la molécula aislada, libre de interacciones intramoleculares con el entorno. Por otra parte, las biomoléculas son muy flexibles, pudiendo adoptar diferentes conformaciones estabilizadas por interacciones intermoleculares y que se pueden interconvertir unas en otras a través de movimientos o coordenadas internas con un aporte energético. Para tener un conocimiento más amplio de este sistema molecular y poder racionalizar sus funciones en este trabajo se ha validado el estudio conformacional de la astragalina previo a su estudio mediante técnicas espectroscópicas de microondas en fase gas utilizando métodos computacionales.

El estudio de la estructura y conformación tanto de la astragalina, como de las diferentes conformaciones del kaempferol y de la glucosa se han simulado en fase gas. Los estudios en fase gas permiten aislar una sola molécula, pudiendo analizar sus propiedades individuales sin ninguna interferencia, aunque normalmente estas moléculas no se encuentren en fase gas ni sea el medio donde estas realicen sus funciones biológicas. Por otro lado, trabajar en fase gas ofrece otras ventajas, como conocer de forma detallada las propiedades estructurales intrínsecas. Cada molécula puede presentar diferentes conformaciones con diferentes posiciones espaciales, pudiendo conocer los factores internos que ayudan a la estabilidad de la molécula, como la presencia de enlaces de hidrógeno o interacciones orbitales, que normalmente se encuentran enmascarados en fases condensadas.

Otra ventaja de los estudios en fase gaseosa es la comparación directa de los resultados con las predicciones. Haciendo esta comparación se pueden calibrar los métodos teóricos con las medidas experimentales y así conocer que modelos serán los apropiados para el estudio de sistemas semejantes.

3. Objetivos y plan de trabajo:

Estudio teórico de la estructura en fase gas de la astragalina. Hallar las energías asociadas a las diferentes conformaciones para encontrar las más probables. Obtener las constantes de rotación, momentos dipolares, energías de Gibbs.

Plan de trabajo:

- Búsqueda bibliográfica para conocer las funciones de la molécula y estudios previos.
- Búsqueda conformacional de la molécula astragalina.
- Optimización de geometría y eliminar duplicados con dos bases de cálculo diferentes.
- Obtener energías de Gibbs y en el punto cero y cálculo de las poblaciones.
- Simulación del espectro de microondas de los diferentes confórmeros.
- Estudio cualitativo de la estructura de los confórmeros más estables.

4. Fundamento teórico:

4.1 Introducción:

A principios del siglo XX, los físicos encontraron que la mecánica clásica no describe correctamente el comportamiento de partículas tan pequeñas como los electrones y los núcleos de los átomos y de las moléculas. El comportamiento de estas partículas está restringido por un conjunto de leyes descritos por la mecánica cuántica.^{12, 13.}

4.2 Ecuación de Schrödinger:

Para resolver la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo en primer lugar hay que establecer cuál es el operador asociado a la energía de la partícula, el Hamiltoniano:

$$\hat{H}\Psi(x) = E\Psi(x) \quad (1)$$

Donde $\Psi(x)$ corresponde con la función de onda que describe el sistema, \hat{H} es el operador Hamiltoniano y E los valores propios de energía de un sistema. El Hamiltoniano permite la obtención de los valores propios de la energía de la función de onda, viene representado por la siguiente ecuación:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + V(x) \quad (2)$$

El factor $V(x)$ corresponde con la energía potencial de la partícula en el punto x , mientras que el primer término está relacionado con la energía cinética de la partícula.

4.3 Aproximación de Born-Oppenheimer:

La ecuación de Schrödinger no tiene solución exacta excepto para sistemas monoeléctricos (como el átomo de hidrógeno o molécula ion de hidrógeno) y no es posible obtener la función de onda exacta, por lo que se han desarrollado métodos para resolver esta ecuación de una forma aproximada:

- Métodos ab initio: parten de las leyes físicas sin utilizar valores experimentales.
- Métodos Semiempíricos: utilizan valores previamente obtenidos experimentalmente para facilitar la resolución de la ecuación y que resultan de utilidad para moléculas de gran tamaño.

El primer paso en el tratamiento mecanocuántico de los sistemas moleculares es la separación de los movimientos electrónicos y nucleares que puede hacerse aplicando la aproximación de Born-Oppenheimer.

Esta aproximación está basada en la gran diferencia de masa entre los núcleos y los electrones. Al ser los núcleos mucho más pesados que los electrones se mueven más lentamente. Esta aproximación asume que ambos movimientos están desacoplados. En primer lugar, se considera que los electrones se mueven alrededor de los núcleos como si estos estuviesen fijos. En segundo lugar, se estudia el movimiento de los núcleos. Se supone que los electrones se reajustan instantáneamente al cambio de configuración de los núcleos. Se trata de una aproximación aceptable debido a las diferentes escalas temporales entre los movimientos electrónico y nuclear.

La función de onda total va a depender de la posición de los núcleos \vec{R} y de las coordenadas de los electrones \vec{r} .

$$\hat{H}\Psi(\vec{R}, \vec{r}) = E\Psi(\vec{R}, \vec{r}) \quad (3)$$

La aproximación de Born-Oppenheimer consiste en separar variables en la función de onda total. La función de onda electrónica se obtiene a partir del hamiltoniano electrónico. El hamiltoniano es el operador cuyo observable es la energía, y por tanto el hamiltoniano total para estos sistemas es la suma de operadores que incluyen términos cinéticos de los núcleos, cinéticos de los electrones, potencial de repulsión entre electrones, potencial atractivo entre electrones y núcleos y potenciales de repulsión entre núcleos:

$$\hat{H}_e = \hat{T}_{nn}(\vec{R}) + \hat{T}_{ee}(\vec{r}) + \hat{V}_{ee}(\vec{r}) + \hat{V}_{en}(\vec{R}, \vec{r}) + \hat{V}_{nn}(\vec{R}) \quad (4)$$

Que en unidades atómicas para un sistema de N electrones y M núcleos queda definido de la siguiente manera:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_{\alpha}^M \frac{1}{M_{\alpha}} \nabla_{\alpha}^2 - \frac{1}{2} \sum_i^N \nabla_i^2 + \sum_i^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} - \sum_{\alpha}^M \sum_i^N \frac{Z_{\alpha}}{r_{\alpha i}} + \sum_{\alpha}^M \sum_{\beta}^M \frac{Z_{\alpha} Z_{\beta}}{R_{\alpha\beta}} \quad (5)$$

El término de la energía potencial entre electrones y núcleos $\hat{V}_{en}(\vec{R}, \vec{r})$ impide separar el Hamiltoniano en una parte solo dependiente de la posición de los núcleos y otra solo dependiente de la posición de los electrones. La ecuación de Schrödinger para sistemas de este tipo es difícil de resolver. Los electrones se mueven en el entorno de un campo electrostático creado por la posición de los núcleos en cada instante (que se tomara como constante), mientras que los núcleos se encuentran en un potencial electrostático promedio que es provocado por el movimiento de los electrones.

Recurriendo a la aproximación de Born-Oppenheimer se puede abordar este problema. Fijando la posición de los núcleos en el espacio, este parámetro será una constante en la función de onda electrónica, es decir, $\hat{T}_{nn}(\vec{R})$ será nulo y no contribuirán a la energía cinética.

Al tomar la posición entre los núcleos como una distancia fija, el termino de energía potencial entre los núcleos $\hat{V}_{nn}(\vec{R})$, tendrá un valor constante y su efecto será cambiar el valor de la energía por una cantidad constante. El término $\hat{V}_{en}(\vec{R}, \vec{r})$ también se verá afectado, ya que \vec{R} también es un parámetro constante aunque dependa de la posición de los electrones respecto a los núcleos. Se puede especificar solo con la variable de la posición de los electrones \vec{r} .

Por tanto, los términos que conforman el hamiltoniano electrónico son:

$$\hat{H}_e = \hat{T}_{ee}(\vec{r}) + \hat{V}_{ee}(\vec{r}) + \hat{V}_{en}(\vec{r}) \quad (6)$$

Con este Hamiltoniano, también denominado Hamiltoniano electrónico geométrico, se formula la ecuación de Schrödinger electrónica:

$$\hat{H}_e \Psi_e(\vec{R}, \vec{r}) = E_e(\vec{R}) \Psi_e(\vec{R}, \vec{r}) \quad (7)$$

Ahora la ecuación resulta más fácil de resolver y se obtiene la función de onda y la energía electrónicas para la configuración de los núcleos.

Representando la energía electrónica obtenida frente a la posición de los núcleos, se obtiene la Superficie de Energía Potencial (SEP), que es el resultado de sumar $E(\vec{R})$ y $\hat{V}_{nn}(\vec{R})$.

La información que se puede extraer del análisis detallado de la Superficie de Energía Potencial (SEP) en relación con la química estructural:

- Información sobre la geometría molecular (predicción de los espectros de rotación).
- Información sobre las frecuencias de vibración moleculares (predicción de los espectros de IR).
- Estudio de los mínimos locales en la SEP, que corresponden con los posibles isómeros del sistema molecular.
- Estudio de los estados de transición.

Analizando la SEP (figura 4) se pueden conocer los siguientes datos:

- Las estructuras de equilibrio correspondientes a los mínimos de la SEP. Pueden ser mínimos absolutos o locales.
- La energía de una reacción se puede calcular a partir de la diferencia de altura entre mínimos de reactivos y productos.
- Máximos o puntos de silla: asociados a configuraciones intermedias o barreras de potencial.
- Las constantes cinéticas se pueden calcular a partir de la altura y perfil de la SEP alrededor del estado de transición.

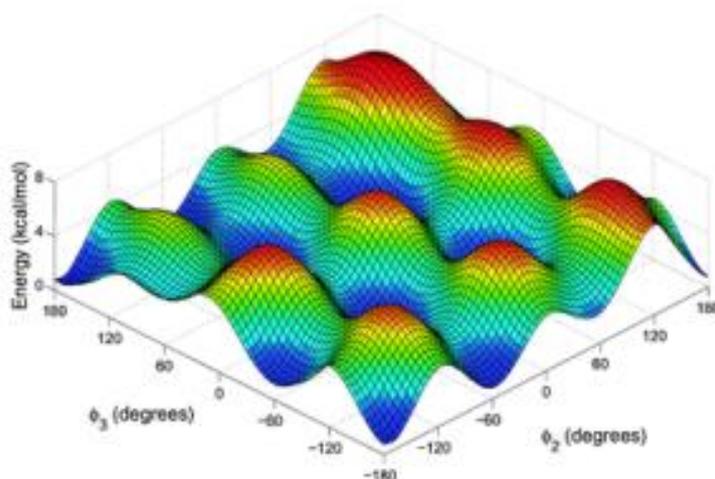


Figura 4: Ejemplo SEP

4.4 Métodos de cálculo:

4.4.1 Mecánica molecular:

La mecánica molecular se basa en un modelo matemático en el que una molécula constituye una colección de bolas (que corresponden a los átomos), las cuales están unidas entre sí por resortes (que corresponden a los enlaces). Según este modelo, la energía de la molécula cambia con la geometría ya que los resortes se resisten a ser estirados o doblados desde su longitud o ángulo original, mientras que las bolas se resisten a estar demasiado juntas (figura 5).

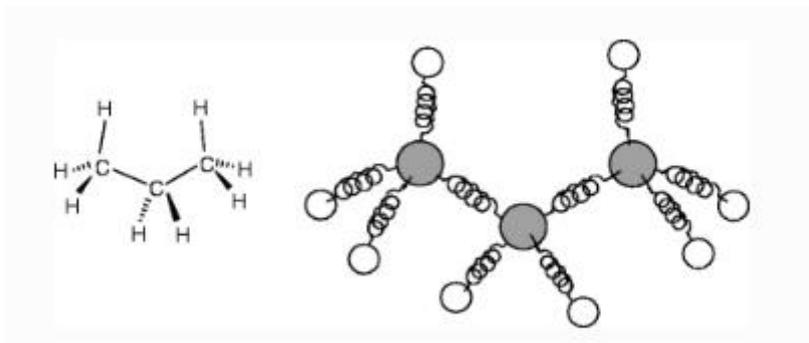


Figura 5: Ejemplo de molécula estudiada por mecánica molecular. Tomado ref. 14

El objetivo de este método es expresar la energía de la molécula como función de su resistencia al estiramiento y flexión de enlaces y acercamiento de átomos y usar la ecuación de energía para encontrar las longitudes de enlace, ángulos y diedros correspondientes al mínimo o diversos mínimos de la superficie de energía potencial posibles. La forma de expresión de matemática de la energía y los parámetros constituyen un campo de fuerza.

Las principales aplicaciones que tiene la mecánica molecular son: obtener geometrías de entrada razonables para cálculos más extensos (ab initio, semiempíricos o funcionales de densidad), obtener geometrías razonables para moléculas de tamaños pequeños, cálculo de geometría y energías de biomoléculas (proteínas y ácidos nucleicos), generar la función de energía potencial bajo la cual se mueven las moléculas y como guía para conocer la viabilidad o resultado probable de las reacciones en la síntesis orgánica.¹⁴

4.4.2 Método Hartree-Fock (HF):

También conocido como el método del campo autoconsistente. Partiendo de la aproximación de Born-Oppenheimer. El hamiltoniano electrónico de una molécula con N electrones y M núcleos se expresa como:

$$\hat{H} = \sum_{i=1}^N \hat{h}(i) + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (8)$$

Donde $\hat{h}(i)$ corresponde con el hamiltoniano monoeléctrico correspondiente al electrón i, que contiene la energía cinética del electrón y la energía potencial de atracción de todos los núcleos de la molécula.

$$\hat{h}(i) = -\frac{1}{2}\nabla^2(i) - \sum_{\alpha=1}^M \frac{Z_{\alpha}}{r_{\alpha i}} \quad (9)$$

Para resolver la ecuación de Schrödinger electrónica y obtener el conjunto de las funciones de onda cada una con su energía hay que seguir los siguientes pasos:

- 1) Elegir funciones de base iniciales, realizando una combinación lineal de estas funciones para obtener una función de onda total que se introduce en la ecuación de Schrödinger. Con las funciones de onda de prueba se forma el determinante de Slater.
- 2) Definir operadores mecanocuánticos, operadores de Fock. Aparecen al aplicar el Hamiltoniano a la función de prueba. Con estos operadores se obtiene la energía del sistema.
- 3) Minimizar energía. La aplicación del método variacional conduce a minimizar la energía del sistema con respecto de la función de prueba. De esta manera se obtienen las ecuaciones de Fock, que se resolverán para obtener una nueva función de onda que tendrá otra energía asociada.

4) Construir sistema de ecuaciones de Fock a partir de la segunda función de onda obtenida y se resuelve, se obtendrá una nueva función de onda con otra energía asociada. Esto se repite hasta cumplir la condición de convergencia, se dice que ha alcanzado la autoconsistencia o autoconherencia. Se asume el valor obtenido como resultado obteniendo una energía y una función de onda.

Una de las ventajas de este método es que rompe con la ecuación de Schrödinger multielectrónica para obtener varias ecuaciones simples monoeléctricas. Cada ecuación electrónica se resuelve para dar una única función de onda del electrón, denominada orbital, y una única energía, denominada energía orbital. El orbital describe el comportamiento de un electrón en un campo neto de todos los electrones.

La segunda aproximación en los cálculos HF es debida a que la función de onda se describe según unas funciones matemáticas, las cuales solo son conocidas para algunos sistemas monoeléctricos. Las funciones normalmente utilizadas son las combinaciones lineales de orbitales tipo Gaussian (GTO). La función de onda se obtiene de combinaciones lineales de orbitales atómicos. Es por esta razón que la mayoría de los cálculos HF dan energías mayores que el límite HF.

Las funciones gaussianas se multiplican por una función angular para obtener la simetría del orbital.

Los orbitales moleculares se describen como una expansión lineal de una base de funciones analíticas, las funciones base. Estas funciones base se desarrollan y optimizan para átomos individuales, las funciones bases de las moléculas comprenden las funciones bases de los átomos que las constituyen.¹⁶

Las funciones de bases GTO (Gaussian-Type Orbitals) son las más comunes para el cálculo de moléculas poliatómicas, numerosos programas han desarrollado estas bases.

La mayor parte de los métodos mecanocuánticos moleculares comienzan con el cálculo de las funciones de base que se utilizan para expresar los orbitales moleculares. El uso de una base adecuada es esencial para el éxito del cálculo.

En el caso de las moléculas diatómicas, las funciones de base se toman como orbitales atómicos, algunos centrados sobre el átomo y los demás centrados sobre otros átomos, cada OM se representa como una combinación lineal de uno o más orbitales tipo Slater (STO). Para moléculas poliatómicas se usan los STO centrados en cada uno de los átomos, la presencia de más de dos átomos dificulta la evaluación de las integrales necesarias.¹⁷

Los orbitales de Slater vienen definidos por¹²:

$$\phi_{nlm_l}^{STO} = N_{\zeta} r^{n-1} e^{-\zeta r} Y_l^{m_l} \quad (10)$$

Donde ζ es un parámetro que se determina variacionalmente y N_{ζ} es la constante de normalización. Un orbital Slater difiere en un orbital hidrogenoide en que el termino polinómico en r es reemplazado por una potencia de r pero manteniendo el término exponencial. En el caso del orbital 1s del átomo de hidrógeno, el orbital de Slater con $\zeta=1$ coincide con el orbital hidrogenoide, lo mismo ocurre para los orbitales 2p y 3d. los orbitales de Slater no son ortogonales y las integrales bielectrónicas son de difícil solución, por lo que su uso es muy limitado.

Por otro lado, están los orbitales gaussianos GTO, que vienen definidos por:

$$\phi_{nlm_l}^{GTO} = N_{\alpha} r^{n-1} e^{-\alpha r^2} Y_l^{m_l} \quad (11)$$

α es un parámetro variacional y N_α es la constante de normalización. El orbital gaussiano difiere de un orbital de Slater en la forma de la función exponencial, por lo que se aleja más de un orbital hidrogenoide, sin embargo, coincide que tampoco son ortogonales. Una ventaja que implica la utilización de orbitales gaussianos es que la resolución de las integrales bielectrónicas es más sencilla.

A diferencia de los orbitales STO, el orbital gaussiano $1s$ para el átomo de hidrógeno no coincide con el hidrogenoide, una función gaussiana da una representación muy pobre del orbital atómico, para resolver este problema se utilizan los orbitales gaussianos contraídos, que se expresan como combinación lineal de funciones gaussianas con distintos exponentes, denominadas funciones primitivas. Los coeficientes de la combinación lineal se determinan para cálculos atómicos y se mantienen fijos para cálculos moleculares, es decir, no se trata de parámetros variacionales, de esta manera se obtiene una función lo más similar posible al orbital de Slater y, cuantas más funciones participen en la contracción mejor será el resultado. El uso de orbitales gaussianos contraídos implica mayor número de integrales, sin embargo, el cálculo de estas es mucho más rápido.

-6-31G (d, p): Se trata de una base desarrollada por Pople. En la base 6-31G usa seis funciones GTO primitivas, la parte interna esta descrita como una combinación de 3 GTO primitivas y la parte más externa es una GTO, nuestra base añade una serie de tres funciones de polarización gaussianas de tipo p para cada átomo de hidrogeno y de helio

-6-311++G (d, p): en esta base se introducen funciones de polarización (orbitales tipo d para átomos diferentes de hidrogeno y tipo p para átomos de hidrogeno) y funciones difusas (orbitales GTO tipo s y p para átomos de las dos primeras filas de la tabla periódica).¹⁷

Los signos ++ indican que la base incluye funciones difusas en todos los átomos. Se denominan de esta manera ya que se extienden a regiones más alejadas de los núcleos que las funciones estándar, son funciones de gran importancia a la hora de evaluar interacciones como los puentes de hidrogeno. La nomenclatura (d, p), por otro lado, indica que la base de cálculo incluye funciones de polarización, que son de gran importancia a la hora de trabajar con sistemas que tienen enlaces polares.¹⁸

Posteriormente, los orbitales se combinan en un determinante, esto se hace por dos razones: en primer lugar, es que los electrones deben ser indistinguibles, y, en segundo lugar, es que la función de onda para fermiones debe ser antisimétrica respecto al intercambio de dos partículas. Si electrón 1 y 2 se intercambian, el signo de la función de onda cambia, esto se puede satisfacer mediante un determinante ya que el intercambio de dos electrones equivale al intercambio de dos columnas en el determinante, lo que hace que cambie el signo.

Los pasos en un cálculo HF comienzan con el conocimiento de los coeficientes de los orbitales, para ello es necesario un método semiempírico. La función se utiliza para calcular la energía y un nuevo set de coeficientes de orbitales y así sucesivamente. Este procedimiento continúa hasta que las energías y los coeficientes obtenidos se mantienen constantes de una interacción a la siguiente, en este caso se dice que el cálculo converge. Este procedimiento se denomina método del campo autoconsistente, que es como también se denomina al método HF.

Una variación del método HF es como se construyen los orbitales para reflejar si los electrones se encuentran apareados o desapareados. Si la molécula tiene spin singlete, la misma función orbital espacial puede ser utilizada para los spines electrónicos α y β de cada par. A esto se le denomina método HF restringido (RHF). Existen dos maneras de construir las funciones de onda HF para moléculas con electrones desapareados.

- 1) Usar dos funciones orbitales independientes para los electrones α y β . Se trata de la función de onda del método HF no restringido (URHF). Esto significa que los pares de electrones no tienen la misma distribución espacial. Este cálculo es muy utilizado ya que es fácil de implementar.
- 2) Otra manera de construir las funciones de onda para moléculas de capa abierta es el método HF restringido de capa abierta (ROHF), mediante este método, los electrones apareados comparten el mismo orbital espacial. Esta técnica es más difícil de implementar y necesita más tiempo de ejecución.

Una de las limitaciones del método HF es que no incluye correlación electrónica, es decir, tiene en cuenta la repulsión electrónica pero no es explícita. Según esta teoría, la probabilidad de encontrar un electrón alrededor del átomo está determinada por la distancia al núcleo, pero no por la distancia a otros electrones. Para corregirlo primero se realiza un cálculo HF y después se añaden correlaciones. Alguno de estos métodos son la teoría de la perturbación de Møller-Plesset, interacción de configuración, Coupled-Cluster...

Esta correlación es importante ya que mejora la precisión de las energías y estructuras obtenidas.

- Métodos Post Hartree-Fock:

- 1) Teoría de la perturbación Møller-Plesset¹⁵:

No se trata de un cálculo variacional, por tanto, no existe la garantía de que las energías obtenidas mediante este método sean superiores al valor exacto, como ocurre con los métodos variacionales. Estos métodos tienen menor coste computacional, por lo que son muy utilizados. Una de las limitaciones más importantes que presentan los métodos perturbacionales es que para obtener resultados fiables, la función de orden cero debe ser una buena aproximación de la función real, la perturbación debe ser pequeña.

El método de Møller-Plesset (MP) expresa el Hamiltoniano de orden cero como una suma de operadores de Fock monoeléctricos, y las funciones de orden cero son los determinantes de Slater construidos a partir de los orbitales moleculares de Hartree-Fock. La perturbación, \hat{H} es la diferencia entre el hamiltoniano verdadero y el hamiltoniano de orden cero, por tanto, corresponde a la diferencia entre la verdadera repulsión interelectrónica y el potencial interelectrónico de Hartree-Fock. Con esta participación del Hamiltoniano, la energía corregida hasta primer orden corresponde con la energía de HF, por lo que no se introduce la correlación electrónica hasta la corrección de segundo orden. Se utiliza la notación MPn para expresar la energía Møller-Plesset corregida hasta orden n: MP0, MP1, MP2...

- 2) Interacción de configuración¹⁵:

Una función de onda de interacción de configuración (CI) es una función de onda de múltiples determinantes, se construyen mediante la función de onda de HF y añadiendo nuevos determinantes al promocionar electrones desde los orbitales ocupados a los vacíos. Estos cálculos pueden ser muy precisos, pero el coste computacional es muy grande. Los cálculos de interacción de configuración se clasifican en función del número de excitaciones para hacer el determinante. La interacción de configuración con todas las posibles excitaciones se denomina full CI, aunque no se suele utilizar ya que requiere mucho coste computacional.

- 3) Método Coupled-Cluster¹⁵:

En este método, la función de onda es una combinación lineal de muchos determinantes, similar a los cálculos de interacción de configuración. Estos cálculos dan energías variacionales según se van incluyendo sucesivas excitaciones. La ventaja de utilizar cálculos Coupled-Cluster (CC) es que es un método de extenso tamaño y

sus resultados son precisos que los cálculos de interacción de configuración. Cuando se han incluido todas las configuraciones, este cálculo equivale a full CI.

4.4.3 Métodos Semiempíricos:

El método Hartree-Fock constituye un método ab initio¹². Los métodos semiempíricos se han desarrollado con el objetivo de poder estudiar sistemas de interés químico con un coste computacional menor que el que los métodos ab initio. La mayoría de los métodos semiempíricos se basan en un conjunto de aproximaciones comunes. En primer lugar, solo se consideran los electrones de valencia, mientras que los electrones internos de cada átomo se integran dentro del core con el núcleo. Los orbitales atómicos de valencia se representan mediante una base mínima de orbitales de Slater.

Para corregir los errores producidos al omitir parte del cálculo, es necesario una parametrización. Estos parámetros se obtienen de comparar los resultados con los datos experimentales o con los cálculos ab initio, sustituyendo algunas de las integrales excluidas.¹⁵

La aproximación más drástica que ocurre se denomina aproximación de recubrimiento diferencial nulo, ZDO (Zero Differential Overlap), la cual hace considerar que el recubrimiento diferencial entre dos funciones atómicas es igual a cero. La primera consecuencia de esta aproximación es que la matriz de recubrimiento se reduce a la matriz unidad, lo que provoca que muchas integrales monoeléctricas y la mayoría de las bielectrónicas se anulan. Las integrales restantes se igualan a los parámetros obtenidos mediante ajustes por mínimos cuadrados.

Los métodos semiempíricos se diferencian en dos aspectos fundamentales: en primer lugar, la extensión de la aproximación ZDO, que puede hacerse siempre o cuando las dos funciones atómicas están centradas en átomos distintos. La segunda diferencia se encuentra en el criterio con el que se hace la parametrización. En los primeros métodos desarrollados por Pople, el criterio consiste en reproducir los resultados obtenidos con HF con una base mínima, mientras que los métodos desarrollados por Dewar consisten en reproducir los datos experimentales.

Los métodos semiempíricos permiten el estudio de sistemas grandes cuando la potencia de los ordenadores no permite estudiarlos mediante métodos ab initio, aunque no resultan del todo fiables debido al número de parámetros ajustables que implican. Actualmente su uso es necesario para sistemas muy grandes como biomoléculas.

4.4.4 Teoría Funcional de la Densidad (DFT):

Es una de las técnicas más utilizadas para el cálculo de la estructura molecular debido a que demanda menos esfuerzo computacional, menor tiempo de ordenador y mayor coincidencia con los resultados experimentales que se obtienen mediante los procedimientos HF.

Mediante esta teoría se puede determinar la energía de la molécula mediante la densidad electrónica en lugar de la función de onda, la aplicación práctica de esta teoría fue desarrollada por Kohn y Sham¹⁴, que la formularon como un método de estructura similar a HF.

Para el estado fundamental, la energía (E) depende de la densidad electrónica (ρ) y se puede calcular como un funcional de la densidad de electrones:

$$E(\rho) = T(\rho) + E_{en}(\rho) + E_{ee}(\rho) \quad (12)$$

Donde $T(\rho)$ representa la energía cinética del sistema, $E_{en}(\rho)$ corresponde con la energía de interacción entre los electrones y núcleos (atractiva), y $E_{ee}(\rho)$ es la energía de interacción entre los electrones (positiva).

La densidad electrónica se expresa como una combinación lineal de funciones base de una manera similar que los orbitales HF. Se obtiene un determinante de estas funciones, que se denominan orbitales Kohn-Sham. La densidad electrónica obtenida de este determinante es la utilizada para calcular la energía.

$$\rho_{aprox}(\vec{r}) = \sum_i^N \chi_i(\vec{r})\chi_i^*(\vec{r}) \quad (13)$$

Se realiza una aproximación a la energía cinética real, que asume que los electrones no tienen interacciones:

$$T_{aprox}(\rho) = \sum_i^N \langle \chi_i | -\frac{1}{2}\nabla^2 | \chi_i \rangle \quad (14)$$

Se define la energía del sistema con la siguiente expresión, que incluye la energía cinética más unos términos para la correlación entre electrones:

$$E(\rho) = T_{aprox}(\rho) + E_{en}(\rho) + J(\rho) + E_{xc}(\rho) \quad (15)$$

Donde $J(\rho)$ es la energía de interacción de Coulomb entre electrones y $E_{xc}(\rho)$ es el termino de correlación e intercambio. Este término se puede separar en dos contribuciones, en primer lugar, la energía de correlación cinética y en segundo lugar, la energía de intercambio y la energía potencial de correlación:

$$E_{xc}(\rho) = (T(\rho) - T_{aprox}(\rho)) + (E_{ee}(\rho) - J(\rho)) \quad (16)$$

Este procedimiento es necesario ya que los sistemas de Fermiones solo pueden tener densidades electrónicas que provengan de funciones de onda antisimétricas. Los orbitales Kohn-Sham describen el comportamiento de los electrones en la molécula como lo hacen otros orbitales. Los valores propios de los orbitales DFT no coinciden con las energías obtenidas en los experimentos de espectroscopía fotoelectrónica como lo hacen los orbitales HF, por lo que es necesario conocer cómo interpretar las diferencias.

Un funcional de densidad se utiliza para obtener la energía mediante la densidad electrónica. Un funcional es una función de una función, en este caso, de la densidad electrónica. El funcional de densidad no es conocido, existe una lista de diferentes funcionales que se han desarrollado de la mecánica cuántica y otros que se han desarrollado para parametrizar funciones para reproducir los valores experimentales lo mejor posible.

La ventaja principal de usar la densidad electrónica es que las integrales de Coulomb de repulsión solo se necesitan hacer sobre la densidad electrónica, lo que constituye una función tridimensional, además, se incluyen algunas correlaciones electrónicas. El resultado es más rápido que los cálculos HF y más preciso también. Los mejores funcionales DFT dan resultados con una precisión muy similar a MP2.

Los cálculos DFT utilizan funciones base, lo que cuestiona si debieran ser usadas las funciones base optimizadas con DFT o con HF. La mayoría de los cálculos DFT se realizan con funciones base GTO optimizadas con el método Hartree-Fock. La precisión de los cálculos DFT puede variar dependiendo de la función base elegida y del funcional de densidad.

Se han desarrollado multitud de funcionales para el término de correlación como para el término de intercambio, en principio, cualquier funcional de correlación se puede combinar con cualquier funcional de

intercambio, dando multitud de métodos disponibles. Los funcionales están desarrollados en función de distintas aproximaciones para obtener una fórmula final para el término de correlación de intercambio.

- Aproximación de densidad local (LDA): en esta aproximación la densidad electrónica es tratada como si fuera un gas uniforme de electrones en el entorno molecular. La energía de intercambio viene dada por:

$$E_x^{LDA}(\rho) = -\frac{3}{2} \left(\frac{3}{4\pi} \right)^{\frac{1}{3}} \int \rho^{\frac{4}{3}}(\vec{r}) d\vec{r} \quad (17)$$

Dentro de esta aproximación hay un caso particular que consiste en despreciar la contribución de la energía de correlación, y por tanto $E_{xc}(\rho) = E_x^{LDA}(\rho)$. No siempre es necesaria esta aproximación ya que se han desarrollado expresiones para la energía de correlación que se pueden combinar con la energía de intercambio, obteniendo funcionales que permiten resolver el sistema de ecuaciones de Kohn-Sham.

- Aproximación de gradiente generalizado (GGA): un gas uniforme de electrones no resulta una buena aproximación para los sistemas moleculares. Mediante esta aproximación se incorporan a las expresiones de la energía de intercambio y de correlación una dependencia con la densidad electrónica (ρ) y también con el módulo del gradiente de la densidad electrónica ($|\nabla(\rho)|$).
- Funcionales híbridos: los funcionales híbridos son aquellos en los que la función de la energía de intercambio incorpora la energía de intercambio del método HF. Se combinan con funcionales de correlación de otro tipo para dar lugar a métodos capaces de predecir bien las propiedades moleculares, pero con un bajo coste computacional.

El funcional más utilizado es B3LYP (Becke Three Parameter Hybrid Functional), se trata de un funcional híbrido y es debido a la precisión obtenida para multitud de compuestos, en especial moléculas orgánicas. En este trabajo se ha utilizado también este funcional¹⁵. Todos los cálculos B3LYP en este trabajo incluyen la corrección empírica de la dispersión de Grimme D3²⁰.

4.5 Métodos de Búsqueda de Confórmeros: CREST:

Durante años, los métodos computacionales han sido una herramienta valiosa en muchos campos de la química. La gran popularidad de la química computacional se puede observar en muchos avances en métodos de la teoría funcional de la densidad, la cual nos da estructuras en fase gas o condensada, además de energías para cientos de átomos, sin embargo, para aplicaciones interesantes como bioquímica o química supramolecular, se sigue requiriendo de un gran coste. Otra de las aplicaciones más importantes es generar una serie de estructuras de baja energía asociados a los confórmeros. El conocer las distintas conformaciones de una molécula es importante para conocer las propiedades. Existen multitud de generadores de confórmeros que utilizan diferentes algoritmos, uno de los tipos de generadores de confórmeros se basan en algoritmos conocidos que tratan de reproducir estructuras desde datos estructurales (que suele provenir de estructuras cristalinas). También se pueden generar a partir de cálculos mecanocuánticos, que no necesitan reglas especiales y obtienen la estructura de la molécula mediante el análisis de la superficie de energía potencial.

El programa CREST¹⁹ (Conformer-Rotamer Ensemble Sampling Tool), emplea un nuevo esquema para generar los diferentes confórmeros basado en muestras a un nivel semiempírico. Aunque no puede competir con otros procedimientos de la química computacional en términos de tiempo de cálculo, tiene la ventaja de dar

energías conformacionales razonables para cualquier especie química. La aplicación más importante de CREST es la generación de conformeros con el algoritmo iMTD-GC, aunque también tiene otras aplicaciones como conocer los agregados con enlaces no covalentes y conocer los diferentes sitios de protonación.

4.5.1 Identificación de conformeros:

Los estereoisómeros de una molécula que solo difieren en su conformación y tienen la misma topología covalente se denominan conformeros y se pueden caracterizar como mínimos diferentes de la energía potencial. Mediante la rotación alrededor de los enlaces covalentes que intercambian núcleos pertenecientes al mismo grupo de nucleidos se obtienen los rotámeros, estos tienen el mínimo de energía potencial degenerado y son indistinguibles por cualquier observable mecanocuántico calculado en cada mínimo.

Para el cálculo de las propiedades es necesario incluir diferentes conformaciones moleculares promediando las propiedades individuales de Boltzmann obtenidas para cada uno de los constituyentes del conjunto, estos conjuntos promedios son relevantes para resonancia magnética nuclear (RMN) o para obtener los valores del pK_a .

Para evitar duplicados, lo que implica promedios incorrectos de Boltzmann y falsas propiedades de las moléculas, es preciso diferenciar estructuras idénticas, conformeros y rotámeros. Esta distinción es posible ya que se basa en las estructuras tridimensionales y en las energías de los isómeros. La energía se emplea como criterio, ya que cada uno de los conformeros se caracteriza por su mínimo en la superficie de energía potencial. Aun así, los parámetros estructurales no incluyen ninguna información sobre si la estructura es la geometría de equilibrio o se trata de un intermedio de alta energía. La información estructural debe combinarse con las energías para la correcta identificación de las diferentes conformaciones.

El enfoque práctico para identificar las conformaciones verdaderas de baja energía es comparar con las medidas experimentales. Las estructuras cristalinas determinadas mediante rayos X es la manera más común de determinar las estructuras, sin embargo, comparan las estructuras obtenidas con CREST con las cristalinas resulta un gran problema debido a que las conformaciones en sólido difieren bastante de las estructuras en fase gaseosa o en disolución debido al empaquetamiento. Además, las estructuras sólidas presentan uno o dos conformeros. Otras técnicas experimentales para la determinación de estructuras son RMN, espectroscopía de microondas, etc. Las condiciones experimentales pueden influir en la conformación de las moléculas, por eso los cálculos teóricos resultan una alternativa válida para obtener las conformaciones en un entorno ideal.

4.5.2 Algoritmo:

Generar los conformeros mediante rotación alrededor de ángulos diedros no es práctico para moléculas de gran tamaño, además requiere definir unas coordenadas conformacionales, para solventar este problema se proponen simulaciones meta-dinámicas (MTD) que se pueden utilizar para generar los conformeros en fase gas. La expresión de la energía para las fuerzas atómicas viene expresada por un potencial Gaussiano:

$$V = \sum_i^n k_i \exp(-\alpha_i \Delta_i^2) \quad (18)$$

Donde n es el número de estructuras de referencia, k_i es la fuerza de empuje y el parámetro Δ_i determina la forma del potencial. Desde esta expresión energética se derivan fuerzas atómicas que entran como fuerzas adicionales en las simulaciones MDT.

Las conformaciones se generan a nivel GFNn-xTB (Geometries, Frequencies and Noncovalent interactions-extended Tight-Binding) dentro de iMTD-GC. Para la generación de confórmeros a un nivel semiempírico hay dos preguntas que resolver: la primera, cómo de fiables son las conformaciones obtenidas comparadas con los métodos teóricos de alto nivel como la teoría funcional de la densidad. Y en segundo lugar, si se pueden observar de manera experimental los confórmeros de baja energía obtenidos con los métodos de bajo coste.

Para la primera pregunta, existe mucha literatura que demuestra que los métodos semiempíricos reproducen bastante bien los resultados de otros métodos teóricos.

El cálculo de energías conformacionales precisas con un nivel semiempírico es complicado ya que las pequeñas diferencias de energía deben ser descritas de manera muy exacta

Con un nivel DFT, la superficie de energía potencial parece tener una forma más consistente, aun así, los métodos semiempíricos dan resultados suficientemente buenos con un tiempo computacional más corto. Estudios han demostrado que los métodos GFNn-xTB resultan ser los mejores métodos semiempíricos para la obtención de energías conformacionales y geometrías.¹⁹

5 Resultados:

5.1 Procedimiento:

En primer lugar, se realizó una búsqueda conformacional de la molécula de astragalina, obteniendo un total de 137 conformeros. Esta búsqueda se realizó con el programa CREST que se ha descrito con anterioridad.

A continuación, se procedió a realizar cálculos de optimización de la geometría de los 55 primeros conformeros a nivel B3LYP-D3/6-31G (d, p). Para cada conformero se tabula su energía en Hartree, las constantes de rotación en MHz y las componentes del momento dipolar en Debyes. Se expresa la energía relativa respecto a la del conformero más estable en cm^{-1} . Según se iban obteniendo las optimizaciones de los conformeros, se observaba que la energía aumentaba, se supuso que se habían obtenido todos los conformeros más abundantes, al ser los de menor energía y por esta razón solo se optimizaron 55. Al realizar la optimización, algunas estructuras resultaron ser las mismas, por lo que se eliminaron los duplicados, quedando con 46 conformeros.

Se realizó otra optimización a nivel B3LYP-D3/6-311++G (d, p), al utilizar una base más grande, el coste computacional es mayor y los cálculos son más lentos, se optimizaron los primeros 30 conformeros, y al igual que con la otra base se eliminaron los duplicados y se tabularon las energías, constantes de rotación y momentos dipolares.

Una vez obtenidos los resultados con ambas bases se ordenaron en orden creciente de energía y se compararon los resultados obtenidos con ambas bases. Se observó que se cumplía el mismo orden en energía de los diferentes conformeros.

Con los resultados obtenidos con la base más grande se procedió a clasificar estos conformeros en función de la molécula de kaempferol y de la glucosa como se ha mencionado con anterioridad.

Se hizo un cálculo de frecuencias de los conformeros con energías por debajo de 1000 cm^{-1} para comprobar que todas las frecuencias fueran positivas y afirmar que se trata de mínimos de la superficie de energía potencial. También se tabularon las energías del punto cero y la energía libre de Gibbs para conocer las poblaciones de los distintos conformeros. Una vez conocidas las poblaciones de los conformeros se realiza una simulación del espectro de microondas de los conformeros con mayor población.

Todos los cálculos realizados para las optimizaciones, obtención de energías, constantes de rotación, momentos dipolares y frecuencias se han realizado con Gaussian²⁶.

5.2 RESULTADOS:

En primer lugar, se realizó la optimización con las dos bases y se comprobó que los conformeros seguían la misma tendencia en estabilidad.

En la siguiente tabla se muestra una clasificación de los conformeros como se ha mencionado anteriormente, también se muestra la energía obtenida para cada uno de los conformeros con las dos bases utilizadas, en primer lugar, con la base 6-31G (d, p) y después con la base 6-311++G (d, p).

- Clasificación:

Debido a la variedad conformacional que puede presentar la molécula de astragalina se debe explicar la clasificación obtenida en función de la molécula de kaempferol y en función de la glucosa.

Mediante cálculos teóricos DFT se ha determinado que la molécula de kaempferol tiene dos posibles conformaciones en estado gas²¹ (figura 6):

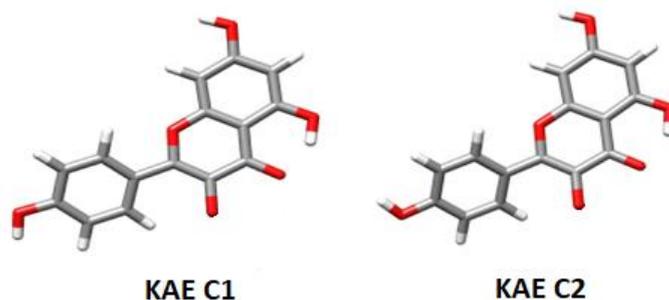


Figura 6: Posibles conformaciones del kaempferol. Tomado de ref. 20

Las diferencias entre las dos posibles conformaciones del kaempferol son mínimas y son debidas al ángulo diedro entre los anillos C y B y la orientación del hidrogeno del grupo hidroxilo del anillo C. Por tanto, una primera clasificación de los conformeros obtenidos será en función de la molécula de kaempferol y se distinguirán dos tipos, C1 y C2 según la orientación del hidrógeno.

En segundo lugar, se clasificarán las moléculas en función de la β -D-glucosa²² (figura 7), para ello se ha utilizado la siguiente notación para distinguir los diferentes conformeros en función del grupo metóxido.

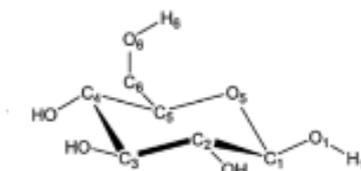


Figura 7: β -D-glucosa. Tomado de ref. 21

El símbolo en letras mayúsculas G+, G- o T describe el ángulo de torsión de $O_6-C_6-C_5-O_5$ si su valor es 60° , -60° o 180° respectivamente. A continuación, aparecen los símbolos g+, g- o t, que describen de la misma manera un ángulo de torsión, en este caso de los átomos $H_6-O_6-C_6-C_5$. Seguido de una barra aparecen los símbolos cl o cc que describen la disposición en sentido de las agujas del reloj o en sentido contrario de las agujas del reloj respectivamente de la red de enlaces de hidrógeno intramoleculares (figura 8). Por último, se ha hallado el ángulo $KAE-O_1-C_1-C_2$, denominado α , que se clasificará con los mismos símbolos que los demás ángulos

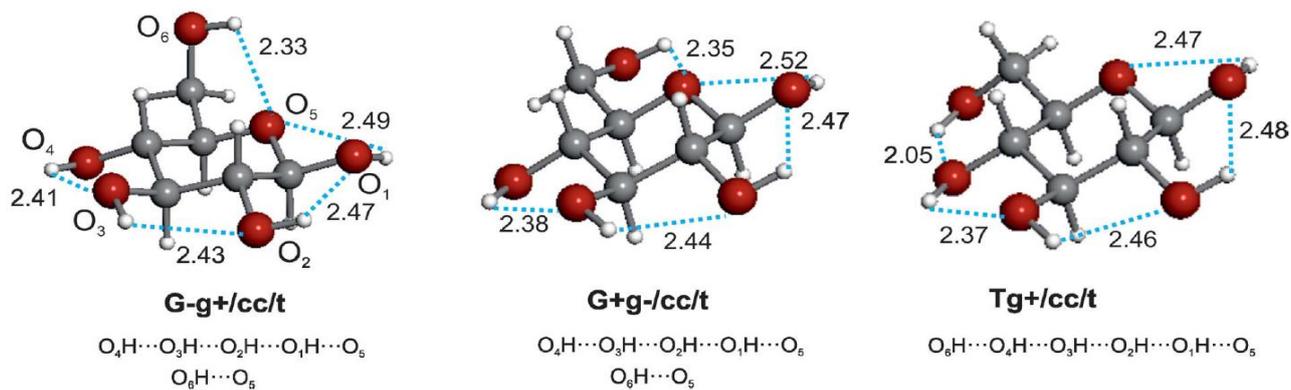


Figura 8: tomado de ref. 21

Por otro lado, se han clasificado las moléculas que tienen la glucosa en conformación bote.

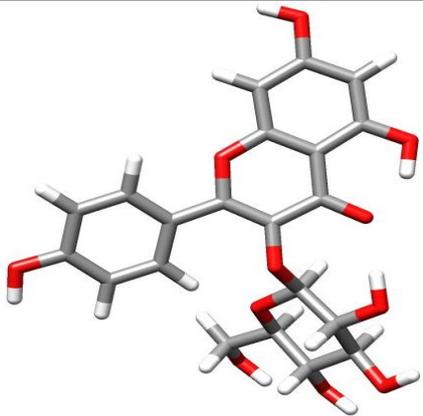
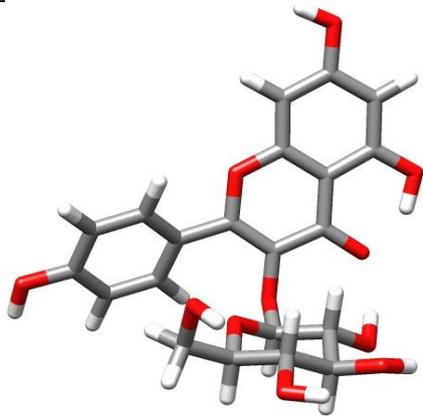
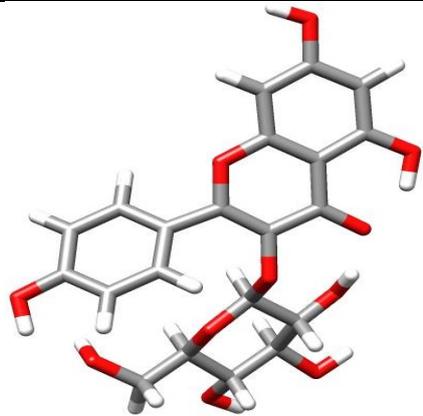
En el caso de la β -glucosa, todas las conformaciones están estabilizadas por una red cooperativa de enlaces de hidrógeno intramoleculares que constituyen el factor principal de estabilidad.²³

En la tabla 1 se tabulan los conforméromos que han aparecido con la conformación C1 del kaempferol y las diferentes conformaciones de la β -glucosa que se encuentran unidas a él, todas ellas en conformación de silla.

Tabla 1: Conforméromos KAE C1. Equivalencia $1 \text{ cm}^{-1} = 83.593 \text{ kJ/mol}$.

CONF	E / cm^{-1} 6-31G (d, p)	E/ cm^{-1} 6-311++G (d, p)	KAE/GLUCOSA/ α	IMAGEN
C1	0.0	0.0	C1/G+g-/cc/g-	

C2	199.17	266.31	C1/G-g+/cc/g-	
C3	295.26	275.53	C1/G+g-/cc/t	
C4	545.77	523.47	C1/G-g+/cc/t	
C5	612.55	691.56	C1/Tg+/cc/g-	

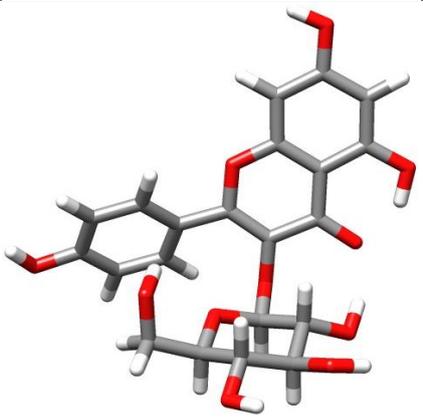
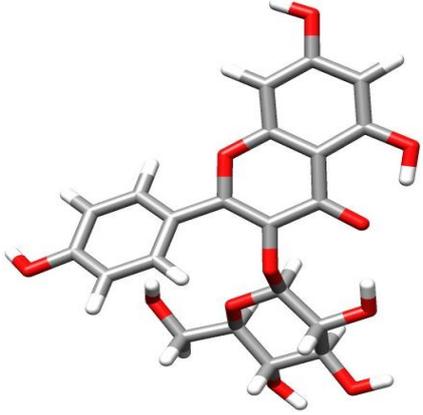
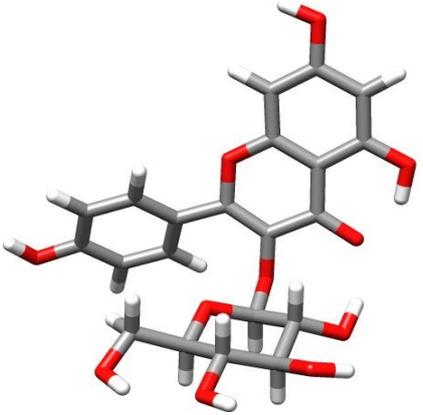
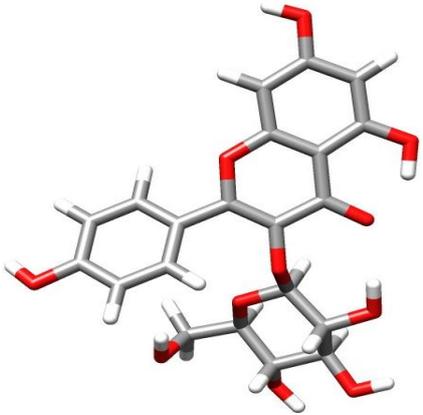
C6	878.49	938.85	C1/Tg+/cc/t	
C7	1084.25	1096.89	C1/Tg+/cc/t	
C8	1278.31	1153.60	C1/G-g-/cc/g-	
C9	1203.51	1324.55	C1/G+g+/cc/t	

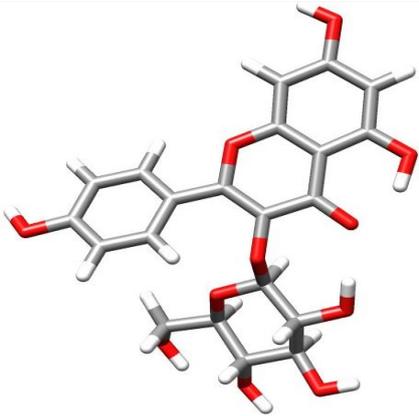
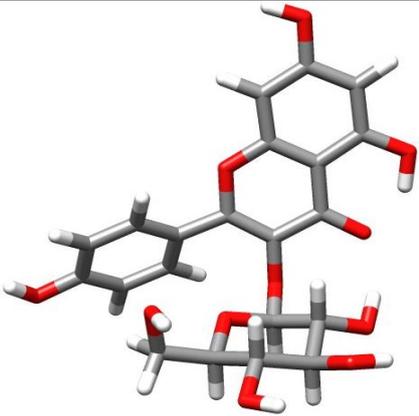
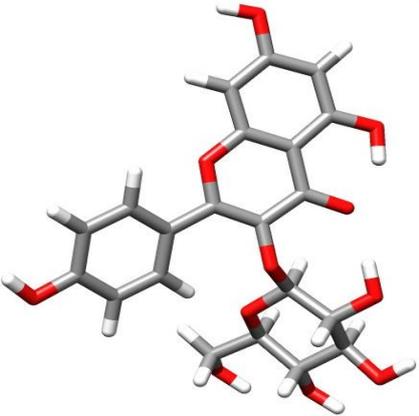
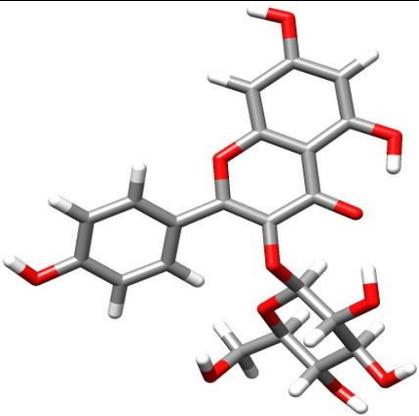
C10	1336.05	1385.37	C1/G+g+/cc/g-	
C11	1251.51	2331.63	C1/G+g-/cc/g+	

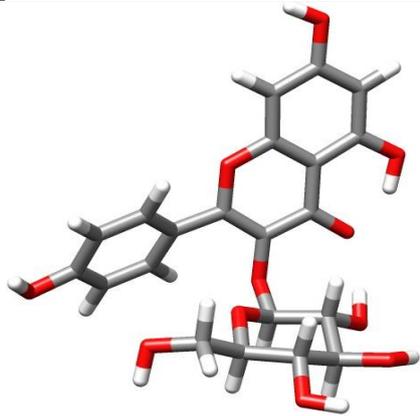
En la tabla 2 aparecen todos los conformeros de la astragalina que poseen el kaempferol tipo C2, del mismo modo se ha tabulado el ángulo diedro entre la molécula de kaempferol y la β -glucosa:

Tabla 2: Conformeros KAE C2. Equivalencia $1\text{ cm}^{-1}=83.593\text{ kJ/mol}$.

CONF	E/ cm^{-1} 6-31G (d, p)	E/ cm^{-1} 6-311++G (d, p)	KAE/GLUCOSA/ α	IMAGEN
C12	27.96	50.11	C2/G+g-/cc/g-	

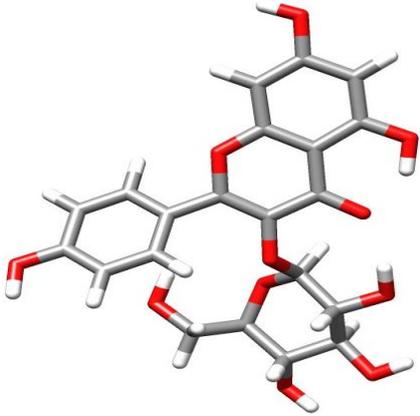
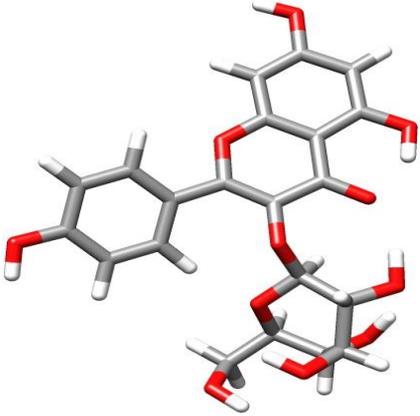
C13	130.74	192.41	C2/G-g+/cc/g-	
C14	432.23	362.95	C2/G+g-/cc/t	
C15	655.40	721.87	C2/Tg+/cc/g-	
C16	800.69	781.75	C2/G-g+/cc/t	

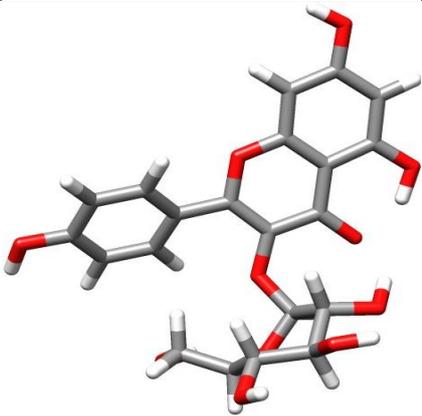
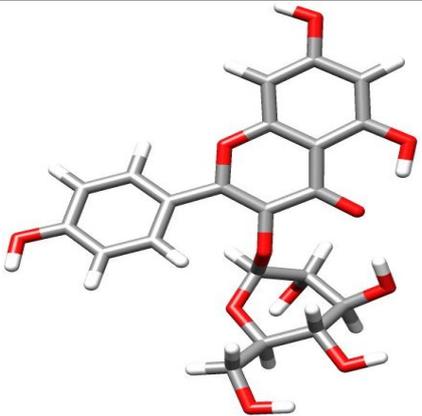
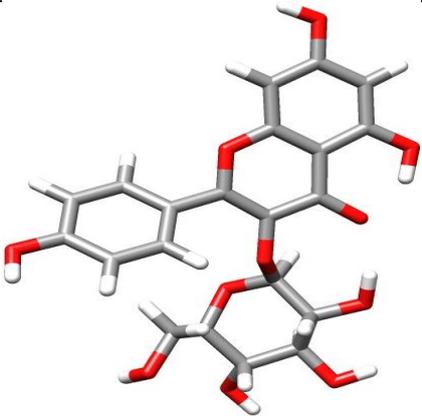
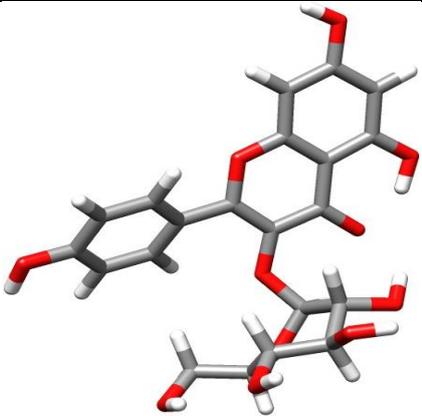
C17	990.20	1029.75	C2/Tg+/cc/t	
C18	1228.51	1089.78	C2/G-g-/cc/g-	
C19	1210.86	1213.30	C2/Tg+/cc/t	
C20	1282.41	1319.33	C2/G-g+/cc/t	

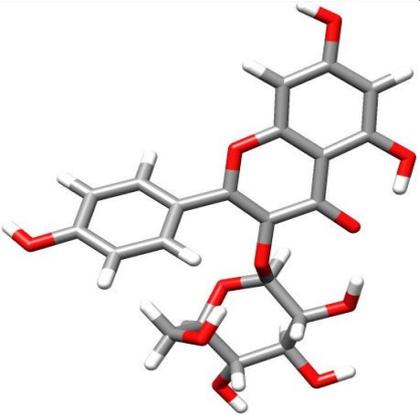
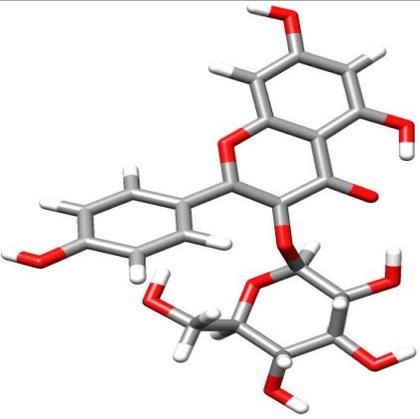
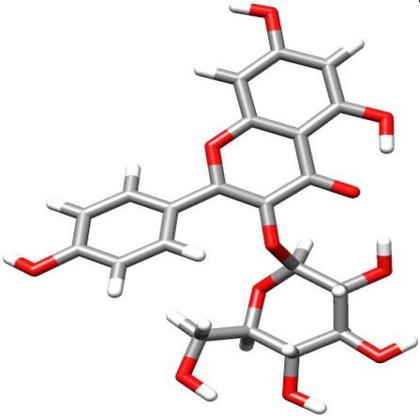
C21	1676.60	1502.26	C2/G+g+/cc/g-	
-----	---------	---------	---------------	--

Por último, en la tabla 3 se muestran los conformeros de la astragalina tienen la β -glucosa en conformación diferente a silla, se han clasificado en función de la molécula de kaempferol y se han tabulado los siguientes diedros: KAE-O-C1-C2 (β), O6-C6-C5-O5 (γ) y H6-O6-C6-C5 (δ) usando la misma nomenclatura que en los anteriores casos.

Tabla 3: Conformeros con glucosa en conformación diferente a silla. Equivalencia 1 cm⁻¹=83.593 kJ/mol

CONF	ENERGÍA/ cm ⁻¹ 6-31G (d, p)	ENERGÍA/ cm ⁻¹ 6-311++G (d, p)	KAE/ β / γ / δ	IMAGEN
C22	2258.28	2249.11	C1/t/g+/g-	
C23	1628.08	2850.01	C1/t/g-/g-	

C24	2740.32	2975.46	C1/g+/g+/g-	
C25	2630.71	3059.02	C1/g+/t/g+	
C26	878.49	3077.12	C1/t/t/g-	
C27	3527.88	3534.44	C1/g+/t/g+	

C28	-	1825.46	C2/t/g-/g+	
C29	2376.32	2351.67	C2/t/g+/g-	
C30	990.20	3286.57	C2/t/t/g+	

5.3 Simulación del espectro de microondas:

Una vez obtenidas las energías y haber clasificado los conformeros se calculan las poblaciones relativas de cada uno. La población de equilibrio de un conformero relativo al conformero más estable viene dada por la siguiente expresión:

$$N_i = e^{-\Delta G/kT} \quad (19)$$

Siendo ΔG el cambio en energía de Gibbs respecto al conformero más estable que se ha obtenido al hacer el cálculo de las frecuencias, k la constante de Boltzmann y T la temperatura, en este caso 298 K. se han calculado las poblaciones de todos los conformeros con energías menores de 1000 cm^{-1} . En la siguiente tabla

se muestran los resultados, son energías relativas en función de la más estable, también se muestra la población relativa:

Tabla 4: Confórmeros más estables y sus poblaciones relativas respecto a C14. Equivalencia 1 cm⁻¹=83.593 kJ/mol

CONFÓRMEROS	$\Delta E/ \text{cm}^{-1}$	$\Delta EPZ/ \text{cm}^{-1}$	$\Delta G/\text{cm}^{-1}$	POBLACION
C14	4,34	0,00	0,00	1,00
C1	0,00	-220,13	68,70	0,72
C12	0,599	-187,87	92,18	0,64
C3	275,53	-25,90	96,35	0,63
C4	523,47	169,87	159,34	0,46
C13	2,3	-37,09	246,47	0,30
C2	266,31	21,95	285,10	0,25
C16	9,35	396,59	353,35	0,18
C6	938,85	623,53	508,30	0,09
C5	691,56	467,92	613,43	0,05
C15	8,63	491,18	651,18	0,04

Para realizar la simulación del espectro de microondas se ha utilizado el programa Pgopher. Los parámetros que son necesarios para predecir el espectro de microondas son: las constantes de rotación y los valores de las componentes del momento dipolar eléctrico.

Este programa simula el espectro de chorro supersónico a una temperatura de 1K, ya que mediante este tipo de espectroscopía se estudian las transiciones entre niveles de energía de rotación molecular de moléculas expandidas adiabáticamente en una cámara de vacío. Utilizando la aproximación isentrópica se describen las propiedades y estructura del chorro supersónico.

El chorro supersónico no representa una situación de equilibrio termodinámico, ya que para ello es necesario una alta frecuencia de colisiones, cuando se produce la expansión supersónica la frecuencia de colisiones es muy baja, lo que hace que las condiciones de equilibrio termodinámico no se den y no se puede definir una única temperatura. Las distintas actividades moleculares son independientes y tienen temperaturas características diferentes. Se puede demostrar que para cada grado de libertad de rotación y vibración existe un equilibrio local.

En el equilibrio previo a la expansión las moléculas se distribuyen en los diferentes niveles de energía de vibraciones asociados a cada foso de potencial, de modo que la población relativa de cada confórmero puede calcularse usando la energía de Gibbs. Las colisiones en la primera etapa de la expansión supersónica producen un enfriamiento que lleva las moléculas que pueblan los distintos estados excitados de vibración al estado de menor energía en cada foso de potencial. De esta forma, la población de los diferentes confórmeros en equilibrio puede relacionarse con la intensidad del espectro de rotación observado para cada confórmero que corresponde al estado de vibración de menor energía.

El ambiente de baja temperatura que se obtiene de la expansión supersónica es el medio ideal para aislar los confórmeros más estables de una molécula para que después sean irradiados por radiación de microondas²⁴, ya que la temperatura de rotación alcanza valores cercanos a 1-2 K, permitiendo la población de la mayoría de los estados de rotación más bajos. La transformada de Fourier del perfil de la radiación emitida por las

moléculas como respuesta a los pulsos de radiación microondas genera el espectro de rotación con buena resolución y sensibilidad. Además, para moléculas en las que puedan existir diferentes conformeros, este enfriamiento congela cada conformación por separado, impidiendo la conversión entre las diferentes estructuras, lo que supone una ventaja para conocer todos los conformeros de una molécula ya que a temperatura ambiente son indistinguibles en la mayoría de los casos²⁵.

La regla de selección general para la observación del espectro de rotación es que la molécula tenga momento dipolar eléctrico permanente, es decir, debe ser polar.

Se presentan los espectros de microondas obtenidos para los conformeros de mayor población (ver anexo). De los conformeros 12, 1 y 2 no se ha hecho el espectro puesto que presentan poblaciones muy pequeñas.

Se representa un espectro conjunto de todos los conformeros (figura 9).

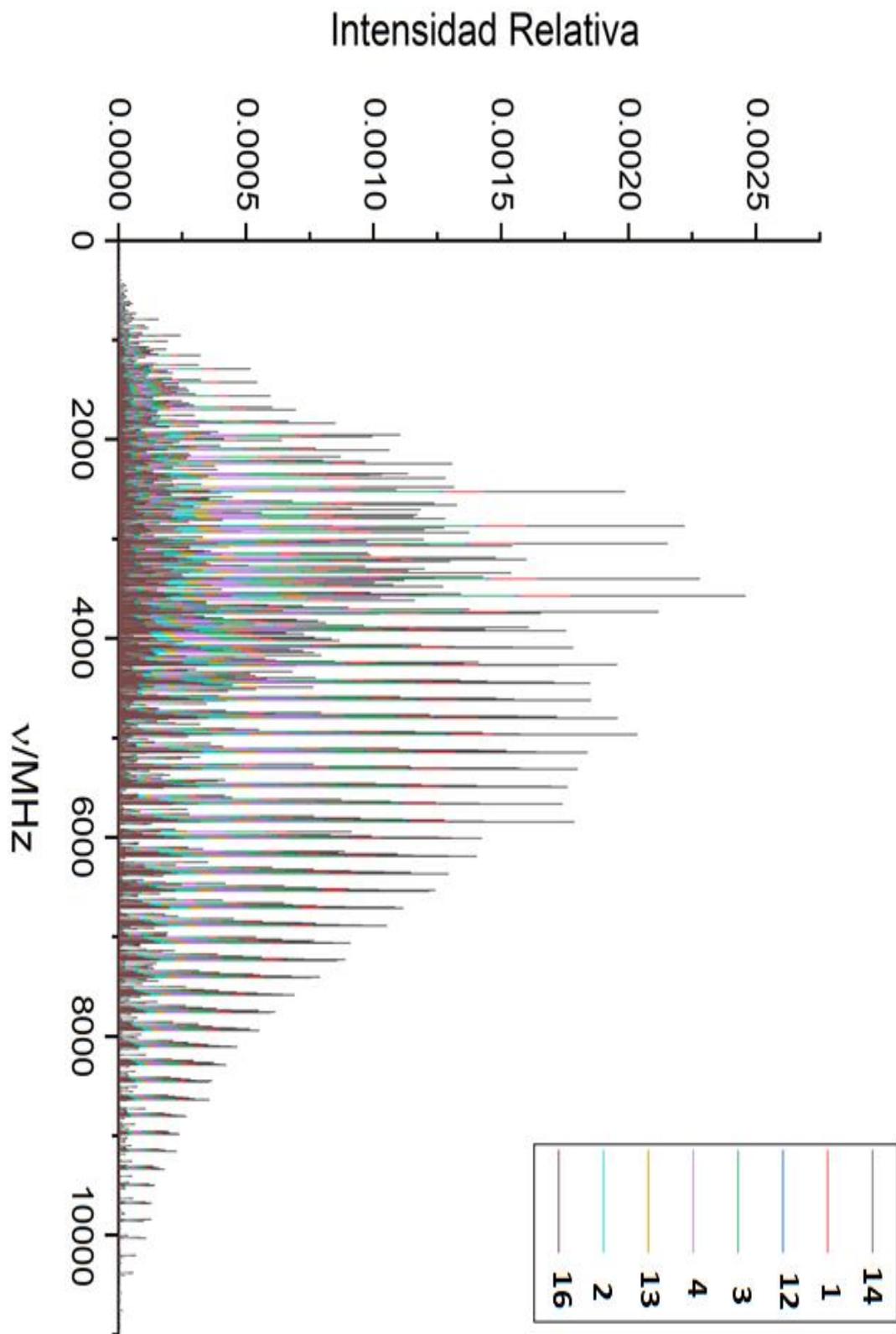


Figura 9: Representación del espectro de rotación de los conformeros más estables de la astragalina. El espectro de cada conformero presenta un color diferente según se indica en el cuadro adjunto.

5.4 Estudio de las interacciones intramoleculares:

Para concluir, se ha realizado un estudio de las posibles interacciones de los conformeros más poblados. Mediante estos cálculos, se pueden conocer todas las interacciones que existen dentro de la molécula, tales como puentes de hidrógeno o repulsiones entre átomos. En primer lugar, se realiza un análisis NCI (Non-Covalent Interaction), este resulta ser un método muy popular para el estudio de las interacciones débiles, estas interacciones aparecen como superficies. La fortaleza de los enlaces está correlacionada con la densidad electrónica en las correspondientes regiones. Las interacciones de Van der Waals suelen tener poca densidad electrónica, mientras que las regiones correspondientes a efectos estéricos o interacciones de atracción tienen mayor densidad electrónica. Así se define el espacio en función de la densidad electrónica. Las superficies de color verde representan las interacciones de Van der Waals, las de color azul representan atracciones fuertes como enlaces de hidrógeno o de halógenos, mientras que las superficies de color rojo representan repulsiones fuertes, como los efectos estéricos dentro de un anillo (figura 10). Mediante este método se obtiene un gráfico de dispersión en el que el eje X y el eje Y corresponden al producto de la densidad electrónica por el signo de λ_2 y al gradiente de densidad reducida respectivamente, cada punto en este gráfico corresponde a un punto de un espacio 3D. Los puntos en sus vértices corresponden a puntos críticos en la teoría AIM ("atoms in molecules"), los picos a la izquierda corresponden a interacciones atractivas y los puntos de la derecha a interacciones repulsivas. Dibujando una línea horizontal en el gráfico, los puntos que la crucen corresponden a las superficies generadas en el análisis NCI. La calidad de las superficies depende del espaciado entre puntos, cuanto más pequeño sea el espaciado mejor será la calidad de las superficies.



Figura 10: Relación color-interacción.

Después se realiza un análisis QTAIM (Quantum Theory of Atoms in Molecules), este método inicialmente se utilizaba para analizar la densidad electrónica en la teoría AIM, aunque se ha extendido a otras funciones. Los puntos donde el gradiente es cero se denominan puntos críticos y se pueden clasificar en cuatro tipos diferentes: puntos críticos nucleares; puntos críticos de enlace; puntos críticos de anillos que muestran efectos estéricos y por último los que se encuentran en el centro de una caja. El camino de enlace (bond path) es la línea de máxima densidad electrónica que une los núcleos de dos átomos enlazados. La colección de caminos de enlace se denomina gráfico molecular y nos da una estructura molecular ambigua. Los puntos críticos aparecen como bolas amarillas y los caminos de enlace como líneas naranjas.

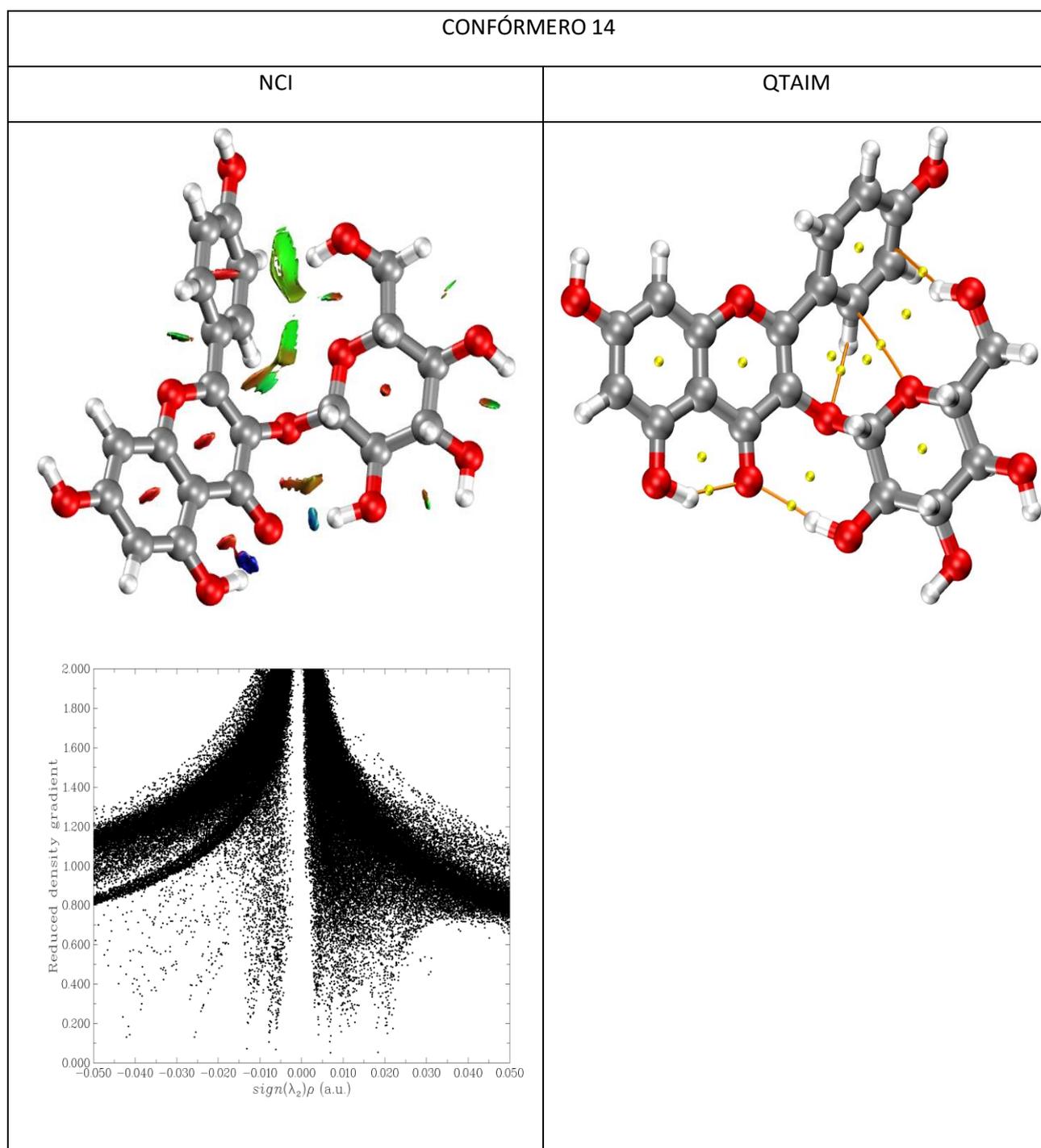


Tabla 5: Representación de los resultados obtenidos del análisis NCI y QTAIM para el conformero 14 de la astragalina.

En la representación NCI del conformero de mayor población se puede observar que existe un enlace de hidrógeno muy fuerte entre el alcohol de la posición 5 del anillo A y la cetona de la posición 4 del anillo C del kaempferol, este enlace de hidrógeno se observa en todos los conformeros y en todos con gran fortaleza. También se observa otro enlace de hidrógeno entre uno de los grupos OH de la D-glucosa y el grupo de la posición 4 del kaempferol. Existen interacciones más débiles (color verde), como la que se da entre el grupo metóxido de la D-glucosa con el anillo B.

La estabilidad de la molécula de D-glucosa se ve reforzada debido a una red cooperativa de enlaces de hidrógeno.

Dentro de todos los anillos aparecen superficies de color rojo que indican repulsión, al igual que en los puentes de hidrógeno, indicando que existe repulsión entre átomos iguales que se encuentran cercanos entre sí.

En el análisis QTAIM se observan puntos críticos de los anteriormente mencionados, como los que se encuentran dentro de los anillos y varias rutas de enlace.

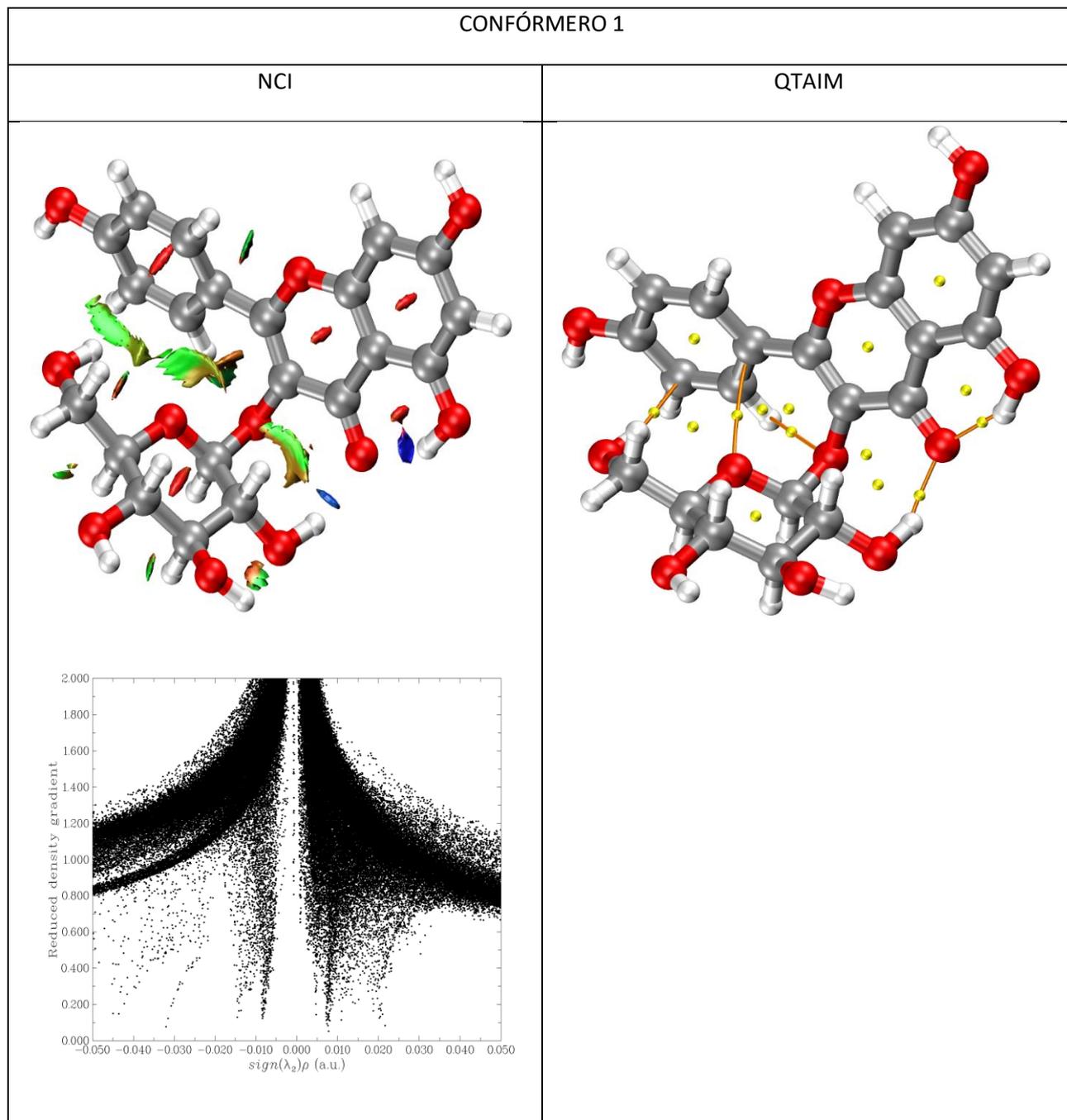


Tabla 6: Representación de los resultados obtenidos del análisis NCI y QTAIM para el conformero 1 de la astragalina.

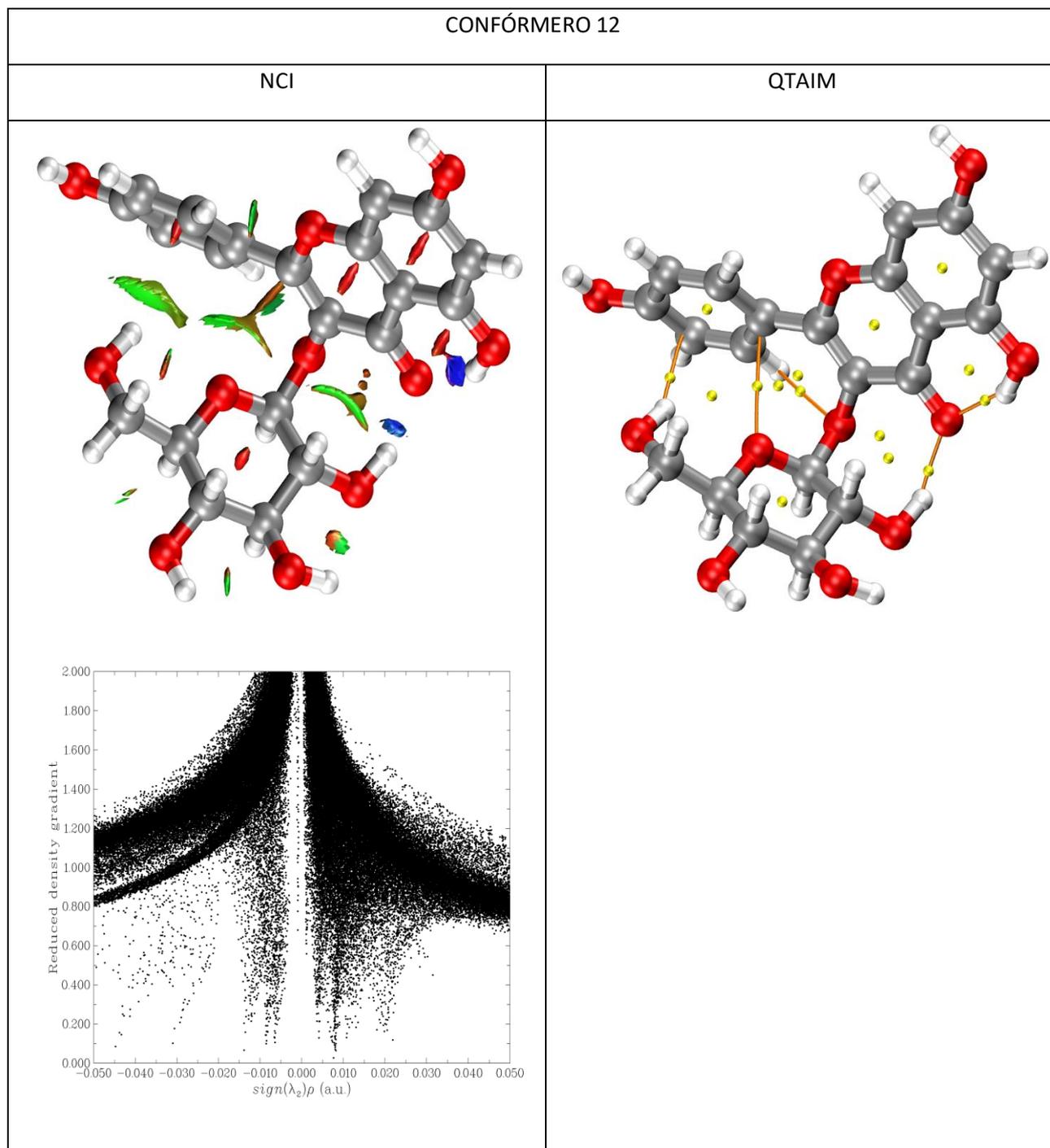


Tabla 7: Representación de los resultados obtenidos del análisis NCI y QTAIM para el conformero 12 de la astragalina.

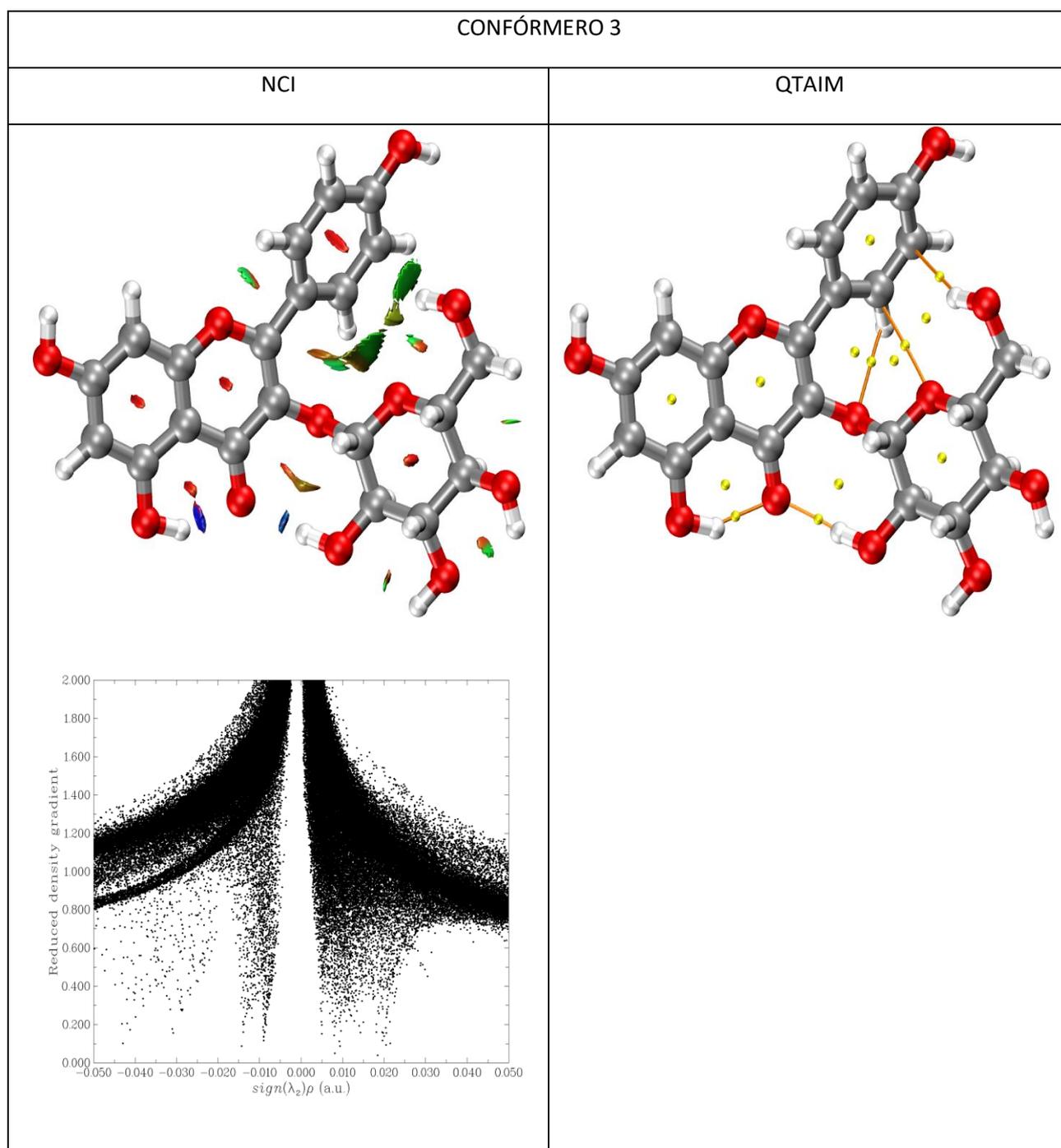


Tabla 8: Representación de los resultados obtenidos del análisis NCI y QTAIM para el conformero 3 de la astragalina.

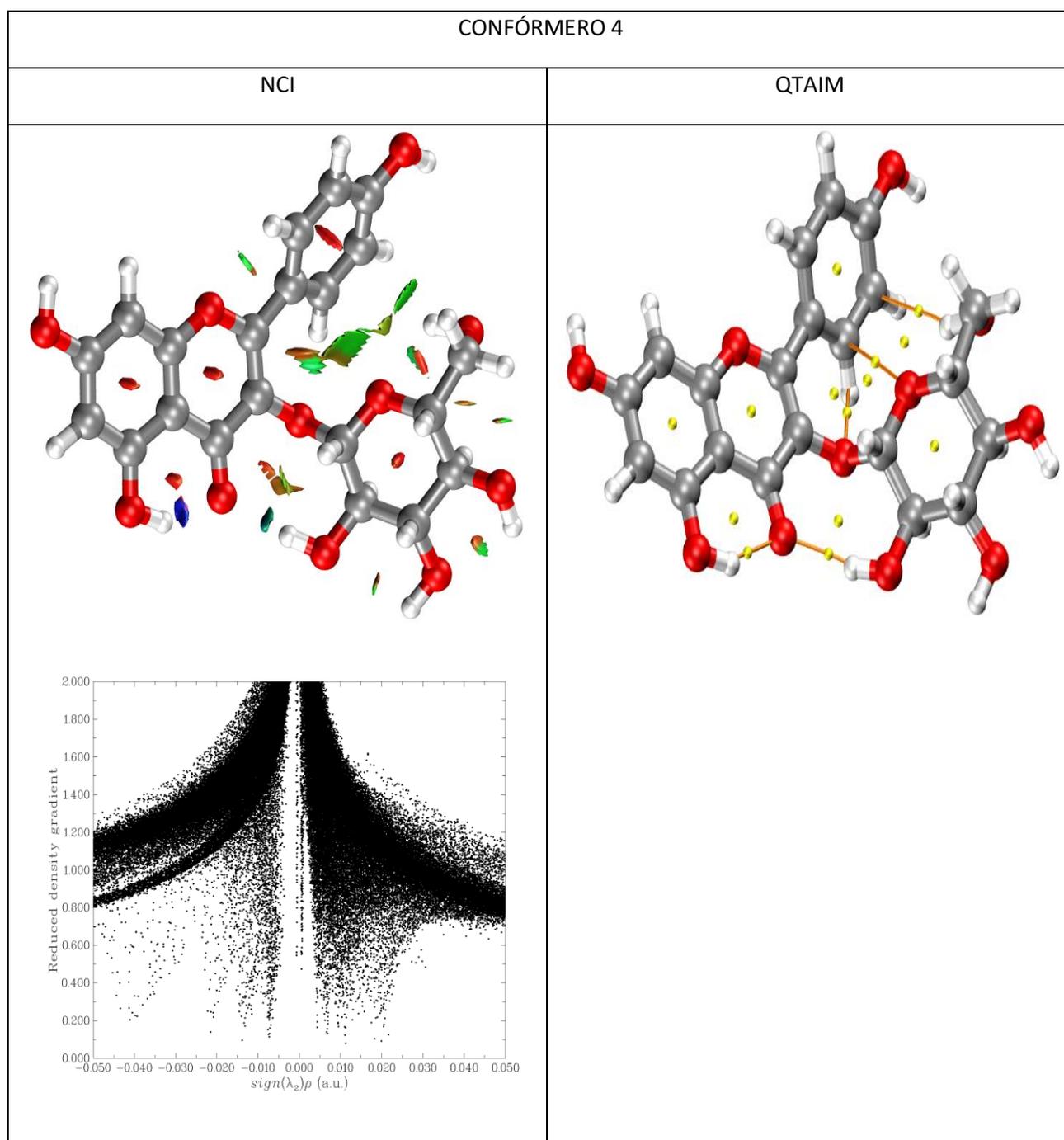


Tabla 9: Representación de los resultados obtenidos del análisis NCI y QTAIM para el conformero 4 de la astragalina.

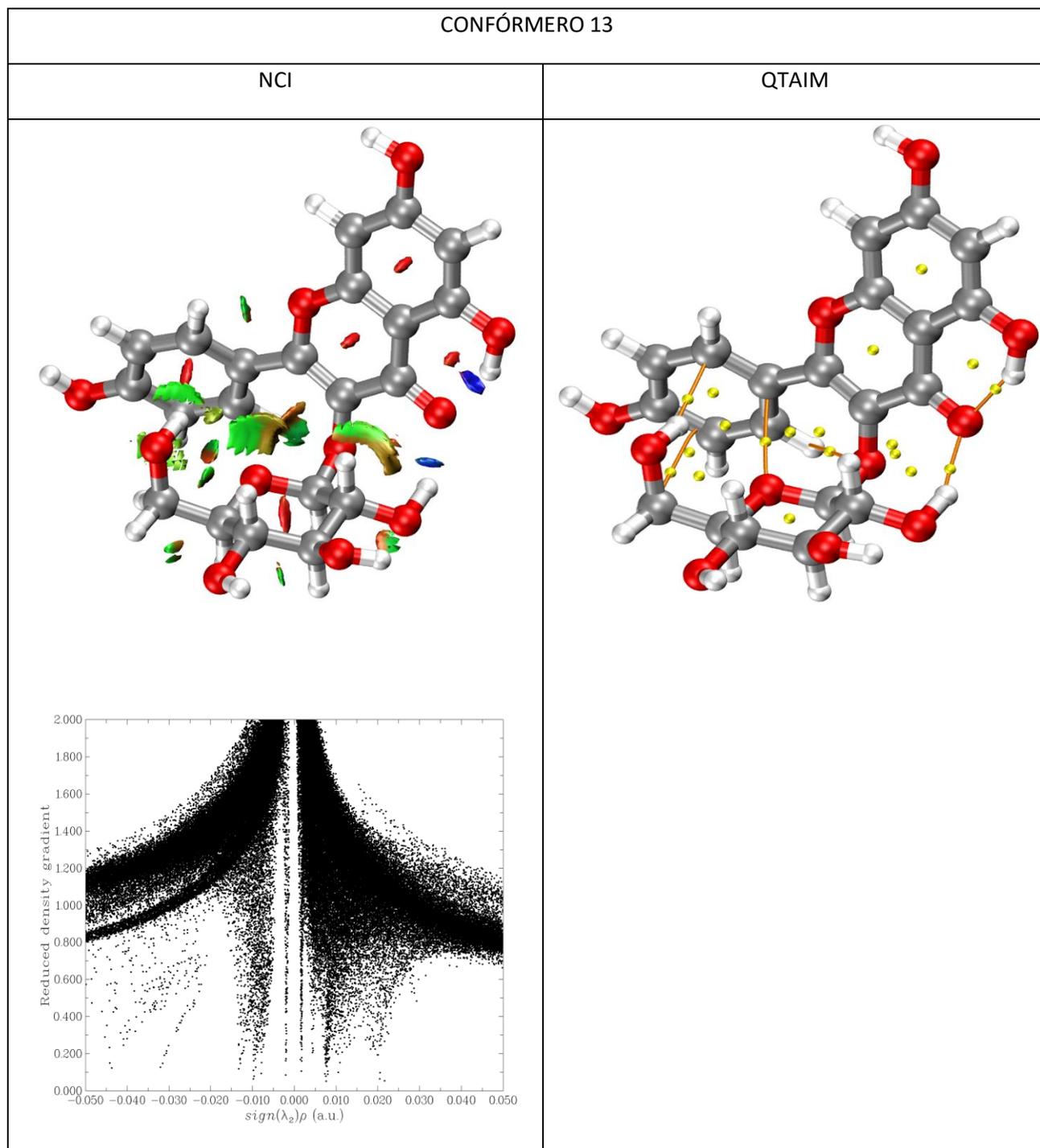


Tabla 10: Representación de los resultados obtenidos del análisis NCI y QTAIM para el conformero 13 de la astragalina.

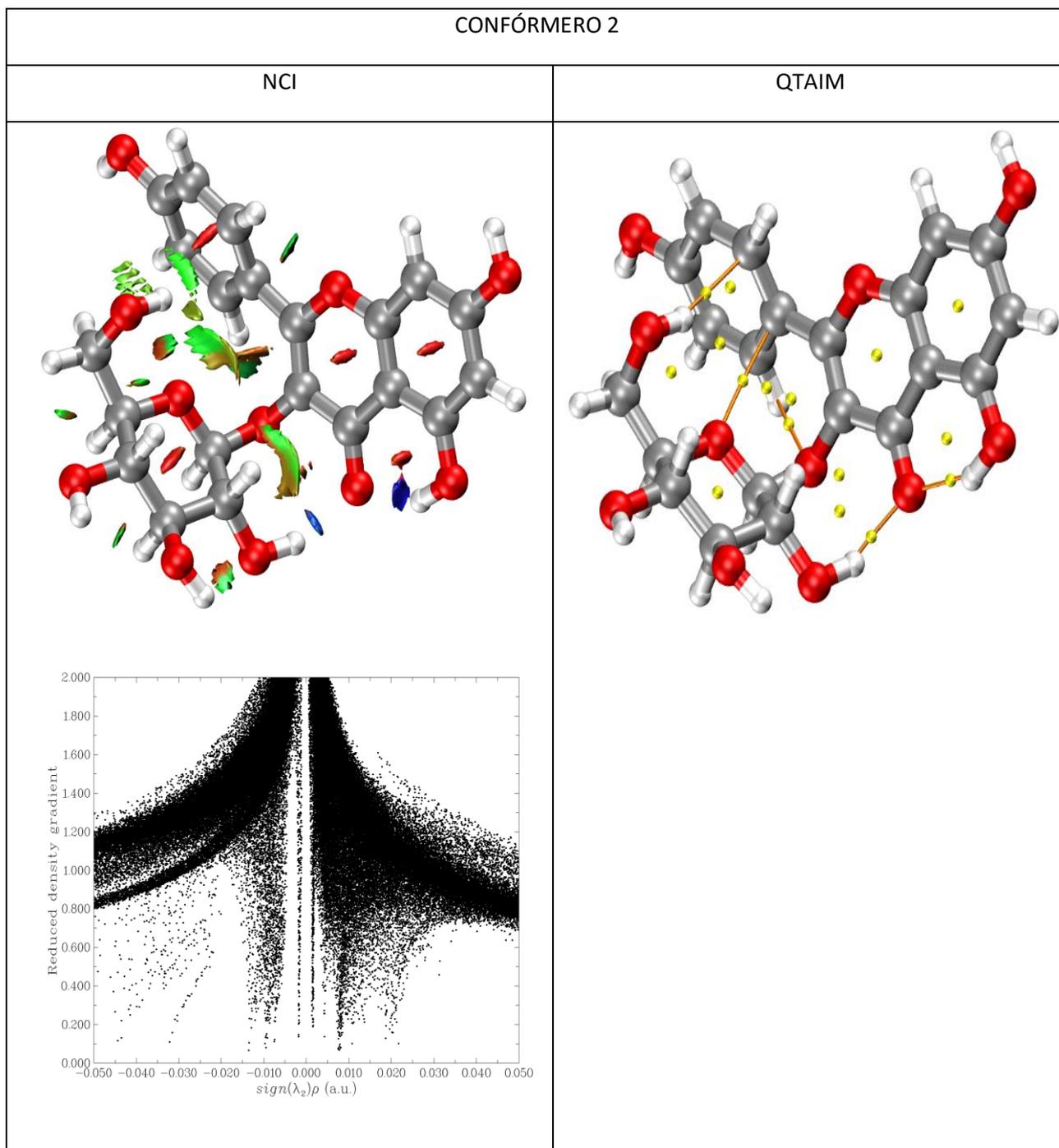


Tabla 11: Representación de los resultados obtenidos del análisis NCI y QTAIM para el conformero 2 de la astragalina.

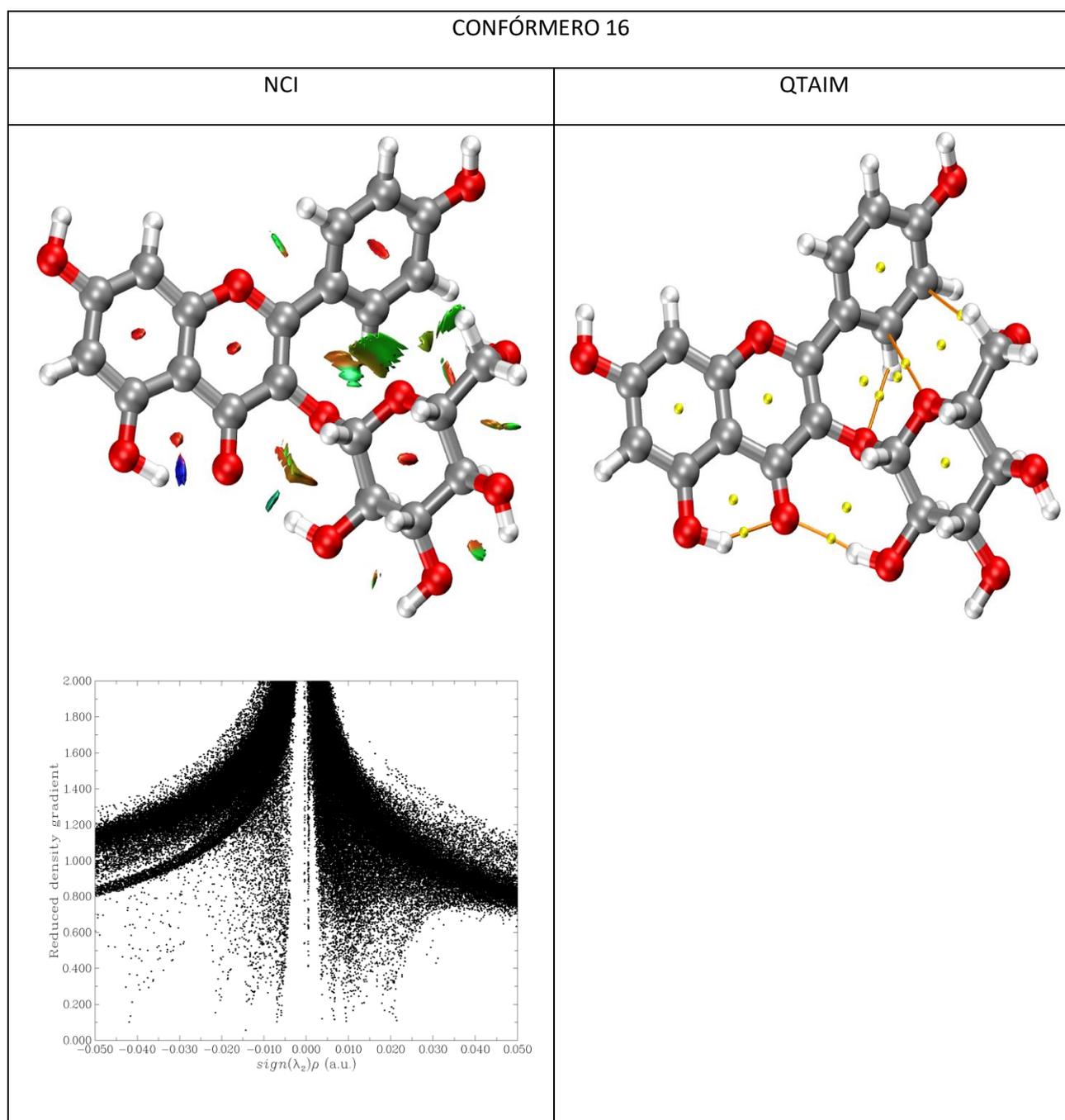


Tabla 12: Representación de los resultados obtenidos del análisis NCI y QTAIM para el confórmero 2 de la astragalina.

6 Conclusiones:

Se ha realizado el estudio conformacional de la astragalina, obteniendo mediante el programa CREST 137 conformeros, que se pueden clasificar en dos principales grupos en función de la estructura del kaempferol y dentro de estos grupos, en función de la estructura de la β -D-glucosa.

Se ha estudiado su estructura mediante métodos DFT, para ambos se ha utilizado el método B3LYP-D3 pero con distintas bases, en primer lugar con base 6-311++G (d, p) y luego 6-31G (d, p). Las energías relativas muestran que los conformeros con el kaempferol C1 tienen energías muy similares a los conformeros con el kaempferol C2. También se muestra un cierto paralelismo entre las energías relativas entre los dos grupos y la estructura de glucosa que poseen. También se distingue un tercer grupo en el que la estructura de la glucosa no se encuentra en conformación silla, siendo los conformeros menos estables.

Al hacer el cálculo de las energías de Gibbs de los conformeros con energías relativas menores de 1000 cm^{-1} se observa que ninguno de los conformeros con mayor población tiene la estructura de la glucosa T. A partir de estas poblaciones se hicieron las simulaciones de los espectros de rotación.

Como se puede observar, estos espectros están conformados por multitud de líneas, ya que están representadas las transiciones de tipo a, b y c, lo que hace que el espectro conjunto sea muy denso. Al observar este espectro se puede comprobar que para moléculas de gran tamaño existen muchas transiciones a bajas frecuencias.

Por último, se hizo un estudio de las interacciones moleculares donde se pueden observar interacciones atractivas, predominando los enlaces de hidrógeno y las interacciones repulsivas.

7 Anexo: Espectros de microondas:

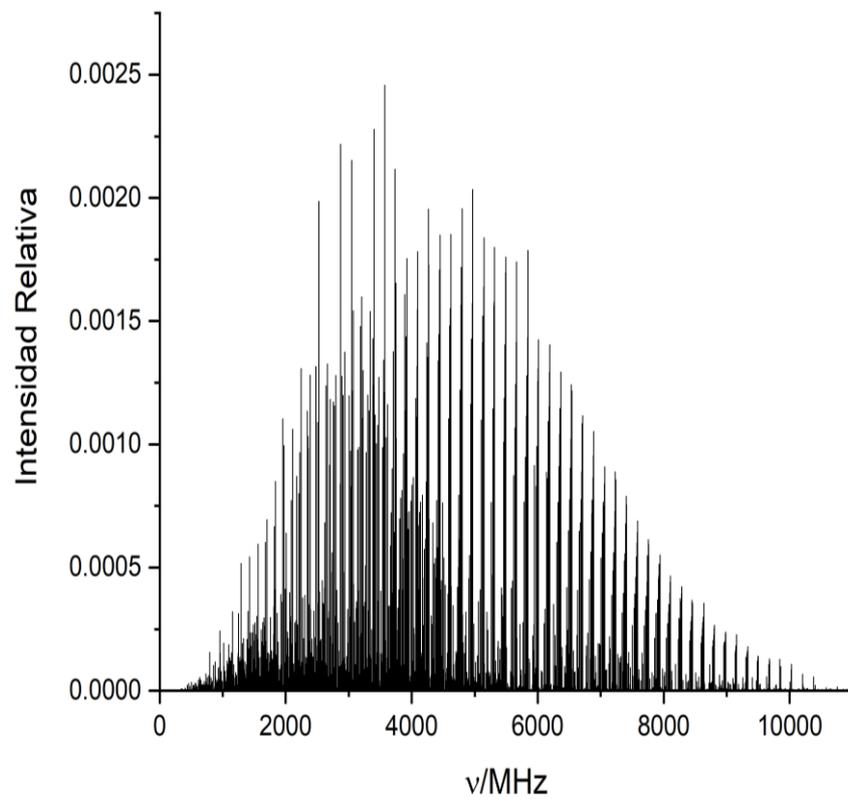


Figura 11: Espectro 14

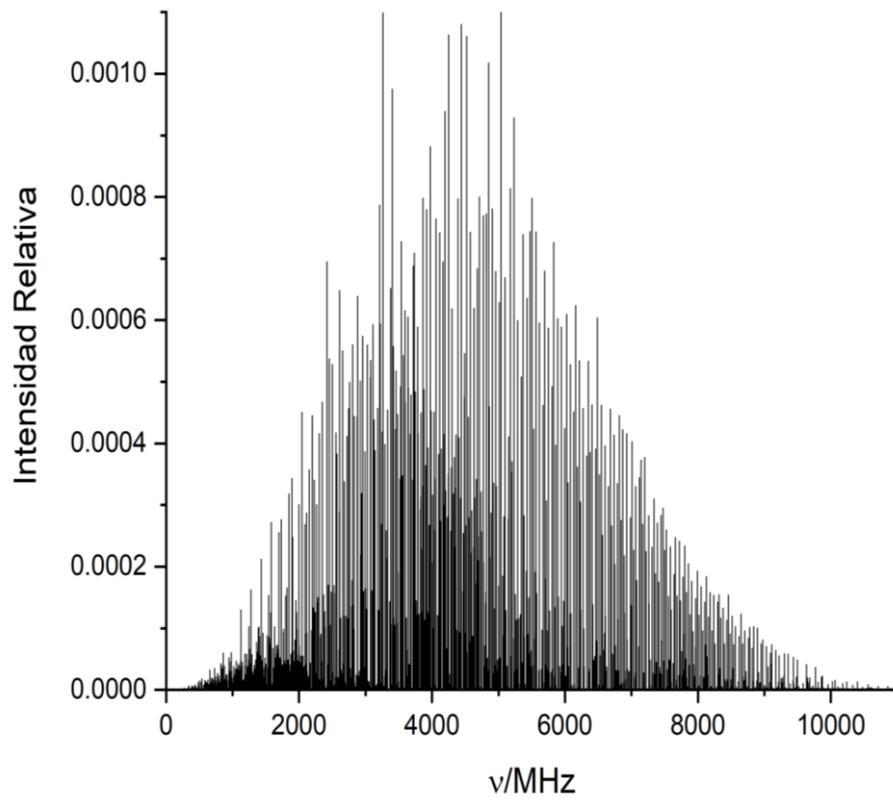


Figura 12: Espectro 1

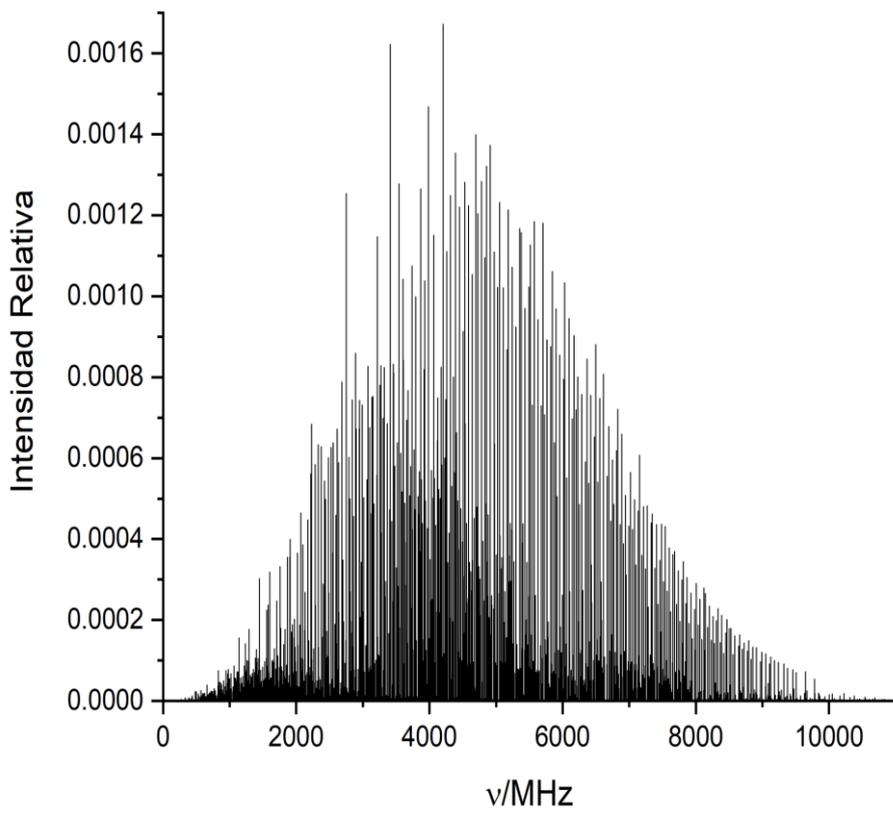


Figura 13: Espectro 12

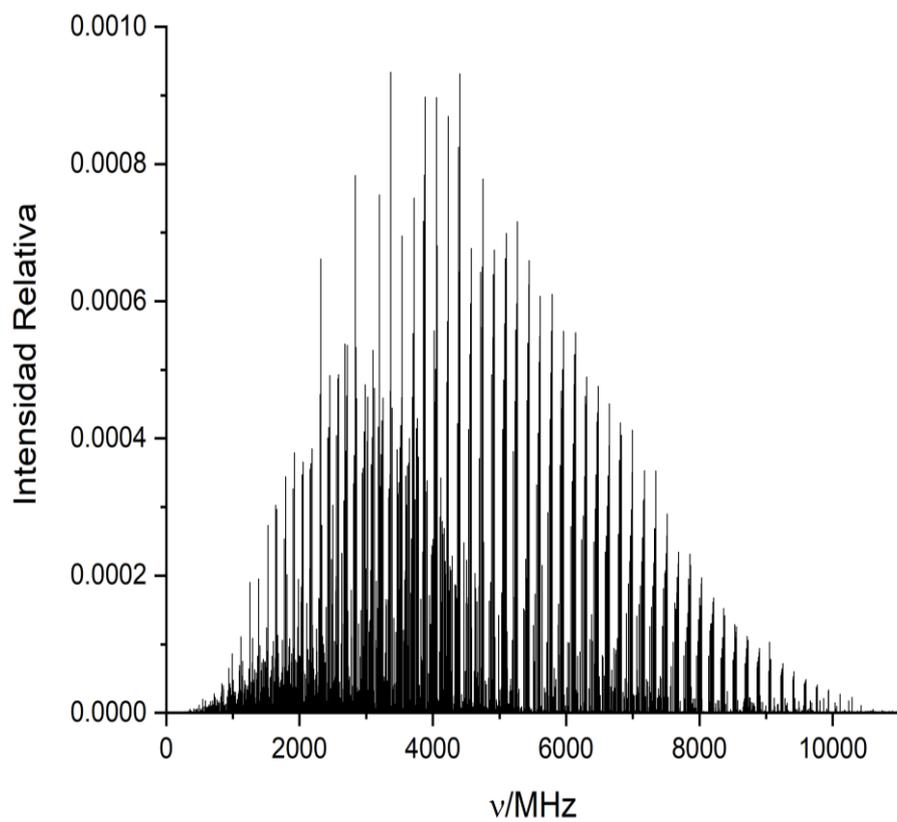


Figura 14: Espectro 3

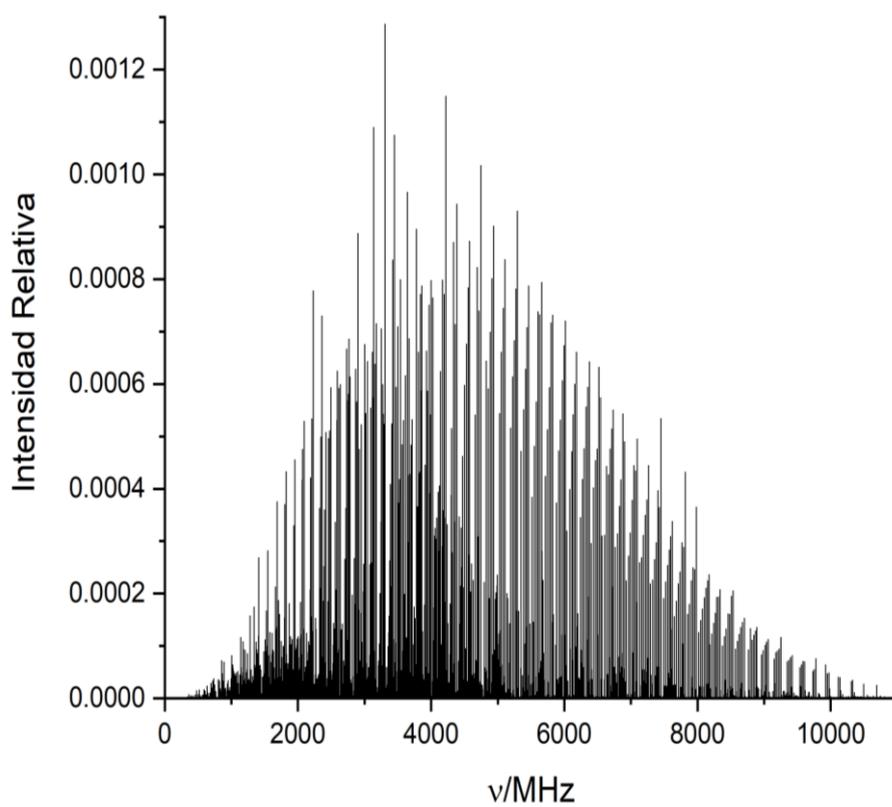


Figura 15: Espectro 4

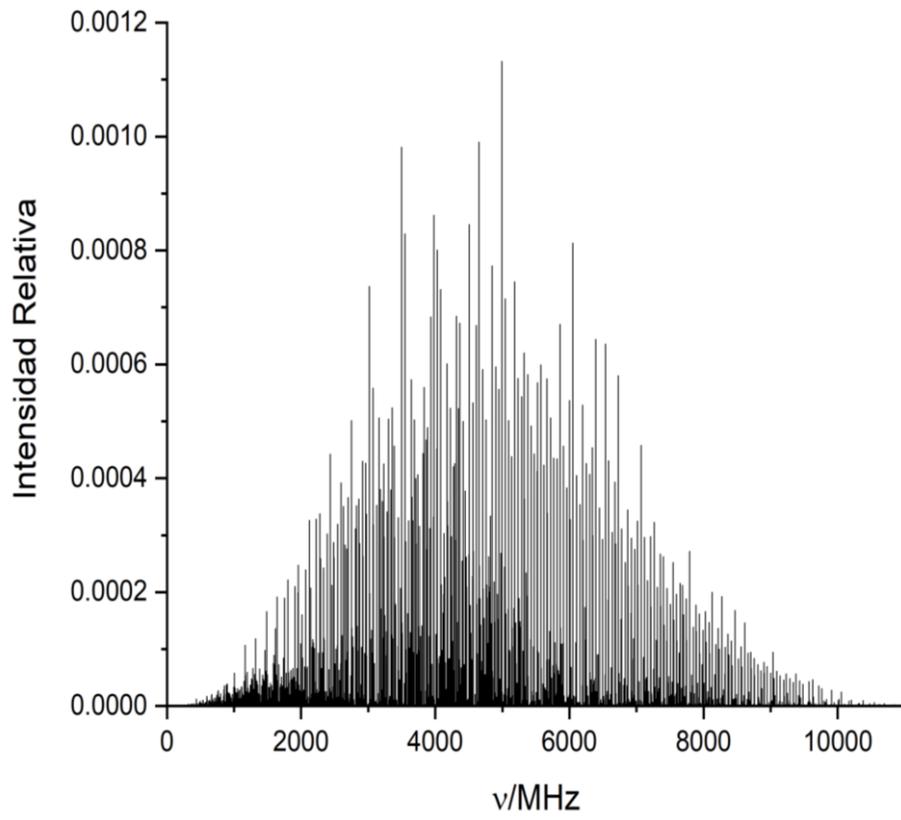


Figura 16: Espectro 13

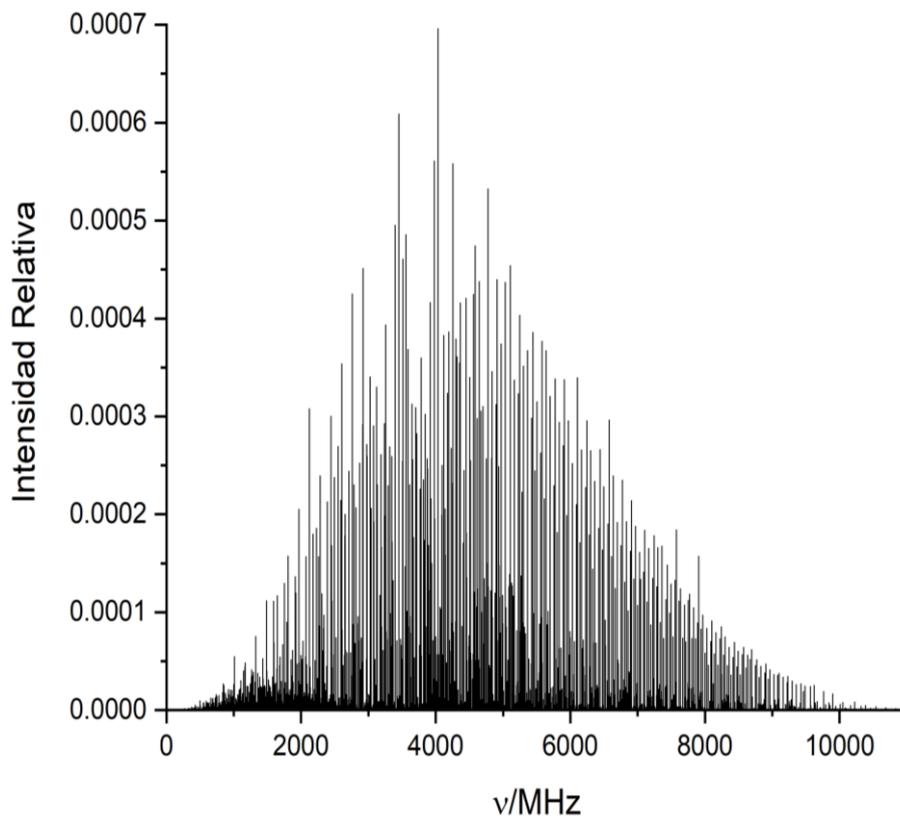


Figura 17: Espectro 2

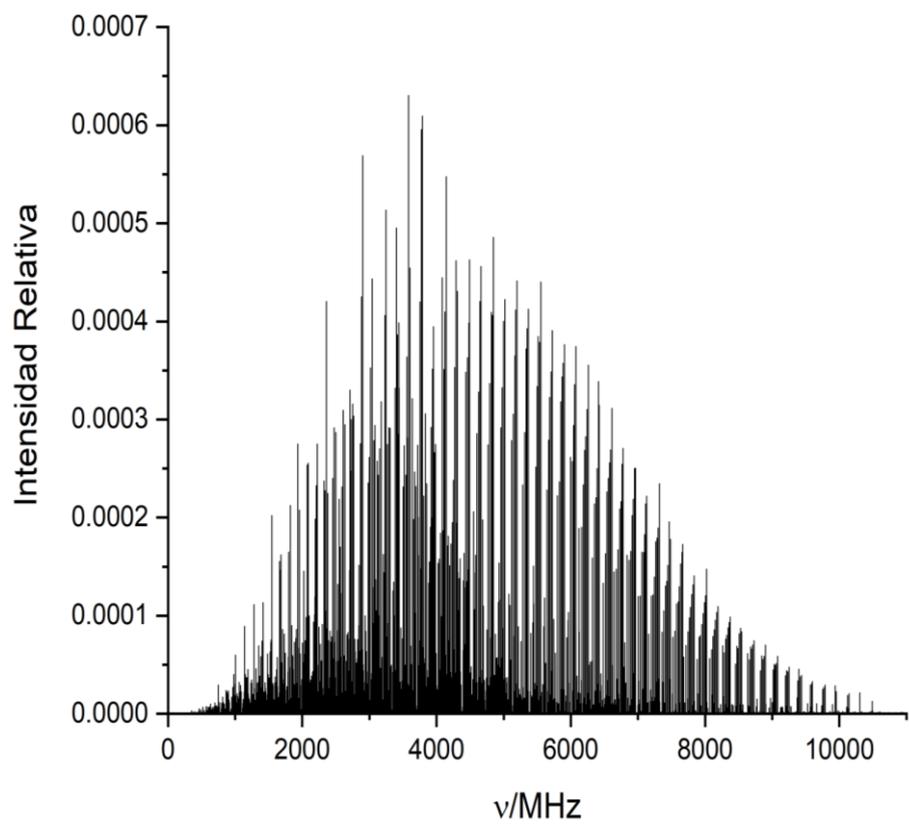


Figura 18: Espectro 16

8 Bibliografía:

- [1] Kumar, & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *TheScientificWorld*, 2013, 162750–16.
- [2] Ochoa, C. I., & Ayala, A. A. (2004). Los flavonoides: apuntes generales y su aplicación en la industria de alimentos. *Ingeniería y competitividad*, 6(2), 64-74.
- [3] Bose, S., Sarkar, D., Bose, A., & Mandal, S. C. (2018). Natural flavonoids and its pharmaceutical importance. *The pharma review*, 61-75.
- [4] Singh, Kaur, M., & Silakari, O. (2014). Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84, 206–239.
- [5] Wang, X. (2009). Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases. *FEBS letters*, 583(20), 3303-3309.
- [6] Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységú, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586-621.
- [7] Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
- [8] Beninger, & Hosfield, G. L. (2003). Antioxidant Activity of Extracts, Condensed Tannin Fractions, and Pure Flavonoids from Phaseolus vulgaris L. Seed Coat Color Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7879–7883.
- [9] Meng, Zhang, A., Wang, X., & Sun, H. (2019). A kaempferol-3-O- β -d-glucoside, intervention effect of astragalín on estradiol metabolism. *Steroids*, 149, 108413–108413.
- [10] Kim, Kang, H.-K., Seo, E.-S., Jung, S.-H., Park, J.-S., Kim, D.-H., Kim, D.-W., Ahn, S.-A., Sunwoo, C., & Kim, D. (2012). Glucosylation of the flavonoid, astragalín by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextran sucrose acceptor reactions and characterization of the products. *Enzyme and Microbial Technology*, 50(1), 50–56.
- [11] Ammara Riaz, Azhar Rasul, Ghulam Hussain, Muhammad Kashif Zahoor, Farhat Jabeen, Zinayyera Subhani, Tahira Younis, Muhammad Ali, Iqra Sarfraz, & Zeliha Selamoglu. (2018). Astragalín: A Bioactive Phytochemical with Potential Therapeutic Activities. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2018.
- [12] Bertrán Rusca, Branchadell Gallo, V., Moreno Ferrer, M., & Sodupe Roure, M. (2002). *Química cuántica: fundamentos y aplicaciones computacionales / Joan Bertrán Rusca[et al.]* (2ª ed.). Síntesis.
- [13] Jensen. (1999). *Introduction to computational chemistry / Frank Jensen*. John Wiley & Sons.
- [14] Lewars. (2016). *Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics* (2nd ed.).
- [15] Young. (2004). *Computational chemistry: a practical guide for applying techniques to real world problems*. WILEY.
- [16] Perlt. (2021). *Basis sets in computational chemistry / Eva Perlt, editor*. (1st ed. 2021.). Springer.

- [17] Levine. (2001). *Química cuántica / Ira N. Levine* (5ª ed.). Prentice-Hall.
- [18] Papajak, Zheng, J., Xu, X., Leverentz, H. R., & Truhlar, D. G. (2011). Perspectives on Basis Sets Beautiful: Seasonal Plantings of Diffuse Basis Functions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(10), 3027–3034.
- [19] Pracht, P., Bohle, F., & Grimme, S. (2020). Automated exploration of the low-energy chemical space with fast quantum chemical methods. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(14), 7169–7192.
- [20] Grimme, S., Antony, J., Ehrlich, S., & Krieg, H. (2010). A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *The Journal of chemical physics*, 132(15), 154104.
- [21] Mata, Peña, I., Cabezas, C., López, J. C., & Alonso, J. L. (2012). A broadband Fourier-transform microwave spectrometer with laser ablation source: The rotational spectrum of nicotinic acid. *Journal of Molecular Spectroscopy*, 280, 91–96.
- [22] Yang, Cao, J., Heng, T., Xing, C., Yang, S., Zhang, L., Lu, Y., & Du, G. (2021). Theoretical Calculation and Structural Analysis of the Cocrystals of Three Flavonols with Praziquantel. *Crystal Growth & Design*, 21(4), 2292–2300.
- [23] Alonso, J. L., Lozoya, M. A., Pena, I., López, J. C., Cabezas, C., Mata, S., & Blanco, S. (2014). The conformational behaviour of free D-glucose—at last. *Chemical Science*, 5(2), 515–522.
- [24] Pérez, E. J. C., & Gómez, A. E. L. (2013). ¡Disolvente fuera!: azúcares en fase gas. In *Anales de la Real Sociedad Española de Química* (No. 4, pp. 258–267). Real Sociedad Española de Química.
- [25] Balle, & Flygare, W. H. (1981). Fabry–Perot cavity pulsed Fourier transform microwave spectrometer with a pulsed nozzle particle source. *Review of Scientific Instruments*, 52(1), 33–45.
- [26] Gaussian 16, Revision A.03,
- M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.