



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

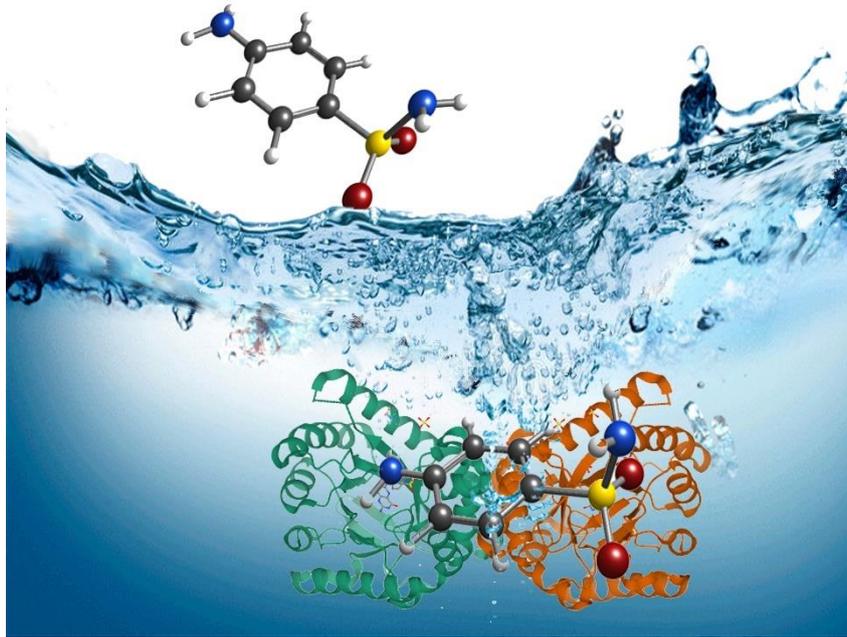
Grado en Química

**Sulfanilamida y su complejo con una molécula de agua**

*Autor: Sergio Mato Domínguez*

*Tutor/es: Iker León Ona*





## INDICE

### Contenido

1.	RESUMEN/ ABSTRACT .....	1
2.	INTRODUCCIÓN .....	3
2.1.	Sulfanilamida.....	3
2.2.	Relación estructura-propiedad: sulfanilamida y su unión al centro activo .....	4
2.3.	Importancia de la solvatación .....	5
2.4.	Diseño de fármacos en la actualidad: Acoplamiento Molecular .....	7
3.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	8
3.1.	Justificación .....	8
3.2.	Objetivos .....	9
4.	FUNDAMENTOS.....	10
4.1.	Espectroscopia de rotación.....	10
4.1.1.	Modelo del rotor rígido.....	10
4.1.2.	Distorsión centrífuga.....	14
4.1.3.	Acoplamiento de cuadrupolo nuclear.....	16
4.2.	Métodos computacionales.....	18
4.2.1.	Mecánica molecular .....	19
4.2.2.	Métodos basados en la resolución de la función de onda.....	20
4.2.3.	Teoría del Funcional de la Densidad (DFT).....	20
4.2.4.	Bases de calculo .....	21
4.3.	Técnicas espectroscópicas .....	22
4.3.1.	Ablación laser .....	22
4.3.2.	Expansión supersónica .....	22
4.3.3.	CP-FTMW.....	23
4.3.4.	MB-FTMW .....	24
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
5.1.	Panorama conformacional de la sulfanilamida.....	27
5.2.	Panorama conformacional de la sulfanilamida-H <sub>2</sub> O .....	28
5.3.	Preparación de la muestra y simulación del espectro rotacional .....	30
5.4.	Espectro rotacional de banda ancha.....	31
5.5.	Análisis del espectro.....	33
5.5.1.	Sulfanilamida .....	33
5.5.2.	Especies isotópicas .....	34

5.6	Espectro de LA-MB-FTMW: análisis de la estructura hiperfina .....	36
5.7	Asignación conformacional: resolviendo el problema .....	37
5.8	Perdida conformacional .....	39
5.9	Sulfanilamida monohidratada.....	40
5.10	Interacciones intramoleculares.....	43
5.11	Interacciones intermoleculares.....	43
5.12	Implicación biológica.....	45
6.	CONCLUSIONES .....	48
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	49
8.	TABLAS Y FIGURAS.....	56
9.	ANEXO .....	59

## 1. RESUMEN/ ABSTRACT

La sulfanilamida (SA, 4-aminobenzenosulfonamida) es un fármaco antibacterial que interfiere con la conversión del ácido para-aminobenzoico(PABA) en folato, lo cual previene la síntesis del ácido fólico (vitamina B9), que es esencial en múltiples reacciones de transferencia de carbono. Debido a su importancia, el principal objetivo de este trabajo es la caracterización estructural de la sulfanilamida y de sus correspondientes complejos hidratados en las condiciones de aislamiento que proporciona la expansión supersónica. Para la caracterización estructural se utilizan técnicas de microondas con transformada de Fourier asistida con ablación laser. Se detectó un único conformero para la molécula aislada, estabilizada por interacciones intramoleculares N-H•••O=S del grupo sulfonilo. La orientación del NH<sub>2</sub> del grupo anilínico es asignada inequívocamente gracias a las constantes de rotación, reglas de selección y la estructura hiperfina. El único conformero de sulfanilamida-agua observado adopta la estructura donde la estabilización de la molécula surge por la formación de tres enlaces de hidrogeno por parte de la molécula de agua con la sulfanilamida. Además, el complejo sulfanilamida-agua encontrado indica que la microsolvatación altera la preferencia conformacional forzando un cambio de la configuración eclipsada hallada en la especie monomérica a la disposición alternada en el complejo. Puesto que el proceso de acoplamiento molecular es controlado por las diferencias de la energía libre de Gibbs entre el ligando solvatado por el medio extracelular y la interacción del ligando con el centro activo del receptor, el trabajo se completa con un cálculo de la sulfanilamida dentro del receptor dihidroterato sintasa, incluyendo el modelo VSGB 2.0 para simular el medio biológico. Estos resultados están en buen acuerdo con nuestros datos experimentalmente.

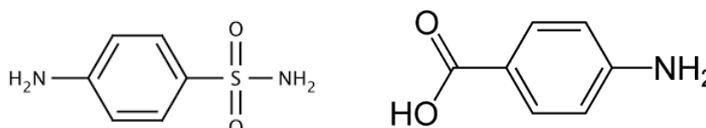
Sulfanilamide (SA, 4-aminobenzenesulfonamide) is an antibacterial drug that interferes with the conversion of para-aminobenzoic acid (PABA) to folate, preventing the synthesis of folic acid (vitamin B9), essential in multiple carbon transfer reactions. Due to its importance, we characterize the structure of sulfanilamide and its hydrated cluster in the isolation conditions of a supersonic expansion. To obtain its structure we use Fourier transform microwave techniques assisted by laser ablation. A single conformer of the bare molecule, stabilized by an N-H•••O=S intramolecular interaction of the sulfonyl group, has been detected. The orientation of the anilinic NH<sub>2</sub> group is unambiguously assigned thanks to the rotational constants, selection rules, and the hyperfine structure. The single conformer of the sulfanilamide-water cluster observed adopts a structure in which the stabilizing is arise from three hydrogen bonds between water and sulfanilamide. The sulfanilamide-water cluster shows that microsolvation alters the conformational preference forcing sulfanilamide to switch from an eclipsed configuration of the monomer to a staggered disposition in the hydrated cluster. Because the docking process is controlled by the difference in Gibbs free energy between the ligands solvated by the extracellular medium and the ligand interacting with the receptor's active site, we made a calculation of sulfamilamide with the

dihydropteroate synthase receptor using the solvent model VSGB 2.0. The results are in good agreement with our experimental data.

## 2. INTRODUCCIÓN

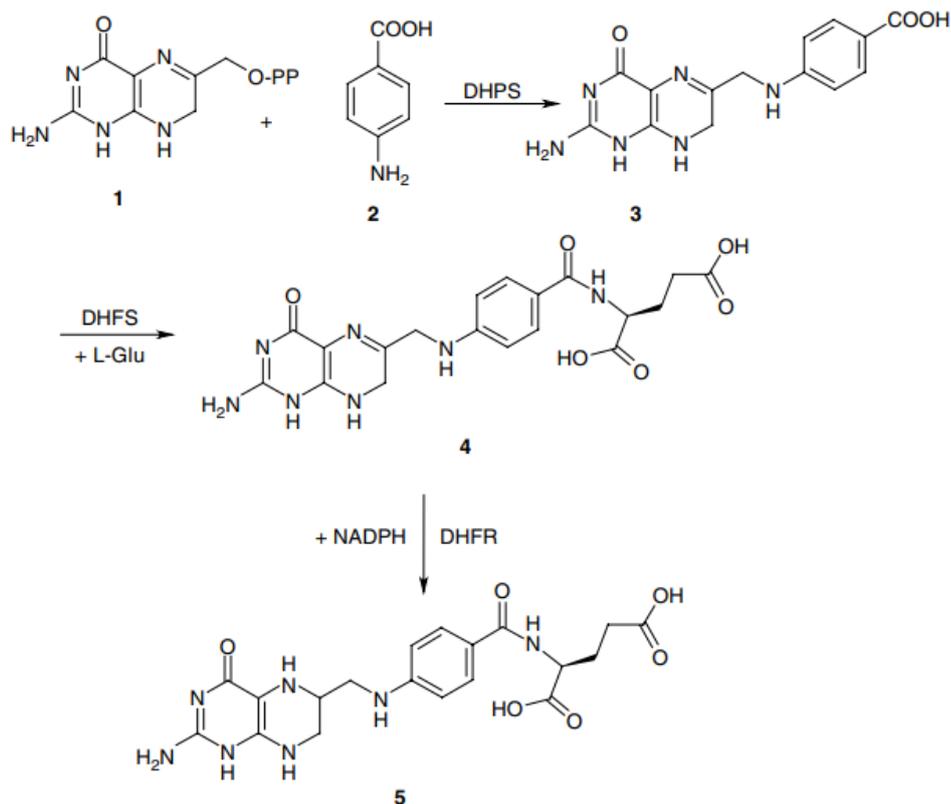
### 2.1. Sulfanilamida

La sulfanilamida (SA, 4-aminobencenosulfonamida), cuya estructura se muestra en el Esquema 1, es una molécula sintética descubierta en 1908.<sup>1</sup> En la década de 1930 se demostró que la sulfanilamida presentaba una actividad antibacteriana<sup>2</sup> y, desde entonces, ha sido empleada como agente quimioterapéutico antimicrobiano en el ámbito clínico y veterinario.<sup>3</sup> Gracias a este descubrimiento a Gerhard Domagk se le otorgó el Premio Nobel.



**Esquema 1.** Izquierda: estructura química de la sulfanilamida. Derecha: estructura química del ácido para-aminobenzoico (PABA).

Estudios posteriores<sup>4-7</sup> concluyeron que la gran semejanza estructural y electrónica de la sulfanilamida con el ácido para-aminobenzoico (PABA) es lo que confiere su comportamiento antibacteriano. Como puede observarse en el esquema 1, la diferencia entre estas dos moléculas reside en el cambio del grupo  $-COOH$  de la PABA por el grupo  $-SO_2NH_2$ , uno de sus bioisómeros, en la sulfanilamida. Ambas moléculas compiten por el centro activo de la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS) previniendo la síntesis del ácido fólico (vitamina B9), esencial en múltiples reacciones de transferencia de carbono, como por ejemplo en la síntesis de aminoácidos (metionina e histidina), pirimidinas (timidina), purinas (adenina), o formil-tRNA entre otros. Un ejemplo se muestra en el esquema 2, donde se representa la síntesis del ácido fólico. Debido a que la función enzimática de la DHPS es de suma importancia en los organismos procariontes y eucariotes inferiores, ya que no son capaces de captar folato del medio ni de transportarlo, su inhibición provocaría la muerte celular. En cambio, en eucariotes superiores, como los mamíferos, esta enzima no está presente. Por tanto, su acción antimicrobiana es ideal para uso clínico y veterinario al matar bacterias sin afectar a los humanos.



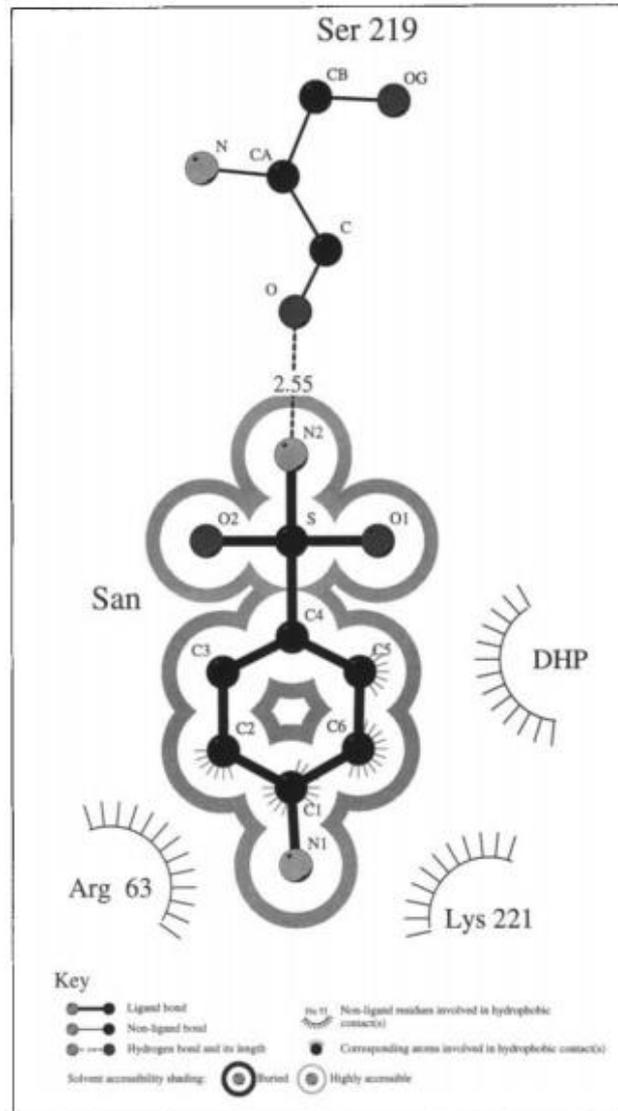
**Esquema 2.** Biosíntesis del ácido tetrahidrofólico (forma reducida y activa del ácido fólico). Imagen recogida de la referencia[8].

Adicionalmente, la sulfanilamida también presenta actividad inhibitoria frente a la familia de enzimas anhidrasa carbónica (CA), la cual es incluso más potente que en otras sulfonamidas.<sup>9</sup> La anhidrasa carbónica se encarga de catalizar la interconversión entre el dióxido de carbono y el agua en los iones disociados del ácido carbónico, permitiendo mantener el balance ácido-base en la sangre y en otros tejidos, además de ayudar en el transporte del CO<sub>2</sub> fuera de los tejidos.<sup>10</sup> La inhibición de este conjunto de enzimas tiene utilidad clínica como agentes de antiglaucoma, diuréticos, antiepilépticos, en el manejo del mal de montaña, úlceras gástricas y duodenales, hipertensión intracraneal idiopática, trastornos neurológicos u osteoporosis.<sup>11-15</sup>

## 2.2. Relación estructura-propiedad: sulfanilamida y su unión al centro activo

Como se ha mencionado en el punto anterior, la sulfanilamida es una molécula muy empleada en la actualidad. Pero, ¿cuál es el motivo por el cual ejerce sus propiedades? ¿por qué actúa como antibiótico? como se puede apreciar en el Esquema 1 la sulfanilamida tiene dos grupos funcionales capaces de establecer enlaces de hidrogeno, tanto dadores como aceptores, es decir, es un bioisómero<sup>16</sup> del carboxilo. Estudios cristalográficos muestran que la capacidad donadora y aceptora de la sulfanilamida es lo que le permite unirse al centro activo de la DHPS,

donde el NH<sub>2</sub> de la sulfonamida forma un enlace de hidrogeno con el carbonilo de la serina 219 (ser219), mientras que uno de sus oxígenos acepta un enlace de hidrogeno entre el grupo guanina del residuo arginina 63 (arg63). La Figura 1 muestra la unión entre la sulfanilamida y el centro activo de la DHPS propuestos por los estudios cristalográficos.<sup>7</sup>

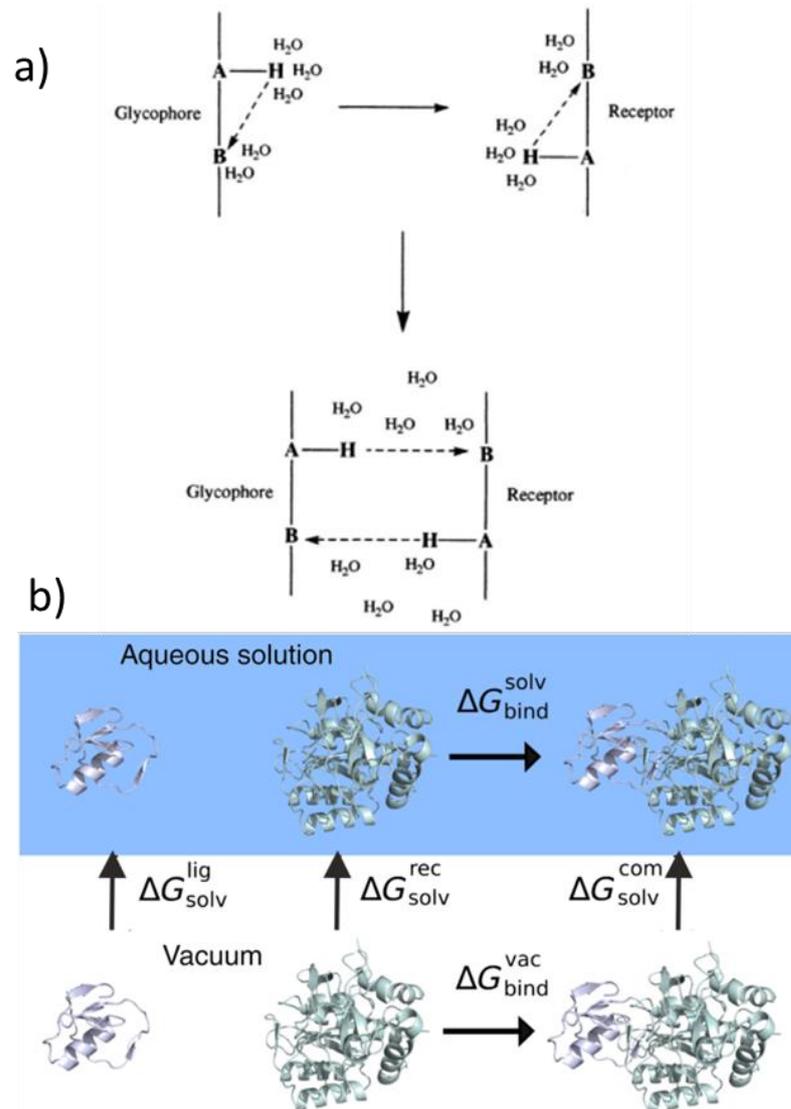


**Figura 1.** Interacciones intermoleculares entre la sulfanilamida y la DHPS de la E.coli. Imagen recogida de la referencia [7].

### 2.3. Importancia de la solvatación

Por otro lado, hay que tener en cuenta que la sulfanilamida no llega al receptor “por arte de magia”. El ambiente donde actúa la sulfanilamida es el biológico, encontrándose a *pH* fisiológico en su forma neutra.<sup>17</sup> Así, el proceso de unión entre el receptor y el ligando está controlado por la diferencia en la energía libre de Gibbs entre los ligandos que se hayan inicialmente solvatados por el medio extracelular y el ligando interaccionando con el sitio activo del receptor. Por lo tanto, el agua tiene

un papel importante como componente activo por su gran flexibilidad para formar enlaces de hidrogeno. La Figura 2 muestra dos ejemplos de la importancia de la solvatación tanto para los ligandos como para las proteínas. Esto implica que la interacción de las biomoléculas con el agua pueda afectar en la estructura, dinámica y función de la sulfanilamida, como sucede en otras moléculas en los equilibrios conformacionales<sup>18</sup> o tautomericos.<sup>19</sup> Por lo tanto, se necesita un conocimiento profundo de las interacciones, no solo dentro de la cavidad, sino también la comprensión del proceso de microsolvatación para comprender el proceso de acoplamiento.



**Figura 2.** a) Importancia de la solvatación en procesos biológicos tales como el dulzor (recopilado de la referencia [20]). b) Variación de la energía libre de Gibbs durante el acoplamiento molecular ligando-receptor.

## *2.4. Diseño de fármacos en la actualidad: Acoplamiento Molecular*

Una forma de dilucidar las interacciones dentro de la cavidad del centro activo es mediante un proceso llamado acoplamiento molecular (Molecular Docking). Consiste en un modelado computacional basado en la estructura que simula las interacciones moleculares entre los receptores y los ligandos. Esto facilita la comprensión y predicción de la orientación de unión y afinidad de ambas moléculas cuando interactúan entre sí para formar un complejo estable, es decir, en el proceso de reconocimiento molecular. La información obtenida de la orientación preferente de las moléculas unidas se puede emplear para predecir el perfil de energía (como la energía libre de unión), la fuerza y la estabilidad (como la afinidad de unión y la constante de unión) de los complejos.<sup>21,22</sup>

Hoy en día, el acoplamiento molecular se utiliza a menudo para pronosticar la orientación de unión de moléculas pequeñas (candidatos a fármacos) a su objetivo biomolecular (como pueden ser las proteínas, carbohidratos, o ácidos nucleicos entre otros) con el objetivo de determinar sus parámetros de unión. Esto establece datos para el diseño racional de fármacos (desarrollo de fármacos basado en la estructura) de nuevos agentes con mejor eficacia y mayor especificidad.<sup>23</sup> Por ello, resulta ser una herramienta de gran utilidad al demostrar la viabilidad de varios procesos, si se lleva a cabo antes de la parte experimental de cualquier investigación, pudiendo predecir la activación o inhibición de una enzima. Este tipo de información puede proporcionar una materia prima para el diseño racional de medicamentos.<sup>24-</sup>

## 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### 3.1. Justificación

Todas las propiedades y usos biológicos de la sulfanilamida descritos arriba la hacen una molécula interesante de estudio. A causa de que las propiedades de una molécula están directamente relacionadas con su estructura, por ende, determinar la disposición espacial de los átomos, los principales grupos funcionales, así como comprender las fuerzas intramoleculares es un paso clave. Teniendo estos factores en cuenta, determinar la estructura tridimensional de la molécula de forma aislada es obligatorio para comprender las principales interacciones intramoleculares que experimenta la molécula en ausencia de otras interacciones externas que pudiesen alterar la preferencia conformacional. Este paso es importante ya que puede brindar información adicional e importante para comprender el proceso de unión al centro activo. Adicionalmente, al contener un átomo de azufre capaz de adoptar un amplio número de estructuras de valencia, influye en las interacciones intra e intermoleculares, así como en las preferencias conformacionales, tal como se observa en biomoléculas y drogas sintéticas.<sup>27-29</sup>

Debido a la relevancia de la sulfanilamida, se han llevado a cabo numerosos estudios para determinar su estructura tanto en fases condensadas como en fase gas. En fase condensada, se observaron por difracción de rayos X cuatro polimorfos que difieren entre sí en la torsión de grupo sulfonamida<sup>30-35</sup>. Mediante las técnicas de FTIR y RMN se encontró que la conformación eclipsada es la que se haya cuando el DMSO es el disolvente<sup>36,37</sup>. En investigaciones llevadas en fase gas mediante espectroscopia FTIR por aislamiento por matrices de Ar y Xe<sup>38</sup>, así como los estudios realizados mediante espectroscopia UV e IR<sup>39</sup>, se encontró una única conformación. Desafortunadamente, las cuatro estructuras estables del monómero no muestran diferencias en el espectro de IR y la asignación se basa principalmente en las energías calculadas. Incluso, un estudio reciente de espectroscopía por rotación no deja clara la asignación entre las dos estructuras eclipsadas.<sup>40</sup> Asimismo, sus complejos de agua presentan un espectro de IR similar con la única diferencia de la variación de un solo modo de tensión en menos de  $30\text{ cm}^{-1}$ . Por lo tanto, actualmente no existe una determinación estructural precisa de la sulfanilamida ni del complejo hidratado.

Con este fin, el grupo de espectroscopía molecular (GEM) ha desarrollado técnicas que permiten la transferencia de moléculas termolábiles que se encuentran en fase sólida a fase gas. De esta forma y en combinación con la expansión supersónica, es posible observar los conformeros más estables en el espectro obtenido mediante espectroscopía de rotación, así como su abundancia, para poder determinar su estructura.<sup>41</sup> A mayores permite medir el cuadrupolo nuclear, una propiedad que facilita la determinación<sup>42</sup> y revelar los sutiles cambios de polarización que ocurre tras una alteración en el entorno del núcleo activo. Así, implementando la ablación laser como introducción de muestra al presentar la sulfanilamida un punto de fusión de  $165\text{ }^{\circ}\text{C}$  y la expansión supersónica que confiere el entorno de aislamiento<sup>43</sup> permitirá el análisis e identificación conformacional del

monómero. Al igual que se ha realizado esta misma estrategia en moléculas relevantes estudiadas en el grupo GEM.<sup>44-46</sup>

Por otro lado, tal y como se ha mencionado en la introducción, es de suma importancia estudiar el rol que produce la solvatación dentro de las propiedades de la sulfanilamida. Por ello, sería interesante observar los efectos que causaría añadir moléculas de agua y ver las interacciones preferentes con la sulfanilamida al incorporarse dentro de su estructura. Esto ofrecería una información inicial del comportamiento en disolución. Afortunadamente, las expansiones supersónicas proporcionan un entorno adecuado para estudiar los procesos de microsolvatación. Esto nos permitirá usar la misma metodología tanto para el monómero como para el complejo con agua.

### ***3.2. Objetivos***

El objetivo principal de este trabajo es realizar un estudio rotacional de la sulfanilamida. Para ello, se realizarán dos procedimientos: por un lado, se realizará un estudio computacional que nos permitirá obtener los confórmeros más relevantes, así como obtener sus parámetros espectroscópicos de interés; por otro lado, se registrará el espectro rotacional de la sulfanilamida. Mediante la simbiosis de estas dos vertientes, se dilucidarán las disposiciones que adopta la molécula en un entorno libre de interacciones y se determinarán cuáles serán sus confórmeros más estables. Esto nos dará una información inicial de la molécula, unas pistas, para entender su afinidad por el receptor.

Seguidamente, se empleará la misma estrategia para el complejo sulfanilamida-agua que sirva como base al entendimiento del medio acuoso de la sulfanilamida. De esta manera se emula el ambiente en el cual se encontrará la molécula en el medio biológico, comprendiendo que interacciones intermoleculares experimenta con el disolvente y como la afectan en sus propiedades y estructura. Esto podría permitir una evaluación de las principales fuerzas que impulsan una molécula hacia un receptor en una fase condensada donde el fármaco tiene su actividad.

Por último, el trabajo se completará con un estudio de acoplamiento molecular de la sulfanilamida con el centro activo empleando diferentes modelos, donde se contemplen las interacciones con el disolvente y en ausencia de este. Gracias a ellos nos propiciara un mejor conocimiento del proceso de interacción y ajuste con la enzima. Por otro lado, nos permitirá validar los modelos de mecánica molecular empleados en este tipo de estudios.

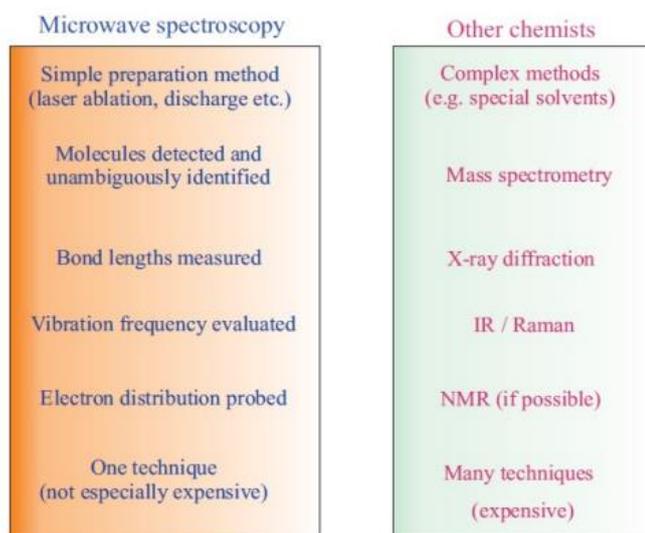
## 4. FUNDAMENTOS

### 4.1. Espectroscopia de rotación

El principal objetivo de la espectroscopia molecular es proporcionar una detallada caracterización de las moléculas y complejos moleculares con sus respectivas propiedades estructurales y dinámicas. La espectroscopia de rotación es considerada dentro de la química-física como una de las técnicas espectroscópicas más poderosas para la determinación estructural. Esto es debido a que las constantes de rotación, junto a las reglas de selección, ofrecen una información estructural muy precisa.

Por estas razones, la espectroscopia de rotación es una herramienta de gran utilidad con un amplio rango de aplicaciones tal y como se muestra en la Figura 3. La principal de cara a este trabajo es la determinación estructural precisa, que permite la identificación inequívoca entre distintas especies químicas y conformacional. Debido a la relación estructura-propiedad, este nivel de detalle es muy importante. A consecuencia de que los rangos de observación de espectros de rotación puros se encuentran en el intervalo de frecuencias desde 1GHz a 1THz (desde microondas hasta milimétricas)<sup>47</sup>, también permite en colaboración con los astrofísicos, la exploración de la composición química del medio interestelar

Los únicos requerimientos que se tiene que cumplir para aplicar esta técnica es que las moléculas se deben encontrar en fase gas y presentar un momento dipolar eléctrico permanente.



**Figura 3.** Utilidad de la espectroscopia de microondas. Imagen recogida de la referencia [48].

#### 4.1.1. Modelo del rotor rígido

La espectroscopia de rotación se fundamenta en la interacción de la radiación electromagnética de microondas con los niveles de energía rotacionales de una molécula. Entonces, para describir el espectro de rotación es necesaria la ayuda de

la mecánica cuántica para formular un modelo matemático a partir del cual se puedan obtener soluciones para los niveles de energía cuantizados. El sistema de rotor rígido proporciona un buen punto de partida para una descripción detallada de la molécula en rotación. Por lo tanto, una primera aproximación para describir los estados propios de rotación de una molécula rígida que gira libremente se puede obtener resolviendo la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo con el hamiltoniano de rotor rígido que se muestra a continuación.

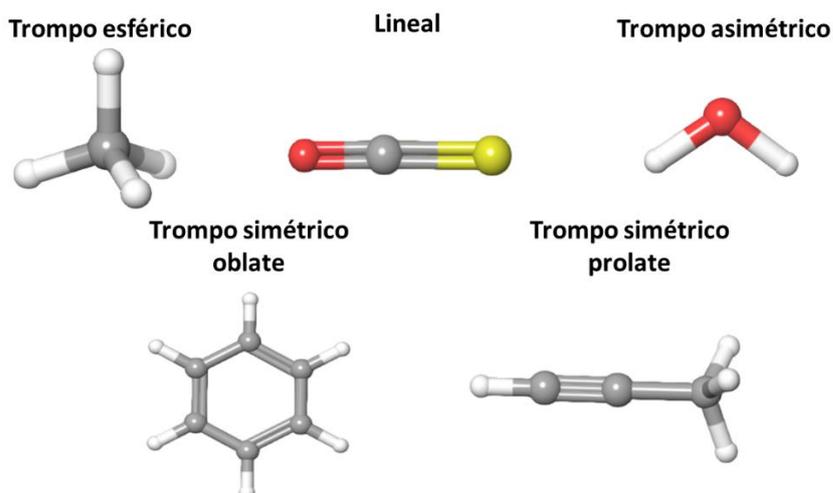
$$H_{rot} = A\hat{J}_a^2 + B\hat{J}_b^2 + C\hat{J}_c^2$$

donde  $\hat{J}_a^2$ ,  $\hat{J}_b^2$  y  $\hat{J}_c^2$  son los operadores para la cantidad de movimiento sobre los ejes principales y  $A$ ,  $B$  y  $C$  son las constantes de rotación definidas como:

$$A = \frac{h}{8\pi^2 I_A}; B = \frac{h}{8\pi^2 I_B}; C = \frac{h}{8\pi^2 I_C}$$

siendo  $I_A$ ,  $I_B$  y  $I_C$  los momentos de inercia en los tres ejes principales de inercia de la molécula. Se define por convenio que  $I_A \leq I_B \leq I_C$ .

Los valores de los principales momentos de inercia y, por tanto, los de las constantes de rotación dependen únicamente de la geometría molecular (longitud de enlace y ángulo de enlace) y de las masas atómicas. Entonces, dependiendo de los valores de los momentos de inercia en los ejes principales de inercia podemos clasificar a las moléculas dentro los cuatro grupos reflejados en la Figura 4:



**Figura 4.** Clasificación de las moléculas según sus momentos de inercia.

*Trompos esféricos:* los tres momentos de inercia son iguales,  $I_A=I_B=I_C$ . Por ejemplo, CH<sub>4</sub> o SF<sub>6</sub>. En este caso no es posible su estudio por esta técnica puesto que el momento dipolar permanente es nulo al tener un centro de inversión.

*Moléculas lineales:* en este caso  $I_A=0$  y  $I_B=I_C$  como el OCS. Para estos sistemas el valor propio  $F(J)$  que se obtiene tras resolver la ecuación de Schrödinger es:

$$F(J) = \frac{h^2}{8\pi^2 I} J(J + 1) = BJ(J + 1)$$

donde  $B$  la constante de rotación y  $J$  es número cuántico de rotación ( $J=0,1,2\dots$ ). Estos niveles suelen degenerar en la proyección del momento angular sobre los ejes

fijos en el espacio (número cuántico M). Sobre esta base los espectros de rotación se observarían transiciones distanciadas  $2B$ .

*Trompos simétricos:* para moléculas las cuales un momento de inercia es único y otros dos son iguales entre sí. Se pueden distinguir entre tropo simétrico *prolate* ( $\text{CH}_3\text{C}\equiv\text{CH}$ ), cuando  $I_A < I_B = I_C$ , u *oblate* (benceno), donde  $I_A = I_B < I_C$ . Para estos sistemas sus niveles de rotación se encuentran degenerados  $2J+1$ , debido a la proyección del vector momento angular de rotación sobre el eje de simetría (eje  $c$ ). Entonces, un segundo número cuántico  $K$  aparece para etiquetar la degeneración y toma valores  $K=0, 1, 2, \dots, J$ . Además, la resolución de valores propios se expresa como:

$$F(J, K) = BJ(J + 1) + (A - B)K^2(\textit{prolate})$$

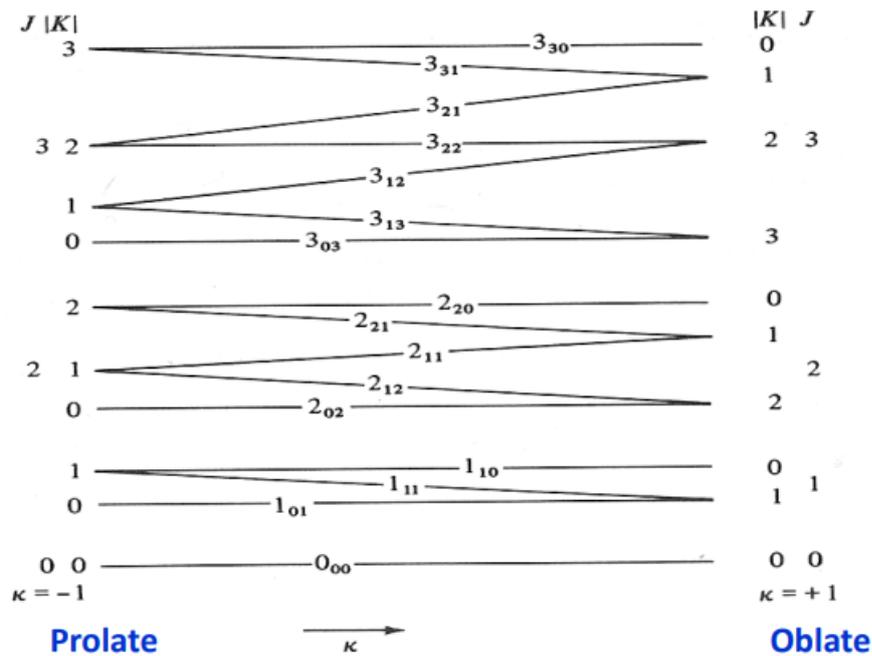
$$F(J, K) = BJ(J + 1) + (C - B)K^2(\textit{oblate})$$

De tal forma se esperan ver progresiones de  $J' \leftarrow J''$  distanciadas  $2B$ .

*Trompos asimétricos:* la mayoría de moléculas pertenecen a esta clasificación y son las más comúnmente estudiadas en espectroscopia de rotación y todos sus momentos de inercia son diferentes entre si,  $I_A < I_B < I_C$ . La molécula de agua es un ejemplo de este tipo de trompos. Este tipo de moléculas presentan una complejidad considerable en su espectro rotacional puro, puesto que el Hamiltoniano para estos sistemas no se puede resolver analíticamente, debido a que no hay una componente interna del momento angular que sea una constante del movimiento, por lo que esta proyección no conmuta con el hamiltoniano. Consecuentemente, un nivel de rotación dado ya no se etiqueta solo con los números cuánticos  $J$  y  $K$  como en los trompos simétricos, sino que implica el uso de un segundo número cuántico  $K$ . Entonces, un nivel de rotación se denota como  $J_{K-1 K_1}$ , donde  $K_{-1}$  y  $K_1$  corresponden a los casos límites trompo simétrico *prolate* y *oblate* respectivamente, con los que se correlaciona el nivel. Podemos observar en la Figura 5 el diagrama de correlación, que muestra como casos límite los niveles de rotación de los trompos simétricos *prolate* y *oblate*. En el lado izquierdo del diagrama de correlación tenemos el límite *prolate*, con la energía rotacional aumentando con  $J$  y  $K$ . En el lado derecho tenemos el límite achatado, en el cual la energía rotacional disminuye con  $K$ . El ordenamiento aproximado de los niveles asimétricos del rotor puede obtenerse entonces uniendo los niveles de los casos límite *prolate* y *oblate*.

Podemos determinar el carácter *prolate* y *oblate* de un trompo asimétrico mediante el parámetro de asimetría de Ray. Si el grado de asimetrías es  $\kappa = -1$  indica que es *prolate* y  $\kappa = 1$  *oblate*. La situación de mayor asimetría es cuando  $\kappa = 0$ . Los niveles de energía de los rotores asimétricos ( $\kappa \approx -1$  o  $\kappa \approx +1$ ) difieren de los trompos simétricos limitantes esencialmente en que los niveles correspondientes a  $-\kappa + \kappa$ , que siempre son degenerados en el rotor simétrico, están separados en el rotor asimétrico.<sup>49</sup>

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



**Figura 5.** Diagrama de correlación para los trompos asimétricos.

Para observar una transición rotacional, tiene que cumplirse la condición de Plank-Bohr. Además, se necesita que la integral de momento de transición sea no nula. Esta integral proporciona la probabilidad (relacionada directamente con la intensidad) de una transición entre un estado de partida ( $\Psi''$ ) y un estado de llegada ( $\Psi'$ ) y puede ser calculada como sigue:

$$\int \Psi' \mu \Psi'' \neq 0$$

A partir de ella se concluyen las reglas de selección que son las características que debe presentar una transición para que sea permitida (se produzca) o prohibida (no ocurren). En el caso de la espectroscopia de rotación la condición más importante es que tengan momento dipolar permanente distinto de 0. Los trompos asimétricos pueden tener valores del momento dipolar distintos de cero para los tres ejes principales de inercia. Siendo importante porque la rotación alrededor de un determinado eje de inercia tiene unos requerimientos en cuanto a la simetría de las funciones de onda de los estados fundamental y excitado diferentes a las de cualquiera de los otros dos ejes. Consecuentemente, se debe estudiar de forma independiente las rotaciones alrededor de los tres ejes de inercia, dándose transiciones tipo *a*, tipo *b* o tipo *c*, en función del eje de inercia alrededor del cual se dé la rotación.

Otra regla de selección tiene que ver con la variación del número cuántico  $J$ , que tiene que ser  $\Delta J = 0, \pm 1$ . En el caso que  $\Delta J = 0$  implicaría que  $K-1$  y  $K+1$  son los que deben cambiar, sino no se produciría la transición. En cambio, si  $\Delta J = \pm 1$ , tanto  $K-1$  como  $K+1$  pueden variar o no. Dependiendo de la  $\Delta J$  las transiciones se clasifican dentro de una rama de transiciones:  $\Delta J = -1$  corresponden a la rama *P*,  $\Delta J = 0$  a la rama *Q* y a la rama *R* cuando  $\Delta J = +1$ . También hay una restricción frente a los cambios de  $K-1$  y  $K+1$  dependiendo del tipo de transición. En las transiciones de tipo *a*  $K-1$  no varía, en

cambio, para las transiciones de tipo *c* el que no se modifica es  $K_1$  y si cambian de forma simultánea es para los de tipo *b*. Todas estas reglas de selección se encuentran recogidas en la Tabla 1.

Transición	Regla selección
Rama P	$\Delta J = -1$
Rama Q	$\Delta J = 0$
Rama R	$\Delta J = +1$

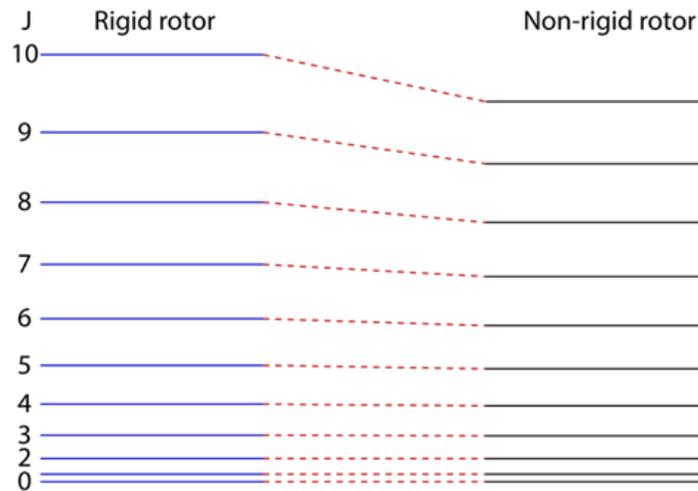
Transición	Momento dipolar	$\Delta K_1$	$\Delta K_2$
Tipo a	$\mu_a \neq 0$	$0, \pm 2, \dots$	$\pm 1, \pm 3, \dots$
Tipo b	$\mu_b \neq 0$	$\pm 1, \pm 3, \dots$	$\pm 1, \pm 3, \dots$
Tipo c	$\mu_c \neq 0$	$\pm 1, \pm 3, \dots$	$0, \pm 2, \dots$

**Tabla 1.** Reglas de selección para trompos asimétricos.

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

#### 4.1.2. Distorsión centrífuga

La consideración de que las moléculas se comportan como un rotor rígido es una aproximación bastante útil en la interpretación de espectros de rotación. No obstante, este tratamiento es incompleto puesto que la estructura molecular no se encuentra absolutamente rígida, sino que es flexible a causa de las vibraciones moleculares y por la fuerza centrífuga ejercida por la rotación. En consecuencia, las distancias y ángulos de enlace se ven alterados. Siendo esta la razón que al incrementar la excitación rotacional la molécula se estire, aumentando a su vez la distorsión centrífuga y resultando en un descenso en las constantes rotacionales, como se puede apreciar en la Figura 6.



**Figura 6.** Comparación de los niveles de energía entre un rotor rígido y uno no rígido. A consecuencia de la distorsión centrífuga los niveles rotacionales de J altos se distancian en mayor medida entre ambos modelos.

A pesar de que se debe considerar la influencia de la distorsión centrífuga para explicar las frecuencias de las transiciones de rotación, este efecto representa una pequeña fracción de la energía rotacional (<100KHz para distorsión y >100 MHz para las constantes de rotación) explicada en el rotor rígido. Por esta razón en ocasiones es tratada como una perturbación del Hamiltoniano del rotor rígido ( $H_r$ ), siendo el más común de estos Hamiltonianos el denominado como Hamiltoniano reducido de Watson<sup>50,51</sup>.

$$H = H_r + H_d$$

$$H_d = \frac{\hbar^4}{4} \sum \tau_{\alpha\beta\gamma\delta} \hat{J}_\alpha \hat{J}_\beta \hat{J}_\gamma \hat{J}_\delta$$

donde  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$  en el sumatorio puede adoptar cualquier valor de las coordenadas  $a, b$  o  $c$  en los principales ejes del sistema. Debido a las propiedades conmutativas y de simetría el número de términos se reduce a seis, donde 5 las que se pueden determinar experimentalmente. Para este Hamiltoniano reducido hay dos propuestas para trompos asimétricos, el asimétrico (A) y el simétrico (S).

En el caso del Hamiltoniano reducido de Watson A:

$$H_d^{(A)} = -\Delta_J \hat{J}^4 - \Delta_{JK} \hat{J}^2 \hat{J}_a^2 - \Delta_K \hat{J}_a^4 - 2\delta_J \hat{J}^2 (\hat{J}_b^2 - \hat{J}_c^2) - \delta_K [\hat{J}_a^2 (\hat{J}_b^2 - \hat{J}_c^2) + (\hat{J}_b^2 - \hat{J}_c^2) \hat{J}_a^2]$$

donde  $\Delta_J, \Delta_{JK}, \Delta_K, \delta_J$  y  $\delta_k$  son las constantes de distorsión centrífuga cuárticas. Esta expresión es principalmente utilizada para rotores asimétricos. No obstante, presenta problemas cuando se asemejan a sistemas muy *prolates* u *oblates*, a consecuencia de que las constantes de rotación y de distorsión centrífuga se encuentran muy correlacionadas. Debido a que  $\delta_k$  depende de  $B-C$  en el denominador, lo que hace que obtenga valores muy elevados. Por esta razón, el Hamiltoniano reducido de Watson S ofrece mejores resultados.

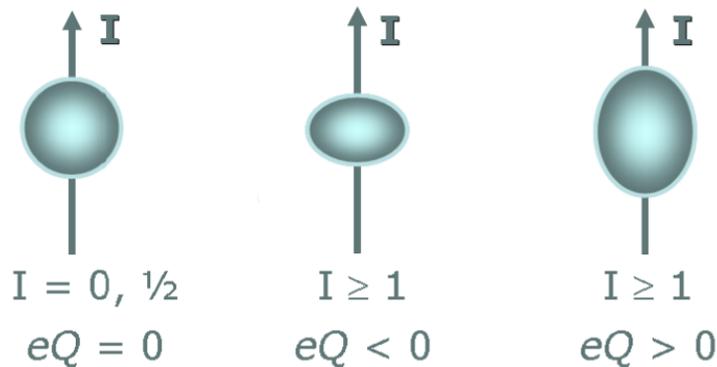
$$H_d^{(S)} = -D_J \hat{J}^4 - D_{JK} \hat{J}^2 \hat{J}_a^2 - D_K \hat{J}_a^4 + d_1 \hat{J}^2 (\hat{J}_+^2 + \hat{J}_-^2) + d_2 (\hat{J}_+^4 + \hat{J}_-^4)$$

siendo  $J_{\pm} = (J_b \pm iJ_c)$  y donde  $D_J, D_{JK}, D_K, d_1$  y  $d_2$  son las constantes cuárticas de distorsión centrífuga.

Al realiza un ajuste por mínimos cuadrados de las frecuencias observadas para obtener las constantes de distorsión rotacional y centrífuga. En particular, las diferencias entre las frecuencias observadas y las frecuencias calculadas del rotor rígido se toman como efecto de distorsión. Las transiciones rotacionales con  $J$  y  $K$  altos mejoran los valores de las constantes de orden superior, porque solo los niveles de energía rotacional con números cuánticos altos dependen de las constantes centrífugas de orden superior.

#### 4.1.3. Acoplamiento de cuadrupolo nuclear

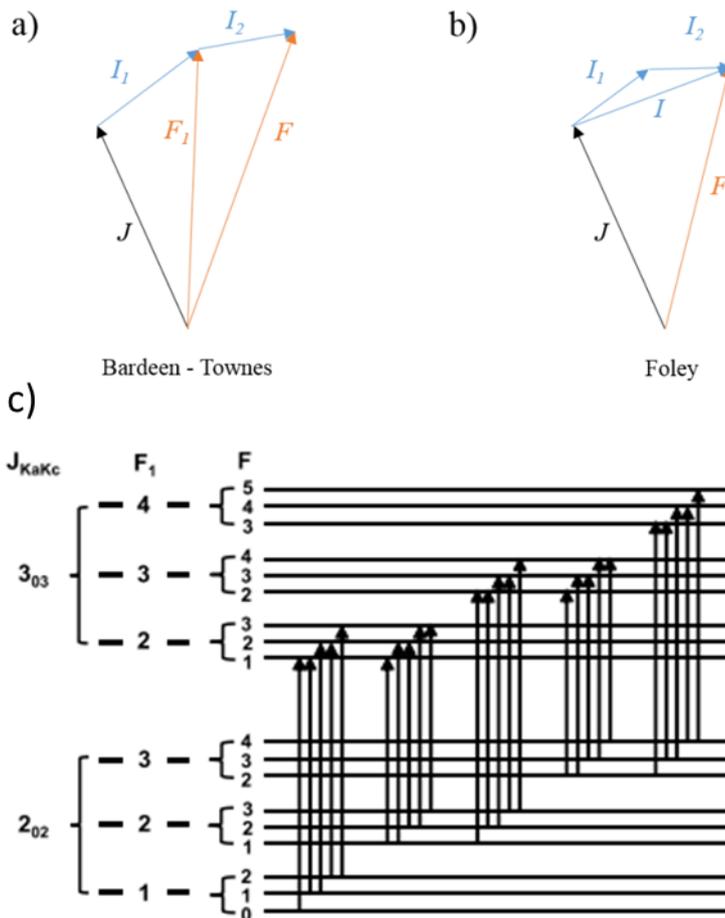
En los espectros de rotación se presenta una estructura hiperfina asociada a la interacción entre la distribución de carga no esférica del núcleo con el gradiente de campo eléctrico producido por la carga molecular en el núcleo. Este fenómeno origina el acoplamiento del momento angular de espín nuclear ( $I$ ) con el momento angular de rotación ( $J$ ) dando como resultado la división del nivel de energía rotacional, descrito por el nuevo número cuántico de momento angular total  $F = J + I, J + I - 1, \dots, 0, \dots, |J - I|$ . Sin embargo, solo los núcleos con número cuántico de spin ( $I$ ) mayor a  $\frac{1}{2}$  son los que presentaran esta cualidad, como se ve reflejado en la Figura 7.<sup>52</sup>



**Figura 7.** Representación de las distribuciones de carga nuclear.

Una transición de rotación se desdoblará en tantas componentes dependiendo del valor del momento de spin nuclear del núcleo que este generando el desdoblamiento y del número de núcleos con cuadrupolo nuclear, a mayor número más complejo es el análisis. Asimismo, la magnitud de este desdoblamiento, es decir, la distancia entre las diferentes componentes en las cuales se desdobra cada una de las líneas originales, dependerá del momento de cuadrupolo nuclear y del gradiente del campo eléctrico. En el caso de un único núcleo activo si el número cuántico  $J$  de un nivel de rotación es mayor que  $I$ , se producen  $2I+1$  niveles; pero si  $J$  es menor que  $I$ , resultan  $2J+1$  niveles.<sup>53</sup> Si hay dos núcleos con cuadrupolo tenemos dos posibles esquemas de acoplamiento que elegir dependiendo de la amplitud del acoplamiento<sup>54-56</sup> como se ilustra en la Figura 8. En el caso que el acoplamiento de un núcleo sea mucho mayor que el otro se aplicara el esquema de Bardeen-Townes,

donde el momento de spin ( $I_1$ ) de primer núcleo se acopla con  $J$  resultando en  $F_1 = J + I_1, J + I_1 - 1, \dots, |J - I_1|$  y luego el momento de spin del segundo núcleo se acopla con  $F_1$  dando  $F = F_1 + I_2, F_1 + I_2 - 1, \dots, |F_1 - I_2|$ . Pero si el acoplamiento de ambos núcleos es similar se opta por aplicar el esquema de Foley donde ambos spines ( $I_1$  y  $I_2$ ) primeramente se acoplan para dar  $I = I_1 + I_2, I_1 + I_2 - 1, \dots, |I_1 - I_2|$  y este se acopla con  $J$ , obteniendo  $F = J + I, J + I - 1, \dots, |J - I|$ . Para estos sistemas de acoplamiento las reglas de selección son  $\Delta F = 0, \pm 1$ , teniendo en cuenta que para el del rotor rígido  $\Delta J = 0, \pm 1$  y condición de que no cambie el spin nuclear ( $\Delta I = 0$ ).



**Figura 8.** Esquemas de acoplamiento para sistemas con dos núcleos con cuadrupolo nuclear. a) Bardeen-Townes, b) Foley, c) Diagrama de energía de la estructura hiperfina que surge de dos espines nucleares  $I = 1$  para la transición rotacional  $3_{03}-2_{02}$ .

El Hamiltoniano rotacional de la molécula empleado para el análisis del espectro se compone por el Hamiltoniano del rotor rígido ( $H_r$ ) adicionando un término que tiene en consideración el cuadrupolo nuclear ( $H_q$ )

$$H = H_r + H_q$$

$$H_q = \frac{eQq_{ij}}{2J(2J - 1)I(2I - 1)} [3(JI)^2 + \frac{3}{2}IJ - I^2J^2]$$

Siendo  $eQ$  el momento de cuadrupolo nuclear  $q_{ij}(i,j=a,b,c)$ , un tensor que representa el gradiente de campo promedio en la dirección del eje en el que  $J$  tiene proyección máxima en el sistema de ejes cartesianos. Este coeficiente se relaciona con la constante de acoplamiento de cuadrupolo nuclear  $\chi_{ij} = eQq_{ij}$  que son los parámetros con los cuales se ajusta en el análisis de la estructura hiperfina y de la magnitud de desdoblamiento. Este tensor presenta la forma siguiente en los principales ejes de inercia:

$$\chi = \begin{pmatrix} \chi_{aa} & \chi_{ab} & \chi_{ac} \\ \chi_{ba} & \chi_{bb} & \chi_{bc} \\ \chi_{ca} & \chi_{cb} & \chi_{cc} \end{pmatrix}$$

Puesto que el  $^{14}\text{N}$  presenta un momento cuadrupolar bajo, las componentes no diagonales del tensor no son significativas en el análisis, por ende, solo son determinadas las componentes diagonales experimentalmente. Las componentes diagonales deben satisfacer que  $\chi_{aa} + \chi_{bb} + \chi_{cc} = 0$ . Esta condición indica que hay solamente dos elementos diagonales independientes, lo cuales pueden determinarse.

Las constantes de acoplamiento son muy sensibles al entorno electrónico en las proximidades del cuadrupolo y a la orientación de los ejes de inercia. Por esta razón, y a pesar de que supone una dificultad adicional en el análisis, las constantes de acoplamiento del cuadrupolo nuclear son una herramienta útil para la identificación inequívoca de diferentes especies químicas y conformeros con constantes de rotación similares.

#### ***4.2. Métodos computacionales***

Los cálculos computacionales son herramientas poderosas y necesarias en la espectroscopia rotacional y otros campos espectroscópicos. Son fundamentales en el análisis conformacional y estructural de los experimentos, proporcionándonos valiosa información sobre las propiedades estructurales y dinámica de las moléculas y complejos. Por lo tanto, nos permiten racionalizar, interpretar y predecir los resultados experimentales con una inversión razonable de tiempo.

En general, antes del registro de los espectros de microondas se realiza una búsqueda conformacional investigando las posibles configuraciones estables de la especie de estudio. Hay diversos métodos que permiten la optimización geométrica aplicando distintas aproximaciones, tal y como se muestra en la Tabla 2, donde se muestran diferentes metodologías. A partir de la estructura calculada es posible extraer información sobre la energía del sistema, frecuencias de vibración, superficies de energía potencial, parámetros espectroscópicos u otra información relevante.

En este apartado se resumirán brevemente las propiedades de los métodos de cálculo empleados en el desarrollo de este trabajo.

Método	Fundamento	Rango de aplicación	Ventajas	Desventajas	Ejemplos
<b>Mecánica Molecular (MM)</b>	Potenciales de interacción	1-10 <sup>5</sup> átomos	Gran rapidez. Muy eficientes en fases condensadas	Aplicabilidad delimitada por el potencial MM seleccionado	AMBER, REBO, ReaxFF
<b>Ab Initio</b>	Ecuación de Schrödinger y Función de Onda	1-10 <sup>2</sup> átomos	Exactitud y precisión controlable	Lentos. Los métodos más avanzados son muy complicados de usar	HF, MP2, CCSD, CCSD(T)
<b>Teoría del Funcional de la Densidad (DFT)</b>	Teoremas de Kohn-Sham y Densidad Electrónica	1-10 <sup>3</sup> átomos	En general, más rápidos que <i>ab initio</i> pero su aplicabilidad es más limitada	Exceso de métodos DFT disponibles. No hay pautas para mejorar sistemáticamente los resultados	B3LYP, BLYP, PW91, PBE
<b>Semi-empíricos (SE)</b>	Ecuación de Schrödinger y Función de Onda o Teorema de Kohn-Sham y Densidad Electrónica	1-10 <sup>4</sup> átomos	Gran rapidez. Fáciles de usar. Bastante fiables en moléculas orgánicas	Errores no sistemáticos. Escasa fiabilidad en moléculas con metales y especies inestables	PM3, PM6, SCC-DFTB

**Tabla 2.** comparación de las distintas metodologías de cálculo.

#### 4.2.1. Mecánica molecular

Los métodos de cálculo de Mecánica Molecular (MM) describen al sistema de estudio mediante la mecánica clásica/newtoniana y, por ende, no se tiene en cuenta la energía electrónica ni efectos cuánticos. Trata a los átomos como esferas unidas por muelles (los enlaces). Esta metodología evalúa la energía mecánica involucrada en distorsionar la estructura molecular, cambiando longitudes de enlace, realizando torsiones, girando, etc, además de evaluar las fuerzas intermoleculares.

Para la utilización de estos cálculos se requiere de una estructura molecular inicial, además de un conjunto de datos iniciales, tales como los giros y torsiones, constantes de fuerza de los enlaces, etc. Esta información se encuentra recopilada en una base de datos dentro del programa empleado y es usada en la parametrización para modelar sus propiedades químicas. El conjunto de parámetros obtenidos empíricamente para describir las interacciones entre átomos y las funciones de potencial utilizadas forman el campo de fuerzas (FF, force field) en el que se basan este tipo de métodos. La selección de un campo de fuerza adecuado es el punto más importante en MM, ya que diferentes métodos producen resultados muy distintos. Los campos de fuerza experimentales utilizados en MM están diseñados para reproducir un conjunto particular de tipos atómicos o parámetros moleculares específicos. Algunos de los campos de fuerza típicos son MM+ (Molecular Mechanics, Allinger 1977), AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement, Weiner 1984), BIO+CHARM (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics, Karplus 1983), OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations, Jorgensen 1988) y MMFFs (Merck Molecular Force Field). Este último es el utilizado en este trabajo puesto que fue diseñado para moléculas orgánicas pequeñas y fármacos. El campo de fuerzas MMFFs incluye términos cruzados sin truncamiento, consiguiendo una mejor representación de los sistemas moleculares tanto de las energías como de las interacciones no enlazantes. Por lo tanto, es adecuado para estudiar moléculas en fase gaseosa y condensadas.<sup>57,58</sup>

La aplicación de estos métodos de cálculo presentan la ventaja del bajo coste computacional, lo que implica que es capaz de estudiar sistemas de un amplio número de átomos en poco tiempo. Debido a estas cualidades de la mecánica molecular es un punto de partida para hacer una búsqueda conformacional barriendo la superficie de energía potencial (PES). Obteniendo de esta manera una primera aproximación de las estructuras más probables en poco tiempo y dificultando la pérdida conformacional que se haría por intuición química. Sin embargo, la baja precisión de los resultados de MM no es un problema grave en este contexto, ya que todas las estructuras generadas en la búsqueda conformacional se reoptimizan posteriormente utilizando métodos de alto nivel.

#### 4.2.2. Métodos basados en la resolución de la función de onda

Al contrario que los cálculos de mecánica molecular, los métodos de cálculo *ab initio* emplean la mecánica cuántica para describir el sistema molecular, implicando que aportan una información más precisa del sistema. Se fundamentan en resolver la ecuación Schrödinger directamente, es decir, sin introducir ningún parámetro experimental, aplica únicamente las constantes universales y aproximaciones matemáticas. Por esta razón, estas metodologías de cálculo son bastantes costosas computacionalmente.

La primera aproximación es la aproximación de Born-Oppenheimer<sup>59</sup>, donde se asume que los núcleos no se mueven en relación con los electrones porque los electrones, al ser ligeros, se mueven mucho más rápido que los núcleos. Así, los núcleos se mueven por la acción del potencial creado por los electrones. Consecuentemente, se considera separar la contribución electrónica y nuclear en la función de onda. Posteriormente, se introduce la aproximación de Hartree-Fock (HF)<sup>60</sup>, donde se supone que los electrones se mueven independientemente unos de otros. Específicamente, la repulsión entre pares individuales de electrones se reemplaza por la repulsión entre un electrón dado y una nube de carga promedio de todos los demás electrones. Esta aproximación sobrestima la correlación electrón-electrón (repulsión); como resultado, la energía de HF es más alta que la energía real, no solo debido al principio de variación sino también a la sobreestimación de las interacciones cuando se trata más de un electrón simultáneamente. Por lo tanto, esta aproximación tiene problemas cuando se calculan sistemas donde las fuerzas dispersivas son las interacciones dominantes, como los complejos débilmente enlazados. Con el desarrollo del método HF, la teoría de perturbaciones de Møller-Plesset (MP)<sup>61</sup> (MP2, MP4, etc.) primero toma la correlación electrónica como la "perturbación" de la solución HF. MP2 suele ser el método más común para obtener resultados de alta precisión porque es suficiente y menos costoso en comparación con otras teorías de perturbaciones de alto orden (MP4, etc.).

#### 4.2.3. Teoría del Funcional de la Densidad (DFT)

En contraste con los métodos basados en la resolución de la función de onda, la Teoría Funcional de la Densidad (DFT) busca calcular la densidad electrónica. Esto hace que sean cálculos muchos más rápidos. Los cálculos DFT se basan en el Teorema

de Hohenberg-kohn<sup>62,63</sup>, que establece que la energía del estado fundamental de un sistema es un funcional de la densidad electrónica. Sin embargo, no proporciona una expresión para la energía, por ello, se aplican las ecuaciones de Kohn-Sham<sup>64,65</sup> para determinar la energía.

La mayoría de los DFT se centran en obtener una mejor definición y solución para la energía de correlación de intercambio. Para ello, se combinan parte del intercambio exacto de HF con el resto de los parámetros ab initio o empíricos en el cuarto término. El funcional de correlación de intercambio más popular es el B3LYP, que mejora muchas propiedades moleculares, como la longitud del enlace y las frecuencias vibratorias que no se describen bien en cálculos simples ab initio. Sin embargo, el funcional B3LYP tiene una limitación, ya que ignora por completo las interacciones de largo alcance, como las fuerzas de dispersión y las interacciones  $\pi$ - $\pi$ . Sin embargo, la correlación de electrones de largo alcance que se omite en estos funcionales también puede ser crucial.

Para solventar estos problemas y mejorar la precisión de los cálculos DFT se introdujo la corrección de dispersión funcional de la densidad (DFT-D)<sup>66</sup>, especialmente la corrección DFT-D3BJ<sup>67</sup> (dispersión de Grimme). Proporciona una mayor precisión, rango de aplicación y menor empirismo, que es crucial para calcular con precisión las constantes de rotación. Las principales modificaciones respecto de los métodos anteriores son los coeficientes de dispersión específicos para pares de átomos y radios de corte, ambos computados por primeros principios. La principal desventaja es que la corrección no es dependiente o no afecta a la estructura electrónica. Es adecuado para sistemas como complejos de Van der Waals e interacciones intramoleculares que suelen tener lugar en problemas conformacionales. También existe la implementación de la función de amortiguamiento Becke-Johnson (BJ)<sup>68</sup>, que no solo tiene un procedimiento de ajuste empírico más sofisticado, sino que también contiene más ingredientes físicos y hace que los resultados calculados se acerquen más a los valores experimentales. Este último mejora las interacciones no covalentes, efectos de dispersión intramoleculares, así como geometrías y energías de enlace de complejos. La ventaja de usar DFT-D3BJ es que puede lograr la precisión CCSD(T) de optimizar estructuras a bajo costo.

#### 4.2.4. Bases de calculo

Una base de cálculo es un conjunto de funciones que se utiliza para describir los orbitales atómicos, lo que permite aproximarse a las funciones de onda reales.

Las funciones gaussianas generalmente se utilizan para imitar los orbitales de tipo Slater (STO) debido a la simplicidad de los cálculos matemáticos.

La selección de un conjunto base adecuado es crucial. Por ejemplo, uno de los conjuntos básicos de valencia desdoblada de Pople<sup>69</sup>, 6-311++G(d,p), empleada para este trabajo. Una base de valencia desdoblada utiliza solo una función de base para cada orbital atómico (AO) central y una función de base más grande para los AO de valencia. Aquí, "6" denota los orbitales atómicos centrales, y una función básica está formada por seis funciones gaussianas; el "311" es la triple zeta de valencia, lo que

significa que los AO de valencia están descritos por tres orbitales, donde el primer orbital está formado por tres funciones gaussianas, y el segundo y el tercer orbital están formados por una función gaussiana. Las funciones de polarización se denotan con “\*” o “(d, p)”, donde la “d” añade funciones *d* para átomos pesados y el “p” funciones *p* para los átomos de hidrógeno, ayudando en una mejor descripción de los cambios en la densidad electrónica de un átomo en un entorno molecular. Las funciones difusas son funciones del mismo número cuántico angular que los orbitales de valencia, pero de menor exponente, permitiendo extender las regiones espaciales más alejadas de los núcleos. Se marcan con el signo +, donde el primero indica que se añaden funciones difusas para los átomos pesados (para el carbono se añaden funciones *s* y *p* de menor exponente) y el segundo añade una función difusa (*s*) para cada átomo de hidrógeno.

### *4.3. Técnicas espectroscópicas*

#### 4.3.1. Ablación laser

Uno de los requerimientos de la espectroscopia de rotación es que las moléculas de estudio se encuentren en fase gas. Esto es un problema para moléculas con puntos de fusión altos y baja volatilidad o frágiles térmicamente, ya los métodos convencionales de vaporización (calentamiento) no posibilitarían su estudio. Es el caso de moléculas tan relevantes como los aminoácidos o los azúcares, por nombrar algunos. Una solución consiste en utilizar la ablación laser (LA), la cual consiste en incidir un pulso laser de alta energía sobre una muestra sólida focalizado en una pequeña área, resultando que las moléculas absorban esa energía y se desprendan del material sin deteriorarse. El grupo de espectroscopia molecular (GEM) tiene una amplia experiencia en la utilización de esta técnica, demostrando que la aplicación de pulsos láser permite la vaporización de cualquier tipo de muestras sólidas. Esto ha posibilitado el estudio de un sin fin de moléculas como los aminoácidos<sup>70</sup>, bases nitrogenadas<sup>71</sup>, edulcorantes, neurotransmisores<sup>72</sup>, farmacos<sup>73</sup>, hormonas<sup>44</sup>, entre otras moléculas de interés biológico.

#### 4.3.2. Expansión supersónica

Una vez en fase gas, necesitamos un sistema de introducción de la muestra en el sistema experimental. Para ello emplearemos la técnica de la expansión supersónica o adiabática que confiere unas condiciones idóneas para estudios en fase gas<sup>74,75</sup>. Consiste en una cámara de estancamiento con un gas a alta presión, donde se encuentra la muestra, que a través de un orificio (nozzle) se conecta a una cámara de vacío que, al ser abierto, genera un flujo de masa hacia la cavidad. Este flujo provoca que las partículas del gas portador colisionen con las moléculas de la muestra y lleven la misma velocidad, transformando la energía electrónica, vibracional y rotacional en traslacional del gas portador. Esto provoca un enfriamiento de la muestra, lo cual aumenta la población de los niveles fundamentales e incrementa las intensidades de las transiciones, a la vez que simplifica los espectros. Por esta razón, el gas portador debe ser un gas inerte sin

grados de libertad rotacionales y vibracionales como los gases nobles. Otra de características de la expansión supersónica es la capacidad de otorgar un entorno libre de colisiones implicando que las especies dentro en la expansión no van a estar influenciados por interacciones intermoleculares con el entorno que alteren su estructura. Finalmente, la expansión supersónica permite colisiones a tres cuerpos, lo que permite la generación y caracterización de especies con interacciones intermoleculares de diferente naturaleza y entidad (complejos de van der Waals y con enlace de hidrógeno).

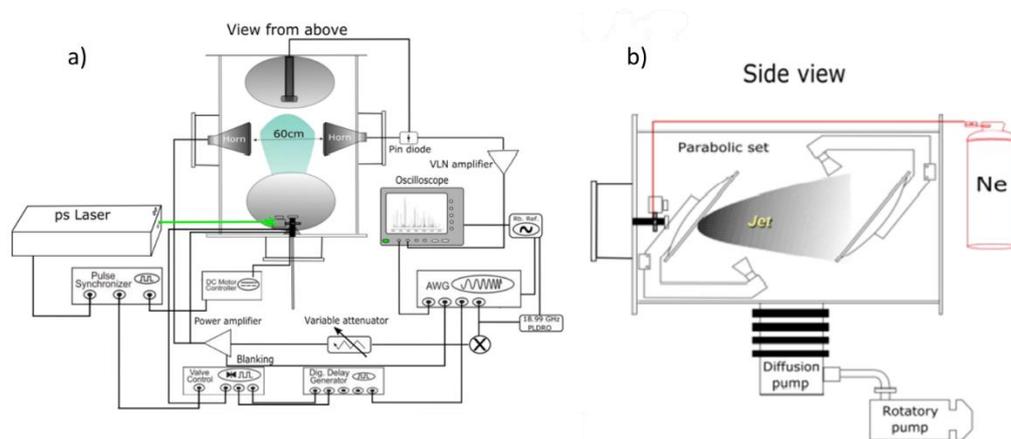
#### 4.3.3. CP-FTMW

La técnica de microondas de transformada de Fourier de trino de frecuencias de banda ancha (Chirped-Pulse Fourier Transform Microwave, CP FTMW) fue desarrollada por Brooks Pate y colaboradores en 2006 en la Universidad de Virginia<sup>76</sup>. Este espectrómetro presenta la ventaja de adquirir un rango amplio del espectro en un tiempo relativamente corto con respecto a otros espectrómetros con una alta resolución y sensibilidad, haciéndolo mucho más eficiente la búsqueda de las distintas especies coexistentes en el chorro supersónico. El fundamento de la técnica consiste en la generación de un barrido lineal de frecuencias (trino de frecuencias, *chirped* en inglés) que amplificado permite la polarización macroscópica de las moléculas, excitándolas. A continuación, se deja un tiempo para se desexciten emitiendo radiación, siendo recogida por un detector y amplificada. La obtención de la señal es en el dominio del tiempo y, posteriormente, se convierte en el dominio de frecuencias mediante la transformada de Fourier.

El orden en el que opera un CP-FTMW es el siguiente: la muestra es introducida en fase gas mediante una válvula pulsada al tanque de alto vacío ( $10^{-3}$  - $10^{-7}$  hPa), produciéndose la expansión supersónica. Simultáneamente, se genera el pulso de polarización del barrido lineal de frecuencias mediante el generador de onda arbitraria (AWG) de 24GS/s y se amplifica utilizando un Tubo de onda progresiva (traveling wave tube, TWT). Seguidamente, la potencia de polarización se ajusta con un atenuador variable. El pulso amplificado es introducido dentro del tanque mediante una antena de banda ancha. Consecuentemente, esta radiación amplificada interacciona con el jet supersónico, polarizando macroscópicamente a las partículas. Tanto la válvula como el AWG están sincronizados temporalmente mediante un generador de pulsos (digital delay generator). En el instante que cesa el pulso de radiación, el sistema molecular se relaja emitiendo energía en forma de radiación. Esta emisión denominada FID (Free Induction Decay) es registrada por una segunda antena. A continuación, esta señal FID es amplificada y recogida en el dominio del tiempo mediante un osciloscopio digital de 50GS/s. Este proceso se repite varios miles de veces con el objeto de ir acumulando los espectros para aumentar la relación señal/ruido, es decir, minimizar todas las señales de origen aleatorio que se recogen en la detección aumentando las señales coherentes procedentes de la emisión molecular. Tras este proceso, se realiza la transformación de Fourier se obtiene el espectro en el dominio de frecuencias. Para lograr una

mayor reproducibilidad, todos los componentes del equipo se encuentran sincronizados a un patrón estándar de rubidio de 10 MHz<sup>77</sup>.

En nuestro laboratorio existen varios espectrómetros CP-FTMW no-comerciales, que funcionan en diferentes rangos de frecuencia. Los utilizados en ese trabajo son la configuración de bocinas de 2-8GHz y el sistema de parabólicas de 6-18GHz. En el primero, la disposición de las dos antenas/ bocinas es perpendicular con respecto al jet supersónico, ilustrado en la Figura 9a, mientras que en el sistema de parabólicas el posicionamiento es coaxial (Figura 9b).



**Figura 9.** a) Esquema del espectrómetro CP-FTMW de bocinas que opera en el rango de 2-8GHz. b) Vista lateral del espectrómetro LA-CP-FTMW donde se aprecia el conjunto parabólico.

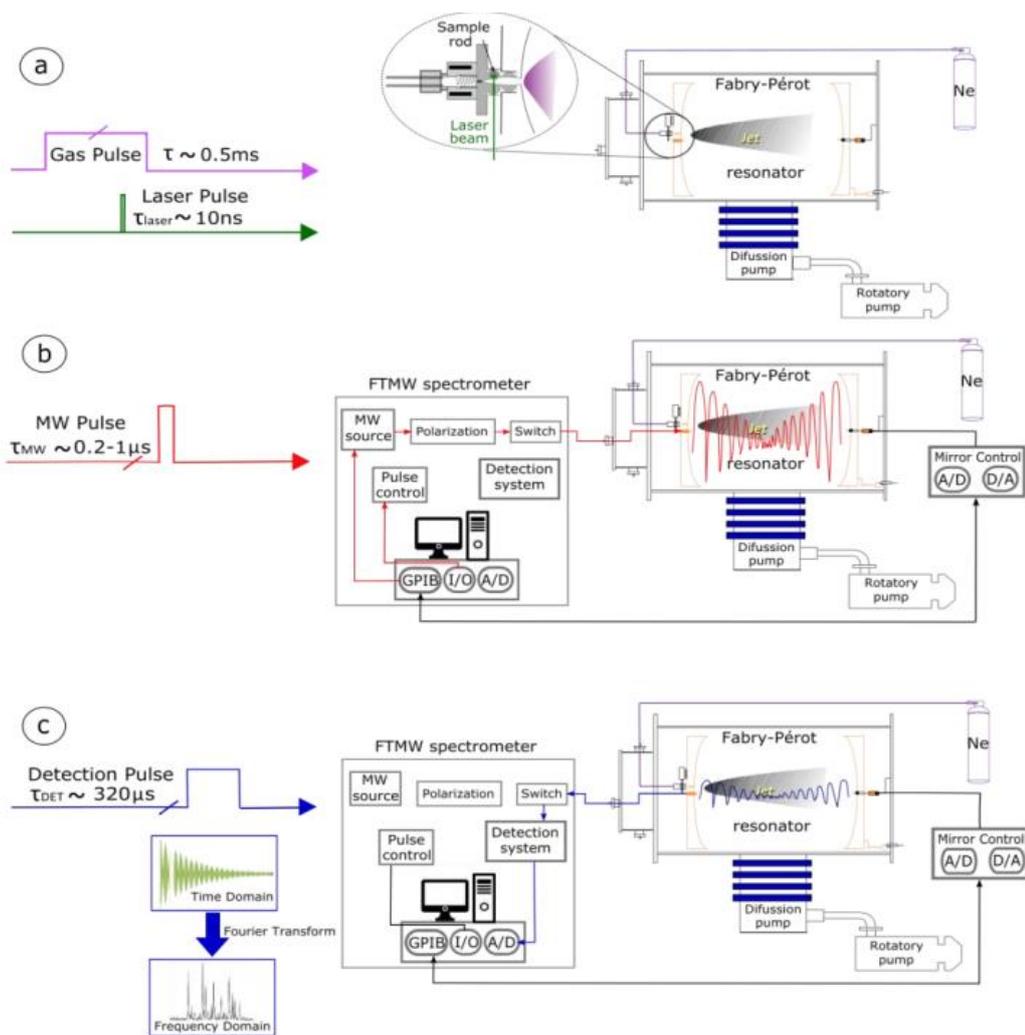
#### 4.3.4. MB-FTMW

Una de las deficiencias del CP-FTMW es que no consigue la suficiente resolución para poder resolver la estructura hiperfina producida por el acoplamiento de cuadrupolo nuclear, dificultando su correcta identificación. Por esta razón, es necesario un equipo de mayor resolución capaz de resolver la estructura hiperfina como el espectrómetro de microondas con transformada de Fourier de haz molecular (Molecular-Beam Fourier Transform Microwave, MB-FTMW).

El funcionamiento de este sistema sigue esencialmente los mismos principios que los anteriormente descritos en el otro equipo diferenciándose en que en este último presenta un resonador de Fabry-Perot y, en vez de utilizar un AWG, se emplea un sintetizador de onda fija. El resonador de Fabry-Perot consiste en dos espejos esféricos de alta reflectancia colocados uno enfrente del otro dentro del tanque donde ocurre la expansión supersónica. Uno de estos espejos se encuentra fijo mientras que el otro es móvil, lo cual permite ajustar la distancia entre ellos y seleccionar con elevada precisión la frecuencia de polarización a la cual se someterá la muestra. La radiación de microondas es generada por un sintetizador de microondas monocromático y se introduce al resonador mediante una antena posicionada en el espejo fijo. Esta radiación emitida por la antena viaja hasta al otro espejo y es reflejado, llegando al otro espejo y revotando de nuevo. Este movimiento

de vaivén de la radiación ocasiona un proceso de interferencia, que al cumplirse la condición de resonancia de la cavidad (longitud de los espejos es igual a un múltiplo de semilongitudes de onda de la radiación electromagnética), será constructiva. Esto conlleva a la generación de una onda estacionaria dentro de la cavidad de mayor intensidad que la inicialmente emitida por la antena, por ende, no es necesario emplear amplificadores. Por otra parte, los múltiples pasos de la radiación a través de la muestra favorecen que un mayor número de partículas se exciten, lo cual se verá reflejado en un aumento de la intensidad de la señal. La resolución que podemos alcanzar con este sistema es subdoppler siendo posible ver la distribución de velocidades de las moléculas en dirección a favor y en contra de la radiación, implicando que una señal la veamos como un doblete donde la frecuencia real es el promedio de ambas componentes Doppler.

Las etapas de este equipo,<sup>78,79</sup> ejemplificado en la Figura 10, consisten en primero emitir el pulso molecular (expansión supersónica). Luego se emite la radiación de microondas producida por el sintetizador, lo cual provoca la polarización de las moléculas. Una vez cesado el pulso de excitación, las moléculas emiten radiación coherente espontáneamente a las frecuencias de resonancia correspondientes a cada transición. Pasado un tiempo, se detecta y amplifica la emisión molecular por un método superheterodino. La señal se registra en el dominio del tiempo y, mediante la transformación de Fourier, da lugar al espectro de rotación en el dominio de frecuencias.

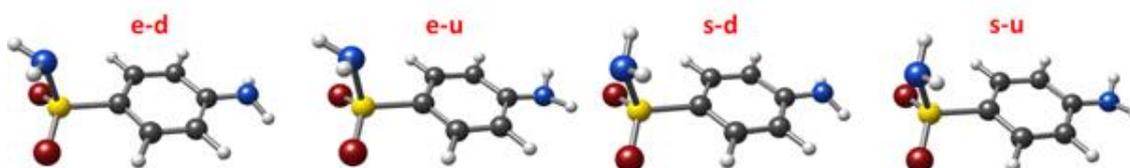


**Figura 10.** Secuencia de pulsos para un solo ciclo experimental en el sistema LA-MB-FTMW.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Panorama conformacional de la sulfanilamida

Para facilitar la identificación de los conformeros de la sulfanilamida presentes durante la expansión supersónica, se procede a realizar una búsqueda conformacional exhaustiva. Inicialmente, empleamos un método de mecánica molecular con el programa Schrödinger-Maestro<sup>80</sup>, el cual nos proporcionara una base de estructuras posibles que puede adoptar la molécula dentro de un marco de energías dado. En la búsqueda conformacional se utilizaron dos algoritmos: el “Large scales Low Mode” (el cual usa modos de frecuencia para crear las nuevas estructuras) y el método de Monte Carlo, usando un campo de fuerzas MMFFs y con una ventana energética de 31kJ/mol considerando la molécula en fase gas (sin disolvente). Como resultado se obtuvieron un total de 3 estructuras. Posteriormente, las geometrías resultantes por mecánica molecular se optimizan con metodología MP2 y B3LYP-D3(BJ) con una base de Pople 6-311++G(d,p). Al aplicar este procedimiento se redujo el número de estructuras a dos. Sin embargo, a consecuencia del método de búsqueda del programa (sampleado de los modos) ha sido necesario un ajuste manual del grupo NH<sub>2</sub> de la anilina en las estructuras optimizadas para obtener otras dos estructuras que también se optimizaron. Finalmente, se obtienen un total de 4 posibles estructuras para el monómero representadas en la Figura 11.



**Figura 11.** Las cuatro conformaciones más estables de la sulfanilamida calculadas a B3LYP-D3(BJ)/6-311++G(d,p).

Las cuatro estructuras obtenidas se muestran en la Figura 11 y pueden clasificarse como eclipsada (eclipsed, *e*, a partir de ahora) cuando la orientación de los hidrógenos del NH<sub>2</sub> del grupo sulfonamida está en oposición al anillo aromático o, en otras palabras, su dirección va en conjunción con los oxígenos, o alternada (staggered, *s*, desde este instante) que es la contraposición de la eclipsada, es decir, se encuentra direccionado hacia al anillo aromático. Adicionalmente, cuando la amina fenólica (anilina) apunta al mismo lado que la sulfonamida la categorizamos como arriba (up, *u*) o al contrario como abajo (down, *d*). Esta nomenclatura se ha elegido para respetar la nomenclatura de otros trabajos en la literatura.<sup>39</sup>

Por otro lado, la optimización geométrica, además de ofrecer las estructuras nos otorga las constantes de rotación, momentos dipolares constantes de cuadrupolo y las energías, que serán de gran ayuda para la identificación conformacional una vez

obtenido el espectro rotacional. Estos valores se encuentran recopilados en la Tabla 3. A partir de esta información podemos hacernos una cierta idea de las características que presentará nuestro espectro experimental. Por ejemplo, las cuatro especies presentan constantes de rotación muy próximas y energías no muy elevadas, por ende, se esperan señales de todas ellas y que estén muy cercanas entre sí. A mayores, todas ellas presentan un momento dipolar en el eje  $a$  bastante alto lo cual facilitará su identificación.

**Tabla 3.** Parámetros espectroscópicos y teóricos para los cuatro confórmeros más estables del monómero de la SA, junto con las energías calculadas.

Monómero (B3LYP-D3(BJ)/MP2)				
Parámetro	$e-d$	$e-u$	$s-d$	$s-u$
A	2553/2556	2553/2555	2554/2557	2554/2557
B	559/561	559/561	558/560	558/560
C	508/510	508/510	507/508	507/508
$ \mu_a $	4.8/4.1	4.8/4.0	7.0/6.4	7.0/6.4
$ \mu_b $	0.1/0.1	0.1/0.1	0.0/0.0	0.0/0.0
$ \mu_c $	2.2/1.9	3.8/4.0	2.8/2.4	4.4/4.5
$\chi_{aa,NA}$	2.66/2.54	2.51/2.34	2.68/2.57	2.52/2.34
$\chi_{bb,NA}$	2.22/1.94	2.23/1.95	2.21/1.94	2.24/1.95
$\chi_{cc,NA}$	-4.88/-4.48	-4.74/-4.29	-4.89/-4.50	-4.76/-4.29
$\chi_{aa,NS}$	-2.57/-2.45	-2.59/-2.57	-5.01/-4.66	-5.01/-4.70
$\chi_{bb,NS}$	0.88/0.88	0.91/1.06	1.79/1.70	1.80/1.71
$\chi_{cc,NS}$	1.69/1.57	1.68/1.51	3.22/2.96	3.22/2.96
$\Delta E$	0/0	26/28	141/26	202/94
$\Delta E_{ZPE}$	0/4	23/0	229/144	270/226
$\Delta G$	0/81	37/0	472/427	507/512

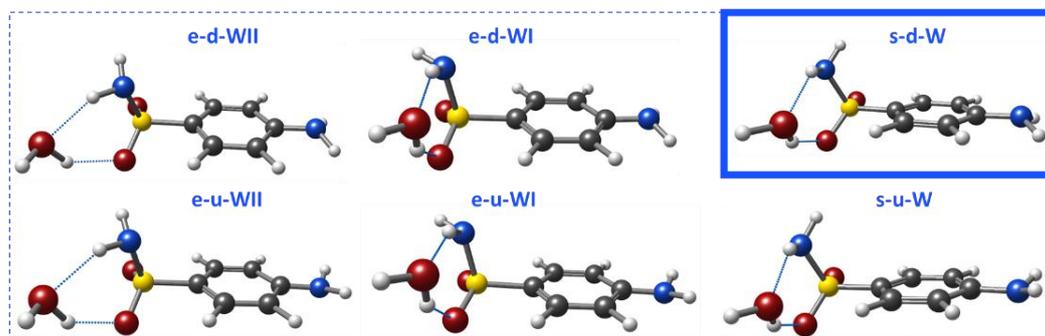
A, B y C son las constantes rotacionales medidas en MHz.  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  se corresponden con los valores de las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debyes (recordar que  $1 \text{ D} \approx 3.33564 \cdot 10^{-34} \text{ C} \cdot \text{m}$ ).  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$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

## 5.2. Panorama conformacional de la sulfanilamida- $\text{H}_2\text{O}$

En el caso del clúster monohidratado se siguió el mismo procedimiento de modelado que para el monómero. De las 20 estructuras obtenidas inicialmente por mecánica molecular, se redujeron a 9 después de la optimización. Al igual que para el monómero, se tuvo que aplicar nuevamente un ajuste manual del grupo amino. Finalmente, se obtuvieron un total de 16 confórmeros.

La Figura 12 recoge los confórmeros más estables, por debajo de  $500 \text{ cm}^{-1}$ , que son los relevantes de cara al experimento. El resto de confórmeros se hayan recopilados en la FiguraA01 y TablaA01 del anexo. Fijándonos en la geometría molecular nos damos cuenta de que todas ellas se basan en la estructura monomérica, pero interactuando con el  $\text{H}_2\text{O}$ . De las cuatro estructuras del monómero, las pequeñas variaciones en la posición que ocupa el agua entre esas configuraciones conllevan a un aumento en el número de estructuras. Los seis confórmeros más estables se catalogan cuatro de ellos como eclipsados (dos “up” y dos “down”) y los otros dos son alterados. En todos ellos el agua se posiciona junto al grupo sulfonamida entre el  $\text{NH}_2$  y el  $\text{S}=\text{O}$  formando una

especie ciclo de seis miembros. La diferencia estructural que presentan las configuraciones eclipsadas es la orientación del H<sub>2</sub>O: en la estructura e-WII el hidrogeno está direccionado hacia fuera de la molécula, mientras que en la estructura e-WIII se dirige más hacia el anillo aromático.



**Figura 12.** Las seis estructuras más estables de la sulfanilamida-agua calculadas a nivel B3LYP-D3(BJ)/6-311++G(d,p).

Los parámetros estructurales de las estructuras más estables del complejo sulfanilamida-agua se recogen en la Tabla 4. Todos presentan momentos dipolares apreciables en los tres ejes de inercia. Sin embargo, al igual que en el monómero el momento dipolar en *a* es sustancialmente el más alto, por ende, este tipo de transiciones serán las que se esperan observar preferentemente. Adicionalmente, estas seis estructuras son casi isoenergéticas, por lo que se espera que todas ellas aparezcan en el espectro.

**Tabla 4.** Parámetros espectroscópicos y teóricos para los conformeros más estables del cluster sulfanilamida-agua, junto con las energías calculadas.

Sulfanilamida-H <sub>2</sub> O(B3LYP-D3(BJ))						
Parámetro	W-s-d	W-s-u	WI-e-d	WI-e-u	WII-e-d	WII-e-u
<i>A</i> <sup>a</sup>	1407	1407	1467	1466	1922	1901
<i>B</i>	506	506	475	475	410	412
<i>C</i>	404	404	396	396	365	366
$ \mu_a $	5.1	5.0	3.4	3.3	5.1	5.0
$ \mu_b $	2.9	3.0	1.9	2.4	2.6	2.7
$ \mu_c $	1.4	3.0	0.8	2.4	1.0	2.6
$\chi_{aa,NA}$	2.66	2.49	2.77	2.21	2.69	2.41
$\chi_{bb,NA}$	2.18	2.26	1.67	1.93	2.16	2.24
$\chi_{cc,NA}$	-4.83	-4.75	-4.44	-4.14	-4.85	-4.65
$\chi_{aa,NS}$	-3.99	-3.99	-2.35	-2.37	-1.73	-1.83
$\chi_{bb,NS}$	0.78	0.78	1.3	1.30	-0.77	-0.54
$\chi_{cc,NS}$	3.21	3.21	1.05	1.07	2.50	2.38
$\Delta E^b$	0	41	154	159	243	263
$\Delta E_{ZPE}^c$	0	28	55	59	114	128
$\Delta G^d$	283	304	0	3	18	6

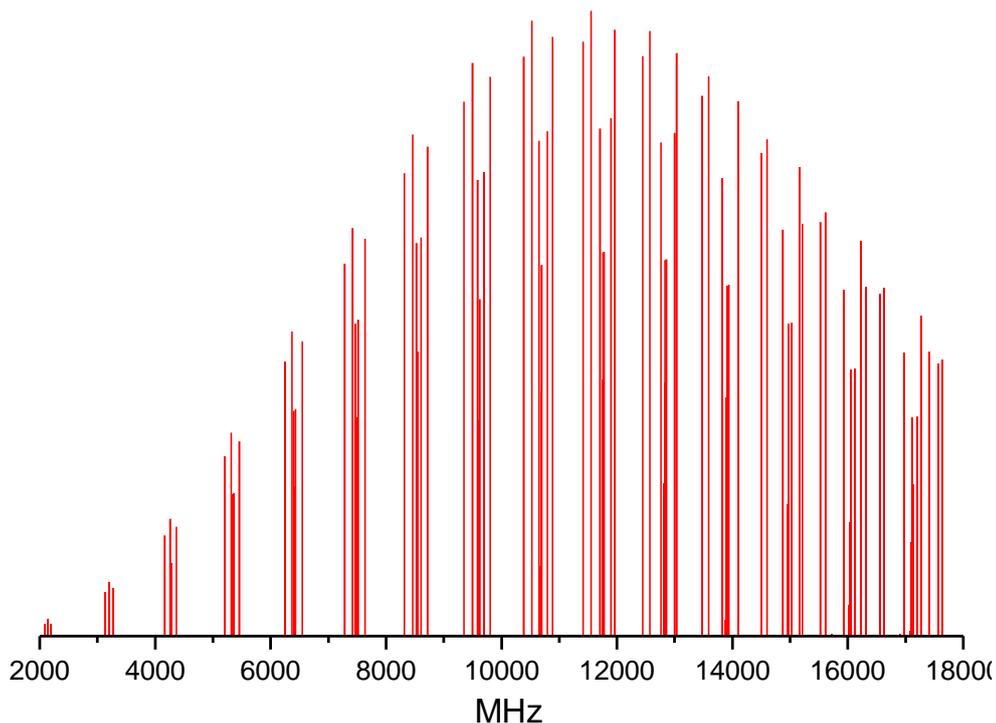
*A*, *B* y *C* son las constantes rotacionales medidas en MHz.  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  se corresponden con los valores de las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debyes (recordar que 1 D  $\approx$  3.33564·10<sup>-34</sup> C·m).  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  son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

### *5.3 Preparación de la muestra y simulación del espectro rotacional*

Este proceso se llevó a cabo a la vez que se realizó la labor computacional. En el desarrollo experimental se ha empleado una muestra comercial de sulfanilamida (Cymit). El punto de fusión de esta muestra es de 165°C, implicando que, por métodos convencionales de vaporización, como el calentamiento, no van a generar el suficiente número de partículas gaseosas para realizar el espectro de microondas y de su complejo con agua. Por este motivo, se optó por utilizar la ablación laser como sistema de vaporización de muestra. Para ello, se mezcló un polvo finamente dividido del compuesto con una pequeña cantidad de aglomerante comercial. A esta mezcla se introdujo a un troquel y con una prensa hidráulica se ejerció presión para conseguir una barra compactada y sólida. La barra se deja en la línea de vacío durante dos o tres semanas.

Mientras tanto y una vez obtenidos los parámetros espectroscópicos de las estructuras más relevantes, procedemos a prepararnos para la realización experimental. Lo primero es elegir la zona óptima de trabajo. Para ello, efectuamos una simulación del espectro en el rango 2-18GHz empleando las constantes de rotación calculadas para el confórmero más estable, recogidas en la Tabla 3, y considerando que la temperatura de rotación que se consigue durante la expansión supersónica es de 2k. Con estos datos el programa calcula la función de partición de rotación necesaria para poder evaluar la distribución de población de los niveles de rotación que dará cuenta de las intensidades de las transiciones.

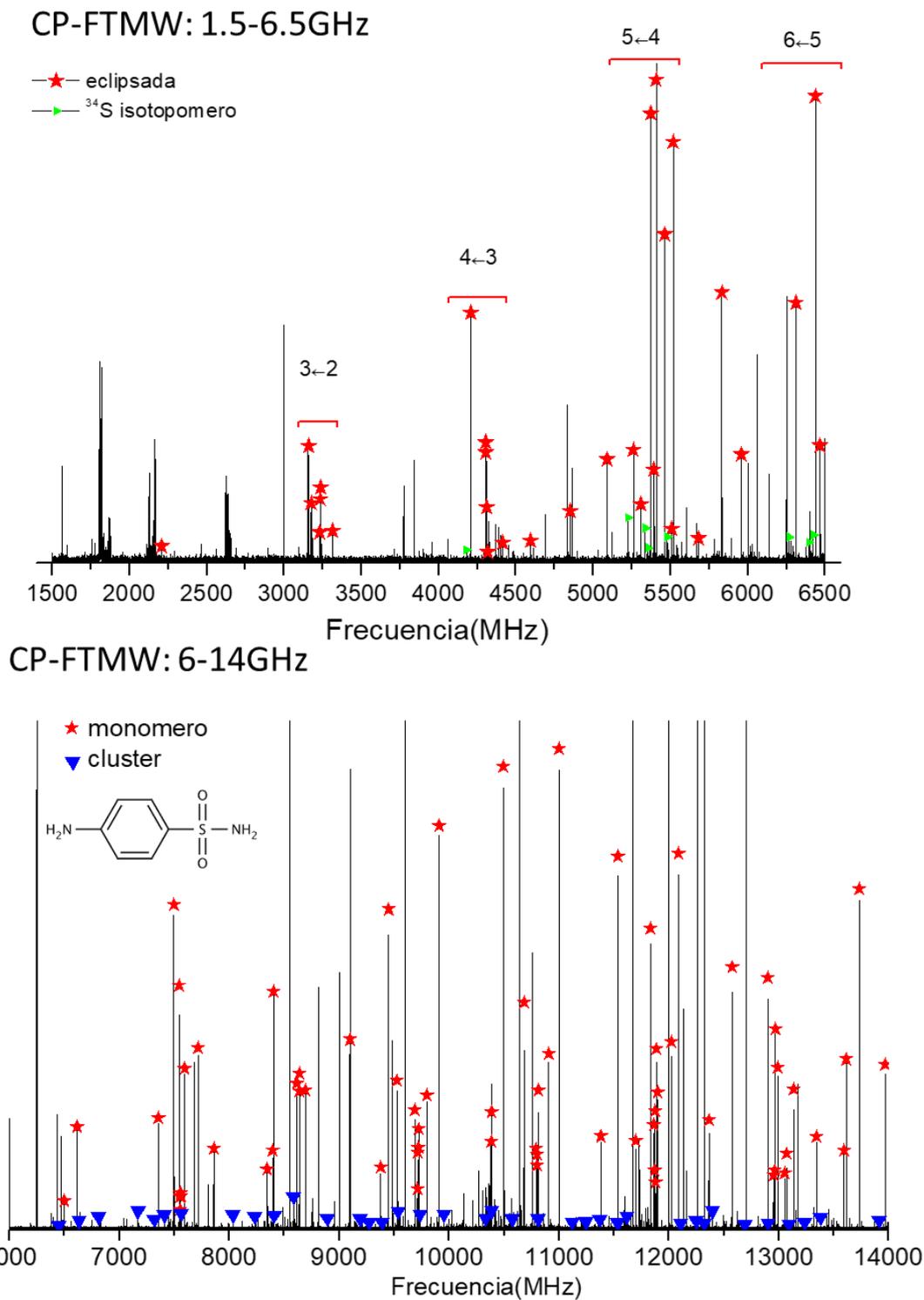
Otro de los factores a tener en consideración en la simulación del espectro son el tipo de transiciones que posiblemente sean observables. En nuestro caso, existe un momento dipolar significativo en los ejes  $a$  y  $c$ , por ende, las transiciones de tipo  $a$  y  $c$  son las esperables en el espectro. La simulación espectral se realizó con las transiciones de tipo  $a$  que son las de mayor momento dipolar en todos los confórmeros y por su patrón característico, lo cual nos ayudará durante el proceso experimental saber que todo funciona adecuadamente. El espectro resultante se muestra en la Figura 13. Concluimos a priori que la zona adecuada del espectro correspondería para la región espectral de 2-16GHz. Como en el grupo GEM tenemos dos espectrómetros que operan de 1.5-6.5GHz y 6-18 GHz, respectivamente, emplearemos ambos espectrómetros de banda ancha.



**Figura 13.** Simulación de espectro de la sulfanilamida para las transiciones de *tipo a* en la región de 2-18GHz.

#### 5.4. *Espectro rotacional de banda ancha*

Una vez transcurridas unas semanas, se coloca la barra en la tobera de ablación de un espectrómetro de microondas de transformada de Fourier de banda ancha (LA-CP-FTMW). Se utilizaron dos espectrómetros distintos, uno que opera en la zona de 1.5-6.5GHz y otro que opera en la zona de 6-18 GHz. Una vez transcurridas unas semanas de secado de la muestra, el primer paso a dar consiste en transferir moléculas de sulfanilamida neutra de un sólido a gas a través de un pulso laser de picosegundos (15 mJ, 20ps). Luego sometemos a las especies que se encuentran en la pluma de ablación a una expansión supersónica empleando un flujo de neón como gas portador a una presión de estancamiento de 10 bar, con la finalidad de enfriar a las moléculas a los niveles fundamentales electrónicos, vibración y rotacionales simplificando los espectros. La generación de pulsos de excitación de alta energía se manejó con un generador de onda arbitraria y un amplificador TWT que permitió la polarización de las moléculas en el rango de frecuencias deseado. Se promediaron un total de 92000 decaimientos de inducción libre individuales (4FID en cada ciclo de válvula, a una tasa de repetición de 2 Hz) en el dominio del tiempo para la región de baja frecuencia y 128000 para la región de alta frecuencia. Posteriormente se aplicó la transformada de Fourier para adquirir el espectro de banda ancha en el dominio de frecuencias mostrado en las Figura 14.



**Figura 14.** Panel superior: Espectro de rotación de banda ancha experimental de la sulfanilamida en la región de frecuencias 1.5-6.5 GHz, remarcando las transiciones de tipo  $\alpha$  de la progresión R ( $J' \leftarrow J''$ ). En triángulos verdes se indican las transiciones observadas del isotopólogo de  $^{34}\text{S}$ . Panel inferior: Espectro de rotación de banda ancha experimental en la región de 6-14 GHz (este espectro fue optimizado para el complejo con agua). Las estrellas rojas indican las transiciones del monómero y los triángulos azules las correspondientes al complejo con agua.

Una observación que se apreció durante la realización del experimento fue que en el instante que se eliminó la influencia del láser, implicó la desaparición de la mayoría de las líneas que se encontraban en el espectro. Adicionalmente, algunas de las transiciones rotacionales vistas presentaban signos de estructura hiperfina debida a la presencia de dos núcleos de  $^{14}\text{N}$  con momento de cuadrupolo eléctrico distinto a cero ( $I=1$ ). Por estas dos razones podemos justificar que el espectro debe corresponder a la sulfanilamida.

## 5.5 Análisis del espectro

### 5.5.1. Sulfanilamida

Después de la adquisición del espectro de rotación procedemos con su análisis. Como indica la Tabla 5 los cuatro confórmeros presentan un momento dipolar elevado en el eje  $a$  de inercia. Entonces, la estrategia a seguir consiste en aprovechar el patrón característico de las transiciones de tipo  $a$  pertenecientes a la rama  $R$ , que se encuentran separadas  $B+C$  siendo este tipo de progresiones prácticamente independiente de la constante  $A$ . Por lo tanto, beneficiándonos de esta peculiaridad seguimos la estrategia de buscar este tipo de progresiones con una separación  $B+C \approx 1060$  MHz, surgiendo de los valores teóricos de los distintos confórmeros que aparecen en la Tabla 5. Gracias a esta metodología conseguimos observar un patrón aproximadamente cada 1078 MHz correspondientes a una primera especie rotamérica, indicada con estrellas rojas en la Figura 14. De esta forma conseguimos un set preliminar de constantes rotacionales determinadas mediante la utilización del modelo del rotor rígido<sup>81</sup> empleando distintos softwares<sup>82,83</sup>. Debido a este primer conjunto de constantes rotacionales nos ayudó en la detección de otra serie de progresiones del tipo  $c$  de las ramas  $R$  y  $Q$ , que fueron posteriormente fueron adicionadas al ajuste y permitieron concluir las constantes de rotación de forma más precisa (sobre todo la  $A$  porque con solo transiciones de tipo  $a$  esta constante rotacional estaría indeterminada). El ajuste se concluyó con un total de 109 transiciones rotacionales asignadas de ambos espectros, que se encuentran recogidas en la Tabla A02 resultando en unas constantes de rotación iniciales  $A=2610.6$ ,  $B=565.0$  y  $C=513.5$  MHz.

Finalizado la caracterización del primer rotámero, aún quedaban nuevas líneas débiles que, como se mencionará más adelante, pertenecen a los isotopómeros. No obstante, ninguna de estas líneas pertenece a la sulfanilamida, concluyendo que solo presenta un confórmero dominante.

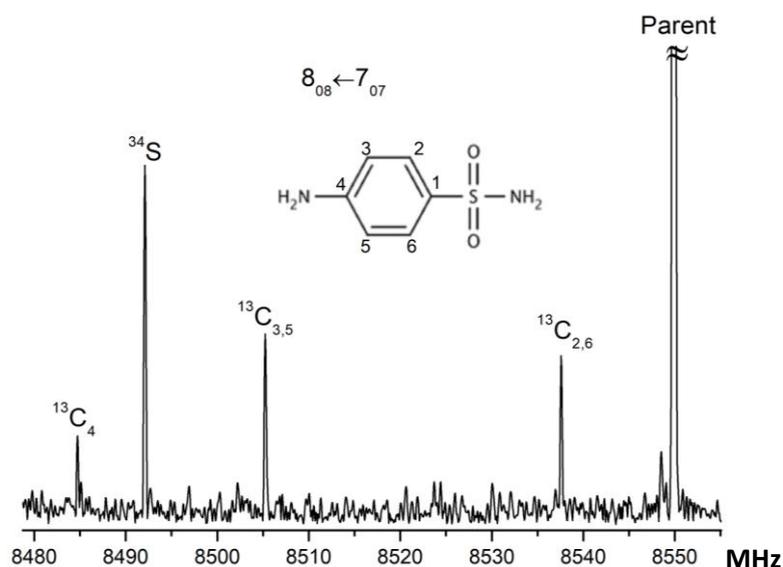
**Tabla 5:** Comparación de los parámetros espectroscópicos de los rotámeros caracterizados con los valores teóricos predichos para las estructuras más estables del monómero

Parámetros	EXPERIMENTAL	SA TEORÍA (B3LYP-D3(BJ)/ MP2)			
	Rotámero I (LA-MB-FTMW)	e-d	e-u	s-d	s-u
$A^a$	2610.4103(21) <sup>b</sup>	2553/2556	2553/2555	2554/2557	2554/2557
$B$	565.02163(30)	559/561	559/561	558/560	558/560
$C$	513.47983(26)	508/510	508/510	507/508	507/508
$ \mu_a $	Observed	4.8/4.1	4.8/4.0	7.0/6.4	7.0/6.4
$ \mu_b $	Not Observed	0.1/0.1	0.1/0.1	0.0/0.0	0.0/0.0
$ \mu_c $	Observed	2.2/1.9	3.8/4.0	2.8/2.4	4.4/4.5
$\chi_{aa}, A$	2.4901(56)	2.66/2.54	2.51/2.34	2.68/2.57	2.52/2.34
$\chi_{bb}, A$	1.8486(75)	2.22/1.94	2.23/1.95	2.21/1.94	2.24/1.95
$\chi_{cc}, A$	-4.3386(75)	-4.88/-4.48	-4.74/-4.29	-4.89/-4.50	-4.76/-4.29
$\chi_{aa}, S$	-2.4632(36)	-2.57/-2.45	-2.59/-2.57	-5.01/-4.66	-5.01/-4.70
$\chi_{bb}, S$	1.3060(64)	0.88/0.88	0.91/1.06	1.79/1.70	1.80/1.71
$\chi_{cc}, S$	1.1572(64)	1.69/1.57	1.68/1.51	3.22/2.96	3.22/2.96
$\Delta E^b$	-	0/0	26/28	141/26	202/94
$\Delta E_{ZPE}^c$	-	0/4	23/0	229/144	270/226
$\Delta G^d$	-	0/81	37/0	472/427	507/512
$N^e$	32	-	-	-	-
$\sigma^f$	2.5	-	-	-	-

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

### 5.5.2. Especies isotópicas

A consecuencia de que la espectroscopia de rotación es muy sensible con la distribución de masas dentro de la molécula, por ende, nos permite distinguir entre especies isotópicas de una misma molécula (isotopólogos). Lo cual nos ha permitido identificar dentro del espectro de rotación los isotopómeros de  $^{34}\text{S}$  y  $^{13}\text{C}$ , ver Tablas A03-A06. Como se puede apreciar en la Figura 15, se determinaron unas intensidades relativas del 4.3% para el  $^{34}\text{S}$ , y 1.1% para el  $^{13}\text{C}$  con respecto a la especie parental. Estos resultados están en buen acuerdo con las abundancias isotópicas naturales esperadas. No obstante, también se observa en la Figura 15 que dos isotopólogos de  $^{13}\text{C}$  presentan una intensidad aproximada del 2%. Este hecho implica que esos isotopólogos tiene el doble de intensidad que el resto de carbonos cuya abundancia es del 1%, a razón de que por simetría esos C se encuentran en posiciones equivalentes. Lo cual demuestra que en el nivel vibracional  $v=0$  la sulfanilamida pertenece al grupo puntual de simetría  $C_s$ .



**Figura 15.** Sección experimental del espectro rotacional de banda ancha de la sulfanilamida donde se muestra una comparación entre la transición de rotación  $8_{08} \leftarrow 7_{07}$  para los isotopólogos de  $^{13}\text{C}$  y  $^{34}\text{S}$  de la conformación eclipsada de la sulfanilamida.

Pudimos caracterizar y obtener las constantes de rotación de los distintos isotopómeros mostrados en la Tabla 6. Sin embargo, para el isotopómeros  $^{13}\text{C}$  ( $C_1$ ) no fue posible su medición a consecuencia de encontrarse muy próximo al centro de masas de la molécula, implicando que sus constantes de rotación son muy semejantes a las del parent. Por lo tanto, las líneas que tendrían que ser observables para este isotopómero se encuentran contenidas en las del parent. Debido a la falta de medición de este C, de los N y O no fue posible concluir la estructura de sustitución ( $r_s$ ) de la molécula. Esto nos impide conocer con mayor precisión la disposición espacial que ocupan los distintos núcleos dentro de la molécula en el mínimo de la curva de energía potencial.

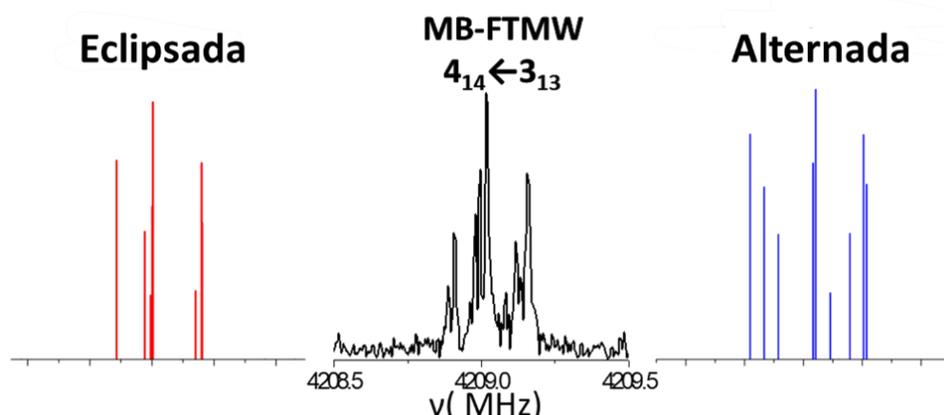
**Tabla 6.** Parámetros rotacionales encontrados de los isotopólogos de la sulfanilamida.

Especie	Parental/ $C_1$	$^{34}\text{S}$	$^{13}\text{C}_2/^{13}\text{C}_6$	$^{13}\text{C}_3/^{13}\text{C}_5$	$^{13}\text{C}_4$
$A^a$	2610.4103(21)	2609.397(255)	2589.792(287)	2590.101(298)	2609.44(50)
$B$	565.02163(30)	560.90647(109)	564.78626(130)	562.48032(134)	560.3892(187)
$C$	513.47983(26)	510.09077(105)	512.52626(126)	510.62989(115)	509.65463(172)
$\chi_{aa,1}$	2.4901(56)	2.49001(56)	2.49001(56)	2.49001(56)	2.49001(56)
$\chi_{bb,1}$	1.8486(75)	1.8486(75)	1.8486(75)	1.8486(75)	1.8486(75)
$\chi_{cc,1}$	-4.3386(75)	-4.3386(75)	-4.3386(75)	-4.3386(75)	-4.3386(75)
$\chi_{aa,2}$	-2.4632(36)	-2.4632(36)	-2.4632(36)	-2.4632(36)	-2.4632(36)
$\chi_{bb,2}$	1.3060(64)	1.3060(64)	1.3060(64)	1.3060(64)	1.3060(64)
$\chi_{cc,2}$	1.1572(64)	1.1572(64)	1.1572(64)	1.1572(64)	1.1572(64)
$N^e$	32	49	35	32	18
$\sigma^f$	2.5	37.9	38.3	35.9	44.1

## 5.6 Espectro de LA-MB-FTMW: análisis de la estructura hiperfina

Una vez que las constantes de rotación son determinadas, se debe de continuar con la identificación conformacional. Como se mencionó en el apartado 5.1 las posibles configuraciones que puede adoptar la sulfanilamida aislada son la *e-d*, *e-u*, *s-d* y *s-u*. A consecuencia que son muy similares al únicamente diferenciarse en las posiciones de los hidrógenos en las aminas. Esto implica que dicha pequeña diferencia no cause un cambio significativo en la distribución de masas y, por ende, que sus constantes rotacionales sean casi idénticas. Este hecho se confirma con la gran similitud de los valores predichos recogidos en la Tabla 5. Por lo tanto, las constantes de rotación por sí solas no permiten una identificación conformacional inequívoca. Afortunadamente, los elementos diagonales del tensor de acoplamiento del cuadrupolo nuclear de cada uno de los  $^{14}\text{N}$  se pueden utilizar como una asignación precisa, ya que dependen en gran medida del entorno químico de cada átomo de nitrógeno. Los dos núcleos  $^{14}\text{N}$  de los grupos amina de la sulfanilamida tienen un momento cuadripolar distinto de cero ( $I=1$ ), que interactúa con el gradiente del campo eléctrico en el sitio de estos núcleos, lo que da como resultado una estructura hiperfina para todas las transiciones rotacionales<sup>84</sup>. Del análisis de las constantes de acoplamiento de cuadrupolo nuclear ( $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$ ,  $\chi_{cc}$ ) aportan información del entorno electrónico de los núcleos de nitrógenos, siendo esta como su huella digital, lo cual nos cerciora de cual es incuestionablemente la estructura. En el caso que nos incumbe, los confórmeros de la sulfanilamida, esta información es crucial ya que da las orientaciones de los dos grupos  $\text{NH}_2$ , y nos permitirá diferenciar entre las configuraciones eclipsada y alterada, como podemos apreciar en la Figura 16.

Por esta razón, el segundo paso fue medir una selección de transiciones rotacionales usando nuestro espectrómetro de haz molecular (MB) con transformada de Fourier que opera en la zona de 2-8GHz (LA-MB-FTMW)<sup>85</sup> para resolver la estructura hiperfina. Elegimos este espectrómetro porque a menores valores de  $J$  las componentes de cuadrupolo nuclear se encuentran más separadas y puesto que se midieron transiciones de tipo  $\alpha$ , que comúnmente su estructura hiperfina es más colapsada, por lo que es preferible medir a menor frecuencia. Se midieron un total de 32 componentes para el rotámero I (ver Tabla A08) y del análisis aparte de determinar el cuadrupolo se determinaron con mayor precisión las constantes de rotación (ver Tabla 5). Un hecho a mencionar es que en los espectros aparecen todas las transiciones como dobletes, debido a la configuración paralela entre haz molecular y la radiación de microondas que crea el efecto Doppler. Por lo tanto, la medida de la frecuencia de resonancia se determinó como la media aritmética de los dos componentes Doppler. La Figura 16 muestra un ejemplo de los resultados, mostrando la transición  $4_{14} \leftarrow 3_{13}$  del rotámero encontrado para la sulfanilamida.

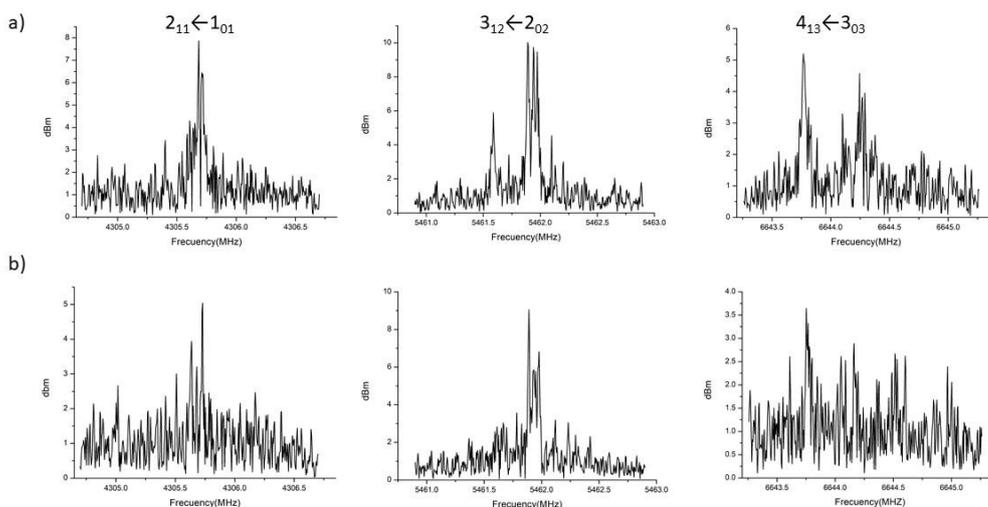


**Figura 16:** Transición  $4_{14} \leftarrow 3_{13}$  del rotámero encontrado para el monómero de la sulfanilamida. Se muestra una comparación entre la estructura hiperfina experimental y la predicha para las configuraciones eclipsada y alternada.

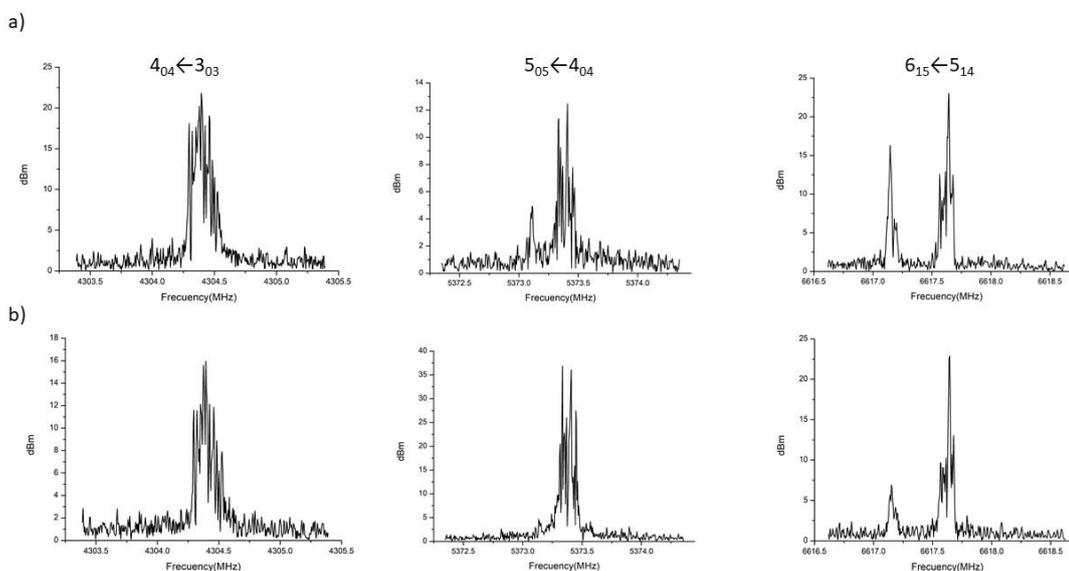
Una vez determinado experimentalmente las constantes de cuadrupolo nuclear se compararon con las predichas para cada conformero. Los valores finales se presentan en la Tabla 5. Como se puede apreciar hay un excelente acuerdo entre los valores experimentales y teóricos de las constantes de acoplamiento de cuadrupolo nuclear para el rotámero I con la configuración sulfanilamida eclipsada (SA-e). Así, podemos decir sin ambigüedad que la especie principal de la sulfanilamida es la conformación eclipsada. Por otro lado, existen dos posibles configuraciones eclipsada (u y d) con constantes de rotación y constantes de cuadrupolo nuclear semejantes, implicando que, por este medio, no sea posible su distinción.

### 5.7 Asignación conformacional: resolviendo el problema

Para discernir entre ambos conformeros, exploramos la dependencia de la intensidad con el poder de polarización en un régimen lineal, como ocurre en el MB-FTMW. Como se observa en la Tabla 5, la configuración *e-u* tiene el mismo momento dipolar en los ejes principales de inercia *a* y *c* (relación 1:1), mientras que para la configuración *e-d* el momento dipolar en el eje *a* es aproximadamente el doble con respecto al del eje *c* (relación 2:1). Por lo tanto, se hizo una comparación del efecto que provoca el cambio en la potencia de polarización en las transiciones de tipo *a* y *c*. Los resultados, que aparecen en las Figuras 17 y 18, demuestran que al atenuar la potencia de polarización únicamente las transiciones de tipo *a* están presentes. En cambio, en caso de aumentar la potencia de polarización hay un incremento en transiciones de tipo *a* y aparecen las de tipo *c*. Además, el aumento adicional de la potencia de polarización satura las transiciones de tipo *a* y aumenta las transiciones de tipo *c* hasta que también se alcanza la saturación. Esta dependencia se espera para una situación en la que  $\mu_a > \mu_c$  concuerde bien con la configuración *e-d*. De hecho, estimamos el doble del momento dipolar para las transiciones de tipo *a* con respecto a las transiciones de tipo *c*, en excelente acuerdo con el valor predicho. Por lo tanto, los experimentos apuntan a la configuración *e-d* como el conformero detectado experimentalmente.



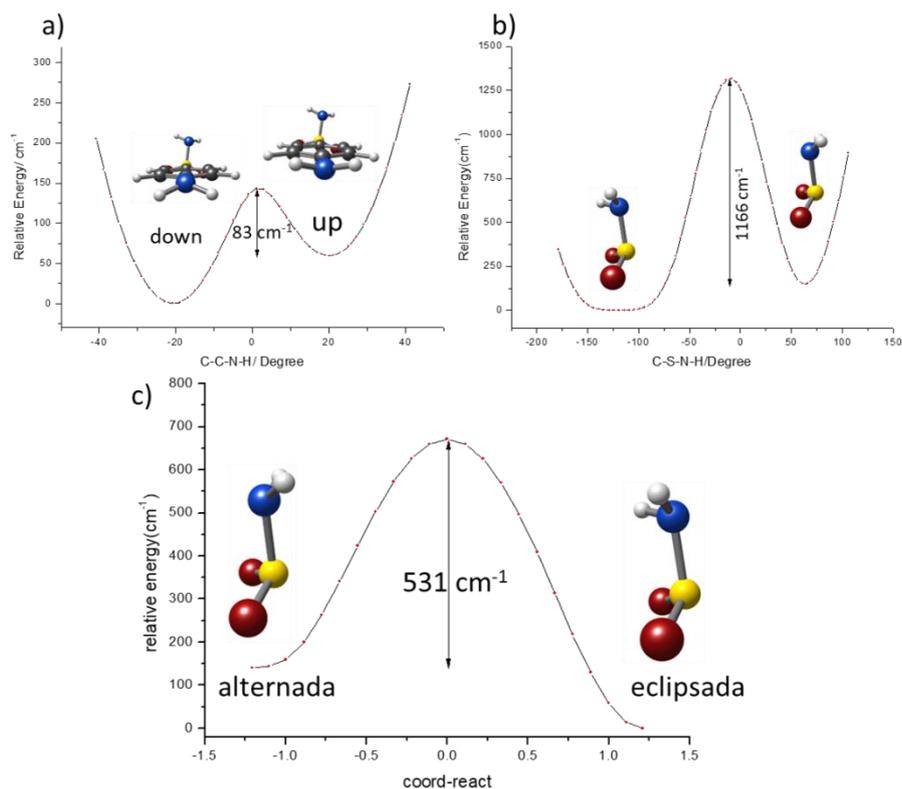
**Figura17.** Comparación de la dependencia de intensidades de transiciones de tipo *c* seleccionadas para el rotamero I a distintos niveles de polarización: a) 1dBm and b) -6.5 dBm



**Figura 18.** comparación de la dependencia de intensidades de transiciones de tipo *a* seleccionadas para el rotamero I empleando un nivel de polarización distinto: a) 1dBm and b) -6.5 dBm

## 5.8 Perdida conformacional

Teniendo en cuenta las energías relativas, existen cuatro confórmeros de la sulfanilamida los cuales deberían estar presentes en el experimento por ser lo suficientemente estables, pero solamente se ha detecta una única estructura. En consecuencia, las otras tres estructuras deben de haberse perdido durante la expansión supersónica<sup>86,87</sup>. Como se aprecia en la Figura 19, las distintas estructuras se diferencian en las inversiones de los NH<sub>2</sub>. La inversión resultante del NH<sub>2</sub> anilínico proporciona las estructuras *u* o *d*. Por lo tanto, ambas estructuras son similares en energía. Además, se espera que la barrera de interconversión entre ambas sea baja, siendo plausible que durante la expansión supersónica suceda una relajación conformacional debido a las colisiones con el gas portador. Este hecho impediría la detección de las especies menos estables. Para resolver esta incógnita, procedimos con un cálculo de la superficie de energía potencial (SEP) para estimar la barrera de interconversión empleando nuestra metodología. El resultado de este análisis, que se encuentra recogido en la Figura 19a, muestra que la barrera energética que conecta con las configuraciones *u* y *d* es inferior a 100cm<sup>-1</sup>, confirmando la interconversión conformacional. Adicionalmente, las conformaciones eclipsada y alternada están conectadas por la inversión del S-NH<sub>2</sub>. Si se procede por la misma metodología empleada con anterioridad la barrera energética es superior a 1000 cm<sup>-1</sup> (ver Figura 19b). No obstante, esta no es la forma precisa de determinar este tipo de barreras y volvimos a estimar la barrera ubicando el estado de transición por el cual transcurrirían ambos estados mediante el algoritmo QST3<sup>88</sup>. La barrera de interconversión estimada es ~500 cm<sup>-1</sup> (ver Figura 19c), encontrándose este valor en el límite de la interconversión conformacional. Esto implica que el proceso de interconversión sucede a través de la inversión S-NH<sub>2</sub> y no por una rotación, al ser el camino de menor energía. Por lo tanto, esta barrera energética no indica que se produzca una interconversión total, pero si puede ocurrir una interconversión parcial. Este hecho, junto a la menor estabilidad de este confórmero, explicaría su no detección.



**Figura 19.**(a) SEP de relajación para la rotación del ángulo diedro C-C-N-H del SA. Este barrido indica que la interconversión entre los conformeros *u* y *d* es menor de  $100\text{ cm}^{-1}$ .(b) SEP de relajación para la rotación del ángulo diedro C-S-N-H del SA. Este barrido indica que la interconversión entre los conformeros eclipsada y alterada es superior de  $1000\text{ cm}^{-1}$ . (c) Interconversión entre las configuraciones eclipsada y alterada de la SA a través del estado de transición empleando el método QST3. Todos estos cálculos fueron realizados usando B3LYP-D3(BJ)/6-311++G(d,p). En (b) y (c) solo se expone la porción relevante del grupo funcional de la molécula implicado para una mejor visualización.

### 5.9 Sulfanilamida monohidratada

Se volvió a repetir el experimento en otras condiciones para medir su complejo monohidratado en la zona de 6-14GHz (ver Figura 14). Procediendo de manera semejante al caso del monómero, nos centramos en encontrar los seis conformeros del complejo de la sulfanilamida con agua. En todos los conformeros existe un valor alto del momento dipolar en el eje *a* y por eso utilizamos la misma estrategia que en el caso de monómero.

Se identificó rápidamente una progresión de transiciones de tipo *a* de la rama *R* separadas  $B+C \approx 908\text{ MHz}$ . El ajuste inicial proporcionó unas constantes de rotación de mayor precisión que produjeron una predicción más exacta del espectro de rotación, lo que nos permitió agregar al ajuste transiciones de tipo *b* y *c* pertenecientes a la rama *R*. En total se midieron 107 transiciones empleando un análisis de rotor semirrígido, porque algunas de las transiciones se encontraban a menores frecuencias a las

predichas. Por ello, fue necesario introducir en el ajuste correcciones cuarticas de distorsión centrifuga. Las constantes rotacionales experimentales finales se muestran en la Tabla7. Todas las transiciones rotacionales medidas se recogen en el anexo Tabla A07.

**Tabla 7:** Comparación de los parámetros espectroscópicos de los rotámeros caracterizados con los valores teóricos predichos para las estructuras más estables del clúster con agua.

Parámetros	EXPERIMENTAL	SA-W TEORÍA(B3LYP-D3(BJ))		
	Rotámero II (LA-CP-FTMW)	s-WI	e-WII	e-WIII
$A^a$	1411.3989(64)	1407	1467	1922
$B$	504.6184(13)	506	475	410
$C$	403.6054(13)	404	396	365
$ \mu_a $	Observed	5.1	3.4	5.1
$ \mu_b $	Observed	2.9	1.9	2.6
$ \mu_c $	Observed	1.4	0.8	1.0
$\Delta_J$	-0.02045(262)	-0.02	-0.15	-0.04
$\Delta_{JK}$	-0.326(49)	-0.11	0.13	1.30
$\Delta_K$	-0.067(179)	-0.11	-2.32	-14.44
$\chi_{aa,A}$		2.66	2.77	2.41
$\chi_{bb,A}$		2.18	1.67	2.24
$\chi_{cc,A}$		-4.84	-4.44	-4.65
$\chi_{aa,S}$		-3.99	-2.35	-1.83
$\chi_{bb,S}$		0.78	1.30	-0.54
$\chi_{cc,S}$		3.21	1.05	2.38
$\Delta E^b$		0	154	263
$\Delta E_{ZPE}^c$		0	55	128
$\Delta G^d$		283	0	6
$N^e$	107			
$\sigma^f$	67.5			

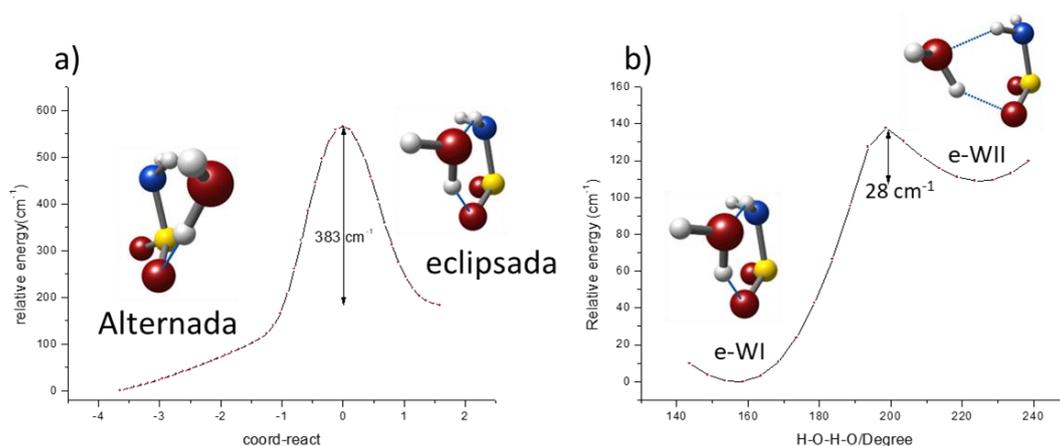
$A$ ,  $B$  y  $C$  son las constantes rotacionales medidas en MHz.  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  se corresponden con los valores de las tres componentes del momento dipolar expresadas en Debyes (recordar que  $1 \text{ D} \approx 3.33564 \cdot 10^{-34} \text{ C}\cdot\text{m}$ ).  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$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

Al eliminar las líneas de rotación del monómero encontrado anteriormente para los isotopólogos y para el complejo con agua recién identificado, en el espectro no quedaron señales significativas sin asignar, lo que sugiere que no hay más especies presentes.

Como se indicó anteriormente, para este complejo con agua hay una gran variedad de estructuras: son las mismas estructuras que el monómero pero con una molécula de agua unida a la sulfonamida, siendo la configuración alternada la más estable. Afortunadamente, debido a la diferencia en la posición del agua, el cambio en las constantes rotacionales es suficiente para distinguir entre confórmeros, no teniendo que recurrir a medir el cuadrupolo nuclear. Al comparar los parámetros rotacionales

experimentales con los teóricos presentes en la Tabla 7, los resultados afirman inequívocamente que el agua prefiere interactuar con la configuración alternada en la sulfanilamida. Además, no solo las constantes rotacionales experimentales son prácticamente idénticas a las teóricas, si no que otro motivo es la mayor semejanza entre las constantes de distorsión centrífuga teórico-experimental. Concluyendo que la estructura preferente para el cluster con agua es la especie s-WI (alternada), que además es el conformero de mayor estabilidad.

Al igual que ocurría en el caso anterior solo se observó una única especie microsolvatada. Nuevamente, se puede explicar la ausencia de la configuración eclipsada por la interconversión conformacional. En consecuencia, inicialmente realizamos una exploración de la PES entre las distintas configuraciones eclipsadas (ver Figura 20a), estimando una barrera de energía ínfima ( $28 \text{ cm}^{-1}$ ) siendo suficiente la energía procedente de del  $v=0$  para sobrepasarla. De igual forma que en el caso del monómero evaluamos la barrera a través de la inversión de S-NH<sub>2</sub> como se aprecia en la Figura 20b. En esta ocasión la barrera de interconversión es de  $383 \text{ cm}^{-1}$  (inferior a la encontrada para el monómero), lo cual explica la presencia de un único conformero en la expansión supersónica.



**Figura 20.** (a) Interconversión entre las conformaciones alternada y eclipsada del complejo sulfanilamida-agua a través del estado de transición empleando el método QST3. La barrera estimada es de  $380 \text{ cm}^{-1}$  (b) PES de relajación de la rotación del ángulo diedro H-O-H-O del SA-agua. En este PES apreciamos que la interconversión entre los conformeros e-WI y e-WII es inferior de  $28 \text{ cm}^{-1}$ . Todos los cálculos fueron realizados con metodología B3LYP-D3(BJ)/6-311++G(d,p).

### 5.10 Interacciones intramoleculares

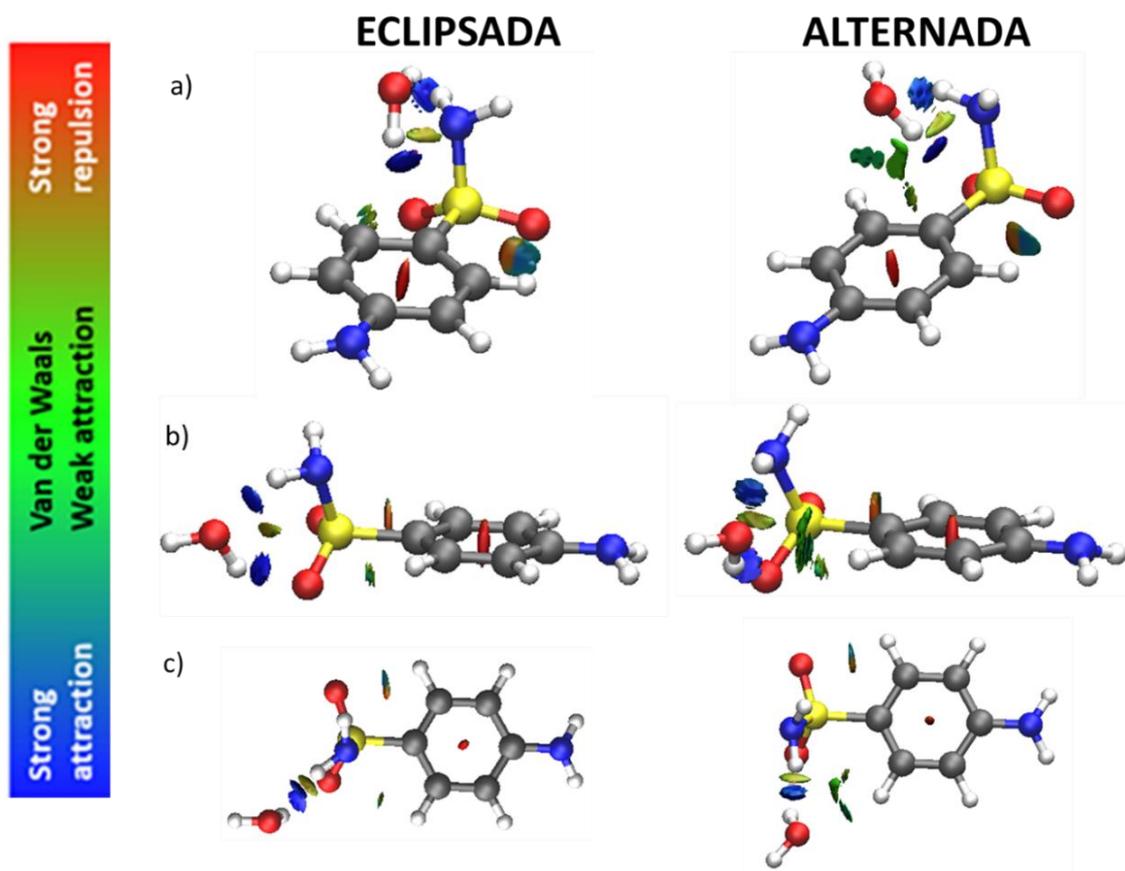
Una vez identificada cual es la estructura del monómero, a partir de ella podemos extraer información relevante sobre las interacciones intramoleculares dentro de la molécula. El caso de la sulfanilamida es especialmente interesante, porque la configuración alternada presenta una estabilización adicional debida a la interacción N-H••• $\pi$ , mientras que la configuración eclipsada pierde esa interacción a favor de dos interacciones N-H•••O=S más direccionados y con mejor solapamiento. Los cálculos usando la metodología B3LYP estiman que el conformero con interacción N-H••• $\pi$  es  $230\text{ cm}^{-1}$  menos estable, mientras que en el caso de utilizar la metodología MP2 el valor es similar pero algo menor ( $144\text{ cm}^{-1}$ ). Entonces, a partir de los resultados experimentales podemos confirmar que la interacción N-H•••O=S aporta una mayor estabilidad frente a la N-H••• $\pi$ .

### 5.11 Interacciones intermoleculares

En las estructuras más estables para el complejo de la sulfanilamida con agua, el agua actúa como un doble donador: por un lado actúa como donante de protones a la molécula de sulfanilamida a través de un enlace de hidrógeno OH•••O=S y, por otro lado, procede como aceptor de protones con el NH de la sulfanilamida a través de un enlace de hidrógeno NH•••O. Esta disposición permite que el complejo forme una red cíclica de hidrógeno y confiere a la molécula, tanto para la configuración eclipsada como a la alternada, una gran estabilidad. Curiosamente, entre ambas configuraciones se observa la alternada y, por lo tanto, debería ser más estable, en contraposición a la molécula aislada donde la eclipsada es la más estable.

Debido a que es muy interesante comparar la situación entre ambas configuraciones para explicar tal estabilización, llevamos a cabo un análisis por NCI<sup>89,90</sup>. La comparación puede verse en la Figura 21, y confirma la estabilización de ambas configuraciones mediante una fuerte red cooperativa de enlaces de hidrogeno N-H•••O-H•••O=S. La imagen también indica que la configuración alternada presenta una interacción intermolecular C-H•••O adicional que estabiliza preferente la configuración alternada sobre la eclipsada.

Finalmente, también cuantificamos la preferencia de la configuración alternada mediante el cálculo de energías de disociación ( $D_0$ ) de ambas configuraciones. La forma alternada tiene una energía de disociación de  $39.0\text{ kJ mol}^{-1}$ , mientras que la conformación eclipsada de  $33.6\text{ kJ mol}^{-1}$  confirmando la estabilización adicional de la forma alternada. Además, comparando estos resultados de energías de disociación con compuestos semejantes (Tabla 8), podemos concluir que la interacción entre la sulfanilamida y el agua es considerablemente fuerte.



**Figura 21.** Comparación entre las configuraciones eclipsada (izquierda) y alternada (derecha) del complejo de la sulfanilamida-agua, donde se muestran los resultados del análisis de las interacciones inter- e intra-moleculares usando NCIPLOT. a) Vista isométrica, b) de perfil y c) de planta. La superficie roja corresponde a fuerzas de repulsión fuertes, las superficies azules a fuerzas no covalentes de fuertes atracción y las superficies verdes a una interacción atractiva débil.

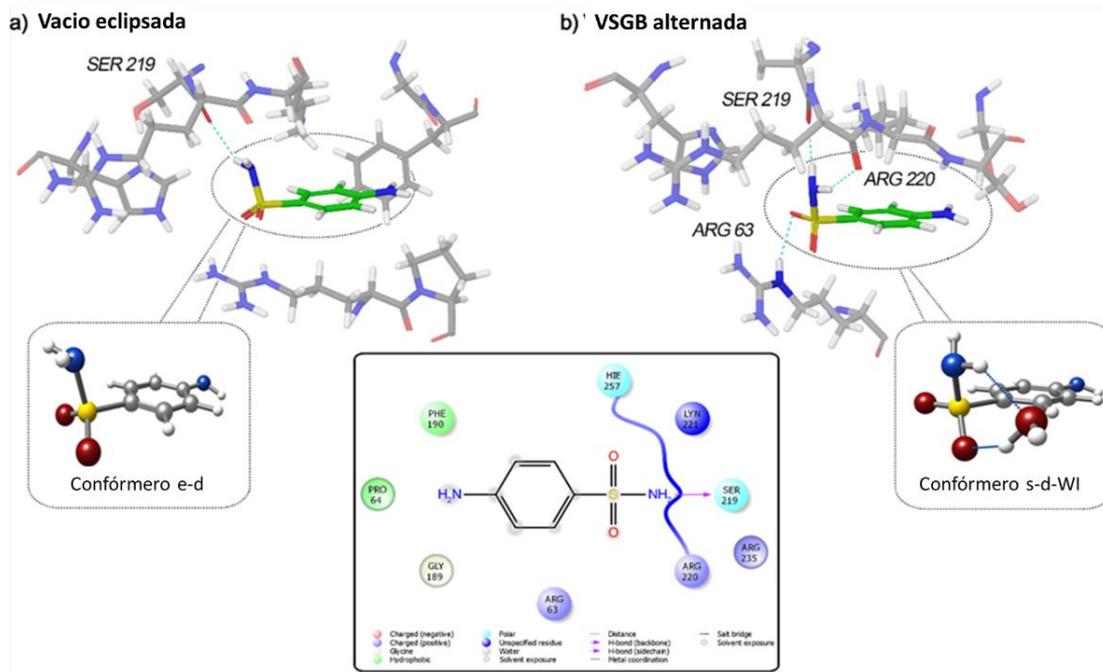
**Tabla 8.** Comparación de las energías de enlace de la sulfanilamida-agua con sistemas similares.

Especie	Energía/ $D_0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	Método	Referencia
SA-agua alternada	39.0	B3LYP-D3(BJ)/6-311++G(d,p)	Este trabajo
SA-agua eclipsada	33.6	B3LYP-D3(BJ)/6-311++G(d,p)	Este trabajo
Ácido Benzoico-agua	30.5	B3LYP/6-311++G(2fd,2pd)	Ref <sup>91</sup>
Fenol-agua	23.9	MATI	Ref <sup>92</sup>
Indol-agua	20.4	MATI	Ref <sup>92</sup>

## 5.12 Implicación biológica

Estos resultados son muy emocionantes ya que hay un cambio conformacional de una configuración eclipsada cuando la molécula está aislada, a una conformación alternada cuando se introduce agua. Por lo tanto, una sola molécula de agua actúa como un selector conformacional. Motivados por estos hallazgos, contrastamos nuestros resultados con los cálculos de Acoplamiento Molecular (Docking). El Acoplamiento Molecular se utiliza para posicionar la estructura 3D generada por ordenador de pequeños ligandos en una estructura receptora en una variedad de orientaciones, conformaciones y posiciones evaluando las fuerzas intermoleculares. Este método es de gran utilidad en el descubrimiento temprano de fármacos, su desarrollo o la química médica, entre otros, y proporciona información sobre el reconocimiento molecular. Se puede utilizar para generar ideas sobre la conformación 3D de compuestos o macromoléculas, interacciones proteína-ligando y para hacer predicciones sobre actividades biológicas. De hecho, el Acoplamiento Molecular se ha convertido en una parte integral del diseño de fármacos asistidos por computadora (CADD, por sus siglas en inglés) y su descubrimiento (CADD)93.

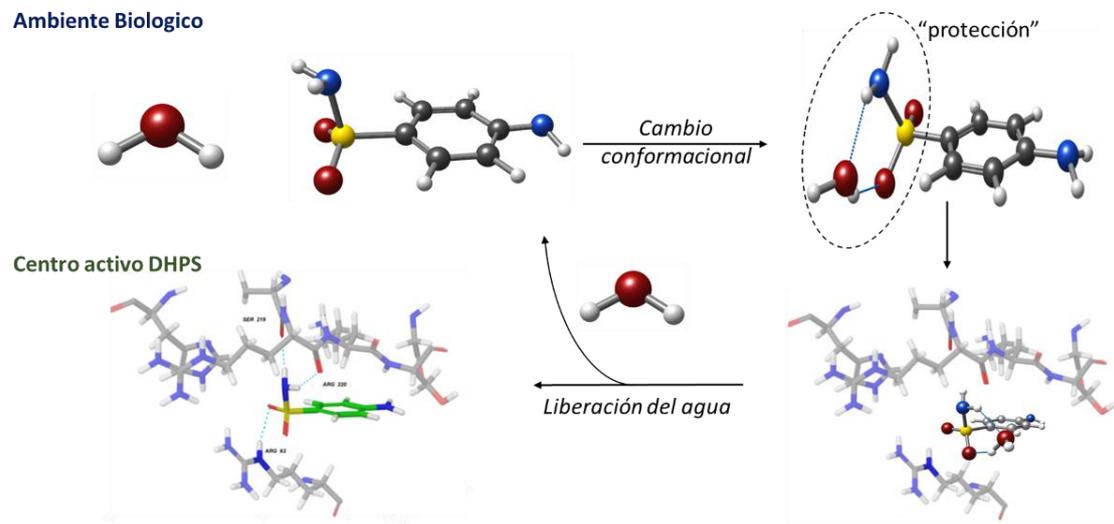
Se sabe que la sulfanilamida interacciona con el receptor de la DHPS. Por ello, descargamos la enzima DHPS (pdb: 1aj0)<sup>94</sup> con una resolución de 2 Ångstrom. Debido a que la estructura de la DHPS se obtuvo mediante cristalografía de rayos X, fue necesaria una preparación de la proteína<sup>95</sup> previa a su optimización. Seguidamente, para la optimización, se optó por emplear un campo de fuerzas OPL3 junto al modelo VSGB<sup>96</sup>. El VSGB es un modelo de modelización estructural de proteínas de alta resolución que incluye implícitamente un modelo del disolvente, así como correcciones basadas en la física para enlaces de hidrógeno, interacciones  $\pi$ - $\pi$ , interacciones de autocontacto e interacciones hidrofóbicas. Por esta razón es adecuado para el modelaje de estructuras proteicas de alta resolución y para tratar la descripción continua de la solvatación. Como se puede ver en la Figura 22, la optimización mediante este modelo predice con éxito una interacción entre la sulfanilamida y el residuo Ser219 con la cual se sabe que interactúa. Además, el modelo sugiere que la sulfanilamida se sitúa en la orientación alternada cuando se incluye la solvatación. Por otro lado, en la Figura 22 también se muestra como la misma optimización empleando un modelo de sin disolvente (es decir, en vacío) da un acoplamiento en el que la sulfanilamida está en la conformación eclipsada. Es interesante ver que se observa el mismo resultado tanto en nuestros resultados usando espectroscopía rotacional en fase gaseosa, como en la modelización en fase condensada. Por lo tanto, nuestros resultados también confirman la importancia de utilizar modelos de última generación tales como el modelo de solvatación VSGB, que son relevantes para modelar estructuras de proteínas de alta resolución, lo que permite una solución más adecuada para abordar problemas "reales", como el modelado de funciones biológicas, descubrimiento de estructuras basada en fármacos, o diseño de fármacos.



**Figura 22.** Panel izquierdo: comparación entre la estructura obtenida experimentalmente de la sulfanilamida en condiciones de aislamiento (abajo) y su estructura acoplada dentro del centro activo de la 1aj0, tal y como es encontrada en el cristal<sup>94</sup> y minimizada con ausencia de disolvente (arriba). Panel central: representación visual 2D de las interacciones de la sulfanilamida dentro del centro activo de la 1aj0. Panel derecho: comparación entre las estructuras obtenidas experimentalmente del complejo sulfanilamida-agua en condiciones de aislamiento (abajo) y su estructura acoplada dentro del centro activo de la 1aj0, tal y como es hallada en el cristal<sup>94</sup> y minimizada con el modelo VSGB (arriba).

A partir de estos resultados, podemos hacer una pequeña discusión sobre la posible implicación biológica en la migración de la sulfanilamida desde el medio biológico al receptor, ejemplificada en la Figura 23. Por ejemplo, a pesar de que la configuración más estable de la sulfanilamida es la forma eclipsada, esta disposición puede implicar problemas. Debido a que el grupo S-NH<sub>2</sub> apunta hacia el área circundante, esto podría conllevar a una menor posibilidad de que la molécula alcance su receptor proteico, al reaccionar el grupo S-NH<sub>2</sub> con otras moléculas en el medio. Sin embargo, en el momento que las moléculas de agua interactúan con la sulfanilamida, esto puede ocasionar un cambio conformacional variando la configuración de la forma eclipsada a la alternada, “protegiendo” el grupo funcional amino y disminuyendo la reactividad de la sulfanilamida. De hecho, como hemos mostrado arriba, la energía de enlace de la configuración alternada es inusualmente alta. Otro argumento para corroborar esta propuesta es que la sulfanilamida se protona en el NH<sub>2</sub> de la parte anilínica en disolución y, en cambio, en fase gas la protonación se lleva a cabo en el S-NH<sub>2</sub><sup>97</sup>. Después de la solvatación, el complejo de la sulfanilamida-agua se aproxima al receptor en la conformación alternada y finalmente soltará el agua uniéndose al receptor. Por lo tanto,

puede ser que el agua actúe como un escudo para proteger la molécula durante el trayecto de la sulfanilamida hasta llegar al receptor. De hecho, los procesos biológicos son el resultado de minimizaciones de las energías libre de Gibbs.



**Figura 23.** Esquema simplificado del posible trayecto de la sulfanilamida desde el medio extracelular hasta el centro activo de la DHPS.

## 6. CONCLUSIONES

Hemos caracterizado la especie monomérica de la sulfanilamida y su complejo con una molécula de agua en condiciones de aislamiento en fase gas utilizando técnicas de ablación laser combinadas con espectroscopia de rotación. Esto nos ha permitido la identificación inequívoca de su estructura intrínseca, permitiendo evaluar las interacciones intra- e intermoleculares que las gobiernan.

Para cada especie, hemos encontrado un solo conformero que coincide con las especies predichas como las más estables. El resto de los conformeros estables se pierden debido a la relajación conformacional ocurrida en el proceso de la expansión supersónica.

Observamos que con añadir tan solo una molécula de agua se produce un cambio en la disposición conformacional. Esto nos ha llevado a pensar que quizás el agua actúe como un escudo en fases condensadas del ambiente biológico protegiendo a sulfanilamida en su camino hasta llegar al receptor. Comprobamos que este cambio conformacional también ocurre al realizar un modelado de acoplamiento molecular entre la sulfanilamida y su receptor cuando se aplican modelos con solvatación implícita de última generación.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Gelmo, P. cber Sulfamide der p-bmidobenzolsalfonsaure; *J. für Prakt. Chemie* **77**, 369–382 (1908).
2. Domagk, G. Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Dtsch. Medizinische Wochenschrift* **61**, 250–253 (1935).
3. Miert, A. S. J. P. A. M. V. A. N. The sulfonamide-diaminopyrimidine story \*. 309–316 (1994).
4. Woods, D. D. The Biochemical Mode of Action of the Sulphonamide Drugs. *J. Gen. Microbiol.* **29**, 687–702 (1962).
5. Sköld, O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist. Updat.* **3**, 155–160 (2000).
6. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology - Google Libros. in.
7. Achari, A. *et al.* Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 490–497 (1997).
8. Capasso, C. & Supuran, C. T. Dihydropteroate synthase (sulfonamides) and dihydrofolate reductase inhibitors. *Bact. Resist. to Antibiot. From Mol. to Man* 163–172 (2019) doi:10.1002/9781119593522.ch7.
9. Prete, S. Del *et al.* Sulfonamide inhibition study of the carbonic anhydrases from the bacterial pathogen *Porphyromonas gingivalis*: The  $\beta$ -class (PgiCAB) versus the  $\gamma$ -class (PgiCA) enzymes. *Bioorganic Med. Chem.* **22**, 4537–4543 (2014).
10. Badger, M. R. & Price, G. D. Badger1994. (1994).
11. Supuran, C. T. & Scozzafava, A. Carbonic-anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Expert Opin. Ther. Pat.* **10**, 575–600 (2000).
12. Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Casini, A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med. Res. Rev.* **23**, 146–189 (2003).
13. KELLER, H. [*Carbonic anhydrase, its inhibitors and activators*]. *Zeitschrift für Vitamin-, Hormon- und Fermentforschung* vol. 9.
14. *Carbonic Anhydrase*. (CRC Press, 2004). doi:10.1201/9780203475300.
15. Carta, F., Supuran, C. T. & Scozzafava, A. Sulfonamides and their isosters as carbonic anhydrase inhibitors. *Future Med. Chem.* **6**, 1149–1165 (2014).
16. Ballatore, C., Huryn, D. M. & Smith, A. B. Carboxylic Acid (Bio)Isosteres in Drug Design. *ChemMedChem* **8**, 385–395 (2013).
17. Geiser, L., Henchoz, Y., Galland, A., Carrupt, P.-A. & Veuthey, J.-L. Determination of pKa values by capillary zone electrophoresis with a dynamic coating procedure. *J. Sep. Sci.* **28**, 2374–2380 (2005).

18. Schmitt, M. *et al.* Structural selection by microsolvation: Conformational locking of tryptamine. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10356–10364 (2005).
19. Mata, S. *et al.* Tautomerism and microsolvation in 2-hydroxypyridine/2-pyridone. *J. Phys. Chem. A* **114**, 11393–11398 (2010).
20. Shallenberger, R. S. Taste Chemistry Principles. *Tast. Chem.* 47–109 (1993) doi:10.1007/978-1-4615-2666-7\_3.
21. Morris, G. M. & Lim-Wilby, M. Molecular Docking. in *Methods in Molecular Biology* vol. 443 365–382 (Humana Press, 2008).
22. Agarwal, S. & Mehrotra, R. An overview of Molecular Docking. *JSM Chem* **4**, 1024 (2016).
23. Guedes, I. A., de Magalhães, C. S. & Dardenne, L. E. Receptor-ligand molecular docking. *Biophys. Rev.* **6**, 75–87 (2014).
24. Torres, P. H. M., Sodero, A. C. R., Jofily, P. & Silva-Jr, F. P. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, Vol. 20, Page 4574 **20**, 4574 (2019).
25. Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G. & Andricopulo, A. D. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Mol.* 2015, Vol. 20, Pages 13384-13421 **20**, 13384–13421 (2015).
26. Keretsu, S., Bhujbal, S. P. & Cho, S. J. Rational approach toward COVID-19 main protease inhibitors via molecular docking, molecular dynamics simulation and free energy calculation. *Sci. Reports* 2020 101 **10**, 1–14 (2020).
27. Grabowsky, S. *et al.* The significance of ionic bonding in sulfur dioxide: Bond orders from X-ray diffraction data. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 6776–6779 (2012).
28. Thomas, S. P., Jayatilaka, D. & Guru Row, T. N. S···O chalcogen bonding in sulfa drugs: Insights from multipole charge density and X-ray wavefunction of acetazolamide. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 25411–25420 (2015).
29. Beno, B. R., Yeung, K. S., Bartberger, M. D., Pennington, L. D. & Meanwell, N. A. A Survey of the Role of Noncovalent Sulfur Interactions in Drug Design. *J. Med. Chem.* **58**, 4383–4438 (2015).
30. O'Connor, B. H. & Maslen, E. N. The crystal structure of  $\alpha$ -sulphanilamide. *Acta Crystallogr.* **18**, 363–366 (1965).
31. ALLEAUME, M. & DECAP, J. Affinement Tridimensionnel Du Sulfanilamide Beta. *Acta Crystallogr.* **18**, 731–736 (1965).
32. Alléaume, M. & Decap, J. Affinement tridimensionnel du sulfanilamide gamma. *Acta Crystallogr.* **19**, 934–938 (1965).
33. O'Connell, A. M. & Maslen, E. N. X-ray and neutron diffraction studies of beta-

- sulphanilamide. *Acta Crystallogr.* **22**, 134–145 (1967).
34. Gelbrich, T., Bingham, A. L., Threlfall, T. L. & Hursthouse, M. B. -Sulfanilamide. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* **64**, 205–207 (2008).
  35. Portieri, A., Harris, R. K., Fletton, R. A., Lancaster, R. W. & Threlfall, T. L. Effects of polymorphic differences for sulfanilamide, as seen through <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N solid-state NMR, together with shielding calculations. *Magn. Reson. Chem.* **42**, 313–320 (2004).
  36. Frydman, L. *et al.* A<sup>13</sup>C solid-state NMR study of the structure and the dynamics of the polymorphs of sulphanilamide. *Mol. Phys.* **70**, 563–579 (1990).
  37. Popova, A. D., Georgieva, M. K., Petrov, O. I., Petrova, K. V. & Velcheva, E. A. IR spectral and structural studies of 4-aminobenzenesulfonamide (sulfanilamide)-d<sub>0</sub>, -d<sub>4</sub>, and -<sup>15</sup>N, as well as their azanions: Combined DFT B3LYP/experimental approach. *Int. J. Quantum Chem.* **107**, 1752–1764 (2007).
  38. Borba, A., Gómez-Zavaglia, A. & Fausto, R. Conformational landscape, photochemistry, and infrared spectra of sulfanilamide. *J. Phys. Chem. A* **117**, 704–717 (2013).
  39. Uhlemann, T., Seidel, S. & Müller, C. W. Laser desorption single-conformation UV and IR spectroscopy of the sulfonamide drug sulfanilamide, the sulfanilamide-water complex, and the sulfanilamide dimer. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 14625–14640 (2017).
  40. Vigorito, A. *et al.* The Shapes of Sulfonamides: A Rotational Spectroscopy Study. *Mol.* **2022**, Vol. 27, Page 2820 **27**, 2820 (2022).
  41. *Spectroscopy and Modeling of Biomolecular Building Blocks - Jean-Pierre Schermann - Google Libros.*
  42. León, I., Alonso, E. R., Mata, S. & Alonso, J. L. A rotational study of the AlaAla dipeptide. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **22**, 13867–13871 (2020).
  43. Alonso, J. L. *et al.* The conformational behaviour of free d-glucose - At last. *Chem. Sci.* **5**, 515–522 (2014).
  44. León, I., Alonso, E. R., Mata, S. & Alonso, J. L. Shape of Testosterone. *J. Phys. Chem. Lett.* **12**, 6983–6987 (2021).
  45. Sanz-Novo, M., Alonso, E. R., León, I. & Alonso, J. L. The Shape of the Archetypical Oxocarbon Squaric Acid and Its Water Clusters. *Chem. - A Eur. J.* **25**, 10748–10755 (2019).
  46. I. León *et al.* The role of amino acid side chains in stabilizing dipeptides: the laser ablation Fourier transform microwave spectrum of Ac-Val-NH<sub>2</sub>. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 24985–24990 (2017).
  47. Bauder, A. Fundamentals of Rotational Spectroscopy. *Handb. High-resolution Spectrosc.* (2011) doi:10.1002/9780470749593.HRS002.

48. Long, B. E. Microwave Spectroscopy of Fluorinated Organic Compounds and Actinide Containing Molecules. (2015) doi:10.14418/WES01.3.43.
49. Cooke, S. A. & Ohring, P. Decoding pure rotational molecular spectra for asymmetric molecules. *J. Spectrosc.* **1**, (2013).
50. Meyer, H. THE MOLECULAR HAMILTONIAN. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physchem.53.082201.124330> **53**, 141–172 (2003).
51. Watson, J. K. G. Simplification of the molecular vibration-rotation hamiltonian. <http://dx.doi.org/10.1080/00268976800101381> **15**, 479–490 (2006).
52. Xu, Y. & Jäger, W. Microwave Rotational Spectroscopy. *Encycl. Inorg. Chem.* (2008) doi:10.1002/0470862106.IA313.
53. Gordy, W. & Cook, R. L. *Microwave molecular spectra. Journal of Molecular Structure* (Wiley, 1984). doi:10.1016/0022-2860(72)80039-5.
54. Bragg, J. K. & Golden, S. The Interaction of Nuclear Electric Quadrupole Moments with Molecular Rotation in Asymmetric Top Molecules. II. Approximate Methods for First-Order Coupling. *Phys. Rev.* **75**, 735 (1949).
55. Bardeen, J. & Townes, C. H. Calculation of nuclear quadrupole effects in molecules. *Phys. Rev.* **73**, 97–105 (1948).
56. Foley, H. M. Note on the nuclear electric quadrupole spectrum of a homonuclear diatomic molecule in a magnetic field. *Phys. Rev.* **71**, 747–751 (1947).
57. Halgren, T. A. Performance of MMFF94\*. *Scope, Parameterization, J. Comput. Chem.* **17**, 490–519 (1996).
58. *Computational Chemistry and Molecular Modeling: Principles and Applications - K. I. Ramachandran, Gopakumar Deepa, Krishnan Namboori - Google Libros.*
59. Woolley, R. G. & Sutcliffe, B. T. Molecular structure and the born—Oppenheimer approximation. *Chem. Phys. Lett.* **45**, 393–398 (1977).
60. Slater, J. C. A Soluble Problem in Energy Bands. *Phys. Rev.* **87**, 807 (1952).
61. Møller, C. & Plesset, M. S. Note on an Approximation Treatment for Many-Electron Systems. *Phys. Rev.* **46**, 618 (1934).
62. Gilbert, T. L. Hohenberg-Kohn theorem for nonlocal external potentials. *Phys. Rev. B* **12**, 2111 (1975).
63. Görling, A. Density-functional theory beyond the Hohenberg-Kohn theorem. *Phys. Rev. A* **59**, 3359 (1999).
64. Kohn, W. & Sham, L. J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Phys. Rev.* **140**, A1133 (1965).

65. 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.* **107**, 187–222 (1997).
66. Grimme, S., Antony, J., Ehrlich, S. & Krieg, H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *J. Chem. Phys.* **132**, (2010).
67. Protocol, M.-, Cao, C., Chen, Y., Wu, Y. & Deumens, E. OPAL : A Multiscale Multicenter Simulation Package Based on MPI-2 Protocol. *Int. J. Quantum Chem.* **111**, 4020–4029 (2011).
68. Becke, A. D. & Johnson, E. R. A density-functional model of the dispersion interaction. *J. Chem. Phys.* **123**, 154101 (2005).
69. Frisch, M. J., Pople, J. A. & Binkley, J. S. Self-consistent molecular orbital methods 25. Supplementary functions for Gaussian basis sets. *J. Chem. Phys.* **80**, 3265–3269 (1984).
70. Blanco, S., Lesarri, A., López, J. C. & Alonso, J. L. The gas-phase structure of alanine. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11675–11683 (2004).
71. Vaquero, V., Sanz, M. E., López, J. C. & Alonso, J. L. The structure of uracil: A laser ablation rotational study. *J. Phys. Chem. A* **111**, 3443–3445 (2007).
72. Cabezas, C., Varela, M., Peña, I., López, J. C. & Alonso, J. L. The microwave spectrum of neurotransmitter serotonin. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 13618–13623 (2012).
73. Varela, M., Cabezas, C., López, J. C. & Alonso, J. L. Rotational spectrum of paracetamol. *J. Phys. Chem. A* **117**, 13275–13278 (2013).
74. Levy, D. H. Laser Spectroscopy of Cold Gas-Phase Molecules. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pc.31.100180.001213> **31**, 197–225 (2003).
75. Bassi, D., Laine, D., York, N. & Oxford, •. *Atomic and Molecular Beam Methods VOLUME 1 GIACINTO SCOLES.*
76. Brown, G. G. *et al.* A broadband Fourier transform microwave spectrometer based on chirped pulse excitation. *Rev. Sci. Instrum.* **79**, 053103 (2008).
77. Mata, S., Pena, 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. *J. Mol. Spectrosc.* **280**, 91–96 (2012).
78. Alonso, J. L. *et al.* Construction of a molecular beam Fourier transform microwave spectrometer used to study the 2,5-dihydrofuran-argon van der Waals complex. *Chem. Phys.* **218**, 267–275 (1997).
79. Grabow, J., Stahl, W. & Dreizler, H. A multioctave coaxially oriented beam-resonator arrangement Fourier-transform microwave spectrometer. *Rev. Sci.*

- Instrum.* **67**, 4072 (1998).
80. Maestro | Schrödinger.
  81. Pickett, H. M. The fitting and prediction of vibration-rotation spectra with spin interactions. *J. Mol. Spectrosc.* **148**, 371–377 (1991).
  82. Z.Kisiel, in: J.Demaison et al. (Eds.), *Spectroscopy from Space*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2001, pp.91-106
  83. JB95 Spectral fitting program | NIST. <https://www.nist.gov/services-resources/software/jb95-spectral-fitting-program>.
  84. Gordy, W. *Microwave molecular spectra*. (Wiley-Interscience, 1984).
  85. Grabow, J., Stahl, W. & Dreizler, H. A multioctave coaxially oriented beam-resonator arrangement Fourier-transform microwave spectrometer. *Rev. Sci. Instrum.* **67**, 4072 (1998).
  86. Ruoff, R. S., Klots, T. D., Emilsson, T. & Gutowsky, H. S. Relaxation of conformers and isomers in seeded supersonic jets of inert gases. *J. Chem. Phys.* **93**, 3142 (1998).
  87. Godfrey, P. D., Brown, R. D. & Rodgers, F. M. The missing conformers of glycine and alanine: relaxation in seeded supersonic jets. *J. Mol. Struct.* **376**, 65–81 (1996).
  88. Peng, C. & Bernhard Schlegel, H. Combining Synchronous Transit and Quasi-Newton Methods to Find Transition States. *Isr. J. Chem.* **33**, 449–454 (1993).
  89. Johnson, E. R. *et al.* Revealing noncovalent interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 6498–6506 (2010).
  90. Contreras-García, J. *et al.* NCIPLOT: A program for plotting noncovalent interaction regions. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 625–632 (2011).
  91. Schnitzler, E. G. & Jäger, W. The benzoic acid–water complex: a potential atmospheric nucleation precursor studied using microwave spectroscopy and ab initio calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 2305–2314 (2014).
  92. Braun, J. E., Mehnert, T. H. & Neusser, H. J. Binding energy of van der Waals- and hydrogen-bonded clusters by threshold ionization techniques. *Int. J. Mass Spectrom.* **203**, 1–18 (2000).
  93. Saha, P., Swarup Das, P. & Abdul, A. A REVIEW ON COMPUTER AIDED DRUG DESIGN IN DRUG DISCOVERY Pharmacy Institute Greater Noida, Dr. *DRUG Discov. Artic. WORLD J. Pharm. Pharm. Sci.* **6**, (2017).
  94. PDB 1aj0 structure summary < Protein Data Bank in Europe (PDBe) < EMBL-EBI. <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1AJ0>.
  95. Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R. & Sherman, W.

Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **27**, 221–234 (2013).

96. Li, J. *et al.* The VSGB 2.0 Model: A Next Generation Energy Model for High Resolution Protein Structure Modeling. *Proteins* **79**, 2794 (2011).
97. Uhlemann, T., Berden, G. & Oomens, J. THE EUROPEAN PHYSICAL JOURNAL D Preferred protonation site of a series of sulfa drugs in the gas phase revealed by IR spectroscopy. *Eur. Phys. J. D* **75**, 23 (2021).

## 8. TABLAS Y FIGURAS

- **Esquema 1.** Izquierda: estructura química de la sulfanilamida. Derecha: estructura química del ácido para-aminobenzoico (PABA).
- **Esquema 2.** Biosíntesis del ácido tetrahidrofólico (forma reducida y activa del ácido fólico). Imagen recogida de la referencia <sup>8</sup>.
- **Figura 1.** Interacciones intermoleculares entre la sulfanilamida y la DHPS de la E.coli. Imagen recogida de la referencia 7.
- **Figura 2.** a) Importancia de la solvatación en procesos biológicos tales como el dulzor (recopilado de la referencia<sup>20</sup>). b) Variación de la energía libre de Gibbs durante el acoplamiento molecular ligando-receptor.
- **Figura 3.** El poder de la espectroscopia de microondas, imagen recogida de la referencia.
- **Figura 4.** clasificación de las moléculas según sus momentos de inercia.
- **Figura 5.** Diagrama de correlación para los trompos asimétricos.
- **Figura 6.** Comparación de los niveles de energía entre un rotor rígido y uno no rígido. A consecuencia de la distorsión centrífuga los niveles rotacionales de J altos se distancian en mayor medida entre ambos modelos.
- **Figura 7.** Representación de las distribuciones de carga nuclear.
- **Figura 8.** esquemas de acoplamiento para sistemas con dos núcleos con cuadrupolo nuclear. a) Bardeen-Townes, b) Foley, c) diagrama de energía de la estructura hiperfina que surge de dos espines nucleares  $I = 1$  para la transición rotacional  $3_{03}-2_{02}$
- **Figura 9.** a) Esquema del espectrómetro CP-FTMW de bocinas que opera en el rango de 2-8GHz. b) Vista lateral del espectrómetro LA-CP-FTMW donde se aprecia el conjunto parabólico.
- **Figura 10.** Secuencia de pulsos para un solo ciclo experimental en el sistema LA-MB-FTMW.
- **Figura 11.** Las cuatro conformaciones más estables de la sulfanilamida calculadas a B3LYP-D3(BJ)/6-311++G(d,p).
- **Figura 12.** Las seis estructuras más estables de la sulfanilamida-agua calculadas a nivel B3LYP-D3(BJ)/6-311++G(d,p).
- **Figura 13.** Simulación de espectro de la sulfanilamida para las transiciones de *tipo  $\alpha$*  en la región de 2-18GHz
- **Figura 14.** Panel superior: Espectro de rotación de banda ancha experimental de la sulfanilamida en la región de frecuencias 1.5-6.5 GHz, remarcando las transiciones de tipo  *$\alpha$*  de la progresión R ( $J' \leftarrow J''$ ). En triángulos verdes se indican las transiciones observadas del isotopólogo de <sup>34</sup>S. Panel inferior: Espectro de rotación de banda ancha experimental en la región de 6-14 GHz. Las estrellas rojas indican las transiciones del monómero y los triángulos azules las correspondientes al complejo con agua

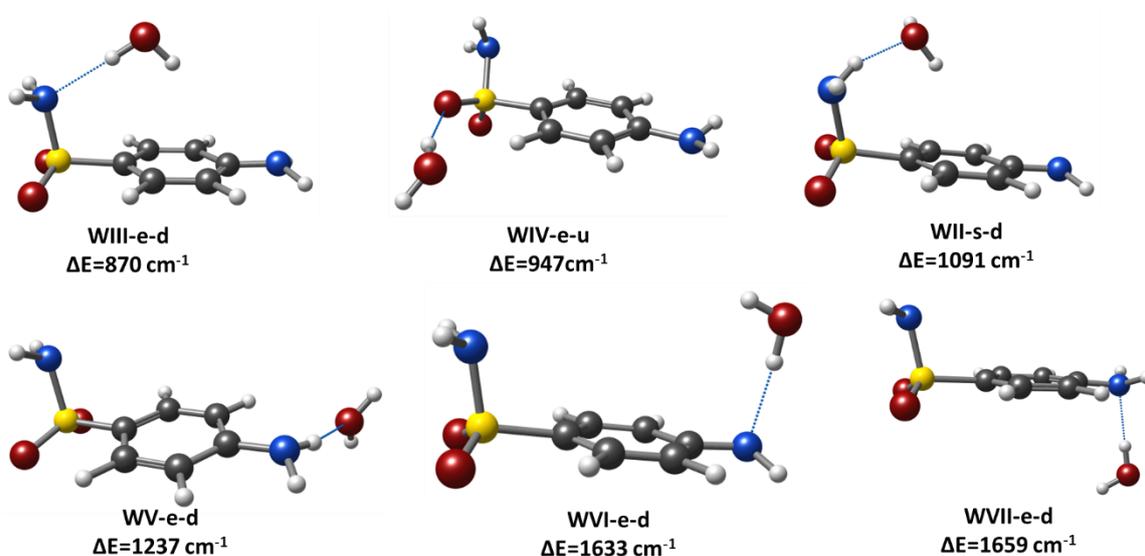
- **Figura 15.** Sección experimental del espectro rotacional de banda ancha de la sulfanilamida donde se muestra una comparación entre la transición de rotación  $8_{08} \leftarrow 7_{07}$  para los isotopólogos de  $^{13}\text{C}$  y  $^{34}\text{S}$  de la conformación eclipsada de la sulfanilamida.
- **Figura 16:** Transición  $4_{14} \leftarrow 3_{13}$  del rotámero encontrado para el monómero de la sulfanilamida. Se muestra una comparación entre la estructura hiperfina experimental y la predicha para las configuraciones eclipsada y alternada.
- **Figura 17.** Comparación de la dependencia de intensidades de transiciones de tipo  $c$  seleccionadas para el rotámero I a distintos niveles de polarización: a) 1dBm and b) -6.5 dBm
- **Figura 18.** Comparación de la dependencia de intensidades de transiciones de tipo  $a$  seleccionadas para el rotámero I empleando un nivel de polarización distinto: a) 1dBm and b) -6.5 dBm
- **Figura 19.** (a) SEP de relajación para la rotación del ángulo diedro C-C-N-H del SA. Este barrido indica que la interconversión entre los conformeros  $u$  y  $d$  es menor de  $100\text{ cm}^{-1}$ . (b) SEP de relajación para la rotación del ángulo diedro C-S-N-H del SA. Este barrido indica que la interconversión entre los conformeros eclipsada y alterada es superior de  $1000\text{ cm}^{-1}$ . (c) Interconversión entre las configuraciones eclipsada y alterada de la SA a través del estado de transición empleando el método qst3. Todos estos cálculos fueron realizados usando B3LYP-D3(BJ)/6-311++G(d,p). (b) y (c) solo se expone la porción relevante de la molécula para una mejor visualización.
- **Figura 20.** (a) Interconversión entre las conformaciones alternada y eclipsada del complejo sulfanilamida-agua a través del estado de transición empleando el método qst3. La barrera estimada es de  $380\text{ cm}^{-1}$  (b) PES de relajación de la rotación del ángulo diedro H-O-H-O del SA-agua. En este PES apreciamos que la interconversión entre los conformeros e-WI y e-WII es inferior de  $28\text{ cm}^{-1}$ . Todos los cálculos fueron realizados con metodología B3LYP-D3(BJ)/6-311++G(d,p).
- **Figura 21.** Comparación entre las configuraciones eclipsada (izquierda) y alternada (derecha) del complejo de la sulfanilamida-agua, donde se muestran los resultados del análisis de las interacciones inter- e intramoleculares usando NCIPLOT. a) vista isométrica, b) de perfil y c) de planta. La superficie roja corresponde a fuerzas de repulsión fuertes, las superficies azules a fuerzas no covalentes de fuertes atracción y las superficies verdes a una interacción atractiva débil.
- **Figura 22.** Panel izquierdo: comparación entre la estructura obtenida experimentalmente de la sulfanilamida en condiciones de aislamiento (abajo) y su estructura acoplada dentro del centro activo de la  $1\text{aj}0'$ , tal y como es encontrada en el cristal<sup>94</sup> y minimizada con ausencia de disolvente (arriba). Panel central: representación visual 2D de las interacciones de la sulfanilamida dentro del centro

activo de la 1aj0'. Panel derecho: comparación entre las estructuras obtenidas experimentalmente del complejo sulfanilamida-agua en condiciones de aislamiento (abajo) y su estructura acoplada dentro del centro activo de la 1aj0', tal y como es hallada en el cristal<sup>94</sup> y minimizada con el modelo VSGB (arriba).

- **Figura 23.** Esquema simplificado del posible trayecto de la sulfanilamida desde el medio extracelular hasta el centro activo de la DHPS.
- **Tabla 1.** Reglas de selección para trompos asimétricos.
- **Tabla 2.** Comparación de las distintas metodologías de cálculo.
- **Tabla 3.** Parámetros espectroscópicos y teóricos para los cuatro conformeros más estables del monómero de la SA, junto con las energías calculadas.
- **Tabla 4.** Parámetros espectroscópicos y teóricos para los conformeros más estables del cluster sulfanilamida-agua, junto con las energías calculadas.
- **Tabla 5:** Comparación de los parámetros espectroscópicos de los rotámeros caracterizados con los valores teóricos predichos para las estructuras más estables del monómero
- **Tabla 6.** Parámetros rotacionales encontrados de los isotopólogos de la sulfanilamida.
- **Tabla 7:** Comparación de los parámetros espectroscópicos de los rotámeros caracterizados con los valores teóricos predichos para las estructuras más estables del clúster con agua.
- **Tabla 8.** Comparación de las energías de enlace de la sulfanilamida-agua con sistemas similares.

## 9. ANEXO

**Figura A0X.** Algunas de las estructuras menos estables de sulfanilamida-agua calculadas mediante B3LYP/6-311<sup>++</sup>G(d,p) D3(BJ) y su energía relativa al mínimo global.



**Tabla A01.** Parámetros espectroscópicos y energéticos de los conformeros más altos en energía del complejo con agua.

Especie	e-d- WIII	e-u- WIV	s-d- WII	e-d- WV	e-d- WVI	e-d-WVII
$A^a$	1365.8	1133.8	1345.2	1802.0	1648.4	1755.0
$B$	508.2	534.4	516.9	361.5	374.8	358.9
$C$	469.8	393.2	457.4	323.0	369.9	358.7
$ \mu_a $	4.7	-4.0	8.1	7.3	-2.0	0.5
$ \mu_b $	0.7	1.8	2.4	0.7	-0.3	-1.2
$ \mu_c $	0.0	-2.5	1.1	2.1	0.0	5.6
$\chi_{aa,NA}$	2.70	2.61	2.74	2.59	1.71	1.39
$\chi_{bb,NA}$	-4.92	2.22	-2.46	1.98	-3.69	1.73
$\chi_{cc,NA}$	2.22	-4.84	-0.28	-4.58	1.98	-3.13
$\chi_{aa,NS}$	-3.09	-2.86	-4.55	-2.89	-4.39	-1.27
$\chi_{bb,NS}$	1.65	0.25	1.89	1.16	2.78	1.52
$\chi_{cc,NS}$	1.45	2.61	2.66	1.73	1.61	-0.25
$\Delta E^b$	1144	1201	1302	1644	1905	1933
$\Delta E_{ZPE}^c$	870	947	1091	1237	1633	1659
$\Delta G^d$	1144	691	1008	665	784	729

**Tabla A02.** Frecuencias y residuales medidos (en MHz) para las transiciones rotacionales del rotámero I utilizando el espectrómetro LA-CP-FTMB.

$J'$	$K'_{-1}$	$K'_{+1}$	$J''$	$K''_{-1}$	$K''_{+1}$	Vobs	Vobs - Vcal
1	1	0	0	0	0	3175.558	-0.064
2	1	1	1	1	0	2208.585	0.039
2	1	1	1	0	1	4305.700	0.033
3	0	3	2	0	2	3231.695	-0.042
3	1	3	2	1	2	3157.551	0.042
3	1	2	2	1	1	3312.222	0.010
3	2	1	2	2	0	3239.375	0.014
3	2	2	2	2	1	3235.518	0.014
3	1	2	2	0	2	5461.852	0.013
4	0	4	3	0	3	4304.363	-0.044
4	1	4	3	1	3	4209.059	0.031
4	1	3	3	1	2	4415.175	0.040
4	2	3	3	2	2	4313.251	-0.006
4	2	3	4	1	3	5958.213	0.067
5	0	5	4	0	4	5373.322	-0.048
5	1	5	4	1	4	5259.590	0.034
5	1	4	4	1	3	5517.008	-0.030
5	2	3	4	2	2	5409.582	0.078
5	2	4	4	2	3	5390.359	-0.010
5	3	3	4	3	2	5395.762	0.066
5	4	2	4	4	1	5394.643	-0.001
5	2	4	5	1	4	5831.447	-0.029
6	0	6	5	0	5	6437.663	-0.045
6	1	6	5	1	5	6308.940	-0.051
6	2	5	5	2	4	6466.643	-0.037
6	2	5	6	1	5	5680.448	-0.082
7	2	6	7	1	6	5505.994	0.002
8	2	7	8	1	7	5308.782	0.033
9	2	8	9	1	8	5089.941	0.005
10	2	9	10	1	9	4850.980	-0.002
11	2	10	11	1	10	4593.660	0.003
12	2	11	12	1	11	4320.141	0.010
6	2	4	5	2	3	6499.966	-0.003
6	1	5	5	1	4	6617.646	0.028
7	1	7	6	1	6	7357.157	-0.005
7	0	7	6	0	6	7496.702	0.001
7	2	6	6	2	5	7542.059	0.037
7	2	5	6	2	4	7594.869	0.061
7	3	4	6	3	3	7558.286	0.075
7	3	5	6	3	4	7556.878	0.076
7	4	3	6	4	2	7554.286	-0.009
7	5	3	6	5	2	7552.907	-0.007
7	1	6	6	1	5	7716.553	-0.008
5	1	4	4	0	4	7858.135	0.226
2	2	0	1	1	0	8346.013	-0.119
2	2	1	1	1	1	8396.418	-0.297
8	1	8	7	1	7	8404.021	0.060
8	0	8	7	0	7	8549.908	0.036
8	2	7	7	2	6	8616.259	0.002
8	3	6	7	3	5	8638.163	-0.001
8	3	5	7	3	4	8640.974	-0.003
8	2	6	7	2	5	8694.363	0.016
8	1	7	7	1	6	8813.495	-0.006
6	1	5	5	0	5	9101.634	-0.531
3	2	1	2	1	1	9376.649	-0.284
9	1	9	8	1	8	9449.298	0.019
3	2	2	2	1	2	9526.503	-0.256
9	0	9	8	0	8	9597.005	0.007
9	2	8	8	2	7	9689.182	-0.037
9	4	5	8	4	4	9715.740	-0.044
9	5	5	8	5	4	9712.782	-0.030
9	3	7	8	3	6	9720.027	-0.018
9	3	6	8	3	5	9725.203	0.016
9	2	7	8	2	6	9798.715	0.081
9	1	8	8	1	7	9908.043	0.009
7	1	6	6	0	6	10381.271	0.242

4	2	2	3	1	2	10387.249	-0.325
10	1	10	9	1	9	10493.089	0.038
10	0	10	9	0	9	10638.225	0.022
4	2	3	3	1	3	10682.478	0.055
10	2	9	9	2	8	10760.763	0.003
10	5	6	9	5	5	10793.254	-0.030
10	4	7	9	4	6	10797.133	-0.079
10	4	6	9	4	5	10797.405	0.007
10	3	8	9	3	7	10802.437	0.049
10	3	7	9	3	6	10811.215	0.052
10	2	8	9	2	7	10907.462	0.092
10	1	9	9	1	8	10999.714	-0.002
5	2	3	4	1	3	11381.920	-0.023
11	1	11	10	1	10	11535.253	0.003
11	0	11	10	0	10	11673.966	0.010
8	1	7	7	0	7	11698.074	0.245
11	2	10	10	2	9	11830.726	-0.007
5	2	4	4	1	4	11863.805	0.041
11	6	5	10	6	4	11871.301	-0.060
11	5	7	10	5	6	11874.133	-0.024
11	4	8	10	4	7	11879.319	-0.013
11	3	9	10	3	8	11885.108	0.005
11	3	8	10	3	7	11899.301	0.026
11	2	9	10	2	8	12019.995	0.090
11	1	10	10	1	9	12088.032	-0.026
6	2	4	5	1	4	12364.439	-0.441
12	1	12	11	1	11	12575.869	-0.007
12	0	12	11	0	11	12705.011	-0.012
12	2	11	11	2	10	12898.961	-0.039
12	5	8	11	5	7	12955.369	-0.103
12	4	9	11	4	8	12962.091	-0.008
12	4	8	11	4	7	12962.768	-0.024
12	3	10	11	3	9	12968.050	-0.016
12	3	9	11	3	8	12989.899	-0.035
9	1	8	8	0	8	13056.330	0.339
6	2	5	5	1	5	13070.948	0.060
12	2	10	11	2	9	13135.328	0.045
12	1	11	11	1	10	13172.444	-0.084
7	2	5	6	1	5	13342.059	-0.010
3	3	0	2	2	0	13591.955	0.238
13	1	13	12	1	12	13614.978	0.012
13	0	13	12	0	12	13732.320	-0.039
13	2	12	12	2	11	13965.376	-0.055

**Tabla A03.** Frecuencias y residuales medidos (en MHz) para las transiciones rotacionales del isotópomo de  $^{34}\text{S}$  del rotámero I utilizando el espectrómetro LA-CP-FTMB.

$J'$	$K'_{-1}$	$K'_{+1}$	$J''$	$K''_{-1}$	$K''_{+1}$	Vobs	Vobs - Vcal
4	1	4	3	1	3	4180.469	-0.037
5	0	5	4	0	4	5336.377	-0.007
5	1	5	4	1	4	5223.998	0.046
5	1	5	4	1	3	5477.823	0.001
5	2	4	4	2	3	5352.895	0.004
6	0	6	5	0	5	6393.617	0.003
6	1	6	5	1	5	6266.322	-0.013
6	2	5	4	2	4	6421.772	-0.005
7	0	7	6	0	6	7445.715	0.018
7	2	6	6	2	5	7489.677	-0.046
7	2	5	6	2	4	7541.061	0.067
7	1	6	6	1	5	7661.922	0.027
8	1	8	7	1	7	8347.451	0.094
8	0	8	7	0	7	8492.080	0.017
8	2	7	7	2	6	8556.652	0.074
8	1	7	7	1	6	8751.230	0.038
9	1	9	8	1	8	9385.742	0.006
9	0	9	8	0	8	9532.567	0.049
9	2	8	8	2	7	9622.184	-0.016
9	2	7	8	2	6	9728.670	0.093
9	1	8	8	1	7	9838.173	0.010
10	1	10	9	1	9	10422.628	0.018
10	0	10	9	0	9	10567.213	0.052
10	2	9	9	2	8	10686.417	-0.024
10	3	7	9	3	6	10735.322	0.019
10	2	8	9	2	7	10829.123	0.045
10	1	9	9	1	8	10922.369	-0.006
11	1	11	10	1	10	11457.914	-0.029
11	0	11	10	0	10	11596.446	0.022
11	2	10	10	2	9	11749.144	-0.015
11	3	8	10	3	7	11815.600	0.009
11	2	9	10	2	8	11933.380	0.025
12	1	12	11	1	11	12491.707	-0.030
12	0	12	11	0	11	12621.048	0.013
12	2	11	11	2	10	12810.173	-0.046
12	3	10	11	3	9	12877.363	-0.051
12	3	9	11	3	8	12898.272	-0.062
12	2	10	11	2	9	13040.533	0.030
12	1	11	11	1	10	13080.573	-0.023
13	1	13	12	1	12	13524.012	-0.013
13	0	13	12	0	12	13641.922	0.027
13	2	12	12	2	11	13869.459	-0.035
8	3	6	7	3	5	8577.896	0.031
8	3	5	7	3	4	8580.546	-0.008
10	3	8	9	3	7	10726.913	-0.000
11	3	9	10	3	8	11802.006	-0.031
11	1	10	10	1	9	12003.323	-0.034
13	3	11	12	3	10	13952.857	-0.040
13	3	10	12	3	9	13983.914	-0.043

**Tabla A04.** Frecuencias y residuales medidos (en MHz) para las transiciones rotacionales de los isotómeros de  $^{13}\text{C}_2=^{13}\text{C}_6$  rotámero I utilizando el espectrómetro LA-CP-FTMB.

$J'$	$K'_{-1}$	$K'_{+1}$	$J''$	$K''_{-1}$	$K''_{+1}$	Vobs	Vobs - Vcal
6	1	6	5	1	5	6299.407	-0.029
5	1	4	4	1	3	5512.680	-0.038
5	2	3	4	2	2	5404.192	-0.011
5	0	5	4	0	4	5366.679	-0.023
4	1	4	3	1	3	4202.741	-0.027
8	0	8	7	0	7	8537.560	0.034
8	1	8	7	1	7	8391.008	0.056
8	1	7	7	1	6	8806.062	0.019
9	1	9	8	1	8	9434.502	0.034
9	0	9	8	0	8	9582.456	0.041
9	2	8	8	2	7	9677.780	-0.097
9	1	8	8	1	7	9899.330	-0.015
10	1	10	9	1	9	10476.405	0.011
10	0	10	9	0	9	10621.322	0.057
10	2	8	9	2	7	10899.642	0.017
10	1	9	9	1	8	10989.671	-0.001
11	1	11	10	1	10	11516.677	-0.027
11	0	11	10	0	10	11654.645	0.044
11	2	10	10	2	9	11816.371	-0.061
11	2	9	10	2	8	12011.893	0.028
11	1	10	10	1	9	12076.479	-0.032
12	1	12	11	1	11	12555.363	-0.042
12	0	12	11	0	11	12683.287	0.037
12	2	10	11	2	9	13126.909	0.034
7	0	7	6	0	6	7486.450	0.019
7	2	6	6	2	5	7533.433	0.006
7	2	5	6	2	4	7588.246	0.077
7	1	6	6	1	5	7710.262	0.032
8	2	7	7	2	6	8606.317	0.006
10	2	9	9	2	8	10747.937	-0.030
10	3	7	9	3	6	10800.409	0.011
11	3	9	10	3	8	11872.726	0.019
12	2	11	11	2	10	12883.078	-0.050
12	3	9	11	3	8	12977.742	-0.042
13	0	13	12	0	12	13708.183	-0.036

**Tabla A05.** Frecuencias y residuales medidos (en MHz) para las transiciones rotacionales de los isotopómeros de  $^{13}\text{C}_3\text{-}^{13}\text{C}_5$  rotámero I utilizando el espectrómetro LA-CP-FTMB.

$J'$	$K'_{-1}$	$K'_{+1}$	$J''$	$K''_{-1}$	$K''_{+1}$	Vobs	Vobs - Vcal
5	1	5	4	1	4	5231.762	0.012
5	0	5	4	0	4	5345.9831	-0.038
5	1	4	4	1	3	5490.7481	-0.010
6	1	6	5	1	5	6275.511	-0.065
6	0	6	5	0	5	6404.635	-0.047
7	0	7	6	0	6	7457.942	0.030
7	2	6	6	2	5	7504.210	0.070
8	0	8	7	0	7	8505.245	0.029
8	1	8	7	1	7	8359.318	0.049
8	1	7	7	1	6	8771.176	0.017
9	1	9	8	1	8	9398.937	0.030
9	0	9	8	0	8	9546.392	0.001
9	1	8	8	1	7	9860.267	0.030
10	0	10	9	0	9	10581.626	0.038
10	1	10	9	1	9	10436.975	-0.001
10	2	9	9	2	8	10706.315	-0.049
11	1	11	10	1	10	11473.428	-0.020
11	0	11	10	0	10	11611.354	0.046
11	2	10	10	2	9	11770.760	-0.013
11	1	10	10	1	9	12029.102	-0.028
12	1	12	11	1	11	12508.327	-0.003
12	0	12	11	0	11	12636.335	-0.016
8	3	6	7	3	5	8595.227	-0.010
8	2	6	7	2	5	8652.605	0.080
9	2	8	8	2	7	9640.332	-0.023
10	2	8	9	2	7	10855.718	0.035
12	2	11	11	2	10	12833.397	-0.047
12	3	10	11	3	9	12903.790	0.005
12	3	9	11	3	8	12926.387	-0.026
13	1	13	12	1	12	13541.653	-0.007
13	0	13	12	0	12	13657.723	0.018
13	2	12	12	2	11	13894.190	-0.051

**Tabla A06.** Frecuencias y residuales medidos (en MHz) para las transiciones rotacionales de los isotopómeros de  $^{13}\text{C}_4$  rotámero I utilizando el espectrómetro LA-CP-FTMB

$J'$	$K'_{-1}$	$K'_{+1}$	$J''$	$K''_{-1}$	$K''_{+1}$	Vobs	Vobs - Vcal
7	0	7	6	0	6	7439.174	-0.001
8	0	8	7	0	7	8484.741	0.075
9	0	9	8	0	8	9524.308	0.045
9	1	8	8	1	7	9829.338	0.069
10	1	10	9	1	9	10413.578	0.006
10	0	10	9	0	9	10558.100	0.039
10	1	9	9	1	8	10912.561	0.032
11	1	11	10	1	10	11447.997	-0.026
11	0	11	10	0	10	11586.490	0.003
12	1	12	11	1	11	12480.912	-0.027
12	0	12	11	0	11	12610.230	-0.029
8	1	8	7	1	7	8340.138	0.041
8	1	7	7	1	6	8743.293	0.028
10	2	9	9	2	8	10676.909	-0.040
11	2	10	10	2	9	11738.734	-0.004
12	2	11	11	2	10	12798.848	-0.027
12	3	9	11	3	8	12886.663	0.010
12	1	11	11	1	10	13068.773	-0.114

**Tabla A07.** Frecuencias y residuales medidos (en MHz) para las transiciones rotacionales del rotámero II utilizando el espectrómetro LA-CP-FTMB.

$J'$	$K'_{-1}$	$K'_{+1}$	$J''$	$K''_{-1}$	$K''_{+1}$	Vobs	Vobs - Vcal
7	3	4	6	3	3	6448.807	0.213
7	2	5	6	2	4	6635.755	0.069
8	0	8	7	0	7	6813.917	0.098
8	2	7	7	2	6	7170.192	0.006
8	3	6	7	3	5	7318.686	0.039
8	3	5	7	3	4	7408.802	0.013
8	1	7	7	1	6	7462.613	0.014
3	3	1	2	2	0	7507.873	-0.026
9	1	9	8	1	8	7563.386	-0.040
6	2	5	5	1	4	7565.108	-0.363
9	0	9	8	0	8	7610.924	0.069
8	2	6	7	2	5	7616.914	0.009
9	2	8	8	2	7	8035.138	0.011
7	2	6	6	1	5	8184.506	0.107
9	3	7	8	3	6	8232.431	-0.009
9	4	6	8	4	5	8245.525	0.066
9	4	5	8	4	4	8257.785	0.040
9	1	8	8	1	7	8317.371	-0.032
10	0	10	9	1	9	8328.290	-0.031
10	1	10	9	1	9	8378.405	-0.059
9	3	6	8	3	5	8387.216	0.061
4	3	2	3	2	1	8399.474	0.117
4	3	1	3	2	1	8402.269	0.156
10	0	10	9	0	9	8409.605	-0.001
4	3	2	3	2	2	8438.717	-0.202
4	3	1	3	2	2	8441.640	-0.036
9	2	7	8	2	6	8585.915	-0.023
10	2	9	9	2	8	8890.802	0.056
10	3	8	9	3	7	9140.937	-0.015
10	1	9	9	1	8	9145.949	0.021
11	0	11	10	1	10	9160.437	-0.023
11	1	11	10	1	10	9190.790	-0.037
10	4	6	9	4	5	9199.311	-0.017
11	0	11	10	0	10	9210.552	-0.051
11	1	11	10	0	10	9240.951	-0.019
5	3	3	4	2	2	9260.327	-0.023
5	3	2	4	2	2	9271.376	0.069
10	3	7	9	3	6	9382.449	0.005
5	3	2	4	2	3	9387.779	-0.016
10	2	8	9	2	7	9537.288	-0.051
11	2	10	10	2	9	9737.294	0.039
11	1	10	10	1	9	9952.645	-0.019
12	0	12	11	1	11	9983.194	0.008
12	1	12	11	1	11	10001.277	-0.029
12	0	12	11	0	11	10013.484	-0.069
12	1	12	11	0	11	10031.564	-0.107
11	3	9	10	3	8	10042.403	0.008
6	3	4	5	2	3	10073.570	-0.020
11	4	8	10	4	7	10102.382	-0.007
6	3	3	5	2	3	10106.135	0.087
11	4	7	10	4	6	10152.441	0.050
4	4	1	3	3	0	10334.808	-0.027
4	4	0	3	3	1	10335.223	-0.023
6	3	4	5	2	4	10336.364	-0.036
6	3	3	5	2	4	10368.892	0.033
11	3	8	10	3	7	10388.806	-0.001
11	2	9	10	2	8	10466.878	-0.045
12	2	11	11	2	10	10575.306	0.025
12	1	11	11	1	10	10745.428	-0.035
13	0	13	12	1	12	10799.821	-0.009
13	1	13	12	1	12	10810.510	-0.001
13	0	13	12	0	12	10817.915	-0.034
7	3	5	6	2	4	10825.118	0.044
13	1	13	12	0	12	10828.609	-0.021
7	3	4	6	2	4	10904.655	0.045
12	3	10	11	3	9	10935.301	0.029

12	5	8	11	5	7	11008.614	-0.033
12	4	8	11	4	7	11120.061	-0.043
5	4	2	4	3	1	11243.501	-0.047
5	4	1	4	3	2	11246.518	0.067
7	3	5	6	2	5	11324.319	-0.021
12	2	10	11	2	9	11370.891	-0.046
12	3	9	11	3	8	11396.787	0.008
7	3	4	6	2	5	11403.887	0.005
13	2	12	12	2	11	11405.775	-0.014
8	3	6	7	2	5	11508.059	0.031
13	1	12	12	1	11	11532.615	0.070
14	1	14	13	1	13	11618.904	0.016
14	0	14	13	0	13	11623.347	0.011
14	1	14	13	0	13	11629.569	0.000
8	3	5	7	2	5	11677.631	-0.082
13	5	8	12	5	7	11955.524	0.031
13	4	10	12	4	9	11957.485	0.006
13	4	9	12	4	8	12105.241	0.032
6	4	3	5	3	2	12146.987	0.012
6	4	2	5	3	3	12158.848	0.194
14	2	13	13	2	12	12229.949	-0.009
13	2	11	12	2	10	12246.158	-0.056
14	1	13	13	1	12	12319.950	0.095
8	3	6	7	2	6	12346.873	0.024
13	3	10	12	3	9	12396.105	-0.041
15	0	15	14	1	14	12423.178	0.042
15	1	15	14	1	14	12426.767	0.026
15	0	15	14	0	14	12429.390	0.021
14	3	12	13	3	11	12691.288	-0.038
14	4	11	13	4	10	12879.840	-0.007
14	5	9	13	5	8	12903.790	-0.097
15	2	14	14	2	13	13049.021	-0.019
14	2	12	13	2	11	13091.330	-0.002
5	5	0	4	4	1	13157.779	-0.034
16	1	16	15	1	15	13234.326	0.054
16	0	16	15	0	15	13235.863	0.056
14	3	11	13	3	10	13378.397	-0.068
16	1	15	15	1	14	13904.817	0.040
15	2	13	14	2	12	13908.189	-0.003
8	4	5	7	3	4	13909.923	-0.093
8	4	4	7	3	4	13917.835	-0.038

**Tabla A08.** Frecuencias y residuales medidos (en MHz) para las componentes de la estructura hiperfina nuclear de cuádrupolo del rotámero I utilizando el espectrómetro LA-MB-FTMB.

$J'$	$K'_{-1}$	$K'_{+1}$	$I'$	$F'$	$J''$	$K''_{-1}$	$K''_{+1}$	$I''$	$F''$	Vobs	Vobs - Vcal
3	1	2	2	3	2	0	2	1	2	5462.734	0.003
3	1	2	3	2	2	0	2	2	1	5460.758	0.001
3	1	2	3	3	2	0	2	3	2	5460.914	0.003
3	1	2	3	4	2	0	2	3	3	5462.309	-0.002
3	1	3	4	3	2	0	2	3	2	5462.115	0.001
3	1	3	4	3	2	0	2	3	3	5462.866	-0.000
3	1	3	4	4	2	0	2	3	3	5461.958	-0.004
3	1	3	4	5	2	0	2	3	4	5461.910	-0.003
4	1	4	3	2	3	1	3	2	1	4209.095	0.002
4	1	4	4	4	3	1	3	3	3	4208.993	-0.005
4	1	4	4	4	3	1	3	3	4	4209.144	-0.002
4	1	4	5	5	3	1	3	4	4	4208.900	0.001
4	1	4	5	6	3	1	3	4	5	4209.007	0.003
4	2	3	3	3	3	2	2	3	2	4312.841	-0.003
4	2	3	3	4	3	2	2	3	4	4313.105	-0.005
4	2	3	4	3	3	2	2	3	3	4313.671	-0.002
4	2	3	4	5	3	2	2	3	4	4313.593	-0.000
4	2	3	5	4	3	2	2	3	3	4313.407	0.002
4	2	3	5	5	3	2	2	4	4	4312.924	-0.002
4	2	3	5	6	3	2	2	4	5	4313.256	0.001
5	0	5	4	5	4	0	4	3	4	5373.424	0.002
5	0	5	5	4	4	0	4	4	3	5373.404	0.004
5	0	5	5	6	4	0	4	4	5	5373.438	0.003
5	0	5	6	6	4	0	4	5	5	5373.331	-0.003
5	0	5	6	7	4	0	4	5	6	5373.350	0.000
5	2	3	4	4	4	2	2	3	3	5409.331	-0.001
5	2	3	4	5	4	2	2	3	4	5409.511	-0.001
5	2	3	5	4	4	2	2	4	3	5409.663	0.001
5	2	3	5	5	4	2	2	4	4	5409.463	0.001
5	2	3	5	6	4	2	2	4	5	5409.643	0.000
5	2	3	6	6	4	2	2	5	5	5409.345	-0.000
5	2	3	6	7	4	2	2	5	6	5409.526	0.003