



Facultad de Ciencias

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

Tesis Doctoral

**ESTUDIOS TEÓRICOS Y EXPERIMENTALES SOBRE LA
ESTRUCTURA DE AMIDAS Y PROTEÍNAS**

José Luis Barneto Lozano

Badajoz, 2005

Edita: Universidad de Extremadura

Servicio de Publicaciones

c/ Caldereros 2, Planta 3ª

Cáceres 10071

Correo e.: publicac@unex.es

<http://www.pcid.es/public.htm>

Universidad de Extremadura

Facultad de Ciencias

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**ESTUDIOS TEÓRICOS Y EXPERIMENTALES SOBRE LA
ESTRUCTURA DE AMIDAS Y PROTEÍNAS**

Memoria presentada por el Licenciado

D. José Luis Barneto Lozano para optar al grado de

Doctor en Ciencias

Universidad de Extremadura

Facultad de Ciencias

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

Vº Bº LOS DIRECTORES

Fdo. DR. D. REYES BABIANO CABALLERO

Fdo. DR. D. PEDRO CINTAS MORENO

Profesores Titulares de Química Orgánica de la Universidad de Extremadura

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A los Dres. D. Reyes Babiano y D. Pedro Cintas, por su dirección e inestimable ayuda en esta Tesis.

A los Dres. D. Martín Ávalos, D. José Luis Jiménez y D. Juan Carlos Palacios, por su estímulo, dedicación y apoyo.

A los Dres. Dña. Pilar Areces, Dña. Victoria Gil, D. Emilio Román, D. José Antonio Serrano y Dña. Guadalupe Silvero, por su ayuda y sus consejos.

A los Dres. D. José Luis Bravo y D. Ignacio López y a la Lda. Dña. Esther M^a Soledad Pérez, por la realización de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

Al Dr. D. Fernando Clemente, que nunca ha dejado una pregunta sin respuesta.

A los Dres. Dña. Anunciación Espinosa y D. David González, que me han resuelto tantas dudas, especialmente en cuestiones de estadística.

A Dña. Isabel M^a Cruz, por prestarme su ayuda cuando ha sido necesaria.

A todos mis compañeros de laboratorio, a quienes tantas veces he recurrido y con los que he compartido tan buenos momentos.

A la Junta de Extremadura - Fondo Social Europeo, por la concesión de una beca de formación del personal investigador.

A mis amigos, algunos ya mencionados, porque sin vosotros nada sería igual.

A mi familia, por vuestra ayuda y cariño, que me han aportado la tranquilidad necesaria para continuar con el trabajo.

A Ana, en la que he encontrado tanto apoyo y comprensión durante la realización de esta Tesis.

Y por último, a Lupe, que ha cambiado mi vida, y me aporta más ilusión cada día.

A mis padres

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes generales sobre las metodologías aplicadas	11
2.1. Cálculos computacionales	15
2.1.1. Mecánica molecular.....	16
2.1.2. Métodos de estructura electrónica.....	17
2.2. La anisotropía magnética en la función amida	22
3. Nuevas investigaciones	37
3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?	39
3.1.1. Resultados y discusión	51
3.1.1.1. Cálculos teóricos en <i>N</i> -alquilacetamidas.....	51
3.1.1.2. Correlaciones de RMN en <i>N</i> -alquilacetamidas.....	69
3.2. Correlaciones entre estructura y desplazamientos químicos en amidas secundarias	83
3.2.1. Resultados y discusión	89
3.2.1.1. Cálculos teóricos en <i>N</i> -alquilformamidas.....	90
3.2.1.2. Correlaciones de RMN en amidas secundarias.....	103

3.3. Correlaciones en proteínas	123
3.3.1. Resultados y discusión	139
3.3.1.1. Estudio teórico de la preferencia conformacional en torno al sustituyente acílico de amidas secundarias.....	139
3.3.1.2. Correlaciones de RMN en el sustituyente acílico de amidas secundarias..	155
3.3.1.3. Correlaciones de RMN en proteínas.....	166
4. Parte experimental	187
4.1. Métodos generales	189
4.2. Productos de partida	192
4.3. Procedimientos sintéticos	194
5. Conclusiones	211
Apéndices	217
A. Fundamento teórico de los cálculos computacionales	219
B. Gráficos adicionales	245
C. Resultados obtenidos al sustituir la ecuación [11] por la [12]	253

1. Introducción

La amplia presencia de la función amida en sustancias biológicamente activas como péptidos y proteínas, glico- y lipoproteínas y numerosos fármacos, así como en procesos de reconocimiento molecular abiótico, su utilización cada vez más frecuente en sistemas anfitrión-huésped útiles en el diseño de procesos supramoleculares, etc., motiva la necesidad de conocer en profundidad la conformación de estas sustancias en disolución para entender sus propiedades. Esta Tesis Doctoral evalúa los distintos factores que contribuyen al desplazamiento químico del entorno de la función amida en resonancia magnética nuclear (en adelante RMN), haciendo especial énfasis en la anisotropía magnética como vehículo para profundizar en su estructura y como herramienta de determinación estructural desde amidas simples a proteínas. Para ello hemos correlacionado datos geométricos obtenidos mediante cálculos teóricos con desplazamientos químicos experimentales de RMN.

La interpretación clásica^{1,2,3,4} de la estructura y propiedades de esta función tanto en fase gaseosa como en disolución o fase condensada, recurre al carácter parcial de doble enlace de la unión C(O)-N, que es consecuencia de la deslocalización del par de electrones no compartido del nitrógeno con el sistema π del grupo carbonilo. La Figura 1a muestra las dos formas resonantes que pueden dibujarse para esta función.

¹ *The Amide Linkage*; A. Greenberg, C. M. Breneman, J. F. Liebman, Eds.; Wiley: Nueva York, 2000.

² (a) B. C. Challis y J. A. Challis, *Comprehensive Organic Chemistry. The Synthesis and Reactions of Organic Compounds*; D. H. R. Barton y W. D. Ollis, Eds.; Pergamon: Oxford, 1979; Vol. 2, pp 957-1065. (b) F. Duus, *Comprehensive Organic Chemistry. The Synthesis and Reactions of Organic Compounds*; D. H. R. Barton y W. D. Ollis, Eds.; Pergamon: Oxford, 1979; Vol. 3, pp 373-487.

³ (a) W. E. Stewart y T. H. Siddall III, *Chem. Rev.* **1970**, *70*, 517-551 y referencias allí citadas. (b) H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1970**, *9*, 219-235. (c) M. Oki, *Top. Stereochem.* **1983**, *14*, 1-81.

⁴ (a) M. Feigel, *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 3054-3058. (b) C. B. LeMaster y N. S. True, *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 1307-1311.

1. INTRODUCCIÓN

Una consecuencia importante del carácter parcial de doble enlace de la unión C–N de las amidas y tioamidas es la existencia de los isómeros *E* y *Z*,⁵ debidos a la rotación impedida en torno a dicho enlace (Figura 1b). La existencia de estos isómeros rotacionales se ha establecido mediante estudios de espectroscopia Raman, espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear y medidas de momento dipolar. En algunos casos, se ha podido aislar un sólo isómero por cristalización a baja temperatura o complejación.¹⁻³

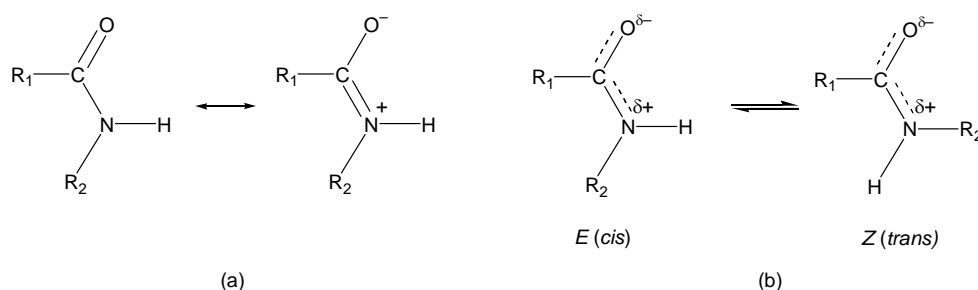


Figura 1. (a) Formas resonantes de la función amida. (b) Isómeros *E* y *Z* de amidas.

En trabajos realizados anteriormente en nuestro departamento se ha analizado la estructura de los amidoazúcares en disolución mediante RMN, y en estado cristalino mediante difracción de rayos X.⁶ También se han realizado cálculos semiempíricos sobre modelos y sobre las estructuras reales de los citados amidoazúcares. Como resultado de estos estudios se encontraron pautas de comportamiento general en estos

⁵ Aunque la rotación en torno al enlace C–N en amidas aparece generalmente como isomerización *cis/trans*, la definición de *cis* y *trans* es ambigua, y la nomenclatura estándar de la IUPAC desaconseja su uso: *A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds. Recommendations 1993*; Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1993.

⁶ (a) M. Avalos, R. Babiano, M. J. Carretero, P. Cintas, F. J. Higes, J. L. Jiménez y J. C. Palacios, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 615-628. (b) M. Avalos, R. Babiano, C. J. Durán, J. L. Jiménez y J. C. Palacios, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1992**, 2205-2215. (c) R. Babiano, C. Durán, J. Plumet, E. Román, E. Sánchez y J. A. Serrano, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1989**, 1923-1926.

compuestos y se propusieron una serie de reglas para la asignación estructural mediante RMN de sus isómeros *Z/E*. Su aplicación ha permitido alcanzar un conocimiento más exacto de la estructura en disolución de moléculas con interés biológico o farmacológico como son las *N*-alquil-*N*-glicosilamidas derivadas de ácidos grasos y los antibióticos istamicinas, *N*-acetilcalicheamicinas, glicocinamoilespermidinas, estreptomicinas, etc.^{6b} Estas reglas sólo se justifican si, como se muestra en la Figura 2 para la *N*-formil-β-D-glucopiranosilamina (**1**), se adopta la conformación *anti* entre el protón unido al nitrógeno y el protón anomérico. Los cálculos semiempíricos y estudios de rayos X realizados^{6a} también muestran esta preferencia.

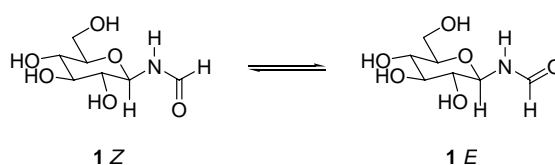


Figura 2. Equilibrio conformacional entre las estructuras *Z_{anti}* y *E_{anti}* de la *N*-formil-β-D-glucopiranosilamina.

Sorprendentemente, al tiempo que en los años 90 se publicaban estos resultados, aparecían también una serie de estudios teóricos a nivel *ab initio* (HF/4-31G, HF/4-31G**, HF/6-31G* y HF/6-31G**; en el apéndice A se describe el formalismo relativo a los métodos de cálculo) que concluían que las conformaciones más estables para amidas sencillas como la *N*-metilacetamida (**2**) eran las *syn*, aproximadamente 0,5 kcal/mol más estables que las *anti* (Figura 3).⁷ Además, en torno al año 2000 prestigiosas revistas como *Journal of the American Chemical Society*, *Journal of Chemical Physics*, *Journal of Physical Chemistry A* y *B*, etc., recogían un considerable

⁷ (a) W. L. Jorgensen y J. Gao, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4212-4216. (b) D. A. Dixon, K. D. Dobbs y J. J. Valentini, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 13435-13439. (c) S. Saito, Y. Toriumi, N. Tomioka y A. Itai, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4715-4720.

1. INTRODUCCIÓN

número de publicaciones en las que grupos como el de Krimm,⁸ Tasumi,⁹ Nandini,¹⁰ etc., basándose en estas preferencias conformacionales calculaban los espectros vibracionales de amidas simples (como la *N*-metilacetamida) y de pequeños péptidos, y asignaban bandas observadas experimentalmente a estas estructuras. En el mismo contexto metodológico se empleaba también el espectro rotacional de microondas.¹¹

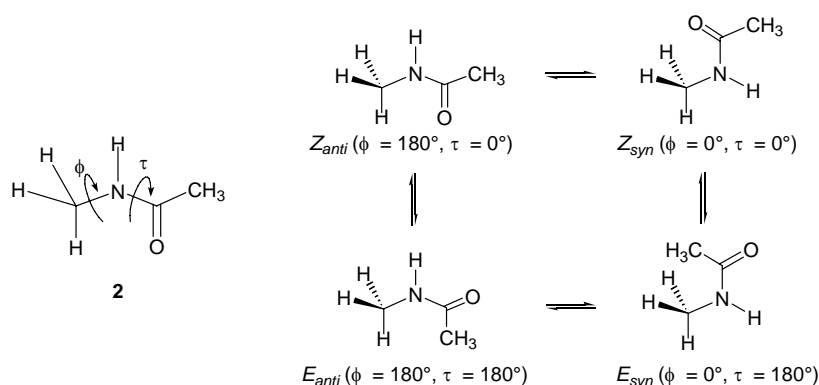


Figura 3. Conformaciones *syn* y *anti* de los isómeros *Z* y *E* de la *N*-metilacetamida (2).

Un análisis más cuidadoso de los antecedentes bibliográficos sobre cálculos computacionales de estructuras de amidas muestra una clara discrepancia de los diferentes modelos, aparentemente producida al aumentar el nivel de teoría. Así, igual

⁸ (a) T. C. Cheam y S. Krimm, *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, 1631-1641. (b) S. Krimm, S. Song y S. A. Asher, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 4290-4294. (c) N. G. Mirkin y S. Krimm, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 9016-9017. (d) S. Song, S. A. Asher, S. Krimm y K. D. Shaw, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1155-1163. (e) N. G. Mirkin y S. Krimm, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9742-9747. (f) X. G. Chen, R. Schweitzer-Stenner, S. A. Asher, N. G. Mirkin y S. Krimm, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 3074-3083. (g) X. G. Chen, S. A. Asher, R. Schweitzer-Stenner, N. G. Mirkin y S. Krimm, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2884-2895. (h) R. Schweitzer-Stenner, G. Sieler, N. G. Mirkin y S. Krimm, *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 118-127.

⁹ H. Torii, T. Tasumi, T. Kanazawa y M. Tasumi, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 309-314.

¹⁰ G. Nandini y D. N. Sathyanarayana, *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2002**, 579, 1-9.

¹¹ A. C. Fantoni y W. Caminati, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1996**, 92, 343-346.

que nuestros cálculos mostraban preferencia por conformaciones *anti* en amidoazúcares,^{6a} otros estudios anteriores basados en el método PRDDO¹² (*Partial Retention of Diatomic Differential Overlap*), utilizado desde los años setenta ya que simula con bajo coste los mínimos *ab initio* de los conjuntos de bases de Slater, y los cálculos de mecánica molecular, semiempíricos y *ab initio* (RHF, pero con conjuntos de bases menos sofisticados que los utilizados por Jorgensen⁷ y Nandini,¹⁰ como 3-21G, y 6-31G* sólo para punto simple) llevados a cabo por Riguera y col.¹³ evidenciaban también la mayor estabilidad de la conformación *anti* de las amidas simples. Sin embargo, cálculos posteriores a nivel *ab initio* con conjuntos de bases más potentes, como los MP2/6-311+G** realizados por Wiberg,¹⁴ insistían de nuevo en que la conformación *syn* es la más estable.

De todo lo anterior se deduce que es necesario explicar esta diferencia estructural aparente entre amidoazúcares y amidas simples y, de ser real, investigar qué factores inciden en este cambio de comportamiento. Para ello debíamos encontrar una metodología que permitiera contrastar las predicciones teóricas de los cálculos y los datos experimentales. La resonancia magnética nuclear podía ser una buena técnica para este objetivo.

La anisotropía magnética del grupo amido provoca fuertes influencias en el desapantallamiento químico de núcleos próximos. Curiosamente, tras una activa investigación desarrollada durante las primeras etapas de la RMN, no se lograron formular metodologías eficientes basadas en este fenómeno. Así, si bien en 1957

¹² S. Scheiner y C. W. Kern, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *12*, 7042-7050.

¹³ S. K. Latypov, J. M. Seco, E. Quiñoá y R. Riguera, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1538-1545.

¹⁴ K. B. Wiberg y D. J. Rush, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 826-830.

1. INTRODUCCIÓN

McConnell¹⁵ propuso ecuaciones generales con pretensiones de cuantificar el fenómeno (ver apartado 2.2 para más información), éstas eran de poca eficiencia práctica al incluir parámetros como el tensor de susceptibilidad magnética, que es poco conocido y difícil de calcular. Posteriormente, tras el estudio de un gran número de sustancias orgánicas se desarrollaron propuestas geométricas^{3a,3b} que describían cualitativamente el desapantallamiento originado en las diferentes regiones en torno a la función. Aunque en los últimos años han aparecido contribuciones notables¹⁶ que consideran la anisotropía magnética en la predicción del comportamiento en RMN de péptidos concretos, no se ha realizado una evaluación cuantitativa del fenómeno que permita su aplicación general.

Un segundo objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido la extrapolación de resultados hacia grandes moléculas como péptidos y proteínas. Como se resalta en una revisión reciente,¹⁷ la determinación de la estructura tridimensional de biomoléculas mediante RMN parte del efecto NOE como base, y su potencialidad se incrementa mediante el desarrollo de las técnicas multidimensionales. Mediante la sistemática de asignación secuencial de Wüthrich,¹⁸ se identifican los diferentes sistemas de espín de los aminoácidos unidos en la estructura primaria de la proteína, y su secuencia se

¹⁵ H. M. McConnell, *J. Chem. Phys.* **1957**, *27*, 226-229.

¹⁶ (a) D. C. Dalgarno, B. A. Levine y R. J. P. Williams, *Biosci. Rep.* **1983**, *3*, 443-452. (b) M. A. Jiménez, J. L. Nieto, J. Herranz, M. Rico y J. Santoro, *FEBS Lett.* **1987**, *221*, 320-324. (c) L. Szilagyi y O. Jardetzky, *J. Magn. Reson.* **1989**, *83*, 441-449. (d) K. Ösapay y D. A. Case, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9436-9444. (e) D. S. Wishart, B. D. Sykes y F. M. Richards, *Biochemistry* **1992**, *31*, 1647-1651. (f) M. P. Williamson y T. Asakura, *J. Magn. Reson., Ser. B* **1993**, *101*, 63-71. (g) K. Ösapay y D. A. Case, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 215-230. (h) R. D. Beger y P. H. Bolton, *J. Biomol. NMR* **1997**, *10*, 129-142. (i) D. Sitkoff y D. A. Case, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12262-12273. (j) G. J. Sharman, S. R. Griffiths-Jones, M. Jourdan y M. S. Searle, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12318-12324.

¹⁷ J. Jiménez-Barbero, *An. Quím.* **2002**, *98* (4), 18-23.

¹⁸ G. Wagner, A. Kumar y K. Wüthrich, *Eur. J. Biochem.* **1981**, *114*, 375-384.

establece fundamentalmente mediante experimentos COSY y NOESY. A su vez, los efectos NOE entre protones lejanos contienen información tridimensional de la biomolécula, ya que son directamente relacionables con la distancia a la que se encuentran en la conformación de la proteína.¹⁹ Pero lo que no explica esta eficiente técnica de asignación es la frecuencia de resonancia de los distintos núcleos. Sin duda, la anisotropía magnética del enlace peptídico debe ser un componente esencial en el desplazamiento de protones y en menor medida de carbonos, junto con otros factores identificables en el entorno químico. Tanto la ecuación de McConnell,¹⁵ como los modelos geométricos cualitativos propuestos posteriormente^{3a,3b} y nuestras investigaciones en amidoazúcares⁶ apuntan a un comportamiento de la anisotropía magnética relacionable con la geometría. Según la idea aceptada de que sólo podemos entender que un concepto está bien establecido cuando somos capaces de expresarlo matemáticamente, en esta Tesis Doctoral proponemos una estrategia cuyo objetivo final es cuantificar la anisotropía magnética que aprecian los núcleos que se encuentran empareados entre dos fragmentos de amida en la secuencia del péptido (Figura 4).

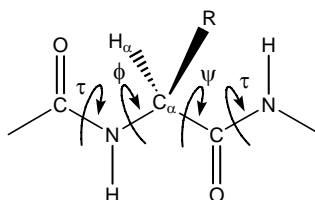


Figura 4. Estructura extendida de un péptido y ángulos diedros que la definen.

¹⁹ W. Braun, C. Bosch, L. R. Brown, N. Go y K. Wüthrich, *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, 667, 377-396.

1. INTRODUCCIÓN

Estos objetivos se encuentran desarrollados en esta memoria en los siguientes capítulos:

2. Antecedentes generales sobre las metodologías aplicadas.

3. Nuevas investigaciones.

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?²⁰

3.2. Correlaciones entre estructura y desplazamientos químicos en amidas secundarias.

3.3. Correlaciones en proteínas.

²⁰ En esta memoria se ha denominado, de forma genérica, a las estructuras RCO-NH₂, RCO-NHR' y RCO-NR'R'' como amidas primarias, secundarias y terciarias, respectivamente, y esta terminología se encuentra ampliamente difundida en la literatura científica moderna. Conviene, no obstante, mencionar que la IUPAC recomienda denominar amidas secundarias a *N*-acilamidas, es decir, la funcionalidad que en química orgánica se denomina imida. Véase: *A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds. Recommendations 1993*; Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1993, p 263.

2. Antecedentes generales sobre las metodologías aplicadas

La estrategia de trabajo de esta investigación se basa en un diálogo continuo entre los datos experimentales que aporta la RMN de amidas secundarias y el cálculo teórico de sus estructuras a un nivel cuyo coste en términos computacionales no impida abordar moléculas de un tamaño medio. La gran aportación de la RMN al conocimiento de la estructura en disolución es más que conocida. Como ejemplo, el trabajo de Karplus,²¹ que demuestra una relación trigonométrica entre núcleos vecinos y su ángulo de torsión, es uno de los artículos más citados del pasado siglo. Que existe una relación entre el desplazamiento químico de un determinado núcleo y su entorno químico es un concepto que viene perfeccionándose desde que la técnica de RMN es asequible al químico.²² Se acepta que la constante de apantallamiento que determina la posición de la señal de resonancia de un núcleo determinado se compone de una serie de contribuciones (ecuación [1]):

$$\sigma = \sigma_{\text{dia}} + \sigma_{\text{para}} + \sigma' + \sigma_{\text{medio}} \quad [1]$$

donde σ' tiene en cuenta la influencia de grupos vecinos que pueden reforzar o atenuar el campo magnético sobre el grupo, y σ_{medio} la influencia de las interacciones intermoleculares. A su vez, la componente diamagnética σ_{dia} se refiere al campo de sentido contrario inducido por el campo magnético externo en la nube electrónica del núcleo considerado, por lo que es desapantallante, mientras que el término σ_{para} influye de forma contraria. Como los electrones más próximos al núcleo apantallan más fuertemente que los alejados, y el ^1H sólo presenta orbitales s, el término σ_{dia} es

²¹ M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2870-2871.

²² (a) J. W. Emsley, J. Feeney y L. H. Sutcliffe, *High Resolution NMR Spectroscopy*; Pergamon: Oxford, 1965. (b) M. Hesse, H. Meier y B. Zeeh, *Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica*, 5^a ed.; Síntesis: Madrid, 1997; Capítulo 3. (c) L. M. Jackman y S. Sternhell, *Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry*, 2nd ed.; Pergamon Press: Oxford, 1972.

2. ANTECEDENTES GENERALES SOBRE LAS METODOLOGÍAS APLICADAS

particularmente importante en la resonancia magnética de protones. Por el contrario, el término σ_{para} se relaciona con la excitación de los electrones p, por lo que es importante en la resonancia de ^{13}C . Por otra parte, en el desplazamiento químico de núcleos próximos a la función amida influye notablemente su efecto anisotrópico (ver apartado 2.2), que en la formulación anterior quedaría recogido en el término σ' .

2.1. Cálculos computacionales.

La química computacional simula estructuras químicas y reacciones basándose totalmente o en parte en las leyes fundamentales de la física. Permite a los químicos sustituir o complementar estudios experimentales mediante la ejecución de cálculos en ordenadores. Puede ser, por ello, tanto un área de investigación independiente como una valiosa herramienta que aporta información extra a los estudios experimentales.²³ Mediante la modelación molecular podemos generar, visualizar y hacer predicciones de estructuras moleculares y de sus propiedades fisicoquímicas asociadas. También podemos aplicar estas potencialidades al reconocimiento molecular. Hay dos grandes áreas dentro de la química computacional: la mecánica molecular²⁴ y la teoría de estructura electrónica.^{23a,25} Ambas se enfrentan a los mismos objetivos:

- Cálculo de la energía de una estructura molecular (disposición espacial de átomos o de núcleos y electrones). Las propiedades relacionadas con la energía pueden predecirse también por algunos de estos métodos.
- Optimizaciones geométricas, que localizan la estructura molecular de menor energía a partir de una estructura dada. Dependen del gradiente de la energía, es decir, de su primera derivada respecto a las posiciones de los átomos.
- Cálculo de las frecuencias vibracionales de las moléculas. Dependen de la segunda derivada de la energía respecto a la estructura atómica, y permiten la

²³ (a) I. N. Levine, *Química Cuántica*, 1ª ed.; AC: Madrid, 1977. (b) J. B. Foresman y Æ. Frisch, *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*, 2ª ed.; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, 1996. (c) *Encyclopedia of Computational Chemistry*; P. v. R. Schleyer, N. L. Allinger, T. Clark, J. Gasteiger, P. A. Kollman, H. F. Schaefer III y P. R. Scheiner, Eds.; Wiley: Chichester, 1998.

²⁴ (a) U. Burkert y N. L. Allinger, *Molecular Mechanics*; ACS Monographs: Washington, D.C., 1982. (b) F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry*; Wiley: Chichester, 1999.

²⁵ A. Szabo y N. S. Ostlund, *Modern Quantum Chemistry*; McGraw-Hill: Nueva York, 1989.

2.1. Cálculos computacionales

caracterización de estructuras como mínimos o puntos de silla.²⁶ Los cálculos de frecuencias no son posibles o prácticos para todos los métodos de química computacional.

2.1.1. Mecánica molecular.

Las simulaciones de mecánica molecular utilizan las leyes de la física clásica para predecir las estructuras y propiedades de las moléculas.²⁴ Hay muchos métodos diferentes, y cada uno se caracteriza por utilizar un *campo de fuerza* particular. Un campo de fuerza tiene estos componentes:

- Una serie de ecuaciones que definen cómo varía la energía potencial de una molécula con las posiciones de sus distintos átomos.
- Una serie de tipos de átomo, que definen las características de un elemento dentro de un contexto químico específico. Por ejemplo, un átomo de carbono en un carbonilo es tratado de forma diferente que uno unido a tres átomos de hidrógeno. El tipo de átomo depende de la hibridación, carga y de los otros tipos de átomo a los que está enlazado.
- Una o más series de parámetros que fijan las ecuaciones y tipos de átomo a datos experimentales. Estas series de parámetros definen constantes de fuerza, que son valores utilizados en las ecuaciones para relacionar características del átomo con componentes de la energía, y datos estructurales tales como distancias y ángulos de enlace.

²⁶ Punto de silla: punto de la superficie de energía potencial que es un mínimo energético en todas las direcciones excepto en una, en la que es un máximo.

Los cálculos de mecánica molecular no tratan explícitamente los electrones en un sistema molecular, sino que realizan cálculos basados en las interacciones entre núcleos. Los efectos electrónicos se incluyen en la parametrización de los campos de fuerza. Esta aproximación hace que estos cálculos sean computacionalmente económicos, y permite su uso para sistemas de gran tamaño que contengan incluso varios miles de átomos. Sin embargo, ello conlleva también importantes limitaciones. Las más importantes son:

- Cada campo de fuerza produce buenos resultados solamente para un tipo limitado de moléculas, relacionadas con aquéllas para las que fue parametrizado. Ningún campo de fuerza puede utilizarse de forma general para todos los sistemas moleculares.
- Al no considerar los electrones, los métodos de mecánica molecular no pueden tratar problemas químicos donde predominen los efectos electrónicos. Por ejemplo, no pueden describir procesos que impliquen la formación o rotura de enlaces.

2.1.2. Métodos de estructura electrónica.

Los métodos de estructura electrónica utilizan las leyes de la mecánica cuántica en lugar de la física clásica como base para sus cálculos.^{23a,25} La mecánica cuántica establece que la energía y otras propiedades de una molécula relacionadas con ella pueden obtenerse resolviendo la ecuación de Schrödinger, desarrollada por este físico austríaco en los años veinte.²⁷

²⁷ (a) E. Schrödinger, *Ann. Physik* **1926**, 79, 361-376, 489. (b) E. Schrödinger, *Ann. Physik* **1926**, 80, 437-490. (c) E. Schrödinger, *Ann. Physik* **1926**, 81, 109-139.

$$H\Psi = E\Psi \quad [2]$$

Pero esta ecuación sólo puede resolverse de forma exacta para el átomo de hidrógeno, por lo que los métodos de estructura electrónica utilizan distintas aproximaciones matemáticas para su resolución. Hay dos grandes grupos de métodos de estructura electrónica:

- Métodos semiempíricos, como el PM3,²⁸ que usan parámetros derivados de resultados experimentales para simplificar el cálculo. Resuelven una forma aproximada de la ecuación de Schrödinger partiendo de los parámetros adecuados para el tipo de sistema químico en cuestión.
- Métodos *ab initio*,^{23a} que no utilizan ningún parámetro experimental durante el cálculo. En su lugar, emplean solamente las leyes de la mecánica cuántica y los valores de un reducido número de constantes físicas: la velocidad de la luz, las masas y cargas de los electrones y los núcleos y la constante de Planck. Para la resolución de la ecuación de Schrödinger realizan rigurosas aproximaciones matemáticas. Ejemplos representativos de métodos *ab initio* que han sido utilizados en esta Tesis Doctoral son Hartree-Fock²⁹ y Møller-Plesset de segundo orden³⁰ (en adelante HF y MP2; para una ampliación sobre el formalismo relativo a los métodos de cálculo, véase el apéndice A).

²⁸ J. J. P. Stewart, *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 209-220.

²⁹ (a) C. C. J. Roothaan, *Rev. Mod. Phys.* **1951**, *23*, 69-89. (b) D. R. Hartree, *Proc. Camb. Phil. Soc.* **1928**, *24*, 89-110. (c) V. Fock, *Z. Physik* **1930**, *61*, 126-148.

³⁰ (a) M. Head-Gordon, J. A. Pople y M. J. Frisch, *Chem. Phys. Lett.* **1988**, *153*, 503-506. (b) S. Saebø y J. Almlöf, *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *154*, 83-89. (c) M. J. Frisch, M. Head-Gordon y J. A. Pople, *Chem.*

La utilización de uno u otro de estos grupos de métodos depende de dos aspectos importantes: el coste computacional que se desea asumir y la precisión del resultado a obtener. Jugando con ambos factores se elige el grupo a utilizar y, dentro de ellos, cuál es el método más apropiado para realizar el cálculo.

En los últimos años se ha empezado a extender un tercer grupo de métodos de estructura electrónica: los métodos DFT, basados en la teoría de funcionales de densidad.³¹ Son similares a los *ab initio* en muchos aspectos. Requieren un coste computacional similar al de un cálculo Hartree-Fock, el método *ab initio* más asequible.²⁹ Su atractivo reside en que incluyen los efectos de la correlación electrónica, es decir, que consideran la interacción entre electrones de un sistema molecular, que se repelen entre sí. Los cálculos HF consideran este efecto sólo de forma promediada (cada electrón se ve afectado por una densidad electrónica promediada), mientras que los métodos que incluyen correlación electrónica explican incluso las interacciones entre pares de electrones con espín opuesto. Esta aproximación provoca que los resultados que proporcionan los métodos Hartree-Fock sean menos precisos para algunos sistemas. Así, los métodos DFT permiten aprovechar las ventajas de métodos *ab initio* más caros computacionalmente, y el menor coste de los métodos Hartree-Fock.

Puesto que el tamaño de las moléculas a estudiar en esta Tesis Doctoral es reducido, hemos realizado la mayoría de los cálculos con métodos *ab initio* y,

Phys. Lett. **1990**, *166*, 275-280. (d) M. J. Frisch, M. Head-Gordon y J. A. Pople, *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *166*, 281-289. (e) M. Head-Gordon y T. Head-Gordon, *Chem. Phys. Lett.* **1994**, *220*, 122-128.

³¹ (a) P. Hohenberg y W. Kohn, *Phys. Rev. B* **1964**, *136*, 864-871. (b) W. Kohn y L. J. Sham, *Phys. Rev. A* **1965**, *140*, 1133-1138. (c) *The Challenge of d and f Electrons*, D. R. Salahub y M. C. Zerner, Eds.; ACS: Washington, D.C., 1989. (d) R. G. Parr y W. Yang, *Density-functional theory of atoms and molecules*; Oxford University Press: Nueva York, 1989.

2.1. Cálculos computacionales

especialmente, con un método DFT, el B3LYP,³² basado en el híbrido de tres parámetros de Becke^{32a} unido al funcional de correlación con corrección de gradiente de Lee, Yang, y Parr.^{32b}

Otro aspecto importante a comentar es la existencia de conjuntos de bases, que proporcionan un modelo de expresión de los orbitales moleculares en el cálculo, en forma de combinaciones lineales de una serie predefinida de funciones monoeléctricas llamadas funciones de base o primitivas. Están centradas en el núcleo del átomo, por lo que tienen cierta semejanza con los orbitales atómicos. Al igual que el método de cálculo, su grado de refinamiento define en gran medida los recursos necesarios para efectuar el cálculo. Los conjuntos de bases mayores imponen menos restricciones a los electrones y se acercan más a la forma de los orbitales. Cuanto mayores sean, mayores recursos computacionales consumirán. Por ello, las moléculas grandes son poco compatibles con los conjuntos de bases grandes, pues el tiempo de cálculo sería extremadamente largo. Se utiliza habitualmente la siguiente nomenclatura para designar el método y conjunto de bases utilizados:

método energía/conjunto de bases energía//método geometría/conjunto de bases geometría

donde el método y el conjunto de bases que se especifican al principio, a la izquierda de la doble barra, son los utilizados para el cálculo de la energía, y los que se encuentran a continuación son los empleados para la optimización de la geometría de la molécula. Por ejemplo, un cálculo B3LYP/6-31G*//HF/3-21G* es aquél en el que se ha obtenido la estructura por el método HF con el conjunto de bases 3-21G*, y a partir de ella se ha

³² (a) A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648-5652. (b) C. Lee, W. Yang y R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **1988**, 37, 785-789.

obtenido su energía al nivel de teoría B3LYP/6-31G*. Como ejemplo de este tipo de nomenclatura, 6-31G, en la notación de Pople, significa que las capas interiores (orbitales core) están representadas por seis funciones gaussianas, mientras que los orbitales de valencia interiores y exteriores constan de tres y una, respectivamente. El conjunto de bases más utilizado en esta Tesis, llamado indistintamente 6-31G* o 6-31G(d),³³ supone de mejora sobre la 6-31G la adición de funciones d en el caso de los átomos *pesados* (átomos del segundo periodo en adelante, que en su estado fundamental tienen los orbitales d vacíos).

³³ W. J. Hehre, L. Radom, P. v. R. Schleyer y J. A. Pople, *Ab Initio Molecular Orbital Theory*; Wiley: Nueva York, 1986.

2.2. La anisotropía magnética en la función amida.

Una sencilla inspección de la estructura de amida clásicamente aceptada (Figura 1), con la rigidez y planaridad que implica la contribución de la estructura con separación de cargas a su estado fundamental, evidencia una serie de consecuencias desde la perspectiva de la resonancia magnética nuclear, como son, entre otras, la posibilidad de observar acoplamiento a larga distancia entre el sustituyente del carbonilo y los del nitrógeno, la existencia de una gran barrera de rotación en torno al enlace C(O)-N, la no equivalencia, geométrica y magnética, de los sustituyentes en el nitrógeno cuando ambos son idénticos, etc. Pero la no equivalencia magnética de ciertos núcleos en los espectros de RMN es consecuencia también de la anisotropía magnética de la función. El término anisotropía deriva del griego “diferente en diferentes direcciones” (*aniso*: desigual, *tropos*: dirección), por lo que anisotropía magnética significa diferente campo magnético en diferentes puntos del espacio. Todos los enlaces químicos son generalmente anisotrópicos, pero el efecto es particularmente importante en sistemas con electrones π . En una descripción sencilla del fenómeno se acepta que debido a que los electrones π se encuentran menos fuertemente ligados a los núcleos que los σ , se mueven más libremente en respuesta al campo magnético. Cuando se aplica un campo magnético a un compuesto con electrones π , éstos se mueven circularmente. Este movimiento de electrones en respuesta al campo magnético aplicado origina un campo magnético inducido que va a afectar de diferente forma al desplazamiento químico de los núcleos próximos, dependiendo de la dirección del campo magnético inducido en la posición de estos núcleos.²² Sin embargo, no debemos olvidar que la anisotropía magnética no es un fenómeno exclusivo de compuestos con enlaces π ; por ejemplo es importante en el anillo de ciclopropano, donde sus protones experimentan un fuerte apantallamiento, así como en los heterociclos de tres miembros.

Desde los inicios de la RMN hubo interés por conocer este efecto anisotrópico en las amidas, ya que la descripción de la forma e intensidad de este campo magnético inducido podría facilitar la asignación de las señales. Esta asignación no siempre era obvia, ya que la lenta rotación del enlace C(O)–N en comparación con la capacidad de detección de la RMN implica la diferenciación de los núcleos por su situación en regiones diferentemente apantalladas, *cis* y *trans* respecto al oxígeno carbonílico.^{3a,3b} Hoy en día, la asignación de señales no es, en general, un problema en amidas sencillas, ya que además de las metodologías clásicas^{3a,3b,22} que utilizan constantes de acoplamiento, efectos de disolvente, efectos NOE,³⁴ etc., pueden utilizarse potentes técnicas multidimensionales.³⁵ También es un problema abordable en moléculas grandes, ya que como hemos anticipado en la introducción, existe una metodología de asignación aplicable a proteínas y otras biomoléculas.¹⁷ Pero, sin duda, la descripción exacta de la anisotropía magnética de las amidas puede permitir el desarrollo de un método alternativo para investigar la estructura tridimensional de estas moléculas. Hasta donde nosotros sabemos, aún no se ha descrito con exactitud la forma e intensidad del campo inducido generado por la función amida.

Uno de los métodos clásicos para calcular desplazamientos de protón basados en la anisotropía magnética fue desarrollado por McConnell, como se ha comentado anteriormente.¹⁵ Asumiendo que el átomo cuyo desplazamiento se considera y la fuente de anisotropía están lejos, ese desplazamiento viene dado por la ecuación [3]:

³⁴ J. H. Noggle y R. E. Schirmer, *The Nuclear Overhauser Effect. Chemical Applications*; Academic Press: Nueva York, 1971.

³⁵ (a) J. K. M. Sanders y B. K. Hunter, *Modern NMR Spectroscopy. A guide for chemists*; Oxford University Press: Oxford, 1992. (b) *Two-Dimensional NMR Spectroscopy. Applications for Chemists and Biochemists*, 2^a ed.; W. R. Croasmun y R. M. K. Carlson, Eds.; Wiley-VCH: Nueva York, 1994. (c) T. D. W. Claridge, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*; Elsevier Science: Oxford, 1999.

2.2. La anisotropía magnética en la función amida

$$\delta_{\text{anis}} = (3L_oR^3)^{-1} \sum \chi_{ii}(1 - 3\cos^2\theta_i) \quad [3]$$

donde L_o representa la constante de Avogadro, R es la distancia entre el átomo considerado y el centro de la anisotropía magnética de grupo, χ_{ii} es un componente del tensor de susceptibilidad magnética, y θ_i es el ángulo entre el eje i ($i = x, y, z$) y el vector R . Esta ecuación puede simplificarse (ecuación [4]) para el caso de un grupo con anisotropía magnética axialmente simétrica, como ocurre en la función amida. Aunque no existe un método para medir directamente la anisotropía magnética,^{16d} los datos encontrados para la formamida sugieren que el grupo peptídico es casi axialmente simétrico respecto al eje normal al plano de simetría, y se ha publicado para él un valor de $\Delta\chi$ de $-5,1 \pm 0,6 \times 10^{-6}$ erg/(G²-mol).

$$\delta_{\text{anis}} = (3L_oR^3)^{-1} \Delta\chi(1 - 3\cos^2\theta) \quad [4]$$

donde θ es el ángulo entre el vector R y el plano de simetría.

La aplicación directa de las ecuaciones de McConnell tiene una serie de limitaciones importantes, ya que el centro de anisotropía de grupo se define a menudo de forma arbitraria y numerosas funciones químicas poseen pequeñas susceptibilidades magnéticas. Ello hace que el modelo de McConnell se utilice habitualmente mediante representaciones esquemáticas como la de la Figura 5, que refleja cómo el campo magnético local del grupo amido desplaza a campo alto o bajo a protones situados encima o en el plano de la función, respectivamente, pero que también nos permite entender el ángulo θ y la distancia R considerados en la ecuación.

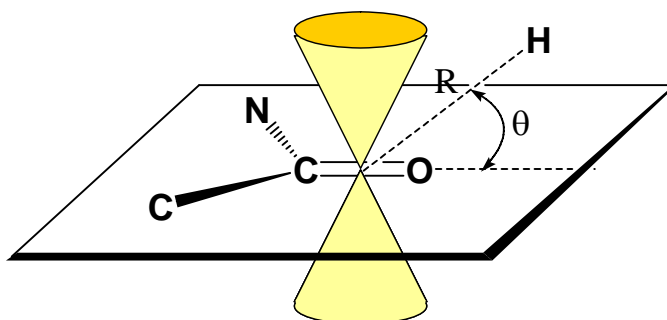


Figura 5. Representación del modelo de McConnell.

No obstante, y de forma sorprendente, las estructuras deslocalizadas parecen suponer una notable excepción ya que Sitkoff y Case han encontrado una buena concordancia entre datos DFT y valores de susceptibilidad proporcionados por las ecuaciones [3] y [4] para el dipéptido de alanina.¹⁶ⁱ

Cuando los sustituyentes del nitrógeno son idénticos y la rotación en torno al enlace C–N es lenta con respecto al tiempo de adquisición, los espectros de ¹H-RMN muestran grupos de señales diferentes, asignables a los protones de estos sustituyentes.^{3a,3b} Se ha sugerido que existe un gran apantallamiento en regiones cónicas situadas por debajo y por encima del plano del grupo amido, mientras que las regiones contenidas en dicho plano están desapantalladas. En la Figura 6 se muestra un modelo, propuesto por Paulsen y Todt,³⁶ en el cual las letras sobre los círculos indican las posibles posiciones de los protones. Así, se distinguen dos regiones en el dibujo: la "región del plano" formada por las posiciones *a*, *a'*, *d* y *d'*, y la "región fuera del plano", formada por las demás posiciones. Experimentalmente, se observa que la posición *a* sufre menor desapantallamiento que la *a'*, siendo el efecto mucho menor en las posiciones *d* y *d'*, debido a la mayor distancia que las separa del grupo carbonilo. Por

³⁶ H. Paulsen y K. Todt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1966**, *5*, 899-900.

2.2. La anisotropía magnética en la función amida

otra parte, la posición *c* está menos apantallada que la *c'* y las posiciones *e* y *e'* son equivalentes a *c* y *c'*.

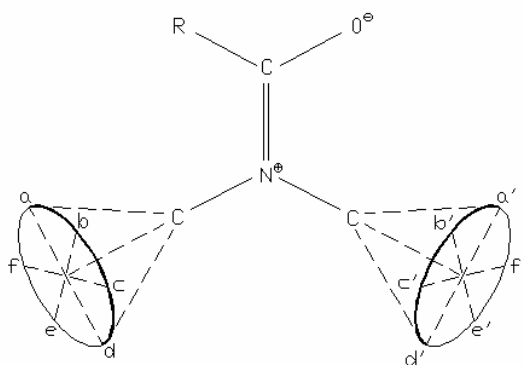


Figura 6. Anisotropía magnética del grupo amida según Paulsen y Todt.

En cuanto al comportamiento de los sustituyentes sobre el carbono carbonílico (R en la Figura 6), no existen discusiones generales que expliquen los desplazamientos observados tanto en ^1H como en ^{13}C . Respecto a los primeros, es cierto que el fuerte desplazamiento a campo bajo del protón del grupo formamido evidencia un fuerte desapantallamiento en el plano de amida. Pero el efecto sobre los protones del grupo acilo no se ha racionalizado en relación con la conformación.

La gran rigidez del anillo de los amidoazúcares piranósicos facilitó a nuestro grupo la resolución del complejo equilibrio estructural que presentan algunas de estas sustancias,⁶ en muchos casos de importante actividad biológica o farmacológica. Así, la bibliografía relativa al estudio estructural mediante RMN de *N*-alquil-*N*-glicosilamidas derivadas de ácidos grasos³⁷ y de los antibióticos pertenecientes a las familias de las

³⁷ O. Lockhoff, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1611-1620.

istamicinas,³⁸ *N*-acetilcalicheamicinas,³⁹ glicocinamoilespermidinas,⁴⁰ estreptomicinas,⁴¹ etc., describía grupos de señales que sugerían la existencia de al menos dos isómeros en disolución. Para la resolución del problema se analizó un buen número de amidoazúcares que, desde la perspectiva del análisis estructural, se clasificaron en las series I-III, en las que Az era siempre un resto de piranosa, R un resto alquílico y R' un grupo alquilo o arilo.



I

II

III

En general, los compuestos de las series I y II presentaban en RMN señales correspondientes a dos isómeros en disolución, mientras que los de la serie III sólo uno. Como en la serie D de los derivados de carbohidratos, los anillos piranósicos, y aún mas los de configuración anomérica β , suelen adoptar la conformación 4C_1 , el problema estructural quedaba reducido al establecimiento de los ángulos ϕ y τ , como muestra la Figura 7 para un derivado de la formamida. Además, debido al carácter de doble enlace de la unión N-C(O), el ángulo τ siempre se encuentra en entornos cercanos a dos

³⁸ D. Ikeda, Y. Horiuchi, M. Yoshida, T. Miyasaka, S. Kondo y H. Umezawa, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 33-45.

³⁹ (a) M. D. Lee, T. S. Dunne, C. C. Chang, M. M Siegel, G. O. Morton, G. A. Ellestad, W. J. McGahren y D. B. Borders, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 985-997. (b) D. Khane, D. Yang y M. D. Lee, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 21-22.

⁴⁰ G. A. Ellestad, D. B. Cosulich, R. W. Broschard, J. H. Martin, M. P. Kuntzmann, G. O. Morton, J. E. Lancaster, W. Fulmor y F. M. Lowell, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2515-2524.

⁴¹ T. Tsuchiya y T. Shitara, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 59-72.

configuraciones: *Z* [$\tau = 0^\circ$ (eclipsamiento de los enlaces O=C y N-C₁)] y *E* [$\tau = 180^\circ$ (disposición antiperiplanar de los enlaces O=C y N-C₁)].

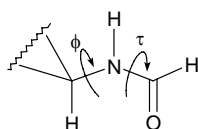


Figura 7. Rotación de los enlaces del grupo formamido, definida por los ángulos diedros ϕ y τ .

Así pues, el problema quedaba centrado mayoritariamente en la caracterización del ángulo ϕ . Si bien los compuestos clasificables en las series I y III muestran el acoplamiento $J_{\text{H,NH}}$, la ecuación de Karplus no permite distinguir inequívocamente las disposiciones definidas por $\phi \sim 0^\circ$ ($J_{\text{H,NH}} \sim 10$ Hz) y $\phi \sim 180^\circ$ ($J_{\text{H,NH}} \sim 12$ Hz) (Figura 8).⁴²

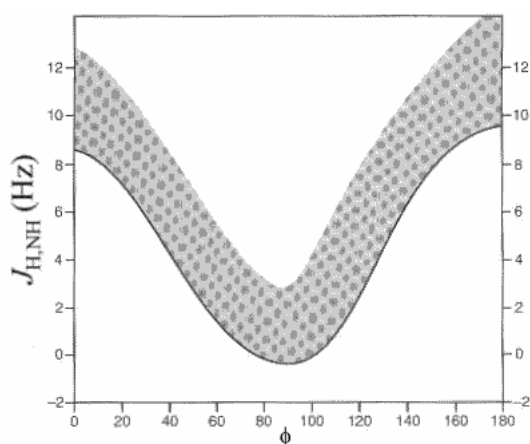


Figura 8. Relación entre el ángulo diedro ϕ y la constante de acoplamiento $J_{\text{H,NH}}$.

⁴² V. F. Bystrov, S. L. Portnova, V. I. Tsetlin, V. I. Ivanov y Y. A. Ovchinnikov, *Tetrahedron* **1975**, *31*, 2177-2209.

Las constantes de acoplamiento observadas entre el NH y el protón del azúcar geminal al grupo funcional en los formamidoazúcares^{6c,43} y amidoazúcares⁴⁴ de la serie III oscilan en el rango de 8 a 11 Hz. Por ello, la bibliografía anterior recoge asignaciones estructurales en las que estos protones se disponen unas veces en disposición sinclinal (*syn*, $\phi \sim 0^\circ$) y otras en disposición antiperiplanar (*anti*, $\phi \sim 180^\circ$) para compuestos en los que se observa la citada *J*. Así, si bien prudentemente algunos autores concluyen^{43b,44a,44e} que estos valores de $J_{H,NH}$ son “consistentes” con una disposición antiperiplanar, se ha propuesto por ejemplo una disposición sinclinal para el isómero *Z* de **3** considerando, además de su $J_{NH,H}$, un acoplamiento a larga distancia (ordenación en W) entre el protón del grupo formilo y el del azúcar (Figura 9).^{43b}

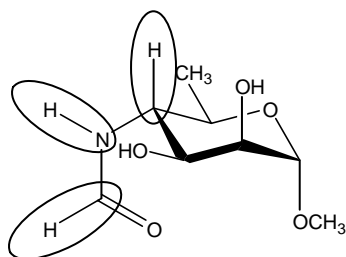


Figura 9. Estructura asignada a la 4,6-dideoxi-4-formamido-1-*O*-metil- α -D-glucopiranososa (**3**) en la referencia 43b.

Nuestro grupo, tras estudiar mediante RMN un buen número de amidas y tioamidas, concluyó que los compuestos clasificables en las series I y II presentaban equilibrios entre los isómeros *Z/E* y los de la serie III sólo adoptaban la configuración

⁴³ (a) D. H. R. Barton, G. Bringmann y W. B. Motherwell, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1980**, 2665-2669. (b) L. Kenne, P. Unger y T. Wehler, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1988**, 1183-1186. (c) M. Trumtel, P. Tavecchia, A. Veyrières y P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1989**, 191, 29-52.

⁴⁴ (a) A. S. Cerezo, *Chem. Ind. (London)* **1971**, 96-97. (b) S. Hirano, *Agr. Biol. Chem.* **1972**, 36, 1071. (c) T. J. Schamper, *Carbohydr. Res.* **1974**, 36, 233-237. (d) S. Hirano, H. Iwaki y Y. Kondo, *Carbohydr. Res.* **1978**, 65, 307-310. (e) A. E. Salinas, J. F. Sproviero y V. Deulofeu, *Carbohydr. Res.* **1987**, 170, 71-99.

2.2. La anisotropía magnética en la función amida

Z.⁶ Su comportamiento en RMN es muy regular y pudo resumirse como se recoge en la Tabla 1:

Tabla 1. Reglas para la asignación configuracional y conformacional de los compuestos de las series I y II. X = O, S.

Serie I	Serie II
$\delta_{\text{H}(\text{azúcar})} (Z) > \delta_{\text{H}(\text{azúcar})} (E)$	$\delta_{\text{H}(\text{azúcar})} (Z) > \delta_{\text{H}(\text{azúcar})} (E)$
$\delta_{\text{C}(\text{azúcar})} (Z) < \delta_{\text{C}(\text{azúcar})} (E)$	$\delta_{\text{C}(\text{azúcar})} (Z) < \delta_{\text{C}(\text{azúcar})} (E)$
$\delta_{\text{CX}} (Z) < \delta_{\text{CX}} (E)$	$\delta_{\text{CX}} (Z) > \delta_{\text{CX}} (E)$
$\delta_{\text{CHX}} (Z) > \delta_{\text{CHX}} (E)$	Si R es un grupo alquilo saturado:
$J_{\text{NH,CHO}} \sim 0 (Z); J_{\text{NH,CHO}} = 9,2-11,3 (E)$	$\delta_{\text{CXCH}_3} (Z) < \delta_{\text{CXCH}_3} (E)$
$J_{\text{NH,CHS}} = 5,0-6,1 (Z); J_{\text{NH,CHS}} = 9,5-14,1 (E)$	Si R es un grupo bencilo:
	$\delta_{\text{CXCH}_3} (Z) > \delta_{\text{CXCH}_3} (E)$

Este comportamiento, en particular el gran desapantallamiento del protón del azúcar geminal a la función amida en el isómero Z con respecto al E, se explicaba en relación con la teoría conocida sobre la anisotropía de la función amida si ambos isómeros presentaban la conformación preferente *anti* (ver Figura 2 en pág. 5), en la que el protón geminal del azúcar se encuentra en el mismo plano de la función pero mucho más cercano en el isómero Z. Estas asignaciones estructurales se veían también apoyadas por las experiencias NOE realizadas en amido y tioamidoazúcares, como se recoge en la Figura 10 para el isómero Z del tioamidoazúcar **4**.

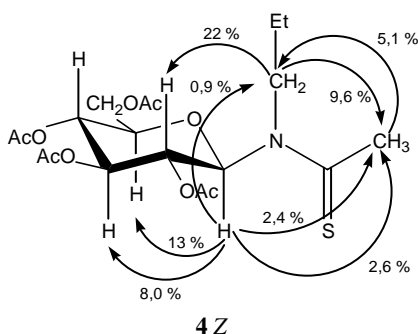


Figura 10. Experiencias NOE realizadas sobre el isómero Z de la tioacetamidoglucopiranososa **4**.

También el análisis de rayos X de monocristal mostró ejemplos de ambos isómeros *Z/E*. Así, la *N*-acetil-*N*-metil- β -D-xilopiranosilamina (**5**), cuyo análisis mediante RMN en disolución muestra un equilibrio de ambos isómeros en el que predomina el *E*, mostró la estructura *E_{anti}* en su análisis de rayos X.^{6a} La cristalización de isómeros *Z*, generalmente más estables que los *E*, es lo habitual, y su conformación preferente también es la *Z_{anti}*. Como ejemplo mostramos las estructuras de rayos X del compuesto **5** (Figura 11) y de la *N*-acetil- β -D-glucopiranosilamina (**6**) (Figura 12). La Tabla 2 muestra los ángulos diedros más significativos de estas estructuras. En particular, los ángulos H-C₁-N-C₆ de **5** (165,3°) y H-C₁-N-H de **6** (-170,2°) reflejan claramente una conformación *anti* en el cristal.^{6b}

2.2. La anisotropía magnética en la función amida

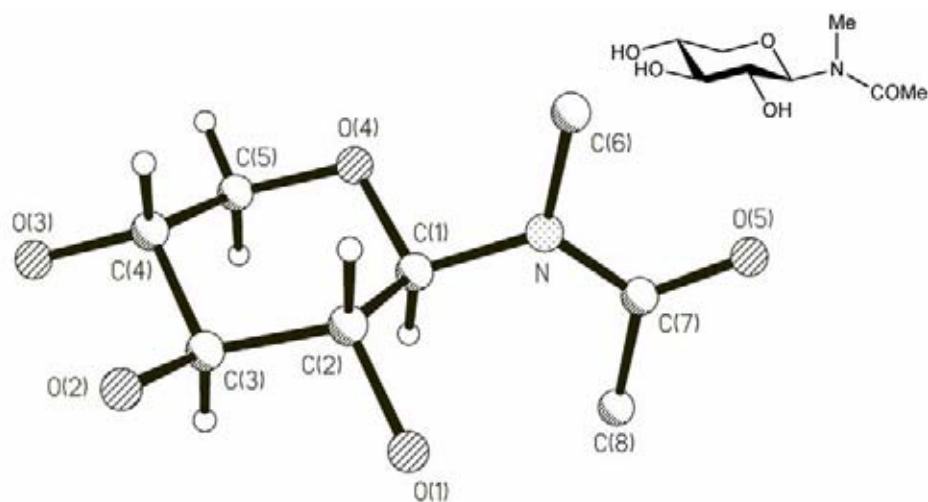


Figura 11. Diagrama ORTEP del compuesto 5.

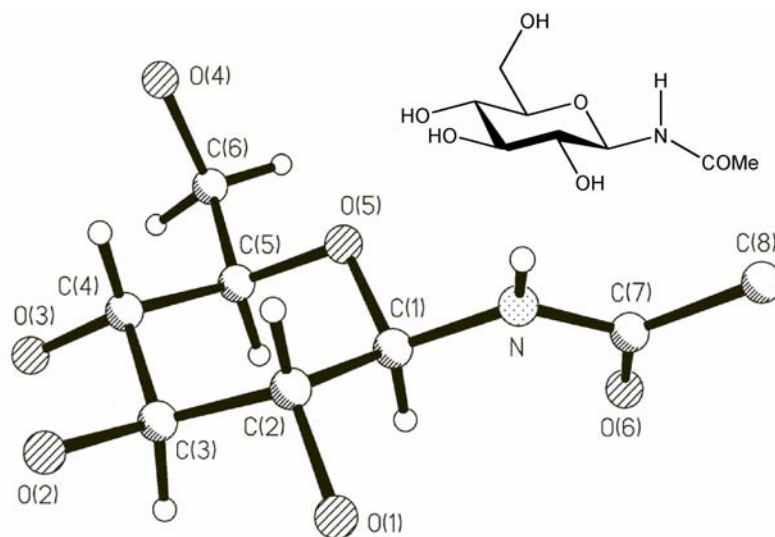
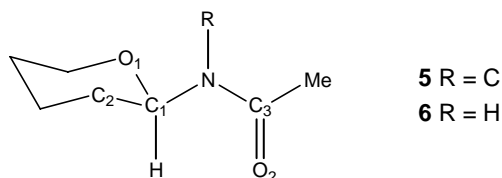


Figura 12. Diagrama ORTEP del compuesto 6.

Tabla 2. Ángulos diedros seleccionados obtenidos por difracción de rayos X.

Ángulo diedro	Compuesto	
	5	6
H-C ₁ -N-R	165,3	-170,2
H-C ₁ -N-C ₃	-16,5	29,7
C ₁ -N-C ₃ -Me	-0,9	177,4
C ₁ -N-C ₃ -O ₂	-179,6	-4,1
R-N-C ₃ -O ₂	-1,4	-162,0
R-N-C ₃ -Me	177,2	19,5

También los cálculos semiempíricos a nivel MNDO-PM3 realizados sobre estas y otras amidas predicen conformaciones *anti*.^{6a}

Por otra parte, los avances recientes en la aplicación de la química cuántica al campo de la RMN han comenzado a aportar contribuciones significativas al cálculo de desplazamientos químicos y a establecer una relación entre estructura y desplazamientos químicos.⁴⁵ Ello es especialmente cierto en el caso de los desplazamientos químicos de ¹³C, para los que se han utilizado cálculos cuánticos sobre moléculas pequeñas en fase

⁴⁵ (a) H. Le, J. G. Pearson, A. C. de Dios y E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3800-3807. (b) E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *5*, 217-225. (c) D. B. Chestnut y C. G. Phung, *Nuclear Magnetic Shieldings and Molecular Structure*; J. A. Tossell, Ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1993; pp 221-241. (d) D. Jiao, M. Barfield y V. J. Hruby, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10883-10887. (e) H. M. Sulzbach, P. v. R. Schleyer y H. F. Schaefer III, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3967-3972. (f) H. M. Sulzbach, P. v. R. Schleyer y H. F. Schaefer III, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2632-2637. (g) V. G. Malkin, O. L. Malkina, M. E. Casida y D. R. Salahub, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5898-5908.

2.2. La anisotropía magnética en la función amida

gaseosa con objeto de evidenciar la dependencia de los desplazamientos de carbono respecto a los ángulos de torsión ϕ y ψ en péptidos y proteínas (Figura 4).⁴⁶ Otra aplicación reciente del cálculo cuántico de desplazamientos químicos es el desarrollo y parametrización de modelos físicos que incluyen efectos ambientales, para lo cual se estudian tanto moléculas simples como combinaciones de éstas, y se analiza y cuantifica su comportamiento en relación con los cambios conformacionales. Se han elaborado así modelos empíricos que tienen en cuenta efectos electrostáticos, de corriente de anillo y de otras anisotropías sobre el desplazamiento de los protones.³⁸ Sitkoff y Case han aplicado recientemente cálculos cuánticos de desplazamientos químicos para investigar la contribución de la anisotropía magnética, de los efectos electrostáticos y de las interacciones no covalentes a los desplazamientos químicos de péptidos modelo. Han encontrado así buena concordancia al aplicar el cálculo del desplazamiento químico DFT al dipéptido de alanina.¹⁶ⁱ En este estudio los autores consideran que el desplazamiento experimental de los protones (δ_{exp}) respondería a la ecuación [5],

$$\delta_{\text{exp}} = \delta_{\text{anis}} + \delta_{\text{pol}} + \delta_{\text{cc}} + \delta_{\text{const}} \quad [5]$$

que es función de la anisotropía magnética (δ_{anis}) calculada básicamente por la ecuación de McConnell,¹⁵ de la polarización electrostática (δ_{pol}), que considera que grupos polares distantes pueden polarizar la nube electrónica del núcleo en estudio afectando a su desplazamiento, de la contribución de contacto cercano (δ_{cc}), que considera la contribución del disolvente e interacciones de no enlace, y de una constante (δ_{const}). En una contribución previa de este grupo se hace un análisis del desplazamiento químico de

⁴⁶ (a) A. C. de Dios y E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5307-5314. (b) J. G. Pearson, J.-F. Wang, J. L. Markley, H. Le y E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8823-8829.

17 proteínas cuyas estructuras fueron determinadas mediante difracción de rayos X, intentando explicar las diferencias entre sus desplazamientos observados y los del enrollamiento en *random coil*.^{16d} Estas diferencias de desplazamiento se interpretan en función de efectos como las corrientes de anillo y la anisotropía magnética del enlace peptídico. En este trabajo, Ösapay y Case descomponen las contribuciones locales y no locales al desplazamiento químico de protones según la ecuación [6],

$$\delta_{\text{tot}} = \delta_{\text{d(local)}} + \delta_{\text{p(local)}} + \delta_{\text{rc}} + \delta_{\text{m}} + \delta_{\text{el}} + \delta_{\text{s}} \quad [6]$$

en la que los primeros términos muestran respectivamente las contribuciones diamagnéticas y paramagnéticas locales, para las que los autores asumen una contribución similar en péptidos pequeños y en proteínas en *random coil*. Los cuatro términos finales representan la contribución de la molécula: las corrientes de anillo (δ_{rc}), la anisotropía magnética debida al enlace peptídico (δ_{m}), los efectos electrostáticos (δ_{el}) y los efectos del disolvente (δ_{s}). Aunque se han utilizado multitud de ecuaciones para reflejar los parámetros que contribuyen al desplazamiento químico, la ecuación [6] se considera una buena aproximación en función de los conocimientos experimentales sobre el desplazamiento químico.⁴⁷

Tampoco queremos pasar por alto en los antecedentes de esta Tesis el hecho de que una proteína en disolución se encuentra siempre sometida a evoluciones conformacionales que dificultan el conocimiento de la posición de sus átomos y demás datos geométricos. Como ejemplo queremos citar dos trabajos aparecidos durante la

⁴⁷ R. K. Harris, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, A Physicochemical View*; Longman, Scientific & Technical: Essex, 1986.

2.2. La anisotropía magnética en la función amida

redacción de esta Tesis en los que Bodenhausen y col.⁴⁸ determinan la amplitud del movimiento en el eje C_{α} - C_{α} y la posición del enlace N-H en la proteína ubiquitina, al tiempo que incluyen una buena revisión de los métodos de RMN con este objetivo. Además, queremos reseñar ahora la reciente aparición de excelentes revisiones sobre el análisis automatizado de proteínas mediante RMN,⁴⁹ y sobre el estudio de sus procesos de plegado y desplegado mediante esta técnica espectroscópica.⁵⁰

⁴⁸ (a) D. Bytchenkoff, P. Pelupessy y G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5180-5185. (b) K. Loth, P. Pelupessy y G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6062-6068.

⁴⁹ M. C. Baran, Y. J. Huang, H. N. B. Moseley y G. T. Montelione, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3541-3555.

⁵⁰ H. J. Dyson y P. E. Wright, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3607-3622.

3. Nuevas investigaciones

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

Los aspectos básicos de la estructura de las amidas, como la reducida distancia del enlace C–N o la rotación impedida alrededor del mismo,² se conocen desde hace mucho tiempo y en parte han sido avanzados en los capítulos anteriores. De hecho, la determinación de la barrera de rotación en amidas y tioamidas ha constituido un tema de investigación habitual en RMN dinámica y otras técnicas espectroscópicas, tanto en disolución como en fase gaseosa.^{3,4} Generalmente se acepta que la isomería *Z/E* se debe a la deslocalización del par de electrones libre del nitrógeno en el orbital π^* del grupo carbonilo, lo que otorga al enlace C–N cierto carácter de doble enlace y ralentiza la rotación. Sin embargo, si bien este esquema simple ha sido de gran interés para los químicos durante mucho tiempo, Wiberg y sus colaboradores han proporcionado una visión alternativa y complementaria, apoyada en cálculos teóricos. Esta descripción sugiere una mayor separación de carga a lo largo del enlace C–N.⁵¹ En esencia, frente al análisis clásico del grupo amido que se fija en la interacción entre el grupo amino y carbonilo en base a la transferencia de carga entre el nitrógeno y oxígeno (Figura 1, pág. 4), se tiene en cuenta también la transferencia de carga entre carbono y nitrógeno.^{51a} El enlace C–N en el conformero plano presentaría un carácter más iónico, más fuerte y corto, que los puntos de silla A y B en el proceso de rotación (Figura 13).

⁵¹ (a) K. B. Wiberg y K. E. Laidig, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5935-5943. (b) K. B. Wiberg y C. M. Breneman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 831-840. (c) K. B. Wiberg y P. R. Rablen, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2201-2209. (d) K. B. Wiberg, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 922-929.

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

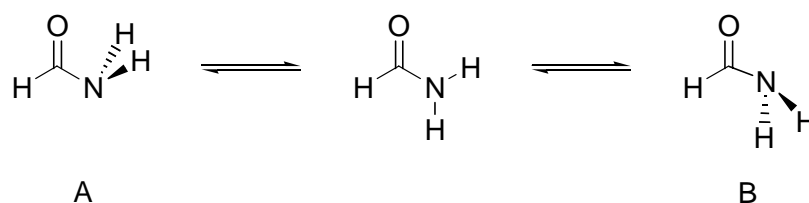


Figura 13. Estructura plana de formamida y puntos de silla originados en la rotación del enlace C–N.

La importancia de la isomería *Z/E* en amidas va más allá del ámbito de la estructura y la reactividad. Una serie de enzimas llamadas inmunofilinas, que poseen efectos inmunosupresivos, catalizan la interconversión de rotámeros *cis* y *trans* en péptidos.⁵² Este grupo de enzimas, conocidas vulgarmente como *rotamasas*, o según las reglas dictadas por la comisión para la nomenclatura de enzimas como peptidil prolil *cis-trans* isomerasas (PPIasas, ver Figura 14), aceleran el plegamiento de polipéptidos que contienen prolina, que sería lentísimo de otro modo.^{53,54} También es necesaria la existencia de rotámeros específicos en ciertos fármacos que contienen enlaces amido o tioamido para que se produzca una fuerte unión con el receptor.⁵⁵

⁵² (a) D. Voet y J. G. Voet, *Biochemistry*, 2ªed.; Wiley: Nueva York, 1995; pp 200-201. (b) Para una excelente revisión, ver: G. S. Hamilton y J. P. Steiner, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5119-5143.

⁵³ (a) G. Fischer, B. Wittmann-Liebold, K. Lang, T. Kiefhaber y F. X. Schmid, F. X. *Nature* **1989**, *337*, 476-478. (b) S. L. Schreiber, *Science* **1991**, *251*, 238-287. (c) C. T. Walsh, L. D. Zydowsky y F. D. McKeon, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 13115-13118. (d) J.-U. Rahfeld, A. Schierhon, K. Mann y G. Fischer, *FEBS Lett.* **1994**, *343*, 65-69. (e) K. P. Lu, S. D. Hanes y T. A. Hunter, *Nature* **1996**, *380*, 544-547.

⁵⁴ Para una aproximación sintética, ver: (a) R. K. Harrison y R. L. Stein, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3464-3471. (b) C. Cox y T. Lectka, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 849-858 y referencias allí citadas.

⁵⁵ Y. Ikeura, Y. Ishichi, T. Tanaka, A. Fujishima, M. Murabayashi, M. Kawada, T. Ishimura, I. Kamo, T. Doi y J. Natsugari, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4232-4239.

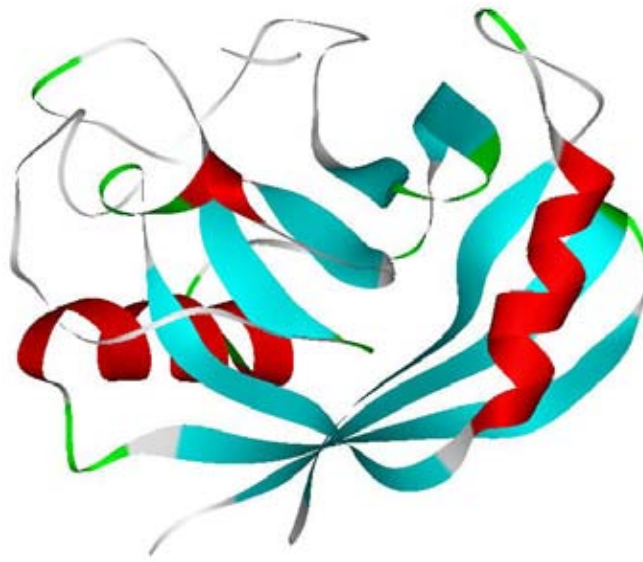


Figura 14. Representación de la ciclofilina A, ejemplo de PPIasa.⁵⁶

La rotamería en las amidas está controlada en gran medida por efectos estéricos y electrónicos que dependen de los sustituyentes en torno al enlace C–N. Los efectos de los sustituyentes del carbonilo⁵⁷ y del nitrógeno⁵⁸ sobre las barreras de rotación en las amidas simples han sido ampliamente estudiados, aunque no se ha llegado a

⁵⁶ (a) F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. B. Williams, E. F. Meyer, M. D. Brice Jr., J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi y M. Tasumi, "The Protein Data Bank: A Computer Based Archival Data File for Macromolecular Structures" *J. Mol. Biol.* **1977**, *112*, 535-542. (b) E. E. Abola, F. G. Bernstein, S. H. Bryant, I. F. Koetzle y J. Weng, *Data Commission of the International Union of Crystallography*; F. H. Allen, G. Bergerhoff y R. Sievers, Eds.; International Union of Crystallography: Bonn / Cambridge / Chester, 1987; p 107. (c) H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov y P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235-242.

⁵⁷ M. D. Wunderlich, L. K. Leung, J. A. Sandberg, K. D. Meyer y C. H. Yoder, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 1500-1503.

⁵⁸ C. H. Yoder y R. D. Gardner, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 64-66.

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

conclusiones definitivas. Además, se han encontrado resultados para amidas en disolución que difieren de los hallados para las mismas en fase gaseosa.^{59,7b}

Sin embargo, como demostraremos a lo largo del capítulo, la preferencia conformacional de las amidas *Z* y *E* no ha sido aún establecida, ya que la bibliografía reciente al respecto muestra conclusiones contradictorias en numerosos trabajos. Estas incoherencias son más evidentes en amidas alifáticas, concretamente en la conformación en torno al enlace CON–alquilo. Por ello, en una primera aproximación, podemos concretar el problema atendiendo a las opciones conformacionales definidas por los ángulos ϕ y τ de *N*-alquilamidas. La Figura 15 muestra estos ángulos en *N*-alquilacetamidas, que por economía de costes en términos computacionales y de RMN han sido las analizadas inicialmente en esta Tesis.

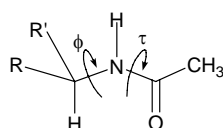


Figura 15. Rotación en una *N*-alquilacetamida, definida por los ángulos diédros ϕ y τ .

En realidad, como se adelantó en la Figura 3, las opciones conformacionales son menores, ya que la planaridad en torno al enlace C(O)–N en el estado fundamental de la amida determina ángulos τ próximos a las configuraciones *Z/E* (0° y 180°). También los antecedentes basados en cálculos computacionales y metodologías experimentales como

⁵⁹ (a) T. Drakenberg, K. J. Dahlqvist y S. Forsen, *J. Phys. Chem.* **1972**, *76*, 2178-2183. (b) C. Suarez, C. B. LeMaster, C. L. LeMaster, M. Tafazzoli y N. S. True, *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 6679-6683. (c) J. Gao, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2930-2935. (d) K. B. Wiberg, P. R. Rablen, D. J. Rush y T. A. Keith, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4261-4270. (e) S. M. Neugebauer Crawford, A. N. Taha, N. S. True y C. B. LeMaster, *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 4699-4706. (f) Para un estudio computacional relacionado sobre carbamatos, ver: P. R. Rablen, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7930-7937.

RMN y difracción de rayos X publicados por nuestro grupo (ver págs. 4 y 27) muestran como opciones a considerar para las disposiciones de los protones CONH-CH_α las determinadas por conformaciones siempre próximas a la *anti* ($\phi \sim 180^\circ$) y *syn* ($\phi \sim 0^\circ$). Como ejemplo, la Figura 16 muestra el espectro conformacional de *N*-alquilacetamidas en función de los ángulos de torsión ϕ y τ .

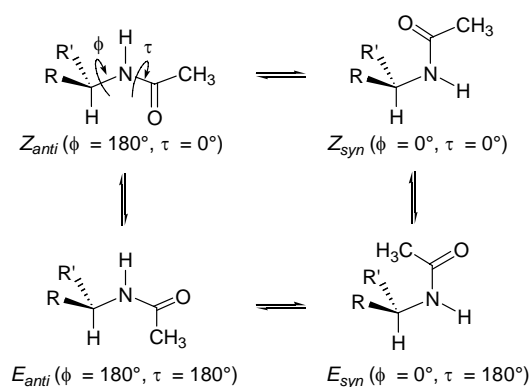


Figura 16. Conformaciones *syn* y *anti* para los isómeros *Z* y *E* de las *N*-alquilacetamidas.

La *N*-metilacetamida ha sido muy estudiada tanto a nivel experimental como teórico ya que, siendo un modelo simple, muestra aspectos estructurales extrapolables a cadenas peptídicas. La Tabla 3 resume el resultado de diversos cálculos *ab initio* publicados sobre esta sustancia.

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

Tabla 3. Resultados de cálculos *ab initio* de la *N*-metilacetamida publicados.

Autor (referencia)	Método de cálculo	Isómero Z/E	Conformación más estable (ϕ)	$\Delta E_{anti-syn}$ (kcal/mol)	ΔE_{Z-E} (kcal/mol)
Jorgensen y Gao ^{7a}	HF/6-31G*	Z	<i>syn</i>	0,1	--
		E	<i>syn</i>	0,5	--
	HF/3-21G	Z	<i>anti</i>	-0,3	--
Dixon y col. ^{7b}	MP2/aug-cc-pVDZ	Z y E	<i>syn</i>	--	-2,3
Itai y col. ^{7c}	HF/4-31G// HF/4-31G	Z y E	<i>syn</i>	--	-2,59
	HF/4-31G**// HF/4-31G	Z y E	<i>syn</i>	--	-2,51
	HF/6-31G**// HF/4-31G	Z y E	<i>syn</i>	--	-2,48
	HF/6-31G**// HF/6-31G**	Z y E	<i>syn</i>	--	-2,46
Guo y Karplus ⁶⁰	HF/6-31G	Z	<i>syn</i>	0,10	--
	HF/6-31G*	Z	<i>syn</i>	0,14	--
	HF/6-311G**	Z	<i>syn</i>	0,07	--
	MP2/6-31G*	Z	<i>anti</i>	-0,06	--

Jorgensen y Gao encontraron una escasa preferencia conformacional en fase gaseosa para el enlace CON-CH₃, siendo a nivel HF/6-31G* el conformero *syn* más estable que el *anti* por 0,1 y 0,5 kcal/mol para los isómeros Z y E de la *N*-metilacetamida, respectivamente. Por el contrario, observaron que cuando utilizaban un método de menor nivel (HF/3-21G), el conformero *anti* del isómero Z era más estable que el *syn* por 0,3 kcal/mol de diferencia.^{7a} Además, estudios realizados por Dixon y col. sobre dímeros de *N*-metilacetamida y el sistema *N*-metilacetamida-agua para determinar la fortaleza de los enlaces de hidrógeno también revelan que el conformero *syn* es la orientación preferida tanto para el isómero Z como para el E.^{7b} En un trabajo posterior, en el que se analizan modelizaciones para las que se partió de los parámetros geométricos de las estructuras cristalinas publicadas, Itai y sus colaboradores hallaron de nuevo que la conformación *syn* era la más estable para los isómeros Z y E de la *N*-metilacetamida según cálculos Hartree-Fock, utilizando los conjuntos de bases 4-31G,

4-31G** y 6-31G**. ^{7c} De igual forma, Guo y Karplus han realizado cálculos HF (con los conjuntos de bases 6-31G, 6-31G* y 6-31G**) y MP2/6-31G* para estudiar el enlace por puentes de hidrógeno en complejos de *N*-metilacetamida en los que ésta se enlaza al agua y/o a la formamida. A diferencia de lo que ocurre en la *N*-metilacetamida aislada, en la que las conformaciones con distintas orientaciones del metilo tienen energías similares ($\Delta E \sim 0,1$ kcal/mol), todos los sistemas con enlaces de hidrógeno muestran una conformación preferente *syn* con una diferencia de 0,2-0,9 kcal/mol. ⁶⁰ Otros estudios realizados coetáneamente a éste insisten en asignar mínimos *syn* para *N*-metilacetamida y otras amidas. Es el caso de Nandini y Sathyanarayana ¹⁰ que describen cálculos *ab initio* HF/6-31+G* de diversas amidas, y de Wiberg y Rush ¹⁴ que han evaluado las barreras rotacionales del metilo en varias *N*-metilamidas y tioamidas a nivel MP2 usando un conjunto de bases mayor, 6-311+G**. A este nivel el confórmero de menor energía resultó ser el *syn*, tanto para el isómero *E* como para el *Z* de la *N*-metilacetamida. En resumen, como hemos anticipado, trabajos con conjuntos de bases cada vez más potentes insisten en predecir una mayor estabilidad para la estructura Z_{syn} .

También es constatable que estos resultados contradicen claramente la preferencia conformacional encontrada previamente por nuestro grupo para amidoazúcares, ^{6a,6b} que son fragmentos clave en la estructura de algunos antibióticos naturales, ya que para estas sustancias tanto su análisis espectroscópico y de difracción de rayos X de monocristal como los cálculos semiempíricos a nivel PM3 predicen una conformación *anti*. Estos resultados son generales y extrapolables, ya que el análisis de los datos de RMN en disolución de un conjunto amplio de amidoazúcares modelo permitió obtener (ver apartado 2.2) una serie de correlaciones empíricas ^{6b} que han

⁶⁰ H. Guo y M. Karplus, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 7273-7287 y referencias en él citadas.

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

demostrado su utilidad a diversos grupos de investigación en la asignación estructural de isómeros *Z* y *E* de amidoazúcares.⁶¹ Es obvio que la preferencia conformacional de las amidas simples no necesariamente debe coincidir con la de glicosilamidas y amidoazúcares, ya que en estos derivados complejos y en otros estructuralmente relacionados como acetales o aminaes sobre carbonos son importantes otros efectos como el anomérico.^{62,63} En amidas congestionadas, es también crucial el efecto estérico, favoreciendo que el sustituyente más voluminoso adopte la conformación *syn* al átomo de oxígeno carbonílico. Por ello, las amidas *torcidas* (“twisted”) se encuentran forzadas a adoptar distintas conformaciones, debido posiblemente a simples razones estéricas.⁶⁴

Por otra parte, debe recordarse que las estructuras de rayos X de monocristal de gran número de amidas simples y péptidos muestran una disposición estructural próxima a una conformación *Z_{anti}*.⁶⁵ No obstante, asumiendo que las amidas pueden asociarse por puentes de hidrógeno en estado sólido, pudiera pensarse que la orientación de los grupos metilo fuera la consecuencia de estos enlaces intermoleculares en vez de la preferencia conformacional. Por ello, es algo comúnmente aceptado que las

⁶¹ (a) R. Isecke y R. Brossmer, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 10009-10016. (b) C. Ortiz Mellet, A. Moreno Marín, J. M. García Fernández y J. Fuentes, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 2313-2324. (c) C. Ortiz Mellet, A. Moreno Marín, J. L. Jiménez Blanco, J. M. García Fernández y J. Fuentes, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 2325-2334. (d) I. Waver, B. Piekarska-Bartoszewicz y A. Temeriusz, *Carbohydr. Res.* **1995**, *267*, 167-176. (e) M. Avalos, R. Babiano, P. Cintas, C. J. Durán, J. L. Jiménez y J. C. Palacios, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8043-8056. (f) P. Fowler, B. Bernet y A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 269-287. (g) V. Gyóllai, L. Somsák y L. Szilágyi, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 3969-3972.

⁶² (a) A. Rauk y S. A. Glover, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2337-2345. (b) S. A. Glover y A. Rauk, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2340-2345.

⁶³ Para una revisión reciente, ver: S. A. Glover, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 7229-7271.

⁶⁴ (a) J. Clayden y J. H. Pink, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 1937-1939. (b) M. Kuttenger, M. Frieser, M. Hofweber y A. Mannschrek, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 3629-3645. (c) A. Ahmed, R. A. Bragg, J. Clayden, L. W. Lai, C. McCarthy, J. H. Pink, N. Westlund y S. A. Yasin, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 13277-13294.

⁶⁵ A. T. Hagler, L. Leiserowitz y M. Tuval, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 4600-4612.

conformaciones preferentes en fase gaseosa y en disolución no necesariamente deben coincidir con las observadas en estado cristalino.

Como es natural en el contexto de la investigación científica, donde avances establecidos sirven de base a posteriores desarrollos, las predicciones de estos cálculos *ab initio*, que a lo largo de este trabajo demostraremos que son incorrectas, se están aplicando en metodologías cuyo objetivo es el análisis estructural de péptidos y proteínas, por lo que las conclusiones alcanzadas deben reconsiderarse a la luz de este estudio. Debemos mencionar así una serie de contribuciones de Krimm y col. realizadas en este contexto conformacional, que hacen cálculos sobre el espectro vibracional de la *N*-metilacetamida y pequeños péptidos para la asignación de las bandas propuestas como características de una estructura.⁸ En general, estos cálculos probaron la existencia de distintas conformaciones de la *N*-metilacetamida que difieren en la orientación de sus hidrógenos *N*-metílicos, siendo dos confórmeros (*syn* y *anti*) los que predominan en el espectro. En total discrepancia con nuestro trabajo (como se verá más adelante), estos estudios encontraron para la geometría más estable de la *N*-metilacetamida *trans* un hidrógeno del NCO–metilo eclipsado con el oxígeno y un hidrógeno del CON–metilo eclipsando el protón NH, es decir, la conformación Z_{syn} en la nomenclatura adoptada por nosotros. También el confórmero *cis* más estable tenía esas mismas disposiciones eclipsadas (E_{syn}).

Por otra parte, Tasumi y colaboradores han estudiado recientemente el efecto de los enlaces de hidrógeno intermoleculares en la banda I de amida de la *N*-metilacetamida.⁹ Estos autores encontraron que cuando el enlace de hidrógeno es con el grupo carbonilo, se induce un desplazamiento de 20-25 cm^{-1} hacia menores números de onda, mientras que cuando el enlace de hidrógeno es con el grupo NH, este desplazamiento en la banda I de amida es de sólo 15-20 cm^{-1} . También encontraron que

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

estos desplazamientos son aditivos para péptidos, en los que ambos grupos CO y NH están formando puentes de hidrógeno (Figura 17).

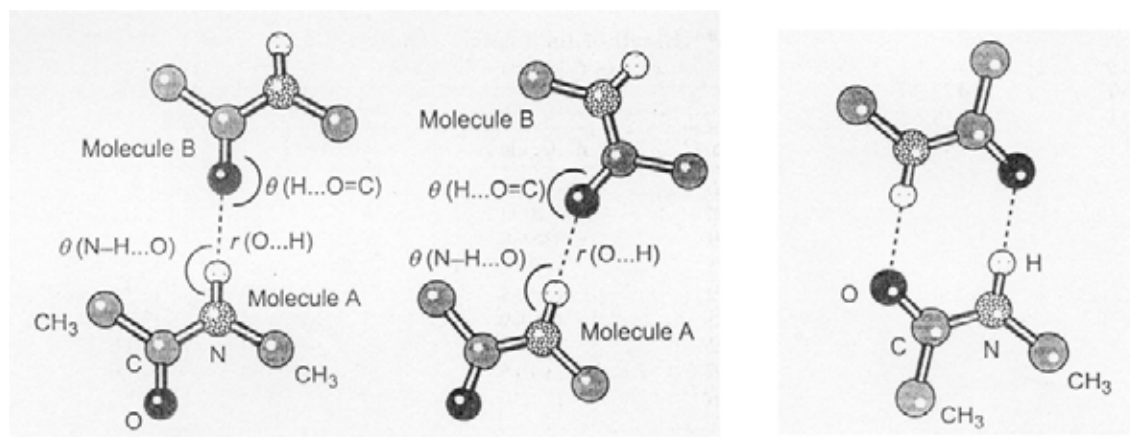


Figura 17. Dimeros modelo en la formación de puentes de hidrógeno en la *N*-metilacetamida analizados por Tasumi et al. (referencia 9).

Otro estudio posterior de Kubelka y Keiderling intentó esclarecer el efecto de los puentes de hidrógeno en las frecuencias vibracionales de las bandas I y II de amida (Figura 18).⁶⁶ Sin embargo, tanto este grupo como el de Tasumi⁹ sugieren conformaciones *syn*.

⁶⁶ J. Kubelka y T. A. Keiderling, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 10922-10928.

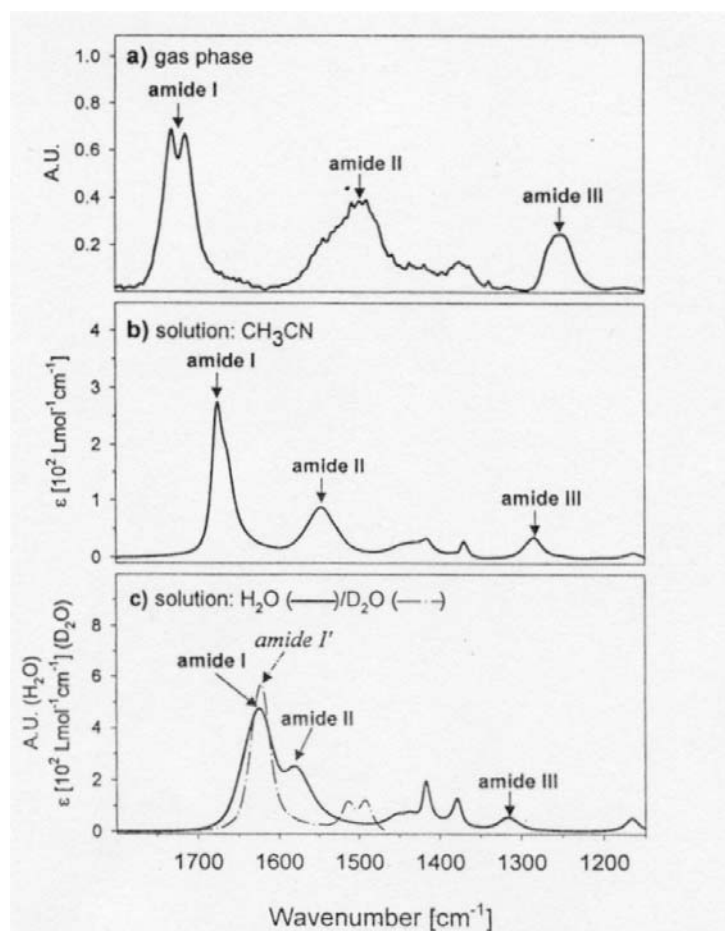


Figura 18. Bandas I, II y III de amida encontradas experimentalmente en los espectros de la *N*-metilacetamida por Kubelka y Keiderling (a) en fase gaseosa, (b) en disolución de CH₃CN, (c) en H₂O (línea continua) y D₂O (línea discontinua).

En definitiva, parece evidente que, si bien la asignación de una banda sensible a la conformación en el espectro vibracional de los péptidos y proteínas puede constituir una valiosa prueba de su estructura secundaria, es dudoso que los espectros ro-vibracionales puedan competir con los modernos y cada vez más sofisticados métodos de RMN para la determinación directa de conformaciones en proteínas (ver más adelante). Sin embargo, una vez demostrado el comportamiento conformacional de estas

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

sustancias mediante RMN, es probable que las absorciones que se observan en espectros vibracionales y rotacionales puedan asignarse adecuadamente, y así ser útiles para la completa caracterización estructural.

3.1.1. Resultados y Discusión.

3.1.1.1. Cálculos teóricos en *N*-alquilacetamidas.

Con las premisas anteriormente mencionadas, decidimos comenzar nuestro estudio llevando a cabo una revisión mediante cálculos computacionales de la tendencia conformacional de las acetamidas secundarias **2** y **7-11** (Figura 19). Para ello, además de realizar estudios en fase gaseosa, hemos examinado el papel del disolvente en la estabilidad de los isómeros rotacionales. Como veremos posteriormente, estos modelos han demostrado ser adecuados para interpretar datos experimentales obtenidos de espectros de RMN en disolución.

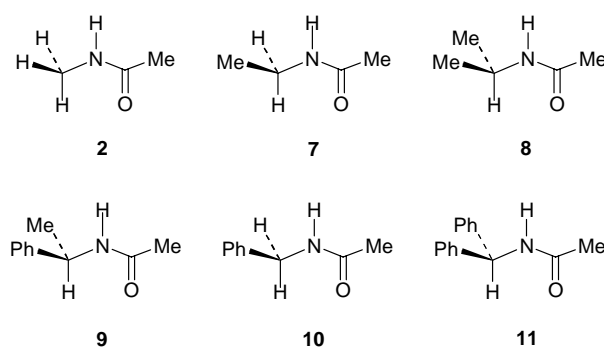


Figura 19. Acetamidas secundarias **2** y **7-11**.

Para minimizar el coste computacional, comenzamos haciendo un estudio preliminar mediante cálculos semiempíricos PM3,²⁸ un método que a menudo concuerda con los datos experimentales. Desafortunadamente, los cálculos PM3 produjeron resultados dispares, prediciendo una conformación E_{anti} para **7**, **8**, **10** y **11**, mientras que la estructura E_{syn} resultó ser más estable para **2**. Para **9**, se encontró la disposición Z_{anti} como la menor en energía, mientras que la conformación E_{syn} era también más estable que la E_{anti} . Con anterioridad a este trabajo se ha sugerido que,

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

como la amida es un grupo funcional altamente polarizado, los métodos semiempíricos disponibles actualmente no reproducen satisfactoriamente su estructura más estable.^{7c}

Afortunadamente, pudieron obtenerse resultados consistentes a través de cálculos B3LYP³² utilizando el conjunto de bases estándar 6-31G*.³³ Esta consistencia apoya la importancia del uso de métodos teóricos que incluyan algún tipo de correlación electrónica (ya sean *ab initio* o DFT),⁶⁷ práctica que se ha convertido en un principio básico de la química computacional moderna.

Detallando la metodología computacional seguida, primero realizamos un análisis conformacional completo PM3 para cada estructura *Z* o *E* de las amidas **2** y **7-11** girando el enlace N-C_α de 30° en 30°, tomando como estructura de partida la conformación *syn* ($\phi = 0^\circ$). Los conformeros más estables para las amidas *Z* y *E* obtenidos por este procedimiento sistemático se optimizaron a ese nivel PM3. La Figura 20 muestra como ejemplo las conformaciones *syn* de los isómeros *Z* y *E* de la *N*-metilacetamida (**2**) tomadas como estructuras de partida en los sucesivos giros del ángulo diedro ϕ (H-N-C-H) en el cálculo.

⁶⁷ (a) W. T. Borden y E. R. Davidson, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 67-75. (b) J. A. Pople, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 1894-1902.

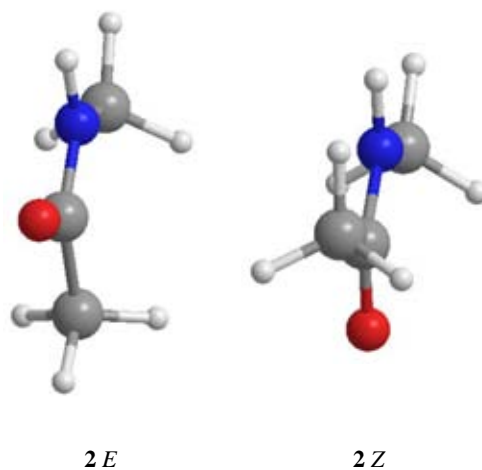


Figura 20. Estructuras de partida en el análisis conformacional de **2**.

Independientemente de la bondad del método PM3 para la predicción de la estructura de las amidas, los mínimos conformacionales encontrados con este método pueden refinarse utilizándolos como estructuras de partida en cálculos DFT o *ab initio*, siendo el proceso global ventajoso en términos de coste computacional. Los conformeros más estables de cada amida *Z* y *E*, ya optimizados a nivel PM3, se optimizaron finalmente sin ninguna restricción a nivel B3LYP/6-31G*.

En las amidas **8**, **9** y **11**, con un sólo átomo de hidrógeno en el C_{α} , el equilibrio conformacional es similar al encontrado previamente para amidas derivadas de carbohidratos,^{6a} presentando en ambas estructuras *Z/E* dos mínimos cercanos a conformaciones *syn* y *anti* ($\phi = 0$ y 180° , respectivamente), como se ve en la Figura 21, que muestra como ejemplo el estudio realizado en **8** a nivel PM3.

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

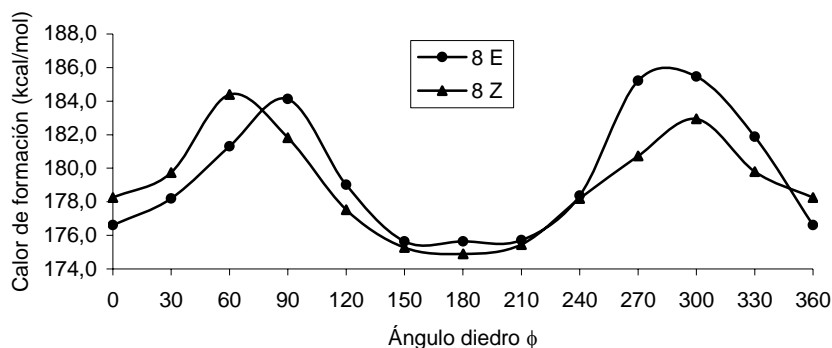


Figura 21. Variación del calor de formación (kcal/mol) respecto al ángulo diedro ϕ en los isómeros Z y E de la N-isopropilacetamida (**8**) a nivel PM3.

En la Tabla 4 pueden verse los resultados obtenidos para estas sustancias a nivel B3LYP/6-31G*, que predicen que los rotámeros más estables corresponden a una disposición *anti* en ambas estructuras ($\Delta E_{syn-anti}$ oscila entre 1,9 y 4,3 kcal/mol). Asimismo, cabe mencionar que el mínimo absoluto lo presenta la estructura Z_{anti} (con un ángulo de torsión ϕ que oscila entre 158 y 176°), presentando diferencias de energía entre las conformaciones más estables de las configuraciones Z/E ($\Delta E = E_{E_{anti}} - E_{Z_{anti}}$) que oscilan en el rango 1,9-2,8 kcal/mol.

Tabla 4. Diferencias de energía (kcal/mol) para **8**, **9** y **11** a nivel B3LYP/6-31G*.

Isómero	ϕ	ψ	Isómero	ϕ	ψ	$\Delta E_{syn-anti}$	$\Delta E (E_{anti} - Z_{anti})$
8 E_{syn}	15,9	17,2	8 E_{anti}	167,4	0,7	3,85	2,76
8 Z_{syn}	0,0	180,0	8 Z_{anti}	157,7	174,5	1,86	
9 E_{syn}	24,2	17,1	9 E_{anti}	142,3	4,0	4,14	1,93
9 Z_{syn}	333,0	169,9	9 Z_{anti}	175,9	173,9	2,05	
11 E_{syn}	30,0	11,2	11 E_{anti}	217,2	6,6	4,33	2,46
11 Z_{syn}	337,5	164,4	11 Z_{anti}	175,6	167,4	4,19	

En cuanto a la disposición en torno al enlace NCO-CH₃, que aparece reflejada en la Tabla 4 mediante el ángulo ψ referido al diedro O=C-C-H, la conformación alternada entre los enlaces C=O y C_α-H es la de menor energía en los isómeros *Z*, mientras que el cálculo predice la conformación eclipsada en los mínimos de energía encontrados para los isómeros *E*. La Figura 22 muestra las conformaciones límite generadas en la torsión alrededor del enlace NCO-CH₃ (ψ) de una acetamida.

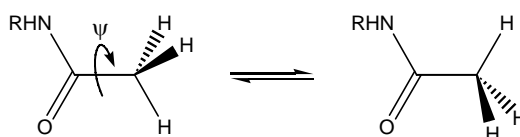


Figura 22. Conformaciones eclipsada ($\psi = 0^\circ$) y alternada ($\psi = 180^\circ$) alrededor del enlace O=C-C-H.

La Figura 23 muestra las conformaciones de mínima energía predichas por los cálculos B3LYP/6-31G* para los isómeros *Z* y *E* de la *N*-isopropilacetamida (**8**).

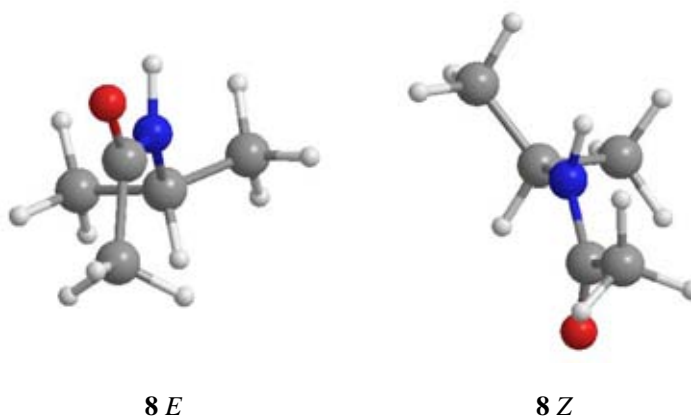


Figura 23. Conformaciones B3LYP/6-31G* más estables de la *E*- y *Z*-*N*-isopropilacetamida.

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

La *N*-metilacetamida (**2**), con tres átomos de hidrógeno en el C_α, es el modelo más simple para el estudio conformacional del enlace peptídico en proteínas, por lo que es una de las sustancias más estudiadas.⁷⁻¹¹ Por nuestra parte también hemos procedido a realizar un riguroso estudio a nivel DFT sobre ella. Para obtener un espectro conformacional completo de esta sustancia se realizaron cálculos de energía a nivel B3LYP/6-31G* para ambos isómeros *Z/E* rotando el enlace NH-CH_α cada 5°, pero sólo en el rango de 0 a 60°, que es suficiente para representar todo su espectro conformacional, y liberando el resto de los parámetros. Las energías electrónicas obtenidas en este cálculo se muestran en la Tabla 5:

Tabla 5. Energías electrónicas (kcal/mol) calculadas para el camino rotacional de (*Z*)- y (*E*)-*N*-metilacetamida al nivel B3LYP/6-31G*.

ϕ	E (kcal/mol)	
	2 Z	2 E
0	-155950,58	-155948,39
5	-155950,58	-155948,39
10	-155950,59	-155948,39
15	-155950,61	-155948,41
20	-155950,63	-155948,42
25	-155950,66	-155948,43
30	-155950,70	-155948,43
35	-155950,73	-155948,42
40	-155950,78	-155948,39
45	-155950,82	-155948,35
50	-155950,86	-155948,30
55	-155950,88	-155948,24
60	-155950,89	-155948,17

Como se observa mejor en la Figura 24, donde se representan estos resultados, la estructura *Z*, con un ángulo de torsión ϕ cercano a 60° (o 180° si nos referimos al H-2) es la más estable. No es difícil deducir de esta representación que mientras que en el isómero *Z*, siempre más estable que el *E* para cualquier ángulo de torsión, la energía decrece continuamente de la conformación *syn* a la *anti*, en el isómero *E* encontramos un mínimo conformacional cercano a los 30° , a partir del cual la energía crece siendo máxima en la conformación *anti*, probablemente debido a que en esta conformación la tensión estérica entre ambos metilos es máxima.

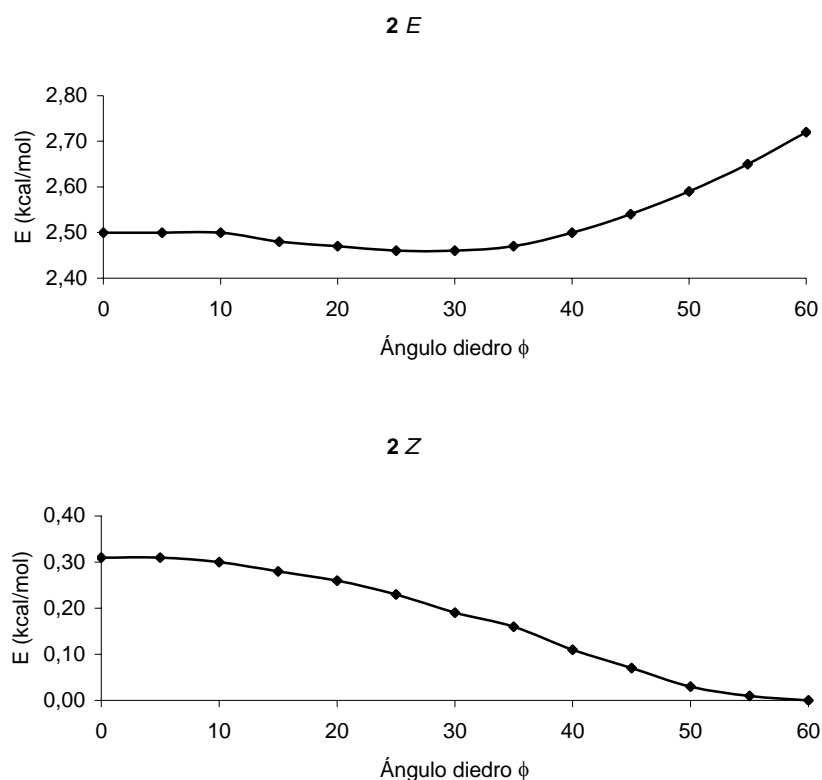


Figura 24. Variación de la energía para la *E*- y *Z*-*N*-metilacetamida en función del ángulo de torsión ϕ ($^\circ$). Energías referidas ($E = 0,00$ kcal/mol) a la conformación más estable ($\phi = 60^\circ$, $E = -155950,89$ kcal/mol).

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

Finalmente, las conformaciones más estables de los isómeros *Z* y *E* se optimizaron completamente sin ninguna restricción; los datos obtenidos se encuentran recogidos en la Tabla 6. La estructura más estable en fase gaseosa corresponde a una disposición *Z_{anti}* ($\phi = 180^\circ$) que es unas 2,5 kcal/mol más estable que el rotámero de mínima energía de la estructura *E*. En el caso del isómero *Z* se realizó también una optimización del máximo de energía ($\phi = 0^\circ$) para localizar el punto de silla, encontrándose que efectivamente se sitúa en la posición ideal que corresponde a una conformación *Z_{syn}* ($\phi = 0,27^\circ$, $\psi = 179,86^\circ$). La diferencia de energía que se obtiene respecto a la conformación *Z_{anti}* es de 0,31 kcal/mol. Esta estructura de transición fue caracterizada por una sola frecuencia imaginaria debida a la rotación en torno al enlace CON-CH₃.⁶⁸ La Figura 25 muestra las conformaciones de mínima energía junto con su punto de silla (respecto al ángulo diedro ϕ) de los isómeros *E* y *Z* de la *N*-metilacetamida encontrados mediante cálculos B3LYP/6-31G*.

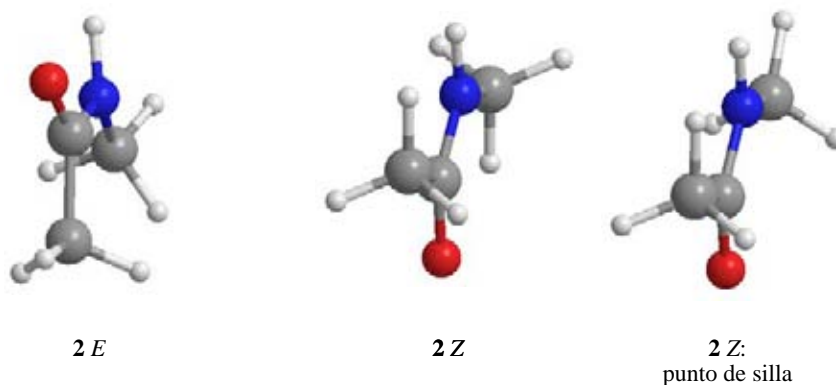


Figura 25. Conformaciones B3LYP/6-31G* más estables para la *E*- y *Z*-*N*-metilacetamida (**2**), y punto de silla respecto a ϕ del isómero *Z*.

⁶⁸ En el listado de frecuencias calculadas, una frecuencia imaginaria aparece como un número negativo. Por definición, una estructura con una frecuencia imaginaria es un punto de silla, por lo que habitualmente se utiliza esta propiedad para caracterizar la estructura de un estado de transición.

Cabe recordar que la mayor estabilidad del isómero *Z* de la *N*-metilacetamida (denominado frecuentemente isómero *trans*)⁵ se ha documentado previamente, pero que es el rotámero *syn* el que se ha postulado como la conformación más estable por cálculos Hartree-Fock.^{7a,7c} Para esclarecer este punto, es decir, la diferente predicción entre cálculos DFT y *ab initio*, hemos recalculado el espectro conformacional mediante modelos *ab initio* de mayor nivel (Tabla 6). Como se observa, los cálculos MP2/6-31G* predicen para la *N*-metilacetamida una disposición *Z_{anti}* con la conformación alternada para el grupo COCH₃ como confórmero de menor energía. Además, es conveniente constatar que no se encontró ningún mínimo local para la conformación *syn* alternativa. Sin embargo, en fuerte contraste con lo anterior, cálculos como los HF/6-31G** y MP2/6-31+G** sugieren invariablemente que una orientación cercana al confórmero *Z_{syn}* ($\phi = 24,60$ y $17,82^\circ$, respectivamente) es aproximadamente 2,7 kcal/mol más estable que la forma *E_{syn}*. Además, como demostración de que las geometrías predichas por unos u otros métodos no son debidas a mínimos locales, cuando las geometrías más estables obtenidas a los niveles HF/6-31G* y MP2/6-31+G** fueron optimizadas completamente a nivel B3LYP/6-31G*, se encontró de nuevo la conformación *Z_{anti}* (con una disposición alternada para el grupo COCH₃) como la menor en energía. Por el contrario, cuando la conformación predicha como más estable a nivel B3LYP/6-31G*, *Z_{anti}*, fue sometida a una completa optimización a los niveles HF/6-31G** y MP2/6-31+G**, se localiza la conformación *Z_{syn}* recogida en la Tabla 6 para estos métodos. Queda claro así que los métodos DFT predicen una conformación diferente a la que predice el método Hartree-Fock, de menor nivel. Como se comentara en el apartado 2.1.2 debemos considerar este último de menor nivel, al utilizar una correlación electrónica “promediada”. Lo que ponemos de manifiesto en esta Tesis es que el método MP2/6-31+G** predice también una conformación *syn* que a lo largo de este trabajo demostraremos que es incorrecta (ver página 119). En cambio, este método,

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

con un conjunto de bases menor como es el 6-31G*, predice valores muy similares a los del cálculo B3LYP/6-31G*.

Tabla 6. Ángulos de torsión (°) y diferencias de energía (kcal/mol) para la *E*- y *Z*-*N*-metilacetamida.

Método de cálculo	Isómero <i>E</i>		Isómero <i>Z</i>		ΔE (<i>E</i> - <i>Z</i>)
	ϕ	ψ	ϕ	ψ	
B3LYP/6-31G*	28,97	1,41	179,99	179,99	2,47
MP2/6-31G*	29,98	1,53	176,32	159,45	2,64
MP2/6-31+G**	29,68	3,69	17,82	179,37	2,72
HF/6-31G**	18,61	2,25	24,60	158,14	2,70

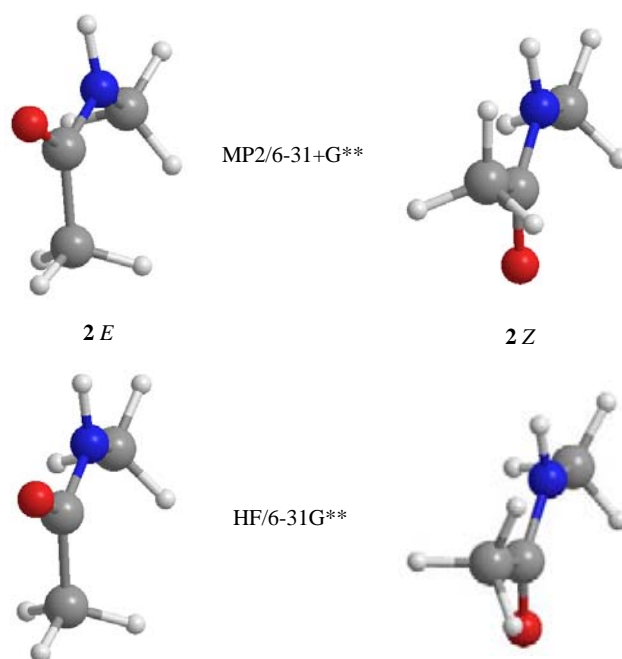


Figura 26. Estructuras de mínima energía de la *E*- y *Z*-*N*-metilacetamida (2), calculadas a los niveles MP2/6-31+G** y HF/6-31G**.

En los casos de la *N*-etilacetamida (**7**) y *N*-bencilacetamida (**10**), que portan dos átomos de hidrógeno en el CON-CH_α, también se llevaron a cabo optimizaciones adicionales a nivel B3LYP/6-31G* siguiendo el procedimiento previamente establecido para **8**, **9** y **11**. Como muestra la Figura 27, que recoge el espectro conformacional encontrado a nivel PM3 para la *N*-etilacetamida (**7**) que se utiliza como modelo, la energía varía débilmente con el ángulo de torsión ϕ , con la excepción del máximo pronunciado que se observa para cada isómero *Z* o *E* debido a disposiciones eclipsadas. Así, en el caso de los isómeros *E*, el metilo del grupo acetato estaría en posición eclipsada con el sustituyente en el C_α al nitrógeno, ya fuera el metilo en **7** o el fenilo en **10**. De igual forma, para los isómeros *Z* el máximo local se debe a un eclipsamiento del carbonilo del grupo acetato con el sustituyente en el C_α al nitrógeno.

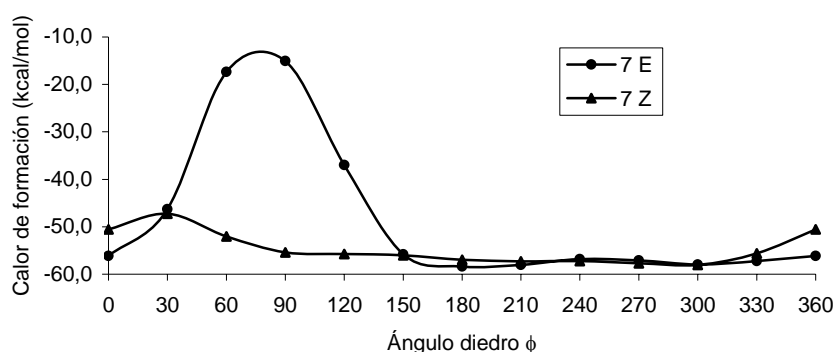


Figura 27. Variación del calor de formación (kcal/mol) con el ángulo diedro ϕ de la *Z*- y *E*-*N*-etilacetamida (**7**) a nivel PM3.

Para ambas amidas, las optimizaciones a nivel B3LYP/6-31G* encuentran que las conformaciones *syn* corresponden a ángulos de torsión $\phi = 0$ y 120° , mientras que los rotámeros *anti* están definidos por valores de ϕ de 180 y 300° . La Tabla 7 resume los resultados del análisis conformacional de **7** y **10**. Además, si se comparan las estructuras

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

Z_{anti} y E_{anti} , se observa que la primera es más estable ($\Delta E = 2,7-3,2$ kcal/mol) a este nivel de teoría. Los ángulos de torsión de las correspondientes amidas Z_{anti} **7** y **10** son $164,7$ y $169,5^\circ$, respectivamente.

Tabla 7. Ángulos de torsión ($^\circ$) y diferencias de energía (kcal/mol) para **7** y **10** a nivel B3LYP/6-31G*.

Isómero	ϕ	ψ	Isómero	ϕ	ψ	$\Delta E (E_{anti}-Z_{anti})$
7 E_{anti}	163,00	1,62	7 Z_{anti}	164,68	175,81	2,68
10 E_{anti}	191,11	1,63	10 Z_{anti}	169,50	173,89	3,16

La Figura 28 muestra las estructuras más estables (Z_{anti}) predichas por los cálculos B3LYP/6-31G* para la *N*-etilacetamida (**7**) y la *N*-bencilacetamida (**10**).

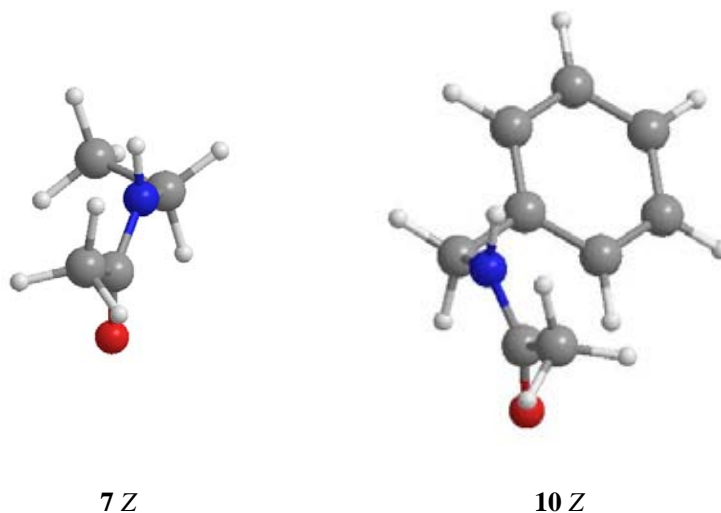


Figura 28. Estructuras Z_{anti} de **7** y **10** a nivel B3LYP/6-31G*.

Efecto del disolvente.

Los estudios de simulación de amidas, tanto en fase gaseosa como en disolución, son especialmente importantes para obtener modelos fiables de las proteínas. De hecho, la elucidación de sus mecanismos de empaquetamiento es uno de los campos más atractivos de la bioquímica teórica.⁶⁹

Los primeros estudios experimentales que implicaban RMN dinámica^{3,59a} han sido complementados a lo largo de los años 90 mediante cálculos computacionales.^{59b-g} La mayoría de estos estudios se concentran en los efectos de parámetros del disolvente sobre la barrera rotacional, tales como su polaridad o su capacidad como donador en enlaces de hidrógeno. En general, la rotación del enlace de amida disminuye cuando aumenta tanto la polaridad como la formación de puentes de hidrógeno. Así, parece ser que la barrera para la *N,N*-dimetilacetamida es mayor en metanol que en acetonitrilo por 1,0 kcal/mol, aunque ambos disolventes tienen constantes dieléctricas similares.^{59e} Sin embargo, las diferencias de energía calculadas a distintos niveles de teoría son diferentes, por lo que hay que tomar con precaución las estimaciones de los efectos del disolvente. De todas formas, se ha encontrado que la inclusión de dichos efectos proporciona barreras que están de acuerdo con los datos experimentales, mientras que los métodos *ab initio* en fase gaseosa muestran una tendencia a dar barreras menores que las observadas experimentalmente.^{59a}

Los cálculos sugieren que los estados de transición de las rotaciones de las amidas simples en fase gaseosa y en disolventes apróticos pueden ser diferentes de los

⁶⁹ (a) *Protein Folding*; T. E. Creighton, Ed.; W. H. Freeman: Nueva York, 1992. (b) R. L. Stein, *Adv. Protein Chem.* **1993**, *44*, 1-24. (c) A. Ben-Naim, *Structure and Reactivity in Aqueous Solution*; C. J. Cramer, D. G. Truhlar, Eds.; ACS Symposium Series 568; American Chemical Society: Washington, D. C., 1994; pp 371-380.

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

encontrados en un medio acuoso.⁷⁰ Debido a que no pueden realizarse deducciones a priori, nosotros hemos elegido como modelos la *N*-metilacetamida (**2**) y la *N*-(1-metilbencil)acetamida (**9**) y hemos recalculado las diferencias de energía en tres disolventes polares: agua ($\epsilon = 78,5$), metanol ($\epsilon = 32,7$) y cloroformo ($\epsilon = 4,8$).^{71,72} La inclusión del cloroformo se justifica por el hecho de que los espectros de RMN de numerosas amidas se registran habitualmente en este disolvente deuterado, con lo que así facilitamos su comparación con los datos experimentales.

Se ha utilizado la teoría del campo de reacción autoconsistente (SCRF),⁷³ con las energías B3LYP/6-31G* para tener un modelo de estas amidas en disolución y para calcular la energía de solvatación usando el modelo sencillo, pero no por ello menos útil, de dipolos de Onsager.⁷⁴ Las optimizaciones se realizaron sin ninguna restricción partiendo de estructuras optimizadas previamente en fase gaseosa al mismo nivel de teoría. Los resultados obtenidos de la aplicación del procedimiento de Onsager a los cuatro posibles conformeros de **9** (determinados por sus ángulos de torsión) se muestran en la Tabla 8. Los rotámeros E_{anti} y Z_{anti} son invariablemente las estructuras más

⁷⁰ E. M. Duffy, D. L. Severance y W. L. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7535-7542.

⁷¹ C. Reichardt, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*; VCH: Weinheim, 1990; pp 408-410.

⁷² La caracterización de la polaridad de un disolvente por medio de su constante dieléctrica puede ser imprecisa, ya que este parámetro representa simplemente la capacidad de una sustancia para separar cargas y orientar sus dipolos, mientras que la capacidad de solvatación depende de varias interacciones. El parámetro de energía de transición de Dimroth-Reichardt (E_T) refleja con más precisión la polaridad del disolvente. Los valores normalizados de E_T para agua, metanol y cloroformo son 1,000, 0,762 y 0,259, respectivamente (ver referencia 71, pp 363-371).

⁷³ (a) O. Tapia y O. Goscinski, *Mol. Phys.* **1975**, *29*, 1653-1661. (b) D. Rinaldi, M. F. Ruiz-López y J.-L. Rivail, *J. Chem. Phys.* **1983**, *78*, 834-838. (c) G. Alagona, C. Ghio, J. Igual y J. Tomasi, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3417-3421. (d) M. W. Wong, K. B. Wiberg y M. J. Frisch, *J. Chem. Phys.* **1991**, *95*, 8991-8998. (e) B. Mennucci y J. Tomasi, *J. Chem. Phys.* **1997**, *106*, 5151-5158.

⁷⁴ L. Onsager, *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 1486-1493.

estables independientemente del disolvente considerado, con diferencias de energía entre ellos que oscilan entre 1,8 y 1,9 kcal/mol.

Tabla 8. Efectos del disolvente (kcal/mol) calculados para la *N*-(1-metilbencil)acetamida al nivel B3LYP/6-31G*.

Disolvente	Isómero	ϕ	ψ	Isómero	ϕ	ψ	ΔE (<i>syn-anti</i>)	ΔE ($E_{anti}-Z_{anti}$)
CHCl ₃	9E_{syn}	23,68	17,25	9E_{anti}	141,36	4,22	3,75	1,92
	9Z_{syn}	26,08	169,30	9Z_{anti}	175,52	173,67	2,00	
CH ₃ OH	9E_{syn}	23,43	15,72	9E_{anti}	140,95	4,44	3,68	1,84
	9Z_{syn}	25,60	169,59	9Z_{anti}	175,34	174,50	2,01	
H ₂ O	9E_{syn}	23,40	15,49	9E_{anti}	140,87	4,49	3,68	1,83
	9Z_{syn}	25,60	169,65	9Z_{anti}	175,46	170,78	2,01	

En el modelo SCRF, la energía de estabilización refleja la interacción entre el momento dipolar de la amida ($\mu E > \mu Z$) y el momento dipolar inducido por solvatación, por lo que los disolventes más polares deben estabilizar mejor a los isómeros más polares. Así, el medio acuoso tiene un efecto más pronunciado sobre el isómero *E* que el que tiene sobre su análogo *Z* con respecto a la fase gaseosa (ver Tabla 4), aunque de todas formas se encuentran pequeñas variaciones (aproximadamente 0,1 kcal/mol). Hay que decir, sin embargo, que aunque la variación de energía responde bien a la variación de polaridad del disolvente, aún no hemos estudiado el efecto de un disolvente asociado, incorporando, por ejemplo, una molécula de agua que forme un puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno. En el caso de la *N*-metilacetamida (**2**) se observa un comportamiento similar, aunque el ángulo de torsión obtenido tras la optimización energética sin restricciones se acerca al de la conformación *E_{syn}* (Tabla 9, ver también la Tabla 6). Debemos destacar nuevamente que, en el rango de los disolventes estudiados, la conformación *Z_{anti}* es la más estable ($\Delta E \sim 1,4-1,8$ kcal/mol). De nuevo la

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

estabilización encontrada en agua para la conformación más estable del isómero *E* es mayor (1,05 kcal/mol) que la encontrada para su análogo *Z*.

Tabla 9. Efectos del disolvente (kcal/mol) calculados para la *N*-metilacetamida a nivel B3LYP/6-31G*.

Disolvente	Isómero	ϕ	ψ	Isómero	ϕ	ψ	$\Delta E (E_{syn}-Z_{anti})$
CHCl ₃	2E	19,42	2,34	2Z	179,98	179,95	1,79
CH ₃ OH	2E	16,53	2,43	2Z	179,97	179,98	1,46
H ₂ O	2E	16,13	2,43	2Z	179,98	179,87	1,42

Los estudios previos de espectroscopia RMN realizados por otros autores^{75,76} encontraron que la *N*-metilacetamida es una excepción dentro de las *N*-alquilacetamidas, ya que existe como isómero *cis* (forma *E*) en pequeña proporción (1-3 % en agua), no variando demasiado en disolventes apolares. Para este compuesto se ha publicado que el isómero *trans* (forma *Z*) es el más estable ($\Delta E \sim 2,5$ kcal/mol). Nuestros cálculos sugieren también que en el conformero menos estable de la *N*-metilacetamida (*E*), el grupo *N*-metilo se orienta en disolución (Tabla 9) de forma que uno de sus átomos de hidrógeno está eclipsado con el átomo de hidrógeno de amida ($\phi = 16,1-19,4^\circ$), mientras que el grupo carbonilo se encuentra también eclipsado con un átomo de hidrógeno del metilo acílico ($\psi \sim 2,4^\circ$).^{75,76} La tendencia a esta conformación se aprecia también en fase gaseosa (ver Figura 25, y Tabla 6, págs. 58 y 60).

En este punto, debemos comentar que los efectos del disolvente han sido evaluados también para los conformeros estables *Z* y *E* de las amidas secundarias

⁷⁵ R. H. Barker y G. J. Boudeaux, *Spectrochim. Acta* **1967**, 23A, 727-728.

⁷⁶ A. Radzicka, L. Pedersen y R. Wolfenden, *Biochemistry* **1988**, 27, 4538-4541.

midiendo sus entalpías de solvatación. Este parámetro presenta una buena correlación con la capacidad del disolvente para actuar como donador en un enlace de hidrógeno con el oxígeno de amida.⁷⁷ Estos estudios se realizaron en dos casos extremos: *N*-metilpropionamida, que se sabe que existe casi exclusivamente en la conformación *Z*,⁷⁸ y 2-pirrolidona, en la que el anillo obliga a la adopción de la conformación *E*, menos favorable.⁷⁹ Sólo en disolventes polares próticos, en los que la agregación entre dos moléculas de soluto debería ser mínima, se obtuvieron las mismas entalpías de solvatación. Nuestros resultados, en cualquier caso, son consistentes con los publicados por Wolfenden y col., que encontraron una población para el conformero *Z* de la *N*-metilacetamida en D₂O del 98,55 %.⁷⁶

Como conclusión al apartado, los cálculos teóricos realizados a nivel B3LYP/6-31G* reproducen bien el análisis conformacional de acetamidas simples tanto en fase gaseosa como en disolución, y predicen como estructura más estable la disposición *Z_{anti}* con una conformación alternada con respecto al ángulo diedro O–C–C–H (ψ). Los ángulos de torsión C _{α} –NH (ϕ) oscilan entre 157,7° y 180,0° en fase gaseosa, que es una variación razonable asumiendo que el estado fundamental es plano. También se han encontrado para las amidas *E* mínimos conformacionales con ángulos de torsión que corresponden a orientaciones *anti* (y una conformación eclipsada para el ángulo diedro ψ), que son menos estables que el isómero *Z* ($\Delta E \sim 1,9$ -3,2 kcal/mol). La *N*-metilacetamida (**2**) se desvía ligeramente de este comportamiento, porque la estructura más estable de su conformero *E* muestra un ángulo de torsión ϕ cercano a 30°. En cualquier caso, este último es menos estable que el conformero *Z_{anti}* correspondiente

⁷⁷ K. M. Morgan y D. A. Kopp, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 2759-2763.

⁷⁸ L. A. LaPlanche y M. T. Rogers, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 337-341.

⁷⁹ G. Pilcher, *The Chemistry of Acid Derivatives, Supplement B*; S. Patai, Ed.; Wiley: Nueva York, 1992; Vol. 2, Capítulo 2.

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

($\Delta E \sim 2,7$ kcal/mol). La utilización del método MP2/6-31G* proporcionó resultados similares. Sorprendentemente, el método HF/6-31G** y los cálculos de mayor nivel MP2/6-31+G** predicen otros mínimos conformacionales ($\phi = 24,60$ y $17,82^\circ$, respectivamente), que a lo largo de esta Tesis demostraremos que son inconsistentes con los datos experimentales de RMN. Con respecto a los efectos del disolvente, la estabilidad relativa de ambos isómeros rotacionales se incrementa en disolventes polares, aunque hay una mayor estabilización del isómero *E*, más polar. Así, el modelo simple SCAF reproduce para estas amidas interacciones dipolo-dipolo inducido que conducen a estructuras Z_{anti} como los rotámeros preferentes en disolución.

3.1.1.2. Correlaciones de RMN en *N*-alquilacetamidas.

La RMN de las acetamidas *N*-alquiladas muestran en disolución un único conjunto de señales que se han asignado a los isómeros *Z*.³ La única excepción es la *N*-metilacetamida (**2**), que muestra en algunos disolventes la presencia del isómero *E*, como se ha comentado anteriormente. En ella son observables ambos isómeros *Z/E* porque existen, pero además porque su interconversión es lenta en la escala de tiempo de detección de la RMN. Es razonable asumir que las demás acetamidas muestren un único conjunto de señales porque sólo el isómero *Z* existe en cuantía observable, ya que el equilibrio *Z/E* debería ser más lento en ellas que en **2**, al ser los grupos unidos a la función más voluminosos.

Otra cuestión es el equilibrio Z_{anti}/Z_{syn} , ya que ambos conformeros han sido encontrados en los cálculos DFT realizados sobre las estructuras **8**, **9** y **11** (Tabla 4). Nosotros hemos estimado las poblaciones de las conformaciones Z_{anti} y Z_{syn} sustituyendo las diferencias energéticas calculadas para ellas en la ecuación [7], donde *K* es la constante de equilibrio entre isómeros:

$$\ln K = -\Delta E/RT \quad [7]$$

encontrando que las conformaciones Z_{anti} existen casi con exclusividad, siendo sus poblaciones a temperatura ambiente del 94,8, 96,6 y 99,9 %, respectivamente. En cuanto a **7** y **10**, no se pudo observar en ellas ningún mínimo atribuible a una orientación Z_{syn} . También en el caso de la *N*-metilacetamida (**2**), más conflictiva, nuestros cálculos DFT nos han permitido la caracterización inequívoca de sus conformaciones Z_{syn} y Z_{anti} como punto de silla y mínimo conformacional, respectivamente.

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

En la actualidad se utilizan varias correlaciones empíricas para determinar el desplazamiento químico de un núcleo en concreto.⁸⁰ Entre ellas, la ecuación aditiva de Shoolery ha llegado a ser la más conocida para calcular desplazamientos químicos aproximados de protones de metileno en disolución en CDCl_3 .⁸¹ El desplazamiento químico de un protón puede ser evaluado por medio de una ecuación de Shoolery modificada:^{81d}

$$\delta_{\text{CHXYZ}} = 0,23 + \sigma_x + \sigma_y + \sigma_z \quad [8]$$

donde σ_x , σ_y y σ_z representan constantes para los sustituyentes, de los que consideramos que un término se debe a la función amida. De acuerdo con esto, el desplazamiento químico observado (δ_{obs}), medido experimentalmente sobre el espectro de RMN, puede utilizarse para estimar el desapantallamiento causado por la función amida sobre un protón concreto (σ_{H}), o sobre un conjunto de protones (σ_{amida}) magnéticamente equivalentes (ecuación [9]),

$$\sigma_{\text{amida}} = \delta_{\text{obs}} - (0,23 + \sigma_x + \sigma_y) \quad [9]$$

Como el enlace CON-CH_α gira rápidamente a temperatura ambiente, el desapantallamiento causado por la función amida en un protón (σ_{H}), se verá reflejado de forma ponderada en el desapantallamiento provocado por la función amida en el conjunto de protones magnéticamente equivalentes (σ_{amida}). Pero además, si como

⁸⁰ P. S. Beauchamp y R. Marquez, *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 1483-1485.

⁸¹ (a) J. N. Shoolery, *Varian Associates Technical Information Bulletin*; Palo Alto; Vol. 2, n° 3. (b) E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl y W. Simon, *Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds*; Springer: Nueva York, 1983; pp H5-H10. (c) E. C. Friedrich y K. Gates Runkle, *J. Chem. Educ.* **1984**, *61*, 830-832. (d) E. C. Friedrich y K. Gates Runkle, *J. Chem. Educ.* **1986**, *63*, 127-129.

muestran los cálculos, se asume que la conformación Z_{anti} predomina en disolución, los protones se encontrarán preferentemente en las disposiciones *anti* y *gauche*.

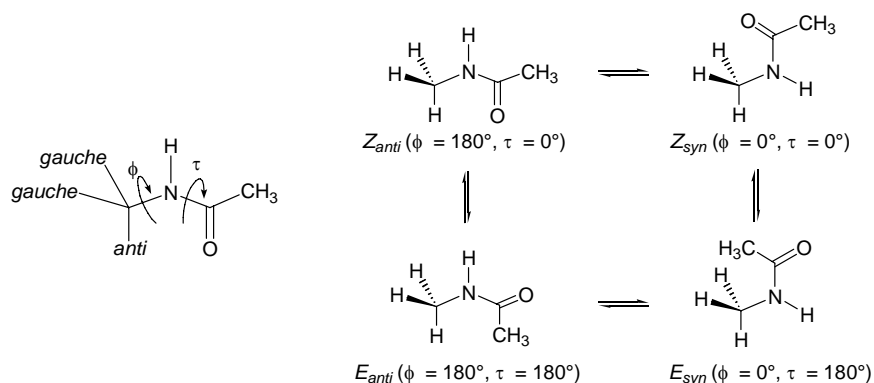


Figura 29. Disposiciones *anti* y *gauche* y conformaciones de la *Z*- y *E*-*N*-metilacetamida (**2**).

La ecuación [10] muestra la contribución a σ_{amida} de los desapantallamientos de los protones individuales (σ_H), de los cuales uno siempre será σ_{anti} , ya que los sustituyentes distintos de hidrógeno, si los hay, ocuparán preferentemente una disposición *gauche*; n en la ecuación [10] representa el número de átomos de hidrógeno sobre el C_α .

$$\sigma_{amida} = \frac{\sigma_{anti}}{n} + (n-1) \frac{\sigma_{gauche}}{n} \quad [10]$$

Los valores promedio de σ_{anti} de la Tabla 10 son la media aritmética de los desapantallamientos provocados sobre el protón $CON-CH_\alpha$ de las amidas **8**, **9** y **11**, marcados con (*) en la Tabla. Estas amidas tienen un único protón en esta posición para el que los cálculos predicen una disposición *anti*, por lo que, como se deduce de la ecuación [10], $\sigma_{amida} = \sigma_{anti}$.

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

Tabla 10. Desapantallamientos provocados por la función amida (ppm) en CDCl₃, DMSO-*d*₆ y D₂O (ppm).

		2	7	8	9	10	11	Promedio	SD
	x, y	H, H	H, Me	Me, Me	Me, Ph	H, Ph	Ph, Ph		
Disolvente	σ_x	0,34	0,34	0,68	0,68	0,34	1,83		
	σ_y	0,34	0,68	0,68	1,83	1,83	1,83		
	δ_{obs}	2,80	3,28	4,06	5,17	4,43	6,25		
CDCl ₃	σ_{amida}	1,89	2,03	2,47	2,43	2,03	2,36		
	σ_{anti}	2,42	2,42	2,47*	2,43*	2,42	2,36*	2,42	0,04
	σ_{gauche}	1,63	1,64			1,64		1,64	0,01
	$\sigma_{anti} - \sigma_{gauche}$	0,79	0,78			0,78		0,78	0,01
	δ_{obs}	2,54	2,96	3,78	4,89	4,24	6,11		
DMSO- <i>d</i> ₆	σ_{amida}	1,63	1,71	2,19	2,15	1,84	2,22		
	σ_{anti}	2,19	2,19	2,19*	2,15*	2,19	2,22*	2,19	0,02
	σ_{gauche}	1,35	1,23			1,49		1,36	0,13
	$\sigma_{anti} - \sigma_{gauche}$	0,84	0,96			0,70		0,83	0,13
	δ_{obs}	2,57	3,17	3,87	4,78	4,34	6,09		
D ₂ O	σ_{amida}	1,66	1,92	2,28	2,04	1,94	2,20		
	σ_{anti}	2,17	2,17	2,28*	2,04*	2,17	2,20*	2,17	0,08
	σ_{gauche}	1,41	1,67			1,71		1,60	0,16
	$\sigma_{anti} - \sigma_{gauche}$	0,76	0,50			0,46		0,57	0,16

* Valores tomados para realizar el promedio de σ_{anti} . SD: desviación estándar.

La Tabla 10 resume el cálculo mediante la ecuación [9] de los desapantallamientos provocados por la función amida en conjuntos de protones magnéticamente equivalentes (σ_{amida}) a partir de los desplazamientos químicos observados (δ_{obs}), y por medio de la ecuación [10], de los desapantallamientos de los protones individuales situados en posición *anti* y *gauche*. En CDCl₃, los σ_{anti} y σ_{gauche} promediados son de 2,42 y 1,64 ppm respectivamente, con escasas desviaciones en todos los casos. Así, en la última columna de la tabla se incluye la desviación estándar

(*standard deviation*, SD),⁸² que es de 0,04 y 0,01, respectivamente. La diferencia de desapantallamiento entre los protones situados en las disposiciones indicadas ($\sigma_{anti} - \sigma_{gauche}$) permanece constante entre 0,78 y 0,79 ppm, con una desviación de sólo 0,01 ppm.

En el disolvente DMSO-*d*₆ se observan diferencias similares ($\sigma_{anti} - \sigma_{gauche} = 0,83$ ppm), si bien los valores promedio de σ_{anti} y σ_{gauche} calculados en este disolvente (2,19 y 1,36 ppm, respectivamente), son inferiores en 0,23 y 0,28 ppm a los calculados para CDCl₃. Hemos de considerar aquí que las mayores desviaciones estándar encontradas en este disolvente (y en D₂O), del orden de 0,1 ppm, nos parecen lógicas si tenemos en cuenta que los valores aditivos de σ para los distintos sustituyentes utilizados en las ecuaciones tipo Shoolery están determinados para los disolventes CDCl₃ y CCl₄.^{80,81}

En D₂O los valores de σ_{anti} muestran desapantallamientos promedio inferiores en 0,25 ppm a los calculados para las disoluciones en CDCl₃, mientras que, curiosamente, los valores de σ_{gauche} son similares. Como consecuencia, la diferencia entre ambos valores ($\sigma_{anti} - \sigma_{gauche} = 0,57$ ppm) es también inferior a la calculada para los otros disolventes. En cuanto a las desviaciones estándar para este disolvente, hemos de tener en cuenta que, a lo dicho para DMSO-*d*₆, se sumaría el hecho de que ciertas amidas son muy insolubles en D₂O, provocando que en parte puedan permanecer como micromicelas. Por otra parte, la formación de puentes de hidrógeno con el agua puede constituir otro foco adicional de distorsiones, tanto de la estructura de la amida como de sus desplazamientos en RMN.

⁸² $SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$, siendo \bar{x} el promedio de todos los datos y n el número total de éstos.

Para el cálculo de estos datos, como se indica en el pie de la Tabla 11, nuevamente en las amidas con un único protón en C_α se considera que éste ocupa la posición *anti*, y el promedio de los cinco valores correspondientes es el valor de σ_{anti} utilizado para el cálculo de σ_{gauche} a partir de la ecuación [10].

Tabla 11. Desapantallamiento (ppm) de protones CON-CH $_\alpha$ para **2** y **7-16** en CDCl $_3$.

Compuesto	δ_{obs}	x, y	σ_{amida}	σ_{anti}	σ_{gauche}	$\sigma_{anti} - \sigma_{gauche}$
2	2,80	H, H	1,89	2,42	1,63	0,79
7	3,28	H, Me	2,03	2,42	1,64	0,78
8	4,06	Me, Me	2,47	2,47*		
9	5,17	Me, Ph	2,43	2,43*		
10	4,43	H, Ph	2,03	2,42	1,64	0,78
11	6,25	Ph, Ph	2,36	2,36*		
Promedio (parcial)				2,42	1,64	0,78
SD (parcial)				0,04	0,01	0,01
12	2,82	H, H	1,91	2,42	1,66	0,76
13	3,29	H, Me	2,04	2,42	1,66	0,76
14	4,05	Me, Me	2,46	2,46*		
15	3,23	H, Et	2,08	2,42	1,74	0,68
16	3,75	-(CH $_2$) $_5$ -	2,36	2,36*		
Promedio (global)				2,42	1,66	0,76
SD (global)				0,03	0,04	0,04

* Valores tomados para el cálculo del promedio. SD: desviación estándar.

Realizamos un proceso similar con las gluconamidas desprotegidas **17-20** (Figura 31), solubles en DMSO- d_6 , añadiendo sus datos a los de las acetamidas **2** y **7-11** en dicho disolvente.

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

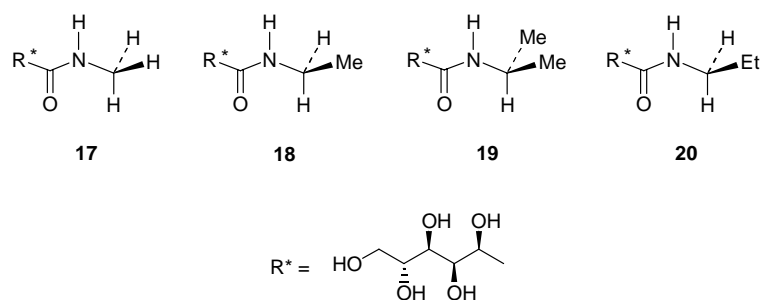


Figura 31. Gluconamidas 17-20.

También en este caso (Tabla 12) se obtienen valores idénticos respecto a los calculados exclusivamente para las acetamidas. Tanto los valores de σ_{anti} y σ_{gauche} (2,22 y 1,33 ppm, respectivamente) como su diferencia ($\sigma_{anti} - \sigma_{gauche} = 0,89$ ppm) y las desviaciones estándar son similares a las calculadas para el conjunto restringido de las amidas sencillas (Tabla 10).

Tabla 12. Desapantallamiento (ppm) de protones CON-CH _{α} para 2, 7-11 y 17-20 en DMSO-*d*₆.

Compuesto	δ_{obs}	x, y	σ_{amida}	σ_{anti}	σ_{gauche}	$\sigma_{anti} - \sigma_{gauche}$
2	2,54	H, H	1,63	2,22	1,34	0,88
7	2,96	H, Me	1,71	2,22	1,20	1,02
8	3,78	Me, Me	2,19	2,19*		
9	4,89	Me, Ph	2,15	2,15*		
10	4,24	H, Ph	1,84	2,22	1,46	0,76
11	6,11	Ph, Ph	2,22	2,22*		
17	2,61	H, H	1,70	2,22	1,44	0,78
18	3,13	H, Me	1,88	2,22	1,54	0,68
19	3,89	Me, Me	2,30	2,30*		
20	3,05	H, Et	1,90	2,22	1,58	0,64
Promedio				2,22	1,33	0,89
SD				0,04	0,13	0,13

* Valores tomados para el cálculo del promedio. SD: desviación estándar.

Como los desapantallamientos *anti* y *gauche* de la *N*-metilacetamida (**2**), para la que diferentes cálculos pronostican mínimos diferentes como los Z_{syn} , son idénticos a los de otras amidas secundarias para las que los cálculos predicen estructuras de mínima energía Z_{anti} , en un intento de dar una explicación alternativa podría sugerirse que es posible que los desapantallamientos para los conformeros Z_{anti} y Z_{syn} fueran los mismos, lo que llevaría a la sobreestimación de la geometría Z_{anti} en nuestro estudio. Sin embargo, esta asunción está totalmente en desacuerdo con el modelo aceptado para el efecto anisotrópico del grupo amido, que entiende que se produce un desapantallamiento mayor en los protones *anti*.^{3a,84}

Como anticipamos en la introducción, los desplazamientos químicos aportan una valiosa información sobre la estructura de las proteínas. Las observaciones recogidas en este capítulo son estimulantes en cuanto a la racionalización de estas correlaciones. En este sentido, queremos mencionar ahora que la búsqueda de una correlación entre el desplazamiento químico de los protones α de amidas y una conformación particular ha sido un logro largamente esperado.^{36,84} En su revisión ya clásica, Stewart y Siddall señalaron que “*the presence of moderately hindered rotation can lead to differences in the relative populations of the possible conformations. In this case, the chemical shift for the α -protons will be a weighted mean of those corresponding to each of the conformations*”.^{3a,85}

Por otra parte, cuando este estudio se encontraba en fases muy avanzadas nos percatamos de un trabajo reciente de Mueller y Weitekamp, sin duda intrigante, ya que

⁸⁴ T. H. Siddall III y W. E. Stewart, *J. Chem Phys.* **1968**, 48, 2928-2935.

⁸⁵ “...la presencia de una rotación moderadamente impedida puede conducir a diferencias en las poblaciones relativas de las distintas conformaciones posibles. En este caso, el desplazamiento químico de los protones α será una media ponderada de los desplazamientos correspondientes a cada una de las conformaciones”.

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

sostiene que cuando existe un rápido intercambio, la relación entre el desplazamiento químico y las poblaciones de confómeros es más compleja que la situación mostrada en las revisiones clásicas de RMN y asumidas por la mayoría de los experimentalistas.⁸⁶ Así, se demuestra que en el metilciclohexano existe una inconsistencia en las diferencias de energía libre entre los confómeros cuando el intercambio es lento y las constantes de equilibrio cuando el intercambio es rápido, que se puso de manifiesto mediante estudios de desplazamiento químico de ^{13}C . De acuerdo con esto, Mueller y Weitekamp concluyen que cualquier ajuste requiere contribuciones al desplazamiento químico con una dependencia de la temperatura que es mayor que la medida en intercambio lento. Estos autores han introducido nuevos términos en el hamiltoniano de espín, al que se refieren como ALBATROSS, que debería ser importante para verificar experimentalmente la dependencia con la temperatura en otros estudios conformacionales.

En todo caso, en nuestra opinión estas observaciones no son extrapolables a nuestro modelo ya que en nuestro trabajo no se han realizado medidas a temperatura variable, y los desplazamientos químicos medidos a temperatura ambiente se interpretan en el contexto de un intercambio conformacional rápido. Sea o no diferente el desapantallamiento magnético sobre protones *gauche* o *anti* al que se llegara tras la extrapolación lineal a diferentes temperaturas, y como demuestran las pequeñas desviaciones estadísticas, nuestros resultados no sufren merma alguna en su validez. Nosotros simplemente hemos establecido a partir de los datos de RMN experimentales la existencia prevalente de un determinado confómero, aunque la población no pueda ser determinada con precisión absoluta. De todas formas, Mueller y Weitekamp concluyen claramente al final de su publicación que “*the new equations of motion give*

⁸⁶ L. J. Mueller y D. P. Weitekamp, *Science* **1999**, 283, 61-65.

intermediate-exchange line widths that are very similar to those of the traditional theory, and therefore, previously reported conformer interconversion rates and activation barriers are not likely to be as significantly affected".^{86,87}

En otro trabajo publicado durante la escritura de esta Tesis, pero con posterioridad a nuestra publicación,⁸⁸ Mennucci y Martínez⁸⁹ calculan las energías de los distintos conformeros de la *N*-metilacetamida Z (Figura 32) en fase gaseosa y en disolución acuosa mediante cálculos DFT a un nivel sin duda superior al utilizado en nuestro estudio como es el B3LYP/6-31+G(d,p), encontrando (Tabla 13) que la estructura más estable en fase gaseosa es II, lo que coincide con nuestras predicciones. Contrariamente, la estructura predicha como más estable en disolución acuosa es IV. Nuevamente nos parece dudosa la validez de los cálculos de los espectros de UV e IR, así como el de los desplazamientos químicos de ¹⁵N y ¹⁷O que los autores realizan en base a estas estructuras.

⁸⁷ "...las nuevas ecuaciones de movimiento proporcionan posiciones de intercambio intermedio que son muy similares a los de la teoría tradicional, y por tanto, es probable que las velocidades de interconversión de conformeros y barreras de activación previamente publicadas no se vean significativamente afectadas".

⁸⁸ M. Avalos, R. Babiano, J. L. Barneto, J. L. Bravo, P. Cintas, J. L. Jiménez y J. C. Palacios, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7275-7282.

⁸⁹ (a) B. Mennucci y J. M. Martínez, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 9818-9829. (b) B. Mennucci y J. M. Martínez, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 9830-9838.

3.1. ¿Podemos determinar la conformación preferente de las amidas secundarias?

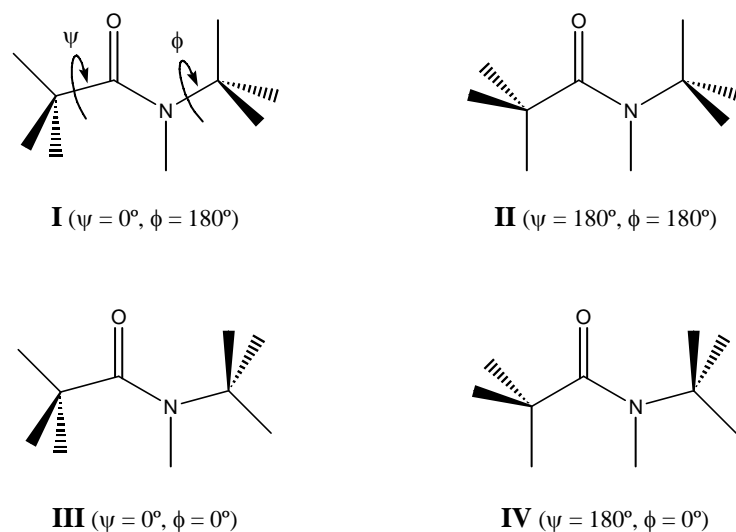


Figura 32. Conforméros de la *N*-metilacetamida obtenidos por rotación de los ángulos diedros ψ y ϕ .

Tabla 13. $\Delta G = G_X - G_{\min}$ (kcal/mol) de los cuatro conforméros (X = I, II, III y IV), en fase gaseosa y en agua.*

Conformero	Fase gaseosa	Agua
I	0,98	1,87
II	0,00	0,87
III	2,06	0,92
IV	1,12	0,00

* La energía cero se ha asignado a la forma más estable en cada fase.

Todo ello muestra la necesidad expuesta por nosotros de poner a punto un procedimiento fiable de contraste de las estructuras que predicen los cálculos y que, como queda patente a lo largo de esta Tesis, lo es sin duda la RMN.

Como conclusión al apartado de RMN, asumiendo la existencia prevalente de la disposición Z_{anti} hemos evaluado el desapantallamiento magnético generado por la función amida sobre los átomos de hidrógeno situados en el átomo de carbono

adyacente al nitrógeno en los disolventes CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$ y D_2O . Se han encontrado desapantallamientos con pequeñas desviaciones estadísticas: $\sigma_{anti} = 2,42 \pm 0,04$ ppm y $\sigma_{gauche} = 1,64 \pm 0,01$ ppm, con una diferencia $\sigma_{anti} - \sigma_{gauche} = 0,78 \pm 0,01$ ppm, para CDCl_3 . Con una base estadística mayor, se encuentra una diferencia $\sigma_{anti} - \sigma_{gauche} = 0,76$ ppm en el mismo disolvente, aunque la desviación estándar aumenta a 0,04 ppm. Estos datos deben ser una guía útil para asignar rotámeros de amidas en disolución.

3.2. Correlaciones entre estructura y desplazamientos químicos en amidas secundarias.

La descripción precisa del enlace de amida es de vital importancia para entender la conformación de estas sustancias y procesos biológicos trascendentes como son las interacciones entre proteínas y el plegamiento de éstas.^{1,69a,90} Un aspecto destacable de la RMN como herramienta experimental es el hecho de que los desplazamientos químicos reflejan con precisión la anisotropía magnética originada por la función amida y son asimismo sensibles a otros efectos locales provocados por disolventes y sustituyentes. Dentro de este contexto cabe destacar que los desplazamientos del H_α se usan constantemente como método de diagnóstico de la estructura secundaria de péptidos y proteínas. Así, se han propuesto correlaciones entre ángulos de torsión y desplazamientos observados, aunque los modelos a menudo no pueden definirse con precisión.¹⁶ De igual forma, las correlaciones basadas en el protón amídico⁹¹ y en tensores de desplazamiento de carbono o nitrógeno han demostrado también ser útiles indicadores de la estructura local de las proteínas.⁹²

⁹⁰ (a) *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*; G. D. Fasman, Ed.; Plenum Press: Nueva York, 1989. (b) K. Wüthrich, *Science* **1989**, *243*, 45-50. (c) T. E. Creighton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, *1*, 5-16. (d) G. Wagner, S. G. Hyberts y T. F. Havel, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, *21*, 167-198. (e) B. W. Matthews, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 139-160. (f) D. Voet y J. G. Voet, *Biochemistry*, 2^aed.; Wiley: Nueva York, 1995; pp 141-213. (g) R. Jaenicke y R. Seckler, *Adv. Protein Chem.* **1997**, *50*, 1-59. (h) E. Craig, W. Yan y P. James, *Molecular Chaperones and Folding Catalysts*; B. Bukau, Ed.; Harwood: Amsterdam, 1999; pp 139-162. (i) S. Walter y J. Buchner, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1098-1113.

⁹¹ (a) N. Tjandra y A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8076-8082. (b) M. Tessari, H. Vis, R. Boelens, R. Kaptein y G. W. Vuister, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8985-8990. (c) Y. Sharma, O. Y. Kwon, B. Brooks y N. Tjandra, *Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 327-335.

⁹² (a) S. Spera y A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5490-5492. (b) D. S. Wishart, B. D. Sykes y F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 311-333. (c) A. C. de Dios, J. G. Pearson y E. Oldfield, *Science* **1993**, *260*, 1491-1496. (d) D. Jiao, M. Barfield y J. M. Hruby, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10883-10887. (e) A. C. de Dios y E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11485-11488. (f) D.-K. Lee y A.

3.2. Correlación entre desplazamientos químicos de protones y la estructura de las amidas

Un inconveniente a tener en cuenta cuando se utilizan las acetamidas *N*-alquiladas como modelos radica en el hecho de que los datos experimentales de RMN sólo pueden obtenerse para los conformeros *Z*, debido a su diferencia de energía con los *E*. Las acetamidas complejas, como las derivadas de amidoazúcares, también muestran de forma preferente o exclusiva una geometría *Z_{anti}*, como revelan tanto los estudios de RMN en disolución como la cristalografía de rayos X.^{6a,6b,61e} Curiosamente, la *N*-metilacetamida es la única acetamida simple que muestra el conformero *E* en proporción suficiente para poder ser observado mediante espectroscopia RMN.⁷⁶ En claro contraste, las formamidas *N*-sustituídas existen en disolución como mezcla de los isómeros *Z* y *E*, permitiendo así hacer una comparación directa entre los datos calculados y los datos experimentales disponibles. La misma *N*-metilformamida (**21**) ha sido objeto de extensivos estudios espectroscópicos y computacionales.⁹³ En principio, la menor congestión estérica del isómero *E* en las formamidas, con respecto a las carboxamidas que portan sendos grupos alquilo en disposición *cis* en este rotámero, induce a aceptar su presencia en los equilibrios de las formamidas. Sin embargo, el efecto estérico puede no ser el único factor a considerar, ya que se ha publicado que a diferencia de lo que predicen los cálculos de mecánica molecular como el MMX y los semiempíricos como el AM1, todos los métodos *ab initio* y DFT predicen que el

Ramamoorthy, *J. Magn. Reson.* **1998**, *133*, 204-206. (g) M. Hong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3762-3770. (h) Y. Wei, D. Lee y A. Ramamoorthy, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6118-6126. (i) X. Yao y M. Hong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2730-2738.

⁹³ (a) W. H. Kirchhoff y D. R. Johnson, *J. Mol. Spectrosc.* **1973**, *45*, 159-165. (b) P. Mohandas y S. Singh, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **1990**, *361*, 229-242. (c) A. Barszczewicz, M. Jaszunski y K. Jackowski, *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *203*, 404-408. (d) J. Florian y B. G. Johnson, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 3681-3687. (e) C. W. Kirby, M. D. Lumsden y R. E. Wasylshen, *Can. J. Chem.* **1995**, *73*, 604-613. (f) J. Neufeind, M. D. Zeidler y H. F. Poulson, *Mol. Phys.* **1996**, *87*, 189-201. (g) H. Adalsteinsson, A. H. Maulitz y T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7689-7693. (h) J. Vaara, J. Kashi, J. Jokisaari, y P. Diehl, *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 5069-5081 y referencias allí citadas.

isómero *Z* es más estable que el *E*.⁹⁴ Como se observa en la Figura 33, que muestra las geometrías en fase gaseosa de la *N*-metilformamida obtenidas con el método B3LYP/6-31G*, esto puede ser debido a interacciones electrostáticas que estos métodos tienen en cuenta.⁹⁴ Así, en las formamidas *E* aparecen más interacciones electrostáticas repulsivas entre el grupo formilo y los hidrógenos del grupo alquilo que en las *Z* alternativas.

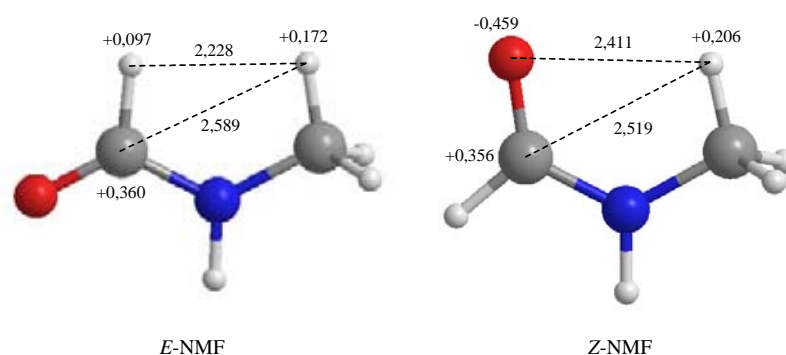


Figura 33. Distancias (Å) y cargas (u.e.) calculadas a nivel B3LYP/6-31G* para la *N*-metilformamida.

Las barreras rotacionales de las formamidas *N,N*-dialquilsustituidas se han investigado también teóricamente, incluyendo el efecto de los disolventes que intervienen en el sistema generando enlaces intermoleculares.^{59d,95} Se han realizado también diversos estudios sobre las interacciones por enlaces de hidrógeno en las *N*-alquilformamidas.⁹⁶ Pero nuevamente, como ocurriera con las *N*-alquilacetamidas (ver capítulo anterior), existen contradicciones en los antecedentes sobre las

⁹⁴ A. G. Martínez, E. Teso, A. García y P. Martínez-Ruiz, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 4942-4950.

⁹⁵ M. Bloemendal, A. C. Rouw y G. Somsen, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1986**, *82*, 53-60.

⁹⁶ (a) A. Engdahl, B. Nelander y P.-O. Astrand, *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 4894-4907. (b) J. E. McGrady y D. M. P. Mingos, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 2287-2292. (c) J. Gao, J. J. Pavelites y D. Habibollazadeh, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 2689-2697.

3.2. Correlación entre desplazamientos químicos de protones y la estructura de las amidas

conformaciones de las *N*-alquilformamidas obtenidas mediante cálculos *ab initio* y espectros ro-vibracionales. Así, un estudio sobre la *N*-metilformamida en base a su espectro de microondas en el rango de frecuencias de 18-40 GHz, junto con cálculos *ab initio*, predijo un conformero *Z*, pero no pudo encontrar la conformación de equilibrio del metilo.¹¹

Dos estudios recientes centrados en la *N*-metilformamida y la *N*-metilacetamida predicen mínimos absolutos similares. Así, Nandini y Sathyanarayana describen cálculos HF/6-31+G* sobre la geometría molecular y el espectro vibracional de estas amidas,¹⁰ mientras que Wiberg y Rush han evaluado las barreras rotacionales del metilo en varias *N*-metilamidas y tioamidas a nivel MP2 con un conjunto de bases más avanzado, 6-311+G**.¹⁴ Para la *N*-metilformamida, encontraron como conformaciones más estables las E_{anti} y Z_{syn} , con una diferencia de 0,88 y 0,33 respecto a las E_{syn} y Z_{anti} , respectivamente (Figura 34). Notablemente, la conformación más estable (Z_{syn}) sufre una marcada piramidalización (es decir, desviación del grupo alquilo del plano H–N–C=O) en el átomo de nitrógeno. De forma similar, tanto para el isómero *E* como para el *Z* de la *N*-metilacetamida el conformero más estable resultó ser el *syn*.¹⁴ Estos resultados están en desacuerdo con las conformaciones experimentales obtenidas a partir de los desplazamientos químicos de protón y de cálculos DFT y *ab initio* que predicen una disposición preferente Z_{anti} , como hemos comentado anteriormente (y publicado).⁸⁸

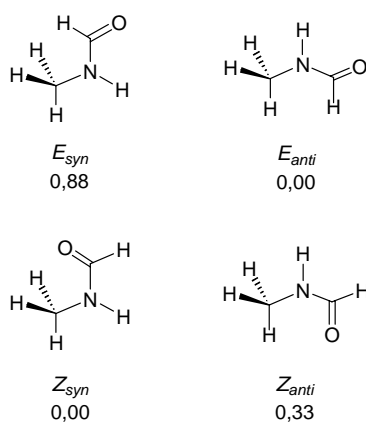


Figura 34. Puntos estacionarios y energías relativas (kcal/mol) para cada isómero *Z/E* encontrados por Wiberg y Rush para la *N*-metilformamida.

De todo lo dicho se deduce que un estudio que incluya datos teóricos y empíricos tanto de isómeros *Z* como *E* de las amidas secundarias, puede proporcionar una visión completa de su estructura. En este capítulo se correlacionan las geometrías calculadas teóricamente con los desapantallamientos magnéticos obtenidos experimentalmente de amidas que contienen la totalidad de las opciones estructurales significativas que son accesibles. Esta nueva correlación se muestra cuantitativa en términos de confianza estadística y proporciona una metodología para la predicción de la conformación de las amidas que puede extrapolarse a grandes moléculas que portan esta unión.

La Figura 35 describe el espectro conformacional de una formamida secundaria, definiendo mediante los ángulos de torsión ϕ y τ la rotación en torno a cada uno de los dos enlaces C–N involucrados en la amida. Como se observa, el análisis conformacional de formamidas, que se aborda por primera vez en este trabajo, es más simple que el de acetamidas debido a que el sustituyente del grupo carbonilo es un átomo de hidrógeno.

3.2. Correlación entre desplazamientos químicos de protones y la estructura de las amidas

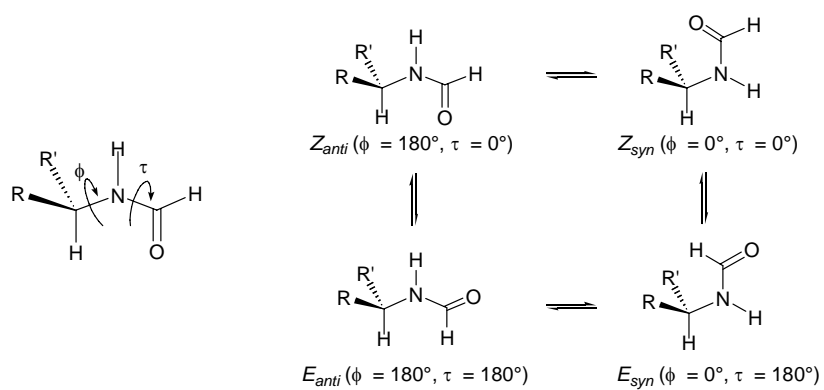


Figura 35. Conformaciones *syn* y *anti* para los isómeros *Z* y *E* de las formamidas secundarias.

3.2.1. Resultados y Discusión.

Se han llevado a cabo estudios experimentales y computacionales sobre los isómeros *Z* y *E* de las formamidas acíclicas **21-28**, así como sobre las cíclicas 2-pirrolidona (**29**) y δ -valerolactama (**30**), que sólo existen como isómeros *E*. También se han tenido en cuenta en este trabajo los datos experimentales y teóricos de las acetamidas **2** y **7-11**, sobre las que se realizó el estudio previo⁸⁸ expuesto en el capítulo anterior, y los amidoazúcares **12-16**, ya que propician discusiones paralelas y permiten ampliar la base estadística (Figura 36).

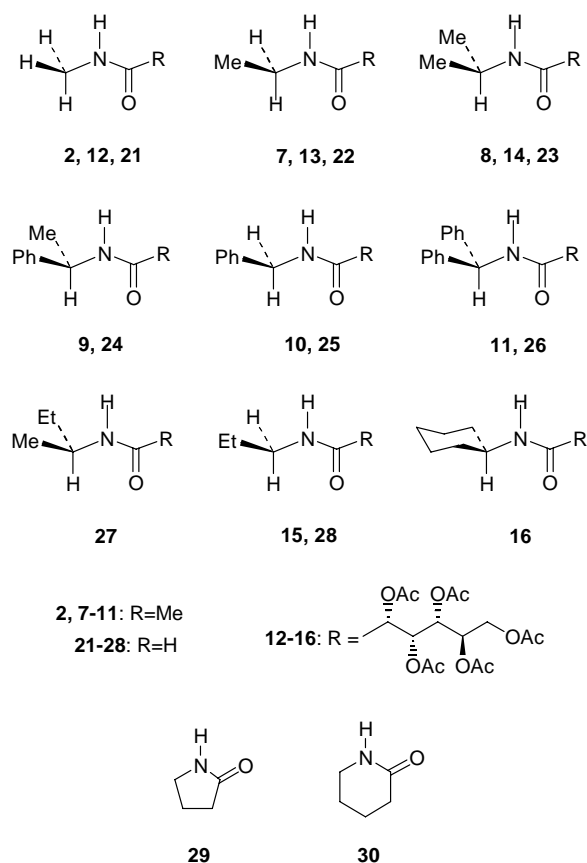


Figura 36. Estructuras **2**, **7-16** y **21-30**.

3.2.1.1. Cálculos teóricos en *N*-alquilformamidas.

El método de cálculo seguido fue similar al descrito en el apartado 3.1.2 para las acetamidas. Así, inicialmente se realizó un estudio a nivel semiempírico (PM3)²⁸ con objeto de obtener una primera idea de los perfiles energéticos de estas moléculas con bajo coste computacional. La Figura 37 muestra como ejemplo de las estructuras de partida en el análisis conformacional las de los isómeros *Z* y *E* en la *N*-etilformamida (**22**).

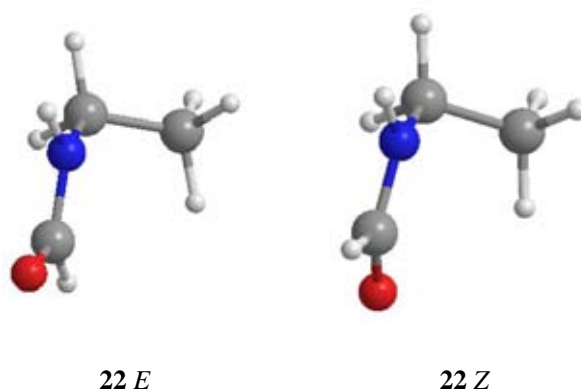


Figura 37. Estructuras de partida en el análisis conformacional de **22**.

Como muestran las Figuras 38-40, en las que tomamos un modelo para cada grupo de formamidas según tengan tres, dos o un protón en la posición CON-CH_α, se encontró de forma invariable que la disposición *anti* era el conformero más estable independientemente de la configuración (*E* o *Z*) que se analizara. No obstante, hemos de tener en cuenta que estas predicciones no son suficientemente fiables, ya que las geometrías tanto de los mínimos como de los máximos a nivel PM3 fueron muy diferentes a las encontradas mediante cálculos DFT o *ab initio* y, además, los isómeros *E* eran más estables que los correspondientes *Z*.

Como se comentó en la introducción, la predicción de diferente estabilidad entre cálculos de mecánica molecular o semiempíricos respecto a los DFT o *ab initio* se ha explicado tomando como modelo la *N*-metilformamida,⁹⁴ asumiendo que estos últimos reflejan mejor las interacciones electrostáticas.

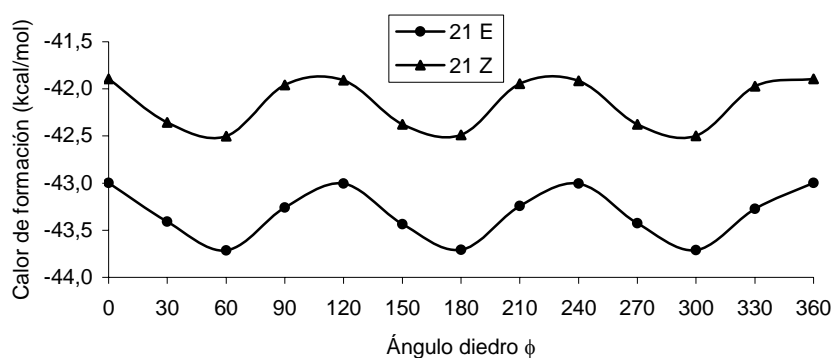


Figura 38. Variación del calor de formación (kcal/mol) respecto al ángulo diedro ϕ en la *Z*- y *E*-*N*-metilformamida (**21**) a nivel PM3.

Como se observa en la Figura 38, la *N*-metilformamida oscila entre un mínimo y un máximo cada 60°, debido a que con esta periodicidad un átomo de hidrógeno pasa de conformación *syn* a *anti*.

3.2. Correlación entre desplazamientos químicos de protones y la estructura de las amidas

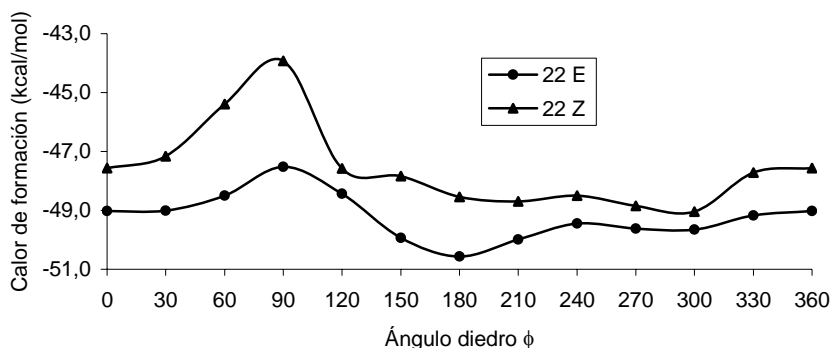


Figura 39. Variación del calor de formación (kcal/mol) respecto al ángulo diedro ϕ en la Z- y E-N-etilformamida (**22**) a nivel PM3.

La N-etilformamida muestra un máximo pronunciado debido al eclipsamiento del metilo con el grupo formilo, y mínimos cuando ambos protones metilénicos adoptan conformaciones *anti* (Figura 39).

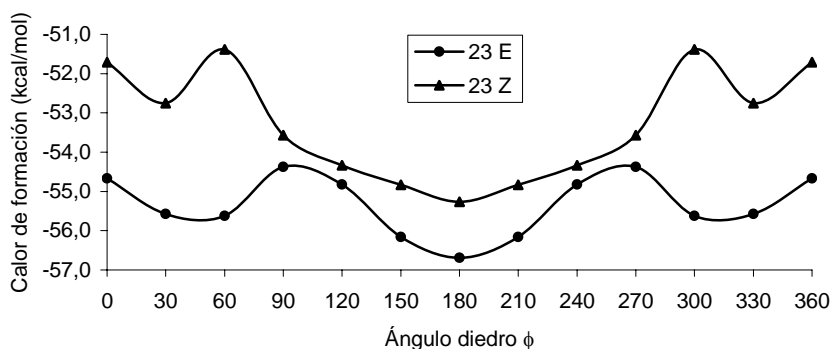


Figura 40. Variación del calor de formación (kcal/mol) respecto al ángulo diedro ϕ en la Z- y E-N-isopropilformamida (**23**) a nivel PM3.

Nuevamente, como ocurriera en las acetamidas y en los amidoazúcares piranósicos,^{6,88} las formamidas con un único protón en CON-CH $_{\alpha}$ lo disponen inequívocamente en conformación *anti* en la estructura más estable, como se muestra en

la Figura 40 para la *N*-isopropilformamida (**23**). En el apéndice B se incluyen representaciones similares para otras formamidas.

En este capítulo se ha realizado también un estudio conformacional completo a nivel B3LYP/6-31G* de las formamidas **21-28**. Presentamos como ejemplo las estructuras **21-23**, que son representativas de las distintas opciones conformacionales. La Figura 41 muestra la variación de la energía frente al ángulo de torsión ϕ . Como se anticipó, a diferencia de lo que se observa a nivel semiempírico, en todo el espectro conformacional el isómero *Z* es más estable que el *E*, excepto en el caso de **22** y **23** que, para ϕ aproximadamente igual a 60° , presenta un máximo en el isómero *Z* como consecuencia de la interacción entre el sustituyente en C_α y el carbonilo.

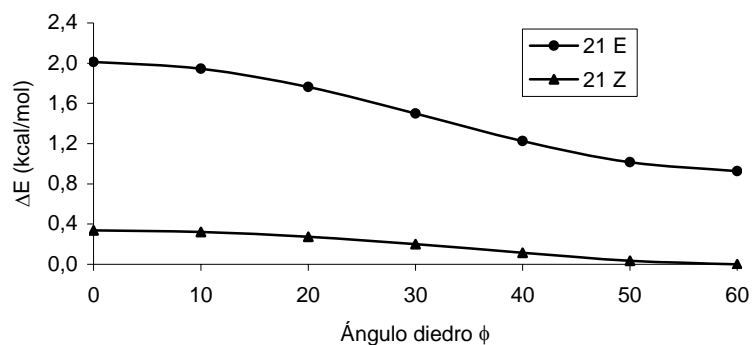


Figura 41. Variación de la energía frente al ángulo de torsión ϕ de los isómeros *E/Z* de la *N*-metilformamida (**21**) a nivel B3LYP/6-31G*.

3.2. Correlación entre desplazamientos químicos de protones y la estructura de las amidas

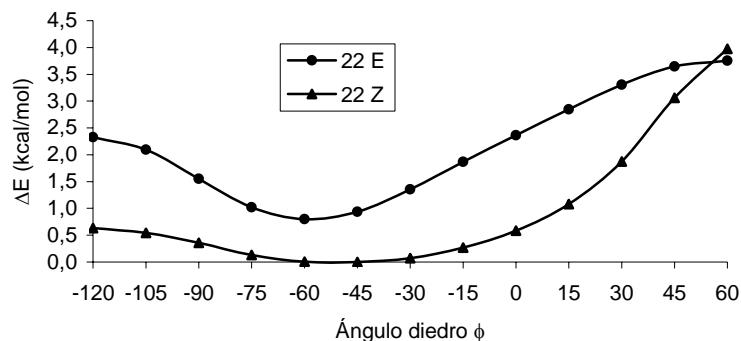


Figura 42. Variación de la energía frente al ángulo de torsión ϕ de los isómeros *E/Z* de la *N*-etilformamida (**22**) a nivel B3LYP/6-31G*.

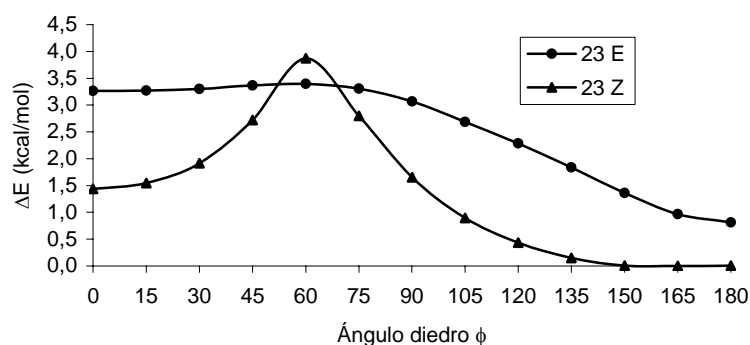


Figura 43. Variación de la energía frente al ángulo de torsión ϕ de los isómeros *E/Z* de la *N*-isopropilformamida (**23**) a nivel B3LYP/6-31G*.

En los tres casos se caracterizaron los mínimos absolutos (comprobando la no existencia de frecuencias imaginarias) de ambos rotámeros de estas formamidas, que presentaron siempre conformaciones *anti*, y cuyas estructuras se muestran en la Figura 44. Los valores de ϕ para esta conformación *anti* de los dos rotámeros oscilan entre 157,9 y 191,4° (Tabla 14). En el caso de *E* y *Z*-**23** fue también posible caracterizar un mínimo local que corresponde a una conformación *syn*. También fue posible la caracterización de los puntos de silla, que se visualizan en el espectro conformacional

presentado en la Figura 41, comprobando que tenían una sola frecuencia imaginaria, que correspondía precisamente al giro del enlace CON-CH_α. Estos puntos de silla presentan una conformación *syn* ($\phi = 0,0^\circ$) tanto para *E*-**21** como para *Z*-**21**; una conformación con ambos protones metilénicos en disposición *gauche* para los dos rotámeros de **22** ($\phi \sim 57,5^\circ$), y una conformación con el protón de *E* y *Z*-**23** en una disposición *gauche* ($\phi \sim 56$ y 61° , respectivamente). La Figura 44 muestra todos los mínimos y puntos de silla encontrados para estas tres formamidas. En el apéndice B se incluyen representaciones similares B3LYP/6-31G* para otras formamidas.

3.2. Correlación entre desplazamientos químicos de protones y la estructura de las amidas

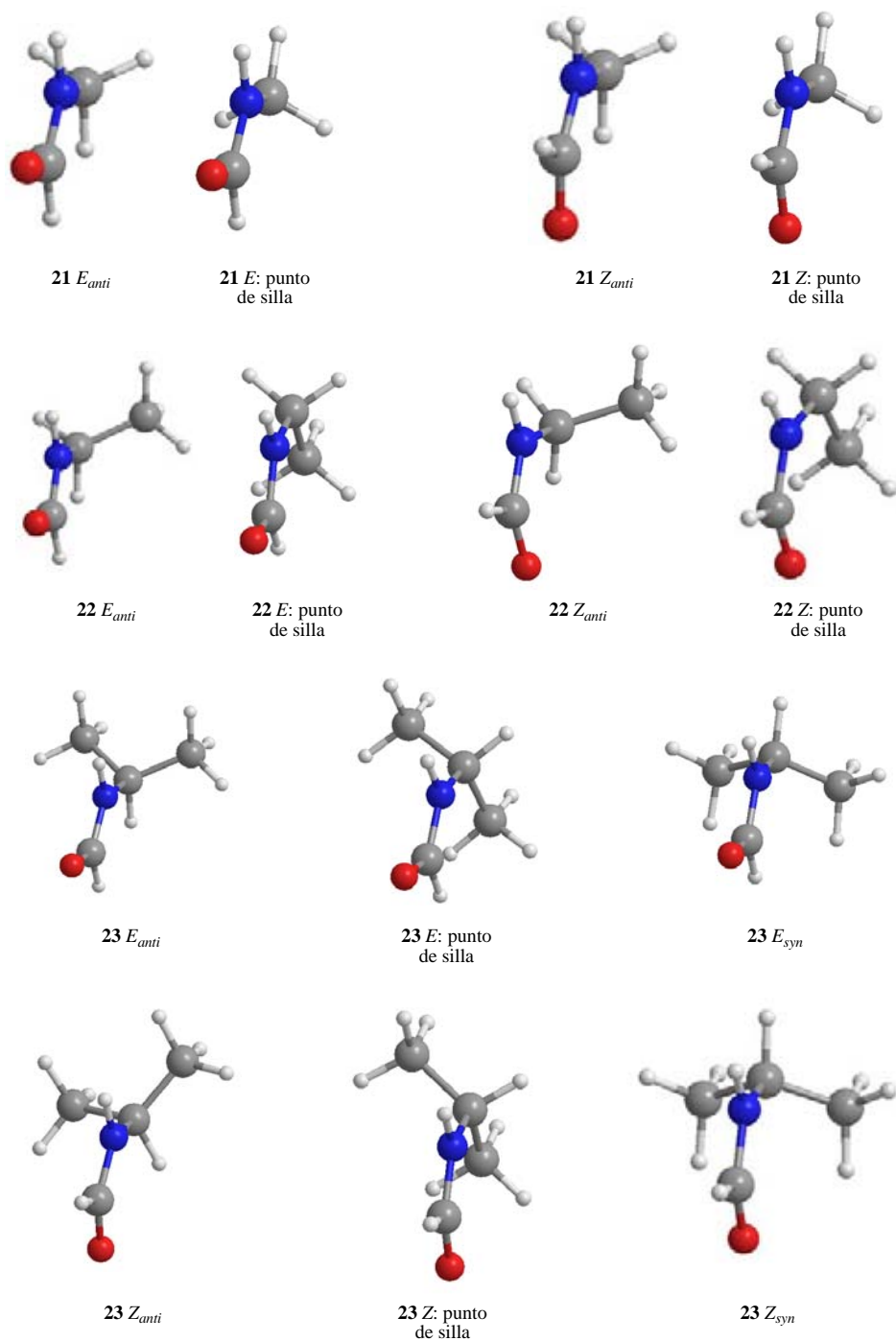


Figura 44. Estructuras de mínima energía y puntos de silla de las formamidas 21-23, calculadas a nivel B3LYP/6-31G*.

La caracterización completa de mínimos y puntos de silla de estas formamidas permite a su vez calcular las barreras rotacionales a nivel B3LYP/6-31G*, que se recogen en la Tabla 14. Para el grupo metilo de la *N*-metilformamida (**21**), esta barrera es mayor en el rotámero *E* que en el *Z*. La situación cambia para la *N*-etil y la *N*-isopropilformamida (**22** y **23**), ya que las barreras de sus isómeros *Z* son ~ 1,4 kcal/mol mayores que las de los isómeros *E*. Lógicamente, el mayor impedimento estérico del grupo alquilo contribuye a incrementar las barreras de rotación (Tabla 14: 0,07-0,80 kcal/mol en **21** frente a 2,78–4,44 kcal/mol en **22** y **23**).

Tabla 14. Parámetros torsionales y diferencias de energía (kcal/mol) para las formamidas **21-23** a nivel B3LYP/6-31G*.

Isómero	Mínimo			Punto de silla			ΔE
	ϕ (°)	τ (°)	Piram. (°)	ϕ (°)	τ (°)	Piram. (°)	
21 E	179,9	180,2	179,7	0,0	180,0	180,0	0,80
21 Z	179,2	0,0	179,9	0,0	0,0	180,0	0,07
22 E	185,3	178,0	183,2	57,8	180,0	180,0	3,09
22 Z	191,4	356,5	187,6	57,4	0,0	180,0	4,44
23 E	180,0	180,0	180,0	55,7	184,5	173,2	2,78
23 Z	157,9	3,6	170,8	61,3	0,4	179,3	4,26

Puesto que este estudio toma como modelo la *N*-metilformamida en cuanto a los efectos estructurales sobre el desplazamiento químico de los protones, nos pareció conveniente comprobar también la fiabilidad de los cálculos DFT frente a los *ab initio*. Los datos recopilados en la Tabla 15 revelan que tanto el método B3LYP/6-31G* como el MP2/6-31G*, e incluso el HF/6-31G**, utilizado frecuentemente, pero que como hemos demostrado en el capítulo 3.1 tiene menos precisión por incluir una correlación

electrónica “promediada”, proporcionan resultados similares en cuanto a los ángulos de torsión ϕ y τ y en las diferencias de energía entre los isómeros *Z* y *E* ($\Delta E = 0,9-1,0$ kcal/mol). De nuevo, como ya ocurriera en la *Z-N*-metilacetamida (**2**), la utilización de funciones difusas a nivel MP2/6-31+G** produce una estructura sustancialmente diferente para *Z-21*, en la que el grupo amido es menos plano ($\tau = 3,0^\circ$) y el grupo metilo adopta una disposición cercana a una conformación *syn* ($\phi = 18,0^\circ$). En este punto observamos que el nitrógeno amídico de este rotámero se piramidaliza⁹⁷ de forma progresiva en disposiciones que se alejan de la conformación preferente *anti* (Tabla 15). Por ello, recordando los trabajos de Wiberg⁵¹ (ver pág. 39), y ante la posibilidad de que estos cálculos reflejaran estructuras reales demostrables mediante RMN, decidimos incluir la piramidalización en el estudio.

Nos ha parecido conveniente incluir también en este apartado la *N*-metilacetamida (**2**), ya que su isómero *E* muestra ángulos de torsión ϕ cercanos a 30° en distintos modelos teóricos y a 19° a nivel HF/6-31G** (Tabla 15). En ambos isómeros *Z/E* se observa de nuevo la falta de planaridad del nitrógeno en las conformaciones más alejadas de una disposición *syn* o *anti* ($\phi = 0^\circ$ o 180°). Además, para el rotámero *Z-2*, los cálculos MP2/6-31+G** y HF/6-31G** también evidencian piramidalización ($\sim 170^\circ$) en los ángulos de torsión ϕ próximos a la conformación *syn* ($17,8^\circ$ y $24,6^\circ$, respectivamente).

⁹⁷ (*) La piramidalización del nitrógeno se indica mediante el ángulo diedro virtual H-N-C(O)---C _{α} , siendo C _{α} el carbono unido al nitrógeno.

Tabla 15. Ángulos de torsión, piramidalización (°) y diferencias de energía (kcal/mol) para los rotámeros *E* y *Z* de la *N*-metilacetamida (**2**) y la *N*-metilformamida (**21**).

Comp.	Método de cálculo	Isómero <i>E</i>			Isómero <i>Z</i>			ΔE (<i>E</i> - <i>Z</i>)
		ϕ	τ	Piram.	ϕ	τ	Piram.	
2	B3LYP/6-31G*	29,0	188,8	165,6	180,0	0,0	180,0	2,47
	MP2/6-31G*	30,0	192,2	160,2	176,3	358,5	183,1	2,64
	MP2/6-31+G**	29,7	191,8	160,4	17,8	3,6	170,3	2,72
	HF/6-31G**	18,6	186,7	169,2	24,6	4,0	170,1	2,70
21	B3LYP/6-31G*	179,9	180,2	179,7	179,2	0,0	179,9	0,85
	MP2/6-31G*	180,2	179,6	180,7	178,7	0,4	179,0	0,98
	MP2/6-31+G**	180,0	180,0	180,1	18,0	3,0	172,2	1,23
	HF/6-31G**	180,2	180,0	180,0	179,3	0,1	179,8	1,02

Como se ha discutido anteriormente, en los rotámeros de **23** y en las formamidas **24**, **26** y **27**, que tienen sólo un protón en el grupo CON-CH _{α} , existen mínimos locales *syn* (Tabla 16), pero sus conformaciones de mínima energía son nuevamente *anti* ($\Delta E_{syn-anti} = 1,64-4,05$ kcal/mol). Considerando el sistema en su conjunto, los rotámeros *Z_{anti}* son los más estables ($\Delta E_{Eanti-Zanti} = 0,74-1,36$ kcal/mol).

Las formamidas con dos átomos de hidrógeno en la posición CON-CH _{α} (**25** y **28**) muestran un comportamiento similar al encontrado para los rotámeros de **22**, exhibiendo conformaciones de mínima energía *Z_{anti}* a nivel B3LYP/6-31G*. Una vez más, la piramidalización tiene lugar en conformaciones que se desvían de la *anti* o la *syn* (Tabla 16).

3.2. Correlación entre desplazamientos químicos de protones y la estructura de las amidas

Tabla 16. Ángulos de torsión, piramidalización (°) y diferencias de energía (kcal/mol) para las formamidas **22-28** a nivel B3LYP/6-31G*.

Isómero	ϕ	τ	Piram.	Isómero	ϕ	τ	Piram.	ΔE (<i>syn-anti</i>)	ΔE ($E_{anti}-Z_{anti}$)
				22 E_{anti}	185,3	178,0	183,2		
				22 Z_{anti}	191,4	356,5	187,6		0,71
23 E_{syn}	7,4	183,0	174,8	23 E_{anti}	180,0	180,0	180,0	2,43	
23 Z_{syn}	0,1	0,0	179,9	23 Z_{anti}	157,9	3,6	170,8	1,64	0,74
24 E_{syn}	34,4	192,3	160,4	24 E_{anti}	158,8	182,7	176,1	2,36	
24 Z_{syn}	333,5	357,0	190,8	24 Z_{anti}	229,1	4,1	170,7	2,01	1,36
				25 E_{anti}	179,7	181,1	179,3		
				25 Z_{anti}	190,9	355,6	193,1		1,04
26 E_{syn}	311,0	170,9	194,3	26 E_{anti}	161,7	177,1	186,2	1,95	
26 Z_{syn}	12,6	354,2	182,5	26 Z_{anti}	174,3	352,3	197,4	4,05	1,03
27 E_{syn}	21,6	187,8	166,9	27 E_{anti}	182,2	178,6	182,0	2,38	
27 Z_{syn}	1,2	0,1	179,4	27 Z_{anti}	202,9	356,8	188,3	1,71	0,85
				28 E_{anti}	172,9	183,9	173,8		
				28 Z_{anti}	166,2	4,0	171,4		0,69

Una comparación directa entre el conjunto de formamidas **22-28** y la serie de acetamidas **7-11**⁸⁸ indica que en estas últimas las diferencias de energía entre sus rotámeros E_{anti} y Z_{anti} son significativamente mayores (1,93-3,16 kcal/mol frente a 0,69-1,36 kcal/mol en las formamidas, ver Tablas 4, 7 y 16). Este resultado está de acuerdo con la evidencia experimental de la coexistencia de ambos rotámeros en disolución en el caso de las formamidas, y puede ser consecuencia de que el protón del grupo formilo ocasiona menos congestión en el isómero E respecto a la que tendría la correspondiente estructura con un grupo metilo en las acetamidas. Por otro lado, tanto en el isómero E como en el Z , las diferencias de energía entre las conformaciones *syn* y *anti* de aquellas amidas en las que se han encontrado computacionalmente ambos mínimos conformacionales, son sólo ligeramente menores para las formamidas **23**, **24**, **26** y **27**

($\Delta E_{syn-anti} = 1,64-4,05$ kcal/mol) que para las correspondientes acetamidas **8**, **9**, y **11** ($\Delta E_{syn-anti} = 1,86-4,33$ kcal/mol). Debe enfatizarse que las barreras rotacionales CON–C $_{\alpha}$ son significativas (Tabla 14), con la única excepción del rotámero Z de la *N*-metilformamida (Z-**21**), en la que la barrera calculada resulta ser similar a la de la *N*-metilacetamida ($\sim 0,07$ kcal/mol). Por el contrario, los rotámeros *E* de la *N*-metilacetamida y la *N*-metilformamida muestran distintos perfiles tanto en los mínimos conformacionales como en las estructuras de transición, ya que la *N*-metilacetamida casi no muestra variación hasta $\phi = 30^{\circ}$ y se incrementa rápidamente para ángulos de torsión mayores debido a la repulsión de los grupos metilo. La estructura de transición se alcanza a $\phi = 60^{\circ}$ con una barrera de 0,27 kcal/mol.⁸⁸

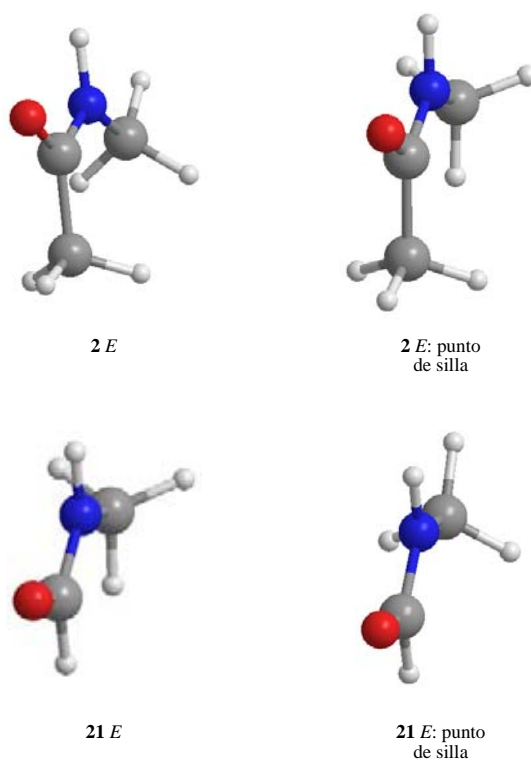


Figura 45. Estructuras de mínima energía y puntos de silla de las *E*-*N*-metilcarboxamidas **2** y **21**, calculadas a nivel B3LYP/6-31G*.

3.2. Correlación entre desplazamientos químicos de protones y la estructura de las amidas

Aunque nuestros estudios DFT y *ab initio* predicen de forma consistente una disposición *anti* para los rotámeros *E* y *Z* de las acetamidas y formamidas simples, no queremos pasar por alto el hecho de que algunos modelos aporten predicciones que implican cierta controversia en relación con la estructura del grupo amido. Así, numerosos estudios muestran que el proceso de inversión del nitrógeno es muy flexible, presentando barreras despreciables entre las configuraciones plana y no plana.^{98,99,100,101} En este sentido, nuestros resultados a nivel B3LYP/6-31G* muestran la existencia de estructuras planas y que la piramidalización aumenta al alejarse de las conformaciones *syn* y *anti*.

En conclusión, puede decirse, a la luz de estos resultados, que el modelo B3LYP/6-31G* predice una conformación *anti* como la disposición favorable para ambos rotámeros de las formamidas en fase gaseosa. Sólo se han detectado mínimos locales correspondientes a conformaciones *syn* en las formamidas que contienen un solo protón en la posición CON-CH_α. La altura de la barrera para la rotación CON-alquilo aumenta cuando lo hace el volumen del grupo alquilo, encontrando una barrera casi despreciable para el rotámero *Z* de la *N*-metilformamida (algo que, como vimos en el capítulo 3.1, ocurre también en la *N*-metilacetamida). Además, no hay desviaciones significativas entre las formamidas y las acetamidas simples con respecto a su preferencia conformacional. Todo ello aporta una visión de la estructura de las amidas secundarias muy útil en la interpretación de sus datos de RMN.

⁹⁸ G. Fogarasi y P. G. Szalay, *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 1400-1408.

⁹⁹ S. Samdal, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **1998**, *440*, 165-174.

¹⁰⁰ Para un desarrollo reciente del campo de fuerzas MM4 en amidas, ver: C. H. Langley y N. L. Allinger, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 5638-5652.

¹⁰¹ Para valores experimentales de barreras rotacionales con microondas, ver: T. Kojima, E. Yano, K. Nakagawa y S. Tsunekawa, *J. Mol. Spectrosc.* **1987**, *122*, 408-416.

3.2.1.2. Correlaciones de RMN en amidas secundarias.

Este estudio continúa nuestro trabajo previo sobre acetamidas que se ha expuesto en el capítulo 3.1, en el que se prueba la fiabilidad de los modelos cuánticos para llegar a un buen acuerdo entre estructura y desplazamientos químicos experimentales de protón. Como ha quedado demostrado en dicho capítulo, las acetamidas secundarias existen preferentemente en disposición Z_{anti} .⁸⁸ En contraste, como se observa en la Tabla 17, los estudios de RMN de las formamidas muestran una elevada población del isómero E en diversos disolventes, con lo cual su análisis en este estudio permite extender nuestra metodología a ambos conformeros. En la Tabla 17 se incluye también la N -metilacetamida ya que, como se ha comentado previamente, esta sustancia presenta una proporción escasa, aunque observable mediante RMN, del isómero E .

Tabla 17. Poblaciones (%) del rotámero E de la N -metilacetamida (**2**) y las formamidas **21-28** en distintos disolventes (datos de ^1H -RMN a 400 MHz)

Disolvente	2	21	22	23	24	25	26	27	28
CDCl_3	3,0	11,5	20,4	22,1	18,8	16,7	16,4	27,1	21,1
$\text{DMSO}-d_6$	0,9	6,6	10,4	12,9	13,4	11,1	9,7	16,0	*
D_2O	1,7	9,2	12,2	17,6	11,7	11,0	13,8	18,1	14,6

* No se pudo observar de forma inequívoca.

Hemos visto ya que, como propusieron Shoolery y otros autores,^{80,81} los desplazamientos químicos de protones metilénicos y metínicos pueden predecirse mediante una relación empírica simple, como es la ecuación aditiva [8].

$$\delta_{\text{CHXYZ}} = 0,23 + \sigma_x + \sigma_y + \sigma_z \quad [8]$$

3.2. Correlación entre desplazamientos químicos de protones y la estructura de las amidas

Esta relación puede utilizarse también en formamidas para determinar el desapantallamiento causado por la función amida sobre un protón particular (σ_H), o sobre un conjunto de protones magnéticamente equivalentes (σ_{amida}):

$$\sigma_{amida} = \delta_{obs} - (0,23 + \sigma_x + \sigma_y) \quad [9]$$

Nuevamente, en las amidas que tienen más de un protón en CON-CH $_{\alpha}$ el desapantallamiento es una magnitud promediada, y la ecuación [10] contempla este efecto en las estructuras Z_{anti} y E_{anti} :

$$\sigma_{amida} = \frac{\sigma_{anti}}{n} + (n-1) \frac{\sigma_{gauche}}{n} \quad [10]$$

La Tabla 18 resume brevemente nuestros resultados previos sobre la anisotropía magnética encontrados para tres conjuntos diferentes de compuestos modelo: las acetamidas **2** y **7-11**, las per-*O*-acetilgluconamidas **12-16** y el conjunto completo de ambos. Como se explicó en el capítulo 3.1, estos datos son consistentes con una conformación preferente Z_{anti} para estas sustancias.⁸⁸

Tabla 18. Desapantallamiento (σ_H , ppm) en protones CON-CH $_{\alpha}$ para **2**, **7-11** y **12-16** en CDCl $_3$.

Compuesto	Promedio \pm SD		
	σ_{anti}	σ_{gauche}	$\sigma_{anti} - \sigma_{gauche}$
2 y 7-11	2,42 \pm 0,04	1,64 \pm 0,01	0,78 \pm 0,01
12-16	2,41 \pm 0,04	1,69 \pm 0,05	0,72 \pm 0,05
2, 7-11 y 12-16	2,42 \pm 0,03	1,66 \pm 0,04	0,76 \pm 0,04

Siguiendo una sistemática idéntica a la descrita para las acetamidas, esto es, asumiendo que en las formamidas que sólo incluyen un protón en CON-CH_α éste se sitúa en disposición *anti*, y cuando tiene varios protones en C_α uno de ellos es *anti* y el resto *gauche*, hemos determinado para los rotámeros *Z* de las formamidas **21-28** el desapantallamiento causado por la función amida en los hidrógenos situados en disposiciones *anti* y *gauche* (Tabla 19). Su valor es 2,52, 1,69 y 0,83 ppm para σ_{anti} , σ_{gauche} , y $\sigma_{anti} - \sigma_{gauche}$, respectivamente, con bajas desviaciones estadísticas. Estos desapantallamientos son próximos, aunque ligeramente mayores, a los encontrados en las acetamidas y en las gluconamidas quirales. Por ello, el grupo CO-alquilo parece tener un efecto pequeño en la anisotropía global. Así, una comparación directa entre los datos de la Tabla 18 y la Tabla 19 permite estimar que el apantallamiento causado por la introducción de un grupo alquilo (NCO-alquilo) en lugar del protón formílico, sobre protones *anti* y *gauche* es de 0,10 y 0,03 ppm, respectivamente.

3.2. Correlación entre desplazamientos químicos de protones y la estructura de las amidas

Tabla 19. Desapantallamientos (ppm) en protones CON-CH_α para los rotámeros Z de las formamidas **21-28** en CDCl₃.

Compuesto	δ _{observado}	x, y	σ _{amida}	σ _{anti}	σ _{gauche}	σ _{anti} - σ _{gauche}
21	2,86	(H, H)	1,95	2,52	1,67	0,85
22	3,36	(H, Me)	2,11	2,52	1,70	0,82
23	4,18	(Me, Me)	2,59	2,59*		
24	5,23	(Me, Ph)	2,49	2,49*		
25	4,49	(H, Ph)	2,09	2,52	1,66	0,86
26	6,34	(Ph, Ph)	2,45	2,45*		
27	4,02	(Me, Et)	2,53	2,53*		
28	3,28	(H, Et)	2,13	2,52	1,74	0,78
Promedio ± SD				2,52 ± 0,04	1,69 ± 0,04	0,83 ± 0,04

* Valores tomados para el cálculo del promedio. SD: desviación estándar.

La dispersión de los desplazamientos químicos es casi inexistente, como demuestran los valores estadísticos en la Tabla 19. Esto sugiere la existencia de una conformación común y prevalente que, teniendo también en cuenta las predicciones de nuestros cálculos DFT y *ab initio*, ha sido asignada a la forma *Z_{anti}*.

Los valores DFT para los rotámeros *E* de las formamidas **21-28** son igualmente consistentes con una conformación *anti*; la Tabla 20 presenta las anisotropías magnéticas sobre los protones *anti* y *gauche* de estas sustancias. Hay que recordar que la forma *anti* es el único mínimo conformacional encontrado mediante cálculos DFT en las formamidas que tienen dos o tres protones en el C_α (como **21**, **22**, **25** y **28**), que muestran mayores barreras rotacionales que los isómeros *Z*. En el caso de las formamidas con un solo protón en el CON-CH_α, se observan en los cálculos tanto la conformación *anti* como la *syn*, aunque la primera es nuevamente la estructura más estable para los isómeros *E* (por unas 1,95-2,43 kcal/mol). Además, curiosamente se observa que en las estructuras *E*, tanto el protón *anti* (σ_{anti} = 1,98 ppm) como el *gauche*

($\sigma_{gauche} = 2,08$ ppm) se ven afectados de forma similar por la anisotropía magnética de la función amida ($\sigma_{anti} - \sigma_{gauche} = -0,10$ ppm), como refleja la baja desviación estadística del conjunto.

Tabla 20. Desapantallamientos (ppm) en protones CON-CH _{α} para los rotámeros *E* de las formamidas **21-28** en CDCl₃.

Compuesto	$\delta_{observado}$	x, y	σ_{amida}	σ_{anti}	σ_{gauche}	$\sigma_{anti} - \sigma_{gauche}$
21	2,94	(H, H)	2,03	1,98	2,06	-0,08
22	3,29	(H, Me)	2,04	1,98	2,10	-0,12
23	3,71	(Me, Me)	2,12	2,12*		
24	4,71	(Me, Ph)	1,97	1,97*		
25	4,42	(H, Ph)	2,02	1,98	2,06	-0,08
26	5,78	(Ph, Ph)	1,89	1,89*		
27	3,42	(Me, Et)	1,93	1,93*		
28	3,19	(H, Et)	2,04	1,98	2,10	-0,12
Promedio \pm SD				1,98 \pm 0,10	2,08 \pm 0,02	-0,10 \pm 0,02

* Valores tomados para el cálculo del promedio. SD: desviación estándar.

Resulta sorprendente que en las formamidas *E* el desapantallamiento local para protones *gauche*, que se encuentran situados fuera del plano de la función amida, sea ligeramente mayor que para los correspondientes protones *anti*, que se encuentran coplanares. Una estimación preliminar basada en la relación de McConnell (ver apartado 2.2)¹⁵ refleja la dependencia directa de la anisotropía magnética de la amida con el ángulo (θ) entre el vector *R* (la distancia entre la amida y el protón considerado) y el plano de simetría (es decir, el del grupo amido). Por ello, esta contribución angular hace que los protones situados fuera del plano de amida, como los protones *gauche*, estén mucho menos desapantallados. No obstante, como se ha señalado antes, las predicciones cuantitativas basadas en modelos clásicos como el de McConnell pueden

ser prematuras ya que los datos para el tensor de susceptibilidad son escasos. Aún así, debemos enfatizar que en una estricta aplicación del mismo, y teniendo en cuenta que en los datos publicados para las formamidas este tensor es axialmente simétrico respecto a la normal al plano de amida,¹⁰² sus predicciones difieren de lo que ahora encontramos (ver Figura 5). Ya previamente se han publicado discrepancias para diferentes grupos anisotrópicos entre las predicciones de otros modelos y la ecuación de McConnell. Así, mientras ésta predice apantallamiento sobre protones situados encima del centro del enlace C=C, Martin y col. observan desapantallamiento para esta posición mediante cálculos a nivel HF/6-31G** en sistemas modelo.¹⁰³ El mismo grupo ha encontrado incoherencias también para el grupo carbonilo.¹⁰⁴ Pero la que ahora comentamos en amidas secundarias es la primera confirmación experimental de que la ecuación de McConnell no es general.

Para arrojar luz sobre la anisotropía magnética de los isómeros *E*, con evidente discrepancia entre el modelo de McConnell y el nuestro, se han realizado cálculos adicionales sobre la 2-pirrolidona (**29**) y δ -valerolactama (**30**), que están forzadas a adoptar una geometría *E*. En la Figura 46 se observa la variación de la energía frente al ángulo de torsión ϕ calculada a nivel B3LYP/6-31G*.

¹⁰² (a) L. Pauling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1979**, 76, 2293-2294. (b) T. G. Schmalz, C. L. Norris y W. H. Flygare, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 7961-7967. (c) W. H. Flygare, *Chem. Rev.* **1974**, 74, 653-687.

¹⁰³ N. H. Martin, N. W. Allen III, E. K. Minga, S. T. Ingrassia y J. D. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 11510-11511.

¹⁰⁴ N. H. Martin, N. W. Allen III, J. D. Brown, D. M. Kmiec Jr. y L. Vo, *J. Mol. Graphics Mod.* **2003**, 22, 127-131.

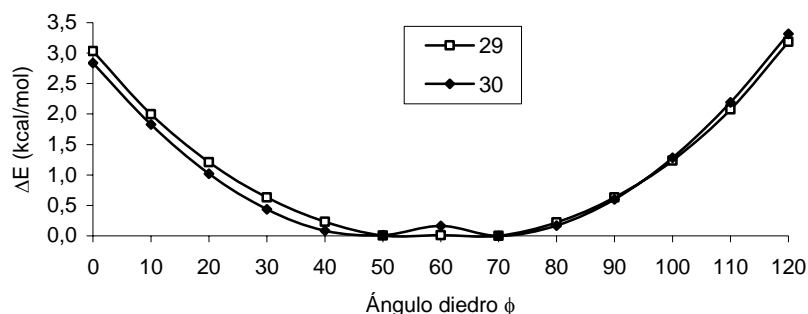


Figura 46. Curvas torsionales para las amidas **29** y **30**.

La Figura 47 muestra cómo en sus estructuras más estables los protones CON- CH_α de estas sustancias se encuentran anclados en una conformación *gauche*, lo que daría lugar a que el desapantallamiento magnético (σ_{amida}) para los protones H-1 y H-2 sea equivalente a σ_{gauche} .

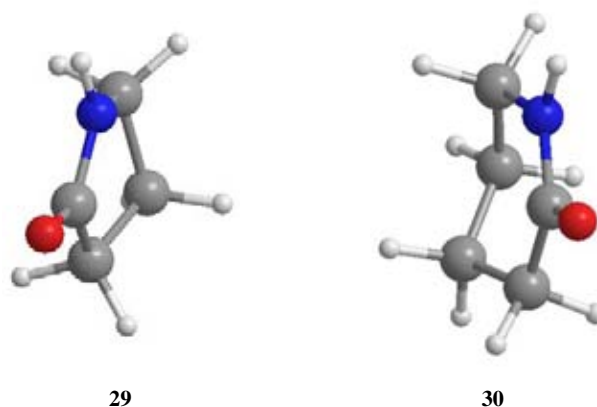


Figura 47. Estructuras de mínima energía de la 2-pirrolidona (**29**) y δ -valerolactama (**30**), calculadas a nivel B3LYP/6-31G*.

La Tabla 21 recopila los resultados de las estructuras de menor energía, cuyos valores de ángulos de torsión (respecto al protón H-1) son 55° para **29** y 47° para **30**.

3.2. Correlación entre desplazamientos químicos de protones y la estructura de las amidas

Tabla 21. Ángulos de torsión (°) y desapantallamiento (ppm) para las amidas **29** y **30**.

Compuesto	ϕ CONH-CH ₁	ϕ CONH-CH ₂	$\delta_{\text{observado}}$	$\sigma_{\text{amida}} = \sigma_{\text{gauche}}$
29	54,8	-65,7	3,41	2,26
30	47,3	-69,7	3,32	2,17
Promedio \pm SD				2,22 \pm 0,06

Aplicando la ecuación de Shoolery al metileno del grupo CON-CH₂- de **29** y **30**, deducimos que su desapantallamiento magnético (σ_{amida}) es de 2,26 y 2,17 ppm, respectivamente (Tabla 21). Estas anisotropías son incluso mayores que los valores de σ_{gauche} hallados para las series acíclicas (Tabla 20). Este hecho puede explicarse, en parte, por la rigidez conformacional y la congestión estérica de estos derivados cíclicos. La existencia de estos efectos sobre el apantallamiento hace imposible, en la práctica, obtener un modelo perfecto y por tanto una buena correlación entre los desplazamientos químicos. De hecho, las referencias bibliográficas advierten sobre los inconvenientes de aplicar datos de desplazamientos químicos de compuestos modelos acíclicos a derivados cíclicos.^{22c} En vista de que la anisotropía magnética de la 2-pirrolidona es inusualmente alta, se ha eliminado esta sustancia del conjunto de datos que discutiremos más adelante. De todas formas, su inclusión sólo modificaría ligeramente (~ 1%) el ajuste total de los datos. Por el contrario, se ha mantenido la δ -valerolactama (**30**), ya que la eliminación de la contribución de su anisotropía magnética causa una variación despreciable en el ajuste estadístico.

Una vez establecida una muestra representativa de los ángulos de torsión de las acetamidas y formamidas a nivel B3LYP/6-31G* y el desapantallamiento magnético correspondiente a estas estructuras, es posible ahora buscar un diagrama esquemático que permita visualizar el desapantallamiento magnético observado por cada protón individual (σ_{H}) como función de la geometría (Figura 49). Tras diferentes intentos se

encontró que, como se muestra en la Figura 49 para datos en CDCl_3 , se llega a un buen ajuste cuando σ_{H} de cada protón CON-CH_α se representa frente al ángulo diedro virtual H-C---C=O (α) que resulta de unir el carbono carbonílico y el C_α , como se define en la Figura 48.

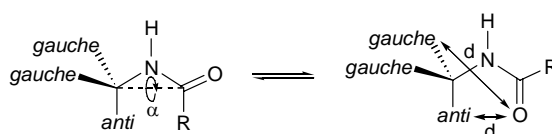


Figura 48. Ángulo diedro virtual (α) y distancia (d) para los rotámeros *Z* y *E* de amidas secundarias.

En la representación se observa que los datos experimentales pueden ajustarse a un polinomio de cuarto orden cuyo perfil recuerda a la función coseno al cuadrado con un desfase aproximado de 35° (Figura 49).

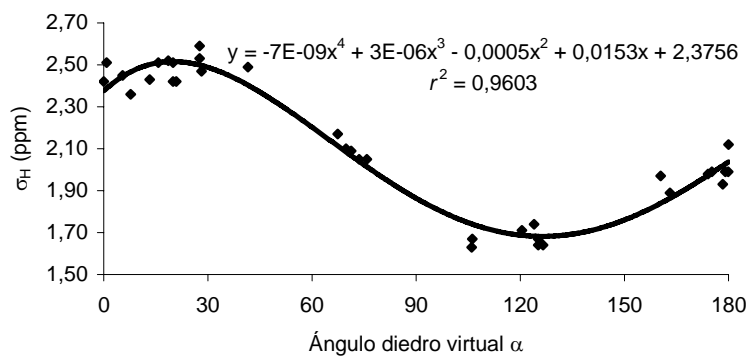


Figura 49. Desapantallamiento magnético (σ_{H} , ppm) frente al ángulo diedro virtual α ($^\circ$) para las amidas **2**, **7-11**, **21-28** y **30** en CDCl_3 .

3.2. Correlación entre desplazamientos químicos de protones y la estructura de las amidas

No obstante, la representación del desapantallamiento magnético frente al ángulo diedro evidencia una fuerte falta de simetría. Así, la inclinación en ambos lados del mínimo (o del máximo) de la representación no coincide, la zona cóncava se extiende en un sector más amplio que la convexa, y el valor del desapantallamiento a 0 y 180° es diferente. Ello sugiere que el ángulo diedro no debe ser la única variable implicada en el desapantallamiento magnético. Consecuentemente, parece apropiado relacionar los datos mediante una ecuación que tenga más parámetros ajustables. Observando el gráfico se aprecia que, en esencia, sólo hay cuatro conjuntos de puntos, que corresponden a las cuatro posibles combinaciones de conformaciones *E/Z* y *anti/gauche*. Intuitivamente, una segunda variable implicada debe ser la distancia entre el átomo en cuestión y algún punto de la fuente de anisotropía. Ello se observa también en la ecuación de McConnell, en la que R es la distancia entre el átomo observado y el centro de la anisotropía magnética de grupo.¹⁰⁵ Con estas premisas y después de diferentes intentos realizamos un ajuste de mínimos cuadrados convencional de σ_H frente a $\cos^2(\alpha-35)/d$, donde d es la distancia en Å entre el protón en cuestión y el oxígeno carbonílico, encontrándose una recta con un coeficiente de determinación $r^2 = 0,94$ (ecuación [11], Figura 50):¹⁰⁵

$$\sigma_H = a + 2,16 \cos^2(\alpha-35)/d \quad [11]$$

¹⁰⁵ También obtuvimos un buen ajuste representando σ_H frente a la función $\cos^2(\alpha-35)/4 + 1/d^2$ ($r^2 = 0,95$), pero por simplicidad nos decantamos por la ecuación [11] comentada.

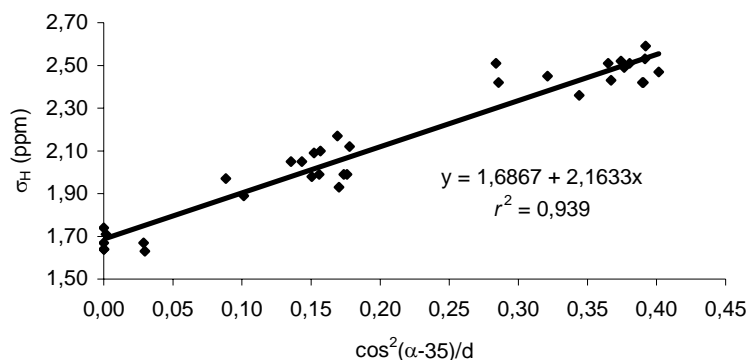


Figura 50. Correlación entre σ_H y la función $\cos^2(\alpha-35)/d$ para las amidas **2, 7-11, 21-28 y 30** en CDCl_3 .

Sin duda, la función angular de la ecuación [11] reproduce bien el efecto anisotrópico. Podría argumentarse que esta correlación propone anisotropías independientes de la distancia entre los átomos considerados, ya que el valor de la ordenada en el origen permanecería incluso a distancia infinita. De hecho, sólo se obtienen soluciones lógicas para estructuras con distancias $\text{CON}-\text{CH}_\alpha$ similares a las encontradas en las amidas. Cuando ello es así, la ecuación [11] puede ser una alternativa conveniente a la ecuación clásica de McConnell para calcular la anisotropía magnética de las amidas. Esta ecuación presenta una serie de ventajas adicionales; en concreto, no se requieren las susceptibilidades magnéticas y pueden determinarse con precisión los parámetros geométricos necesarios.

La ecuación [11] se puede parametrizar en otros disolventes distintos a CDCl_3 . Teniendo en cuenta el nivel de información del que disponíamos, era razonable considerar más fiable la representación obtenida en disolución de CDCl_3 , ya que los valores de σ utilizados en la ecuación de Shoolery están parametrizados para este disolvente. Además, en D_2O un buen número de amidas presentan poca solubilidad y existe la posibilidad, no contemplada en el cálculo, de que sus estructuras se vean

3.2. Correlación entre desplazamientos químicos de protones y la estructura de las amidas

afectadas por la formación de puentes de hidrógeno. Por ello, se optó por utilizar la ecuación [11] en DMSO- d_6 y D_2O fijando la pendiente encontrada para $CDCl_3$ y calculando la ordenada en el origen promediando la obtenida para cada amida. Se llegó así a la ecuación [11] generalizada para cualquier disolvente, que es más simple que la obtenida sin fijar la pendiente y que no difiere sustancialmente en términos de calidad estadística (ver más adelante). En esta ecuación, al fijar la pendiente, el término r^2 sólo puede aplicarse en el caso del $CDCl_3$, por lo que decidimos aplicar la desviación estándar de la regresión ($s_{y,x}$) como índice de calidad estadística (Tabla 22).¹⁰⁶ Las mayores desviaciones que se obtienen en estos disolventes respecto a las de $CDCl_3$ son lógicas, por todo lo dicho. La Figura 51 muestra la representación de σ_H frente a la función $\cos^2(\alpha-35)/d$ en DMSO- d_6 .

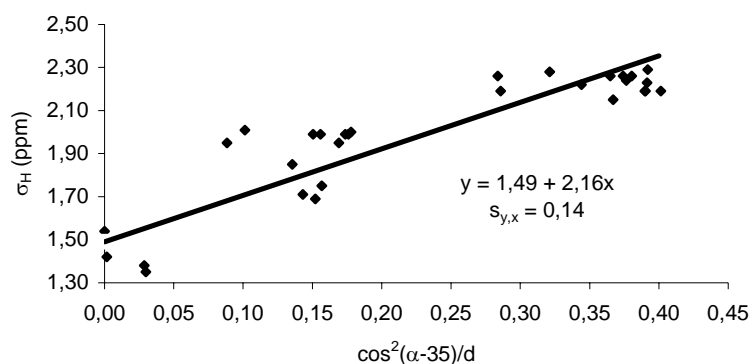


Figura 51. Correlación entre σ_H y la función $\cos^2(\alpha-35)/d$ para las amidas **2, 7-11, 21-28** y **30** en DMSO- d_6 .

¹⁰⁶ $s_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \hat{x}_i)^2}{n - 2}}$. Este parámetro mide la capacidad de ajuste lineal de una serie de puntos, por lo que es el idóneo para comparar dos ajustes diferentes entre sí.

La Figura 52 muestra una representación similar para datos obtenidos en D₂O.

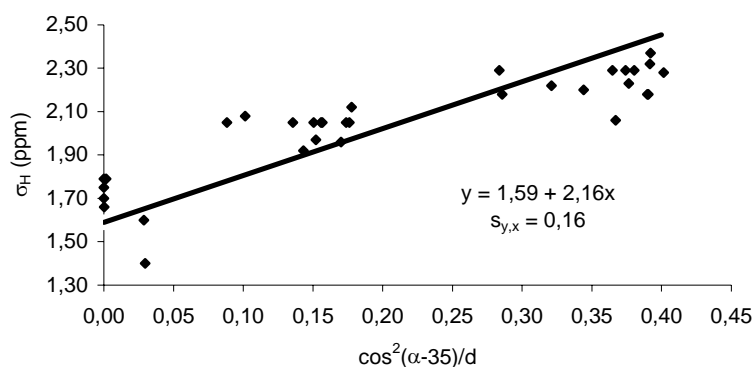


Figura 52. Correlación entre σ_H y la función $\cos^2(\alpha-35)/d$ para las amidas **2**, **7-11**, **21-28** y **30** en D₂O.

La Tabla 22 muestra los valores de la ordenada en el origen a y la desviación estándar de la regresión $s_{y,x}$ en los tres disolventes, junto al coeficiente de determinación r^2 en CDCl₃.

Tabla 22. Parámetros de la ecuación [11].

Disolvente	a	r^2	$s_{y,x}$
CDCl ₃	1,69	0,94	0,08
DMSO- d_6	1,49	--	0,14
D ₂ O	1,59	--	0,16

Además, para mostrar la validez de la metodología y las ecuaciones encontradas en estos otros disolventes, se calcularon a partir de los datos geométricos B3LYP/6-31G* los desapantallamientos σ_{anti} y σ_{gauche} en DMSO- d_6 y D₂O utilizando la ecuación [11], y a partir de ellos los desapantallamientos σ_{amida} mediante la ecuación [10]. Estos σ_{amida} se compararon con los σ_{amida} experimentales, calculados de la forma habitual (ecuación [9]) a partir de los desplazamientos químicos observados. Se

3.2. Correlación entre desplazamientos químicos de protones y la estructura de las amidas

encontró así que la diferencia entre la teoría y el experimento se encuentra en un intervalo de $\pm 0,30$ ppm, con un error RMSE¹⁰⁷ de 0,12 y 0,14 ppm en DMSO-*d*₆ y D₂O, respectivamente (ver Tabla 23 y Figuras 51 y 52).

¹⁰⁷ $RMSE = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}}$; RMSE: *root mean square error*, raíz del error cuadrático medio.

Tabla 23. Desapantallamientos experimentales y calculados sobre protones CON-CH_c en DMSO-*d*₆ y D₂O.

isómero	experimental						calculado						$\Delta\sigma_{\text{amida}}$ exp - calc	
	δ_{obs}		σ_{amida}		σ_{anti}		σ_{gauche}		σ_{amida}		$\Delta\sigma_{\text{amida}}$ exp - calc		$\Delta\sigma_{\text{amida}}$ exp - calc	
	DMSO- <i>d</i> ₆	D ₂ O	DMSO- <i>d</i> ₆	D ₂ O	DMSO- <i>d</i> ₆	D ₂ O	DMSO- <i>d</i> ₆	D ₂ O	DMSO- <i>d</i> ₆	D ₂ O	DMSO- <i>d</i> ₆	D ₂ O	DMSO- <i>d</i> ₆	D ₂ O
2 Z	2,54	2,57	1,63	1,66	2,11	2,21	1,55	1,65	1,74	1,84	-0,11	-0,18		
7 Z	2,96	3,17	1,71	1,92	2,33	2,43	1,49	1,59	1,91	2,01	-0,20	-0,09		
8 Z	3,78	3,87	2,19	2,28	2,36	2,46			2,36	2,46	-0,17	-0,18		
9 Z	4,89	4,80	2,15	2,06	2,28	2,38			2,28	2,38	-0,13	-0,32		
10 Z	4,24	4,34	1,84	1,94	2,33	2,43	1,49	1,59	1,91	2,01	-0,07	-0,07		
11 Z	6,11	6,09	2,22	2,20	2,23	2,33			2,23	2,33	-0,01	-0,13		
21 E	2,71	2,87	1,80	1,96	1,87	1,97	1,80	1,90	1,82	1,92	-0,02	0,04		
21 Z	2,58	2,74	1,67	1,83	2,10	2,20	1,55	1,65	1,74	1,84	-0,07	-0,01		
22 E	3,09	3,26	1,84	2,01	1,83	1,93	1,82	1,92	1,82	1,92	0,02	0,09		
22 Z	3,09	3,29	1,84	2,04	2,28	2,38	1,49	1,59	1,89	1,99	-0,05	0,05		
23 E	3,59	3,71	2,00	2,12	1,87	1,97			1,87	1,97	0,13	0,15		
23 Z	3,88	3,96	2,29	2,37	2,34	2,44			2,34	2,44	-0,05	-0,07		
24 E	4,69	*	1,95		1,68	1,78			1,68	1,78	0,27			
24 Z	4,98	4,97	2,24	2,23	2,30	2,40			2,30	2,40	-0,06	-0,17		
25 E	4,32	4,45	1,92	2,05	1,87	1,97	1,78	1,88	1,82	1,92	0,10	0,13		
25 Z	4,30	4,42	1,90	2,02	2,31	2,41	1,49	1,59	1,90	2,00	0,00	0,02		
26 E	5,89	5,97	2,00	2,08	1,71	1,81			1,71	1,81	0,29	0,27		
26 Z	6,17	6,11	2,28	2,22	2,18	2,28			2,18	2,28	0,10	-0,06		
27 E	*	3,45		1,96	1,86	1,96			1,86	1,96	0,00	0,00		
27 Z	3,72	3,81	2,23	2,32	2,34	2,44			2,34	2,44	-0,11	-0,12		
28 E	3,02	3,20	1,87	2,05	1,82	1,92	1,83	1,93	1,82	1,92	0,05	0,13		
28 Z	3,03	3,19	1,88	2,04	2,30	2,40	1,49	1,59	1,89	1,99	-0,01	0,05		
30 E	3,10	3,28	1,95	2,13			1,84	1,94	1,84	1,94	0,11	0,19		
RMSE											0,12	0,14		

* Estos desplazamientos no se pudieron observar de forma inequívoca.

3.2. Correlación entre desplazamientos químicos de protones y la estructura de las amidas

Por otra parte, en las amidas para las que los cálculos predicen conformaciones excepcionales, también debe existir un buen acuerdo entre las anisotropías experimentales y las calculadas (σ_{amida}) si la predicción del cálculo es correcta. Esto ocurre en el rotámero *E* de la *N*-metilacetamida, que es el isómero con menor población en disolución de esta sustancia, para el que nuestros cálculos predicen una conformación preferente en la que el ángulo diedro ϕ tiene un valor aproximado de 29° (Figura 53).



Figura 53. Estructura de mínima energía de la *N*-metilacetamida *E*, calculada al nivel B3LYP/6-31G*.

Para este rotámero se pueden observar los protones CON-CH₃ en algunos disolventes deuterados. Como se muestra en la Tabla 24, los valores de σ_{amida} , calculados promediando los valores de σ_{H} proporcionados por la ecuación [11] a partir de datos geométricos B3LYP/6-31G*, son próximos a los valores de σ_{amida} experimentales obtenidos a partir de sus desplazamientos químicos. En definitiva, la concordancia entre desplazamientos magnéticos experimentales y calculados avala la bondad del ángulo diedro ϕ predicho por el cálculo. Ello demuestra que aunque inicialmente el ángulo de torsión ϕ calculado puede resultar extraño, no es así si

consideramos que este ángulo debe ser el resultado de un balance entre la conformación *anti* favorable y la repulsión entre los grupos metilo que provoca esta conformación.

Tabla 24. Desapantallamientos calculados y experimentales para el rotámero *E* de la *N*-metilacetamida en disolventes deuterados.

Calculados			CDCl ₃			DMSO- <i>d</i> ₆			D ₂ O		
			Calculados		Exp.	Calculados		Exp.	Calculados		Exp.
ϕ	α	d	σ_H	σ_{amida}	σ_{amida}	σ_H	σ_{amida}	σ_{amida}	σ_H	σ_{amida}	σ_{amida}
29,0	32,5	4,340	2,19			1,99			2,09		
147,0	150,1	3,997	1,79	1,92	1,99	1,59	1,72	1,75	1,69	1,82	1,94
268,8	259,8	4,064	1,78			1,58			1,68		

Sin duda las predicciones de los cálculos más contradictorias son las obtenidas para los isómeros *Z* de la *N*-metilacetamida (**2**) y *N*-metilformamida (**21**) mediante los métodos DFT, HF y MP2, que como se ha anticipado, ofrecen resultados dispares respecto al ángulo diedro ϕ (Tabla 15). La Tabla 25 resume los valores de σ_{amida} experimentales y calculados usando los parámetros α (°) y d (Å) generados por esos modelos. Independientemente del disolvente que se utilice, hay un buen acuerdo entre teoría y experimento, especialmente en CDCl₃, con la excepción de las estructuras obtenidas a nivel HF/6-31G** y MP2/6-31+G** que se indican en negrita, que muestran grandes desviaciones. Estas discrepancias son consecuencia de la predicción por el cálculo de un conformero de menor energía equivocado. Así, es relevante concluir que sólo los modelos teóricos que predicen conformaciones *anti* son consistentes con las anisotropías experimentales encontradas para amidas simples. Como ejemplo final, no se encontraron discrepancias para los rotámeros *E* de ambas amidas, ya que todos los métodos empleados predicen la conformación *anti* como el conformero más estable (Tabla 25).

3.2. Correlación entre desplazamientos químicos de protones y la estructura de las amidas

Tabla 25. Desapantallamientos calculados y experimentales para las amidas **2** y **21**.

Isómero	Método	CDCl ₃		DMSO- <i>d</i> ₆		D ₂ O	
		Calculados	Exp.	Calculados	Exp.	Calculados	Exp.
		σ_{amida}	σ_{amida}	σ_{amida}	σ_{amida}	σ_{amida}	σ_{amida}
2 Z	B3LYP/6-31G*	1,94		1,74		1,84	
	MP2/6-31G*	1,97	1,89	1,77	1,63	1,87	1,66
	MP2/6-31+G**	2,23		2,03		2,13	
	HF/6-31G**	2,18		1,98		2,08	
2 E	B3LYP/6-31G*	1,92		1,72		1,82	
	MP2/6-31G*	1,93	1,99	1,73	1,75	1,83	1,94
	MP2/6-31+G**	1,92		1,72		1,82	
	HF/6-31G**	1,94		1,74		1,84	
21 Z	B3LYP/6-31G*	1,94		1,74		1,84	
	MP2/6-31G*	1,94	1,95	1,74	1,67	1,84	1,83
	MP2/6-31+G**	2,21		2,01		2,11	
	HF/6-31G**	1,93		1,73		1,83	
21 E	B3LYP/6-31G*	2,02		1,82		1,92	
	MP2/6-31G*	2,02	2,03	1,82	1,80	1,92	1,96
	MP2/6-31+G**	2,02		1,82		1,92	
	HF/6-31G**	2,03		1,83		1,93	

Por otra parte, los parámetros de ajuste de la ecuación [11] para los disolventes DMSO-*d*₆ y D₂O se han calculado también liberando tanto la ordenada en el origen como la pendiente (ver apéndice C), con lo que se llega a la ecuación [12] y a los parámetros de ajuste de la Tabla 26, en los que $s_{y,x}$ para D₂O (0,12) es ligeramente mejor que el de la ecuación [11] para este disolvente (0,16). No obstante, como se verá más adelante, cuando ambas ecuaciones se utilizan en el cálculo de desplazamientos

químicos de protones de proteínas, se llega a resultados estadísticamente similares. Todo ello corrobora nuestras hipótesis y valida la ecuación [11].¹⁰⁸

$$\sigma_H = a + b \cos^2(\alpha-35)/d \quad [12]$$

Tabla 26. Parámetros de la ecuación [12].

Disolvente	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> ²	<i>s</i> _{y,x}
CDCl ₃	1,69	2,16	0,94	0,08
DMSO- <i>d</i> ₆	1,52	2,02	0,82	0,14
D ₂ O	1,75	1,40	0,76	0,12

Por último, esta metodología se puede incorporar en ecuaciones bien conocidas como por ejemplo la de Shoolery u otras basadas en las contribuciones aditivas de los sustituyentes (σ),⁸¹ para calcular los desplazamientos de protones en α a la función amida (ecuación [13]),

$$\delta_{CH\alpha} = 0,23 + \Sigma\sigma + \sigma_{amida} \quad [13]$$

en la que a su vez σ_{amida} , si hubiera varios protones CON-CH $_{\alpha}$, sería la media ponderada (ecuación [10]) de sus σ_H , que se calcularían mediante la ecuación [11].

En conclusión, en este apartado se han descrito los desapantallamientos magnéticos calculados para los protones CH $_{\alpha}$ en disposiciones *anti* y *gauche* para

¹⁰⁸ M. Avalos, R. Babiano, J. L. Barneto, P. Cintas, F. R. Clemente, J. L. Jiménez y J. C. Palacios, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 1834-1842.

3.2. Correlación entre desplazamientos químicos de protones y la estructura de las amidas

ambos rotámeros *Z* y *E*. También se ha encontrado que hay una dependencia significativa y sistemática del desapantallamiento químico experimental sufrido por un determinado protón CON-CH_α respecto al ángulo de torsión y a la distancia entre el protón y el átomo de oxígeno, que se puede cuantificar matemáticamente mediante la ecuación [11]. Esta relación empírica permite utilizar al desplazamiento químico observado como prueba experimental de la estructura.

3.3. Correlaciones en proteínas.

Las proteínas son esenciales en la vida. Son las enzimas que catalizan los procesos biológicos, y participan en el transporte de biomoléculas pequeñas, en la generación y transmisión de señales celulares y en los procesos de agregación y diferenciación, entre otras funciones. Este estudio perdería bastante sentido sin un intento de aplicar nuestras metodologías al desarrollo de su análisis estructural.

En general, la estructura secundaria de un polipéptido se define mediante los ángulos de torsión ϕ ($[\phi]$, $C_1-N_1-C_\alpha-C_2$), ψ ($[\psi]$, $N_1-C_\alpha-C_2-N_2$), y ω ($[\omega]$, $P-C_1-N_1-C_\alpha$),¹⁰⁹ que en la estructura extendida representada (Figura 54) tienen el valor de 180° .

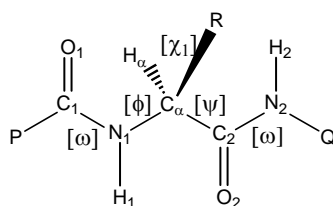


Figura 54. Estructura extendida de un péptido y ángulos que la definen.

Los ángulos definidos para las amidas como ϕ y ψ se continuarán utilizando en este capítulo con el mismo significado para describir ángulos diedros en proteínas, con el objeto de extender las correlaciones obtenidas previamente en amidas sencillas. Dichos ángulos diedros son conceptualmente diferentes de los ángulos de torsión $[\phi]$ y $[\psi]$ empleados para caracterizar la estructura secundaria de los péptidos y las proteínas,

¹⁰⁹ (a) *IUPAC-IUB Recommendations 1971*; IUPAC: Pergamon, 1971; IUPAC Information Bulletin No. 10. (b) *Amino Acids, Peptides and Proteins*; G. T. Young, Ed.; The Chemical Society: Londres, 1972; Vol.4, p 455.

3.3. Correlaciones en proteínas

y no deben tomarse como equivalentes de ningún modo. Para evitar confusión, cuando nos refiramos en este capítulo a los ángulos diedros definidos en la referencia 109 se indicarán entre corchetes.

En los últimos años se han analizado un buen número de estructuras de proteínas mediante difracción de rayos X o por métodos espectroscópicos. De este amplio trabajo se ha concluido que la estructura de las proteínas puede subdividirse en regiones con una determinada organización. La mayor parte de los plegamientos de estas porciones estructurales se encuentran en la categoría de lo que entendemos como estructura secundaria: hélices, hojas plegadas, bucles, etc. Frecuentemente, la estructura tridimensional estática de una proteína se describe bien mediante los diedros $[\phi]$, $[\psi]$, y $[\omega]$. Considerando que este último es habitualmente 180° (o 0°), debido a la deslocalización, se puede hacer una representación simplificada en dos dimensiones, una superficie de energía potencial bidimensional, $E = E(\phi, \psi)$, que usualmente se conoce como representación de Ramachandran (Figura 55).¹¹⁰ Para la representación de algunos motivos conformacionales puede ser necesario describir también los ángulos de torsión $[\chi]$.

¹¹⁰ G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan y V. Sasisekharan, *J. Mol. Biol.* **1963**, 7, 95-99.

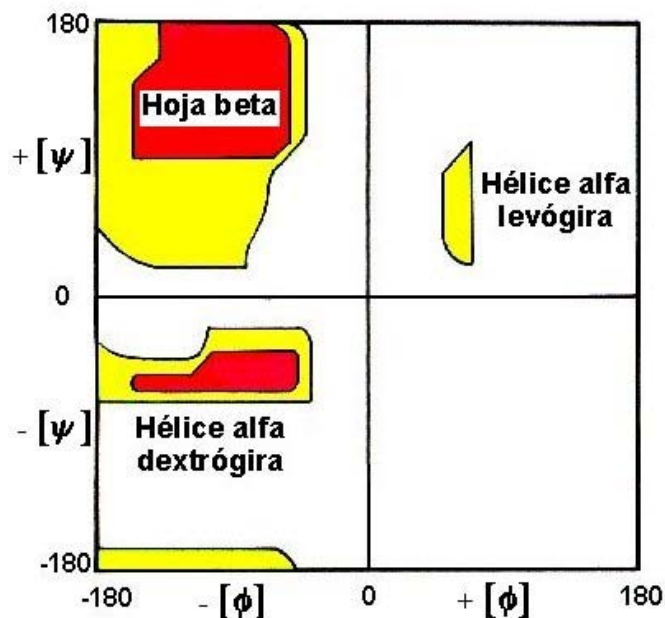


Figura 55. Representación de Ramachandran.

En la última década la resonancia magnética nuclear se ha mostrado como una potente herramienta en el estudio de la estructura tridimensional de las proteínas.^{17,49} Tanto la RMN como la difracción de rayos X se utilizan independiente y/o conjuntamente para la elucidación experimental de la estructura completa de las proteínas. Ambos métodos son obviamente diferentes, ya que el primero se realiza habitualmente en disolución y permite estudios de dinámica de proteínas que ayudan a entender las relaciones de estructura-función. Las estructuras deducidas por estas técnicas suelen depositarse en bases de datos (por ejemplo, la Protein Data Bank, más conocida como PDB,⁵⁶ o la BioMagResBank (BMRB)).¹¹¹ Los cálculos computacionales constituyen también una herramienta útil en el estudio de las proteínas. Con este

¹¹¹ B. R. Seavey, E. A. Farr, W. M. Westler y J. L. Markley, *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 217-236.

3.3. Correlaciones en proteínas

propósito es importante destacar la aplicación de cálculos *ab initio* al estudio de la estructura de las subunidades.¹¹²

Como se sabe, los desplazamientos químicos aportan una valiosa información sobre la estructura de las proteínas. Las contribuciones del grupo peptídico son particularmente notables para los protones en posición CH_α . Parece claro que estos protones están desplazados predominantemente a campo más bajo en hojas β y a campo más alto en las hélices α con respecto a la estructura en *random coil*, aunque esos desplazamientos pueden reflejar también la influencia de enlaces de hidrógeno sobre el grupo carbonilo o con el disolvente.^{16d} Ya que la mayoría de ángulos $[\phi]$ en las proteínas¹⁰⁹ se encuentran en la región entre -180 y -60° , debe esperarse una gran dependencia con el desplazamiento del protón sobre el C_α situado en este ángulo. Además, las hélices tendrán valores $[\phi]$ medios cercanos a -60° , y las hojas próximos a -120° . Desafortunadamente, la correlación entre los conformeros y desplazamientos químicos se puede establecer solamente para las regiones de la hélice α y la hoja β de la superficie de Ramachandran.^{45a,113}

De todas formas, pueden estimarse un gran número de conformaciones en péptidos y proteínas mediante el cálculo de los tensores de anisotropía del desapantallamiento químico en RMN a nivel GIAO-RHF con los conjuntos de bases 6-31+G* y TZ2P. Esos desplazamientos químicos se relacionan bien con los resultados experimentales, lo que refuerza la idea de que es posible establecer una conformación

¹¹² A. Perczel y I. G. Csizmadia, *The Amide Linkage*; A. Greenberg, C. M. Breneman y J. F. Liebman, Eds.; Wiley: Nueva York, 2000; Capítulo 13.

¹¹³ (a) A. Pastore, V. Saudek, *J. Magn. Reson.* **1990**, *90*, 165-176. (b) M. D. Reily, V. Thanabal y D. O. Omeckinsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6251-6252. (c) A. C. de Dios, J. G. Pearson y E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9768-9773.

preferente del esqueleto peptídico empleando sólo desplazamientos químicos.¹¹⁴ Igualmente, cabe mencionar aquí la posibilidad de hacer una predicción del espectro de ¹H-RMN completo de moléculas orgánicas mediante cálculos DFT de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento espín-espín.¹¹⁵

De forma resumida, el protocolo básico para la determinación mediante RMN de la estructura de proteínas suele comenzar con experiencias NOESY y TOCSY que permiten la identificación de sistemas de espín individuales (aminoácidos) y coloca a éstos en una determinada estructura primaria (asignamiento secuencial). Los picos NOESY¹¹⁶ (cuantos más mejor) se clasifican de acuerdo con su relativa intensidad como fuertes, medios y débiles. Estas intensidades están relacionadas con la distancia^{90b,116,117} entre los protones que las ocasionan (2,3-2,7, 2,8-3,6 y 3,7-4,5 Å, respectivamente). La información sobre ángulos de enlace suele obtenerse de espectros COSY, mediante la ecuación empírica de Karplus que relaciona constantes de acoplamiento con ángulos diedros. Posteriormente, estos datos se relacionan mediante programas informáticos, y las estructuras encontradas se refinan minimizando su energía y considerando también interactivamente otros datos (impedimentos estéricos, posibilidad de puentes disulfuro, interacciones electrostáticas, desplazamientos químicos...). De lo dicho se desprende un gran avance que ha sido reconocido con la concesión del Premio Nobel en Química en

¹¹⁴ A. Perczel y A. G. Császár, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1069-1083.

¹¹⁵ A. Bagno, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1652-1661.

¹¹⁶ D. Neuhaus y M. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*; VCH: Nueva York, 1989.

¹¹⁷ (a) K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley: Nueva York, 1986. (b) J. A. Smith y L. G. Pease, *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol.* **1980**, *8*, 315-399. (c) M. Nilges, *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 645-660. (d) J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III y N. J. Skelton, *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*; Academic Press: San Diego, 1996. (e) S. W. Fesik y E. R. P. Zuiderweg, *Q. Rev. Biophys.* **1990**, *23*, 97-131. (f) G. M. Clore y A. M. Gronenborn, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1991**, *23*, 43-92. (g) A. Bax y S. Grzesiek, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 131-138.

el año 2002 a Kurt Wüthrich, por el desarrollo de la Resonancia Magnética Nuclear para la determinación de la estructura de biomoléculas en disolución. Pero la enorme dificultad de la determinación estructural de grandes proteínas también nos permite entender la necesidad de aportar metodologías que faciliten esta labor. Así, la asignación completa de las resonancias de los núcleos de ^1H , ^{13}C y ^{15}N puede conseguirse sin la utilización de experiencias NOE mediante experimentos 3D específicos (por ejemplo HNCA, HN(CO)CA, CBCA-(CO)NH, HBHA(CO)NH, HCC(CO)NH, y HCCH-TOCSY)^{117d} cuando se dispone de muestras doblemente marcadas. Se han desarrollado estrategias de asignación de resonancias basadas en constantes de acoplamiento homo- y heteronucleares,^{117e-g} que fundamentan expectativas sobre una asignación automatizada de espectros. También se han iniciado técnicas novedosas basadas en la medida directa de ángulos en fase sólida que han sido aplicadas a la determinación de la estructura secundaria de proteínas en estado sólido.¹¹⁸ Otra nueva posibilidad es la utilización de correlaciones cruzadas de la relajación dipolo-dipolo y coherencias cuánticas dobles y cero,^{118d} que pueden complementar los experimentos NOE en el cálculo de estructuras.

La utilización de la resonancia magnética nuclear en tres dimensiones ha permitido también un avance en el análisis automatizado.⁴⁹ Diversos laboratorios han desarrollado programas que permiten asignaciones automatizadas.¹¹⁹ De alguna forma estos programas utilizan generalmente la estrategia clásica de Wüthrich y

¹¹⁸ (a) B. Reif, M. Henning y C. Griesinger, *Science* **1997**, 276, 1230-1233. (b) N. Tjandra y A. Bax, *Science* **1997**, 278, 1111-1114. (c) J. D. van Beek, L. Beaulieu, H. Schafer, M. Demura, T. Asakura y B. H. Meier, *Nature* **2000**, 405, 1077-1079. (d) J. H. Prestegard, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 517-522.

¹¹⁹ (a) H. N. Moseley y G. T. Montelione, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 635-642. (b) T. D. Goddard y D. G. Kneller, *SPARKY 3*; University of California, San Francisco, 2000. (c) V. Y. Orekhov, I. V. Ibraghimov y M. Billeter, *J. Biomol. NMR* **2001**, 20, 49-60.

colaboradores^{119a,120} que se basa en las siguientes etapas: (i) registro y tabulación de picos, (ii) agrupar resonancias en sistemas de espín, (iii) identificar aminoácidos en estos sistemas de espín, (iv) agrupar secuencias de sistemas de espín en segmentos, y (v) agrupar los segmentos de sistemas de espín en un mapa que represente la estructura.

Los diferentes programas de asignación automática de resonancias difieren en la metodología de construcción de este mapa. Algunos programas como MONTE¹²¹ y PASTA¹²² utilizan algoritmos del método Monte Carlo;¹²¹⁻¹²³ otros como el GARANT,¹²⁴ algoritmos genéticos; TATAPRO,¹²⁵ MAPPER,¹²⁶ y PACES,¹²⁷ algoritmos de búsqueda exhaustiva; por otro lado, CAMRA¹²⁸ hace comparaciones heurísticas con desplazamientos químicos de proteínas homólogas. También los métodos difieren en los datos experimentales utilizados en el análisis. Mientras casi todos los programas anteriores utilizan experiencias heteronucleares, otros como el GARANT¹²⁴ y el CAMRA¹²⁸ usan también datos de experiencias homonucleares.

¹²⁰ (a) M. Billeter, W. Braun y K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1982**, *155*, 321-346. (b) G. Wagner y K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1982**, *155*, 347-366.

¹²¹ J. A. Lukin, A. P. Gove, S. N. Talukdar y C. Ho, *J. Biomol. NMR* **1997**, *9*, 151-166.

¹²² M. Leutner, R. M. Gschwind, J. Liermann, C. Schwarz, G. Gemmecker y H. Kessler, *J. Biomol. NMR* **1998**, *11*, 31-43.

¹²³ N. E. Buchler, E. R. Zuiderweg, H. Wang y R. A. Goldstein, *J. Magn. Res.* **1997**, *125*, 34-42.

¹²⁴ (a) C. Bartels, M. Billeter, P. Güntert y K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR* **1996**, *7*, 207-213. (b) C. Bartels, P. Güntert, M. Billeter y K. Wüthrich, *J. Comp. Chem.* **1997**, *18*, 139-149.

¹²⁵ H. S. Atreya, S. C. Sahu, K. V. Chary y G. Govil, *J. Biomol. NMR* **2000**, *17*, 125-136.

¹²⁶ P. Güntert, M. Salzmann, D. Braun y K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 129-137.

¹²⁷ B. E. Coggins y P. Zhou, *J. Biomol. NMR* **2003**, *26*, 93-111.

¹²⁸ W. Gronwald, L. Willard, T. Jellard, R. F. Boyko, K. Rajarathnam, D. S. Wishart, F. D. Sonnichsen y B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1998**, *12*, 395-405.

3.3. Correlaciones en proteínas

En definitiva, aunque la asignación completa de resonancias pueda hacerse sin experiencias NOE, la técnica que hasta ahora nos permite deducir mejor el gran número de relaciones espaciales de la estructura de la proteína sigue estando basada en experiencias NOE. Consecuentemente, cualquier otra vía de acceso a distancias puede ser muy útil.

Una vía alternativa podría ser la que desarrollamos en esta Tesis que relaciona desplazamientos químicos y geometría. Los cambios en el desplazamiento químico de un determinado núcleo localizado en el mismo tipo de aminoácido en diferentes puntos de la proteína son debidos sin duda a diferencias en la estructura. Se han realizado diversos intentos para aprovechar las variaciones en los desplazamientos químicos respecto al *random coil* establecidos mediante varios métodos.^{50,129} Si los efectos conformacionales predominan sobre otros efectos ambientales es razonable la pretensión de correlacionar los desplazamientos químicos con ángulos diedros y distancias de la proteína. Recientemente se han desarrollado programas computacionales como el TALOS,¹³⁰ que buscan en las bases de datos uniones de residuos de aminoácidos adyacentes para predecir ángulos de unión. Los experimentos de RMN de triple resonancia muestran desplazamientos químicos en tres dimensiones de los que pueden extraerse cortes en 2D (por ejemplo ^1H - ^{13}C) para su análisis. Como resultado de todos estos experimentos, cada vez más datos de desplazamientos químicos pueden obtenerse de las bases que almacenan proteínas investigadas mediante RMN y rayos X.^{56,111} De estos datos experimentales y de los estudios computacionales

¹²⁹ (a) S. Schwarzinger, G. J. A. Kroon, T. R. Foss, J. Chung, P. E. Wright y H. J. Dyson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2970-2978. (b) A. Bundi y K. Wüthrich, *Biopolymers* **1979**, *18*, 285-297. (c) D. S. Wishart, B. D. Sykes y F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 311-333. (d) D. S. Wishart y B. D. Sykes, *Methods Enzymol.* **1994**, *239*, 363-392. (e) G. Merutka, H. J. Dyson y P. E. Wright, *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 14-24. (f) D. Braun, G. Wider y K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8466-8469.

¹³⁰ G. Cornilescu, F. Delaglio y A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 289-302.

complementarios se han establecido ciertas relaciones estructura-desplazamiento en proteínas. Aunque hasta la fecha estas correlaciones sólo sean útiles^{45a,46a,92c,113} en regiones concretas de la superficie de Ramachandran, sin duda son estimulantes en el objetivo de la resolución de la estructura de proteínas a partir de desplazamientos químicos.

Otra posible conexión del análisis estructural de las proteínas con nuestro trabajo es el software que se desarrolla actualmente para la validación de las asignaciones de resonancia. Existen métodos que utilizan desplazamientos químicos calculados sobre una estructura en 3D, para validar las asignaciones de los desplazamientos químicos.⁴⁹ En general, las últimas versiones de los programas diseñados para la elucidación automática de las estructuras de proteínas inciden cada vez más en los procesos de validación. Ello puede ser entendido como la demostración de una fuerte concordancia entre los datos esperables para la estructura de la proteína propuesta y los experimentales. En este esquema, en programas recientes como el AUREMOL¹³¹ es muy importante el proceso continuo e iterativo que se produce entre los espectros de RMN medidos y calculados, que en principio puede utilizar toda técnica que aporte información sobre la estructura de la proteína.

Este estudio parte de la hipótesis de que los desplazamientos químicos de elementos significativos contienen información de elementos de geometría como los ángulos diedros citados. En el capítulo 3.2 se ha demostrado este hecho para el caso del ángulo diedro ϕ en amidas sencillas. Como muestra la Figura 54 (página 123), en un péptido cada residuo C_α se encuentra insertado en la proteína entre dos enlaces peptídicos, y la estructura puede definirse mediante diversos ángulos diedros. Si queremos describir el comportamiento en ^1H -RMN de los protones CH_α de proteínas a

¹³¹ W. Gronwald y H. R. Kalbitzer, *Prog. NMR Spectrosc.* **2004**, *44*, 33-96.

3.3. Correlaciones en proteínas

partir de los datos proporcionados por amidas simples, debemos conocer también la influencia sobre el desplazamiento de los factores geométricos del ángulo ψ . Para ello, debemos empezar estudiando el comportamiento conformacional respecto al citado ángulo (Figura 56).

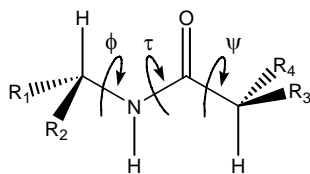


Figura 56. Ángulos de torsión ϕ , τ y ψ de amidas secundarias analizados en esta Tesis.

Para una molécula con tres ángulos de torsión (ϕ , τ y ψ), son posibles infinitud de estructuras que se reducen a ocho si sólo tenemos en cuenta las conformaciones extremas (Figura 57).

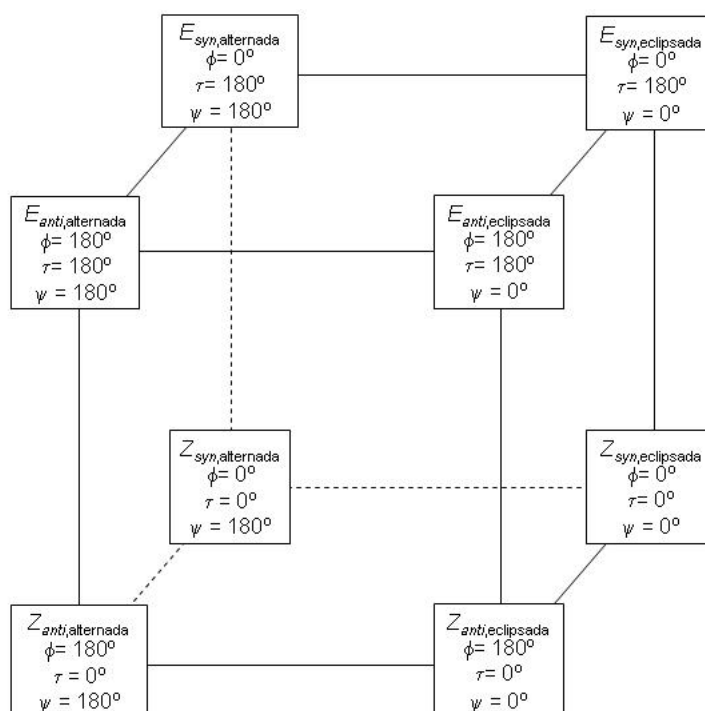


Figura 57. Espectro conformacional idealizado de amidas secundarias.

En los capítulos anteriores de esta Tesis hemos demostrado que las amidas alifáticas presentan estructuras *Z/E anti*. Excluyendo por claridad los conformeros *syn*, energéticamente desfavorecidos, e incorporando las conformaciones en torno al enlace NCO-CH₃, el espectro conformacional de la *N*-metilacetamida puede reducirse al que se representa en la Figura 58:

3.3. Correlaciones en proteínas

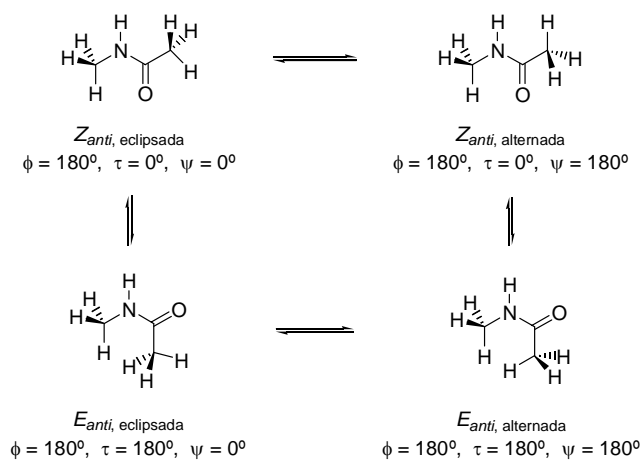


Figura 58. Conformaciones eclipsada y alternada de los isómeros *E* y *Z* de la *N*-metilacetamida *anti*.

La Tabla 27 resume los mínimos conformacionales respecto al ángulo diedro NCO–CH₃ observados mediante diferentes modelos químicos para las acetamidas **2** y **7-11**, según anticipamos en el capítulo anterior.

Tabla 27. Ángulos diedros ϕ y ψ para los mínimos conformacionales de las acetamidas **2** y **7-11**.

Método de cálculo	Isómero	ϕ	ψ	Isómero	ϕ	ψ
B3LYP/6-31G*		28,97	1,41		179,99	179,99
MP2/6-31G*	2 E	29,98	1,53	2 Z	176,32	159,45
MP2/6-31+G**		29,68	3,69		179,97	179,99
HF/6-31G**		18,61	2,25		24,60	158,14
B3LYP/6-31G*	7E_{anti}	163,00	1,62	7Z_{anti}	164,68	175,81
	8E_{syn}	15,85	17,23	8Z_{syn}	0,04	179,98
	8E_{anti}	167,38	0,68	8Z_{anti}	157,74	174,45
	9E_{syn}	24,19	17,13	9Z_{syn}	332,99	169,93
	9E_{anti}	142,26	4,03	9Z_{anti}	175,91	173,92
	10E_{anti}	191,11	1,63	10Z_{anti}	169,50	173,89
	11E_{syn}	30,00	11,23	11Z_{syn}	337,52	164,44
	11E_{anti}	217,24	6,63	11Z_{anti}	175,62	167,39

Como puede apreciarse, en todas las acetamidas estudiadas e independientemente del modelo DFT o *ab initio*, los cálculos siempre predicen para los isómeros *E* ángulos ψ próximos a la conformación eclipsada ($E_{anti,eclipsada}$), y para los *Z* a la alternada ($Z_{anti,alternada}$).

En una publicación reciente Wiberg estudia mediante cálculos MP2/6-311+G** la rotación de los metilos de una serie de amidas y tioamidas, observando también en la *N*-metilacetamida la preferencia por una conformación alternada en el isómero *Z* y eclipsada en el *E* para el enlace NCO–CH (Figura 59).¹⁴ No obstante, como se comentó en el capítulo anterior, la predicción de este modelo para el enlace CON–CH es la *syn* en ambos casos (conformaciones $E_{syn,eclipsada}$ y $Z_{syn,alternada}$).

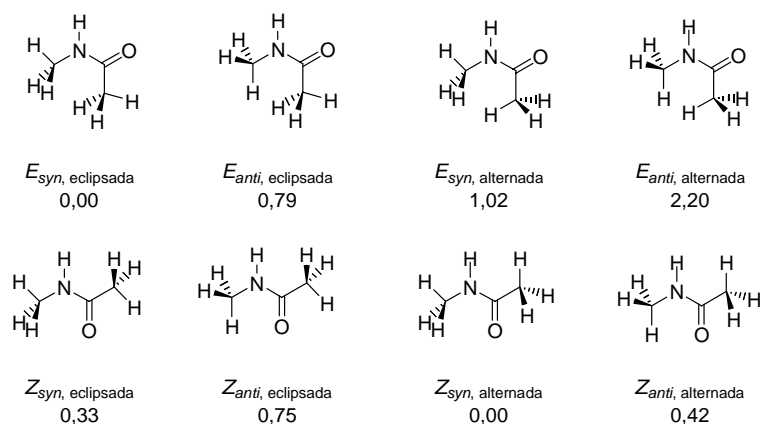


Figura 59. Puntos estacionarios y energías relativas (kcal/mol) para cada isómero *E/Z* encontrados por Wiberg y Rush para la *N*-metilacetamida.

Este resultado coincide también con otros estudios *ab initio* clásicos comentados ya como el de Jorgensen y Gao,^{7a} y el de Guo y Karplus.⁶⁰ En cambio, Itai en cálculos HF/4-31G y 6-31-G* encuentra como más estables para ambos isómeros *Z* y *E* la

3.3. Correlaciones en proteínas

conformación *syn* pero en una disposición eclipsada entre el oxígeno carbonílico y el hidrógeno del metilo NCO–CH ($Z/E_{syn,eclipsada}$).^{7c}

También es necesario volver a mencionar aquí la serie de trabajos de Krimm y colaboradores, que analizan espectros vibracionales de amidas y pequeños péptidos sobre estructuras *ab initio* calculadas a distintos niveles (HF/6-31G* entre otros),⁸ que predicen para la *N*-metilacetamida que su estructura *cis* más estable muestra “*un H de C-metilo eclipsando el O y un H de N-metilo eclipsando el NH*”, (que en la nomenclatura adoptada por nosotros sería $E_{syn,eclipsada}$) y que su estructura más estable *trans* muestra también este eclipsamiento ($Z_{syn,eclipsada}$).^{8c,e} Cálculos *ab initio* posteriores de estos autores muestran como estructura más estable la *trans*-N_cC_t,^{8f} en una terminología que indica que los hidrógenos NH–CH son *cis* y el oxígeno carbonílico con el hidrógeno CO–CH *trans* ($Z_{syn,alternada}$). En el estudio de Nandini y Sathyanarayana de espectroscopia vibracional IR y Raman de la *N*-metilacetamida a partir de cálculos *ab initio* a nivel HF/6-31+G*, la conformación más estable para el isómero *Z* es la *syn* alternada, y para el *E* la *syn* eclipsada.¹⁰ Por otra parte, estudios como el de Tasumi⁹ y Kubelka y Keiderling⁶⁶ sobre el efecto de las interacciones por puentes de hidrógeno sobre las frecuencias vibracionales de las bandas I y II de amida en IR que toman como modelo la *N*-metilacetamida, o no detallan claramente la conformación de los metilos⁹ o sugieren conformaciones preferentes $Z_{syn,alternadas}$.

Algunos autores analizan amidas con restos acílicos diferentes al de acetilo. Así, Tasaki y Suter estudian la barrera rotacional del enlace Me₂CH–CO de la isobutiramida mediante el modelo HF/4-31G* encontrando la conformación *anti* entre el protón y el oxígeno como conformación más estable.¹³² Esta misma disposición ha sido encontrada también por Riguera y col. en Boc-fenilglicina y estructuras análogas mediante cálculos

¹³² K. Tasaki y U. W. Suter, *J. Phys. Chem.* **1988**, 92, 5886-5891.

AM1.¹³³ Por otra parte, Wiberg y col. estudian la acetamida a altos niveles *ab initio* con correlación electrónica como MP2/6-311++G** y CISD (ver apéndice A), encontrando una conformación de mínima energía en la que un enlace C–H del metilo se encuentra casi perpendicular al plano de amida ($H_1-C-C=O = 29,8^\circ$; $H_2-C-C=O = 151,6^\circ$; $H_3-C-C=O = -88,0^\circ$) y el grupo amino ligeramente piramidalizado.¹³⁴ Esta conformación es próxima a la que muestra la acetamida por difracción de rayos X en el cristal.

De lo expuesto hemos de concluir que, de forma similar a como hemos demostrado para el caso del enlace CON–CH en los capítulos anteriores, los antecedentes en cuanto a las preferencias conformacionales en torno al enlace NCO–CH son confusos, al menos en lo que a la *N*-metilacetamida se refiere, y es necesario clarificar el comportamiento conformacional de amidas en torno a este enlace previamente a cualquier intento de correlacionar este motivo geométrico con el desplazamiento de los protones en el carbono α al grupo carbonilo.

En resumen, existen evidencias de que los desplazamientos químicos isotrópicos (por ejemplo de $^1H_\alpha$, $^1H_\beta$, $^{13}C_\alpha$, $^{13}C_\beta$) son relacionables con la estructura secundaria de proteínas.^{92a,92i,135} También se ha observado experimentalmente¹³⁶ y calculado mediante química cuántica¹³⁷ una dependencia entre la conformación y la anisotropía química. Pero en cuanto a la incidencia del enlace NCO–CH, que es la que analizaremos en este

¹³³ J. M. Seco, E. Quiñoá y R. Riguera, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4669-4675.

¹³⁴ M. W. Wong y K. B. Wiberg, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 668-671.

¹³⁵ (a) D. S. Wishart, C. G. Bigam, A. Holm, R. S. Hodges y B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 67-81. (b) M. Iwadate, T. Asakura y M. P. Williamson, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 199-211.

¹³⁶ N. Tjandra y A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9576-9577.

¹³⁷ (a) R. H. Havlin, H. Le, D. D. Laws, A. C. de Dios y E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11951-11958. (b) N. Asakawa, H. Kurosu, I. Ando, A. Shoji y T. Ozaki, *J. Mol. Struct.* **1994**, *317*, 119-129. (c) D. A. Case, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 624-630.

3.3. Correlaciones en proteínas

capítulo, nos parece necesario destacar en este punto el estudio en el que Ösapay y Case analizan los desplazamientos químicos de protones de 17 proteínas para las que su estructura ha sido determinada mediante rayos X en el cristal, calculando la anisotropía magnética provocada por el enlace peptídico en CH_α .^{16d} Como se observa en la Figura 60, la contribución del ángulo $[\phi]$ es marcadamente más fuerte que la de $[\psi]$.

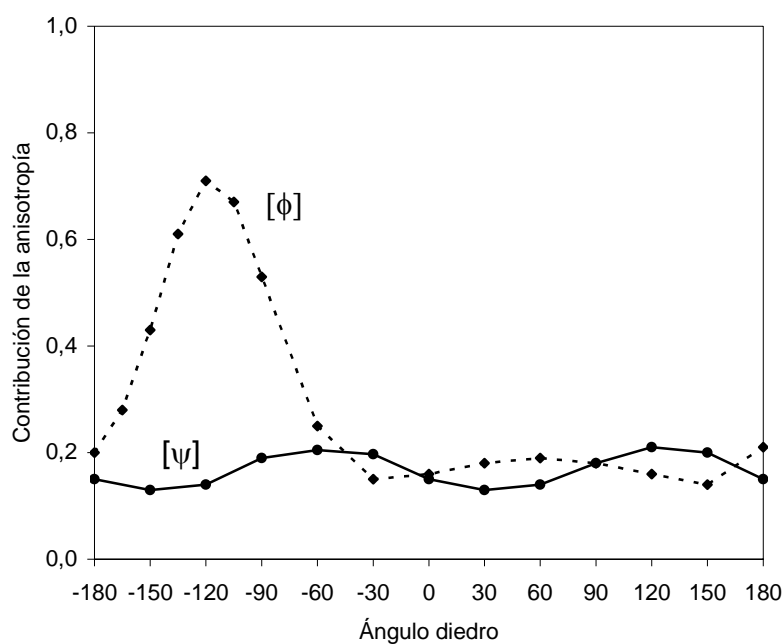


Figura 60. Contribuciones de la anisotropía al desplazamiento del protón CH_α calculadas por Ösapay y Case al variar los ángulos diedros $[\phi]$ y $[\psi]$.^{16d}

3.3.1. Resultados y discusión.

3.3.1.1. Estudio teórico de la preferencia conformacional en torno al sustituyente acílico de amidas secundarias.

Tras la elección del conjunto de amidas secundarias **2**, **7-11** y **31-39** (Figura 61) como modelo representativo de las sustituciones en el grupo acilo, comenzamos este trabajo calculando su espectro conformacional en torno al enlace $\text{NCO}-\text{CH}_\alpha$ directamente a nivel B3LYP/6-31G*. Como hemos podido comprobar en los capítulos anteriores, y de acuerdo con lo que han sugerido Wiberg y otros,^{51a,c-d,138} el uso de métodos que incluyen correlación electrónica y funciones difusas parece ser importante en la representación de pares de electrones libres y estructuras deslocalizadas.

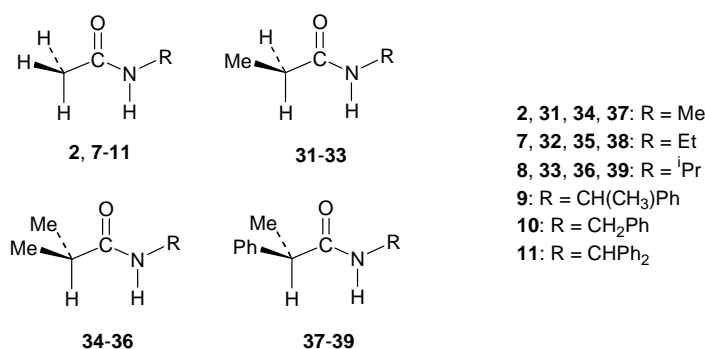


Figura 61. Acetamidas **2** y **7-11**, propionamidas **31-33**, isobutiramidas **34-36** y 2-fenilpropionamidas **37-39** utilizadas en este estudio.

Como muestra la Figura 62, para realizar este estudio se partió de la situación de eclipsamiento en el ángulo diedro $\text{O}=\text{C}-\text{C}-\text{H}$ ($\psi = 0^\circ$) y se giró en periodos regulares

¹³⁸ A. Greenberg, T. D. Thomas, C. R. Bevilacqua, M. Coville, D. Ji, J.-C. Tsai y G. Wu, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 7093-7099.

3.3. Correlaciones en proteínas

según el tipo de sustitución de cada amida. Para cada punto, se fijó el diedro indicado y se liberó el resto de los parámetros, calculando la energía de cada estructura resultante. Los mínimos locales y absolutos observados se optimizaron después completamente liberando todos sus parámetros y se comprobó su carácter de estructuras de mínima energía mediante cálculos de frecuencias, que en ningún caso resultaron ser imaginarias. Además, los datos energéticos recogidos en las tablas incluyen siempre corrección del punto cero.¹³⁹

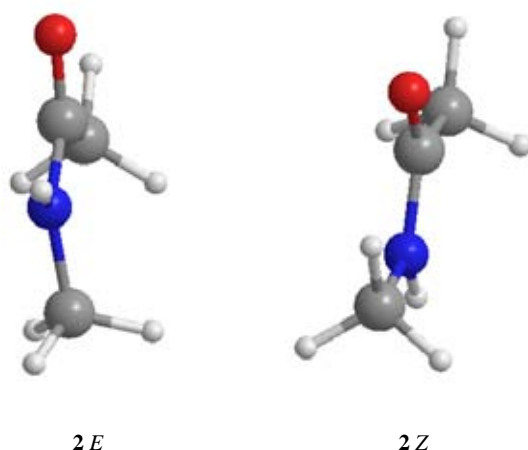


Figura 62. Estructuras de partida en el análisis conformacional de **2**.

Las amidas **2** y **7** representan bien el conjunto de las acetamidas **2** y **7-11**, que portan tres protones sobre el C_{α} al carbonilo. La Figura 63 muestra la *N*-metilacetamida **2**, en la que un giro entre 0 y 60° es suficiente para definir su estudio conformacional.

¹³⁹ La energía del punto cero es una corrección a la energía electrónica de la molécula, para considerar los efectos de las vibraciones moleculares que persisten incluso a 0 K. Para establecer una comparación adecuada entre estructuras, se le ha de sumar a cada una su energía en el punto cero.

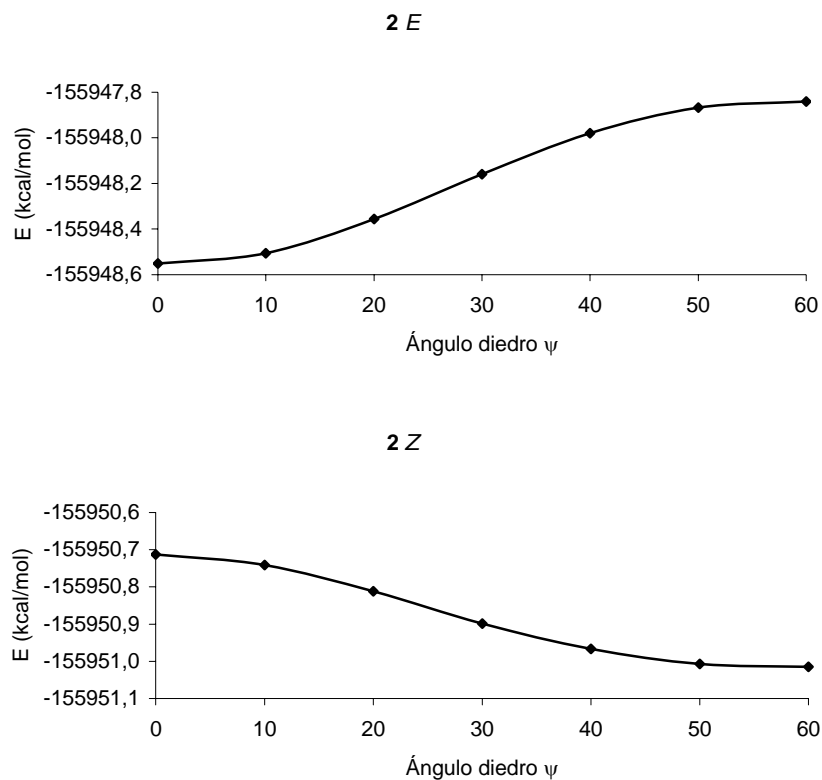


Figura 63. Variación de la energía frente al ángulo de torsión ψ de los isómeros *E/Z* de la *N*-metilacetamida a nivel B3LYP/6-31G*.

Para el resto de las acetamidas **7-11**, teniendo en cuenta la falta de simetría provocada por los sustituyentes en N-C α , estimamos necesario calcular el rango 0-120° para observar su análisis conformacional completo. Como ejemplo mostramos las estructuras *E* y *Z* de la *N*-etilacetamida (**7**) (Figura 64). Los gráficos correspondientes a los cálculos para otras estructuras de las acetamidas se incluyen en el apéndice B.

3.3. Correlaciones en proteínas

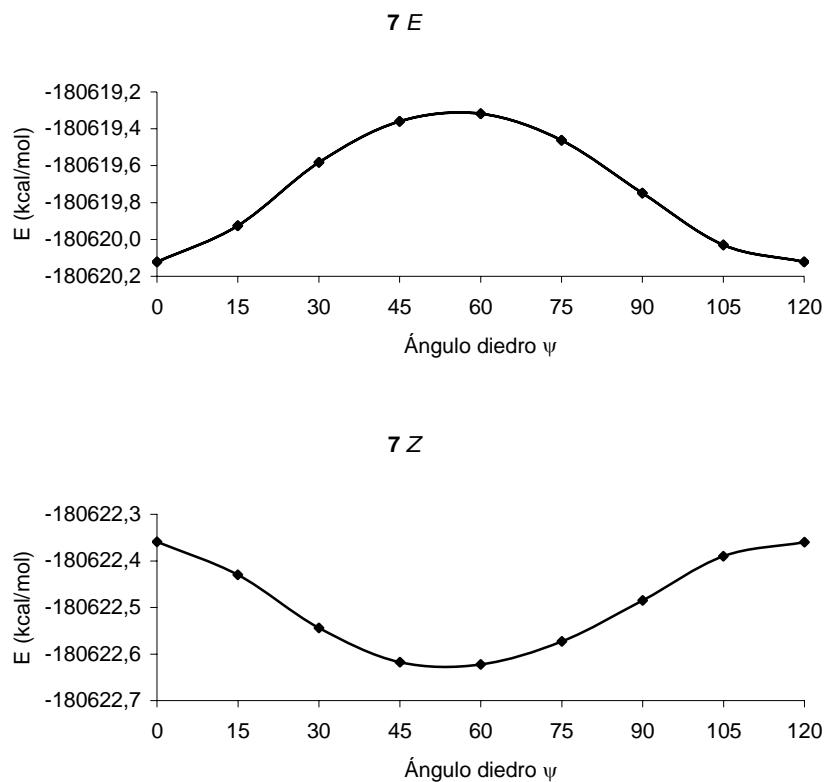


Figura 64. Variación de la energía frente al ángulo de torsión ψ de los isómeros *E/Z* de la *N*-etilacetamida a nivel B3LYP/6-31G*.

La Figura 65 muestra las estructuras de mínima energía encontradas para ambos isómeros de las acetamidas **2** y **7**.

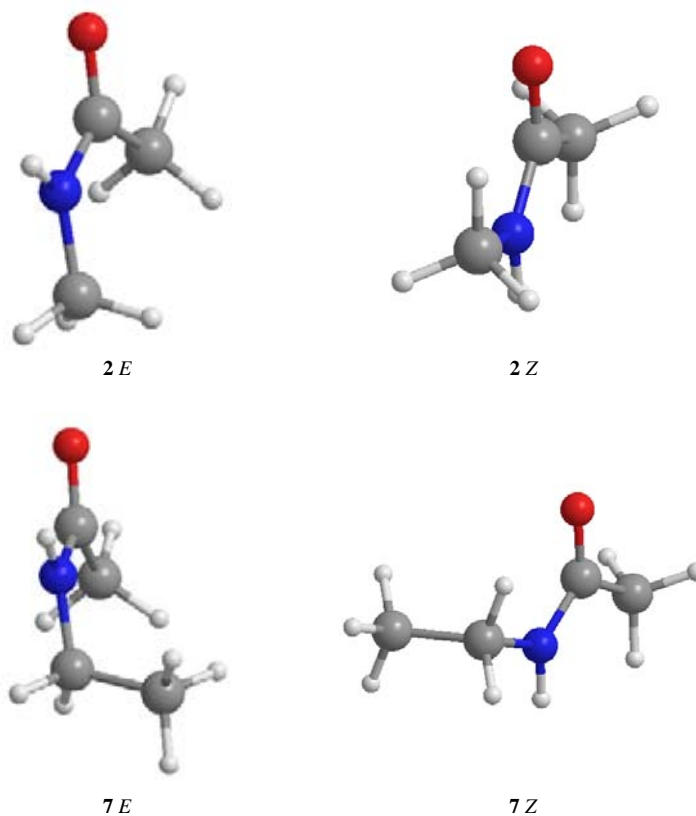


Figura 65. Estructuras de mínima energía de los isómeros *E* y *Z* de las acetamidas **2** y **7** a nivel B3LYP/6-31G*.

En ambos casos, mientras que para el isómero *E* el mínimo conformacional se corresponde con la conformación eclipsada ($\psi \sim 0^\circ$), el *Z*, contrariamente, presenta un mínimo, que resulta ser el mínimo absoluto, y que se encuentra en conformación alternada ($\psi \sim 60^\circ$). Como quiera que estas conformaciones son de referencia habitual a lo largo del capítulo, en adelante nos referiremos a protones o sustituyentes situados en ellas como *syn*, *anti* o *gauche* respecto al oxígeno carbonílico, como se muestra en la Figura 66.

3.3. Correlaciones en proteínas

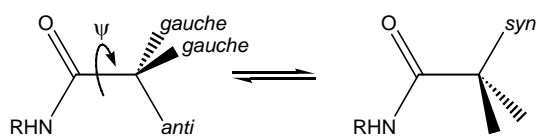


Figura 66. Protones *anti*, *syn* y *gauche* en las conformaciones alternada ($\psi = 180^\circ$) y eclipsada ($\psi = 0^\circ$).

La Tabla 28 muestra los ángulos de torsión y las diferencias de energía de los mínimos encontrados para estas acetamidas. Como se anticipó en la Tabla 27, a la que se llegó al estudiar el ángulo diedro ϕ , las estructuras *Z* muestran conformaciones próximas a la conformación *anti* respecto a dicho diedro ϕ , y mínimos cercanos a la disposición alternada en torno al diedro ψ (situando siempre un protón con valores para este ángulo *anti* entre 174,14 y 186,28°). En cambio, las estructuras *E* presentan respecto a ϕ una preponderancia menos acusada de la conformación *anti* a nivel B3LYP/6-31G*, lo que es más evidente en el caso de **2**. También aquí, a diferencia de las estructuras *Z*, la conformación respecto al diedro ψ es claramente eclipsada (en la que un protón es *syn*, $\psi = 353,43$ - $3,98^\circ$). Para todas las acetamidas, las estructuras *Z_{anti,alternadas}* son los mínimos absolutos del sistema (1,94-3,16 kcal/mol más estables que los isómeros *E* alternativos).

Tabla 28. Ángulos de torsión ($^\circ$) y diferencias de energía (kcal/mol) B3LYP/6-31G* para las acetamidas **2** y **7-11**.

Isómero	ϕ	τ	ψ	Isómero	ϕ	τ	ψ	ΔE (<i>E-Z</i>)
2 E	29,10*	188,88	1,41	2 Z	180,10	359,95	180,02	2,48
7 E	197,00	170,80	358,51	7 Z	164,61	4,37	176,22	2,67
8 E	167,41	188,65	0,72	8 Z	202,19	355,98	184,83	2,76
9 E	142,39	184,33	3,98	9 Z	175,94	4,52	174,14	1,94
10 E	191,25	171,54	0,00	10 Z	190,55	355,38	185,39	3,16
11 E	217,22	178,59	353,43	11 Z	174,93	351,87	186,28	2,42

* El diedro ϕ es 147,13° y 268,95° para H-2 y H-3.

Se hizo un estudio similar para las propionamidas **31-33**, que portan dos protones en CO-C α . Para la *N*-metilpropionamida (**31**) se consigue el espectro conformacional completo haciendo que el metilo en β al carbonilo pase de la posición eclipsada con el oxígeno carbonílico hasta 180°, lo que referido a uno de los protones (ver Figura 67) se corresponde con el rango 240-60°, en el cual se realizaron cálculos cada 15°.

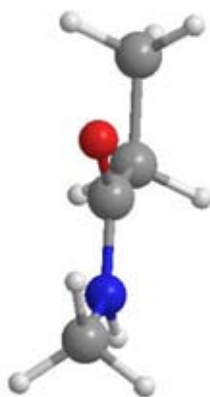


Figura 67. Estructura de partida para el cálculo de la *Z-N*-metilpropionamida (**31**).

La Figura 68 muestra el análisis conformacional obtenido para esta amida en torno al diedro ψ , que se ha calculado fijando ángulos de torsión para el diedro O=C-C α -C β en cada paso.

3.3. Correlaciones en proteínas

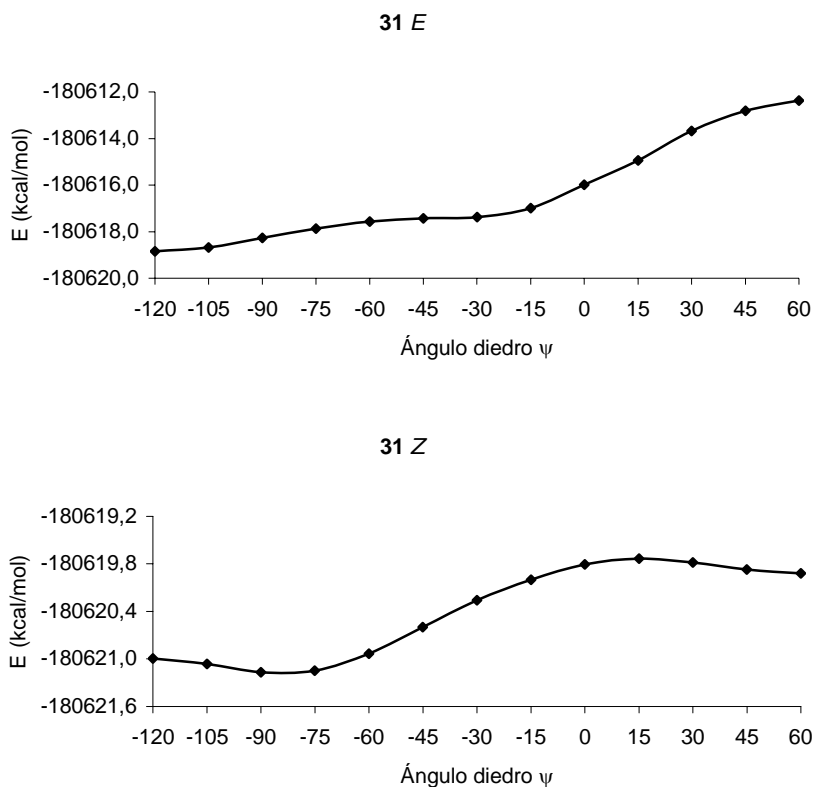


Figura 68. Variación de la energía frente a ψ de la *E*- y *Z*-*N*-metilpropionamida a nivel B3LYP/6-31G*.

El análisis conformacional de la *N*-etil y la *N*-isopropilpropionamida, **32** y **33** respectivamente, requirió una evaluación entre 0 y 360°, que se realizó en periodos de 30°. Ambas amidas muestran perfiles energéticos similares, por lo que sólo incluimos en la Figura 69 el correspondiente a **32**.

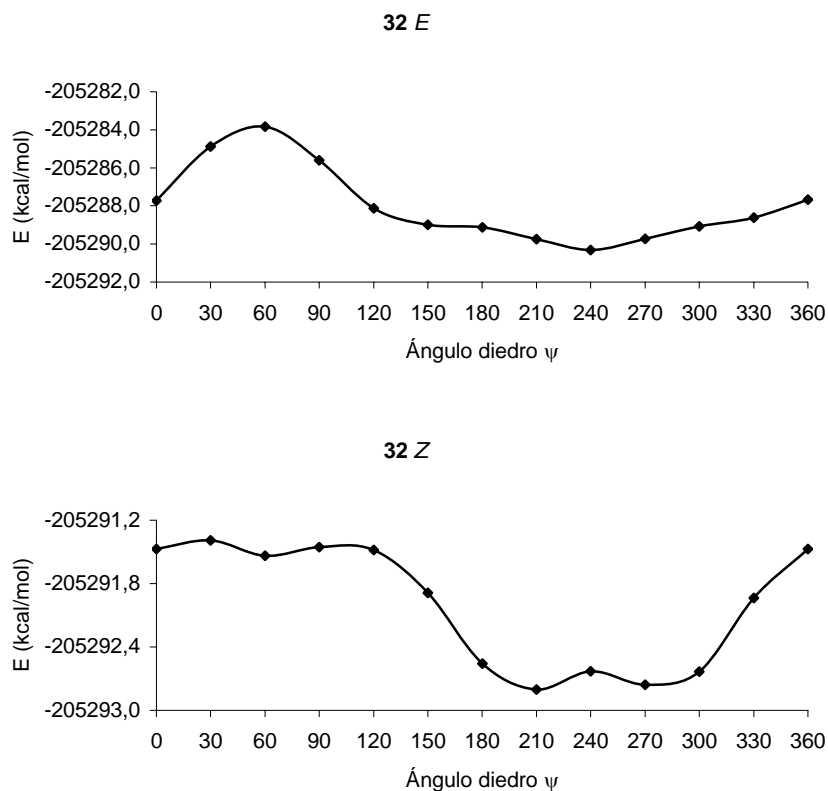


Figura 69. Variación de la energía frente a ψ de la *E*- y *Z*-*N*-etilpropionamida a nivel B3LYP/6-31G*.

La Tabla 29 permite observar los diedros y datos energéticos que presentan las estructuras de mínima energía de las tres propionamidas estudiadas. Como ocurriera en las acetamidas, las propionamidas presentan también como mínimo absoluto la estructura $Z_{anti,alternada}$ con una conformación respecto al ángulo ψ en la que uno de los protones se encuentra próximo a una disposición *anti* ($\psi = 160,33-201,36^\circ$). En cuanto a los isómeros *E*, la conformación preferente respecto al diedro ψ sigue presentando un eclipsamiento respecto al carbonilo, pero es el grupo metilo el que ocupa esta posición (ψ es aproximadamente 123 y 238° para ambos protones). Curiosamente, de forma

3.3. Correlaciones en proteínas

similar a como se ha discutido para la *N*-metilacetamida, también la *N*-metilpropionamida (**31**) presenta para el isómero *E* un ángulo de torsión ϕ más próximo a una conformación *syn* ($\phi = 21,34^\circ$) que a la *anti* encontrada para el resto de las propionamidas de este conjunto. En cuanto a los datos energéticos, los estereoisómeros *Z* son también más estables que los *E* alternativos en un rango que oscila entre 2,24 y 2,61 kcal/mol.

Tabla 29. Ángulos de torsión ($^\circ$) y diferencias de energía (kcal/mol) B3LYP/6-31G* para las propionamidas **31-33**.

Isómero	ϕ	τ	ψ	Isómero	ϕ	τ	ψ	ΔE (<i>E-Z</i>)
31 E	21,34	187,15	123,95 y 238,51*	31 Z	178,83	1,73	160,33 y 275,96*	2,24
32 E	162,12	189,06	123,881 y 238,91*	32 Z	196,84	354,20	201,36 y 85,76*	2,54
33 E	166,07	188,98	122,684 y 237,73*	33 Z	160,00	4,94	160,67 y 276,39*	2,61

* Referidos a los dos protones CO-CH₂-.

La Figura 70 muestra como ejemplo los mínimos conformacionales encontrados para los isómeros *Z/E* de la *N*-etilpropionamida (**32**).

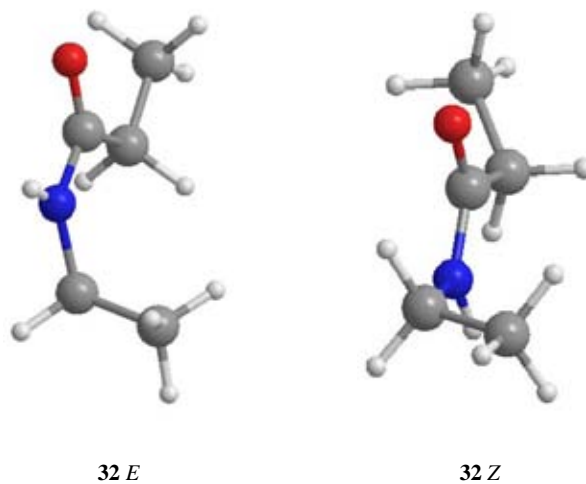


Figura 70. Estructuras de mínima energía encontradas para la *E*- y *Z*-*N*-etilpropionamida (**32**).

En tercer lugar, estudiamos dos conjuntos de amidas con un solo protón en C_{α} , como son las isobutiramidas **34-36** y las 2-fenilpropionamidas **37-39**, para reproducir así los efectos causados por sustituyentes alquílicos y aromáticos en el grupo acilo. En el caso de la *N*-metilisobutiramida (**34**), debido a su simetría, se pudo reducir su estudio al intervalo de $\psi = 0-180^{\circ}$, en el que los cálculos en torno al enlace $NCO-CH_{\alpha}$ se realizaron cada 30° (Figura 71).

3.3. Correlaciones en proteínas

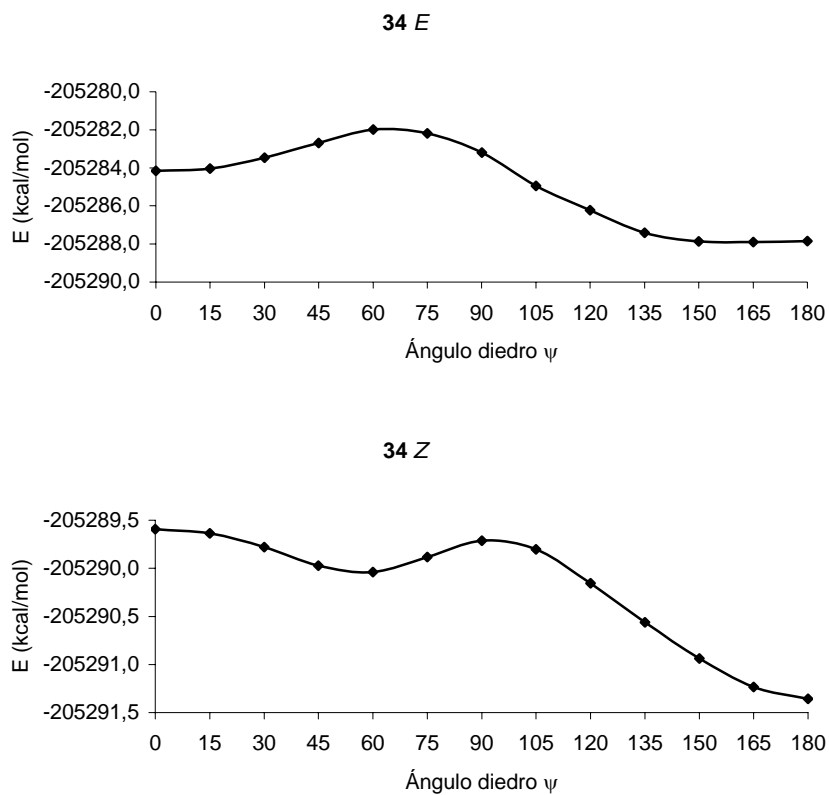


Figura 71. Variación de la energía frente a ψ de la *E*- y *Z*-*N*-metilisobutiramida a nivel B3LYP/6-31G*.

La *N*-etil y *N*-isopropilisobutiramida (**35** y **36**) muestran gráficos similares, por lo que la Figura 72 recoge como ejemplo el caso de **35**. El análisis conformacional en torno al ángulo ψ se realizó en el rango de 0 a 360° a intervalos de 30°.

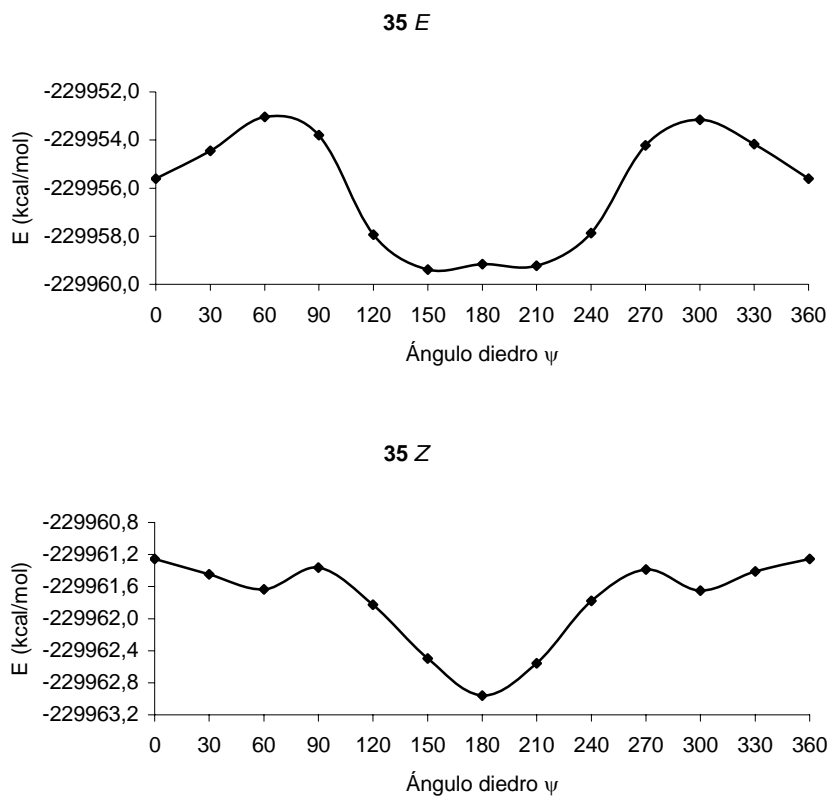


Figura 72. Variación de la energía frente a ψ de la *E*- y *Z*-*N*-etilisobutiramida a nivel B3LYP/6-31G*.

También las dos 2-fenilpropionamidas estudiadas (**37-39**) muestran un comportamiento similar en su análisis en torno al diedro ψ . La Figura 73 muestra como ejemplo la *N*-metil-2-fenilpropionamida (**37**):

3.3. Correlaciones en proteínas

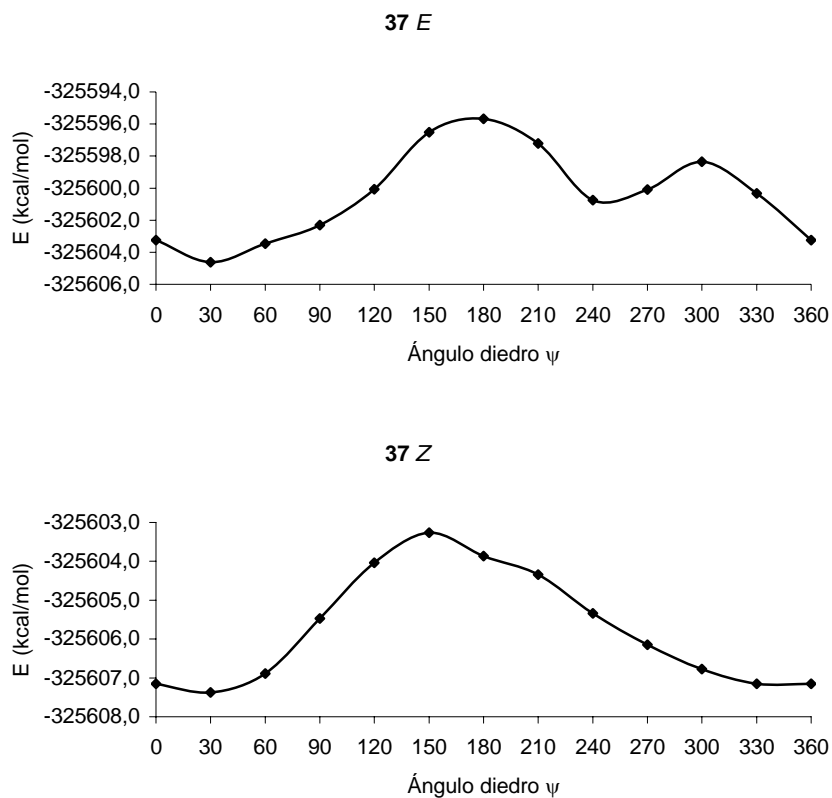


Figura 73. Variación de la energía frente a ψ de la *E*- y *Z*-*N*-metil-2-fenilpropionamida a nivel B3LYP/6-31G*.

En la Tabla 30 mostramos los ángulos de torsión y las diferencias de energía de los mínimos obtenidos para las amidas **34-39**. Respecto a los ángulos diedros ϕ , mientras los isómeros *Z* muestran en todos los casos la conformación *anti* como la más estable, para las estructuras *E* que tienen metilo (**34** y **37**) y etilo (**35** y **38**) como sustituyentes en el nitrógeno, los cálculos en fase gaseosa predicen en torno a ϕ una conformación de mínima energía *syn* o intermedia entre *syn* y *anti* ($\phi = 348-39^\circ$). Alternativamente, las amidas con un solo protón en CON-C α como las *N*-isopropilamidas **36** y **39** muestran este protón cercano a la disposición *anti*. En cuanto

al ángulo diedro ψ , que es el de más interés en este estudio, el único protón sobre NCO- C_α se dispone en **34-39** en una conformación próxima a la *anti* respecto al grupo carbonilo tanto en los isómeros *Z* como en los *E*. En esta conformación alternada, los sustituyentes voluminosos adoptan disposiciones *gauche* respecto al carbonilo. En cuanto a la estabilidad relativa de las estructuras, las diferencias energéticas entre mínimos *E* y *Z* oscilan entre 2,87 y 3,75 kcal/mol.

Tabla 30. Ángulos de torsión ($^\circ$) y diferencias de energía (kcal/mol) B3LYP/6-31G* para las amidas **34-39**.

Isómero	ϕ	τ	ψ	Isómero	ϕ	τ	ψ	$\Delta E (E-Z)$
34 E	348,07	177,20	203,12	34 Z	180,01	0,00	180,82	3,47
35 E	153,308 y 38,901*	185,08	158,08	35 Z	195,63	355,97	180,71	3,70
36 E	158,91	187,46	152,87	36 Z	155,57	3,51	179,90	3,75
37 E	7,72	177,64	148,10	37 Z	177,04	5,29	153,84	2,87
38 E	151,053 y 36,799*	179,06	148,19	38 Z	165,34	7,36	154,77	3,20
39 E	155,90	178,64	147,04	39 Z	162,26	6,93	154,75	3,25

* Referidos a los dos protones N-CH₂-.

Como conclusión a este apartado, se ha encontrado a nivel B3LYP/6-31G* en fase gaseosa que los isómeros *Z* de amidas secundarias presentan, independientemente de su sustitución en el grupo acilo, una conformación *anti* respecto al diedro ϕ (160,00-202,19 $^\circ$) y alternada en torno a ψ (153,84-201,36 $^\circ$) en la que un protón ocupa siempre la disposición *anti* respecto al carbonilo (Figura 74). A esta estructura la hemos denominado *Z_{anti,alternada}*.

3.3. Correlaciones en proteínas

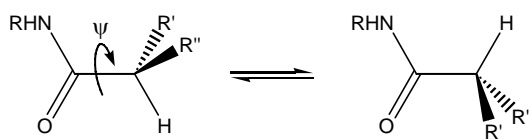


Figura 74. Conformaciones eclipsada ($\psi \sim 0^\circ$) y alternada ($\psi \sim 180^\circ$) en torno al ángulo diedro $O=C-C-H$.

En cambio, en los isómeros *E*, probablemente debido al impedimento estérico entre el grupo acilo y el sustituyente sobre el nitrógeno, que se encuentran en este isómero geoméricamente más próximos que en el *Z*, se fuerzan otras opciones conformacionales en ambos diedros. Así, respecto a ϕ hemos encontrado como más estables las conformaciones *syn* o las intermedias entre *syn* y *anti* en las *N*-metilamidas **2**, **31**, **34** y **37**, pero con otros sustituyentes alquílicos se opta por conformaciones *anti* ($H-N-C-H$) en la que los grupos más voluminosos en $N-C_\alpha$ se disponen en *gauche* al oxígeno carbonílico. Respecto al diedro ψ , en las acetamidas y alquilamidas con tres y dos protones en $NCO-C_\alpha$ se prefieren conformaciones eclipsadas en las que, respectivamente, un protón alquílico o el resto alquílico voluminoso ocupa la disposición *syn* al carbonilo. Alternativamente, en las carboxamidas con un único protón en C_α al carbonilo se prefiere una conformación alternada en la que el protón adopta la disposición *anti* al carbonilo y los grupos voluminosos la *gauche*. En todos los casos, la conformación $Z_{anti,alternada}$ es el mínimo absoluto del sistema, siendo más estable en el rango de 1,94-3,75 kcal/mol que los correspondientes mínimos locales *E* alternativos.

3.3.1.2. Correlaciones de RMN en el sustituyente acílico de amidas secundarias.

Una vez que en el capítulo anterior se han obtenido correlaciones en torno al ángulo diedro ϕ (enlace CON-CH $_{\alpha}$) aplicables tanto a amidas como a proteínas (ver más adelante), en este apartado pretendemos desarrollar una ecuación relativa al ángulo diedro ψ (enlace NCO-CH $_{\alpha}$) que relacione los datos estructurales que predicen los cálculos (B3LYP/6-31G*) con los desplazamientos químicos experimentales. Para ello, se registraron los espectros de ^1H -RMN de las amidas **2**, **7-11**, **31-39** y se repitió el proceso ya explicado en los apartados 3.1.1.2 y 3.2.1.2. En el apartado anterior se han evidenciado las preferencias conformacionales de los isómeros *Z/E* de carboxamidas diferentemente sustituidas en el resto acílico. Sin embargo, como las carboxamidas secundarias muestran en sus espectros de RMN en disolución únicamente el isómero *Z* (ver capítulo anterior), sólo podemos utilizar los desplazamientos químicos de éstos en el estudio. Las formamidas, con un protón como sustituyente acílico, no son obviamente modelos útiles. La *N*-metilacetamida muestra una pequeña proporción de isómero *E*. Para otras acetamidas hemos identificado también en este trabajo lo que pueden ser ligeras poblaciones de isómero *E*. Sin embargo, a falta de datos de desplazamiento de protones individuales en este isómero, la investigación de la ecuación se hace sólo a partir de los desplazamientos de las estructuras *Z*. Para este isómero, la estructura predicha por los cálculos es la *anti* respecto al diedro H-C-N-H ($\phi \sim 180^\circ$) y alternada respecto a O=C-C-H ($\psi \sim 180^\circ$).

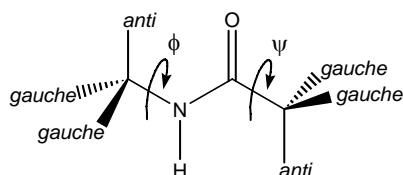


Figura 75. Disposiciones de protones *anti* y *gauche* en la estructura $Z_{anti,alternada}$.

3.3. Correlaciones en proteínas

Aplicando a los protones en NCO-CH_α la ecuación aditiva de Shoolery⁸¹ utilizada anteriormente,

$$\delta_{\text{CHXYZ}} = 0,23 + \sigma_x + \sigma_y + \sigma_z \quad [8]$$

puede calcularse el desapantallamiento provocado por la función amida en estos protones situados en el resto acílico, al que llamamos σ'_{amida} para distinguirlo del ya calculado en el extremo CON-CH_α.

$$\sigma'_{\text{amida}} = \delta_{\text{obs}} - (0,23 + \sigma_x + \sigma_y) \quad [9]$$

Nuevamente, consideramos que en amidas con más de un protón en C_α el desapantallamiento es una magnitud promediada, ya que estos átomos de hidrógeno *anti* y *gauche* sobre el C_α se interconvierten rápidamente a temperatura ambiente por giro en el enlace NCO-CH_α.

$$\sigma'_{\text{amida}} = \frac{\sigma'_{\text{anti}}}{n} + (n-1) \frac{\sigma'_{\text{gauche}}}{n} \quad [10]$$

En la ecuación [10] n es el número de protones en C_α. Como se ha anticipado (Figura 75), las disposiciones *anti* y *gauche* se refieren a disposiciones respecto al oxígeno carbonílico.

De acuerdo con las predicciones de los cálculos, asumimos que en amidas con un único protón en C_α, como ocurre en **34-39**, éste adopta la conformación preferente *anti*. La ecuación [9] nos permite calcular su σ'_{amida} , ya que en estas amidas $\sigma'_{\text{amida}} =$

σ'_{anti} . A partir de este valor, es posible calcular en las amidas **2**, **7-11** y **31-33** el valor de σ'_{gauche} mediante la ecuación [10]. La Tabla 31 resume el resultado de estos cálculos para el disolvente $CDCl_3$.

Tabla 31. Desapantallamientos (ppm) en protones $NCO-CH_\alpha$ para **2**, **7-11** y **31-39** en $CDCl_3$.

Compuesto	$\delta_{observado}$	x, y	σ'_{amida}	σ'_{anti}	σ'_{gauche}	$\sigma'_{anti} - \sigma'_{gauche}$
2	1,99	(H, H)	1,08	0,76	1,24	-0,48
7	1,97	(H, H)	1,06	0,76	1,21	-0,45
8	1,95	(H, H)	1,04	0,76	1,18	-0,42
9	2,02	(H, H)	1,11	0,76	1,29	-0,53
10	2,03	(H, H)	1,12	0,76	1,30	-0,54
11	2,07	(H, H)	1,16	0,76	1,36	-0,60
31	2,22	(H, Me)	0,97	0,76	1,18	-0,42
32	2,19	(H, Me)	0,94	0,76	1,12	-0,36
33	2,16	(H, Me)	0,91	0,76	1,06	-0,30
34	2,36	(Me, Me)	0,77	0,77*		
35	2,33	(Me, Me)	0,74	0,74*		
36	2,29	(Me, Me)	0,70	0,70*		
37	3,55	(Me, Ph)	0,81	0,81*		
38	3,53	(Me, Ph)	0,79	0,79*		
39	3,50	(Me, Ph)	0,76	0,76*		
Promedio \pm SD				0,76 \pm 0,02	1,22 \pm 0,09	-0,46 \pm 0,09

* Valores tomados para realizar el promedio. SD: desviación estándar.

Como puede observarse, en este disolvente el desapantallamiento promedio provocado por la función amida en los protones situados en las disposiciones *anti* y *gauche* es de 0,76 y 1,22 ppm, respectivamente, con pequeñas desviaciones estándar (0,02 y 0,09 ppm). A su vez, la diferencia de desplazamientos entre protones situados en

3.3. Correlaciones en proteínas

estas posiciones ($\sigma'_{anti} - \sigma'_{gauche}$) es en promedio de sólo -0,46 ppm, con una desviación estándar de 0,09 ppm. Claramente los desapantallamientos promedio provocados por la función amida en los protones *anti* y *gauche* del resto acílico son marcadamente inferiores a los observados en estas disposiciones respecto al NH (fragmento CON-CH $_{\alpha}$), que se calcularon en 2,42 y 1,64 ppm respectivamente. También la anisotropía magnética en el resto acílico (NCO-CH $_{\alpha}$) es sensiblemente inferior que en los sustituyentes en el nitrógeno (CON-CH $_{\alpha}$), como muestra la menor diferencia de desplazamiento en el primero respecto al último ($\sigma_{anti} - \sigma_{gauche} = 0,78$ ppm).

Tabla 32. Desapantallamientos (ppm) en protones NCO-CH $_{\alpha}$ para **2, 7-11** y **31-39** en DMSO- d_6 .

Compuesto	$\delta_{observado}$	x, y	σ'_{amida}	σ'_{anti}	σ'_{gauche}	$\sigma'_{anti} - \sigma'_{gauche}$
2	1,78	(H, H)	0,87	0,75	0,93	-0,18
7	1,71	(H, H)	0,80	0,75	0,83	-0,08
8	1,75	(H, H)	0,84	0,75	0,89	-0,14
9	1,83	(H, H)	0,92	0,75	1,01	-0,26
10	1,86	(H, H)	0,95	0,75	1,05	-0,30
11	1,93	(H, H)	1,02	0,75	1,16	-0,41
31	2,04	(H, Me)	0,79	0,75	0,83	-0,08
32	2,03	(H, Me)	0,78	0,75	0,81	-0,06
33	2,01	(H, Me)	0,76	0,75	0,77	-0,02
34	2,31	(Me, Me)	0,72	0,72*		
35	2,30	(Me, Me)	0,71	0,71*		
36	2,28	(Me, Me)	0,69	0,69*		
37	3,55	(Me, Ph)	0,81	0,81*		
38	3,54	(Me, Ph)	0,80	0,80*		
39	3,52	(Me, Ph)	0,78	0,78*		
Promedio \pm SD				0,75 \pm 0,03	0,92 \pm 0,13	-0,17 \pm 0,13

* Valores tomados para realizar el promedio. SD: desviación estándar.

En DMSO- d_6 se realizaron los cálculos de forma similar (Tabla 32). Como se observa, el desapantallamiento de los protones σ'_{anti} (0,75 ppm) es muy similar al encontrado en $CDCl_3$, en cambio, el de los protones σ'_{gauche} (0,92 ppm) es marcadamente inferior. Como consecuencia, el efecto anisotrópico entre ambas posiciones también es inferior ($\sigma'_{anti} - \sigma'_{gauche} = -0,17$ ppm) al encontrado en $CDCl_3$.

Tabla 33. Desapantallamientos (ppm) en protones NCO- CH_α para **2, 7-11** y **31-39** en D_2O .

Compuesto	$\delta_{observado}$	x, y	σ'_{amida}	σ'_{anti}	σ'_{gauche}	$\sigma'_{anti} - \sigma'_{gauche}$
2	1,84	(H, H)	0,93	0,90	0,95	-0,05
7	1,96	(H, H)	1,05	0,90	1,13	-0,23
8	1,93	(H, H)	1,02	0,90	1,08	-0,18
9	1,89	(H, H)	0,98	0,90	1,02	-0,12
10	2,01	(H, H)	1,10	0,90	1,20	-0,30
11	2,12	(H, H)	1,21	0,90	1,37	-0,47
31	2,22	(H, Me)	0,97	0,90	1,04	-0,14
32	2,23	(H, Me)	0,98	0,90	1,06	-0,16
33	2,19	(H, Me)	0,94	0,90	0,98	-0,08
34	2,47	(Me, Me)	0,88	0,88*		
35	2,43	(Me, Me)	0,84	0,84*		
36	2,39	(Me, Me)	0,80	0,80*		
37	3,73	(Me, Ph)	0,99	0,99*		
38	3,68	(Me, Ph)	0,94	0,94*		
39	3,70	(Me, Ph)	0,96	0,96*		
Promedio \pm SD				0,90 \pm 0,04	1,09 \pm 0,13	-0,19 \pm 0,13

* Valores tomados para realizar el promedio. SD: desviación estándar.

Por último, en D_2O (Tabla 33) se obtienen desapantallamientos de los protones σ'_{anti} y σ'_{gauche} de 0,90 y 1,09 ppm respectivamente, y una diferencia de desplazamiento

3.3. Correlaciones en proteínas

entre ambos ($\sigma'_{anti} - \sigma'_{gauche}$) de -0,19 ppm. Respecto a las desviaciones estándar encontradas en DMSO- d_6 y D $_2$ O, nuevamente son ligeramente superiores a las de CDCl $_3$, lo cual puede ser razonable si tenemos en cuenta que los valores de σ tabulados fueron establecidos para este disolvente o CCl $_4$.

Nuevamente, el que los protones NCO-CH $_{\alpha}$ *gauche*, situados fuera del plano de la amida, sufran un desapantallamiento mayor que los *anti*, que se encuentran coplanares (ver también Figura 76), es contrario a la predicción de la ecuación de McConnell. Debemos recordar aquí el comportamiento también discrepante con la ecuación de McConnell que hemos encontrado para los protones CON-CH $_{\alpha}$ de los isómeros *E*, expuesto en el apartado 3.2.1.2 (ver pág. 107), ya que mostraban los protones *gauche* ligeramente más desapantallados que los *anti*. Si bien con anterioridad se ha publicado que la citada ecuación muestra predicciones opuestas a los cálculos HF en el desapantallamiento de protones situados sobre el plano de los grupos C=C 103 y CO, 104 es por primera vez en esta Tesis cuando se demuestra experimentalmente que la ecuación de McConnell 15 no es un modelo general ni siquiera a nivel cualitativo, ya que sus predicciones, al menos en amidas secundarias, pueden ser contrarias a lo observado.

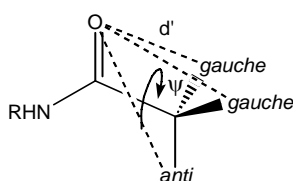


Figura 76. Ángulo diedro ψ (O=C-H) y distancia d' (O-H).

De forma análoga a como se hizo en el capítulo 3.2 para llegar a la ecuación [11], una vez que tuvimos una muestra representativa de ángulos de torsión en carboxamidas secundarias a nivel B3LYP/6-31G* y el desapantallamiento magnético

observado para estas estructuras, nos propusimos buscar una representación que permitiera visualizar el desapantallamiento magnético (σ'_H) observado sobre protones *anti* y *gauche* como función de la geometría. Tras considerar diversos datos geométricos y funciones, se llegó a un ajuste aceptable para los protones situados en el resto acílico, cuando el ángulo diedro O=C-C $_{\alpha}$ -H (ψ , Figura 76) se representa frente a σ'_H . En la Figura 77 puede verse que en CDCl $_3$ los datos se ajustan bien a un polinomio de tercer grado:

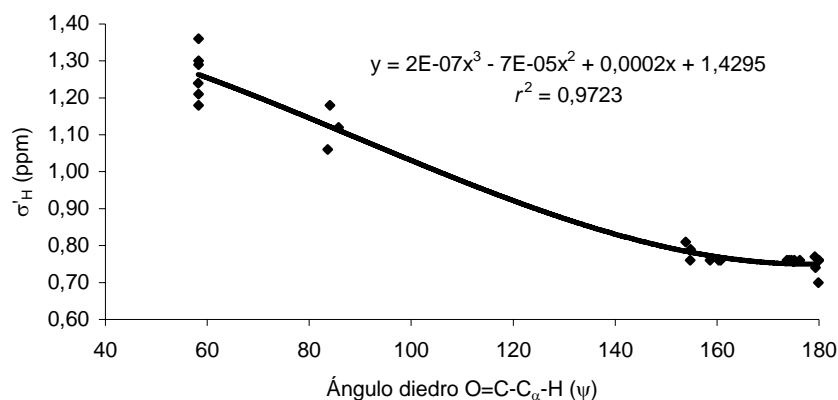


Figura 77. Desapantallamiento magnético (σ'_H , ppm) frente al diedro ψ para las amidas **2**, **7-11** y **31-39** en CDCl $_3$.

En la representación equivalente realizada para protones CON-CH $_{\alpha}$ (ver Figura 49, página 111) se apreció una similitud con la función coseno al cuadrado. En este caso, los datos accesibles recuerdan de nuevo a la función coseno al cuadrado, siempre que se divida el valor del diedro entre dos, ya que el periodo de la función mostrada en la Figura 77 es acorde con 360° y no con 180°. Por ello, dividimos el ángulo diedro entre dos, situando así el mínimo en 90° y manteniendo el máximo aproximadamente en 0°. Así, tras diversas pruebas, se encontró un buen ajuste entre el desapantallamiento σ'_H

3.3. Correlaciones en proteínas

y la función $\cos^2[(\psi-10)/2]/d'$, en la que d' es la distancia (\AA) entre el oxígeno carbonílico y el protón sobre el carbono en posición α (ver Figura 76).

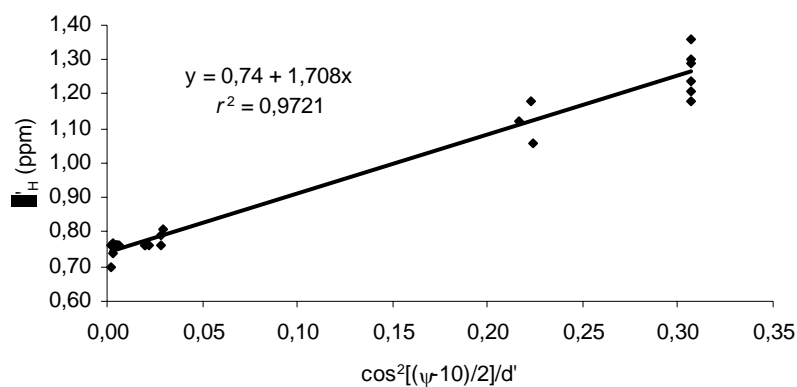


Figura 78. Correlación entre σ'_H y la función $\cos^2[(\psi-10)/2]/d'$ para las amidas **2, 7-11** y **31-39** en CDCl_3 .

Como se ve en la Figura 78, se llega así a una recta con un coeficiente de determinación $r^2 = 0,97$, que permite formular la ecuación [14] para el disolvente CDCl_3 .

$$\sigma'_H = 0,74 + 1,71 \cos^2[(\psi-10)/2]/d' \quad [14]$$

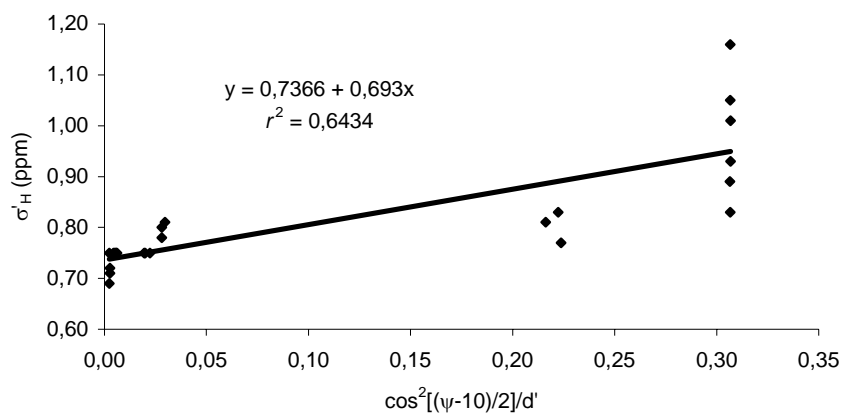


Figura 79. Correlación entre σ'_H y la función $\cos^2[(\psi-10)/2]/d'$ para las amidas **2, 7-11 y 31-39** en DMSO- d_6 .

Se realizó una correlación similar en DMSO- d_6 que se muestra en la Figura 79. En este caso el ajuste fue notablemente peor, $r^2 = 0,64$. Se llega así a la ecuación [15] para este disolvente:

$$\sigma'_H = 0,74 + 0,69 \cos^2[(\psi-10)/2]/d' \quad [15]$$

3.3. Correlaciones en proteínas

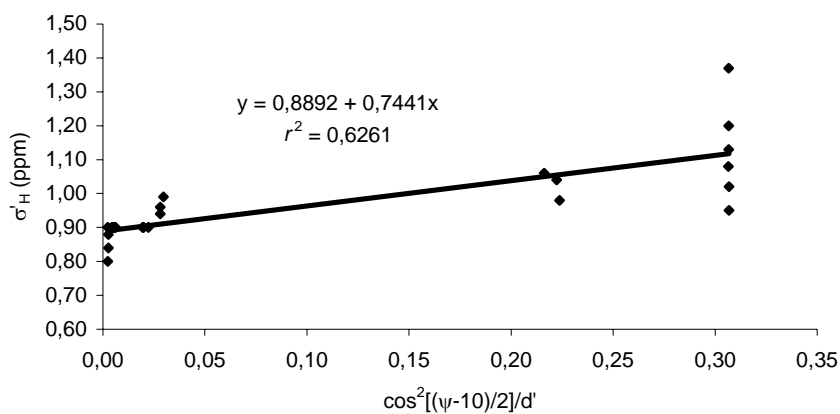


Figura 80. Correlación entre σ'_H y la función $\cos^2[(\psi-10)/2]/d'$ para las amidas **2, 7-11 y 31-39** en D_2O .

Por último, la Figura 80 muestra la correlación alcanzada en D_2O , con un r^2 de 0,63. Ello permite formular para este disolvente la ecuación [16]:

$$\sigma'_H = 0,89 + 0,74 \cos^2[(\psi-10)/2]/d' \quad [16]$$

Podemos hacer una presentación global de la ecuación en la que la pendiente y ordenada en el origen varían con el disolvente (ecuación [17]), como se muestra en la Tabla 34.

$$\sigma'_H = c + e \cos^2[(\psi-10)/2]/d' \quad [17]$$

Tabla 34. Parámetros de la ecuación [17].

Disolvente	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>r</i> ²
CDCl ₃	0,74	1,71	0,97
DMSO- <i>d</i> ₆	0,74	0,69	0,64
D ₂ O	0,89	0,74	0,63

Evidentemente, los r^2 alcanzados en DMSO- d_6 y D₂O son notablemente inferiores al obtenido para CDCl₃, ello puede ser debido en buena parte a que, como se ha comentado, los σ aditivos de la ecuación de Shoolery están calculados para este disolvente o CCl₄, así como a otros efectos, como por ejemplo las interacciones soluto-disolvente, que no se han tenido en cuenta. Por otra parte, la ecuación [11], que rige para los protones CON-CH _{α} , se diseñó (ver apartado 3.2.1.2) adoptando una pendiente común para los tres disolventes. Ello no es lógico para la ecuación [17], a la vista de las diferencias de pendiente tan pronunciadas que se observan en la Tabla 34 para DMSO- d_6 y D₂O respecto a CDCl₃.

3.3.1.3. Correlaciones de RMN en proteínas.

A partir de las ecuaciones obtenidas en los apartados 3.2.1.2 y 3.3.1.2, se podría evaluar el desplazamiento de un protón unido al C_α de una proteína. La Figura 81 muestra, junto a los ángulos de torsión definidos para los cálculos de esta Tesis (a), los parámetros geométricos que se emplean en las ecuaciones [11] y [17] (b). Como se anticipara en la introducción de este capítulo 3.3 (pág. 123), los ángulos diedros $[\phi]$ y $[\psi]$ son diferentes de α y ψ .

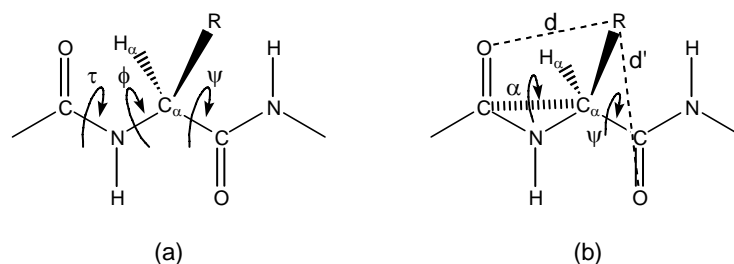


Figura 81. Estructura extendida de un fragmento de proteína. (a) Ángulos diedros definidos en esta Tesis. (b) Ángulos diedros y distancias de las ecuaciones [11] y [17].

Para alcanzar este objetivo, dos de los sustituyentes aditivos de la ecuación de Shoolery,⁸¹

$$\delta_{\text{calc}} = 0,23 + \sigma_x + \sigma_y + \sigma_z \quad [8]$$

deben ser las ecuaciones [11] y [17] con los coeficientes calculados para el disolvente en que se registre el espectro de la proteína, y el tercero el grupo R propio de cada aminoácido (ver Figura 81). En un contexto quiral cuyos protones son magnéticamente no equivalentes, incluso los geminales de la glicina, el desapantallamiento causado por

los grupos amido en ambos lados del C_α sería σ_H y σ'_H , por lo que el desplazamiento de un determinado protón vendría dado por la ecuación [18]:

$$\delta_{\text{calc}} = 0,23 + \sigma_R + \sigma_H + \sigma'_H \quad [18]$$

en la que el cálculo de σ'_H se acaba de detallar en el apartado anterior:

$$\sigma'_H = c + e \cos^2[(\psi-10)/2]/d' \quad [17]$$

En cuanto a σ_H , comenzamos trabajando con la ecuación [11] publicada¹⁰⁸ para este término y con los parámetros de ajuste (ver la página 115 del apartado 3.2.1.2) que figuran en la Tabla 22, que volvemos a incluir aquí:

$$\sigma_H = a + 2,16 \cos^2(\alpha-35)/d \quad [11]$$

Tabla 22. Parámetros de la ecuación [11].

Disolvente	a	r^2	$s_{y,x}$
CDCl_3	1,69	0,94	0,08
$\text{DMSO-}d_6$	1,49	--	0,14
D_2O	1,59	--	0,16

Incorporando a la ecuación [18] las ecuaciones [11] y [17], obtenemos la ecuación [19], que es una ecuación general aplicable a cualquier disolvente:

3.3. Correlaciones en proteínas

$$\delta_{\text{calc}} = 0,23 + \sigma_{\text{R}} + a + 2,16 \cos^2(\alpha-35)/d + c + e \cos^2[(\psi-10)/2]/d' \quad [19]$$

Puesto que el disolvente más universal en cuanto al registro de espectros de proteínas es D₂O, vamos a realizar nuestro ensayo de validación de la ecuación [19] para este disolvente, aún sabiendo que deberían obtenerse mejores resultados en CDCl₃ como consecuencia del mayor ajuste que muestran las ecuaciones [11] y [17] en este disolvente. Para D₂O, la ecuación quedaría:

$$\delta_{\text{calc}} = 0,23 + \sigma_{\text{R}} + 1,59 + 2,16 \cos^2(\alpha-35)/d + 0,89 + 0,74 \cos^2[(\psi-10)/2]/d' \quad [20]$$

y agrupando términos,

$$\delta_{\text{calc}} = 2,71 + \sigma_{\text{R}} + 2,16 \cos^2(\alpha-35)/d + 0,74 \cos^2[(\psi-10)/2]/d' \quad [21]$$

Un problema que nos encontramos en este punto es que no existen valores de σ_{R} tabulados para los grupos R de los distintos aminoácidos (H₂N-CHR-COOH) en la ecuación de Shoolery. Para calcularlos se sustituyó el desplazamiento calculado por el observado, llegándose a la ecuación [22], de la que se despejó σ_{R} (ecuación [23]). En esta ecuación, se incorporaron los datos geométricos y desplazamientos observados de un total de 2153 aminoácidos de distintas proteínas (ver más adelante), cuya estructura se ha determinado mediante RMN en los últimos años. Por último, los valores de σ_{R} así obtenidos se promediaron para cada aminoácido. En definitiva, hemos utilizado para calcular el término aditivo σ_{R} de cada aminoácido, un procedimiento similar al empleado para determinar los términos σ_{x} usuales en el cálculo de desplazamientos

químicos mediante las clásicas ecuaciones aditivas.⁸¹ Además, este término σ_R ha sido determinado para el disolvente más usual en el estudio de proteínas mediante RMN, D_2O .

$$\delta_{\text{obs}} = 2,71 + \sigma_R + 2,16 \cos^2(\alpha-35)/d + 0,74 \cos^2[(\psi-10)/2]/d' \quad [22]$$

$$\sigma_R = \delta_{\text{obs}} - (2,71 + 2,16 \cos^2(\alpha-35)/d + 0,74 \cos^2[(\psi-10)/2]/d') \quad [23]$$

Para la captación de los desplazamientos químicos y parámetros geométricos de las proteínas, decidimos buscar un método que permitiera la obtención de un número de datos elevado, sin necesidad de medir los ángulos diedros y distancias necesarios uno a uno mediante programas de visualización de las estructuras. Los datos geométricos de proteínas de los que partimos se obtuvieron de la base Protein Data Bank (PDB),⁵⁶ y sus desplazamientos de la BioMagResBank (BMRB),¹¹¹ ya mencionadas. Mediante un sencillo proceso automatizado de medida de distancias y diedros a partir de las coordenadas cartesianas que constituyen un archivo PDB, todo ello implementado en una hoja de cálculo, se midieron los diedros α y ψ y las distancias d y d' para un total de 2153 protones CH_α de 13 proteínas o fragmentos de ellas distintas, citadas a continuación. Tras su nombre se incluyen su código BMRB, compuesto por cuatro cifras, y el código de su estructura PDB (normalmente hay varias para cada proteína), mezcla de cuatro cifras y letras:

3.3. Correlaciones en proteínas

- Dominio *N*-terminal de 30 kDa de la Enzima I del Sistema fosfotransferasa de azúcar dependiente de fosfoenolpiruvato de *Escherichia coli*, 4106, 2EZB.¹⁴⁰
- Lipocalina neutrófila humana asociada a gelatinasa, en forma apo (apo-HNGAL) (*Human Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*), 4267, 1NGL.¹⁴¹
- Dominio *N*-terminal de 20 kDa de la proteína XRCC1, reparadora de ADN de una hebra, 4282, 1XNA.¹⁴²
- Proteína de la cápsula del virus HTLV-I (*human T-cell lymphotropic virus type I*, virus linfotrópico de células T humanas tipo I), 4311, 1QRJ.¹⁴³
- Dominio *N*-terminal de VAT (*VCP-like ATPase of Thermoplasma*, ATPasa tipo VCP de termoplasma), ATPasa AAA de grupo II, 4376, 1CZA.¹⁴⁴
- Proteína de la cápsula del virus del sarcoma de Rous, 4384, 1D1D.¹⁴⁵
- Proteína de prión humano hPrP (23-230), 4402, 1QLX.¹⁴⁶

¹⁴⁰ D. S. Garrett, Y.-J. Seok, D.-I. Liao, A. Peterkofsky, A. M. Gronenborn y M. G. Clore, *Biochemistry* **1997**, 36, 2517-2530.

¹⁴¹ M. Coles, T. Diercks, B. Muehlenweg, S. Bartsch, V. Zoelzer, H. Tschesche y H. Kessler, *J. Mol. Biol.* **1999**, 289, 139-157.

¹⁴² A. G. Marintchev, M. W. Maciejewski y G. P. Mullen, *J. Biomol. NMR* **1999**, 13, 393-394.

¹⁴³ S. Khorasanizadeh, R. Campos-Olivas, C. A. Clark y M. F. Summers, *J. Biomol. NMR* **1999**, 14, 199-200.

¹⁴⁴ M. Coles, T. Diercks, J. Liermann, A. Groeger, B. Rockel, W. Baumeister, K. K. Koretke, A. Lupas, J. Peters y H. Kessler, *Curr. Biol.* **1999**, 9, 1158-1168.

¹⁴⁵ R. Campos-Olivas, J. L. Newman, Y. Ndassa y M. F. Summers, *J. Biomol. NMR* **1999**, 15, 267-268.

- Dominio I del antígeno-1 asociado a la función del leucocito humano, 4553, 1DGQ.¹⁴⁷
- Cdc42 unido al dominio de enlace de GTPasa de PAK, 4700, 1AJE.¹⁴⁸
- Glicosilasa I de 3-metiladenina del ADN de *Escherichia coli*, 5398, 1LMZ.¹⁴⁹
- FGF (*Fibroblast Growth Factor*, factor de crecimiento del fibroblasto), aún no depositada.¹⁵⁰
- Heveína truncada de 32 aminoácidos, 6123, 1T0W.¹⁵¹
- Hesx-1 o Rpx, gen *homeobox*, aún no depositada.^{152,153}

¹⁴⁶ R. Zahn, A. Liu, T. Luhrs, R. Riek, C. v. Schroetter, F. Lopez Garcia, M. Billeter, L. Calzolari, G. Wider y K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 145-150.

¹⁴⁷ R. W. Kriwacki, G. B. Legge, U. Hommel, P. Ramage, J. Chung, L. L. Tennant, P. E. Wright y H. J. Dyson, *J. Biomol. NMR* **2000**, *16*, 271-272.

¹⁴⁸ A. Morreale, M. Venkatesan, H. R. Mott, D. Owen, D. Nietlispach, P. N. Lowe y E. D. Laue, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 384-388.

¹⁴⁹ A. C. Drohat, K. Kwon, D. J. Krosky y J. T. Stivers, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 659-664.

¹⁵⁰ (a) A. Pineda-Lucena, M. A. Jiménez, J. L. Nieto, J. Santoro, M. Rico y G. Giménez-Gallego, *J. Mol. Biol.* **1994**, *242*, 81-98. (b) R. M. Lozano, M. Jiménez, J. Santero, M. Rico y G. Giménez-Gallego, *J. Mol. Biol.* **1998**, *281*, 899-915. (c) A. Canales, Tesis Doctoral, UAM (Madrid), 2005.

¹⁵¹ (a) N. H. Andersen, B. Cao, A. Rodríguez-Romero y B. Arreguin, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1407-1422. (b) J. L. Asensio, F. J. Cañada, M. Bruix, A. Rodríguez-Romero y J. Jiménez-Barbero, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 621-633. (c) J. L. Asensio, F. J. Cañada, M. Bruix, C. González, N. Khiar, A. Rodríguez-Romero y J. Jiménez-Barbero, *Glycobiology* **1998**, *8*, 569-577. (d) J. L. Asensio, F. J. Cañada, H. C. Siebert, J. Laynez, A. Poveda, P. M. Nieto, U. M. Soedjanaamadja, H. J. Gabius y J. Jiménez-Barbero, *Chem. & Biol.* **2000**, *7*, 529-543. (e) N. Aboitiz, M. Vila-Perelló, P. Groves, J. L. Asensio, D. Andreu, F. J. Cañada y J. Jiménez-Barbero, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1245.

¹⁵² I. de la Mata, J. L. Garcia, C. González, M. Menéndez, J. Cañada, J. Jiménez-Barbero y J. L. Asensio, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 726-740.

3.3. Correlaciones en proteínas

Por el procedimiento comentado se calculó el parámetro σ_R para cada grupo R en cada residuo. La Tabla 35 muestra el valor de σ_R promedio calculado para los residuos de los aminoácidos proteicos, así como el número de residuos de cada aminoácido utilizados para realizar el promedio.

Tabla 35. Valores de σ_R promedio calculados para cada aminoácido.

Aminoácido	Residuos medidos	σ_R promedio	
Alanina	ALA	151	0,61
Arginina	ARG	113	0,65
Asparagina	ASN	77	1,05
Ácido aspártico	ASP	119	0,98
Cisteína	CYS	35	1,08
Glutamina	GLN	111	0,56
Ácido glutámico	GLU	149	0,63
Glicina	GLY	118*	0,55
Histidina	HIS	39	0,96
Isoleucina	ILE	124	0,50
Leucina	LEU	187	0,76
Lisina	LYS	138	0,68
Metionina	MET	40	0,61
Fenilalanina	PHE	74	1,12
Prolina	PRO	97	0,85
Serina	SER	128	0,92
Treonina	THR	113	0,79
Triptófano	TRP	19	0,86
Tirosina	TYR	63	1,08
Valina	VAL	140	0,58

* Para la glicina el número de protones medidos es 236.

¹⁵³ Los genes *homeobox* codifican una gran familia de proteínas reguladoras. Todos ellos contienen un fragmento de 60 residuos (llamado homeodominio) responsable de la actividad de enlace a ADN específico para la secuencia.

Una vez obtenido el parámetro σ_R promediado para cada aminoácido, éste se utilizó en la ecuación [21] para calcular el desplazamiento de cada uno de los protones. La Tabla 36 muestra, junto al desplazamiento promedio observado para cada aminoácido ($\bar{\delta}_{\text{obs}}$), que evidentemente coincide con el desplazamiento promedio calculado para cada aminoácido ($\bar{\delta}_{\text{calc}}$), las correspondientes desviaciones estándar de los valores observados (SD_{obs}) y calculados (SD_{calc}). En general, como se aprecia bien en el cómputo global, se observan mayores desviaciones estándar para los desplazamientos observados que para los calculados, con excepción de la asparagina, el ácido aspártico y la glicina. También se incluye en la tabla el error promedio, o promedio de las diferencias en valor absoluto entre los desplazamientos calculados y observados para cada aminoácido, y la desviación estándar sobre el error promedio (SD_{EP}), que resultaron ser de $0,44 \pm 0,35$ ppm en el cómputo global. Cuando este mismo proceso se realizó incorporando la ecuación [12] (en lugar de la ecuación [11]) que proporciona σ_H a la ecuación [18] se llega, como anticipamos en la pág. 120, a unos datos estadísticos similares ($0,44 \pm 0,36$ ppm), como se ve en el apéndice C.

3.3. Correlaciones en proteínas

Tabla 36. Error promedio (ppm) y datos estadísticos para cada aminoácido.

Aminoácido	$\bar{\delta}_{\text{obs}} = \bar{\delta}_{\text{calc}}$	SD_{obs}	SD_{calc}	Error promedio*	SD_{EP}	R. medidos
ALA	4,24	0,46	0,27	0,39	0,36	151
ARG	4,29	0,44	0,27	0,41	0,28	113
ASN	4,64	0,39	0,46	0,34	0,29	77
ASP	4,59	0,33	0,34	0,31	0,25	119
CYS	4,70	0,60	0,33	0,54	0,35	35
GLN	4,19	0,37	0,33	0,34	0,28	111
GLU	4,26	0,45	0,29	0,40	0,34	149
GLY	3,94	0,52	0,56	0,37	0,34	118
HIS	4,54	0,52	0,39	0,45	0,35	39
ILE	4,13	0,63	0,19	0,59	0,39	124
LEU	4,39	0,52	0,28	0,49	0,35	187
LYS	4,30	0,45	0,35	0,40	0,29	138
MET	4,26	0,64	0,19	0,53	0,45	40
PHE	4,73	0,67	0,29	0,64	0,40	74
PRO	4,42	0,36	0,19	0,30	0,31	97
SER	4,50	0,46	0,34	0,42	0,32	128
THR	4,42	0,54	0,26	0,49	0,39	113
TRP	4,49	0,47	0,42	0,47	0,33	19
TYR	4,67	0,58	0,27	0,51	0,39	63
VAL	4,20	0,68	0,20	0,64	0,41	140
TOTAL**	4,33	0,55	0,29	0,44	0,35	2153

* $\Sigma(|\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{calc}}|)/n$. ** Calculado para los 2153 aminoácidos considerados, de forma individual.

En cuanto a un posible análisis de la bondad de los desplazamientos calculados, hemos de decir en primer término que los valores promediados ($\bar{\delta}_{\text{obs}}$ y $\bar{\delta}_{\text{calc}}$) y desviaciones estándar observadas (SD_{obs}) coinciden con los publicados en trabajos

previos llevados a cabo en otras proteínas.¹⁵⁴ Así, como se observa en la Tabla 37, nuestros valores promedio coinciden con los desplazamientos promediados descritos por Zhang y col., con diferencias inferiores a 0,1 ppm para todos los aminoácidos excepto metionina, glutamina, treonina y triptófano, que muestran diferencias de 0,14, 0,11, 0,11 y 0,30 ppm, respectivamente. Ello es indicativo de la representatividad del conjunto de aminoácidos considerado en este trabajo, excepto en el caso del triptófano, que como se ve es muy poco abundante en las proteínas elegidas (sólo contienen 19 restos). No obstante, hay que decir que nuestro estudio se ha hecho al azar, mediante un método automatizado de captura de datos que no tiene en cuenta la estructura (hélice α , hoja plegada β ,...) del fragmento. Ello apoya fuertemente nuestra metodología de cálculo, que es válida independientemente de la estructura considerada. Probablemente en el caso del triptófano (y quizás también en la metionina), la muestra elegida contiene pocos aminoácidos en fragmentos β . Aun así, en lo que a los objetivos de este trabajo interesa, hemos de decir que nuestra metodología de cálculo es también predictiva para ellos.

¹⁵⁴ H. Zhang, S. Neal y D. S. Wishart, *J. Biomol. NMR* **2003**, 25, 173-195.

3.3. Correlaciones en proteínas

Tabla 37. Comparación entre los desplazamientos promedio de la referencia 154 y de esta Tesis.

Aminoácido	<i>Random coil</i> *		Hélice α *		Hoja β *		Media*		Esta Tesis	
	$\bar{\delta}_{\text{obs}}$	SD	$\bar{\delta}_{\text{obs}}$	SD	$\bar{\delta}_{\text{obs}}$	SD	$\bar{\delta}_{\text{obs}}$	SD	$\bar{\delta}_{\text{obs}}$	SD
ALA	4,26	0,33	4,03	0,33	4,77	0,55	4,29	0,49	4,24	0,46
ARG	4,24	0,43	3,99	0,32	4,74	0,50	4,29	0,50	4,29	0,44
ASN	4,66	0,36	4,48	0,22	5,06	0,49	4,71	0,42	4,64	0,39
ASP	4,60	0,28	4,43	0,22	4,94	0,40	4,62	0,34	4,59	0,33
CYS	4,65	0,39	4,15	0,67	5,15	0,51	4,79	0,64	4,70	0,60
GLN	4,26	0,34	3,99	0,28	4,80	0,49	4,30	0,48	4,19	0,37
GLU	4,28	0,33	4,01	0,24	4,78	0,49	4,28	0,45	4,26	0,45
GLY	3,96	0,35	3,81	0,38	4,20	0,60	3,98	0,41	3,94	0,52
HIS	4,53	0,50	4,33	0,34	5,06	0,48	4,64	0,52	4,54	0,52
ILE	4,15	0,38	3,67	0,33	4,68	0,48	4,23	0,60	4,13	0,63
LEU	4,36	0,37	4,00	0,34	4,82	0,46	4,37	0,52	4,39	0,52
LYS	4,26	0,41	3,99	0,30	4,69	0,51	4,29	0,49	4,30	0,45
MET	4,38	0,41	4,07	0,34	4,96	0,47	4,40	0,53	4,26	0,64
PHE	4,54	0,47	4,16	0,46	5,09	0,46	4,67	0,61	4,73	0,67
PRO	4,37	0,35	4,22	0,29	4,60	0,50	4,40	0,39	4,42	0,36
SER	4,47	0,35	4,25	0,25	4,91	0,48	4,56	0,45	4,50	0,46
THR	4,45	0,36	4,00	0,34	4,86	0,46	4,53	0,51	4,42	0,54
TRP	4,55	0,48	4,38	0,37	5,19	0,50	4,79	0,58	4,49	0,47
TYR	4,52	0,44	4,09	0,39	5,10	0,54	4,70	0,63	4,67	0,58
VAL	4,12	0,41	3,58	0,36	4,60	0,48	4,20	0,61	4,20	0,68
Nº total de desplazamientos	9637		7312		7956		26294		2153	

* Referencia 154.

En general, el que los desplazamientos observados (ver Tabla 36) muestren mayores desviaciones que los calculados puede ser esperable si tenemos en cuenta que, de entre los distintos parámetros que intervienen (ver por ejemplo las ecuaciones [5] y [6] de las págs. 34 y 35), aquí sólo hemos considerado la anisotropía de la función amida.

Por otra parte, si bien las columnas de error promedio y su desviación estándar (SD_{EP}) permiten ciertos análisis (ver más adelante), es difícil la determinación del error del método, ya que siempre se acumularán los errores de nuestra metodología a los debidos a asignaciones incorrectas de desplazamientos, así como a los datos de ángulos y distancias inexactos contenidos en la geometría de la proteína.

Sin embargo, aunque esta metodología sólo tiene en cuenta relaciones geométricas cercanas y no otras interacciones inter- o intramoleculares, como por ejemplo la formación de puentes de hidrógeno, sí puede permitir un principio de análisis de estos hechos en función de la adecuación entre desplazamientos calculados y observados.

Un factor importante en la estructura de las proteínas es el carácter hidrofílico o hidrofóbico de aminoácidos o conjuntos de ellos en la secuencia. Como se observa en la Tabla 38, es interesante constatar que en D_2O sean los protones de aminoácidos hidrofóbicos los que presentan los errores promedio más altos y los hidrofílicos los más bajos. A efectos comparativos se incluyen en la tabla los valores de hidrofilia/hidrofobia de los aminoácidos proteicos en dos escalas desarrolladas a partir de valores de partición de péptidos en disolventes polares y apolares, y que se utilizan en la evaluación del carácter hidrofóbico de segmentos de proteínas. La conocida como escala Kyte-Doolittle (K-D) clasifica los aminoácidos en un rango comprendido entre el más hidrofóbico isoleucina (+4,5) y el más hidrofílico arginina (-4,5).¹⁵⁵ La denominada escala de Hopp-Woods (H-W) es un índice de hidrofilia que clasifica en el rango de +3 para los hidrofílicos arginina, ácido aspártico y lisina hasta -3,4 para el triptófano.¹⁵⁶ Independientemente de la escala con que comparemos, los aminoácidos más

¹⁵⁵ J. Kyte y R. F. Doolittle, *J. Mol. Biol.* **1982**, 157, 105-132.

¹⁵⁶ T. P. Hopp y K. R. Woods, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 3824-3828.

3.3. Correlaciones en proteínas

hidrofóbicos como valina, fenilalanina, isoleucina, etc., presentan los errores promedio y las desviaciones estándar sobre el error promedio (SD_{EP}) más altos. Pero además, se observa que en estos aminoácidos hidrofóbicos hay también más desviación en los datos de los desplazamientos observados, como muestra SD_{obs} , pero no la hay en los calculados (ver SD_{calc}). Ello sugiere que no son los factores geométricos utilizados por nuestra metodología los que ocasionan el alto error promedio encontrado en estos aminoácidos, sino otros efectos ligados a la hidrofobia que pueden provocar ordenaciones en regiones de la proteína donde estos aminoácidos se acumulan, que evitan la interacción con el disolvente y propician otras intramoleculares entre grupos poco polares.

Tabla 38. Comparación del carácter hidrofóbico, el error promedio y otros datos estadísticos en aminoácidos.

Aminoácido	K-D ¹⁵⁵	H-W ¹⁵⁶	Error promedio	SD _{EP}	SD _{obs}	SD _{calc}	R. medidos
ALA	1,8	-0,5	0,39	0,36	0,46	0,27	151
ARG	-4,5	3,0	0,41	0,28	0,44	0,27	113
ASN	-3,5	0,2	0,34	0,29	0,39	0,46	77
ASP	-3,5	3,0	0,31	0,25	0,33	0,34	119
CYS	2,5	-1,0	0,54	0,35	0,60	0,33	35
GLN	-3,5	0,2	0,34	0,28	0,37	0,33	111
GLU	-3,5	3,0	0,40	0,34	0,45	0,29	149
GLY	-0,4	0,0	0,37	0,34	0,52	0,56	118
HIS	-3,2	-0,5	0,45	0,35	0,52	0,39	39
ILE	4,5	-1,8	0,59	0,39	0,63	0,19	124
LEU	3,8	-1,8	0,49	0,35	0,52	0,28	187
LYS	-3,9	3,0	0,40	0,29	0,45	0,35	138
MET	1,9	-1,3	0,53	0,45	0,64	0,19	40
PHE	2,8	-2,5	0,64	0,40	0,67	0,29	74
PRO	-1,6	0,0	0,30	0,31	0,36	0,19	97
SER	-0,8	0,3	0,42	0,32	0,46	0,34	128
THR	-0,7	-0,4	0,49	0,39	0,54	0,26	113
TRP	-0,9	-3,4	0,47	0,33	0,47	0,42	19
TYR	-1,3	-2,3	0,51	0,39	0,58	0,27	63
VAL	4,2	-1,5	0,64	0,41	0,68	0,20	140
TOTAL*			0,44	0,35	0,55	0,29	2153

* Calculado para los 2153 aminoácidos considerados, de forma individual.

En definitiva, el comportamiento en RMN de un aminoácido hidrófobo puede ser distinto en D₂O si se encuentra en un entorno hidrofílico o hidrofóbico. En contraste, los aminoácidos hidrofílicos o intermedios muestran errores promedio y desviaciones sobre éstos más bajos; pero además, sus desviaciones estándar sobre los desplazamientos calculados y observados muestran magnitudes comparables. Conviene

3.3. Correlaciones en proteínas

recordar en este punto que la definición de dominios hidrofílicos e hidrofóbicos en regiones de una proteína o en su conjunto, es muy importante en relación con propiedades como su actividad antigénica,^{155,156} y existen programas basados en las escalas de hidrofilia/hidrofobia desarrollados para su determinación (por ejemplo, “Hydropathy”).¹⁵⁵

Por otra parte, es lógico que la glicina presente magnitudes de SD_{obs} y SD_{calc} altas, ya que tiene dos protones sobre C_{α} en posiciones muy distintas.

En la Figura 82 se presenta, en sucesivos intervalos de 0,1 ppm, el porcentaje de aminoácidos cuyas diferencias entre los desplazamientos calculados y observados ($|\delta_{calc} - \delta_{obs}|$) se encuentran en cada uno de esos intervalos. También podemos apreciar el porcentaje de aminoácidos cuyo error es inferior al límite superior del intervalo.

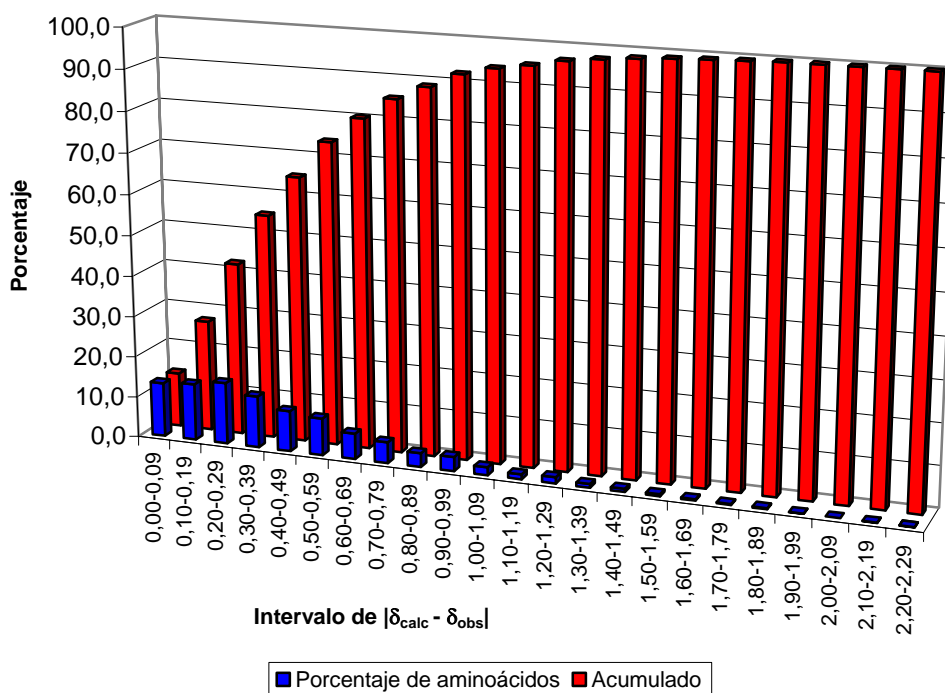


Figura 82. Porcentaje de aminoácidos en cada intervalo de error cometido en el cálculo.

Al observar valores de $|\delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{obs}}|$ muy altos en aminoácidos concretos, decidimos buscar otras posibles causas que lo explicaran, aceptando siempre que la asignación de desplazamientos descrita es correcta. Al comprobar estructura a estructura, encontramos frecuentemente (Tabla 39) que la estructura asignada recoge la presencia de al menos un segundo grupo fuertemente anisotrópico cercano (un anillo aromático, amido, etc.), que puede ser la causa del desplazamiento anómalo.

Tabla 39. Ejemplos de protones con error elevado $|\delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{obs}}|$ y grupos anisotrópicos más cercanos.

Estr.	Residuo	$ \delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{obs}} $	Residuo próximo	Dist. (Å)	Átomo	Observaciones
1XNA	ALA 21	0,73	TRP 33	2,487	N(-C=C)	
FGF	ALA 62	0,85	GLU 67	2,697	O(=C)	
			TYR 69	5,737	C (Ph)	
FGF	ALA 80	1,04	PHE 99	3,494	C (Ph)	
1XNA	ASP 59	1,07	HIS 150	4,186	-N=	Algo por encima del plano
			ARG 109	3,261	O(=C)	
1QLX	GLN 172	1,41	TYR 218	2,937	C (Ph)	Perpendicular a ese átomo del plano
1XNA	GLN 15	1,42	TRP 33	3,099	N(-C=C)	Algo por encima del plano
			ARG 34	2,545	O(=C)	
1XNA	PRO 96	1,24	SER 99	3,305	OH	
			TYR 136	4,395	C (Ph)	
FGF	PRO 148	1,14	LEU 27	2,500	O(=C)	

Las siguientes imágenes visualizan algunos de estos casos:

3.3. Correlaciones en proteínas

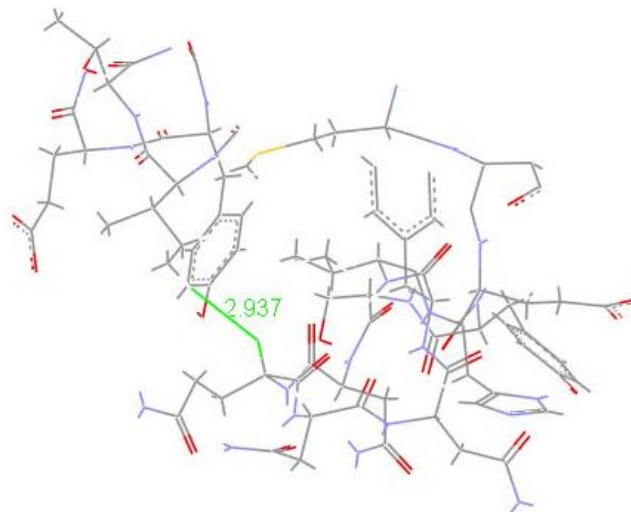


Figura 83. Protón en C α del residuo de la glutamina 172 y carbono aromático de la tirosina 218 situado a una distancia de 2,937 Å, en un fragmento de la estructura 1QLX.

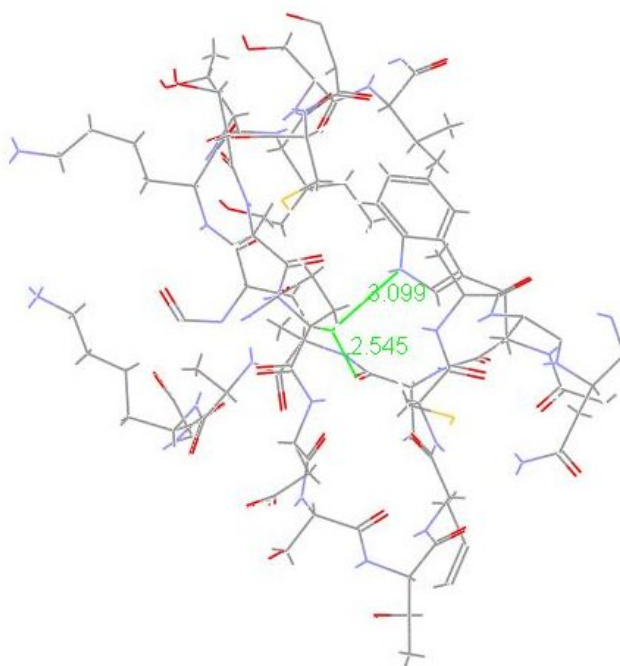


Figura 84. Protón en C α de la glutamina 15, a una distancia de 3,099 Å del nitrógeno arílico del triptófano 33 y a 2,545 Å del oxígeno carbonílico de la arginina 34, en un fragmento de la estructura 1XNA.

En contraste, en residuos de aminoácidos con diferencias entre los desplazamientos calculado y observado ($|\delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{obs}}|$) pequeñas no se suelen observar grupos anisotrópicos cercanos, como es el caso de los recogidos en la Tabla 40:

Tabla 40. Ejemplos de protones con pequeño error $|\delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{obs}}|$ y grupos anisotrópicos más cercanos.

Estr.	Residuo	$ \delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{obs}} $	Residuo próximo	Dist. (Å)	Átomo	Observaciones
1XNA	ALA 66	0,01	MET 94	3,093	O(=C)	
1QLX	ASP 147	0,04	PHE 141	3,250	C (Ph)	Exactamente en el plano
			ILE 139	3,355	O(=C)	
1XNA	ASP 83	0,04	TYR 84	4,331	O(=C)	Algo por encima del plano
				5,131	C (Ph)	
FGF	ASP 42	0,05	LEU 40	4,888	O(=C)	
FGF	ASP 154	0,10	GLU 101	5,332	C(OO ⁻)	
1QLX	ASN 159	0,05	MET 213	4,076	S	
1QLX	GLN 227	0,10	TYR 226	5,070	C (Ph)	Casi perpendicular a ese átomo del plano
FGF	GLN 91	0,03	TYR 78	5,179	C (Ph)	Algo por encima del plano
1T0W	GLN 2	0,09	TRP 23	5,098	C (Ph)	Casi perpendicular a ese átomo del plano
1T0W	GLN 6	0,10	ARG 5	3,982	-NH-	
1XNA	PRO135	0,05	TYR 136	4,534	C (Ph)	Casi perpendicular a ese átomo del plano
			GLU 140	2,220	O(=C)	
1XNA	PRO 141	0,06	PHE 142	5,322	C (Ph)	
			GLU 40	2,463	(C=O)O ⁻	
			LYS 37	3,033	O(=C)	
FGF	PRO 25	0,01	LEU 58	2,476	O(=C)	

3.3. Correlaciones en proteínas

En ella, por ejemplo, en la asparagina 159 de la estructura 1QLX el único grupo anisotrópico medianamente cercano es un átomo de azufre de la metionina 213 a 4,076 Å, y $|\delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{obs}}| = 0,05$ ppm (Figura 85).

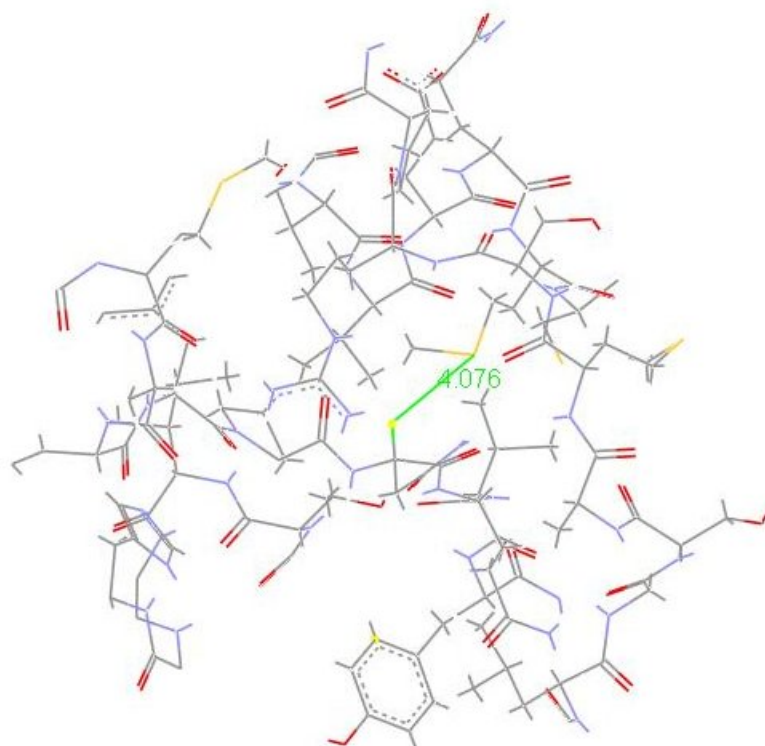


Figura 85. Protón en C_α de la asparagina 159 en la estructura 1QLX, con un átomo de azufre como único grupo anisotrópico en su proximidad, a 4,076 Å.

La alanina 66 de la estructura 1XNA, con $|\delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{obs}}| = 0,01$ ppm, muestra como grupo con posible influencia más cercano un oxígeno carbonílico de la metionina 94 a 3,093 Å. En contraste, el protón α de esta alanina 66 está a 2,514 Å del oxígeno carbonílico de su propio residuo y a 2,323 Å del inmediatamente anterior (con el que forma el diedro virtual α). En la Figura 86 se muestra otro ejemplo, la glutamina 2 de la

estructura 1T0W, en la que únicamente encontramos un carbono aromático del triptófano 23, y a una distancia de 5,098 Å.

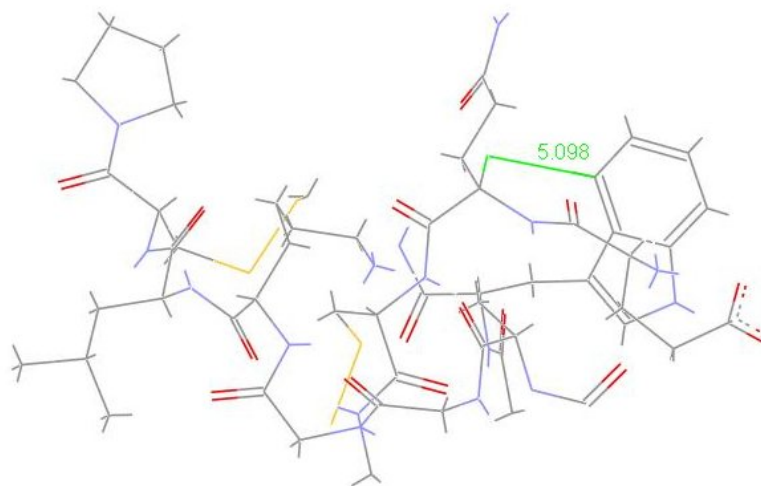


Figura 86. Protón en C_{α} de la glutamina 2 en la estructura 1T0W, que presenta como grupo anisotrópico más cercano el anillo benzénico del triptófano 23, a 5,098 Å.

Como conclusión, asumiendo la existencia prevalente de la estructura $Z_{anti,alternada}$ para las carboxamidas, hemos evaluado en los disolventes $CDCl_3$, $DMSO-d_6$ y D_2O el desapantallamiento magnético generado por la función amida sobre los átomos de hidrógeno $NCO-CH_{\alpha}$, que por ejemplo para $CDCl_3$ son $\sigma'_{anti} = 0,76 \pm 0,02$ ppm y $\sigma'_{gauche} = 1,22 \pm 0,09$ ppm. Se ha encontrado también que hay una dependencia significativa y sistemática entre el desapantallamiento químico experimental y dos parámetros geométricos, el ángulo de torsión ψ y la distancia entre el protón considerado y el átomo de oxígeno, que se puede cuantificar matemáticamente mediante la expresión optimizada $\sigma'_H = c + e \cos^2[(\psi-10)/2]/d'$. Por último, esta ecuación, junto con la [11] desarrollada en el capítulo 3.2, permite la elaboración de otras que posibilitan el cálculo del desplazamiento químico de los protones $-CO-NH-CRH-CO-$

3.3. Correlaciones en proteínas

NH-. Así, para D₂O la ecuación tomaría la expresión $\delta_{\text{calc}} = 2,71 + \sigma_{\text{R}} + 2,16 \cos^2(\alpha - 35)/d + 0,74 \cos^2[(\psi - 10)/2]/d'$, en la que σ_{R} es un parámetro propio de cada aminoácido y del disolvente. Esta ecuación se ha aplicado a 2153 aminoácidos de 13 proteínas de estructura determinada previamente mediante RMN, encontrándose un error promedio, $\Sigma(|\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{calc}}|)/n$, de 0,44 ppm, y una desviación estándar sobre el error promedio (SD_{EP}) de 0,35 ppm. Significativamente estos parámetros, error promedio y su desviación estándar, son mayores en los aminoácidos hidrofóbicos que en los hidrofílicos.

4. Parte experimental

4.1. Métodos generales.

Evaporación de disolventes.

La evaporación de disolventes se efectuó en un rotavapor a temperaturas inferiores a 50 °C, a presiones estimadas entre 15 y 30 mm de mercurio.

Cromatografía en capa fina.

Esta técnica se utilizó con carácter analítico cualitativo, empleando placas Polygram Sil G/UV₂₅₄ suministradas por la casa Aldrich. Como reveladores se utilizaron luz ultravioleta de longitudes de onda 254 y 360 nm, vapores de yodo, permanganato potásico al 1 % en agua y pulverización con ácido sulfúrico-agua 1:1. Los eluyentes empleados fueron acetato de etilo-éter de petróleo 1:1, 2:1 y 3:1, y diclorometano-éter de petróleo 1:1.

Espectros de resonancia magnética nuclear.

Se registraron en los espectrómetros Bruker AC 200 E (200 MHz para ¹H y 50 MHz para ¹³C) y AM 400 (400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C), a concentraciones de 5 mg/0,5 mL (¹H) y 30 mg/0,5 mL (¹³C) en los disolventes perdeuterados CDCl₃, DMSO-*d*₆ y D₂O (99,9 % D). Los valores de desplazamiento químico están referidos a las siguientes referencias: tetrametilsilano (SiMe₄, TMS, δ = 0,00 ppm) en espectros de ¹H-RMN en CDCl₃, y la señal residual del propio CDCl₃ en ¹³C-RMN (δ = 77,0 ppm); DMSO-*d*₆ tanto en espectros realizados en ¹H-RMN (δ = 2,50 ppm) como en ¹³C-RMN (δ = 39,7 ppm) en este mismo disolvente; por último, en D₂O, al HDO residual (δ = 4,79 ppm) en ¹H-RMN, y a dioxano (δ = 67,8 ppm) en ¹³C-RMN. El aspecto y la

multiplicidad de las señales de RMN de protones se indican mediante las abreviaturas siguientes: s, singlete; sa, singlete ancho; d, doblete; dd, doble doblete; t, triplete; dt, doble triplete; c, cuadruplete; q, quintuplete; m, multiplete. La interpretación de los espectros se facilitó empleando las siguientes experiencias:

- a) Desacoplamiento selectivo de protones.
- b) Intercambio isotópico con óxido de deuterio.
- c) Correlación homo- y heteronuclear.
- d) DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*).

Cálculos teóricos.

Los cálculos semiempíricos, DFT y *ab initio* se realizaron por medio de los programas GAUSSIAN 94¹⁵⁷ y GAUSSIAN 98¹⁵⁸ en las estaciones de trabajo IBM RS/6000 y en el *Beowulf Cluster* de nuestro departamento. Este último está compuesto por 15 ordenadores PC equipados con procesadores AMD a 1 GHz. Los puntos

¹⁵⁷ M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, T. Keith, G. A. Petersson, J. A. Montgomery, K. Raghavachari, M. A. Al-Laham, V. G. Zakrzewski, J. V. Ortiz, J. B. Foresman, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, A. Nanayakkara, M. Challacombe, C. Y. Peng, P. Y. Ayala, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, E. S. Replogle, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, J. S. Binkley, D. J. Defrees, J. Baker, J. P. Stewart, M. Head-Gordon, C. Gonzalez y J. A. Pople, *Gaussian 94*, revisión D.1; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, 1995.

¹⁵⁸ M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. W. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, Jr., R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E. S. Replogle y J. A. Pople, *Gaussian*, Inc.: Pittsburgh, 1998.

estacionarios se caracterizaron mediante cálculos de frecuencias para verificar que los mínimos energéticos y los puntos de silla tenían cero y una frecuencias imaginarias, respectivamente. Se calcularon las energías vibracionales del punto cero (ZPE) y se escalaron según los correspondientes niveles de teoría, B3LYP/6-31G* (0,9806), HF/6-31G** (0,9181), MP2/6-31G* (0,9670) y MP2/6-31+G** (sin escalar).¹⁵⁹ Los efectos del disolvente se evaluaron mediante cálculos DFT según la teoría del campo de reacción autoconsistente (*self-consistent reaction field*, SCRF) de Onsager.⁷⁴

¹⁵⁹ A. P. Scott y L. Radom, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 16502-16513.

4.2. Productos de partida.

4.2.1. Amidas comerciales utilizadas en esta Tesis.

- *N*-Metilacetamida **2** (Aldrich).
- *N*-Etilacetamida **7** (Aldrich).
- *N*-Metilformamida **21** (Aldrich).
- 2-Pirrolidona **29** (Aldrich).
- δ -Valerolactama **30** (Acros).
- *N*-Metilpropionamida **31** (Aldrich).

4.2.2. Reactivos y disolventes.

- Metilamina (Fluka).
- Etilamina (Aldrich).
- Isopropilamina (Acros).
- 1-Metilbencilamina (Aldrich).
- Bencilamina (Merck).
- Difenilmetilamina (Aldrich).
- Propilamina (Carlo Erba).
- 1-Metilpropilamina (Aldrich).
- Anhídrido acético (Panreac).
- Ácido fórmico (Probus).

- Cloruro de propionilo (Acros).
- Cloruro de isobutirilo (Acros).
- Ácido 2-fenilpropiónico (Acros).
- Cloruro de tionilo (Aldrich).
- Diclorometano (Panreac).
- Ácido clorhídrico (Panreac).
- Bicarbonato sódico (Scharlau).
- Sulfato sódico (Scharlau).
- Éter etílico (Scharlau).
- Etanol 96 % (Scharlau).

4.3. Procedimientos sintéticos.

Las acetamidas **2** y **7**, la formamida **21**, las amidas cíclicas **29** y **30** y la propionamida **31** se obtuvieron de distribuidores comerciales, sin que fuera necesaria su purificación previa. Las gluconamidas **12-20** se obtuvieron según se describe en la referencia 83.

Las acetamidas **9-11** se sintetizaron según el siguiente procedimiento:

Procedimiento General (A). A una disolución de la amina correspondiente (0,1 mol) en diclorometano (25 mL) a 0 °C se añadió anhídrido acético (0,05 mol) gota a gota y se agitó durante 24 horas. Pasado este tiempo, se lavó con agua, y de ésta se extrajo con diclorometano. Reunidas las fracciones orgánicas, se secaron con sulfato sódico y se evaporaron a sequedad.

Las formamidas **22-28** se prepararon siguiendo el siguiente procedimiento, basado en el descrito para **23**:⁷⁸

Procedimiento General (B). Sobre la amina correspondiente (0,25 mol), mantenida a 0 °C, se añadió gota a gota una cantidad equimolar de ácido fórmico. Seguidamente, se sometió la mezcla de reacción a reflujo durante 6 horas.

Las propionamidas **32** y **33**, isobutiramidas **34-36** y 2-fenilpropionamidas **37-39** se obtuvieron según el siguiente procedimiento, basado en el descrito para la *N*-metilisobutiramida (**34**):⁷⁸

Procedimiento General (C). Sobre la amina correspondiente (0,25 mol), mantenida a 0 °C, se añadió gota a gota una cantidad equimolar del cloruro de acilo

necesario en cada caso. Seguidamente, la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 6 horas, tras lo cual se disolvió en diclorometano y se lavó con ácido clorhídrico 1 M, disolución saturada de bicarbonato sódico y agua, y se extrajeron estas fracciones de nuevo con diclorometano. Reunidas las fracciones orgánicas, se secaron con sulfato sódico y se evaporaron a sequedad.

N-Metilacetamida (2): fue adquirida de distribuidores comerciales. ¹H-RMN. CDCl₃ (97,0 % Z, 3,0 % E): δ (ppm) 6,07 (sa, 1H, NH, Z y E), 2,90 (d, 3H, NCH₃, E), 2,80 (d, 3H, NCH₃, Z), 2,03 (s, 3H, COCH₃, E), 1,99 (s, 3H, COCH₃, Z). DMSO-*d*₆ (99,1 % Z, 0,9 % E): δ (ppm) 7,76 (sa, 1H, NH, Z y E), 2,54 (d, 3H, NCH₃, Z), 2,51 (d, 3H, NCH₃, E), 1,82 (s, 3H, COCH₃, E), 1,78 (s, 3H, COCH₃, Z). D₂O (98,3 % Z, 1,7 % E): δ (ppm) 2,86 (d, 3H, NCH₃, E), 2,71 (d, 3H, NCH₃, Z), 2,04 (s, 3H, COCH₃, E), 1,98 (s, 3H, COCH₃, Z). ¹³C-RMN (isómero Z). CDCl₃: δ (ppm) 171,12 (CO), 25,99 (NCH₃), 22,61 (COCH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 169,74 (CO), 25,64 (NCH₃), 22,64 (COCH₃). D₂O: δ (ppm) 175,82 (CO), 27,07 (NCH₃), 22,83 (COCH₃).

N-Etilacetamida (7): fue adquirida de distribuidores comerciales. ¹H-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 5,54 (sa, 1H, NH), 3,28 (q, 2H, CH₂), 1,97 (s, 3H, COCH₃), 1,14 (t, 3H, CH₂CH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 7,75 (sa, 1H, NH), 2,96 (q, 2H, CH₂), 1,71 (s, 3H, COCH₃), 0,93 (t, 3H, CH₂CH₃). D₂O: δ (ppm) 3,17 (c, 2H, CH₂), 1,96 (s, 3H, COCH₃), 1,10 (t, 3H, CH₂CH₃). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 170,08 (CO), 34,23 (CH₂), 23,01 (COCH₃), 14,55 (CH₂CH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 168,97 (CO), 33,50 (CH₂), 22,80 (COCH₃), 14,94 (CH₂CH₃). D₂O: δ (ppm) 174,92 (CO), 35,71 (CH₂), 23,03 (COCH₃), 14,60 (CH₂CH₃).

N-Isopropilacetamida (8): ⁷⁸ sobre *N*-isopropilamina (25 mL, 0,30 mol) se añadió anhídrido acético (15 mL, 0,16 mol) gota a gota y se agitó durante 24 horas.

4.3. Procedimientos sintéticos

Transcurrido este tiempo, se evaporó la amina no reaccionada, y el aceite resultante se evaporó a presión reducida. El destilado se disolvió en diclorometano (100 mL), se lavó con agua y la capa acuosa con diclorometano (50 mL). Reunidas las fracciones orgánicas, se secaron con sulfato sódico y se evaporaron a sequedad, obteniéndose el compuesto **8** como líquido viscoso. P.eb. 92 °C a 7 mm (descrito⁷⁸ 86,5-87,0 °C a 4 mm). ¹H-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 5,36 (sa, 1H, NH), 4,06 (m, 1H, CH), 1,95 (s, 3H, COCH₃), 1,14 (d, 6H, CH(CH₃)₂). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 7,69 (sa, 1H, NH), 3,78 (m, 1H, CH), 1,75 (s, 3H, COCH₃), 1,02 (d, 6H, CH(CH₃)₂). D₂O: δ (ppm) 3,87 (q, 1H, CH), 1,93 (s, 3H, COCH₃), 1,11 (d, 6H, CH(CH₃)₂). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 169,44 (CO), 41,28 (CH), 23,25 (COCH₃), 22,55 (CH(CH₃)₂). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 168,30 (CO), 40,31 (CH), 22,91 (COCH₃), 22,62 (CH(CH₃)₂). D₂O: δ (ppm) 174,04 (CO), 42,93 (CH), 23,19 (COCH₃), 22,57 (CH(CH₃)₂).

N-(1-Metilbencil)acetamida (9): a partir de 1-metilbencilamina se aplicó el Procedimiento General (A) y cristalizó el compuesto **9** en éter de petróleo. P.f. 75,5-76 °C (descrito¹⁶⁰ 75 °C). ¹H-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 7,40-7,29 (m, 5H, Ar), 5,80 (sa, 1H, NH), 5,17 (q, 1H, CH), 2,02 (s, 3H, COCH₃), 1,53 (d, 3H, CHCH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 8,29 (d, 1H, NH), 7,33-7,19 (m, 5H, Ar), 4,89 (q, 1H, CH), 1,83 (s, 3H, COCH₃), 1,32 (d, 3H, CHCH₃). D₂O: δ (ppm) 7,32-7,19 (m, 5H, Ar), 4,78 (c, 1H, CH), 1,89 (s, 3H, COCH₃), 1,32 (d, 3H, CHCH₃). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 169,16 (CO), 143,19, 128,50, 127,19, 126,08 (aromáticos), 48,64 (CH), 23,23 (COCH₃), 21,67 (CHCH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 168,44 (CO), 145,03, 128,43, 126,75, 126,17 (aromáticos), 47,94 (CH), 22,88 (CHCH₃), 22,72 (COCH₃). D₂O: δ (ppm) 174,38 (CO), 144,84, 130,07, 128,60, 126,98 (Ar), 50,68 (CH), 23,05 (COCH₃), 22,66 (CHCH₃).

¹⁶⁰ F. Nerdel, H. Goetz y M. Fenske, *Ann.* **1963**, 665, 21-34; *C. A.* **1963**, 59, 12612d.

N-Bencilacetamida (10): a partir de bencilamina se aplicó el Procedimiento General (A) y cristalizó el compuesto **10** en éter etílico. P.f. 61-62 °C (descrito¹⁶¹ 61 °C). ¹H-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 7,36-7,26 (m, 5H, Ar), 5,77 (sa, 1H, NH), 4,43 (d, 2H, CH₂), 2,03 (s, 3H, COCH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 8,34 (sa, 1H, NH), 7,33-7,23 (m, 5H, Ar), 4,24 (d, 2H, CH₂), 1,86 (s, 3H, COCH₃). D₂O: δ (ppm) 7,40-7,29 (m, 5H, Ar), 4,34 (s, 2H, CH₂), 2,01 (s, 3H, COCH₃). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 170,00 (CO), 138,20, 128,59, 127,72, 127,38 (aromáticos), 43,58 (CH₂), 23,09 (COCH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 139,82, 128,49, 127,47, 126,94 (aromáticos), 42,32 (CH₂), 22,77 (COCH₃). D₂O: δ (ppm) 175,21 (CO), 139,10, 130,00, 128,68, 128,43 (aromáticos), 44,28 (CH₂), 23,05 (COCH₃).

N-Difenilmetilacetamida (11): a partir de difenilmetilamina se aplicó el Procedimiento General (A) y cristalizó el compuesto **11** en etanol 96 %. P.f. 145-146 °C (descrito¹⁶² 146-147 °C). ¹H-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 7,35-7,22 (m, 10 H, Ar), 6,25 (d, 1H, CH), 6,04 (d, 1H, NH), 2,07 (s, 3H, COCH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 8,78 (d, 1H, NH), 7,34-7,22 (m, 10 H, Ar), 6,11 (d, 1H, CH), 1,93 (s, 3H, COCH₃). D₂O: δ (ppm) 7,41-7,36 (m, 10 H, Ar), 6,09 (s, 1H, CH), 2,12 (s, 3H, COCH₃). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 169,12 (CO), 141,48, 128,57, 127,37 (aromáticos), 56,90 (CH), 23,20 (COCH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 168,66 (CO), 142,83, 128,52, 127,45, 127,06 (aromáticos), 56,04 (CH), 22,79 COCH₃).

2,3,4,5,6-Penta-O-acetil-N-metil-D-gluconamida (12): se obtuvo como se indica en la referencia 83. ¹H-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 6,26 (m, 1H, NH), 5,66 (t, 1H, H-3), 5,46 (dd, 1H, H-4), 5,31 (d, 1H, H-2), 5,06 (m, 1H, H-5), 4,32 (dd, 1H, H-6), 4,12

¹⁶¹ B. S. Furniss, A. J. Hannaford, P. W. G. Smith y A. R. Tatchell, *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th ed.; Longman Scientific & Technical: Essex, 1989.

¹⁶² *Dictionary of Organic Compounds*, 4th ed.; Eyre & Spottiswoode, E. & F. N. Spon.: Londres, 1965.

4.3. Procedimientos sintéticos

(dd, 1H, H-6'), 2,82 (d, 3H, NCH₃), 2,20 (s, 3H, OAc), 2,09 (s, 3H, OAc), 2,08 (s, 3H, OAc), 2,07 (s, 3H, OAc), 2,06 (s, 3H, OAc). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 170,6 (CO, OAc), 169,8 (CO, OAc), 169,8 (CO, OAc), 169,6 (CO, OAc), 169,2 (CO, OAc), 166,6 (NCO), 71,4 (C-2), 69,2 (C-4), 69,0 (C-3), 68,6 (C-5), 61,5 (C-6), 26,1 (NCH₃), 20,7 (OAc), 20,6 (OAc).

2,3,4,5,6-Penta-O-acetil-N-etil-D-gluconamida (13): se obtuvo como se indica en la referencia 83. ¹H-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 6,19 (t, 1H, NH), 5,68 (t, 1H, H-3), 5,45 (dd, 1H, H-4), 5,30 (d, 1H, H-2), 5,04 (m, 1H, H-5), 4,32 (dd, 1H, H-6), 4,13 (dd, 1H, H-6'), 3,29 (m, 2H, NCH₂), 2,21 (s, 3H, OAc), 2,12 (s, 3H, OAc), 2,10 (s, 3H, OAc), 2,06 (s, 3H, OAc), 2,05 (s, 3H, OAc), 1,13 (t, 3H, CH₃). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 170,5 (CO, OAc), 169,8 (2C, CO, OAc), 169,6 (CO, OAc), 169,1 (CO, OAc), 165,8 (NCO), 71,6 (C-2), 69,2 (C-4), 68,9 (C-3), 68,6 (C-5), 61,4 (C-6), 34,3 (NCH₂), 20,7 (OAc), 20,6 (OAc), 20,3 (OAc), 14,5 (CH₃).

2,3,4,5,6-Penta-O-acetil-N-isopropil-D-gluconamida (14): se obtuvo como se indica en la referencia 83. ¹H-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 5,97 (d, 1H, NH), 5,69 (t, 1H, H-3), 5,44 (dd, 1H, H-4), 5,26 (d, 1H, H-2), 5,03 (m, 1H, H-5), 4,32 (dd, 1H, H-6), 4,13 (dd, 1H, H-6'), 4,05 (m, 1H, NCH), 2,21 (s, 3H, OAc), 2,11 (s, 3H, OAc), 2,10 (s, 3H, OAc), 2,06 (s, 3H, OAc), 2,05 (s, 3H, OAc), 1,15 (d, 6H, CH₃). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 170,5 (CO, OAc), 169,7 (2C, CO, OAc), 169,5 (CO, OAc), 169,0 (CO, OAc), 164,9 (NCO), 71,7 (C-2), 69,2 (C-4), 68,9 (C-3), 68,6 (C-5), 61,3 (C-6), 41,4 (NCH), 22,3 (CH₃), 22,2 (CH₃), 20,6 (OAc), 20,5 (OAc), 20,3 (OAc).

2,3,4,5,6-Penta-O-acetil-N-propil-D-gluconamida (15): se obtuvo como se indica en la referencia 83. ¹H-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 6,42 (t, 1H, NH), 5,69 (t, 1H, H-3), 5,46 (dd, 1H, H-4), 5,30 (d, 1H, H-2), 5,09 (m, 1H, H-5), 4,32 (dd, 1H, H-6), 4,13 (dd, 1H, H-6'), 3,23 (m, 2H, NCH₂), 2,21 (s, 3H, OAc), 2,11 (s, 3H, OAc), 2,10 (s, 3H, OAc), 2,06 (s, 3H, OAc), 2,05 (s, 3H, OAc), 1,51 (q, 2H, CH₂CH₃), 0,91 (t, 3H, CH₃).

¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 170,3 (CO, OAc), 169,6 (CO, OAc), 169,5 (CO, OAc), 169,4 (CO, OAc), 168,9 (CO, OAc), 165,7 (NCO), 71,5 (C-2), 69,1 (C-4), 68,8 (C-3), 68,4 (C-5), 61,2 (C-6), 40,8 (NCH₂), 20,4 (CH₂CH₃), 20,4 (OAc), 10,9 (CH₃).

2,3,4,5,6-Penta-O-acetil-N-ciclohexil-D-gluconamida (16): se obtuvo como se indica en la referencia 83. **¹H-RMN.** CDCl₃: δ (ppm) 5,98 (d, 1H, NH), 5,69 (t, 1H, H-3), 5,44 (dd, 1H, H-4), 5,27 (d, 1H, H-2), 5,04 (m, 1H, H-5), 4,32 (dd, 1H, H-6), 4,13 (dd, 1H, H-6'), 3,75 (m, 1H, NCH), 2,21 (s, 3H, OAc), 2,11 (s, 3H, OAc), 2,10 (s, 3H, OAc), 2,06 (s, 3H, OAc), 2,05 (s, 3H, OAc), 1,90-1,10 (m, 10H, ciclohexilo). **¹³C-RMN.** CDCl₃: δ (ppm) 170,5 (CO, OAc), 169,8 (2C, CO, OAc), 169,6 (CO, OAc), 169,1 (CO, OAc), 164,9 (NCO), 71,8 (C-2), 69,3 (C-4), 69,0 (C-3), 68,5 (C-5), 61,3 (C-6), 48,2 (NCH), 32,8, 32,6, 25,3, 24,6 (2C), 20,7 (OAc), 20,6 (OAc), 20,3 (OAc).

N-Metil-D-gluconamida (17): se obtuvo como se indica en la referencia 83. **¹H-RMN.** DMSO-*d*₆: δ (ppm) 7,67 (m, 1H, NH), 4,62-3,36 (m, 11H), 2,61 (d, 3H, CH₃). **¹³C-RMN.** DMSO-*d*₆: δ (ppm) 173,2 (C-1), 73,8, 72,5, 71,6, 70,3, 63,5 (C-6), 25,6 (CH₃).

N-Etil-D-gluconamida (18): se obtuvo como se indica en la referencia 83. **¹H-RMN.** DMSO-*d*₆: δ (ppm) 7,67 (t, 1H, NH), 5,40-3,36 (m, 11H), 3,13 (m, 2H, CH₂), 1,02 (t, 3H, CH₃). **¹³C-RMN.** DMSO-*d*₆: δ (ppm) 172,4 (C-1), 73,7, 72,5, 71,6, 70,2, 63,5 (C-6), 33,2 (CH₂), 15,0 (CH₃).

N-Isopropil-D-gluconamida (19) : se obtuvo como se indica en la referencia 83. **¹H-RMN.** DMSO-*d*₆: δ (ppm) 7,33 (d, 1H, NH), 5,37-3,37 (m, 11H), 3,89 (m, 1H, NCH), 1,07 (d, 6H, CH₃), 0,84 (t, 3H, CH₃). **¹³C-RMN.** DMSO-*d*₆: δ (ppm) 171,6 (C-1), 73,6, 72,5, 71,6, 70,2, 63,5 (C-6), 40,3 (NCH), 22,4 (2C, CH₃).

N-Propil-D-gluconamida (20): se obtuvo como se indica en la referencia 83. **¹H-RMN.** DMSO-*d*₆: δ (ppm) 7,66 (t, 1H, NH), 5,43-3,38 (m, 11H), 3,05 (q, 2H,

4.3. Procedimientos sintéticos

NCH₂), 1,43 (q, 2H, CH₂CH₃), 0,84 (t, 3H, CH₃). ¹³C-RMN. DMSO-*d*₆: δ (ppm) 172,7 (C-1), 73,9, 72,7, 71,7, 70,3, 63,6 (C-6), 39,9 (NCH₂), 22,3 (CH₂CH₃), 11,6 (CH₃).

N-Metilformamida (21): fue adquirida de distribuidores comerciales. ¹H-RMN. CDCl₃ (88,5 % *Z*, 11,5 % *E*): δ (ppm) 8,19 (s, 1H, HCO, *Z*), 8,04 (d, 1H, HCO, *E*), 5,83 (sa, 1H, NH, *Z* y *E*), 2,94 (d, 3 H, CH₃, *E*), 2,86 (d, 3H, CH₃, *Z*). DMSO-*d*₆ (93,4 % *Z*, 6,6 % *E*): δ (ppm) 8,00 (s, 1H, HCO, *Z*), 7,90 (d, 1H, HCO, *E*), 7,89 (sa, 1H, NH, *Z* y *E*), 2,71 (d, 3H, CH₃, *E*), 2,58 (d, 3H, CH₃, *Z*). D₂O (90,8 % *Z*, 9,2 % *E*): δ (ppm) 8,01 (s, 1H, HCO, *Z*), 7,92 (s, 1H, HCO, *E*), 2,87 (s, 3H, CH₃, *E*), 2,74 (s, 3H, CH₃, *Z*). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 165,36 (CO, *E*), 162,20 (CO, *Z*), 27,86 (CH₃, *E*), 24,53 (CH₃, *Z*). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 165,38 (CO, *E*), 161,91 (CO, *Z*), 27,62 (CH₃, *E*), 24,31 (CH₃, *Z*). D₂O: δ (ppm) 165,41 (CO, *E*), 162,30 (CO, *Z*), 25,44 (CH₃, *E*), 21,84 (CH₃, *Z*).

N-Etilformamida (22): a partir de etilamina se aplicó el Procedimiento General (B). La mezcla de reacción resultante se disolvió en diclorometano y se lavó con ácido clorhídrico 1 M, disolución saturada de bicarbonato sódico y agua, y se extrajeron estas fracciones de nuevo con diclorometano. Reunidas las fracciones orgánicas, se secaron con sulfato sódico y se evaporaron a sequedad, obteniéndose el compuesto **22** como líquido viscoso. P.eb. 197-199 °C (descrito¹⁶³ 198 °C). ¹H-RMN. CDCl₃ (79,6 % *Z*, 20,4 % *E*): δ (ppm) 8,15 (s, 1H, HCO, *Z*), 8,06 (s, 1H, HCO, *E*), 6,08 (sa, 1H, NH, *E*), 5,64 (sa, 1H, NH, *Z*), 3,36 (q, 2H, CH₂, *Z*), 3,29 (q, 2H, CH₂, *E*), 1,24 (t, 3H, CH₃, *E*), 1,18 (t, 3H, CH₃, *Z*). DMSO-*d*₆ (89,6 % *Z*, 10,4 % *E*): δ (ppm) 8,15 (s, 1H, HCO, *E*), 7,96 (s, 1H, HCO, *Z*), 3,35 (sa, 1H, NH, *Z* y *E*), 3,09 (q, 2H, CH₂, *Z* y *E*), 1,04 (t, 3H, CH₃, *E*), 1,02 (t, 3H, CH₃, *Z*). D₂O (87,8 % *Z*, 12,2 % *E*): δ (ppm) 8,27 (s, 1H, HCO, *E*), 8,00 (s, 1H, HCO, *Z*), 3,29 (c, 2H, CH₂, *Z*), 3,26 (c, 2H, CH₂, *E*), 1,16 (t, 3H, CH₃ *E*), 1,14 (t,

¹⁶³ M. Liler, *J. Chem. Soc. B: Phys. Org.* **1971**, 334-338.

3H, CH₃ Z). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 164,87 (CO, E), 161,47 (CO, Z), 36,75 (CH₂, E), 32,97 (CH₂, Z), 16,53 (CH₃, E), 14,47 (CH₃, Z). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 164,47 (CO, E), 161,02 (CO, Z), 35,95 (CH₂, E), 32,20 (CH₂, Z), 17,09 (CH₃, E), 14,86 (CH₃, Z). D₂O: δ (ppm) 168,37 (CO, E), 165,20 (CO, Z), 38,38 (CH₂, E), 34,38 (CH₂, Z), 16,69 (CH₃, E), 14,74 (CH₃, Z).

N-Isopropilformamida (23): a partir de isopropilamina se aplicó el Procedimiento General (B). La mezcla de reacción resultante se destiló a presión reducida y se recogió la fracción entre 53 y 61 °C, que se disolvió en diclorometano y se lavó con agua, extrayendo de nuevo la capa acuosa con diclorometano. Reunidas las fracciones orgánicas, se secaron con sulfato sódico y se evaporaron a sequedad, obteniéndose el compuesto **23** como líquido viscoso. P.eb. 78 °C a 7 mm (descrito⁷⁸ 70,0 °C a 1,5 mm). ¹H-RMN. CDCl₃ (77,9 % Z, 22,1 % E): δ (ppm) 8,12 (d, 1H, HCO, E), 8,09 (s, 1H, HCO, Z), 6,01 (sa, 1H, NH, E), 5,59 (sa, 1H, NH, E), 4,18 (m, 1H, CH, Z), 3,71 (m, 1H, CH, E), 1,25 (d, 6H, CH(CH₃)₂, E), 1,19 (d, 6H, CH(CH₃)₂, Z). DMSO-*d*₆ (87,1 % Z, 12,9 % E): δ (ppm) 7,98 (d, 1H, HCO, E), 7,90 (s, 1H, NH, E), 7,89 (s, 1H, HCO, Z), 7,75 (sa, 1H, NH, Z), 3,88 (m, 1H, CH, Z), 3,59 (m, 1H, CH, E), 1,09 (d, 6H, CH(CH₃)₂, E), 1,05 (d, 6H, CH(CH₃)₂, Z). D₂O (82,4 % Z, 17,6 % E): δ (ppm) 7,99 (s, 1H, HCO, E), 7,89 (s, 1H, HCO, Z), 3,96 (m, 1H, CH, Z), 3,71 (m, 1H, CH, E), 1,17 (d, 6H, CH(CH₃)₂, E), 1,13 (d, 6H, CH(CH₃)₂, Z). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 163,84 (CO, E), 160,65 (CO, Z), 44,30 (CH, E), 40,21 (CH, Z), 24,04 (CH(CH₃)₂, E), 22,46 (CH(CH₃)₂, Z). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 163,51 (CO, E), 160,22 (CO, Z), 43,39 (CH, E), 39,48 (CH, Z), 24,20 (CH(CH₃)₂, E), 22,52 (CH(CH₃)₂, Z). D₂O: δ (ppm) 167,43 (CO, E), 164,29 (CO, Z), 46,27 (CH, E), 41,85 (CH, Z), 23,9 (CH(CH₃)₂, E), 22,63 (CH(CH₃)₂, Z).

N-(1-Metilbencil)formamida (24): a partir de 1-metilbencilamina se aplicó el Procedimiento General (B). La mezcla de reacción resultante se evaporó a presión

4.3. Procedimientos sintéticos

reducida hasta obtener un residuo que se disolvió en éter etílico, cristalizando el compuesto **24**. P.f. 46 °C. ¹H-RMN. CDCl₃ (81,2 % Z, 18,8 % E): δ (ppm) 8,18 (s, 1H, HCO, Z), 8,17 (d, 1H, HCO, E), 7,39-7,26 (m, 5H, Ar, Z y E), 5,79 (sa, 1H, NH, Z y E), 5,23 (q, 1H, CH, Z), 4,71 (q, 1H, CH, E), 1,57 (d, 3H, CH₃, E), 1,53 (d, 3H, CH₃, Z). DMSO-*d*₆ (86,6 % Z, 13,4 % E): δ (ppm) 8,54 (d, 1H, NH, Z y E), 8,09 (d, 1H, HCO, E), 8,02 (s, 1H, HCO, Z), 7,36-7,21 (m, 5H, Ar, Z y E), 4,98 (q, 1H, CH, Z), 4,69 (q, 1H, CH, E), 1,40 (d, 3H, CH₃, E), 1,35 (d, 3H, CH₃, Z). D₂O (88,3 % Z, 11,7 % E): δ (ppm) 8,08 (s, 1H, HCO, E), 8,02 (s, 1H, HCO, Z), 7,42-7,30 (m, 5H, Ar, Z y E), 4,97 (c, 1H, CH, Z), 4,79 (c, 1H, CH, E), 1,51 (d, 3H, CH₃, E), 1,44 (d, 3H, CH₃, Z). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 164,23 (CO, E), 160,47 (CO, Z), 142,82 (E), 142,70 (Z), 128,75 (E), 128,53 (Z), 127,56 (E), 127,26 (Z), 125,99 (Z), 125,65 (E) (aromáticos), 51,68 (CH, E), 47,43 (CH, Z), 23,40 (CH₃, E), 21,74 (CH₃, Z). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 160,28 (CO, Z), 144,37 (Z), 128,66 (E), 128,54 (Z), 127,14 (E), 126,97 (Z), 126,17 (Z), 126,09 (E) (aromáticos), 50,98 (CH, E), 46,76 (CH, Z), 23,65 (CH₃, E), 22,67 (CH₃, Z). D₂O: δ (ppm) 168,17 (CO, E), 164,51 (CO, Z), 144,46 (E), 144,29 (Z), 130,19 (E), 130,13 (Z), 128,96 (E), 128,74 (Z), 127,19 (E), 127,06 (Z) (aromáticos), 53,35 (CH, E), 49,52 (CH, Z), 23,18 (CH₃, E), 22,71 (CH₃, Z).

N-Bencilformamida (25): a partir de bencilamina se aplicó el Procedimiento General (B). La mezcla de reacción resultante se evaporó a presión reducida hasta obtener un residuo que se disolvió en éter etílico, cristalizando el compuesto **25**. P.f. 63 °C (descrito¹⁶⁴ 60 °C). ¹H-RMN. CDCl₃ (83,3 % Z, 16,7 % E): δ (ppm) 8,27 (s, 1H, HCO, Z), 8,19 (d, 1H, HCO, E), 7,39-7,21 (m, 5H, Ar, Z y E), 5,89 (sa, 1H, NH, Z y E), 4,49 (d, 2H, CH₂, Z), 4,42 (d, 2H, CH₂, E). DMSO-*d*₆ (88,9 % Z, 11,1 % E): δ (ppm)

¹⁶⁴ Z. Rappoport, *Handbook of tables for Organic Compound Identification*, 3rd ed.; CRC Press: Boca Raton, 1967.

8,51 (sa, 1H, NH, *Z y E*), 8,13 (s, 1H, HCO, *Z*), 8,11 (d, 1H, HCO, *E*), 7,37-7,23 (m, 5H, Ar, *Z y E*), 4,32 (d, 2H, CH₂, *E*), 4,30 (d, 2H, CH₂, *Z*). D₂O (89,0 % *Z*, 11,0 % *E*): δ (ppm) 8,14 (s, 1H, HCO, *Z*), 8,13 (s, 1H, HCO, *E*), 7,42-7,32 (m, 5H, Ar, *Z y E*), 4,45 (s, 2H, CH₂, *E*), 4,42 (s, 2H, CH₂, *Z*). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 164,66 (CO, *E*), 161,08 (CO, *Z*), 137,54 (*Z*), 137,42 (*E*), 128,80 (*E*), 128,62 (*Z*), 127,83 (*E*), 127,62 (*Z*), 127,50 (*Z*), 126,86 (*E*) (aromáticos), 45,54 (CH₂, *E*), 41,98 (CH₂, *Z*). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 165,16 (CO, *E*), 161,27 (CO, *Z*), 139,87 (*E*), 139,21 (*Z*), 128,68 (*E*), 128,57 (*Z*), 127,52 (*Z*), 127,28 (*E*), 127,11 (*Z*) (aromáticos), 44,77 (CH₂, *E*), 40,94 (CH₂, *Z*). D₂O: δ (ppm) 168,91 (CO, *E*), 165,41 (CO, *Z*), 139,13 (*E*), 138,69 (*Z*), 130,07 (*Z*), 129,84 (*E*), 129,04 (*E*), 128,79 (*Z*), 128,51 (*Z*) (aromáticos), 46,82 (CH₂, *E*), 42,90 (CH₂, *Z*).

***N*-Difenilmetilformamida (26)**: a partir de difenilmetilamina se aplicó el Procedimiento General (B). La mezcla de reacción resultante se evaporó a presión reducida hasta obtener un residuo que se disolvió en éter etílico, cristalizando el compuesto **26**. P.f. 108-109 °C. ¹H-RMN. CDCl₃ (83,6 % *Z*, 16,4 % *E*): δ (ppm) 8,32 (s, 1H, HCO, *Z*), 8,23 (d, 1H, HCO, *E*), 7,39-7,23 (m, 10H, Ar, *Z y E*), 6,34 (d, 1H, CH, *Z*), 6,16 (sa, 1H, NH, *Z y E*), 5,78 (d, 1H, CH, *E*). DMSO-*d*₆ (90,3 % *Z*, 9,7 % *E*): δ (ppm) 9,11 (d, 1H, NH, *Z*), 8,96 (t, 1H, NH, *E*), 8,25 (d, 1H, HCO, *E*), 8,16 (s, 1H, HCO, *Z*), 7,36-7,23 (m, 10H, Ar, *Z y E*), 6,17 (d, 1H, CH, *Z*), 5,90 (d, 1H, CH, *E*). D₂O (86,2 % *Z*, 13,8 % *E*): δ (ppm) 8,30 (s, 1H, HCO, *E*), 8,22 (s, 1H, HCO, *Z*), 7,53-7,37 (m, 10H, Ar, *Z y E*), 6,13 (d, 1H, CH, *Z*), 5,99 (d, 1H, CH, *E*). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 164,34 (CO, *E*), 160,26 (CO, *Z*), 140,88 (*Z*), 140,79 (*E*), 128,87 (*E*), 128,65 (*Z*), 127,93 (*E*), 127,53 (*Z*), 127,32 (*Z*), 127,17 (*E*) (aromáticos), 59,87 (CH, *E*), 55,58 (CH, *Z*). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 164,64 (CO, *E*), 160,39 (CO, *Z*), 142,88 (*E*), 142,39 (*Z*), 128,96 (*E*), 128,65 (*Z*), 128,41 (*E*), 127,32 (*Z*), 127,25 (*Z*), 127,00 (*E*) (aromáticos), 59,06 (CH, *E*), 54,73 (CH, *Z*).

4.3. Procedimientos sintéticos

N-(1-Metilpropil)formamida (27): a partir de 1-metilpropilamina se aplicó el Procedimiento General (B). La mezcla de reacción resultante se disolvió en diclorometano y se lavó con ácido clorhídrico 1 M, disolución saturada de bicarbonato sódico y agua, y se extrajeron estas fracciones acuosas de nuevo con diclorometano. Reunidas las fracciones orgánicas, se secaron con sulfato sódico y se evaporaron a sequedad, obteniéndose el compuesto **27** como líquido viscoso. ¹H-RMN. CDCl₃ (72,9 % Z, 27,1 % E): δ (ppm) 8,15 (s, 1H, HCO, Z), 8,09 (d, 1H, HCO, E), 5,47 (sa, 1H, NH, E), 5,35 (sa, 1H, NH, Z), 4,02 (m, 1H, CH, Z), 3,42 (m, 1H, CH, E), 1,50 (m, 2H, CH₂, Z y E), 1,22 (d, 3H, CHCH₃, E), 1,16 (d, 3H, CHCH₃, Z), 0,93 (m, 3H, CH₂CH₃, Z y E). DMSO-*d*₆ (84,0 % Z, 16,0 % E): δ (ppm) 7,95 (s, 1H, HCO, Z), 7,94 (d, 1H, HCO, E), 7,85 (sa, 1H, NH, Z), 7,59 (sa, 1H, NH, E), 3,72 (m, 1H, CH, Z), 3,40 (m, 1H, CH, E), 1,38 (m, 2H, CH₂, Z y E), 1,07 (d, 3H, CHCH₃, E), 1,02 (d, 3H, CHCH₃, Z), 0,82 (t, 3H, CH₂CH₃, Z y E). D₂O (81,9 % Z, 18,1 % E): δ (ppm) 7,98 (s, 1H, HCO, Z), 3,81 (m, 1H, CH, Z), 3,45 (m, 1H, CH, E), 1,50 (m, 2H, CH₂, E), 1,44 (m, 2H, CH₂, Z), 1,18 (d, 3H, CHCH₃, E), 1,12 (d, 3H, CHCH₃, Z), 0,86 (t, 3H, CH₂CH₃, Z y E). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 163,87 (CO, E), 160,62 (CO, Z), 49,91 (CH, E), 45,42 (CH, Z), 30,64 (CH₂, E), 29,46 (CH₂, Z), 22,03 (CHCH₃, E), 20,31 (CHCH₃, Z), 10,29 (CH₂CH₃, E), 10,21 (CH₂CH₃, Z). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 163,86 (CO, E), 160,44 (CO, Z), 49,13 (CH, E), 44,61 (CH, Z), 30,16 (CH₂, E), 29,00 (CH₂, Z), 22,14 (CHCH₃, E), 20,37 (CHCH₃, Z), 10,53 (CH₂CH₃, Z y E). D₂O: δ (ppm) 167,83 (CO, E), 164,62 (CO, Z), 52,06 (CH, E), 47,29 (CH, Z), 30,82 (CH₂, E), 29,86 (CH₂, Z), 22,00 (CHCH₃, E), 20,68 (CHCH₃, Z), 10,88 (CH₂CH₃, Z y E).

N-Propilformamida (28): a partir de propilamina se aplicó el Procedimiento General (B). La mezcla de reacción resultante se disolvió en diclorometano y se lavó con ácido clorhídrico 1 M, disolución saturada de bicarbonato sódico y agua, y se extrajeron estas fracciones acuosas de nuevo con diclorometano. Reunidas las

fracciones orgánicas, se secaron con sulfato sódico y se evaporaron a sequedad, obteniéndose el compuesto **28** como líquido viscoso. $^1\text{H-RMN}$. CDCl_3 (78,9 % *Z*, 21,1 % *E*): δ (ppm) 8,18 (s, 1H, HCO, *Z*), 8,05 (d, 1H, HCO, *E*), 5,59 (sa, 1H, NH, *Z* y *E*), 3,28 (c, 2H, NCH₂, *Z*), 3,19 (c, 2H, NCH₂, *E*), 1,57 (m, 2H, CH₂CH₃, *Z* y *E*), 0,95 (t, 3H, CH₃, *Z* y *E*). $\text{DMSO-}d_6$: δ (ppm) 7,99 (s, 1H, HCO, *Z*), 7,98 (sa, 1H, NH, *Z* y *E*), 7,92 (d, 1H, HCO, *E*), 3,03 (c, 2H, NCH₂, *Z*), 3,02 (c, 2H, NCH₂, *E*), 1,42 (m, 2H, CH₂CH₃, *Z* y *E*), 0,84 (t, 3H, CH₃, *Z* y *E*). D_2O (85,4 % *Z*, 14,6 % *E*): δ (ppm) 8,02 (s, 1H, HCO, *Z*), 7,96 (s, 1H, HCO, *E*), 3,20 (c, 2H, NCH₂, *E*), 3,19 (c, 2H, NCH₂, *Z*), 1,53 (m, 2H, CH₂CH₃, *Z* y *E*), 0,89 (t, 3H, CH₃, *Z* y *E*). $^{13}\text{C-RMN}$. CDCl_3 : δ (ppm) 164,94 (CO, *E*), 161,43 (CO, *Z*), 43,57 (NCH₂, *E*), 39,81 (NCH₂, *Z*), 24,32 (CH₂CH₃, *E*), 22,67 (CH₂CH₃, *Z*), 11,23 (CH₃, *Z*), 10,84 (CH₃, *E*). $\text{DMSO-}d_6$: δ (ppm) 164,75 (CO, *E*), 161,15 (CO, *Z*), 42,82 (NCH₂, *E*), 39,09 (NCH₂, *Z*), 24,34 (CH₂CH₃, *E*), 22,52 (CH₂CH₃, *Z*), 11,55 (CH₃, *Z*), 11,05 (CH₃, *E*). D_2O : δ (ppm) 168,72 (CO, *E*), 165,41 (CO, *Z*), 45,02 (NCH₂, *E*), 41,04 (NCH₂, *Z*), 24,54 (CH₂CH₃, *E*), 22,99 (CH₂CH₃, *Z*), 11,77 (CH₃, *Z*), 11,33 (CH₃, *E*).

2-Pirrolidona (29): fue adquirida de distribuidores comerciales. $^1\text{H-RMN}$. CDCl_3 : δ (ppm) 6,50 (sa, 1H, NH), 3,41 (t, 2H, NCH₂), 2,31 (t, 2H, COCH₂), 2,16 (q, 2H, CH₂CH₂CH₂). $\text{DMSO-}d_6$: δ (ppm) 7,50 (sa, 1H, NH), 3,20 (t, 2H, NCH₂), 2,06 (t, 2H, COCH₂), 1,96 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂). D_2O : δ (ppm) 3,43 (t, 2H, NCH₂), 2,35 (t, 2H, COCH₂), 2,13 (q, 2H, CH₂CH₂CH₂). $^{13}\text{C-RMN}$. CDCl_3 : δ (ppm) 179,43 (CO), 42,22 (NCH₂), 30,04 (COCH₂), 20,61 (CH₂CH₂CH₂).

δ -Valerolactama (30): fue adquirida de distribuidores comerciales. $^1\text{H-RMN}$. CDCl_3 : δ (ppm) 6,38 (sa, 1H, NH), 3,31 (m, 2H, NCH₂), 2,37 (t, 2H, COCH₂), 1,80 (m, 4H, NCH₂ y COCH₂). $\text{DMSO-}d_6$: δ (ppm) 7,38 (sa, 1H, NH), 3,10 (dt, 2H, NCH₂), 2,11 (t, 2H, COCH₂), 1,64 (m, 4H, NCH₂ y COCH₂). D_2O : δ (ppm) 3,28 (t, 2H, NCH₂), 2,32

4.3. Procedimientos sintéticos

(t, 2H, COCH₂), 1,77 (m, 4H, NCH₂ y COCH₂). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 172,61 (CO), 42,06 (NCH₂), 31,38 (COCH₂), 22,13 (NCH₂CH₂), 20,74 (COCH₂CH₂).

N-Metilpropionamida (31): fue adquirida de distribuidores comerciales. ¹H-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 5,65 (sa, 1H, NH), 2,82 (d, 3H, NCH₃), 2,22 (c, 2H, CH₂), 1,17 (t, 3H, CH₂CH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 7,67 (sa, 1H, NH), 2,54 (d, 3H, NCH₃), 2,04 (c, 2H, CH₂), 0,97 (t, 3H, CH₂CH₃). D₂O: δ (ppm) 2,70 (s, 3H, NCH₃), 2,22 (c, 2H, CH₂), 1,08 (t, 3H, CH₂CH₃). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 174,76 (CO), 29,34 (CH₂), 26,05 (NCH₃), 9,78 (CH₂CH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 173,56 (CO), 28,67 (CH₂), 25,64 (NCH₃), 10,17 (CH₂CH₃). D₂O: δ (ppm) 179,70 (CO), 30,25 (CH₂), 27,02 (NCH₃), 10,76 (CH₂CH₃).

N-Etilpropionamida⁷⁸ (**32**): a partir de etilamina y cloruro de propionilo se aplicó el Procedimiento General (C) y se obtuvo el compuesto **32** como líquido viscoso. P.eb. 91 °C a 7 mm (descrito⁷⁸ 79,5-80,5 °C a 1 mm). ¹H-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 5,41 (sa, 1H, NH), 3,30 (q, 2H, NCH₂), 2,19 (c, 2H, COCH₂), 1,19-1,11 (m, 6H, NCH₂CH₃ y COCH₂CH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 7,70 (sa, 1H, NH), 3,04 (q, 2H, NCH₂), 2,03 (c, 2H, COCH₂), 1,01-0,95 (m, 6H, NCH₂CH₃ y COCH₂CH₃). D₂O: δ (ppm) 3,19 (c, 2H, NCH₂), 2,23 (c, 2H, COCH₂), 1,11 (t, 6H, NCH₂CH₃ y COCH₂CH₃). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 173,76 (CO), 34,20 (NCH₂), 29,62 (COCH₂), 14,74 (NCH₂CH₃), 9,83 (COCH₂CH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 172,69 (CO), 33,42 (NCH₂), 28,70 (COCH₂), 14,99 (NCH₂CH₃), 10,15 (COCH₂CH₃). D₂O: δ (ppm) 178,90 (CO), 35,59 (NCH₂), 30,41 (COCH₂), 14,70 (NCH₂CH₃), 10,82 (COCH₂CH₃).

N-Isopropilpropionamida (33): a partir de etilamina y cloruro de propionilo se aplicó el Procedimiento General (C). El residuo resultante se disolvió en éter etílico, cristalizando el compuesto **33**. P.f. 51,0-51,5 °C. ¹H-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 5,30 (sa, 1H, NH), 4,08 (m, 1H, NCH), 2,16 (c, 2H, COCH₂), 1,15 (d, 6H, CH(CH₃)₂), 1,14 (t,

3H, CH₂CH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 7,57 (sa, 1H, NH), 3,80 (m, 1H, NCH), 2,01 (c, 2H, COCH₂), 1,02 (d, 6H, CH(CH₃)₂), 0,97 (t, 3H, CH₂CH₃). D₂O: δ (ppm) 3,89 (m, 1H, NCH), 2,19 (c, 2H, COCH₂), 1,12 (d, 6H, CH(CH₃)₂), 1,09 (t, 3H, CH₂CH₃). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 172,94 (CO), 40,93 (NCH), 29,58 (COCH₂), 22,51 (CH(CH₃)₂), 9,78 CH₂CH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 172,08 (CO), 40,30 (NCH), 28,76 (COCH₂), 22,62 (CH(CH₃)₂), 10,17 CH₂CH₃). D₂O: δ (ppm) 177,96 (CO), 42,75 (NCH), 30,56 (COCH₂), 22,64 (CH(CH₃)₂), 11,00 CH₂CH₃).

N-Metilisobutiramida (34): a partir de metilamina y cloruro de isobutirilo se aplicó el Procedimiento General (C) y se obtuvo el compuesto **34** como líquido viscoso. P.eb. 88 °C a 7 mm (descrito⁷⁸ 78,0-78,5 °C a 2,5 mm). ¹H-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 5,59 (sa, 1H, NH), 2,81 (d, 3H, NCH₃), 2,36 (q, 1H, COCH), 1,16 (d, 6H, CH(CH₃)₂). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 7,64 (sa, 1H, NH), 2,55 (d, 3H, NCH₃), 2,31 (q, 1H, COCH), 0,98 (d, 6H, CH(CH₃)₂). D₂O: δ (ppm) 2,71 (s, 3H, NCH₃), 2,47 (q, 1H, COCH), 1,09 (d, 6H, CH(CH₃)₂). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 177,75 (CO), 35,45 (CH), 26,17 (NCH₃), 19,56 (CH(CH₃)₂). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 176,62 (CO), 34,19 (CH), 25,61 (NCH₃), 19,77 (CH(CH₃)₂). D₂O: δ (ppm) 182,82 (CO), 36,29 (CH), 27,00 (NCH₃), 19,83 (CH(CH₃)₂).

N-Etilisobutiramida⁷⁸ (**35**): a partir de etilamina y cloruro de isobutirilo se aplicó el Procedimiento General (C). El residuo resultante se disolvió en éter etílico, cristalizando el compuesto **35**. P.f. 72,0-72,5 °C (descrito⁷⁸ 69-71 °C). ¹H-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 5,48 (sa, 1H, NH), 3,29 (q, 2H, NCH₂), 2,33 (q, 1H, COCH), 1,15 (d, 6H, CH(CH₃)₂), 1,14 (t, 3H, CH₂CH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 7,69 (sa, 1H, NH), 3,03 (q, 2H, NCH₂), 2,30 (q, 1H, COCH), 0,98 (t, 3H, CH₂CH₃), 0,97 (d, 6H, CH(CH₃)₂). D₂O: δ (ppm) 3,15 (c, 2H, NCH₂), 2,43 (q, 1H, COCH), 1,06 (t, 3H, CH₂CH₃), 1,05 (d, 6H, CH(CH₃)₂). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 176,83 (CO), 35,44 (CH), 34,05 (NCH₂), 19,51 (CH(CH₃)₂), 14,74 (CH₂CH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 175,85 (CO), 34,13 (CH), 33,33

4.3. Procedimientos sintéticos

(NCH₂), 19,77 (CH(CH₃)₂), 14,97 (CH₂CH₃). D₂O: δ (ppm) 181,99 (CO), 36,34 (CH), 35,49 (NCH₂), 19,83 (CH(CH₃)₂), 14,76 (CH₂CH₃).

N-Isopropilisobutiramida⁷⁸ (**36**): a partir de isopropilamina y cloruro de isobutirilo se aplicó el Procedimiento General (C). El residuo resultante se disolvió en éter etílico, cristalizando el compuesto **36**. P.f. 102,5-103,0 °C (descrito⁷⁸ 102 °C). **¹H-RMN**. CDCl₃: δ (ppm) 5,27 (sa, 1H, NH), 4,07 (m, 1H, NCH), 2,29 (q, 1H, COCH), 1,15 (d, 6H, NCH(CH₃)₂), 1,14 (d, 6H, COCH(CH₃)₂). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 7,54 (d, 1H, NH), 3,79 (m, 1H, NCH), 2,28 (q, 1H, COCH), 1,02 (d, 6H, NCH(CH₃)₂), 0,96 (d, 6H, COCH(CH₃)₂). D₂O: δ (ppm) 3,86 (q, 1H, NCH), 2,39 (q, 1H, COCH), 1,08 (d, 6H, NCH(CH₃)₂), 1,04 (d, 6H, COCH(CH₃)₂). **¹³C-RMN**. CDCl₃: δ (ppm) 176,03 (CO), 40,88 (NCH), 35,56 (COCH), 22,68 (NCH(CH₃)₂), 19,53 (COCH(CH₃)₂). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 175,21 (CO), 34,05 (COCH), 22,58 (NCH(CH₃)₂), 19,77 (COCH(CH₃)₂). D₂O: δ (ppm) 181,11 (CO), 42,60 (NCH), 36,34 (COCH), 22,61 (NCH(CH₃)₂), 19,83 (COCH(CH₃)₂).

N-Metil-2-fenilpropionamida (**37**): a partir de metilamina y cloruro de 2-fenilpropionilo se aplicó el Procedimiento General (C). El residuo resultante se disolvió en éter etílico, cristalizando el compuesto **37**. P.f. 83,5-84,5 °C. **¹H-RMN**. CDCl₃: δ (ppm) 7,37-7,25 (m, 5H, Ar), 5,33 (sa, 1H, NH), 3,55 (c, 1H, COCH), 2,74 (d, 3H, NCH₃), 1,53 (d, 3H, CHCH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 7,87 (d, 1H, NH), 7,31-7,18 (m, 5H, Ar), 3,55 (c, 1H, COCH), 2,54 (d, 3H, NCH₃), 1,31 (d, 3H, CHCH₃). D₂O: δ (ppm) 7,43-7,31 (m, 5H, Ar), 3,73 (c, 1H, COCH), 2,69 (s, 3H, NCH₃), 1,45 (d, 3H, CHCH₃). **¹³C-RMN**. CDCl₃: δ (ppm) 174,75 (CO), 141,33, 128,80, 127,62, 127,16 (aromáticos), 46,94 (CH), 26,41 (NCH₃), 18,44 (CHCH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 173,79 (CO), 142,56, 128,37, 127,40, 126,61 (aromáticos), 45,34 (CH), 25,79 (NCH₃), 18,81 (CHCH₃). D₂O:

δ (ppm) 179,51 (CO), 142,21, 130,19, 128,65, 128,59 (aromáticos), 47,23 (CH), 27,19 (NCH₃), 18,23 (CHCH₃).

N-Etil-2-fenilpropionamida (38): a partir de etilamina y cloruro de 2-fenilpropionilo se aplicó el Procedimiento General (C). El residuo resultante se disolvió en éter etílico, cristalizando el compuesto **38**. P.f. 67,0-67,5 °C. ¹H-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 7,37-7,25 (m, 5H, Ar), 5,34 (sa, 1H, NH), 3,53 (c, 1H, COCH), 3,23 (m, 2H, CH₂), 1,52 (d, 3H, CHCH₃), 1,04 (t, 3H, CH₂CH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 7,94 (sa, 1H, NH), 7,31-7,18 (m, 5H, Ar), 3,54 (c, 1H, COCH), 3,02 (m, 2H, CH₂), 1,30 (d, 3H, CHCH₃), 0,97 (t, 3H, CH₂CH₃). D₂O: δ (ppm) 7,39-7,29 (m, 5H, Ar), 3,68 (c, 1H, COCH), 3,13 (c, 2H, CH₂), 1,41 (d, 3H, CHCH₃), 1,01 (t, 3H, CH₂CH₃). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 173,93 (CO), 141,48, 128,77, 127,56, 127,19 (aromáticos), 47,00 (CH), 34,39 (CH₂), 18,53 (CHCH₃), 14,64 (CH₂CH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 173,06 (CO), 142,62, 128,34, 127,38, 126,55 (aromáticos), 45,30 (CH), 33,61 (CH₂), 18,83 (CHCH₃), 14,83 (CH₂CH₃). D₂O: δ (ppm) 178,69 (CO), 142,29, 130,17, 128,54 (aromáticos), 47,27 (CH), 35,75 (CH₂), 18,21 (CHCH₃), 14,71 (CH₂CH₃).

N-Isopropil-2-fenilpropionamida (39): a partir de isopropilamina y cloruro de 2-fenilpropionilo se aplicó el Procedimiento General (C). El residuo resultante se disolvió en éter etílico, cristalizando el compuesto **39**. P.f. 78-79 °C. ¹H-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 7,36-7,24 (m, 5H, Ar), 5,11 (sa, 1H, NH), 4,03 (m, 1H, NCH), 3,50 (c, 1H, COCH), 1,50 (d, 3H, COCHCH₃), 1,07 (d, 3H, NCHCH₃), 1,02 (d, 3H, NCHCH₃). DMSO-*d*₆: δ (ppm) 7,81 (d, 1H, NH), 7,31-7,17 (m, 5H, Ar), 3,78 (m, 1H, NCH), 3,52 (c, 1H, COCH), 1,29 (d, 3H, COCHCH₃), 1,05 (d, 3H, NCHCH₃), 0,95 (d, 3H, NCHCH₃). D₂O: δ (ppm) 7,46-7,29 (m, 5H, Ar), 3,90 (q, 1H, NCH), 3,70 (c, 1H, COCH), 1,44 (d, 3H, COCHCH₃), 1,13 (d, 3H, NCHCH₃), 1,06 (d, 3H, NCHCH₃). ¹³C-RMN. CDCl₃: δ (ppm) 173,17 (CO), 141,54, 128,74, 127,50, 127,04 (aromáticos), 47,07 (COCH), 41,27 (NCH), 22,53 (NCHCH₃), 22,44 (NCHCH₃), 18,59 (COCHCH₃).

4.3. Procedimientos sintéticos

DMSO-*d*₆: δ (ppm) 172,40 (CO), 142,68, 128,31, 127,32, 126,49 (aromáticos), 45,16 (COCH), 40,44 (NCH), 22,52 (NCHCH₃), 22,44 (NCHCH₃), 18,86 (COCHCH₃).

Cloruro de 2-fenilpropionilo (40): se obtuvo como se ha descrito para el cloruro de butirilo.¹⁶⁵ En un matraz de dos bocas provisto de un sistema de refrigeración de reflujo, conectado a su vez a una trampa de absorción de gases, se colocó cloruro de tionilo (14,3 mL, 0,3 mol), y se añadió gota a gota ácido 2-fenilpropiónico (22,7 mL, 0,25 mol) durante 20 minutos. Tras la adición, se calentó a 80 °C durante 6 horas, y transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción resultante se destiló, recogiendo la fracción próxima a 79 °C.

¹⁶⁵ B. S. Furniss, A. J. Hannaford, P. W. G. Smith y A. R. Tatchell, *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th ed.; Longman Scientific & Technical: Essex, 1989; pp 692-693.

5. Conclusiones

1. Los cálculos teóricos DFT a nivel B3LYP/6-31G* son una herramienta adecuada para el análisis conformacional de amidas secundarias. Para *N*-alquilacetamidas predicen como estructuras más estables las Z_{anti} , en las que ϕ (H-C $_{\alpha}$ -N-H) oscila en fase gaseosa entre 157,7° y 180,0°, y tienen una conformación alternada respecto al diedro ψ (O=C-C-H). Alternativamente, las estructuras más estables para los isómeros *E* son las $E_{anti,eclipsada}$, que son 1,9-3,2 kcal/mol más inestables que las *Z* anteriores. Como excepción, la estructura *E* de la *N*-metilacetamida (**2**) presenta un ϕ cercano a 30°.

2. Hemos evaluado en los disolventes CDCl₃, DMSO-*d*₆ y D₂O el desapantallamiento magnético (σ_H) generado por la función amida sobre los átomos de hidrógeno CON-CH $_{\alpha}$ en las estructuras Z_{anti} , que por ejemplo en CDCl₃ son $\sigma_{anti} = 2,42 \pm 0,04$ ppm, $\sigma_{gauche} = 1,64 \pm 0,01$ ppm, y $\sigma_{anti} - \sigma_{gauche} = 0,78 \pm 0,01$ ppm. Estos desapantallamientos se ven poco afectados por el sustituyente acílico, como se demostró al ampliar el estudio a gluconamidas y formamidas.

3. Las *N*-alquilformamidas presentan a nivel B3LYP/6-31G* un comportamiento similar al de las *N*-alquilacetamidas, siendo las estructuras más estables Z_{anti} y E_{anti} . La diferencia de energía entre ambas estructuras en fase gaseosa es inferior ($E_{anti} - Z_{anti} = 0,7-1,4$ kcal/mol), lo que es coherente con la observación experimental de ambos isómeros mediante RMN en disolución.

4. La extensión del estudio a formamidas nos ha permitido también evaluar en los disolventes CDCl₃, DMSO-*d*₆ y D₂O el desapantallamiento magnético (σ_H) generado por la función amida sobre los átomos de hidrógeno CON-CH $_{\alpha}$ en las

5. CONCLUSIONES

estructuras E_{anti} , que por ejemplo en $CDCl_3$ son $\sigma_{anti} = 1,98 \pm 0,10$ ppm, $\sigma_{gauche} = 2,08 \pm 0,02$ ppm, y $\sigma_{anti} - \sigma_{gauche} = -0,10 \pm 0,02$ ppm.

5. Se ha encontrado una dependencia significativa y sistemática entre el desapantallamiento químico experimental de los protones $CON-CH_\alpha$ con respecto a la estructura, que se puede cuantificar matemáticamente mediante la expresión $\sigma_H = a + 2,16 \cos^2(\alpha-35)/d$ (ecuación [11]) donde σ_H es el desapantallamiento magnético provocado por la función amida, α es el diedro virtual $O-C---C_\alpha-H$, d la distancia en Å entre el protón y el oxígeno carbonílico, y a una constante propia de cada disolvente (1,69 para $CDCl_3$, 1,49 para $DMSO-d_6$ y 1,59 para D_2O). Esta relación empírica permite utilizar el desplazamiento químico observado como prueba experimental de estructura.

6. También se ha realizado un estudio conformacional exhaustivo a nivel B3LYP/6-31G* del grupo acilo de carboxamidas secundarias. Las estructuras más estables en fase gaseosa son las $Z_{anti,alternada}$ ($\phi \sim 180^\circ$, $\psi \sim 180^\circ$), en la que un protón $NCO-CH_\alpha$ ocupa siempre la posición *anti* al carbonilo. Las estructuras E , más inestables, prefieren en carboxamidas con tres y dos protones $NCO-CH_\alpha$ conformaciones eclipsadas para el diedro ψ , en las que un protón y el resto alquílico ocupan la disposición *syn* al carbonilo, respectivamente, mientras que las carboxamidas con un protón $NCO-CH_\alpha$ prefieren una conformación alternada, en la que el protón ocupa la posición *anti* al carbonilo y los sustituyentes la *gauche*. Respecto al ángulo diedro ϕ , las estructuras E presentan también la conformación *anti*, con la excepción de algunas *N*-metilcarboxamidas en las que se ha observado la conformación *syn* o una intermedia entre ambas.

7. Hemos evaluado en los disolventes CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$ y D_2O el desapantallamiento magnético (σ'_H) generado por la función amida sobre los átomos de hidrógeno NCO-CH_α en las carboxamidas, que por ejemplo en CDCl_3 son $\sigma'_{anti} = 0,76 \pm 0,02$ ppm, $\sigma'_{gauche} = 1,22 \pm 0,09$ ppm, y $\sigma'_{anti} - \sigma'_{gauche} = -0,46 \pm 0,09$ ppm, en conformaciones del protón definidas respecto al oxígeno carbonílico.

8. Se ha encontrado también una dependencia significativa y sistemática entre el desapantallamiento químico experimental de los protones NCO-CH_α del grupo acilo con respecto a la estructura, que se puede cuantificar matemáticamente mediante la expresión $\sigma'_H = c + e \cos^2[(\psi-10)/2]/d'$ (ecuación [17]) donde σ'_H es el desapantallamiento magnético provocado por la función amida, ψ el diedro $\text{O-C-C}_\alpha\text{-H}$, d' la distancia en Å entre el protón y el oxígeno carbonílico, y c y e constantes propias de cada disolvente (0,74 y 1,71 para CDCl_3 , 0,74 y 0,69 para $\text{DMSO-}d_6$, y 0,84 y 0,74 para D_2O).

9. Las ecuaciones [11] y [17] desarrolladas para amidas se han utilizado en la investigación de una expresión que calcula los desplazamientos químicos de los protones C_αH , situados en las proteínas entre dos grupos peptídicos ($-\text{NH-CO-CHR-NH-CO-}$). En la ecuación [19], $\delta_{\text{calc.}} = 0,23 + \sigma_R + a + 2,16 \cos^2(\alpha-35)/d + c + e \cos^2[(\psi-10)/2]/d'$, σ_R es un parámetro específico para cada resto de aminoácido en cada disolvente, y que hemos calculado para D_2O .

10. La ecuación [19] puede utilizarse adecuadamente en el cálculo del desplazamiento químico (δ_{calc}) de los protones C_αH de proteínas. Su aplicación en D_2O

5. CONCLUSIONES

mediante un procedimiento automatizado a 2153 aminoácidos de 13 proteínas, descritas en bancos de estructuras, permitió el cálculo de su desplazamiento con un error promedio, o promedio de la diferencia en valor absoluto entre los desplazamientos observados y calculados, $\Sigma(|\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{calc}}|)/n$, de 0,44 ppm, y una desviación estándar sobre el error promedio (SD_{EP}) de 0,35 ppm.

11. Cuando se analiza para cada aminoácido el error promedio y su desviación estándar, se observa que son significativamente superiores en los más hidrofóbicos. También es más alta en los aminoácidos más hidrofóbicos la desviación estándar de los desplazamientos observados, pero no la de los calculados. Ello se ha interpretado como una consecuencia del efecto hidrofóbico, que puede determinar en D_2O la estructura de zonas hidrófobas de la proteína. En aminoácidos específicos con error promedio muy alto pueden observarse interacciones con restos anisotrópicos distantes en la secuencia de la proteína, que no tiene en cuenta nuestra metodología.

Apéndices

A. Fundamento teórico de los cálculos computacionales.

A.1. La ecuación de Schrödinger.

La mecánica cuántica explica cómo entidades como los electrones tienen características propias tanto de partículas como de ondas. La ecuación de Schrödinger²⁷ describe la función de onda de una partícula:

$$\left(\frac{-\hbar^2}{8\pi^2 m} \nabla^2 + V \right) \Psi(\mathbf{r}, t) = \frac{i\hbar}{2\pi} \frac{\delta \Psi(\mathbf{r}, t)}{\delta t} \quad [\text{A1}]$$

donde el operador hamiltoniano que aparecía como H en la ecuación [2] es:

$$H = \frac{-\hbar^2}{8\pi^2 m} \nabla^2 + V \quad [\text{A2}]$$

Además, Ψ es la función de onda, m es la masa de la partícula, \hbar es la constante de Planck y V es el campo de energía potencial en el que se mueve la partícula. ∇ es un operador que equivale a la derivada parcial respecto a las componentes en x , y y z :

$$\nabla = \frac{\delta}{\delta x} \mathbf{i} + \frac{\delta}{\delta y} \mathbf{j} + \frac{\delta}{\delta z} \mathbf{k} \quad [\text{A3}]$$

La función de onda depende de la posición (\mathbf{r}) y del tiempo (t). El producto de Ψ con su conjugado complejo ($\Psi^* \Psi$, que se suele escribir como $|\Psi|^2$) se interpreta como la distribución de probabilidad de la partícula.

Se puede obtener la energía y muchas otras propiedades de la partícula resolviendo la ecuación de Schrödinger para Ψ , sujeta a las condiciones frontera

apropiadas. Las soluciones son muchas funciones de onda diferentes, que corresponden a distintos estados estacionarios del sistema.

Si V no es función del tiempo, la ecuación de Schrödinger puede simplificarse utilizando el recurso matemático conocido como separación de variables. Así, podemos escribir la función de onda como el producto de una función espacial y otra temporal:

$$\Psi(\mathbf{r}, t) = \psi(\mathbf{r})\tau(t) \quad [\text{A4}]$$

y al sustituir estas nuevas funciones en la ecuación [A1], obtendremos dos ecuaciones, una que depende de la posición de la partícula independientemente del tiempo y otra que sólo es función del tiempo. Para la mayoría de los casos, como son los de esta Tesis, esta separación es válida, por lo que nos centraremos exclusivamente en la familiar ecuación de Schrödinger independiente del tiempo:²⁷

$$H\psi(\mathbf{r}) = E\psi(\mathbf{r}) \quad [\text{A5}]$$

donde E es la energía de la partícula.

Las distintas soluciones a la ecuación [A5] corresponden a distintos estados estacionarios de la partícula (molécula). El de menor energía es el llamado *estado fundamental*. La ecuación [A5] es una descripción no relativista del sistema que no es válida por tanto cuando la velocidad de las partículas se aproxima a la velocidad de la luz. Así, esta ecuación no da una descripción precisa de los electrones core (internos) en grandes núcleos. Cabe mencionar también que es una ecuación de valores propios: una ecuación en la que un operador, al actuar sobre una función, produce como resultado un múltiplo de la propia función, con la forma general:

$$\text{Op}f = cf \quad [\text{A6}]$$

donde Op es un operador, f es una función y c es una constante. Las funciones para las que se cumple la ecuación son sus funciones propias, cada una de las cuales tiene un valor asociado de c , conocido como valor propio. En el caso de la ecuación de Schrödinger, los valores propios son las energías correspondientes a los distintos estados estacionarios del sistema molecular.

El operador hamiltoniano. Para un sistema molecular, Ψ es una función de las posiciones de los electrones y el núcleo dentro de la molécula, que designaremos por \mathbf{r} y \mathbf{R} , respectivamente. Nos referiremos a cada electrón o núcleo en particular mediante \mathbf{r}_i y \mathbf{R}_1 . Los electrones se tratan de forma individual, mientras que cada núcleo se trata como un agregado, no se consideran sus componentes de forma individual.

El hamiltoniano está compuesto de dos términos, de energía cinética y potencial:

$$H = T + V \quad [\text{A7}]$$

La energía cinética es la suma de ∇^2 aplicado sobre todas las partículas de la molécula:

$$T = -\frac{\hbar}{8\pi^2} \sum_k \frac{1}{m_k} \left(\frac{\delta^2}{\delta x_k^2} + \frac{\delta^2}{\delta y_k^2} + \frac{\delta^2}{\delta z_k^2} \right) \quad [\text{A8}]$$

El componente de energía potencial es la repulsión de Coulomb entre cada par de entidades con carga (tratando cada núcleo atómico como una única masa con carga, como ya se ha mencionado):

$$V = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_j \sum_{k < j} \frac{e_j e_k}{\Delta r_{jk}} \quad [A9]$$

en la que Δr_{jk} es la distancia entre las dos partículas, y e_j y e_k son las cargas de las partículas j y k . Para un electrón, la carga es $-e$, y para un núcleo, Ze , donde Z es el número atómico del átomo. Así,

$$V = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \left(- \sum_i \sum_I \left(\frac{Z_I e^2}{\Delta r_{iI}} \right) + \sum_i \sum_{j < i} \left(\frac{e^2}{\Delta r_{ij}} \right) + \sum_I \sum_{J < I} \left(\frac{Z_I Z_J e^2}{\Delta R_{IJ}} \right) \right) \quad [A10]$$

El primer término corresponde a la atracción electrón-núcleo, el segundo a la repulsión entre electrones y el tercero a la repulsión entre núcleos.

Unidades atómicas. Las ecuaciones fundamentales de la química cuántica se expresan habitualmente en unidades diseñadas para su simplificación por medio de la eliminación de constantes fundamentales. La unidad atómica de longitud es el *radio de Bohr*:

$$a_0 = \frac{h^2}{4\pi^2 m_e e^2} = 0,52917725 \text{ \AA} \quad [A11]$$

Las coordenadas pueden transformarse en bohrs dividiéndolas entre a_0 . La energía se mide en *hartrees*, que se definen como la repulsión coulombiana entre dos electrones separados por 1 bohr:

$$1 \text{ hartree} = \frac{e^2}{a_0} \quad [A12]$$

Las masas se dan también en términos de unidades electrónicas (se toma $m_e = 1$). En las ecuaciones que siguen se utilizan estas unidades.

La aproximación de Born-Oppenheimer.¹⁶⁶ Ésta es la primera de varias aproximaciones utilizadas para simplificar la resolución de la ecuación de Schrödinger. Consiste en la separación del movimiento de núcleos y electrones. Esta aproximación es razonable, ya que la masa de un núcleo típico es miles de veces mayor que la de un electrón. Los núcleos se mueven muy lentamente respecto a los electrones, y éstos reaccionan de forma casi instantánea a los cambios en la posición del núcleo. Así, la distribución de electrones dentro de un sistema molecular depende de las posiciones de los núcleos, y no de sus velocidades. Dicho de otra forma, los núcleos parecen fijados a los electrones, y puede decirse que éstos se mueven en un campo de núcleos fijos.

El hamiltoniano completo para todo el sistema molecular puede escribirse como:

$$H = T^{\text{elec}}(\mathbf{p}) + T^{\text{núcl}}(\mathbf{R}) + V^{\text{núcl-elec}}(\mathbf{R}, \mathbf{p}) + V^{\text{elec}}(\mathbf{p}) + V^{\text{núcl}}(\mathbf{R}) \quad [\text{A13}]$$

La aproximación de Born-Oppenheimer permite resolver las dos partes del problema de forma independiente, con lo que podemos construir un hamiltoniano electrónico en el que se desprecia el término de energía cinética nuclear:

$$H^{\text{elec}} = -\frac{1}{2} \sum_i^{\text{elec}} \left(\frac{\delta^2}{\delta x_i^2} + \frac{\delta^2}{\delta y_i^2} + \frac{\delta^2}{\delta z_i^2} \right) - \sum_i^{\text{elec}} \sum_I^{\text{núcl}} \left(\frac{Z_I}{|\mathbf{R}_I - \mathbf{r}_i|} \right) + \sum_i^{\text{elec}} \sum_{j < i}^{\text{elec}} \left(\frac{1}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|} \right) + \sum_I^{\text{núcl}} \sum_{I' < I}^{\text{núcl}} \left(\frac{Z_I Z_{I'}}{|\mathbf{R}_I - \mathbf{R}_{I'}|} \right) \quad [\text{A14}]$$

Como se ve, han desaparecido las constantes físicas fundamentales al utilizar unidades atómicas.

¹⁶⁶ M. Born y J. R. Oppenheimer, *Ann. Physik* **1927**, 84, 457.

Este hamiltoniano se utiliza en la ecuación de Schrödinger que describe el movimiento de electrones en un campo de núcleos fijos

$$H^{\text{elec}} \psi^{\text{elec}}(\mathbf{P}, \mathbf{R}) = E^{\text{ef}}(\mathbf{R}) \psi^{\text{elec}}(\mathbf{P}, \mathbf{R}) \quad [\text{A15}]$$

La resolución de esta ecuación para la función de onda electrónica produce la función potencial nuclear efectiva E^{ef} . Depende de las coordenadas nucleares y describe la superficie de energía potencial del sistema. De acuerdo con esto, E^{ef} se usa también como potencial efectivo para el hamiltoniano nuclear:

$$H^{\text{núcl}} = T^{\text{núcl}}(\mathbf{P}) + E^{\text{ef}}(\mathbf{R}) \quad [\text{A16}]$$

Este hamiltoniano se utiliza en la ecuación de Schrödinger para movimiento nuclear, describiendo los estados vibracionales, rotacionales y traslacionales de los núcleos. La resolución de la ecuación de Schrödinger nuclear (al menos de forma aproximada) es necesaria para la predicción del espectro vibracional de las moléculas.

De aquí en adelante, nos centraremos en el problema electrónico, y omitiremos los superíndices en todos los operadores y funciones.

Restricciones en la función de onda. Ya se ha mencionado que se interpreta ψ^2 como la densidad de probabilidad para la partícula que describe. Por ello, se requiere que ψ esté normalizada; si se integra en todo el espacio, la probabilidad debe ser el número total de partículas, pues en algún sitio han de estar. Por tanto, se multiplica ψ por una constante tal que:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} |c\psi|^2 dv = n_{\text{partículas}} \quad [\text{A17}]$$

Podemos hacer esto porque la ecuación de Schrödinger es una ecuación de valores propios, y en general, si f es una solución a una ecuación de valores propios, entonces $c f$ también lo es para cualquier valor de c . Para la ecuación de Schrödinger, es fácil demostrar que $H(c\psi) = cH(\psi)$ y que $E(c\psi) = c(E\psi)$; así, si ψ es una solución para la ecuación de Schrödinger, entonces $c\psi$ también lo es.

En segundo lugar, ψ debe ser también antisimétrica, es decir, que debe cambiar de signo cuando dos partículas idénticas se intercambien. Para una función simple, la antisimetría significa que se cumple la siguiente relación:

$$f(i, j) = -f(j, i) \quad [\text{A18}]$$

Más específicamente, este requerimiento significa que cualquier función de onda válida debe satisfacer la siguiente condición:

$$\psi(r_1^p, \dots, r_i^p, \dots, r_j^p, \dots, r_n^p) = -\psi(r_1^p, \dots, r_j^p, \dots, r_i^p, \dots, r_n^p) \quad [\text{A19}]$$

A.2. Teoría de Hartree-Fock.

La resolución exacta de la ecuación de Schrödinger no es posible más que para los sistemas moleculares más triviales. Sin embargo, se consiguen soluciones aproximadas para una gran variedad de moléculas gracias a distintas simplificaciones.

Orbitales moleculares. La primera aproximación que consideraremos viene de la interpretación de $|\psi|^2$ como una densidad de probabilidad para los electrones dentro del sistema. La teoría de orbitales moleculares descompone ψ en una combinación de orbitales moleculares: ϕ_1, ϕ_2, \dots Para que se cumplan algunas de las condiciones de ψ que hemos discutido previamente, elegimos una serie normalizada y ortogonal de orbitales moleculares:

$$\begin{aligned} \iiint \phi_i^* \phi_i dx dy dz &= 1 \\ \iiint \phi_i^* \phi_j dx dy dz &= 0 \quad i \neq j \end{aligned} \quad [A20]$$

La forma más sencilla de hacer que ψ sea una combinación de estos orbitales moleculares es formar su *producto de Hartree*:

$$\psi(\mathbf{r}) = \phi_1(\mathbf{r}_1) \phi_2(\mathbf{r}_2) \dots \phi_n(\mathbf{r}_n) \quad [A21]$$

Sin embargo, esta función no es antisimétrica, ya que el intercambio de dos de los vectores \mathbf{r}_i (lo que equivale a intercambiar los orbitales de dos electrones) no provoca un cambio de signo. Por tanto, este producto de Hartree no es una función de onda adecuada.

Espín electrónico. La función antisimétrica más sencilla que es una combinación de orbitales moleculares es un determinante. Antes de formarlo, necesitamos considerar un factor hasta ahora despreciado: el espín electrónico. Los electrones pueden tener espín *hacia arriba* (+ 1/2) o *hacia abajo* (-1/2). La ecuación [A21] supone que cada orbital molecular sólo puede tener un electrón. Sin embargo, la mayoría de los cálculos son cálculos de capa cerrada, utilizando orbitales doblemente

ocupados, conteniendo éstos dos electrones de espines opuestos. Por el momento, limitaremos nuestra discusión a este caso.

Definimos dos funciones de espín, α y β de modo que:

$$\begin{aligned} \alpha(\uparrow) &= 1 & \alpha(\downarrow) &= 0 \\ \beta(\uparrow) &= 0 & \beta(\downarrow) &= 1 \end{aligned} \quad [A22]$$

La función α es 1 para un electrón con espín hacia arriba, y la función β es 1 cuando el espín es hacia abajo. La notación $\alpha(i)$ y $\beta(i)$ designa los valores de α y β para el electrón i ; así, $\alpha(1)$ es el valor de α para el electrón 1. Al multiplicar una función de orbitales moleculares por α o β se incluye el espín electrónico como parte de la función de onda electrónica global ψ . El producto del orbital molecular y una función de espín se define como orbital de espín, que es función tanto de la localización del electrón como de su espín. Estos orbitales de espín son también ortonormales cuando los orbitales moleculares que lo componen lo son.

Ahora puede construirse una función de onda de capa cerrada definiendo $n/2$ orbitales moleculares para un sistema con n electrones, asignando electrones a estos orbitales en pares con espín diferente:

$$\psi(\mathbf{r}) = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} \phi_1(\mathbf{r}_1)\alpha(1) & \phi_1(\mathbf{r}_1)\beta(1) & \phi_2(\mathbf{r}_1)\alpha(1) & \phi_2(\mathbf{r}_1)\beta(1) & \Lambda & \phi_{n/2}(\mathbf{r}_1)\alpha(1) & \phi_{n/2}(\mathbf{r}_1)\beta(1) \\ \phi_1(\mathbf{r}_2)\alpha(2) & \phi_1(\mathbf{r}_2)\beta(2) & \phi_2(\mathbf{r}_2)\alpha(2) & \phi_2(\mathbf{r}_2)\beta(2) & \Lambda & \phi_{n/2}(\mathbf{r}_2)\alpha(2) & \phi_{n/2}(\mathbf{r}_2)\beta(2) \\ M & M & M & M & & M & M \\ \phi_1(\mathbf{r}_i)\alpha(i) & \phi_1(\mathbf{r}_i)\beta(i) & \phi_2(\mathbf{r}_i)\alpha(i) & \phi_2(\mathbf{r}_i)\beta(i) & \Lambda & \phi_{n/2}(\mathbf{r}_i)\alpha(i) & \phi_{n/2}(\mathbf{r}_i)\beta(i) \\ \phi_1(\mathbf{r}_j)\alpha(j) & \phi_1(\mathbf{r}_j)\beta(j) & \phi_2(\mathbf{r}_j)\alpha(j) & \phi_2(\mathbf{r}_j)\beta(j) & \Lambda & \phi_{n/2}(\mathbf{r}_j)\alpha(j) & \phi_{n/2}(\mathbf{r}_j)\beta(j) \\ M & M & M & M & & M & M \\ \phi_1(\mathbf{r}_n)\alpha(n) & \phi_1(\mathbf{r}_n)\beta(n) & \phi_2(\mathbf{r}_n)\alpha(n) & \phi_2(\mathbf{r}_n)\beta(n) & \Lambda & \phi_{n/2}(\mathbf{r}_n)\alpha(n) & \phi_{n/2}(\mathbf{r}_n)\beta(n) \end{vmatrix} \quad [A23]$$

Cada fila se forma representando todas las posibles asignaciones del electrón i a todas las combinaciones de orbital y espín. El factor inicial es necesario para la normalización. El intercambio de dos electrones corresponde al intercambio de dos filas

del determinante, lo cual tiene el efecto de cambiar su signo. Esta formulación no es sólo un truco matemático para formar una función de onda antisimétrica. La mecánica cuántica especifica que la localización de un electrón no es determinista, sino que consiste en una densidad de probabilidad; en este sentido, el electrón puede estar en cualquier sitio. Este determinante mezcla todos los orbitales posibles de todos los electrones del sistema molecular para formar la función de onda.

Funciones de base. La siguiente aproximación implica expresar los orbitales moleculares como combinaciones lineales de una serie predefinida de funciones monoeléctricas conocidas como funciones de base o primitivas. Estas funciones de base suelen estar centradas en el núcleo del átomo, por lo que tienen cierta semejanza con los orbitales atómicos. Sin embargo, en realidad el tratamiento matemático es más general, y se puede tomar cualquier serie de funciones definidas de forma apropiada.

Un orbital molecular individual se define como:

$$\phi_i = \sum_{\mu=1}^N c_{\mu i} \chi_{\mu} \quad [A24]$$

donde los coeficientes $c_{\mu i}$ se llaman coeficientes de expansión de los orbitales moleculares. Las funciones de base χ_1, \dots, χ_N están también normalizadas. Seguimos la convención habitual en la notación de usar subíndices con letras romanas para las funciones de orbitales moleculares y subíndices con letras griegas para las funciones de base. Así, χ_{μ} se refiere a una función de base arbitraria de igual forma que ϕ_i se refiere a un orbital molecular arbitrario.

Suelen utilizarse funciones atómicas de tipo Gauss o gaussianas. Las llamadas de tipo Slater son más precisas, pero más complicadas matemáticamente.¹⁶⁷ Por ello, habitualmente se prefiere el uso de funciones gaussianas, a pesar de que el número requerido de éstas es mayor. Las gaussianas tienen la forma general:

$$g(\alpha, \mathbf{r}) = c x^n y^m z^l e^{-\alpha r^2} \quad [\text{A25}]$$

donde \mathbf{r} tiene tres componentes x , y y z . α es una constante que determina el tamaño (radio) de la función. En una función gaussiana, $e^{-\alpha r^2}$ es multiplicado por potencias (a veces 0) de x , y y z , y una constante de normalización, de forma que:

$$\int_{\text{todo el espacio}} g^2 = 1 \quad [\text{A26}]$$

así, c depende de α , l , m y n . Las funciones de base están compuestas de combinaciones lineales de primitivas gaussianas, y tienen esta forma:

$$\chi_\mu = \sum_p d_{\mu p} g_p \quad [\text{A27}]$$

donde los coeficientes $d_{\mu p}$ son constantes fijas para cada conjunto de bases. Así, finalmente, expresamos los orbitales moleculares como sigue:

$$\phi_i = \sum_\mu c_{\mu i} \chi_\mu = \sum_\mu c_{\mu i} \left(\sum_p d_{\mu p} g_p \right) \quad [\text{A28}]$$

¹⁶⁷ S. F. Boys, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **1950**, 200, 542-554.

El principio variacional.¹⁶⁸ El problema entonces es obtener los coeficientes de expansión de los orbitales moleculares, $c_{\mu i}$. Para ello, la teoría de Hartree-Fock aprovecha el principio variacional, que establece que para el estado fundamental de cualquier función normalizada antisimétrica de las coordenadas electrónicas, que denotaremos por Ξ , el valor esperado para la energía correspondiente a Ξ siempre debe ser mayor que la energía de la función de onda exacta:

$$E(\Xi) > E(\Psi); \quad \Xi \neq \Psi \quad [\text{A29}]$$

Es decir, que la energía de la función de onda exacta sirve como límite inferior de las energías calculadas para otras funciones antisimétricas normalizadas. Así, el problema se reduce a encontrar la serie de coeficientes que minimizan la energía de la función de onda resultante.

Ecuaciones de Roothaan-Hall.¹⁶⁹ El principio variacional conduce a la siguiente ecuación obtenida por Roothaan y Hall, que vemos en su forma matricial:

$$FC = SC\varepsilon \quad [\text{A30}]$$

Es conocida habitualmente como ecuación secular. En ella, ε es una matriz diagonal de energías de los orbitales, en la que cada uno de sus elementos ε_i es la energía de uno de los orbitales monoeléctronicos que componen χ_i ; F es la llamada *matriz de Fock*, y representa el efecto promediado del campo formado por todos los

¹⁶⁸ I. N. Levine, *Química Cuántica, 1ª ed.*; AC: Madrid, 1977; p188.

¹⁶⁹ (a) C. C. Roothaan, *J. Rev. Mod. Phys.* **1951**, 23, 69-89. (b) G. G. Hall, *Proc. R. Soc. London* **1951**, A205, 541-542.

electrones sobre cada orbital; S es la *matriz de solapamiento*, que indica el solapamiento entre orbitales; y C es la matriz de coeficientes. Dado que tanto la matriz de Fock como los orbitales dependen de los coeficientes de expansión de los orbitales moleculares, la ecuación [A30] no es lineal, y debe ser resuelta mediante iteraciones, según el método del Campo Autoconsistente (*Self-Consistent Field, SCF*).¹⁷⁰ Cuando alcanza los criterios de convergencia, la energía se encuentra en un mínimo, y los orbitales generan un campo que produce esos mismos orbitales, lo que explica el nombre del método. La solución produce un conjunto de orbitales, tanto ocupados ($\phi_{i,j,\dots}$) como virtuales (no ocupados, que se denotan por $\phi_{a,b,\dots}$). El número total de orbitales es igual al número de funciones de base utilizadas.

La matriz de Fock incluye un término que corresponde a las *integrales de repulsión bielectrónicas*. Según el proceso de Hartree-Fock, para cada electrón se toma el resto de electrones como una distribución promediada, no se incluye una interacción instantánea entre electrones. Los métodos de mayor nivel teórico intentan remediar este desprecio de la llamada correlación electrónica de distintas formas.

La estrategia general utilizada en el método SCF es la siguiente:

- Evaluar las integrales. En un algoritmo convencional, están almacenadas en el disco, desde el que se leen para cada iteración. En un algoritmo directo, se calculan varias integrales a la vez mientras se forma la matriz de Fock.
- Construir la matriz de densidad (que forma parte de la matriz de Fock) tomando inicialmente coeficientes de orbitales moleculares arbitrarios.
- Formar la matriz de Fock.
- Resolver la matriz de densidad.

¹⁷⁰ S. M. Blinder, *Am. J. Phys.* **1965**, 33, 431-443.

- Comprobar si se ha alcanzado la convergencia. Si falla, empezar la siguiente iteración. Si se consigue, continuar con otras partes del cálculo, tales como un análisis de población.

A.3. Métodos de correlación electrónica.

Como ya se ha mencionado, la teoría de Hartree-Fock realiza un tratamiento defectuoso de la correlación entre los movimientos de los electrones de un sistema molecular, especialmente entre electrones con espín opuesto. Cuando la teoría de Hartree-Fock cumple el requerimiento de que $|\Psi^2|$ sea sensible al intercambio de dos electrones haciendo que la función de onda sea antisimétrica, incluye efectos de correlación debidos a electrones con el mismo espín. Sin embargo, no considera el movimiento de electrones con espín opuesto. Los métodos que van más allá del método SCF al intentar tratar de forma adecuada este fenómeno se llaman métodos de correlación electrónica (a pesar de que la teoría de Hartree-Fock incluye algunos efectos de correlación) o métodos post-SCF.

A.3.1. Métodos *ab initio*.

Interacción de Configuraciones (CI).¹⁷¹ Los métodos CI comienzan negando la asunción de la teoría de Hartree-Fock de que la función de onda exacta Ψ puede ser expresada como un sólo determinante. Se construye otro determinante reemplazando uno o más orbitales ocupados del determinante de Hartree-Fock por un orbital virtual.

¹⁷¹ (a) S. F. Boys, G. B. Cook, C. M. Reeves e I. Shavitt, *Nature* **1956**, 178, 1207-1209. (b) J. A. Pople, R. Seeger y R. Krishnan, *Int. J. Quant. Chem. Symp.* **1977**, 11, 149. (c) R. Krishnan, H. B. Schlegel y J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1980**, 72, 4654-4655. (d) K. Raghavachari y J. A. Pople, *Int. J. Quant. Chem.* **1981**, 20, 167.

En una *sustitución sencilla*, un orbital virtual, digamos ϕ_a , reemplaza a un orbital ocupado ϕ_i dentro del determinante. Esto equivale a excitar un electrón a un orbital de mayor energía. De forma similar, en una *sustitución doble*, dos orbitales ocupados son reemplazados por orbitales virtuales: ϕ_i por ϕ_a y ϕ_j por ϕ_b . En las *sustituciones triples* se intercambian tres orbitales, y así sucesivamente.

CI completo.¹⁷² El método CI completo forma la función de onda ψ como combinación lineal del determinante de Hartree-Fock y de todos los posibles determinantes sustituidos:

$$\psi = b_0\psi_0 + \sum_{s>0} b_s\psi_s \quad [\text{A31}]$$

en la que el término con subíndice cero constituye el nivel de teoría Hartree-Fock, y s representa todas las posibles sustituciones. La resolución de esta ecuación permite obtener los coeficientes b , de nuevo minimizando la energía de la función de onda.

El significado físico de la ecuación [A31] es que ésta es una mezcla de todos los estados electrónicos posibles de la molécula, cada uno de los cuales tiene, según las leyes de la mecánica cuántica, alguna posibilidad de existir. CI completo es el tratamiento no relativista del sistema molecular más completo que es posible realizar, dentro de las limitaciones que impone el conjunto de bases elegido. Representa los posibles estados cuánticos del sistema al determinar la densidad electrónica de acuerdo con la definición (y restricciones) del conjunto de bases utilizado. Por ello este método, si se combinara con un conjunto de bases infinitamente flexible, más allá de los de alto

¹⁷² P. Čársky, *Encyclopedia of Computational Chemistry*; P. v. R. Schleyer, N. L. Allinger, T. Clark, J. Gasteiger, P. A. Kollman, H. F. Schaefer III y P. R. Scheiner, Eds.; Wiley: Chichester, 1998; p 486.

momento angular (que se comentarán más adelante), llegaría a la solución exacta de la ecuación de Schrödinger no relativista e independiente del tiempo.

Interacción de Configuraciones limitada. El método CI completo, sin embargo, tiene un coste computacional muy elevado, por lo que no es práctico más que para los sistemas muy pequeños. Los métodos CI que se utilizan en la práctica aumentan el nivel Hartree-Fock añadiendo un número limitado de sustituciones. Por ejemplo, el método CIS¹⁷³ añade excitaciones sencillas al determinante de Hartree-Fock, CID¹⁷¹ añade excitaciones dobles, CISD¹⁷¹ sencillas y dobles, CISDT sencillas, dobles y triples, y así sucesivamente. Una desventaja de estos métodos CI limitados es que no son consistentes respecto al tamaño. Para corregir esta deficiencia se desarrolló el método de Interacción de Configuraciones Cuadrática (QCI).¹⁷⁴ El método QCISD¹⁷⁵ añade nuevos términos al CISD para restablecer la consistencia respecto al tamaño. De igual forma, hay métodos QCISD(T),¹⁷⁶ que añade sustituciones triples al QCISD, QCISD(TQ)¹⁷⁵ también con cuádruples, etc.

Teoría de perturbaciones de Møller-Plesset.¹⁷⁷ Se basa en la división del hamiltoniano en dos partes:

$$H = H_0 + \lambda V \quad [A32]$$

¹⁷³ J. B. Foresman, M. Head-Gordon, J. A. Pople y M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 135-149.

¹⁷⁴ J. A. Pople, M. Head-Gordon y K. Raghavachari, *J. Chem. Phys.* **1987**, *87*, 5968-5975.

¹⁷⁵ K. Raghavachari, J. A. Pople, E. S. Replogle y M. Head-Gordon, *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 5579-5586.

¹⁷⁶ J. Gauss y C. Cremer, *Chem. Phys. Lett.* **1988**, *150*, 280-286. (b) E. A. Salter, G. W. Trucks y R. J. Bartlett, *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 1752-1766.

¹⁷⁷ C. Møller y M. S. Plesset, *Phys. Rev.* **1934**, *46*, 618-622.

de tal forma que H_0 tenga solución exacta. λV es una *perturbación* aplicada a H_0 , que se asume que es una corrección comparativamente muy pequeña (no confundir el operador V con la energía potencial, no tiene ninguna relación). Esta asunción sugiere que la función de onda perturbada y la energía pueden ser expresadas como series de potencias, lo que se hace habitualmente con el parámetro λ :

$$\begin{aligned}\psi &= \psi^{(0)} + \lambda\psi^{(1)} + \lambda^2\psi^{(2)} + \lambda^3\psi^{(3)} + \dots \\ E &= E^{(0)} + \lambda E^{(1)} + \lambda^2 E^{(2)} + \lambda^3 E^{(3)} + \dots\end{aligned}\tag{A33}$$

La función de onda perturbada y la energía se sustituyen en la ecuación de Schrödinger:

$$(H_0 + \lambda V)(\psi^{(0)} + \lambda\psi^{(1)} + \dots) = (E^{(0)} + \lambda E^{(1)} + \dots)(\psi^{(0)} + \lambda\psi^{(1)} + \dots)\tag{A34}$$

Tras realizar el desarrollo de esta ecuación e igualar los coeficientes a cada lado de ésta para cada potencia de λ , se llega a una serie de relaciones que sucesivamente van aumentando de orden de perturbación. Las tres primeras, para potencias 0, 1 y 2 de λ , son:

$$\begin{aligned}(H_0 - E^{(0)})\psi^{(0)} &= 0 \\ (H_0 - E^{(0)})\psi^{(1)} &= (E^{(1)} - V)\psi^{(0)} \\ (H_0 - E^{(0)})\psi^{(2)} &= (E^{(1)} - V)\psi^{(1)} + E^{(2)}\psi^{(0)}\end{aligned}\tag{A35}$$

Esto corresponde a la teoría general de perturbaciones. En el caso particular de la teoría de Møller-Plesset, se define H_0 como la suma de los operadores monoeléctricos de Fock:

$$H_0 = \sum_i F^i \quad [A36]$$

El determinante de Hartree-Fock y todos los determinantes sustituidos son funciones propias de H_0 ; éstas son las soluciones para la parte del hamiltoniano dividido para el que tenemos una solución. Así,

$$H_0 \psi_s = E_s \psi_s \quad [A37]$$

para todas las funciones de onda con determinante sustituido. Considerando paso a paso las relaciones que establece la ecuación [A35], se obtiene que $E^{(0)}$ es la suma de las energías de los orbitales:

$$E^{(0)} = \sum_i \varepsilon_i \quad [A38]$$

y la suma de $E^{(0)}$ y $E^{(1)}$ es la energía de Hartree-Fock. Así, $E^{(2)}$ es la primera energía que añade una perturbación a la de Hartree-Fock. Es no nula solamente cuando las sustituciones son dobles, lo que significa físicamente que todas las interacciones entre electrones se producen entre pares. Esta energía minimizada es la que proporciona el método MP2.³⁰ Mediante un proceso similar pero más complicado, se obtienen correcciones de energía de tercer y cuarto orden (MP3,^{171b,178} MP4¹⁷⁹).

¹⁷⁸ J. A. Pople, J. S. Binkley y R. Seeger, *Int. J. Quant. Chem. Symp.* **1976**, 10, 1.

¹⁷⁹ R. Krishnan y J. A. Pople, *Int. J. Quant. Chem.* **1978**, 14, 91.

A.3.2. Teoría de funcionales de densidad (DFT, *Density Functional Theory*).

Los métodos basados en esta teoría³¹ derivan de avances en la mecánica cuántica de los años veinte, especialmente el modelo de Thomas-Fermi-Dirac,¹⁸⁰ y de los trabajos fundamentales de Slater en química cuántica en los cincuenta.¹⁸¹ Esta aproximación considera la correlación electrónica a través de funcionales de la densidad electrónica. Un funcional es una definición cuya definición es en sí misma otra función; en otras palabras, es una función de una función. Sus orígenes modernos se remontan al teorema de Hohenberg-Kohn,^{31a} publicado en 1964, que demostró que hay un único funcional que determina exactamente la energía y la densidad electrónica del estado fundamental. Sin embargo, el teorema no proporciona la forma de este funcional, sólo su existencia.

Siguiendo el trabajo de Kohn y Sham,^{31b} los funcionales aproximados empleados por los métodos DFT actuales dividen la energía electrónica en varios términos:

$$E = E^T + E^V + E^J + E^{XC} \quad [A39]$$

donde E^T es el término de energía cinética (que proviene del movimiento de los electrones), E^V incluye términos que describen la energía potencial de la atracción núcleo-electrón y la repulsión entre pares de núcleos, E^J es el término de repulsión entre electrones (también llamado repulsión coulombiana de la densidad electrónica) y E^{XC} es el término de correlación-intercambio, que incluye el resto de las interacciones entre

¹⁸⁰ (a) L. H. Thomas, *Proc. Camb. Phil. Soc.* **1927**, 23, 542-548. (b) E. Fermi, *Rend. Accad. Lincei* **1927**, 6, 602-607. (c) P. A. M. Dirac, *Proc. Camb. Phil. Soc.* **1930**, 26, 376-385.

¹⁸¹ J. C. Slater, *Phys. Rev.* **1951**, 81, 385-390.

electrones. Todos los términos, excepto la repulsión entre núcleos, son función de ρ , la densidad electrónica. La suma $E^T + E^V + E^J$ corresponde a la energía clásica de la distribución de carga ρ . E^{XC} engloba los restantes términos de la energía: la energía de intercambio que proviene de la antisimetría de la función de onda y la correlación dinámica en los movimientos individuales de los electrones.

Hohenberg y Kohn demostraron que E^{XC} viene determinado en su totalidad por la densidad electrónica, lo que equivale a decir que es un funcional de ésta. En la práctica, se suele tomar E^{XC} de forma aproximada, como una integral de las densidades de espín y de sus gradientes:

$$E^{XC}(\rho) = \int f(\rho_\alpha(\mathbf{r}), \rho_\beta(\mathbf{r}), \nabla\rho_\alpha(\mathbf{r}), \nabla\rho_\beta(\mathbf{r})) d^3\mathbf{r} \quad [A40]$$

Se utiliza ρ_α para referirse a la densidad de espín α , ρ_β para la densidad de espín β y ρ para la densidad electrónica total ($\rho_\alpha + \rho_\beta$).

E^{XC} suele dividirse en dos partes, a las que se llama partes de intercambio y de correlación, que en realidad corresponden a interacciones con igual y con distinto espín, respectivamente:

$$E^{XC}(\rho) = E^X(\rho) + E^C(\rho) \quad [A41]$$

Los tres términos son también funcionales de la densidad electrónica, y a los dos que definen las dos partes de E^{XC} por separado se les llama funcionales de intercambio y de correlación, respectivamente. Ambos pueden ser a su vez de dos tipos: funcionales locales, que sólo dependen de la densidad electrónica ρ , y funcionales con corrección de gradiente o no locales, que dependen tanto de ρ como de su gradiente, $\nabla\rho$. Se han

definido distintos funcionales de todos estos tipos, entre los que destacan el funcional de intercambio con corrección de gradiente de Becke,¹⁸² basado en el funcional local LDA (*local density approximation*), y los funcionales de correlación con corrección de gradiente de Lee, Yang y Parr (LYP)^{32b,183} y Perdew-Wang (del que hay más de una versión).¹⁸⁴ Los métodos DFT puros pueden combinar un funcional de intercambio y uno de correlación, como ocurre con el conocido método BLYP,^{32b,182} en el que se utilizan los funcionales de Becke y de Lee, Yang y Parr.

Funcionales híbridos. En la actualidad se realizan cálculos DFT autoconsistentes de forma iterativa, de forma análoga a la metodología de la teoría Hartree-Fock. La teoría de Hartree-Fock incluye también un término de intercambio como parte de su formulación. Hace unos años, Becke formuló funcionales que incluyen una mezcla de intercambio Hartree-Fock y DFT y correlación DFT, definiendo E^{XC} como sigue:

$$E^{\text{XC}}_{\text{híbrido}} = c_{\text{HF}} E^{\text{X}}_{\text{HF}} + c_{\text{DFT}} E^{\text{XC}}_{\text{DFT}} \quad [\text{A42}]$$

donde los términos c son constantes. Se puede definir un funcional tipo Becke de tres parámetros por medio de esta expresión.^{32a}

¹⁸² A. D. Becke, *Phys. Rev. A* **1988**, 38, 3098-3100.

¹⁸³ B. Miehlich, A. Savin, H. Stoll y H. Preuss, *Chem. Phys. Lett.* **1989**, 157, 200-206.

¹⁸⁴ (a) K. Burke, J. P. Perdew y Y. Wang, *Electronic Density Functional Theory: Recent Progress and New Directions*; J. F. Dobson, G. Vignale y M. P. Das, Eds.; Plenum: Nueva York, 1998. (b) J. P. Perdew, *Electronic Structure of Solids '91*; P. Ziesche y H. Eschrig, Eds.; Akademie Verlag: Berlín, 1991; p 11. (c) J. P. Perdew y Y. Wang, *Phys. Rev. B* **1992**, 45, 13244-13249. (d) J. P. Perdew, J. A. Chevary, S. H. Vosko, K. A. Jackson, M. R. Pederson, D. J. Singh y C. Fiolhais, *Phys. Rev. B* **1992**, 46, 6671-6687. (e) J. P. Perdew, J. A. Chevary, S. H. Vosko, K. A. Jackson, M. R. Pederson, D. J. Singh y C. Fiolhais, *Phys. Rev. B* **1993**, 48, 11638-11645. (f) J. P. Perdew, K. Burke y Y. Wang, *Phys. Rev. B* **1996**, 54, 16533-16539.

$$E_{\text{B3LYP}}^{\text{XC}} = E_{\text{LDA}}^{\text{X}} + c_0 (E_{\text{HF}}^{\text{X}} - E_{\text{LDA}}^{\text{X}}) + c_{\text{X}} \Delta E_{\text{B88}}^{\text{X}} + E_{\text{VWN3}}^{\text{C}} + c_{\text{C}} (E_{\text{LYP}}^{\text{C}} - E_{\text{VWN3}}^{\text{C}}) \quad [\text{A43}]$$

Aquí, el parámetro c_0 permite ponderar la proporción a utilizar del intercambio local Hartree-Fock y LDA. Además, se incluye la corrección de gradiente de Becke al intercambio LDA, $\Delta E_{\text{B88}}^{\text{X}}$. También toma el funcional de correlación local VWN3,¹⁸⁵ muy parecido al no local de Perdew y Wang, y puede ser corregido con correlación LYP mediante el parámetro c_{C} . En el funcional B3LYP, los valores de estos parámetros fueron especificados por Becke, y son $c_0 = 0,20$, $c_{\text{X}} = 0,72$ y $c_{\text{C}} = 0,81$.^{32a}

De igual forma, se pueden construir diferentes funcionales variando sus componentes y ajustando los valores de los parámetros. Por ejemplo, se obtiene el funcional B3PW91 sustituyendo el componente LYP por el de Perdew y Wang de 1991.

Además del método a utilizar en un cálculo computacional, como se ha visto es importante también la elección del conjunto de bases, que también influye en gran medida en la precisión y coste computacional del cálculo.

A.4. Tipos de conjuntos de bases.

Conjuntos de bases mínimos. Contienen el número mínimo de funciones de base requeridas para cada átomo. Cada orbital viene representado por una función de base. Por ejemplo, en el átomo de hidrógeno, sería 1s, y en el de carbono, 1s, 2s, 2p_x, 2p_y y 2p_z. Los conjuntos de bases mínimos utilizan orbitales de tamaño fijo, el cual

¹⁸⁵ S. H. Vosko, L. Wilk y M. Nusair, *Can. J. Phys.* **1980**, 58, 1200-1211.

varía según el tipo de átomo. El conjunto STO-3G,¹⁸⁶ por ejemplo, usa tres primitivas gaussianas para cada función de base (3G); STO significa “orbitales de tipo Slater”. Como ya hemos dicho que se prefiere el uso de funciones gaussianas a las de tipo Slater, estas últimas se aproximan mediante funciones gaussianas.

Conjuntos de bases split valence. La primera forma de incrementar el tamaño de un conjunto de bases es aumentar el número de funciones de base por átomo. En los conjuntos de bases de este tipo, como son 3-21G¹⁸⁷ y 6-31G,¹⁸⁸ hay dos o más tamaños de funciones de base por cada orbital. Por ejemplo, el átomo de carbono está representado por 1s, 2s, 2s', 2p_x, 2p_x', 2p_y, 2p_y', 2p_z y 2p_z', donde los orbitales marcados o no con ' (prima) son de diferente tamaño. Los conjuntos de bases doble zeta forman los orbitales moleculares mediante combinaciones lineales de dos tamaños de funciones

¹⁸⁶ (a) W. J. Hehre, R. F. Stewart y J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1969**, *51*, 2657-2664. (b) J. B. Collins, P. v. R. Schleyer, J. S. Binkley y J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 5142-5151.

¹⁸⁷ (a) J. S. Binkley, J. A. Pople y W. J. Hehre, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 939-947. (b) M. S. Gordon, J. S. Binkley, J. A. Pople, W. J. Pietro y W. J. Hehre, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 2797-2803. (c) W. J. Pietro, M. M. Francl, W. J. Hehre, D. J. Defrees, J. A. Pople y J. S. Binkley, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5039-5048. (d) K. D. Dobbs y W. J. Hehre, *J. Comp. Chem.* **1986**, *7*, 359. (e) K. D. Dobbs y W. J. Hehre, *J. Comp. Chem.* **1987**, *8*, 861-879. (f) K. D. Dobbs y W. J. Hehre, *J. Comp. Chem.* **1987**, *8*, 880-893.

¹⁸⁸ (a) R. Ditchfield, W. J. Hehre y J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1971**, *54*, 724-728. (b) W. J. Hehre, R. Ditchfield y J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 2257-2261. (c) P. C. Hariharan y J. A. Pople, *Theo. Chim. Acta* **1973**, *28*, 213-218. (d) P. C. Hariharan y J. A. Pople, *Mol. Phys.* **1974**, *27*, 209. (e) M. S. Gordon, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *76*, 163-168. (f) M. M. Francl, W. J. Pietro, W. J. Hehre, J. S. Binkley, D. J. DeFrees, J. A. Pople y M. S. Gordon, *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 3654-3665. (g) R. C. Binning Jr. y L. A. Curtiss, *J. Comp. Chem.* **1990**, *11*, 1206-1216. (h) J.-P. Blaudeau, M. P. McGrath, L. A. Curtiss y L. Radom, *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 5016-5021. (i) V. A. Rassolov, J. A. Pople, M. A. Ratner y T. L. Windus, *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 1223-1229. (j) V. A. Rassolov, M. A. Ratner, J. A. Pople, P. C. Redfern y L. A. Curtiss, *J. Comp. Chem.* **2001**, *22*, 976-984.

de base por cada orbital atómico. De forma similar, los triple zeta, como 6-311G,¹⁸⁹ utilizan tres tamaños de funciones para cada tipo de orbital.

Conjuntos de bases polarizados. Los conjuntos de bases split valence permiten a los orbitales cambiar de tamaño, pero no de forma. Los conjuntos de bases polarizados eliminan esta limitación añadiendo orbitales con momento angular más allá del requerido para el estado fundamental en la descripción de cada átomo. Por ejemplo, estos conjuntos de bases añaden funciones d a los átomos de carbono y funciones f a los metales de transición, y algunos de ellos añaden funciones p a los átomos de hidrógeno.

Un ejemplo es el conjunto de bases 6-31G(d), también conocido como 6-31G*,³³ que es el que hemos utilizado habitualmente en esta Tesis Doctoral. Su nombre indica que es el conjunto de bases 6-31G con funciones d añadidas a los átomos *pesados* (átomos del segundo periodo en adelante que en su estado fundamental tienen los orbitales d vacíos). El uso de este conjunto de bases es muy común en el estudio de sistemas de tamaño pequeño y mediano. Otro conjunto de bases polarizado muy popular es el 6-31G(d,p) o 6-31G**,³³ que añade funciones p a los átomos de hidrógeno además de las d en átomos *pesados*.

Funciones difusas. Son versiones en gran tamaño de las funciones tipo s y p. Permiten que los orbitales ocupen una región del espacio mayor. Los conjuntos de bases con funciones difusas son importantes en sistemas en los que los electrones están relativamente lejos del núcleo: moléculas con pares de electrones libres, aniones y otros sistemas con carga negativa significativa, sistemas en sus estados excitados, sistemas con bajo potencial de ionización, etc.

¹⁸⁹ (a) R. Krishnan, J. S. Binkley, R. Seeger y J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1980**, 72, 650-654. (b) A. D. McLean y G. S. Chandler, *J. Chem. Phys.* **1980**, 72, 5639-5648.

El conjunto de bases 6-31+G(d) es el 6-31G(d) con funciones difusas añadidas a los átomos *pesados*. El 6-31++G(d) añade funciones difusas también a los átomos de hidrógeno, aunque en este caso su uso raramente produce una diferencia significativa.

Conjuntos de bases con alto momento angular. Incluso los conjuntos de bases mayores son prácticos en la actualidad para muchos sistemas. Éstos añaden múltiples funciones de polarización por cada átomo a los conjuntos de bases triple zeta. Por ejemplo, el 6-31G(2d) añade dos funciones d por cada átomo *pesado* en lugar de uno, mientras que el 6-311++G(3df,3pd) añade funciones difusas tanto en átomos *pesados* como en hidrógenos, y múltiples funciones de polarización: tres funciones d y una f en átomos *pesados* y tres funciones p y una d en átomos de hidrógeno. Estos conjuntos de bases son útiles para describir las interacciones entre electrones en métodos de correlación electrónica; generalmente no son necesarios en cálculos HF.

B. Gráficos adicionales.

B.1. Gráficos de energía frente al ángulo diedro ϕ .

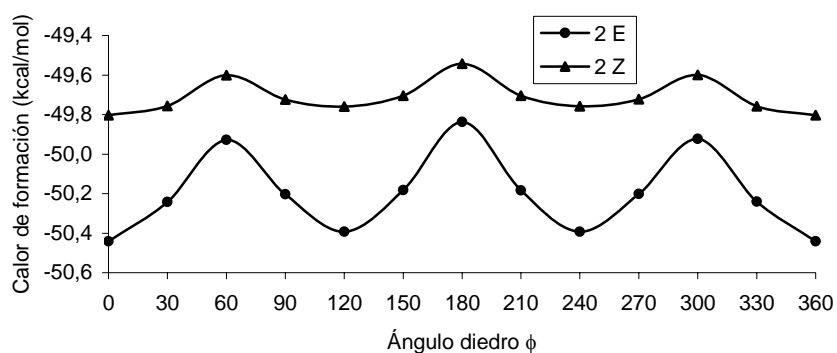


Figura 87. Variación del calor de formación (kcal/mol) con el ángulo diedro ϕ de la E- y Z-N-metilacetamida (2) a nivel PM3.

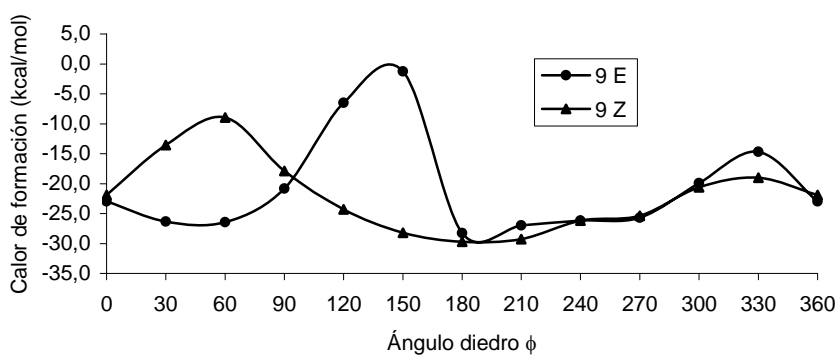


Figura 88. Variación del calor de formación (kcal/mol) con el ángulo diedro ϕ de la E- y Z-N-(1-metilbencil)acetamida (9) a nivel PM3.

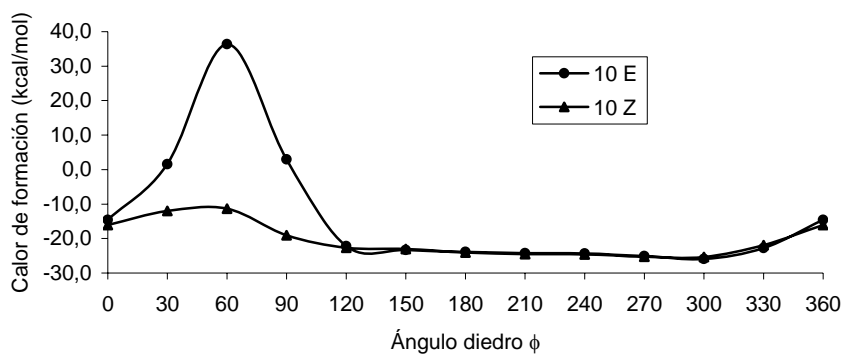


Figura 89. Variación del calor de formación (kcal/mol) con el ángulo diedro ϕ de la *E*- y *Z*-*N*-bencilacetamida (**10**) a nivel PM3.

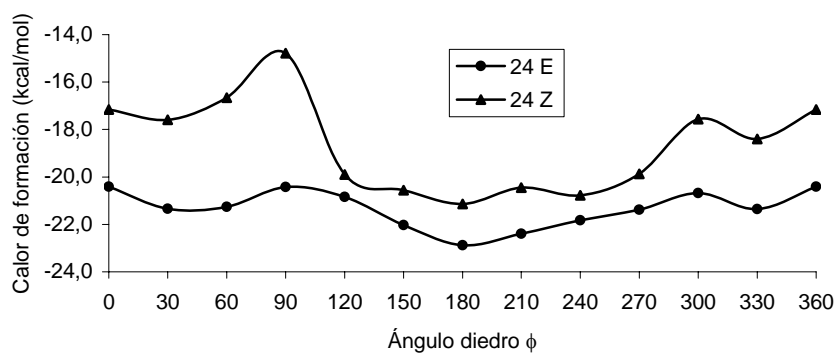


Figura 90. Variación del calor de formación (kcal/mol) con el ángulo diedro ϕ de la *E*- y *Z*-*N*-(1-metilbencil)formamida (**24**) a nivel PM3.

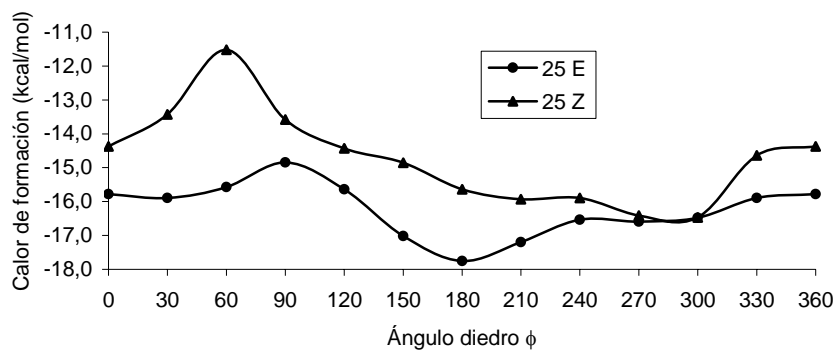


Figura 91. Variación del calor de formación (kcal/mol) con el ángulo diedro ϕ de la E- y Z-N-bencilformamida (**25**) a nivel PM3.

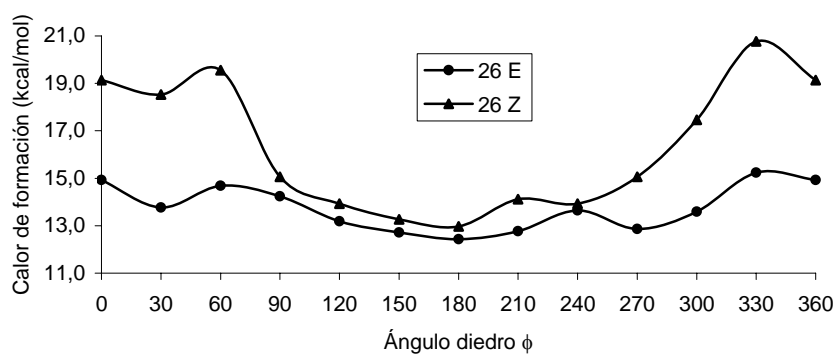


Figura 92. Variación del calor de formación (kcal/mol) con el ángulo diedro ϕ de la E- y Z-N-difenilmetilformamida (**26**) a nivel PM3.

B.2. Gráficos de energía frente al ángulo diedro ψ .

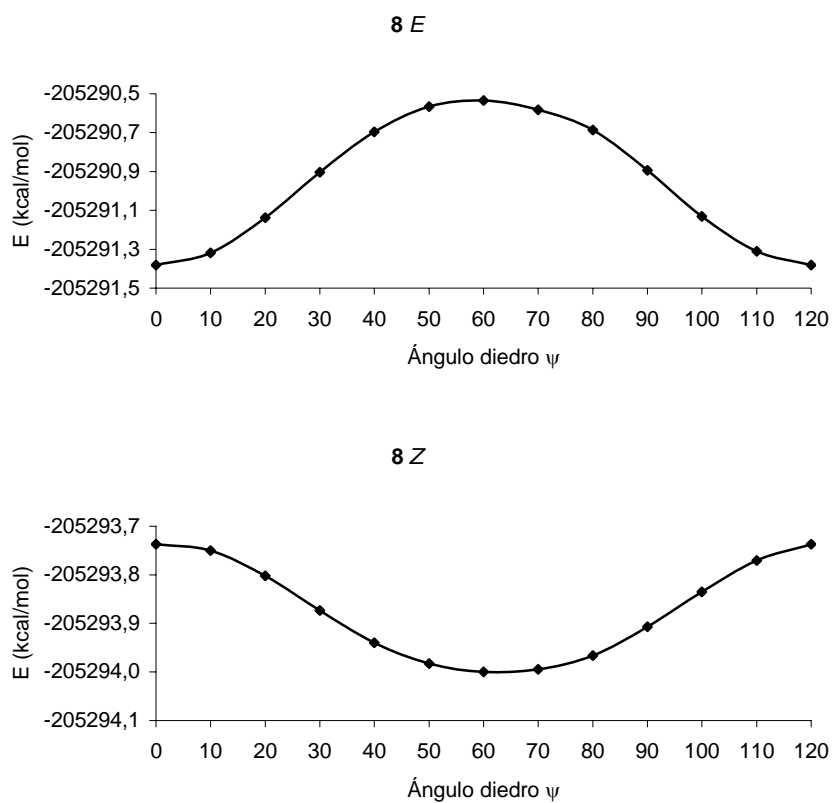


Figura 93. Variación de la energía frente al ángulo de torsión ψ de los isómeros *E/Z* de la *N*-isopropilacetamida (**8**) a nivel B3LYP/6-31G*.

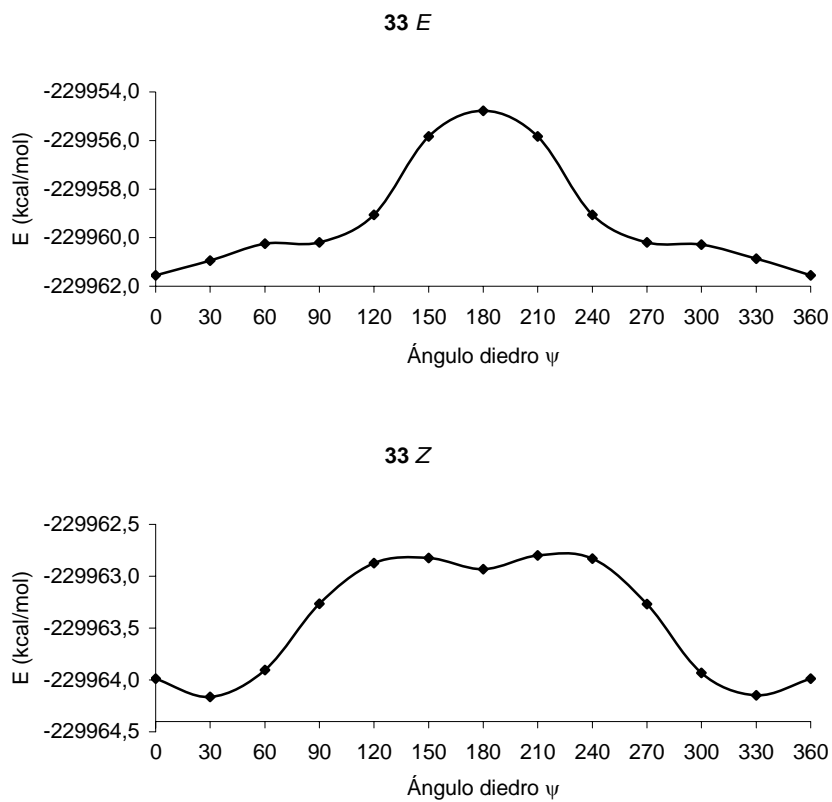


Figura 94. Variación de la energía frente al ángulo de torsión ψ de los isómeros *E/Z* de la *N*-isopropilpropionamida (**33**) a nivel B3LYP/6-31G*.

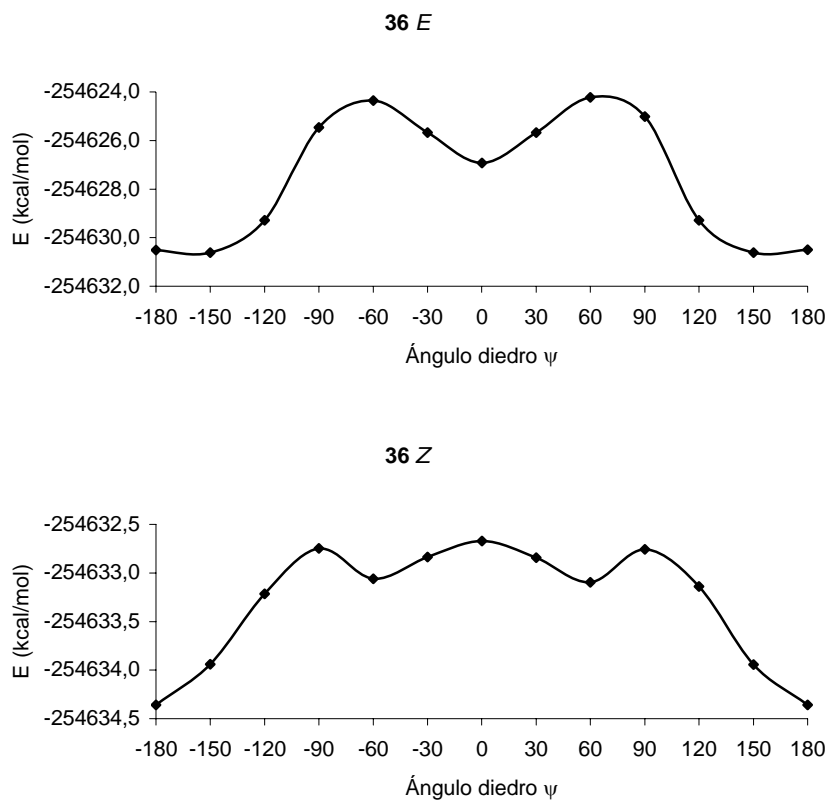


Figura 95. Variación de la energía frente al ángulo de torsión ψ de los isómeros *E/Z* de la *N*-isopropilisobutiramida (**36**) a nivel B3LYP/6-31G*.

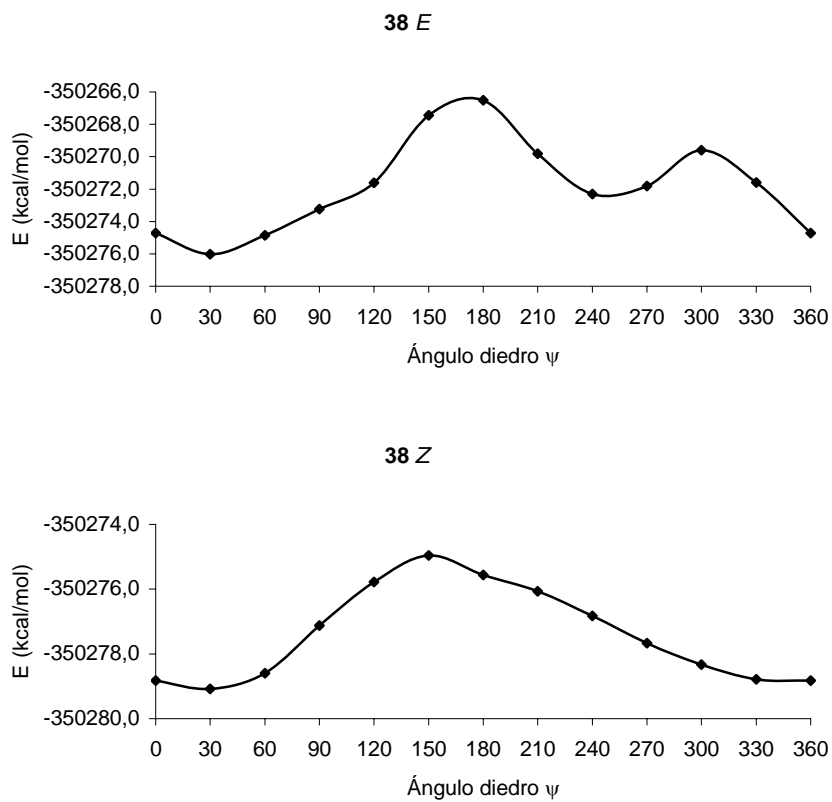


Figura 96. Variación de la energía frente al ángulo de torsión ψ de los isómeros *E/Z* de la *N*-etil-2-fenilpropionamida (**38**) a nivel B3LYP/6-31G*.

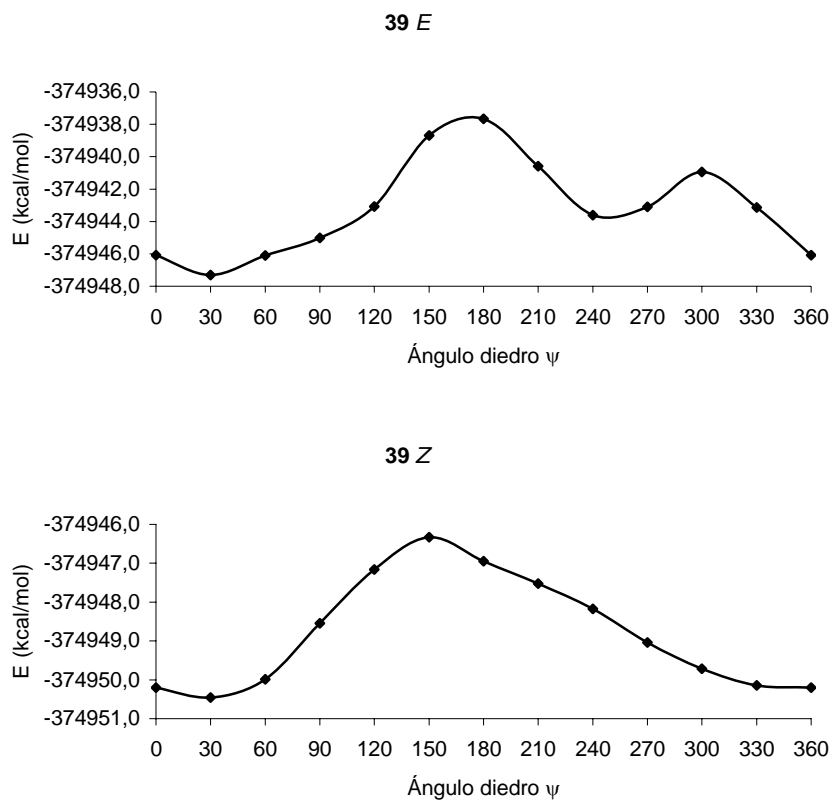


Figura 97. Variación de la energía frente al ángulo de torsión ψ de los isómeros *E/Z* de la *N*-isopropil-2-fenilpropionamida (**39**) a nivel B3LYP/6-31G*.

C. Resultados obtenidos al sustituir la ecuación [11] por la [12].

Como ya se ha comentado, los parámetros de ajuste para la ecuación [11] se calcularon también en DMSO- d_6 y D₂O liberando la pendiente de la recta, con lo que se llegó a la ecuación [12], cuyos parámetros se recogen en la Tabla 26 (en la que, como se ve, mejora ligeramente la desviación estándar de la regresión en D₂O (0,12 frente a 0,16, ver también Tabla 22).

$$\sigma_H = a + b \cos^2(\alpha-35)/d \quad [12]$$

Tabla 26. Parámetros de la ecuación [12].

Disolvente	a	b	r^2	$s_{y,x}$
CDCl ₃	1,69	2,16	0,94	0,08
DMSO- d_6	1,52	2,02	0,82	0,14
D ₂ O	1,75	1,40	0,76	0,12

La Figura C1 muestra el ajuste alcanzado en D₂O cuando se libera la ordenada en el origen y la pendiente:

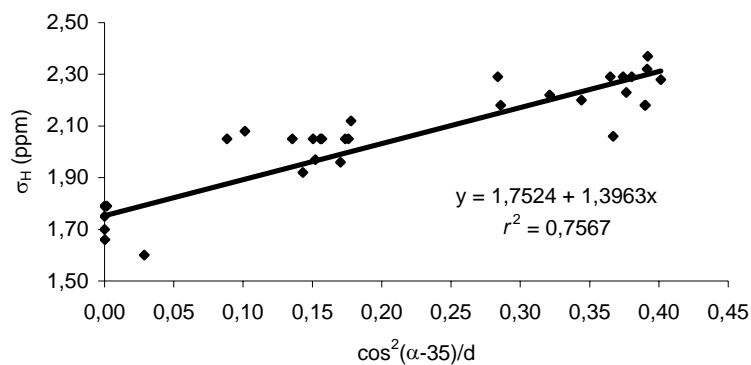


Figura C1. Correlación entre σ_H y la función $\cos^2(\alpha-35)/d$ para las amidas **2, 7-11, 21-28 y 30** en D_2O .

De este ajuste proceden los parámetros a y b para D_2O de la ecuación [12]. Al incorporar esta ecuación [12] para D_2O a la ecuación [18], se obtuvieron las ecuaciones [C1] y [C2]:

$$\delta_{\text{calc}} = 2,64 + \sigma_R + 1,40 \cos^2(\alpha-35)/d + 0,74 \cos^2[(\psi-10)/2]/d' \quad [C1]$$

$$\sigma_R = \delta_{\text{obs}} - (2,64 + 1,40 \cos^2(\alpha-35)/d + 0,74 \cos^2[(\psi-10)/2]/d') \quad [C2]$$

Calculando con esta última el valor de σ_R para cada aminoácido, se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla C1:

Tabla C1. Valores de σ_R promedio calculados para cada aminoácido.

Aminoácido		Residuos medidos	σ_R promedio
Alanina	ALA	151	0,70
Arginina	ARG	113	0,76
Asparagina	ASN	77	1,14
Ácido aspártico	ASP	119	1,07
Cisteína	CYS	35	1,19
Glutamina	GLN	111	0,65
Ácido glutámico	GLU	149	0,72
Glicina	GLY	118*	0,57
Histidina	HIS	39	1,05
Isoleucina	ILE	124	0,61
Leucina	LEU	187	0,86
Lisina	LYS	138	0,78
Metionina	MET	40	0,71
Fenilalanina	PHE	74	1,22
Prolina	PRO	97	0,95
Serina	SER	128	1,01
Treonina	THR	113	0,89
Triptófano	TRP	19	0,96
Tirosina	TYR	63	1,18
Valina	VAL	140	0,69

* Para la glicina el número de protones medidos es 236.

Tras obtener el σ_R promediado para cada aminoácido, se utilizó este valor en la ecuación [C1] para el cálculo del desplazamiento, que como ya se anticipó produjo resultados muy similares a los de la ecuación [21]. En la Tabla C2 pueden observarse los valores obtenidos por aminoácido:

Tabla C2. Error promedio (ppm) y datos estadísticos para cada aminoácido.

Aminoácido		$\bar{\delta}_{\text{obs}} = \bar{\delta}_{\text{calc}}$	SD_{obs}	SD_{calc}	Error promedio*	SD	R medidos
Alanina	ALA	4,24	0,46	0,27	0,38	0,35	151
Arginina	ARG	4,29	0,44	0,27	0,42	0,29	113
Asparagina	ASN	4,64	0,39	0,46	0,34	0,28	77
Ácido aspártico	ASP	4,59	0,33	0,34	0,31	0,23	119
Cisteína	CYS	4,70	0,60	0,33	0,55	0,34	35
Glutamina	GLN	4,19	0,37	0,33	0,33	0,28	111
Ácido glutámico	GLU	4,26	0,45	0,29	0,40	0,33	149
Glicina	GLY	3,94	0,52	0,56	0,34	0,36	118*
Histidina	HIS	4,54	0,52	0,39	0,45	0,35	39
Isoleucina	ILE	4,13	0,63	0,19	0,60	0,39	124
Leucina	LEU	4,39	0,52	0,28	0,49	0,35	187
Lisina	LYS	4,30	0,45	0,35	0,41	0,29	138
Metionina	MET	4,26	0,64	0,19	0,53	0,46	40
Fenilalanina	PHE	4,73	0,67	0,29	0,64	0,40	74
Prolina	PRO	4,42	0,36	0,19	0,30	0,30	97
Serina	SER	4,50	0,46	0,34	0,41	0,32	128
Treonina	THR	4,42	0,54	0,26	0,49	0,38	113
Triptófano	TRP	4,49	0,47	0,42	0,45	0,33	19
Tirosina	TYR	4,67	0,58	0,27	0,52	0,39	63
Valina	VAL	4,20	0,68	0,20	0,64	0,41	140
TOTAL**		4,24	0,46	0,27	0,44	0,36	2153

* $\Sigma(|\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{calc}}|)/n$. ** Calculado para los 2153 aminoácidos considerados, de forma individual.

Por último, la Figura C2 muestra, en sucesivos intervalos de 0,1 pm, el porcentaje de aminoácidos medidos cuyas diferencias entre desplazamiento calculado y observado ($|\delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{obs}}|$) se encuentran en cada uno de esos intervalos.

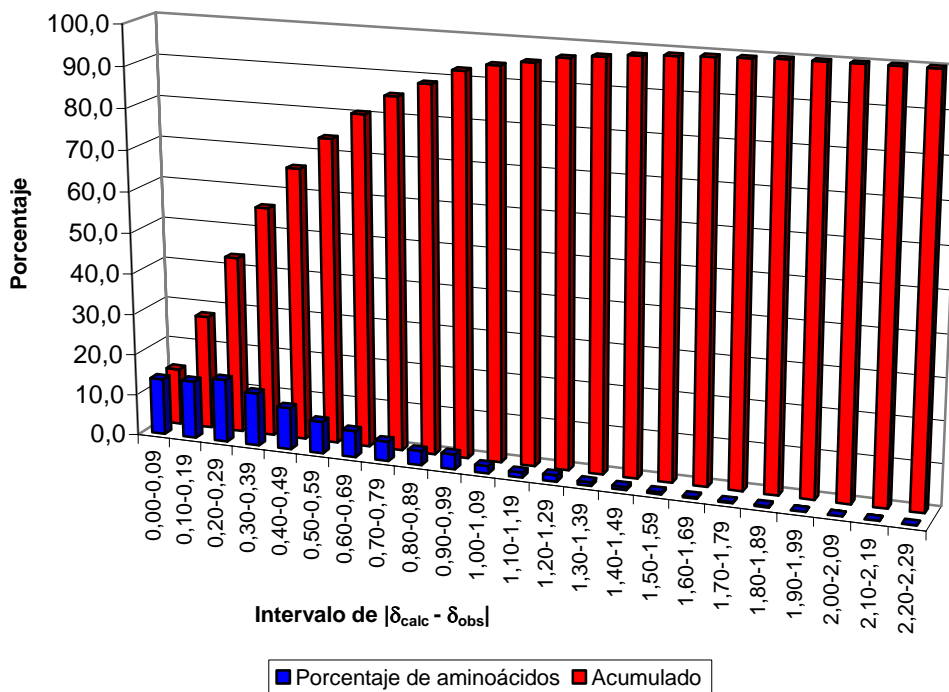


Figura C2. Porcentaje de aminoácidos en cada intervalo de error cometido en el cálculo.