

Gradu Amaierako Lana  
Kimikako Gradua

# Karbohidrato-Aminoazido agregazioen laser ikerketa espektroskopikoa

Egilea:

Ander Camiruaga Leza

Zuzendaria:

José Andrés Fernández

Ko-zuzendaria:

Imanol Usabiaga Gutierrez

© 2016, Ander Camiruaga Leza

# AURKIBIDEA

1.	SARRERA .....	1
2.	METODOLOGIA .....	5
2.1.	Kalkulu teorikoak .....	5
2.1.1.	Entropiaren eragina eta Gibbs energia askearen kalkulua .....	5
2.2.	Teknika Esperimentalak .....	8
2.2.2.	Masa bereizmenaren bidezko ionizazio espektroskopia multifotonikoa ...	10
2.2.3.	Erresonantzia bikoitzeko espektroskopia.....	12
2.3.	Sistema Esperimentalak .....	14
2.3.1.	Laginaren tratamendua.....	16
2.3.2.	Laser bidezko baporizazioa eta jet supersonikoaren espantsioa .....	16
2.3.4.	Hegaldi-denboraren bidezko masa espektrometroa .....	17
2.3.5.	Huts sistema .....	19
2.3.6.	Datuen jasotze eta tratamendurako instrumentazioa .....	19
2.3.7.	Erradiazio Iturriak.....	19
3.	EMAITZAK ETA EZTABAIDA .....	21
3.1.	REMPI espektroak .....	21
3.2.	IR/UV espektroak .....	26
3.3.	Lehentasun konformazionalak .....	43
4.	ONDORIOAK .....	45
5.	BIBLIOGRAFIA .....	46

## 1. SARRERA

Izaki bizidunek biomolekulen lau multzo nagusietan oinarritzen dute bere metabolismoa. Azukreak funtsezko multzo horien barruan aurkitzen dira, proteinekin, azido nukleikoekin eta lipidoekin batera, eta hauen interakzioak proteinekin oinarritzko eginkizuna dute prozesu biologikoetan. Multzo hauek isolatuta aurkitu ahal dira, mezulari kimiko moduan jokatuz, edota egitura erraldoiak eratuz (proteinak, DNA, geruza lipidikoak, glukoproteinak... etab)<sup>1</sup>. Karbohidratoak, polisakarido gisa, proteina/lipidoei lotuta edota azido nukleikoz osatutako egitura-sareetan aurkitu ahal dira. Hala ere, karbohidratoak gutxitan egon ohi dira gas fasean. Azken urteetako garapenari esker, posiblea izan da sistema biologikoen molekulak indibidualki aztertzea, haien ingurunearekiko elkarrekintza gabeko egoeran isolatuta. Modu honetan, disoluzioan edo baldintza fisiologikoetan dauden interakzio molekularrak minimizatzea posiblea da, egitura eta bere eragin-truke buruzko oinarritzko informazio jasoz<sup>2-9</sup>.

Ikuspuntu kimiko eta biokimiko batetik, karbohidratoek eratzen dituzten interakzioak bestelako biomolekulekin garrantzia handia dute. Karbohidratoek ez dute garrantzia soilik energiaren metaketan eta kontsumoan, baizik eta seinalearen itzulpenean eta sistema immunologikoan parte hartze handia izaten dute. Hala nola, leukozitoen pilaketa hantura lekuetan, glukoproteinen garbiketa zirkulazio sisteman, interakzio zelularrak sistema immunologikoan, eta baita bakterio edo birusen itsaspenean zelula anfitrioiaren ere<sup>10,11</sup>. Gai horrek, ikerketa esperimental eta konputazional ugari sortu du karbohidrato eta gune aromatikoaren  $\pi$  orbitalen arteko interakzio eredu idealaren bila<sup>12-14</sup>.

Azukreen azterketa selektiborako oinarri estrukturalak X-izpien bidezko kristalografiaren<sup>15-18</sup> bitartez analizatu dira. Karbohidrato-proteina konplexuen X-izpien analisiaren bidez, azukre isolatuen interakzioak errekonozimendu prozesuan aztertzeaz gain, hidrogeno-loturak, azukreen C-H-en interakzioak proteinen hondakin aromatikoekin, koordinazioak metalekin eta van der Waals (vdW) elkarrekintzen indarrak ikusi dira. Hidrogeno loturak, proteina aldameneko talde funtzionalekin

edota hezurdura peptidikoekin <sup>19</sup> eman daiteke. Azukreen OH taldeek hidrogeno zubi horietan, protoi emaile edo hartzaile moduan parte har dezakete.

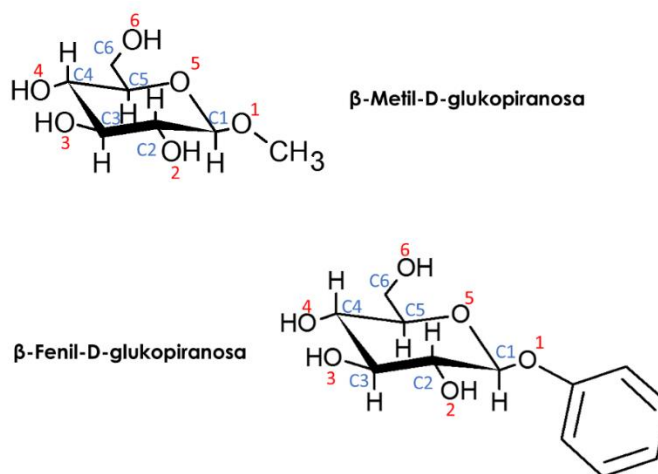
Horretaz gain, proteina eta karbohidratoen artean bestelako molekulak egon daitezke; ur molekulak, molekulen arteko hidrogeno zubiak eratuz eta ioiak,  $\text{Ca}^{2+}$ , ioiak indar elektrostatikoen bidez molekulak hurbilduz besteak beste. Hala ere, sarritan aurkitzen den multzokatzea talde aromatikoaren eta karbohidratoen alde apolarren artean  $\text{C-H} \cdots \pi$  interakzio dispertsiboen parte hartze handia iradokitzen du. Proteinek egiten duten karbohidratoen errekonozimendu molekularra sarritan ematen da triptofano, tirosina edo fenilalanina moduko aminoazidoen degradazio produktu aromatikoekin elkarrekintza selektiboen bitartez. Elkarrekintza horiek normalean karbohidratoek proteinaren aldameneko gune aromatikoekin ematen dira multzokatutako egiturak sortuz. Hori, aldez aurretik aipatutako  $\text{C-H} \cdots \pi$  lotura apolarrekin erlazionatzen da, zeinak OH edo NH motako talde polarrek egin dezaketen H-zubien loturak ordezkatu ahal duten.

Errezeptoreak osatzen dituzten proteinek, karbohidratoen errekonozimendua emateko, ohikoa da proteina horiek osatzen duten triptofano, tirosina edo fenilalanina moduko aminoazidoen degradazio selektiboa jasatea, beraien arteko elkarrekintza emateko. Proteina-karbohidrato sistema sinplifikatuaren loturen joerak eta bere interakzioen ezagutzak karbohidratoen errezeptore eraginkor zein selektiboen garapenera eraman gaitzake. Mota honetako errezeptoreen diseinuak, naturan ematen diren detekzio fenomenoak hobeto ezagutzeko balio izateaz gain, aplikazio berrien garapenerako medikuntzan, kimika analitikoan edo bestelako arloetan ere oso erabilgarriak izan ahal dira.

Errekonozimendu molekularrean ematen den karbohidrato-aminoazido elkarrekintza mekanismoen konplexutasuna disoluzioan (batez ere NMR teknikarekin <sup>20</sup>) eta gas fasean (laser espektroskopiarekin <sup>21,22</sup>) egindako hainbat ikerketak motibatu egin dute.

Karbohidratoen kimikan behin sakonduta, nahiko finkatuta geratu da karbohidratoaren eta gune aktiboen zonalde aromatikoaren artean ematen diren

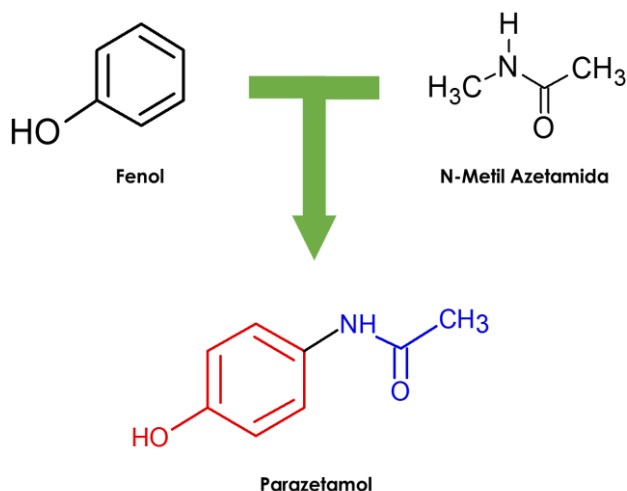
elkarrekintza ez-kobalenteen garrantzia. Hortaz, lan honen helburua errekonozimendu molekularrean aurkitzen den karbohidrato-aminoazido loturan sakontzea eta ikertzea da. Lotura horien orokorreko ezagutza bat finkatzeko, molekula isolatu eta kluster agregatuen azterketa egin da, horrekin sistema konplexu eta handiagoen identifikazio orokor batentzako abiapuntua definitu nahian. Lan honetan  $\beta$ -Fenil-D-Glukopiranosanosa eta  $\beta$ -Metil-D-Glukopiranosanosa (1.Irudia) karbohidratoek izan ahal duten interakzioak ikertu dira.



**1.Irudia** Lanean erabilitako azukre molekularak. Urdinez adierazi da karbono atomoen lehentasuna, eta gorritz oxigeno atomoen posizioak. Bi azukre molekulen  $\beta$  anomeroak erabili dira.

Agregazioen konplexutasuna ez areagotzeko, karbohidrato molekulek aminoazidoen degradazio produktuekin eratzen dituzten kluster molekularrak erabiliko dira eskala txikiko hurbilpen moduan; hala nola, fenolarekin eta N-metil azetamidarekin. Fenola tirosina aminoazidoan aurkitu daiteke, eta proteinen gune aktibo askotan egoten da molekulen arteko interakzio ez-kobalenteak ahalbidetzeko,  $\pi \cdots \pi$  pilaketa edo C-H  $\cdots \pi$  interakzioak. Bestalde, N-metil azetamida aminoazidoetan ematen den lotura peptidikoaren sinplifikazio gisa erabili da (ikusi 2.Irudia). Lotura peptidiko isolatuaren joera interakzioetan aztertzea interesgarria da, izan ere, H-loturak eratzeko lehiaketa aztertu ahal delako NH edo karboniloaren artean. Baina, aldeztatik pentsatu daiteke karbohidratoek fenolen aurrean eraztun aromatikoaren  $\pi$  orbital antilotzailerekin interakzioak eratzeko lehentasunak izango dituztela, eta lotura peptidikoarekin hidrogeno zubiak. Hortaz, bi interakzio mota hauen lehiaketa edo konbinaketa sistema berean ikertzeko, molekula komertzialen artean parasetamol

(fenola eta lotura peptidikoaren arteko konbinazioa) erabili da hurbilpen moduan lotura guñeak galdu barik (ikus 2.Irudia).



**2.Irudia** Ikertutako N-metil azetamidaren eta paracetamolaren egiturak.

Aipatutako glukosa molekulen eta fenolaren arteko kluster molekularren ikerketarekin jarraituz<sup>23</sup>, sistema aztertzeko, masa-bereizmenaren bidezko laser espektroskopia erabiliko da jet supersonikoan. Baldintza horiek lortzeko metodologia estandarra Levy<sup>24</sup>-ek garatu zuen. Metodologia horretan, egoera solidoko antolamendu molekularra tenperatura baxuetan aurkitzen den *jet* espantsio aske batera transferitzen da, bai lagina berotuz edota laser-ablazioaren bitartez ere. Karbohidrato molekulak gas fasera eramateko urtu edo termikoki degradatu gabe, laser baporizazioa erabili da. Jet espantsioari esker, molekulak ingurumenarekiko izan dezaketen edozein interakzio eliminatzen da, solbatazio-efektuak saihestuz. Zenbait lanetan frogatu egin den moduan<sup>25,26</sup>, teknika hau egokia da biomolekulen analisi konformazionala eta bestelako molekulekin izan dezakeen interakzioak aztertzeko. Teknika honen desabantailen artean, aztertutako molekulen artean kromoforo bat existitu behar da. Horrek detekzioa emateko beharrezkoa den ionizazioa ahalbidetzen du, aztertutako UV espektroaren zonaldean. Glukosa molekulen konplexutasun konformazionala dela eta, emaitza esperimentalak mekanika kuantikoan oinarritutako kalkuluekin osatu dira egituren esleipen ahalik eta zehatzena burutzeko helburuarekin.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Kalkulu teorikoak

Ikuspegi konformazionalaren lehen azterketa bat egin da mekanika molekularren *Merck* energia eremua erabiliz (MMFFs – *Merck Molecular Mechanics force field*)<sup>27</sup>, 30 kJ·mol<sup>-1</sup>-eko energia tarte baten barruan klusterra osatzen duten molekula bikoteen egitura aipagarrienak aurkitzeko. Bilaketa konformazional hau Macromodel<sup>28</sup>-en inplementatutako metodoarekin burutu da, zeina Monte Carlo eta bibrazio modu-normalen analisisen arteko konbinazioan oinarritzen den. Behin egitura multzo bat izanda, hauek antzekotasunak aurkezten dituzten familiatan pilatu dira ondoren optimizazio sakonago bat jasateko.

Egitura molekularren optimizazioa Truhlar-en taldeak garatutako Minnesota funtzioak (M06-2X) inplementatzen dituen DFT kalkuluak erabili dira. Hauek kimika arloan erabilpen zabala daukate<sup>29,30</sup>, eta espezifikoki garatuta daude interakzio dispertsiboak kontuan hartzeko. Kalkulu zehaztasuna eta denbora iraupenaren arteko erlazio onargarri gisa Pople-ren  $\zeta$ -hirukoitzeko multzo basikoa erabili da polarizazio eta orbital difusoeekin (6-311++G(d,p)). Aurreragoko ikerketetan maila teoriko honen funtzionaltasuna frogatu da tamaina molekularreko antzeko sistemetan<sup>31</sup>. Optimizazio guztiak Gaussian09-ak eragindako analisi modu-normalekin lagunduta egon dira, ziurtatzeko amaierako egiturak minimo globalak izaten direla. Lanean ematen diren energien balioak zero-puntuko energiaren (ZPE) zuzendu dira.

#### 2.1.1. Entropiaren eragina eta Gibbs energia askearen kalkulua

Jet supersonikoan dauden espezieen egitura multzoa ez dago soilik baldintzatuta konformero posible guztiekin. Honez gain, kontuan hartu behar dira isomerizazio bideen energia hesiak eta hozte prozesuaren zinetika eta dinamika. Prozesua ondo ulertzeko, kalkulaturako espezieen entalpia erlatiboak aztertzeaz gain oso lagungarria da haien entropia eta Gibbs energia askearen aldaketa ( $\Delta G$ ), lurrunketa prozesutik espantsioaren amaierako tenperatura tartean. Agregazio molekularren kasuan Gibbs energia erlatiboak,  $\Delta G_R$ , eta Gibbs lotura energia askeak,  $\Delta G_B$ ,

informazio oso baliagarria eman dezakete esperimentalki ikusten den egitura ondo zehazteko.

Entropia eta Gibbs energia askea Gaussian kalkuletatik lortzen den amaierako artxiboa eta NIST-ek <sup>32</sup> emandako informazioarekin batera kalkulatu dira, hurrengo ekuazioak jarraituz<sup>33</sup>:

$$\Delta G_{\text{monomeroak}} = E_{\text{Elek.}} + E_{\text{ZPE}} + E_{\text{ddH}} - T\Delta S_{\text{dS}} \quad (1)$$

$$\Delta G_{\text{Konplexua}} = E_{\text{Elek.}} + E_{\text{ZPE}} + E_{\text{BSSE}} + E_{\text{ddH}} - T\Delta S_{\text{dS}} \quad (2)$$

$$\Delta G_{\text{B}} = \Delta G_{\text{Konplexua}} - \sum \Delta G_{\text{monomeroak}} \quad (3)$$

$$\Delta G_{\text{R}} = \Delta G_{\text{Konplexua}}^i - \Delta G_{\text{min}} \quad (4)$$

$$\Delta G_{\text{RB}}^i = [\Delta G_{\text{Konplexua}}^i - \Delta G_{\text{monomeroa}}^i] - [\Delta G_{\text{Konplexua}}^{\text{Min}} - \Delta G_{\text{Konplexua}}^{\text{Min}}] = \Delta G_{\text{B}}^i - \Delta G_{\text{B}}^{\text{Min}} \quad (5)$$

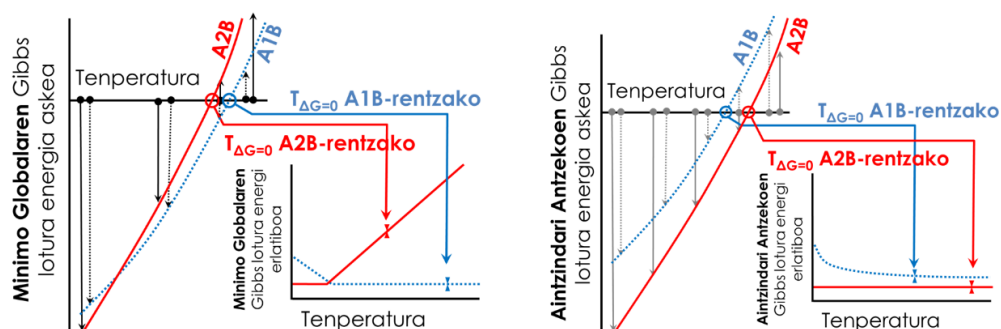
1. Ekuazioa espezie jakin baten Gibbs energia erlatiboa determinatzeko erabili da. Horretarako, espezieen egonkortasuna ( $E_{\text{Elek.}}$ ), bere zero-puntuko energia ( $E_{\text{ZPE}}$ ), entalpiaren aldaketa tenperaturarekin ( $E_{\text{ddH}}$ ), tenperatura eta entropia ( $T\Delta S_{\text{dS}}$ ) erabili dira. Azken bi terminoak NIST web-orritik<sup>30</sup> eskuratutako ahalbideekin kalkulatu dira. Konplexuen kasuan (2. Ekuazioa), beharrezkoa da BSSE zuzenketa gehitzea ( $E_{\text{BSSE}}$ ), zeinak konplexua eraketaren energiaren desberdintasunaren hurbilketa bat ematen duen (orbital molekularren superposiziorako determinatu beharreko terminoa). Hori *Counterpoise* prozeduraren bidez determinatu da<sup>34</sup>. Klusterraren formazioan ematen den Gibbs energia askearen aldaketa determinatzeko konplexuaren Gibbs energia askeari dagozkion monomeroen Gibbs energia askearen balio kendu zaio (3. Ekuazioa). Balio honekin posiblea da jakitea zein tenperatura maximoan egonkorak izan diren esperimentuan lortutako espezieak. Azkeneko ekuazioarekin (5. Ekuazioa) Gibbs lotura energia askea erlatiboa determinatu da konplexu baten Gibbs lotura energiari Gibbs lotura energien minimo globala kenduz, konplexu bakoitzaren kasuan.

Aztertzen den sistema bakoitzean konformero ugari lortzen dira bilaketa konformazional baten ondorioz. Hauen optimizazioa burutu ondoren DFT kalkuluen



bitartez, Gibbs energia askearen kalkulua burutzen da egitura bakoitzean.  $\Delta G_B$  kalkulaterakoan (3. Ekuazioa) bi ikuspuntu hartu ahal dira: alde batetik, konplexuari aztertutako monomeroen minimo globalak kentzea (Minimo Globala); edo bestetik, kasu bakoitzean, aztertzen den egituran agertzen diren monomero konformero antzekoen energiak erabiltzea (Aintzindari Antzekoenak). Biek in klusterraren Gibbs lotura energia askea lortzen da, baina balioak aldatzen dira agregazioaren formazioan aintzindariak desberdinak direlako.

Gibbs energien balio absolutuak irudikatuz gero ez da informazio adierazgarririk lortzen egituren egonkortasunei buruz. Hori dela eta, lan honetan Gibbs-en diagramak energia erlatiboan egin dira, hurrengo 3. Irudian azaltzen den eskemari jarraituz.



**3. Irudia** Konplexuen Gibbs lotura energia askeen diagramak tenperaturarekiko.

Diagrama hauetatik jakin daiteke zein tenperaturatan izango den minimoa konplexuaren egitura bat. Gure lan tarte 100-200 K tartean dagoela jakinda, IR/UV espektroekin esleipena egiterakoan diagramaren arabeko egiturak hartzen dira konparazioak egiteko. Gainera, egitura bakoitzaren oreka tenperaturak ( $T_{\Delta G=0}$ ) determinatu direnez, alde aurretik ezagutu da aztertutako egitura bakoitza gure lan tartean existitzen den edo ez.

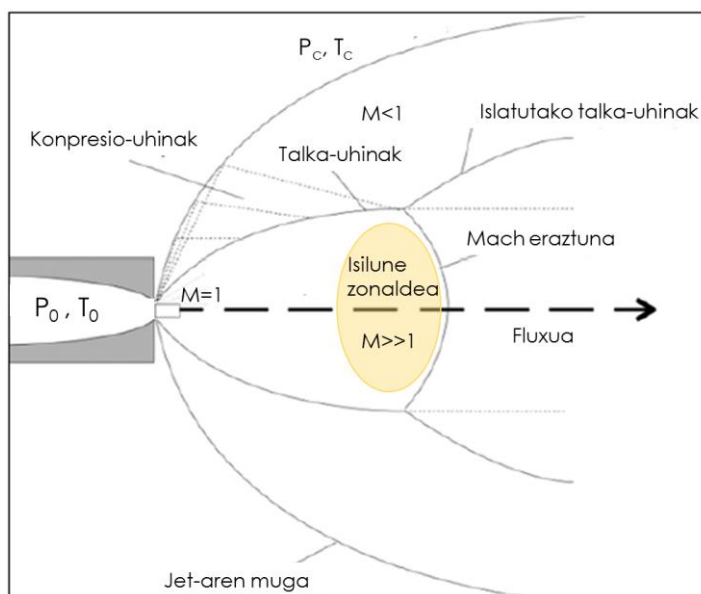
## 2.2. Teknika Esperimentalak

Kromoforoen maila elektronikoei eta van der Waals konplexuei buruzko informazioa lortzeko zenbait teknika espektroskopiko erabili dira, haien artean bateragarriak direnak. Teknika hauek laginaren jet supersoniko batean aplikatu dira.

### 2.2.1. Jet supersonikoak

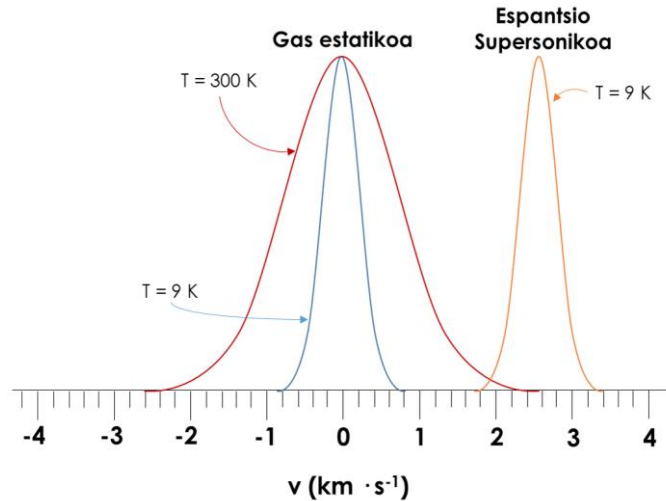
Konformero molekularren eta konplexu intermolekularen identifikazio eta karakterizaziorako jet supersoniko baten muinean burututako espektroskopia estrategia oso erabilia da. Jet supersoniko bat presio handitan aurkitzen den gas bat hutsean dagoen zonaldera haizebide batetik pasatzean eratzen da<sup>35</sup>. Indar biskosen, bero eroate eta talka-uhinen gabezia, espantsioa isentropikoa da, eta isentropikoki hedatzen den substantzia hoztu egiten da.

Espantsio supersoniko batean, errotazio eta bibrazio molekularrak molekularen fusio tenperatura baino askoz txikiagoak diren tenperaturetara hozten dira. Ikuspuntu mikroskopiko batetik ikusita, espantsioak gas estatikoaren zorizko higidura termikoa higidura direkzionalera bilakatzen du, 4.Irudian ikusten den moduan. Tenperatura translazionala gas molekulen abiadura-banaketa baten moduan definitu daiteke<sup>24</sup>.



4.Irudia Jet supersoniko baten atalen eskema.

Gas estatiko batean, abiadura-banaketa norabide batean maximo batera ailegatzen da zeroan, aurrerantzko higidura atzerantzkoaren berdina delako. 5. irudian ikusi daitekeen moduan, gas estatiko bat hoztu egiten denean abiadura-banaketa estutu egiten da, baina zeroan mantentzen delarik. Aldiz, espantsio supersoniko batean, abiadura-banaketa estutu egiten den bitartean maximoa zeroa ez den balio batera desplazatzen da, gasaren fluxua ematen delako norabide konkretu batera.



**5. Irudia** Abiadura-banaketa helio gaserako egoera estatikoa ingurugiro tenperaturan eta 9 K-etan, eta helio gasaren espantsio supersonikorako 9 K-etan.

Espantsioaren hasiera, molekulen arteko talkak eragiten dute errotazio eta bibrazio moduen izozketa bat. Espantsioan zehar, molekulen higidura translazionalaren hozketa ematen da. Espantsioa aurrera egiten duen heinean, partikulen arteko kolisioa gutxiagotu egiten da hauek isilune zonaldean sartzen direnean. Kolisioak ematen ez direnean, molekularen barne askatasun mailetatik energia ezin da atera, eta ondorioz, molekulak daukan egoera isilune zonaldean sartzean izoztuta geratzen dela esaten da. Kolisioen gabezia edozein sistema interakziorik gabeko egoeran aztertzea ahalbidetzen du. Haizebidearen inguruan konplexu intermolekularren eratzen dituzten talkak ematen dira (baita ezegonkorak diren espezieen eraketa eman daitezke), eta konplexu hauek isilune zonaldera sartzean ez dira suntsitzen. Honi esker, konplexu isolatuen karakterizazioa egin daiteke metodo espektroskopikoen bitartez.

Gure kasuan, haizebidearen ondoan laser ablazioa ematen da. Honek zailtzen du espantsioaren hozketa egokia, eta lortzen diren tenperaturak 100-200 K artekoak dira. Hala ere, molekulen bibrazio mailak nahiko despopulatuak geratzen dira, eta molekula "beroan" (bibrazio mailak populatuta dauzkaten molekulak) kantitatea ez da hain nabaria.

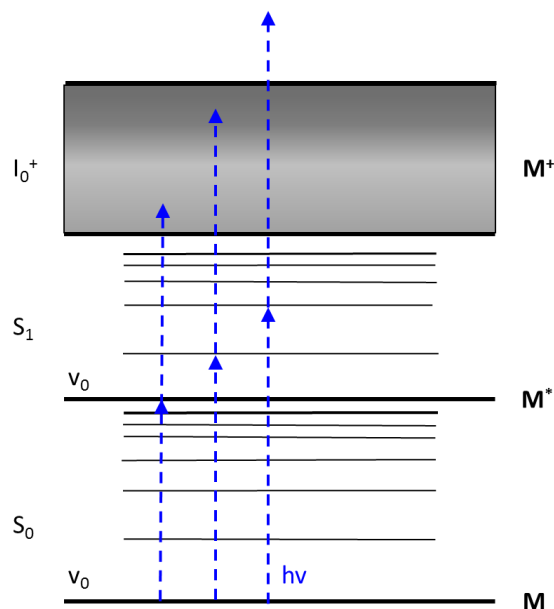
### **2.2.2. Masa bereizmenaren bidezko ionizazio espektroskopia multifotonikoa**

REMPI espektroskopiak <sup>36,37</sup> (*Resonance Enhanced Multiphoton Ionization*) ionizazio prozesuan parte hartzen duten maila elektronikoko kitzikatuei eta egoera horien bibrazio frekuentzietan buruzko informazioa lortzea ahalbidetzen du. Espezie (molekula isolatua edo van der Waals konplexua) baten ionizazioan datza bi fotoi edo gehiagoren absortzioaren bitartez, erresonantea den bitarteko maila elektronikoa erabiliz. Ondoren sortutako ioiei eremu elektriko bat aplikatzen zaie; modu honetan, ioiak detektagailurantz azelerazio bat pairatzen dute. Ionizazio zonaldearen eta detektagailuaren artean ioi selekzionarako gailu bat egoten da, gure kasuan, TOF (*Time of Flight*) ioi hautatzailea. Espezie bakoitza dagokion masa kanalean ( $m/z$ ) agertzen da, hortaz, espezieen arteko diskriminazioa ahalbidetzen du masa espezifikoak jakinda. Beraz, ioi korronteen monitorizazioa eginda kitzikapen uhin-luzeraren menpean molekula neutroaren maila elektronikoko kitzikatuaren espektroa lortzen da, bereizmen bibrazionalarekin.

#### **- Kolore bakarreko REMPI espektroskopia**

Teknika hau bi fotoi edo gehiagoren absortzioaren ondorioz emandako espezie baten ionizazioan datza, bitarteko energia maila erresonantzaile baten bidez (6. Irudia). Molekularen ionizazioa emateko oinarritzko egoeratik,  $S_0$ , gutxienez bi fotoien absortzioa eman behar da ionizazio muga gainditzeko. Kitzikapen prozesu horren probabilitatea hobetu ahal da benetako energia maila kitzikatu bat baldin badago. Baina, erresonantzia ez da baldintza bakarra espezieak absortzio multifotoniko bat jasateko. Horrez gain, beharrezkoa da  $S_1 \leftarrow S_0$  fotoien kitzikapena nulua ez den trantsizio probabilitatea izatea; eta  $S_1$  bitarteko energia maila kitzikatuaren erdibizitza beste bigarren fotoi baten absortzioa gertatzeko bezain luzea izatea.

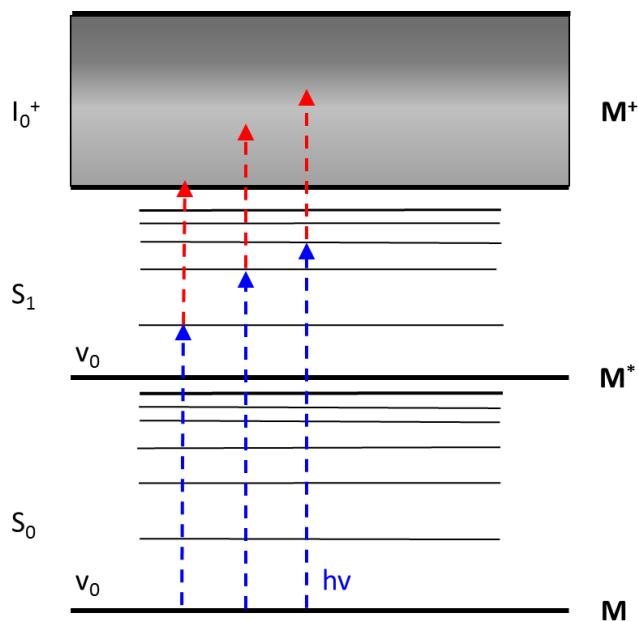
Baldintza hauek betetzen badira, ioi korronteen monitorizazioa eginda kitzikapen uhin-luzeraren funtzio gisa, molekula neutroaren  $S_1 \leftarrow S_0$  trantsizioen espektroa lortzen da erresoluzio bibrazionalarekin.



**6.Irudia** Kolore bakarreko REMPI espektroskopiaren diagrama. Fotoi baten absorptzioak erdiko egoera elektronikoa batera kitzikatzen du molekula. Bigarren fotoi baten absorptzioak molekula ionizatzen du, soberako energiarekin normalean.

- Bi koloreko REMPI espektroskopia edo R2PI

Kasu askotan, lehenengo trantsizio elektronikoaren energia ( $S_1 \leftarrow S_0$ ) ionizazio trantsizioarekin ( $I_0^+ \leftarrow S_1$ ) bat etortzen da. Ondorioz, REMPI espektroskopia erabiltzerakoan molekulak gehiegizko energia izaten du ionizazio prozesuan. Honek arazoak sortu ditzake molekulen azterketa egiteko, batez ere indar ez-kobalenteen bidez lotutako konplexuen ikerketan, non gehiegizko energia horrek konplexuaren fragmentazioa eragin dezakeen. Arazo hau konpontzeko, energia desberdineko bi fotoi erabiltzen dira, espazioan eta denboran sinkronizatutako bi erradiazio iturritatik lortzen direnak (ikusi 7.Irudia). Teknika honi bi koloreko REMPI espektroskopia edo R2PI deritzo <sup>38,39</sup>.



7.Irudia R2PI espektroskopiaren diagrama.

### 2.2.3. Erresonantzia bikoitzeko espektroskopia

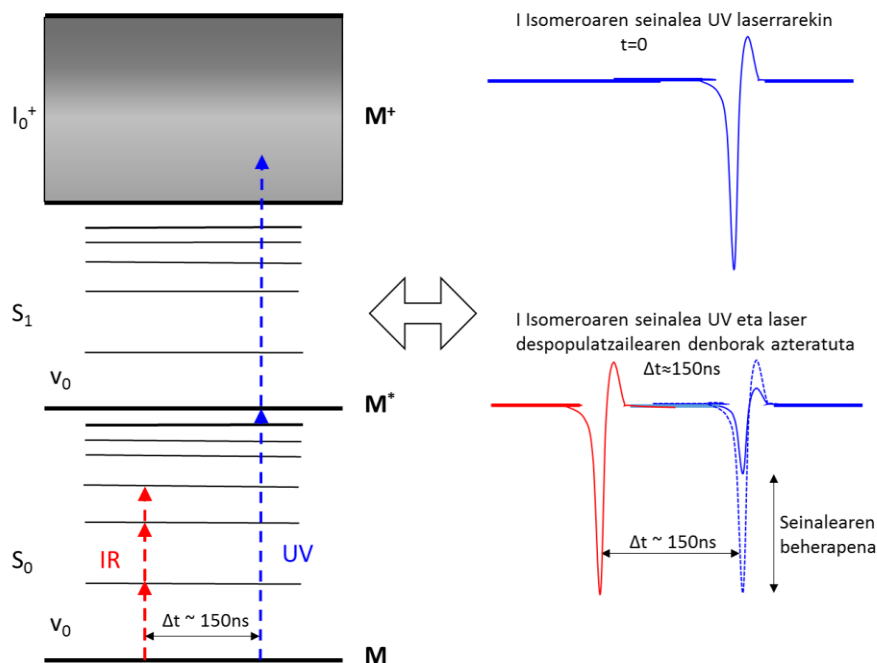
Aurretik azaldutako REMPI espektroskopiak egiturak desberdintzea ahalbidetzen du masa bereizmenarekin. Hala ere, ezin da isomero konformazionalen arteko desberdintasunik ikusi. Horretarako, erresonantzia bikoitzeko teknika espektroskopikoak erabiltzen dira, non sistema batean konformeroen diskriminazioa egitea ahalbidetzen den, masa bereizmenaren bidezko detekzioarekin.

#### - IR/UV Ion Dip espektroskopia

IR/UV *Ion Dip* edo IDIRS (*Infrared Ion Dip Spectroscopy*)<sup>40</sup> erresonantzia bikoitzeko teknika espektroskopikoa da, zeinaren bitartez sistema baten isomero konformazionalen bereizketa egin daitekeen espektro bibrazionalean. Infragorrian emititzen duen eta ultramorean emititzen duen bi laserren koordinazioa beharrezkoa da, 8.Irudian aurkezten den moduan. UV laserrekin I isomeroaren trantsizio erresonante bat sintonizatzen da eta eratutako ioi-korronteen seinalea monitorizatzen da. Beste laserra, IRan emititzen duena, UV laserra baino 150-200 ns lehenago heltzen da. Bigarren laser honi laser despulatzailea deritzo. Laser despulatzaileak zonalde espektralean ekorketa egiten duen bitartean, UV erradiazioarekin eratzen diren ioien seinaleen aldaketak monitorizatzen dira. Laser despulatzaileak emititzen duen erradiazioak I isomeroaren trantsizio erresonante

batekin topo egiten duenean, oinarrizko energia mailan ( $S_0$ ) despopulazio bat gertatzen da. Jarraian, UV laserra sistemara heltzean populazio txikiago bat aurkituko du oinarrizko  $S_0$ -an, eta ondorioz ioi kantitate txikiagoak sortuko ditu. Ioi sorpenaren gutxipena seinale elektrikoaren intentsitatearen beherapen gisa hautematen da. Aldiz, laser despopulatuzaileak emititzen duen erradiazioa trantsizio erresonante batekin bat ez badator, I isomeroaren oinarrizko energia mailaren populazioan ez da aldaketarik egongo eta seinale elektrikoa berdina izango da. Seinalearen beherapena esperimentalki ikusteko, hau bitan banantzen da denbora tarte batekin. Denbora tarte hau UV eta IR laser akzioen arteko denborarekin erlazionatuta dago. Modu honetan, osziloskopioan intentsitate bereko bi seinale ikusten dira masa/karga kanal bakoitzean. Isomeroaren oinarrizko populazioa kitzikatzerakoan, gailur batean intentsitatearen beherapena ikusten da. Honi seinalearen erreketeta deritzo.

Gure kasuan, laser infragorria  $2800-3800\text{ cm}^{-1}$  tartean sintonizatu daiteke, zeinak informazio oso baliagarria ematen duen NH eta OH talde funtzionalen bibrazioei buruz.



8. Irudia IDIRS espektroskopiaren diagrama.

### 2.3. Sistema Esperimentalak

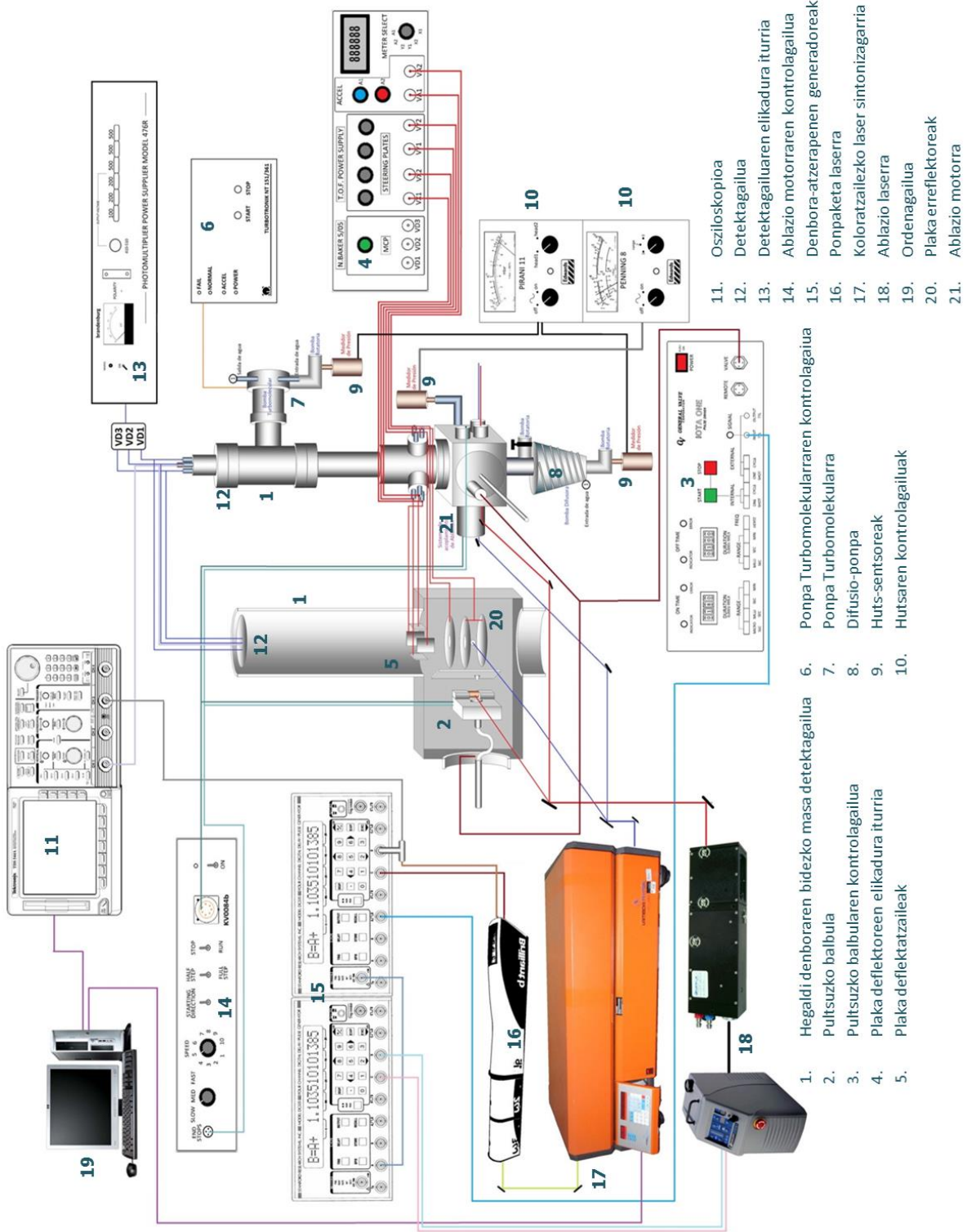
Lan honetan aztertzen diren molekulei buruzko informazio esperimentalak lortzeko Euskal Herriko Unibertsitateko Espektroskopia Taldearen masa espektrometro bat erabili da, zeinari ablazio sistema bat gehitu zaion. Modu honetan, posiblea da egoera solidoko laginen espektroak gas fasean jasotzea lurrunketa prozesuetan ematen diren arazoak izan ordez; hala nola, produktuaren fragmentazioa edota beroketaren ondoriozko deskonposaketa termikoak.

Espektro bat jasotzeko, lehenik eta behin solido egoeran aurkitzen diren molekulak energia handiko ablazio laser baten bidez baporizatzen dira. Jarraian, gas molekulak garraiatzen dira ionizazio gunera, non bertan erradiazioarekiko elkarrekintzak ematen diren. Sekuentzia esperimentalak, hortaz, hasten da pulsu molekularra sortzen denean. Hurrengo 9. eta 10. irudietan laborategiko sistema aurkezten da.



9. Irudia Laborategiko sistema esperimentalak.





10. Irudia Laborategiko sistema esperimentalaren eskema orokorra.

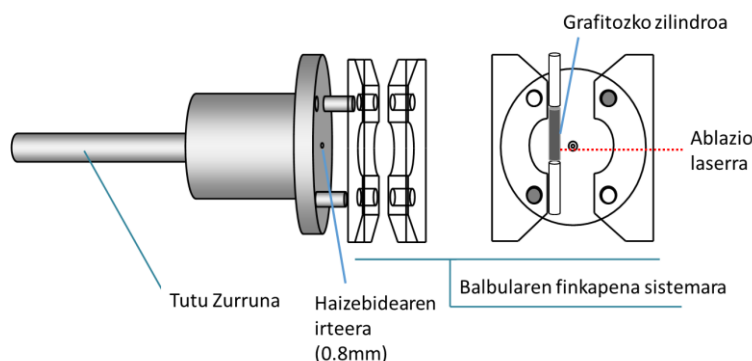
### 2.3.1. Laginaren tratamendua

Lagina sistema esperimentalean sartu baino lehen, karbonozko nano-tutuez osatutako matrize batekin tratatu egiten da. Erabilitako  $\beta$ -D-Fenil glukopiranos ( $\geq 97\%$ ),  $\beta$ -Metil-D-glukopiranos ( $\geq 99\%$ ), N-metil azetamida ( $\geq 99\%$ ) eta Paracetamola ( $\geq 98\%$ ) Sigma-Aldric-H-etik lortu egin dira. Mortairu batean bi erreaktiboaren kantitate ekimolekularrei karbonozko nanotutuak gehitzen zaizkie eta nahastea ondo birrindu eta homogeneizatu egiten da.

Lagina kabitatean sartu ahal izateko, grafitozko zilindro bat erabili da. Itsasgarri pixka baten laguntzaz, grafitozko zilindroa pulberizatutako laginaren gainera pasatzen da, eta jarraian presioa egiten da lagina ondo itsatsita geratu dadin. Prozesua errepikatu egiten da zilindroaren paretetan laginaren geruza homogeneo bat lortu arte.

### 2.3.2. Laser bidezko baporizazioa eta jet supersonikoaren espantsioa

Aldatutako injekzio balbula (General Valve Iota One) batez osatuta dago, zeinaren haizebidearen irteeran (0.8mm) aztertuko den lagina duen grafitozko zilindroa bertikalki kokatzen den, 11. irudian ikusi daitekeen moduan. Aldatutako laser-sortak laginaren alde batean jotzen du, solidoaren zati bat baporizatuz. Baporizatutako partikulak gas garraiatzaile (Ar, Ne edo He) batekin narrasten dira, eta ganbaran dagoen presio diferentzia dela eta, *jet* supersoniko bat sortzen da. Ablazio laser gisa Nd:YAG egoera solidoko laser mota erabiltzen da (*Quantel ULTRA*), zeinak infragorrian emititzen duen (lehen harmonikoa, 1064nm) eta *Q-switched* moduan lan egiten duen.



11. irudia Laser ablazioarentzako aldatutako injekzio balbula.

Baporizazio prozesuaren errepikakortasuna hobetzeko, lagina abiadura konstante batean biratzen da, pausuz pausuko motor bati esker. Modu honetan, laser pultsu bakoitzak zilindroaren puntu desberdin batean jotzen du, lagin-atal berria erasotuz sekuentzia bakoitzean.

#### 2.3.4. Hegaldi-denboraren bidezko masa espektrometroa

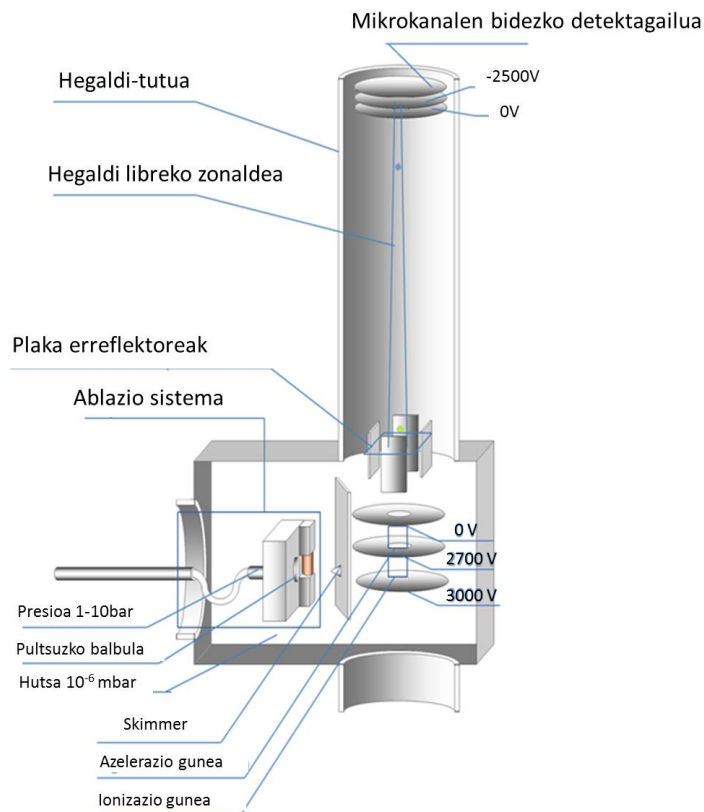
Masa espektrometroa erauzketa eta azelerazio plaka sistema batez, hegaldi tutu batez eta mikrokanalezko detekzio plaka (*MCP, Micro C-Hannel Plate*) batez osatuta dago (ikusi 12.Irudia). Ionizazio ganbararen gainean ioiak Wiley eta McLaren motako hegaldi-tutu linealen sarreran fokalizatzen dira. Honetarako, tutuaren sarreran plaka erreflektore batzuk daude, zeinek ioi-sorta detektagailura bideratzen duten. Ioien hegaldian eremu elektrikorik ez dagoenez, ioien banaketa ahalbidetzen du haien masa/karga erlazioaren funtziopean:

$$\frac{T_1}{T_2} = \sqrt{\frac{m_1}{m_2}} \quad (6)$$

Non  $T_i$  ioiaren hegaldi denbora den, eta  $m_i$  ioi horri dagokion masa. Sistemaren erresoluzioa hurrengo ekuazioarekin adierazten da:

$$R_T = \frac{t}{\Delta t} = \frac{m}{\Delta m} \quad (7)$$

Non  $\Delta t$  gailurraren altueraren erdialdeko zabalera den (FWHM) eta  $\Delta m$  elkarren segidako bi masen arteko tartea den. Aipatutako FWHW-a ioiak duten hasierako energia zinetikoarekiko menpean dagoenez, pultsu molekularren abiaduren distribuzioa txikiagotzean bereizmena handiagotu egiten da. Hau lortzeko *skimmer* delako pieza bat jartzen da *jet* supersonikoaren bidean.



**12. Irudia** Hegaldi denboraren bidezko (TOF) banaketa sistema.

Ioien detekzioa mikrokanalen bidezko detektagailu (MCP) baten bidez burutzen da (ikusi 13. Irudia). Mikrokanal hauen gainean ioi batek talka egitean elektroioi bat askatzen da, zeinak seinale elektriko bat ematen duen amplifikazio etapa baten ondoren.



**13. Irudia** Mikrokanalen bidezko detektagailua.

### **2.3.5. Huts sistema**

*Jet* supersonikoaren espantsio ganbararen hutsa lortzeko Diffstak 160-700 Edwards olioizko difusio ponpa erabili da (760 l/s-ko kapazitatea ponpaketarako), 25 m<sup>3</sup>/h irteera fluxua izatea ahalbidetzen duen Trivac D25B Leybold ponpa birakariaren laguntzarekin. Masa espektrometroaren hutserako, 145 l/s-ko kapazitatea duen Turbovac 151 Leybold ponpa turbomolekularra erabili da, 4 m<sup>3</sup>/h irteera fluxua ematen duen Triviac D4B Leybold ponpa birakariaren laguntzarekin. Laginik ez dagoenean, masa espektrometroaren hutsa 10<sup>-6</sup> mbar izatera ailegatzeko da. Baina lagina sartzen denean, espantsioarekin 10<sup>-5</sup>-10<sup>-4</sup> mbar-eko presioa lortzen da 0.1 – 0.3 ms-ko pultsu molekularrekin eta Ar erabilita gas garraiatzaile gisa. Presio baldintza horiek lortzen dira elkarren arteko bi esperimenteren errepikapen abiadura 10 Hz-koa baldin bada.

### **2.3.6. Datuen jasotze eta tratamendurako instrumentazioa**

Osziloskopio batez, ordenagailu batez eta *Agilent VEE* erramintarekin eraikitako programa batez osatuta dago datuen jasotzeko sistema. Eraikitako programari esker, hobetu egiten da laserrekiko komunikazioa. Honi esker, ordenagailua datuen jasotze sekuentziak arduratzen da, espektro elektromagnetikoaren ekorketak modu jarraitu batean ahalbidetuz. Detektagailutik sortzen den seinale elektrikoa Tektronix 520A osziloskopioan jasotzen da, eta bertan esperimenterako baldintzak ezartzen dira ekorketa egin baino lehen. Esperimenteru guztian zeharreko sinkronizazioa eta pultsuen sekuentziak bi pultsu sortzaileen (DG535 Digital Delay Generator) bitartez kudeatu da.

### **2.3.7. Erradiazio Iturriak**

Esperimenteruetan erabilitako teknikak burutzeko erradiazio iturri bat edo gehiago erabili dira, teknikaren arabera:

- 1- Fine Adjustment Pulsare Pro-S koloratzailezko laserra (Nd-YAG Quantel Brilliant-b laser batekin bonbeatuta dagoena, 400 mJ/pulso indarrarekin 532nm-tan), erradiazioa bikoizteko eta nahasteko unitatearekin akoplatuta. Cumarine 540A erabili da koloratzaile gisa, zeinak 517-612 nm tartean (260-

305 nm bikoizketaren ondoren) erradiazioaren emisioa izatea ahalbidetzen duen.

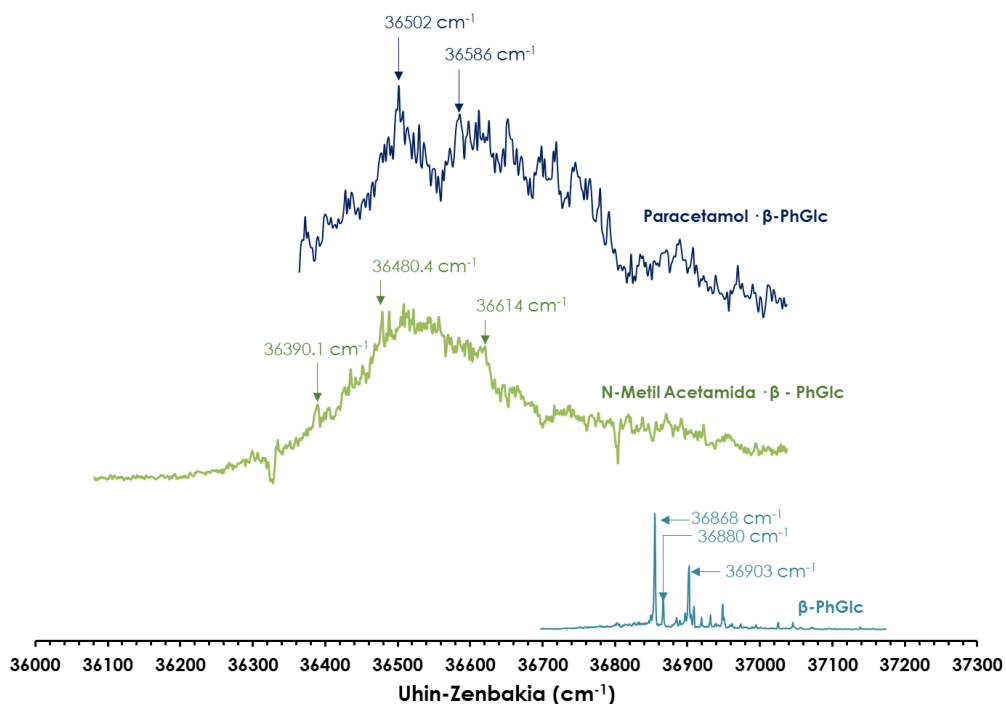
- 2- Quantel ULTRA ablazio laserra (Nd-YAG motakoa), zeinak lehenengo harmonikoan emititzen duen, 1064nm. Laser pultsuaren zabalera 4-6 ns-koa da, eta 10 Hz frekuentziarekin ematen ditu pultsuak. *Q-switch* moduaren atzerapen denbora aldatuz laserraren energia kontrolatu daiteke. Seinale/Zarata erlazio egokia lortzeko eta seinalearen egonkortasuna hobetzeko 5 mJ/pultsuko energiak erabiltzen dira.
- 3- Nd-YAG Quantel YG-980 laserra (532 nm-ko uhin-luzeran 750mJ/pultsuko energiakoa), zeina Quantel TDL-90 laser koloratzailea bonbeatzeko erabili den. Pultsuaren iraupena 10 ns-koa da, izpiaren lerro-zabalera  $0.2 \text{ cm}^{-1}$  izanik. Koloratzailezko laserraren atalak erradiazioa nahasteko eta bikoizteko unitate bat dauka, zeinarekin ultramore zonaldeko erradiazioa lortu egin den.
- 4- Continuum Surelite Nd-YAG laserra (532 nm-tan emititzen duena), zeina OPO (LaserVision) sistema bat bonbeatzeko erabili den. Sistema honetan erradiazioaren zatiketa egiten da infragorrian argia sortarazteko.

### 3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

Hurrengo atalean aztertutako agregazio molekularretatik lortutako emaitzak aurkeztu eta eztabaidatuko dira. Karbohidratoen interakzioak aztertzeko molekula desberdinekin lan egin da. Kromoforoa ez da beti izan glukosa molekula. Aztertutako karbohidratoak bi izan direnez ( $\beta$ -Fenil-D-Glukopiranosan eta  $\beta$ -Metil-D-Glukopiranosan), hauekin lortutako emaitzak banan-banan azaldu dira, amaieran hauen interakziorako lehen tasunak ondorioztatu dira.

#### 3.1. REMPI espektroak

Hurrengo 14.irudian  $\beta$ -Fenil-D-Glukopiranosan,  $\beta$ -Fenil-D-Glukopiranosan ... N-metilazetamidan eta  $\beta$ -Fenil-D-Glukopiranosan ... Paracetamol klusterren REMPI espektro esperimentalak aurkezten dira.

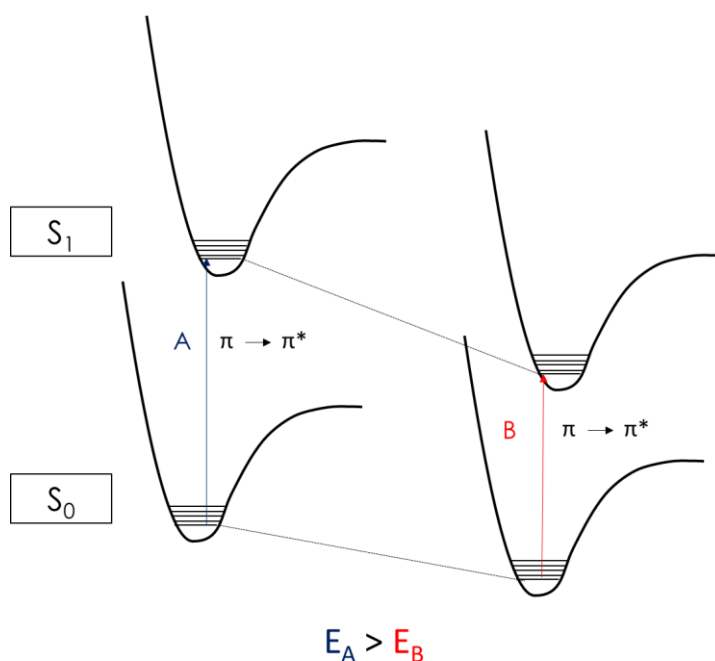


14.irudia  $\beta$ -PhGlc,  $\beta$ -PhGlc ... N-Metil azetamida eta  $\beta$ -PhGlc ... Paracetamol klusterren REMPI espektroak.

$\beta$ -Fenil-D-Glukopiranosaren absorzio multifotonikoko lehen ultramore espektroa jet espantsio batean F.O. Talbot eta J. P. Simons egindako lanean aurkezten da <sup>41</sup>. Espektro hori, 36800-37200  $\text{cm}^{-1}$  tartean neurtu zen, eta hiru glukosa konformeroren

$0_0^0$  trantsizioen existentzia frogatu zen 36868, 36880 eta 36903  $\text{cm}^{-1}$ -an, zeinak azukrearen C5-ri lotutako hidroximetil taldearen orientazioaren arabera trantsizioei dagozkie. 14.irudian molekula berberaren REMPI espektroa erreproduzitu da, non azaldutako trantsizioak adierazten diren. Fenil glukosa molekula bera kromoforo gisa erabilia, bestelako klusterren REMPI espektroak neurtu dira. Hauetan,  $\beta$ -Fenil-D-Glukopiranosaren  $0_0^0$  trantsizioak ikusten dira, baina ez dira ematen uhin-luzera berdinetan. Fenomeno hau ikusten da kitzikatzen den kromoforo molekular interakzio batean parte hartzen duenean, zeinetan oinarrizko trantsizio elektronikoak espektroaren gorri-alderantz desplazamendu bat pairatzen duten.

Kromoforoa eraztun aromatiko bat izanda, kitzikatzen diren trantsizio gehienak molekular  $\pi \rightarrow \pi^*$  izaten dira. Kromoforoak interakzio batean parte hartzean (H-loturen bidez, vdW loturen bidez edota biek aldi berean) orbital molekular hauen energia mailak txikiagotu egiten dira, eta molekula egonkortu egiten da. Ondorioz,  $\pi$  elektroia bat  $\pi^*$  orbitalera kitzikatzeko behar den energia txikiagoa da, hots, trantsizioa ikusteko energia txikiagoko fotoiak behar dira (ikusi 15.irudia).



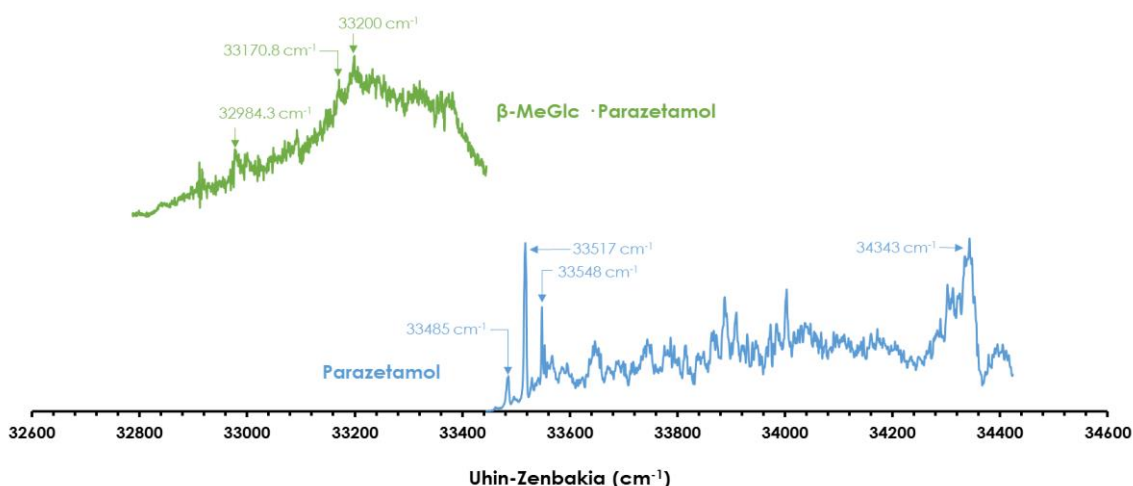
15.Irudia Elektroia baten kitzikapenaren energia diagrama  $\pi - \pi^*$  trantsiziorako.



14. Irudian ikusi daitekeen moduan,  $\beta$ -Fenil-D-Glukopiranosaren oinarrizko trantsizio elektronikoak aurkitu dira bai N-metil azetamidarekin zein paracetamolarekin interakzionatzen duenean ere. Bi kasuetan, trantsizio hauek gorri-alderantz desplazatuta daude.  $\beta$ -PhGlc · N-metil azetamidaren kasuan espektroa  $36200\text{ cm}^{-1}$  inguruan hasten da absortzio zabal batekin. REMPI espektroak zehar seinalearen bi beherapen ikusten dira. Hauek kromoforo molekula soilaren absortzio bortitz baten ondorioz eman dira, zeinak eragiten duen osziloskopioan oin-lerroaren mugimendu bat. Mugimendu horien ondorioz, lortzen den seinalea ezin da oin-lerroarekin zuzendu, hau berez ere desplazatu delako. Arazo nahiko arrunta izan da esperimentuan zehar,  $\beta$ -PhGlc, edo Paracetamola kromoforo gisa erabili denean absortzioa intentsuegia delako, detektagailua asetuz.

$\beta$ -PhGlc · Paracetamol klusterraren kasuan, absortzioa  $36360\text{ cm}^{-1}$  inguruan hasten da absortzio zabal batekin. Agregazioen bi kasuetan absortzio zabalak ikusten dira monomeroarekin konparatuta ( $\beta$ -PhGlc). Hau kromoforoaren interakzioaren beste fenomeno adierazgarri bat da. Kromoforoak interakzionatzen baldin badu, bi molekulako sistema batean frekuentzia txikiagoko bibrazio moduak akoplatu egiten dira. Honen ondorioz, espektro elektronikoan trantsizio bibrazionalen agerpena handitu egiten da, trantsizio elektronikoarekin batera frekuentzia txikiko bibrazioak akoplatzen direlako bi molekulen artean. Fenomeno hau dela eta, klusterretan zaila izaten da molekularen trantsizioak argi eta garbi ikustea absortzio banden zabalkuntza dela eta.

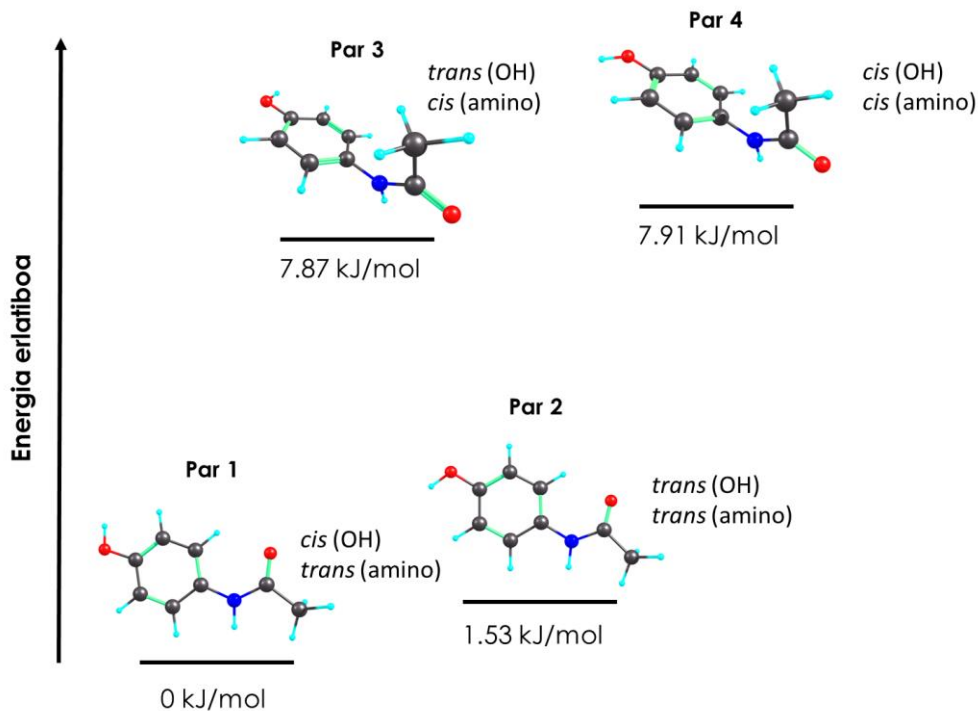
Aurreko emaitzak lortzeko  $\beta$ -PhGlc-ren fenilo taldea erabili da kromoforo gisa. Baina, kromofororik gabeko glukosa molekulen interakzioak aztertzeko, nahastean bertan aurkitzen den paracetamolaren eraztun aromatikoa erabili da baliabide moduan. Paracetamolaren lehen espektro elektronikoa jet espantsio supersonikoan Beames eta Hudsonnek <sup>42</sup> ikertu zuten.  $\beta$ -PhGlc-rekin konparatuta, oinarrizko trantsizioak frekuentzia txikiagoetan agertzen dira. Hori dela eta, laser iturri desberdin bat erabili da paracetamolaren REMPI espektroa lortzeko. Hurrengo 16. Irudian aurkezten da lortutako paracetamolaren espektroa eta  $\beta$ -Metil-D-glukopiranosaren eta paracetamolaren arteko klusterraren REMPI espektroa:



16. Irudia Paracetamol eta  $\beta$ -MeGlc  $\cdots$  Paracetamol klusterraren REMPI espektroak.

Paracetamolari dagokionez, ezkerretatik agertzen diren lehen bi gailurrak *trans* eta *cis* konformeroren  $0_0^0$  trantsizioei dagokie,  $33485\text{ cm}^{-1}$  *trans* konformerorako eta  $33517\text{ cm}^{-1}$  *cis* konformerorako konkretuki. Hasierako trantsizioei dagokienez, espektroa bibliografiako espektroen nahiko antzekoa da<sup>43,44</sup>. Beraz, momentuz ziurtatu da espantsioan *cis* eta *trans* egiturak daudela. Hala ere, aurretik beste ikerketetan egindako espektroen oin-lerroa ez da gurea bezain zaratatsua. Hori, erabilitako laser iturriaren energiarekin zuzenki erlazonaturik dago. Espektroaren frekuentzia txikiagoko zonaldean lortutako laser energia txikiagoa da gainontzeko espektroarekin konparatuz. Laser energia handiegia molekulen absortzio multifotonikoa eragiten du, zeinak espektroaren oin-lerroa handiagotu eta trantsizio diskretuen behaketa ezezten duen. Errore nahiko arrunta izaten da REMPI espektroetan, eta absortzio multifotonikoa ekiditeko beste ultramore laser bat erabili daiteke ionizazio ahulago bat lortzeko, R2PI teknikarekin esaterako.

Kalkulu konputazionalak egiterakoan, lau konformero desberdin auresan dira (17. Irudia), Sohn eta bere taldeak adierazi zuten bezala<sup>43</sup>. Egitura horien artean, amina eta karbonilo taldeak *cis* egoeran dituztenak energia altuagotan aurkitzen dira egitura lauak baino. Hala ere, molekula horien energia maila ez da hain altua espantsioan ikusi ahal ez izateko. Konformero gehiago kitzikatzeko ideiarekin, oinarriko trantsizioetan ez ezik, IR/UV espektroak ere neurtu dira frekuentzia altuagotan ( $34343\text{ cm}^{-1}$ ).



**17. Irudia** M06-2X/6-311++G(d,p) mailan optimizatutako paracetamolaren egiturak. Erabilitako nomenklatura paracetamolera: OH fenolikoaren posizioa C=O taldearekiko, eta amina taldearen posizioa C=O taldearekiko.

16. Irudian, paracetamolaren espektroaren ondoan  $\beta$ -Metil-D-glukopiranososa ( $\beta$ -MeGlc) eta paracetamola molekulen artean eratutako agregazioaren REMPI espektroa aurkezten da. Aldez aurretik azaldutako agregazioen REMPI espektroetan gertatzen den moduan, gorri-alderanzko desplazamendu bat ikusten da paracetamolaren trantsizioei dagokienez. Kasu honetan, gorri-alderanzko desplazamendua eman daiteke kromoforoak elektroi emaile moduan jokatzen duelako: paracetamolaren OH fenolikoak hidrogeno lotura batean parte hartzen badu protoi emaile moduan, eraztun aromatikoetik, indukzioz, dentsitate elektronikoa txikiagotu egiten baita. Efektu honek paracetamolaren trantsizioen maila energetikoak alda ditzake, espektroa gorri-alderantz lekualdatuz. Desplazamenduz gain absortzio bandaren zabalkuntza ematen denez, kluster honetan kromoforoak (paracetamola) C-H  $\cdots \pi$  interakzio edota H-lotura batean parte hartzen duela ondorioztatu daiteke. Espektroan, trantsizio garrantzitsuenak markatu dira; horien artean, paracetamolaren  $0_0^0$  trantsizioa egongo da.

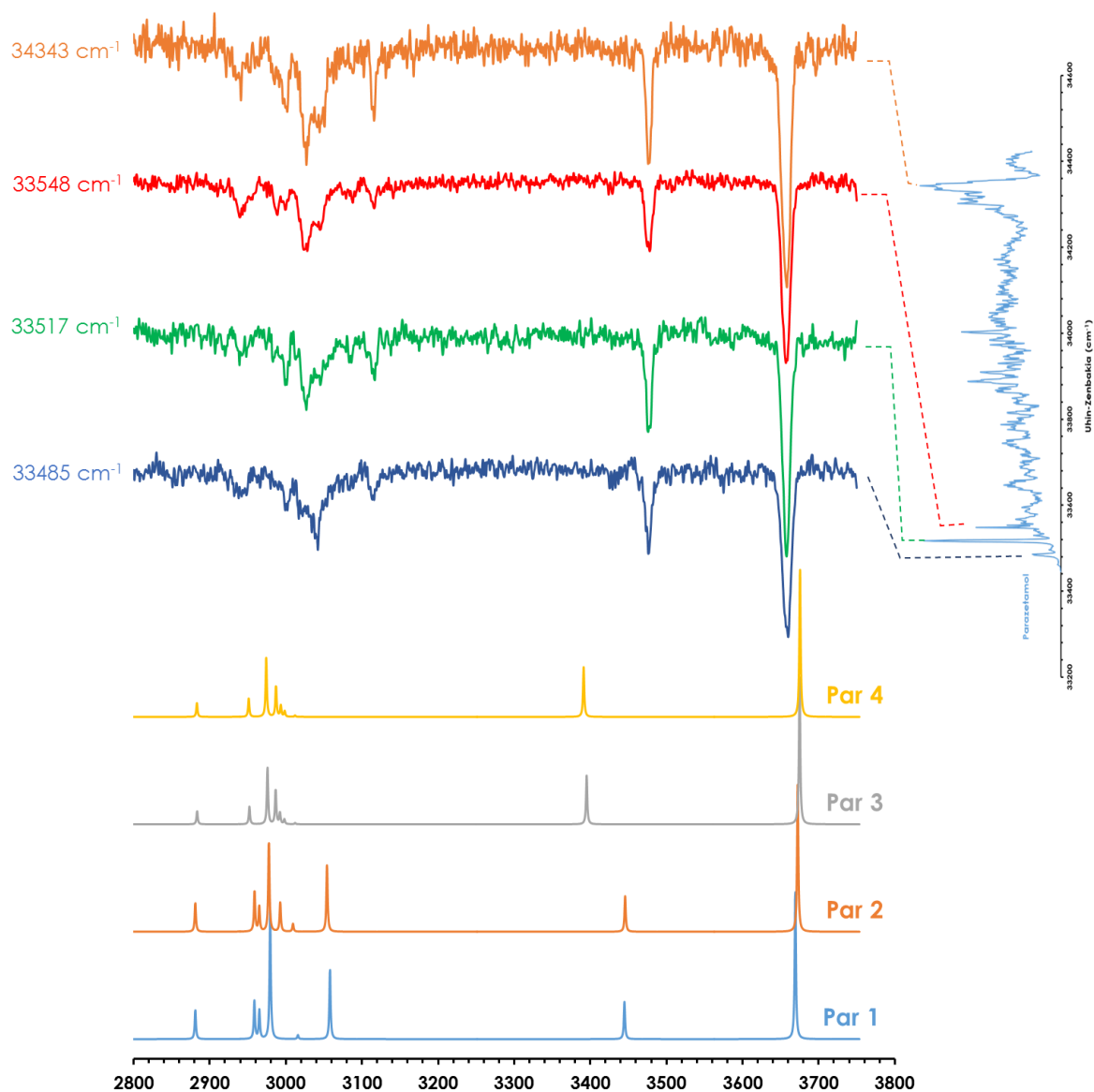
Agregazio molekular hauen REMPI espektroetatik informazio sakonago bat lortzea zaila da absortzio zabal eta zaratatsua dela eta. Hala ere, sistema hauen trantsizio nagusiak finkatu dira, ondoren IR/UV espektroen bitartez analisi estruktural sakonago bat burutzeko. Horretaz gain, molekula isolatuaren espektroarekin konparatuta gorri-alderanzko desplazamenduak ikusi dira. Ondorioz, kromoforoarekin interakzioak aurkezten dituzten egiturak ikustea espero da.

Jarraian, sistema bakoitzeko IR/UV espektroen aurkezpena eta azalpena burutu da.

### **3.2. IR/UV espektroak**

#### **- Parazetamola**

Neurtutako azetaminofenoaren espektro infragorriak hurrengo 18. irudian aurkezten dira, kalkulaturako espektro infragorri teorikoekin konparatuta. Ikusi daitekenez, laser ultramorea uhin-luzera desberdinetan finkatu da konformero desberdinen absortzio infragorria lortzeko helburuarekin.



**18.Irudia** Esperimentalki neurtutako IR/UV espektroa eta simulatutakoen arteko konparazioa parasetamol molekularako. Espektroa lortu da UV laserra REMPI-aren lau uhin-luzera desberdinetan finkatuz, eta egituren simulazioa M06-2X/6-311++G(d,p) mailan burutu da. X ardatza eskalatzeko OH zonalderako 0.9385 faktorea erabili da.

Espektro teorikoetan antzeman ahal den moduan, *cis*(OH)- eta *trans*(OH)- duten *cis*(amida) egituretan (Par3 eta Par4) N-H loturari dagokion tentsio bibrazio-banda ( $3400\text{ cm}^{-1}$ ) desplazatuta agertzen da gorri-alderantz *trans*(amida) (Par 1 eta Par 2) egiturek duten bandekin konparatuta ( $3450\text{ cm}^{-1}$ ). Hori gertatzen da amida talde funtzionalean eratutako hidrogeno zubi intramolekularrak NH eta karboniloaren oxigenoaren artean, trantsizioa gorri-alderantz desplazatzen duelako. Beraz, hau

jakinda, planarrak ez diren paracetamolaren Par3 eta Par4 egiturak, N-H bibrazio bandaren bitartez identifikatu ahal dira. Ikusi daitekenez, egindako espektroetan ez da ikusten N-H loturaren bibrazio bandaren desplazamendurik, eta honek *cis*(amida) egituren gabezia frogatu du.

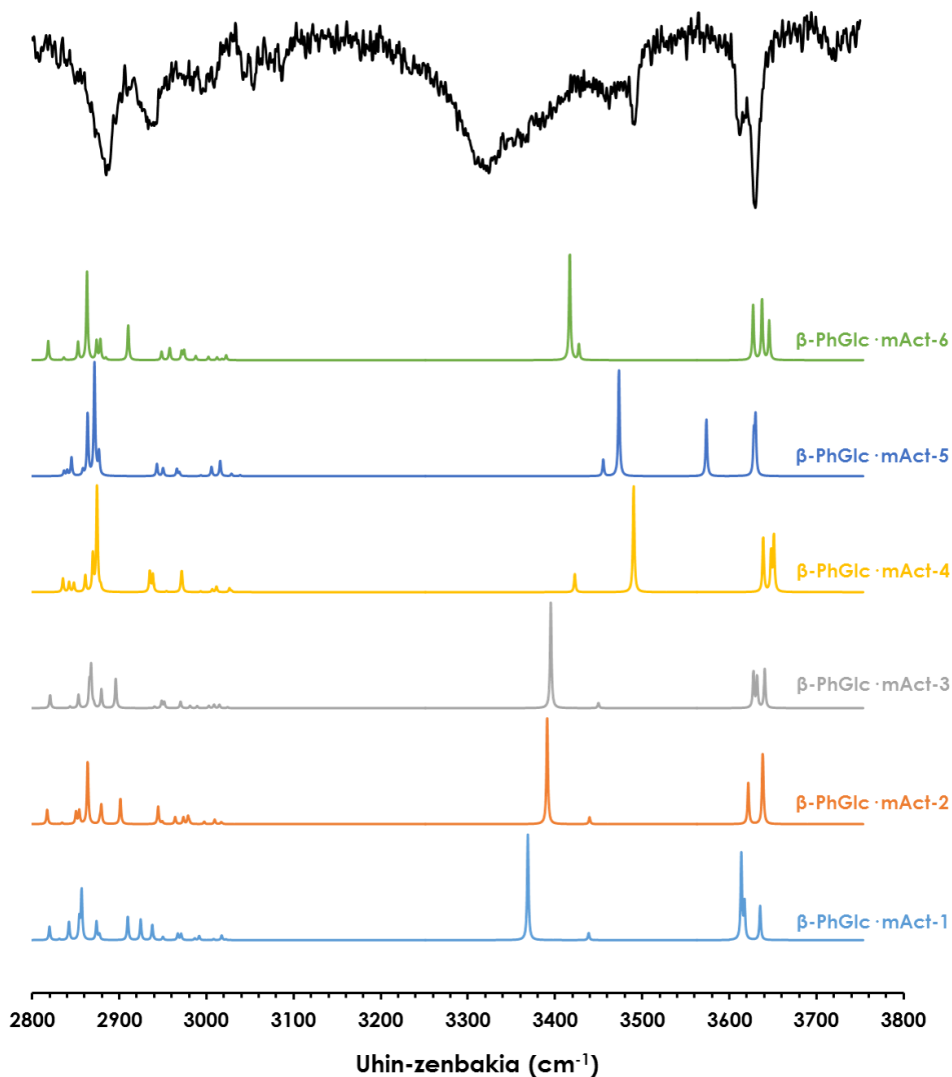
Horrez gain, badago *cis*(amida) egiturak identifikatzeko beste modu bat C-H bibrazioen zonaldean (2900-3150  $\text{cm}^{-1}$ ). Espektro teorikoen arabera, Par3 eta Par4 egiturek 3120  $\text{cm}^{-1}$  –tan bibrazio-banda bat gutxiago dute Par1 eta Par2 egiturekin konparatuta. Bibrazio-banda honi dagokion bibrazioa talde peptidikotik gertuago dauden eraztun aromatikoaren C-H loturen bibrazioei dagokie. *Trans*(amida) egituran, C-H lotura horietako batek oztopo bat jasaten du bere bibrazioan, karbonilo taldearen oxigenoaren  $\pi$  orbital antilotzaileena hain zuzen. Hidrogenoaren eta karbonoaren arteko lotura luzatzean, hidrogenoa oxigenoaren  $\pi$  elektroi antilotzaileak eratzen duten hodei elektronikotik hurbilago dago. Efektu honek hidrogeno-atomoaren aldarapena eragiten du, bibrazio-modua ezegonkortuz. Ondorioz, energia pixka bat altuagoak beharko dira bibrazio hau kitzikatzeko, eta horregatik agertzen da urdinalderantz desplazatuta. Espektro esperimental guztietan, 3120  $\text{cm}^{-1}$  inguruan agertzen den bibrazio banda da hain zuzen ere.

Beraz, lortutako espektro hauekin ziurtatu da *cis*(amida) egituren existentzia espantsioan oso eskasa edo eza dela. Dena den, egitura horien aurkikuntza lortzeko helburuarekin, espantsioaren baldintzak aldatu dira. Alde batetik, beste ultramore laser bat erabili da,  $0_0^0$  trantsizioen zonaldekoak baino energetikoak diren fotoiak ematen dituenak. Modu honetan, molekula erresonantziatik kanpo egongo dira absortzio jarraitu batean, hots, konformeroen kitzikapen ez selektiboa egiten da. Bestaldetik, gas garraiatzailea heliora aldatu da. Honi esker espantsio “beroago” bat lortzen da, He atomo baten talka efektiboa txikiagoa delako Ar atomo batena baino, eta modu honetan konformeroen arteko interkonbertsioa ekiditu daiteke.

Nahiz eta konformero guztien formazioa derrigortu kitzikapen uhin-luzera aldatuz, infragorrietan, N-H eta C-H bibrazio-banden desplazamendua ez da ikusten. Hortaz, *cis*(amida) egituren existentzia ezin da frogatu.

-  $\beta$ -Fenil-D-glukopiranososa ··· N-Metil azetamida

Kluster honen IR/UV espektroa lortzeko laser ultramorea hiru uhin-luzera desberdinetan finkatu da: 36390.1, 36480.4 eta 36614  $\text{cm}^{-1}$ . Sistema hiru trantsizio desberdinetan finkatu den arren, hiru kasuetan IR/UV espektro bera lortu da, hurrengo 19.Irudian aurkezten dena. Honek, jet espantsioan konformero bakarraren edo konformero nahaste baten existentzia dagoela aurreratzen du. Espektroekin batera energiatan aurkitu diren sei egitura baxuenen infragorri espektroen simulazioak, M06-2X/6-311++G(d,p) mailan kalkulatuta aurkezten dira.

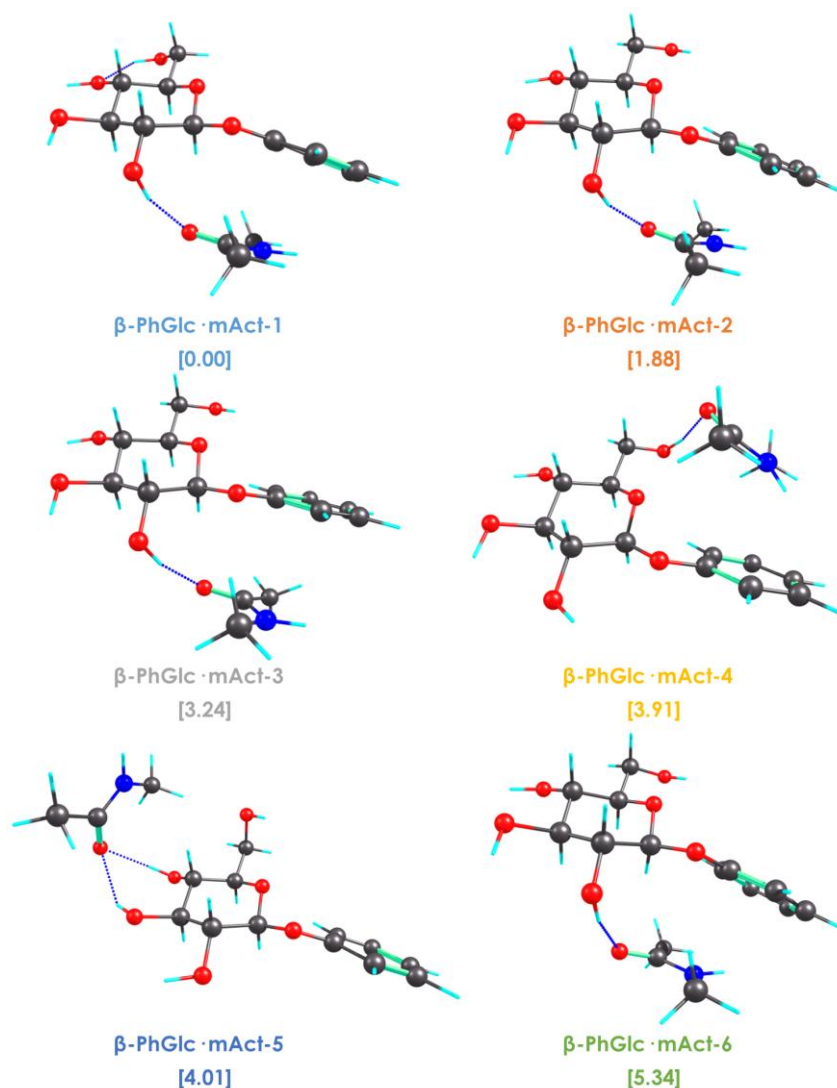


**19.Irudia** Esperimentalki neurtutako IR/UV espektroa eta simulatutakoen arteko konparazioa  $\beta$ -Fenil-D-glukopiranososa ··· N-Metil azetamida klusterrarentzako. Espektroa lortu egin da UV laserra 36480.4  $\text{cm}^{-1}$  finkatuz,

eta egituren simulazioak M06-2X/6-311++G(d,p) mailan egin dira. X ardatza eskalatzeko OH zonalderako 0.9385 faktorea erabili da.

Lortutako espektroak ondo definituta dauden hiru trantsizio aurkezten ditu 3500-3800  $\text{cm}^{-1}$  bitartean, sendoagoa eta zabalagoa den trantsizio bat 3340  $\text{cm}^{-1}$  inguruan eta pilatutako zonaldea 2800-3200  $\text{cm}^{-1}$  tartean, azken hauek, C-H tentsio mugimenduei dagozkienak.

Kimika konputazionala aplikatzean 180 egitura desberdin lortu dira kluster honentzako. Familiatan bereiztu eta gero, soilik 25 optimizatu dira metodo zehatzago baten bidez. Energia minimoak diren lehen sei egiturak hurrengo 20. Irudian behatu daitezke.

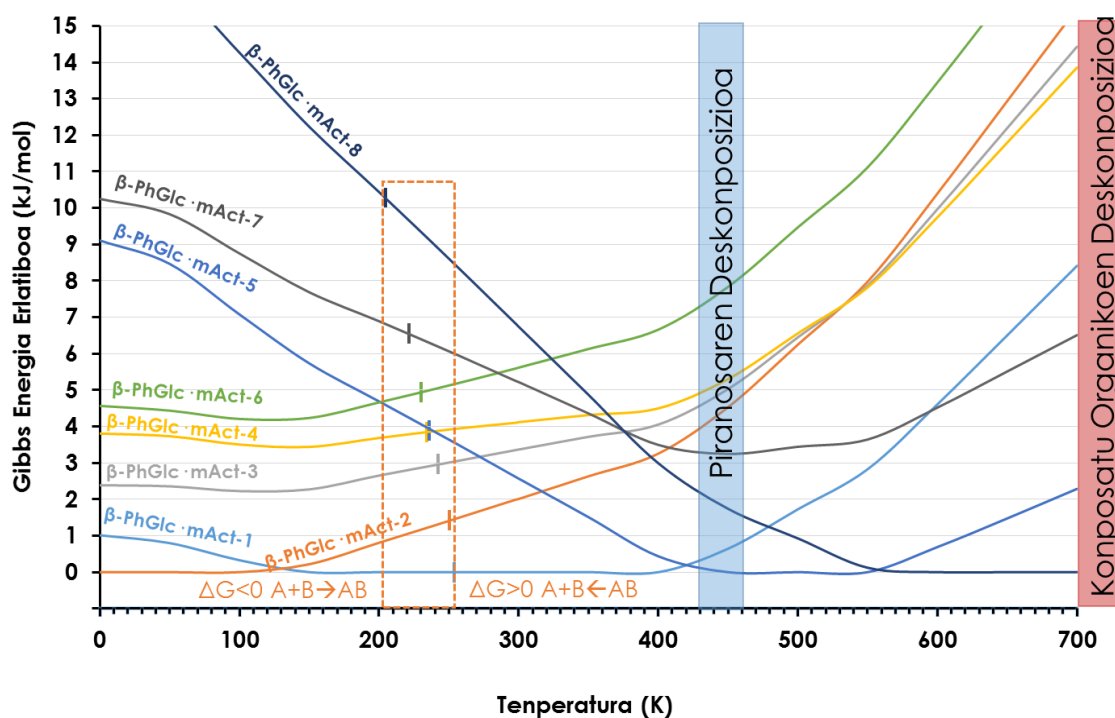


**20. Irudia** Gibbs energia askean egonkorrenak diren lehen sei egiturak  $\beta$ -PhGlc · · · N-Metil azetamida klusterrean, M06-2X/6-311++G(d,p) mailan kalkulatu. Kortxeteen artean energia erlatiboak adierazi dira  $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  unitateetan.



Lortutako espektro esperimentalak korrelazioan dago energia erlatibo txikiena duten kalkulaturako lehen bi egiturekin,  $\beta$ -PhGlc· mAct-1 eta  $\beta$ -PhGlc· mAct-2 hain zuzen ere. Energiatan altuagoak diren egituren IR espektroak desberdinak dira emaitza esperimentalekin konparatuz gero, batez ere, trantsizio bibrazionalen lerrakuntzan.

Informazio gehiago izateko, tenperatura desberdinetan determinaturako Gibbs-en energia erlatiboak kalkulatu dira. Honi esker gure tenperatura tartean (100-200K) ikusi daitezke zein egiturak diren egonkorrenak (ikusi 21.Irudia), eta horren laguntzaz, espektroaren esleipena egin da.



**21.Irudia** Gibbs energia aske erlatiboa x.Irudian agertzen diren  $\beta$ -Fenil-D-glukopiranosaren ... N-metil azetamida konformeroentzako. Lauki laranjak adierazten du  $\Delta G > 0$  den gunea, eta ondorioz, zein puntutik aurrera klusterra ez den egonkorra. Kalkulurako Minimo Globalaren ikuspuntua erabili da.

Goiko 21.Irudiak adierazten duen bezala, aurrean daitezke  $\beta$ -PhGlc· mAct-1 edo  $\beta$ -PhGlc· mAct-2 egiturak espantsioan egongo direla, eta ondorioz, ziurrenik, lortutako espektro esperimentalean parte hartuko dutela. Alde batetik, bai  $\beta$ -PhGlc· mAct-1 zein  $\beta$ -PhGlc· mAct-2 egituretan, N-metil azetamida glukosaren O2H-ra lotuta dago H-zubi baten bitartez, eta bestetik, azetamidaren metilo batek glukosaren

kromoforoarekin C-H $\cdots\pi$  motako interakzioa aurkezten du. Desberdintasun bakarra bi egituren artean glukosaren C5-ari lotutako hidroximetilo taldearen posizioa da, 20. irudian antzeman daitekeen moduan. Hidroximetilo beso honen mugimenduak egituren arteko interkonbertsioa ahalbidetu dezake. Energia langa horiek gainditu ahalko litzateke klusterraren edota monomero baten talkarekin gas garraiatzailearen molekula batekin. Gure esperimentuan, erabilitako gasa Ar izan da, eta honek eman dezakeen energia talka efektibo baten ondorioz  $\sim 10$  kJ/mol da, *MaC-H 2* abiadurara. Kalkulu teorikoen arabera, konformeroen interkonbertsioa emateko gainditu behar den energia langa 10 kJ/mol baino handiagoa denez gero, probabilitate handiarekin ikusiko ditugu konformero bakoitza bere minimo lokalean harrapatuta.

19. Irudiko espektroan ikusten diren lehen bi banda estuak ( $\sim 3620$  eta  $\sim 3640$   $\text{cm}^{-1}$ ) glukosa molekularen O3H, O4H eta O6H taldeen tentsioei dagozkie. Hauek, ingurumen oso antzekotan daude kokatuta, batez ere O3H eta O4H. Hori dela eta, trantsizio bibrazional hauek nahiko gertu agertzen dira, gailur bat eta sorbalda baten modura. Gorri-alderantz dagoen hurrengo banda NH tentsioari dagokio eta  $\sim 3500$   $\text{cm}^{-1}$ -ean agertzen da. Normalean, NH askeen bibrazioak 3450-3550  $\text{cm}^{-1}$  bitartean agertzen dira, eta espektro esperimentalean ez da ikusten inolako desplazamendurik trantsizio honetan. Hortaz, ondorioztatu daiteke espantsioan agertzen ari diren klusterren egituretan ez dagoela hidrogeno lotura NH taldean ematen duenik.

NH bibrazio bandatik gorri-alderantz dagoen banda zabala, 3320  $\text{cm}^{-1}$ -ean maximoa duena, O2H tentsioari dagokio. Baina, kasu honetan, OH talde honen hidrogenoak H-lotura batean parte hartzen du N-metil azetamidaren karbonilo taldearekin. Alkohol talde honen trantsizio bibrazionala gorri-alderantz desplazatuta dago hidrogeno lotura sendo baten ondorioz sortutako efektu induktiboa dela eta. Zenbat eta sendoagoa izan hidrogeno lotura, orduan eta anharmonikoagoa egiten da lotura. Honen ondorioz, talde funtzionalaren bibrazioarekin batera frekuentzia txikiagoko bibrazioak akoplatu egiten dira, eta absortzioa zabalagoa egiten da. Infragorri espektroen simulazio teorikoan efektu hau ere ikusi daiteke 3360-3400  $\text{cm}^{-1}$  inguruan agertzen den banda intentsua eta estuarekin, zeina glukosaren O2H-ri dagokion.

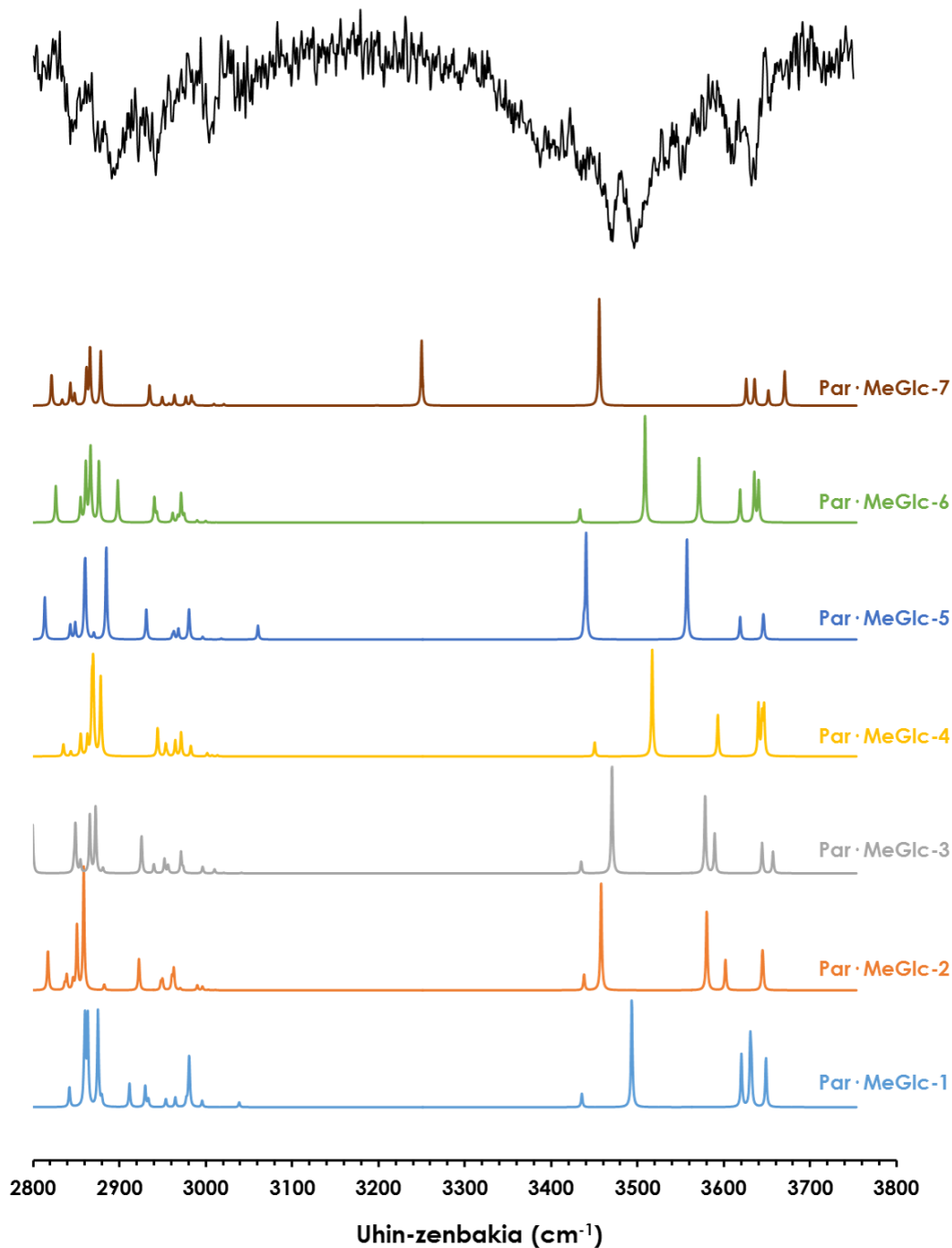
C-H tentsioen zonaldean konparazioa zailagoa da, seinale/zarata erlazioa pixka bat handia delako trantsizio guztiak garbi ikusteko. Hala ere, simulazioekin konparatuta oso intentsuak diren bi absortzio ikusten dira  $\sim 2900$  eta  $\sim 2940$   $\text{cm}^{-1}$ , zeinak ados datozen  $\beta$ -PhGlc· mAct-1 eta  $\beta$ -PhGlc· mAct-2 egituren espektroekin.

Beraz, lortutako emaitza esperimenterak simulazio teorikoekin konparatuz gero, ondorioztatu egin da espantsioan  $\beta$ -PhGlc· mAct-1 eta  $\beta$ -PhGlc· mAct-2 egiturak ikusten direla. Hala ere,  $\beta$ -PhGlc· mAct-2 eta  $\beta$ -PhGlc· mAct-3 egiturak oso antzekoak dira eta soilik desberdintzen dira N-metil azetamidaren C-H<sub>3</sub> taldeen errotazioan, baina Gibbs energien diagramaren arabera  $\beta$ -PhGlc· mAct-3 egitura energian altuegi dago espantsioan ikusi ahal izateko. Metil talde horien errotazioa energiak txikia behar duenez aurrera eramateko, eta beraz esperimendu baldintzetan erraz eman daitekenez, bi egituren arteko interkonbertsioa eman eta  $\beta$ -PhGlc· mAct-3 egitura  $\beta$ -PhGlc· mAct-1 edo  $\beta$ -PhGlc· mAct-2 energiatan minimoak diren egitura bihurtu daiteke.

-  $\beta$  – Metil-D-glukopiranososa ··· Paracetamol

Agregazio molekular honen kasuan zaila izan da IR/UV espektroen neurketa. 16. Irudian aurkeztutako REMPI espektroan markatutako trantsizioetan finkatu da UV laserra, baina klusterraren seinalearen detekzioan arazoak egon dira. Agregazioaren absortzioa ematen zen bitartean, masa/karga erlazio txikiagoko molekula batek absortzio bortitza jasaten zuen. Osziloskopioan hegaldi denbora txikiagotan agertzen zenez klusterrarekin konparatuta, eta honen absortzioak detektagailua asetzen zuenez, klusterrak trantsizio bat ematean seinale okerra iristen zen osziloskopiora. Arazo horri konponbide bat emateko eta agregazio molekular honen IR/UV espektroa neurtu ahal izateko, UV laserra urdin-alderagoko zonalde batean finkatu da  $\sim 36700$   $\text{cm}^{-1}$ -tan. Modu honetan detektagailua ez da asetzen masa txikiagoko zatiketen edo molekulen absortzioaz. Kontrara, kromoforoaren oinarritzko trantsizioetatik urruneko zonalde batean neurtu da. Hortaz, konformeroen kitzikapenean selektibitatea galdu egiten da, eta ondorioz, espero da IR/UV espektroa konformero bat baino gehiagoren nahasketa izatea.

Hurrengo 22.Irudiak aurkezten du neurtutako  $\beta$ -MeGlc  $\cdot \cdot \cdot$  Parazetamol klusterraren IR/UV espektroa kalkulaturako egitura egonkorren simulazio teorikoekin konparatuta.

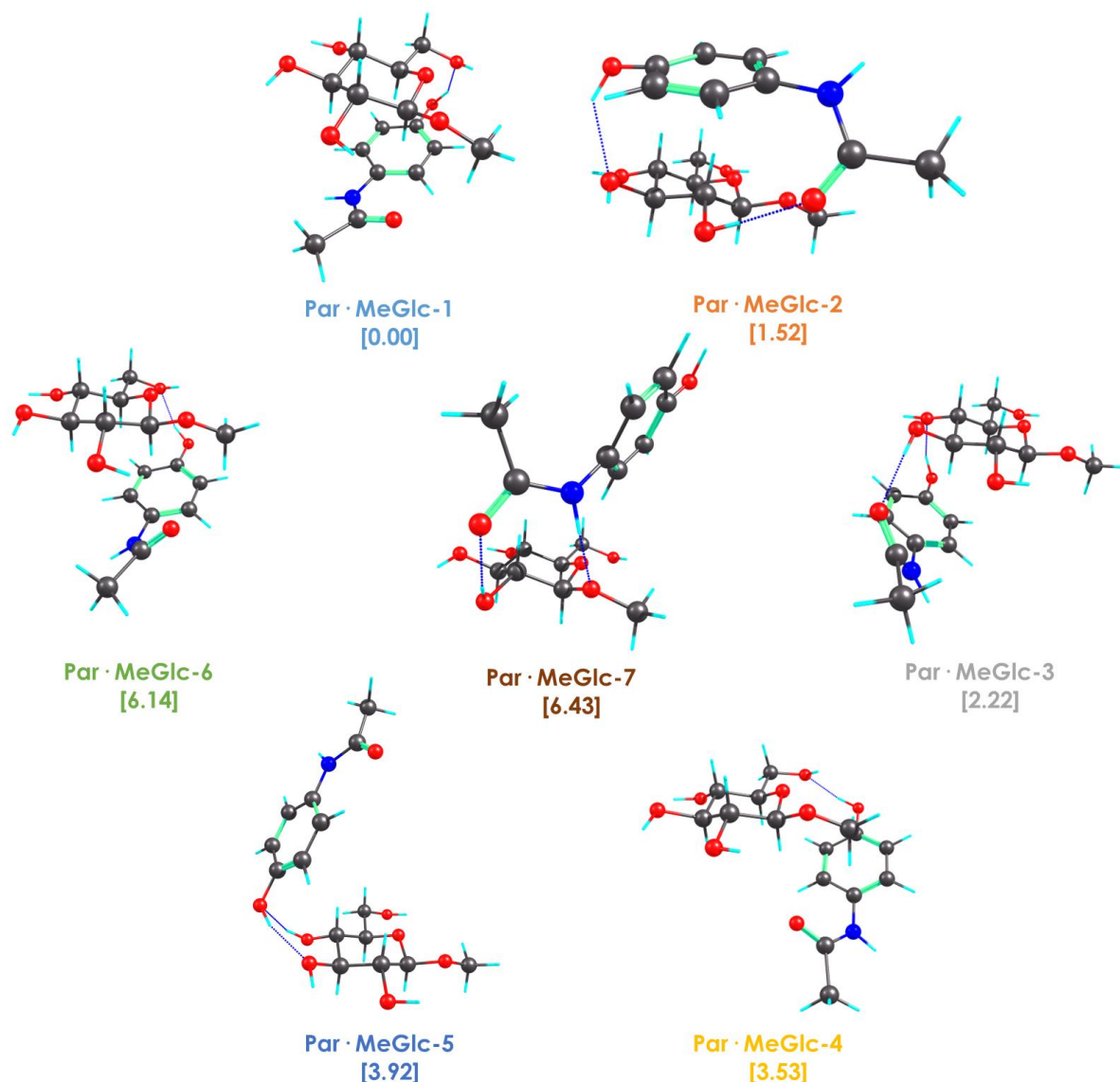


**22.Irudia** Esperimentalki neurtutako IR/UV espektroa eta simulaturakoen arteko konparazioa  $\beta$ -Metil-D-glukopiranos  $\cdot \cdot \cdot$  Parazetamol klusterrarentzako. Espektroa lortu egin da UV laserra  $36700 \text{ cm}^{-1}$  finkatuz, eta egituren simulazioak M06-2X/6-311++G(d,p) mailan egin dira. X ardatza eskalatzeko OH zonalderako 0.9385 faktorea erabili da.

Espektro esperimentalaren eta teorikoen arteko lehen konparaketa eginda, ez da ikusten nagusitzen den egitura konkreturen bat. Hala ere, jakinda klusterra oinarrizko trantsizioetatik kanpo kitzikatu dela, posiblea da konformero bat baino gehiago izatea espantsioan. Beraz, espektroaren analisi zehatzago bat egitea beharrekoa da.

Urdin-aldetik hasita, espektroan aurkitzen ditugun lehen bandak ( $3640$ ,  $3600$  eta  $3540\text{ cm}^{-1}$ )  $\beta$ -MeGlc-ren OH askeen tentsioei dagozkie. Hiru banda ikusi ahal dira, non intentsuena erdian agertzen den. Hauek pixka bat zabalak dira, ondoan daukan trantsizio zabalaren ondorioz. OH aske hauei dagozkien trantsizioak oso antzekoak dira Par · MeGlc-1 egitura iradokitzen duen espektro teorikoarekin konparatuta. OH askeen ondoren bibrazio banda intentsuena eta zabalena dugu,  $3480$ - $3500\text{ cm}^{-1}$  tartean. Honen zabalkuntzak adierazten du talde funtzionalak H-lotura batean parte hartzen duela, ziur aski, glukosa molekularen OH lotzaile baten bibrazioa. Hala ere, absortzio zabal honetan bi gailur bereiztu daitezke. Beraz, posiblea da antzekoak diren bi konformeroen OH lotzaileei dagozkien bibrazio banda izatea, bata bestearen alboan agertzen direlarik.

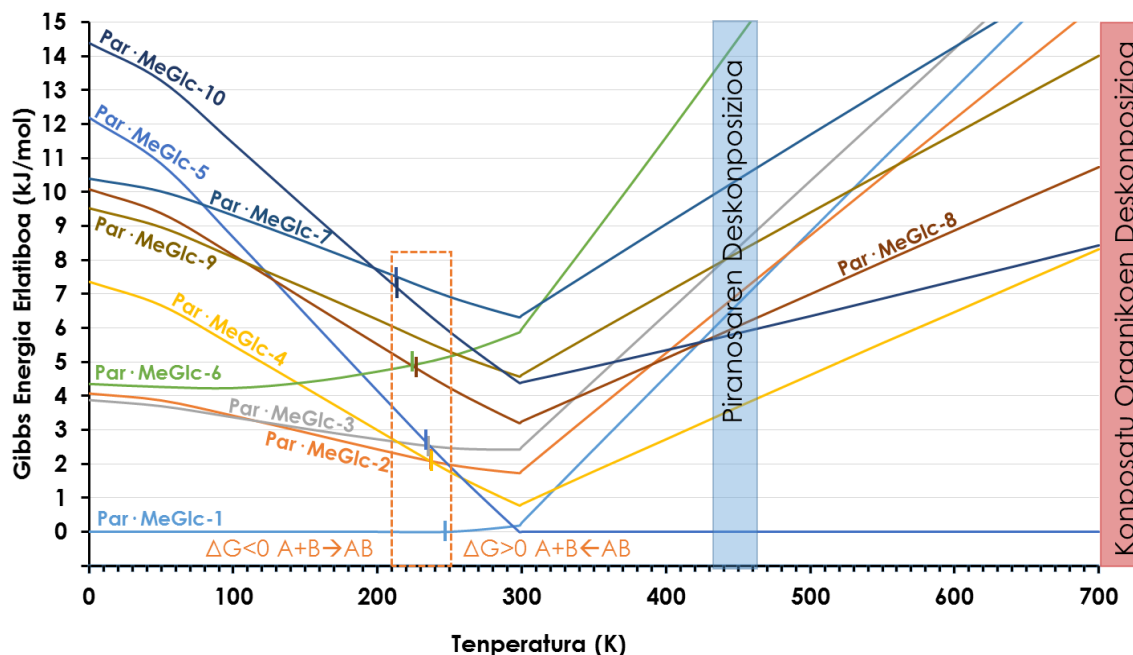
Jakinda espantsioan konformeroen nahaste bat egon ahal dela, simulatutako egituren azterketa bat egitea beharrezkoa da antzekoak edo haien artean interkonbertsioak eman ahal diren egiturak identifikatzeko. Mekanika molekularren bidezko bilaketa konformazionalak egin ondoren 261 egitura desberdin aurkitu dira. Antzekotasunen arabera familiatan antolatu ondoren, soilik 28 egiturak jasan dute optimizazio zehatzago bat. Hurrengo 23. Irudian agertzen dira energiatan egonkorrenak diren egitura motak kluster honetarako.



**23.Irudia** Gibbs energia askean egonkorrenak diren lehen zazpi egiturak  $\beta$ -Metil-D-glukopiranososa  $\cdots$  Paracetamol klusterrarako, M06-2X/6-311++G(d,p) mailan kalkulatu. Kortxeteen artean energia erlatiboak adierazi dira  $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  unitateetan.

Antzeman daiteken moduan, erlazio handi bat dago Par · MeGlc-1, Par · MeGlc-4 eta Par · MeGlc-6 egituren artean. Hauetan, bi molekulen posizioak zerbait aldatzen dira, baina beti mantentzen da H-zubia glukosaren O6 eta paracetamolaren OH fenolikoaren artean. Par · MeGlc-1 eta Par · MeGlc-6 egituretan C-H  $\cdots$   $\pi$  interakzioa glukosaren C1 eta paracetamolaren artean mantentzen den bitartean, Par · MeGlc-4 egiturean C-H  $\cdots$   $\pi$  interakzio hau glukosaren O1 posizioan atxikitutako metiloak eragiten du. Hala ere, Gibbs energia erlatiboaren kalkuluan antzeman daitekeen

moduan (ikusi 24.Irudia), Par · MeGlc-1 minimoa da eta Par · MeGlc-4 eta Par · MeGlc-6 egiturak gehiegizko energia dute espantsioan ikusi ahal izateko.



**24.Irudia** Gibbs energia aske erlatiboa x.Irudian agertzen diren  $\beta$ -Metil-D-glukopiranosaren Parazetamol konformerentzako. Lauki laranja adierazten du  $\Delta G > 0$  den gunea, eta ondorioz, zein puntutik aurrera klusterra ez den egonkorra. Kalkulurako Minimo Globalaren ikuspuntua erabili da.

Zenbait egitura erraz baztertu ahal dira aurkezten dituzten loturak eta interakzioak direla eta. Par · MeGlc-7 egituraren H-lotura bat ematen da zeinean parazetamolaren NH-ak parte hartzen duen. Simulazio teorikoak ondo zehazten duen moduan, NH bibrazio bandaren desplazamendu bat ikusi beharko zen trantsizioa  $\sim 3240 \text{ cm}^{-1}$  agertaraziz. Espektrorik ez da ikusten inolako trantsiziorik zonalde honetan, eta azaltzen den parazetamolaren konformeroa, *cis*(amida), alde aurretik espantsioan existitzen ez dela frogatu da (aurretik aurkeztutako parazetamolaren atalean). Bestalde, Par · MeGlc-2, Par · MeGlc-3 eta Par · MeGlc-5 ere baztertu daitezke hauek glukosaren bi OH taldek parte hartzen dutelako H-loturetan. Honek eragingo zuen  $3560\text{-}3580 \text{ cm}^{-1}$  agertzen den trantsizioa (OH askeengandik hurbilena) zabala izatea, eta espektrorik ez da ikusten inolako trantsiziorik zonalde honetan, eta azaltzen den parazetamolaren konformeroa, *cis*(amida), alde aurretik espantsioan existitzen ez dela frogatu da (aurretik aurkeztutako parazetamolaren atalean).

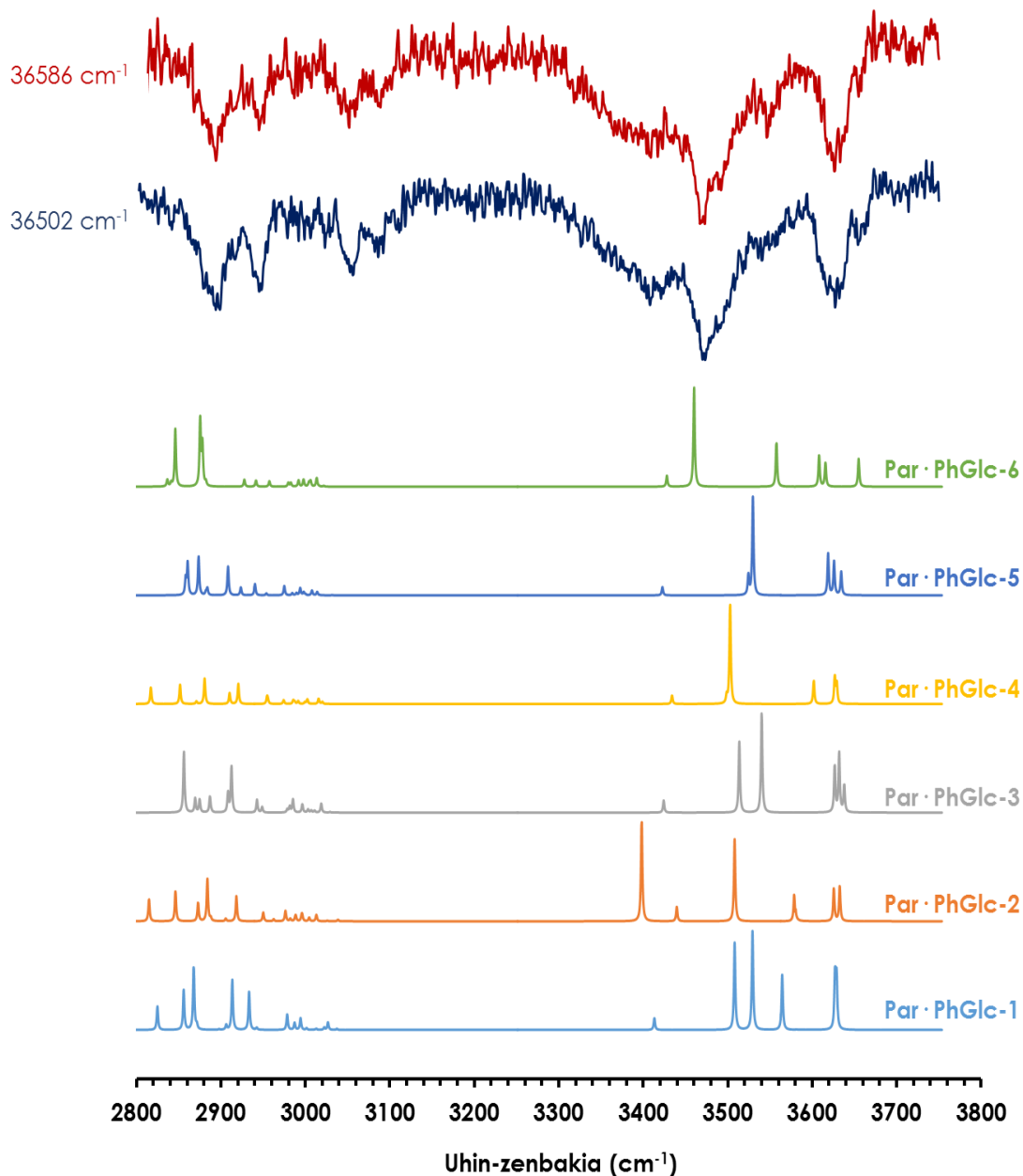
trantsizio zabal bakarra agertu beharrean. C-H bibrazioen zonaldea ez da hain adierazgarria egituren esleipenerako, baina proposatutako hiru egituren aldetik nahiko ados daude simulazioa eta emaitza esperimentalak. Hala ere, bestelako egiturek bibrazio banda oso antzekoak aurkezte dute, eta agian esleipen zehatzago bat egiteko beharrezkoa izango lirateke IR/UV espektro gehiago egitea seinale/zarata erlazioa txikitzeko edota beste uhin-luzera batean finkatzea UV espektroa froga gehiago izateko.

Beraz, Gibbs-en energien kalkuluen arabera egitura egonkorrena espantsioan Par · MeGlc-1 da, nahiz eta Par · MeGlc-4 eta Par · MeGlc-6 egiturak antzekoak izan. Espektroaren seinale/zarata erlazio eta absortzio hain zabalaren ondorioz egitura baterako zalantzarik gabeko esleipena egitea ezinezkoa da. Hala ere, frogatu da Par · MeGlc-1 egituraren trantsizio bibrazionalak bat datozela neurtutako espektroaren zenbait trantsizioekin, eta  $\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ -ko absortzio zabalaren bi banda horiek konformero bat baino gehiagoren existentzia iradokitzen du.



-  $\beta$ -Fenil-D-glukopiranososa ··· Parazetamol

Neurtutako kluster honen IR/UV espektroak hurrengo 25.Irudian aurkezten dira:



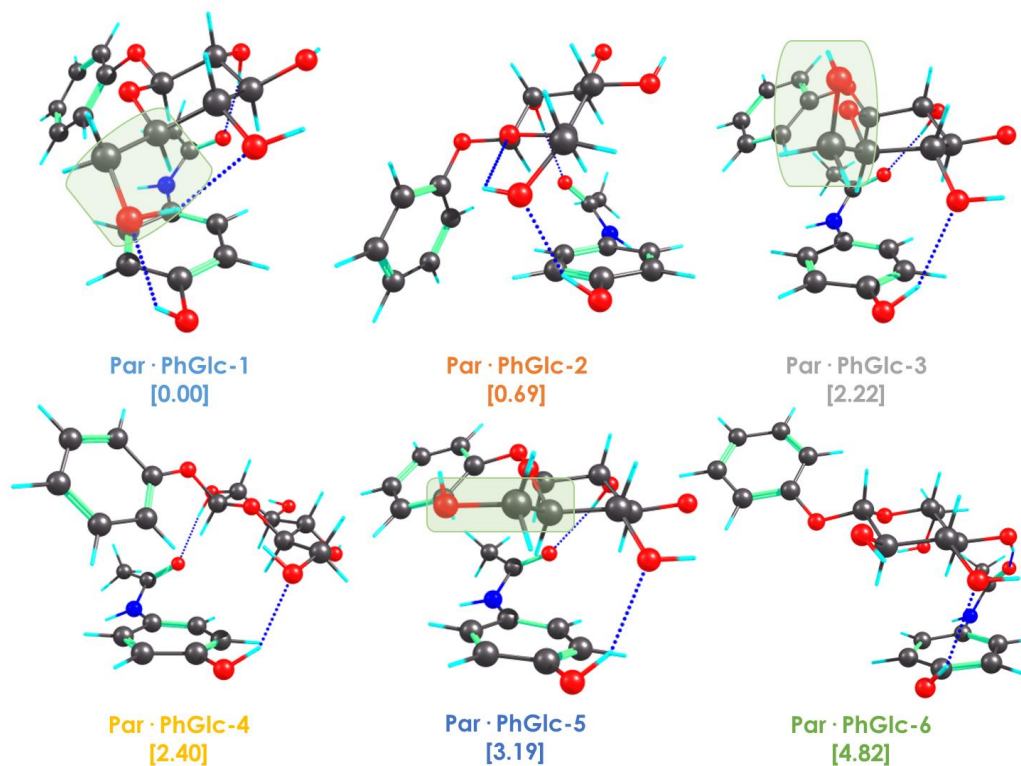
**25.Irudia:** Esperimentalki neurtutako IR/UV espektroa eta simulatutakoen arteko konparazioa  $\beta$ -Fenil-D-glukopiranososa ··· Parazetamol klusterrarentzako. Espektroak lortu egin dira UV laserra  $36502\text{ cm}^{-1}$  (urdina) eta  $36586\text{ cm}^{-1}$  (gorria) finkatuz, eta egituren simulazioak M06-2X/6-311++G(d,p) mailan egin dira. X ardatza eskalatzeko OH zonalderako 0.9385 faktorea erabili da.

C-H loturen bibrazioen zonaldean,  $2800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ , ondo definitutako lau banda zabal ikusten dira. Urdin-alderantz jarraituz, OH lotzaileen absortzio zabalak daude. Azkenik,  $3650\text{ cm}^{-1}$ -tik aurrera OH askeen bibrazio bandak aurkitzen dira. Ikusi

daitekenez, orokorrean, bi espektroak absortzio zabalak erakusten dituzte, batez ere hidrogeno loturan parte hartzen duen glukosaren OH taldearen bibrazio bandari dagokiona. Horrek egituraren esleipena zaildu egiten du, kontuan izanda energetikoki egonkorrenak diren egituren simulazioetan OH taldeen bibrazioak absortzio zabalen zonaldeetan metatuta daudela.

Lortutako espektroak oso antzekoak direnez gero pentsatu daiteke konformero bera edo konformero nahaste berdina kitzikatu dela. Hala ere, behatu daiteke 3570-3580  $\text{cm}^{-1}$  tartean nola IR/UV espektro gorrian banda bat agertzen den, espektro urdinean intentsitate txikiagotan agertzen dena. Hau gerta daiteke nahaste batean konformero bat gehiago kitzikatu delako, edo banda horri dagokion konformeroa kantitate handiagotan dagoelako uhin-luzera horretan.

Edozein esleipen egin baino lehen, simulatutako egituren azterketa bat egin da haien arteko antzekotasunak zehazteko. Bilaketa konformazionaletik 300 egitura inguru lortu dira, zeinetatik 45 optimizatu diren familiatan antolatu ondoren. Optimizatutako egitura egonkorrenak hurrengo 26. Irudian aurkezten dira:

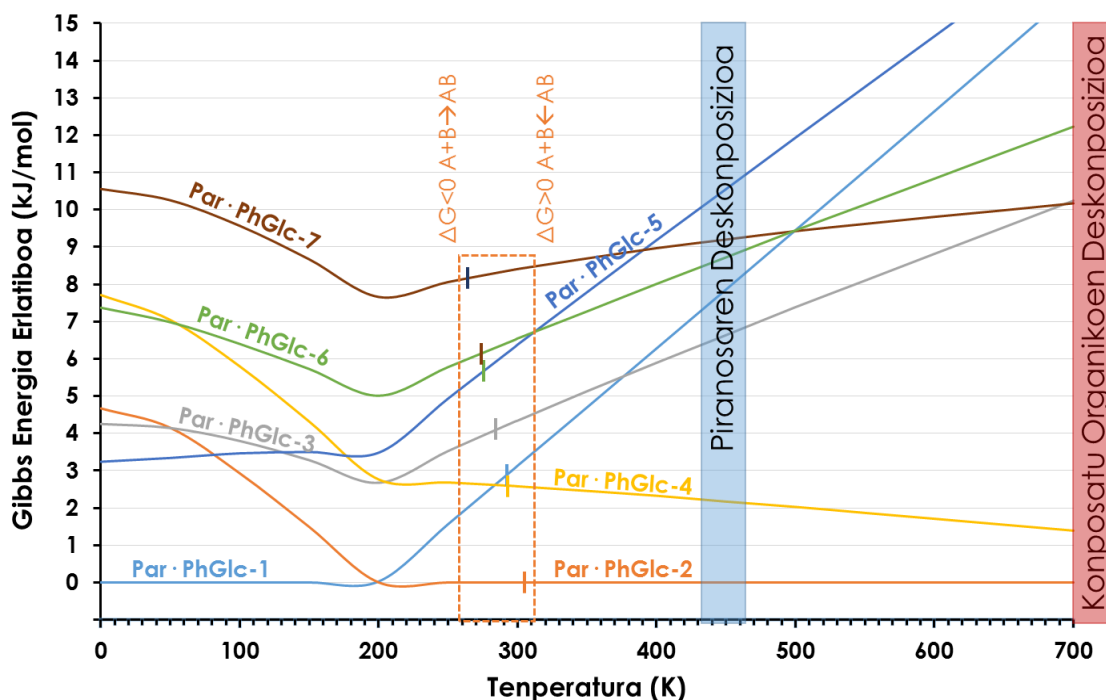


**26.Irudia** Gibbs energia askean egonkorrenak diren lehen zazpi egiturak  $\beta$ -Fenil-D-glukopiranosaren Paracetamol klusterrarako, M06-2X/6-311++G(d,p) mailan kalkulatuak. Kortxeteen artean energia erlatiboak adierazi dira  $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  unitateetan.

Konformeroak sakontasunez aztertuz gero, behatu daiteke nola Par · PhGlc-1, Par · PhGlc-3 eta Par · PhGlc-5 egituren arteko desberdintasuna glukosaren C5-ari lotutako hidroximetilo taldearen posizioa dela, 26.Irudian azpimarratu den moduan. Gainera, Par · PhGlc-1 egituren hidroximetiloaren posizioak eragiten du glukosaren O6 paracetamolaren OH fenolikotik gertuago egotea, eta ondorioz, paracetamolak trans egitura hartzen du egonkor moduan. Bestelako interakzioei dagozkenez, Par · PhGlc-1, Par · PhGlc-3 eta Par · PhGlc-5 egituretan C-H  $\cdots$   $\pi$  interakzioak mantendu egiten dira C5H eta paracetamolaren eraztunaren artean, eta paracetamolaren metiloaren eta glukosaren kromoforoaren artean. Par · PhGlc-2 eta Par · PhGlc-4 egituretan berriz, C-H  $\cdots$   $\pi$  interakzio hauek ez dira mantentzen molekulen arteko posizioa aldatu egin delako. Hala ere, azken bi egitura horietan, glukosaren eta paracetamolaren artean hidrogeno loturak mantendu dira. Azkenik Par · PhGlc-6 egituren, denetatik bitxiena, kromoforoaren interakzioa falta da. Egitura hau, aurretik baztertu daiteke, izan ere, kluster honen REMPI espektroa aztertzean,  $\beta$ -PhGlc-ren

trantsizioak desplazamendu bat erakutsi dutelako kromoforoarekiko interakzio bat dela eta.

Hurrengo 27. Irudian kluster honen egituren Gibbs-en energia erlatiboak temperaturarekiko ikusi ahal dira. Diagrama honen arabera espantsioan Par · PhGlc-1 eta Par · PhGlc-2 ikusi beharko liritezke, espantsioaren temperatura tartean (100-200K) energetikoki egonkorrenak direlako.



27. Irudia Gibbs energia aske erlatiboa x. Irudian agertzen diren β-Fenil-D-glukopiranosaren Paracetamol konformeroentzako. Lauki laranja adierazten du  $\Delta G > 0$  den gunea, eta ondorioz, zein puntutik aurrera klusterra ez den egonkorra. Kalkulurako Minimo Globalaren ikuspuntua erabili da.

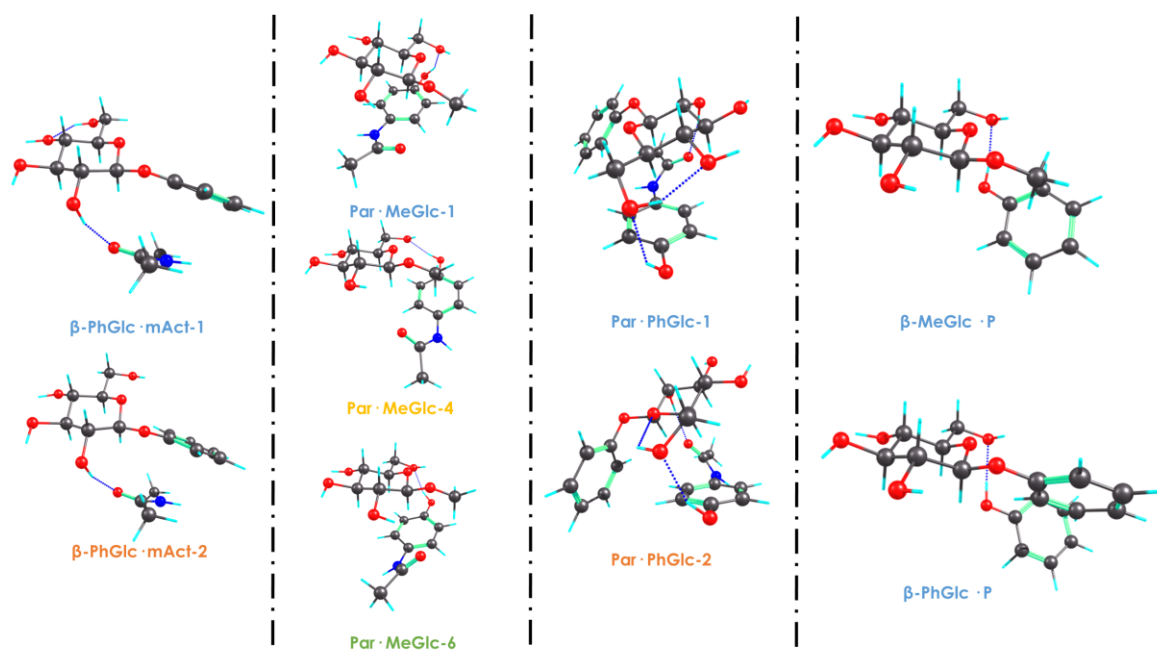
Jakinda hidroximetilo taldearen errotazio mugimendua baimenduta dagoela (energia langa txikia duelako), Par · PhGlc-1, Par · PhGlc-3 eta Par · PhGlc-5 egituren arteko bihurketa baimenduta egongo lirateke. Hala ere, Gibbs energien diagraman Par · PhGlc-3 eta Par · PhGlc-5 egiturak 3.5 kJ/mol-eko energia tartean agertzen dira Par · PhGlc-1-etik aldentuta. Suposatuz egituren arteko interkonbertsioa ematen dela eta Par · PhGlc-3 eta Par · PhGlc-5 egiturak Par · PhGlc-1 den minimora bilakatzen direla, espektro esperimentalak Par · PhGlc-1 egiturarekin ados egongo lirateke. Dena dela,

Par · PhGlc-2 egituraren IR espektroaren simulazioak OH fenoliko lotzailearen banda  $3400\text{ cm}^{-1}$  proposatzen du. Honek ondo azalduko zuen lerrakuntza honetan agertzen den absortzio zabalaren sorbalda ( $3300\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ ). Gainera, OH askeen  $3580\text{ cm}^{-1}$  eta  $3680\text{ cm}^{-1}$  bandak ondo azaltzen ditu, Par · PhGlc-1-ek ez bezala.

Beraz, espektro esperimentalaren bibrazio banden konplexutasuna dela eta, ezin da egitura bakar baten esleipena egin zehaztasun osoz. Hau egin beharrean, Gibbs-en energia erlatiboen kalkuluen ikuspuntua jarraitu da Par · PhGlc-1 eta Par · PhGlc-2 egituren nahasketa proposatzeko espantsioan.

### 3.3. Lehtasun konformazionalak

Jarraian aurreko ataletan landutako klusterren arteko egituren eta interakzioen konparaketa egin da. Nahiz eta agregazio bakoitzaren egitura zehaztasun handiz ez esleitu, espektro esperimentalen laguntzaz kalkulu konputazionalen bitartez lortutako egitura multzo handiak pare bat egituretara gutxitu dira. Gainera, kluster bakoitzerako proposatutako egiturek haien artean antzekotasunak aurkezten dituzte, bai interakzio motan edota interkonbertsio bideetan. Hurrengo 28. Irudiak landutako klusterren egitura nagusiak aurkezten ditu.



**28. Irudia**  $\beta$ -Fenil-D-glukopiranososa ··· N-metil azetamida,  $\beta$ -Metil-D-glukopiranososa ··· Parazetamol eta  $\beta$ -Fenil-D-glukopiranososa ··· Parazetamol klusterren oinarriko egiturak. Eskuinaldean  $\beta$ -MeGlc eta  $\beta$ -PhGlc azukreen klusterra fenolarekin aurkezten dira, beste lan batean landu egin zirenak<sup>23</sup>.

Lan honetan erabilitako glukosa deribatuek lau OH talde dituzte, zeinek hidrogeno-sare kooperatibo bat eratzen duten molekula isolatuan. Azukre molekulak talde hidrofiliakoak dituzten molekulen lotura gune egokiak aurkezten dituzte. Konformeroaren arabera, molekula kideak hidrogeno sare kooperatiboan parte hartu dezake. Horrela ez bada, molekula kideak hidrogeno sare kooperatiboa apurtzeko energia eman beharko du. Lan honetan analizatutako klusterretan H-zubien sare hau antzeman daiteke egituren minimo globaletan; hala nola,  $\beta$ -PhGlc · mAct-1 eta Par · PhGlc-1 egituretan.

Aztertutako egitura guztien artean, hidrogeno loturak glukosaren eta bestelako molekularen artean, azukreen gune berdinetan eman dira. Hala nola, bai  $\beta$ -PhGlc · mAct, Par · MeGlc eta Par · PhGlc klusterretan lotura peptidikoaren karboniloak glukosa molekularen O2H-rekin interakzionatzeko joera aurkezten duela behatu da. Hori primeran ikusi daiteke N-metil azetamidarekin eratutako klusterrean. N-metil azetamida molekula txikia izanda hainbat modutan lotu daiteke  $\beta$ -PhGlc-rekin, baina, nagusiki, esleitutako  $\beta$ -PhGlc · mAct-1 eta  $\beta$ -PhGlc · mAct-2 egituretan aipatutako O2H-rekin sortzen da hidrogeno lotura. Modu honetan, metiloen eta glukosaren kromoforoaren arteko C-H ···  $\pi$  interakzioa ahalbidetzen da.

Glukosa molekulari kromoforoa kenduta ( $\beta$ -MeGlc), aurreko kasuan azukrearen O2-rekin lotzeko ikusitako lehentasuna galtzen da. OH fenolikoa protoi emaile ona da, eraztun aromatikoaren ondoan egoteak dentsitate elektronikoa gehigarria ematen diolako efektu inductiboz. Horregatik, paracetamolaren OH fenolikoa hidrogeno loturak eratzen ikusten da Par · MeGlc eta Par · PhGlc klusterretan. Gainera, C-H ···  $\pi$  interakzioaren garrantzia antzematen da, glukosa molekula paracetamolaren eraztun aromatikoaren gainean kokatzen delako, konkretuki C5-a. Posizio honi esker, paracetamolaren OH fenolikoa glukosaren O6H-tik distantzia egokira geratzen da, H-lotura ahalbidetuz. C-H ···  $\pi$  interakzio eta H-lotura hauen joerak ondo ikusi daitezke goiko 28. Irudian adierazitako Par · MeGlc eta Par · PhGlc klusterretan.

Par · MeGlc klusterrean, paracetamolaren zati peptidikoaren lotura-joera galdu egiten da kromoforoaren falta dela eta. Egituretan ikusi daiteke nola eraztunarekiko azetamida taldea norabideaz aldatzen den. Hidrogeno loturen norabidetasuna

nahiko malgua denez gero, azetamida taldeak glukosaren O2H-rekin H-lotura eratzean ez dauka posizio finko bat hartzeko joerarik. Dena dela, hau guztiz aldatzen da glukosari kromoforoa berriro gehitzen zaion kasuan, Par · PhGlc agregazioan. Honetan, berriz ere ikusten dugu C-H · · ·  $\pi$  interakzioaren garrantzia, eta azetamida taldea O2H-rekin lotzen denean berrantolatu egiten da metiloaren eta kromoforoaren arteko interakzio ez-kobalentea ahalbidetzeko.

Ateratako ondorioak zuzenean erlazionatu ahal dira  $\beta$ -MeGlc · Fenol eta  $\beta$ -PhGlc · Fenol klusterren ikerketekin<sup>23</sup>. Bertan, aztertu zen nola fenolak glukosaren hidroximetil taldearekin lotzeko lehentasuna zeukan (ikusi 28.irudia). Joera berdina aurkitu dugu paracetamolarekin agregatutako glukosa molekula lan honetan. Exoziklikoa den hidroximetilo ordezkatzaillea polisakaridoen azukre-ligando loturetan trinkotasun gehigarria emateagatik ezaguna da<sup>45</sup>, azukre molekularen alde malguena denez, hidrogeno-zubi intermolekularrak sendotzeko posizio egokiena hartzeko joera duelako.  $\beta$ -PhGlc · Fenol klusterretan ikusi zen nola gas fasean aminoazido hondakin eta karbohidratoen arteko interakzioa gas fasean H-loturen bidez zuzenduta daudela. C-H · · ·  $\pi$  interakzioak garrantzia txikiagoa dute; eta hau ingurugiro fisiologikoan ikusitako joerarekin desberdintzen da, non karbohidratoaren hidroxilo taldeak disolbatzailearekin interakzioetan jarduten duten eta bestelako ligandoen interakzio nagusiak C-H · · ·  $\pi$  motakoak diren (proteinekin esaterako).

#### 4. ONDORIOAK

$\beta$ -Metil-D-glukopiranosan eta  $\beta$ -Fenil-D-glukopiranosan azukreen agregazio lehentasunak N-metil azetamida eta paracetamolekin aztertu dira, masabereizmenaren bidezko kitzikapen espektroskopia eta mekanika kuantikoko kalkuluen arteko konbinazioa erabiliz.

Interakzioen lehentasunean, aldaketak ingurumenaren eraginei dagokienez ikusi dira, batez ere glukosa molekulan kromoforoaren gehiketan. Alde batetik, N-metil azetamidaren eta  $\beta$ -PhGlc-ren interakzioan, azukrearen O2 posizioaren lehentasuna nagusitu da, paracetamol edo fenol klusterrekin konparatuz gero, azetamidako metiloaren eta  $\beta$ -PhGlc-ren kromoforoaren C-H · · ·  $\pi$  interakzioaren garrantzia dela

eta. Bestalde, paracetamola eta fenolaren klusterren artean antzekotasunak aurkitu dira, batez ere OH fenolikoaren eta hidroximetilo ordezkatzailaren artean ematen den hidrogeno-zubian. Gainera, interakzio hauek hidrogeno zubi intramolekular kooperatiboan parte hartzen dute, konformazioari egonkortasun gehigarria emanez. Aztertutako klusterren konformazioetan egiaztatu da C-H · · ·  $\pi$  interakzioaren garrantzia, izan ere, molekulen talde funtzionalak solbatatuta egongo dira ingurune fisiologikoan eta interakzioak  $\pi$  elektroiekin zuzenduko dute molekulen arteko agregazioak.

Hala ere, karbohidratoen interakzio eta agregazio lehentasunak modu sakonago batean aztertzeko informazio falta dago, eta beharrezkoa izango litzateke sistema berrien ikerketa lortutako emaitzak osatzeko. Nahiz eta kromofororik ez izan,  $\beta$ -Metil-D-glukopiranososa eta N-metil azetamidaren arteko klusterra teorikoki aztertu daiteke mekanika molekularren eta mekanika kuantikoaren bitartez. Modu honetan, C-H · · ·  $\pi$  interakzioaren garrantzia lan honetan aztertutako sistemekin egiaztatu daiteke. Horrez gain, N-metil azetamidari kromoforo bat gehitu ahal zaio, N-fenilazetamida edo Azetanilida lortuz. Azken hau esperimenterik aztertu daiteke landutako bi glukosa sistemekin informazio gehigarria lortzeko.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- (1) Lehninger, A. L. *Principles of biochemistry*; Worth: New York, 1982.
- (2) Rizzo, T. R.; Park, Y. D.; Levy, D. H. *J. Chem. Phys.* **1986**, *85* (12), 6945.
- (3) Rizzo, T. R.; Park, Y. D.; Peteanu, L.; Levy, D. H. *J. Chem. Phys.* **1985**, *83* (9), 4819.
- (4) Rizzo, T. R.; Park, Y. D.; Peteanu, L. A.; Levy, D. H. *J. Chem. Phys.* **1986**, *84* (5), 2534.
- (5) Philips, L. A.; Levy, D. H. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90* (21), 4921–4923.
- (6) Robertson, E. G.; Simons, J. P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3* (1), 1–18.
- (7) Plützer, C.; Nir, E.; de Vries, M. S.; Kleinermanns, K. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3* (24), 5466–5469.
- (8) Nir, E.; Janzen, C.; Imhof, P.; Kleinermanns, K.; de Vries, M. S. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115* (10), 4604.
- (9) Nir, E.; Janzen, C.; Imhof, P.; Kleinermanns, K.; de Vries, M. S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**,



- 4 (5), 740–750.
- (10) Gabius, H. J.; Siebert, H. C.; André, S.; Jiménez-Barbero, J.; Rüdiger, H. *ChemBioChem* **2004**, *5* (6), 740–764.
- (11) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. *Science (80-. )*. **2001**, *291* (5512), 2357–2364.
- (12) BORASTON, A. B.; BOLAM, D. N.; GILBERT, H. J.; DAVIES, G. J. *Biochem. J.* **2004**, *382* (3), 769–781.
- (13) Nishio, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 13873–13900.
- (14) Raju, R. K.; Ramraj, A.; Hillier, I. H.; Vincent, M. a; Burton, N. a. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 3411–3416.
- (15) Lis, H.; Sharon, N. *Chem. Rev. (Washington, DC, United States)* **1998**, *98* (2), 637–674.
- (16) *Pure and Applied Chemistry* . 1989, p 1293.
- (17) Weis, W. I.; Drickamer, K. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65* (1), 441–473.
- (18) Spurlino, J.; Lu, G.; Quijcho, F. J. *Biol. Chem.* **1991**, *266* (8), 5202–5219.
- (19) Cocinero, E. J.; Pierre, C.; Vaden, T. D.; Davis, B. G.; Simons, J. P. **2011**, 4548–4557.
- (20) Carmen Fernández-Alonso, M.; Díaz, D.; Berbis, M. Á.; Marcelo, F.; Cañada, J.; Jiménez-Barbero, J. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2012**, *13* (8), 816–830.
- (21) Oertelt, C.; Lindner, B.; Skurnik, M.; Holst, O. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268* (3), 554–564.
- (22) Rijs, A. M.; Oomens, J. *Gas-Phase IR Spectroscopy and Structure of Biological Molecules*; 2015.
- (23) Usabiaga, I.; González, J.; Arnáiz, P. F.; León, I.; Cocinero, E. J.; Fernández, J. A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (18), 12457–12465.
- (24) Levy, D. H. *Science* **1981**, *214* (4518), 263–269.
- (25) Asami, H.; Urashima, S.; Saigusa, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13* (45), 20476–20480.
- (26) Nagornova, N. S.; Rizzo, T. R.; Boyarkin, O. V. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52* (23), 6002–6005.
- (27) Halgren, T. a. *J Comp. Chem.* **1999**, *20* (7), 720–729.
- (28) Schrödinger, L. New York 2012.
- (29) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120* (1-3), 215–241.
- (30) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (2), 157–167.
- (31) Aguado, E.; León, I.; Cocinero, E. J.; Lesarri, A.; Fernández, J. A.; Castaño, F. *Phys. Chem. Chem.*

- Phys.* **2009**, *11* (48), 11608–11616.
- (32) Irikura, K. Thermodynamics Functions from Gaussian Output Files  
[http://www.nist.gov/mml/csd/informatics\\_research/thermochemistry\\_script.cfm](http://www.nist.gov/mml/csd/informatics_research/thermochemistry_script.cfm).
- (33) Irikura, K. K.; Frurip, D. J. **1998**.
- (34) Boys, S. F.; Bernardi, F. *Mol. Phys.* **2006**, *19* (4), 553–566.
- (35) Liepman, H. W.; Roshko, A. Wiley, Ed.; New York, 1957; p 53.
- (36) Lubman, D. M.; Kronick, M. N. *Anal. Chem.* **1982**, *54* (4), 660–665.
- (37) Tembreull, R.; Lubman, D. M. *Anal. Chem.* **1984**, *56* (11), 1962–1967.
- (38) Kroemer, R. T.; Liedl, K. R.; Dickinson, J. A.; Robertson, E. G.; Simons, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (48), 12573–12582.
- (39) Yao, J.; Im, H. S.; Foltin, M.; Bernstein, E. R. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104* (26), 6197–6211.
- (40) Mons, M.; Robertson, E. G.; Snoek, L. C.; Simons, J. P. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *310* (5-6), 423–432.
- (41) Talbot, F. O.; Simons, J. P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4* (15), 3562–3565.
- (42) Beames, J. M.; Hudson, A. J. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (16), 4157–4164.
- (43) Sohn, W. Y.; Ishiuchi, S.; Miyazaki, M.; Kang, J.; Lee, S.; Min, A.; Choi, M. Y.; Kang, H.; Fujii, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (1463-9084 (Electronic)), 957–964.
- (44) Lee, S. J.; Min, A.; Kim, Y.; Ahn, A.; Chang, J.; Lee, S. H.; Choi, M. Y.; Kim, S. K. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13* (37), 16537–16541.
- (45) Barry, C. S.; Cocinero, E. J.; Çarçabal, P.; Gamblin, D. P.; Stanca-Kaposta, E. C.; Remmert, S. M.; Fernández-Alonso, M. C.; Rudić, S.; Simons, J. P.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (45), 16895–16903.