



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

**CARACTERIZACIÓN
ESTRUCTURAL DE RESIDUOS DE
PLAGUICIDAS EN LA INDUSTRIA
ALIMENTARIA: METABOLITO DE
PROCLORAZ BTS 40348**

Alumno: Casas Jaraíces, Rubén

Tutores: Prof. Dr. Manuel Montejo Gámez
Prof. Dra. Pilar Gema Rodríguez Ortega

Dpto: Química Física y Analítica

Octubre, 2018



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

**MÁSTER EN
AVANCES EN SEGURIDAD DE LOS ALIMENTOS**

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL
DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN
LA INDUSTRIA ALIMENTARIA:
METABOLITO DE PROCLORAZ BTS
40348**

Departamento: Química Física y Analítica

Trabajo de Fin de Máster presentado por:

Rubén Casas Jaraíces

Jaén, Octubre de 2018

Fdo. Rubén Casas Jaraíces

Índice

1	Introducción	5
1.1	Pesticidas: definición	5
1.2	Historia de los pesticidas	6
1.3	El problema de los pesticidas	7
1.4	Tipos de pesticidas según su estructura	9
1.4.1	Organoclorados	9
1.4.2	Organofosforados.....	13
1.4.3	Carbamatos.....	14
1.4.4	Piretroides	15
1.4.5	Feromonas como alternativa a los pesticidas	15
1.5	Procloraz	17
1.5.1	Toxicidad del Procloraz.....	19
1.5.1.1	Procloraz como disruptor endocrino	21
1.5.2	Métodos de análisis.....	22
1.5.3	Presencia del metabolito BTS 40348.....	23
1.6	Antecedentes determinación BTS 40348	26
1.7	Breve introducción a las herramientas empleadas	27
1.7.1	Métodos teóricos.....	27
1.7.2	Técnicas de espectroscopía vibracional: IR y Raman.	29
1.8	Justificación de nuestro trabajo.....	31
1.9	Objetivos	32
2	Materiales y métodos	33
2.1	Estándares, productos químicos y solventes.....	33
2.2	Espectroscopía IR y Raman.	33

2.3	Cálculos computacionales.....	33
3	Resultados y discusión	35
3.1	Búsqueda conformacional	35
3.2	Análisis estructural de los confórmeros mayoritarios de BTS 40348	37
3.3	Influencia en el perfil espectral de diferentes poblaciones de confórmeros..	38
3.4	Asignación vibracional	41
3.4.1	Región espectral: 3500 – 2700 cm ⁻¹	41
3.4.2	Región espectral: 1600 – 1100 cm ⁻¹	44
3.4.3	Región espectral: 1100 – 400 cm ⁻¹	47
3.4.4	Modos normales a baja frecuencia en Raman: 400-100 cm ⁻¹	50
4	Conclusiones y acciones futuras	53
5	Referencias.....	55

Resumen

El Procloraz es un fungicida de amplio espectro ampliamente utilizado en la agricultura industrial, y, por ende, con una repercusión directa sobre una industria alimenticia cada vez más limitada en lo que se refiere a la presencia de pesticidas en sus productos. Esto se debe, en parte, a una creciente concienciación acerca de los problemas derivados de su uso, y a los posibles riesgos toxicológicos sobre los consumidores. Teniendo esto en mente, se observó la rapidez con la que el Procloraz se transformaba en otros metabolitos persistentes con restos de 2,4,6-triclorofenol (TCP) en su estructura, lo cual hacía necesario la implantación de un método analítico suficientemente representativo, y que mostrara fielmente el riesgo toxicológico debido a los metabolitos con restos TCP derivados del Procloraz. Estos hechos pusieron nuestra atención en el metabolito BTS 40348, pues la amplia presencia residual en alimentos frescos y procesados, y remitida en diversos estudios, se ignoraba por completo en propuestas oficiales para la definición de residuo de Procloraz, provocando con ello unos resultados inexactos para la evaluación del riesgo toxicológico en alimentos.

Se centró así nuestro estudio en la caracterización estructural del metabolito BTS 40348 mediante el uso de técnicas de espectroscopia vibracional como son la espectroscopías infrarroja (IR) y Raman complementadas con métodos de la Química Computacional para facilitar la interpretación de los resultados experimentales. Para el estudio de la superficie de energía potencial (PES) de nuestra molécula se emplearon tanto métodos basados en la Mecánica Molecular (en primera instancia) como el funcional híbrido DFT denominado B3LYP con el conjunto de base de Dunning denominado cc-pVTZ. De este modo se confirmaron 21 estructuras como mínimos de la superficie de energía potencial (PES) de la molécula (confórmeros). La posterior asignación de las bandas vibracionales observadas a los modos normales de vibración calculados para la especie confirmó que un modelo teórico que contemplara solo a los tres confórmeros mayoritarios de la especie, permite una correcta reproducción de las observaciones experimentales.

Abstract

Prochloraz is a broad-spectrum fungicide widely used in industrial agriculture, and therefore, with a direct impact on a food industry which is being increasingly limited as concerns the presence of residues of pesticides in its products. This is partly due to a growing awareness of the problems arising from its use related to toxicological risks to consumers. Abovementioned Prochloraz quickly undergoes transformation into other persistent metabolites containing 2,4,6-trichlorophenol (TCP) residues in its structure. For this reason, the detection of Prochloraz derivatives would imply implementing a sufficiently representative analytical method. The toxicological importance of these species made us focus specifically on the metabolite called BTS 40348, due to its extensive residual presence in fresh and processed foods which was addressed in several studies. Despite this, BTS 40348 was completely ignored in official proposals for the Prochloraz residue definition, thus causing inaccurate results in the evaluation of toxicological risk.

Our study focused on the structural characterization of BTS 40348 metabolite by using vibrational spectroscopy techniques such as IR and Raman spectroscopies combined with methods of Computational Chemistry for allowing a better interpretation of experimental results. For the scan of the potential energy surface (PES) of our molecule, both Molecular Mechanics (MM) based and DFT calculation methods. In the latter case, we implemented the B3LYP hybrid functional with cc-pVTZ Dunning's basis set. A total of 21 minimum energy structures were confirmed as minima of the PES. The assignment of vibrational bands to the normal modes of vibration of our molecule performed in this study, allowed to confirm that a theoretical model comprising only the three main conformers of BTS 40348 is enough to correctly reproduce experimental features in the IR and Raman spectra.

1 Introducción

1.1 Pesticidas: definición

En el *Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Pesticidas* de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) se indica la definición de pesticida o plaguicida como:

«Cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte» [1].

Los pesticidas, además, forman parte de un grupo muy amplio de compuestos que se caracterizan por una estructura química específica y que, junto con las denominadas sustancias activas, se incluyen en la composición de los productos comercialmente disponibles. La principal característica y por lo que son realmente demandados, es su alta toxicidad, o la capacidad de la sustancia para provocar daños químicos o biológicos y, en consecuencia, la muerte del organismo. Normalmente su acción se centra en daños neurotóxicos, y que en la mayoría de las veces afectan en menor o mayor grado a mamíferos y especies no perjudiciales, por lo que siempre habrá que ser extremadamente cuidadosos en su aplicación.

1.2 Historia de los pesticidas

A día de hoy, los pesticidas representan el recurso más importante para el control de enfermedades y diferentes tipos de plagas en la producción agrícola, pero se tiene constancia que ya en la época de los sumerios se usó polvo de azufre como pesticida, e incluso en la antigua roma se recomendó alpechín para combatir hormigas, topos y malas hierbas, lo que sería el primer pesticida de amplio espectro de la historia [2]. Se siguieron usando todo tipo de pesticidas a lo largo de los años, considerándose pesticidas de primera generación todos aquellos usados hasta la década de 1940. Estos consistían en compuestos orgánicos e inorgánicos que no habían sido sintetizados por el hombre. El principal problema de los pesticidas minerales como el arsénico, el mercurio o el plomo, era su elevada toxicidad, la cual se intensificaba debido a su larga persistencia en suelos y aguas, alcanzando niveles tan altos que la tierra incluso dejaba de ser fértil. También se usaron productos orgánicos como la rotenona, por su efectividad para el control de algunos insectos y por su fácil degradación, evitándose así una persistencia prolongada en suelos o plantas. Sin embargo, era altamente tóxica en peces y algunos mamíferos. A pesar de ello, la rotenona se siguió usando en la Unión Europea e incluso era uno de los pocos insecticidas autorizados para la industria ecológica [3], hasta su sustitución por un nuevo reglamento en 2007.

Pero el uso de los pesticidas de primera generación cambió radicalmente con el inicio de la Segunda Guerra Mundial. Los avances tecnológicos y el enorme desarrollo de la industria química que se impulsaron en esta contienda bélica, dieron lugar a la aparición de nuevos pesticidas que mejoraban notablemente a aquellos usados hasta la fecha, por lo que consiguieron desplazar rápidamente a prácticamente todas las sustancias químicas usadas hasta entonces en la agricultura. Estos pesticidas se conocen como pesticidas de segunda generación, y siguen siendo los más usados en la actualidad. La mayoría de los pesticidas o principios activos usados actualmente, derivan o son refinamientos de aquellos descubiertos en este periodo considerado como revolucionario para la industria química, pues de un uso mayoritario de productos inorgánicos se

pasó a un uso casi exclusivo de productos orgánicos sintéticos, donde se incluye a una familia muy amplia de compuestos orgánicos destacando sobre todo los organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. Desde el principio fueron considerados como productos casi milagrosos debido a su alta toxicidad para determinadas plagas y su bajo precio, además de por la entonces desconocida toxicidad hacia el ser humano.

A día de hoy, su uso sigue siendo mayoritario en gran parte del planeta, a pesar de que la mayoría de ellos siguen presentando un alto grado de toxicidad hacia los mamíferos, o incluso hacia otros insectos considerados como beneficiosos. Por ello, la persistencia de estos compuestos en suelos o aguas subterráneas sigue siendo un problema en muchas zonas [4], sobre todo en países en vías de desarrollo donde, pesticidas prohibidos en Europa o Estados Unidos desde hace décadas, se siguen usando de forma cotidiana debido al bajo coste que estos presentan y a una falta de control por parte de las autoridades.

1.3 El problema de los pesticidas

La cantidad de pesticidas utilizados en la producción agrícola ha aumentado de forma exponencial desde que en los años 80 comenzó su aplicación masiva, aumentando de forma inherente la amenaza para la salud pública de los consumidores debido a los residuos que estos productos químicos puedan dejar en alimentos frescos y procesados. A esto hay que añadir los efectos perjudiciales producidos en los propios agricultores durante su aplicación, ya que, solo en la Union Europea, en 2014, se comercializaron alrededor de 400.000 toneladas de pesticidas, con España a la cabeza [5].

Al tratarse de un producto económico y altamente efectivo, su aplicación se convirtió en una práctica habitual, incluso sin un peligro evidente que justificara su uso. Con la experiencia de los años, se ha demostrado que un uso indiscriminado de pesticidas no solo es perjudicial para el medio ambiente y la salud de los consumidores, sino que además, un uso prolongado de los mismos ha provocado una resistencia en distintas plagas, motivando que su erradicación

sea difícil o imposible de controlar [6]. Debido a este uso abusivo de los pesticidas, y con el fin de poder garantizar la inocuidad de los alimentos, la Unión Europea se ha visto obligada a establecer los llamados límites máximos de residuos (LMRs) para pesticidas en diferentes productos alimenticios y que no deben excederse [7].

En la práctica, el consumidor está expuesto no solo a la sustancia activa aplicada, sino también a una amplia gama de compuestos químicos como resultado de procesos metabólicos y de degradación. Tales compuestos se generan a través del metabolismo en los tejidos de la planta durante el proceso de desintoxicación, en el mismo ambiente causado por los propios efectos medioambientales, o incluso por animales a los que se ha alimentado con alimentos de origen vegetal [8].

La transformación de las moléculas de pesticidas se produce comúnmente mediante reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis o conjugación (principalmente con glucosa o glutatión). Pero a pesar de esta transformación, debemos tener en cuenta que el atributo tóxico y la persistencia de un pesticida también pueden aparecer en sus metabolitos, o incluso se pueden crear nuevos grupos tóxicos con un mecanismo de acción potencialmente diferente [9,10], por lo que el descubrimiento e identificación de tales compuestos se antoja como una tarea analítica importante. El progreso en los métodos analíticos y su creciente sensibilidad han posibilitado la detección de un número creciente de metabolitos a niveles cada vez más bajos, permitiendo la identificación de numerosos metabolitos de pesticidas. Pero la legislación no ha sido capaz de seguir este rápido avance, ya que los propios estudios de toxicidad tienden a no proporcionarse para toda la gama de metabolitos encontrados. Por tanto, solo hay unos pocos MRLs en la regulación de la UE en los que también se incluyen metabolitos (por ejemplo, metiocarb - suma de metiocarb, metiocarb sulfóxido y sulfona, expresada como methiocarb) [11]. Esto podría explicarse por la falta de información exhaustiva acerca del metabolismo de los pesticidas y de las investigaciones toxicológicas necesarias que nos permiten evaluar estos MRLs. Además, es habitual y recomendable que en los métodos analíticos se incluyan los metabolitos relevantes dentro de la definición de residuo, sin embargo, no es

fácil decidir qué metabolitos son relevantes y cuáles no. Para facilitar este proceso de evaluación de riesgos, es necesario un análisis en profundidad de los metabolitos de los pesticidas, incluido el desarrollo de métodos que sean capaces de descubrir metabolitos conocidos y también desconocidos.

1.4 Tipos de pesticidas según su estructura

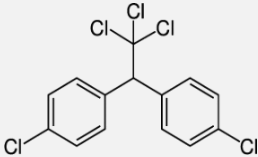
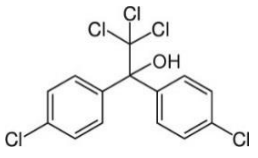
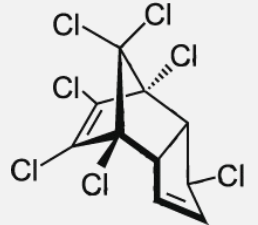
Debido al gran número de pesticidas que existen en la actualidad, estos se pueden clasificar en diferentes categorías, por lo que dependiendo de la clasificación que usemos podremos encontrar dos productos diferentes dentro de una misma categoría y viceversa. En este sentido podemos encontrar a los pesticidas clasificados según su estructura, actividad biológica, rutas de acceso, naturaleza química, formulación o toxicidad. En este documento nos centraremos en una clasificación según su estructura química, ya que además de estar estrechamente relacionada con su toxicidad, es una característica esencial a la hora de elegir un modelo analítico y realizar su caracterización. Entre los pesticidas más populares atendiendo a su estructura química están los organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides, aunque debido a la importancia por su toxicidad y uso histórico, pondremos nuestra atención en los pesticidas organoclorados.

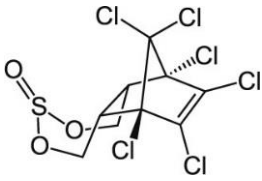
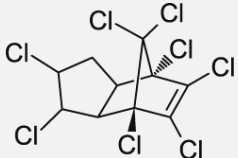
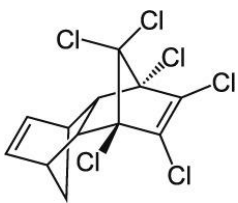
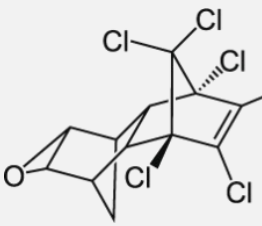
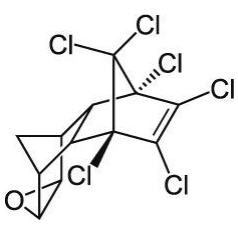
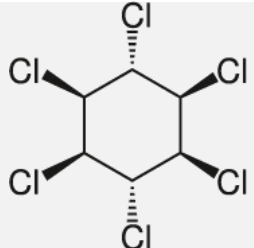
1.4.1 Organoclorados

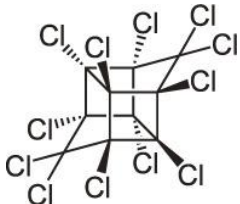
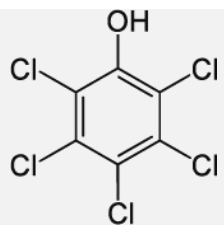
Estructuralmente, los organoclorados se caracterizan por ser compuestos orgánicos donde algunos átomos de carbono de su cadena han sido sustituidos por átomos de cloro. Los organoclorados fueron los primeros compuestos orgánicos sintéticos usados por el hombre de forma intensiva para la erradicación de plagas, debido a su bajo coste y la alta eficiencia que mostraban en la lucha contra diferentes tipos de insectos. Su amplia variedad estructural permitió su uso en un gran número de aplicaciones, facilitando su rápida expansión a lo largo del planeta en todo tipo de cultivos. Con el tiempo, estos productos fueron perdiendo popularidad y su elevada toxicidad empezó a

mostrarse cada vez más problemática al comprobarse su elevada persistencia ambiental y, sobre todo, su capacidad de bioacumulación. Esto se debe a que estos pesticidas son muy estables a la luz solar y el calor, además de ser muy poco solubles en agua. Si a esto le sumamos que se caracterizan por ser muy solubles en ácidos grasos, nos lleva a una alta acumulación de pesticidas en alimentos y en tejidos humanos y animales, causando daños neurológicos y trastornos endocrinos, con efectos agudos y crónicos sobre la salud. En la tabla 1 se muestran algunos de los organoclorados más populares junto con algunas de sus características más relevantes como toxicidad y persistencia.

Tabla 1. Estructura, toxicidad, usos y persistencia de algunos de los principales pesticidas organoclorados [12].

Nombre	Estructura	Toxicidad según OMS (DL ₅₀ en ratas)	Uso	Persistencia
DDT		Moderadamente peligroso; 113 - 130 mg/kg	Insecticida	Alta persistencia; Vida media: 2-15 años
Dicofol		Moderadamente peligroso; 684 - 1495 mg/kg	Acaricida	Persistencia moderada; Vida media: 60 días
Heptacloro		Alta- Moderadamente peligroso; 40 - 220 mg/kg	Insecticida	Alta persistencia; Vida media: 2 años

Endosulfan		Altamente peligroso; 18 - 220 mg/kg	Insecticida	Persistencia moderada; <i>Vida media:</i> <i>Isómero alfa</i> → 35 días <i>Isómero beta</i> → 150 días
Clordano		Moderadamente peligroso; 200 - 700 mg/kg	Insecticida	Alta persistencia; <i>Vida media:</i> 10 años
Aldrin		Altamente peligroso; 39 - 60 mg/kg	Insecticida	Persistencia moderada; <i>Vida media:</i> 4-7 años
Dieldrin		Altamente peligroso; 46 mg/kg	Insecticida	Alta persistencia; <i>Vida media:</i> 9 meses
Endrina		Altamente peligroso; 3 mg/kg	Insecticida	Persistencia moderada; <i>Vida media:</i> 12 años
Lindano		Moderadamente peligroso; 88 - 270 mg/kg	Acaricida Insecticida Rodenticida	Alta persistencia; <i>Vida media:</i> 15 meses.

Mirex		El riesgo agudo es poco probable; 600 - 740 mg/kg	Insecticida	Persistencia alta; Vida media: 10 años
Pentaclorofenol		Alta- moderadamente peligroso; 27-211 mg/kg	Fungicida Herbicida Insecticida	Persistencia moderada; Vida media: 45 días

Uno de los integrantes más conocido de este grupo, y que por su notoriedad merece una mención especial, es el DDT, ya que fue, de largo, el pesticida más utilizado desde que en 1940 Paul Hermann Müller descubriera sus propiedades como insecticida. En su comienzo sus resultados fueron muy prometedores, ya que conseguía eliminar un extenso número de plagas, debido a que se trataba de un insecticida de amplio espectro, y que sus efectos persistían en el tiempo. Pero todo lo que parecía idílico y beneficioso en un principio, acabó por convertirse en uno de los mayores problemas de aquella época. Se demostró que el DDT era potencialmente cancerígeno para el ser humano, y que sus efectos tóxicos perduraban peligrosamente en el tiempo, lo que provocaba su acumulación en la cadena trófica, y como consecuencia en los seres humanos, aumentando considerablemente tanto los daños biológicos como ambientales. De modo que este largo idilio existente entre la agricultura y el DDT se terminó después de una sonora campaña internacional donde se alertaba de los peligros y problemas que acarrearba su uso, tanto a corto como a largo plazo, por lo que se consiguió prohibir su producción, uso y comercialización en todos los productos destinados a la protección de plantas. A día de hoy, algunos países siguen resistiéndose a su completa prohibición, por lo que todavía serán necesarios algunos años para que el mundo tome conciencia de su gravedad y acabé desapareciendo totalmente de nuestros campos.

En este grupo también se pueden incluir al Procloraz y a sus metabolitos, en los cuales se centra el estudio analítico y de caracterización estructural realizado en este trabajo de fin de máster, y que vendrá explicado con más detalle a partir de la sección 1.5.

1.4.2 Organofosforados

Los organofosforados son ésteres o aminas derivados del ácido fosfórico, por lo que todos poseen una estructura común. Su actividad se centra en el ámbito de los insecticidas, aunque también se encuentran en herbicidas y fungicidas. Tras la prohibición más o menos generalizada y la concienciación de la población de los peligros del uso de pesticidas organoclorados, los compuestos organofosforados pasaron a tener un papel principal en la composición de los pesticidas.

Se caracterizan por su alta toxicidad en seres humanos, a la altura de otros venenos como cianuro, arsénico o estricnina, aunque a diferencia de los organoclorados, estos no persisten más allá de unos pocos días en la naturaleza y son expulsados fácilmente en la orina, por lo que el peligro de su toxicidad se presenta especialmente en intoxicaciones agudas o a largo plazo (crónicas).

El método de acción de los organofosforados se distingue por la fosforilación y consiguiente inactivación de la enzima acetilcolinesterasa, la cual es responsable de la hidrólisis y control biológico del neurotransmisor acetilcolina, que es la sustancia encargada de la transmisión de los impulsos nerviosos entre las células nerviosas (neuronas). Esto se traduce en la acumulación de acetilcolina en el espacio existente entre las neuronas (espacio sináptico), interrumpiendo el paso normal de los impulsos nerviosos y por tanto la actividad neuronal. De esta alteración sináptica se produce una paralización del cerebro y, por consiguiente, la muerte del insecto. El problema reside en que el ser humano también posee esta enzima, por lo que una exposición aguda o prolongada a alguna sustancia organofosforada conlleva la misma acción

inhibidora del sistema nervioso, pudiéndose ver también afectados de forma severa.

1.4.3 Carbamatos

Los carbamatos son compuestos orgánicos cuya estructura química deriva del ácido carbámico. De la sustitución de uno o los dos átomos de oxígeno de la estructura general de ácido carbámico por átomos de azufre, se forman lo que se conocen como tiocarbamatos, y que destacan por poseer una menor toxicidad para los mamíferos que los carbamatos, y son utilizados principalmente como fungicidas.

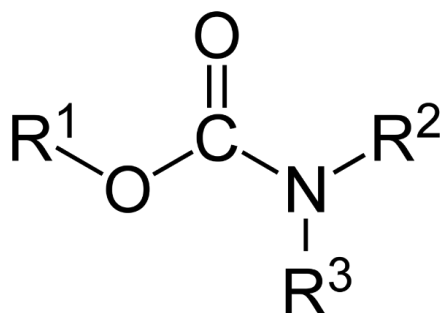


Figura 1. Estructura química general de los carbamatos.

Al igual que los organoclorados y organofosforados, su desarrollo coincidió con el transcurso de la segunda guerra mundial, primero centrados en su uso como agentes nerviosos, y posteriormente como pesticida. Los carbamatos surgieron como alternativa a los compuestos organofosforados, y tras las prohibiciones que siguieron a los pesticidas organoclorados, consiguieron colocarse en una situación muy favorecedora en el mercado de los pesticidas. Poseen propiedades similares a los organofosforados, ya que centran su acción en la inactivación de la enzima acetilcolinesterasa y son fácilmente eliminados tanto por el organismo como en el medio ambiente. Pero a diferencia de los compuestos organofosforados, la inactivación causada por los carbamatos se produce de forma reversible, mientras que los organofosforados lo hacen de forma irreversible. A pesar de una menor toxicidad para los mamíferos, estos presentan en ocasiones una mayor toxicidad en insectos polinizadores [13], por

lo que su uso tendrá que venir precedido de un estudio cuidadoso de cada situación.

1.4.4 Piretroides

Dentro del grupo de los pesticidas encontramos los piretroides, compuestos derivados de las piretrinas y que suelen distinguirse por contener en su estructura un ciclopropano. Las piretrinas son sustancias químicas que se encuentran de forma natural en las flores de la planta conocida como piretro o peritre y que a principios del siglo XIX ya se usaban en China para la desinfección de garrapatas, pulgas, piojos o mosquitos [14]. Al igual que el resto de insecticidas, basan su actividad en la alteración del funcionamiento normal del sistema nervioso. Su acción se basa en la inactivación del cierre del canal de sodio en la membrana de las células nerviosas, provocando una sobreestimulación del sistema nervioso que acaba produciendo convulsiones, parálisis y en la mayoría de los casos, la muerte.

Las piretrinas destacan sobre todo por su alto poder de degradación en la naturaleza y por ser fácilmente biodegradables, por lo que no presentan un peligro alto para los mamíferos y pájaros, en cambio, sí que presentan un problema para peces y algunos invertebrados acuáticos [14].

Gracias a todas estas características que los hacen casi inocuos o de difícil intoxicación para el ser humano, han conseguido situarse como la principal arma elegida para la erradicación de plagas tanto en el sector agropecuario (exceptuando medios acuáticos) como en la mayoría de los hogares destinados para jardines, animales domésticos o insectos de todo tipo, como mosquitos.

1.4.5 Feromonas como alternativa a los pesticidas

En vista a los evidentes peligros que conlleva el uso continuado de pesticidas, se intentó enfocar la lucha contra las plagas en pesticidas naturales y específicos de cada especie. Es por esto que ya en los años 70 se empezó a trabajar en el

uso de feromonas u hormonas juveniles que impidieran el desarrollo o la reproducción de una especie objetivo, y es lo que se conoce como pesticidas de 3ª generación.

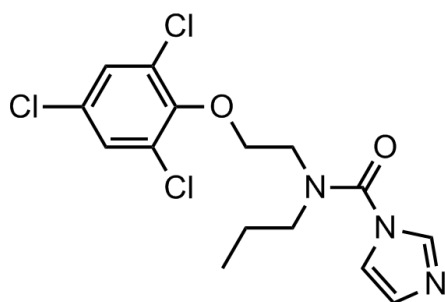
Las feromonas no son más que señales químicas emitidas por los insectos y que buscan una acción específica entre los miembros de la misma especie, en otras palabras, son las señales que utilizan los insectos para comunicarse de forma intraespecífica. La liberación de estas sustancias pretende provocar una respuesta determinada en el resto de individuos ante situaciones de alarma, defensa, fuente de alimento, marcación de camino o reproducción. Las feromonas más usadas en la actualidad son las feromonas sexuales, con las que se consiguen atraer a los individuos macho de cada especie, evitando así su apareamiento y crecimiento en un área determinada.

Las grandes ventajas del uso de feromonas como baja toxicidad, fácil aplicación, ausencia restricciones regulatorias, dificultad de resistencias y respeto a la biodiversidad, han conseguido reducir drásticamente el uso de pesticidas convencionales, a pesar de algunos inconvenientes como los sistemas de difusión de feromonas aún ineficiente que aún deben subsanarse. Como intento de mejora de los pesticidas basados en semioquímicos, se han utilizado combinaciones entre feromonas y otras sustancias atractivas para los insectos, como alimentos o sustancias producidas por las propias plantas objeto de ataque [15]. Aun así, la realidad nos dice que el uso de feromonas sexuales para paliar el ataque de insectos en la agricultura seguirá estando siempre acompañado de los pesticidas convencionales, pues es muy complicado que los primeros puedan sustituir de forma totalmente eficiente a las formas de erradicación que actualmente conocemos. Pero lo que sí se puede afirmar, es que el uso conjunto de las feromonas y los insecticidas permitirán obtener resultados excelentes, donde los insecticidas serán la opción más recomendada para tratamientos curativos, mientras que las feromonas jugarán un papel muy importante para tratamientos de prevención y control a largo plazo.

1.5 Procloraz

Como ya mencionamos en la sección 1.4.1, dentro del grupo de los organoclorados encontramos al Procloraz (N-Propil-N-[2-(2,4,6-triclorofenoxi)etil]-1H-imidazol-1-carboxamida) (Figura 2). El Procloraz es un fungicida de amplio espectro que pertenece a la familia de los imidazoles y que es ampliamente utilizado para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades en campos de cultivo de frutas, verduras, cereales o incluso champiñones. También es utilizado después de la recolección como un tratamiento de inmersión contra enfermedades de almacenamiento o tránsito de cítricos, mangos, piñas y otras frutas tropicales.

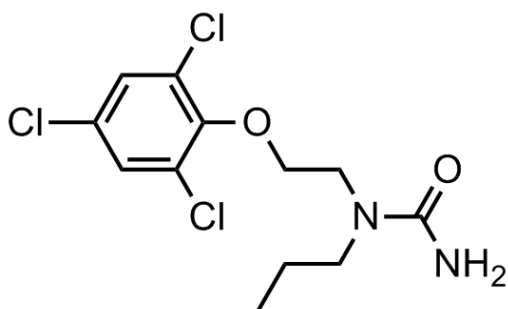
Una de las características del Procloraz es su rápida transformación en diferentes metabolitos o productos de degradación tras su aplicación, obteniéndose como producto final de degradación el resto 2,4,6-Triclorofenol (TCP). El problema de todos estos metabolitos es la presencia del resto TCP en su estructura, el cual les dota de una toxicidad elevada hacia los mamíferos. A día de hoy, existe cierto debate acerca de la presencia de estos metabolitos en diferentes muestras con fines alimenticios, ya que, tal y como se expondrá en las siguientes páginas, la inclusión o no de ciertos metabolitos en la definición actual de residuo de Procloraz sigue siendo un tema controvertido. En las siguientes páginas se muestra un pequeño esquema sobre la estructura, identificadores y propiedades físicas del Procloraz y sus metabolitos.



Procloraz

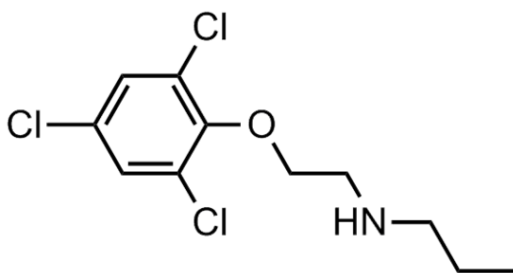
CAS	67747-09-5
Nombre	N-Propil-N-[2-(2,4,6-triclorofenoxi)etil]-1H-imidazol-1-carboxamida
Fórmula molecular	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂
Peso molecular	376.67 g/mol
DT ₅₀ *	68.8 días

BTS 44595



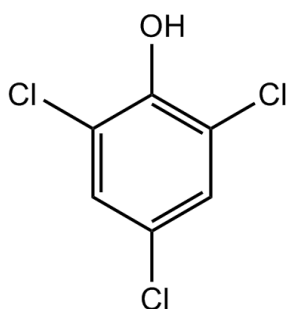
CAS	139520-94-8
Nombre	N-Propil-N-[2-(2,4,6-triclorofenoxi)etil]urea
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₁₅ Cl ₃ N ₂ O ₂
Peso molecular	325.62 g/mol
DT ₅₀ *	197.9 días

BTS 40348



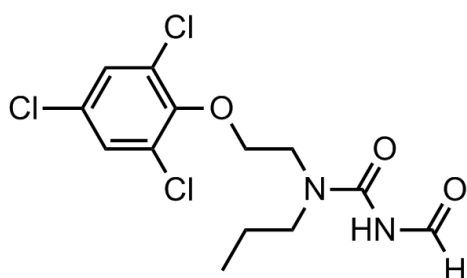
CAS	67747-01-7
Nombre	N-[2-(2,4,6-Triclorofenoxi)etil]-1-propanamina
Fórmula molecular	C ₁₁ H ₁₄ Cl ₃ NO
Peso molecular	282.59 g/mol
DT ₅₀ *	91 días

2,4,6- Triclorofenol (TCP)



CAS	88-06-2
Nombre	2,4,6-Triclorofenol
Fórmula molecular	C ₆ H ₃ Cl ₃ O
Peso molecular	197.45 g/mol

BTS 44596



CAS	139542-32-8
Nombre	N-Formil-N-propil-N-[2-(2,4,6-triclorofenoxy)etil]urea
Formula molecular	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₃ N ₂ O ₃
Peso molecular	353.63 g/mol
DT ₅₀ *	6.5 días

DT₅₀*: período requerido para la desaparición del 50 por ciento en suelos [16].

Figura 2. Estructura, identificación y propiedades físico-químicas del Prochloraz y sus metabolitos.

1.5.1 Toxicidad del Prochloraz

La principal característica de los pesticidas, y en consecuencia de los fungicidas, es su toxicidad hacia determinados organismos, con la que se busca su eliminación o control por medio de un daño biológico. Este daño consiste en la interrupción o bloqueo de ciertas, enzimas u hormonas, que controlan importantes procesos vitales. Pero esta toxicidad no es una característica invariable, ya que depende de la especie, tiempo de exposición, ruta de acceso al organismo, etc. El criterio básico utilizado para medir la toxicidad de una sustancia se conoce como dosis letal media (LD₅₀), y expresa la dosis individual necesaria de cierta sustancia para que la mitad del conjunto de una población muera.

En el caso del Prochloraz, este debe su acción fungicida al resto de imidazol presente en su estructura. La unión del grupo imidazol al átomo de hierro del citocromo P450 (CYP51A1) provoca la inhibición de la enzima 14 α -dimetilasa, responsable de la dimetilación del lanosterol, reacción necesaria para la obtención del ergosterol en hongos, componente esencial de la membrana celular. Sin embargo, uno de los problemas de los fungicidas con restos de imidazol se basa en que esta unión es bastante inespecífica, por lo que se produce también la inhibición de un gran número de enzimas dependientes del citocromo P450, incluyendo algunas enzimas clave implicadas en la biosíntesis y metabolismo de esteroides en vertebrados (CYP17, CYP19) [17]. Además, la

inhibición de la enzima 14 α -dimetilasa, también es la responsable en animales de la dimetilación del lanosterol para obtener colesterol, reacción también impedida debido a la acción del imidazol. Existen también otros estudios a largo plazo realizados con perros, ratas y ratones, donde se observaron efectos críticos en el hígado de estos animales, siendo los perros la especie más afectada [16].

Otro de los problemas que más preocupa desde el punto de vista toxicológico, es el causado por sus metabolitos (en plantas y animales) o productos de degradación (en suelos). Desde el momento de su aplicación, el Procloraz se metaboliza rápidamente, produciéndose el primer paso metabólico con la escisión del anillo de imidazol, dando lugar al metabolito N-Formil-N-propil-N-[2-(2,4,6-triclorofenoxi)etil]urea (BTS 44596) que se continúa degradando hasta N-Propil-N-[2-(2,4,6-triclorofenoxi)etil]urea (BTS 44595) y N-[2-(2,4,6-Triclorofenoxi)etil]-1-propanamina (BTS 40348) (Figura 2) entre otros metabolitos, todos ellos tanto de forma libre como conjugada [16,18]. La hidroxilación del anillo fenólico daría como residuo final el TCP y que es el compuesto de referencia para realizar la evaluación de riesgos de residuos de Procloraz en alimentos. Según datos de la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (EPA), el uso del TCP ha demostrado ser carcinógeno en animales, produciendo linfomas, leucemia y cáncer de hígado a través de la exposición oral. Sin embargo, la información acerca de los posibles efectos a corto y largo plazo en humanos es aún limitada. Aun así, los pocos estudios disponibles informaron de efectos respiratorios tales como tos, bronquitis, crónica, sibilancias en el pecho, alteración de la función pulmonar y lesiones pulmonares por exposición crónica al 2,4,6-Triclorofenol por inhalación [19]. Debido a las evidencias sobre el peligro carcinógeno en animales, y a pesar de los resultados aún no concluyentes sobre su peligro en humanos, la EPA ha clasificado al TCP dentro de Grupo 2B de sustancias cancerígenas de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), es decir, está clasificada como sustancia posiblemente cancerígena para el ser humano.

1.5.1.1 Procloraz como disruptor endocrino

Los disruptores endocrinos son sustancias químicas capaces de alterar el equilibrio hormonal de una especie en cuestión, pudiendo afectar gravemente a su expresión genética. En 2004 un estudio llevado a cabo sobre 200 pesticidas de amplio uso en agricultura y jardinería, mostró un total de 66 pesticidas con capacidad para interferir con el receptor de andrógenos [20], y, por tanto, alterar factores de transcripción que regulan la expresión genética. En la actualidad, muchas de las sustancias identificadas como disruptores endocrinos corresponden a compuestos organoclorados persistentes (DDT, dieldrin o dicofol), aunque debido a su persistencia y toxicidad están prohibidos en la mayoría de los países desde hace años.

Debido a que los pesticidas conforman un grupo con un amplio abanico de sustancias químicas, es de esperar que la disrupción endocrina causada por estos compuestos difiera en sus modos de acción. Asimismo, en lo relativo al Procloraz, se sabe que el mecanismo crítico de los compuestos químicos que presentan el anillo imidazol en su estructura (econazol, ketoconazol, miconazol), está basado en la alteración de la biosíntesis de esteroides [21]. Por tanto, aunque ya se tenía constancia del peligro carcinogénico del Procloraz en animales, lo que realmente puso el foco de atención en el Procloraz fueron los estudios que demostraron su capacidad para actuar como disruptor endocrino al alterar el equilibrio hormonal en ratones. Se pudo comprobar *in vivo*, que el Procloraz actuaba como supresor hormonal (antiandrógeno), ya que redujo el peso de los órganos reproductivos, afectando a las expresiones génicas reguladas por andrógenos, y aumentando los niveles de la hormona luteinizante, que es la hormona encargada, entre otras acciones, de la secreción de la testosterona en hombres o de la ovulación en mujeres. Estos resultados mostraron como el Procloraz reducía considerablemente los niveles de testosterona plasmática y testicular (hormona sexual masculina) en los fetos masculinos durante el periodo de gestación, mientras que la progesterona testicular (hormona sexual femenina) aumentó, es decir, el Procloraz feminizó la descendencia masculina [22].

Tras estos estudios se manifestó una preocupación generalizada por el uso general de Procloraz como fungicida en un gran número de países, porque, aunque no se haya encontrado aún una relación causal entre la exposición a pesticidas y trastornos reproductivos en humanos, sí existen estudios donde se encontró una mayor incidencia de criptorquidia (trastorno testicular) en hijos de mujeres embarazadas dedicadas a la jardinería [23], e incluso una menor fertilidad en mujeres que trabajaban en invernaderos [24], por lo que se llamó a la necesidad de su reducción para disminuir así el riesgo de exposición humana.

1.5.2 Métodos de análisis

Actualmente, para poder realizar la evaluación de los riesgos toxicológicos, los residuos de Procloraz se definen como *“suma de Procloraz y sus metabolitos que contienen el resto 2,4,6-triclorofenol expresado como Procloraz”*. Para el análisis de riesgos según la actual definición se usa el método de “resto común”, (RESID/88/72) [25] y en el que es necesario un paso de hidrólisis para obtener el resto TCP a partir del Procloraz y sus metabolitos. En este método, las muestras se extraen en Soxhlet con acetona seguido de una concentración por evaporación del disolvente. El extracto se hidroliza con clorhidrato de piridina para poder descomponer todos los componentes en 2,4,6-triclorofenol. A continuación, el hidrolizado resultante se extrae en éter de petróleo mediante destilación a vapor. A la fase acuosa se le realiza una limpieza adicional con adición de álcali y posterior extracción con tolueno acidificado. Los residuos totales de 2,4,6-triclorofenol se determinan por cromatografía de gases con detección de captura de electrones (materia vegetal) o espectrometría de masas (leche o tejido animal). Los resultados se expresan como equivalentes de Procloraz con un factor de corrección de 1,906.

A la luz de lo engorroso del método de “resto común”, en 2011 la EFSA propuso una visión alternativa para la definición de residuo de Procloraz, en la cual se realizaría un análisis directo de los metabolitos relevantes susceptibles de poseer el resto TCP. De esta forma se propuso la nueva definición de residuo

como “suma de Procloraz, BTS 44595 y BTS 44596, expresada como Procloraz” [16].

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) ha sido una técnica de análisis utilizada para la determinación de Procloraz y TCP. Sin embargo, este análisis parece complicado, ya que el Procloraz y sus metabolitos se degradan fuertemente a TCP en la inyección. En un estudio realizado por el laboratorio de referencia de la unión europea para el control de residuos de pesticidas (EURL-SRM) [18], se comprobó que en inyecciones repetitivas de estándares de los metabolitos de Procloraz en diferentes matrices y con diferentes procedimientos de limpieza, se obtenían tasas de conversión de estos metabolitos a TCP significativamente diferentes, por lo que la cuantificación exacta global de Procloraz y sus metabolitos por cromatografía de gases es difícil.

Tras el análisis y prueba de varios métodos analíticos para la determinación de Procloraz y sus metabolitos de acuerdo a la nueva definición de residuo propuesta por la EFSA (suma de Procloraz, BTS 44595 y BTS 44596, expresada como Procloraz), se concluyó que el Procloraz y los metabolitos BTS 44595 y BTS 44596 podrían analizarse en productos de origen vegetal mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) con un límite de cuantificación (LOQ) de 0.01 mg/kg para cada compuesto [16]. Además, debido a que la fragmentación de ciertos metabolitos origina otros de menor tamaño molecular en LC-MS/MS, es necesaria una buena separación cromatográfica de todos los metabolitos para evitar errores de cuantificación [18]. Así, se han validado métodos que HPLC-MS/MS para el análisis de Procloraz, metabolitos BTS 44595 y BTS 44596 en vegetales de alto contenido de agua, alto contenido de ácido, alto contenido de aceite y productos secos [26].

1.5.3 Presencia del metabolito BTS 40348

Cuando se analizan los pesticidas, las concentraciones más altas de pesticidas suelen encontrarse en la cáscara o zona exterior del fruto, pero no en la pulpa.

En muchas frutas, para la obtención del zumo no es necesario el exprimido de la cáscara, pero en determinados tipos de zumos como la naranja, el exprimido del fruto puede llevarse a cabo sin una eliminación previa de la cáscara, por lo que se pueden encontrar pequeñas cantidades de pesticidas en el zumo, aunque estos niveles no suelen ser altos.

Por ello, en diversos análisis realizados en cítricos sobre el contenido de pesticidas, se ha podido detectar Procloraz junto con N-[2-(2,4,6-Triclorofenoxi)etil]-1-propanamina (BTS 40348) como metabolito principal [18, 24-26]. Fue en el año 2004 cuando se describió por primera vez este metabolito por el grupo de investigación de residuos de plaguicidas de la Universidad de Almería, publicándose en 2005 en el *Journal of Chromatography A* [27]. El descubrimiento de este metabolito se llevó a cabo mediante el uso de cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masas (LC-MS) con un analizador de tiempo de vuelo (TOF). Más tarde se sintetizó y se desarrolló un método para la determinación de este producto de degradación de Procloraz junto con otros fungicidas post-cosecha en zumos o refrescos de frutas [28,29].

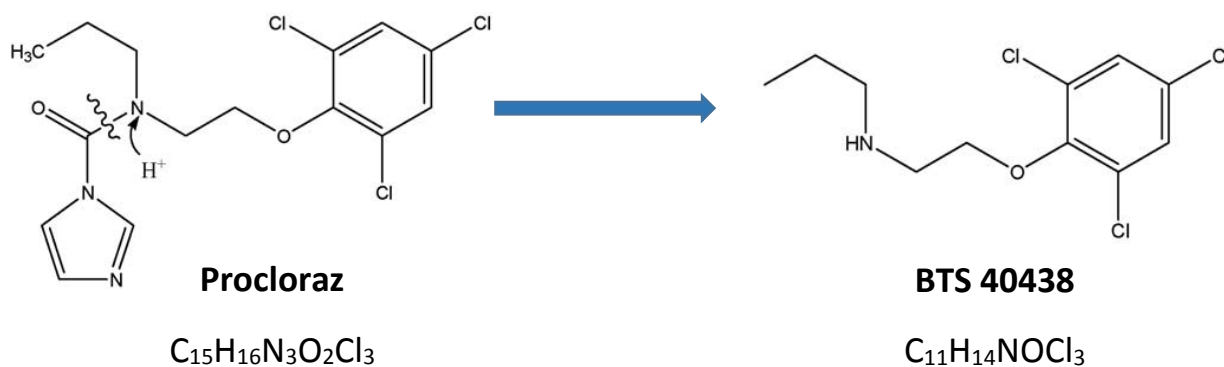


Figura 3. Transformación del metabolito BTS 40348 a partir de Procloraz.

Pero a pesar de ser en cítricos o frutas exóticas donde se encuentran de forma más habitual, tanto Procloraz como sus metabolitos pueden aparecer en una gran cantidad de alimentos. En 2016 un extenso estudio realizado por los EURL [18] acerca de la presencia de Procloraz y sus metabolitos en varios grupos de alimentos con diferente matriz, se pudo comprobar como entre un total de 4692

muestras, el metabolito BTS 40348 fue, tras el Procloraz, el metabolito con presencia mayoritaria en el total de muestras analizadas, y cuyos datos pueden observarse en la tabla 2.

Tabla 2. Presencia de Procloraz y sus metabolitos en alimentos con diferentes matrices [18].

Compuesto	Nº. de muestras presente (≥0.005mg/kg)	Concentración media (mg/kg)	Concentración máxima	% medio de la suma de Procloraz
Procloraz	104	0.41	6.5	64%
BTS 40348	98	0.082	1.13	29%
BTS 44596	56	0.034	0.15	4%
BTS 44595	25	0.014	0.039	1%
BTS 9608	12	0.025	0.059	3%

En este mismo informe del consorcio de EURL [18], se analizaron diferentes tipos de muestras con controles positivos conocidos de Procloraz (mango, piña y lima), cuyos resultados se compararon usando diferentes enfoques propuestos para residuo de Procloraz, en contraste con la definición de residuo existente, a fin de demostrar los errores que se puedan cometer en la práctica. Todos estos análisis se realizaron por LC-MS/MS, donde la mejor estimación para definición de residuo actual se obtuvo como la suma de Procloraz, BTS 44595, BTS 44596, BTS 44348, BTS 9608 y TCP, en lugar del método de “resto común”. Un resumen de estos análisis se muestra en la tabla 3:

Tabla 3. Cálculo de la suma de Procloraz por diferentes métodos propuestos.

	Suma de Procloraz (mg/kg)		
	Lima	Mango	Piña
Según la definición de residuo existente.*	0.76	1.48	0.11
Según la definición de residuo propuesto por la EFSA.**	0.63	1.39	0.09
Según la definición de residuo propuesta por los EURL (incluyendo BTS 40348).	0.76	1.48	0.11

* suma de Procloraz y sus metabolitos que contienen el resto 2,4,6-triclorofenol expresado como Procloraz

** suma de Procloraz, BTS 44595 y BTS 44596, expresada como Procloraz

1.6 Antecedentes determinación BTS 40348

La actividad y toxicidad del Procloraz ha sido evaluada varias veces por el JMPR (FAO/OMS), realizándose en 2001 la última evaluación de su toxicidad y en 2009 de sus residuos. Fue evaluado por la Comisión Europea e incluido en la lista positiva de ingredientes activos en 2012 (hasta 2021). Los límites máximos de residuos se fijaron en la Comisión de Regulación de la Unión Europea No. 520/2011 del 25 de mayo de 2011, donde se definieron los residuos de Procloraz como *“suma de Procloraz y sus metabolitos que contienen el resto 2,4,6-triclorofenol expresado como Procloraz”* [30]. Esta definición de los residuos de Procloraz hace necesario el uso de procedimientos donde se requieren al menos algún paso de hidrólisis para poder acceder a los restos de 2,4,6-triclorofenol (TCP). Estos procedimientos analíticos son generalmente largos y engorrosos, y que en la mayoría de los casos el beneficio de realizarlos no justifica el esfuerzo, por lo que muy pocos laboratorios los emplean de forma rutinaria. Es por ello, que en un informe presentado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) se propuso un enfoque alternativo a la definición actual de residuo, en la que se entendería como residuo de Procloraz todo aquel metabolito susceptible de poseer el resto TCP. Tras el estudio de los diferentes metabolitos de Procloraz por medio de LC-MS/MS [18], se propuso la definición de residuo vegetal como *“suma de Procloraz, BTS 44595 y BTS 44596, expresada como Procloraz”*. Esta nueva definición excluye o ignora los datos relativos a los demás metabolitos de Procloraz, atribuyendo la toxicidad de sus residuos en cualquier producto vegetal, únicamente a la presencia de solo 3 compuestos con restos TCP (Procloraz, BTS 44595 y BTS 44596). Pero estos datos contradicen a otros estudios donde, si se ignorara la presencia del metabolito BTS 40348 con presencia mayoritaria, se cometería un error importante en la evaluación del riesgo toxicológico de los restos TCP por degradación del Procloraz [31]. De hecho, en los análisis de diferentes muestras realizados por los EURLs [26], se observó una presencia claramente mayoritaria del metabolito BTS 40348 (tabla 2) en comparación con los dos metabolitos principales propuestos por la EFSA. Además, en este informe se alertó de la clara desviación que se producía en los resultados al no verse incluido el

metabolito BTS 40348 en la definición oficial de residuo de Procloraz (tabla 3). Se propuso incluso el establecimiento de una definición de residuo donde se incluyera únicamente al Procloraz y al metabolito BTS 40348 [18]. Pero en agosto de 2018, la EFSA publicó una nueva revisión de los niveles máximos de residuos para Procloraz, donde se menciona brevemente las observaciones realizadas por los EURLs acerca del metabolito BTS 40348, y concluyó que no es esperable que la presencia de este metabolito se deba a la degradación de Procloraz, por lo que no se considera la posibilidad de una pronta inclusión del metabolito BTS 40348 en la definición de residuo de Procloraz.

Por tanto, a pesar de las últimas conclusiones de la EFSA, y teniendo en cuenta los resultados concluyentes en pruebas de toxicidad de residuos de Procloraz, se deberían de reconsiderar nuevos enfoques para la evaluación de riesgos de los metabolitos, y utilizar así métodos que no excluyan compuestos predominantemente mayoritarios, y basados en el análisis comparativo del peligro de compuestos estructuralmente relacionados, de forma que se puedan aplicar de manera óptima para obtener resultados realmente fiables.

1.7 Breve introducción a las herramientas empleadas

1.7.1 Métodos teóricos

La Química Computacional es una disciplina que se distingue por el uso de ordenadores y software para aplicar modelos y simulaciones teóricas para proponer respuestas a problemas químico-físicos de muy diversa índole en sistemas moleculares de distinto tipo. Los datos que normalmente se quieren obtener con la Química Computacional, son geometrías moleculares, energías relativas y parámetros que informan acerca de la reactividad y los mecanismos de reacción [32].

Para estos fines se recurre al uso de programas especializados en los se han implementado diferentes modelos de cálculo, siendo los más usados los métodos de mecánica molecular, *ab initio*, DFT o métodos semiempíricos [33].

La mecánica molecular (MM) se basa la concepción del átomo como un conjunto de esferas unidas mediante resortes, y utiliza para los cálculos de su energía únicamente los términos que involucran estiramiento de enlace, ángulo de flexión, ángulos diédricos e interacciones no enlazantes. Se trata del método más rápido de los 4, y es capaz de optimizar la energía de una molécula grande en apenas unos pocos segundos.

Los métodos *ab initio* (desde el principio, en latín) por su parte, nos permiten resolver, de forma aproximada, la ecuación de Schrödinger para el sistema de interés. La gran complejidad de la ecuación para sistemas moleculares (hay que recordar que solo tiene solución exacta para átomos hidrogenoides, es decir, de un solo electrón) hace necesaria la implementación de aproximaciones para reducir los elevados costes computacionales que implica el uso de estas herramientas y que las convertirían en prácticamente inaplicables para sistemas de moderado tamaño. El tipo de aproximación que llevemos a cabo definirá tanto el coste computacional como la precisión del cálculo realizado.

Una variable de estos métodos, llamados semiempíricos, consiguen rebajar notablemente dicho coste mediante la parametrización de determinadas ecuaciones con valores experimentales. Aunque no permiten una gran precisión, son el único método Químico Cuántico realmente práctico computacionalmente para el estudio de moléculas grandes.

Finalmente, nos encontramos con los métodos DFT (Density Functional Theory) [34-37]. Al igual que los métodos *ab initio* y los cálculos semiempíricos, se basan en la ecuación de Schrödinger, sin embargo, los métodos DFT no plantean una ecuación de onda convencional, sino que minimizan la función de energía electrónica con respecto a la densidad electrónica, lo que implica realizar una aproximación sobre el problema real. Así, la filosofía DFT consiste en plantear un problema aproximado y darle una solución exacta, en contraste con los métodos *ab initio*, que proponen soluciones aproximadas a la ecuación de Schrödinger.

En nuestro trabajo, emplearemos el funcional híbrido conocido como B3LYP [38-42]. Se trata de uno de los métodos más populares actualmente y es

especialmente útil debido a que ofrece un buen rendimiento en los cálculos de frecuencias e intensidades para los espectros IR y Raman.

1.7.2 Técnicas de espectroscopía vibracional: IR y Raman.

Los átomos que configuran las moléculas se encuentran continuamente vibrando respecto de su posición de equilibrio. Los movimientos que experimentan, aparentemente desordenados y caóticos, pueden sin embargo construirse como la combinación de una serie de movimientos periódicos: acortamientos-elongaciones de enlaces, deformaciones de ángulos de enlace, movimientos torsionales, etc. En total, una molécula presenta $3N-6$ (siendo N el número de átomos) de los llamados modos normales de vibración, formados por combinaciones de estas vibraciones sencillas [43].

La energía de estas vibraciones es del orden de magnitud de la radiación infrarroja, por lo que, si irradiamos una muestra con este tipo de radiación electromagnética, esta responderá absorbiendo selectivamente las energías (o frecuencias o números de onda) correspondientes a estos modos normales de vibración (esta afirmación está sujeta a una serie de restricciones llamadas reglas de selección, aunque para un sistema poliatómico no simétrico puede considerarse cierto).

Así, en un espectro IR, se observarán una serie de picos (bandas) cada uno centrado a una determinada frecuencia. La posición de estos picos será característica del sistema estudiado dado que el valor de las frecuencias vibracionales estará íntimamente ligado con la geometría molecular, constituyendo lo que se conoce como la huella dactilar del sistema. De este modo, el espectro vibracional de dos especies con la misma composición elemental pero distinto ordenamiento de átomos en el espacio será distinto, incluso para distintos confórmers de la misma especie, los espectros vibracionales diferirán. Puede decirse, pues, que la correcta caracterización del espectro vibracional de una especie permitirá su identificación inambigua.

En espectroscopía IR la muestra, situada en un compartimento “transparente” a la radiación IR se coloca entre una fuente de un haz de esta radiación y un detector sensible a la misma que registra la caída de la potencia radiante en determinadas regiones del espectro IR, traduciendo esta información a un impulso eléctrico que luego es traducido con ayuda de software. La complejidad de los equipos actuales es mucho mayor, habiéndose impuesto en los últimos 30 años el uso de equipos por transformada de Fourier.

El efecto Raman, por su parte, es distinto en su naturaleza. Se basa en el desplazamiento que sufre la energía de una pequeña parte de una radiación electromagnética cuando incide sobre un medio material en vibración. Como decimos, la gran mayoría de los fotones incidentes se dispersarán elásticamente, cambiando de dirección sin cambiar su longitud de onda (frecuencia o energía, fenómeno conocido como difusión Rayleigh). Pero 1 de cada 10000000 de fotones variará de frecuencia, precisamente debido a que las moléculas están vibrando continuamente. Este es el conocido como efecto Raman. Es más, la diferencia entre la energía de la radiación incidente y la radiación Raman es del orden de magnitud de la radiación IR. Así, en un espectro Raman se observarán una serie de bandas situadas a ciertas diferencias de energía respecto de la radiación incidente (desplazamiento Raman) que se corresponden con las energías de los modos normales de vibración de la molécula en cuestión.

Un equipo para espectrometría Raman consiste, esencialmente, en una fuente de radiación (un láser), un compartimento de muestra, un monocromador, que separa los fotones dispersados según sus energías y los enfoca hacia un detector que suele colocarse en una geometría de 180° respecto de la fuente. El detector cuenta los fotones dispersados para cada valor de energía correspondiente. En espectrometría Raman es común también el uso de equipos basados en la transformada de Fourier, aunque las variables experimentales respecto a los equipos IR son mucho mayores.

Las técnicas IR y Raman son complementarias, y, a veces, es necesario el uso de ambas para poder analizar totalmente los modos normales de vibración de una molécula, ya que algunos tipos de vibraciones serán más intensas en una

técnica que en otra. Por ejemplo, las vibraciones simétricas de grupos no polares son muy intensas en Raman y poco en IR, pero las vibraciones asimétricas de grupos polares serán más intensas en IR que en Raman [44].

1.8 Justificación de nuestro trabajo

En base a diferentes estudios donde se expone la presencia mayoritaria del metabolito BTS 40348, y a la propuesta de definición de residuo de Procloraz por parte de la EFSA donde se ignora este hecho, nos empujó a la realización de un estudio estructural en este metabolito.

El conocimiento de la estructura molecular y las conformaciones más estables de una especie potencialmente perjudicial para la salud es de capital importancia en estudios toxicológicos. El empleo de métodos *in-silico* está cada vez más extendido para este fin, ya que permiten una mejor comprensión de la interacción entre el compuesto en cuestión y su diana biológica, así como el desarrollo de fármacos que permitan inhibir la acción de dichos tóxicos mediante el diseño de especies análogas estructuralmente.

En el caso más ideal, que supone tener disponible a la especie en cuestión, la fiabilidad y exactitud de estos cálculos computacionales se han de verificar mediante la predicción teórica de propiedades de la especie medibles experimentalmente. En este sentido, el espectro vibracional de una especie química, comúnmente conocido como su “huella dactilar”, permite distinguir incluso entre confórmeros de una misma especie, por lo que las técnicas IR y Raman son poderosas herramientas para llevar a cabo estudios estructurales como el que aquí se plantea, como muestran numerosos ejemplos en la bibliografía [45,46].

1.9 Objetivos

El objetivo de este trabajo es conseguir una adecuada caracterización estructural del metabolito de Procloraz denominado BTS 40348 mediante el uso de métodos químico-cuánticos y espectroscopías vibracionales IR y Raman.

Para este fin se propone:

- Analizar, mediante el uso de métodos de la Química Computacional, la superficie de energía potencial del metabolito BTS 40348 en busca de sus estructuras de mínima energía en fase gaseosa y llevar a cabo el consiguiente estudio poblacional según la ley de distribución de Boltzman.
- Registrar los espectros vibracionales IR y Raman de la especie en fase sólida.
- Llevar a cabo la asignación vibracional de los espectros IR y Raman para confirmar la validez del modelo teórico escogido.

2 Materiales y métodos

2.1 Estándares, productos químicos y solventes

El metabolito de Procloraz denominado BTS 40348 fue sintetizado por el Dr. Antonio Marchal Ortega en el laboratorio del departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad de Jaén y ha sido empleado para este estudio sin sufrir ningún tipo de modificación o purificación adicional.

Brevemente, el proceso de síntesis consistió en los siguientes pasos. Primero se disolvió 98.5 mg de Procloraz (0.257 mmol) en 5 ml de HCl concentrado (37%). Para facilitar la hidrólisis, la mezcla se llevó a una temperatura de 100 °C durante 16 horas. La disolución resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente, y nuestro metabolito fue aislado en forma de cloruro mediante filtración a vacío, a la cual se le realizó sucesivos lavados con agua. Para finalizar, la muestra resultante se secó a vacío sobre gránulos de hidróxido sódico. Se obtuvo 42.7 mg de polvo blanco (0.133 mmol) que nos dio un rendimiento del 52%, con un punto de fusión de entre 200 y 205 °C. La pureza se verificó y se calculó mediante un ensayo HPLC-UV y se encontró que era superior al 98%.

2.2 Espectroscopía IR y Raman.

Los espectros IR del líquido sólido puro se midieron con un espectrofotómetro Bruker Vector 22 FT-IR con una fuente Global y un detector DTGS, usando una celda líquida estándar equipada con ventanas de CsI. Los espectros Raman del líquido puro se registraron con un espectrómetro Bruker RF/100S FT-Raman, equipado con un láser He/Ne ($\lambda_{\text{exc}} = 1064 \text{ nm}$) y un detector de Germanio enfriado a la temperatura del nitrógeno líquido, usando una celda líquida de sólidos estándar. Todos los espectros fueron adquiridos con una resolución de 4 cm^{-1} y 50 acumulaciones con el fin de mejorar la relación señal/ruido.

2.3 Cálculos computacionales

Los cálculos computacionales cuyos resultados se recogen en este trabajo se han llevado a cabo con el paquete de programas Gaussian16 (Revision A.01).

Concretamente, la búsqueda conformacional mediante mecánica molecular ha sido llevada a cabo con el complemento GMMX de GaussView 6.0, empleando para este fin el campo de fuerzas MMFF94 [47-51]. El hardware empleado en esta fase del trabajo fue un PC con un procesador Intel Core i3-2100, 4 GB de RAM y Windows 7.

Las subsiguientes optimizaciones de las estructuras obtenidas mediante mecánica molecular fueron llevadas a cabo con Gaussian16 implementado en un clúster para cálculo científico del Departamento de Química Física y Analítica de la UJA equipado con 96 núcleos de cálculo distribuidos en 3 nodos, 112 GB de RAM y 6TB de disco duro, bajo Rocks Linux.

En esta fase se emplearon el funcional híbrido DFT conocido como B3LYP en combinación con la base de tipo Pople y calidad doble zeta conocida como 6-31G* [52,53] y la base de tipo Dunning y calidad triple zeta conocida como cc-pVTZ [54].

Para facilitar la comparación teórico-experimental, los espectros vibracionales calculados con el método B3LYP/cc-pVTZ fueron escalados de acuerdo con la metodología explicada en la literatura científica [55], empleándose el factor de escala 0,965 para todo el rango espectral, y cuyo valor se obtuvo de la “Computational Chemistry Comparison and Benchmark DataBase” [56]. De este modo se corrige la sobreestimación generalizada que los métodos teóricos hacen de los valores de las frecuencias vibracionales debidos a que estos consideran que las vibraciones moleculares son armónicas (aproximación del oscilador armónico).

3 Resultados y discusión

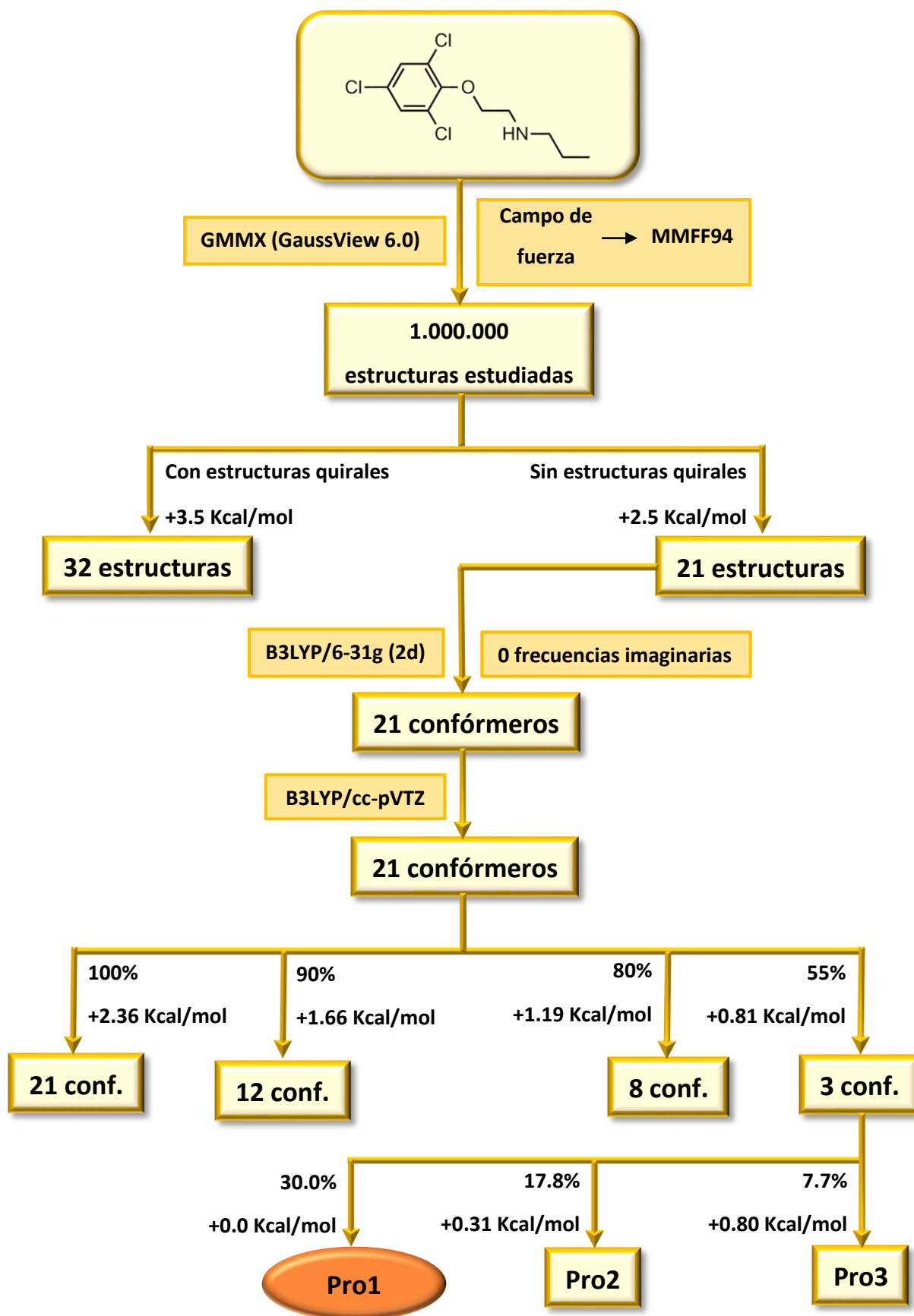
3.1 Búsqueda conformacional

Para la búsqueda de las estructuras de mínima energía en la superficie de energía potencial (PES) del metabolito de Procloraz, los cinco ángulos diedros en la cadena lateral unidos al anillo aromático se escanearon individualmente utilizando mecánica molecular tal y como se encuentra implementada en el complemento GMMX de GaussView 6.0 usando el campo de fuerza MMFF94. La búsqueda se realizó entre 1 millón de estructuras posibles y con una ventana de energía de 3,5 Kcal/mol. El método de cálculo solo tuvo en cuenta las coordenadas cartesianas y no permitió la formación de epímeros ni la ruptura o formación de dobles enlaces.

De una primera búsqueda se obtuvieron un total de 32 confórmeros diferentes, de los cuales se descartaron aquellas estructuras quirales debido a la inversión piramidal del nitrógeno de la cadena, ya que la energía de inversión es tan baja que ambos enantiómeros se interconvierten rápidamente, encontrándose siempre en forma racémica, por lo que solo se tuvo en cuenta una única estructura enantiomérica.

Se descartaron también las estructuras que se alejaban en más de 2,5 kcal/mol de la energía del confórmero más estable. De esta forma nos quedamos solo con 21 conformaciones moleculares optimizadas, las cuales diferían únicamente en la orientación de la cadena alquílica.

La posterior optimización de la geometría se realizó a nivel de B3LYP/6-31g* como se implementó en Gaussian16. El resultado fue la confirmación de estas 21 estructuras como mínimos reales de la PES de la molécula, al no calcularse ninguna frecuencia vibracional imaginaria para ellas. Estas 21 estructuras fueron reoptimizadas a un nivel de cálculo mayor, B3LYP/cc-pVTZ, nivel al que se calcularon de nuevo sus espectros vibracionales. En el esquema recogido en la figura bajo estas líneas se recoge un esquema del procedimiento de implementación de los distintos cálculos teóricos.



Esquema 1. Resumen de los cálculos computacionales realizados y la población de los conformeros según su energía.

Las poblaciones teóricas de los conformeros en la fase gaseosa se determinaron usando la estadística de Boltzmann en términos de las energías E_0 calculadas para ellos (B3LYP/cc-pVTZ):

$$p_i = \frac{e^{-\varepsilon_i/KT}}{\sum_{i=1}^N e^{-\varepsilon_i/KT}}$$

$$K = 1.987 \cdot 10^{-3} \text{ Kcal/mol}$$

$$T = 298.15 \text{ K}$$

$$\varepsilon_i = E_0 = E_e + \text{ZPE}$$

$$p_i = \% \text{ del estado } i$$

$$N = \text{número de estados totales}$$

Como puede apreciarse en el esquema, de los 21 conformeros confirmados como mínimos de la PES, 12 de ellos representan el 90% de la composición de la mezcla de conformeros en fase gaseosa, mientras que con únicamente 8 estructuras se estaría contemplando el 80% de la misma. Más allá, si solo nos quedamos con los tres conformeros de menor energía (que estarían en un rango de 0,81 kcal/mol) estaríamos contemplando el 55% de la composición de la mezcla.

3.2 Análisis estructural de los conformeros mayoritarios de BTS

40348

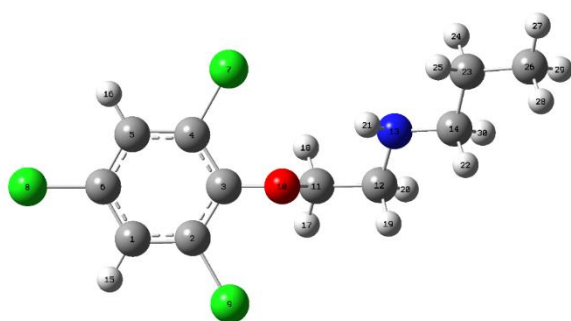


Figura 4. Estructura del conformero pro1 con la numeración de los átomos usada.

En la figura 5 se puede observar la representación esquemática del conjunto de conformeros más estables para el metabolito BTS 40348.

Como puede apreciarse, el ángulo diedro

$\phi_{O_{10}C_{11}C_{12}N_{13}}$ (Figura 4 para numeración de los átomos) se mantiene inalterable en las 3 estructuras, con ángulos cercanos a los 66° , y debido a la rigidez del anillo por la deslocalización de la densidad electrónica asociada a su

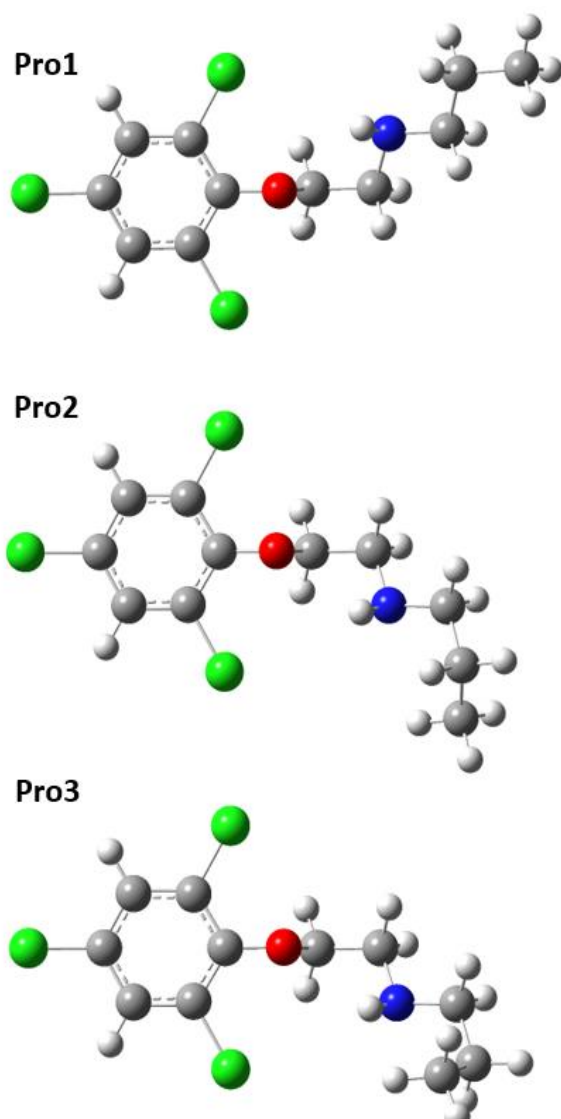


Figura 5. Estructuras optimizadas de los 3 conformeros mayoritarios de BTS 40348 al nivel B3LYP/cc-pVTZ.

aromaticidad. Así, las estructuras de los conformeros pro1, pro2 y pro3 difieren únicamente en la orientación del ángulo diedro $\Phi_{N_{13}C_{14}C_{23}C_{26}}$. Además, de entre los 3 conformeros mayoritarios, la estructura correspondiente a pro1 fue la que presentaba una mayor abundancia relativa según las poblaciones de Boltzmann (30%). Esto se puede justificar debido a la isomería trans adoptada por la cadena lateral del conformero pro1, lo que se traduce en un bajo impedimento estérico entre los átomos de la cadena. Por tanto, en el análisis de los espectros experimentales, es de esperar un perfil muy parecido al obtenido teóricamente para el conformero pro1, con ligeras variaciones debido al resto de conformeros mayoritarios que prácticamente

definirían el espectro vibracional para el metabolito BTS 40348.

3.3 Influencia en el perfil espectral de diferentes poblaciones de conformeros

Cuando obtenemos un espectro vibracional, en el mismo aparecerá la contribución combinada de los perfiles de todas las conformaciones moleculares que componen nuestra muestra en las condiciones a las que se realiza el experimento, por lo que es necesario un estudio del paisaje conformacional que

nos permita obtener una buena coincidencia teórico-experimental y así poder obtener conclusiones suficientemente validadas.

En el estudio conformacional de nuestro metabolito, obtuvimos en total 21 estructuras moleculares optimizadas, y de acuerdo con la física estadística, sabemos que siempre será más probable el estado de menor energía, por lo tanto, cuando tenemos en cuenta las poblaciones de Boltzman en nuestro sistema, observamos como un número pequeño de confórmeros supone un grupo poblacional predominante, y que esencialmente definirían la forma del espectro vibracional. Es por ello que se realizó un estudio para comprobar si el uso de diferentes poblaciones conformacionales para la obtención del espectro teórico, influía de forma significativa en el perfil espectral. Para ello, se usaron diferentes poblaciones en las que se iban eliminando los estados de mayor energía, así como otro grupo que incluyera únicamente a los 3 confórmeros mayoritarios y cuya información viene recogida en la tabla 4:

Tabla 4. Número de confórmeros y umbral de energía para cada grupo poblacional utilizado.

	100% confórmeros	90% confórmeros	80% confórmeros	55% confórmeros
Nº de confórmeros	21	12	8	3
Umbral energético	+2.36 Kcal/mol	+1.66 Kcal/mol	+1.19 Kcal/mol	+0.81 Kcal/mol

En la Figura 6 y 7 podemos observar los espectros IR y Raman respectivamente, contruidos considerando las contribuciones ponderadas según sus poblaciones de Boltzmann para 21 (100%), 12 (90%), 8 (80%) y, finalmente 3 (55%) confórmeros de la especie.

Como puede apreciarse, los perfiles son muy parecidos en los cuatro casos. Esto se debe, principalmente, a que las estructuras de los 21 confórmeros, se encuentran estrechamente relacionadas unas con otras, y con ello, el correspondiente espectro vibracional para cada una de ellas. Se ha comentado en el apartado anterior que la principal diferencia estructural entre las tres especies mayoritarias es únicamente el ángulo diedro que involucra al nitrógeno

de la cadena alquílica, circunstancia que cabe esperar que, en todo caso, produzca una variación leve del perfil espectral.

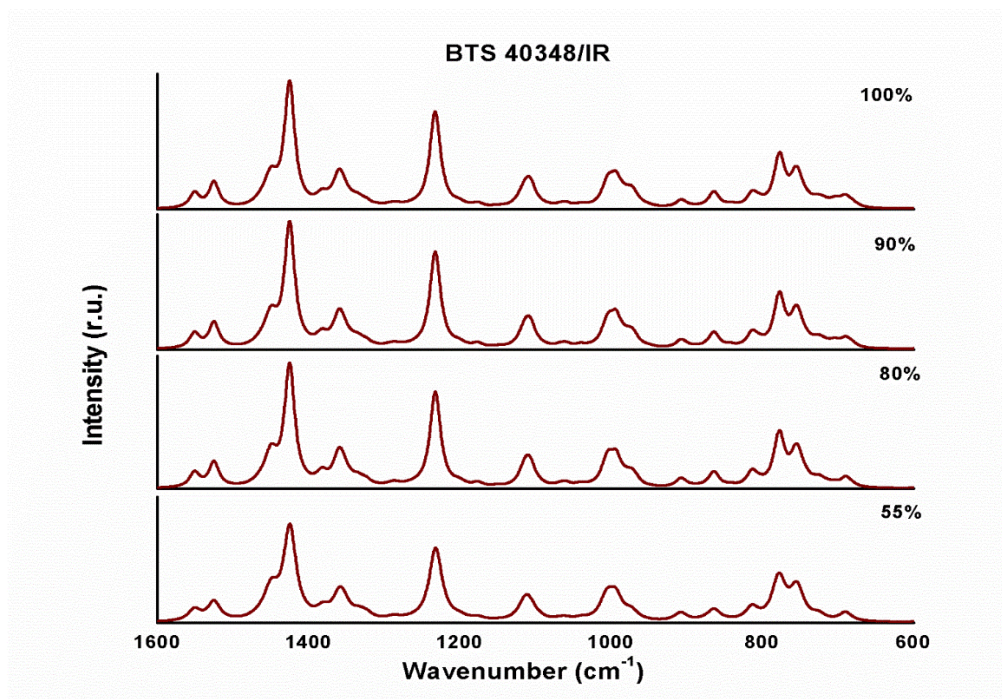


Figura 6. Comparación espectros IR teniendo en cuenta diferentes poblaciones de conformeros en la región 1600-600 cm^{-1} .

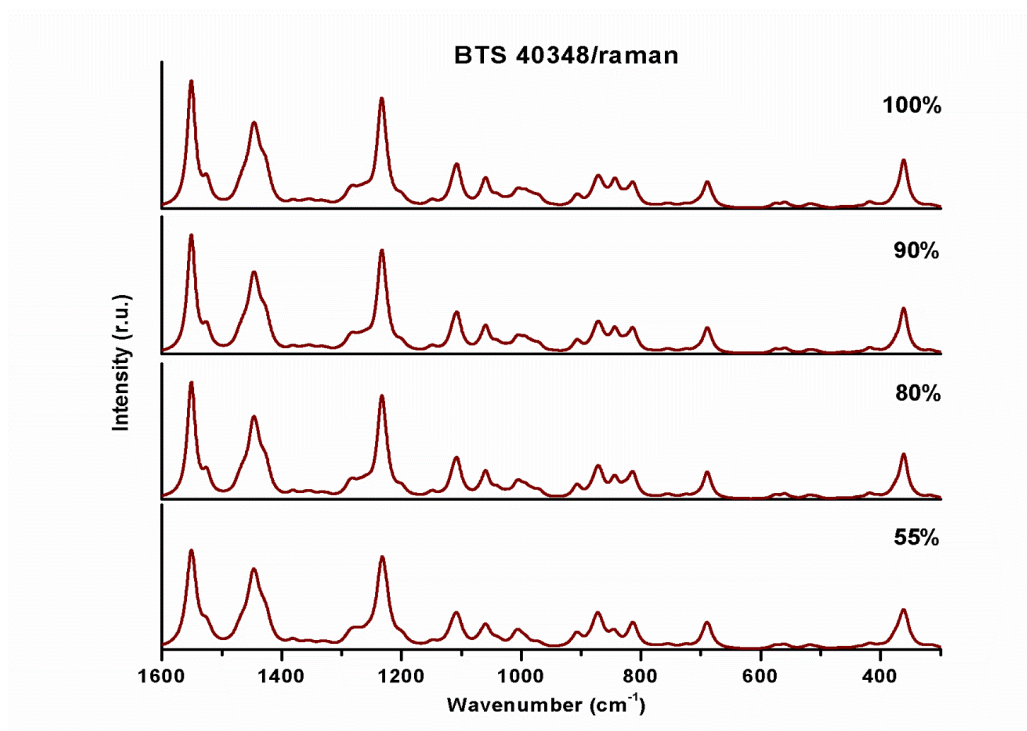


Figura 7. Comparación espectros Raman teniendo en cuenta diferentes poblaciones de conformeros en la región 1600-300 cm^{-1} .

Por tanto, podemos concluir que el perfil del espectro vibracional está bien definido si se tienen en cuenta únicamente las tres estructuras de menor energía. Debido a esto, se optará por usar un modelo teórico que considere sólo a estos 3 conformeros mayoritarios. De este modo, los espectros teóricos IR y Raman que se emplearán para llevar a cabo la asignación vibracional se construirán considerando que estas tres especies conforman el 100% de la población en fase gaseosa lo que implica considerar unas abundancias de 54.0%, 32.0% y 13.9% para pro1, pro2 y pro3 respectivamente.

3.4 Asignación vibracional

En esta sección se va a realizar una comparación entre los espectros experimentales y los espectros teóricos obtenidos para la especie estudiada. En el caso de los espectros teóricos, como se ha comentado anteriormente, se ha construido según un modelo que contempla únicamente los espectros vibracionales de los 3 conformeros mayoritarios, cuyas contribuciones al perfil total han sido ponderadas según sus poblaciones de Boltzmann respectivas en fase gaseosa. Como también se mencionó en la sección 2.3, las frecuencias calculadas al nivel B3LYP/cc-pVTZ fueron escaladas con un factor de escala de 0,965 [56].

A lo largo de este apartado se analizarán por separado diferentes regiones del espectro, y en base a nuestros cálculos, las bandas vibratorias observadas se informan junto con nuestra propuesta de asignación a los modos normales de la molécula.

3.4.1 Región espectral: 3500 – 2700 cm^{-1}

En las figuras 8 y 9 se muestra la comparación de los perfiles experimental (arriba) y teórico (abajo) para los espectros IR y Raman de la especie, respectivamente.

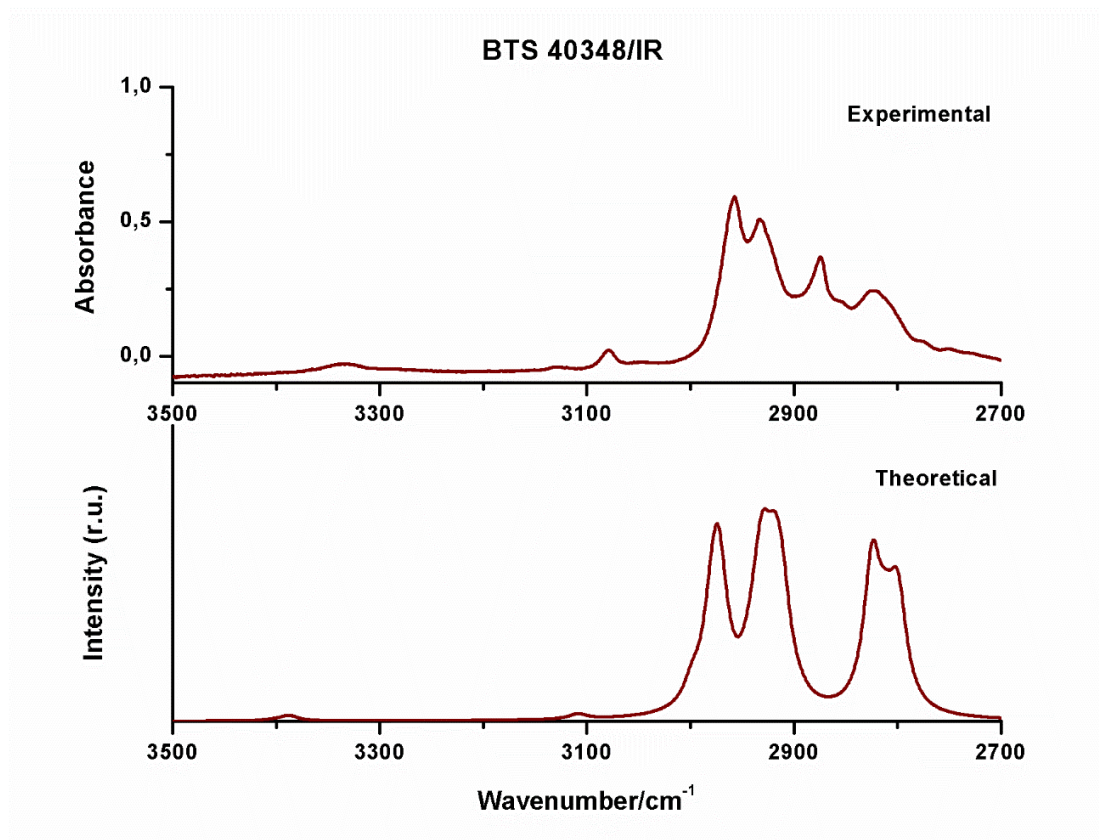


Figura 8. Comparación teórico-experimental del espectro IR en la región 3500-2700 cm⁻¹.

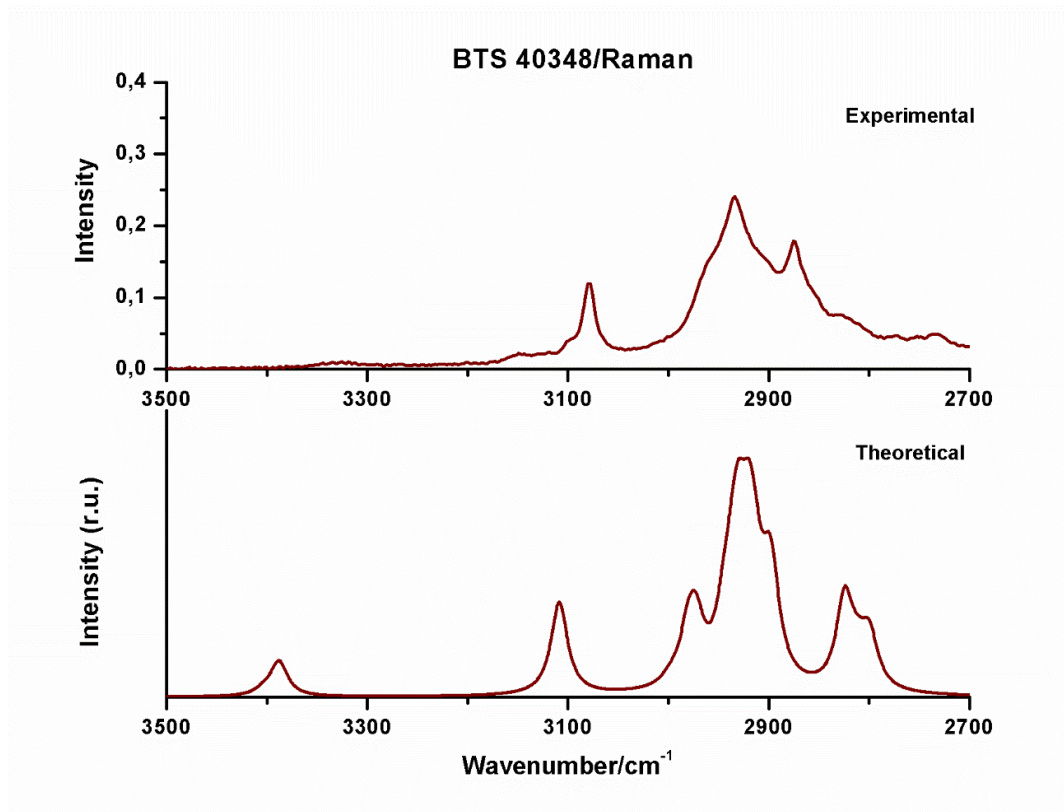


Figura 9. Comparación teórico-experimental del espectro Raman en la región 3500-2700 cm⁻¹.

De acuerdo con los valores calculados para estos modos en los tres confórmeros (tabla 5), el estiramiento del enlace N-H se ha asignado a la banda débil centrada en 3336 cm^{-1} en el infrarrojo (3330 cm^{-1} en Raman). Por su parte, la banda observable a 3078 cm^{-1} en el espectro Raman se puede asignar al estiramiento asimétrico en el plano de los 2 enlaces C-H del anillo. Finalmente, las bandas observadas en la región $3000\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ solo pueden atribuirse al estiramiento de los enlaces C-H de la cadena alquílica, de acuerdo con sus valores calculados.

Tabla 5. Frecuencias vibracionales experimentales y teóricas de BTS 40348 en la región $3500\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$.

Experimental ^a		Theoretical B3LYP / cc-pVTZ						Asignación ^{b,c}
IR	Raman	Pro1		Pro2		Pro3		
		Sin escalar	Escaladas	Sin escalar	Escaladas	Sin escalar	Escaladas	
3336 w	3330 vw	3512	3389	3509	3386	3527	3404	vNH
3079 m	3078 s	3222	3109	3222	3109	3222	3109	vCH _{anillo}
		3221	3109	3221	3109	3221	3109	
2957 vs	2955 sh	3089	2981	3107	2998	3087	2979	vCH _{cadena}
		3082	2974	3081	2973	3083	2975	
		3079	2971	3078	2971	3079	2971	
2934 vs	2933 vs	3051	2944	3043	2937	3052	2945	
		3037	2931	3037	2931	3037	2931	
-	2912 sh	3025	2919	3026	2920	3031	2925	
		3024	2918	3025	2919	3025	2919	
		3017	2911	3017	2911	3022	2917	
2874 vs	2876 vs	3004	2899	3002	2897	3017	2911	
2820 vs	2827 sh	2927	2824	2926	2824	2928	2825	
		2902	2800	2913	2811	2898	2797	

^a Abreviaciones: vs = very strong, s = strong, m = medium, w = weak, vw = very weak, sh=shoulder; ^bLa asignación vibracional se realizó después de la visualización de los modos normales calculados utilizando GaussView;

^cSímbolos griegos: ν = estiramiento

3.4.2 Región espectral: 1600 – 1100 cm^{-1}

En las figuras 10 y 11 se muestra la comparación de los perfiles experimental (arriba) y teórico para los espectros IR y Raman de la especie, respectivamente, en la región indicada.

Lo primero que cabe observarse al inspeccionar esta región es que, aún habiendo sido escalada, se puede apreciar una ligera desviación teórico-experimental en los números de onda, aunque a primera vista los perfiles muestran un parecido razonable (tabla 6).

Cabe mencionar en este punto que, aunque los cálculos teóricos se realizan bajo la “aproximación de la molécula aislada” (es decir, para la especie en fase gaseosa) se están comparando con espectros registrados para la especie en fase sólida. Esta diferencia de base puede verse reflejada en estos desplazamientos o también en la aparición de señales inesperadas en el espectro experimental.

Como ejemplo, cabe señalarse lo observado con las dos señales en los espectros experimentales a 1577 y 1571 cm^{-1} y que se asignan a un único modo normal de vibración (estiramiento C-C del anillo) de acuerdo con su valor calculado en nuestro modelo teórico. Este tipo de desdoblamiento puede estar justificado por el llamado efecto de la estructura cristalina que implicaría que en la celda unidad de la especie se encontraran varios anillos aromáticos con geometrías ligeramente distintas o sometidos a restricciones estéricas ligeramente diferentes. Estos fenómenos podrían justificar que para esa vibración se observaran dos señales ligeramente diferentes.

En la región comprendida entre 1475 y 1400 cm^{-1} se observan dos bandas anchas y de perfil complejo en los espectros IR y Raman. Estas han sido asignadas a las deformaciones de los enlaces C-H de la cadena alquílica con contribuciones de la deformación del enlace N-H y del anillo, de acuerdo con los valores calculados para los mismos.

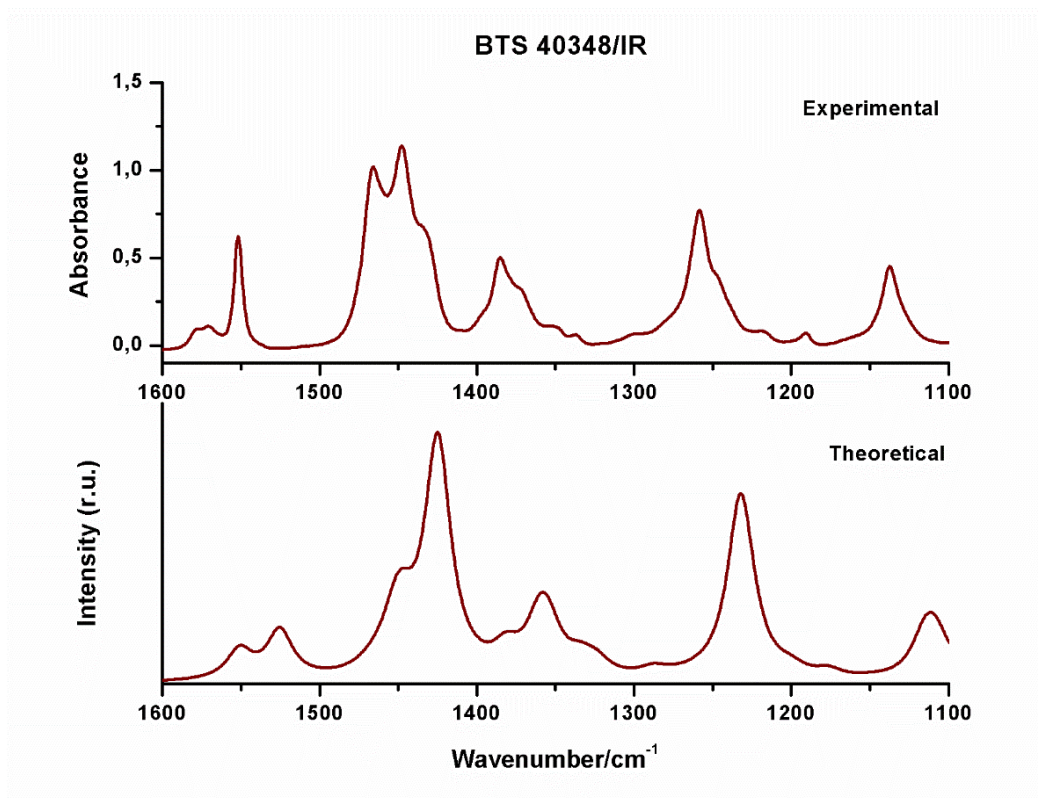


Figura 10. Comparación teórico-experimental del espectro IR en la región 1600-1100 cm⁻¹.

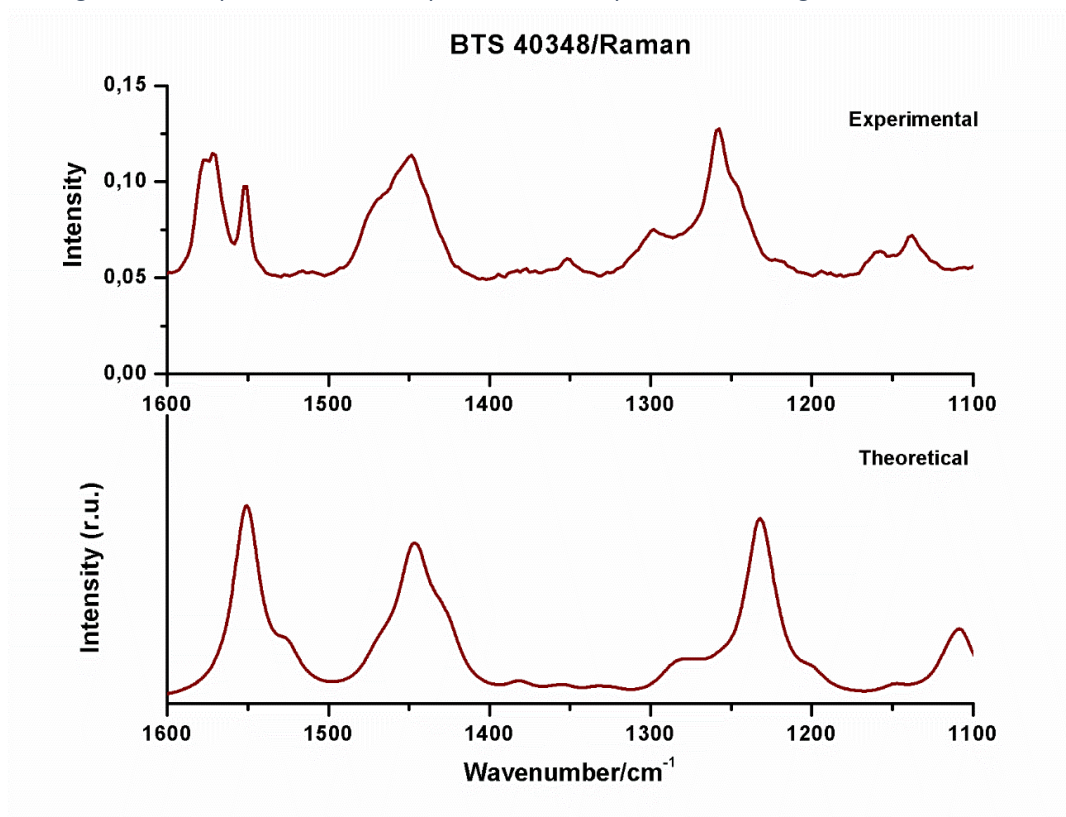


Figura 11. Comparación teórico-experimental del espectro Raman en la región 1600-1100 cm⁻¹.

Cabe destacar, también en esta zona, la presencia de una banda a 1385 cm^{-1} en el IR que no encuentra correspondencia en el espectro Raman. Esta ausencia de intensidad Raman para esta banda es confirmada por los métodos teóricos (ver figuras 10 y 11). La naturaleza del modo normal asignado a esta banda, la deformación simétrica de los grupos C-H del anillo, justificaría la ausencia de actividad Raman sirviendo este como ejemplo de la complementariedad de las dos técnicas y de la necesidad de llevar a cabo los dos registros para analizar el espectro vibracional en detalle.

Más allá, en la tabla 6 se recogen el resto de bandas observadas experimentalmente y su propuesta de asignación a los modos normales de vibración calculados, cuya descripción también se recoge. Como puede apreciarse tanto en la tabla 6 como las figuras 10 y 11, la tónica general es el buen acuerdo entre el modelo teórico y las observaciones experimentales.

Tabla 6. Frecuencias vibracionales experimentales y teóricas de BTS 40348 en la región $1600\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$.

Experimental ^a		Theoretical B3LYP / cc-pVTZ						
IR	Raman	Pro1		Pro2		Pro3		Asignación ^{b,c}
		Sin escalar	Escaladas	Sin escalar	Escaladas	Sin escalar	Escaladas	
1577 w	1577 w	1607	1551	1607	1551	1607	1551	νCC _{anillo}
1571 w	1572 w							
1552 s	1553 m	1581	1525	1581	1525	1581	1525	
1466 vs	1465 sh	1525	1472	1519	1466	1520	1467	δCH _{cadena}
1448 vs	1448 m	1508	1455	1513	1460	1516	1463	δNH + δCH _{cadena}
		1505	1452	1507	1454	1504	1452	
		1502	1450	1502	1450	1503	1450	
		1500	1448	1499	1446	1499	1446	
		1499	1447	1495	1443	1494	1442	
		1494	1441	1483	1431	1483	1431	
1437 sh	-	1476	1425	1476	1425	1476	1425	δCH _{anillo} + δCH _{cadena}
1393 sh	-	1432	1382	1430	1380	1431	1381	δCH _{cadena}
		1416	1366	1412	1362	1416	1366	

1385 s	-	1409	1360	1409	1360	1409	1360	$\delta\text{CH}_{\text{anillo}}$
1373 sh	-	1405	1356	1401	1352	1402	1353	$\delta\text{CH}_{\text{cadena}}$
1354 sh	1352 vw	1383	1334	1382	1334	1381	1333	
1337 w	-	-	-	-	-	-	-	-
1299 sh	1298 w	1335	1289	1372	1324	1371	1323	$\delta\text{NH} + \delta\text{CH}_{\text{cadena}}$
		1327	1281	1317	1271	1330	1283	
-	-	1301	1255	1306	1260	1295	1250	
1258 vs	1258 m	1283	1238	1283	1238	1283	1238	$\nu\text{CC}_{\text{anillo}}$
		1277	1232	1277	1232	1277	1232	$\delta\text{CH}_{\text{cadena}} + \nu\text{CO}$
1246 sh	1247 sh	1269	1225	1268	1224	1270	1225	$\delta\text{NH} + \delta\text{CH}_{\text{cadena}}$
1220 w	1222 vw	1246	1203	1242	1199	1241	1198	
1131 w	1197 vw	1219	1176	1219	1176	1219	1176	$\delta\text{CH}_{\text{anillo}}$
-	1157 vw	1190	1149	1191	1149	1175	1134	$\delta\text{NH} + \delta\text{CH}_{\text{cadena}}$
1137 vs	1138 w	1156	1116	1157	1117	1160	1119	$\nu\text{CN} + \delta\text{CH}_{\text{cadena}}$
		1153	1112	1147	1107	1153	1113	
		1147	1107	1136	1096	1147	1107	$\delta\text{CH}_{\text{anillo}} + \nu\text{CCl}$

^a Abreviaciones: vs = very strong, s = strong, m = medium, w = weak, vw = very weak, sh=shoulder; ^bLa asignación vibracional se realizó después de la visualización de los modos normales calculados utilizando GaussView;

^cSímbolos griegos: ν = estiramiento, δ = deformación.

3.4.3 Región espectral: 1100 – 400 cm^{-1}

En las figuras 12 y 13 se ha mostrado la comparación de los perfiles experimental (arriba) y teórico (abajo) para los espectros IR y Raman de la especie, respectivamente, en la región indicada. En la tabla 7, por su parte, se recoge el compendio de bandas observadas en los espectros IR y Raman y su propuesta de asignación a modos normales de vibración de la molécula, de acuerdo con sus valores calculados.

En la figura 13 se muestra el buen acuerdo entre el modelo teórico y el espectro Raman, destacando la reproducción del perfil complejo centrado a 850 cm^{-1} , para el cual se consigue incluso una buena reproducción de la relación de intensidades.

En contraste, el espectro IR no está aparentemente tan bien reproducido, principalmente alrededor de la región de 800 cm^{-1} . Nuevamente, observamos la aparición de dos picos IR en el espectro experimental donde los cálculos en fase gaseosa nos predicen la presencia de uno y nuevamente se trata de un modo normal relacionado con el anillo aromático, por lo que el desdoblamiento podría justificarse por el efecto cristalino. Este mismo modo normal cabe destacar que es activo en IR (la intensidad calculada es alta) y prácticamente inactivo en Raman (su intensidad calculada es muy baja), lo que justificaría su ausencia en el espectro Raman y pondría un nuevo ejemplo de la complementariedad de las dos técnicas y de la necesidad de emplearlas combinadas para hacer una interpretación completa del espectro vibracional.

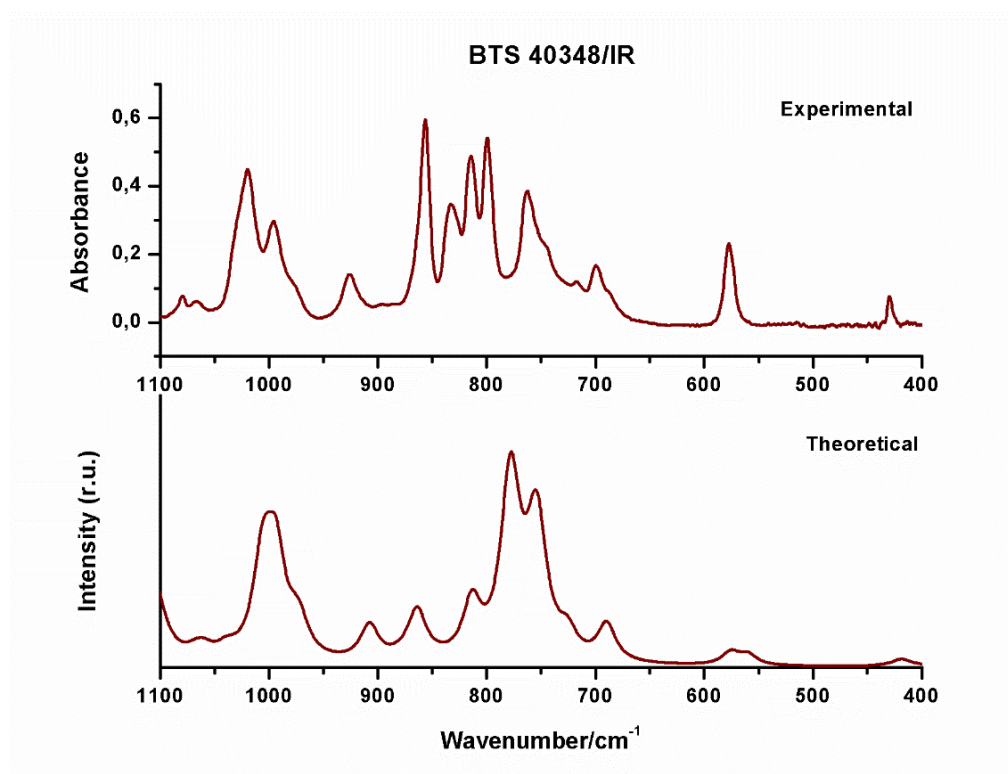


Figura 12. Comparación teórico-experimental del espectro IR en la región $1100\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

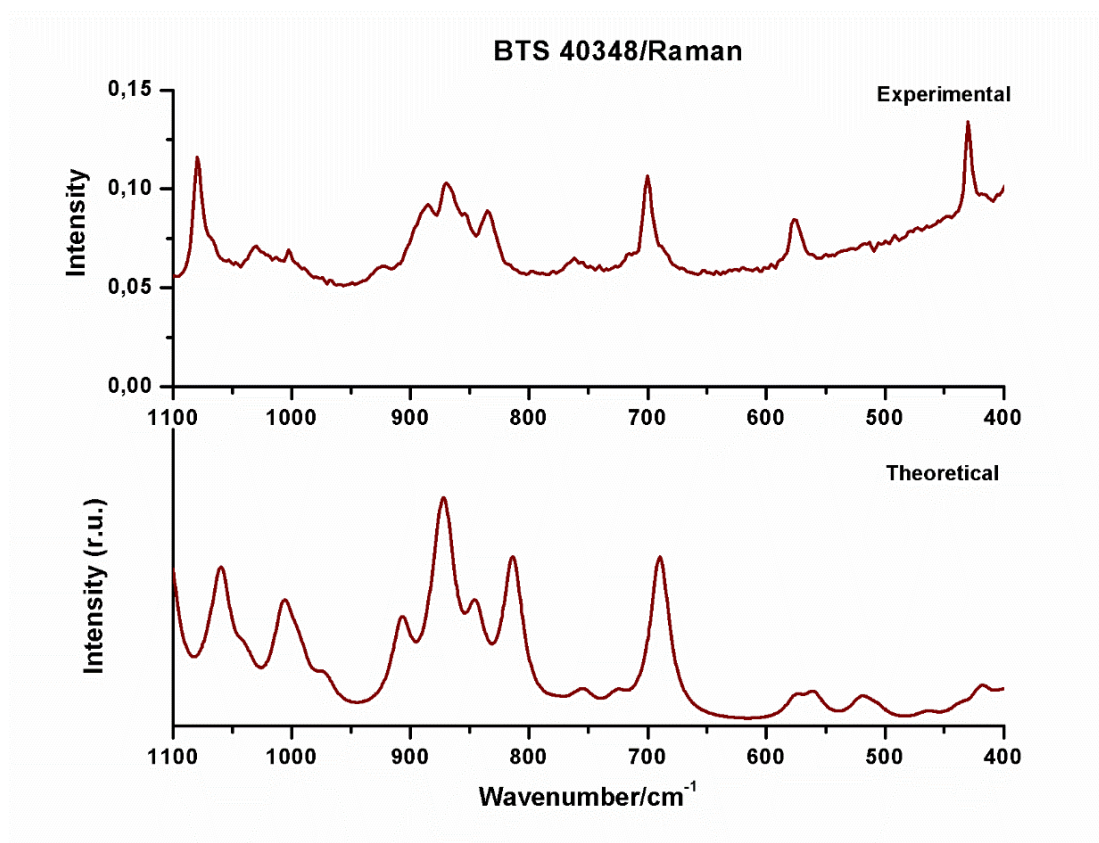


Figura 13. Comparación teórico-experimental del espectro Raman en la región 1100-400 cm^{-1} .

Tabla 7. Frecuencias vibracionales experimentales y teóricas de BTS 40348 en la región 1100-400 cm^{-1} .

Experimental ^a		Theoretical B3LYP / cc-pVTZ						
IR	Raman	Pro1		Pro2		Pro3		Asignación ^{b,c}
		Sin escalar	Escaladas	Sin escalar	Escaladas	Sin escalar	Escaladas	
1079 w	1080 m	1109	1070	1105	1066	1109	1070	$\delta\text{CH}_{\text{cadena}}$
		1098	1060	1098	1059	1098	1060	$\delta^{\text{sim}}\text{CH}_{\text{anillo}}$
1066 w	1065 sh	1078	1041	1079	1041	1073	1036	$\delta\text{CH}_{\text{cadena}} + \nu\text{CN}$
1020 vs	1030 w	1045	1008	-	-	-	-	$\delta\text{CH}_{\text{cadena}}$
996 s	1003 w	1030	993	1040	1003	1044	1008	$\delta\text{CC}_{\text{cadena}} + \nu\text{CO}$
980 sh	-	-	-	1006	971	1012	977	$\delta\text{CH}_{\text{cadena}} + \nu\text{CC}_{\text{cadena}}$
926 m	922 w	940	907	942	909	941	908	$\delta\text{NH} + \delta\text{CH}_{\text{cadena}}$
-	885 m	907	875	914	882	916	884	$\delta\text{CH}_{\text{cadena}}$
-		903	871	905	873	902	870	

-	869 w	899	868	899	868	899	868	$\delta_{\text{oop}}^{\text{asim}} \text{CH}_{\text{anillo}} + \delta \text{CH}_{\text{cadena}}$
-		899	867	-	-	-	-	
857 vs	854 sh	-	-	895	864	895	864	$\delta_{\text{oop}}^{\text{sim}} \text{CH}_{\text{anillo}}$
		895	863	875	845	877	846	
833 m	835 m	843	814	844	815	840	811	$\delta \text{CH}_{\text{cadena}} + \delta \text{CC}_{\text{anillo}}$
814 s	-	806	777	810	781	806	778	$\delta \text{NH} + \delta \text{CC}_{\text{anillo}}$
800 s	-			803	774			
763 s	761 vw	787	759	-	-	793	765	$\delta \text{NH} + \delta^{\text{oop}} \text{CC}_{\text{anillo}}$
		780	752	785	757	784	757	
718 w	715 vw	763	736	751	725	754	727	$\delta_{\text{p}} \text{CH}_{\text{cadena}}$
700 m	700 m	715	690	715	690	715	690	$\delta_{\text{oop}}^{\text{sim}} \text{CH}_{\text{anillo}} + \delta \text{CH}_{\text{cadena}}$
577 m	576 w	596	576	596	576	596	576	$\delta_{\text{oop}}^{\text{sim}} \text{CH}_{\text{anillo}}$
		580	560	580	560	580	560	$\delta \text{CO}_{\text{anillo}} + \delta \text{CCl}$
-	-	541	522	536	517	536	517	$\delta \text{CC}_{\text{cadena}}$
-	-	536	517	525	507	525	507	$\delta^{\text{oop}} \text{CC}_{\text{anillo}}$
-	-	453	437	483	467	478	462	$\delta^{\text{oop}} \text{CC}_{\text{anillo}} + \delta \text{CC}_{\text{cadena}}$
430 m	430 m	434	419	434	419	434	419	$\delta \text{CCl} + \nu \text{CCl}$

^a Abreviaciones: vs = very strong, s = strong, m = medium, w = weak, vw = very weak, sh=shoulder; ^bLa asignación vibracional se realizó después de la visualización de los modos normales calculados utilizando GaussView;

^cSímbolos griegos: ν = estiramiento, δ = deformación. Los superíndices oop, sim y asim indican fuera del plano, simétrico y asimétrico respectivamente.

3.4.4 Modos normales a baja frecuencia en Raman: 400-100 cm⁻¹

En la figura 14 se muestra la comparación de los perfiles experimental (arriba) y teórico (abajo) para el espectro Raman de la especie en la región de bajas frecuencias.

Cabe mencionar que no se dispone de información del espectro IR para esta región debido al método empleado en su registro: la pastilla de KBr. El KBr es una sustancia ampliamente empleada en espectroscopía IR como soporte para sólidos y como material en ventanas para celdas de líquidos y gases. Presenta la propiedad de ser transparente a la radiación IR en el rango de 4000-450 cm⁻¹

aproximadamente, aunque absorbe fuertemente a partir de este valor, por lo que impide la apreciación de bandas vibracionales por debajo de dicho valor. Esto hace que el uso de espectrometría Raman esté indicado especialmente para el estudio de esta región, donde suelen aparecer vibraciones muy complejas.

Como puede apreciarse en la figura 14, la reproducción teórica del perfil experimental es bastante buena, incluyendo la banda de perfil complejo centrada a aproximadamente 200 cm^{-1} .

En esta región se han asignado los modos de estiramiento y deformación de los enlaces C-Cl a las bandas centradas en 378 cm^{-1} y 189 cm^{-1} respectivamente, también de acuerdo con sus valores teóricos calculados (tabla 8). Para finalizar, la deformación asimétrica fuera del plano de los enlaces C-H del anillo se pueden atribuir a la banda presente a 216 cm^{-1} .

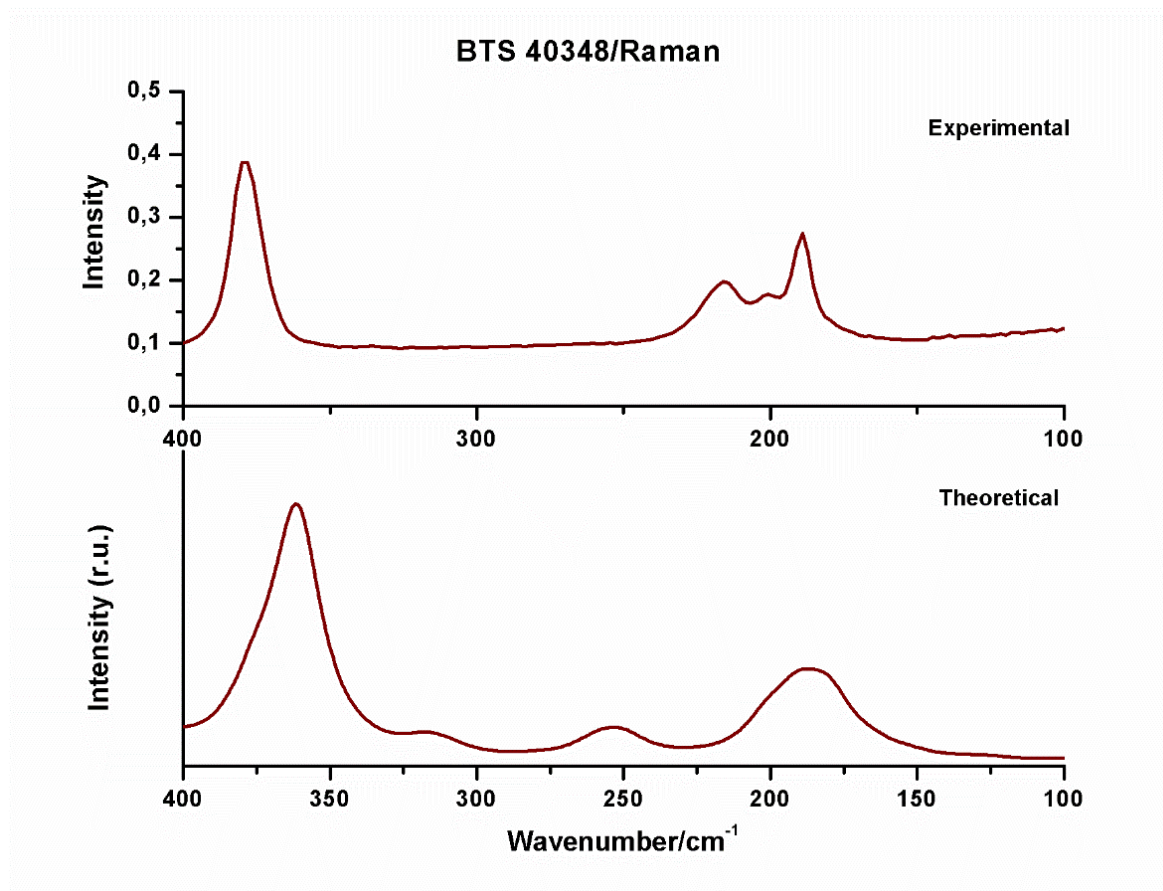


Figura 14. Comparación teórico-experimental del espectro Raman en la región $400\text{-}100\text{ cm}^{-1}$.

Tabla 8. Frecuencias vibracionales experimentales y teóricas de BTS 40348 en la región 400-100 cm⁻¹.

Experimental ^a		Theoretical B3LYP / cc-pVTZ						
IR	Raman	Pro1		Pro2		Pro3		Asignación ^{b,c}
		Sin escalar	Escaladas	Sin escalar	Escaladas	Sin escalar	Escaladas	
-	378 vs	392	378	418	403	418	404	$\delta^{\text{oop}}\text{CC}_{\text{anillo}} + \delta\text{CC}_{\text{cadena}}$
-		389	376	384	370	383	370	
-		374	361	374	361	374	361	νCCI
-	335 vw	329	317	321	310	326	315	$\delta\text{CC}_{\text{cadena}}$
-	-	290	280	291	280	292	281	$\delta\text{COC} + \delta\text{CH}_{\text{cadena}}$
-	-	260	251	267	258	272	262	$\delta\text{CH}_{\text{cadena}}$
-	-	235	227	246	237	256	247	
-	216 s	208	201	208	201	209	201	$\delta^{\text{sim}}_{\text{oop}}\text{CH}_{\text{anillo}}$
-	200 sh	197	190	198	191	199	192	$\delta\text{CCI} + \delta\text{CC}_{\text{cadena}}$
-	190 s	187	181	190	183	195	188	
-		184	178	187	180	187	180	
-	-	159	153	171	165	171	165	
-	-	138	133	157	151	139	134	$\delta\text{CC}_{\text{cadena}} + \delta\text{NH}$
-	-	129	125	130	126	129	125	Deformaciones del anillo y la cadena
-	-	107	103	98	95	118	114	
-	-	73	70	70	67	73	70	
-	-	55	53	62	59	56	54	
-	-	47	46	39	38	38	37	
-	-	24	23	23	22	26	25	
-	-	14	14	16	15	15	15	

^a Abreviaciones: vs = very strong, s = strong, m = medium, w = weak, vw = very weak, sh=shoulder; ^bLa asignación vibracional se realizó después de la visualización de los modos normales calculados utilizando GaussView;

^cSímbolos griegos: ν = estiramiento, δ = deformación. Los superíndices oop, sim indican fuera del plano y simétrico respectivamente

4 Conclusiones y acciones futuras

El estudio detallado por métodos Químico Cuánticos de la estructura molecular del metabolito de Procloraz denominado BTS 40348 permitió identificar hasta 21 conformaciones moleculares que son mínimos en la superficie de energía potencial del sistema.

El análisis de las abundancias relativas de estas especies en fase gaseosa realizado en términos de la estadística de Boltzmann mostró que los tres confórmeros mayoritarios suponían el 55% de la composición teórica de la muestra en fase gaseosa, estando los 18 restantes en porcentajes muy inferiores.

Los perfiles espectrales IR y Raman calculados teóricamente considerando únicamente las contribuciones a la intensidad total de los tres confórmeros mayoritarios (ponderadas según sus abundancias relativas), han mostrado una coincidencia más que aceptable con los espectros vibracionales de la especie registrados experimentalmente en fase sólida. Esto nos permite afirmar con seguridad, que las estructuras moleculares de los estados de mínima energía calculados teóricamente, se corresponden con aquellos estados mayoritarios presentes en nuestra muestra.

Con todo ello, se pudo llevar a cabo la asignación vibracional completa de los espectros IR y Raman de la especie, que da aún más fiabilidad al modelo teórico escogido.

A pesar de lo prometedor de los resultados del presente estudio cabe plantearse al menos dos acciones futuras para poder denominar a estos de totalmente concluyentes:

- Registrar los espectros de la especie en fase dispersada (disolución) con el fin de eliminar los posibles efectos del estado cristalino presentes en los espectros vibracionales de la especie sólida. La interpretación de los espectros en disolución permitirá una mejor aproximación a la estructura

real en entornos biológicos y además es presumible que permita distinguir la presencia de distintos conformeros más allá de los tres contemplados, lo cual podría redundar en el replanteamiento del modelo.

- Contemplar en el modelo teórico el disolvente de forma implícita repitiendo la optimización de las geometrías de los 21 conformeros y recalculando sus energías. Para este fin se consideraría el uso de los métodos PCM (polarization continuum model) que permiten llevar a cabo las simulaciones teóricas en entornos cuya constante dieléctrica se corresponda con la del disolvente empleado en el registro experimental de los espectros.

5 Referencias

- 1- FAO. *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides*. (2002).
- 2- https://www.nationalgeographic.com.es/historia/grandes-reportajes/aceite-articulo-multiusos-romanos_11568/6
- 3- Ministerio de medio ambiente y medio rural y marino. *REGLAMENTO (CEE) N° 2092/91*. (1991)
- 4- M. Arias-Estévez, E. López-Periago, E. Martínez-Carballo, J. Simal-Gándara, J.C. Mejuto, L. García-Río. *The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources*. Agriculture, Ecosystems and Environment Vol.123 (2008) 247–260.
- 5- https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Archive:Pesticide_sales_statistics&oldid=327059
- 6- Crop Life International. *Resistance management for sustainable agriculture and improve public health*. Insecticide Resistance Action Committee. (2007).
- 7- European Union. *REGULATION (EC) NO 396/2005 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL*. Official Journal of the European Union. (2005)
- 8- R.M. Hollingworth, N. Kurihara, J. Miyamoto, S. Otto, G.D. Paulson. *Detection and significance of active metabolites of agrochemicals and related xenobiotics in animals*. Pure and Applied Chemistry, Vol.67 (1995) 1487-1532.
- 9- European Food Safety Authority (EFSA). (2012). *Scientific Opinion on Evaluation of the Toxicological Relevance of Pesticide Metabolites for Dietary Risk Assessment*. EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (2012).

- 10-Laura L. Van Eerd, Robert E. Hoagland, Robert M. Zablotowicz, J. Christopher Hall. *Pesticide metabolism in plants and microorganisms*. Weed Science, Vol.51 (2003) 472–495.
- 11-Union Europea. *REGLAMENTO (CE) No 839/2008 DE LA COMISIÓN*. Diario Oficial de la Unión Europea. (2008).
- 12-R. Jayaraj, P. Megha, P. Sreedev. *Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment*. Interdisciplinary Toxicology Vol. 9 No.3–4 (2016) 90–100.
- 13-Anasac Control. *Normativa plaguicidas*. Chile.
(<http://www.anasaccontrol.cl>)
- 14-J.E. Casida. *Pyrethrum Flowers and Pyrethroid Insecticide*. *Environmental Health Perspectives*. Vol.34 (1980) 189-202.
- 15-P. Kirsh, B. Lingren. *Commercial advancement in pheromone related monitoring and control technology*. IOBC/WPRS Bulletin. Vol.16 No.10 (1993) 121 -127
- 16-EFSA. *Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance prochloraz*. EFSA Journal (2011).
- 17-United States Environmental Protection Agency (EPA). 2,4,6-Trichlorophenol. (<https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/2-4-6-trichlorophenol.pdf>)
- 18-EURL-SRM. *Determination of Prochloraz (sum) via its Metabolites*. (2016)
- 19-Philippa D. Darbre. *Endocrine Disruption and Human Health*. Elsevier. (2015).
- 20-H.Kojima, E.Katsura, S.Takeuchi, K.Niiyama, K.Kobayashi. *Screening for Estrogen and Androgen Receptor Activities in 200 Pesticides by In Vitro Reporter Gene Assays Using Chinese Hamster Ovary Cells*. *Environmental Health Perspectives*. Vol.112 No.5 (2004) 524-531.
- 21-M.B.Kjærstad, C.Taxvig, C.Nellemann, A.M.Vinggaard, H.R.Andersen. *Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as*

- pesticides and pharmaceuticals*. Reproductive Toxicology 30 (2010) 573–582.
- 22- A.M.Vinggaard, U.Hass, M.Dalgaard, H.R.Andersen, E.Bonefeld-Jørgensen, S.Christiansen, P.Laier, M.E.Poulsen. *Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action*. international journal of andrology. Vol.29 (2006) 186–192.
- 23- I.S.Weidner, H.Møller, T.K.Jensen, N.E.Skakkebæk. *Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers*. Environmental Health Perspectives Vol.106 No.12 (2016) 793-796.
- 24- A.Rosano, V.Gemelli, C.Giovannelli, G.Paciotti, A.Sabatucci, A.Spagnolo. *Fertility changes in women working in greenhouses*. Medicina del Lavoro Vol.100 No.6 (2009) 448-454.
- 25- FAO/WHO. *Pesticide residues in food 2004 - Evaluations Part I- Residues*. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR). (2004).
- 26- EFSA. *Review of the existing maximum residue levels for prochloraz according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005*. EFSA Journal (2018).
- 27- E.M.Thurmana, I.Ferrer, J.A.Zweigenbaum, J.F.García-Reyes, M.Woodman, A.R.Fernández-Alba. *Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, Vol.1082 (2005) 71–80.
- 28- B.Gilbert-López, J.F.García-Reyes, M.Mezcua, A.Molina-Díaz, A.R.Fernández-Alba. *Determination of Postharvest Fungicides in Fruit Juices by Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography Electrospray Time-of-Flight Mass Spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol.55 (2007) 10548–10556.

- 29- J.F.García-Reyes, B.Gilbert-López, A.Molina-Díaz, A.R.Fernández-Alba. *Determination of Pesticide Residues in Fruit-Based Soft Drinks*. Analytical Chemistry. Vol.80 (2008) 8966–8974.
- 30- European Commission. *COMMISSION REGULATION (EU) No 520/2011*. Official Journal of the European Union. (2011).
- 31-E. Thurmana, I. Ferrer, J.A. Zweigenbaum, J.F. García-Reyes, M.I. Woodmanb, A.R. Fernandez-Alba. *Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A. Vol.1082 (2005) 71–80.
- 32- F.Jensen. *Introduction to Computational Chemistry (second edition)*. John Wiley & Sons Ltd (2007)
- 33- C.J.Cramer. *Essentials of Computational Chemistry. Theories and Models (second edition)*. Wiley (2004)
- 34-P. Hohenberg and W. Kohn, *Inhomogeneous Electron Gas*, Phys. Rev., 136 (1964) B864-B71
- 35-W. Kohn and L. J. Sham, *Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects*, Phys. Rev., 140 (1965) A1133-A38
- 36-R. G. Parr and W. Yang, *Density-functional theory of atoms and molecules*. Oxford Univ. Press, (1989).
- 37-Ed. D. R. Salahub and M. C. Zerner. *The Challenge of d and f Electrons*. ACS, Washington, D.C. (1989).
- 38-A. D. Becke. Density-functional thermochemistry. III. *The role of exact exchange*. J. Chem. Phys., 98 (1993) 5648-52.
- 39-C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density*, Phys. Rev. B 37 (1998) 785–789.
- 40-J.P. Perdew, J.A. Chevary, S.H. Vosko, K.A. Jackson, M.R. Pederson, D.J. Singh, C. Fiolhais, *Atoms molecules, solids, and surfaces: Applications of the generalized gradient approximation for exchange and correlation*, Phys. Rev. B 46 (1992) 6671–6687.

- 41-P. Perdew, K. Burke, Y. Wang, *Generalized gradient approximation for the exchange-correlation hole of a many-electron system*, Phys. Rev. B 54 (1996) 16533.
- 42-J.F. Dobson, G. Vignale, M.P. Das, *Electronic Density Functional Theory: Recent Progress and New Directions*, Plenum, 1998.
- 43-J.L. Koenig. *Infrared and Raman Spectroscopy of Polymers*. Rapra Technology LTD. Vol.12 No.2 (2001)
- 44- P.Larkin. *Infrared and raman spectroscopy. Principles and spectral interpretation*. Elversier (2011).
- 45-Ramaiah, K, Prashanth, J., Haribabu, J., Srikanth, K.E., Venkatram Reddy, B., Karvembu, R., Laxma R.K. *Vibrational spectroscopic (FT-IR, FT-Raman), anti-inflammatory, docking and molecular characteristic studies of Ni(II) complex of 2-aminonicotinaldehyde using theoretical and experimental methods*. Journal of Molecular Structure. Vol. 1175 No 5 (2019) 769-781.
- 46- Gordon, K.C., McAdam, C.J., Moratti, S.C., Shillito, G.E., Simpson, J. *Conformational aspects of dibenzo-tetroxecin: A structural, Raman spectroscopic and computational study*. Journal of Molecular Structure. Vol.1145 No.5 (2017) 321-328.
- 47-T.A. Halgren, Merck molecular force field. I. Basis form scope, parameterization, and performance of MMFF94, J. Comput. Chem. 17 (1995). 490–519. T. A. Halgren, J. Comput. Chem. 1996, 17, 520.
- 48- T.A. Halgren, Merck molecular force field. II. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions, J. Comput. Chem. 17 (1995) 520–552.
- 49- T.A. Halgren, Merck molecular force field. III. Molecular geometries and vibrational frequencies for MMFF94, J. Comput. Chem. 17 (1995) 553–586.
- 50- T.A. Halgren, R.B. Nachbar, Merck molecular force field. IV. Conformational energies and geometries for MMFF94, J. Comput. Chem. 17 (1995) 587–615.

- 51-T.A. Halgren, Merck molecular force field. V. Extension of MMFF94 using experimental data additional computational data, and empirical rules, J. Comput. Chem. 17 (1995) 616–641.
- 52-G.A. Petersson, A. Bennett, T.G. Tensfeldt, M.A. Al-Laham, W.A. Shirley, J. Mantzaris. *A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row elements*. J. Chem. Phys. Vol.89 (1988) 2193–2218.
- 53- G.A. Petersson, M.A. Al-Laham. *A complete basis set model chemistry. II. Open-shell systems and the total energies of the first-row atoms*. J. Chem. Phys. 94 (1991) 6081–6090.
- 54- R.A.Kendall, T.H.Dunning Jr., R.J.Harrison. *Electron affinities of the first-row atoms revisited. Systematic basis sets and wave functions*. J. Chem. Phys., 96 (1992) 6796-806.
- 55-J.P.Merrick, D.Moran, L.Radom. An Evaluation of Harmonic Vibrational Frequency Scale Factors. J. Phys. Chem. A, Vol.111 No.45 (2007) 11683–11700.
- 56-NIST Computational Chemistry Comparison and Benchmark Database, NIST standard reference Database 101, release 19 april 2018 (<https://cccbdb.nist.gov/vibscalejust.asp>).