

3.3.1.3.- CÀLCULS TEÒRICS

En el cas del β -aminoàcid **11**, s'han realitzat càlculs teòrics usant el mètode DFT per tal d'establir les preferències conformacionals.[☐] A la **Figura 62** es mostren els confòrmers *cis* i *trans* així com l'estat de transició d'interconversió. La **Taula 4** mostra els valors dels angles involucrats en la formació de l'enllaç d'hidrogen en cada cas.

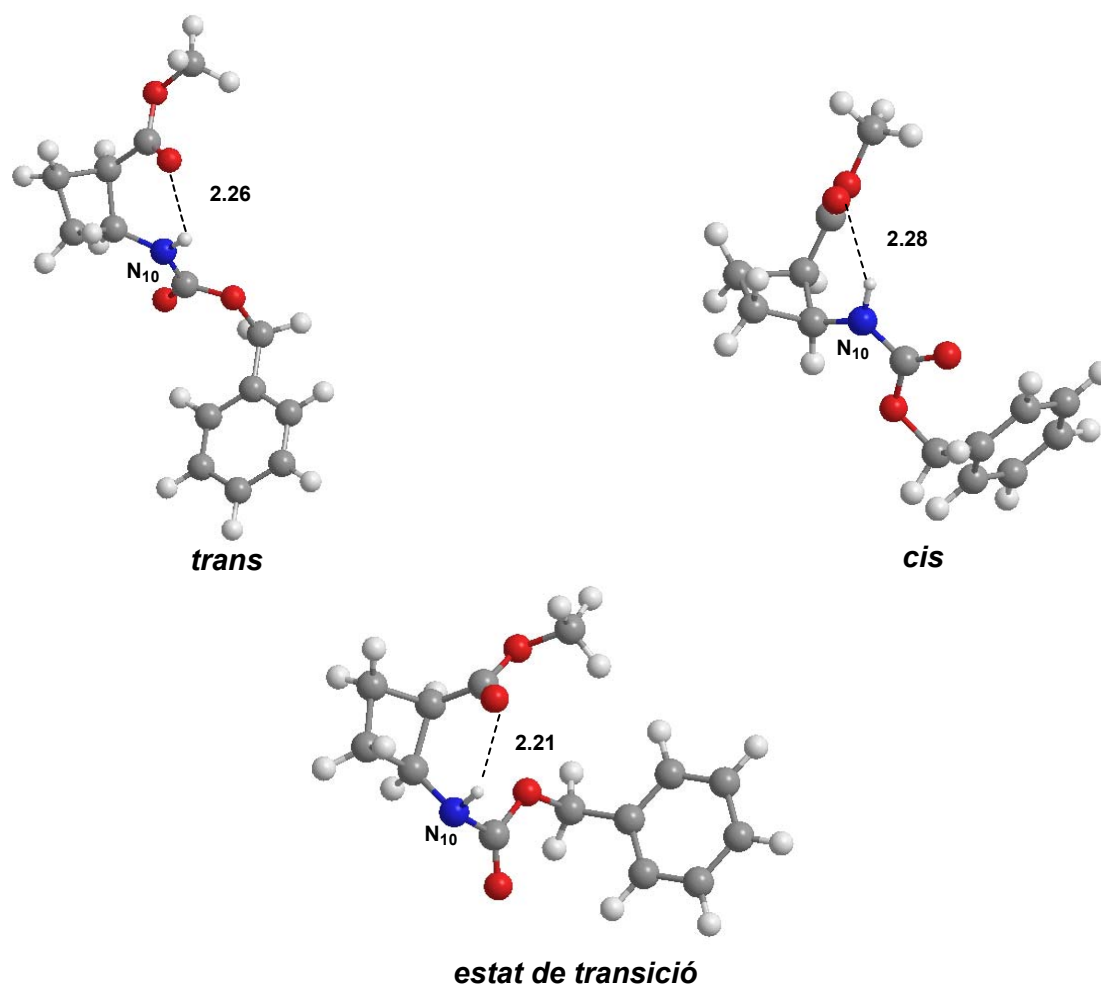


Figura 62. Estructures dels confòrmers *trans*, *cis* i de l'estat de transició d'interconversió en relació al carbamat de benzil del β -aminoàcid **11**. Hom mostra la distància interatòmica (Å) resultant per a cada confòrmer i que involucra la formació de l'enllaç d'hidrogen observat per RMN ¹H.

[☐] En l'apartat **5.- Mètode de càlcul**, trobareu el detall dels càlculs realitzats al llarg de la Tesi Doctoral.

Taula 4. Valors dels angles^a $\alpha(\text{COH})$ i $\beta(\text{NHO})$ pel monòmer **11** i els β -dipèptids bisciclobutànics.

| compost | α | β | α' ^b | β' ^b |
|---------------------------|----------|---------|------------------------|-----------------------|
| 11-trans | 98.8 | 117.8 | — | — |
| 11-cis | 116.8 | 118.6 | — | — |
| 11-estat transició | 127.8 | 127.8 | — | — |
| 21 | 97.5 | 119.9 | 100.7 | 120.7 |
| 25 | 97.8 | 120.1 | 121.8 | 121.8 |

^a en graus.

^b α' i β' indiquen els angles del segon residu ciclobutànic, respectivament.

El rotàmer *trans* és el més estable, i el gir per tal de donar lloc al rotàmer *cis* representa un ΔG de $2.3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ i un ΔG^\ddagger de $17.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ en fase gas; resultats que en solució de cloroform esdevenen 2.6 i $17.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivament. Aquests resultats estan en concordància amb el raonament fet i segons el qual suposàvem que, en solució, el confòrmer majoritari devia tractar-se del *trans* en funció del valor trobat per a la constant d'acoblament del protó amídic majoritari.

Així mateix, si ens fixem en els valors trobats per a la distància que involucra la formació de l'enllaç d'hidrogen detectat experimentalment, en totes dues estructures tenim distàncies compatibles amb la presència d'aquest enllaç, la qual cosa està d'acord amb els valors determinats experimentalment pels coeficients de temperatura, -0.76 i $-0.93 \text{ ppb}\cdot\text{K}^{-1}$ respectivament, i segons els quals en ambdues estructures s'està formant l'enllaç d'hidrogen.

També s'han calculat teòricament els valors dels desplaçaments químics pels protons amídics corresponents a l'equilibri conformacional *cis/trans*, obtenint-se uns valors de 5.8 ppm pel protó amídic del rotàmer *trans* i 5.4 ppm pel rotàmer *cis*. Aquests valors estan en excel·lent concordància amb les diferències observades experimentalment ($\delta_{trans}=5.76$ i $\delta_{cis}=5.43$) en el comportament dels desplaçaments químics d'ambdós confòrmeres.

En quant als β -dipèptids bisciclobutànics, concretament amb **21** i **25**, hom ha realitzat una sèrie de càlculs DFT per tal d'optimitzar l'estructura utilitzant el funcional B3LYP (**Figura 63**). Els angles de les estructures optimitzades es troben a la **Taula 4**.

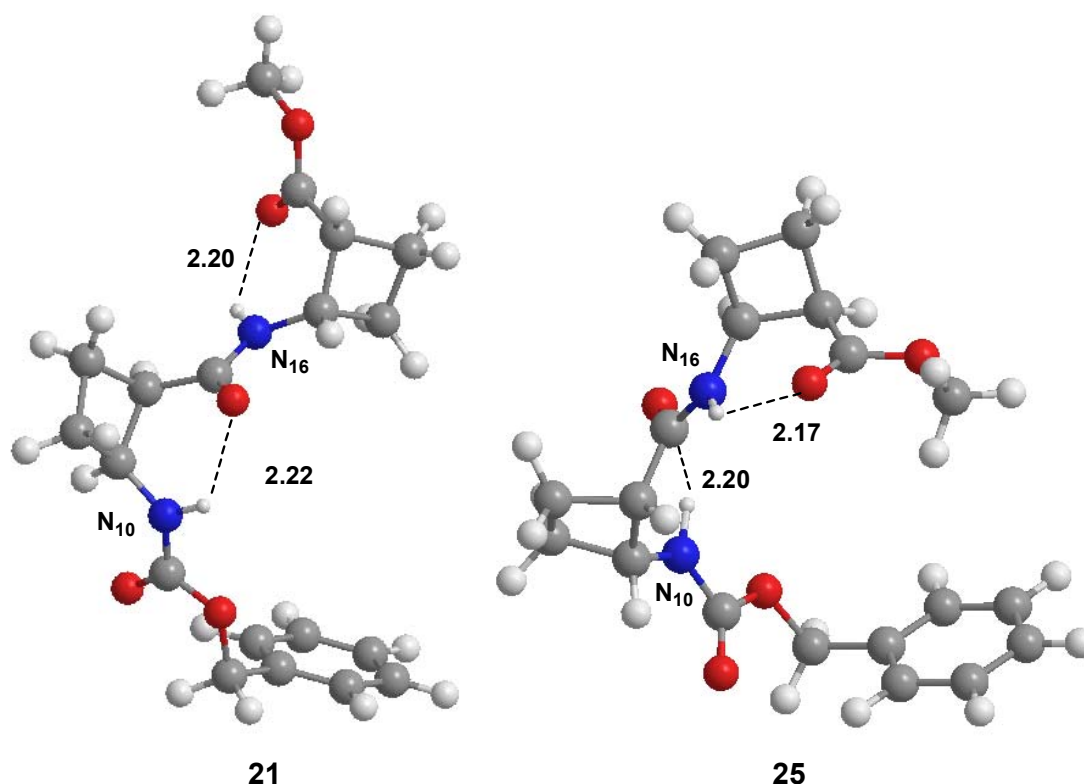


Figura 63. Estructures optimitzades pel mètode DFT dels β -dipèptids **21** i **25**; hom mostra la distància interatòmica (Å) corresponent als enllaços d'hidrogen observats experimentalment.

En comparació amb l'estructura optimitzada en el cas del monòmer **11**, podríem dir que la dimerització ha causat un escurçament en les distàncies d'enllaç d'hidrogen. Així mateix, les estructures optimitzades presenten una distància més curta per a l'enllaç d'hidrogen que involucra el protó de l'enllaç peptídic, la qual cosa està en concordància amb els valors dels coeficients de temperatura determinats per a ambdós protons amídics. De la mateixa manera, s'observa un augment en els angles α i β , amb valors més propers a 120° , la qual cosa també concorda amb una major preferència per la formació d'enllaços d'hidrogen.

3.3.1.2.- ESTUDI EN ESTAT SÒLID

A partir d'una dissolució del β -aminoàcid **12** en AcOEt / pentà, hom va aconseguir un monocristall apte per tal de recollir les dades de difracció de raigs X. L'estructura molecular de **12** així com una vista parcial de la cadena infinita formada per molècules unides per enllaços d'hidrogen es mostren en les **Figures 64 i 65**, respectivament.

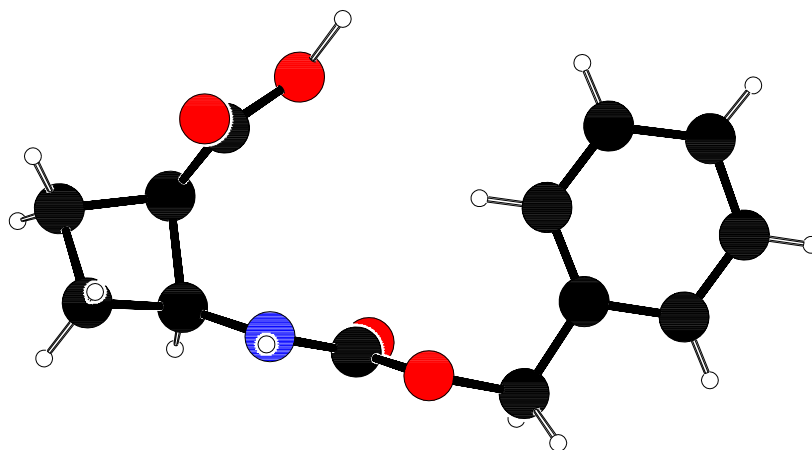


Figura 64. Estructura molecular del monòmer **12** determinada per raigs X.

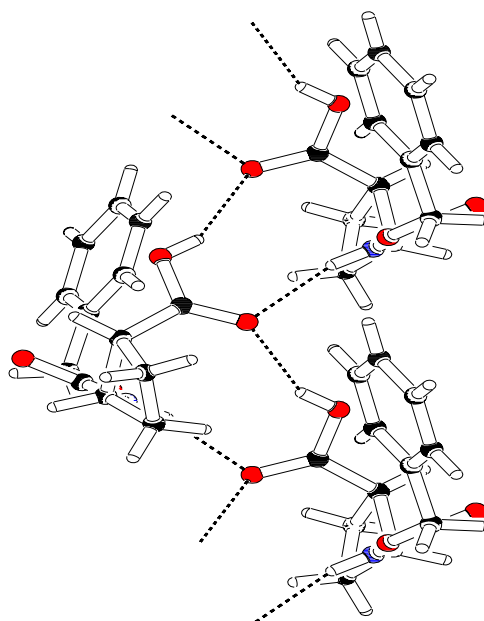


Figura 65. Vista parcial de l'empaquetament cristal·lí del monòmer **12**.

El monòmer **12** mostra una estructura en què les molècules s'uneixen mitjançant enllaços d'hidrogen intermoleculars formats pels parells $O_{16}H_{16}\cdots O_{15}$ i $N_{10}H_{10}\cdots O_{15}$, donant lloc a una infinites cadenes en la direcció del vector cristal·logràfic **a** (Taula 5). També s'aprecia que les amides de les cadenes adopten una disposició *trans*.

Taula 5. Geometries dels enllaços d'hidrogen intermoleculars que donen lloc a les infinites cadenes en l'estructura cristal·lina del monòmer **12**.^a

| | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| $N_{10}\cdots O_{15}$ ^b | $H_{10}\cdots O_{15}$ ^b | $N_{10}H_{10}O_{15}$ ^c | s |
| 2.914 | 1.911 | 163.9 | x-1/2, -y+3/2, -z+1 |
| $O_{16}\cdots O_{15}$ | $H_{16}\cdots O_{15}$ | $O_{16}H_{16}O_{15}$ | s |
| 3.012 | 2.162 | 150.2 | x+1/2, -y+3/2, -z+1 |

^a) N_{10} - H_{10} (1.030 Å), O_{16} - H_{16} (0.938 Å) i la resta dels paràmetres que involucren a NH_{10} i OH_{16} han estat normalitzats.⁹⁰ **s** és el codi de simetria de la molècula veïna.

^b) en Å.

^c) en graus.

* $d[NH_{10}\cdots OC_{15}] = 3.186$ Å.

D'aquestes observacions es desprèn que hom pot considerar que el monòmer **12** presenta una estructura en estat sòlid de tipus *agulla de cabell*, deguda bàsicament a l'orientació que fixa i dirigeix l'anell de ciclobutà, i que es manté, amb valors dels angles adequats, al llarg de la cadena del carbamat de benzil.

⁹⁰ (a) G.A. Jeffrey, L. Lewis; *Carbohydr. Res.*, **1978**, *60*, 179. (b) R. Taylor, O. Kennard; *Acta Cryst.*, **1983**, *B39*, 133.

Al igual que en cas del monòmer **12**, hom va obtenir monocristalls aptes dels β -dipèptids **21**, **22** i **25**, cristal·litzats d'AcOEt / pentà per recollir les dades de difracció de raigs X, a partir dels quals s'ha determinat tant l'estructura molecular com l'empaquetament cristal·lí. (Figures 66 i 67, respectivament)

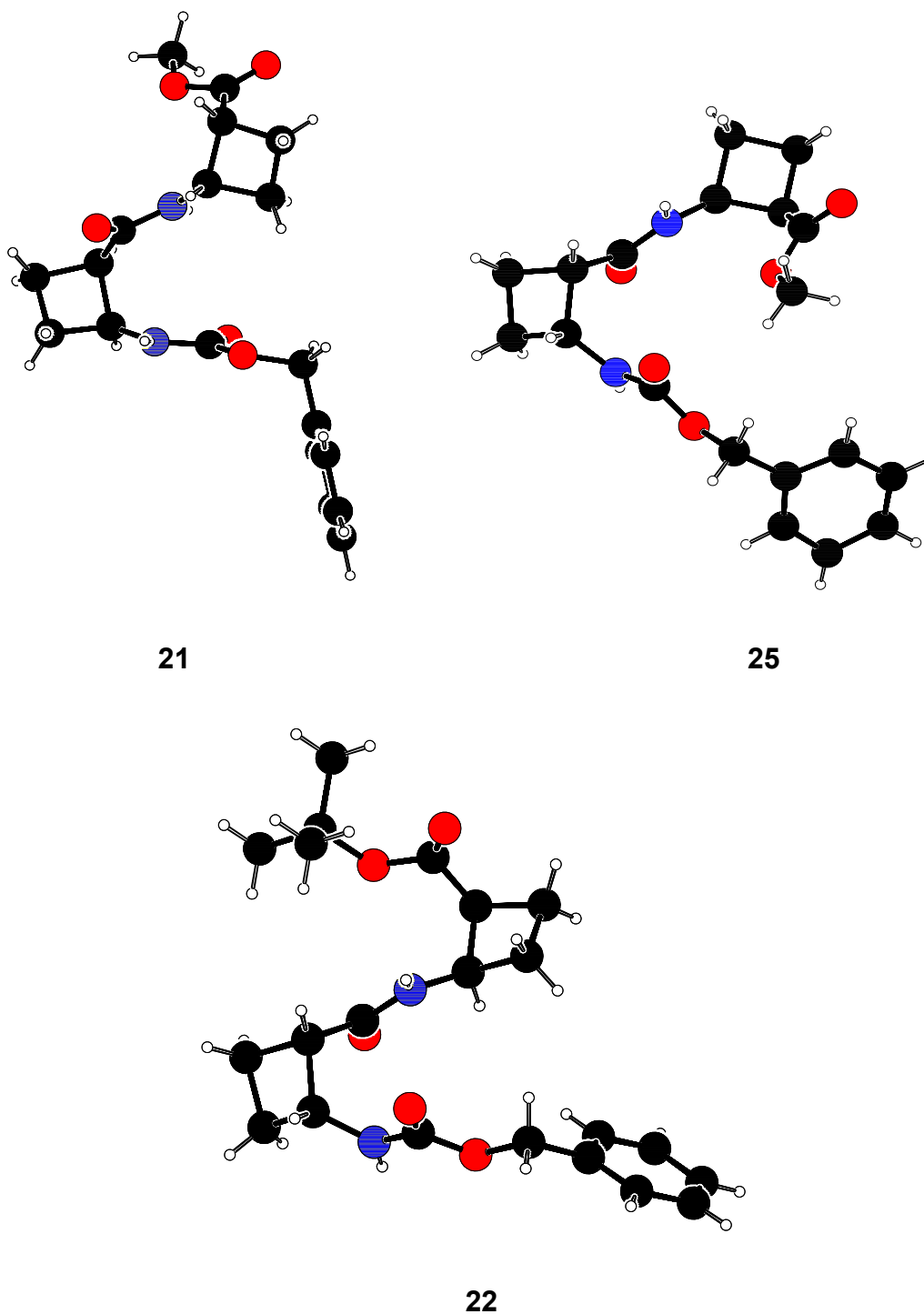


Figura 66. Estructures moleculars dels β -dipèptids, **21**, **22** i **25**, en estat sòlid.

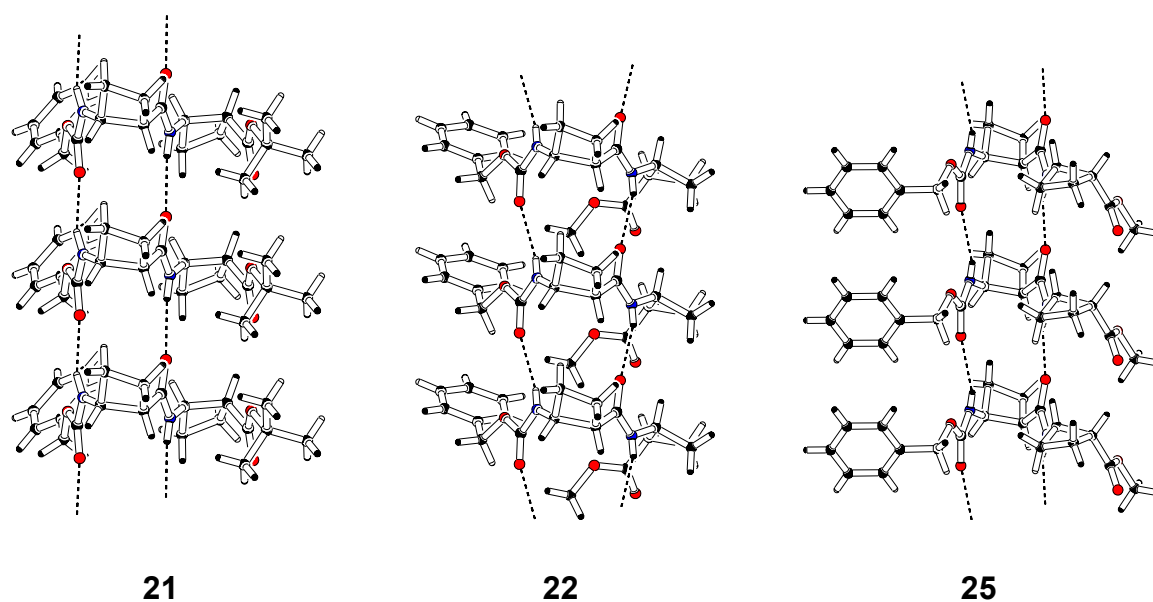


Figura 67. Vistes parcials dels β -dipèptids **21**, **22** i **25**, respectivament, en les quals s'aprecien els enllaços d'hidrogen intermoleculars formant infinites cadenes en l'empaquetament cristal·lí.

Si s'observa detingudament la **Figura 67**, podem afirmar que les estructures de tots tres β -dipèptids bisciclobutànics tenen com a tret característic comú l'existència d'infinites cadenes de molècules unides per enllaços d'hidrogen intermoleculars que involucren als grups amida (**Taula 6**). Així mateix, cada cadena conté dos jocs antiparal·lels d'enllaços d'hidrogen $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}$, en els que tots els grups amida adopten una disposició *trans*.

En aquest sentit, hom pot considerar la formació d'una estructura secundària de tipus *agulla de cabell*, en la que el segon residu d'aminoàcid ciclobutànic es col·loca en el centre de l'*agulla de cabell*, de manera oposada al primer. (**Figura 66**)

En aquesta estructura formada de tipus *agulla de cabell*, els plans de les amides són ortogonals al pla principal de l'*agulla de cabell* per tal de poder formar els enllaços d'hidrogen intermoleculars mencionats.

En quant a les principals diferències conformacionals entre els diferents β -dipèptids, aquestes estan relacionades principalment amb la disposició dels grups terminals, depenent de si es tracta d'un èster metílic, **21** i **25**, o *tert*-butílic, **22**.

Generalment, mentre el metil tendeix a col·locar-se indistintament a dins o a fora del cos de l'*agulla de cabell*, el *tert*-butil degut al seu volum es col·loca sempre a fora de l' *agulla de cabell*.

A més, s'ha observat que tant el grup fenil i el *tert*-butil, en **22**, com el fenil en **21** i **25**, presenten algun tipus de desordre estructural.

Taula 6 . Geometries dels enllaços d'hidrogen intermoleculars que donen lloc a les infinites cadenes en l'estructura cristal·lina dels β -dipèptids bisciclobutànics **21**, **22** i **25**.^a

| Compost | $N_{10}\cdots O_9^b$ | $H_{10}\cdots O_9^b$ | $N_{10}H_{10}O_9^c$ | s |
|-----------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------|
| 21 | 2.982 | 2.014 | 155.41 | x, y+1, z |
| 22 | 3.019 | 2.031 | 159.71 | x+1, y, z |
| 25 | 3.049 | 2.049 | 163.07 | x+1, y, z |
| | $N_{16}\cdots O_{15}$ | $H_{16}\cdots O_{15}$ | $N_{16}H_{16}O_{15}$ | s |
| 21 | 3.035 | 2.038 | 162.25 | x, y-1, z |
| 22 | 3.164 | 2.145 | 169.96 | x-1, y, z |
| 25 | 2.997 | 2.009 | 159.76 | x-1, y, z |

^a) N_{10} - H_{10} , N_{16} - H_{16} (1.030Å) i la resta dels paràmetres que involucren a NH_{10} i NH_{16} han estat normalitzats.⁹¹ **s** és el codi de simetria de la molècula veïna.

^b) en Å.

^c) en graus.

⁹¹ (a) G.A. Jeffrey, L. Lewis; *Carbohydr. Res.*, **1978**, *60*, 179. (b) R. Taylor, O. Kennard; *Acta Cryst.*, **1983**, *B39*, 133.

Si observem detingudament l'empaquetament cristal·lí de les estructures del monòmer **12** i dels β -dipèptids bisciclobutànics, **21**, **22** i **25**, podem afirmar que aquests compostos segueixen el mateix patró de formació d'enllaços d'hidrogen en estat sòlid.

Aquest patró, com ja s'ha indicat, es basa en infinites cadenes de molècules unides per dos jocs antiparal·lels d'enllaços d'hidrogen intermoleculars, la variant consisteix en què, en el cas dels β -dipèptids bisciclobutànics, l'amida del segon residu adopta la posició de l'àcid carboxílic del monòmer. De tal manera, canvia l'àtom acceptor del parell de l'enllaç d'hidrogen, però la posició d'on parteix aquest continua essent la mateixa.

La principal diferència entre les estructures trobades en estat sòlid i les optimitzades en fase gas consisteix en què aquestes últimes reproduïxen els dos enllaços d'hidrogen que hom detecta en solució.

3.3.1.4.- CONCLUSIONS

A la vista dels resultats, podem concloure dient que l'estudi estructural del β -aminoàcid **11** així com dels β -dipèptids bisciclobutànics **21**, **22** i **25**, indica que, en solució, s'està formant una estructura molt rígida i ben definida.

Aquesta estructura, confirmada per experiments de RMN ^1H , està basada en la formació d'enllaços d'hidrogen *intramoleculars* que donen lloc a un esquelet assimilable a *cis*-[4.2.0]octà. En el cas del monòmer **11**, l'enllaç d'hidrogen involucra el parell $\text{NH}_{10}\cdots\text{OC}_{15}$. En el cas dels β -dipèptids, els enllaços d'hidrogen involucren els parells $\text{NH}_{10}\cdots\text{OC}_{15}$ i $\text{NH}_{16}\cdots\text{OC}_{21}$. De fet, en tant que totes segueixen el mateix patró estructural, podríem considerar que l'estructura dels β -dipèptids és una prolongació de l'estructura del monòmer.

L'estructura que presenta el monòmer en solució es pot visualitzar com una làmina girada i connectada per l'enllaç d'hidrogen *intramolecular*, tal i com es mostra a la **Figura 68**.

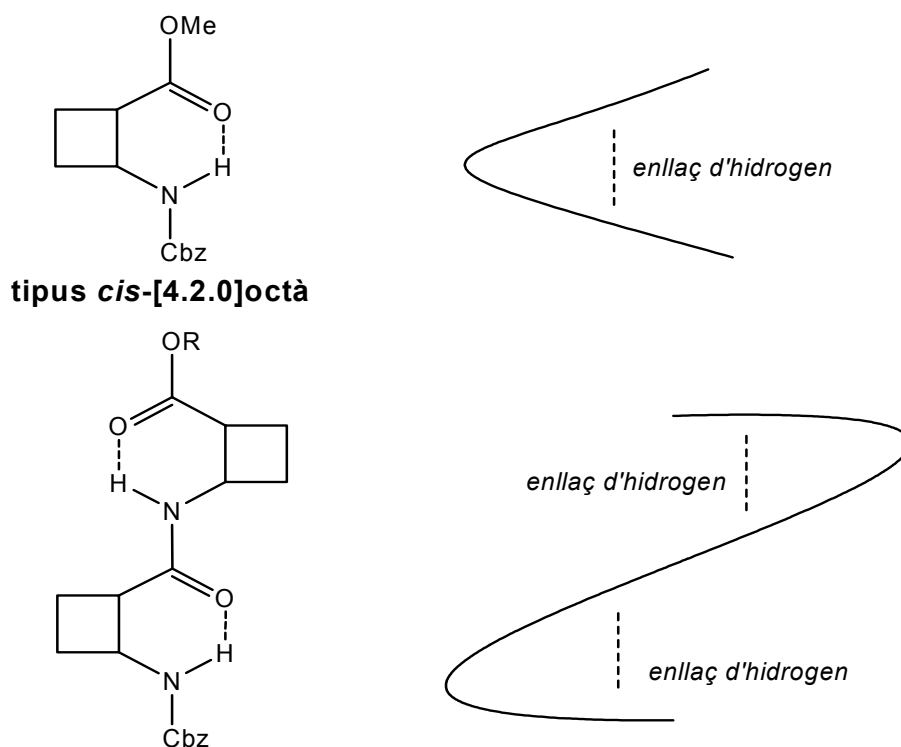


Figura 68. Estructura secundària formada en solució.

L'estructura que presenten els β -dipèptids en solució es pot visualitzar com una làmina que conté dos girs i que està connectada per enllaços d'hidrogen *intramoleculares* (**Figura 68**).

En quant a l'estructura en estat sòlid podem dir que també totes les molècules presenten el mateix tipus de patró. En aquest cas, formen una estructura caracteritzada per la presència d'enllaços d'hidrogen *intermoleculares*, que per la disposició d'ambdues cadenes del ciclobutà es pot considerar similar a un tipus *agulla de cabell*.

Així mateix, s'ha comprovat que la quiralitat dels residus acoblats no afecta a la disposició final que adopta l'estructura ni en estat sòlid ni en solució, puix en tots tres casos s'adopta el mateix plegament.

3.3.2.- ESTUDI ESTRUCTURAL DEL β -DIPÈPTID 17

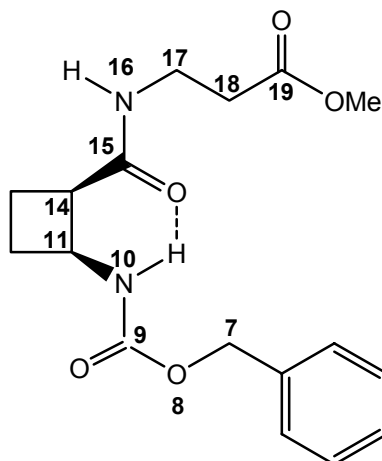


Figura 68. β -dipèptid 17

El β -dipèptid **17**, ja s'havia preparat amb anterioritat en el nostre laboratori, no obstant només s'havia realitzat l'estudi en estat sòlid (vegeu l'apartat **1.4** de la Introducció), i restava pendent tot l'estudi estructural en solució.

En un primer moment es van realitzar una sèrie d'estudis preliminars^[1] basats en la determinació de l'efecte de la dilució en un dissolvent apolar per RMN ^1H i per IR, així com experiments basats en l'addició de DMSO- d_6 a una mostra del compost en CD_2Cl_2 de concentració coneguda.

Aquests experiments, malgrat la seva utilitat demostrada en d'altres estudis, en el nostre cas no han resultat concloents i només ens han servit com a punt de partida en la realització d'un estudi estructural en solució més exhaustiu, basat fonamentalment en l'ús de la RMN ^1H en relació a la determinació dels coeficients de temperatura i la difusió.

^[1] Podeu revisar els resultats preliminars d'aquests experiments en l'**Annex 7.1**.

3.3.2.1.- ESTUDI ESTRUCTURAL EN DISSOLUCIÓ

Val a dir que l'estudi estructural en dissolució del β -dipèptid **17** s'ha portat a terme amb el seu derivat **18** per raons de disponibilitat de mostra; aquest canvi no afecta als resultats.

L'anàlisi estructural en solució del β -dipèptid **18** comença amb la completa assignació dels espectres de RMN usant tècniques en 1D i 2D, dels què els experiments més representatius es mostren a les **Figures 69 i 70**.

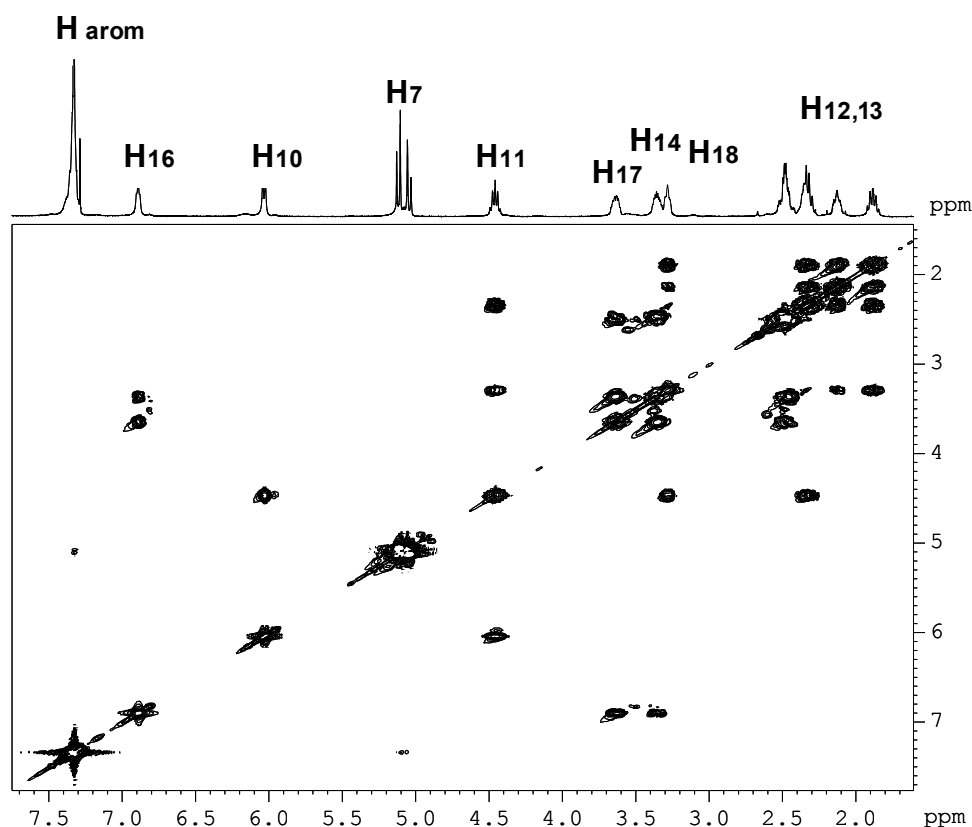


Figura 69. Espectre en 2D, ^1H - ^1H COSY del β -dipèptid **18** en CDCl_3 a 298 K.

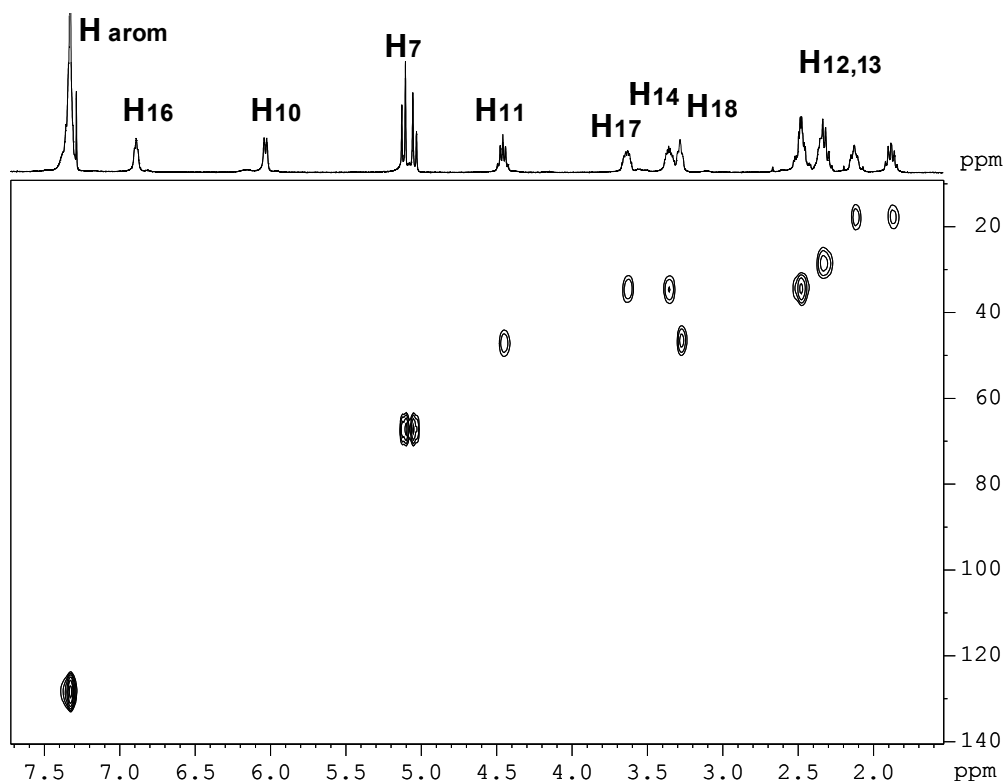


Figura 70. Espectre en 2D, ^1H - ^{13}C HSQC del β -dipèptid **18** en CDCl_3 a 298 K.

Un cop s'han assignat els espectres, hom determina el valor dels coeficients de temperatura dels protons amídics, enregistrant l'espectre de RMN ^1H a diferents temperatures, que van des dels 260 K fins els 300 K. A la **Figura 71**, hom mostra la superposició de la regió dels protons amídics a diferents temperatures. És destacable la definició amb què apareixen els senyals – molt especialment del doblet del protó del NH_{10} , i com s'insinua el triplet del protó de l'enllaç peptídic, NH_{16} – la qual cosa suggereix la formació d'una estructura relativament ordenada.

Si observem detingudament la **Figura 71**, per a cada protó amídic s'aprecia novament, al igual que en el cas del monòmer **11** i els β -dipèptids bisciclobutànics, la presència d'una conformació minoritària.

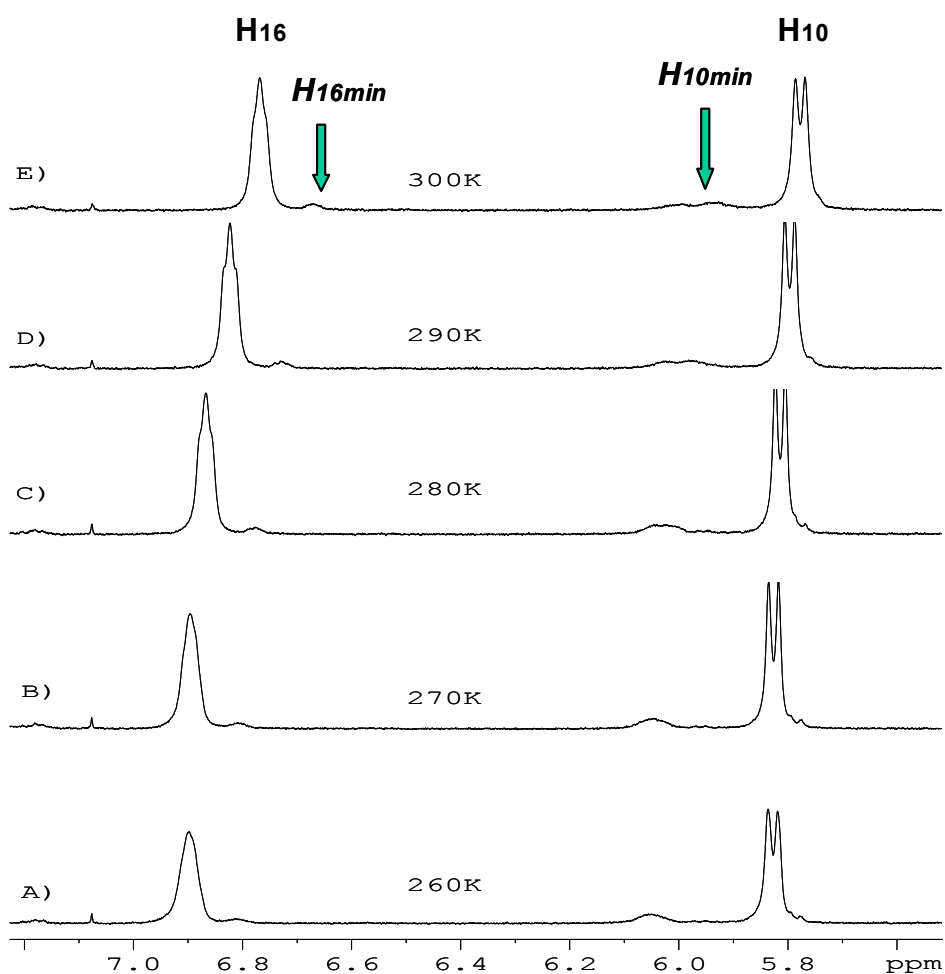


Figura 71. Superposició de la regió dels protons amídics en l'espectre de RMN ^1H en CDCl_3 del β -dipèptid **18** a diferents temperatures. **H_{min}** indica els protons amídics de la conformació minoritària

A la **Taula 7** es mostren els valors determinats pels coeficients de temperatura dels protons amídics, així com els seus valors de desplaçament químic.

Taula 7. Valors dels desplaçaments químics dels protons amídics **NH₁₀** i **NH₁₆** (en ppm) per a la conformació majoritària del β -dipèptid **18** i dels valors determinats per a cada un d'ells dels coeficients de temperatura (en ppb·K⁻¹).

| NH₁₀ | | NH₁₆ | |
|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| δ | $\Delta\delta/\Delta T$ | δ | $\Delta\delta/\Delta T$ |
| 5,77 | -1,3 | 6,74 | -3.3 |

De la revisió dels resultats que es mostren a la **Taula 7**, es desprèn que en base als valors del coeficients de temperatura, el protó **NH₁₀**, $-1.3 \text{ ppb}\cdot\text{K}^{-1}$, és més probable que estigui involucrat en la formació d'un enllaç d'hidrogen que el protó de l'enllaç peptídic, **NH₁₆**, que té un valor de coeficient de temperatura de $-3.3 \text{ ppb}\cdot\text{K}^{-1}$.

Així mateix, al igual que en el cas dels derivats estudiats anteriorment, si ens fixem en la **Figura 71**, s'aprecia l'existència d'una conformació minoritària, en relació d'aproximadament 1:10, la qual respon novament a l'equilibri rotacional *cis/trans* de l'amida **NH₁₀**. Aquests pics d'intercanvi continuen fins i tot en disminuir la temperatura i es poden apreciar més clarament en la revisió de la **Figura 72**.

La constant d'acoblament del protó **NH₁₀** en la conformació majoritària té un valor de 9 Hz, això juntament amb l'experiència que ens precedeix del monòmer **11** i dels β -dipèptids bisciclobutànics, ens permet afirmar que la conformació majoritària correspon al rotàmer *trans*.

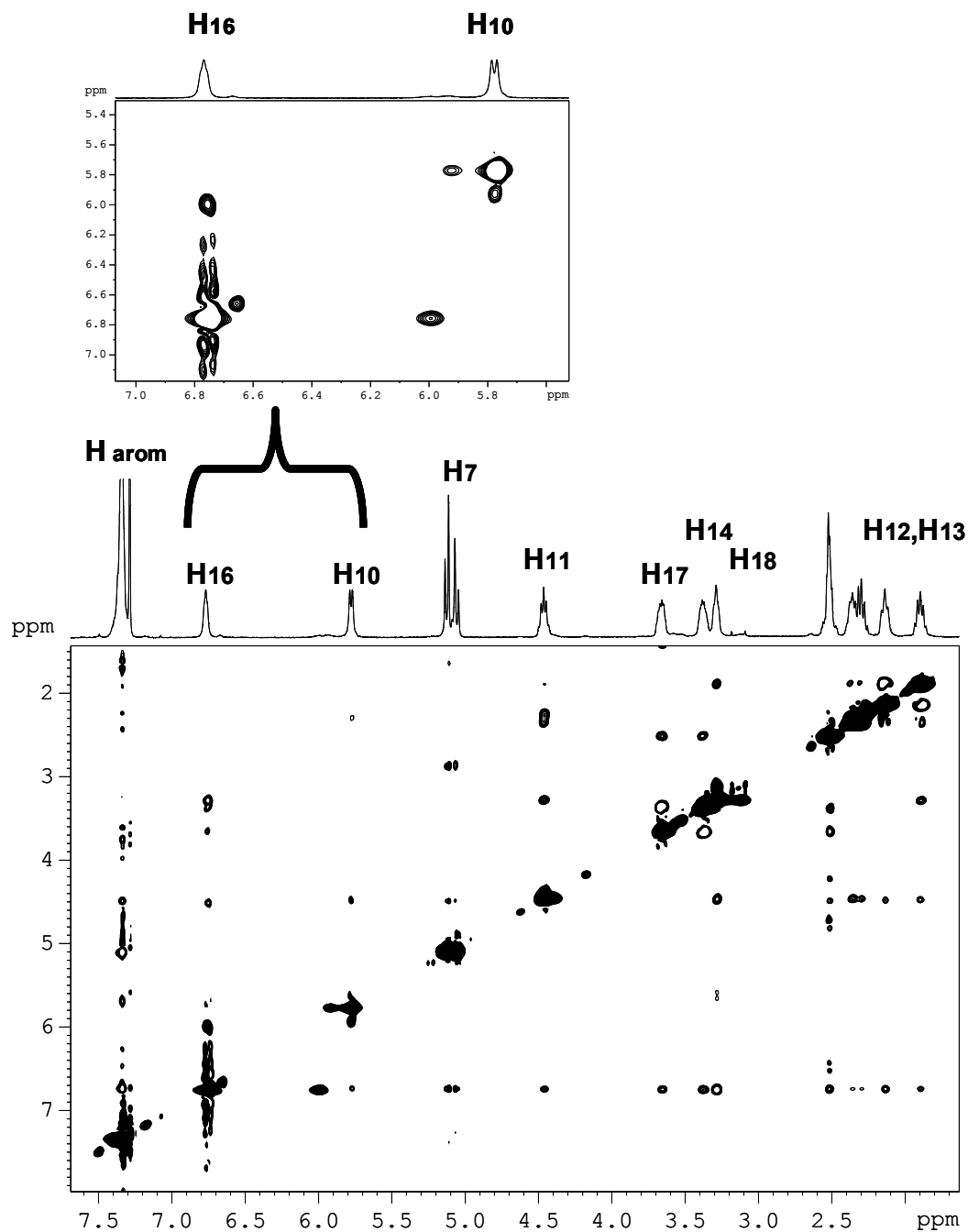


Figura 72. Espectre en 2D ^1H - ^1H NOESY del β -dipèptid **18** en CDCl_3 a 298 K. Hom pot apreciar els pics d'intercanvi entre els protons d'ambdós conformers en equilibri; així mateix, hom mostra l'ampliació de la regió dels protons amídics per visualitzar més clarament aquest intercanvi.

Amb totes aquestes dades i amb els efectes nOe's observats en l'estructura en solució i que hom esquematitza a la **Figura 73**, estem en condicions de proposar una estructura mitjana pel β -dipèptid **18**.

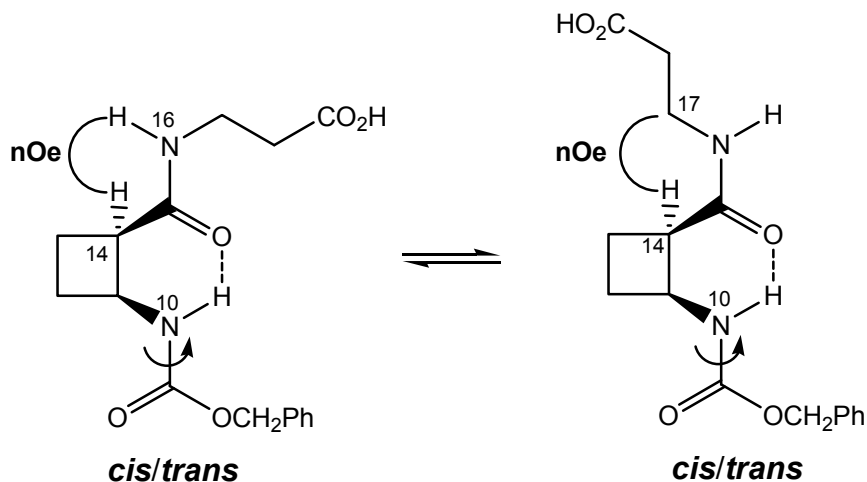


Figura 73. Estructura mitjana proposada pel β -dipèptid **18**, prenent en consideració els coeficients de temperatura i els efectes nOe observats.

D'una banda sabem que un dels protons amídics té més probabilitats d'estar formant enllaç d'hidrogen i sabem que es tracta del protó **NH₁₀** ($\Delta\delta/\Delta T = -1.3$ ppb·K⁻¹). Això concorda amb la part de l'estructura anàloga a la del monòmer **11** i als β -dipèptids bisciclobutànics **21**, **22** i **25**, i segons la qual s'estaria induint una estructura de tipus laminar amb un gir com a conseqüència de la presència del ciclobutà i connectada per un enllaç d'hidrogen.

En quant a l'equilibri *cis/trans* que dona lloc a l'aparició d'un segon confòrmer en l'espectre de RMN ¹H, i als pics d'intercanvi en l'espectre NOESY, i que involucra aquesta part de la molècula, podem dir que novament en tenim un de clarament majoritari respecte de l'altre, i que el preferent es correspon amb el rotàmer *trans*.

Un cop analitzada la part més rígida de la molècula i que, de fet, ve definida pràcticament des del monòmer ciclobutànic, ens queda la part més flexible, derivada del residu de β -alanina.

Considerant els resultats de la determinació dels coeficients de temperatura sabem que el protó **NH₁₆** ($\Delta\delta/\Delta T = -3.3 \text{ ppb}\cdot\text{K}^{-1}$) no està involucrat en la formació d'enllaç d'hidrogen, quelcom d'acord amb la flexibilitat conformacional d'aquesta part de la molècula.

Si, a més, tenim en compte que hom ha detectat la presència de nOe indistintament entre el protó **HC₁₄** i el protó de l'enllaç peptídic, **NH₁₆**, així com amb el metilè de la β -alanina, **(H₂C)₁₇**, (**Figura 73**), podem dir que aquesta part es manté en equilibri conformacional, sense cap mena d'ordenació promoguda per la formació d'una estructura secundària.

Aquest equilibri conformacional, a diferència del *cis/trans* pel grup del carbamat, és massa ràpid per poder ésser detectat en l'escala de temps de la RMN, i per tant observem els senyals mitjans.

3.3.2.2.- ESTUDI TEÒRIC DEL β -DIPÈPTID 17

Hom ha realitzat una optimització de l'estructura (**Figura 74**) mitjançant un càlcul DFT partint de les coordenades cristal·logràfiques de la molècula, per tal de comparar els seus resultats amb els trobats experimentalment, tant en estat sòlid com en dissolució.

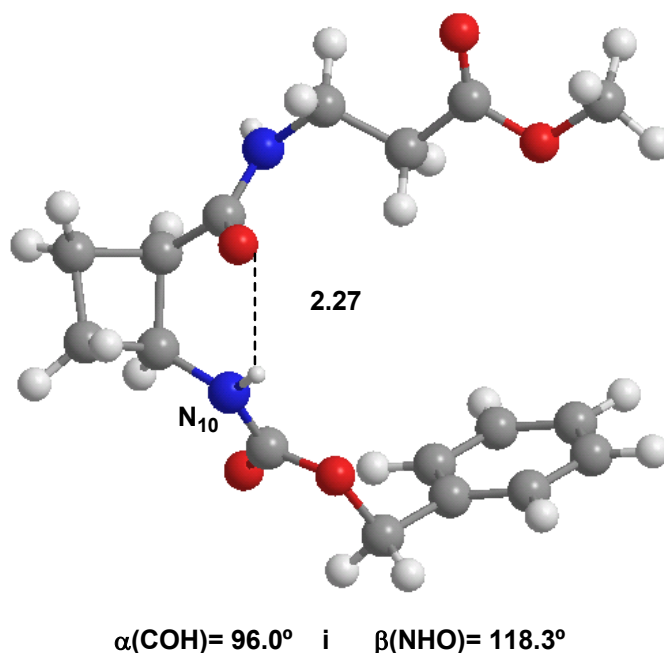


Figura 74. Estructura del β -dipèptid **17**, optimitzada utilitzant el funcional B3LYP. Hom mostra la distància interatòmica involucrada en la formació de l'enllaç d'hidrogen (Å).

L'estructura optimitzada del β -dipèptid **17**, mostra un enllaç d'hidrogen entre el parell $\text{NH}_{10} \cdots \text{OC}_{15}$, tal i com s'observa en els experiments de RMN. A més, presenta uns valors molt similars de distància interatòmica d'enllaç d'hidrogen i dels angles α i β en comparació amb l'estructura optimitzada anteriorment pel monòmer **11** (**Taula 4**).

De la mateixa manera, l'amida del carbamat presenta una disposició espacial *anti*, la qual cosa també concorda amb què, donat l'equilibri rotacional d'aquesta amida considerant les posicions que pot adoptar el carbonil, s'observi una de clarament majoritària i que aquesta correspongui a la *trans*.

La part de l'estructura corresponent al residu de β -alanina presenta una disposició estesa, que es correspon amb una de les conformacions en equilibri en solució, que presentaria nOe entre el protó amídic de l'enllaç peptídic i el seu protó veïnal del ciclobutà, **HC₁₄**.

A la vista de les concordàncies entre el càlcul DFT i els resultats experimentals podem dir que aquest ens permet explicar l'estructura adoptada per la molècula. Tot i així, cal tenir en compte que aquest mètode utilitzat no considera la llibertat conformacional del sistema i, en aquest sentit, a l'hora d'analitzar molècules més complexes serà necessari realitzar un estudi conformacional més exhaustiu, que contempli les aportacions de les diferents conformacions del sistema al total de la població.

L'estructura optimitzada en fase gas presenta l'enllaç d'hidrogen *intramolecular* detectat pels experiments de RMN. Així, com ja s'ha vist amb anterioritat en el cas del monòmer **11** i els β -dipèptids bisciclobutànics, l'estructura resultant en dissolució i en els càlculs difereix de l'observada en el monocristall, la qual es caracteritza per la presència d'enllaços d'hidrogen *intermoleculars*.

3.3.2.3.- CONCLUSIONS

En base als resultats de l'estudi estructural en solució, així com dels resultats dels càlculs, podem afirmar que el β -dipèptid **17** forma una estructura en solució que es caracteritza per la dualitat entre una part rígida que involucra la formació de l'enllaç d'hidrogen *intramolecular* entre el parell $\text{NH}_{10} \cdots \text{OC}_{15}$, i una part flexible que correspon al residu de β -alanina. (**Figura 75**)

Al igual que en el cas del monòmer **11** i dels β -dipèptids bisciclobutànics, l'estructura del β -dipèptid **17** es pot considerar una làmina girada per efecte de la presència de l'anell de ciclobutà, en què ambdues parts de la làmina estan unides per la formació d'un enllaç d'hidrogen *intramolecular*. (**Figura 75**)

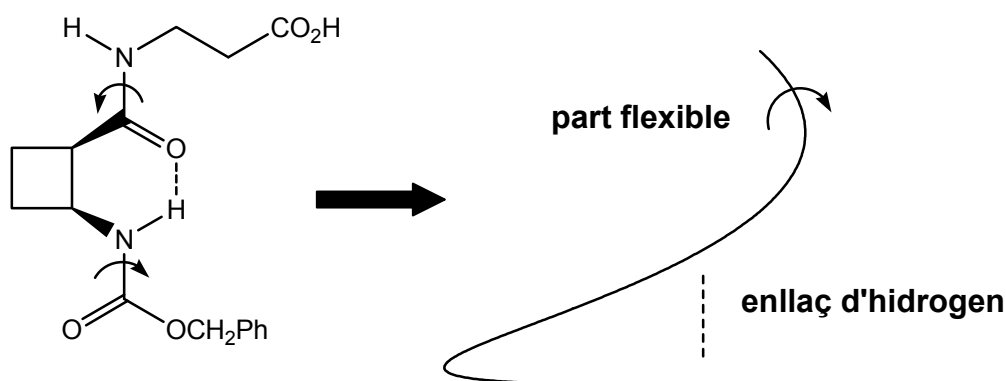


Figura 75. Visualització de l'estructura que presenta el β -dipèptid **18** en solució.

En aquest moment, hom s'ha plantejat si en augmentar la cadena peptídica continuaria aquesta dualitat rigidesa-flexibilitat de l'estructura en solució ó, si pel contrari, predominaria una d'aquestes característiques en detriment de l'altra.

Per aquest motiu s'ha realitzat el corresponent estudi estructural del β -tetrapèptid **20**.

3.3.3.- ESTUDI ESTRUCTURAL DEL β -TETRAPÈPTID 20

En el cas del β -tetrapèptid **20**, a diferència de la resta de derivats estudiats amb anterioritat, malgrat èsser un sòlid no s'ha obtingut un cristall apte per a la difracció de raigs X.

3.3.3.1.- ESTUDI ESTRUCTURAL EN DISSOLUCIÓ

La **Figura 76** mostra la numeració utilitzada pels àtoms.

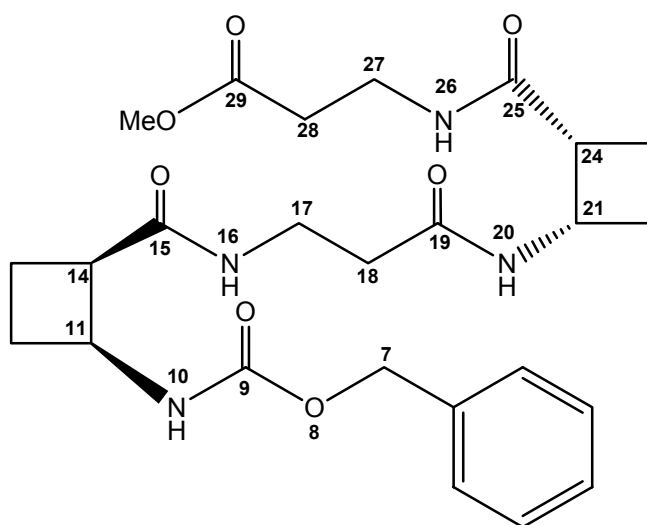


Figura 76. β -tetrapèptid **20**.

Com ja és habitual, i encara amb més raó tractant-se d'una molècula complexa, hom comença l'estudi estructural en solució assignant totalment la molècula, com ja s'ha fet amb anterioritat, en 1D i en 2D.

Els espectres més representatius per portar a terme l'assignació es mostren a les **Figures 77 i 79**.

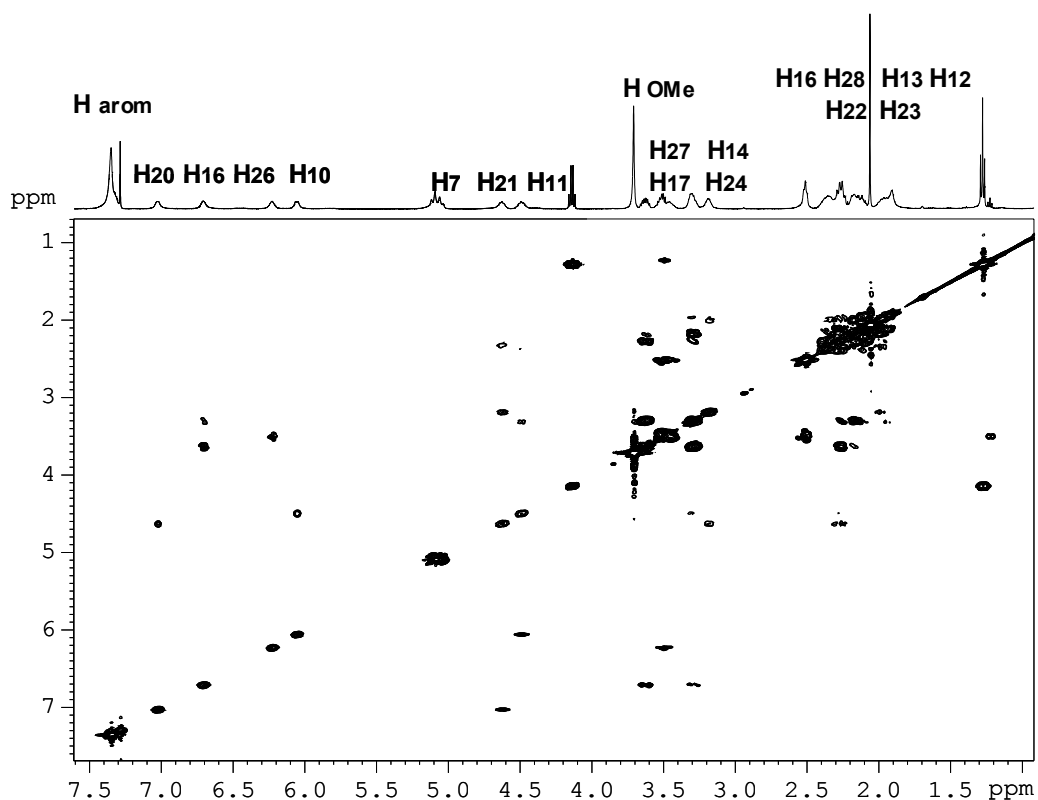


Figura 77. Espectre en 2D ^1H - ^{13}C HSQC en CDCl_3 del β -tetrapèptid **20** a 298 K.

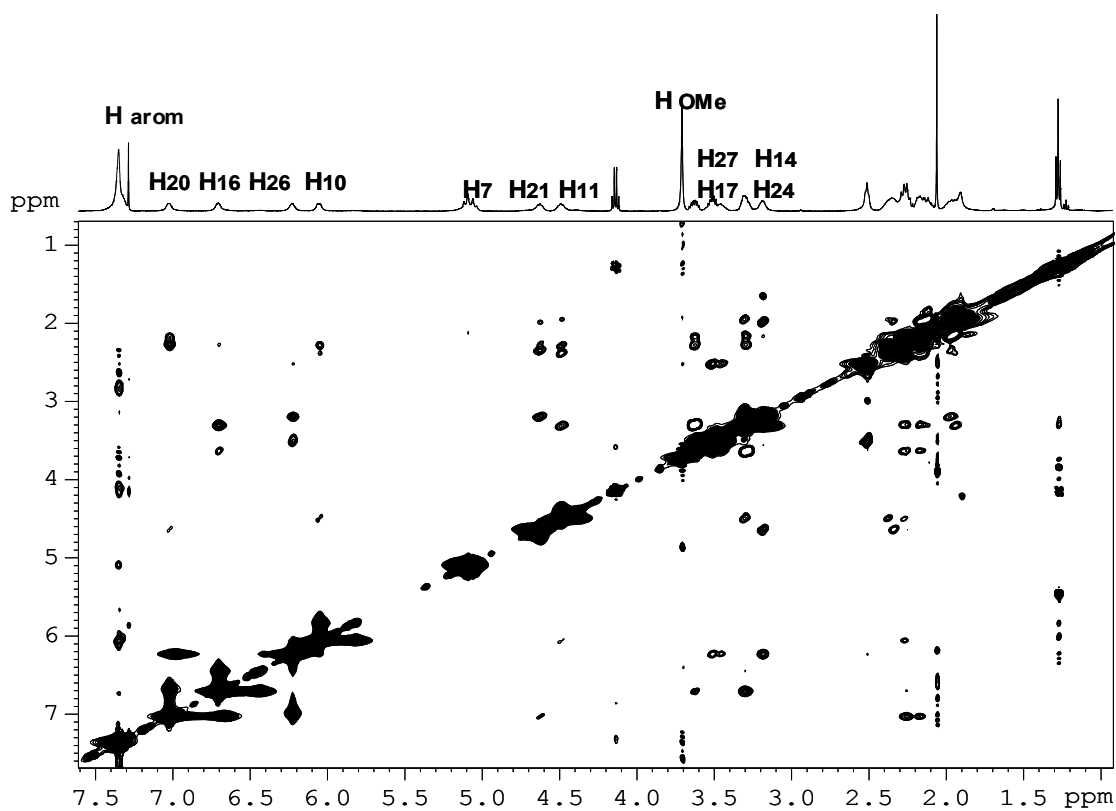


Figura 78. Espectre en 2D ^1H - ^1H NOESY en CDCl_3 del β -tetrapèptid **20** a 298 K. Els pics apareixen molt marcats a conseqüència de l'existència de processos d'intercanvi químic.

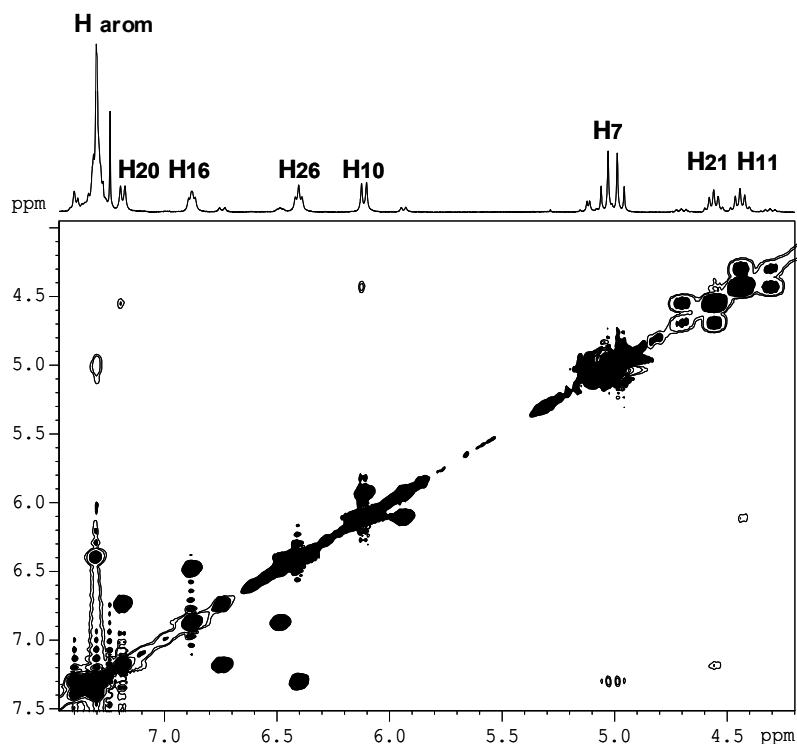


Figura 79. Ampliació de la regió de l'espectre en 2D ^1H - ^1H NOESY en CDCl_3 del β -tetrapèptid **20** a 260 K. S'observa com fins i tot baixant la temperatura, roman l'intercanvi entre els protons amídics de la conformació majoritària i minoritària.

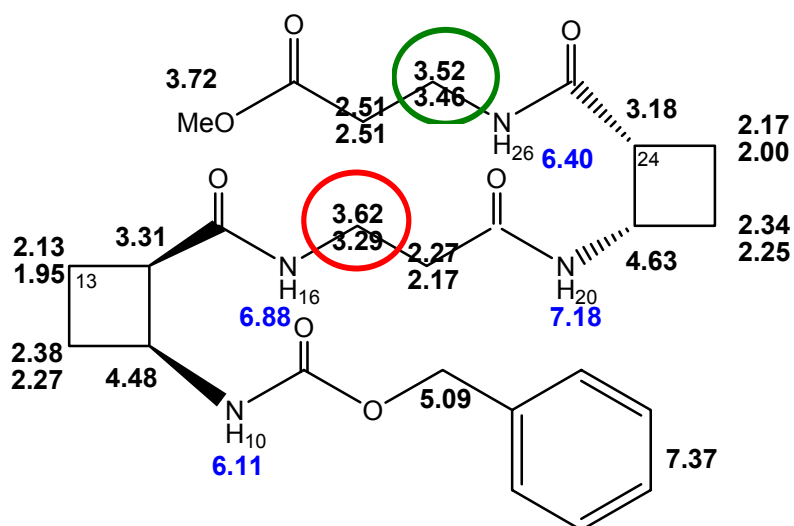


Figura 80. Representació esquemàtica de l'assignació dels protons (ppm) del compost **20** en CDCl_3 a 298 K. En blau s'indiquen els protons amídics. Els valors enmarcats en vermell pretenen destacar l'elevada diastereotopia d'aquests protons metilènics a diferència dels enmarcats en verd.

Al igual que en els derivats estudiats anteriorment, experimentalment es detecta l'equilibri conformacional *cis/trans* de l'amida del carbamat de benzil. (**Figura 77-79**) En aquest cas les proporcions són d'aproximadament 95 :5, essent de nou, molt probablement, la clarament predominant aquella que correspon al rotàmer *trans*. Si s'observa detingudament la **Figura 78** es pot apreciar el procés d'intercanvi químic. Aquest equilibri roman fins i tot baixant la temperatura, tal i com es mostra en l'ampliació de l'espectre de la **Figura 79**.

Un cop tenim l'espectre assignat, i havent fet aquestes puntualitzacions, estem en condicions de determinar els coeficients de temperatura pels quatre protons amídics presents a la molècula. (**Figura 81**) En aquest cas ens hem centrat en un rang de temperatures que va des dels 273 K fins els 308 K.

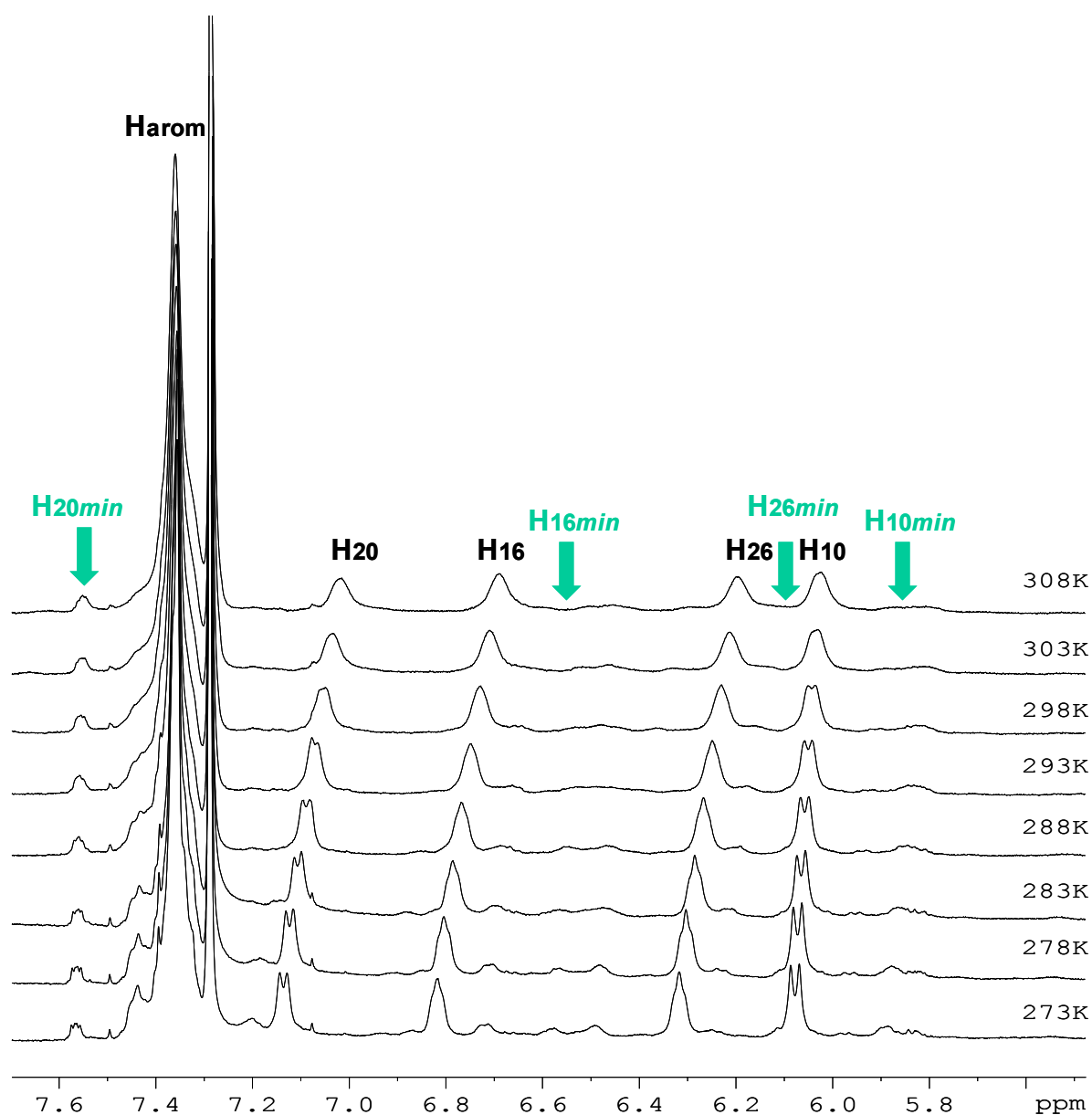


Figura 81. Superposició de la regió de l'espectre de RMN ^1H en CDCl_3 on apareixen els protons amídics del compost **20** a diferents temperatures.

En la **Taula 8**, hom mostra els desplaçaments químics, constants d'acoblament, els valors dels coeficients de temperatura així com els nOe's més importants relacionats amb els protons amídics.

Taula 8. Valors dels desplaçaments químics, coeficients de temperatura, constants d'acoblament i nOe's més importants per a la conformació majoritària del β -tetrapèptid **20**.

| NH ^a | δ^b | $\Delta\delta/\Delta T^c$ | J^d | nOe ^e |
|-----------------|------------|---------------------------|-------|---|
| H ₁₀ | 6.11 | -2.2 | 9.0 | H _{13a} (w), H _{12a} (s), H _{12b} (m) |
| H ₁₆ | 6.88 | -3.7 | 6.0 | H _{18a,18b} (m), H _{17a,17b} (s), H _{14b} (s) |
| H ₂₀ | 7.18 | -3.5 | 8.2 | H _{22b} (s), H ₂₁ (m), H _{18b} (s), H _{17a,17b} (w) |
| H ₂₆ | 6.40 | -3.4 | 6.0 | H ₂₈ (m), H _{27a,27b} (s), H ₂₄ (s) |

^{a)} vegeu la **Figura 76** per a la numeració dels àtoms.

^{b)} valors en CDCl₃ a 260 K (ppm).

^{c)} valors en CDCl₃ (ppb·K⁻¹).

^{d)} en Hz.

^{e)} on w: feble; m: mitjà; s: fort.

D'una banda, a la vista dels valors dels coeficients de temperatura, el protó **NH₁₀** és el que està més fixat, o altrament dit és més probable que estigui formant un enllaç d'hidrogen en solució que la resta de protons amídics

D'altra banda, observant la **Figura 80** on s'esquematitza l'assignació dels protons de la molècula, els protons metilènics de (**H_{2C}**)₁₇ i (**H_{2C}**)₁₈ corresponents al residu de β -alanina presenten valors molt diferents de desplaçaments químics, aquesta elevada diastereotopia no s'observa, en canvi, en els protons metilènics de (**H_{2C}**)₂₇ i (**H_{2C}**)₂₈ corresponents al segon residu de β -alanina. Això ens està indicant que la part central de la molècula, que queda entre ambdós residus de ciclobutà, és rígida mentre que la part corresponent al segon residu de β -alanina és més flexible.

Aquesta rigidesa de la part central de la molècula concorda amb el fet de tenir una estructura ordenada en solució, promoguda per la formació d'un enllaç d'hidrogen que implica el protó amídic **NH₁₀**.

Així mateix, el valor de les constants d'acoblament de 9 Hz, així com l'absència de nOe entre els protons amídics del ciclobutà, **NH₁₀** i **NH₂₀**, i els seus corresponents protons veïnals de l'anell, **HC₁₄** i **HC₂₁**, està d'acord amb una disposició *anti* de les amides, la qual cosa reafirma la nostra suposició que el confòrmer majoritari és el *trans*.

Així doncs, d'aquesta anàlisi podem concloure que tenim una estructura amb una part central de la molècula rígida i una part terminal més flexible. Molt probablement el protó **NH₁₀** està involucrat en la formació d'un enllaç d'hidrogen. La resta de protons amídics tenen uns valors de coeficients de temperatura en un rang en què no estem en condicions d'afirmar res; per tal d'obtenir més informació s'han realitzat experiments de difusió.

Els experiments de difusió es basen en què, en solució *aquosa*, l'intercanvi dels protons amídics d'un pèptid experimenta dos tipus de medis o entorns; d'una banda tenim la interacció amb la resta del pèptid amb un coeficient de difusió relativament lent i, d'altra banda, tenim l'intercanvi amb l'aigua del dissolvent amb un coeficient de difusió més ràpid. Malgrat que, per a l'escala de temps dels desplaçaments químics en RMN aquest és un intercanvi lent, la dependència de la intensitat del pic d'NH amb el gradient del camp magnètic emprat per mesurar els coeficients de difusió és un reflex dels períodes relatius de temps utilitzats en ambdós entorns i això ens permet determinar l'accessibilitat relativa dels protons envers el dissolvent.

Per tant, tenir una noció de les velocitats relatives d'intercanvi dels protons làbils d'un pèptid també és d'extremada importància des del moment en què ens proporciona informació sobre l'estructura secundària del mateix. Des d'aquest punt de vista l'espectroscopia de RMN ¹H, mitjançant els experiments PFSGSE (Pulse Field Gradient Spin-Echo en 1D), és una eina important per comprovar les cinètiques d'intercanvi en equilibri tèrmic, permetent-nos

determinar les velocitats relatives d'intercanvi dels protons amídics amb l'aigua del dissolvent en funció de com decauen en el temps.^{92,93,94}

Com més intercanvi, més ràpid decauen, donant senyals amples. Això indica que estan lliures per intercanviar-se amb el dissolvent puix no estan involucrats en la formació d'enllaç d'hidrogen. En canvi, si l'intercanvi és mínim i observem senyals estrets, això significarà que el protó no es pot intercanviar amb el dissolvent perquè està fixat formant un enllaç d'hidrogen.

D'alguna manera, la determinació del coeficients de temperatura i la mesura de la difusió són dos tipus d'experiments complementaris donat que un valor baix de coeficient de temperatura voldrà dir que el protó amídric en qüestió molt probablement està formant un enllaç d'hidrogen. Així, és lògic que estigui poc accessible a l'aigua del dissolvent i que pràcticament no tingui lloc intercanvi; per tant, observarem un temps de difusió molt lent. Altrament, si es tracta d'un protó amb un coeficient de temperatura més elevat com que no està formant part d'un enllaç d'hidrogen és lògic que estigui més accessible a l'aigua del dissolvent, que hi hagi un intercanvi i un temps de difusió més ràpids i que, per tant, els protons amídics donin senyals més amples de decaïment ràpid.

En el nostre cas, es van realitzar una sèrie d'experiments, enregistrant l'espectre de RMN ^1H en CDCl_3 a 298 K a un temps de difusió d'1ns, amb una duració de gradient d'1ms i diferents percentatges de força de gradient que van des del 5% fins el 20%. Aquests experiments van confirmar les nostres suposicions (**Figura 82**). Tots els protons amídics, a excepció del protó NH_{10} decauen ràpidament. Fins i tot, si s'observen acuradament els espectres es pot comprovar que el protó NH_{10} té un decaïment similar al dels protons no intercanviables, com ara els del grup fenil ($\delta=7.3-7.4$ ppm) i els $(\text{H}_2\text{C})_7$ ($\delta=4.9-5.2$ ppm).

⁹² E.J. Cabrita, S. Berger, P. Bräuer, *J. Magn. Reson.*, **2002**, 157, 124.

⁹³ E.J. Cabrita, S. Berger, *Magn. Reson. Chem.*, **2002**, 40, S122.

⁹⁴ M. Liu, H.C. Toms, G.E. Hawkes, J.K. Nicholson, J.C. Lindon, *J. Biomol. NMR*, **1999**, 13, 25.

Aquests resultats ens permeten afirmar que el protó NH_{10} , corresponent al grup carbamat, està involucrat en la formació d'un enllaç d'hidrogen.

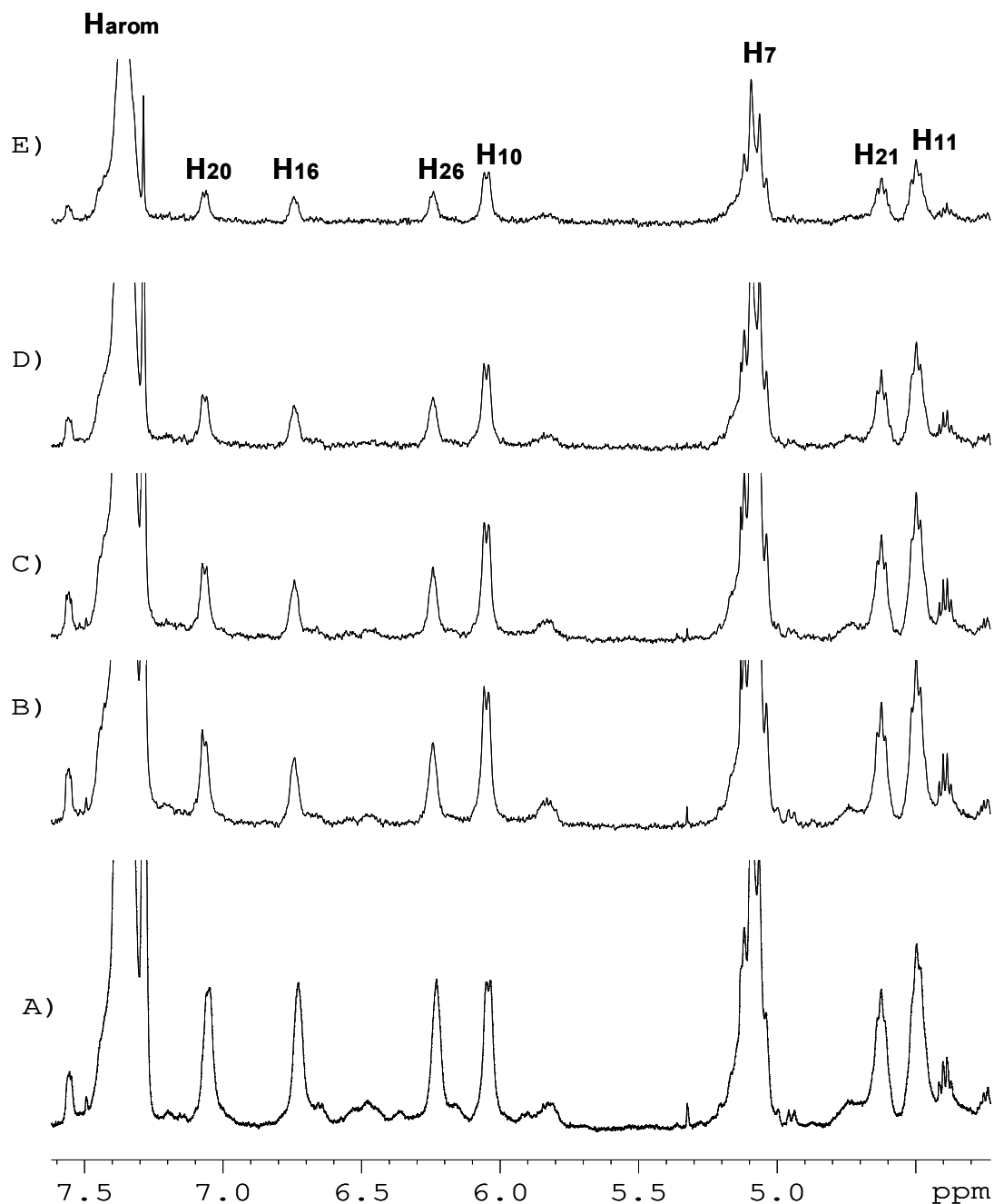


Figura 82. Estudis d'autodifusió en CDCl_3 a 298 K. A) Espectre convencional de RMN ^1H a 298 K, on s'observen clarament els quatre senyals dels protons amídics. B)-E) Espectres de difusió BPLED en 1D enregistrats amb temps de difusió d'1s, amb una duració del gradient d'1ms, i amb una força de gradient de 5%, 10%, 15% i 20%, respectivament. Per tal d'entendre els processos d'intercanvi i les corresponents propietats dels protons formadors d'enllaços d'hidrogen, hom pot prendre com a referència la intensitat en el decaïment de la resta de protons no bescanviables, tals com els de $\delta = 7.3\text{-}7.4$ ppm o els de $\delta = 4.9\text{-}5.2$ ppm.

Fins aquest moment, els estudis realitzats apunten cap a la formació d'una estructura ordenada en solució, amb una part central rígida, delimitada per ambdós residus de ciclobutà, i una part terminal flexible. A tot això, hem d'afegir que el protó amidic NH_{10} està formant un enllaç d'hidrogen. (**Figura 83**)

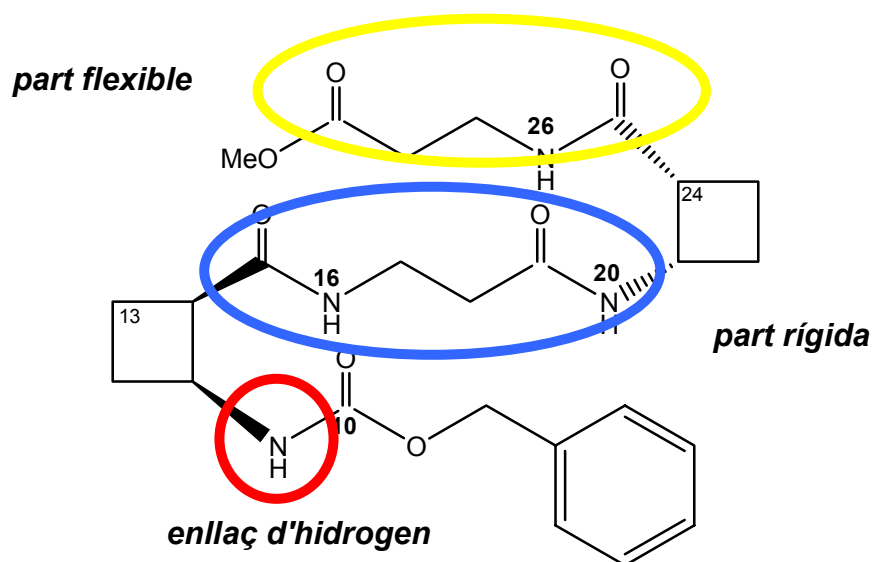


Figura 83. Consideracions estructurals de la molècula **20** en solució, en base als resultats experimentals.

L'experiència acumulada amb els derivats anteriors ens podria suggerir que el més probable és que estiguem davant d'una estructura laminar girada, amb una part central molt fixada: d'una banda per l'enllaç d'hidrogen i d'altra banda perquè es troba entre dos residus carbocíclics amb clara tendència a l'estructuració.

Per tal de confirmar entre quin dels possibles carbonils de la molècula es forma l'enllaç d'hidrogen amb el protó NH_{10} , hom va considerar la conveniència de realitzar un estudi conformational teòric.

3.3.3.2.- ESTUDI CONFORMACIONAL TEÒRIC

El β -tetrapèptid **20** és una molècula prou complexa com per no poder ésser estudiada únicament en termes d'optimitzacions estructurals pel mètode DFT, essent necessari un estudi rigurós de les diferents aportacions conformacionals del sistema al total de la població.

De fet, l'estudi teòric de sistemes com el què ens ocupa presenta alguns problemes metodològics. El primer problema és degut a l'existència de múltiples mínims quan tenim una molècula *gran* amb molts graus de llibertat. En aquestes circumstàncies, es fa molt difícil assegurar que s'han estudiat tots els mínims possibles i que tenim, doncs, el mínim absolut. D'altra banda, ens trobem en el cas d'una molècula amb un gran nombre d'àtoms i amb una enorme flexibilitat on la diferència energètica entre els mínims no és gaire gran i les barreres energètiques d'interconversió tampoc. Així, encara que tinguéssim un mínim absolut, aquest no ens donaria la informació sobre el comportament real de molècula a temperatura ambient, donat que el fet que una estructura sigui la més estable no vol dir necessàriament que la seva població sigui significativa estadísticament.

Tot això ens indica la necessitat de realitzar un estudi dinàmic del sistema per poder extreure tot aquest tipus d'informació.

La majoria dels pèptids existeixen com una barreja de conformacions bescanviables d'energia similar; com a conseqüència d'aquesta flexibilitat conformacional existeixen una gran quantitat de mínims locals, quantitat que pot arribar a ser de l'ordre de 10^n , per a un pèptid de n residus. En aquestes circumstàncies, la realització d'un estudi dinàmic amb un mètode químic-quàntic com ara el DFT esdevé inviable.

Així, per tal de portar a terme el nostre objectiu de realitzar un estudi dinàmic del β -tetrapèptid **20**, hom ha decidit utilitzar tècniques clàssiques que

no consideren els electrons, donat que els àtoms que constitueixen el model material es descriuen com un conjunt de partícules que interaccionen entre si d'acord amb les lleis de la mecànica clàssica. En tant que no es consideren explícitament els graus de llibertat electrònics, són tècniques menys costoses computacionalment, fet que permet la seva aplicació en l'estudi dinàmic de sistemes grans, quelcom impensable amb les tècniques quàntiques. En aquest sentit, s'ha utilitzat la Dinàmica Molecular usant el camp de forces CFF91, el qual està parametritzat per a proteïnes i inclou els derivats ciclobutànics.

Aquest estudi conformacional del sistema, que hom resumeix a continuació, ha estat realitzat en col·laboració amb el Dr. Marcelo J. Kogan, durant la seva estada al laboratori del Professor Ernest Giralt, a la Universitat de Barcelona.

Per començar aquest estudi, cal realitzar una cerca de l'espai conformacional de la molècula i estudiar la incidència de les conformacions que presenten la formació d'algun tipus enllaç d'hidrogen. Aquesta inspecció es porta a terme mitjançant la tècnica del Tremp Simulat Iteratiu^{95,☐} utilitzant com a estructures de partida cinc estructures diferents completament esteses del β -tetrapèptid **20**.

D'entre tot el conjunt d'estructures obtingudes, les que es troben fins a un rang de $2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ del mínim energètic s'analitzen en termes dels paràmetres geomètrics més importants (**Figura 84**) per tal de considerar la formació d'una estructura secundària.

L'anàlisi detallada d'aquestes estructures de mínima energia en funció d'aquests paràmetres ens permet obtenir cinc famílies representatives de confòrmers del β -tetrapèptid **20**, les quals es mostren ordenades energèticament a la **Figura 85**. Així mateix, les **Taules 8 i 9**, mostren els valors per a cada família de confòrmers dels paràmetres estudiats.

⁹⁵ Tesi Doctoral de Josep Cantó i Silva, "Utilització i desenvolupament metodològic d'eines basades en la dinàmica molecular, aplicades a l'estudi estructural de pèptids", Departament d'Enginyeria Química, Universitat Politècnica de Catalunya, 1999.

☐ Vegeu l'apartat **5.- Mètode de Càlcul**. Aquest terme correspon a la traducció de l'anglès *Iterative Simulated Annealing*.

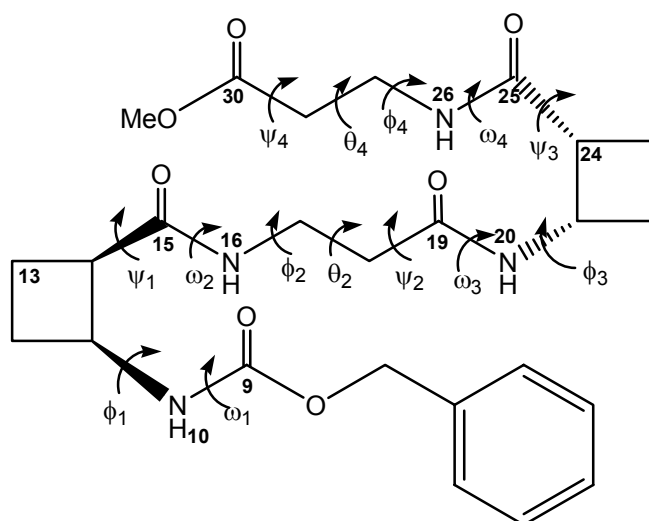


Figura 84. Estructura del β -tetrapèptid **20** amb la definició de la numeració dels àtoms i dels angles de torsió considerats.

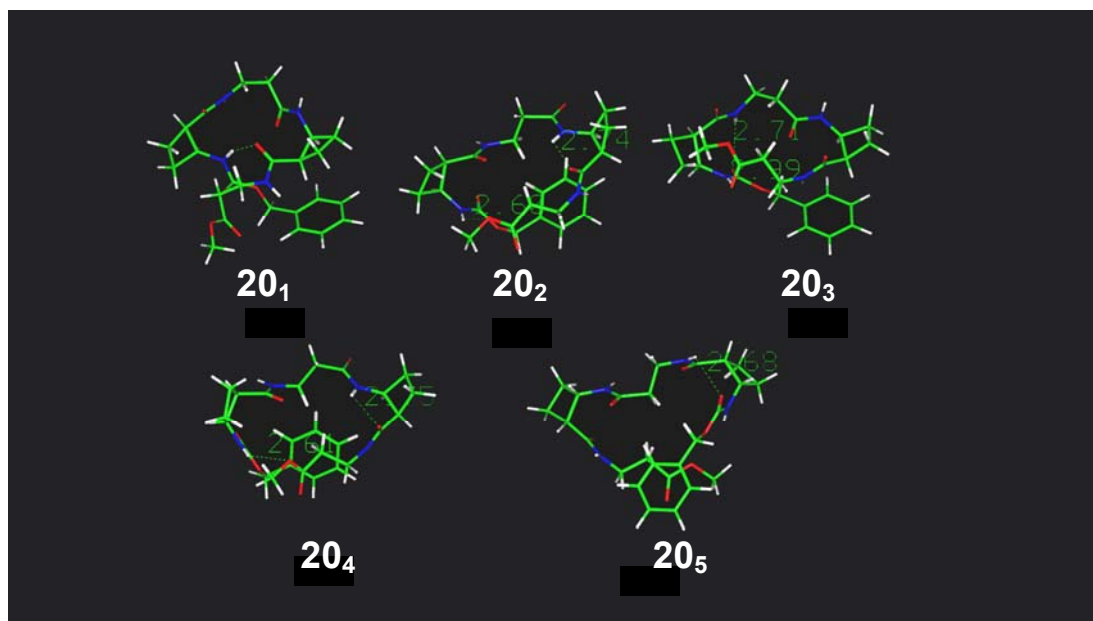


Figura 85. Famílies de conformators del β -tetrapèptid **20** ordenades segons els enllaços d'hidrogen que formen i també energèticament, on **20₁** és la de menor energia.

Taula 9. Energies relatives^a i distàncies^b per a una selecció de parells d'àtoms NH i CO dels mínims conformacionals del β -tetrapèptid **20**.

| Família de confòrmers | E ^b | NH ₁₀ ...OC ₂₅ | NH ₁₀ ...OC ₃₀ | NH ₂₀ ...OC ₂₅ | NH ₁₆ ...OC ₉ |
|-----------------------|----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 20₁ | 0.00 | 2.3 | 4.0 | 5.7 | 4.9 |
| 20₂ | 0.70 | 7.1 | 2.6 | 2.7 | 2.9 |
| 20₃ | 0.97 | 5.7 | 3.8 | 3.5 | 2.7 |
| 20₄ | 0.99 | 7.0 | 2.6 | 2.7 | 3.0 |
| 20₅ | 1.00 | 7.2 | 2.9 | 3.4 | 2.7 |

^a en kcal·mol⁻¹;

^b en angstroms.

Taula 10. Paràmetres característics^a dels conformers de mínima energia del β -tetrapèptid **20**.

| Família ^b de confòrmers | E ^c | ω_1 | ω_2 | ϕ_2 | θ_2 | ψ_2 | ω_3 | ω_4 | ϕ_4 | θ_4 | ψ_4 | R* ^d | ϕ_1 | ϕ_3 |
|---------------------------------------|----------------|------------|------------|----------|------------|----------|------------|------------|----------|------------|----------|-----------------|----------|----------|
| 20₁ | 0.00 | -179 | 179 | 147 | -67 | -91 | -179 | 179 | 73 | 60 | -160 | 7.3 | 128 | -140 |
| 20₂ | 0.70 | 177 | -173 | -78 | 173 | -83 | -179 | -176 | 76 | 175 | -147 | 9.4 | -140 | 134 |
| 20₃ | 0.97 | 178 | 167 | 74 | 69 | 153 | 177 | -175 | 71 | 178 | 165 | 8.9 | -128 | -149 |
| 20₄ | 0.99 | 177 | 175 | -77 | 176 | -82 | 179 | -176 | 77 | 176 | 137 | 9.2 | -123 | 133 |
| 20₅ | 1.00 | 176 | -173 | 70 | -177 | 73 | 172 | -174 | 79 | 175 | 179 | 9.4 | -148 | -135 |

^a) vegeu **Figura 84**, corresponent als angles diedres.

^b) vegeu **Figura 85**, corresponent als mínims conformacionals de **20**.

^c) energies relatives en kcal·mol⁻¹.

^d) R*: distància (Å) entre els pseudoàtoms de cada anell ciclobutànic en el centre de masses.

Si examinem els paràmetres tabulats podem apreciar com una de les famílies conformacionals, la **20₁**, és clarament més estable que les altres quatre, que estan en un rang entre 0.7 i 1.0 kcal·mol⁻¹ per sobre d'aquest mínim.

Centrant-nos en les distàncies compatibles amb la presència d'un enllaç d'hidrogen intramolecular en l'estructura (**Taula 9**), i considerant que aquesta ha de ser inferior a 2.5 Å, podem afirmar que només el confòrmer més estable té una distància interatòmica adequada com per indicar la formació d'un enllaç d'hidrogen puix la resta de confòrmers estan per sobre de la distància requerida o formen enllaços d'hidrogen molt febles.

Tot indica que en el confòrmer de mínima energia **20₁** s'observa la presència d'un enllaç d'hidrogen entre el parell **NH₁₀...OC₂₅**, compatible amb la formació d'una estructura secundària de tipus 14-hèlix. Aquest fet, en concordància amb els resultats dels experiments de RMN realitzats, és força destacable en una molècula de mides tan reduïdes i amb només quatre residus.

D'altra banda, si examinem els valors dels angles de torsió, ω_i , (**Taula 10**) aquests suggereixen una conformació *trans* preferent en la disposició de les amides, la qual cosa també concorda amb els resultats experimentals.

Així mateix, si hom analitza la distància entre els dos anells ciclobutànics, **R***, el confòrmer **20₁** presenta una distància de 7 Å, compatible amb la formació d'una estructura plegada i lluny dels 11 Å que indicarien una estructura estesa.

De manera similar, l'angle de torsió θ_2 en **20₁** (-67°) indica la presència d'una conformació *gauche*, la qual estaria d'acord amb els valors del mateix que adopten els β -aminoàcids que participen en la formació d'una estructura de tipus 14-hèlix, com ja s'ha comentat a la introducció.

En quant a la resta de confòrmers podem dir que, **20₃** té un valor de θ_2 compatible amb una conformació *gauche*, però no presenta l'enllaç d'hidrogen que estabilitzaria l'hèlix; els confòrmers **20₂**, **20₄** i **20₅** presenten una conformació de tipus més estesa puix presenten valors de distància entre ambdós ciclobutans al voltant de 9 Å.

Tot això ens permet afirmar que l'estructura del confòrmer **20₁** és la que més s'ajusta a les evidències experimentals. Això fa que ens plantegem la realització d'un càlcul de dinàmica molecular amb aquesta estructura per tal de comprovar que aquest plegament es manté.

La dinàmica molecular es porta a terme durant 1 ns, a 298 K i usant cloroform com a model de dissolvent.

Revisant els paràmetres involucrats en el plegament durant tota la trajectòria de la dinàmica molecular (**Figura 86**), podem afirmar que la distància entre els àtoms involucrats en la formació de l'enllaç d'hidrogen que defineix la 14-hèlix es manté. També es mantenen els valors dels angles diedres ψ_2 , θ_2 , ϕ_2 , θ_4 i ψ_4 , corresponents a l'esquelet central que és la part rígida de la molècula, en canvi, l'angle ϕ_4 , corresponent al segon residu de β -alanina, presenta una major fluctuació, quelcom lògic si tenim en compte que aquesta és la part més flexible de l'estructura.

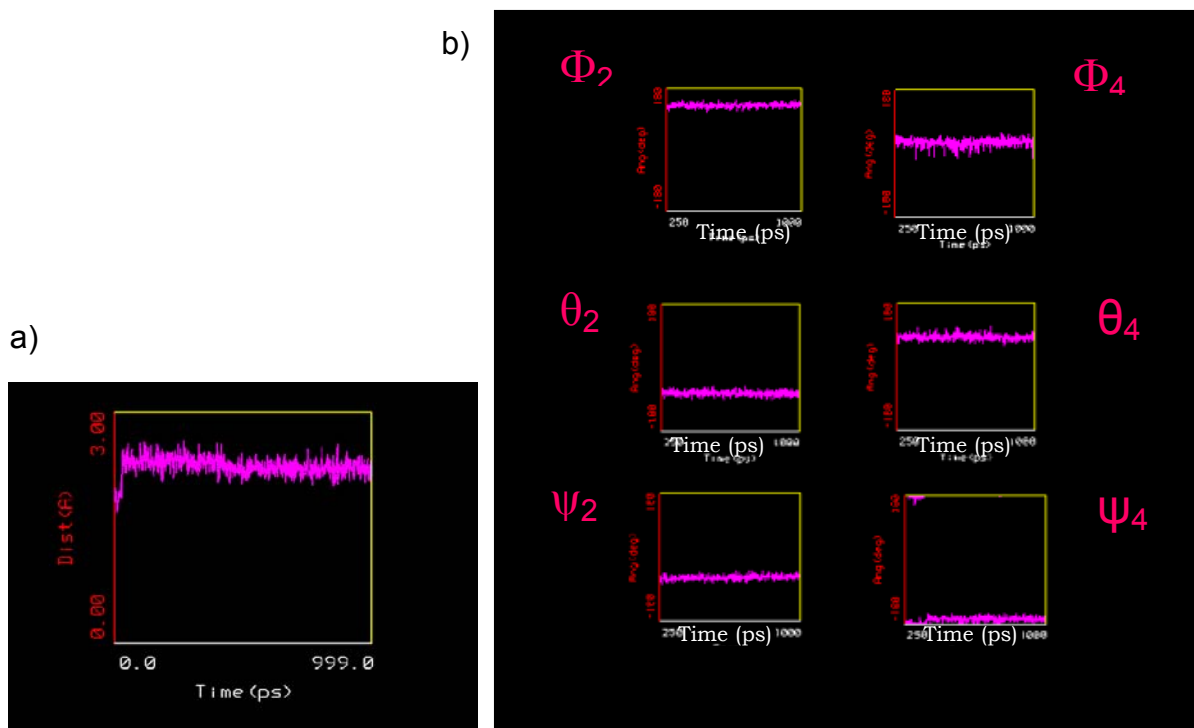


Figura 86. Valors de l'evolució dels paràmetres geomètrics seleccionats en el plegament de **20₁** en funció del temps en una dinàmica molecular en CHCl_3 a 298 K. a) distància del parell $\text{NH}_{10} \cdots \text{OC}_{25}$ i b) angles de torsió pertanyents als esquelets de β -alanina $\text{N}_{16}-\text{C}_{19}$ i $\text{N}_{26}-\text{C}_{29}$, respectivament.

Per tal de comprovar que partint del confòrmer **20**₁, s'arriba a una estructura optimitzada que manté aquest tipus de plegament, es va fer un càlcul DFT d'optimització de la geometria partint de les coordenades de **20**₁ i utilitzant el funcional B3LYP. (Figura 87)

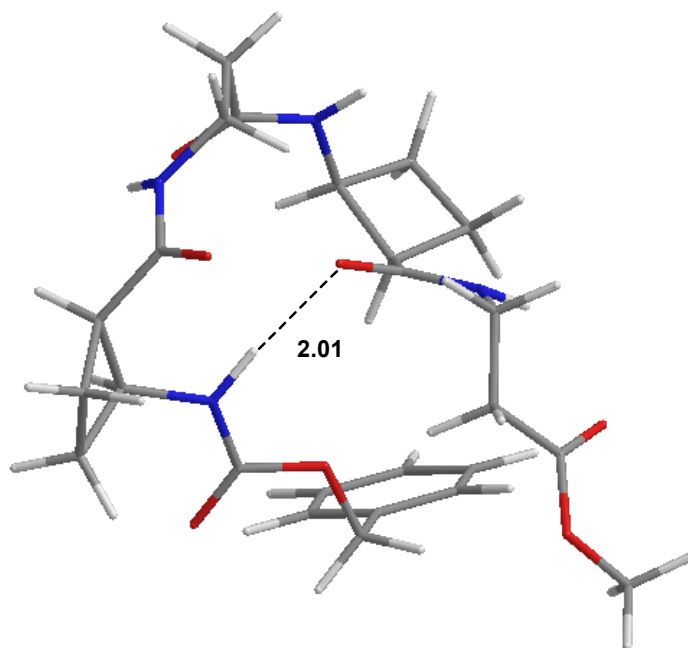


Figura 87. Estructura optimitzada del β -tetrapèptid **20** usant el mètode DFT. Hom mostra la distància interatòmica (en Å) per a l'enllaç d'hidrogen format pel parell $\text{NH}_{10}\cdots\text{OC}_{25}$. Els angles formats pels àtoms involucrats en l'enllaç d'hidrogen són: $\alpha(\text{COH})=162.1^\circ$ i $\beta(\text{NHO})=162.1^\circ$.

Com es pot apreciar a la **Figura 87**, l'estructura optimitzada manté l'estructura de tipus 14-hèlix, amb una distància entre els àtoms involucrats en la formació de l'enllaç d'hidrogen de 2.01 Å, una mica més curta que en el l'estructura del confòrmer **20**₁, trobat pel camp de forces CFF91 i que era de 2.3 Å.

Les diferències entre ambdues geometries optimitzades provenen principalment de l'orientació del grup fenil en l'agrupació del carbamat de benzil, i en el valor de l'angle diedre ψ_3 , les quals no són representatives puix afecten a una part més flexible de la molècula.

3.3.3.3.- CONCLUSIONS

L'estudi conformacional teòric i les evidències experimentals indiquen la formació d'una 14-hèlix en solució pel β -tetrapèptid **20**, la qual ve definida per la formació d'un enllaç d'hidrogen entre el protó del carbat, NH_{10} , i l'oxigen del carbonil de l'enllaç peptídic del segon residu de β -alanina, OC_{25} . Aquest tipus de plegament provoca que tinguem una part central definida pels dos anells de ciclobutà molt rígida i una altra part, corresponent al segon residu de β -alanina, o a l'extrem terminal, més flexible. (Figura 88)

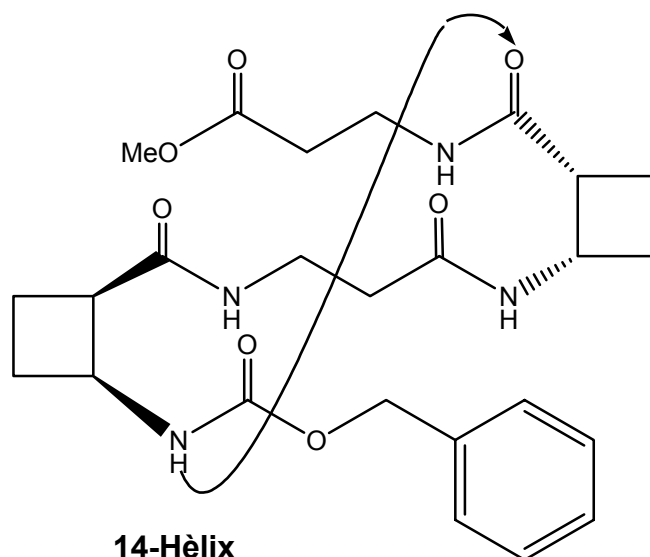


Figura 88. Estructura de tipus 14-hèlix adoptada en solució pel β -tetrapèptid **20**, i que ve corroborada pels estudis de RMN i per l'estudi conformacional teòric.

La formació d'aquest tipus d'estructura secundària, 14-hèlix, és sorprenent perquè *a priori* hom esperava confirmar la presència d'una estructura de tipus *laminar girada* com la que s'evidencia en els derivats ciclobutànics anteriors.

No obstant, això demostra, d'una banda, que el fet d'augmentar la complexitat del derivat, promou la formació d'altres ordenacions més sofisticades i, d'altra banda, que el ciclobutà esdevé un candidat excel·lent per a la inducció de diferents tipus de plegaments, fins i tot amb residus gens propensos a induir ordenacions com és el cas de la β -alanina, i que van des d'estructures de tipus laminar, fins a la formació d'estructures helicoïdals de tipus 14-hèlix.

A més, ha quedat pal·lès que són suficients pocs residus per evidenciar aquests tipus d'ordenacions estructurals promogudes per l'anell de ciclobutà.

Malauradament, com ja s'ha comentat, en el cas del β -tetrapèptid **20**, malgrat ésser un sòlid, no s'han obtingut cristalls aptes per a l'enregistrament del difractograma de raigs X. En aquest sentit, no s'ha pogut estudiar quin és el patró estructural en estat sòlid, i si aquest difereix de l'observat per a la resta de derivats estudiats.

4.- RESUM I CONCLUSIONS

A la vista dels resultats obtinguts en la realització de la present Tesi Doctoral i considerant els objectius plantejats a l'inici de la mateixa, podem concloure que:

- S'ha assolit amb èxit la síntesi de 2-benziloxicarbonilamino-(1*S*,2*R*)-ciclobutan-1-carboxilat de metil, **9**, l'enantiòmer del producte **11**, que havia estat prèviament sintetitzat en el nostre laboratori.
- S'han solventat els problemes presentats durant la reacció d'hidrogenòlisi del grup carbamat de benzil utilitzant unes noves condicions de reacció i, com a conseqüència, s'ha assolit la síntesi d'ambós aminoàcids completament desprotegits, **13** i **14**.
- S'ha aconseguit sintetitzar els diferents β -pèptids ciclobutànics **16**, **20**, **21**, **22**, i **25**, així com la preparació dels β,δ -dipèptids **26** i **27**.
- En el cas dels β -pèptids bisciclobutànics s'ha utilitzat una reacció alternativa a l'acoblament peptídic clàssic que ha permès escurçar la seqüència sintètica i millorar el rendiment global de la mateixa.
- S'ha portat a terme l'estudi estructural del monòmer **11** així com dels β -pèptids **17**, **20**, **21**, **22**, **25**. En solució s'ha evidenciat que **11** i els β -pèptids bisciclobutànics **17**, **21**, **22** i **25**, tant per la seva rigidesa com per la seva mida, manifesten un mateix patró de plegament. Aquest patró dona lloc a una estructura secundària de tipus *laminar girada* basada en la formació d'un enllaç d'hidrogen *intramolecular* entre el **NH₁₀** i **OC₁₅**. En canvi, el β -tetrapèptid **20** dona lloc a un plegament més complex de tipus 14-hèlix. Aquests resultats experimentals estan en concordància amb els diferents càlculs teòrics realitzats.

- S'ha realitzat l'estudi estructural en estat sòlid de **12, 21, 22 i 25**, posant-se de manifest que comparteixen un mateix patró estructural, basat en la generació d'una estructura d'infinites cadenes de molècules unides per enllaços d'hidrogen *intermoleculares*. Aquesta estructura en estat sòlid pot assimilar-se amb una estructura de tipus *agulla de cabell*.

5.- MÈTODE DE CÀLCUL

A continuació, i de forma breu, es presenten els mètodes químic-quàntics utilitzats per estudiar l'estructura electrònica d'un sistema molecular així com la Dinàmica Molecular.

MÈTODES QUÍMICO-QUÀNTICS

L'objectiu de la majoria dels mètodes químic-quàntics és resoldre l'equació d'Schrödinger independent del temps.

$$H\Psi(r,R)=E\Psi(r,R)$$

On H és l'operador hamiltonià, Ψ és la funció d'ona, que depèn de les coordenades dels electrons, r , i dels nuclis, R , i E és l'energia del sistema. Aquesta equació és irresoluble de forma exacta per a sistemes moleculars.

Donat que els nuclis són molt més pesats que els electrons, el moviment dels nuclis i dels electrons pot tractar-se per separat. Això és el que es coneix per l'aproximació de Born-Oppenheimer. Dins d'aquesta aproximació hom ha de resoldre l'equació d'Schrödinger electrònica. Degut a la presència dels termes de repulsió electrònica, aquesta equació no es pot resoldre exactament per a molècules amb més d'un electró.

L'aproximació més simple per resoldre l'equació d'Schrödinger electrònica és l'aproximació del camp autoconsistent de Hartree-Fock^{96,97} (SCF) en la que s'escull com a funció d'ona un determinant d'Slater que és el producte antisimetritzat de funcions monoelectròniques o spin orbitals. Amb aquesta aproximació s'assumeix que cada electró es mou en el camp de potencial mitjà creat per la resta d'electrons i nuclis. Els spin-orbitals són el producte d'una part espacial – orbital molecular – per una funció d'spin. Els orbitals moleculars es construeixen com una combinació lineal de funcions de base

⁹⁶ D.R. Hartree, *Proc. Cambridge Phil. Soc.*, **1928**, 24, 89.

⁹⁷ V.A. Fock, *Z. Phys.*, **1930**, 61, 126.

atòmiques – aproximació CLOA –. Els coeficients d'aquesta combinació lineal es troben resolent de forma iterativa les equacions de Roothaan-Hall.

El nombre i tipus de funcions de base emprades condiciona la qualitat dels resultats. L'ús d'una funció de base per a cada orbital atòmic ens porta a les bases mínimes. Per tal de millorar els resultats, s'usen bases esteses, amb més d'una funció de base per orbital. Dins d'aquest grup tenim les bases doble- ζ , triple- ζ ,... depenent de si cada orbital atòmic és descrit mitjançant dues, tres,... funcions de base, i les bases esteses de valència, on únicament es descriuen mitjançant més d'una funció els orbitals de valència. Funcions amb nombre quàntic de moment angular superior, anomenades de polarització, són també necessàries a l'hora de descriure la distorsió de la distribució electrònica deguda a l'enllaç.

Augmentar la grandària de la base porta una millora de la descripció del sistema. Tot i així, amb una funció d'ona monoconfiguracional mai s'assolirà el resultat exacte. Això és degut a la manca de correlació electrònica en el mètode de Hartree-Fock.

Es poden distingir dos tipus de correlació. La primera s'anomena correlació dinàmica i prové del fet que en l'aproximació de Hartree-Fock no es té en compte la repulsió electrònica instantània. La correlació no dinàmica apareix quan diferents configuracions electròniques són pràcticament degenerades i estan fortament barrejades en la funció d'ona.

S'han desenvolupat varies aproximacions per tal d'introduir la correlació electrònica. La majoria dels mètodes parteixen de la funció d'ona de Hartree-Fock, com és el cas dels mètodes d'Interacció de Configuracions, Coupled Cluster, Mètodes Pertorbacionals..., però l'aplicació d'aquests mètodes a sistemes grans implica un cost computacional molt elevat.

MÈTODES DEL FUNCIONAL DE LA DENSITAT

Alternativament, i partint dels teoremes de Hohenberg i Kohn, s'han desenvolupat els mètodes del Funcional de la Densitat.⁹⁸ Aquests mètodes també introdueixen la correlació electrònica i el seu cost és molt menor. La diferència recau en el fet que els mètodes químic-quàntics convencionals descrits anteriorment avaluen l'energia a partir de la funció d'ona mentre que els mètodes DFT ho fan a partir de la densitat electrònica.

Hohenberg i Kohn van enunciar dos teoremes⁹⁹. El primer d'ells ens diu que coneguda la densitat electrònica $\rho(r)$, es pot determinar l'energia de l'estat fonamental del sistema.

El segon teorema de Hohenberg i Kohn enuncia que es pot aplicar el principi variacional al funcional de l'energia, de tal manera que el valor mínim d'energia correspondrà a la densitat electrònica exacta. El problema, però, recau en què no es coneix l'expressió exacta d'aquest funcional.

$$E[\rho] \geq E[\rho_{\text{exacta}}]$$

L'aplicació pràctica, emperò, dels mètodes DFT va ser possible gràcies al treball de Kohn i Sham en considerar que un sistema de N electrons es podia representar mitjançant un sistema de referència d'electrons sense interacció.¹⁰⁰ Aquest sistema de referència es podia descriure mitjançant funcions monoelectròniques o spin orbitals, Φ_i de forma que la densitat del sistema de referència $\rho_s(r)$ coincidís amb la densitat real $\rho(r)$.

⁹⁸ Vegeu per exemple, R.G. Parr i W. Yang, *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, N. Y., **1989**.

⁹⁹ P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev. B*, **1964**, 136, 864.

¹⁰⁰ W. Kohn, L. Sham, *J. Phys. Rev. A*, **1965**, 140, 1133.

Aquesta aproximació permet construir el hamiltonià com la suma de hamiltonians monoelectrònics i trobar uns orbitals que ens permetran trobar la densitat.

L'energia en funció de la densitat ve representada pels següents termes,

$$E[\rho] = T_s[\rho] + V_c[\rho] + V_{e-n}[\rho] + E_{xc}[\rho]$$

On $T_s[\rho]$ és l'energia cinètica del sistema sense interacció, $V_c[\rho]$ fa referència al terme Coulombià de l'energia d'interacció electró-electró, $V_{e-n}[\rho]$ és l'energia d'interacció electró-nuclis i $E_{xc}[\rho]$ és l'energia de bescanvi i correlació, que inclou els termes no clàssics de l'energia d'interacció electró-electró i la correcció de la correlació a l'energia cinètica.

D'entre aquests termes, l'últim no té una expressió coneguda sinó que s'han proposat diferents funcionals de correlació-bescanvi, com ara el BPW91¹⁰¹ o el B3LYP¹⁰², aquest últim ha estat utilitzat en la realització d'aquesta Tesi Doctoral.

En el nostre cas, l'estudi teòric del monòmer **11** ha tingut lloc començant per una exploració de l'espai conformacional usant el mètode semiempíric AM1.¹⁰³ Les estructures més estables trobades s'han optimitzat pel mètode DFT, usant el funcional B3LYP amb un conjunt de base 6-31G(d).

També s'han considerat les freqüències de vibració harmòniques de totes les estructures obtingudes per tal de verificar que es tractava de mínims energètics o d'estats de transició. Les energies de Gibbs d'aquestes estructures s'han calculat a 1 atm i a 298.15 K.

¹⁰¹ (a) Y. Wang, J.P. Perdew, *Phys. Rev. B*, **1991**, *44*, 13298. (b) J.P. Perdew, J.A. Chevary, S.H. Vosko, K.A. Jackson, M.R. Pederson, D.J. Singh, C. Fiolhais, *Phys. Rev. B*, **1992**, *46*, 6671.

¹⁰² A.D. Becke; *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98*, 5648.

¹⁰³ M.J.S. Dewar, E.G. Zoebisch, E.F. Healy, J.J.P. Stewart; *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 3902.

L'efecte de solvatació del cloroform ($\epsilon=4.9$) en l'equilibri rotacional de **11** s'ha considerat utilitzant el mètode CPCM.¹⁰⁴

El càlcul dels desplaçaments químics de protó en els conformers *cis* i *trans* del β -aminoàcid **11** ha tingut lloc utilitzant el *gauge independent atomic orbital method* (GIAO) a nivell de càlcul B3LYP i usant un conjunt de base 6-31+G(d,p).

Les estructures dels β -dipèptids bisciclobutànics **21** i **25** s'han optimitzat realitzant un càlcul DFT usant el funcional B3LYP i un conjunt de base 6-31G(d).

En quant a l'estudi teòric del β -dipèptid **17**, aquest s'inicià realitzant un càlcul DFT d'optimització de l'estructura a partir de les dades cristal·logràfiques de la molècula. Concretament s'utilitzà el funcional B3LYP i una base doble- ζ de valència amb polarització sobre els àtoms pesats, 6-31G(d).¹⁰⁵

En el cas del β -tetrapèptid **20**, el càlcul DFT consisteix en l'optimització de la geometria final obtinguda per càlculs de Dinàmica Molecular, emprant novament la base 6-31G(d).

Tots els càlculs DFT que s'han portat a terme en aquest Treball s'han realitzat a la Unitat de Química Física d'aquesta Universitat, usant els programes Gaussian-98¹⁰⁶ i Gaussian-03¹⁰⁷.

¹⁰⁴ (a) A. Klamt, G.J. Schüürmann; *Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1993**, 799. (b) V. Barone, M. Cossi; *J. Phys. Chem. A*; **1998**, *102*, 1995.

¹⁰⁵ W.J. Hehre, L. Radom, P. V R. Schleyer, J.A. Pople, *Ab initio Molecular Orbital Theory*, Wiley, New York, **1986**.

¹⁰⁶ M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.a. Robb, J.R. Cheeseman, V.K.N. Zakrzewski, J.A. Jr Montgomery, R.E. Stratmann, J.C. Burant, S. Drappich, J.M. Millam, A.D. Daniels, K.N. Kudin, M.C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G.A. Peterson, P.Y. Ayala, Q.Cui, K. Morokuma, D.K. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski, J.V. Ortiz, B.B.Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Kamaromi, R. Gomperts, R.L. Martín, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, C. González, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, C. González, M. Head-Gordon, E.S. Peplogle, J.A. Pople. GAUSSIAN-98, Revision A.5; Gaussian: Pittsburgh, PA, **1998**.

DINÀMICA MOLECULAR

La Dinàmica Molecular es basa en l'aplicació directa de les equacions del moviment de Newton, que descriuen l'evolució temporal d'un sistema.

Fent servir les lleis de la mecànica clàssica hom pot predir la posició que ocuparà i la velocitat que tindrà cada partícula del sistema en un temps donat. Analitzant successivament en el temps la força exercida sobre cada partícula i fent una estimació de la posició i velocitat futures, hom pot obtenir un conjunt d'estructures representatiu de l'evolució temporal del sistema.

Per tal d'iniciar una Dinàmica Molecular cal indicar unes coordenades i unes velocitats inicials. Les coordenades poden obtenir-se, per exemple, d'una estructura minimitzada mentre que les velocitats es calculen aleatòriament seguint una distribució de Maxwell a la temperatura de referència.

S'han presentat nombrosos algorismes per a la integració de les equacions de la Dinàmica Molecular. El més conegut de tots és el mètode de la diferència finita descrit per Verlet,¹⁰⁸ el qual mesura les posicions atòmiques a temps $t+\Delta t$ a partir de les forces i posicions a temps anteriors. Aquest mètode és relativament ràpid donat que només requereix una avaluació de la força per a cada pas, essent aquesta avaluació la que requereix més temps de càlcul.¹⁰⁹

¹⁰⁷ M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.a. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Jr. Montgomery, T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Ada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakay, M. Klene, X. Li, J.E. Kanox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K.Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q.Cui, A.G. Babold, S. Clifford, J. C Cioslowski, B.B.Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Kamaromi, , R.L. Martín, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, G. González, J.A. Pople; GAUSSIAN-03, Revision B.04; Gaussian Inc: Pittsburgh, PA, 2003. <http://www.gaussian.com>

¹⁰⁸ L. Verlet, *Phys. Rev. A*, **1967**, 159, 98.

¹⁰⁹ A.R. Leach, *Molecular Modelling: Principles and Applications*. U.K., Ed. Longman, **1996**.

Un punt clau per què es pugui aplicar a la pràctica aquesta metodologia és l'elecció del temps d'integració, puix això implica l'ús de càlculs numèrics. Aquest temps ve determinat per l'escala temporal de moviments més ràpids de la simulació, que correspon a la tensió dels enllaços. Això implica que el temps d'integració sigui de l'ordre de femtosegons. Com a conseqüència, l'escala de temps real que hom pot assolir en la simulació és de l'ordre dels nanosegons, tenint en compte que la durada de la simulació implica la realització de milers de càlculs per tal d'avaluar l'energia potencial de les diferents configuracions.

En la simulació d'una Dinàmica Molecular és important el tipus d'entorn que s'utilitza. Existeixen tres situacions generals a emular, que són: a) sistema en el buit, on no existeix un dissolvent explícit i les interaccions es produeixen únicament entre els àtoms del sistema; l'efecte de l'apantallament del dissolvent es representa mitjançant una constant dielèctrica; b) sistema envoltat per una esfera de solvatació; c) sistema en condicions de contorn periòdiques.

En funció de les condicions inicials, s'efectuarà una exploració diferent de l'espai conformacional accessible. Magrat aquesta consideració, la Dinàmica Molecular és una tècnica molt valuosa a l'hora de determinar un conjunt de conformacions representatives del sistema molecular. Això és possible gràcies a què el sistema pot, en teoria, travessar barreres energètiques, la qual cosa fa possible l'estudi conformacional de molècules. El coneixement de l'espai conformacional accessible d'un pèptid pot utilitzar-se de manera complementària a les dades obtingudes per RMN.

EL TREMP SIMULAT ITERATIU¹¹⁰

Aquest mètode permet fer una recerca de l'espai conformacional de la molècula per tal de localitzar les estructures de mínima energia. En particular, consisteix en iniciar una simulació portant l'estructura optimitzada a una temperatura elevada i anar-la disminuint en períodes intermedis fins a una temperatura suficientment baixa com per què el sistema arribi a un mínim. Aquesta velocitat de refredament cal que sigui suficientment lenta com per permetre l'adquisició d'un estat de semiequilibri termodinàmic a cada etapa.¹¹¹

En el cas del Tremp Simulat Iteratiu s'acobla al final de cada procés de refredament, un altre d'escalfament molt més ràpid, de manera que s'obté un procés cíclic. Cada cicle genera una estructura. Aquesta estructura generada es minimitza i, per una banda iniciarà el següent cicle i per altra banda passarà a formar part del conjunt d'estructures finals que seran analitzades. L'escalfament del sistema es realitza de manera més ràpida que el refredament per tal d'augmentar de manera brusca l'energia del sistema i afavorir-ne així el pas a una zona diferent de l'espai conformacional. (**Figura 96**)

En el nostre cas s'utilitzà en tots els càlculs el camp de forces CFF91¹¹² implementat en el programa Discover 3.0.

L'efecte del dissolvent es té en compte mitjançant una constant dielèctrica que depèn de la distància de cada parell d'àtoms amb un valor de $\epsilon=4r$. En el cas del β -tetrapèptid **20** hom va realitzar els càlculs considerant la molècula envoltada de molècules del dissolvent, en aquest cas CHCl_3 , per tal d'aproximar les condicions del càlcul el més possible a la situació real. En tots els casos s'utilitzà també l'algorisme de Verlet.

¹¹⁰ Tesi Doctoral de Josep Cantó i Silva, "Utilització i desenvolupament metodològic d'eines basades en la Dinàmica Molecular, aplicades a l'estudi estructural de pèptids", Departament d'Enginyeria Química; Universitat Politècnica de Catalunya; **1999**.

¹¹¹ F.J. Corcho, M. Filizola, J.J. Pérez; *Chem. Phys. Lett.*, **2000**, 319, 65.

¹¹² (a) http://www.accelerys.com/support/life/discover/forcefield/cff9x_refs.html (b) B. Mal; R. Nussinov; *J. Mol. Biol.*, **2000**, 296, 1091.

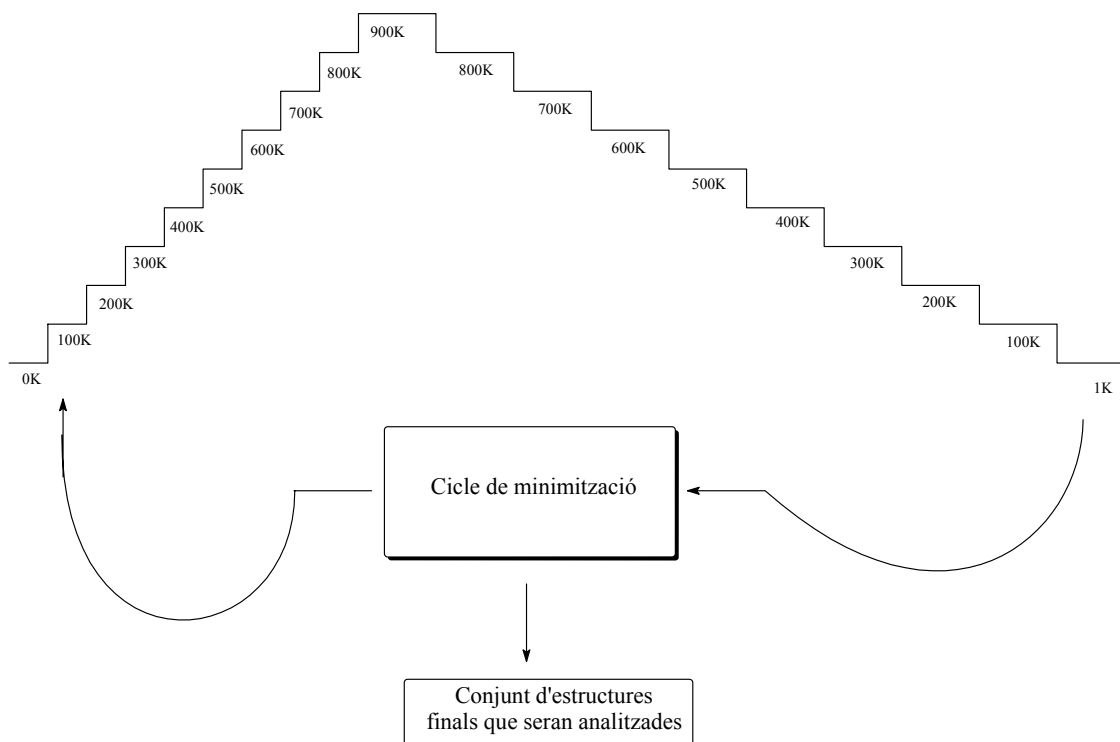


Figura 96. Esquema del procés del Tremp Simulat Iteratiu, consisteix en escalfar des de 0 K fins a 900 K amb una velocitat de 100 K en 0.1 ps, romanent 0.1 ps a cada temperatura. Un cop s'han assolit els 900 K durant 10 ps, comença el refredament a una velocitat de 100 K en 0.1 ps, però romanent ara un temps de 10 ps a cada temperatura, fins arribar a 1 K. En aquest moment es minimitza l'energia d'aquesta estructura que, per una banda iniciarà el següent cicle i d'altra banda passarà a formar part del conjunt d'estructures finals a analitzar. Aquest procés es repeteix 150 vegades, obtenint-se així 150 estructures a analitzar.

Un cop minimitzada l'estructura de partida amb una opció del mateix programa de disseny del Discover 3.0, es realitza un procés del Tremp Simulat Iteratiu. Té lloc un escalfament gradual de la molècula des de 0 K i fins a 900 K, amb una velocitat d'escalfament de 100 K en 0.1 ps, i es roman a cada etapa durant un temps de 1.0 ps. Un cop s'han assolit els 900 K, aquesta temperatura es manté durant 10 ps i a continuació es porta a terme un procés de refredament gradual de 100 K en 0.1 ps, però mantenint ara la temperatura 10 ps a cada etapa. L'estructura resultant es minimitza pel mètode del gradient conjugat i amb un criteri de convergència de 0.0001 kcal/Å·mol. Aquest procés es repeteix 150 vegades obtenint-se així 150 estructures a analitzar per cada estructura de partida. Aquests confòrmers obtinguts s'estudiaren en funció de les distàncies entre els protons amídics i els diferents carbonils presents a la molècula així com dels angles dihedres més importants en cada cas i parant especial atenció a les estructures separades del mínim en 2 kcal.mol⁻¹.

En el nostre cas s'ha portat a terme el TSI partint de cinc conformacions esteses totalment diferents en el cas del β -tetrapèptid **20**.

Analitzant amb detall les estructures separades del mínim en $2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, s'obtenen cinc famílies de confòrmers. D'entre aquestes, amb la de mínima energia que, a més, forma l'enllaç d'hidrogen evidenciat pels experiments de RMN i concorda en els paràmetres geomètrics, es realitza un estudi dinàmic amb l'objectiu de conèixer si aquesta conformació que evidencia aquest plegament és prou estable i es manté.

Amb aquesta estructura representativa de la família de confòrmers de mínima energia obtinguda en el Tremp Simulat Iteratiu i després d'un temps d'equilibració de 0.25 ps es realitza una dinàmica usant un model de dissolvent de cloroform a 298 K i durant un període d'evolució de 0.75 ns. Durant la realització de la dinàmica es realitza un seguiment de diferents paràmetres geomètrics per tal de confirmar que no hi hagi una variació considerable en la temperatura ni en l'energia total del sistema.

Els càlculs tant de Dinàmica Molecular com del Tremp Simulat Iteratiu s'han portat a terme a la Universitat de Barcelona, sota la supervisió del Dr. Marcelo J. Kogan, en el grup del Professor Ernest Giralt, utilitzant el programa Insight II Discover 3.0 v 1997 i emprant un ordinador SGI² IMPACTTM 10000 (128MB RAM, 19 GB de disc dur) amb un sistema operatiu Irix 5.3.

6.- DESCRIPCIÓ EXPERIMENTAL

6.1.- OBSERVACIONS GENERALS

6.1.1.- ESPECTROSCOPIA I ESPECTROMETRIA

Els espectres de Ressonància Magnètica Nuclear han estat enregistrats al Servei de RMN d'aquesta Universitat. S'ha utilitzat un aparell Bruker, model Avance 250 per registrar els espectres rutinaris de ^1H a 250 MHz i ^{13}C a 62.5 MHz. També s'ha utilitzat l'equip Bruker model Avance 500 per tal de realitzar experiments de RMN ^1H a 500 MHz dels β -pèptids ciclobutànics principalment, així com la caracterització en 1D i 2D dels mateixos. Els desplaçaments químics es donen utilitzant el propi dissolvent com a referència interna, prenent els següents valors,

CDCl_3 : $\delta = 7.29$ i 77.0 per a ^1H i ^{13}C , respectivament.

Acetona- d_6 : $\delta = 2.04$ i 29.8 per a ^1H i ^{13}C , respectivament.

Metanol- d_4 : $\delta = 3.33$ i 49.0 per a ^1H i ^{13}C , respectivament.

CD_2Cl_2 : $\delta = 5.32$ per a ^1H .

D_2O : $\delta = 4.64$ per a ^1H .

Les abreviatures emprades per designar la multiplicitat dels senyals han estat les següents,

| | |
|------------|-------------------------------|
| s | singulet |
| s.a., t.a. | singulet ample, triplet ample |
| d | doblet |
| t | triplet |
| q | quintuplet |
| m | multiplet |

Les abreviatures emprades per designar els carbonis aromàtics del grup fenil i d'altres particulars han estat,

| | |
|---------------------------|--------------------|
| C_o, C_m, C_p, C_{arom} | carboni aromàtic |
| C_{ipso} | carboni ipso |
| C_{4i} | carboni quaternari |

Els **espectres d'IR** s'han enregistrat en film ó en sòlid en un aparell model NICOLET 5ZDX, amb transformada de Fourier (film, solució) de la Unitat de Química Orgànica ó en un aparell Bruker model TENSOR 27 (sòlid) amb accessori d'ATR del Servei d'Anàlisi Química .

Els **espectres de masses**, EM, han estat enregistrats al Servei d'Anàlisi Química d'aquesta Universitat. S'han efectuat en un aparell Bruker model SQUIRE 3000; algunes anàlisis s'han efectuat per la tècnica de fragmentació per impacte electrònic 70 e.V. i d'altres per infusió directa de la mostra, per ionització química i pel mètode IFE-IT, el tipus d'anàlisi està indicat en la descripció experimental en cada cas.

Les **masses d'alta resolució** han estat enregistrades a la Universidad de Córdoba i s'han efectuat per impacte electrònic a 70 e.V.

6.1.2.- CROMATOGRAFIA

Les cromatografies en capa prima, CCP, s'han realitzat sobre gel de sílice, concretament sobre cromatofolis Macherey Nagel[Ⓜ] . Els reveladors utilitzats han estat,

- Irradiació amb làmpada d'UV d'una longitud d'ona de 254 nm.
- Sumergint el cromatofoli en una solució aquosa bàsica de $KmnO_4$.

Les cromatografies en columna s'han realitzat emprant gel de sílice Baker® de 240-400 mesh com a fase estacionària, utilitzant nitrogen com a gas impelent i amb el dissolvent o la barreja de dissolvents indicats en cada cas.

[Ⓜ] cromatofolis ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄ 25 unitats de 20X20cm per a CCP, ref 818-133 de Macherey Nagel.

Les **anàlisis elementals** han estat efectuades al Servei d'Anàlisi Química d'aquesta Universitat.

6.1.3.- UTILLATGES GENERALS DE LABORATORI

Les **rotacions òptiques específiques**, $[\alpha]_D$, s'han determinat en un polarímetre Propol Automates, model Dr. Kermchen, utilitzant-se una cubeta de 0.5 cm de longitud per realitzar les mesures.

Els **punts de fusió** han estat determinats en un bloc Kofler de la marca Reicher i no han estat corregits.

Les **microdestil·lacions** han estat realitzades en un microdestil·lador de boles giratòries Buchi, model KRV65/30.

Les **hidrogenacions a pressió** han estat realitzades amb un hidrogenador model Chemipress 80, dissenyat per Trallero&Schlee. Les **hidrogenacions a pressió atmosfèrica** s'han efectuat en un muntatge Parr.

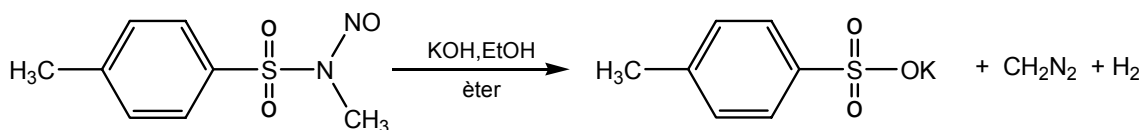
La **liofilització** de les mostres s'ha realitzat en un liofilitzador model Telstar o Virtis, depenent de cada cas, al Departament de Bioquímica d'aquesta Universitat.

Els **dissolvents** han estat utilitzats directament donat que eren d'elevada qualitat[☞], o bé s'han purificat per les metodologies estàndard descrites al Vogel's, *Textbook of practical Organic Chemistry*. Ed. Logman Scientific and Technical, UK, **1989**.

[☞] catàleg de subministres de Scharlab: qualitat Multisolvant p. HPLC, ACS ISO.

6.2.- Síntesi de β -aminoàcids i β -pèptids ciclobutànics

6.2.1.- Preparació del diazometà

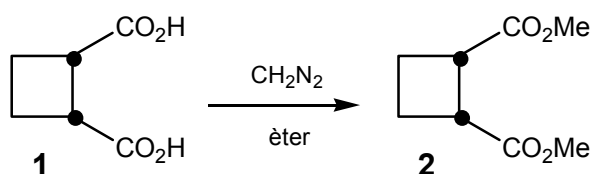


En un erlenmeyer de 100 ml de capacitat es dissolen 2.1 g (10.00 mmols) de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluensulfonamida en 30 ml d'èter. Es refreda a 0°C, i s'hi addicionen 0.4 g (7.1 mmols) de KOH dissolts en 10 ml d'etanol al 96%, tot afegint-hi més etanol si apareix turbidesa.

Es deixa el sistema reposant durant 5-10 minuts a 0°C i, tot seguit, es destil·la la solució etèria de diazometà en un bany d'aigua a 60°C, en absència d'esmerilats i de superfícies rugoses per tal d'evitar la descomposició del diazometà.

Per tal de valorar la concentració de diazometà en la solució resultant, es dissolen 200 mg (1.6 mmol) d'àcid benzoic en 10 ml d'èter anhidre i s'hi addicionen 2 ml de la solució preparada de diazometà. La mescla resultant queda totalment incolora, la qual cosa indica que s'ha destruït tot el diazometà, tot seguit es valora l'excés d'àcid benzoic amb NaOH 0.1 N, utilitzant fenolftaleïna com a indicador. Les dades espectroscòpiques del producte obtingut coincideixen amb les descrites prèviament a la bibliografia.

6.2.2.- Preparació del 1,2-ciclobutandicarboxilat de dimetil, 2



En un erlenmeyer de 250 ml de capacitat proveït d'agitació magnètica es dissolen 500 mg (3.5 mmols, 1 eq) de l'àcid 1,2-ciclobutandicarboxílic, **1**, en 10 ml d'èter. Es destil·la, a 60°C, una solució etèria de diazometà preparada a partir de 7.4 g de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluensulfonamida dissolts en 50 ml d'èter i 1.3 g de potassa dissolts en 30 ml d'etanol. Tot seguit es deixa el sistema tapat i en agitació a temperatura ambient durant uns 20 min. Un cop ha transcorregut aquest temps s'evapora el dissolvent, s'obtenen així 600 mg d'un oli groguenc, que un cop analitzat es correspon amb el 1,2-ciclobutandicarboxilat de dimetil, **2**, amb un rendiment quantitatiu.

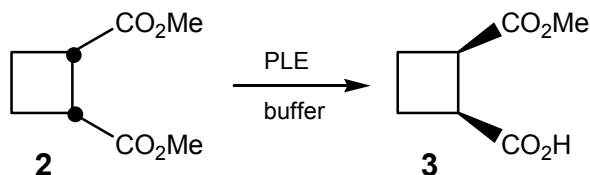
Les dades espectroscòpiques del producte obtingut coincideixen amb les descrites prèviament a la bibliografia.¹¹³

Dades espectroscòpiques

• ¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃): 2.16 (m, 2H, H₃, H₄), 2.34 (m, 2H, H_{3'}, H_{4'}), 3.37 (m, 2H, H₁, H₂), 3.67 (s, 3H, OMe)

¹¹³ M. Martín-Vilà, C. Minguillón, R.M Ortuño; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, *9*, 4291.

6.2.3.- Síntesi de l'àcid 2-metoxycarbonil-(1R,2S)-ciclobutan-1-carboxílic, **3**



En un vas de precipitats de 100 ml de capacitat proveït d'agitació magnètica es dissolen 600 mg (3.5 mmols, 1 eq.) de l'1,2-ciclobutandicarboxilat de dimetil, **2**, en 50 ml de solució tampó preparada a partir de KH_2PO_4 0.1 M a pH=7 i s'hi addicionen 16 mg (247 unitats) de PLE. Es deixa el sistema agitant, a temperatura ambient, durant 7 hores, mentres hom va controlant el pH de la solució amb un pH-metre mantenint-lo neutre mitjançant l'addició de gotes d'una solució aquosa bàsica de NaOH 1M.

Un cop ha transcorregut el temps de reacció, es realitzen 4 rentats amb èter. La fase aquosa s'acidifica amb HCl 2 M fins a pH=2. En aquest punt es realitzen successives extraccions amb AcOEt, s'asseca posteriorment la fase orgànica amb MgSO_4 anhidre i s'evapora la mateixa al rotavapor. D'aquesta manera s'obtenen 495 mg de l'àcid 2-metoxycarbonil-(1R,2S)-ciclobutan-1-carboxílic, **3**, amb un rendiment del 91%.

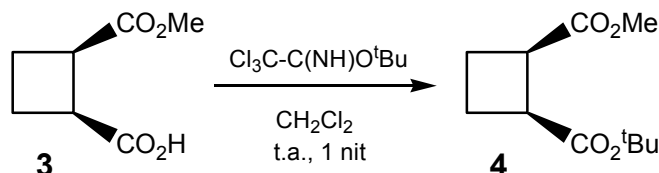
Dades físiques i espectroscòpiques

- **Punt d'ebullició:** 85°C (0.15 mmHg)
- $[\alpha]_D$: -3.6 ($c = 2.36$ en CHCl_3) (lit¹¹⁴ $[\alpha]_D = -3.0$, $c = 2.11$ en CHCl_3)
- **IR (film):** 3002, 2952, 1729 (C=O), 1110 (C=O)
- **¹H-RMN (250 MHz, CDCl_3):** 2.19 (m, 2H, H_3 , H_4), 2.37 (m, 2H, H_3' , H_4'), 3.39 (m, 2H, H_1 , H_2), 3.66 (s, 3H, OMe).
- **¹³C-RMN (62.5 MHz, CDCl_3):** 22.1 (C_3 , C_4), 40.5 (C_1 , C_2), 51.8 (OMe), 173.6 (C=O_{èster}), 179.46 (C=O àcid carboxílic)

¹¹⁴ (a) M. Martín-Vilà, C. Minguillón, R.M. Ortuño; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 4291.

(b) M. Martín-Vilà, E. Muray, G.P. Aguado, A. Álvarez-Larena, V. Branchadell, C. Minguillón, E. Giralt, R.M. Ortuño; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, 11, 3569.

6.2.4.- Síntesi del 2-metoxicarbonil-(1*S*,2*R*)-ciclobutan-1-carboxilat de *tert*-butil, **4**



En un baló de 50 ml de capacitat proveït d'agitació magnètica es dissolen 316 mg (2.0 mmols, 1 eq.) de l'àcid 2-metoxicarbonil-(1*R*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxílic, **3**, en 20 ml de CH₂Cl₂ anhidre i s'hi addicionen 0.7 ml (4.0 mmols, 2 eq.) de tricloroacetimidat de *tert*-butil, comercialment assequible. El sistema es deixa agitant a temperatura ambient durant tota la nit.

L'endemà s'evapora el dissolvent, obtenint-se així un oli espès que es purifica per cromatografia en columna amb suport de gel de sílice Baker® i amb una barreja d'eluent d'hexà-AcOEt en relació 3:1, així s'obtenen 386 mg d'un oli groguenc que s'identifica amb el 2-metoxicarbonil-(1*S*,2*R*)-ciclobutan-1-carboxilat de *tert*-butil, **4**, amb un rendiment del 90%.

Dades físiques i espectroscòpiques

- $[\alpha]_D$: +4.0 ($c = 0.50$, MeOH)
- IR (film): 2967, 1733, (C=O), 1152 (C-O)
- ¹H-RMN (250 MHz, acetona-d₆): 1.42 (s, 9H, O^tBu), 2.16 (m, 2H, H₃, H₄), 2.24 (m, 2H, H_{3'}, H_{4'}), 3.36 (m, 2H, H₁, H₂), 3.64 (s, 3H, OMe).
- ¹³C-RMN (62.5 MHz, acetona-d₆): 21.5 (C₃), 21.7 (C₄), 28.3 (3C, C_{Me}), 40.1 (C₁), 41.4 (C₂), 50.7 (C_{OMe}), 79.6 (C_{4i}, tBu), 172.0 (C=O èster tBu), 173.1 (C=O èster Me)
- Anàlisi elemental
 - Calculat per a C₁₁H₁₈O₄ : C: 61.60% H: 8.50%
 - Experimental : C: 61.53% H: 8.48%