



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Estudos de RMN de ^1H e ^{13}C do Ligante HBHisOMe e seus
Produtos de N-alquilação**

Patrícia Jeremias Giordani

Orientador: Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro

Florianópolis, agosto de 2006.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Marlene Jeremias e Valdemar Giordani, por todo amor, compreensão, e confiança.

Ao meu orientador, Prof. Miguel Soriano Balparda Caro.

As minhas irmãs, cunhados e sobrinhos por toda coragem e força.

Ao amor da minha vida, Eduardo Fagundes, pela paciência e carinho.

Aos melhores amigos do mundo, Clariana, Paola, Michele, Marcio, Diogo, Bruna, Ricardo, Eduardo, Thiago, Alexandre, Roberta, Cíntia e Carolina.

Ao grande amigo Sandro, por toda ajuda nessa etapa tão importante.

Aos queridos professores, Valdir Rosa Correia e Wilson Erbs por todo apoio.

Aos professores e funcionários do departamento de Química, em especial Prof.(a) Maria da Graça, Prof.(a) Iolanda, Prof. Dílson, Prof. Eduardo Pinheiro, Prof. Valdir Soldi, Salete, Nezi, Marilene.

Ao Departamento de Química da UFSM (RS) pela atenção.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	iv
RESUMO.....	v
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	1
1.2 - Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H).....	1
1.3- Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C).....	2
1.4- Ressonância Magnética Nuclear de ^{15}N (RMN ^{15}N).....	3
1.5- Histidina – Racemização e Grupos Protetores.....	3
2- OBJETIVOS.....	8
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
4- CONCLUSÃO.....	26
5- PARTE EXPERIMENTAL.....	27
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
7- ANEXOS.....	32

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 a - Estrutura da Insulina.....	3
FIGURA 1 b - Estrutura da Histamina.....	3
FIGURA 2 - Estrutura da Hemoglobina.....	4
FIGURA 3 - Estrutura do Imidazol.....	4
FIGURA 4 - Estrutura da Histidina.....	5
FIGURA 5 - Esquema da síntese demonstrado por Jones e colaboradores.	5
FIGURA 6 - Estruturas dos grupos protetores BOC e BOM.....	6
FIGURA 7 - Estrutura dos compostos estudados por Zaramella <i>et.al.</i>	7
FIGURA 8 - Estrutura numerada do HBHisOMe.....	9
FIGURA 9 -Espectro de infravermelho (IV) do HBHisOMe em pastilha de KBr.....	9
FIGURA 10 - Estrutura numerada do H ₂ BHisMFF.....	10
FIGURA 11 - Espectro de Infravermelho (IV) do H ₂ BHisMFF em pastilha de KBr.....	10
FIGURA 12 - Estrutura numerada do H ₃ BHis(MFF).....	11
FIGURA 13 - Espectro de Infravermelho (IV) do H ₃ BHis(MFF) ₂ em pastilha de KBr.	11
FIGURA 14 - Estrutura numerada do ligante HBHisOMe.....	13
FIGURA 15 - Espectro de RMN ¹ H do HBHisOMe em DMSO(400 MHz).....	13
FIGURA 16 - Estrutura numerada do ligante HBHisOMe.....	14
FIGURA 17 - Espectro de RMN ¹³ C do HBHisOMe em DMSO(100 MHz).....	14
FIGURA 18 - Estrutura numerada do ligante H ₂ BHisMFF.....	15
FIGURA 19 - Espectro de RMN ¹ H do H ₂ BHisMFF em DMSO (400 MHz).....	15
FIGURA 20 - Estrutura numerada do ligante H ₂ BHisMFF.....	16
FIGURA 21 - Espectro de RMN ¹³ C do H ₂ BHisMFF em DMSO (100MHz).....	16
FIGURA 22 - Estrutura numerada do ligante H ₃ BHis(MFF) ₂	17
FIGURA 23 - Espectro de RMN ¹ H do H ₃ BHis(MFF) ₂ em DMSO(400 MHz).....	17
FIGURA 24 - Estrutura numerada do ligante H ₃ BHis(MFF) ₂ .	18
FIGURA 25 -Espectro de RMN ¹³ C do H ₃ BHis(MFF) ₂ em DMSO (100MHz).....	18
FIGURA 26 - Estrutura numerada do ligante HBHisOMe.....	21
FIGURA 27 - Espectro HMQC do HBHisOMe.....	21
FIGURA 28 - Estrutura numerada do ligante H ₂ BHisMFF.....	22
FIGURA 29 – Ampliação do Espectro HMBC (122-176 ppm) do H ₂ BHisMFF.....	22
FIGURA 30 – Espectro NOESY do ligante HBHisOMe.....	23

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -Principais bandas no IV dos ligantes HBHisOMe, H ₂ BHisMFF, H ₃ BHis(MFF) ₂	12
TABELA 2 – Deslocamento químico (δ) ¹ H (ppm), δ ¹³ C (ppm) dos compostos HBHisOMe, H ₂ BHisMFF, H ₃ BHis(MFF) ₂	19
	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ_{H} - deslocamento químico (RMN ^1H)

δ_{C} - deslocamento químico (RMN ^{13}C)

δ_{N} - deslocamento químico (RMN ^{15}N)

s – singleto

d – dubleto

t – tripleto

m – multipletto

d/d - dubleto, dubleto

d/t– dubleto, tripleto

g – grama

His – histidina

Im – imidazol

RMN – Resonancia Magnética Nuclear

COSY- Espectroscopia de correlações

NOESY- NOE em duas dimensões

INEPT-Aumento da insensitividade do núcleo por transferência de polarização

HMQC- Coerência heteronuclear múltiplo quântica

HMBC- Coerência heteronuclear em ligações múltiplas

RESUMO

A importância de compostos derivados do aminoácido essencial histidina tem estimulado muitos trabalhos em síntese, porém a racemização que ocorre devido a diferença de reatividade dos nitrogênios π e τ do anel imidazólico tem sido um obstáculo na caracterização destes compostos. Com o objetivo de solucionar tal problema muitos trabalhos envolvendo técnicas de Ressonância Magnética Nuclear podem ser encontrados na literatura.

As técnicas de RMN como ^1H e ^{13}C (HMBC, HMQC, NOESY, COSY, INEPT), utilizadas neste trabalho permitiram a caracterização e atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para estudos do ligante HBHisOMe e seus derivados N-alquilados, com eficiência.

Porém a posição da segunda alquilação no $\text{N}\pi$ ou $\text{N}\tau$ não pode ser determinada com absoluta certeza pelas técnicas de RMN usadas.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear fundamenta-se no fato de núcleos que possuem uma distribuição não homogênea de massa e carga, e, portanto momento de spin nuclear (I) diferente de zero, em condições apropriadas, sob influência de um campo magnético, absorverem radiação eletromagnética (rf), em uma frequência regida pelas características estruturais destes núcleos.

Essa frequência absorvida por um certo núcleo, é fortemente afetada pelo seu ambiente químico, ou seja, pequenos campos magnéticos locais, geralmente opostos ao campo aplicado, são gerados pelos elétrons que circulam ao redor do núcleo dando origem à blindagem diferenciada dos núcleos, a qual resulta em diferenças de deslocamentos químicos, fenômeno que torna essa técnica poderosa na identificação e determinação estrutural de substâncias.^{1,2}

1.2 - Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H)

Dentre os núcleos utilizados em RMN, ^1H ($I=1/2$) é largamente utilizado pela sua elevada abundância natural (99,9%). Os núcleos de hidrogênio em uma molécula são blindados fracamente pelas nuvens eletrônicas que os cercam, cuja densidade varia com o ambiente químico no qual o núcleo está inserido e dá origem a absorção em diferentes posições no espectro.

Dados muito importantes são obtidos através de relações simples como a número de sinais do espectro com o número de grupos diferentes de átomos de ^1H , e a relação entre a intensidade dos sinais do espectro com o número de átomos H em cada grupo. Outro aspecto importante em RMN é a interação entre spins nucleares de átomos vizinhos não equivalentes originando o acoplamento de spin que é independente do campo magnético aplicado. Esse acoplamento causa o desdobramento dos sinais de RMN, que traduz o ambiente dos prótons responsáveis pela absorção. A diferença de frequência (Hz) entre os componentes desdobrados do sinal é denominado constante de acoplamento (J), é e um indicativo da diferença entre os núcleos acoplados.

Uma ferramenta importante na espectroscopia de RMN é o Efeito Overhauser Nuclear (NOE) que se manifesta através da diminuição da intensidade dos sinais de núcleos com spin diferente de zero e próximos espacialmente (até 4 Angstroms). As técnicas instrumentais usadas para avaliar este efeito podem ser mono ou bidimensionais. A técnica 1D mais usada é a que consiste na subtração do espectro convencional de ^1H a um espectro em que um hidrogênio em particular é irradiado com a finalidade de eliminar o NOE, podendo-se então medir a interação entre o núcleo de ^1H irradiado e outros distantes até 4,0Å. Este procedimento é muito versátil para distinção de isômeros geométricos. A técnica em 2D usual é o NOESY, no qual são visualizadas todas as interações NOE na molécula.^{1,2}

1.3- Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C)

O núcleo de ^{12}C ($I=0$) não é magneticamente ativo para RMN, porém o ^{13}C , assim como ^1H possui $I=1/2$. Apesar da abundância natural do ^{13}C ser de apenas 1,1%, o aprimoramento da técnica e a disponibilidade de instrumentação pulsada com transformada de Fourier (FT) que permite a irradiação simultânea de todos os núcleos ^{13}C resultou em um acréscimo da atividade na espectrometria de ^{13}C no início dos anos 1970.

O uso do desacoplamento de banda larga ou irradiação dos hidrogênios é muito importante para RMN pois elimina o problema de sobreposição dos sinais pelo acoplamento $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ que dificulta a interpretação dos espectros.

Com a ausência de acoplamento tem-se um único sinal agudo para cada átomo de ^{13}C não-equivalente. O sinal em RMN de ^{13}C também é intensificado pela eliminação do NOE.

Os deslocamentos químicos de ^{13}C estão na faixa de 240 ppm e estão relacionados principalmente com a hibridação e com a eletronegatividade dos substituintes.

O acoplamento direto de spin $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ variam de 110 a 320 Hz, tornando-se maior quanto maior o caráter σ da ligação $^{13}\text{C}-^1\text{H}$, com distorção angular e com a presença de grupos substituintes eletroatraentes. Os valores de constante de acoplamento (J) entre os núcleos está intimamente relacionado com a natureza das ligações em que os respectivos átomos participam.^{1,2}

1.4- Ressonância Magnética Nuclear de ^{15}N (RMN ^{15}N)

A espectroscopia de Nitrogênio pode ser de grande ajuda na identificação de compostos nitrogenados. Ambos isótopos ^{14}N e ^{15}N tem spin diferente de zero. A presença de momento quadrupolar no ^{14}N faz com que o alargamento dos seus sinais de RMN dificulte muito a análise dos seus espectros. O ^{15}N , com $I=1/2$, fornece espectros com linhas finas, mas tem como desvantagem a baixa abundância natural (0,37%) aliada a uma também baixa sensibilidade ao método.

Como resultado destas características deste isótopos, os experimentos de RMN de ^{15}N com amostras na abundância natural, são conduzidos geralmente na forma de detecção indireta (HMBC; INEPT), nos quais usa-se a transferência de polarização H-N.

Os deslocamentos químicos e acoplamentos ^{15}N - ^1H seguem os mesmos princípios observados na espectroscopia de ^{13}C .^{1,2}

1.5- Histidina – Racemização e Grupos Protetores

A histidina é um aminoácido essencial que ocorre em proteínas e peptídeos biologicamente ativos como, por exemplo, corticotropina e insulina (Figura 1-a). Destaca-se ainda pelo seu papel fundamental em várias funções biológicas como a produção de histamina (responsável pelo estímulo do sistema imunológico), liberação de enzimas digestivas e formação da mielina (responsável pela comunicação entre o corpo e o cérebro) (Figura 1-b).

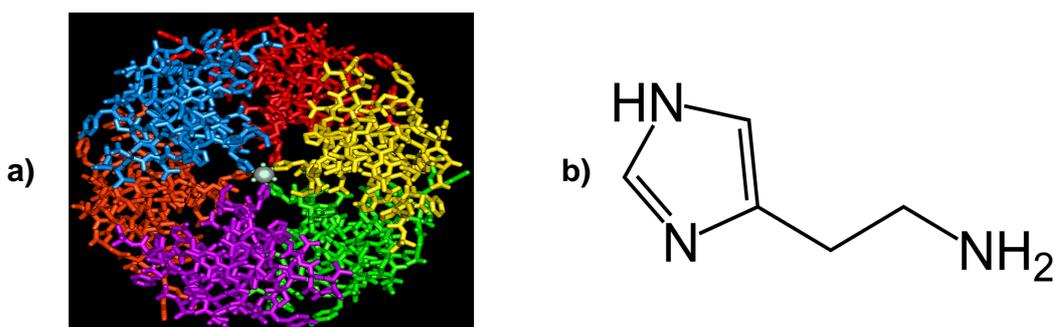


Figura 1- a) Estrutura esquemática da Insulina; b) Estrutura da Histamina

O resíduo de aminoácido histidina tem importância relevante no efeito catalítico de várias enzimas, permitindo que atue como ácido ou base em pH neutro. O anel imidazólico quando parte da cadeia lateral, funciona como ligante em relação a metais de transição em várias metaloenzimas de importância biológica, incluindo a superoxide dismutase, hemoglobina, hidrolases entre outras.³

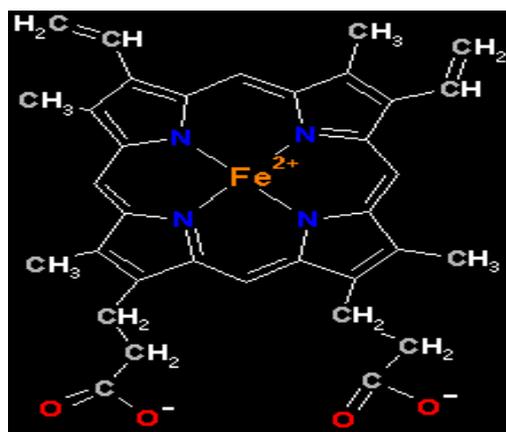


Figura 2 – Estrutura Esquemática da Hemoglobina

A importância de compostos que contenham histidina ou seus derivados tem estimulado o “design” e a síntese de vários modelos, que possam mimetizar algumas de suas propriedades. No entanto, a cadeia lateral do imidazol (básica e nucleofílica) cria sérias dificuldades na incorporação da histidina sem proteção, podendo facilitar a racemização durante a síntese de peptídeos.⁴ (Figura 3).

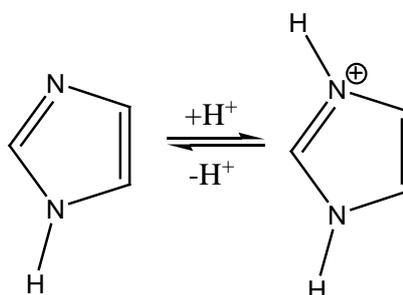


Figura 3 – Protonação do Imidazol em solução aquosa ácida.⁵

Na literatura, a proteção de cadeias laterais da histidina é relatada de maneira bastante confusa, em muitos casos a diferença entre os dois nitrogênios

imidazólicos (π e τ) é ignorada (Figura 4).

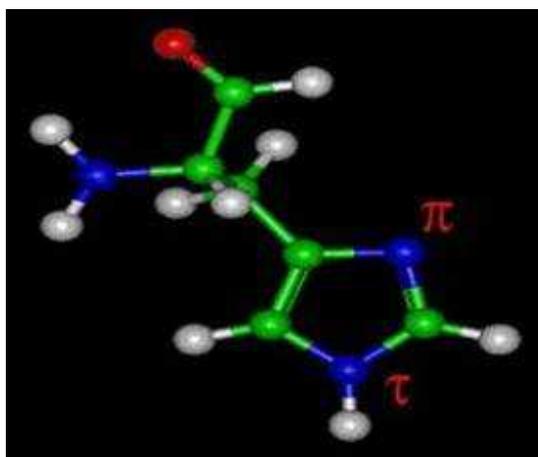


Figura 4 – Estrutura esquemática do aminoácido Histidina.⁶

O fato dos nitrogênios terem reatividade similar influencia principalmente nas reações de alquilação, podendo ser obtidos tanto produtos monossustituídos (π ou τ) como também produtos dissustituídos (π e τ), o que constitui um interessante problema de análise estrutural. Jones⁷ e colaboradores. Utilizaram vários agentes alquilantes e em todos os casos obteve uma mistura de produtos N-alquilados.

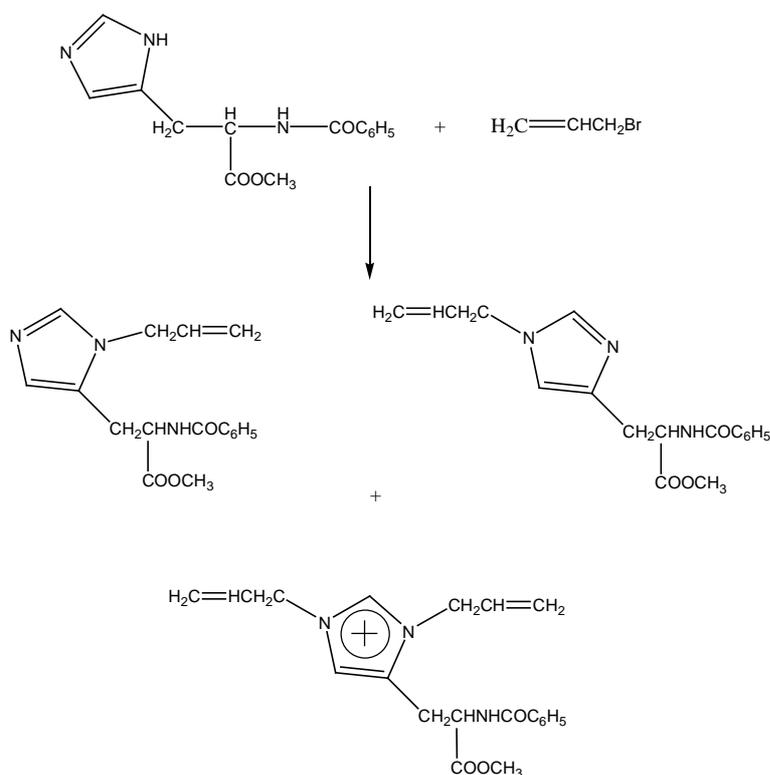


Figura 5 – Esquema de síntese demonstrado por Jones⁷.

Isto tem estimulado o desenvolvimento de muitos grupos protetores nas últimas décadas. Um exemplo é o BOM (benziloximetil), projetado por Jones⁸ e colaboradores, para uma introdução seletiva na posição π , que posteriormente foi confirmada por análise cromatográfica e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Um outro exemplo é o 2,6-DMBZ (2,6-dimetoxibenzoil), uma proteção acilada desenvolvida durante a síntese de biopolímeros contendo imidazol, cuja posição (π ou τ) não foi claramente revelada devido ao regioisomerismo demonstrado por RMN, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Espectroscopia de Massas (EM).



Figura 6 - Estruturas dos grupos protetores usados por Jones⁸.

Entretanto, a maioria dos compostos derivados da histidina foram propostos sem um conhecimento definitivo da posição dos grupos protetores. Conhecer a posição desses grupos no anel imidazólico é então relevante, pois o nitrogênio π pode facilitar o processo de racemização de peptídeos.

Vários métodos para a diferenciação desses isômeros contendo derivados da histidina foram testados por Rapoport⁹ e colaboradores. Experimentos usando uma série de compostos 1-metil-4,5-dialquilimidazóis com o auxílio de técnicas como EM, Espectroscopia de Ultravioleta (UV) e Espectroscopia de Infravermelho (IV) foram testadas, porém os resultados obtidos não foram satisfatórios. Outro método aplicado para a diferenciação destes compostos foi então a espectroscopia de RMN com base na magnitude das constantes de acoplamento dos hidrogênios no anel imidazólico.

Apesar desta tentativa ter sido avaliada a mais satisfatória dentre as técnicas testadas, ela pode gerar dúvidas quanto a posição. As constantes de acoplamento para os derivados analisados são muito próximas, variando entre 1,1

a 1,5Hz (τ -substituído) e 0,9 a 1,0Hz (π -substituído), dificultando a diferenciação, principalmente no caso de estruturas mais complexas. A sobreposição de sinais dos hidrogênios também dificulta a aplicabilidade desse método.

Um método de maior aplicabilidade foi estudado por Zaramella¹⁰ e *colaboradores.*, que publicaram em 2003 o primeiro trabalho sobre correlação heteronuclear ^1H - ^{15}N com RMN para diferenciação da posição de grupos protetores em derivados de histidina.

Usando compostos propriamente qualificados foram realizadas medidas diretas do núcleo, onde a correlação entre os hidrogênios (β) e o nitrogênio (π) do anel imidazólico foram usadas para determinar as estruturas, com base no fato de que o sinal do nitrogênio substituído do imidazol aparece sempre com menor deslocamento químico que o nitrogênio não-substituído, a posição do grupo protetor foi facilmente deduzida.

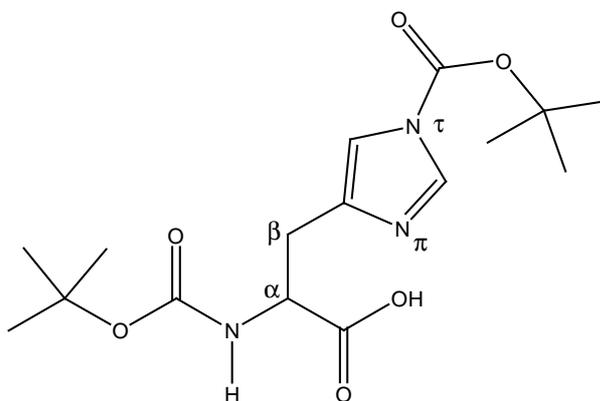


Figura 7 – Estrutura do composto estudado por Zaramella⁴ *et. al.*

Sveshnikov¹¹ e *colaboradores*, também desenvolveram um trabalho semelhante, por RMN de ^{15}N , na identificação de isômeros estruturais de tetrazóis alquilados e derivados, porém os resultados obtidos mostraram ambigüidade em alguns casos, não sendo possível a determinação.

2- OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo a aplicação de técnicas modernas de RMN na atribuição de sinais de RMN de ^1H e ^{13}C do ligante HBHisOMe e seus derivados de N-alquilados, uma vez que os dados da literatura deixam dúvidas sobretudo no relativo aos carbonos não hidrogenados.

Com base nestas atribuições e experimentos de NOESY, será abordada a problemática da identificação da posição da N-alkilação, tão largamente discutida na literatura, com o objetivo de atingir um nível maior de conhecimento na identificação destes produtos.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterizações preliminares

Os ligantes HBHisOMe, H₂BHisMFF, H₃BHis(MFF)₂ utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo Prof. Antonio Carlos Joussef e doutorando Sandro Mireski. As sínteses, purificações quando necessárias, e as caracterizações preliminares de identificação como ponto de fusão (PF), Espectroscopia de Infravermelho (IV) (Figuras 6,7,8) e análise elementar (CHNS) foram realizadas antes deste estudo segundo Mireski e colaboradores.¹²

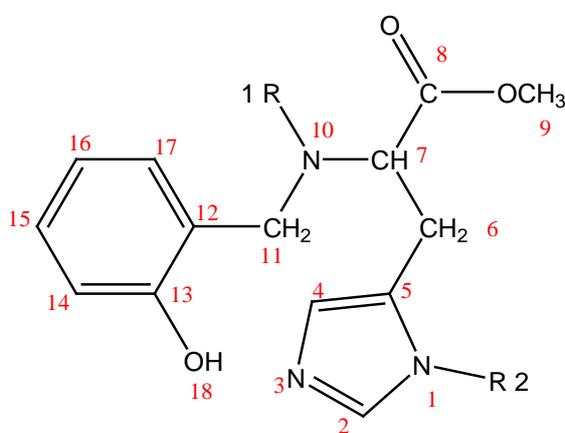


Figura 8 - Estrutura numerada do HBHisOMe.

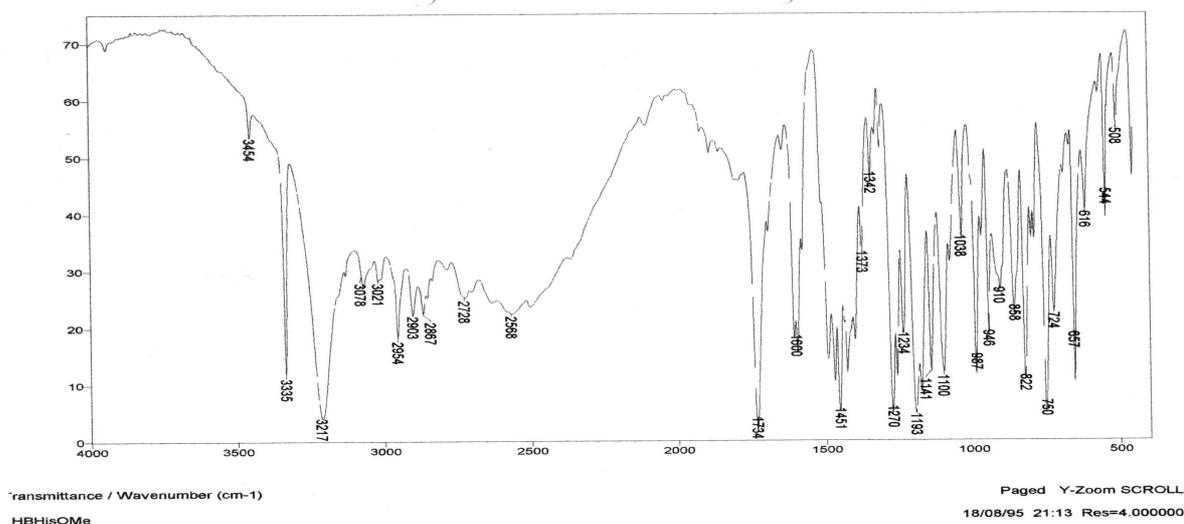


Figura 9- Espectro de infravermelho (IV) do HBHisOMe em pastilha de KBr.

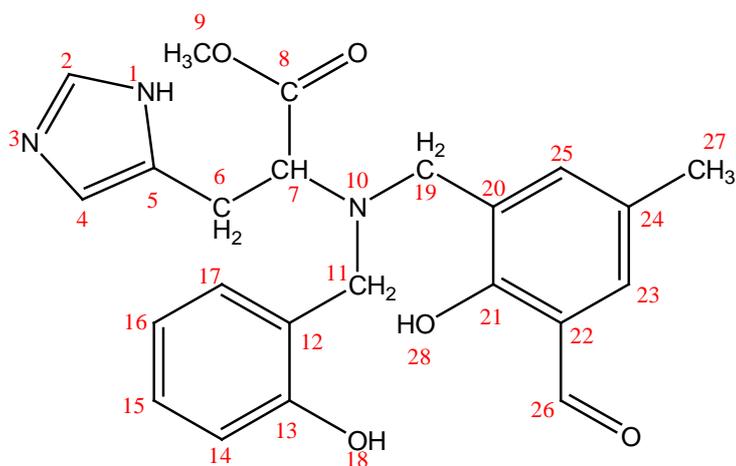


Figura 10- Estrutura numerada do H₂BHisMFF.

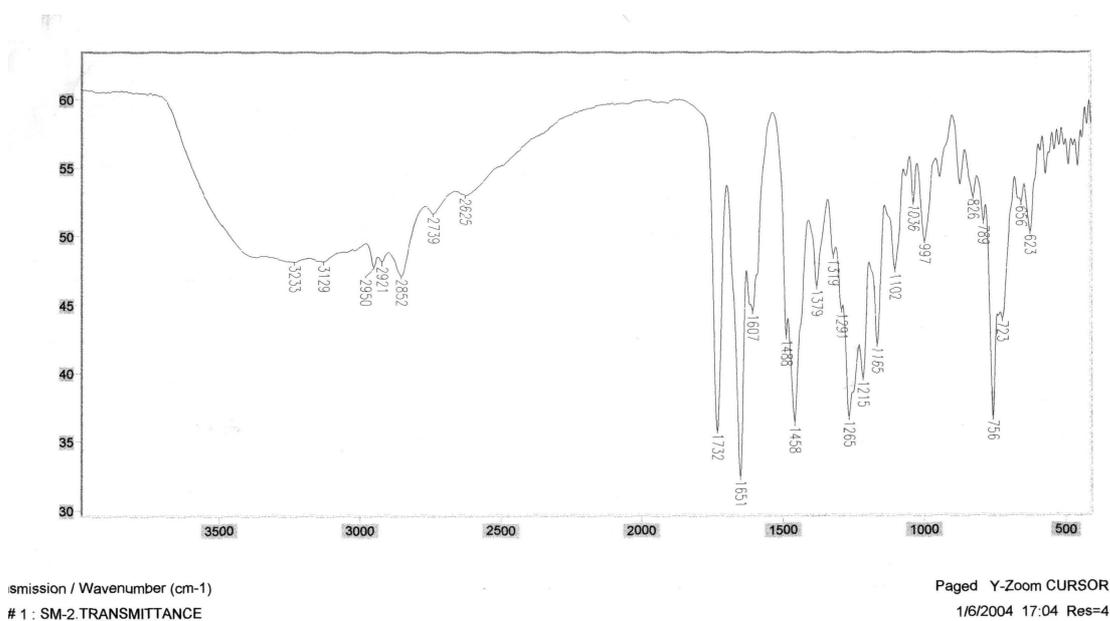


Figura 11- Espectro de infravermelho (IV) do H₂BHisMFF em pastilha de KBr

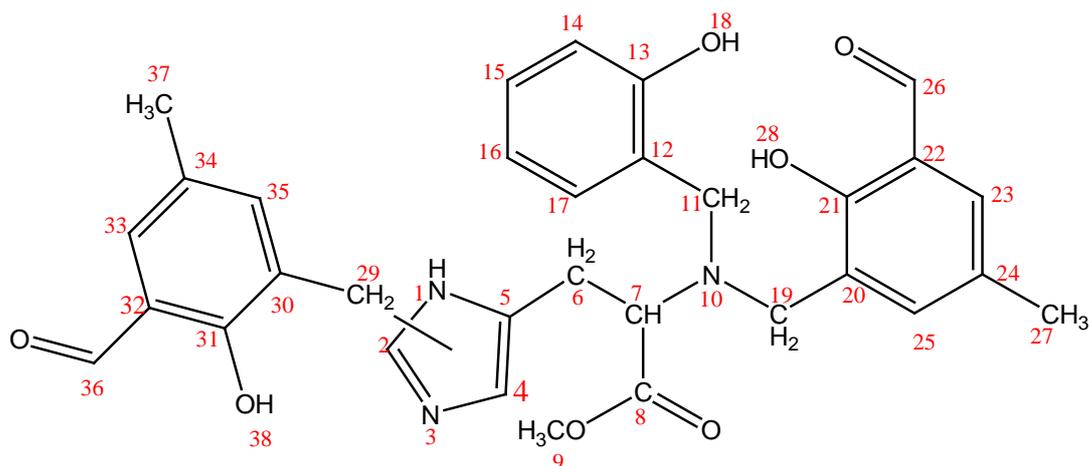
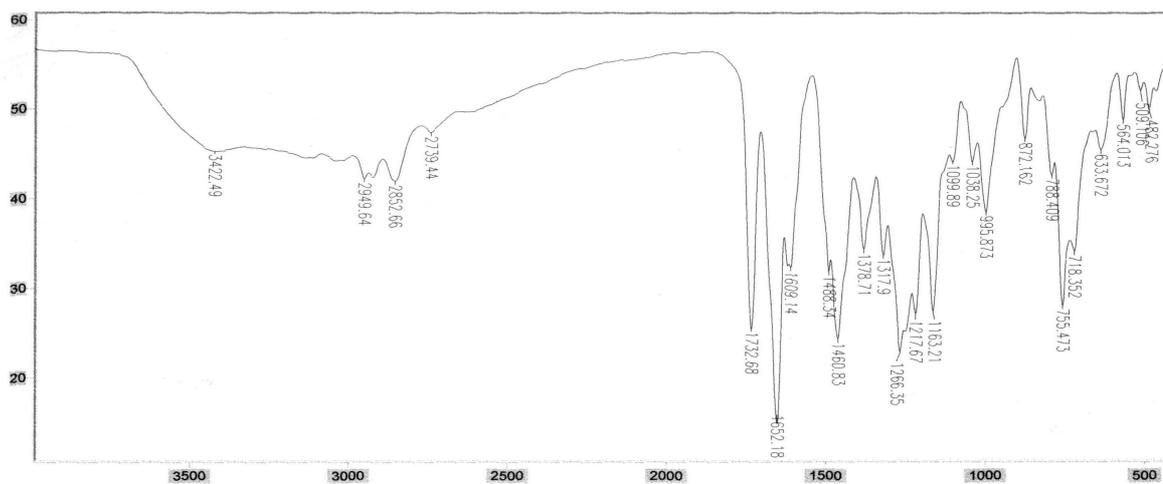


Figura 12- Estrutura numerada do $H_3BHis(MFF)_2$.



smission / Wavenumber (cm-1)
1 : M0320.TRSMITTANCE

Paged Y-Zoom CURSOR
13/4/2004 15:49 Res=4

Figura 13- Espectro de infravermelho (IV) do $H_3BHis(MFF)_2$ em pastilha de KBr

TABELA 1- Principais bandas no IV dos ligantes.

HBHisOMe		H ₂ BHisMFF		H ₃ BHis(MFF) ₂	
Posição (cm ⁻¹)	Atribuição	Posição(cm ⁻¹)	Atribuição	Posição(cm ⁻¹)	Atribuição
3335	v (NH) _{amina}	3124	v(NH)		
3250	v (NH) _{lm}	2950	v(CH) Ar	2949,64	v(CH) Ar
1734	v (C=O) _{éster}	2854	v(CH) Ar	2852,66	v(CH) Ar
1379	δ (OH)	1734	v(C=O) _{éster}	1733	v(C=O) _{éster}
3335	v (NH) _{amina}	1652	v(C=O) _{aldeíd}	1652,18	v(C=O) _{ald}
3250	v (NH) _{lm}	1606	v(COO-)	1609	v(COO-)
-	-	1458	v(COO-)	1460	v(COO-)
-	-	1380	δ(OH)	1379	δ(OH)
-	-	1166	δ(OCH ₃)	1163	δ(OCH ₃)
-	-	756	(Ar) _o -substituído	755,43	(Ar)

As bandas que aparecem na região de 1734 cm⁻¹ são características do estiramento C=O da carbonila do éster e estão presentes nos três espectros.

Em comparação aos espectros de IV dos três compostos, a intensidade da banda em 1651 cm⁻¹ atribuída ao aldeído, que não aparece no espectro do HBHisOMe, aparece nos espectros dos compostos H₂BHisMFF e muito mais intensa no espectro do H₃BHis(MFF)₂ confirmando a segunda alquilação, assim como as bandas em 1458 cm⁻¹ atribuídas ao estiramento OCH₃ que aparecem nos espectros dos compostos H₂BHisMFF e H₃BHis(MFF)₂.

Estudos por RMN

Através das técnicas de RMN utilizadas obteve-se os espectros de ¹H e ¹³C apresentados abaixo, sendo possível a atribuição dos deslocamentos

químicos encontrados (¹³C e ¹H) para os compostos HBHisOMe, H₂BHisMFF, H₃BHis(MFF)₂ listados na tabela 2.

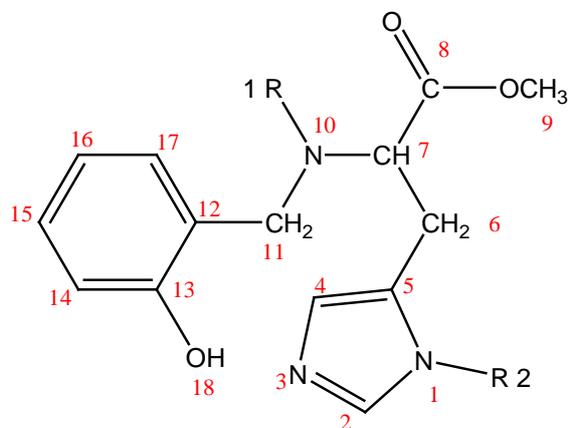


Figura 14 – Estrutura numerada do ligante HBHisOMe

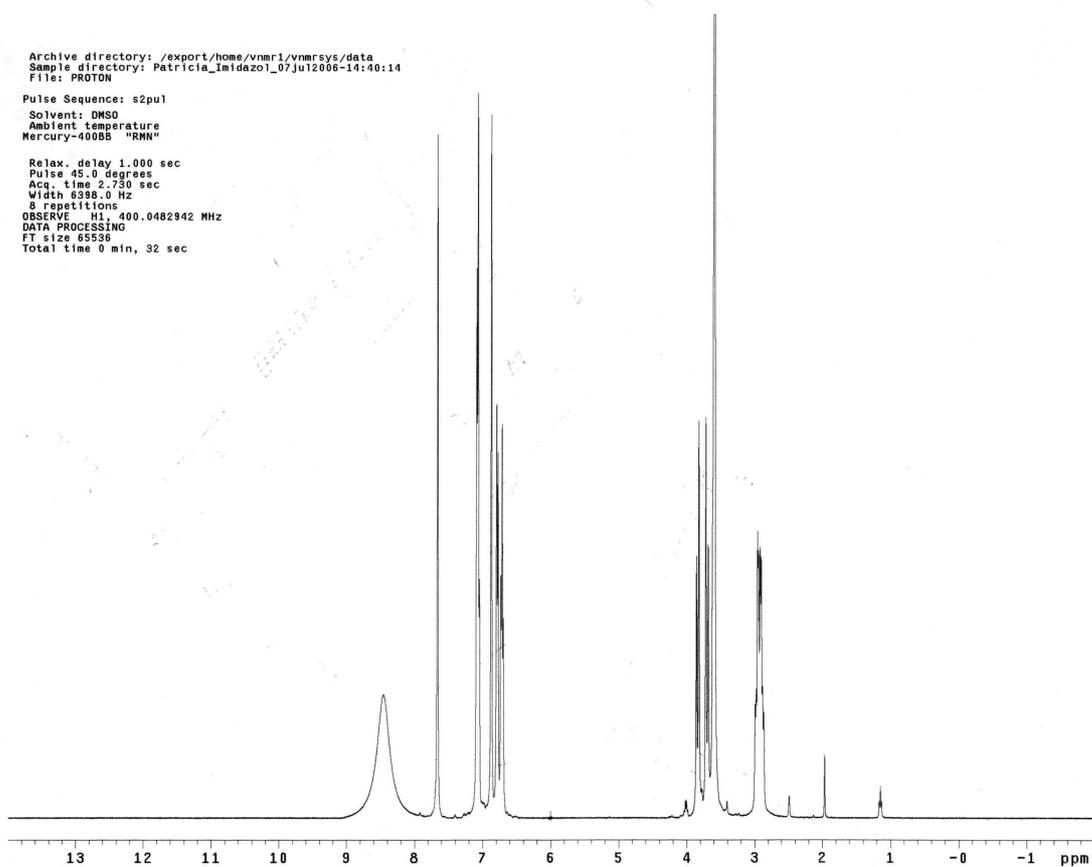


Figura 15- Espectro de RMN ^1H do HBHisOMe em CDCl_3 (400MHz).

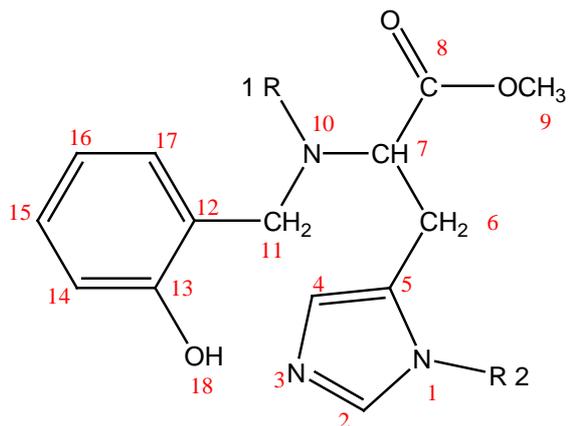


Figura 16 – Estrutura numerada do ligante HBHisOMe

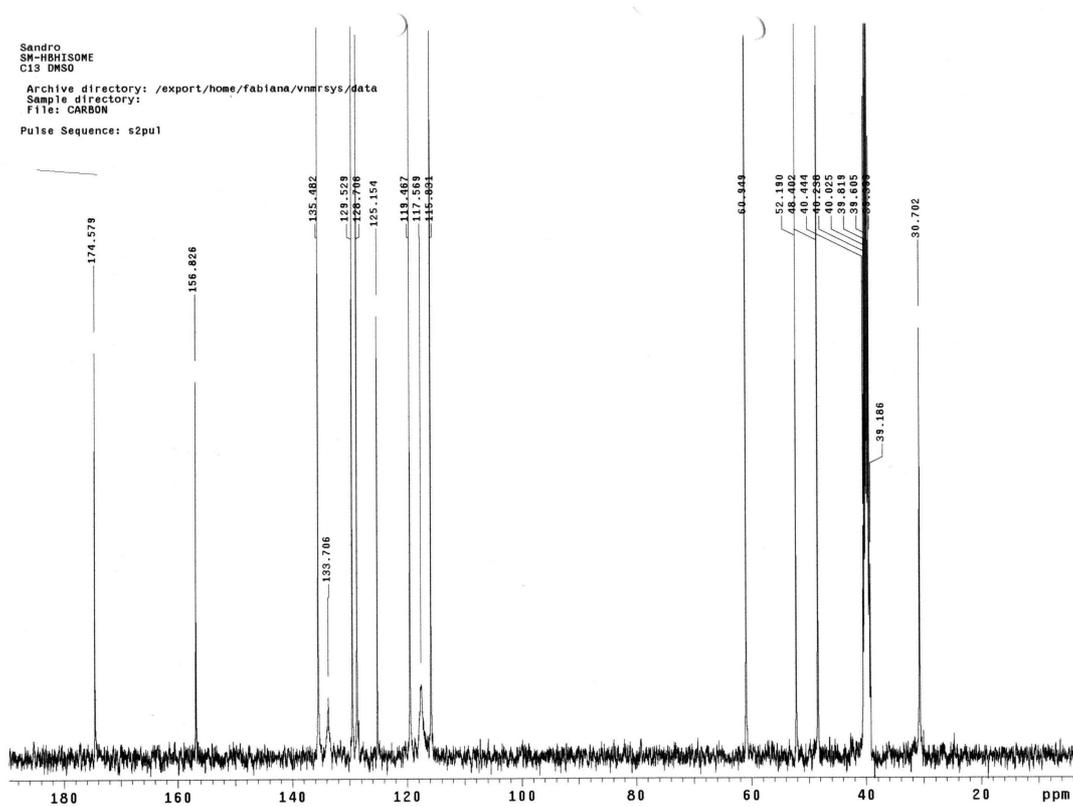


Figura 17- Espectro de RMN ¹³C do HBHisOMe em CDCl₃ (100MHz).

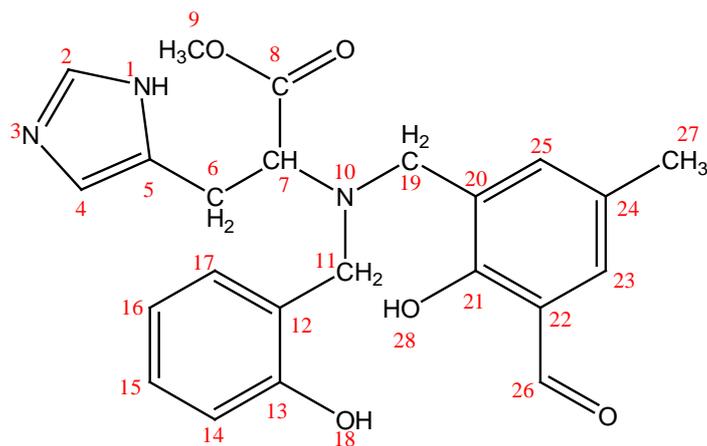


Figura 18– Estrutura numerada do ligante H₂BHisMFF

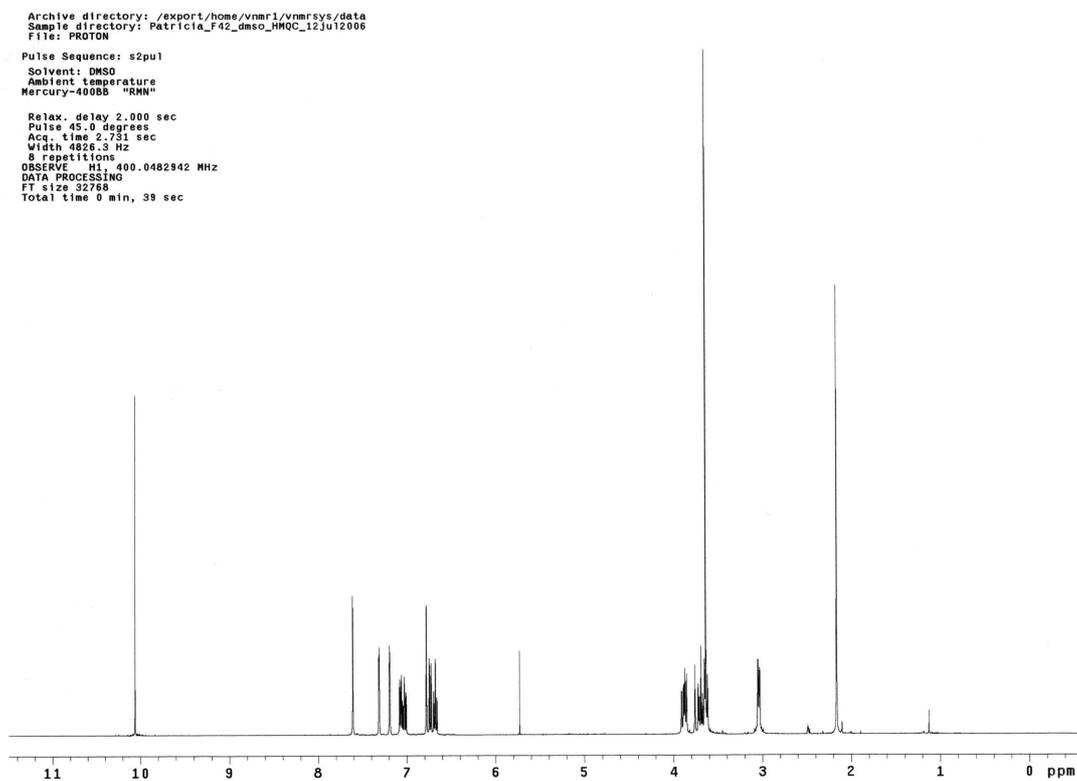


Figura 19- Espectro de RMN ¹H do H₂BHisMFF em CDCl₃ (400MHz).

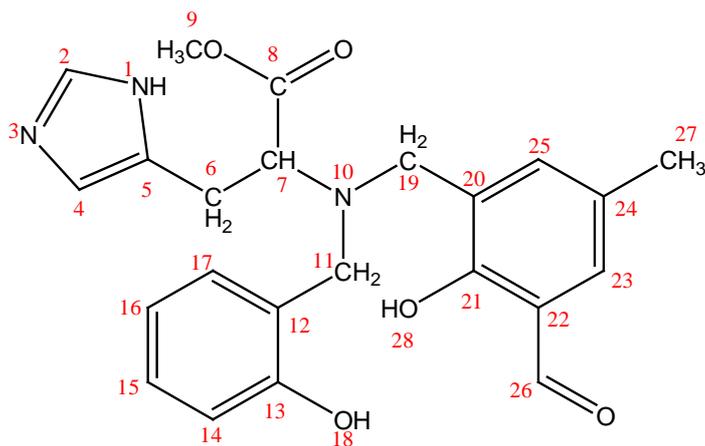


Figura 20 – Estrutura numerada do ligante H₂BHisMFF

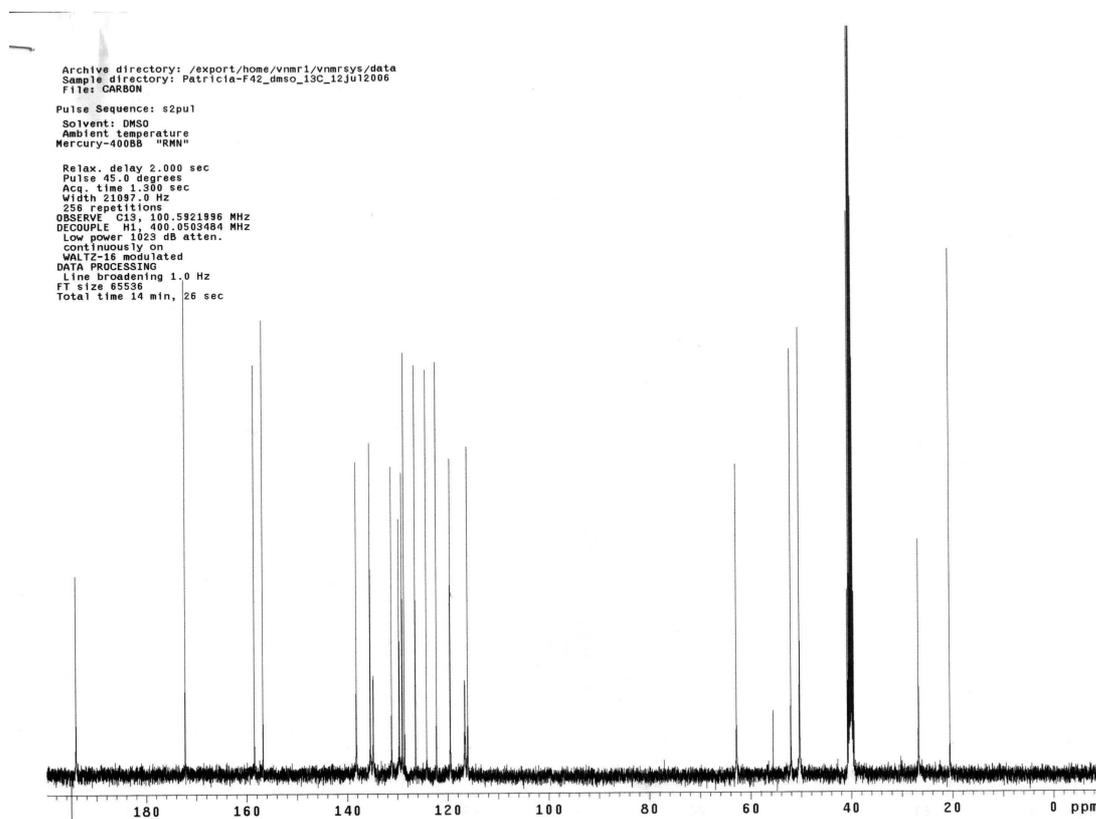


Figura 21- Espectro de RMN ¹³C do H₂BHisMFF em CDCl₃ (100MHz).

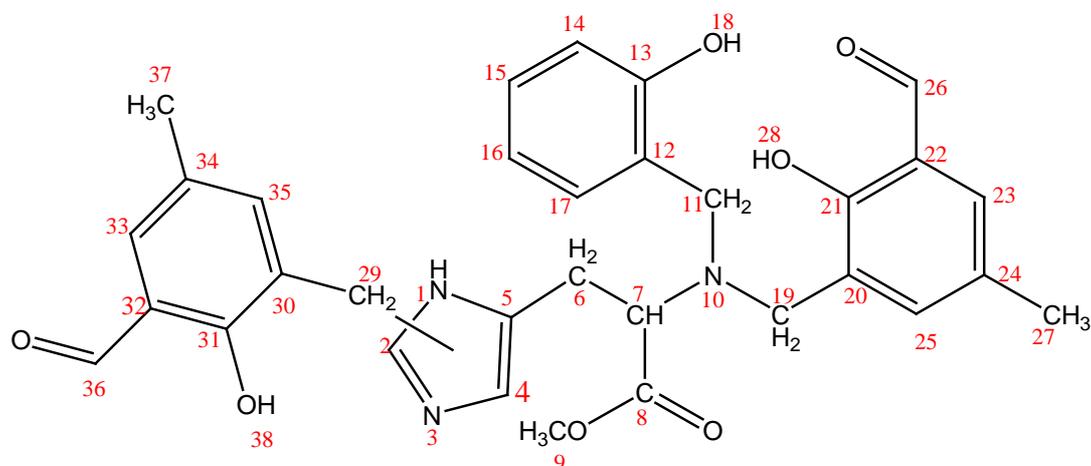


Figura 22– Estrutura numerada do ligante $\text{H}_3\text{BHis}(\text{MFF})_2$

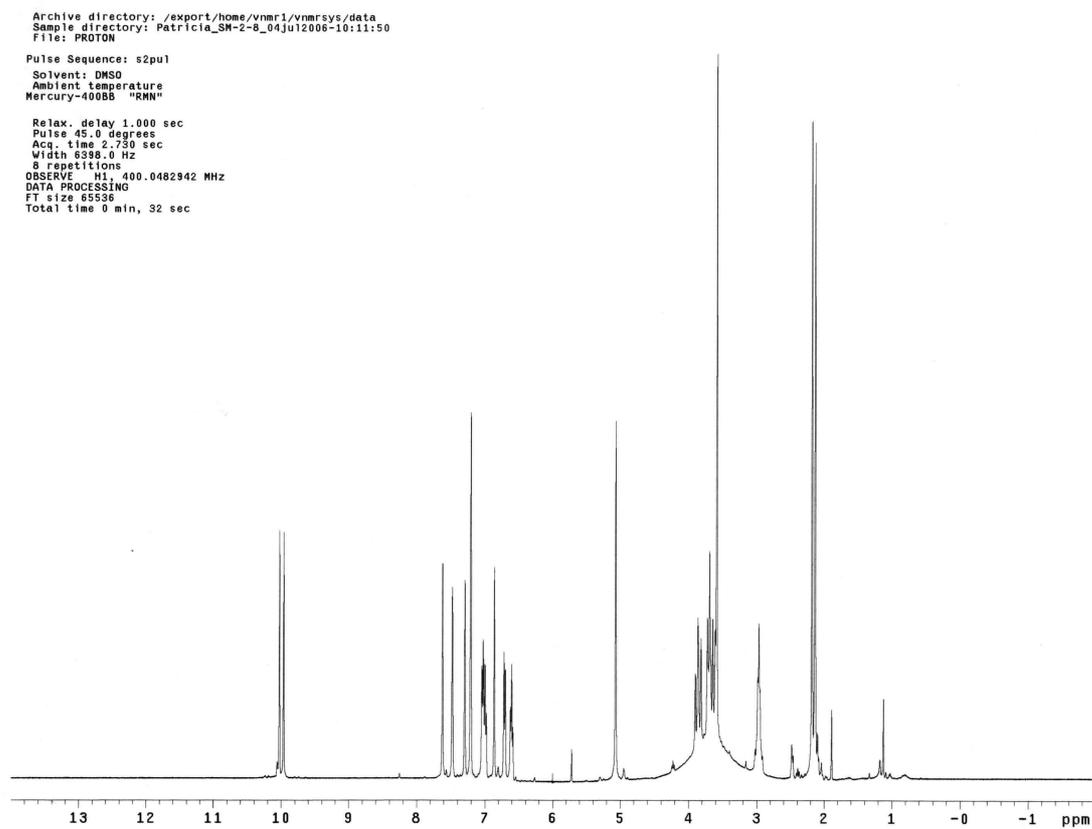


Figura 23 - Espectro de RMN ^1H do $\text{H}_3\text{BHis}(\text{MFF})_2$ em CDCl_3 (400MHz).

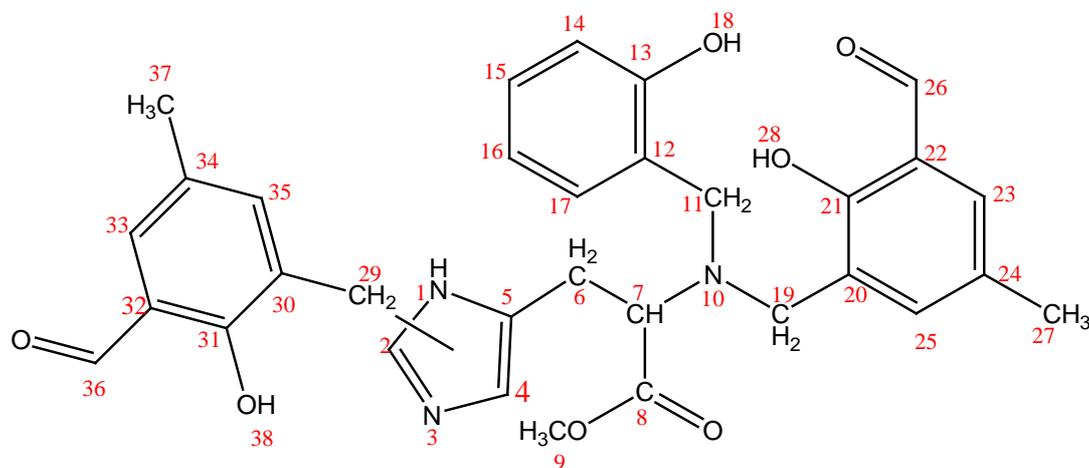


Figura 24– Estrutura numerada do ligante $H_3BHis(MFF)_2$

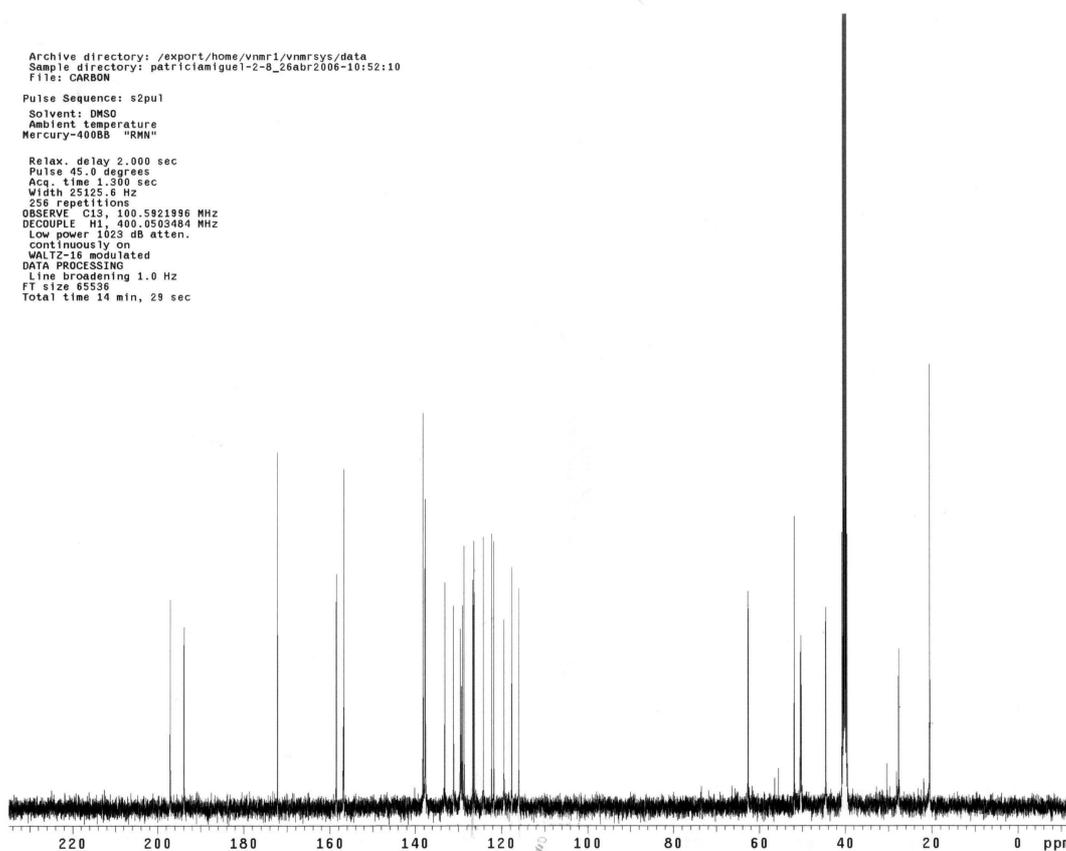


Figura 25 - Espectro de RMN ^{13}C do $H_3BHis(MFF)_2$ em $CDCl_3$ (100MHz).

Tabela 2 - δ ^1H (ppm) δ ^{13}C (ppm) dos compostos HBHisOMe, H₂BHisMFF, H₃BHis(MFF)₂

	R ₁ = R ₂ = H		R ₁ = H R ₂ = MFF		R ₁ = R ₂ = MFF	
	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H
1	-	8,5	-	-	-	-
2	135	7,66	135,6	7,60	137,64	7,22
3	-	-	-	-	-	-
4	118	6,86	116,6	6,78	116,0	6,71
5	133	-	134,82	-	133,13	-
6	31	2,90	26,69	3,04	27,60	2,96
7	64	3,60	62,84	3,70	62,66	3,70
8	173	-	172,21	-	172,21	-
9	52	3,60	52,05	3,64	52,00	3,60
10	-	8,5	-	-	-	-
11	49	3,7 -3,9	50,32	3,68 + 3,88	50,30	3,70 + 3,88
12	116,84	-	124,19	-	124,15	-
13	157,14	-	156,76	-	156,75	-
14	116	6,8	119,48	6,68	119,6	6,61
15	128	7,1	129,05	7,0	129,2	7,00
16	120	6,7	116,04	6,73	117,60	6,87
17	130	7,1	131,62	7,08	131,05	7,48
18	-	8,5	-	-	-	-
19	-	-	50,32	3,74 + 3,90	50,2	3,65 + 3,85
20	-	-	126,38	-	126,40	-
21	-	-	158,48	-	158,51	-
22	-	-	128,61	-	128,80	-
23	-	-	129,60	7,32	129,60	7,32
24	-	-	122,20	-	122,23	-
25	-	-	138,20	7,1	138,16	7,22
26	-	-	194,11	10,1	193,89	9,87
27	-	-	20,55	2,15	20,00	2,15
28	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	44,30	5,08
30	-	-	-	-	126,56	-

31	-	-	-	-	156,20	-
32	-	-	-	-	129,26	-
33	-	-	-	-	133,8	7,48
34	-	-	-	-	121,75	-
35	-	-	-	-	137,71	7,61
36	-	-	-	-	197,12	-
37	-	-	-	-	20,43	2,20
38	-	-	-	-	-	-

Em sistemas aromáticos, a atribuição de sinais carbonos não-protonados constitui um problema. Nos sistemas estudados, a presença de vários substituintes em diferentes anéis torna trabalhosa a identificação dos mesmos.

As técnicas usadas, desenvolvidas nos últimos anos tais como HMBC e HMQC foram de enorme valia, visto que aumentam grandemente a precisão do trabalho de atribuição deste tipo de sinais.

Os picos característicos dos deslocamentos de ^{13}C , atribuídas a carbonila do éster, na região de 172 ppm, e aos carbonos do imidazol na região de 116 e 134 ppm aparecem nos espectros dos três compostos. Os picos característicos dos deslocamentos $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-OH}$ aparecem na região de 156 a 158 ppm, com um sinal no espectro do HBHisOMe, dois sinais no espectro do $\text{H}_2\text{BHisMFF}$, e três sinais no espectro do $\text{H}_3\text{BHis(MFF)}_2$, assim como os deslocamentos característicos da carbonila dos aldeídos (em torno de 194 ppm) aparecem nos espectros dos compostos $\text{H}_2\text{BHisMFF}$ (um sinal) e $\text{H}_2\text{BHis(MFF)}_2$ (dois sinais) confirmando a segunda alquilação.

Da análise do espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 a 400MHz do ligante HBHisOMe (Figura 12), observa-se na região de 8,5 ppm um singleto largo proveniente dos deslocamentos químicos de ^1H dos hidrogênios da ligações N-H e O-H, entre 6,5 e 8,0 ppm os hidrogênios ligados a carbonos sp^2 e na região de 2,5 a 4,0 ppm os hidrogênios ligados a carbonos sp^3 .

Da análise dos deslocamentos químicos e integração destes espectros é possível fazer algumas atribuições preliminares. As mesmas foram confirmadas pelo espectro bidimensional COSY.

Da mesma forma, o espectro de RMN de ^{13}C a 100MHz (Figura 11) mostra quatorze sinais, indicando que não há coincidência de deslocamentos químicos.

Através do experimento de duas dimensões HMQC onde são relacionados os carbonos com os hidrogênios com os quais acoplam diretamente ($^1J_{C-H}$), levando assim a atribuição dos carbonos hidrogenados da molécula. (Figura 23). Para exemplificar será mostrada o espectro HMBC do ligante HBHisOMe.

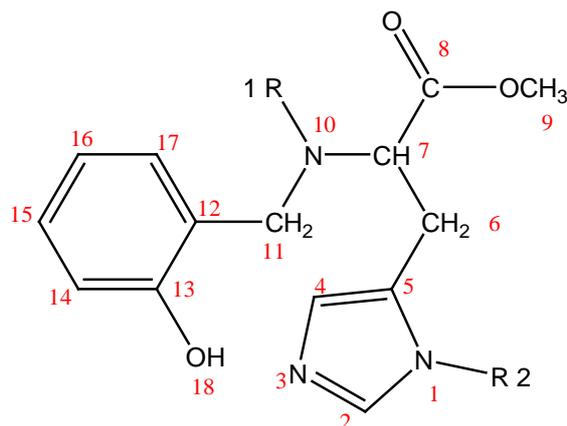


Figura 26 - Estrutura numerada do HBHisOMe.

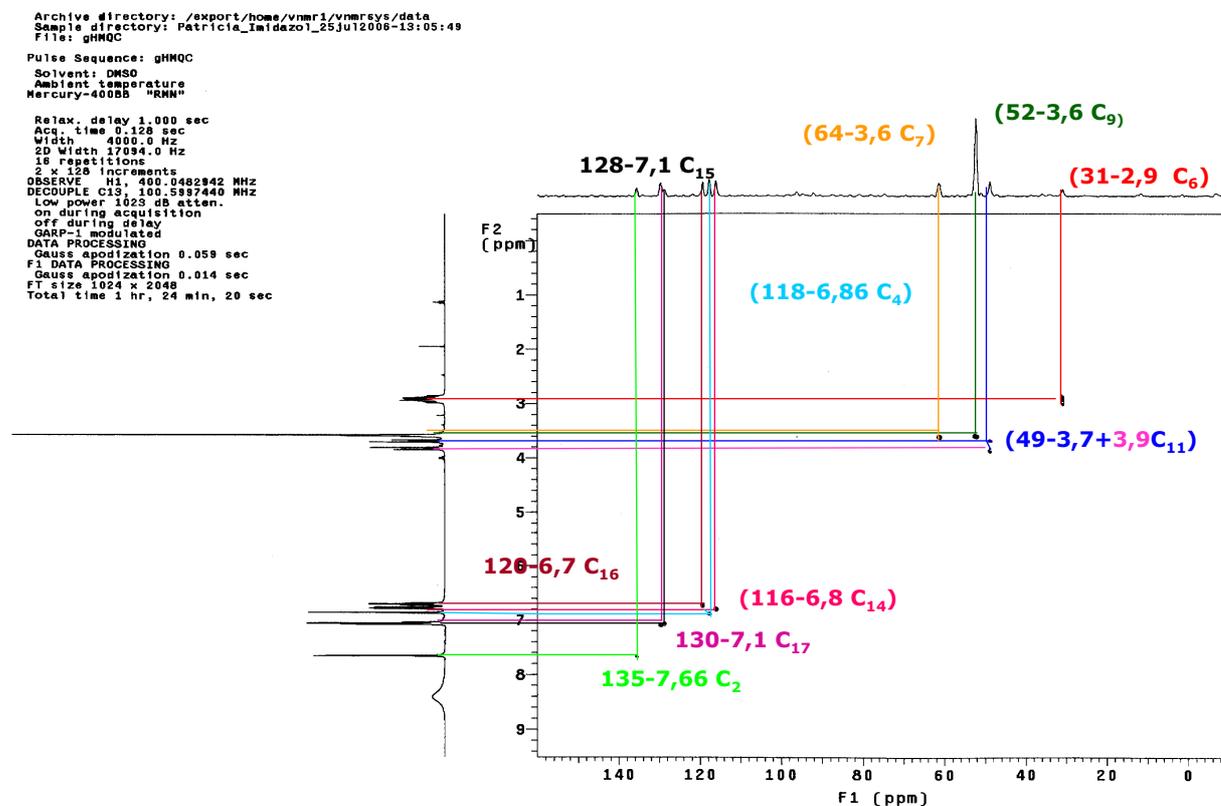


FIGURA 27- Espectro HMQC do ligante HBHisOMe.

Para a atribuição dos carbonos não hidrogenados foi necessário um outro tipo de experimento heteronuclear de duas dimensões, HMBC (Figura 24), que mostra os acoplamentos $^nJ_{C-H}$ ($n>1$). Deste modo é possível atribuir com certeza os sinais destes carbonos. Para exemplificar será mostrada uma região (122 – 176 ppm) do espectro HMBC do ligante H₂BHisMFF.

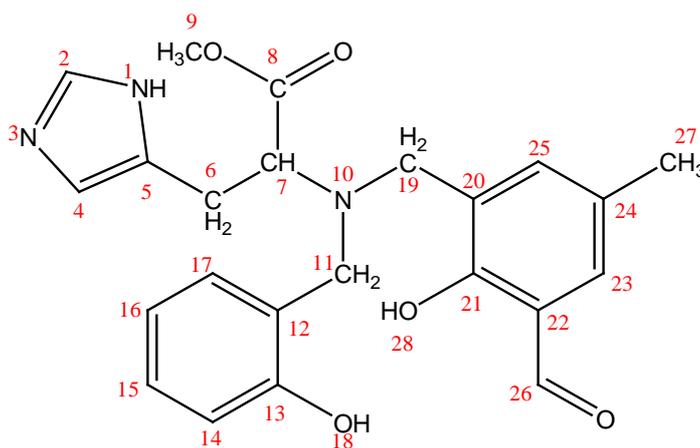


Figura 28 – Estrutura numerada do ligante H₂BHisMFF

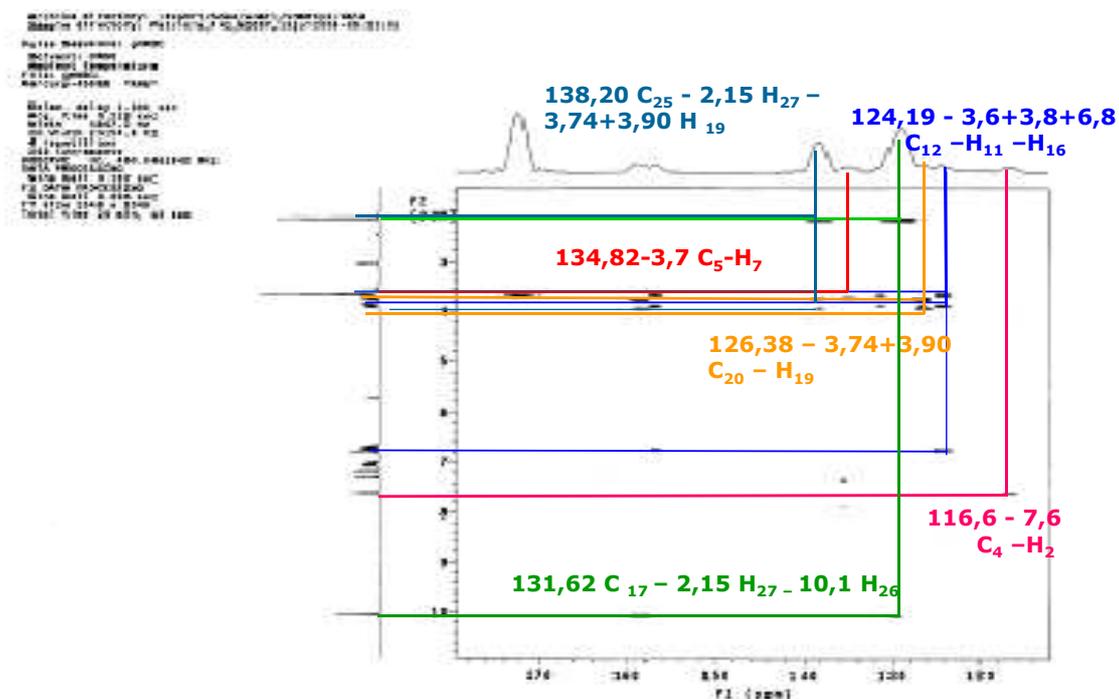
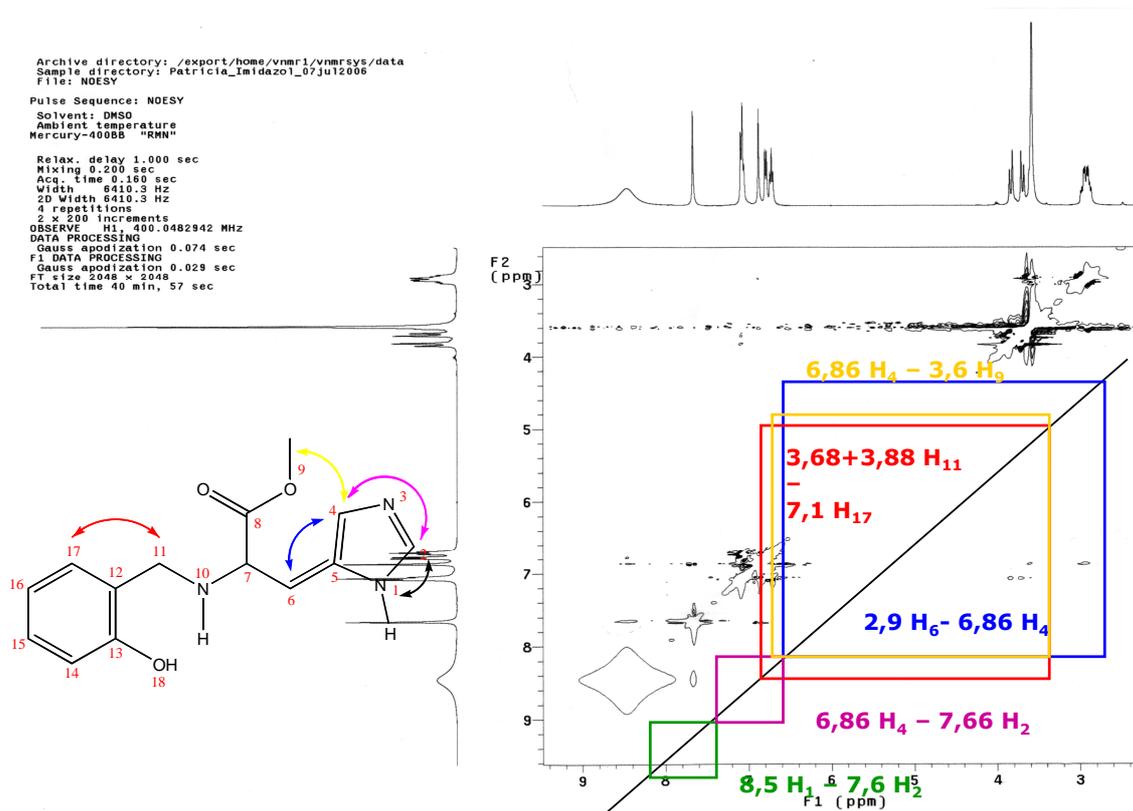


Figura 29 – Ampliação HMBC (122 – 176 ppm) do ligante H₂BHisMFF.

Para confirmar as atribuições feitas, o experimento de RMN ^1H -2D NOESY forneceu as relações espaciais entre hidrogênios próximos. Desta forma fica exemplificada a sistemática adotada para atribuição dos produtos de N-alkilação (Tabela 2). Como exemplo será mostrado o espectro NOESY do ligante HBHisOMe.

Figura 30 - Espectro NOESY do HBHisOMe.



Outros espectros de correlação para exemplificação das atribuições estão em anexo.

A dificuldade na atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C destes sistemas fica evidente quando na análise dos espectros do composto mono-alkilado ($\text{H}_2\text{BHisMFF}$) o deslocamento químico dos hidrogênios dos dois $-\text{CH}_2$ (C_{11} , C_{19}) benzílicos ligados ao nitrogênio da amina (N_{10}), ficaram muito próximos, enquanto os deslocamentos químicos dos seus carbonos foram idêntico. Isto impossibilita a atribuição tanto por COSY como por HMQC destes hidrogênios e carbonos.

A técnica usada para resolver este problema foi o HMBC, que fornece os acoplamentos $^n\text{J}_{\text{H-C}}$ ($n=2-3$). Da análise do espectro obtido por esta técnica foi possível estabelecer que ambos hidrogênios de cada $-\text{CH}_2$ eram diferentes (por serem diastereotópicos), enquanto seus carbonos eram isócronos, isto é, não são equivalentes, apenas tem deslocamentos químicos coincidentes.

Com esta técnica foi possível diferenciar cada par de hidrogênios dos grupos $-\text{CH}_2$ (C_{11} e C_{19}) através de seus acoplamentos $^2\text{J}_{\text{C-H}}$ e $^3\text{J}_{\text{C-H}}$ com carbonos dos anéis aromáticos aos quais estão ligados.

Os dados de atribuição do ligante HBHisOMe e seus produtos de N-alquilação mostrados na tabela 2, permitem tirar algumas conclusões em relação ao comportamento espectroscópico dos mesmos:

1. A partir dos espectros de ^{13}C e ^1H pode ser observado que apesar do grupo alquilante ser volumoso não houve uma alteração significativa dos deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H no esqueleto do HBHisOMe.
2. Através dos deslocamentos observados pode-se afirmar que apesar de existir uma competição entre a N-alquilação e a O-alquilação, ocorre somente a N-alquilação, confirmada pelo deslocamento do C_{29} em 50,28 ppm (Ver 3).
3. A coincidência de deslocamento químico de ^{13}C do $-\text{CH}_2$ benzílico do agente alquilante (C_{19}) no produto mono-alquilado ($\text{H}_2\text{BHisMFF}$) com o $-\text{CH}_2$ do ligante (C_{11}) leva a sugerir fortemente que ambos estão ligados ao mesmo tipo de átomo de nitrogênio (amina). A pequena diferença de deslocamento químico observado no RMN de ^1H para estes mesmos grupos pode ser atribuída a um efeito estéreo muito pequeno.
4. Quando acontece a segunda alquilação observa-se o aparecimento de um $-\text{CH}_2$ em 44 ppm o que indica que este $-\text{CH}_2$ benzílico do agente alquilante (C_{29}) está em um ambiente químico diferente do $-\text{CH}_2$ (C_{19}), proveniente da primeira alquilação (ver 3), sugerindo que este está ligado a um tipo diferente de nitrogênio, isto é, no anel imidazólico.
5. A literatura descreve que a alquilação ocorre provavelmente no N π , porém espera-se uma variação nos deslocamentos químicos e acoplamentos vistos por HMBC, o que não foi observado nos experimentos, sendo possível atribuir a alquilação como ocorrendo no N τ .

Devido ao fato de as constantes de acoplamento ^1H - ^1H não se mostrarem de real valor na elucidação estrutural, conforme o descrito por Rapoport ⁶, elas não serão apresentadas. As variações observadas em cada tipo de hidrogênio, ($\text{H}_{\text{alifático}}$ $^2\text{J}_{\text{Gem}}$ em 13 a 14 Hz, $^3\text{J}_{\text{vicinal}}$ em 6 a 7,4 Hz e $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ^3J em 7,2 a 8,4 Hz e $\text{H}_{\text{heteroaromáticos}}$ ^4J em 1,0 Hz), não foram significativas.

A informação relevante usada neste trabalho foi a qualitativa: isto é, a existência ou não de acoplamento H – H e H – C assim como interações de NOE, como será apresentado a seguir:

Deslocamentos químicos de O-H e N-H:

- HBHisOMe – sinal largo em 8,5 ppm
- Compostos Mono e Di-alquilados sinal longo na base dos sinais de O-CH₃ e N-CH₂

Uma maneira mais eficaz de se revelar essa posição da N-alquilação seria por RMN de ^{15}N . Espectros de ^{15}N –1D foram obtidos com formamida 90% e também com piridina d-6 100%. Porém, quando realizados com soluções saturadas dos compostos objetos deste estudo não se obteve nenhum sinal após 60 h. Isto devido à baixa abundância natural do nitrogênio (0,37%) e a baixa sensibilidade para o método.

Experimentos de INEPT (detecção indireta N-H) realizados com a formamida também foram bem sucedidos. Neste tipo de experimento também não obtivemos sinal dos nossos compostos contendo N-H.

Os experimentos de HMBC que segundo a literatura se mostra o mais adequado não puderam ser realizados até o momento por problemas de configuração do equipamento do nosso Departamento e por defeito no sintetizador de frequência do equipamento da UFSM (RS).

4- CONCLUSÃO

Através dos estudos realizados pôde-se atribuir com certeza os deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H dos compostos HBHisOMe, $\text{H}_2\text{BHisMFF}$, $\text{H}_3\text{BHis(MFF)}_2$.

Os dados de deslocamento químico de ^1H e ^{13}C assim como os experimentos de NOE confirmam que a primeira alquilação ocorre no nitrogênio amínico (N10), sendo assim a N-alquilação preferencial a O-alquilação no sistema estudado.

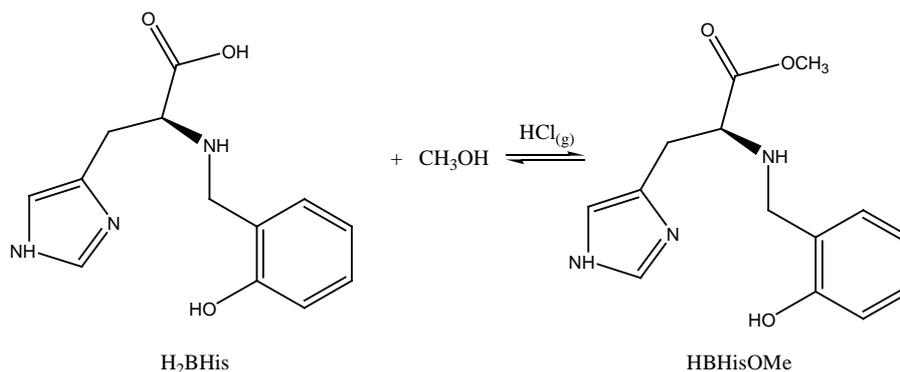
Pode-se afirmar que a segunda alquilação ocorre no anel imidazólico, N (π ou τ) a posição exata do substituinte alquílico não pode ser determinada com certeza por nenhuma das técnicas utilizadas, devido as mínimas variações dos deslocamentos químicos encontrados, e ao fato de ausência de NOE não excluir a possibilidade de proximidade espacial.

Devido à baixa abundância natural e baixa sensibilidade à técnica, do nitrogênio, e apesar de realizar as medidas com solução saturada de composto em DMSO, não foi possível obter os espectros de ^{15}N , tanto por detecção direta como indireta.

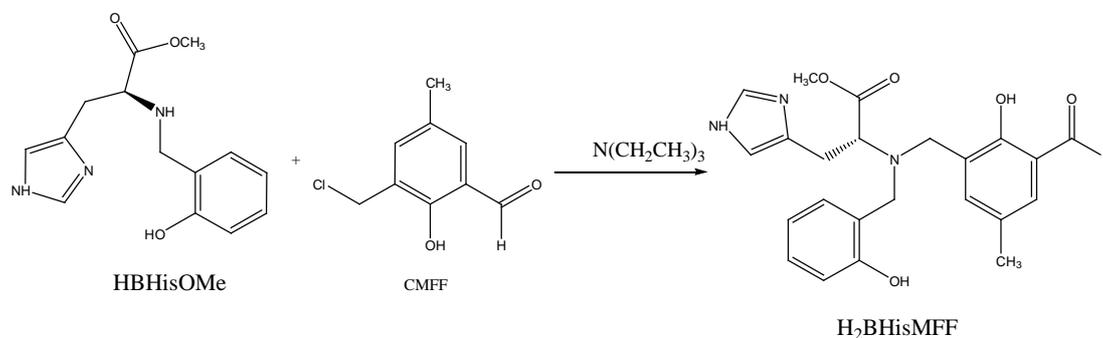
5- PARTE EXPERIMENTAL

Os ligantes utilizados para os estudos foram previamente sintetizados por Mireski e colaboradores, conforme os esquemas abaixo:

Esquema 1– síntese do HBHisOMe.



Esquema 2- Reação de alquilação do HBHisOMe.



Adicionado lentamente uma solução contendo 2,2g de HBHisOMe (60mL de THF) e 2,2 mL de trietilamina (TEA) sobre uma solução CMFF (30mL de THF) sob agitação e a 0°C. Após a adição, retirou-se o banho de gelo e deixou-se a mistura reacional sob agitação por 1:30h a temperatura ambiente. A fase orgânica foi concentrada em rotaevaporador e novamente redissolvida em diclorometano. A fase orgânica foi lavada com uma solução aquosa saturada de cloreto de Amônio (NH₄Cl), seca com sulfato de sódio, filtrada, obtendo-se uma solução de cor amarela intensa. Concentrado em rotaevaporador e colocado em bomba de alto vácuo, obtendo-se um foam amarelo.

A purificação do produto foi realizada em coluna de sílica, utilizando como eluente a mistura de solventes Acetato de etila/Hexano (7:3). Os ligantes HBHisOMe, H₂BHisMFF e H₃BHis(MFF)₂ foram isolados em 60%, 25% e 10% de rendimento respectivamente.

Preparação das Amostras

Os experimentos de RMN foram realizados com 60 mg de HBHisOMe, H₂BHisMFF e H₂BHis(MFF)₂ que foram dissolvidos em 0,7mL de DMSO d₆ (CIL) e colocados em tubos de 5 mm de diâmetro.

As medidas foram realizadas em espectrômetro Varian Mercury Plus, magneto de 9,4 Tesla, operando a 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C a temperatura ambiente (19 °C). as condições de cada experimento estão relatadas abaixo:

RMN ¹H

- Pulso = 45°
- Memória = 64K
- N° de repetições = 8
- Janela espectral = 16 ppm
- d1 = 1s

RMN ¹³C

- Pulso = 45°
- Memória = 64K
- N° de repetições = 256
- Janela espectral = 16 ppm
- d1 = 1s

COSY

- $d1 = 1\text{ s}$
- $nt = 4$
- $ne = 128$
- Memória = 2K
- Janela espectral = 16 ppm

NOESY

- $d1 = 1\text{ s}$
- $nt = 4$
- $ne = 200$
- Memória = 2K
- Janela espectral = 16 ppm
- Tempo de mistura = 0,2s

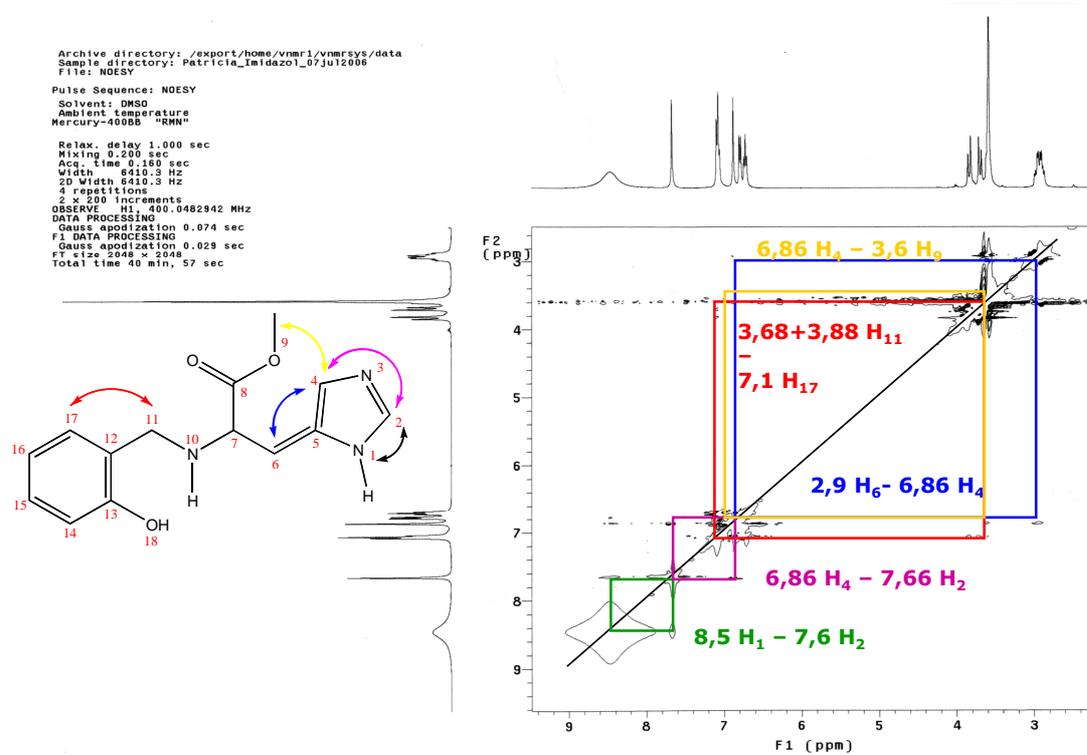
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SILVERSTEIN, R.M., **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6.Ed. LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 2000, p 136-276.
2. GIL, V.M.S, GERALDES, C.F.G.C., **Ressonância Magnética Nuclear**, 1 Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 1987, p 3-395.
3. MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYER, P.A., RODWELL, V.W., **Harper's Illustrated Biochemistry**, 26 Ed., McGraw-Hill Medical, New York, 2003, p. 14-60.
4. JONES, J. H. **The Chemical Syntesis of Peptides (International Series of monogrphs on chemistry)**. New York: Oxford University Press, n. 23, 1991.p. 89-89.
5. ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C.; JOHNSON, C. R.; LEBEL,N. A.; STEVENS, C. L. **Química Orgânica**. 2. ed., Editora Guanabara Dois S.A., Rio de Janeiro, 1979. p. 707-707.
6. SOLE, R. V. **Current Research: Evolution of complex networks and Astrobiology**. Disponível em: <<http://complex.upf.es/~ricard/histidine.gif>>. Acesso em: 10/03/2006, 08:05:00.

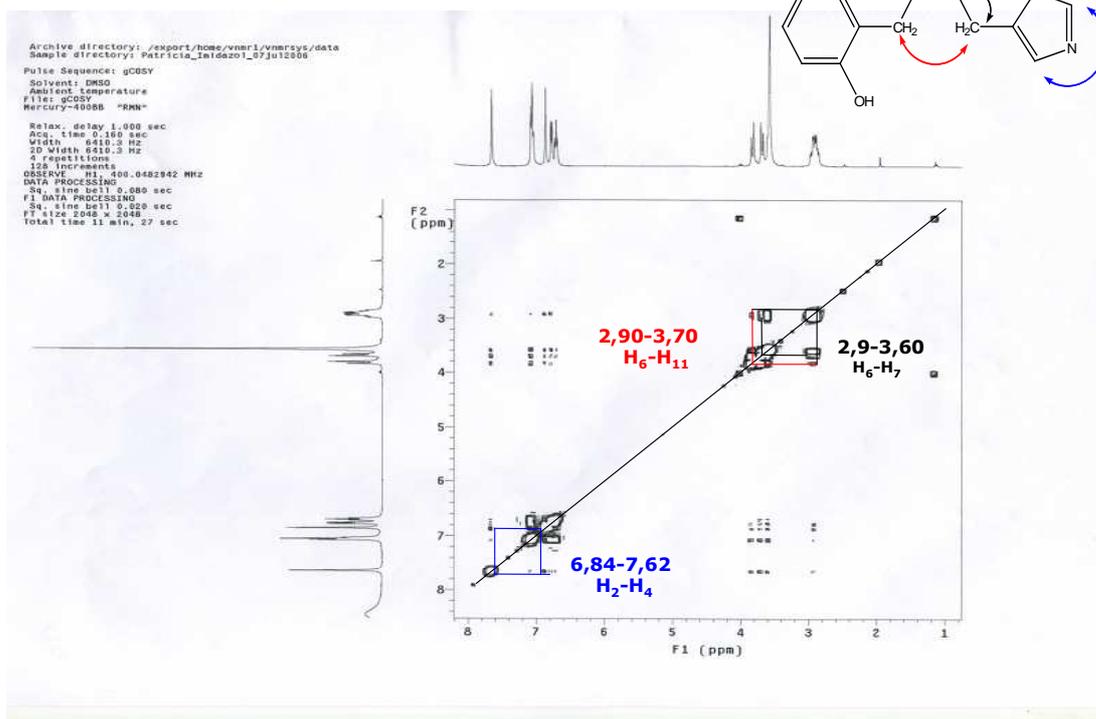
7. JONES, J. B. **Canadian Journal of Chemistry**, 1971, 49, p 3012 – 3019.
8. BROWN, T., JONES J. H. **J.C.S. CHEM. COMM**, 1981, 648-649.
9. MATTHEWS H. R., RAPOPORT, H. **Journal of the American Chemical Society**, 1973, 95, p.2297-2303.
10. ZARAMELLA, S., STROMBERG, R., YEHESKIELY, E. **Journal Organic Chemistry**, 2003, 68,19, p. 2454-2461.
11. SVESHNIKOV, N.N., NELSON, J.H., **Magnetic Resonance in Chemistry**, 1997, 35, p. 209-212.
12. MIRESKI, S.L., **Síntese e caracterização de ligantes derivados do aminoácido histidina para formação de complexos modelos estruturais e/ou funcionais de metaloenzimas**. Tese de conclusão de curso, Departamento de Química, UFSC, 2004, p. 7-50.
13. RODANSZKY, M. **Side Reactions in Peptide Synthesis**, 1981, 333-344.
14. COLOMBO, R., COLOMBO, F., **J. Chem. Soc. Perkin Trans**, 1985, 1811-1815.

7- ANEXOS

Espectro NOESY do HBHisOMe



Espectro COSY do ligante HBHisOMe



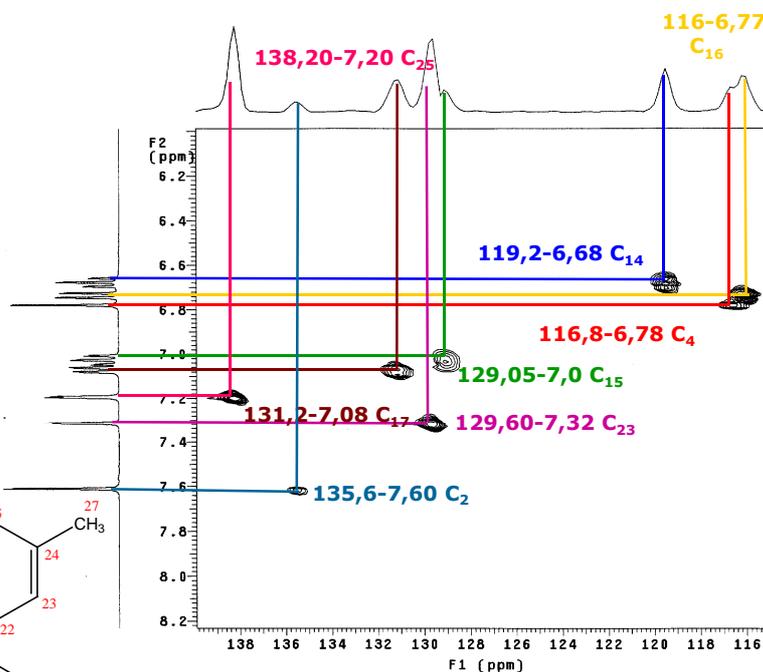
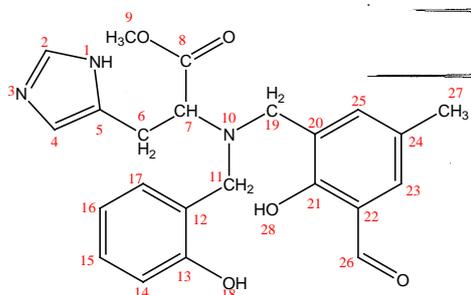
Ampliação HMQC (117-139 ppm) do H₂BHisMFF.

```

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: Patricia_F42_dmsd_HMOC_12jul2008

Pulse Sequence: gHMOC
Solvent: DMSO
Ambient temperature
File: gHMOC
Mercury-400BB "RMN"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.213 sec
Width 4807.7 Hz
2D Width 17084.0 Hz
4 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE N1, 400.0482842 MHz
DECOUPLE C13, 100.5897440 MHz
Low power 1823 dB atten.
on during acquisition
off during delay
GMRP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.098 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.014 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 24 min, 25 sec
  
```



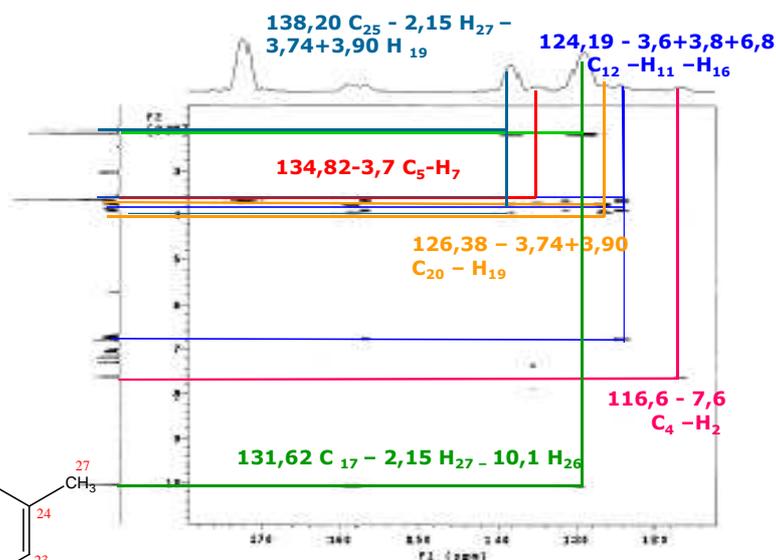
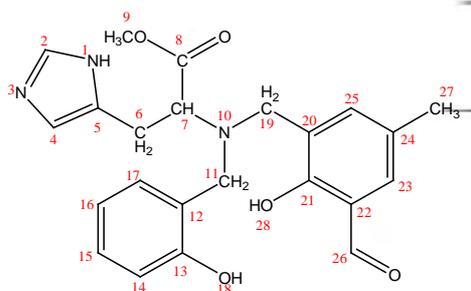
Ampliação HMBC (122-176 ppm) do H₂BHisMFF.

```

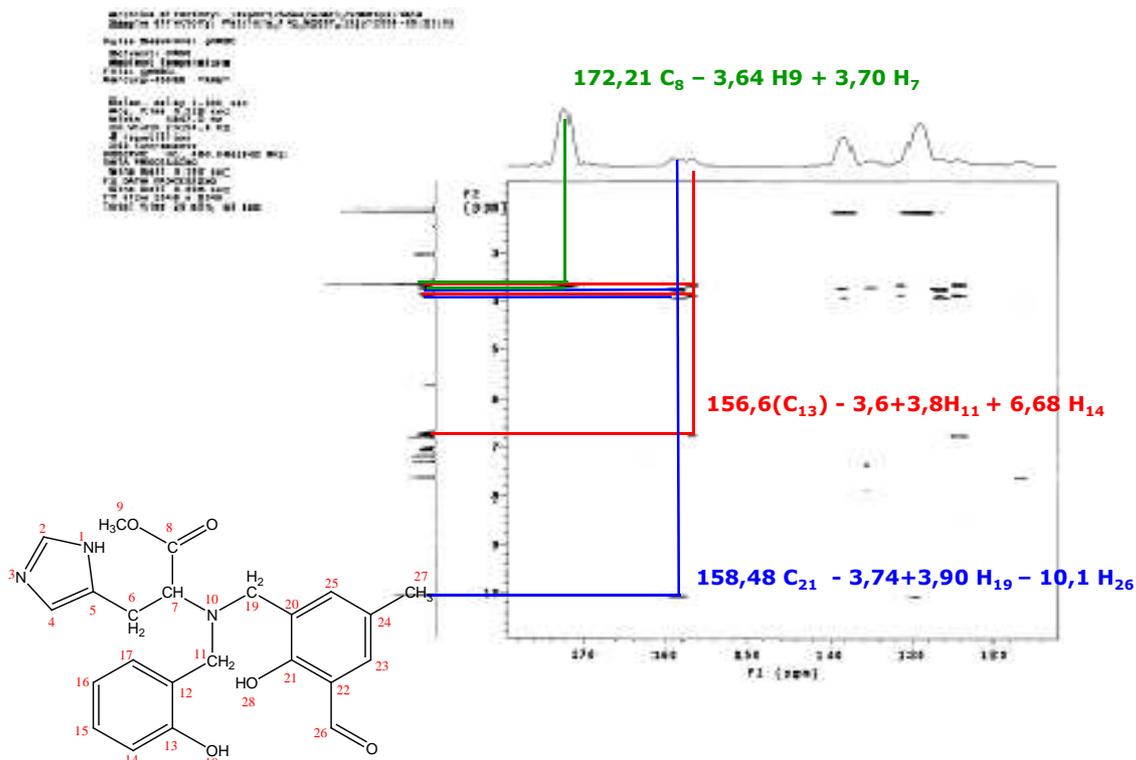
Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: Patricia_F42_dmsd_HMOC_12jul2008

Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: DMSO
Ambient temperature
File: gHMBC
Mercury-400BB "RMN"

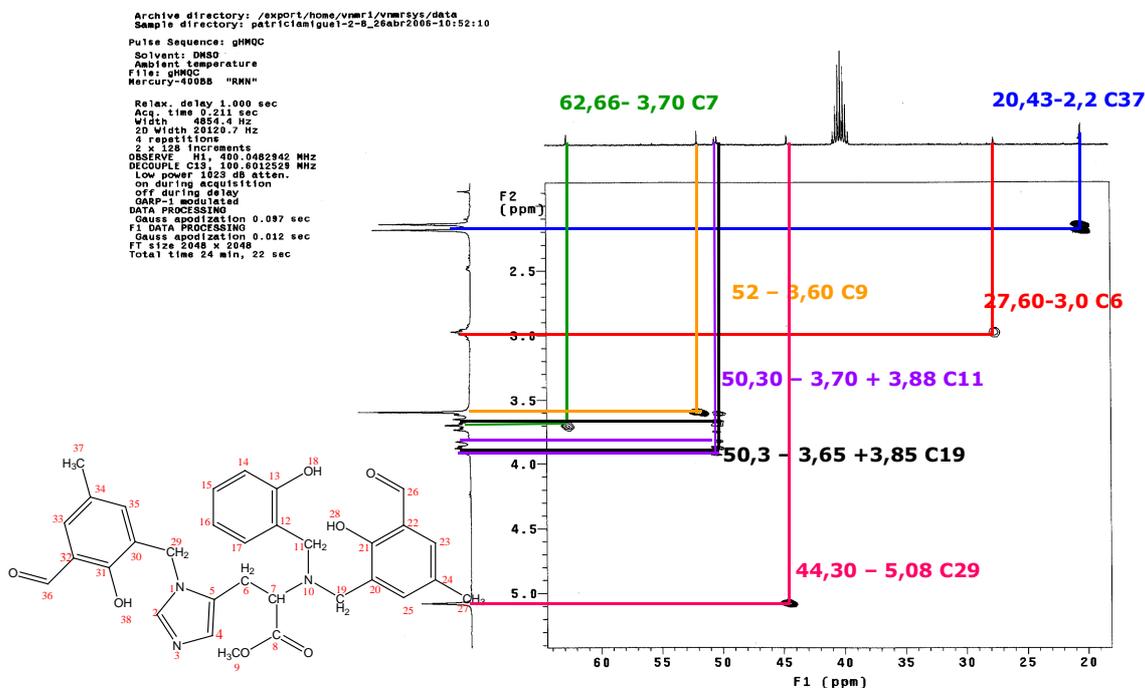
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.213 sec
Width 4807.7 Hz
2D Width 17084.0 Hz
4 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE N1, 400.0482842 MHz
DECOUPLE C13, 100.5897440 MHz
Low power 1823 dB atten.
on during acquisition
off during delay
GMRP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.098 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.014 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 24 min, 25 sec
  
```



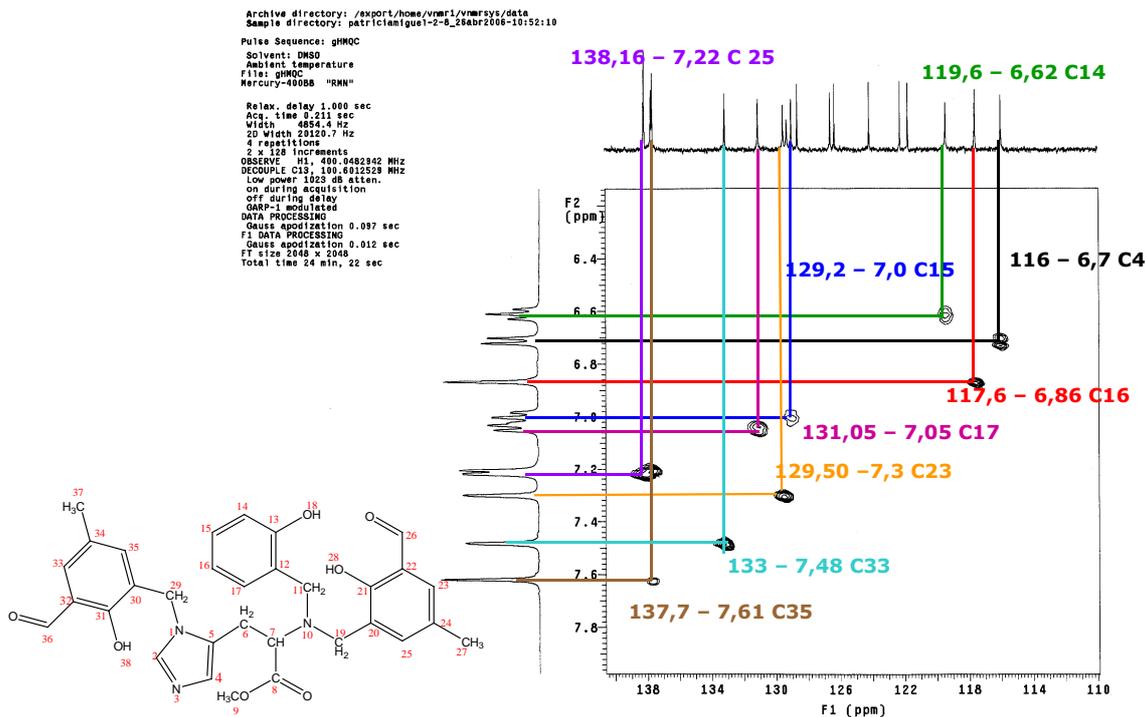
Ampliação HMBC (122-176 ppm) do H₂BHisMFF (cont.)



Ampliação HMQC (19-65 ppm) do H₃BHis(MFF)₂



Ampliação HMQC (110- 140 ppm) do H₃BHis(MFF)₂



Ampliação HMBC (122- 176 ppm) do H₃BHis(MFF)₂

