

Tese de Doutorado

***Estudos conformacionais de ésteres metílicos de alguns
aminoácidos através das espectroscopias no infravermelho, de
RMN e cálculos teóricos.***

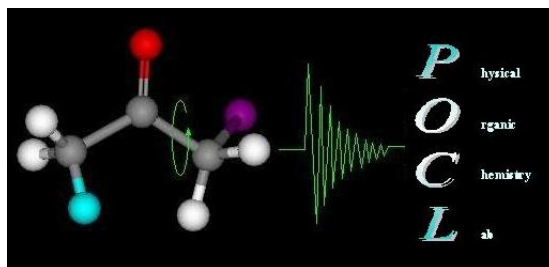
Aluna: Carina Rabelo Martins

Orientador: Roberto Rittner Neto

Departamento de Química Orgânica - Instituto de Química

UNICAMP

Laboratório de Físico-Química Orgânica



Campinas 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

M366e	Martins, Carina Rabelo. Estudos conformacionais de ésteres metílicos de alguns aminoácidos através das espectroscopias no infravermelho, de RMN e cálculos teóricos / Carina Rabelo Martins. -- Campinas, SP: [s.n], 2009. Orientador: Roberto Rittner Neto. Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Análise conformacional. 2. Constantes de acoplamento. 3. Teoria da solvatação. 4. Ésteres de aminoácidos. I. Rittner Neto, Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.
-------	---

Título em inglês: IR, NMR and theoretical investigation on the conformational analysis of some amino acids methyl esters

Palavras-chaves em inglês: Conformacional analysis, Coupling constants, Amino acid esters, Solvation theory

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Roberto Rittner Neto (orientador), Adriana Karla Cardoso Amorim Reis (DCET-UNIFESP), Álvaro Cunha Neto (CEUNES-UFES), Fred Yukio Fujiwara (IQ-UNICAMP), Rogério Custodio (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 17/12/2009

Dedicatória

Dedico esta tese a duas pessoas fundamentais, que me incentivaram e encorajaram a desenvolvê-la:

À minha mãe Elisabete, por seu amor incondicional;

E ao Professor Roberto Rittner, meu orientador desde a iniciação científica, pelo carinho com que sempre se dispôs a me ensinar e pela generosidade com que sempre tratou seus alunos. Não tenho palavras para agradecer tamanha satisfação em ter sido sua aluna.

A estas pessoas tão especiais, com todo carinho, muito obrigada!

Agradecimentos:

Agradeço a todos que de certa forma contribuíram para o desenvolvimento desta tese:

Especialmente à Janaina Dantas Vilcachagua e ao Lucas Colucci Ducati, excelentes colegas de laboratório sempre dispostos a ajudar e que contribuíram expressivamente para o desenvolvimento desta;

Aos colaboradores do laboratório: Francisco Paulo dos Santo, Léia Maria Job, Gabriela Fantinato, Raphael Bellis, Pedro Anizelli, Cleverson Bocca, Thiago Pinheiro e em especial ao Álvaro Cunha e à Adriana Reis, que foram meus colegas e também participaram da banca examinadora;

Ao Cláudio Tormena pela fundamental contribuição para o desenvolvimento desse projeto;

Às alunas de iniciação que contribuíram no desenvolvimento dos experimentos Aline Macedo e Paula Gimenes;

Aos meus colegas do IQ;

Ao pessoal da CPG, especialmente a Izabel Aquino Calasso e Izabel Ribeiro Filippi, sempre muito prestativas e atenciosas;

Ao meus amigos, especialmente à Lídia Glanzmann, Isabel Debien, Carla Zanaga, Mariana Guillard, Yeda Endrigo, Alessandra Prando, Ana Paula Lemos, Marcelo André, Silvia Sayuri e Mariana Frota também fundamentais durante o desenvolvimento dessa tese pelo apoio incondicional;

Ao pessoal da biblioteca e funcionários do IQ;

À FAPESP e à minha família pelo apoio financeiro;

Muito obrigada.

Currículo

Nome: Carina Rabelo Martins
Data de Nascimento: 23/08/1979
Estado civil: solteira
Nacionalidade: brasileira
Endereço: Rua Guaira, 235 apto 72, Saúde São Paulo – SP
Telefone: (11) 50719827 (11) 82573487
carinarm@uol.com.br

Formação Acadêmica

Pós-Graduação:

- Doutorado em química orgânica pelo laboratório de físico-química orgânica (LFQO) do instituto de química - UNICAMP (03/2005 –12/2009). Título da tese: Estudos conformacionais de ésteres metílicos de alguns aminoácidos através das espectroscopias no infravermelho, de RMN e cálculos teóricos;
- Mestrado em química orgânica pelo laboratório de físico-química orgânica (LFQO) do instituto de química - UNICAMP (03/2003 – 02/2005). Título da dissertação: Análise conformacional por RMN e cálculos teóricos em anéis de cinco membros: 2-halociclopentanonas.

Graduação:

- Bacharel em Química, Instituto de Química da UNICAMP (03/1999 - 12/2002).

Idiomas

- Inglês avançado
- Espanhol básico

Experiência no exterior

- Trainee do DAAD (programa de intercambio do governo alemão), no BAM (Instituto Federal para Pesquisa de Materiais e Testes); Participação em projeto de determinação de toxinas em alimentos. Novembro a dezembro de 2007, Berlim, Alemanha;

- Curso de inglês no Colchester English Study Centre, Colchester, Inglaterra, duração de cinco semanas (out/2007).

Participação em congressos internacionais:

- 2nd IberoAmerican MNR Meeting, Julho de 2007, Tarragona, Espanha;
- Euromar 2007 Congress, Julho de 2007, Tarragona, Espanha;
- 11th Nuclear Magnetic Users Meeting, Maio de 2007 Angra dos Reis, Rio de Janeiro. Pôster premiado no congresso;
- 10th Nuclear Magnetic Users Meeting, Maio de 2005, Angra dos Reis, Rio de Janeiro.

Publicação em revista estrangeira

- C. R. Martins, R. Rittner, C. F. Tormena, *J. Molec. Struct.: THEOCHEM*, **728** (2005) 79-84
- C. R. Martins, L. Ducatti, C. F. Tormena, R. Rittner, Conformational analysis of 2-halocyclopentanones by NMR and IR spectroscopy and theoretical calculations, *Spectr. Acta Part A* **72** (2009) 1089–109

Informações adicionais

- Participação na Empresa Jr do IQ-UNICAMP All Química (2000-2002):
- Representante discente na Congregação do Instituto de Química UNICAMP (2008); da Comissão de Segurança IQ-UNICAMP (2006-2007), do Departamento de Orgânica IQ-UNICAMP (2004 - 2005)
- Participação no programa de capacitação docente PED – IQ UNICAMP (1º semestre 2007);
- Co-orientação das alunas de iniciação científica Aline Macedo e Paula Gimenes do laboratório de físico-química orgânica IQ-UNICAMP;

Resumo: ESTUDOS CONFORMACIONAIS DE ÉSTERES METÁLICOS DE ALGUNS AMINOÁCIDOS ATRAVÉS DAS ESPECTROSCOPIAS NO INFRAVERMELHO, DE RMN E CÁLCULOS TEÓRICOS

Palavras chave: análise conformacional, acoplamento, teoria da solvatação, ésteres de aminoácidos

Este trabalho apresenta estudos teóricos e experimentais sobre estabilidade conformacional de ésteres metílicos de alguns aminoácidos (glicina, alanina, prolina e ácido aspártico) por meio de espectroscopia vibracional e cálculos teóricos da estrutura eletrônica. Os cálculos teóricos foram efetuados com o método *ab initio* em nível MP2 e com o da Teoria do Funcional de Densidade (“DFT”) com diferentes conjuntos de bases e com correção de energia do ponto zero “ZPE”, disponíveis no pacote Gaussian03. Determinaram-se as energias e geometrias dos confôrmeros mais estáveis na fase vapor e com a inclusão dos efeitos do solvente. Os espectros no infravermelho na região do estiramento fundamental do grupo carbonila e no seu primeiro “overtone”, em solventes de diferentes constantes dielétricas, assim como o comportamento dos acoplamentos J_{HH} e J_{CH} em solução foram utilizados para determinar o número e as populações dos rotâmeros presentes. A análise conjunta dos dados permitiu avaliar quais são os fatores responsáveis pela estabilidade conformacional nos ésteres de aminoácidos estudados. No caso do éster do ácido aspártico realizou-se um estudo detalhado RMN de 1H e ^{13}C a fim de verificar se os acoplamentos J_{HH} e J_{CH} , dos grupos CH e CH₂ apresentavam variação com a mudança da população dos confôrmeros, uma vez que os hidrogênios do grupo CH₂ são diastereotópicos, portanto apresentam deslocamentos químicos diferentes e acoplam entre si. Estes dados foram tratados pelo programa Models juntamente com as geometrias previamente otimizadas, o que forneceu informações detalhadas sobre o comportamento conformacional da molécula em solução e também no vapor.

Abstract: IR, NMR AND THEORETICAL INVESTIGATION ON THE CONFORMATIONAL ANALYSIS OF SOME AMINO ACIDS METHYL ESTERS

Keywords: conformacional analysis, coupling, amino acid esters, solvation theory

The present work reports a theoretical and experimental study on the conformational analysis of some amino acid methyl esters (glycine, alanine, proline and acid aspartic) through IR and NMR spectroscopy, and theoretical calculations. The results from *ab initio* calculations of energy and structure for the main conformers were performed with the Gaussia03 program using MP2 and DFT theory including ZPE corrections and solvation effects. The infra-red spectrum in solvents with wide range of dielectric constants as well the behavior of couplings constants J_{HH} and J_{CH} in solution were used to determine the number and the populations of the rotamers in solution. The analysis of the data allowed the evaluation of the factors responsible for conformacional stability in the studied compounds. For the acid aspartic ester, a detailed investigation was performed using the through Models program, with the optimized geometries from Gaussian combined with experimental couplings constant values, which yielded detailed information on the conformacional behavior of the molecule in solution and also in the vapor.

Índice analítico

Índice de Figuras	xvi
Índice de Tabelas	xviii

Capítulo 1: Introdução

1.1 Conformação	1
1.2 Utilizações da Espectroscopia de RMN em Análise Conformacional	3
1.2.1 Determinação do Isomerismo Conformacional a partir das Constantes de Acoplamento	4
1.2.2 Efeitos do meio no equilíbrio conformacional	4
1.2.3 Teoria do efeito do solvente, modelo do campo de reação (MODELS)	7
1.3 Cálculos Teóricos de Orbitais Moleculares	8
1.3.1 Inclusão do Efeito do solvente	9
1.4 Observações Gerais	12
1.5 Aminoácidos	13

Capítulo 2 : Objetivos

2. Objetivos	21
--------------	----

Capítulo 3: Experimental

3.1 Instrumentação	22
3.2 Solventes	22
3.3 Obtenção dos espectros na região do infravermelho	22
3.4 Obtenção dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C	23
3.4.1 Preparação das amostras para a obtenção dos espectros	23
3.4.2 Condições Típicas dos Espectros de RMN de ^1H	23
3.4.3 Condições Típicas dos Espectros de RMN de ^{13}C	24
3.5 Cálculos teóricos	24
3.5.1 Gaussian	24
3.5.2 Models	25
3.6 Síntese dos compostos	26
3.6.1 Síntese do cloridrato do glicinato de metila	27

3.6.2 Glicinato de metila	27
3.6.3 Síntese do cloridrato do éster metílico da alanina	28
3.6.4 Alaninato de metila	28
3.6.5 Síntese do cloridrato do éster metílico da prolina	28
3.6.6 Prolinato de metila	29
3.6.7 Síntese do cloridrato do aspartato de metila	29
3.6.8 Aspartato de dimetila	29
3.7 Síntese do dipeptídeo	30
Capítulo 4: Resultados e discussão	
4.1 Éster metílico da glicina (glicinato de metila)	33
4.2 Éster metílico da alanina (alaninato de metila)	42
4.3 Éster metílico da prolina (prolinato de metila)	50
4.4 Éster metílico do ácido aspártico (aspartato de metila)	59
4.5 Dipeptídeos	73
Capítulo 5: Conclusões	
5. Conclusões	83
Capítulo 6 :Bibliografia	
6. Bibliografia	85
Anexos	92
Índice de Figuras	
Figura 1. Gráfico da superfície de energia potencial do glicinato de metila, em nível B3LYP/6-31g(d,p). O gráfico apresenta o scan em relação à ligação $O=C-O-CH_3$, variando o ângulo de diedro de 0° a 180°	33
Figura 2. Superfície de energia potencial para o éster metílico da glicina em nível B3LYP/cc-pVDZ. A diferença de energia apresentada no gráfico se refere aos confôrmeros antes da otimização.	34
Figura 3. Representação espacial dos átomos para o éster metílico da glicina nas conformações gli1 (<i>cis</i>) e gli2 (<i>trans</i>).	36
Figura 4: Espectro na região do infravermelho para o estiramento $C=O$ do glicinato de metila, nos diferentes solventes utilizados A) CCl_4 , B) CH_2Cl_2 , C) $CHCl_3$ e D) CH_3CN .	38

Figura 5. Exemplo de interação entre os orbitais σ_{O-C} e σ^*_{C-N} , só observado para a conformação gli1.	40
Figura 6. Gráficos das superfícies de energia potencial para o alaninato de metila, calculadas com o método B3LYP com diferentes conjuntos de bases.	43
Figura 7. Representação espacial dos átomos para o éster metílico da alaninato nas conformações ala1 (sinperiplanar) e ala2 (anticlinal), obtidos em nível de teoria MP2/ aug-cc-pVDZ	44
Figura 8. Espectro na região do infravermelho para o estiramento C=O do alaninato de metila, nos diferentes solventes utilizados.	47
Figura 9. Representação espacial dos átomos em diferentes configurações: em 1 <i>endo</i> , 2 <i>exo</i> e 3 em uma configuração intermediária (<i>inter</i>).	50
Figura 10. Gráfico das superfícies de energia potencial para o prolinato de metila, calculadas com o método B3LYP/6-311++g(d,p).	51
Figura 11 Gráfico das superfícies de energia potencial para o prolinato de metila.	52
Figura 12. Representação espacial dos átomos para o prolinato de metila nas duas conformações mais estáveis, otimizadas em B3LYP/aug-cc-pVDZ.	53
Figura 13: Espectro na região do infravermelho para o estiramento C=O do alaninato de metila, nos diferentes solventes: (A) CCl ₄ , (B) CH ₂ Cl ₂ , (C) CHCl ₃ , (D) CH ₃ CN e (E) primeiro overtone em CCl ₄ .	55
Figura 14. Aspartato de metila	59
Figura 15. Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro N-C(H)-C=O do aspartato de metila, calculado em nível B3LYP/cc-pvdz.	60
Figura 16. Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro N-C(H)-C(H ₂)-C(=O) do aspartato de metila, calculado em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ.	60
Figura 17. Representação espacial dos átomos para o aspartato de metila nas conformações Asp1, Asp2 e Asp3 obtidos em nível de teoria B3LYP/aug-cc-pVDZ	61
Figura 18. Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro CH-CH ₂ -C=O do aspartato de metila, calculado em nível B3LYP/cc-pvdz.	63

Figura 19. Gráfico da superfície de energia potencial do ângulo diedro N-C(H)-C(H ₂)-C(=O) incluindo o efeito do solvente (DMSO) para o aspartato de metila calculado em nível HF/cc-pVDZ	64
Figura 20. Espectro na região do infravermelho para o estiramento C=O do aspartato de metila, nos diferentes solventes utilizados.	68
Figura 21. Dipeptídeo gli-ala-OMe. O dipeptídeo foi dividido em seções: a N-terminal do fragmento de aminoácido gli ω -1, a do fragmento ala ω e a do grupo protetor C-terminal -OMe ω +1.	75
Figura 22. Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro ϕ N-C(H)-C=O do gli-ala-OMe	76
Figura 23. Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro ϕ N-C(H)-C=O do gli-ala-OMe, calculado em nível B3LYP/6-31++g(d,p).	76
Figura 24 Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro ϕ N-C(H)-C=O do ala-gli-OMe, calculado em nível B3LYP/6-31++g(d,p).	77
Figura 25 Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro ψ_i [N-C(H)-C=O] do gli-ala-OMe, calculado em nível B3LYP/6-31++g(d,p).	78
Figura 26 Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro ψ_{i-1} [N-C(H)-C=O] do gli-ala-OMe, calculado em nível B3LYP/6-31++g(d,p).	78
Figura 27 Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro ω_{i-1} [H-N-C(H)-C(=O)] do gli-ala-OMe, calculado em nível B3LYP/6-31++g(d,p).	79
Figura 28 Numeração dos átomos do dipeptídeo utilizada na descrição dos dados da Tabela 22	81
Figura 29 Representação espacial dos átomos para o dipeptídeo gli-ala-OMe nas conformações de 1 a 3 obtidos em nível de teoria B3LYP/aug-cc-pVDZ	81

Índice Tabelas

Tabela 1. Dados teóricos para os confôrmeros gli1 e gli2 do éster metílico da glicina em nível MP2/aug-cc-pVDZ.	35
Tabela 2. Dados teóricos para os confôrmeros 1 e 2 do glicinato de metila B3LYP/aug-cc-pVDZ e B3LYP/aug-cc-pVTZ	36

Tabela 3: Deslocamentos químicos (ppm) de ^1H e de ^{13}C em diferentes solventes e constantes de acoplamento (Hz) para o glicinato de metila.	37
Tabela 4. Comparação entre as principais interações orbitales para o glicinato de metila obtido através de cálculos de NBO em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ	40
Tabela 5. Dados teóricos para os confôrmeros ala1 (sinperiplanar) e ala2 (anticlinal) do éster metílico da alanina em nível. MP2/ aug-cc-pVDZ	44
Tabela 6. Dados teóricos para os confôrmeros ala1 (sinperiplanar) e ala2 (anticlinal) do alaninato de metila calculados nos níveis de teoria B3LYP/aug-cc-pVDZ, B3LYP/6-311++g(d,p) e B3LYP/aug-cc-pVTZ	45
Tabela 7: Deslocamentos químicos (ppm) de ^1H e de ^{13}C em diferentes solventes e constantes de acoplamento (Hz) para o alaninato de metila.	46
Tabela 8. Comparação entre as principais interações orbitales para o alaninato de metila obtido através de cálculos de NBO em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ	49
Tabela 9. Dados teóricos para os confôrmeros pro1 e pro2 do éster metílico da prolina em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ.	53
Tabela 10: Deslocamentos químicos (ppm) de ^1H em diferentes solventes e constantes de acoplamento (Hz) para o prolinato de metila.	54
Tabela 11: Valores das frequências ^a do estiramento da carbonila de cada confôrmero obtidos pela deconvolução dos espectros obtidos em solventes de diferentes constantes dielétricas (ϵ).	56
Tabela 12. Comparação entre as principais interações orbitales para o prolinato de metila obtidas através de cálculos de NBO em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ	57
Tabela 13. Comparação entre os valores totais de interações orbitales para o prolinato de metila obtido através de cálculos de NBO em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ	58
Tabela 14. Dados teóricos para os três confôrmeros mais estáveis do aspartato de metila obtidos em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ	62
Tabela 15. Comparação entre as estabilidades relativas e momento dipolar dos confôrmeros com e sem o efeito do solvente, calculadas em nível	64

Tabela 16: Deslocamentos químicos (δ em ppm) de ^1H e de ^{13}C em solventes com diferentes constantes elétricas (ϵ) e constantes de acoplamento (Hz) referentes ao carbono quirático do aspartato de metila.	65
Tabela 17. Parâmetros para cálculo das energias de solvatação para o aspartato de metila, obtidos a partir da geometria otimizada pelo método B3LYP	66
Tabela 18. Diferenças de energias (kcal mol^{-1}), constantes de acoplamento observadas e calculadas (Hz), e populações dos conformeros calculadas para o aspartato de metila em diferentes solventes, obtidos pelo Bestfit.	67
Tabela 19. Comparação entre as principais interações orbitais para os conformeros mais estáveis do aspartato de metila obtido através de cálculos de NBO em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ, sem efeito do solvente (energias em kcal mol^{-1})	69
Tabela 20. Comparação entre os valores totais de interações orbitais para o aspartato de metila obtido através de cálculos de NBO em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ	70
Tabela 21. Comparação entre as principais interações orbitais para o conformero Asp2 do aspartato de metila obtido através de cálculos de NBO em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ (energia em kcal mol^{-1}) considerando o efeito do solvente.	71
Tabela 22. Dados teóricos para os três conformeros mais estáveis do dipeptídeo gli-ala-OMe obtidos em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 Conformação

Os elétrons de uma ligação servem não somente como seu esqueleto, mas também como um sistema nervoso rudimentar. Eles revelam os efeitos de perturbações locais de outros centros, mais ou menos efetivos, dependendo da distância e geometria. Portanto, em princípio, muitos núcleos em moléculas podem sentir a presença de um átomo ou grupo fortemente eletronegativo ou a aproximação de outra molécula, ou ainda a mudança na densidade eletrônica que acontece quando ligações são formadas ou quebradas. ¹

Na prática estes efeitos são localizados e é isso que dá origem aos efeitos estereoeletrônicos. Eles podem causar profundas mudanças na conformação molecular e em mecanismos de reação e são fundamentais para o entendimento da relação entre estrutura e reatividade. Os efeitos estereoeletrônicos típicos envolvem uma interação eletrônica, que estabiliza uma conformação ou um estado de transição e são observados somente quando a geometria correta é alcançada. ²

O estudo do isomerismo conformacional de uma grande diversidade de compostos levou à proposição de um correspondente grande número de efeitos conformacionais, quando não é possível explicar os resultados apenas em termos de efeitos estéricos. Esses efeitos têm sido denominados de efeito *gauche*, efeito anomérico, efeito “orelhas de coelho”, etc. Além desses, há os de natureza puramente eletrônica como interações de orbitais através das ligações e através do espaço, interações superjacentes, etc. ³

1.1.1 Análise conformacional

Análise conformacional é o estudo detalhado do arranjo espacial dos átomos de uma molécula, isto é, a estrutura tridimensional de uma molécula. O conceito de análise conformacional foi introduzido por Barton, em seus trabalhos fundamentais. A premissa básica da análise conformacional baseia-se no fato de

as propriedades físicas e químicas de um composto estarem intimamente relacionadas com a conformação adotada.⁴

Inicialmente os principais métodos de determinação de conformação das moléculas eram baseados em métodos químicos, que nem sempre produziam resultados inequívocos. A partir da segunda metade do século passado os métodos físicos foram introduzidos na determinação estrutural com bastante êxito. Entre os métodos utilizados estão as técnicas de difração (raios-X e elétrons) e toda variedade de métodos espectroscópicos (microondas, infravermelho, RMN, Raman, ultravioleta). Uma grande quantidade de informação é obtida, em adição, pela determinação dos momentos de dipolos. Estes métodos são de importância fundamental para a análise conformacional, porém em alguns casos o estudo experimental não é possível, ou ainda hoje pode sozinho não ser totalmente conclusivo a respeito da conformação exata de uma determinada substância. Assim a utilização de técnicas teóricas tem sido cada vez mais utilizada e tem oferecido informações cada vez mais precisas em relação à conformação de um composto.⁴

O mais importante princípio da análise conformacional é que a rotação sobre a ligação simples não é livre, mas restringida pela barreira de energia, que depende dos substituintes. Conformações alternadas são preferidas, quando grupos volumosos estão presentes, resultando em uma conformação *antiperiplanar* ou *anti*. As preferências são facilmente entendidas em termos de repulsão estérica entre os grupos, as quais são de fato interações entre orbitais preenchidos (ligantes) e, portanto, são repulsivas. Porém interações entre orbitais ligantes e antiligantes favorecem a estabilização de uma conformação em relação a outra, na qual estas interações não poderiam ocorrer.^{1, 2}

A determinação da conformação preferencialmente adotada por moléculas em solução é de importância óbvia, por exemplo, no caso de polipeptídeos. Espera-se que para esta classe de compostos a atividade biológica que possuem esteja diretamente relacionada com a conformação adotada em solução. Estas moléculas são, no entanto, relativamente complexas, e uma resposta definitiva

para os problemas suscitados por estes estudos devem aguardar primeiramente por uma teoria coerente e eficiente sobre os efeitos do meio no equilíbrio conformacional para moléculas mais simples.

Uma abordagem à respeito da análise conformacional de aminoácidos, objetivo deste trabalho, será feita no final deste capítulo (item 1.5).

1.2 Utilizações da Espectroscopia de RMN em Análise Conformacional

Dentre os diversos métodos de estudo da conformação de moléculas, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) vem sendo largamente utilizada na determinação das preferências conformacionais dos compostos, e especialmente na determinação de equilíbrios conformacionais em solução com bastante sucesso.

O uso da espectroscopia de RMN no estudo de equilíbrios conformacionais iniciou-se com o trabalho clássico de Garbisch ⁵ baseado no método de Eliel para a determinação das proporções dos confôrmeros do bromociclohexil, ⁶ em que o deslocamento químico dos confôrmeros foram determinados através de medidas feitas em modelos rígidos, no caso o derivado 4-terc substituído.



Entretanto, essa metodologia até então estabelecida baseada no estudo das constantes de acoplamentos ou nos deslocamentos químicos do hidrogênio em posição α , era aplicável a cicloexanonas α -heterossubstituídas ou a sistemas rígidos semelhantes. Isto porque ela utiliza derivados de estrutura rígida, modelos *ancoméricos* (do grego $\alpha\nu\alpha\gamma\kappa\epsilon\iota\nu$ = fixado por lei ou destino), ⁷ para a determinação dos deslocamentos químicos ou das constantes de acoplamento dos confôrmeros individuais. Além de esse procedimento ter recebido inúmeras críticas, ⁸ ele não é aplicável a sistemas alifáticos para os quais não se tem os modelos rígidos correspondentes.

Por outro lado, tem sido observado que as constantes de acoplamento, especialmente a vicinal 3J e a 4J , apresentam marcante dependência com a conformação e que os efeitos do solvente nas constantes de acoplamento,

incluindo os anisotrópicos, são muito menores do que aqueles devidos a mudanças conformacionais e por isso são mais confiáveis nos estudos de isomerismo rotacional.^{2,9} O acoplamento $^4J_{HH}$, e como foi verificado mais recentemente também $^4J_{HF}$ e $^2J_{CF}$, por exemplo, são facilmente medidos com alta precisão e exibem uma grande dependência relativa com o solvente.¹⁰

Assim, o uso da variação da constante de acoplamento com o solvente, associado a cálculos da energia de solvatação e a cálculos teóricos das energias e geometrias dos confômeros conduziram a elaboração de um método extremamente confiável e preciso para a análise de equilíbrios conformacionais.¹¹ Dentre os compostos estudados por esse método podemos citar as cicloexanonas, as acetonas e acetatos de metila cujos resultados foram obtidos com bastante êxito.

1.2.1 Determinação do Isomerismo Conformacional a partir das Constantes de Acoplamento

Os fundamentos para essa determinação se encontram bem estabelecidos e descritos na literatura.^{2, 12} Sua aplicação na prática iniciou-se nos anos 90 com um trabalho de Abraham sobre fluorcetonas¹⁰ em conjunto com o nosso laboratório de Físico-Química Orgânica. Estudos posteriores com outros sistemas comprovaram a aplicabilidade e precisão deste método^{11,13-20}.

1.2.2 Efeitos do meio no equilíbrio conformacional

A diferença de energia entre isômeros rotacionais é quase sempre muito pequena (0-3 kcal/mol) e como a energia de solvatação de um soluto polar em um meio polar tem no mínimo essa magnitude, chegando não raramente a ser muito maior, é de se esperar que a mudança do meio afete o equilíbrio conformacional consideravelmente. De fato, há muitos compostos que apresentam uma inversão populacional com a variação do meio, isto é, o confômero mais estável em solventes pouco polares não é o mesmo confômero mais estável em solventes muito polares.

Consideremos uma molécula em equilíbrio entre dois rotâmeros A e B. Se as populações dos dois rotâmeros em algum solvente (S) são n_A e n_B , temos que:



$$K = n_B/n_A = \exp(-\Delta G^S/RT) \quad (1)$$

$$n_B + n_A = 1$$

onde, ΔG^S é a diferença de energia livre para o equilíbrio em um dado solvente (S). A nomenclatura adotada utiliza a letra sobrescrita para indicar o meio (v=vácuo, s=solvente) e subscrita para indicar o estado.

Para este equilíbrio diferença de energia em dois solventes ou entre a fase vapor e um solvente, será dada por:

$$\delta\Delta G = \Delta G^V - \Delta G^S$$

Neste caso podem ser feitas algumas simplificações, como a troca de $\delta\Delta G$ por $\delta\Delta E$. Esta simplificação baseia-se nas equações fundamentais da físico-química para os gases perfeitos ($H=E+ RT$ e $G=H - TS$), e no fato de as considerações serem feitas apenas para a variação de solventes (meio) sem mudança de temperatura.

Será assumido que a diferença de entropia entre os estados A e B não é afetada pelo meio, isto é, $\delta\Delta S$ é nula. É muito comum em estudos de equilíbrios conformacionais a consideração de que no equilíbrio ΔS é zero em todos os solventes. No entanto, para a proposta apresentada neste trabalho não é necessário fazer essa drástica consideração, já que na verdade será utilizado $\delta\Delta S$. De fato existe uma notória dificuldade na obtenção de valores exatos de ΔS , e muitas das estimativas de variação de entropia no equilíbrio em questão estão dentro do erro experimental observado. Portanto neste caso a consideração de que $\delta\Delta S=0$ parece ser bastante razoável.¹²

Assim, baseando-se nestas considerações a equação acima pode ser reescrita,

$$\delta\Delta E = \Delta E^V - \Delta E^S$$

Torna-se necessário então calcular apenas a variação de $E_A - E_B$ com o solvente.

Dentre os métodos estáticos, o método da variação do solvente em RMN é o mais indicado nestes casos. Vamos considerar a sua aplicação apenas às constantes de acoplamento J . Em um experimento estático, a escala de tempo da técnica experimental é tal que a interconversão entre os rotâmeros ocorre durante uma simples medida, fornecendo um valor médio de J . No equilíbrio entre A e B, J_A e J_B são os valores de J para esses rotâmeros. Então, teremos:

$$J_{\text{observado}} = n_A J_A + n_B J_B \quad (2)$$

Os valores de J_A e J_B serão utilizados para obter o valor de ΔE^s para este sistema. O processo comumente usado é obter os valores de J em função da temperatura T e do solvente. O gráfico de J versus T é uma curva de quatro parâmetros desconhecidos ΔE^s , ΔS , J_A e J_B , sendo usualmente $\Delta S=0$. Com isso têm-se apenas três parâmetros desconhecidos: ΔE^s , J_A e J_B .

No trabalho descrito nesta tese realizou-se medidas sempre à uma mesma temperatura e, portanto, doravante vamos considerar apenas o efeito do solvente.

Os valores da medida J_{obs} a uma dada temperatura T e em um dado solvente (eq. 1 e 2), podem ser expressos por:

$$J_{\text{obs}} = (J_A + K J_B)/(1 + K)$$

$$\text{onde: } K = (J_{\text{obs}} - J_A)/(J_B - J_{\text{obs}}) \quad (3)$$

Para este equilíbrio nós temos que:

$$n_A = 1/[1 + \exp(-\Delta E/RT)]$$

$$\text{e } n_B = \exp(-\Delta E/RT)/[1 + \exp(-\Delta E/RT)] \quad (4)$$

com isso uma função ϕ é formada e é dada por:

$$\phi = \sum (J_{\text{obs}} - n_A J_A - n_B J_B)^2 \quad (5)$$

a qual é minimizada computacionalmente pela variação dos valores de ΔE^s , J_A e J_B .

Na prática, um valor arbitrário de ΔE^V é introduzido e os valores de n_A e n_B são calculados para cada solvente pela equação 4. Estes, quando combinados com os valores experimentais de J_{obs} e a equação 2, fornecem os valores de J_A e J_B , os quais, quando introduzidos na equação 5, conduzem ao valor de ϕ . ΔE^S é variado até que o valor mínimo de ϕ é encontrado, o qual define o melhor valor de J_A e J_B . Estes cálculos são realizados através do programa Bestfit, que permite obter os valores de J para cada rotâmero individual. Para obter a população destes rotâmeros em solução se faz necessário o cálculo da energia de solvatação que é feito pelo programa Models.

Convém salientar que estes programas foram elaborados pelo Professor Abraham da Universidade de Liverpool, não se acham publicados e foram concedidos por ele em caráter reservado, como parte do programa de intercambio que mantém com o nosso laboratório.

1.2.3 Teoria do efeito do solvente, modelo do campo de reação (MODELS)¹²

Neste tratamento a energia de solvatação de uma molécula é dada pela inclusão dos campos de reação de dipolo e quadrupolo e também por um termo direto dipolo-dipolo para levar em conta a falha da teoria do campo de reação de Onsager em meio muito polar.

Com essas considerações a energia de solvatação de uma molécula em um estado A, por exemplo, é a diferença de energia entre a fase vapor (E_A^V) e em algum solvente (E_A^S) de constante dielétrica ϵ e é dada pela equação 6

$$E_A^V - E_A^S = k_A x / (1 - lx) + 3h_A x / (5 - x) + bf [1 - \exp(-bf / 16RT)] \quad (6)$$

onde $x = (\epsilon - 1) / (2\epsilon + 1)$; $l = 2(n_D^2 - 1) / (n_D^2 + 2)$; n_D é o índice de refração; T é a temperatura (K).

O primeiro termo é devido ao dipolo do soluto ($k_A = \mu_A^2 / a^3$, μ_A é o dipolo do soluto) e o segundo termo o quadrupolo do soluto ($h_A = q_A^2 / a^5$, q_A é o quadrupolo do soluto) e a é o raio do soluto. O terceiro termo é o termo dipolo-dipolo em meio

muito polar, onde $b = 4.30(1.5a/r^3)(k_A + 0.5h_A)^{1/2}$ e $f = [(\epsilon-2)(\epsilon+1)/\epsilon]^{1/2}$ para $\epsilon > 2$ e zero para $\epsilon < 2$. O raio do soluto é obtido diretamente do volume molar (V_M) do soluto ($V_M/N = 4\pi a^3/3$) onde N é o número de Avogadro. O volume molar pode ser obtido da densidade do líquido puro, se conhecida, ou diretamente no programa de aditividade de volumes atômicos. Similarmente, o índice de refração do soluto pode ser inserido se conhecido ou calculado diretamente de contribuições aditivas.

Para uma molécula em um estado B uma equação similar é obtida diferindo somente nos valores de k_B e h_B . Subtraindo as duas equações obtêm-se a quantidade requerida experimentalmente $\Delta E^V - \Delta E^S = [(E_A^V - E_A^S) - (E_B^V - E_B^S)]$ ou seja para um dado valor de ΔE^V , o programa calcula ΔE^S , que determina as proporções dos confôrmeros em um solvente S.

1.3 Cálculos Teóricos de Orbitais Moleculares

Os métodos da estrutura eletrônica empregam as leis da mecânica quântica ao invés das leis da física clássica como base para seus cálculos. Os métodos da estrutura eletrônica podem ser *semi-empíricos* ou *ab initio*. Os métodos *semi-empíricos* usam parâmetros derivados de dados experimentais para simplificar os cálculos. Por outro lado, os métodos *ab initio* não utilizam nenhum parâmetro experimental, apenas os valores de poucas constantes físicas: velocidade da luz, massa e carga do elétron e dos núcleos e a constante de Planck.²¹

No caso de moléculas simples, os cálculos *ab initio* são os que têm sido mais utilizados e fornecem informações a respeito das diferenças de energia entre os confôrmeros mais estáveis, os momentos de dipolo e as geometrias de cada possível confôrmero no vácuo.²²

Dentre os métodos *ab initio*, o método Hartree-Fock (HF) produz um modelo razoável para um grande número de sistemas moleculares. Porém, a teoria Hartree-Fock tem suas limitações; elas surgem principalmente do fato que esta teoria não inclui um tratamento dos efeitos da correlação eletrônica, ou seja, não leva em consideração as interações entre os elétrons, pois os elétrons, em um sistema molecular, interagem entre si e tendem a se permanecer afastados.

Para suprir esta limitação, um grande número de métodos foram desenvolvidos, os quais incluem alguns efeitos de correlação eletrônica. Dentre eles, podemos destacar o método MP2 (teoria de perturbação de segunda ordem Möller-Plesset)²³ o qual contabiliza as interações instantâneas dos pares de elétrons com spins opostos.²¹ Portanto, cálculos com teoria MP2 ou outros métodos que levam em consideração as correlações eletrônicas fornecem resultados mais precisos, principalmente em se tratando da geometria molecular e energias, pois há uma diferença considerável nas geometrias obtidas para uma determinada molécula quando se faz uso da teoria HF e quando se utiliza a teoria MP2. Porém, a teoria MP2 necessita de recursos computacionais mais sofisticados, pois seu cálculo é mais complexo e requer um tempo maior de máquina.

Atualmente, uma terceira classe de métodos da estrutura eletrônica, os métodos da teoria do funcional de densidade (DFT) têm sido amplamente empregados. Estes métodos são similares aos métodos *ab initio* em muitos aspectos. O método DFT alcança melhor precisão do que a teoria HF com somente um modesto aumento de custo (tempo de processamento), porém muito menor do que o MP2. Os métodos DFT também incluem alguns dos efeitos de correlação eletrônica muito menos dispendiosos do que os métodos de correlação tradicionais.

Com isso, os métodos DFT, mais especificamente o método Becke3LYP, fornecem geometrias iguais ou melhores do que o método MP2, pois esta teoria necessita de menos recursos computacionais e, portanto conjuntos de bases mais sofisticados podem ser empregados.²¹

Os métodos descritos acima têm sido utilizados em nosso laboratório com resultados bastante satisfatórios.¹³⁻²⁰

1.3.1 Inclusão do Efeito do solvente

Os métodos citados anteriormente são empregados para calcular parâmetros como a energia e a geometria da molécula no estado 'vapor' (ou no vácuo), ou seja, sem considerar qualquer interação com o meio externo a ela. Para calcular estes parâmetros tentando simular o efeito que meio exerce sobre eles, utilizamos

modelos que descrevem o efeito da solvente na molécula. Estes efeitos em alguns casos podem ser bastante expressivos, uma vez que efeitos eletrostáticos, por exemplo, são muitas vezes significativamente menos importantes em moléculas colocadas em um meio com constante dielétrica muito alta, em relação à mesma no vapor.²¹

Uma família de modelos que descrevem sistemas em solução são os chamados SCRF (do inglês self-consistent reaction field), ou métodos de campo de reação auto-consistentes. Esses métodos descrevem o solvente como sendo uma constante contínua e uniforme ϵ : o campo de reação, onde o soluto é colocado em uma cavidade de solvente.²¹ A interação entre a carga do soluto, ou melhor, o campo produzido no volume externo ocupado pelo solvente e o próprio solvente (descrito como um dielétrico polarizável) é representado em termos de carga de superfície aparente (σ) espalhada pela superfície da cavidade. Como resposta, tal carga produz um novo campo, chamado de campo de reação, que pode modificar o estado anterior da distribuição de carga do soluto (se considerarmos este constituído de cargas pontuais não fixas). A ação combinada entre o campo do soluto e o campo de reação do solvente pode ser tratada analiticamente a fim de se obter o resultado final, quando a distribuição de cargas de ambos, soluto e solvente estarão equilibradas.²⁴

As aproximações SCRF diferem pelas várias definições de cavidade e de campo de reação. O modelo mais simples é o modelo de campo de reação de Onsager.²⁵ Neste método o soluto ocupa uma cavidade esférica e fixa de raio a dentro do campo do solvente, onde o dipolo da molécula induzirá o dipolo no meio. O solvente e o soluto são estabilizados pela interação entre os dipolos do soluto e o dipolo induzido no solvente. Assim, os sistemas com dipolo igual a zero não serão solvatados por esse modelo.²¹

O modelo PCM (polarized continuum model), sigla em inglês para o modelo de polarização contínua de Tomasi²⁶ define a cavidade como sendo a união de uma série de esferas atômicas interligadas. Esta cavidade é cercada por um meio dielétrico contínuo, representando o solvente, que pode ser caracterizado por suas

propriedades específicas macroscópicas (densidade, constante dielétrica, índice de refração, etc.). O efeito da polarização do solvente é representado numericamente, computado pela integração numérica das cavidades atômicas que até certo ponto é uma aproximação analítica do modelo de Onsager. O IPCM (PCM de densidade isoeletrônica) define a cavidade como sendo uma superfície de densidade isoeletrônica da molécula. É calculada por um procedimento iterativo. Esta superfície é uma forma um pouco mais natural e intuitiva para a cavidade, uma vez que corresponde à forma reativa do soluto, a promover maior interação soluto-solvente, num grau tão bom quanto o possível (ou seja melhor do que a simples e pré-definida forma de esfera ou apenas um conjunto de esferas sobrepostas).²¹ O modelo PCM (e suas diversas formas atualizadas ²⁷⁻³²) é hoje amplamente utilizado na descrição do efeito do solvente na energia e barreira conformacional de diversos solutos, os quais não sofrem transformações químicas em solução.

Além dos modelos de SCRF de Onsager ²⁵, e PCM ²⁶, o estudo de solvatação de aminoácidos emprega vários outros métodos, tanto contínuos (implícitos) quanto os métodos discretos (explícitos). Os mais empregados além dos já citados são baseados nos métodos de polarização contínua, entre eles o Modelo de Solvatação-8 (SMX, solvation model X, X=1,...,8) ³³, COSMO (conductor-like screening model) ³⁴, GCOSMO (generalized conductor-like screening model) ³⁵ e SVP(solvation with volume polarization) ³⁶ que tentam solucionar problemas de interações eletrostáticas e não eletrostáticas entre solvente e soluto, que envolvem a melhor descrição do meio, construção da superfície da cavidade, etc.

Também bastantes empregados no estudo de aminoácidos são os métodos discretos. ⁴³⁻⁴⁶ Estes métodos (também chamados de explícitos, estudos de microssolvatação) são muito empregados e importantes no estudo da solvatação quando a molécula apresenta forte interação com o solvente, ou seja, nos casos que há formação de ligação de hidrogênio entre solvente e soluto, e principalmente quando a molécula do soluto é altamente carregada, como é o caso de um aminoácido na sua forma zwitteriônica, uma vez que as equações usadas nos modelos contínuos, não são adequadas para estes sistemas.

É possível incluir os efeitos de solvatação em cálculos de propriedades moleculares e também de reações em solução, usando eficientes modelos baseados no tratamento do solvente como um meio contínuo. Alguns podem ainda combinar o tratamento do meio como contínuo e discreto ³⁷⁻³⁹ (o solvente é explícito na primeira camada de solvatação e posteriormente tratado com o método contínuo). Os que descrevem o solvente levando em consideração as interações intermoleculares soluto-solvente, os modelos discretos, dependendo do número de moléculas de solventes utilizadas podem fazer uso de cálculos de mecânica molecular ou ainda cálculos híbridos de mecânica quântica/dinâmica molecular para otimizar a estrutura da molécula.

Por causa do aumento da atividade nessa área, recentemente muitos *artigos de revisão* foram publicados tratando do assunto.^{29,30,32,40-42} Tantos trabalhos na área mostram ao mesmo tempo a importância e a dificuldade de se desenvolver um modelo de solvatação mais geral e preciso para descrição dos efeitos do solvente.

No presente trabalho o modelo utilizado para os cálculos incluindo o efeito de solvatação é o IEFPCM (Integral-Equation-Formalism Polarizable Continuum Model) ²⁷, que é o modelo padrão do pacote Gaussian03. Nesta versão do modelo geral do PCM, as principais modificações são em relação às funções utilizadas para determinar a carga aparente de superfície que é colocada na cavidade do solvente para representar a polarização do meio. Essa mudança permite uma utilização mais ampla desse modelo, em sistemas de solventes padrões caracterizados por permissividade escalar até dielétricos anisotrópicos, como cristais líquidos e polímeros.

1.4 Observações Gerais

A determinação do equilíbrio conformacional pelo método elaborado em conjunto com o nosso laboratório, descrito ao longo deste capítulo, tem sido aplicado com êxito a compostos que apresentam como substituinte um núcleo magneticamente ativo (flúor) e cujas constantes de acoplamento com o hidrogênio e com o carbono são relativamente grandes. Assim um próximo desafio seria a sua aplicação em

sistemas sem a presença desse substituinte, como é o caso dos compostos propostos neste trabalho.

A grande vantagem da utilização do método proposto em relação ao da espectroscopia no infravermelho é que ele não apresenta as dificuldades inerentes a esta última. Assim, no caso do infravermelho, as principais fontes de erro do método são a consideração de que a banda do grupo carbonila apresenta o mesmo valor de absortividade molar para os dois confômeros e a ocorrência da ressonância de Fermi, que resulta numa banda adicional na região do estiramento do grupo carbonila, além da forte superposição das bandas dos dois confômeros dificultando a sua deconvolução.

1.5 Aminoácidos

O comportamento conformacional de aminoácidos é de importância crucial para entender a dinâmica dessas moléculas na formação de polipeptídios e proteínas.⁴⁷ Nos últimos 20 anos, tem crescido o interesse no estudo dessas biomoléculas em condições isoladas, por exemplo na fase vapor. Assim, embora a fase vapor esteja longe de representar as condições *in situ* do meio condensado no qual as reações bioquímicas ocorrem, importantes propriedades intrínsecas dessas moléculas podem ser estudadas neste estado sem sofrer a interferência do meio onde elas estão inseridas, uma vez que é difícil distinguir na fase condensada, quais propriedades são verdadeiramente intramoleculares.⁴⁸

Aminoácidos no estado sólido exibem uma estrutura bipolar zwitteriônica ("zwitterion") a qual não ocorre nas cadeias de polipeptídeos.⁴⁷ A maioria dos aminoácidos ocorre predominantemente na sua forma neutra na fase gasosa ou em um estado isolado. As interações com a vizinhança (intermoleculares) através de ligações de hidrogênio levam a uma considerável estabilidade da forma bipolar, quando comparada com a forma neutra. Portanto, para obter essas estruturas neutras, os estudos devem ser realizados na fase vapor, essencialmente livre de interações intermoleculares.^{47,48,49}

As dificuldades óbvias dos estudos experimentais na fase gasosa são causadas pelos altos pontos de fusão, associados à baixa pressão de vapor dos aminoácidos.⁴⁷ Métodos de aquecimento foram empregados somente para o estudo de dois aminoácidos, na fase gasosa, a glicina⁵⁰ e a alanina.⁵¹

Como um método alternativo, a dissipação a laser, oferece uma maneira de vaporizar um composto orgânico sólido, na qual a rápida dessorção produzida pela energia do pulso de laser previne a decomposição térmica causada pelo método de aquecimento.⁵²

Mesmo com essas dificuldades, nos últimos 10 anos vários estudos, teóricos e experimentais, da estabilidade conformacional de aminoácidos vem sendo realizados na fase gasosa.^{47-49,53-71} Dentre os aminoácidos mais estudados, podemos destacar a prolina,^{47,55-58,69-71} glicina,^{49,58-62} alanina,^{54,58,63,64,67,68} valina,⁴⁸ serina⁵³ e ácido aspártico.⁶⁵

Devido aos problemas dos altos pontos de fusão e baixa pressão de vapor dos aminoácidos a maioria dos estudos do comportamento conformacional de alguns deles são exclusivamente teóricos.^{56,58, 59,62,64,68,70} Esses estudos foram realizados com o emprego de diferentes métodos e conjuntos de bases, dos quais os métodos que mais foram utilizados são o de correlação eletrônica Moller-Plesset de segunda ordem (MP2) e a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) utilizando o funcional B3LYP. Dentre os conjuntos de bases, as bases de Pople contendo funções difusas [6-31++g(d,p) e 6-311++g(d,p)] são as mais empregadas, uma vez que as funções difusas permitem uma melhor descrição do grupo carboxila com carga negativa.

Destes, alguns poucos estudos empregam cálculos teóricos, em diferentes níveis de teoria, juntamente com dados experimentais na fase gasosa provenientes principalmente da espectroscopia vibracional no infravermelho^{49,53,61,66,67,69} e espectroscopia rotacional no microondas.^{47,48,54} Essa escassez de informações experimentais se deve aos problemas apresentados anteriormente.

Recentemente pôde-se observar um aumento substancial no número de trabalhos teóricos sobre a solvatação de aminoácidos. Explorar as preferências

conformacionais em solução de pequenos aminoácidos, como a glicina e a alanina é de fundamental importância para o entendimento de moléculas mais complexas de grande importância biológica.³⁹ De fato, os trabalhos mais recentes empregam em sua maioria estudos teóricos de solvatação de tais compostos.^{26,37-39,43,44, 46,66,72,73}

Por outro lado, estudos experimentais da estabilidade conformacional de aminoácidos em solventes orgânicos e mesmo em água são pouco explorados. No caso dos solventes orgânicos essa restrição se deve ao fato dos aminoácidos serem insolúveis na maioria dos solventes orgânicos, ao passo que em água a grande limitação se deve ao fato da forte interação intermolecular entre o aminoácido e a água através de ligações de hidrogênio. Outro fator limitante é que em solução aquosa a forma encontrada do aminoácido não é a neutra, mas sim a bipolar.

Para aumentar a solubilidade dos aminoácidos em solventes orgânicos uma alternativa seria realizar a esterificação dos mesmos. Com isso dois problemas seriam resolvidos: a solubilidade e a ausência da forma bipolar.

Estudos realizados em nosso laboratório têm mostrado que ácidos acéticos e acetatos de metila α -substituídos apresentam praticamente os mesmos confôrmeros estáveis, tanto na fase vapor como em solução.⁷⁴ Portanto, a mudança da função ácido carboxílico para éster não exerceria uma influência significativa na estabilidade conformacional. Tem sido também observado que a rotação em torno da ligação O-CH₃, que geraria dois confôrmeros adicionais, *s-cis* e *s-trans* em relação à ligação C=O, podem ser descartados, uma vez que a superfície de energia potencial ("PES") para o acetato de metila, calculada em nível B3LYP/6-31G(d,p), mostrou que o confôrmero *s-cis* é mais estável que o *s-trans* por 7.8 kcal mol⁻¹ sugerindo que os ésteres metílicos ocorrem apenas na conformação *s-cis*.

Como pode ser observado na literatura um dos aminoácidos mais estudados é a prolina.^{47,55-58,69-73} Isso se deve ao fato da prolina ser o único aminoácido contendo um grupo amino secundário fazendo parte de um anel flexível de cinco

membros. O resíduo de prolina ocorre em maior frequência que dos demais aminoácidos, normalmente como parte de uma sequência repetitiva (por exemplo, o colágeno é formado principalmente por glicina e prolina). A revisão dos trabalhos teóricos já publicados demonstra que a ordem de estabilidade dos confôrmeros da prolina é fortemente dependente do nível de teoria usado, gerando inclusive controvérsias quanto a origem da estabilidade conformacional.

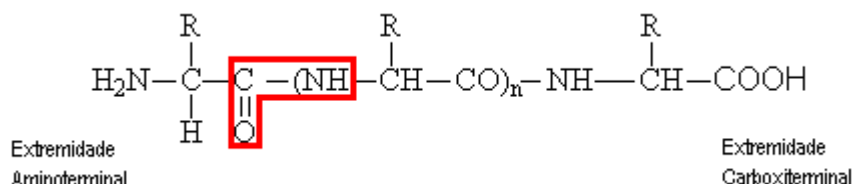
Um outro aminoácido muito estudado é a glicina,^{26,37,38,43,45,49,58-62,66} pois é o aminoácido mais simples e o único onde o carbono α não é um carbono quirálico. A L-alanina,^{39,44,46,54,58,63,64,67,68} também extensivamente investigada, é o aminoácido mais simples que contém um carbono quirálico, cujo comportamento conformacional tem sido também alvo de estudos tanto em solução como na fase gasosa.

Por fim, o ácido aspártico, também alvo da investigação feita neste trabalho, apresenta-se como um aminoácido de grande importância no comportamento de sistemas biológicos, sendo considerado resíduo com alto grau de envolvimento nesses sistemas. De acordo com o Protein Data Bank, resíduos deste aminoácido tem ocorrência de 5% nas proteínas. Sem dúvidas a conformação desses resíduos deve contribuir expressivamente para a forma tridimensional das proteínas, podendo alterar sua estrutura e função num sistema biológico ativo. Além disso, alguns estudos têm demonstrado que o ácido aspártico está diretamente relacionado com a função de receptor em proteínas. O estudo do ácido aspártico mostra-se atualmente de grande importância em vários campos de pesquisa incluindo medidas de decomposição de proteínas, seletividade de anticorpos, estudos da doença de Alzheimer, entre outras^{65,101,102}.

1.5.1 Peptídeos

Os peptídeos são biomoléculas que contém de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos entre si através de ligações peptídicas⁷⁵. A ligação peptídica é formada pela remoção de elementos de água (desidratação) de um grupo OH da carboxila de um aminoácido e de um H do grupo α -amino de outro, exemplo típico de reação de condensação. No entanto para tornar a reação termodinamicamente

mais favorável, o grupo carboxila precisa ser quimicamente modificado ou ativado, de forma que o grupo hidroxila possa ser eliminado mais prontamente.



Esquema 1. Representação de um polipeptídeo. Os peptídeos são nomeados a partir do resíduo aminoterminal, o qual é, por convenção, colocado à esquerda. A ligação peptídica aparece em destaque.

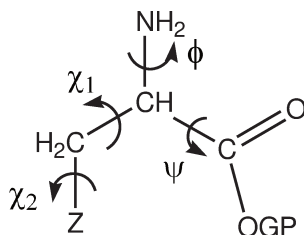
Quando um pequeno número de aminoácidos é reunido através de ligações peptídicas, a estrutura é chamada de oligopeptídeo, e quando muitos aminoácidos são reunidos o produto é chamado de polipeptídeo. As proteínas podem ter milhares de unidades de aminoácidos. Embora os termos “proteína” e “polipeptídeo” possam ser algumas vezes intercambiáveis, as moléculas referidas como polipeptídeos geralmente têm peso molecular abaixo de 10.000 Daltons⁷⁶.

Peptídeos são moléculas extremamente diversificadas em termos funcionais. Muitos atuam como hormônios ou fatores liberadores destes, enquanto outros são, neurotransmissores, toxinas, antibióticos naturais, adoçantes ou substratos de proteases. Nenhuma generalização pode ser feita com relação aos pesos moleculares de peptídeos e proteínas biologicamente ativos em relação a suas funções. Peptídeos de ocorrência natural variam em tamanho, entre dois a muitos milhares de resíduos de aminoácidos. Mesmo os menores podem ter efeito biológico importante, como é o caso do dipeptídeo comercial sintético éster metílico de L-aspartil-L-fenilalanina (o adoçante artificial mais conhecido por aspartame) ou da bradicinina (nove resíduos de aminoácidos) que inibe a inflamação nos tecidos. Todo o conhecimento nessa área começou a ser acumulado a partir da década de 50, quando muitos peptídeos biologicamente ativos foram descobertos e tiveram suas estruturas químicas determinadas. Estas descobertas geraram um enorme interesse por esta classe de compostos e por metodologias para seu isolamento, análise, purificação, identificação e

quantificação, as quais passaram a ser sistematicamente estudadas e aprimoradas⁷⁵.

Dipeptídeos estão sendo cada vez mais utilizados como modelos no estudo da conformação de peptídeos, uma vez que representam a menor unidade estrutural para a análise de padrões estruturais recorrentes como, por exemplo, folhas- β na modelagem de peptídeos. Dentre a enorme possibilidade de combinações entre os aminoácidos, alguns dos mais estudados são provenientes da combinação entre a alanina e a valina uma vez que ambos os resíduos apresentam cadeia lateral alifática (metila e isopropila respectivamente), com características não polar e hidrofóbica, que resulta em uma unidade importante e recorrente na estrutura interna de proteínas solúveis e de hélices transmembrânicas. Também muito estudados são os dipeptídeos contendo resíduos de prolina e serina⁷⁷.

Recentemente muitos estudos têm sido feitos em torno da superfície de energia potencial de dipeptídeos. O alvo é encontrar uma maneira de prever-se a conformação preferencial de oligo- e polipeptídeos compostos de aminoácidos de ocorrência natural. A maioria dos aminoácidos (com exceção da glicina e da prolina) podem ser relacionados à alanina com substituição da cadeia lateral.



Esquema 2 Alanina com o grupo C-terminal protegido (GP), e possível substituição da cadeia lateral(Z)

A conformação dos resíduos de aminoácidos pode ser caracterizada a principio por quatro ângulos de torção : ϕ , ψ , χ_1 e χ_2 , o que leva a uma superfície de energia potencial com quatro variáveis independentes. : $E = E(\phi, \psi, \chi_1, \chi_2)$. Se as variáveis forem separadas entre os ângulos diedros da cadeia lateral e do esqueleto central do resíduo, então pode-se construir duas curvas de energia potencial 2D: $E = E(\phi, \psi)$ e $E = E(\chi_1, \chi_2)$. A primeira, envolvendo os ângulos de torção do esqueleto

central do resíduo, é a mais importante para a determinação da conformação do polipeptídeo e é referida freqüentemente como “mapa de Ramachandran”.⁷⁸

A maioria das estruturas de peptídeos publicadas recentemente tem grupos protetores em ambas as terminações, sendo as mais populares modificações a inclusão dos grupos protetores fenila e aminoisobutila. Uma saída interessante para simulação de interações com vizinhos aminoácidos é a inclusão de grupos acetila do lado aminoterminal e N-metila do lado carboxiterminal, o que resulta na formação de ligações peptídicas nas terminações dos peptídeos.⁷⁹

Em uma serie de artigos já foi mostrado que a preferência conformacional do ângulo diedro ϕ desses dipeptídeos (de aminoácidos com as terminações protegidas por grupos acetila e N-metila)⁸⁰ são similares aqueles resíduos presentes em pequenos peptídeos.⁸¹⁻⁸³ em proteínas denaturadas^{84,85} e em regiões enoveladas de proteínas nativas.⁸⁶ A determinação de preferências conformacionais de dipeptídeos em solução aquosa é também de grande importância para o entendimento da estrutura de proteínas, e é alvo de muitas publicações. Experimentalmente, os dados que relatam as preferências conformacionais desses dipeptídeos são baseados principalmente em constantes de acoplamento de RMN. Recentemente, porém, o uso da espectroscopia vibracional também tem sido usada com eficiência para a determinação das preferências conformacionais dessas moléculas,^{80,87-90} sendo a maioria desses estudos focados em di- e tripeptídeos não protegidos. A principal vantagem apontada do uso de outras técnicas espectroscópicas, em relação ao uso da RMN, no estudo desse sistema é a escala de tempo desta ultima ser muito longa (~1ms) em relação ao tempo de interconversão dos possíveis confôrmeros.

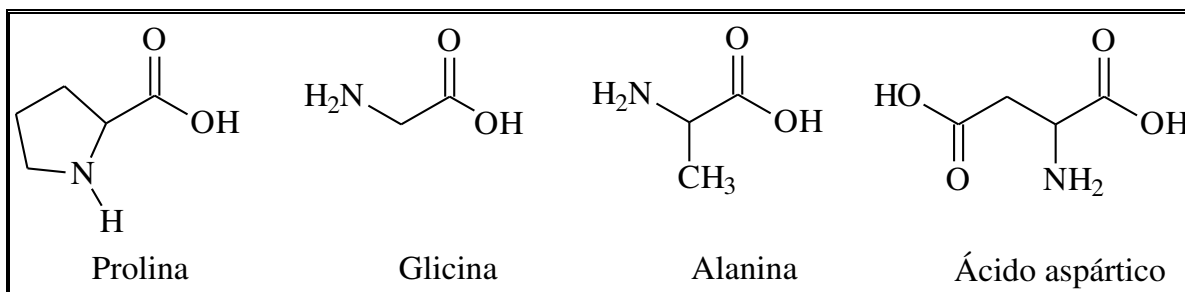
Recentemente a dependência da conformação em relação ao meio tem sido estudada por espectroscopia de infravermelho e simulação de dinâmica molecular, utilizando-se água e tetracloreto de carbono e foi verificada a dependência da freqüência da amida em relação ao solvente utilizado.⁸⁷ Dipeptídeos de glicina e alanina em solução aquosa foram estudados por espectroscopia Raman e dispersão de Rayleigh⁹¹⁻⁹² e uma diferença de entalpia de aproximadamente 4,4

kJ/mol entre os dois confôrmeros mais estáveis, e de 12 kJ/mol em relação ao primeira e à terceira conformações mais estável foi encontrada.

O grande volume de trabalhos encontrados na literatura com modelos de dipeptídeos demonstra sua relevância não só na elucidação do mecanismo de enovelamento de proteínas⁹³, assim como sua importante contribuição para a determinação de estrutura secundária e terciária de polipeptídeos.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo desse trabalho foi o de estudar o comportamento conformacional de ésteres derivados de alguns aminoácidos, através de cálculos teóricos em diferentes níveis de teoria (MP2 e DFT/B3LYP), bem como obter dados experimentais da frequência de vibração no infravermelho do grupo C=O em solventes orgânicos de diferentes polaridades. Os resultados obtidos foram comparados com os estudos prévios, realizados na fase gasosa, para verificar se existia alguma mudança na estabilidade conformacional, quando se passava da fase gasosa para o estudo em solução e também de ácido para éster. Os aminoácidos escolhidos (Esquema 3) foram a prolina, glicina, alanina e ácido aspártico. No caso do éster do ácido aspártico foi realizado um estudo detalhado de RMN de ^1H e ^{13}C para verificar se os acoplamentos J_{HH} e J_{CH} , entre os hidrogênios dos grupos CH e CH_2 apresentavam variação com a mudança da população dos confôrmeros, ressaltando que os hidrogênios do grupo CH_2 são diastereotópicos e portanto apresentam deslocamentos químicos diferentes e acoplam entre si.



Esquema 3. Estrutura dos aminoácidos que foram estudados

Na segunda etapa do projeto iniciou-se o estudo de um dipeptídeo formado a partir de dois dos aminoácidos estudados anteriormente, a alanina e a glicina. Foi feita uma busca pelos mínimos energéticos dos variados ângulos diedros a fim de identificar os possíveis confôrmeros dessa molécula. Esta etapa do projeto tem como objetivo principal dar início a uma série de estudos conformacionais de di- e tripeptídeos a serem realizados futuramente em nosso grupo de trabalho.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentação

A instrumentação básica utilizada na realização do trabalho está listada a seguir:

- Espectrômetros de RMN Varian: Gemini 300; INOVA 500 MHz e Bruker 250MHz;
- Micro computadores Pentium IV HT de 2,8 GHz, 2,0GB de RAM com sistema operacional FreeBSD com interface gráfica KDE e os programas Gaussian03 e Molden;
- Cromatógrafo à gás acoplado ao espectrômetro de massa (GC/MS QP5000 SHIMADZU);
- Espectrômetro de Infravermelho (BOMEN MB100);
- Bombas de vácuo

3.2. Solventes

Para a análise conformacional proposta neste trabalho foi necessária a utilização de solventes com variadas constantes dielétricas tais como: CCl_4 , CHCl_3 , CH_2Cl_2 , CH_3CN e DMSO.

Na obtenção dos espectros ressonância magnética nuclear foram utilizados solventes deuterados (Cil, Aldrich).

Para os espectros de infravermelho utilizaram-se solventes previamente secos de qualidade P. A.

Na síntese e na extração dos compostos foram utilizados solventes de qualidade técnica previamente purificados ou P. A.

3.3 Obtenção dos espectros na região do infravermelho

As amostras foram preparadas a concentrações entre 0,03 e 0,05 M em diferentes solventes previamente secos (CCl_4 , CHCl_3 , CH_2Cl_2 e acetonitrila). Os espectros foram adquiridos utilizando celas de NaCl com espaçador de 0,5 mm e resolução

de $1,0\text{ cm}^{-1}$ com 32 ou 64 acumulações. Para a aquisição do espectro do primeiro overtone utilizou-se uma cela de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

O estiramento do grupo carbonila que apresentava bandas sobrepostas foi deconvoluído computacionalmente utilizando o programa GRAMS/32 disponível no equipamento.

3.4. Obtenção dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C

3.4.1 Preparação das amostras para a obtenção dos espectros

As amostras foram preparadas pesando-se cerca de 20 mg do composto para os espectros de ^1H e 30 mg para os espectros de ^{13}C , os quais foram dissolvidos em 0,7 mL de solvente. Os solventes utilizados na obtenção dos espectros foram $\text{CCl}_4/\text{C}_6\text{D}_6$, CDCl_3 , $\text{C}_2\text{D}_2\text{Cl}_4$, CD_3CN e DMSO-d_6 .

Todas as amostras foram filtradas antes da aquisição dos espectros, pois a presença de partículas sólidas impele à solução um campo não homogêneo, o que impede o ajuste correto do 'shim'.

3.4.2. Condições típicas dos espectros de RMN de ^1H

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em condições padrão de operação.

- Freqüência: 250, 300 ou 500 MHz, dependendo do equipamento utilizado;
- Trava: sinal de deutério do solvente, no caso de tetracloreto de carbono foi utilizado benzeno- d_6 (adicionado no solvente na proporção de 1:10)
- Como referência interna utilizou-se TMS;
- Temperatura $22\text{ }^\circ\text{C}$;
- Largura de varredura (SW): 3000Hz ou 5000 Hz, dependendo do equipamento;
- Número de pontos de dados: 32 K;
- Número de transientes acumulados: 32;
- Largura do sinal do TMS a meia-altura: 0,3 a 0,7 Hz;

3.4.3. Condições típicas dos espectros de RMN de ^{13}C

- Freqüência: 125 MHz,
- Trava: sinal de deutério do solvente, no caso de tetracloreto de carbono foi utilizado benzeno- d_6 ;
- Como referência interna utilizou-se TMS;
- Temperatura 22 °C;
- Largura de varredura (SW): 15000 MHz – 25000 Hz;
- Número de pontos de dados: 64 K;
- Número de transientes acumulados: 512 à 1028;
- Número de pontos na transformada (fn): 256 K;
- Resolução digital média: 0,1Hz/ponto.

3.5 Cálculos teóricos

3.5.1 Gaussian

Os cálculos *ab initio* para os compostos em estudo foram realizados com o programa GAUSSIAN 03,²² utilizando os computadores disponíveis para cálculo no laboratório. As superfícies de energia potencial foram obtidas utilizando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) utilizando o terceiro parâmetro híbrido de troca de Becke e os funcionais de correlação de Lee, Wang e Par (B3LYP) com diferentes conjuntos de bases em alguns casos: 6-31g(d,p); 6-311++g(d,p); cc-pVDZ; aug-cc-pVDZ e aug-cc-pVTZ. Para obtenção das superfícies de energia potencial variou-se o ângulo diedro em análise de 0° a 360°, sendo a geometria da molécula otimizada a cada 10°, obtendo-se assim os gráficos de energia em função do ângulo diedro.

Para os confôrmeros obtidos pelos mínimos energéticos destes gráficos foram feitos cálculos de energia e geometria e ainda cálculos vibracionais obtendo-se

também a energia do ponto zero (ZPE).⁹⁴ Na maioria dos casos empregou-se o método DFT B3LYP, nestes cálculos. Para estes confôrmeros também foram feitos cálculos de energia incluindo o efeito do solvente pelo método PCM [Introdução 1.3.1], disponível como método pré-definido no pacote do Gaussian03, a partir das geometrias previamente otimizadas.

Ainda para os confôrmeros mais estáveis, também com energias e geometrias previamente otimizadas, foram feitos cálculos de NBO (natural bond orbital)⁹⁵ para avaliar quais interações entre orbitais são responsáveis pela estabilização relativa entre eles. Estes cálculos foram feitos com o programa NBO disponível no Gaussian03.

Para descrever os orbitais atômicos, os quais formam os orbitais moleculares, foram empregados os conjuntos de bases de Dunning aug-cc-pVDZ e aug-cc-pVTZ [*“correlation consistent polarized Valence Double Zeta (DZ) e Triple Zeta (TZ)”*]. Esses conjuntos de bases incluem funções difusas adicionais (prefixo aug), as quais são importantes para levar em conta a natureza difusa dos pares de elétrons não ligantes do nitrogênio e do oxigênio. Também foram utilizados conjuntos de funções de base de Pople com funções de polarização (funções d para os átomos pesados e p para os hidrogênios) e também funções difusas (++), as quais permitem que os elétrons ocupem uma região maior do espaço^{21, 96}.

Em alguns casos, para efeito de comparação, também foram feitos para os confôrmeros mais estáveis cálculos de correlação eletrônica através da teoria de perturbação Möller-Plesset de segunda ordem (MP2)²³.

Os valores de energias fornecidos pelo output do programa Gaussian são dados em Hartree. Para o cálculo das energias em kcal mol⁻¹ considerou-se o fator de conversão 1Hartree = 627,5 kcal mol⁻¹.

3.5.2 MODELS

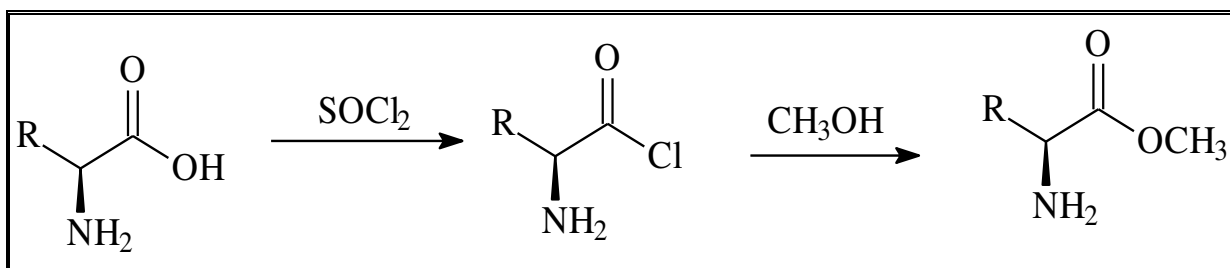
No caso do aspartato de metila foram feitos cálculos de energia de solvatação utilizando-se o modelo de campo de reação do Models.

Os parâmetros necessários para os cálculos de energia da energia de solvatação pela metodologia desenvolvida em conjunto ao nosso laboratório [Introdução 1.2.1] foram obtidos através de programa Models utilizando-se a geometria otimizada previamente pelo Gaussian03 (DFT B3LYP/ aug-cc-pVDZ). A matriz otimizada de cada conformação é introduzida no programa Models que calcula os parâmetros h , k e l que se relacionam com o quadrupolo, o dipolo e o índice de refração da molécula naquela conformação, respectivamente. Estes parâmetros de solvatação, juntamente com os valores experimentais de acoplamentos J (em diversos solventes) são introduzidos no programa Bestfit, que através da construção de uma equação de mínimos quadráticos fornece os melhores valores para os acoplamentos individuais dos confôrmeros presentes em solução, bem como a diferença de energia experimental na fase vapor.

3.6 Síntese dos compostos

Ésteres metílicos:

Os compostos foram sintetizados de acordo com o Esquema 2.⁹⁷ Primeiramente os aminoácidos (prolina, glicina, alanina e o ácido aspártico) foram convertidos nos cloretos de ácidos e com a adição de metanol foram obtidos os ésteres correspondentes.



Esquema 4. Síntese dos ésteres metílicos derivados dos aminoácidos.

3.6.1 Síntese do cloridrato do éster metílico da glicina

Em 50 mL de metanol seco, sob banho de gelo seco e etanol (temperatura em torno de -10°C) adicionou-se 5,5 mL de cloreto de tionila comercial (Spectrum) gota a gota e sob constante agitação. A mistura foi deixada sob agitação por 10 minutos e em seguida adicionou-se 5,0 g (0,065 mol) de glicina (Acros organics). Após 2 horas, o solvente foi então evaporado em um rota-vapor, e o produto lavado com 25 mL de metanol, e recristalizado com 12 mL de éter seco. Os cristais foram filtrados e em seguida o produto foi tratado de acordo como descrito a seguir.

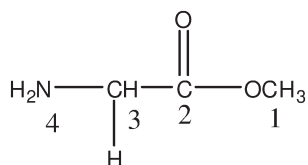
3.6.2 Glicinato de metila

O produto obtido a partir do procedimento descrito acima se encontra na forma de cloridrato. Assim, para a obtenção de seus espectros nos demais solventes orgânicos é necessário a desprotonação do mesmo, obtida da maneira descrita a seguir.

Borbulhou-se gás amônia em uma suspensão do cloridrato do éster em éter (previamente seco) sob constante agitação, por aproximadamente duas horas. O precipitado de cloreto de amônio foi filtrado e a solução orgânica seca com sulfato de sódio. Após evaporar o solvente em um rota-vapor obteve-se 2,6 g (0,029 mol) de um líquido transparente e incolor (45% de rendimento global), caracterizado como sendo o éster metílico da glicina por RMN de ^1H e ^{13}C (Anexos Figuras 1 e 2).

RMN de ^1H (em CDCl_3 a 500MHz) δ : 1,90 [2H, s, H-4]; 3,51 [2H, H-3, s]; 3,82 [3H, s, H-1]

RMN de ^{13}C { ^1H } (em CDCl_3 a 125MHz): δ 43,5 [C-3]; 51,6 [C-1]; 174,4 [C-2];

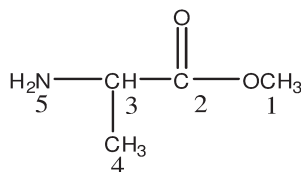


3.6.3 Síntese do cloridrato do éster metílico da alanina

Em 50 mL de metanol seco, sob banho de gelo seco e etanol (temperatura em torno de -10°C) adicionou-se 3,3 mL de cloreto de tionila comercial (Spectrum) gota a gota e sob constante agitação. A mistura foi deixada sob agitação por 10 minutos e em seguida adicionou-se 3,5 g (0,04 mol) de L-alanina. Após 24 horas, o solvente foi então evaporado em um rota-vapor, e o resíduo solubilizado em 25 mL de metanol e recristalizado com 12 mL de éter seco.

3.6.4 Alaninato de metila

Para a desprotonação do produto procedeu-se da mesma forma descrita para o éster da glicina. Borbulhou-se o gás amônia em uma suspensão do cloridrato do éster em éter previamente seco sob constante agitação, por duas horas. O precipitado de cloreto de amônio foi filtrado e a solução orgânica seca com sulfato de sódio. Após evaporar o solvente, produto obtido 1,35g (33% de rendimento) foi caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C . (Anexos Figuras 3 e 4).



RMN de ^1H (em DMSO a 300MHz): δ 1,16 [3H, d, $^3J_{\text{HH}} = 6,96$ Hz, H-4]; 2,21 [2H, s, H-5]; 3,39 [1H, q, $^3J_{\text{HH}} = 6,96$ Hz, H-3]; 3,59 [3H, s, H-1],

RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (em DMSO- d_6 a 75MHz) : δ 20,5 [CH_3 -4]; 49,8 [CH-3]; 51,8 [CH_3 -1]; 176,9 [C-2,].

3.6.5 Síntese do cloridrato do éster metílico da prolina

Em 50 mL de metanol seco, sob banho de gelo seco e etanol (temperatura em torno de -10°C) adicionou-se 3.3 mL de cloreto de tionila (Spectrum) gota a gota e sob constante agitação. A mistura foi deixada sob agitação por 10 minutos e em seguida adicionou-se 2,0 g (0,04 mol) de L-prolina. Após 24 horas, o solvente foi

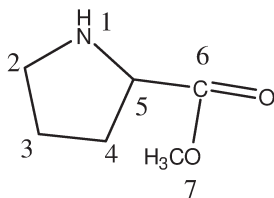
então evaporado em um rota-vapor, e o resíduo lavado em 25,0 mL de metanol, e recristalizado com 12 mL de éter seco.

3.6.6 Prolinato de metila

Para a desprotonação do produto procedeu-se da mesma forma descrita anteriormente para o éster da glicina. O rendimento global da reação foi de 56%. O produto foi caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C e HSQC (Anexo Figuras 5 e 6).

RMN de ^1H (em CDCl_3 a 500MHz): δ 1,76 [2H, H-3, m]; 1,84 [1H, H-4, m]; 2,13 [1H, H-4', m]; 2,55 [1H, H-1, s]; 2,92 [1H, H-2, dt]; 3,05 [1H, H-2', dt], 3,76 [3H, H-7, s]. 3,74 [1H, H-5, dd, $^3J_{\text{HH}}=5,8$ Hz]

RMN de ^{13}C (em CDCl_3 a 125MHz): δ 25,1 [C-3]; 29,9 [C-4]; 45,9 [C-2]; 51,4 [C-7]; 57,8 [C-5]; 176,0 [C-6].



3.6.7 Síntese do cloridrato do aspartato de metila

Em 100 mL de metanol seco, sob banho de gelo seco e etanol (temperatura em torno de -10°C) adicionou-se 6,6 mL de cloreto de tionila comercial (Spectrum) gota a gota e sob constante agitação. A mistura foi deixada sob agitação por 10 minutos e em seguida adicionou-se 3,5 g (0,02 mol) do ácido aspártico (Acros organics). Após 2 horas, o solvente foi então evaporado em um rotaevaporador, e o produto lavado com 25 mL de metanol, e recristalizado com 12 mL de éter seco.

3.6.8 Aspartato de dimetila

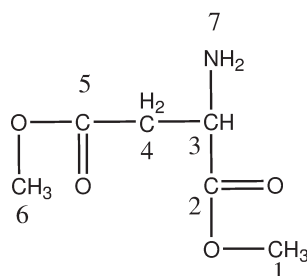
O produto obtido a partir do procedimento descrito acima, assim como os demais aminoácidos, encontra-se na forma de cloridrato. Assim, para a obtenção de seus

espectros em solventes orgânicos é necessária a desprotonação do mesmo, obtida da maneira descrita a seguir.

Borbulhou-se gás amônia em uma suspensão do cloridrato do éster em éter (previamente seco) sob constante agitação, por duas horas. O precipitado de cloreto de amônio foi filtrado e a solução orgânica seca com sulfato de sódio. Após evaporar o solvente em um rota-vapor obteve-se um líquido transparente e incolor (53% de rendimento), caracterizado como sendo o éster dimetílico do ácido aspártico por RMN de ^1H e ^{13}C (Anexo Figuras 7 e 8).

RMN de ^1H (em CDCl_3 a 300MHz): δ 2,40 [2H, H-7]; 2,72 [1H, dd, $^2J=16,48$, $^3J=7,19$, H-4]; 2,83 [1H, dd, $^2J=16,53$, $^3J=4,76$, H-4']; 3,70 [3H, s, H-1]; 3,74 [3H, s, H-6]; 3,84 [1H, dd, $^3J=7,16$, $^3J=4,76$, H-3]

RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (em CDCl_3 a 75MHz): δ 38,7 [CH, C-3]; 51,2 [CH₂-C4]; 51,9 [CH-C6]; 52,4 [CH₃-C1]; 171,7 [C-5]; 174,6 [C-2].



3.7 Sínteses do dipeptídeo

Para síntese dos dipeptídeos utilizou-se o método de síntese em solução usando como estratégia a condensação por utilização de agente acoplador (ativador do grupo carbonila do resíduo de aminoácido doador de acila). A proteção do grupo N-terminal, do aminoácido doador de acila foi feita utilizando t-butiloxilcarbonila (Boc), (lábil aos ácidos trifluoracético e fórmico) e enquanto que o grupo C-terminal, do aminoácido aceitor de acila foi protegido por esterificação. Como agente ativador do grupo carbonila foi usado DCC (N,N-diciclohexilcarboiimida).

Proteção do grupo C-terminal

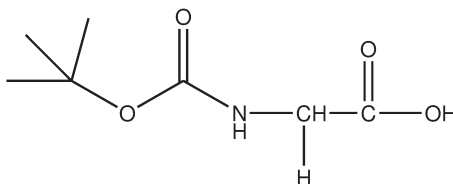
A esterificação do grupo C terminal foi feita como descrito anteriormente para os aminoácidos individuais. Como o objetivo era a síntese de um dipeptídeo gli-ala-OMe, fez-se a esterificação da alanina.

Proteção do grupo N-terminal

Para proteção do resíduo de aminoácido utilizado como doador de acila, a glicina, foi feita a proteção do nitrogênio da seguinte forma:⁹⁸

À uma solução do aminoácido livre (50 mmol) em uma mistura de THF/H₂O 1:1 (300 mL) a 0 °C, adicionou-se consecutivamente NaHCO₃ (150 mmol) e Boc₂O di-terc-butiloxil-dicarbonato (60 mL). Após 30 minutos, a solução foi deixada sob agitação em temperatura ambiente durante uma noite. A solução foi então extraída com Et₂O (2 x 200 mL). A fase aquosa foi acidificada a pH entre 4 e 5 pela adição de solução saturada de ácido cítrico a 0 °C e em seguida extraída com CH₂Cl₂. A fase orgânica foi então seca com Na₂SO₄ e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida fornecendo o aminoácido protegido, sendo utilizado posteriormente sem purificação. O composto foi caracterizado por RMN de ¹H (Anexos, Figura 9).

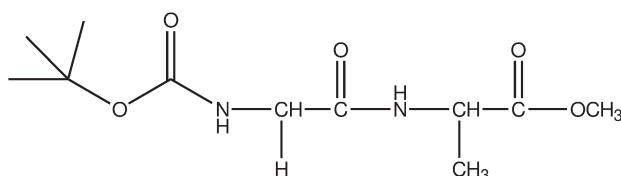
RMN de ¹H (em CDCl₃ a 250MHz): δ 1,45 [9H, 3CH₃, s]; 3,90 [2H, CH₂]; 6,80 [1H, NH, s]; 9,75 [1H, OH, s];



Acoplamento dos resíduos de aminoácidos

Purificação do reagente DCC (dicicloexilcarbodiimida):⁹⁹ O composto foi dissolvido em CH₂Cl₂ e seco com MgSO₄ anidro durante 4 horas, filtrado e evaporado e destilado a pressão reduzida em banho de silicone a 150°C.

Reação de acoplamento:¹⁰⁰ A uma solução do aminoácido protegido Boc-Gli (1,25g) em 50 mL de THF adicionou-se consecutivamente N,N-dicicloexilcarbodiimida (3,10g) e alaninato de metila (0,72g). A mistura foi deixada sob agitação durante a noite à temperatura ambiente. Em seguida a mistura reacional foi tratada com gotas de ácido acético, para a decomposição do excesso de reagente. A uréia, insolúvel, foi filtrada e lavou-se a solução consecutivamente com água, solução diluída de ácido cítrico (5%), solução diluída de bicarbonato de potássio (10%) e água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, e o solvente foi evaporado em um rota evaporador. O produto obtido foi caracterizado como sendo o Boc-gli-ala-OMe por RMN de ^1H e ^{13}C . Tentou-se a purificação do produto por recristalização em éter de petróleo, sem sucesso. Anexos Figuras 10 e 11.



RMN de ^1H (em CDCl_3 a 250MHz): δ 1,47 [3H, CH_3 , d]; 1,49 [9H, 3 CH_3 , s]; 3,72 [3H, OCH_3 , s]; 3,80 [2H, CH_2 , s]; 4,11 [1H, CH, q]; 5,25 [H, NH, s]; 6,75 [H, NH, s]

RMN de ^{13}C (em CDCl_3 a 62,4MHz): δ 18,1 [CH_3]; 27,3 [3 CH_3]; 48,2 [CH_2]; 53,2 [OCH_3]; 78 [C]; 168,3 [$\text{C}=\text{O}$], 172,1 [$\text{C}=\text{O}$], 174,3 [$\text{C}=\text{O}$]

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Éster metílico da glicina (glicinato de metila)

Síntese:

Inicialmente tentou-se obter o éster do aminoácido por esterificação direta da glicina, inclusive usando um Dean-Stark, porém os resultados não foram satisfatórios. Assim, optou-se por converter o aminoácido no cloreto de aminoácido correspondente, utilizando-se o reagente cloreto de tionila, e em seguida transformando-o no éster metílico. O produto foi mantido sob refrigeração por algumas horas antes da recristalização, feita com éter previamente seco. A etapa de desprotonação também apresentou dificuldades, sendo testados alguns procedimentos, com a utilização de diferentes bases (NaOH, NaH_2CO_3 , NH_4OH), sem resultados satisfatórios, sendo o problema resolvido empregando-se gás amônia. O rendimento global da reação (calculada depois da etapa de desprotonação) foi de 46%.

Cálculos teóricos:

A partir de cálculos em nível B3LYP/6-31g(d,p) construiu-se o gráfico da superfície de energia potencial da ligação $\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{CH}_3$ do éster metílico da glicina, assim como descrito na seção 3.5 da parte Experimental (Figura 1). A diferença de energia calculada entre os confôrmeros *cis* e *trans* foi de $8,12 \text{ kcal mol}^{-1}$

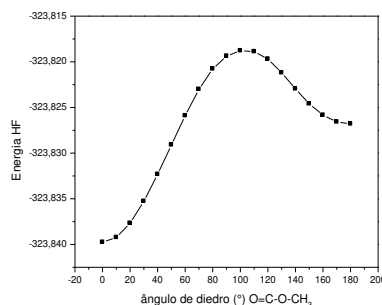


Figura 1. Gráfico da superfície de energia potencial do glicinato de metila, em nível B3LYP/6-31g(d,p). O gráfico apresenta o scan em relação à ligação $\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{CH}_3$, variando o ângulo de diedro de 0° a 180°

Como a diferença de energia entre o conformero *cis* e o *trans* é maior que 5 kcal mol⁻¹ (o que infere ao conformero mais estável, no caso o *cis*, mais de 99,9% da população à temperatura ambiente), foram feitos para o estudo do comportamento conformacional do glicinato de metila, cálculos considerando apenas os conformeros com o ângulo de diedro O=C-O-CH₃ igual a zero (*cis*). Esta observação concorda com estudos prévios que demonstraram que a mudança da função ácido carboxílico para éster não exerce influência na estabilidade conformacional (Introdução 1.5).

Assim, construiu-se um gráfico da superfície de energia potencial variando-se o ângulo diedro O=C-CH₂-NH₂ do glicinato de metila (Figura 2), através do qual foram obtidos os rotâmeros mais estáveis para este composto (Figura 3).

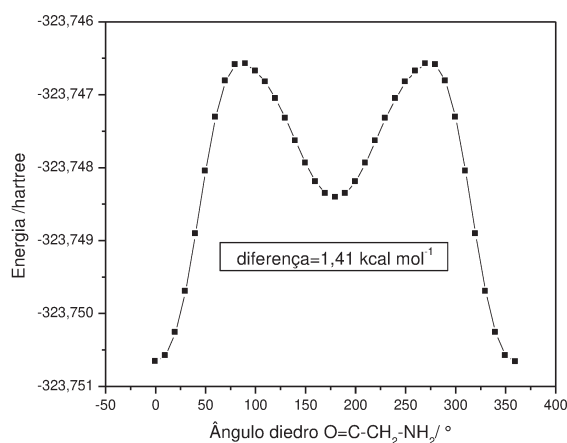


Figura 2. Superfície de energia potencial para o éster metílico da glicina em nível B3LYP/cc-pVDZ. A diferença de energia apresentada no gráfico se refere aos conformeros antes da otimização.

As geometrias das formas mais estáveis foram identificadas através dos mínimos da superfície de energia potencial como sendo a *cis* (ou sinperiplanar) com o ângulo de diedro O=C-CH₂-NH₂ = 0° e a *trans* (ou antiperiplanar) com O=C-CH₂-NH₂ = 180°. Estas geometrias foram então otimizadas e tiveram suas energias e frequências calculadas em nível MP2/aug-cc-pVDZ, sendo o rotâmero *cis* mais estável que o *trans* por uma diferença de energia de $\Delta E^V = 1,47$ kcal mol⁻¹. A

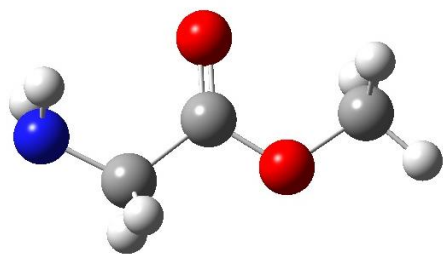
Tabela 1 mostra os dados de geometria, energia, momento de dipolo e frequência calculados para esse nível de teoria.

Estes dois confôrmeros foram também otimizados e tiveram suas frequências calculadas em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ e B3LYP/aug-cc-pVTZ. Os dados obtidos de energia, momento de dipolo e frequência calculada nesses níveis de teoria estão listados na Tabela 2. A Figura 3 mostra a representação espacial dos átomos.

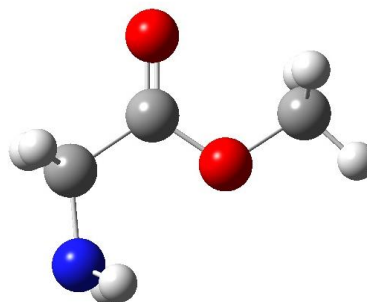
Tabela 1. Dados teóricos para os confôrmeros gli1 e gli2 do éster metílico da glicina em nível MP2/aug-cc-pVDZ.

Parâmetros	gli1	gli2
$r(C=O)^a$	1,22245	1,22245
$r(C-O)^a$	1,36002	1,35923
$r(C-C)^a$	1,52760	1,52500
$r(C-N)^a$	1,45905	1,45719
$r(C-H)^a$	1,10167	1,10182
$\angle(O=C-C)^b$	123,730	125,403
$\angle(N-C-C)^b$	118,887	115,329
$\angle(N-C-H)^b$	109,787	109,740
$\angle(C-C-H)^b$	106,150	107,709
$\phi(N-C-C=O)^b$	179,446	0,019
$\phi(O=C-O-C)^b$	0,019	0,003
$E_{relativa}$ corrigida pelo ZPE ^c	0	1,47
Energia fornecida corrigida ZPE ^d	-322,797417	-322,795059
Frequência carbonila ^e	1762	1758
Momento de dipolo ^f	1,8402	2,4408

^a angstroms; ^b graus; ^c kcal mol⁻¹; ^d Hartrees; ^e cm⁻¹; ^f Debye



gli1 (*cis*) sinperiplanar



gli2 (*trans*) antiperiplanar

Figura 3. Representação espacial dos átomos para o éster metílico da glicina nas conformações gli1 (*cis*) e gli2 (*trans*).

Tabela 2. Dados teóricos para os confôrmeros 1 e 2 do glicinato de metila B3LYP/aug-cc-pVDZ e B3LYP/aug-cc-pVTZ

Parâmetros	B3LYP/aug-cc-pVDZ		B3LYP/aug-cc-pVTZ	
	gli1	gli2	gli1	gli2
E_{relativa} corrigida ZPE ^a	0	1,60	0	1,61
Energia fornecida corrigida ZPE ^b	-323,677035	-323,67448	-323,762775	-323,760202
Frequência carbonila ^c	1782	1775	1788	1780
Momento de dipolo ^d	1,7879	2,4001	1,7683	2,4117

^a (kcal mol⁻¹), ^b Hartree, ^c (cm⁻¹), ^d (Debye)

Pela análise das Tabelas 1 e 2 observa-se que para o glicinato de metila, os dados obtidos pelos dois métodos de cálculos utilizados são concordantes, mostrando o confôrmero gli1 (*cis*) como sendo o mais estável na fase vapor. A mudança de conjunto de bases de aug-cc-pVDZ para aug-cc-pVTZ não altera significativamente o resultado do método B3LYP, sendo que a diferença de energia do confôrmero mais estável *cis* para o segundo mais estável *trans* é de 1,60 kcal mol⁻¹ para o primeiro e 1, 61 kcal mol⁻¹ para o segundo conjunto de

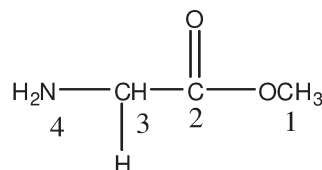
bases empregado. Quanto aos cálculos de frequência, os obtidos pelo método MP2 são os mais próximos dos resultados experimentais.

Observações experimentais:

Foram obtidos espectros de RMN de ^1H (300MHz) e de ^{13}C (75MHz) para o glicinato de metila em diferentes solventes. Os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento obtidos estão mostrados a seguir (Tabela 3).

Tabela 3: Deslocamentos químicos (ppm) de ^1H e de ^{13}C em diferentes solventes e constantes de acoplamento (Hz) para o glicinato de metila.

Solvente	$\delta\text{H-1}$	$\delta\text{H-3}$	$\delta\text{H-4}$	δC1	δC2	δC3	$^1J_{\text{C3-H}}$
CCl_4	3,61	3,24	1,25	51,0	173,7	43,6	136,10
CDCl_3	3,73	3,44	1,81	51,6	174,4	43,5	136,73
CD_2Cl_2	3,69	3,38	1,52	51,6	174,7	43,7	136,44
DMSO-d_6	3,61	3,26	2,10	51,7	175,2	42,1	135,80



Pela Tabela 3 observa-se que a constante de acoplamento $^1J_{\text{CH}}$ não sofre variação significativa com a mudança do solvente, indicando que neste caso, provavelmente não há variação na população dos rotâmeros com a mudança da polaridade do solvente.

Nos espectros de infravermelho obtidos em diferentes solventes (Figura 4) pode-se observar a presença de apenas uma banda simétrica na região da carbonila para todos os solventes utilizados.

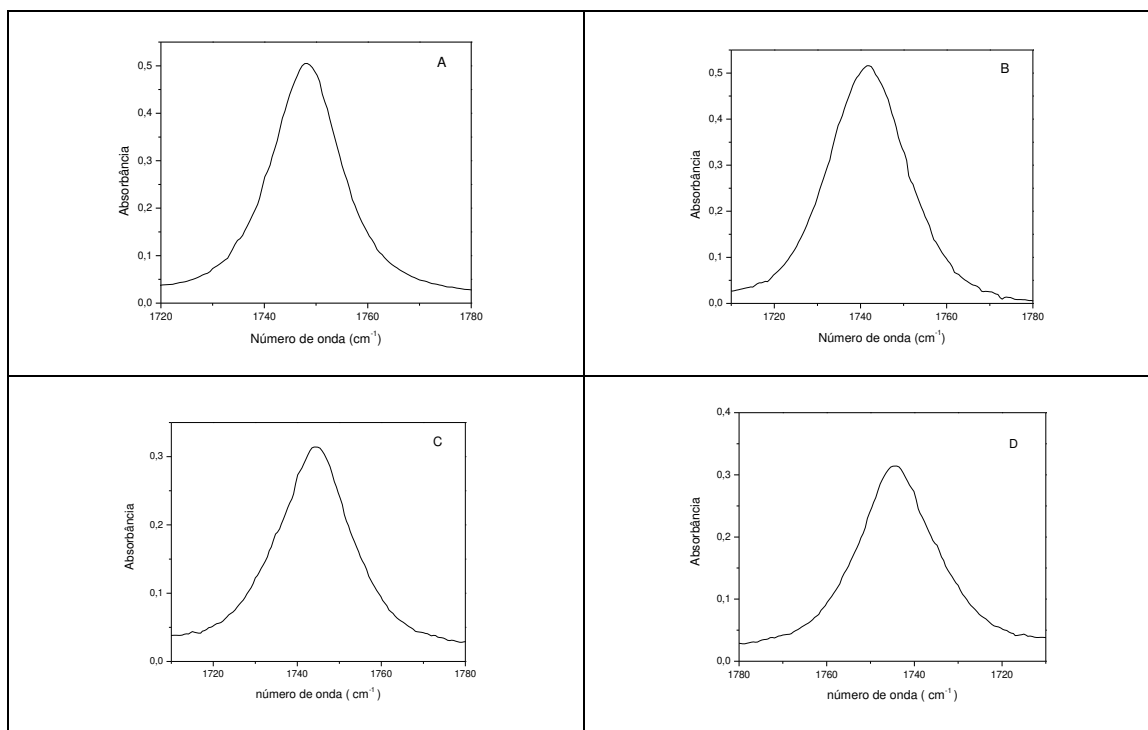


Figura 4: Espectro na região do infravermelho para o estiramento C=O do glicinato de metila, nos diferentes solventes utilizados A) CCl_4 , B) CH_2Cl_2 , C) CHCl_3 e D) CH_3CN .

Esta banda é atribuída ao rotâmero mais estável *cis* que apresenta uma diferença de energia em relação ao rotâmero *trans* de $1,47\text{kcal mol}^{-1}$ na fase vapor (em nível MP2/aug-cc-pVDZ). Não é descartada, entretanto, a possibilidade dessa banda ser uma sobreposição das bandas dos rotâmeros *cis* e *trans*. Esta hipótese é válida, uma vez que as frequências calculadas para as duas conformações são muito parecidas, com diferença de em média 6 cm^{-1} . No entanto, a presença de apenas uma banda é o mais provável, já que não foi observada variação na constante de acoplamento $^1J_{\text{CH}}$. Para verificar esta hipótese foi feito um espectro de infravermelho no primeiro overtone da região da carbonila. Este espectro confirma a presença de apenas uma banda nessa região do espectro para o éster metílico da glicina.

Cálculos de solvatação e NBO:

Cálculos incluindo o efeito do solvente, pelo método PCM, em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ mostram uma pequena diminuição na diferença de energia entre os

confômeros, sendo $\Delta E_{\text{solv}}^{\text{gli2-gli1}} = 1,30 \text{ kcal mol}^{-1}$. Para efeito de comparação, utilizou-se parâmetros de solvatação referentes ao DMSO (disponíveis no pacote do Gaussian03) uma vez que esse foi o solvente de maior constante dielétrica utilizado experimentalmente. A diminuição na diferença de energia entre os confômeros, no entanto, não é suficiente para estabilizar a conformação gli2 (que apresenta maior momento de dipolo) em solução, mesmo nos solventes de maior constante dielétrica, como pode ser observado através dos dados de IV e RMN.

Os parâmetros de geometria (distâncias, ângulos de ligação etc.) da molécula calculada com efeitos do solvente não estão incluídos por serem muito semelhantes aos obtidos no estado de vapor.

Cálculos de NBO, obtidos também em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ a partir da geometria otimizada com efeito do solvente nesse mesmo nível de teoria, mostram que as principais interações entre orbitais envolvidas na estabilização do glicinato de metila são aquelas típicas de ésteres, entre o par de elétrons livres do oxigênio da metoxila e os orbitais antiligantes da carbonila e do carbono alfa carbonila. Algumas interações envolvendo os orbitais do nitrogênio são importantes na estabilização do confômero gli1 em relação ao outro confômero, e na Tabela 4 são mostrados, além das principais interações observadas para os dois confômeros, exemplos de interações que só ocorrem para essa geometria.

Pela Tabela 4 observamos que a conformação gli1 tem simetria adequada para a existência de interações como as do tipo $\sigma_{\text{O-C}} \rightarrow \sigma_{\text{C-N}}^*$ e $n_{\text{N}} \rightarrow \sigma_{\text{O-C}}^*$, que não ocorrem na conformação gli2 devido a falta de simetria entre esses orbitais.

Tabela 4. Comparação entre as principais interações orbitais para o glicinato de metila obtido através de cálculos de NBO em nível B3LYP\aug-cc-pVDZ

Tipo de interação	gli1 ^a	gli2 ^a
$n_O \rightarrow \pi^*_{C=O}$	49,17	48,77
$n_O \rightarrow \sigma^*_{O-C}$	33,99	34,83
$n_O \rightarrow \sigma^*_{C-C}$	18,54	17,88
$n_O \rightarrow \sigma^*_{C-O}$	9,16	8,75
$n_N \rightarrow \sigma^*_{C-C}$	9,10	10,42
$\sigma_{O-C} \rightarrow \sigma^*_{C-N}$	1,65	-
$n_O \rightarrow \sigma^*_{C-N}$	0,63	-
$n_N \rightarrow \sigma^*_{O-C}$	0,94	-

^a kcal mol⁻¹

Estas interações são substituídas no confômero gli2 por interações normalmente de menor magnitude. Por exemplo, a interação $n_N \rightarrow \sigma^*_{O-C}$ de 0,94 kcal mol⁻¹ no gli1 é substituída por uma interação do tipo $n_N \rightarrow \sigma^*_{O=C}$ de 0,67 kcal mol⁻¹ no gli2. As outras duas interações exemplificadas na Tabela 1 não possuem interações respectivas para o confômero gli2. Estas interações são as principais responsáveis pela maior estabilidade do confômero gli1 em relação ao gli2.

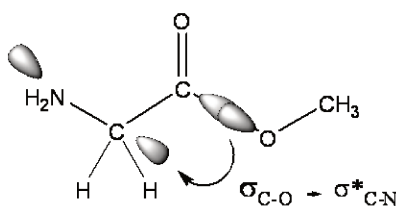


Figura 5. Exemplo de interação entre os orbitais σ_{O-C} e σ^*_{C-N} , só observado para a conformação gli1.

Algumas interações que ocorrem em ambos os confômeros aparecem com maior magnitude na conformação gli2, como por exemplo, a $n_N \rightarrow \sigma^*_{C-C}$, com magnitude de 9,10 kcal mol⁻¹ no gli1 e 10,42 kcal mol⁻¹ no gli2. Isso acontece porque para a

conformação gli2 o par de elétrons no nitrogênio está menos comprometido em outras interações, pela falta de simetria, e conseqüentemente mais disponível para essa interação.

Verifica-se dessa forma que o glicinato de metila possui dois confôrmeros na fase vapor, gli1 e gli2, com diferença de energia de 1,60 kcal mol⁻¹, calculado em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ. Apesar da diminuição dessa diferença de energia com efeito do solvente para 1,30 kcal mol⁻¹, em solução só foi possível observar o confôrmero mais estável, gli1, em todos os solventes estudados (CCl₄, CH₂Cl₂, CH₃Cl, CH₃CN, DMSO). Os dados de infravermelho mostram apenas uma banda na região da carbonila, e os dados de RMN mostram que as constantes de acoplamentos não sofrem variações significativas com a mudança da polaridade do meio, podendo-se concluir assim que o composto não é sensível a mudanças de polaridade do meio. Esse estudo foi complementado com dados de NBO que confirmam a maior estabilidade do confôrmero gli1 devido a interações presentes apenas nessa conformação, como exemplo $\sigma_{\text{O-C}} \rightarrow \sigma^*_{\text{C-N}}$.

Pode-se concluir dessa maneira que o glicinato de metila apresenta apenas uma conformação mais estável em solução – a *cis* em relação ao ângulo diedro O=C-O-NH₂, e que essa conformação não é sensível à variação da polaridade do meio, uma vez que a mudança da constante dielétrica dos solventes utilizados não influenciaram no equilíbrio conformacional.

4.2 Éster metílico da alanina (alaninato de metila)

Síntese:

Assim como o éster da glicina, o alaninato de metila foi obtido pela conversão da alanina no cloreto do aminoácido, com a seguida esterificação com metanol. O cloridrato foi desprotonado com gás de amônia, e o produto obtido armazenado sob refrigeração. O rendimento total da reação foi de 33%.

Cálculos teóricos:

A partir de cálculos em nível B3LYP/6-31g(d,p) construiu-se o gráfico da superfície de energia potencial da ligação $\text{O}=\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_3$ do éster metílico da alanina. A diferença de energia calculada entre os confôrmeros *cis* e *trans* foi de $9,54 \text{ kcal mol}^{-1}$. Dessa forma, assim como para o glicinato de metila, não foram consideradas as conformações com ângulo diedro $\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{CH}_3$ diferente de 0° .

Construiu-se então um gráfico da superfície de energia potencial, em nível B3LYP/cc-pVTZ, da ligação $\text{O}=\text{C}-\text{CH}-\text{NH}_2$ do alaninato de metila, através do qual observa-se apenas um mínimo energético, sinperiplanar com ângulo diedro $\text{O}=\text{C}-\text{CH}-\text{NH}_2 = 340^\circ$ (Figura 6a). Para efeito de comparação, construiu-se outro gráfico da superfície de energia potencial utilizando o mesmo método DFT, porém agora com um conjunto de bases de Pople [6-311++g(d,p)] (Figura 6b).

Nesse novo gráfico, diferentemente do observado anteriormente, pode-se constatar a presença de dois mínimos energéticos, um sinperiplanar com ângulo diedro $\text{O}=\text{C}-\text{CH}-\text{NH}_2 = 340^\circ$ e outro anticlinal com ângulo diedro $\text{O}=\text{C}-\text{CH}-\text{NH}_2 = 140^\circ$.

No entanto, para uma análise mais precisa, foi necessária a construção de mais dois gráficos de energia potencial, uma vez que apenas para o conjunto de bases de Pople foram incluídas funções difusas (++). Os gráficos foram então construídos em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ (Figura 6c) e B3LYP/6-31g(d,p) (Figura 6d). O resultado obtido está na Figura 6.

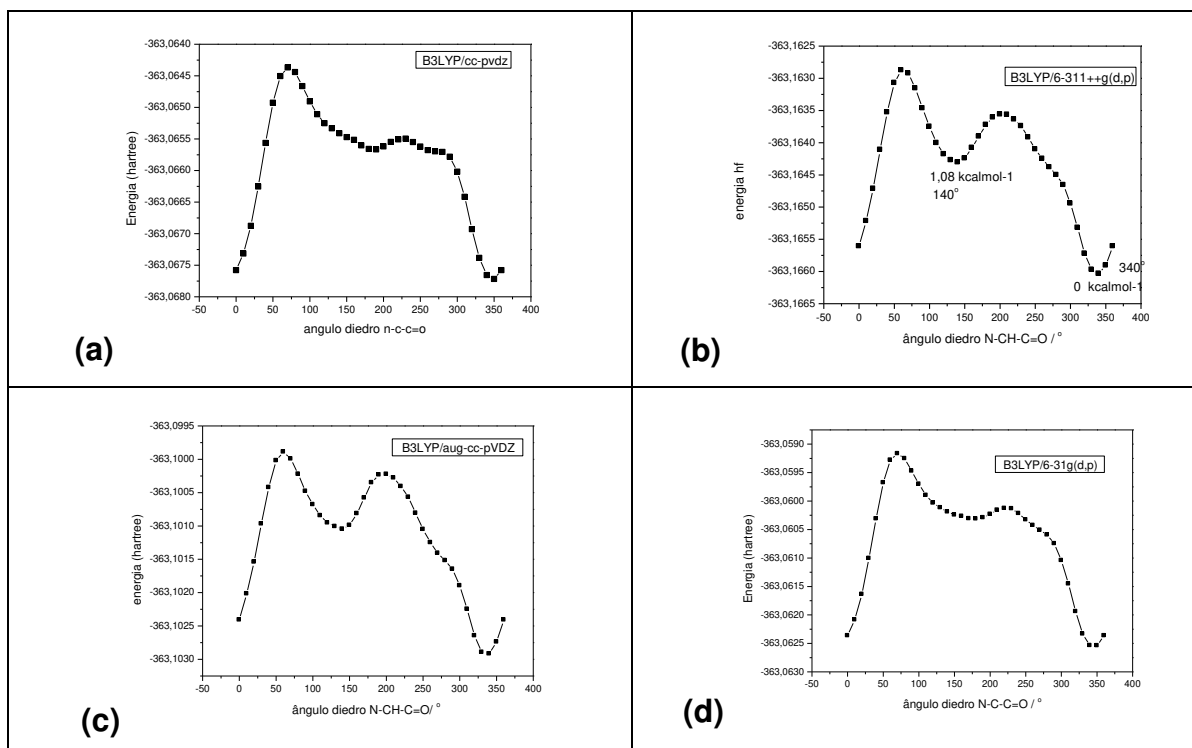
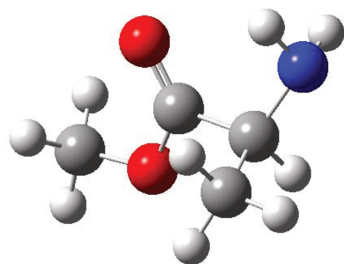


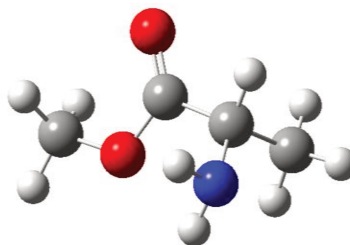
Figura 6. Gráficos das superfícies de energia potencial para o alaninato de metila, calculadas com o método B3LYP com diferentes conjuntos de bases.

Analisando os resultados obtidos, verificamos que a inclusão de funções difusas (aug- para bases de Dunning e ++ para bases de Pople) influi significativamente no perfil da superfície de energia potencial do alaninato de metila, mas que a mudança do conjunto de bases de Pople para um conjunto de bases de Dunning não altera o resultado obtido. As curvas obtidas com a inclusão dessas funções apontam dois mínimos energéticos, enquanto que as obtidas sem a inclusão de funções difusas apontam apenas um mínimo mais ou menos bem definido.

A seguir, as geometrias dos mínimos energéticos (sinperiplanar e anticlinal) foram otimizadas e tiveram suas energias e freqüências calculadas método DFT B3LYP em diferentes conjuntos de bases. Estas geometrias foram também otimizadas pelo método MP2. Os resultados obtidos de geometria, momento de dipolo e freqüência calculados em nível MP2/ aug-cc-pVDZ estão na Tabela 5 (abaixo). A Figura 7 apresenta a representação espacial dos átomos calculada nesse nível de teoria.



ala1 (sinperiplanar)



ala2 (anticlinal)

Figura 7. Representação espacial dos átomos para o éster metílico da alanina nas conformações ala1 (sinperiplanar) e ala2 (anticlinal), obtidos em nível de teoria MP2/ aug-cc-pVDZ

Tabela 5. Dados teóricos para os confôrmeros ala1 (sinperiplanar) e ala2 (anticlinal) do éster metílico da alanina em nível. MP2/ aug-cc-pVDZ

Parâmetros	ala1	ala2
$r(\text{C}=\text{O})^a$	1,2135	1,2133
$r(\text{C}-\text{O})^a$	1,3503	1,3532
$r(\text{C}-\text{C})^a$	1,5241	1,5300
$r(\text{C}-\text{N})^a$	1,4558	1,4595
$r(\text{C}-\text{H})^a$	1,0943	1,0938
$\angle(\text{O}=\text{C}-\text{CH})^b$	125,36	125,14
$\angle(\text{N}-\text{C}-\text{CO})^b$	113,45	115,27
$\angle(\text{N}-\text{C}-\text{H})^b$	108,71	108,40
$\angle(\text{NC}-\text{C}-\text{H})^b$	109,87	109,25
$\phi(\text{O}=\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3)^b$	96,17	263,12
$\phi(\text{O}=\text{C}-\text{C}-\text{H})^b$	213,9	20,11
$\phi(\text{N}-\text{C}-\text{C}=\text{O})^b$	334,44	139,89
$\phi(\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{C})^b$	358,25	0,82
E_{relativa} corrigida pelo ZPE ^c	0	0,98
E fornecida corrigida ZPE ^d	-362.02879	-362.02723
Frequência carbonila (cm^{-1}) ^e	1789	1787
Dipole moment (Debye) ^f	1,9519	2,2079

^a angstroms; ^b graus; ^c kcal.mol⁻¹; ^d Hartrees; ^e cm⁻¹; ^f Debye

Pela análise das Tabelas 5 e 6 observa-se que para o alaninato de metila, os dados obtidos pelos diferentes níveis de teoria utilizados são concordantes, mostrando o confômero ala1 (sinperiplanar) como sendo o mais estável na fase de vapor. O método MP2 mostra uma diferença de energia no vapor de $\Delta E^{\text{v}}_{\text{ala2-ala1}} = 0,98 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabela 5) em favor deste confômero. A Tabela 6 faz uma comparação entre dados de momento de dipolo, frequência e energia relativa, calculados em outros níveis de teoria: B3LYP/aug-cc-pVDZ, B3LYP/6-311++g(d,p) e B3LYP/aug-cc-pVTZ.

Tabela 6. Dados teóricos para os confômeros ala1 (sinperiplanar) e ala2 (anticlinal) do alaninato de metila calculados nos níveis de teoria B3LYP/aug-cc-pVDZ, B3LYP/6-311++g(d,p) e B3LYP/aug-cc-pVTZ

Parâmetros	B3LYP/ aug-cc-pVDZ		B3LYP/ 6-311++g(d,p)		B3LYP/ aug-cc-pVTZ	
	sin	anti	sin	anti	sin	anti
	ala1	ala2	ala1	ala2	ala1	ala2
E _{relativa} corrigida ZPE (kcal mol ⁻¹)	0	1,17	0	1,10	0	1,20
Frequência carbonila (cm ⁻¹)	1776	1773	1786	1784	1781	1778
Momento de dipolo (Debye)	1,90	2,11	1,94	2,16	1,88	2,12

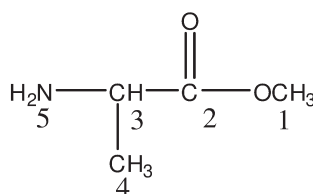
Observações experimentais:

Foram obtidos espectros de RMN de ¹H (300MHz) e de ¹³C (75MHz) para o alaninato de metila em diferentes solventes. Os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento ³J_{HH} do hidrogênio do carbono quirático são mostrados a seguir (Tabela 7).

Pela Tabela 7 observa-se que a constante de acoplamento ³J_{HH} não sofre variação, indicando que neste caso, possivelmente não ocorre mudança de população dos rotâmeros com a mudança da polaridade do meio.

Tabela 7: Deslocamentos químicos (ppm) de ^1H e de ^{13}C em diferentes solventes e constantes de acoplamento (Hz) para o alaninato de metila.

Solvente	ϵ	$\delta\text{H-1}$	$\delta\text{H-3}$	$\delta\text{H-4}$	$\delta\text{H-5}$	$\delta\text{C 1}$	δC2	δC3	δC4	$^3\text{J}_{\text{H3-}}$	$^1\text{J}_{\text{CH}}$
CCl_4	2,2	3,61	3,37	1,23	1,30	51,5	176,4	50,1	20,8	6,96	137,96
CDCl_3	4,8	3,72	3,56	1,33	1,61	52,3	177,4	50,3	21,0	6,95	137,95
CD_2Cl_2	9,8	3,68	3,51	1,28	1,66	52,1	177,4	50,4	20,9	6,94	137,95
CD_3CN	37,5	3,64	3,46	1,21	1,76	51,7	177,4	50,2	20,5	6,96	137,96
DMSO-d6	46,7	3,79	3,58	1,34	2,50	52,3	177,5	50,3	21,4	6,96	137,94



Inicialmente, observando no IV a região do estiramento da carbonila, não é possível verificar a existência de mais de um confômero para esse composto, sendo observado apenas uma banda nessa região em todos os solventes utilizados. No entanto, somente essa observação não é conclusiva, uma vez que as frequências calculadas para esse estiramento são muito parecidas para as duas conformações, com diferença $< 10 \text{ cm}^{-1}$. A simetria das bandas, no entanto aponta para a existência de apenas uma conformação.

A Figura 8 mostra a deconvolução das bandas na região da carbonila em diferentes solventes. Exceto em CHCl_3 , observa-se apenas uma banda, simétrica, indicando a presença de apenas um confômero. No caso do CHCl_3 , a assimetria da banda pode ser atribuída à interação com o solvente.

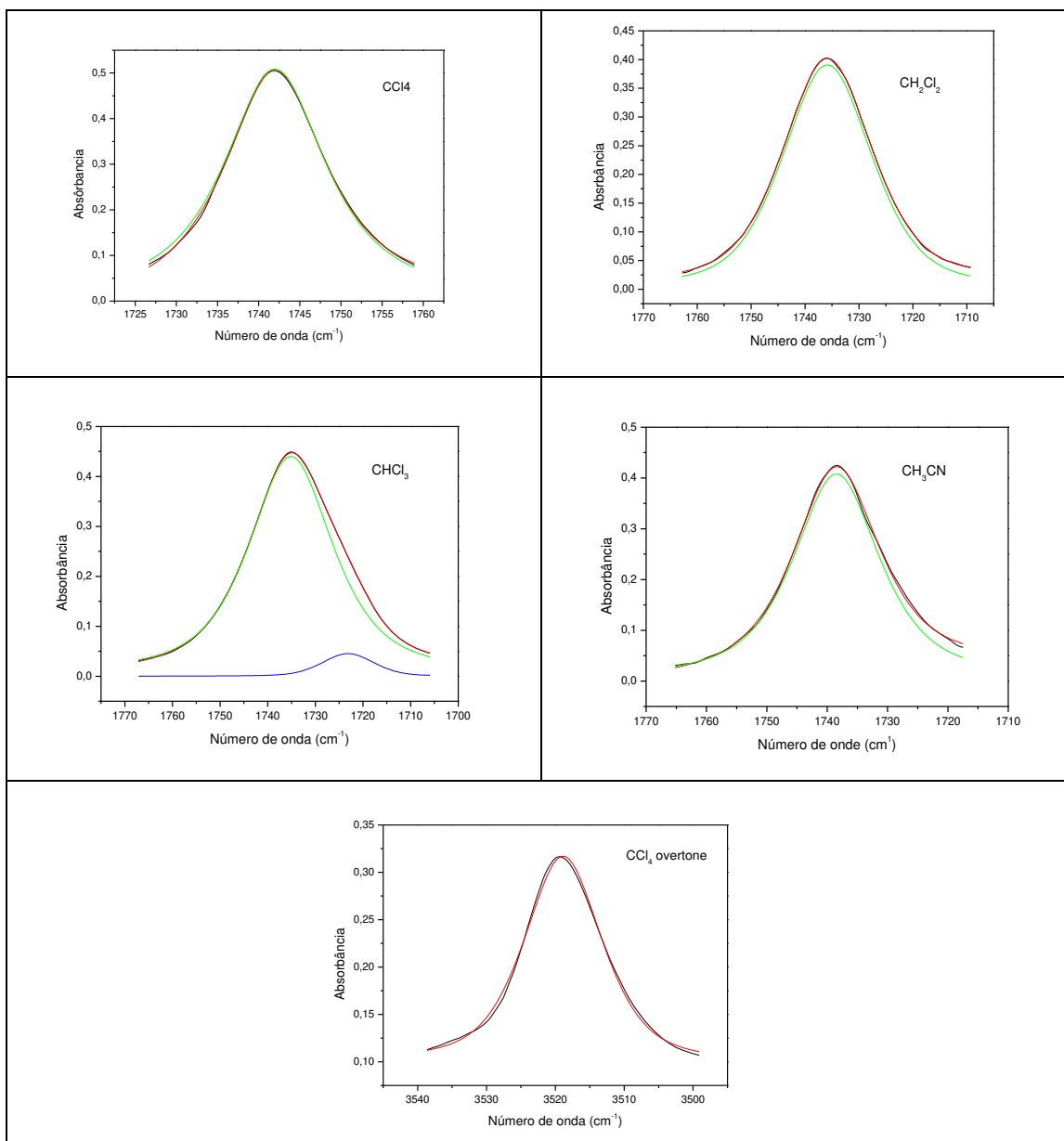


Figura 8. Espectro na região do infravermelho para o estiramento C=O do alaninato de metila, nos diferentes solventes utilizados.

Nessa Figura 8 também podemos observar que o espectro no primeiro overtone apresenta também apenas uma banda. Assim, conclui-se que em solução, da mesma forma que no caso do glicinato de metila, o alaninato de metila possui apenas uma conformação e essa foi atribuída ao confôrmero ala1 (de configuração sinperiplanar), mais estável também no vapor.

Cálculos de solvatação e NBO:

Cálculos incluindo o efeito do solvente em nível B3LYP\aug-cc-pVDZ mostram uma pequena diminuição na diferença de energia entre os confôrmeros, sendo $\Delta E^{\text{solv}}_{\text{ala2-ala1}} = 0,92 \text{ kcal mol}^{-1}$. Assim como para o glicinato de metila, para efeito de comparação utilizou-se parâmetros de solvatação referentes ao DMSO, uma vez que esse foi o solvente de maior constante dielétrica utilizado experimentalmente. A diminuição na diferença de energia entre os confôrmeros de $1,17 \text{ kcal mol}^{-1}$ para $0,92 \text{ kcal}^{-1}$ também parece nesse caso não ser suficiente para estabilizar efetivamente a conformação anticlinal (que apresenta maior momento de dipolo) em solução, mesmo nos solventes de maior constante dielétrica. A distribuição de Boltzmann vai de 91% para o confôrmero ala1 sem o efeito do solvente para 82% para esse mesmo confôrmero considerando-se o efeito do solvente, no nível de teoria utilizado. Nenhuma mudança na estabilidade conformacional da molécula em estudo, no entanto, pôde se observada experimentalmente.

Os cálculos de NBO mostram que as interações envolvidas na estabilização do alaninato de metila são bastante parecidas com as que ocorrem no glicinato de metila.

A interação mais importante na estabilização do composto é a do tipo $n_{\text{O}} \rightarrow \pi^*_{\text{C=O}}$, com energia em torno de 47 kcal mol^{-1} , para os dois confôrmeros. De modo geral, essa interação é também, assim como outras interações presentes nos dois confôrmeros, de grande importância para a maior estabilização da conformação ala1 em relação ao outro confôrmero ala2. A conformação sinperiplanar (ala1), no entanto, permite algumas interações que envolvem principalmente a ligação C-H do carbono quiral e a ligação C=O, que não ocorrem no confôrmero ala2, e que têm magnitude significativa para a estabilização da geometria sinperiplanar. Estas e outras interações importantes para a estabilização dos dois confôrmeros no estado vapor, estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Comparação entre as principais interações orbitais para o alaninato de metila obtido através de cálculos de NBO em nível B3LYP\aug-cc-pVDZ

Orbitais	Ala1 ^a	Ala2 ^a
$n_O \rightarrow \pi^*_{C=O}$	48,54	46,19
$n_O \rightarrow \sigma^*_{O-C}$	34,09	35,11
$n_O \rightarrow \sigma^*_{C-C}$	17,89	17,33
$n_O \rightarrow \sigma^*_{C-O}$	9,28	8,89
$n_N \rightarrow \sigma^*_{C-C}$	8,44	9,06
$\sigma_{C-H} \rightarrow \sigma^*_{C=O}$	4,16	-
$\sigma_{C-H} \rightarrow \pi^*_{C-O}$	2,66	0,55
$\sigma_{C-H} \rightarrow \sigma^*_{C-H}$	2,83	-

^a kcal mol⁻¹

Algumas interações que aparecem estabilizando apenas a conformação ala1, devido a rotação do ângulo diedro (O=)C-C-C-NH₂, são substituídas por interações que por sua vez só ocorrem com a geometria do confôrmere ala2. Essas, no entanto, são menos efetivas, e contribuem menos para a estabilização da conformação. No caso da interação do tipo $\sigma_{C-H} \rightarrow \sigma^*_{C=O}$, que aparece na conformação ala1 com 4,16 kcal mol⁻¹, a interação respectiva no confôrmere ala2 é a $\sigma_{C-C} \rightarrow \sigma^*_{C-O}$, com magnitude de 1,68 kcal mol⁻¹.

Assim, concluímos que também para o alaninato de metila existem duas conformações mais estáveis na fase vapor, mas que em solução os dados de RMN e IV apontam apenas uma conformação, atribuída à mais estável, de geometria sinperiplanar com relação ao ângulo diedro (O=)C-C-C-N. Cálculos de energia incluindo o efeito do solvente mostram que a estabilização induzida pelo solvente não é significativa para a estabilização do segundo confôrmere em solução.

4.3 Éster metílico da prolina (prolinato de metila)

Síntese:

Da mesma forma que realizado para a obtenção dos ésteres da glicina e da alanina, o prolinato de metila foi obtido através da conversão do aminoácido prolina no cloreto do aminoácido, seguida da esterificação com metanol. O cloridrato foi então desprotonado utilizando amônia gasosa e o produto obtido teve rendimento total de 56%.

Cálculos teóricos:

O gráfico da superfície de energia potencial da ligação $\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{CH}_3$ do éster metílico da prolina, em nível B3LYP/cc-pVDZ, forneceu uma energia relativa de $9,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ entre os dois confôrmeros *s-cis* e *s-trans*. Assim, também nesse caso foi feita restrição da simetria *s-cis* em relação ao diedro $\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{CH}_3$, tanto para otimização geométrica quanto para os cálculos subseqüentes.

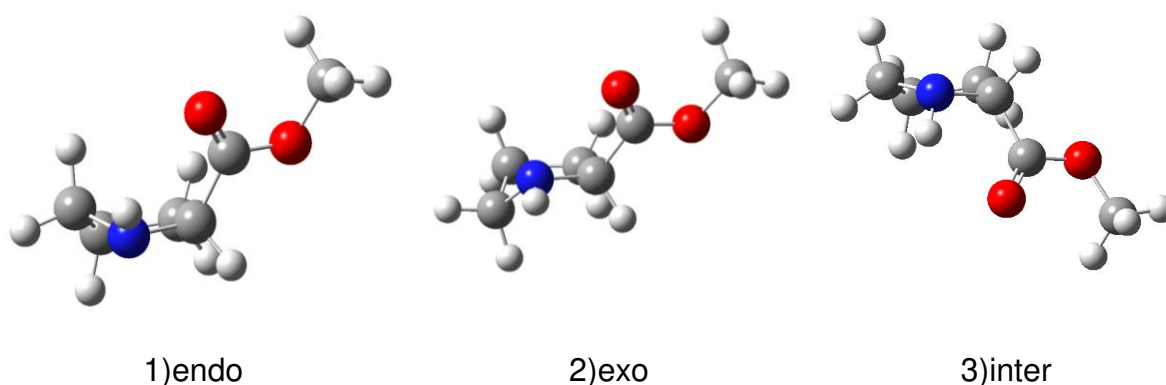


Figura 9. Representação espacial dos átomos em diferentes configurações: em 1 *endo*, 2 *exo* e 3 em uma configuração intermediária (*inter*).

Na primeira tentativa de estudo da rotação do ângulo diedro $\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{NH}$, a superfície de energia potencial obtida apresentava pontos de quebra, o que sugere uma inversão da configuração do par de elétrons no nitrogênio nesta região. Além disso, encontrou-se dificuldade na construção da superfície de energia potencial do prolinato de metila, dada à baixa barreira rotacional do anel

pirrolidínico, que se interconverte facilmente entre as conformações *exo* e *endo* da molécula.

Para tentar solucionar esse problema, foram construídos gráficos com restrição da rotação do anel, ou seja, fixou-se inicialmente o anel na configuração *endo* e construiu-se o gráfico da energia potencial em relação à rotação do ângulo diedro O=C-C(H)-N(H). Em seguida repetiu-se o mesmo procedimento para a configuração *exo* e a configuração intermediária, mostradas na Figura 9. Estes gráficos foram construídos em nível de teoria B3LYP/6-311++g(d,p). O resultado obtido está na Figura 10.

A comparação entre as superfícies de energia potencial obtidas da maneira descrita acima apontam dois mínimos energéticos, um com ângulo diedro O=C-CH-NH = 0° e outro com diedro O=C-CH-NH = 190°, ambos para a curva com o anel em *endo* e um mínimo em O=C-CH-NH = 10° para a curva com o anel em configuração intermediária.

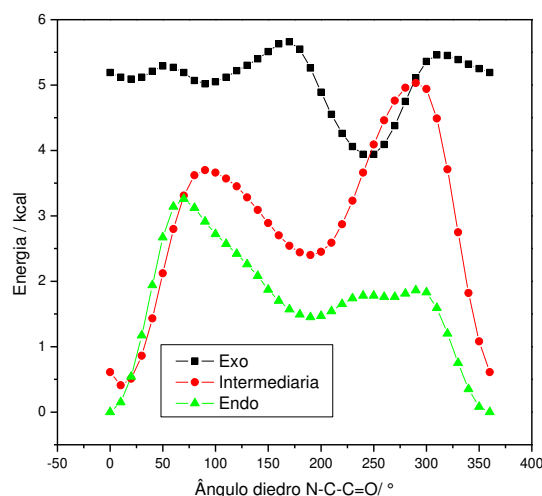


Figura 10. Gráfico das superfícies de energia potencial para o prolinato de metila, calculadas com o método B3LYP/6-311++g(d,p).

Um ponto de mínimo energético também é observado na curva para a configuração *exo*, porém, como a diferença relativa em relação aos mínimos energéticos da curva em *endo* é de 4,0 e 2,5 kcal mol⁻¹ e assim pela distribuição de Boltzman esse mínimo corresponde a menos de 0,01% da população. Portanto,

essa conformação foi desconsiderada para os cálculos de otimização da sua estrutura.

Foi feito ainda um novo gráfico de superfície de energia potencial para o prolinato de metila. Dessa vez, ao invés de restringir a rotação do anel, fez-se o cálculo de otimização da estrutura, restringindo a rotação do diedro O=C-O-NH e mantendo o anel livre, para 36 estruturas montadas rotacionando o diedro O=C-CH-NH de 10° em 10°. O resultado foi uma superfície de energia potencial muito parecida com a obtida com a restrição do anel na configuração *endo* mostrada na Figura 11.

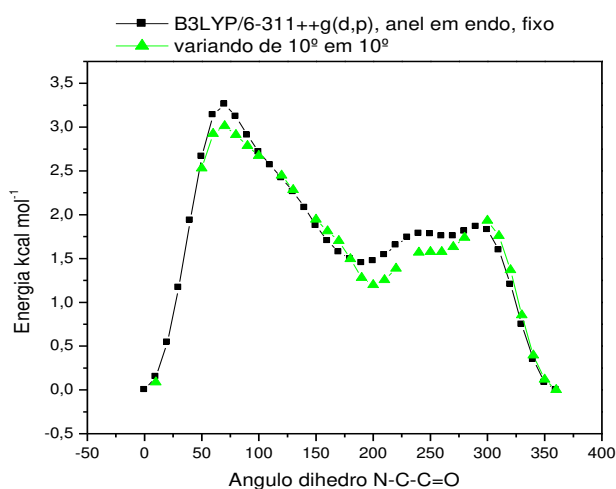


Figura 11 Gráfico das superfícies de energia potencial para o prolinato de metila.

A seguir, as estruturas geométricas dos confôrmers mais estáveis foram otimizadas sem nenhuma restrição.

As estruturas montadas inicialmente com ângulo de diedro O=C-CH-NH = 0° e O=C-CH-NH = 10° convergiram para uma estrutura pro1, com a carbonila sinperiplanar ao nitrogênio, e com o anel pirrolidinico com configuração *endo* em relação ao substituinte. A estrutura com O=C-CH-NH = 190° convergiu para a estrutura pro2, com a carbonila antiperiplanar ao nitrogênio e com o anel em uma configuração intermediária. A Figura 12 mostra a representação espacial dos átomos dessas duas conformações mais estáveis, obtidas em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ. Os resultados obtidos de geometria e energia com a correção de energia no ponto zero (ZPE), momento de dipolo e frequência calculada nesse nível de teoria estão na Tabela 9.

Para este composto também foram feitos cálculos de otimização da geometria com o método MP2, sendo que a diferença de energia obtida entre os dois conformêros foi de $\Delta E^v = 0,96 \text{ kcal mol}^{-1}$, porém para esse método não foram realizados os cálculos de frequência.

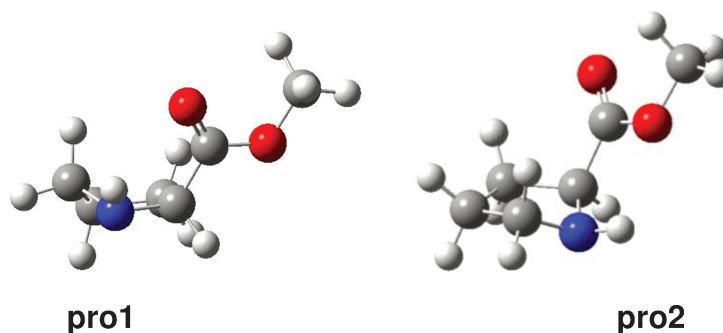


Figura 12. Representação espacial dos átomos para o prolinato de metila nas duas conformações mais estáveis, otimizadas em B3LYP/aug-cc-pVDZ.

Tabela 9. Dados teóricos para os conformêros pro1 e pro2 do éster metílico da prolina em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ.

Parâmetros	pro1	pro2
$r(\text{C}=\text{O})^a$	1,2141	1,2125
$r(\text{N}-\text{C2})^a$	1,4736	1,4692
$r(\text{C}-\text{C})^a$	1,5381	1,5534
$r(\text{C5}-\text{N})^a$	1,4688	1,4628
$r(\text{N}-\text{H})^a$	1,0161	1,0152
$\angle(\text{C6}-\text{N}-\text{C2})^b$	108,949	106,216
$\angle(\text{N}-\text{C2}-\text{C3})^b$	102,936	102,427
$\angle(\text{C3}-\text{C4}-\text{C5})^b$	103,467	104,875
$\phi(\text{C6}-\text{C5}-\text{N}-\text{H})^b$	348,58	322,00
$\phi(\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{C})^b$	359,64	359,73
$\phi(\text{N}-\text{C}-\text{C}=\text{O})^b$	353,04	158,82
E_{relativa}^c	0	1,69
Energia corrigida pelo ZPE ^d	-440.347675	-440.344983
Frequência carbonila ^e	1770	1773
Momento de dipolo ^f	2,0810	1,8074

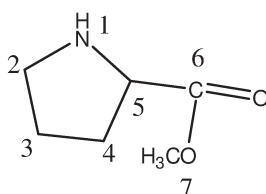
^a angstroms; ^b graus; ^c kcal.mol⁻¹; ^d Hartrees; ^e cm⁻¹; ^f Debye

Observações experimentais:

Foram obtidos espectros de RMN de ^1H para o prolinato de metila em solventes de diferentes polaridades. Os deslocamentos químicos do hidrogênio do carbono quirálico e as constantes de acoplamento $^3J_{\text{HH}}$ obtidas para esse hidrogênio estão mostrados a seguir (Tabela 10).

Tabela 10: Deslocamentos químicos (ppm) de ^1H em diferentes solventes e constantes de acoplamento (Hz) para o prolinato de metila.

Solvente	ϵ	$\delta\text{H-1}$	$^3J_{\text{H5-H4}}$
CCl_4	2,2	3,60	5,2
CDCl_3	4,8	3,76	5,8
Piridina-d5	12,40	3,84	5,8
CD_3CN	37,5	3,68	5,8
DMSO	46,7	3,65	5,5



Pela Tabela 10 observa-se que a constante de acoplamento $^3J_{\text{H5-H4}}$ não sofre variação significativa com a mudança do solvente, indicando que, também neste caso, provavelmente não há variação na população dos rotâmeros com a mudança da polaridade do solvente.

Os espectros de infravermelho obtidos em diferentes solventes (Figura 13) mostram a presença de uma banda não simétrica na região da carbonila para todos os solventes utilizados, indicando uma possível sobreposição de bandas. Com a ajuda do programa de deconvolução Grams/32 esta hipótese foi verificada. Este programa calcula a área de cada banda utilizando uma mistura de funções gaussianas e lorentzianas, que decompõem a banda observada nas possíveis bandas de cada um dos confôrmeros.

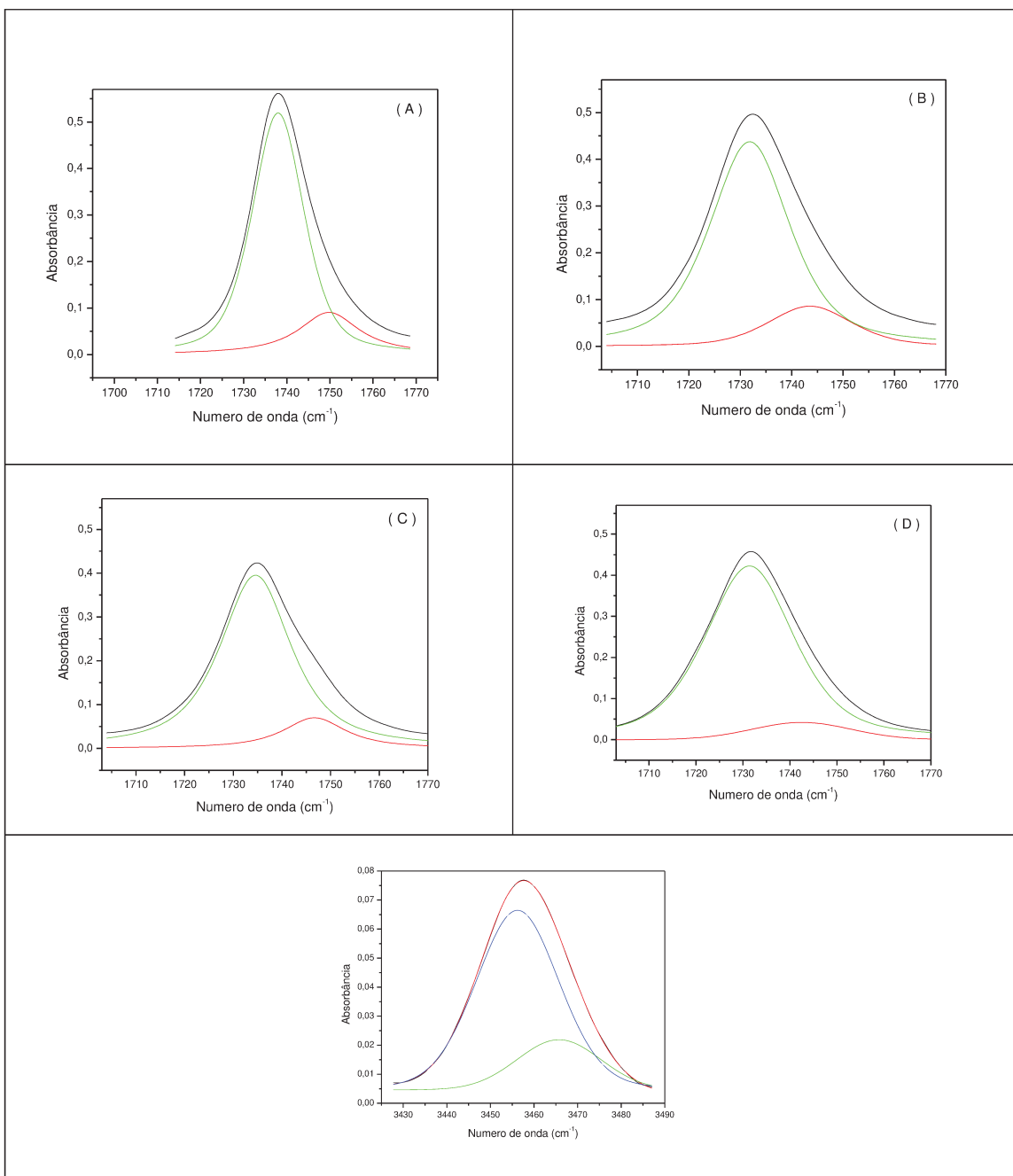


Figura 13: Espectro na região do infravermelho para o estiramento C=O do alaninato de metila, nos diferentes solventes: (A) CCl_4 , (B) CH_2Cl_2 , (C) CHCl_3 , (D) CH_3CN e (E) primeiro overtone em CCl_4 .

Nos espectros analisados pode-se observar uma banda de maior intensidade (85% da área) na região de menor frequência, sendo atribuída ao confômero **I** (confômero mais estável no vapor por $\Delta E^v = 0,96 \text{ kcal mol}^{-1}$ pelo método MP2). Essa proporção é mantida em todos os solventes utilizados: CCl_4 , CH_2Cl_2 , CHCl_3 e

CH₃CN. A Figura 13 mostra os espectros na região da carbonila, inclusive para o primeiro overtone obtido em CCl₄.

A população obtida para os dois confôrmeros foi de 15 e 85% em tetracloreto de carbono, clorofórmio e acetonitrila e de 16 e 84% em diclorometano, e na região do overtone da carbonila obteve-se a população de 21 e 69%. Pode-se sugerir a existência de um equilíbrio conformacional, porém sem que ocorra variação da população dos confôrmeros com a variação da polaridade do solvente.

Tabela 11: Valores das freqüências^a do estiramento da carbonila de cada confôrmero obtidos pela deconvolução dos espectros obtidos em solventes de diferentes constantes dielétricas (ϵ).

Solventes	ϵ	<i>pro1</i>	<i>pro2</i>
CCl ₄ (A)	2,2	1748	1738
CH ₂ Cl ₂ (B)	9,1	1743	1732
CH ₃ CN (C)	37,5	1747	1734
CHCl ₃ (D)	4,8	1742	1731

^a $\nu_{C=O}$ (cm⁻¹)

Cálculos de solvatação e NBO:

Os cálculos com efeito do solvente (da mesma forma que para os outros aminoésteres estudados anteriormente, usou-se como referência o cálculo com parâmetros para o DMSO) feitos em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ, mostram uma redução da diferença de energia (incluindo a correção do ZPE) entre os confôrmeros para $\Delta E^{\text{solv}}_{\text{pro2-pro1}} = 1,41 \text{ kcal mol}^{-1}$. Pela distribuição de Boltzmann, a variação de população referente a essa variação na diferença de energia é de apenas 3% (no estado vapor a diferença para esse mesmo nível de teoria foi de $\Delta E^{\text{v}}_{\text{pro2-pro1}} = 1,69 \text{ kcal mol}^{-1}$). Através dos dados de infravermelho foi possível observar as duas conformações em solução, porém sem mudança na população de cada confôrmero com a variação da polaridade do meio, concordando assim os dados teóricos e os experimentais.

Concluiu-se dessa maneira que apenas essa pequena diminuição na diferença de energia relativa não é suficiente para aumentar a estabilidade do confômero pro2 em relação ao pro1 em solução, ou seja, o equilíbrio conformacional entre as geometrias pro1 e pro2 não é sensível à polaridade do meio. Atribuiu-se o confômero pro1, como sendo o confômero mais estável no vapor, e também o mais estável em solução, com 85% da população em todos os solventes utilizados.

Esta estabilidade do confômero pro1 pode ser explicada através da análise de NBO (“natural bond orbitals”).

A primeira vista, os dados de NBO mostram uma grande estabilização da conformação pro2 pela interação de orbitais moleculares. Podemos identificar inclusive, para essa conformação, interações bastante significativas para a estabilização do sistema, e que não aparecem na conformação pro1. A Tabela 12 mostra algumas dessas interações:

Tabela 12. Comparação entre as principais interações orbitais para o prolinato de metila obtidas através de cálculos de NBO em nível B3LYP/6-311++(2d,2p)

Orbitais ^a	pro1	pro2
$n_O \rightarrow \pi^*_{C=O}$	49,30	41,15
$n_O \rightarrow \sigma^*_{O-C}$	33,91	34,99
$n_O \rightarrow \sigma^*_{C1-C2}$	17,23	17,72
$n_O \rightarrow \sigma^*_{C-O}$	9,58	8,80
$n_N \rightarrow \sigma^*_{C1-C2}$	4,29	8,96
$n_N \rightarrow \sigma^*_{C-H}$	14,38	11,79
$\sigma_{C-H} \rightarrow \pi^*_{C=O}$	4,92	5,19
$\sigma_{C-C} \rightarrow \pi^*_{C-O}$	4,09	4,11
$\sigma^*_{C1-O8} \rightarrow \sigma^*_{C-C}$	-	5,48
$\sigma^*_{C1-O8} \rightarrow \sigma^*_{C-N}$	-	20,39

^a energia em kcal mol⁻¹

Entretanto, as pequenas interações, ou seja, aquelas com valor em torno de 1kcal mol⁻¹ ou menor, quando somadas acabam tornando-se muito importantes

para a estabilização da geometria e isso pode ser verificado fazendo cálculos de NBO com deleção das interações eletrônicas do tipo conjugativas. Esses cálculos determinam o valor da energia de estabilização do sistema levando em conta todas as interações entre os orbitais. Na Tabela 13 são apresentados estes valores:

Tabela 13. Comparação entre os valores totais de interações orbitales para o prolinato de metila obtido através de cálculos de NBO em nível B3LYP\aug-cc-pVDZ

<i>Tipo de energia considerada</i>	Energia do confômero	
	pro1	pro2
Energia de deleção ^a	-439,582777790	-439,584963165
Energia SCF total ^a	-440,519175716	-440,516381479
Diferença de energia ^b	587,598	584,474

^a a. u. ^b kcal mol⁻¹

Como podemos constatar pelos dados da Tabela 13, o valor da estabilização provocada pelas interações de orbitais do tipo conjugativas, que é a diferença entre a energia total da molécula e a energia da molécula após a deleção dessas interações, é maior para a conformação pro1 (587,598kcal mol⁻¹). Dessa forma podemos afirmar que nesse caso do prolinato de metila as pequenas interações entre os orbitais tem fundamental importância para a estabilização da conformação pro1 em relação à segunda conformação mais estável pro2.

4.4 Éster dimetílico do ácido aspártico (aspartato de metila)

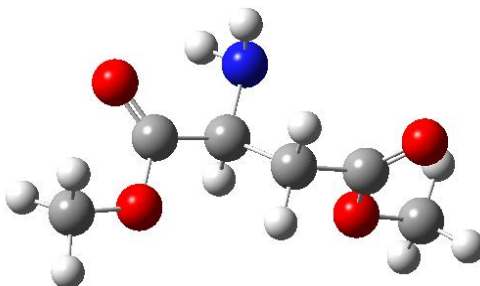


Figura 14. Aspartato de dimetila

Síntese:

Assim como os demais compostos estudados, o aspartato de metila foi obtido pela conversão do ácido aspártico no cloreto do aminoácido, com a seguida esterificação com metanol. O cloridrato foi desprotonado com gás de amônia, e o produto obtido armazenado sob refrigeração. O rendimento total da reação foi de 53%.

Cálculos teóricos:

Construiu-se um gráfico da superfície de energia potencial variando-se o ângulo diedro N-C(H)-C=O do aspartato de metila (Figura 15), através do qual foram obtidos dois mínimos para a rotação dessa ligação. A barreira rotacional, no entanto, é grande o suficiente para desprezarmos a rotação dessa ligação. As conformações com rotação do ângulo diedro O=C-O-CH₃ dos dois grupos ésteres da molécula, com valores diferentes de zero também não foram consideradas, da mesma forma que para os outros compostos estudados anteriormente, uma vez que a energia de rotação dessa ligação gira em torno de 9 kcal mol⁻¹.

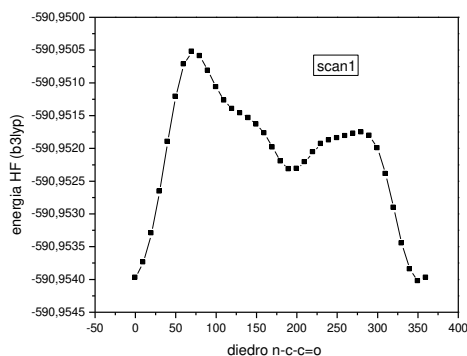


Figura 15. Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro N-C(H)-C=O do aspartato de metila, calculado em nível B3LYP/cc-pvdz.

Como podemos verificar pela Figura 15, a geometria antiperiplanar em relação a esse ângulo diedro está localizado em um mínimo energético. Assim como no alaninato de metila, a barreira rotacional dessa ligação, no entanto é alta o suficiente para que pudéssemos considerar essa conformação possível apenas no estado vapor, sem considerarmos o efeito do solvente. Após concluir outros gráficos de energia potencial, decidiu-se não considerar essa geometria para cálculos de otimização, como os que foram feitos para as geometrias com esse ângulo diedro igual a zero.

A seguir, foi feito outro gráfico de superfície de energia potencial, dessa vez com relação ao ângulo diedro N-C-C-C(=O), partindo de uma geometria com o diedro N-C(H)-C=O igual a zero. O resultado obtido está apresentado na Figura 16.

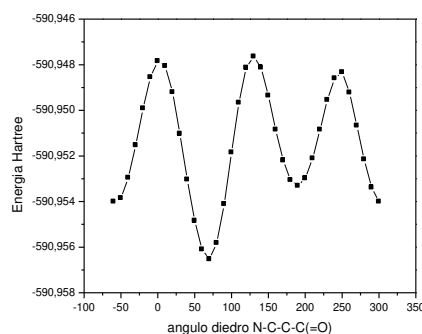


Figura 16. Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro N-C(H)-C(H₂)-C(=O) do aspartato de metila, calculado em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ.

Os três mínimos obtidos, Asp1 geometria sinclinal (–) em relação ao ângulo diedro $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$, Asp2 sinclinal (+) e Asp3 antiperiplanar, foram otimizados, e tiveram suas energias e frequências calculadas pelo método DFT B3LYP com o conjunto de bases aug-cc-pVDZ.

O método e a base utilizados para esses e os demais cálculos feitos para o aspartato de metila foi escolhido observando os resultados obtidos anteriormente, com o estudo dos ésteres da glicina, alanina e prolina. Este nível teórico foi o que apresentou os melhores resultados com o menor custo computacional para essa classe de compostos. Este nível de teoria inclui em seu cálculo funções difusas (prefixo aug), importante na descrição de sistemas com pares de elétrons livres, como foi verificado para o caso dos compostos em estudo. Os resultados obtidos de geometria, momento de dipolo e frequência calculados estão a Tabela 14. A Figura 17 apresenta a representação espacial dos átomos para os três mínimos encontrados.

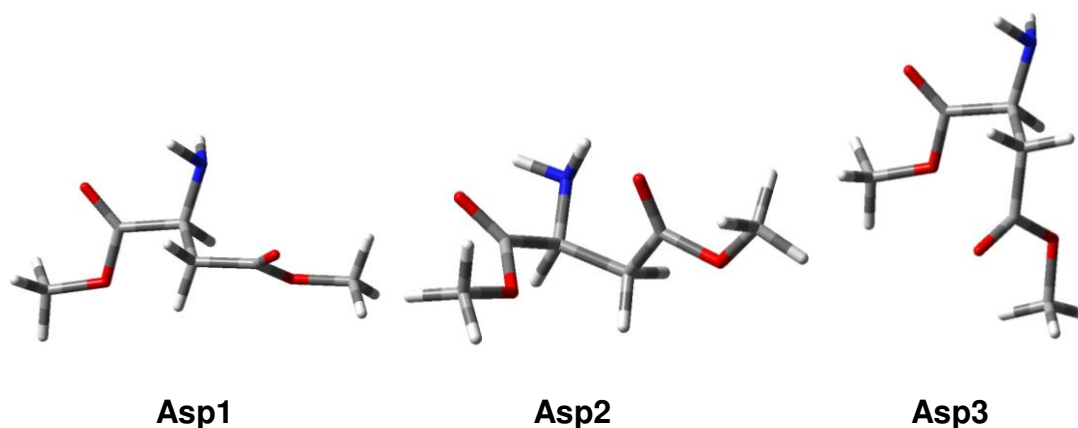


Figura 17. Representação espacial dos átomos para o aspartato de metila nas conformações Asp1, Asp2 e Asp3 obtidos em nível de teoria B3LYP/aug-cc-pVDZ

Para verificar a existência de confôrmeros devido à rotação da cadeia lateral foi feito um gráfico da energia potencial da rotação dessa ligação (ângulo diedro $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$) a partir da conformação mais estável Asp1. O resultado está na Figura 18.

Tabela 14. Dados teóricos para os três confôrmeros mais estáveis do aspartato de metila obtidos em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ

Parâmetros	Asp1	Asp2	Asp3
$r(\text{C16} = \text{O17})^a$	1,2105	1,2123	1,2125
$r(\text{C4} = \text{O5})^a$	1,2150	1,2110	1,2124
$r(\text{C16} - \text{O18})^a$	1,3530	1,3507	1,3483
$r(\text{C4} - \text{O6})^a$	1,3491	1,3520	1,3529
$r(\text{O} - \text{CH}_3)^{a,*}$	1,443	1,441	1,444
$r(\text{C} - \text{N})^a$	1,4580	1,4557	1,4586
$r(\text{N} - \text{H14})^a$	1,0173	1,0169	1,0175
$r(\text{N} - \text{H15})^a$	1,0193	1,0188	1,0196
$r(\text{C2} - \text{H13})^a$	1,1025	1,0969	1,0967
$r(\text{C3} - \text{H11})^a$	1,0969	1,0965	1,0969
$r(\text{C3} - \text{H12})^a$	1,0979	1,0988	1,0961
$r(\text{C} - \text{C})^{a,*}$	1,5345	1,5431	1,5499
$\angle(\text{O} = \text{C} - \text{O})^{b,*}$	123,40	123,57	123,97
$\angle(\text{O5} = \text{C4} - \text{C3})^{b,*}$	125,37	124,28	125,359
$\angle(\text{O17}=\text{C16}-\text{C2})^{b,*}$	124,17	124,77	124,374
$\angle(\text{N} - \text{C} - \text{CO})^b$	113,35	113,67	113,050
$\angle(\text{N} - \text{C} - \text{H})^b$	107,44	108,65	108,80
$\angle(\text{C2} - \text{C3} - \text{H11})^b$	111,13	110,34	106,622
$\angle(\text{C2} - \text{C3} - \text{H12})^b$	108,7	109,68	109,798
$\phi(\text{O17}=\text{C16}-\text{C18}-\text{C})^b$	-1,37	-1,040	-3,533
$\phi(\text{O5}=\text{C4}-\text{C6}-\text{CH}_3)^b$	-0,23	-2,525	1,797
$\phi(\text{O5} = \text{C} - \text{C} - \text{C})^b$	1,78	129,05	-111,63
$\phi(\text{N} - \text{C} - \text{C} = \text{O})^b$	20,63	-18,87	155,050
$\phi(\text{N} = \text{C} - \text{C} - \text{C})^b$	110,87	-57,78	173,29
E^v_{relativa}	0	0,83	1,55
Energia corrigida (ZPE)	-590,830749	-590,829412	-590,828274
Frequência carbonila	1770/ 1785	1779/ 1788	1778/ 1782
Momento de dipolo	3,1302	3,5089	2,8486

^a angstroms; ^b graus; ^c kcal mol⁻¹; ^d Hartrees; ^e cm⁻¹; ^f Debye

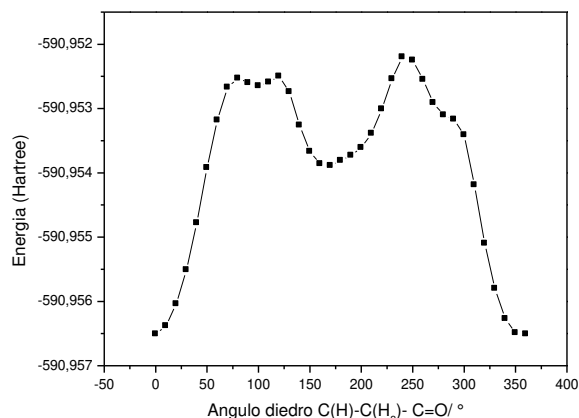


Figura 18. Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro CH-CH₂-C=O do aspartato de metila, calculado em nível B3LYP/cc-pvdz.

Como é possível observar pelo gráfico, além da conformação inicial mais estável (ângulo diedro CH-CH₂-C=O = 0°), existe um ponto de mínimo local com diferença de energia de 1,64 kcal mol⁻¹ e uma barreira rotacional em torno de 3,0 kcal mol⁻¹. Também nesse caso, comparando como os valores obtidos para outros ângulos de torção, essa geometria (CH-CH₂-C=O = 160°) não foi considerada estável o suficiente para ser observada experimentalmente.

Cálculos teóricos com efeito do solvente:

Foram feitos ainda, cálculos com efeito do solvente para os três confôrmeros mais estáveis observados no vapor. Inicialmente, a superfície de energia potencial, calculada incluindo o efeito do solvente já aponta uma estabilização de um dos confôrmeros em relação aos demais (Figura 19). Este cálculo foi feito em nível HF, pois a inclusão do efeito do solvente aumenta consideravelmente o custo computacional. Já as otimizações das geometrias com o efeito do solvente, para efeito de comparação, foram feitas no mesmo nível de teoria que as otimizações anteriores.

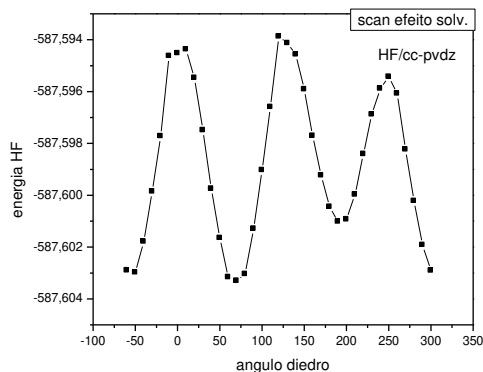


Figura 19. Gráfico da superfície de energia potencial do ângulo diedro N-C(H)-C(H₂)-C(=O) incluindo o efeito do solvente (DMSO) para o aspartato de metila calculado em nível HF/cc-pVDZ

Cálculos posteriores de energia com efeito do solvente (no caso utilizou-se DMSO), como os que foram feitos para as geometrias otimizadas no vapor (incluindo a correção do ZPE), mostram uma estabilização do conformero Asp2, em torno de 1,0 kcal mol⁻¹, o suficiente considerarmos uma possível inversão no equilíbrio conformacional a favor desse conformero. A Tabela 15 mostra uma comparação entre as estabilidades relativas dos conformeros com e sem o efeito do solvente.

Tabela 15. Comparação entre as estabilidades relativas e momento dipolar dos conformeros com e sem o efeito do solvente, calculadas em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ

Conformero	E _{rel.} ^a s/ef.solv.	E _{rel.} ^a c/ef.solv.	Mom. dipolar ^b s/ef.solv.	Mom. dipolar ^b c/ef.solv..
Asp1	0	0,19	3,1302	3,9719
Asp2	0,83	0	3,5089	4,6293
Asp3	1,55	1,17	2,8486	3,5313

^a kcal mol⁻¹, ^b Debye

Como podemos constatar pela Tabela 15, o solvente provoca uma substancial estabilização do conformero Asp2, de maior momento de dipolo. Esta estabilização é suficiente para provocar uma inversão no equilíbrio

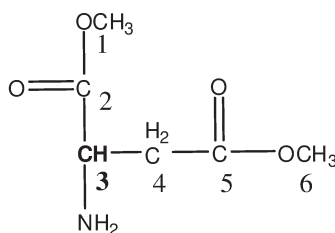
conformacional. O confômero Asp3, no entanto, sofre uma estabilização menos pronunciada frente à estabilização do confômero Asp1. Este comportamento é compatível com o esperado, já que a conformação Asp3 apresenta o menor momento de dipolo entre os três confômeros estudados. Esses dados em conjunto com informações obtidas através da espectroscopia de infravermelho apontam para a presença principalmente de dois confômeros em solução sensíveis à polaridade do meio. Assim para o estudo do comportamento em solução do equilíbrio conformacional foram consideradas apenas as conformações mais estáveis Asp1 e Asp2.

Observações experimentais:

Experimentalmente, foram obtidos os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C para o aspartato de metila em diferentes solventes. Os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento $^1J_{\text{CH}}$, referentes ao C quiral estão na Tabela 16. A análise desses espectros mostra uma variação da constante de acoplamento com a variação da constante dielétrica do solvente, indicando uma provável mudança na população dos confômeros presente em solução.

Tabela 16: Deslocamentos químicos (δ em ppm) de ^1H e de ^{13}C em solventes com diferentes constantes elétricas (ϵ) e constantes de acoplamento (Hz) referentes ao carbono quiralico do aspartato de metila.

Solvente	ϵ	H-3	C-3	$^1J_{\text{CH}}$
CCl_4	2,2	3,64	51,0	137,5
CDCl_3	4,8	3,70	51,2	138,2
CD_2Cl_2	9,8	3,78	51,1	138,6
CD_3CN	37,5	3,66	51,3	140,0
DMSO-d6	46,7	3,65	51,5	139,0



Esses valores serão usados no cálculo das constantes de acoplamentos individuais dos confôrmeros e na determinação do equilíbrio populacional entre as conformações presente em solução.

As geometrias otimizadas pelo Gaussian03 de cada um dos confôrmeros foram introduzidas no programa Models de onde foram obtidos os parâmetros de solvatação h , k e l , necessários para calcular as energias de solvatação do composto (Introdução, item 1.2.1). Os valores obtidos para esses parâmetros estão na Tabela 17.

Tabela 17. Parâmetros para cálculo das energias de solvatação para o aspartato de metila, obtidos a partir da geometria otimizada pelo método B3LYP.

Parâmetros	Confôrmero	
	Asp1	Asp2
k^a	1,1786	1,356
h^a	0,956	2,7391
L	0,5225	0,5225
V_M	141,019	141,019

^a kcal mol⁻¹

Os resultados dos cálculos obtidos pelo programa Models juntamente com os valores de acoplamentos experimentais foram introduzidos no programa Bestfit, obtendo-se os melhores valores de acoplamentos para os confôrmeros individuais, assim como a diferença de energia no vácuo. Estes valores quando empregados na equação (2) fornecem os valores de acoplamentos calculados, as diferenças de energia e as populações dos confôrmeros em solução.

$$J_{\text{observado}} = n_{\text{Asp1}} J_{\text{Asp1}} + n_{\text{Asp2}} J_{\text{Asp2}} \quad (2)$$

$$n_{\text{Asp1}} + n_{\text{Asp2}} = 1$$

$$n_{\text{Asp2}}/n_{\text{Asp1}} = \exp(-\Delta E/RT)$$

$$\Delta E = E_{\text{Asp2}} - E_{\text{Asp1}}$$

Nesse caso os melhores valores de acoplamentos no vácuo, encontrados pelo Bestfit para a convergência da função ϕ , isto é, o erro mínimo encontrado, igual a

0,435, foram $^1J_{CH}$ igual a 144,0 Hz para o confômero Asp2, e 133,2 Hz para o Asp1, com uma diferença de energia entre os confômeros de $\Delta E^V_{Asp2-Asp1} = 0,60$ kcal mol⁻¹. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos pelo Gaussian03. Os valores de $^1J_{CH}$ calculados pelo programa para os confômeros em nível B3LYP/aug-cc-pvdz foram de 145,8 para o Asp2 e 135,5 Hz para o Asp1, para uma diferença de energia de $\Delta E^V_{Asp2-Asp1} = 0,83$ kcal mol⁻¹.

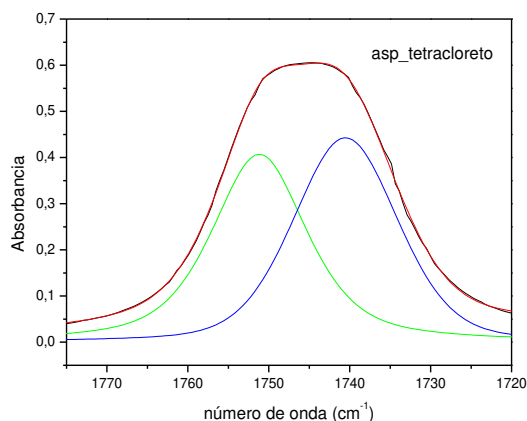
A Tabela 18 mostra os dados de constantes de acoplamentos observados e calculados, a diferença de energia entre os confômeros em solução e a população referente à conformação Asp1 em cada um dos solventes, obtidos pelo programa Bestfit (em Anexos, pág. 17 encontra-se o output com todos os valores fornecidos pelo programa).

Tabela 18. Diferenças de energias (kcal mol⁻¹), constantes de acoplamento observadas e calculadas (Hz), e populações dos confômeros calculadas para a o aspartato de metila em diferentes solventes, obtidos pelo Bestfit.

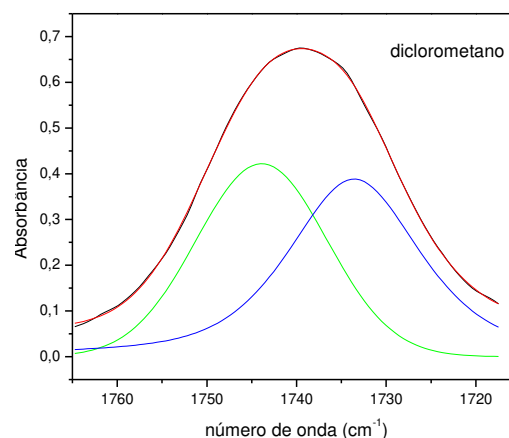
Solvente	ϵ	$^1J_{C^*H}$ obs ^a	$\Delta E_{asp2-asp1}$ ^b	$^1J_{C^*H}$ calc ^a	% Asp1
CCl ₄	2,2	137,56	0,30	137,25	62
CDCl ₃	4,8	138,24	0,10	138,17	54
CD ₂ Cl ₂	9,8	138,60	-0,03	138,74	48
CD ₃ CN	37,5	140,00	-0,20	139,54	41
DMSO-d ₆	46,7	139,04	-0,24	139,70	39

^a Hz, ^b kcal mol⁻¹

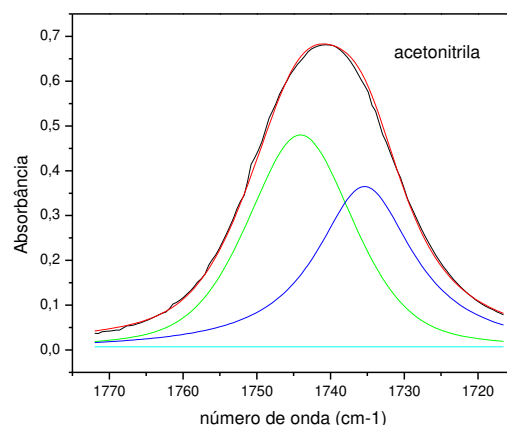
Como podemos observar pelos resultados mostrados acima, o programa Bestfit utilizando dados experimentais de constantes de acoplamentos em conjunto com parâmetros de solvatação obtidos através do programa Models, fornece informações sobre equilíbrio populacional do composto em solução. Podemos observar pela Tabela 18 um aumento da estabilização do confômero Asp2 em solução à medida que aumenta a constante dielétrica do solvente. Uma ligeira inversão populacional pode ser observada, com a mudança do $\Delta E^{solv}_{Asp2-Asp1}$ de 0,30 kcal mol⁻¹ em CCl₄ para -0,24 kcal mol⁻¹ em DMSO. Estes resultados estão de acordo com o observado por IV.



1751cm⁻¹ (47%) 1740cm⁻¹ (52%)



1744cm⁻¹ (50%) 1734cm⁻¹ (50%)



1746 cm⁻¹(56%) 1737cm⁻¹ (44%)

Figura 20. Espectro na região do infravermelho para o estiramento C=O do aspartato de metila, nos diferentes solventes utilizados.

Nos espectros de infravermelho obtidos em diferentes solventes (Figura 20) pode-se observar a presença de duas bandas sobrepostas na região da carbonila. A deconvolução dessas bandas, feita utilizando o programa Grams/32, mostra qualitativamente a variação da população dos confôrmeros com a variação da polaridade do meio.

Este programa calcula a área de cada banda utilizando uma mistura de funções gaussianas e lorentzianas, que decompõem a banda observada nas possíveis bandas de cada um dos confôrmeros.

No espectro obtido em CCl₄ pode-se observar uma banda de maior intensidade (52% da área) na região de maior frequência, atribuída ao conformero Asp1 (conformero mais estável no vapor por $\Delta E^v = 0,83 \text{ kcal mol}^{-1}$). Com o aumento da polaridade do solvente notamos o aumento da intensidade da banda na região de menor frequência no espectro, e consequentemente a diminuição da banda referente ao Asp1. Em CH₃CN a banda na região de maior frequência passa para 44% da área total. Qualitativamente os espectros de infravermelho concordam plenamente com os resultados obtidos através dos cálculos do Bestfit.

NBO:

Através da análise de NBO, podemos identificar algumas interações importantes para a estabilização dos conformeros Asp1 e Asp2 (Tabela 19).

Tabela 19. Comparação entre as principais interações orbitales para os conformeros mais estáveis do aspartato de metila obtido através de cálculos de NBO em nível B3LYP\aug-cc-pVDZ, sem efeito do solvente (energias em kcal mol⁻¹)

Orbitais	Asp1	Asp2
$\sigma_{\text{C2-H13}} \rightarrow \sigma^*_{\text{C16-O17}}$	2,41	3,30
$\sigma_{\text{C2-H13}} \rightarrow \pi^*_{\text{C16-O17}}$	0,95	2,65
$n_{\text{N}} \rightarrow \sigma^*_{\text{C2-C16}}$	9,35	9,23
$n_{\text{O5}} \rightarrow \sigma^*_{\text{C3-C4}}$	17,24	18,04
$n_{\text{O5}} \rightarrow \sigma^*_{\text{C4-O6}}$	32,17	33,25
$n_{\text{O6}} \rightarrow \pi^*_{\text{C4-O5}}$	49,01	46,55
$n_{\text{O6}} \rightarrow \sigma^*_{\text{C4-O5}}$	7,42	7,07
$n_{\text{O17}} \rightarrow \sigma^*_{\text{C2-O16}}$	18,68	18,20
$n_{\text{O17}} \rightarrow \sigma^*_{\text{C16-O18}}$	32,85	32,44
$n_{\text{O18}} \rightarrow \sigma^*_{\text{C16-O17}}$	7,13	7,39
$n_{\text{O18}} \rightarrow \pi^*_{\text{C16-O17}}$	46,58	48,04

As pequenas interações, (aquelas com valor em torno de 1kcal mol^{-1} ou menor), neste caso também são, quando somadas, muito importantes para a estabilização da geometria e isso pode ser verificado fazendo cálculos de NBO com deleção das interações eletrônicas do tipo conjugativas. Esses cálculos determinam o valor da energia de estabilização do sistema levando em conta todas as interações entre os orbitais. Na Tabela 20 estão apresentados esses valores.

Tabela 20. Comparação entre os valores totais de interações orbitales para o aspartato de metila obtido através de cálculos de NBO em nível B3LYP\aug-cc-pVDZ

<i>Tipo de energia considerada</i>	Energia do confômero	
	Asp1	Asp2
Energia de deleção ^a	-589,611497576	-589,619938593
Energia SCF total ^a	-591,008798964	-591,007232117
Diferença de energia ^b	876,820	870,540

^a a. u. ^b kcal mol^{-1}

Como podemos observar pelos dados da Tabela 20, o valor da estabilização provocada pelas interações de orbitais do tipo conjugativas, que é a diferença entre a energia total da molécula e a energia da molécula após a deleção dessas interações, é maior para a conformação Asp1 ($876,82\text{ kcal mol}^{-1}$). Dessa forma constatamos que também nesse caso as pequenas interações entre os orbitais têm grande importância para a estabilização da conformação Asp1 no estado vapor, uma vez que o valor das principais interações nas duas conformações são bastante parecidos, e não são suficientes para explicar a estabilização do Asp1 em relação ao outro confômero.

Tabela 21. Comparação entre as principais interações orbitales para o confôrmero Asp2 do aspartato de metila obtido através de cálculos de NBO em nível B3LYP\aug-cc-pVDZ (energia em kcal mol⁻¹), considerando o efeito do solvente.

Orbitais	Asp2	Asp2-solv ^a
$\sigma_{C2-H13} \rightarrow \sigma^*_{C16-O17}$	3,30	3,78
$\sigma_{C2-H13} \rightarrow \pi^*_{C16-O17}$	2,65	3,49
$\sigma_{C3-H11} \rightarrow \sigma^*_{C4-O6}$	4,97	5,13
$n_{O5} \rightarrow \sigma^*_{C3-C4}$	18,04	16,43
$n_{O5} \rightarrow \sigma^*_{C4-O6}$	33,25	32,68
$n_{O6} \rightarrow \sigma^*_{C4-C5}$	34,09	35,11
$n_{O6} \rightarrow \pi^*_{C4-C5}$	7,07	9,26
$n_{O6} \rightarrow \sigma^*_{C4-O5}$	46,55	51,26
$n_{O17} \rightarrow \sigma^*_{C2-O16}$	18,20	17,59
$n_{O17} \rightarrow \sigma^*_{C16-O18}$	32,44	32,16
$n_{O18} \rightarrow \sigma^*_{C16-O17}$	7,39	9,63
$n_{O18} \rightarrow \pi^*_{C16-O17}$	48,04	51,57

^asolvente DMSO

Na presença de solvente, por sua vez, o confôrmero Asp2 é estabilizado, tendo em DMSO energia menor que o confôrmero Asp1. Podemos analisar a estabilização dessa conformação em termos de orbitais moleculares. A Tabela 21 mostra uma comparação entre as interações orbitales para o confôrmero Asp2 no vácuo e com o efeito do solvente. Pela Tabela observamos a estabilização do confôrmero com o efeito do solvente, através do aumento da magnitude das principais interações entre os orbitais, como por exemplo, $n_{O6} \rightarrow \sigma^*_{C4-O5}$. Nesse caso, como o par de e⁻ do O5 estaria envolvido no processo de solvatação, as interações $n_{O5} \rightarrow \sigma^*_{C3-C4}$ e $n_{O5} \rightarrow \sigma^*_{C4-O6}$ diminuem de intensidade. Isso leva a uma

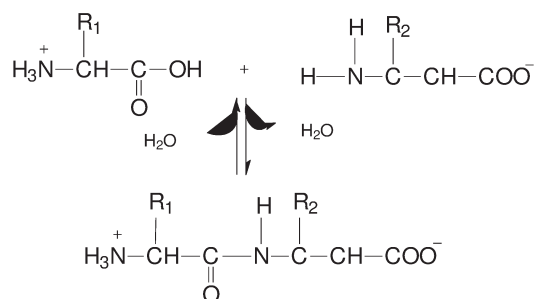
diminuição da densidade eletrônica no C4 e conseqüentemente aumenta a interação $n_{O6} \rightarrow \sigma^*_{C4-O5}$ (de 46,55 kcal mol⁻¹ para 51,26 kcal mol⁻¹). O mesmo processo ocorre para o outro grupo éster presente, envolvendo os oxigênios O17 e O18.

Assim, concluímos que para o aspartato de metila existem três conformações mais estáveis na fase vapor, mas que em solução os dados de RMN e IV apontam apenas duas conformações, Asp1 mais estável, e Asp2 com energia de 0,83 kcal mol⁻¹ em relação ao primeiro. Em solução a conformação Asp2 sofre significativa estabilização, sendo que em DMSO é o confômero majoritário, com 61% da população (pelos dados obtidos pelo Bestfit). Por RMN observamos a variação da população dos confômeros pelo aumento progressivo da constante de acoplamento $^1J_{CH}$ com o aumento da polaridade do meio. Por IV podemos observar qualitativamente essa mudança, por meio da deconvolução das bandas na região da carbonila de cada um dos confômeros.

4.5 Dipeptídeos

Síntese:

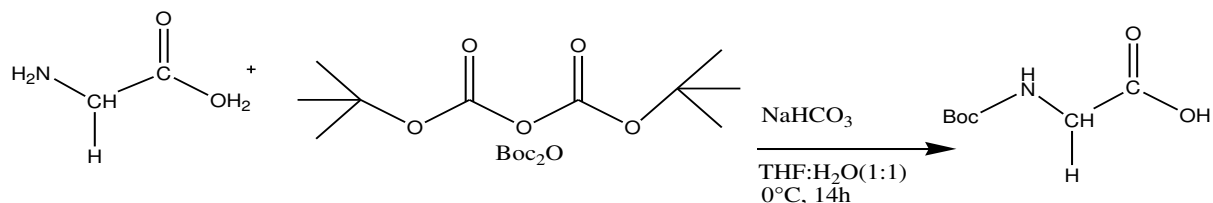
Para a tentativa de obtenção dos dipeptídeos utilizou-se o método clássico de síntese em solução, chamada na química de peptídeos de *síntese química*. É assim denominada pois utiliza um reagente químico para ativar o ácido carboxílico de um aminoácido ou fragmento peptídico (RCOOH, componente carboxílico, doador de acila ou agente acilante), o qual sofre o ataque nucleofílico do grupo α -amino de outro aminoácido ou fragmento peptídico C_α bloqueados (H_2N-R^1 , componente amínico, receptor de acila ou agente nucleofílico) resultando na formação da ligação peptídica entre eles ($RCONHR^1$).



Esquema 5. Formação da ligação peptídica por condensação.

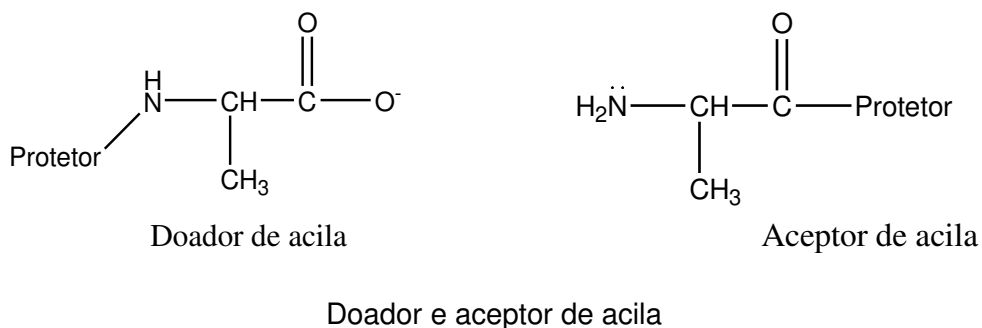
Para a proteção do grupo C-terminal, importante também por aumentar a solubilidade em solventes orgânicos, foi feita a esterificação do aminoácido aceptor de acila. A metodologia utilizada para esta etapa de proteção do aminoácido foi a mesma determinada na primeira parte desse projeto, para a esterificação dos aminoácidos.

Em seguida, a proteção do grupo N-terminal do fragmento do aminoácido doador de acila foi feita utilizando t-butiloxilcarbonila (Boc). O aminoácido protegido foi obtido pela reação de Boc_2O (dicarbonato di-terc-butila) com o aminoácido livre escolhido, no caso a glicina, em presença de NaHCO_3 . O produto obtido, 1,24g de um sólido branco, foi caracterizado por RMN de ^1H . O produto foi utilizado em seguida na síntese do di-peptídeo.



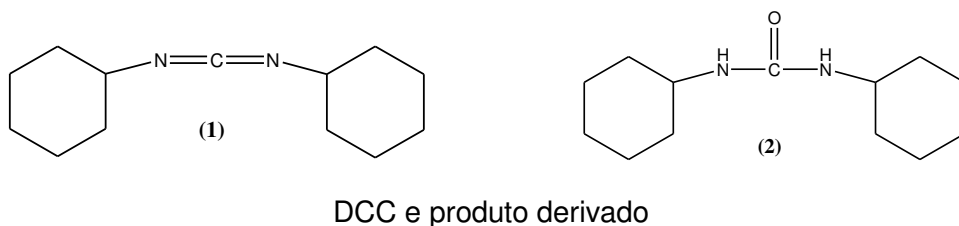
Esquema 6. Proteção do grupo N-terminal

Em síntese de peptídeos, a formação da ligação amidíca entre dois aminoácidos ou fragmentos peptídicos é chamada de acoplamento. Dentre as diferentes maneiras encontradas na literatura para promover esta reação, foi escolhida uma em que o agente acilante é gerado no meio reacional em presença do componente amídico, pela adição do reagente ativador ou acoplador.



A etapa de ativação é necessária devido à alta energia de ativação apresentada pela formação da ligação amidíca a partir de um ácido carboxílico e uma amina, cuja reação resulta na perda de energia livre.

Como agente ativador da carbonila utilizou-se o reagente DCC (1) (N,N-dicicloexilcarbodiimida), que durante a reação de acoplamento é convertido a um derivado da uréia (2).



O produto obtido pela reação do Boc-gli com o ala-OMe, por intermédio do agente acoplador DCC, um óleo viscoso de cor amarelada, foi caracterizado como sendo o dipeptídeo Boc-gli-ala-OMe por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C . O produto, no entanto, apresentava impurezas, e a etapa de purificação não foi bem sucedida. Foram feitas algumas tentativas de recristalização, sem sucesso.

Análise conformacional através de cálculos teóricos:

A estrutura do dipeptídeo gli-ala-OMe, foi dividido em três seções marcadas na Figura 21 pelo plano ω : o resíduo N-terminal glicina, o resíduo alanina e o grupo protetor C-terminal. Esse procedimento permite que qualquer seção seja substituída por outro aminoácido, facilitando o uso dos resultados em estudos futuros.

Em resíduos de peptídeos três ângulos diedros ϕ , ψ e ω medem a rotação das ligações $\text{N}-\text{C}_\alpha$, $\text{C}_\alpha-\text{CO}$, e $\text{OC}-\text{OCH}_3$ respectivamente. Os diedros das cadeias laterais são definidos por χ . No gli-ala-OMe os ângulos diedros que definem o esqueleto peptídico são os seguintes: ϕ_{i-1} , ϕ_i , ω_{i-1} , ω_i , ω_{i+1} , ψ_{i-1} , ψ_i e χ_i . Desses os mais relevantes para a forma e a estabilidade do dipeptídeo e os quais serão investigados detalhadamente pela varredura (scan) da ligação são os que envolvem os ângulos diedros ϕ e ψ .

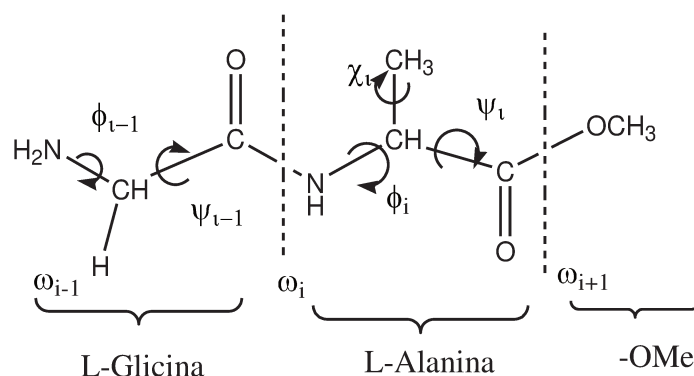


Figura 21. Dipeptídeo gli-ala-OMe. O dipeptídeo foi dividido em seções: a N-terminal do fragmento de aminoácido gli $\omega-1$, a do fragmento ala ω e a do grupo protetor C-terminal -OMe $\omega+1$.

As conformações com rotação do ângulo diedro ω_{i+1} ($\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{CH}_3$) dos grupos ésteres da molécula, com valores diferentes de zero também não foram consideradas no caso do estudo do dipeptídeo, da mesma forma que para os aminoácidos estudados na primeira parte desse projeto, uma vez que a energia de rotação dessa ligação gira em torno de 9 kcal mol^{-1} .

Construiu-se um gráfico da superfície de energia potencial variando-se o ângulo diedro ϕ_i do gli-ala-OMe (Figura 22), através do qual foram obtidos dois mínimos para a rotação dessa ligação.

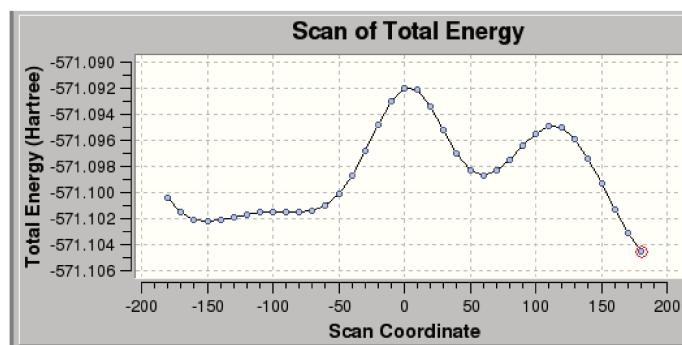


Figura 22. Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro ϕ_i N-C(H)-C=O do gli-ala-OMe, calculado em nível B3LYP/6-31++g(d,p).

Um segundo gráfico (Figura 23) da superfície de energia potencial para a mesma ligação, mas dessa vez iniciando-se a rotação da ligação com a conformação final encontrada pelo primeiro scan também foi feito, uma vez que a energia apresentada pela conformação inicial e a final não eram congruentes.

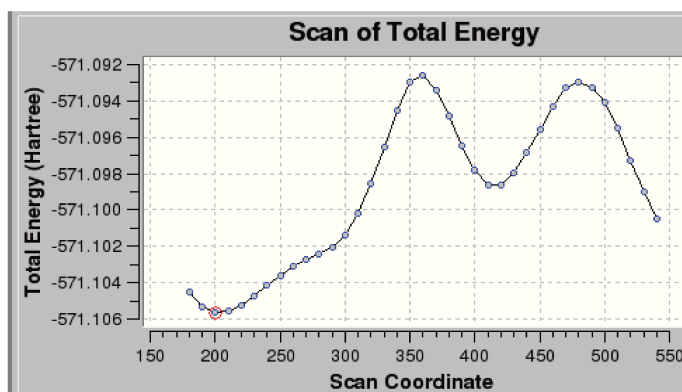


Figura 23. Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro ϕ_i N-C(H)-C=O do gli-ala-OMe, calculado em nível B3LYP/6-31++g(d,p).

A comparação entre os gráficos, no entanto mostra que os dois apontam os mesmos mínimos conformacionais. O fato de que os valores de energia da conformação inicial e final não serem os mesmos deve-se a um fator importante no estudo de mínimos conformacionais através de curva de potencial. Nesse caso ocorre a inversão de configuração de um substituinte, nesse caso do grupo O=C-O-CH₃

A Figura 24 mostra um outro caso, também muito importante, especialmente no estudo dos compostos em questão, que é a inversão da configuração do nitrogênio. Nela podemos observar claramente o ponto onde a configuração do nitrogênio é invertida, numa área que apresenta oscilação abrupta na energia.

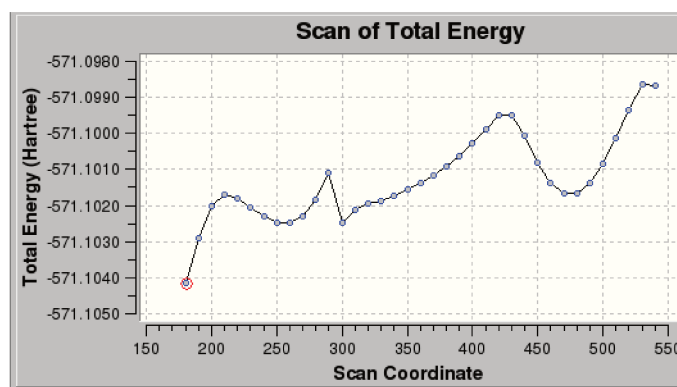


Figura 24. Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro ϕ N-C(H)-C=O do ala-gli-OMe, calculado em nível B3LYP/6-31++g(d,p).

Para contornar esse problema de inversão de configuração, as superfícies de energia potencial passaram a ser montados incluindo o congelamento dos outros ângulos diedros da molécula. Esse procedimento evita que o programa utilizado para o cálculo dessas energias interfira nos valores de coordenadas específicas pré-determinadas, o que pode impedir por exemplo a mudança de configuração da molécula.

A Figura 25 mostra o gráfico da superfície de energia potencial do ângulo diedro ψ_i (C _{α} -C). Observam-se dois mínimos energéticos para a rotação dessa ligação, uma em 170° e outra em 350°.

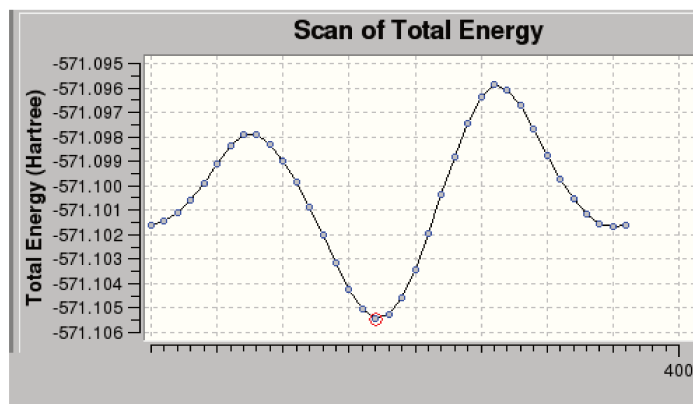


Figura 25. Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro ψ_i [N-C(H)-C=O] do gli-ala-OMe, calculado em nível B3LYP/6-31++g(d,p).

Já a Figura 26 mostra o gráfico da superfície de energia potencial para a ligação ψ_{i-1} , onde também podemos observar dois pontos de mínimo energéticos.

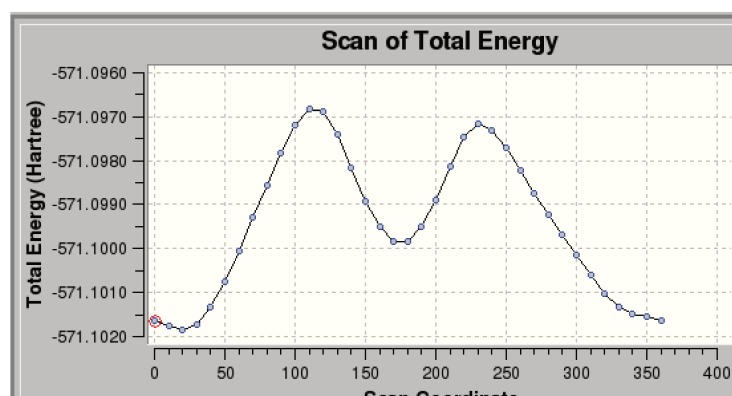


Figura 26. Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro ψ_{i-1} [N-C(H)-C=O] do gli-ala-OMe, calculado em nível B3LYP/6-31++g(d,p).

Para verificar a existência de confôrmers devido a rotação do ângulo diedro H-N-C-C, da extremidade N-terminal do dipeptídeo também foi feito em gráfico da superfície de energia superficial para essa ligação (Figura 27).

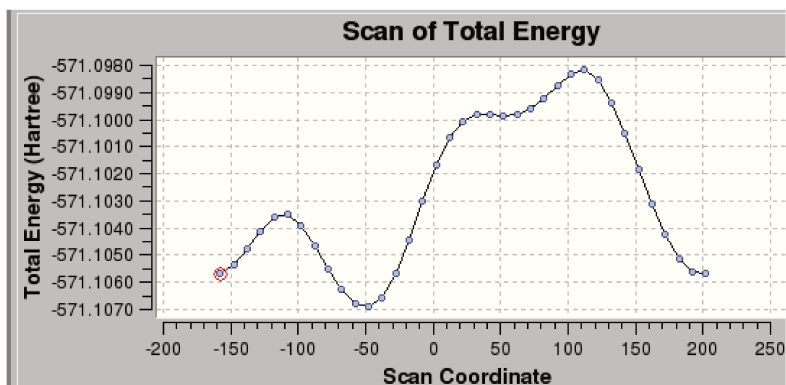


Figura 27. Gráfico da superfície de energia potencial da rotação do ângulo diedro ω_{i-1} [H-N-C(H)-C(=O)] do gli-ala-OMe, calculado em nível B3LYP/6-31++g(d,p).

Como pode-se observar em todos esses gráficos, os cálculos de superfície de energia potencial foram feitos usando o nível de teoria B3LYP/6-31++g(d,p). A inclusão das funções ++ foram necessárias devido a natureza difusa dos pares de elétrons no nitrogênio. Esse procedimento foi feito levando-se em conta os resultados obtidos na primeira parte desse projeto. A seção 4.2 havia mostra do uma comparação entre as diversas superfícies de energia potencial para o alaninato de metila. Desse estudo concluiu-se que a inclusão de funções ++ (para as bases de Pople, ou aug- para as bases de Duning) são de extrema importância para determinar os mínimos energéticos dessa classe de compostos. A não inclusão dessas funções poderia acarretar na exclusão ou inclusão errônea de algumas conformações.

Tabela 22. Dados teóricos para os três confôrmeros mais estáveis do dipeptídeo gli-ala-OMe obtidos em nível B3LYP/aug-cc-pVDZ

Parâmetros	Confôrmero1	Confôrmero2	Confôrmero3
r (C5 = O8) ^a	1,2313	1,2286	1,22967
r (C14 = O19) ^a	1,2168	1,21001	1,21095
r (C2– C5) ^a	1,5278	1,53664	1,52675
r (C5 – N9) ^a	1,3502	1,36182	1,3612
r (C2 – N1) ^a	1,4598	1,45624	1,45868
r (C11 – N9) ^{a,*}	1,4548	1,45617	1,45408
r (C11 – C13) ^a	1,5421	1,54156	1,54062
r (N 1– H3) ^a	1,0184	1,01492	1,01918
r (N9 – H10) ^a	1,0106	1,0100	1,0112
r (C2 – H6) ^a	1,1049	1,09884	1,10813
r (C13 – H15) ^a	1,0958	1,0973	1,0957
r (C11 – H12) ^a	1,1002	1,0983	1,0994
r (C11 – C14) ^{a,*}	1,54	1,52	1,52
∠ (O 8= C5 – C2) ^{b,*}	121,21	120,40	121,62
∠ (N1 = C2 – C5) ^{b,*}	109,13	120,34	109,58
∠ (N1 – C 2 – H7) ^{b,*}	109,98	108,90	110,12
∠ (C5 – C2 – H7) ^b	110,57	106,08	110,08
∠ (O8 – C5 – N9) ^b	122,76	122,81	122,62
∠ (C5 – N9– C11) ^b	121,98	121,81	122,03
∠ (N9 – C11 – C14) ^b	107,58	112,09	107,55
φ (N1 –C2–C5=O8) ^b	38,90	178,75	31,35
φ (O8 = C5–N9– C11) ^b	1,78	0,68	1,75
φ (C5= N9– C11– C14) ^b	-157,87	-149,73	-151,87
φ (N9–C11–C14=O19) ^b	-11,88	162,14	169,49
φ (O8 = C5 – C2 – N1) ^b	31,36	178,75	18,58
E ^c _{relativa}	1,4	2,51	0
Energia corrigida (ZPE) ^d	-570.952885	-570.951177	-570.955180
Frequência carbonila ^e 1	1791.6951	1791.1166	1771.1239
Momento de dipolo ^f	4.1321	4.8439	3.1849

^a angstroms; ^b graus; ^c kcal mol⁻¹; ^d Hartrees; ^e cm⁻¹; ^f Debye

Esses mínimos tiveram suas geometrias otimizadas em nível de teoria B3LYP/aug-cc-pVDZ. Os resultados obtidos de geometria, momento de dipolo e frequência calculados nesse mesmo nível de teoria estão apresentados acima na Tabela 22. A Figura 28 apresenta a numeração dos átomos do dipeptídeo utilizada nessa tabela.

A análise conjunta dos gráficos apresentados acima permitiu verificar a existência de 4 mínimos energéticos, bem delineados, dos quais apenas três são possíveis de existirem em condições experimentais. O quarto mínimo encontrado apresenta uma diferença de energia de mais de 10 kcal mol⁻¹ em relação ao confôrmero mais estável, e os dados obtidos para esse confôrmero não serão apresentados.

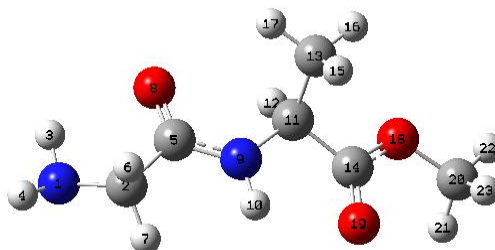


Figura 28. Numeração dos átomos do dipeptídeo utilizada na descrição dos dados da Tabela 22

A Figura 29 apresenta a representação espacial dos átomos para os três mínimos encontrados.

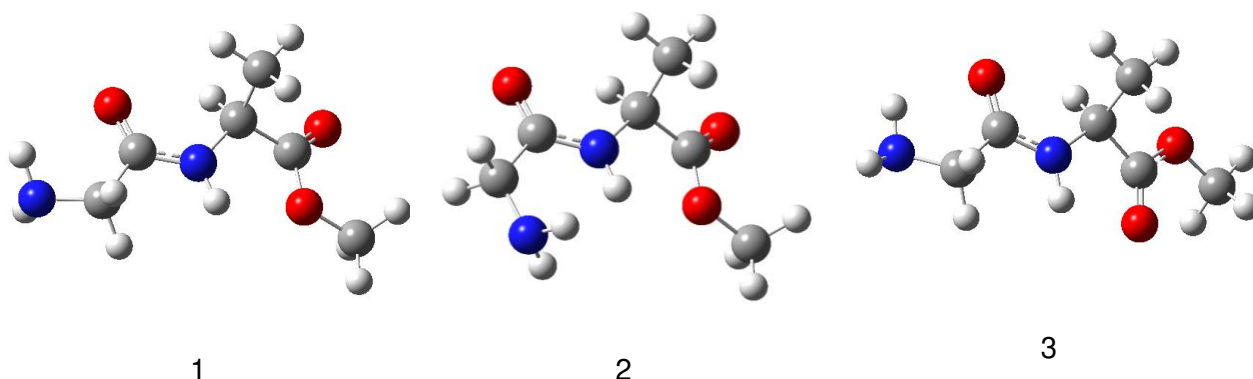


Figura 29. Representação espacial dos átomos para o dipeptídeo gli-ala-OMe nas conformações de 1 a 3 obtidos em nível de teoria B3LYP/aug-cc-pVDZ

Analisando estes dados iniciais espera-se encontrar experimentalmente as conformações de mais baixas energias obtidas para o estado vapor, apresentadas acima. Fazendo-se uma comparação com os resultados obtidos no estudo para os ésteres dos aminoácidos individuais, que apresentam os mesmos tipos de interação para estabilização da molécula, é de se esperar que as formas 1 e 3 estejam envolvidas no equilíbrio conformacional dessa molécula.

A síntese da molécula em estudo foi feita, como descrito na seção anterior. A etapa de purificação do composto, no entanto, não foi finalizada, e a análise experimental do composto (a obtenção dos espectros de RNM e infravermelho em solventes de diferentes polaridades) não pôde ser concluída.

5. Conclusões

Neste projeto realizou-se o estudo do isomerismo conformacional dos ésteres metílicos dos seguintes aminoácidos: glicina, alanina, prolina e ácido aspártico. Utilizou-se, para tanto, dados de espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C , espectroscopia de infravermelho, cálculos teóricos utilizando o programa Gaussian03 (em níveis de teoria DFT B3LYP e MP2) para cálculos de geometria, energia e parâmetros espectroscópicos no estado vapor e em solução. Foram feitos ainda cálculos utilizando os programas Models e Bestfit, no caso do éster do ácido aspártico, para determinação da população experimental de cada confômero em solução e também no vapor.

Para os três primeiros ésteres de aminoácidos estudados (glicinato, alaninato e prolinato de metila) concluiu-se que estes não apresentam variação conformacional com a mudança de polaridade do meio. O glicinato de metila apresentou dois mínimos conformacionais no estado vapor calculados em diversos níveis de teoria, sendo que em MP2/aug-cc-pVDZ o rotâmero *cis*, em relação ao diedro $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ apresentou-se mais estável que o *trans* por uma diferença de energia de $\Delta E_{\text{gli2-gli1}}^{\text{V}} = 1,47 \text{ kcal mol}^{-1}$. Experimentalmente foi observado apenas um confômero em soluções de variadas constantes dielétricas (CCl_4 , CHCl_3 , CH_2Cl_2 e DMSO) e foi atribuído com sendo o mais estável no vapor gli1 (*cis*). Analogamente, o alaninato de metila também apresentou dois mínimos possíveis no estado vapor, um sinperiplanar e outro anticlinal em relação ao ângulo diedro $\text{O}=\text{C}-\text{CH}-\text{NH}_2$, sendo a diferença de energia calculada entre os dois confômeros de $\Delta E_{\text{ala2-ala1}}^{\text{V}} = 0,98 \text{ kcal mol}^{-1}$ pelo método MP2/aug-cc-pVDZ. Novamente em solução só foi possível observar um confômero, atribuído como sendo o mais estável no vapor ala1 (sinperiplanar). Para o prolinato de metila também foram obtidos dois confômeros mais estáveis na fase vapor, *sinclinal* (pro1) e *antiperiplanar* (pro2) em relação ao ângulo de diedro $\text{O}=\text{C}-\text{CH}-\text{NH}$. O primeiro apresenta configuração do anel pirrolidinico em *endo* e o último apresenta uma configuração intermediária. A diferença de energia entre os dois confômeros, calculada pelo método MP2, foi de $\Delta E_{\text{prp2-pro1}}^{\text{V}} = 0,96 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Experimentalmente, através dos dados de IV em solução, foi possível observar dois confôrmeros em todos os solventes utilizados. Não foi possível observar, no entanto, variação de população para estes confôrmeros com a mudança de polaridade do meio, sendo essa observação confirmada pelos dados de RMN, uma vez que os acoplamentos investigados não apresentaram variação significativa em seu valor com a mudança de polaridade do meio. Estes confôrmeros foram atribuídos como sendo o pro1 com 85% da população em solução e o pro2 com 15% da população em todos os solventes utilizados nessa investigação.

No caso do aspartato de metila foram verificadas três conformações mais estáveis na fase vapor, sendo que em solução os dados de RMN e IV apontam apenas duas conformações, Asp1 mais estável e Asp2 com energia de 0,83 kcal mol⁻¹ (B3LYP/aug-cc-pvdz) em relação ao primeiro. Em solução pode-se observar que a conformação Asp2 sofre significativa estabilização, sendo que em DMSO esta é a conformação majoritária, com 61% da população (pelos dados obtidos pelo Bestfit). Por RMN observamos a variação da população dos confôrmeros pelo aumento progressivo da constante de acoplamento $^1J_{CH}$ conforme o aumento da polaridade do meio. Através dos dados de IV podemos observar qualitativamente essa mudança, por meio da deconvolução das bandas na região da carbonila de cada um dos confôrmeros. Foi verificada boa concordância entre os resultados experimentais e os teóricos. Dessa forma podemos afirmar que a teoria aplicada descreve adequadamente o equilíbrio conformacional do sistema em estudo.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1) A. J. Kirby, *Stereoelectronic effects*, Oxford University Press, Bath (2000).
- 2) E. L. Eliel, S. H. Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*, Cap. 11 (1994).
- 3) V. Zefirov, *Tetrahedron*, **33**, 3293 (1977).
- 4) W. J. Orville-Thomas, *In Internal Rotation in Molecules*, Cap. 1: Londres, Inglaterra (1974)
- 5) W. Garbisch, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1780 (1964).
- 6) E. L. Eliel, *Chem. Ind. (London)*, 568 (1959).
- 7) M. J. O. Anteunis, *Some Results and Limitations in Conformational Studies of Six-Membered Heterocycles*. In *Conformational Analysis*; Chiurdoglu, G. Ed.; Academic: Nova Iorque, p. 31 (1971).
- 8) E. A. Basso, C. Kaiser, R. Rittner, J. B. Lambert, *J. Org. Chem.* **58**, 7865 (1993).
- 9) B. L. Shapiro, C. K. Tseng, M. D. Johnston, *J. Magn. Reson.* **10**, 65 (1973).
- 10) R. J. Abraham, A. D. Jones, M. A. Warne, R. Rittner, C. F. Tormena, R. Rittner, *J. Chem. Soc. Perkin 2*, 533-539 (1996)
- 11) R. J. Abraham, C. F. Tormena, R. Rittner, *J. Chem. Soc. Perkin 2*, 1663 (1999).
- 12) R. J. Abraham, E. Bretschneider, *in: Internal Rotation in Molecules*, W. J. Orville-Thomas (Ed.), Wiley, Cap. 13, (1974).
- 13) R. J. Abraham, C. F. Tormena, R. Rittner, *J. Chem. Soc. Perkin 2*, 815, (2001).
- 14) C. F. Tormena, R. Rittner, R. J. Abraham, E. A. Basso, R. M. Pontes, *J. Chem. Soc. Perkin 2*, 2054, (2000).
- 15) C. F. Tormena, M. P. Freitas, R. Rittner and R. J. Abraham, *Magn. Reson. Chem.* **40**, 279 (2002).
- 16) C. F. Tormena, R. Rittner, R. J. Abraham, E. A. Basso, B. C. Fiorin, *J. Phys. Org. Chem.*; **17**, 42 (2003).
- 17) M. P. Freitas, R. Rittner, C. F. Tormena, R. J. Abraham, *J. Phys. Org. Chem.*, **14**, 317 (2001).

- 18) M. P. Freitas, C. F. Tormena, R. Rittner, R. J. Abraham, *J. Phys. Org. Chem.*, **15**, (2002).
- 19) F. Yoshinaga, C. F. Tormena, M. P. Freitas, R. Rittner, R. J. Abraham, *J. Chem Soc. Perkin Trans. 2*, 1494 (2002).
- 20) C. R. Martins, L. C. Ducati, C. F. Tormena and R. Rittner, *Spectrochim. Acta A* **72**, 1089-1096 (2009).
- 21) J. B. Foresman, A. Frish, *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*, 2a. ed.: EUA, (1996).
- 22) M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., 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. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, 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. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian 03, revisão D.02, Gaussian, Inc., Pittsburg, EUA, 2004.
- 23) C. Möller; M. S. Plesset.; *Phys. Rev.*; **46**, 618 (1934)
- 24) L. Gontrani, B. Mennucci, J. Tomasi, *J. Molec. Struct. (Theochem)* **500**, 113-127 (2000)
- 25) L. Onsager, *J. Am. Chem. Soc.* **58**, 1486 (1938)
- 26) S. Miertus, E. Scrocco, J. Tomasi, *J. Chem. Phys.* **55**, 117 (1981)

- 27) E. Cancès, B. Mennucci, J. Tomasi, *J. Chem. Phys.* **107**, 30323041 (1997)
- 28) J. Tomasi, M. Persisco, *Chem. Rev.* **94**, 2027, (1994)
- 29) J. Tomasi, B. Mennucci, E. Cancès, *The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level*, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **464**, 211(1999).
- 30) J. Tomasi, R. Cammi, B. Mennucci, *Medium Effects on the Properties of Chemical Systems: an Overview of Recent Reformulations in the Polarizable Continuum Model (PCM)* *Int. J. Quantum Chem.*, **75** 783(1999).
- 31) J. Tomasi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Cappelli, S. Corni, *Molecular properties in solution described with a continuum solvation model*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **4**, 5697(2002).
- 32) J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Quantum Mechanical Continuum Solvation Models*, *Chem. Rev.* **105**, 2999 (2005).
- 33) C. Cramer, D. G. Truhlar *Acc. Chem. Res.* **41**, 760, (2008)
- 34) A. Klamt, G. Shuüürmann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **11**, 799, (1993)
- 35) K. Baldrige, A. Klamt, *J. Chem. Phys.*, **106**, 6622 (1997)
- 36) C. Zhan, J. Bentley, D. M. Chipman, *J. Chem. Phys.*, **108**, 177 (1998)
- 37) Q. Cui, *J. Chem Phys.* **117**, 4720 (2002)
- 38) P. Bandyopadhyay, M. S. Gordon, B. Mennucci, J. Tomasi, *J. Chem. Phys.*, **116**, 5023 (2002)
- 39) J. M. Mullin, M. S. Gordon, *J. Phys. Chem. B* **25**, 113 (2009)
- 40) Tomasi, J. Thirty Years of Continuum Solvation Chemistry: A Review and Prospectsfor the near Future. *Theor. Chem. Acc*, **112**, 184–203 (2004).
- 41) Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *Implicit Solvation Models: Equilibria, Structure, Spectra and Dynamics*. *Chem. Rev.*, **99**, 2161–2200 (1999).

- 42) Feig, M.; Brooks, C. L. Recent Advances in the Development and Application of Implicit Solvent Models in Biomolecule Simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **14**, 217–224 (2004).
- 43) S. M. Bachrach, *J. Phys. Chem. A* **112**, 3722 (2008)
- 44) K. Chuchev, J. J. BelBruno, *J. Molec. Struct. (Theochem)* **850**, 111, (2008)
- 45) M. Campo, *J. Chem. Phys.*, **125**, 114511 (2006)
- 46) H. Zhang, Z. Zhou, Y. Shi, *J. Phys. Chem. A*, **108**, 6735 (2004)
- 47) A. Lesarri, S. Mata, E. J. Cocinero, S. Blanco, J. C. Lopez, J. L. Alonso, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 4673 (2002).
- 48) A. Lesarri, E. J. Cocinero, J. C. Lopez, J. L. Alonso, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 605 (2004).
- 49) R. Ramaekers, J. Pajak, B. Lambie, G. Maes, *J. Chem. Phys.*, **120**, 4182 (2004).
- 50) P. D. Godfrey, R. D. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2019 (1995).
- 51) P. D. Godfrey, S. Firth, L. D. Hatherley, R. D. Brown, A. P. Pierlot, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 9687 (1993).
- 52) R. J. Levis, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **45**, 483 (1994).
- 53) B. Lambie, R. Ramaekers, G. Maes, *J. Phys. Chem. A*, **108**, 10426 (2004).
- 54) S. Blanco, A. Lesarri, J. C. Lopez, J. L. Alonso, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 11675 (2004).
- 55) E. Czinki, A. G. Csaszar, *Chem. Eur. J.*, **9**, 1008 (2003).
- 56) T. Marino, N. Russo, E. Tocci, M. Toscano, *Int. J. Quantum Chem.*, **84**, 264 (2001).
- 57) R. Improta, C. Benzi, V. Barone, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 12568 (2001).
- 58) S. Oldziej, U. Kozłowska, A. Liwo, H. A. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, **107**, 8035 (2003).

- 59) A. D. Headley, S. D. Starnes, *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, **453**, 247 (1998).
- 60) T. F. Miller, D. C. Clary, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6**, 2563 (2004).
- 61) A. Gomez-Zavaglia, I. D. Reva, R. Fausto, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **5**, 41 (2003).
- 62) K. Zhang, A. Chung-Phillips, *J. Comp. Chem.*, **19**, 1862 (1998).
- 63) C. F. Weise, J. C. Weisshaar, *J. Phys. Chem. B*, **107**, 3265 (2003).
- 64) P. A. Nielsen, P. Norrby, T. Liljefors, N. Rega, V. Barone, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 3151 (2000).
- 65) P. I. Nagy, B. Noszal, *J. Phys. Chem. A*, **104**, 6834 (2000).
- 66) J. L. Alonso, E. J. Concinero, A. Lesarri, M. E. Sanz, J. C. López, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 3471-3474 (2006)
- 67) J. Kapitán, V. Baumruk, V. Kopecký Jr. P. Bour, *J. Phys. Chem. A*, **110**, 4689-4696 (2006)
- 68) N. G. Mirkin, S. Krimm, *J. Phys. Chem. A*, **108**, 5438-5448 (2004)
- 69) S. G. Stepanian, I. D. Reva, E. D. Radchenko, L. Adamowicz, *J. Phys. Chem. A*, **105**, 10664-10672 (2001)
- 70) W. D. Allen, E. Czinki, A. G. Császár, *Chem. Eur. J.*, **10**, 4512-4517 (2004)
- 71) C. L. Jenkins, G. Lin, J. Duo, D. Rapolu, I. Guzei, R. Raines, G. R. Krow, *J. Org. Chem.*, **69**, 8565-8573 (2004)
- 72) A. E. Aliev, D. Courtier-Murias, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 14034-14042 (2007)
- 73) J. Kapitán, V. Baumruk, V. Kopecký Jr., R. Pohl, P. Bour, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 13451-13462 (2006)
- 74) L. Tasic, Tese de Doutorado, UNICAMP, 2002
- 75) Machado, A., Liria, C. W., Proti, P. B., Remuzgo, C. e Miranda, M. T. M., (2004) *Quím. Nova*, **27**, 781-789

- 76) Nelson, D. L., Cox. M. M *Lehninger Principios de Bioquímica* 3ª edição, Sarvier Editora de Livros Médicos, 2002
- 77) Balaram, P., *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7916 (2006)
- 78) Ramachandran, G. N., Sasisekharan, V. *Adv. Protein Chem*, **23**, 283 (1968)
- 79) Chass, A. Gregory, Cindy, P., Chun, Connor, A., J. *Molec. Struct.(THEOCHEM)*, **729** 177 (2005)
- 80) Grdadolnik, J., Grdadolnik, S. G., Avbelj, F., *J. Phys. Chem. B*, **112**, 2712 (2008)
- 81) Bundi, A., Wuthrich, K. *Biopolymers* **18**, 285 (1979)
- 82) Plaxco, K. W., Morton, C. J., Grimshaw, S. B., Jones, J.A., Campbell, M. P. I. D., Dobson, C. M, *J. Biomol. NMR*, **10**, 221(1997)
- 83) Shwrzinger, S., Kroon, G. J.A., Foss, T. R., Wright, P. E, Dyson, H. J. *J. Biomol. NMR*, **18**, 43, (2000)
- 84) Peti, W., Henning, M., Smith, L. J. Schwalbe, H. *J. Am. Soc.*, **122**, 12017 (2000)
- 85) Avbelj, F., Grdadolnik, G. S. *Protein Sci*, **16**, 273 (2007)
- 86) Serrano, L. *J.. Mol. Biol.* **254**, 322 (1995)
- 87) Bandekar, J. *Biochim. Biophys. Acta*, **1120**, 123 (1992),
- 88) Gnanakaran, S., Hochstrasser, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 12886 (2001)
- 89) Wang, J., Hochstrasser, R. M., *J. Phys. Chem. B*, **110**, 7858 (2006)
- 90) Watson, T.W., Hirst, J.D., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6**,998 (2004)
- 91) Avignon, M. Garrigou-Lagrange, C., Bothorel, P. *Biopolymers*, **12**, 1651 (1973)
- 92) Takekiyo, T. Imai, T, Kato, M., Taniguchi, Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**,355 (2006)

- 93) McAllister, M. A., Perczel, P. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **288**, 181 (1993)
- 94) Scott, A. P. ; Radom, L., *J. Phys. Chem.*, **100**, 16502 (1996)
- 95) Alan E.Reed, Larry A.Curtiss, Frank Weinhold, *Chem. Rev.*, **88** 899–926 (1988)
- 96) F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry*, Wiley, Chichester (1999).
- 97) **a.** S. Guttman, R. A. Boissonnas, *Helv. Chim. Acta*, , **41**, 1858. (1958) **b.** J. F. Almeida, J. Anaya, N. Martin, M. Grande, J. R. Moran, M. C. Caballero, *Tetrahedron: Asymmetry*, **3** 1431-1440 (1992)
- 98) Shendage, D.M., Fröhlich, R., Haufe, G., *Org. Lett.*, **6(21)** 3675 (2004)
- 99) Armarego, W.L.F., Chai, C. L. L., *Purif. Lab. Chem.*, 5thed., 201
- 100) **a.** Sheehan, J. C., Hess, G. P., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1067 (1955)
b. Wonnemann, J., Oberhoff, M., Erker, G. Fröhlich, R., Bergander, K., *Eur. J. Inorg. Chem.* 1111(1999)
- 101) B. Nilius, R. Vennekens, J. Prenen, J. G. Hoenduoop, G. Drogmans, *J. Biol. Chem.* **276**, 1020 (2001)
- 102) J. C. P. Koo, J. S. W. Lam, G. A. Chaass, D. H. Setiadi, J. M. S. Law, J. G. Papp, B. Penke, I. G. Csizmadia, *J. Mol. Struct. (Theochem)* **620**, 231 (2003)

Anexos

SOLVENTS BESTFIT FOR VARIABLE EG (EA-EB)

asp

	K	H	Z	VOLUME	L
A	1.3566	2.7391	1.0	141.019	0.5225
B	1.1786	0.9560	1.0		

SOLN.DIEL 2.240 4.810 9.810 37.500 46.700
 JOBS 137.560138.240138.600140.000139.040
 TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00

EG= 0.00 C = 1.80 JA = 142.293 JB = 128.673 ERROR=0.443
 TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
 DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
 JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
 JCALC137.19138.24138.82139.53139.66
 ENERGY -0.30 -0.50 -0.63 -0.80 -0.84

EG= 0.10 C = 1.80 JA = 142.478 JB = 129.774 ERROR=0.441
 TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
 DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
 JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
 JCALC137.20138.23138.81139.53139.66
 ENERGY -0.20 -0.40 -0.53 -0.70 -0.74

EG= 0.20 C = 1.80 JA = 142.698 JB = 130.704 ERROR=0.439
 TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
 DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
 JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
 JCALC137.21138.22138.80139.54139.67
 ENERGY -0.10 -0.30 -0.43 -0.60 -0.64

EG= 0.30 C = 1.80 JA = 142.958 JB = 131.488 ERROR=0.438
 TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
 DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
 JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
 JCALC137.23138.21138.79139.54139.68
 ENERGY 0.00 -0.20 -0.33 -0.50 -0.54

EG= 0.40 C = 1.80 JA = 143.264 JB = 132.151 ERROR=0.436
 TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
 DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
 JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
 JCALC137.24138.20138.77139.54139.69
 ENERGY 0.10 -0.10 -0.23 -0.40 -0.44

G= 0.50 C = 1.80 JA = 143.627 JB = 132.712 ERROR=0.435
 TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
 DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70

JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
JCALC137.25138.19138.76139.55139.69
ENERGY 0.20 0.00 -0.13 -0.30 -0.34

EG= 0.60 C = 1.80 JA = 144.057 JB = 133.185 ERROR=0.435
TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
JCALC137.26138.18138.75139.55139.70
ENERGY 0.30 0.10 -0.03 -0.20 -0.24

EG= 0.70 C = 1.80 JA = 144.566 JB = 133.584 ERROR=0.435
TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
JCALC137.27138.17138.74139.55139.71
ENERGY 0.40 0.20 0.07 -0.10 -0.14

EG= 0.80 C = 1.80 JA = 145.169 JB = 133.921 ERROR=0.436
TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
JCALC137.28138.16138.73139.56139.72
ENERGY 0.50 0.30 0.17 0.00 -0.04

EG= 0.90 C = 1.80 JA = 145.880 JB = 134.208 ERROR=0.435
TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
JOBS 137.56 138.24 138.60 140.00 139.04
JCALC137.30 138.15 138.71 139.56 139.73
ENERGY 0.60 0.40 0.27 0.10 0.06

EG= 1.00 C = 1.80 JA = 146.726 JB = 134.449 ERROR=0.437
TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
JCALC137.31138.14138.70139.56139.74
ENERGY 0.70 0.50 0.37 0.20 0.16

EG= 1.10 C = 1.80 JA = 147.726 JB = 134.653 ERROR=0.438
TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
JCALC137.31138.13138.69139.56139.74
ENERGY 0.80 0.60 0.47 0.30 0.26

EG= 1.20 C = 1.80 JA = 148.913 JB = 134.825 ERROR=0.439
TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
JCALC137.32138.12138.68139.57139.75

ENERGY 0.90 0.70 0.57 0.40 0.36

EG= 1.30 C = 1.80 JA = 150.320 JB = 134.970 ERROR=0.441
TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
JCALC137.33138.11138.67139.57139.76
ENERGY 1.00 0.80 0.67 0.50 0.46

EG= 1.40 C = 1.80 JA = 151.981 JB = 135.095 ERROR=0.442
TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
JCALC137.34138.10138.66139.57139.76
ENERGY 1.10 0.90 0.77 0.60 0.56

EG= 1.50 C = 1.80 JA = 153.955 JB = 135.199 ERROR=0.443
TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
JCALC137.34138.10138.65139.57139.77
ENERGY 1.20 1.00 0.87 0.70 0.66

EG= 1.60 C = 1.80 JA = 156.301 JB = 135.285 ERROR=0.445
TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
JCALC137.35138.09138.65139.57139.78
ENERGY 1.30 1.10 0.97 0.80 0.76

EG= 1.70 C = 1.80 JA = 159.073 JB = 135.360 ERROR=0.446
TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
JCALC137.35138.09138.64139.57139.78
ENERGY 1.40 1.20 1.07 0.90 0.86

EG= 1.80 C = 1.80 JA = 162.360 JB = 135.424 ERROR=0.447
TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
JCALC137.36138.08138.64139.58139.79
ENERGY 1.50 1.30 1.17 1.00 0.96

EG= 1.90 C = 1.80 JA = 166.258 JB = 135.477 ERROR=0.448
TEMP 22.00 22.00 22.00 22.00 22.00
DIEL 2.24 4.81 9.81 37.50 46.70
JOBS 137.56138.24138.60140.00139.04
JCALC137.36138.08138.63139.58139.79
ENERGY 1.60 1.40 1.27 1.10 1.06

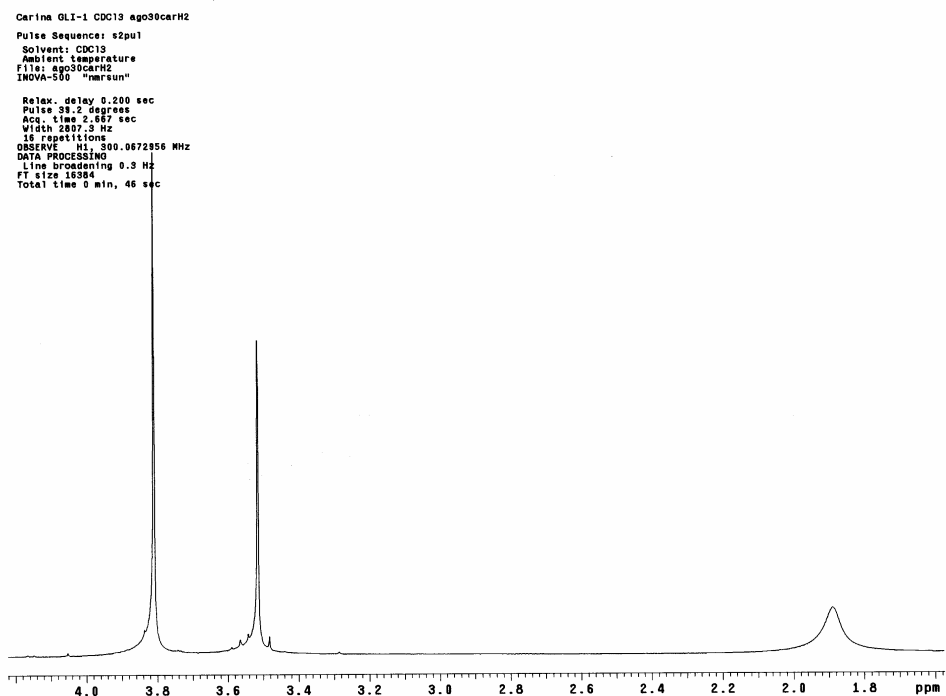


Figura 1. Espectro de RMN de ^1H (em CDCl_3 a 300MHz) do glicinato de metila

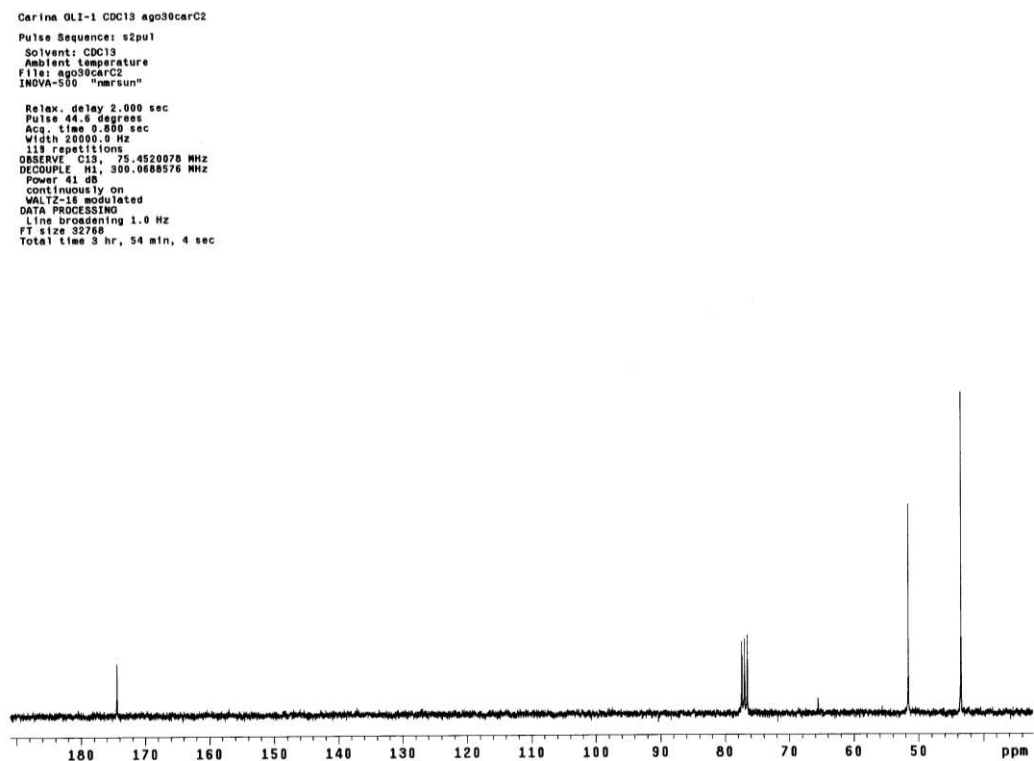


Figura 2. Espectro de RMN de ^{13}C (em CDCl_3 a 75MHz) do glicinato de metila

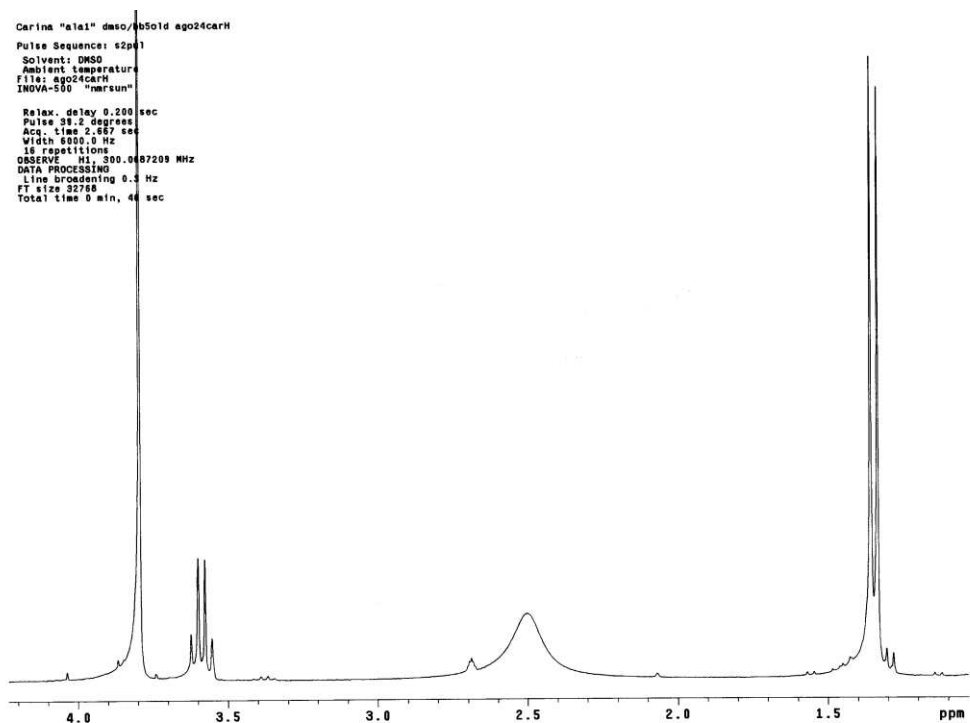


Figura 3. Espectro de RMN de ^1H (em DMSO- d_6 a 300MHz) do alaninato de metila

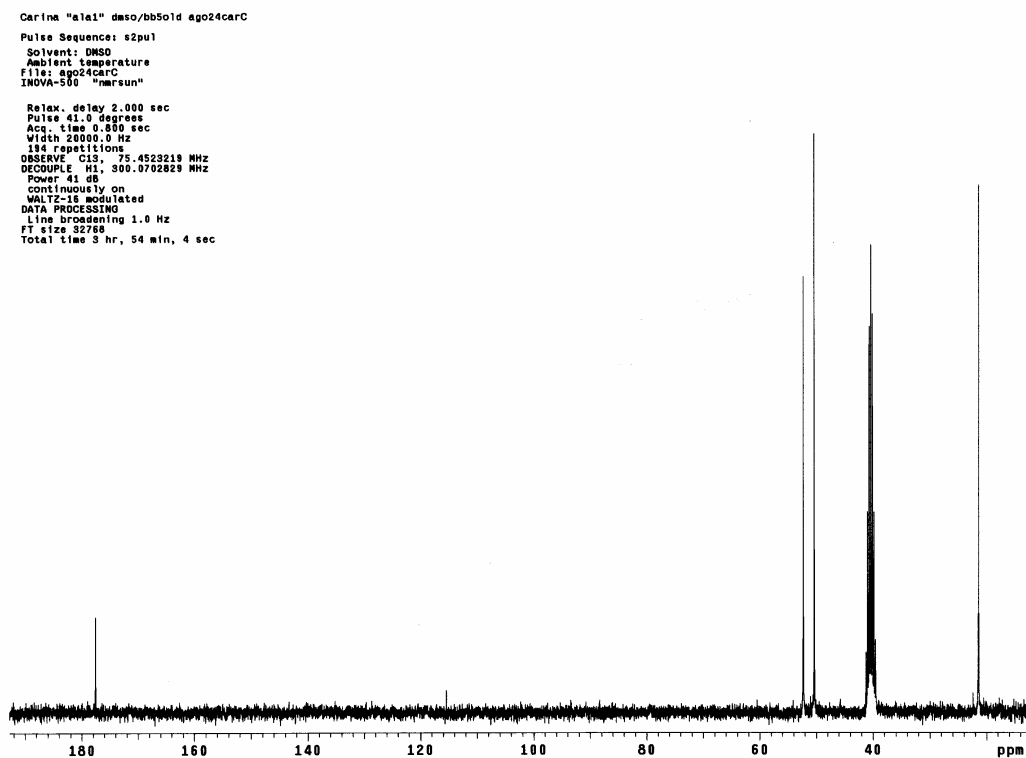


Figura 4. Espectro de RMN de ^{13}C (em DMSO- d_6 a 300MHz) do alaninato de metila

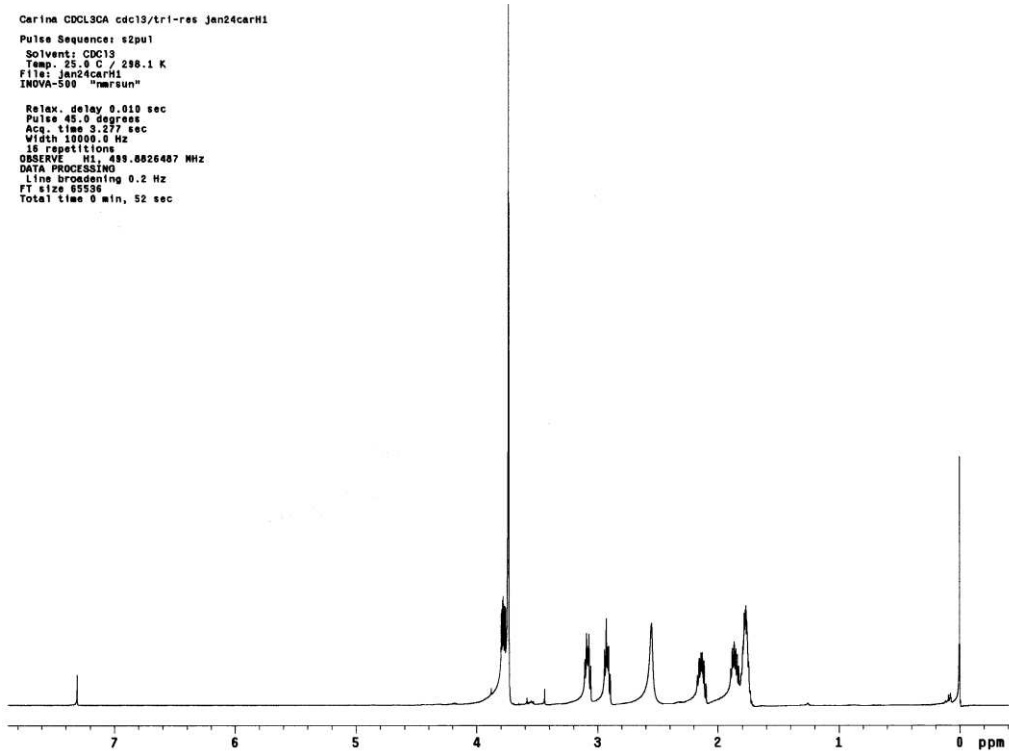


Figura 5. Espectro de RMN de ^1H (em CDCl_3 a 500MHz) do prolinato de metila

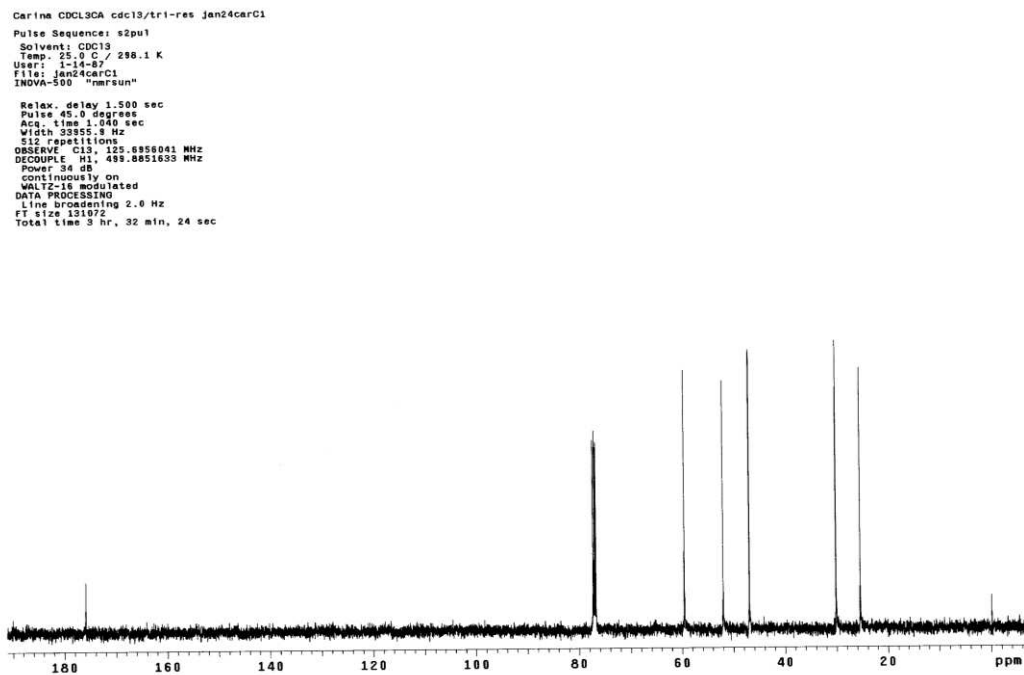


Figura 6. Espectro de RMN de ^{13}C (em CDCl_3 a 125MHz) do prolinato de metila

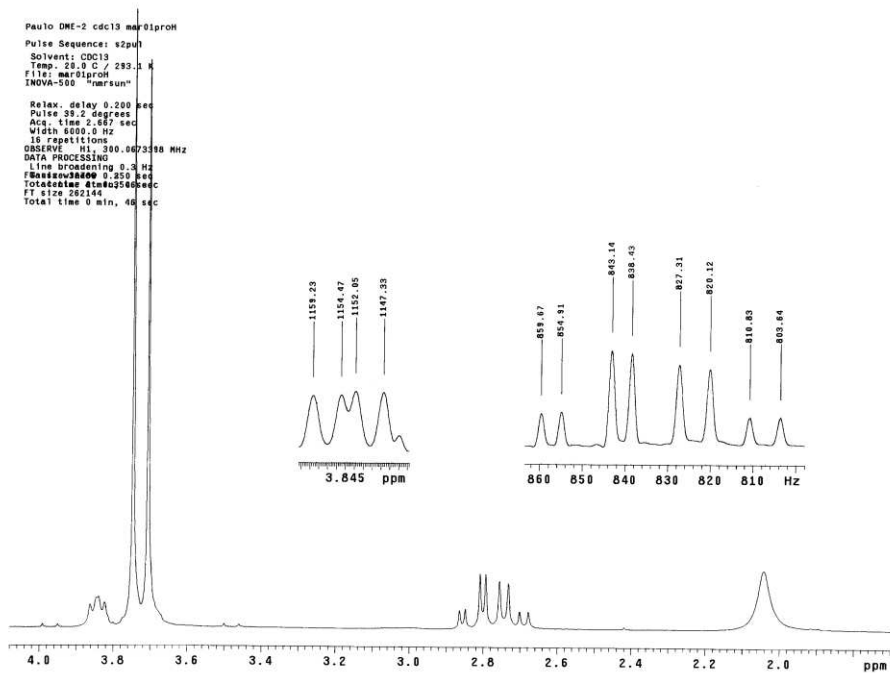


Figura 7. Espectro de RMN de ^1H (em CDCl_3 a 300MHz) do aspartato de metila

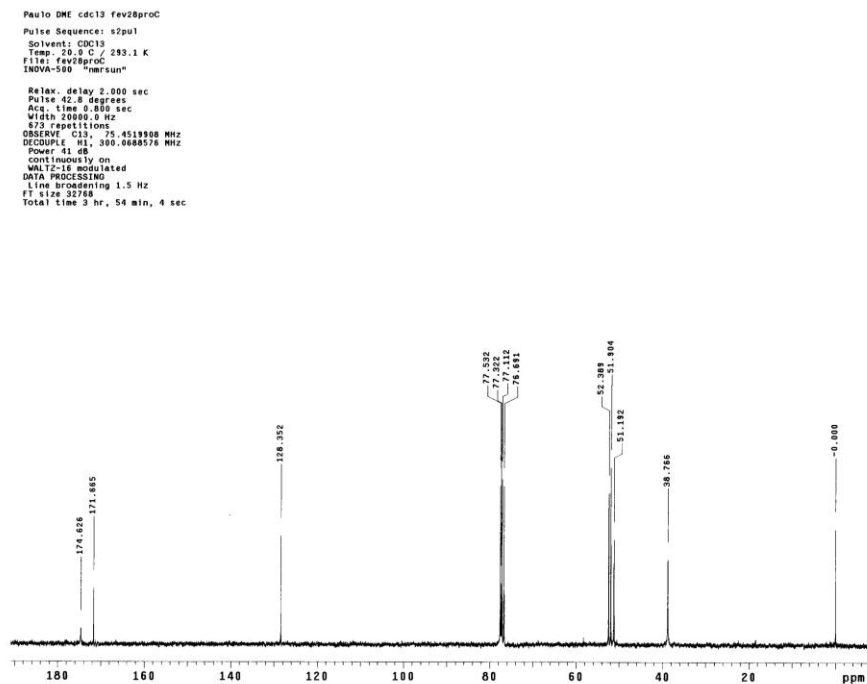


Figura 8 Espectro de RMN de ^{13}C (em CDCl_3 a 75MHz) do aspartato de metila

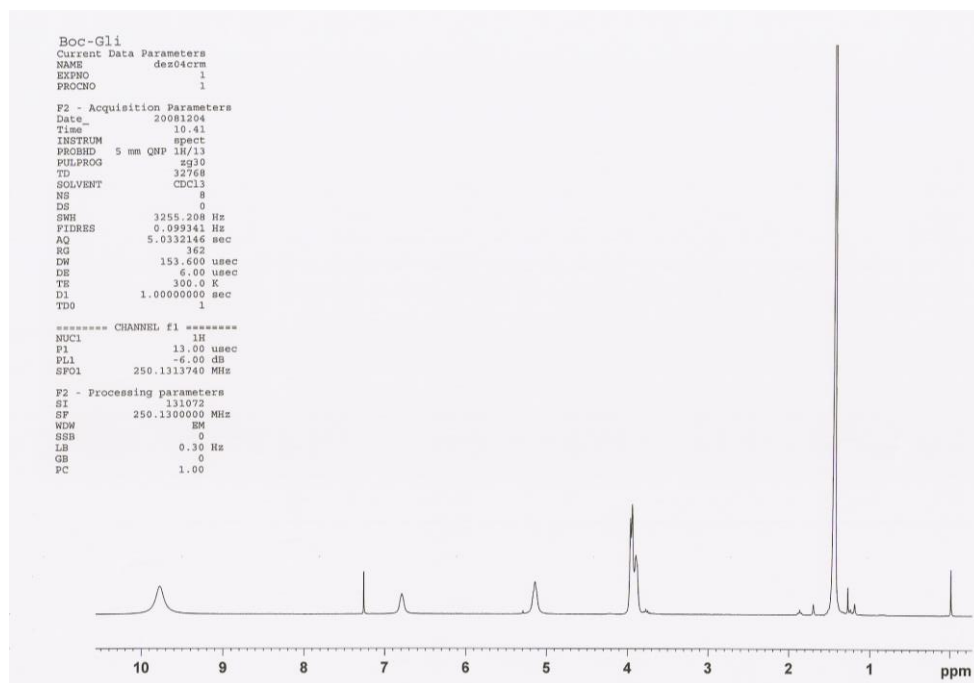


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H (em CDCl_3 a 250MHz) do aminoácido protegido Boc-glicina (produto impuro)

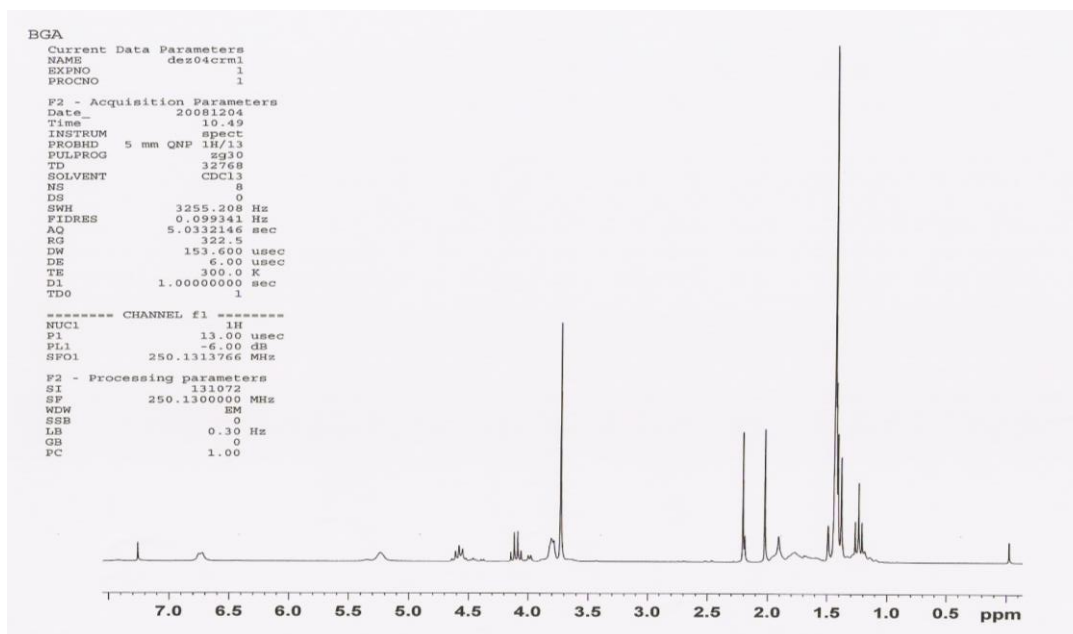


Figura 10. Espectro de RMN de ^1H (em CDCl_3 a 250MHz) do dipeptídeo protegido Boc-gli-ala-OM

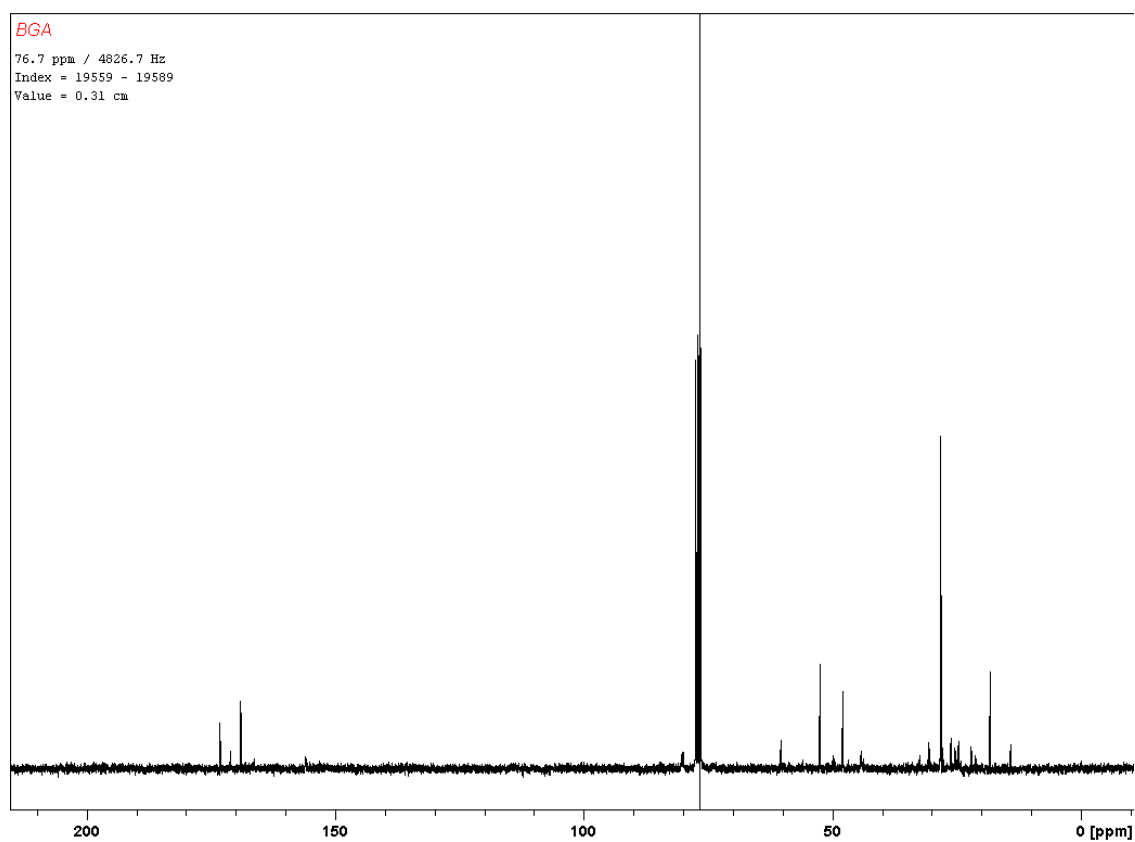


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C (em CDCl_3 a 62,4MHz) do dipeptídeo protegido Boc-gli-al

