

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali



CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN CHIMICA

Curriculum Molecolare

Studio conformazionale di un derivato dendrimerico
dell'acido L-glutammico tramite spettroscopia NMR e IR.

Relatore interno: dr. Donata Catalano

Controrelatore: prof. Pietro Diversi

Candidato: Luca D'Amario

Anno Accademico 2007/2008

Indice.

Introduzione	1
1.La letteratura	3
2.La molecola studiata e i primi spettri NMR	5
Spettro ^1H NMR	5
Spettro ^{13}C NMR	8
3.Sezione sperimentale	11
4.Esperimenti non routinari	13
DEPT	13
Misura dei T_1 dei nuclei ^1H	15
Disaccoppiamento selettivo	18
Mappe di correlazione	21
COSY	22
NOESY	23
HETCOR	26
Spettri IR	29
5.Effetti della temperatura e del solvente	32
Effetto della temperatura	32
Effetto del solvente	34
6.Ipotesi conformazionale e conclusioni	37
7.Bibliografia	39

Introduzione.

Con questo lavoro si vuole proporre un modello conformazionale di una molecola dendrimerica tramite studi di spettroscopia NMR e FT-IR.

Prima di inoltrarci nel fitto bosco di picchi spettroscopici introduciamo brevemente questa classe di composti [1a,b,c].

Le specie dendrimeriche sono dette tali in quanto strutturate da un corpo centrale (monomero di pochi u.m.a. ad esempio un amminoacido o un anello aromatico polifunzionalizzato) da cui si diramano vari bracci a loro volta ramificati.

Se la molecola è molto grossa il risultato finale prende la forma di un granulo che presenta la superficie esterna ricca dei gruppi funzionali propri dei monomeri costituenti. L'utilizzo principale di questi composti comporta l'attivazione della loro superficie, ottenuta legando ai gruppi funzionali determinate molecole. È così possibile, per esempio, il veicolamento di farmaci a specifici siti attivi. Inoltre, sfruttando la formazione di legami non covalenti, alcuni dendrimeri sono utilizzati come fasi stazionarie in tecniche cromatografiche GC, HPLC, e scambio ionico.

La possibilità di costruire dendrimeri con monomeri chirali ha portato queste molecole ad essere delle ottime candidate per lo studio degli effetti macroscopici della chiralità molecolare. In questo campo ci sono studi sulla chiralità del "core", dei bracci dendrimerici o solo della superficie [2].

I gruppi funzionali superficiali possono essere di vario tipo e alcuni possono essere in grado di legarsi tra loro (ad esempio gruppi amminici e carbonilici con legami ad idrogeno). I legami possono avvenire sia tra due rami dendrimerici della stessa molecola (legami intramolecolari), sia tra gruppi funzionali di altre molecole (legami intermolecolari).

Nel caso di legami ad idrogeno intermolecolari, quello che accade è l'aggregamento di due o più molecole dendrimeriche. Questo fenomeno genera lunghe catene di dendrimeri dette fibrille, le cui soluzioni assumono macroscopicamente l'aspetto di gel [3]. I gel dendrimerici ad una certa temperatura (o meglio in un intervallo di temperature) subiscono una transizione di fase, si rompono i legami ad idrogeno e

le fibrille si scindono in dendrimeri liberi; questo processo non è sempre reversibile.

Molto comuni sono i composti dendrimerici costruiti usando amminoacidi come monomeri, alcuni dei quali, ad esempio l'acido glutammico e la lisina, avendo più di un gruppo amminico o più di un gruppo carbossilico, sono in grado di legare, tramite legami ammidici, più molecole contemporaneamente. Questo fa sì che alcuni dendrimeri vengano studiati dal punto di vista conformazionale per fare meglio luce sul tema del folding delle proteine [4].

Il dendrimero studiato in questa tesi, un trimero dell'acido glutammico, è troppo piccolo per essere considerato come un frammento significativo di una proteina; il nostro lavoro è comunque finalizzato allo studio conformazionale di questa molecola. Questo compito è stato affrontato utilizzando comuni tecniche di indagine spettroscopica NMR sia monodimensionali che bidimensionali, integrandole anche con alcuni spettri all'infrarosso che come vedremo sono stati cruciali per il fine del lavoro.

I risultati verranno presentati grossomodo nell'ordine in cui sono stati registrati; i parametri sperimentali di ogni esperimento sono riportati in un capitolo a parte. In fine verrà formulata un'ipotesi conformazionale compatibile con i dati raccolti.

1. La letteratura

Facciamo ora una piccola panoramica sulla letteratura essenziale che riguarda studi strutturali e conformazionali di dendrimeri e molecole affini svolti mediante tecniche spettroscopiche.

Gli aggregati dendrimerici sono molecole oligomeriche sintetizzate a partire da monomeri aventi la capacità di legarsi tra loro in più punti della molecola. Si parte dal "nucleo" a cui si legano vari monomeri (il numero dipende da quanti punti di attacco sono presenti), che possono essere della stessa specie chimica del "nucleo" o di una diversa [1a]. Il monomero centrale è detto "core", ogni ciclo di reazione produce una nuova "generazione" di dendrimero: con il primo ciclo si produce un dendrimero di seconda generazione (G2), con il secondo ciclo un dendrimero di terza (G3), e così via.

Fra i legami più comunemente usati per "costruire" i dendrimeri troviamo quelli ammidici tra un gruppo carbossilico e uno amminico.

Già nei dendrimeri di seconda generazione i gruppi ammidici possono essere parecchi (3-6): gli idrogeni legati all'azoto tendono a legarsi agli ossigeni dei gruppi carbonilici, formando legami ad idrogeno intermolecolari o intramolecolari.

I segmenti dendrimerici pur essendo chimicamente uguali tra loro, dal punto di vista della spettroscopia NMR tendono a distinguersi in definiti sottospettri a causa del diverso intorno chimico prodotto dalle diverse condizioni conformazionali. Questo rende la tecnica NMR potenzialmente molto promettente per l'indagine conformazionale. Inoltre per quanto riguarda gli idrogeni ammidici coinvolti o meno in legami ad idrogeno, essi sono facilmente distinguibili dal chemical shift. Nelle parti degli articoli di letteratura dedicate all'interpretazione degli spettri NMR, in particolare all'analisi dei segnali degli idrogeni ammidici, si ricorre spesso al confronto con studi di molecole non dendrimeriche pressoché lineari di varia lunghezza e di solito aventi due o più siti capaci di legarsi ad idrogeno tra loro. Sono riportati studi di molecole di lunghezza variabile da 1 a 6 unità, nelle quali i siti leganti (ammidici e/o

carbossilici), alle estremità, possono dare legami intramolecolari (formando cicli da 6 a 11 termini) e intermolecolari [5,6]. Nei lavori in cui si vuole studiare in particolare la formazione di legami intramolecolari, l'indagine è condotta analizzando spettri IR e NMR di soluzioni poco concentrate per evitare l'insorgere di legami intermolecolari.

Proprio la spettroscopia IR permette di distinguere legami inter e intramolecolari dall'analisi di soluzioni di diversa concentrazione e, da misure di assorbanza si può calcolare il rapporto tra la forma legata e la forma aperta [5].

L'analisi di questi rapporti calcolati per diverse molecole e per diverse temperature porta a stabilire che:

- per le diammidi oltre al ciclo a 6 termini che è stabile in un intervallo ampio di temperature, si formano solo cicli a 9 termini, prevalentemente presenti a basse temperature [5];

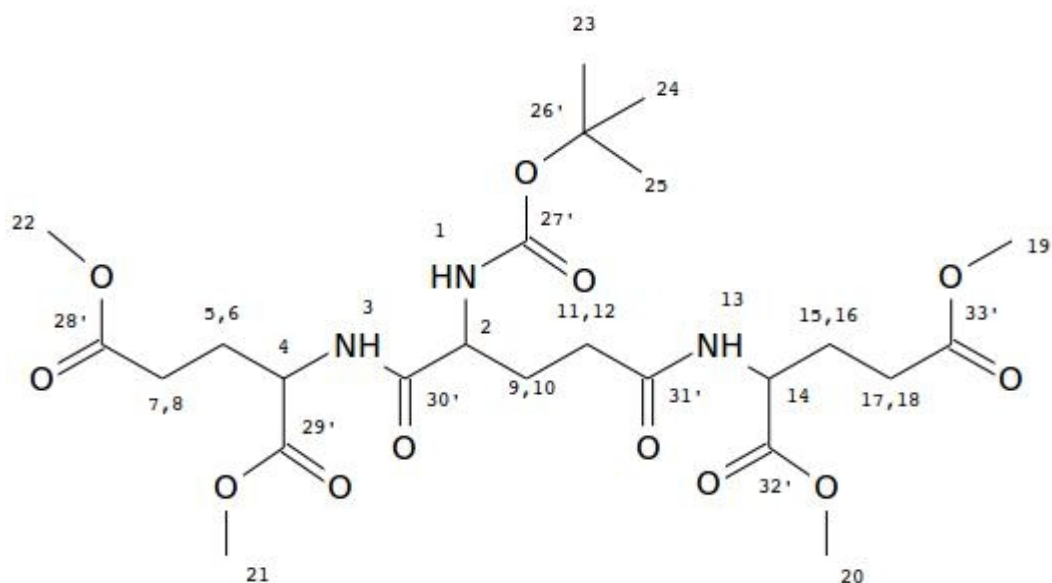
- per cicli ammidoesterici è favorevole solo l'anello a 6 termini [5];

- per molecole aventi gruppi ammidici anche all'interno della catena i cicli favorevoli sono sia a 8 e 9 che a 10 e 11 termini [6].

Tutti i cicli comunque tendono a rompersi a temperature relativamente alte (330K), questo comportamento è stato interpretato con un aumento della componente entropica dell'energia libera favorevole alla forma aperta [5].

2. La molecola studiata e i primi spettri NMR

La molecola in questione è un dendrimero di seconda generazione dell'acido L-glutammico, che chiameremo **Boc-G2** (dove Boc sta per il gruppo protettore *terz*butossido carbonile e G2 sta per dendrimero di seconda generazione).



Questo composto è stato sintetizzato nel laboratorio della Professoressa Menicagli, che ce ne ha gentilmente fornito un campione, partendo da acido L-glutammico enantiomericamente puro e usando una procedura che garantisce la ritenzione di configurazione.

Per chiarezza di esposizione abbiamo numerato tutti i protoni (attribuendo un solo numero ad ogni gruppo metilico) e ci riferiremo ai carboni ad essi legati con i medesimi numeri (il primo dei due numeri nel caso di metileni); inoltre gli atomi di carbonio che non sono legati a nessun protone sono numerati con numeri aggiuntivi apostrofati.

Spettro ^1H NMR

Per avere un'idea generale sul composto in questione il primo esperimento che abbiamo effettuato è stato uno spettro NMR del protone.

Il dendrimero è stato sciolto in CDCl_3 con una concentrazione iniziale

circa 75mM. La concentrazione è stata scelta in modo da permetterci di registrare i primi spettri in modo veloce e senza troppi problemi. Il dendrimero ha una buona solubilità in molti dei solventi comuni, infatti la soluzione in cloroformio deuterato è limpida e facile da preparare.

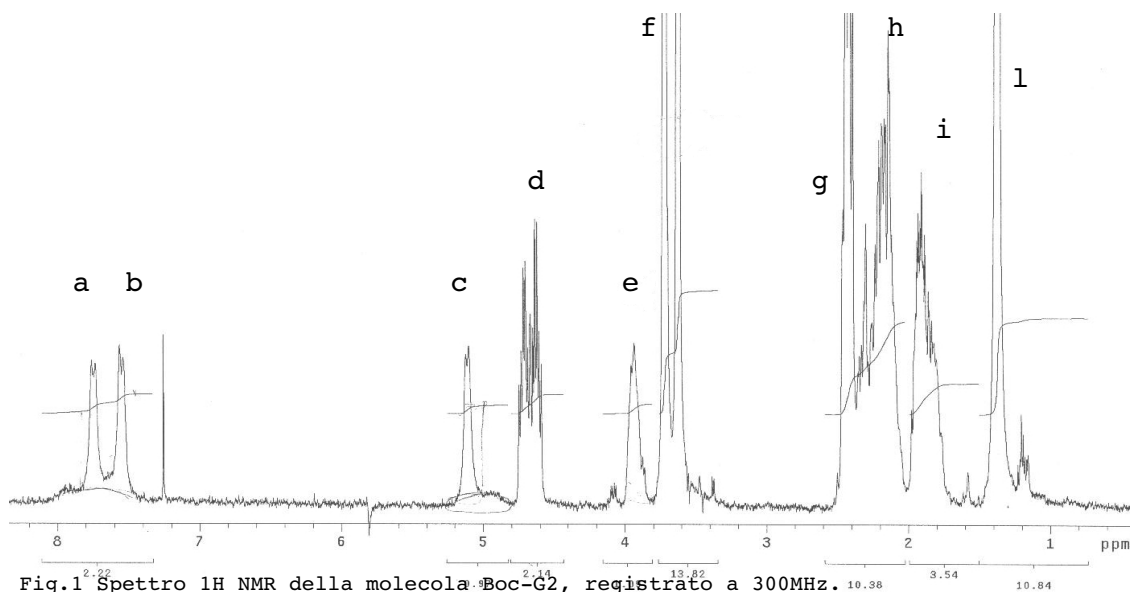


Fig.1 Spettro 1H NMR della molecola Boc-G2, registrato a 300MHz.

Lo spettro reale rispetta abbastanza le aspettative. Riportiamo qui una tabella con i chemical shift sperimentali e l'assegnazione dei vari gruppi di segnali.

Picco	C.S. (ppm)	Protone n	Aspetto	Picco	C.S. (ppm)	Protone n	Aspetto
a	7.75	3 o 13	doppietto	b	7.45	3 o 13	doppietto
c	5.17	1	doppietto	d	4.65 e 4.7	4 e 14	multipletti
e	3.90	2	mult. poco risolto	f	3.6 3.7	19, 20, 21, 22	singoletti
g	2.4	7,8; 11,12; 17,18	multipletti	h	2.2	5,6; 9,10; 15,16	multipletti
i	1.85	5,6; 9,10; 15,16	multipletti	l	1.4	23, 24, 25	singoletto

La giustificazione di questa assegnazione non può essere rigorosa ma si possono comunque fare delle prime ipotesi abbastanza realistiche, anche perché il nostro spettro è sufficientemente risolto.

L'assegnazione non è definitiva, è una prima ipotesi che andrà man mano confermata o cambiata tramite altre prove.

-Il singoletto pronunciato "l" a 1.4ppm, che integra per 9, appartiene ai metili del boc (del *terz-butile*) ed è l'unico ad essere nei campi degli alifatici;

-Il grosso gruppo di multipletti (tre sembrerebbe: g, h, i) centrato a 2.1ppm è stato in prima istanza attribuito ai metileni. Integrano per circa 12 unità e possiamo distinguerli tra quelli che accoppiano sia con il metino che con il metilene vicinale e quelli che possono solo accoppiare con il metilene. I due gruppi dovrebbero avere c.s. ben differenziati (minore il primo e maggiore il secondo) in quanto sono in intorni chimici differenti. Inoltre i carboni metinici sono centri chirali, quindi ci aspettiamo che i protoni metilenici più vicini abbiano c.s. e costante di accoppiamento con il protone metinico differenti e manifestino un accoppiamento geminale. Ciò spiega l'assegnazione proposta nella tabella per i gruppi "g" e "h-i";

-Il gruppo di due segnali centrato a 3.7ppm "f" è senza dubbio quello generato dai metili dei gruppi funzionali esterei, anch'esso integra per circa 12 unità e denota una leggera ma non trascurabile differenza di intorni chimici tra le due coppie di metili;

-Il segnale slargato a 3.9ppm "e", integrante per una unità, è il primo strano caso di questo spettro. In prima istanza è attribuito al metino centrale 2, che potrebbe essere spostato rispetto agli altri (4 e 14) visto che si trova in un diverso intorno chimico, ma una differenza così marcata (circa 0.8ppm) potrebbe anche essere dovuta a un riarrangiamento conformazionale che porta il protone "e" in una zona più schermata;

-Il segnale successivo "d" difatti integra per due, è costituito distintamente da due multipletti, in parte sovrapposti, cosa che permette di attribuirli ai due metini rimasti;

-Il segnale a 5.1ppm "c", un doppietto poco risolto, può essere attribuito solo ad un protone ammidico, così come gli ultimi due a 7.7 e 7.45ppm, "a" e "b", identici nell'aspetto. Chiaramente uno degli idrogeni ammidici si trova in un intorno chimico radicalmente diverso dagli altri due. Si potrebbero considerare varie ipotesi tra cui la possibilità di un equilibrio chetoenolico, ma questa opzione è stata scartata in quanto è noto dalla letteratura [5] che i protoni ammidici risuonano intorno a 7ppm quando sono impegnati in un legame ad idrogeno, e sotto 6ppm quando sono liberi.

Dello spettro ^1H è stata fatta una simulazione utilizzando il programma Chem Drawn. Lo spettro simulato rispecchia a grandi linee lo spettro sperimentale; si nota che gli idrogeni ammidici (dati come molto incerti) sono previsti tutti a 8ppm.

Spettro ^{13}C NMR

Successivamente è stato registrato uno spettro del ^{13}C disaccoppiato dal protone, senza sfruttare l'effetto NOE. Per alzare lo scarso rapporto segnale/rumore dovuto alla bassa intensità della risonanza del C abbiamo effettuato 2000 scansioni.

Riportiamo tre ingrandimenti dello spettro del ^{13}C :

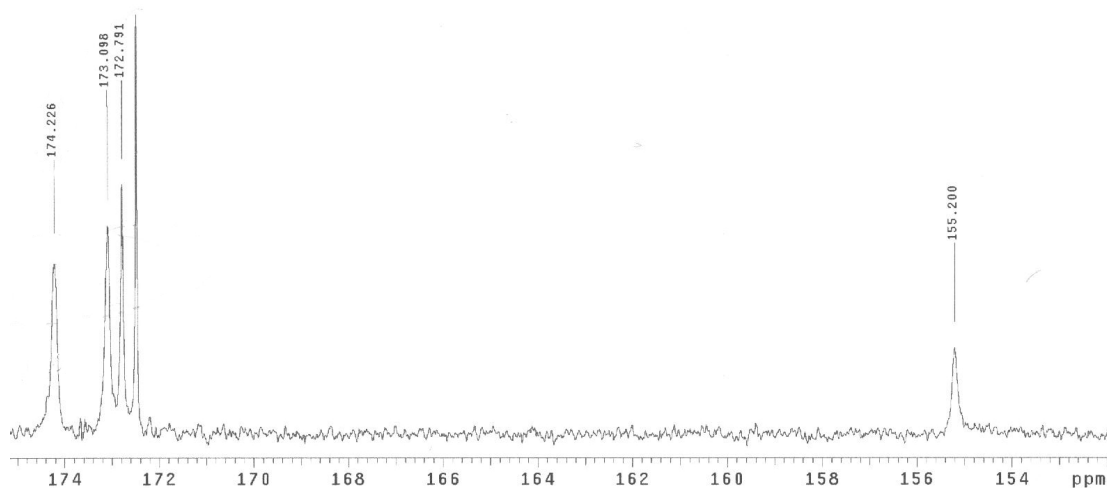


Fig.2 spettro ^{13}C , ingrandimento da 152 a 175ppm, sezione dei carbonili.

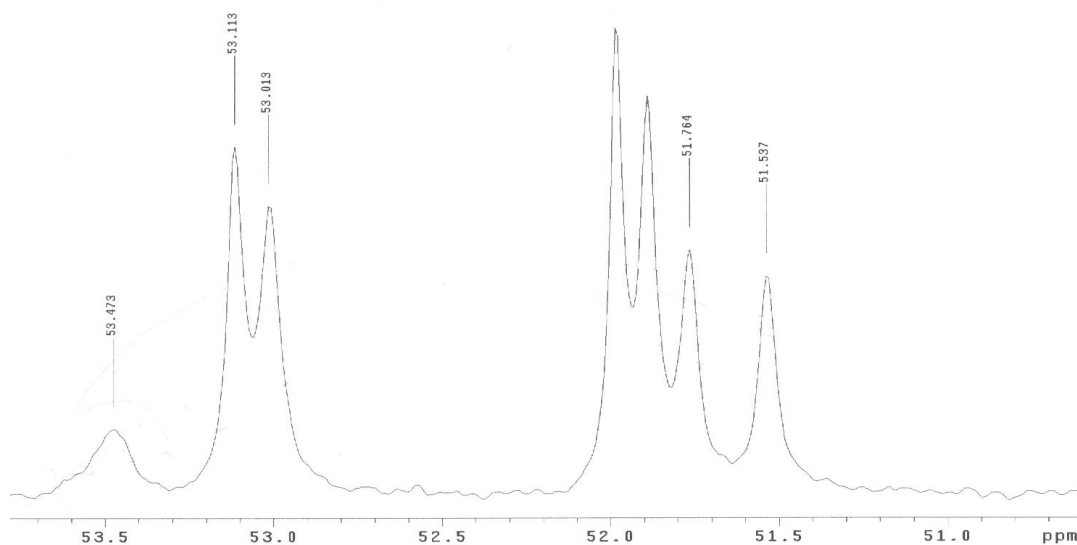


Fig.3 Spettro ^{13}C , ingrandimento zona metinica e metilica da 50.5 a 54ppm.

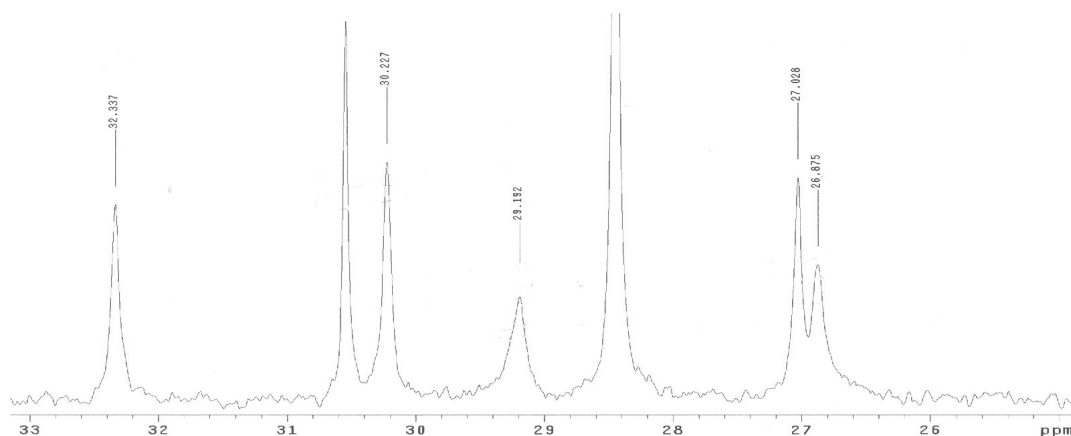


Fig.4 Spettro ¹³C, sezione dei metili (Boc) e metileni da 25 a 33ppm.

Negli ingrandimenti non abbiamo riportato il gruppo di segnali del solvente che comprende anche un segnale a 80ppm.

Qui di seguito riportiamo una tabella con i relativi chemical shift:

c.s. (ppm)	Carbonio	c.s. (ppm)	Carbonio	c.s. (ppm)	Carbonio
26.9	5 o 15	51.9	19, 20, 21, 22	80	26'
27	5 o 15	52.0		155	27'
28.5	23, 24, 25	53.0		172.5	28', 29',
29.2	9	53.1		172.7	30', 31',
30.5	7 o 17	51.5	2, 4, 14	173	32', 33'
30.2	7 o 17	51.8		174.5	
32.3	11	53.5			

I carboni della nostra molecola si vedono bene quasi tutti.

Come si può facilmente prevedere abbiamo i carboni carbonilici tutti a campi alti. Dato che nella molecola ci sono 7 gruppi carbonilici e nello spettro sono attribuibili a carbonili solo 5 picchi i due rimanenti devono essere sovrapposti. Tra questi il picco un po' anomalo è quello assegnato al 27' che cade molto più in basso degli altri. Questo spostamento è caratteristico del carbonio carbonilico appartenente ad un carbammato, come confermato dallo spettro simulato con il programma Chem Drawn.

Nella zona spettrale tra 51 e 54ppm compaiono i segnali dei 4 carboni

metossilici e dei 3 metinici. I carboni metossilici sono stati assegnati ai quattro picchi più intensi, che si raggruppano in due coppie come già osservato per i corrispondenti segnali del protone.

Tra i segnali dei carboni metinici si distingue quello a 53.5ppm che appare molto largo, ed è stato assegnato al carbonio 2: questo sicuramente si differenzia dagli altri per l'intorno chimico e anche per una ridotta mobilità del frammento molecolare, che può essere la causa dell'allargamento del segnale.

Rimangono i carboni metilici del gruppo Boc e i metilenici. I metilici sono inconfondibili, producono un segnale singolo, intenso e stretto, a campi relativamente bassi (28.5ppm). I metileni producono sei segnali differenti, quattro si presentano a coppie a circa 27 e 30 ppm. Questi 4 segnali sono probabilmente da riferirsi ai metileni delle catene periferiche, i più schermati ai carboni metilenici vicino ai metini e quelli meno schermati ai carboni vicini ai carbonili. Rimangono due segnali ben distinti e isolati che corrispondono ai metileni della catena principale entrambi spostati più a campi alti, rispetto ai loro simili. Il più "alto" sarà ovviamente quello più vicino al carbonile e il più "basso" al metino. Si nota poi che anche questi segnali sono più larghi dei loro simili, segno nuovamente di una maggiore rigidità del sistema nella parte centrale.

3. Sezione sperimentale

Tutti gli esperimenti NMR sono stati effettuati con uno spettrometro Varian VXR300.

Riportiamo schematicamente i parametri utilizzati in ogni esperimento dando, quando necessario, dei chiarimenti. La maggior parte degli spettri sono stati registrati usando una soluzione circa 75mM in CDCl₃ e a temperatura di 25.0°C. I parametri elencati sono stati utilizzati anche in casi diversi, adeguando se necessario il numero di transienti.

¹ H:	DEPT:	T ₁	¹ H(inversion recovery):
at: 3.744 s	at: 1.500 s	at: 1.500 s	
np: 29952	np: 9014	np: 29998	
pw: 7.0 μs	pw: 22.0 μs(90°)	tpwr: 55	
d1: 0.5 s	tpwr: 55	pw: 18.5 μs(90°)	
nt: 4	pp: 26.0 μs	p1: 37.0 μs(180°)	
	pplvl: 49	d1: 4.000 s	
¹³ C:	tof: -4471.3 Hz	d2(s): 0.005, 1.5,	
at: 1.815 s	nt: 256	0.1, 0.2, 0.3, 0.4,	
np: 59904	j: 130.00 Hz	0.05, 0.5, 0.6, 0.8,	
tpwr: 55	mult: 0.5, 1, 1,	1, 2, 4	
	1.5		
pw: 12.0 μs	disacc. (DEPT):	nt: 100	
d1: 2.0 s	dof: -155.0 Hz		
nt: 2000	dm: nny		
disaccoppiamento:	dmm: ccw		
dm: nny	dmf: 11600 Hz		
dmm: w	dpwr: 40		
dmf: 11600 Hz			
dpwr: 40			
Disaccop. selettivo ¹ H:	COSY:	NOESY:	
at: 1.500 s	at: 2.000 s	at: 0.398 s	
np: 12000	np: 11200	np: 2228	
tpwr: 55	tpwr: 55	tpwr: 55	
pw: 14 μs	pw: 19.5 μs(90°)	pw: 19.5 μs(90°)	
d1: 2.000 s	p1: 19.5 μs(90°)	d1: 1.000 s	
nt: 4	d1: 1.500 s	mix: 0.300 s	
dof(Hz):1254.2,1196.	tof: 200.0 Hz	tof: 200.0 Hz	
3,451.4,347.5,322.6,	nt: 64	nt: 160	
112.5,-341.5,-420.3,	2D ACQUISITION:	2D ACQUISITION:	
-491.8, -655	sw1: 2799.9 Hz	sw1: 2799.9 Hz	
dm: y	ni: 200	ni: 100	
dmm: c	fn: 1024	phase: 1, 2	
dpwr: 15	fn1: 1024	fn: 1024	

HETCOR:

at: 0.500 s
np: 3004
tpwr: 55
pw: 22.0 μ s(90°)
pp: 26.0 μ s
pplvl: 49
d1: 0.500 s
tof: -4471.3 Hz
nt: 400

disaccoppiamento: 2D ACQUISITION (HET.):

dof: 277.1 Hz	sw1: 2709.5 Hz
dm: nny	ni: 128
dmm: ccw	fn:1024
dmf: 11600 Hz	j1xh: 140.0 Hz
dpwr: 40	jnxh: 0

In molti esperimenti la corretta valutazione del parametro "pw (90°)" è determinante. Perciò tale parametro è stato calibrato sia per il ^1H che per il ^{13}C , più volte, con un esperimento eseguito appositamente: abbiamo registrato diversi spettri con pw variabili e abbiamo quindi selezionato il valore che annullava i segnali, corrispondente all'impulso a 180°. A questo punto abbiamo verificato l'andamento sinusoidale delle intensità. Nei vari esperimenti il parametro pw 90° può comparire con valori lievemente diversi, questo è dovuto a effetti legati ad un problema di sintonia.

Gli spettri IR sono stati registrati utilizzando uno spettrometro Avatar 360 FT-IR. Per le soluzioni concentrate (75 e 25mM) gli spettri sono stati effettuati con 32 transienti, per la soluzione diluita (1mM) invece abbiamo usato 2000 repliche.

Abbiamo utilizzato una cassetta di cloruro di sodio con un cammino ottico interno di 1,1mm (misurato spettroscopicamente mediante le interferenze costruttive e distruttive del raggio incidente doppiamente riflesso dalle pareti della cella).

4. Esperimenti non routinari

DEPT.

In questo capitolo presentiamo i primi esperimenti fuori routine che abbiamo effettuato sul campione tal quale, arrivando già con essi ad importanti considerazioni.

La tecnica DEPT (Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer) permette di amplificare il segnale del ^{13}C differenziando anche i metili, metileni e metini (i ^{13}C quaternari non vengono visualizzati) utilizzando un trasferimento di polarizzazione dai protoni a essi legati. Con questa tecnica i carboni interessati rilassano molto più velocemente (con tempi caratteristici dell'ordine di quelli dei protoni) e subiscono un effetto di amplificazione notevole (da 3 a 5 volte) [7].

La ragione prevalente per cui si applica questa tecnica è possibilità di identificare i diversi tipi di carboni. Questo è permesso tramite la registrazione di più spettri e la loro opportuna combinazione.

La tecnica DEPT, dopo aver operato il trasferimento di polarizzazione rifocalizza le componenti della magnetizzazione; questa operazione è diversa per ogni tipo di carbonio.

Infatti il meccanismo della rifocalizzazione comprende degli intervalli tra un impulso e l'altro la cui ampiezza dipende dal tipo di multipletto. I rapporti ottimali tra gli intervalli sono 0.5:1:1.5 per il doppietto, il tripletto e il quartetto, vale a dire per carboni terziario, secondari e primario. In questo modo si registrano degli spettri con picchi di intensità variabile in funzione del tipo di carbonio. Operando delle opportune sottrazioni tra gli spettri si riescono a produrre degli spettri-sottrazione che mostrano picchi solo di un determinato gruppo di carboni.

Inoltre tutti gli intervalli sono inversamente proporzionali alla costante di accoppiamento eteronucleare $^1J_{\text{CH}}$, questa quindi diventa un parametro molto importante nella messa appunto di uno spettro DEPT. Se possibile si sceglie un giusto compromesso tra tutte le costanti presenti nel sistema. La costante che abbiamo scelto è stata 130Hz, dopo alcuni esperimenti meno riusciti che prendevano valori ad essa vicini.

Gli spettri sono stati registrati in un range più stretto di frequenze (per quanto riguarda il carbonio), i carboni carbonilici non sono in dubbio e comunque non possono essere messi in evidenza con la tecnica DEPT essendo quaternari.

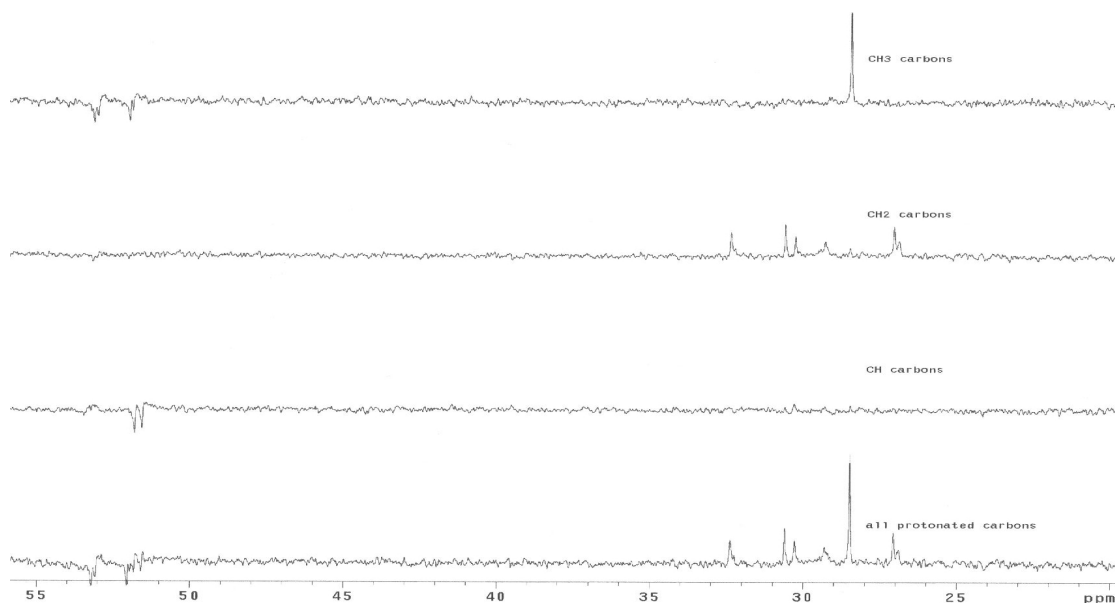


Fig.5 DEPT totale sottrazione, partendo dal basso sono rappresentati: lo spettro ¹³C totale, i carboni metinici, i carboni metilenici, i carboni metilici.

Dalla sottrazione degli spettri, in particolar modo dall'ingrandimento, si nota che l'assegnazione precedentemente fatta riguardo i CH e CH₃ dei metossili è corretta, i picchi corrispondenti ai CH sono quelli a 51.8, 51.5 e 53.5ppm. Quest'ultimo slargato, è messo in evidenza solo nel secondo spettro dal basso.

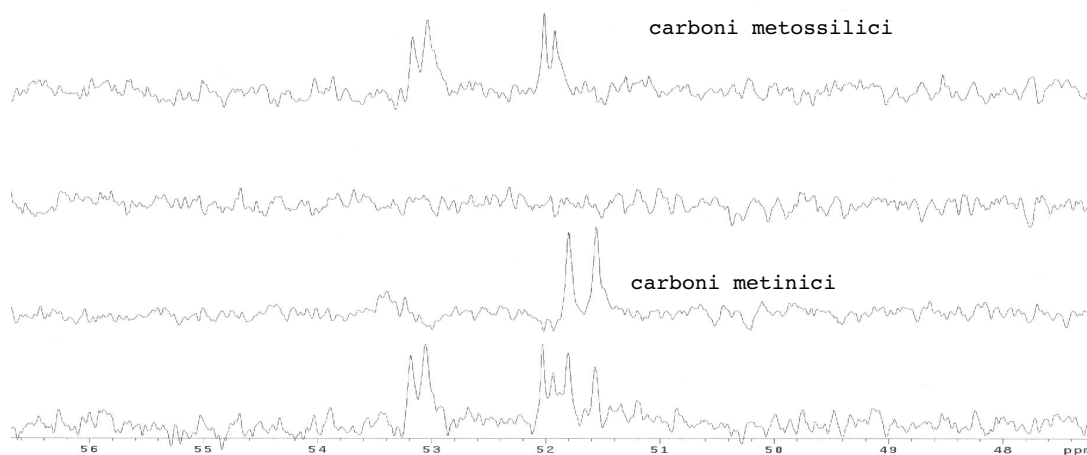


Fig.6 DEPT sottrazione. Particolare della zone dei metini e metossili.

Dalle sottrazioni si nota bene che la regione dei CH₂ è identica all'originale a meno del picco dei metili del Boc.

Misura dei T₁ dei nuclei ¹H

Introducendo la prossima tecnica d'indagine, apriamo una piccola parentesi sui due tipi fondamentali di rilassamento dei nuclei [7,8].

Dopo un singolo impulso a 90° la magnetizzazione giace sul piano xy, dall'istante successivo i nuclei inizieranno a ruotare intorno all'asse z, producendo il segnale che misuriamo, il FID. Ogni nucleo però avrà una frequenza leggermente diverse da quella di Larmor. Le varie componenti nel piano xy della magnetizzazione subiscono una perdita di intensità dovuta al rilassamento spin-spin, ovvero al mutuo scambio di spin tra due nuclei che porta alla perdita di fase nel loro moto di precessione. La costante cinetica di questo processo di rilassamento è detta T₂, o costante di rilassamento spin-spin.

L'altro tipo di rilassamento, di cui ci occuperemo in particolare, è quello che ricostruisce la magnetizzazione lungo l'asse z fino alla posizione di equilibrio.

È un processo condizionato dalla mobilità microscopica del sistema in esame in quanto è indotto da fluttuazioni del campo magnetico locale che sono appunto prodotte da movimenti dell'intorno chimico del nucleo in questione (il cosiddetto "reticolo"). La costante cinetica di questo processo è detta T₁, o costante di rilassamento di spin-reticolo.

La teoria al riguardo fornisce una funzione di questa grandezza rispetto alla variabile legata alla mobilità della molecola. Il parametro che tiene conto del "tumbling" della molecola è detto "correlation time" (τ_c) e, nel caso di un rotolamento isotropo, esso corrisponde all'incirca al tempo che occorre alla molecola per ruotare di un radiante intorno ad un asse qualsiasi.

La formula che lega il tempo di rilassamento spin-reticolo, dovuto ad interazioni dipolari, al correlation time è la seguente:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{20} \left(\hbar^2 \frac{\gamma_N^4}{r^6} \right) \left(\frac{2\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{8\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right)$$

dove γ_N è il rapporto giromagnetico del nucleo, ω_0 è la frequenza di Larmor ed r è la distanza tra il nucleo considerato e un altro interagente dipolarmente con esso [8]. La relazione non è semplice, ma può essere discussa facilmente nei due casi limite:

- i) quando il prodotto $\tau_c\omega_0$ è molto minore di 1, il T_1 diventa inversamente proporzionale al correlation time τ_c ;
- ii) quando invece $\tau_c\omega_0$ è molto maggiore di 1 addirittura T_1 diventa proporzionale a τ_c .

Il valore soglia del prodotto $\tau_c\omega_0$ che scinde i due casi è preso uguale a 1, in pratica si possono fare considerazioni solo quando si è abbastanza lontani da questo valore.

Misurando quindi i T_1 dei vari nuclei di una molecola, dopo adeguati ragionamenti sulla validità dell'uno o dell'altro caso limite, si dovrebbe capire quali sono i nuclei più mobili e quali meno, e questo ai fini conformazionali è molto utile.

La sequenza di impulsi che abbiamo usato per la misura di T_1 è nota come "inversion recovery" [7]. Essa inizialmente inverte la magnetizzazione portandola lungo $-z$ (impulso 180° lungo x), attende un tempo d_2 variabile (intanto la magnetizzazione rilassa), infine la porta sul piano xy (impulso 90° lungo x) dove viene "misurata" (intensità del segnale). Collezionando una buona serie di spettri con diverso tempo d_2 si riescono ad ottenere tutti i tempi T_1 dei nuclei della molecola.

Di seguito portiamo come esempio la sezione da 4 a 8ppm della serie di spettri registrata:

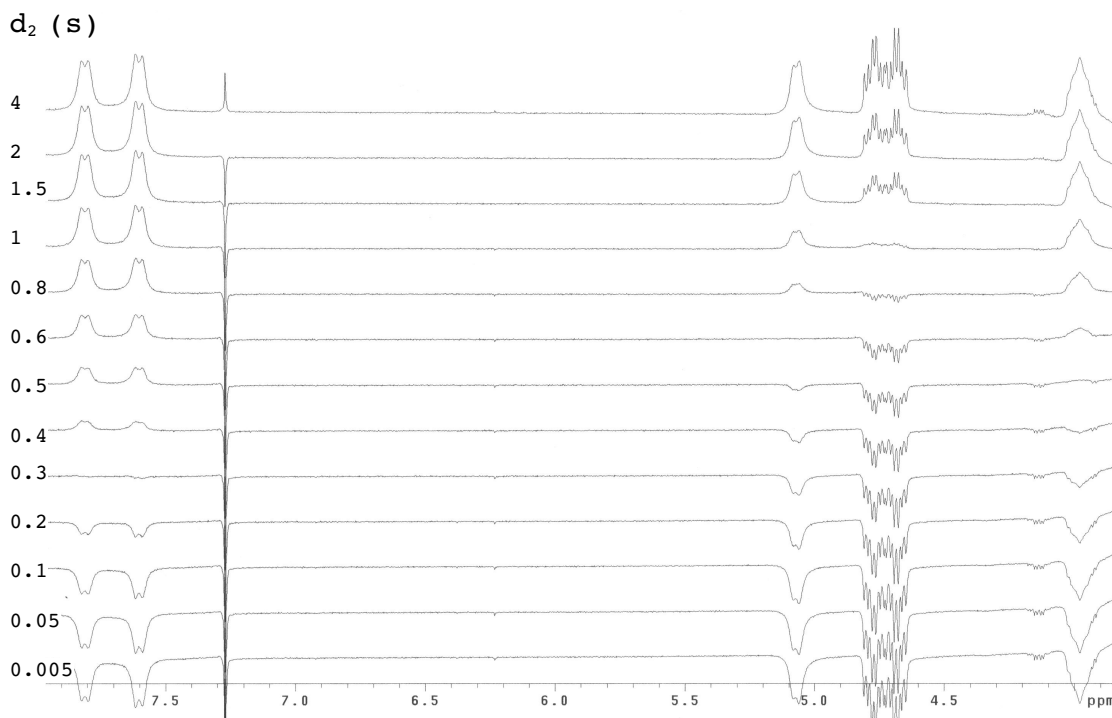


Fig.7 Sezione dei protoni ammidici e metinici nell'esperimento di inversion recovery.

Per i motivi detti in precedenza, prima di interpretare questi spettri ci accertiamo di essere nell'intervallo di linearità in cui il T_1 è inversamente proporzionale al correlation time. Il correlation time per il moto di "tumbling" isotropo molecolare può essere valutato con la seguente formula:

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta a^3}{3kT}$$

dove η è la viscosità del solvente, a rappresenta il "raggio" molecolare e T la temperatura [8].

La viscosità del solvente è tabulata e a 25°C vale 0.542 cp (centipoise), che equivalgono a $5.42 \cdot 10^{-4} \text{ Kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Il raggio molecolare è stato valutato intorno a 6.5Å.

Facendo il calcolo, il τ_c risulta circa $1.5 \cdot 10^{-10} \text{ s}^{-1}$. Moltiplicando il τ_c per la frequenza di Larmor del protone (300MHz) si ottiene un valore di $4.5 \cdot 10^{-2}$ che possiamo assumere come "molto minore di 1".

Ora possiamo dire qualcosa sui tempi di rilassamento. Elenchiamo di seguito in ordine crescente di T_1 i nuclei principali:

- i protoni ammidici "a-b" e il gruppo "h-i" dei metileni, $T_1=0.43$ s;
- i protoni metilici del Boc, $T_1=0.59$ s;
- i protoni del gruppo "g", $T_1=0.68$ s;
- il protone "e", $T_1=0.72$ s;
- il protone ammidico non legato, $T_1=0.87$ s;
- i protoni metossilici "f" in due tempi differenti, $T_1=0.88$ s e $T_1=1.44$ s rispettivamente per il gruppo a campi più alti e più bassi;
- i protoni metinici "d" che rilassano insieme, $T_1=1.41$ s.

La valutazione dei T_1 è stata effettuata considerando che l'intensità del segnale in uno spettro è proporzionale alla magnetizzazione portata nel piano xy dall'impulso a 90° . A sua volta la magnetizzazione dipende dall'intervallo di tempo d_2 secondo la formula:

$$M(d_2) = M_0 \left(1 - 2 e^{-d_2/T_1} \right)$$

Una valutazione rapida di T_1 è possibile individuando nella serie di spettri quello in cui il segnale si annulla [7]. Questa condizione si verifica quando $d_2 = T_1 \cdot \ln 2$.

Da questi risultati possiamo fare un paio di considerazioni:

- i) gli ammidici "a" e "b" rilassano pressappoco insieme e prima di tutti, sono quindi quelli che hanno il correlation time più lungo, dato in accordo con l'ipotesi di un legame ad idrogeno piuttosto stabile;
- ii) il protone metinico "e" ha, rispetto ai suoi simili, un correlation time più lungo, questo è un indizio che lo lega al carbonio metinico che si presenta con un segnale slargato (a 53.5ppm).

Disaccoppiamento selettivo.

Pian piano stiamo cercando di affinare le nostre prove per assegnare con sicurezza ogni segnale al proprio nucleo, per poi concentrarci su un particolare gruppo critico ai fini conformazionali.

Un passo importante in questa direzione sarebbe individuare gli atomi vicini, o per il momento quelli vicini nella catena di carbonio.

In spettri molto semplici, cioè con picchi stretti e ben definiti,

questa operazione si può tentare analizzando le costanti di accoppiamento, se presenti. La costante J è dovuta all'accoppiamento di due nuclei vicini nella catena di legami (due, tre legami, di più è raro incontrarne), per questo denota una "vicinanza elettronica". Perciò in spettri in cui queste costanti sono facilmente misurabili basta confrontarle, due a due, per individuare quali nuclei accoppiano e quindi sono vicini elettronicamente. Inoltre lo studio delle costanti di accoppiamento è utile a scopi conformazionali tramite la ben nota regola di Karplus.

Nel nostro spettro ^1H è difficile mettere in pratica questo metodo per la complessità spettrale.

Uno strumento utile per ovviare a questo problema è il disaccoppiamento selettivo.

Questa tecnica permette di eliminare tutti gli accoppiamenti dovuti a un determinato nucleo, irraggiando intensamente e selettivamente un piccolo range di frequenze centrato sul baricentro dell'assorbimento del nucleo selezionato, durante l'acquisizione dello spettro.

In pratica si registrano vari spettri irraggiando uno alla volta i diversi gruppi. Per praticità non riportiamo tutti gli spettri effettuati ma solo alcuni esempi più rappresentativi:

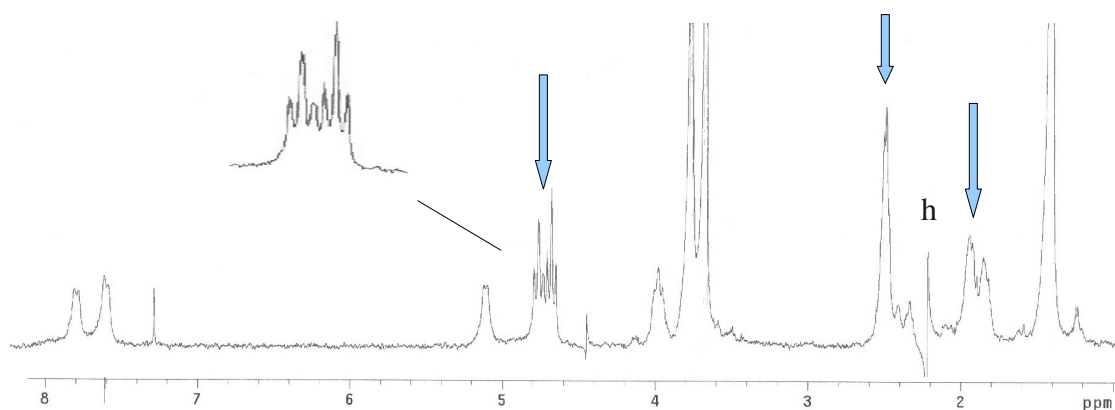


Fig.8 Spettro del protone con irraggiamento selettivo del gruppo "h";

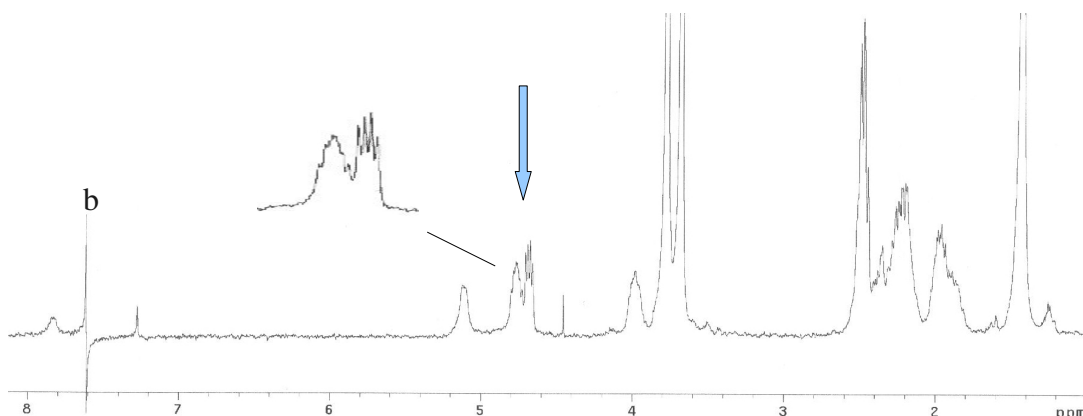


Fig.9 Spettro del protone con irraggiamento selettivo del protone "b".

Nell'esempio abbiamo riportato due degli spettri con disaccoppiamento selettivo più significativi. Nel primo si nota bene la relazione del gruppo "h" con i protoni metinici "d", inoltre si notano gli ovvi accoppiamenti con i protoni dei gruppi "g" e "i" visto che si tratta sempre di protoni metilenici che sono tra loro vicini (c'è anche la possibilità che queste ultime alterazioni siano in parte dovute all'irraggiamento selettivo così vicino). Una leggera influenza si ha anche sul protone metinico "e", questo è spiegato dal fatto che il gruppo irradiato comprende segnali di tutti i protoni metilenici che sono nelle vicinanze di tutti i protoni metinici. Non si nota invece nessun notevole cambiamento nei protoni ammidici, escludendo qualsiasi accoppiamento.

Il secondo spettro è leggermente più interessante in quanto permette di apprezzare le capacità di questa tecnica. Si irraggia selettivamente il protone ammidico "b" e si notano dei cambiamenti notevoli a livello dei protoni "d", ma solo uno dei due multipletti ravvicinati risulta semplificato. L'iniziale tripletto sdoppiato si trasforma in un doppietto sdoppiato: ciò mette in evidenza che gli accoppiamenti fra il protone metinico e i due metilenici vicini sono diversi (con J di 4.5Hz e 9.3Hz). Quindi il tripletto sdoppiato iniziale è dovuto al fatto che, casualmente, anche la J fra il protone ammidico e il metinico è di 9.3Hz. Osservazioni del tutto analoghe si possono applicare all'altro multipletto "d" quando si irradia il segnale "a".

Mappe di correlazione.

Finora abbiamo trattato esperimenti di NMR cosiddetti monodimensionali, questo perché si riferiscono ad una sola dimensione delle frequenze. In questo capitolo parleremo invece degli esperimenti effettuati in due dimensioni e più precisamente delle mappe di correlazione COSY, NOESY ed HETCOR [7].

Le mappe bidimensionali sono chiamate tali in quanto gli spettri vengono rappresentati in un piano cartesiano con due domini di frequenze come coordinate. Nelle mappe COSY e NOESY lo spettro monodimensionale viene rappresentato sulla diagonale di un quadrato dove l'intensità dei segnali è indicata tramite una gradazione di colore o curve di livello. I picchi fuori diagonale sono detti "picchi di correlazione" e costituiscono il punto di forza di queste tecniche. Alla base delle tecniche bidimensionali si trova una comune sequenza di impulsi, rappresentata qui di seguito:

$$\left(\frac{\pi}{2}\right)_x \text{ ————— } t_1 \text{ ————— } \left(\frac{\pi}{2}\right)_x \text{ ——— } \text{acquisiz. } (t_2)$$

La sequenza presentata, particolarmente adatta all'introduzione degli spettri COSY, dopo un impulso a 90° lungo l'asse x, un tempo di attesa t_1 prima di un altro impulso a 90° lungo x. Questo t_1 è detto "tempo di evoluzione", è praticamente il cuore della tecnica bidimensionale. Le frequenze di precessione di due nuclei accoppiati sono sdoppiate, rispetto alle frequenze di base, della stessa quantità, pari alla costante di accoppiamento. Il tempo t_1 funge da selezionatore di frequenze: infatti la magnetizzazione può essere scomposta in varie componenti oscillanti lungo gli assi x e y, e il secondo impulso sposta tutte le componenti che sono sull'asse y sull'asse -z e non ruota quelle sull'asse x che continuano la loro precessione e vengono misurate dal ricevitore. Inoltre il secondo impulso ridistribuisce le componenti della magnetizzazione di ogni nucleo tra quelle degli altri nuclei ad esso accoppiati. I picchi fuori diagonale sono dati solo da quelle componenti della magnetizzazione che subiscono tale ridistribuzione e precedono con una frequenza durante t_1 e con un'altra durante t_2 . In questo modo solo le frequenze che accoppiano

compariranno come picchi di correlazione.

Per la rappresentazione nel dominio bidimensionale delle frequenze si esegue la trasformata di Fourier due volte, la prima è la trasformata classica del FID nel dominio del tempo t_2 che si esegue su ogni singolo spettro, la seconda si applica ai dati riferiti alla seconda variabile tempo t_1 . La mappa prodotta da questa operazione presenta sulla diagonale lo spettro monodimensionale e fuori della diagonale picchi alle intersezioni delle coordinate dei segnali accoppiati.

COSY

Di seguito riportiamo la mappa COSY del nostro campione:

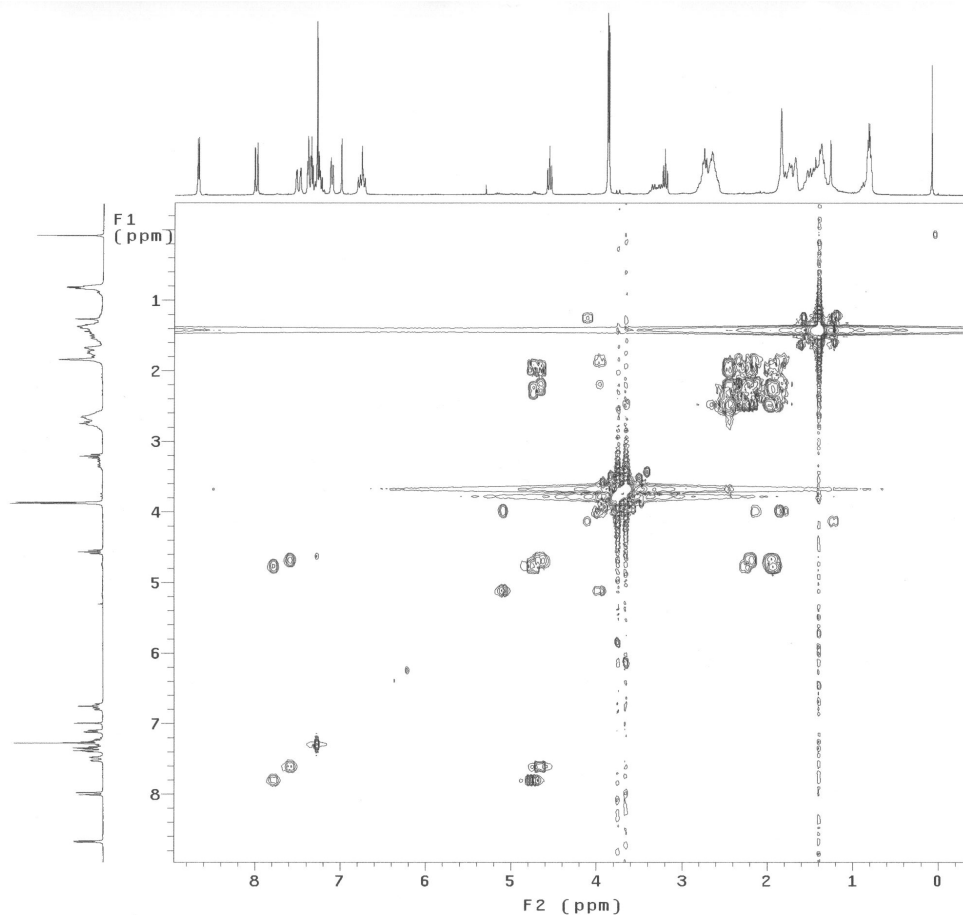


Fig.10 Mappa di correlazione COSY del Boc-G2

Con questo esperimento si vede chiaramente che i protoni ammidici legati ad idrogeno hanno un buon accoppiamento solo con i protoni CH più deschermati, invece il protone ammidico libero accoppia solo con il CH più schermato, d'altronde come si capiva, ma non così

chiaramente, dalle misure di disaccoppiamento omonucleare. Ogni CH accoppia con due gruppi di CH₂, in particolar modo si vede che il CH schermato accoppia con minor intensità dei suoi simili, forse per motivi conformazionali l'accoppiamento è sfavorito.

NOESY

Il secondo esperimento bidimensionale che abbiamo effettuato è stato registrare una mappa NOESY (NOESpettroscopy).

Questa tecnica sfrutta l'effetto NOE per produrre uno spettro bidimensionale [7,8].

L'effetto NOE (Nuclear Overhauser Effect) è un importantissimo strumento di indagine nella spettroscopia NMR, permette infatti di individuare in una molecola i nuclei spazialmente vicini.

Questo fenomeno si produce saturando una determinata banda di assorbimento e si osserva sulle bande correlate tramite un incremento dell'intensità.

Il meccanismo si basa sul modo di rilassare del sistema, il livello saturato infatti tenderà a tornare nello stato di equilibrio attraverso ogni percorso a lui disponibile. Il meccanismo di rilassamento che ci permette di avere l'effetto NOE è l'accoppiamento dipolare, già nominato a proposito del rilassamento spin-reticolo.

L'efficienza di questo tipo di meccanismo non dipende dal tipo di connessione esistente tra i nuclei ma principalmente dalla distanza a cui si trovano e da un insieme di altri fattori ampiamente discussi su testi specifici. La teoria porta a definire una relazione tra efficienza dell'effetto NOE e distanza fra nuclei interagenti inversamente proporzionale alla sesta potenza di quest'ultima. Per questo motivo un qualsiasi effetto NOE ha un'intensità rilevante solo se la distanza tra il nucleo saturato e quello ricevente è molto piccola, indicativamente inferiore ai 4Å. D'altra parte, l'assenza di effetto NOE rilevabile non garantisce la lontananza fra i nuclei in questione.

Una mappa NOESY si presenta come una classica mappa bidimensionale, con lo spettro totale sulla diagonale e con i picchi di correlazione fuori diagonale, prodotti dai vari effetti NOE.

Di seguito riportiamo la mappa NOESY registrata:

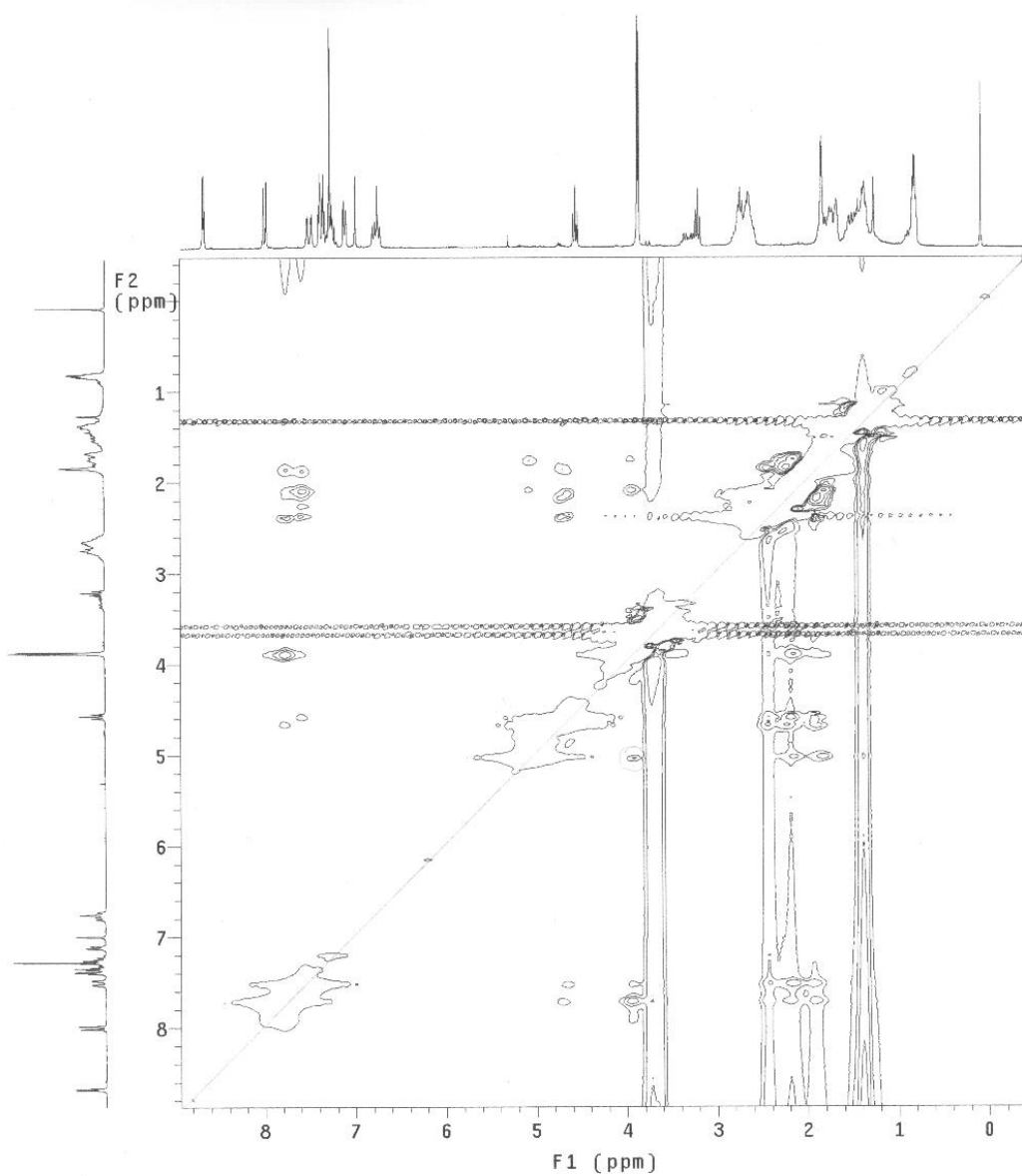


Fig.11 Mappa NOESY omonucleare del protone del Boc-G2.

Naturalmente i protoni vicini lungo la catena saranno abbastanza vicini anche spazialmente da produrre un consistente effetto NOE. In pratica, come si può vedere dalla mappa, la NOESY è molto simile alla mappa COSY a parte alcuni punti che possono risultare di difficile individuazione.

Per questo motivo abbiamo usato uno stratagemma semplice ma molto efficace, abbiamo "colorato" al calcolatore le due mappe di due colori

diversi (rosso e blu) e le abbiamo sovrapposte.

Il risultato è il seguente:

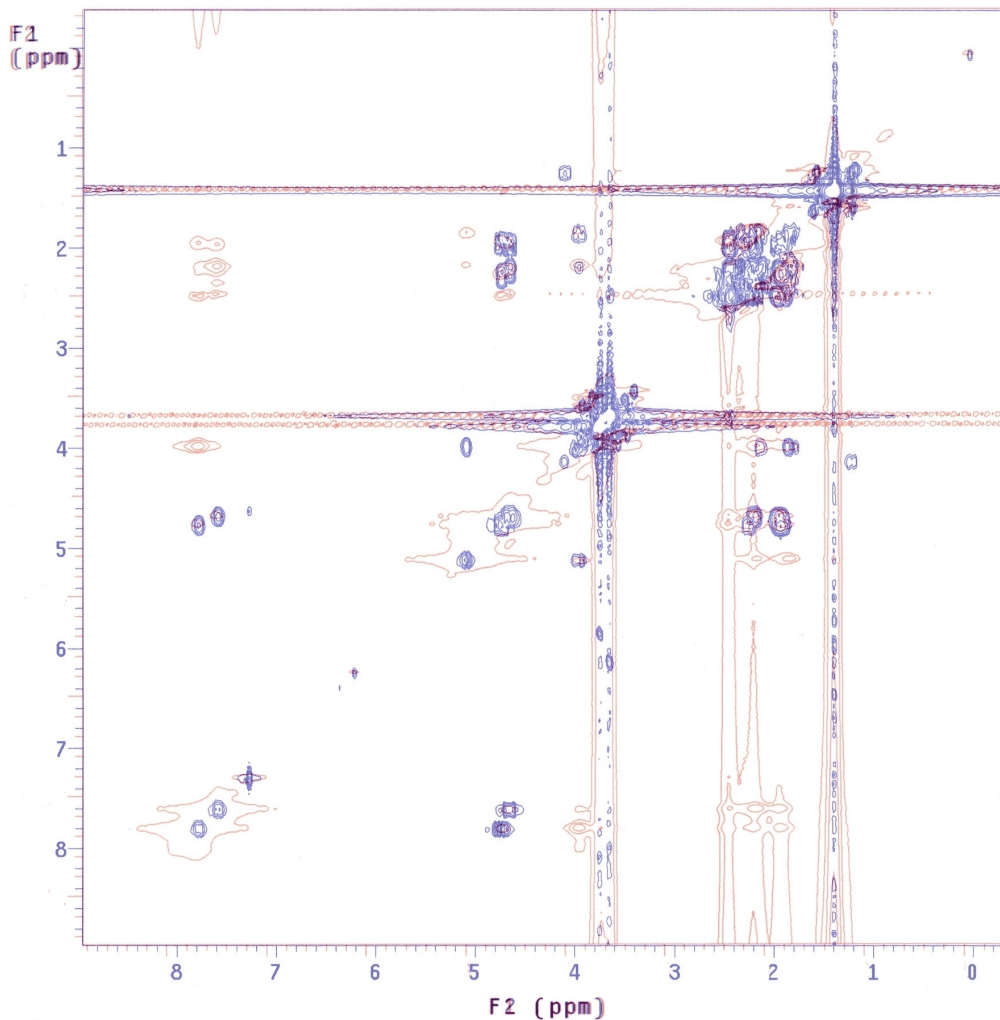


Fig.13 Sovrapposizione delle mappe NOESY(rosso)-COSY(blu) del Boc-G2.

E' evidente che il guadagno in chiarezza è notevole, le zone che sono colorate di entrambi i colori sono quelle dovute alla naturale disposizione della molecola a seguito del concatenamento, invece le zone colorate solo in rosso sono quelle relative ad un effetto NOE dovuto ad accoppiamenti dipolari di nuclei vicini a causa di particolari arrangiamenti della molecola.

Si nota in particolare un intenso effetto NOE relativo al protone ammidico "a" con il protone metinico "e". Questo è un'importante risultato, perché porta un protone legato ad idrogeno (3 o 13) vicino

al metino 2 che strutturalmente è lontano.

Inoltre i protoni "a" e "b" presentano altri accoppiamenti dipolari con i protoni metilenici, cosa che però non aiuta molto in quanto la zona dei metileni non è perfettamente risolta.

Altri segnali di minore intensità ed importanza che questa tecnica ci offre correlano il protone ammidico non legato "c" con protoni metilenici diversi da quelli correlati con i protoni "a" e "b"; si nota inoltre la correlazione tra i protoni metinici "d" e metilenici "g" che sono strutturalmente lontani dai centri chirali.

HETCOR

L'ultima ma non meno importante mappa bidimensionale registrata è stata la HETCOR (HETeronuclear CORrelation).

Questa tecnica applica il meccanismo visto per la COSY per produrre una correlazione tra nuclei di diversi ^1H e ^{13}C nel nostro caso [7].

Il risultato è una mappa bidimensionale con lo spettro del protone in ascisse e quello del carbonio nelle ordinate e ogni segnale indica una correlazione tra il protone associato in ascissa e il carbonio in ordinata.

La mappa registrata non comprende tutto lo spettro ma solo una parte. Visto che i carboni carbonilici e gli idrogeni ammidici non si vedono con questa tecnica abbiamo stretto l'intervallo di acquisizione tra 20 e 60ppm per il carbonio e 1.0 e 5.5ppm per il protone.

Riportiamo gli ingrandimenti delle zone popolate:

-da 27 a 33 ppm per il ^{13}C e da 1.2 a 2.7 ppm per il ^1H (fig.14);

-da 50 a 55 ppm per il ^{13}C e da 3.5 a 5 ppm per il ^1H (fig.15).

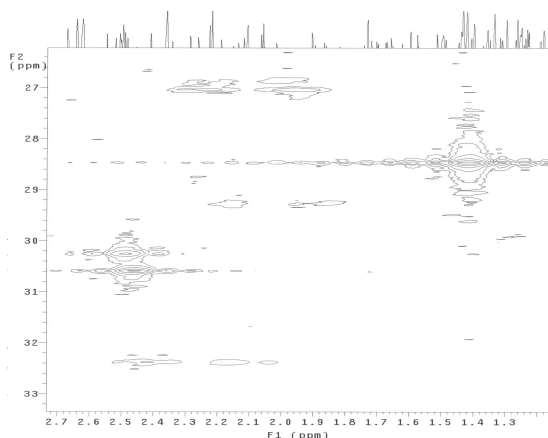


Fig.14 Particolare 1 della mappa HETCOR

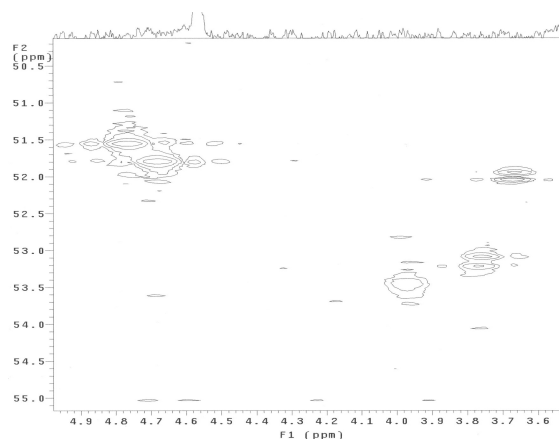


Fig.15 Particolare 2 della mappa HETCOR

L'interpretazione è molto semplice, si analizza segnale dopo segnale assegnandolo al corrispondente picco nei due spettri monodimensionali:

- partendo dall'alto nella figura 14 abbiamo due segnali vicini che sono, nello spettro ^{13}C , a 26.9 e 27ppm, correlati con i gruppi "h" e "i" dello spettro protonico appartenenti ai metileni. L'interpretazione precedente quindi era esatta: carboni 5-15 ai picchi 26.9-27, e questa sarebbe la prova che i due protoni dei CH_2 producono segnali in entrambi i gruppi "h" e "i";

- il segnale successivo è invece quello che compare come primo segnale nel protone, il picco "l" dei metili del Boc, che come già detto in precedenza corrisponde al segnale dei carboni 23, 24 e 25 a 28.5ppm;

- procedendo lungo la coordinata del ^{13}C incontriamo il segnale assegnato al carbonio 9 a 29.2ppm che produce due bande nella zona dei picchi "h" e "i";

- i segnali a 30.2 e 30.5ppm assegnati ai carboni 7 e 17 producono solo una banda nello spettro del protone, il picco "g";

- infine il picco assegnato al carbonio 11 a 32.3ppm produce dei segnali nelle bande "g" e "h", è da notare che i protoni legati al carbonio 11 si differenziano sensibilmente pur essendo relativamente lontani dal centro chirale, a differenza di quanto accade per le coppie di protoni legati ai carboni 7 e 17;

- facendo un balzo in avanti arriviamo nella zona dei metini e metossili (figura 15), i primi segnali che si incontrano sono quelli dei carboni 4 e 14 a 51.5-51.8ppm confermati dallo spettro del protone: ora sappiamo a quale picco del ^{13}C corrisponde ciascun

multipletto del gruppo "d" nello spettro ^1H ;

-i segnali successivi sono dei metili metossilici: 19, 20, 21 e 22 che producono il doppio segnale "f";

-infine troviamo il metino "e" che produce un bel segnale anche qui slargato all'intersezione di 53 e 4ppm.

In pratica abbiamo confermato tutte le assegnazioni precedentemente fatte.

Da questa prima analisi degli spettri si deduce che la nostra molecola deve:

- in qualche modo legare ad idrogeno solo due dei suoi idrogeni ammidici, cosa che potrà fare tramite legami intra o intermolecolari;
- assumere una conformazione relativamente rigida per la catena centrale dal carbonio 2 al carbonio 11;
- porre il protone 2 molto vicino al protone ammidico "a".

La prima cosa da chiarire è se i legami a idrogeno che si formano sono di natura intra o intermolecolare, il che non è facile da stabilire solo con l'analisi NMR. Un modo semplice è assumere che, ad una concentrazione abbastanza bassa, la formazione di legami intermolecolari non sia favorita. Questo è dimostrato dall'analisi dei chemical shifts del protone NH della N-metilformammide al variare della concentrazione [5].

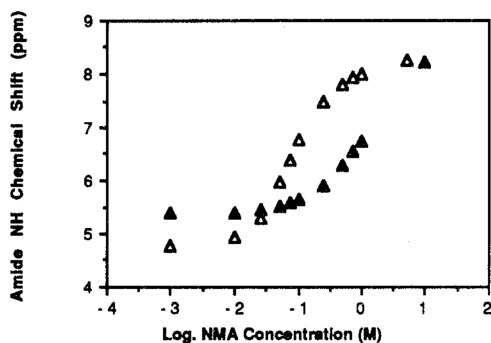


Fig.16 Chemical shift dei protoni dell'N-metilacetammide a temperatura ambiente, come funzione del logaritmo della concentrazione, in CD_2Cl_2 (pieno), e in $\text{CCl}_4/\text{C}_6\text{D}_6$ 9:1 (vuoto).

La N-metilformammide è una monoammide di piccole dimensioni, questo ci permette di dire che, se dagli spettri si evidenzia la presenza di legami ad idrogeno, questi non possono essere che intermolecolari.

Dalla figura si nota, alle alte concentrazioni, il c.s. tipico di un protone ammidico legato a idrogeno (8ppm), mentre a basse concentrazioni il c.s. diminuiscono notevolmente (4ppm). Dai dati quindi si può dedurre che sotto 5mM i legami intermolecolari non sono presenti.

Considerando quest'ultimo dato applicabile al nostro caso, abbiamo preparato due soluzioni di Boc-G2 in CCl_4 di concentrazione 25mM e 1mM e ne abbiamo registrato degli spettri NMR e IR. Abbiamo usato come solvente CCl_4 e non CDCl_3 , perché a basse concentrazioni lo spettro IR dell'acqua presente nel solvente deuterato interferisce significativamente con lo spettro del soluto.

Spettri IR.

A concentrazioni molto basse la sensibilità dell'NMR si abbassa notevolmente (si devono accumulare migliaia di spettri per ottenere un sufficiente rapporto s/r).

Abbiamo quindi cercato di discriminare i legami ad idrogeno intramolecolari da quelli intermolecolari con spettri IR, seguendo una metodologia ben consolidata [5].

La spettroscopia infrarossa infatti ha una sensibilità maggiore dell'NMR perché i segnali sono dovuti ad una maggior efficienza del processo di assorbimento. Questa è dovuta alla maggior differenza di energia tra i livelli delle transizioni vibrazionali rispetto alle transizioni di spin della NMR.

I segnali che andremo ad osservare sono gli stretching NH che producono in genere una banda tra i 3400 e i 4000 cm^{-1} . Se i protoni partecipano a legami ad idrogeno è naturale pensare che gli stretching NH subiscano delle modifiche e in particolare la banda sarà spostata verso numeri d'onda inferiori (dai 3000 ai 3500 cm^{-1}), in quanto la formazione del legame ad idrogeno indebolisce lievemente il legame precedente.

Abbiamo analizzato la soluzione concentrata (75mM) in CDCl_3 , la soluzione concentrata (25mM) in CCl_4 e quella diluita (1mM) in CCl_4 . Uno spettro completo della soluzione in CDCl_3 e gli ingrandimenti della zona degli stretching NH (2500-3800 cm^{-1}) delle soluzioni in CCl_4 sono riportati di seguito.

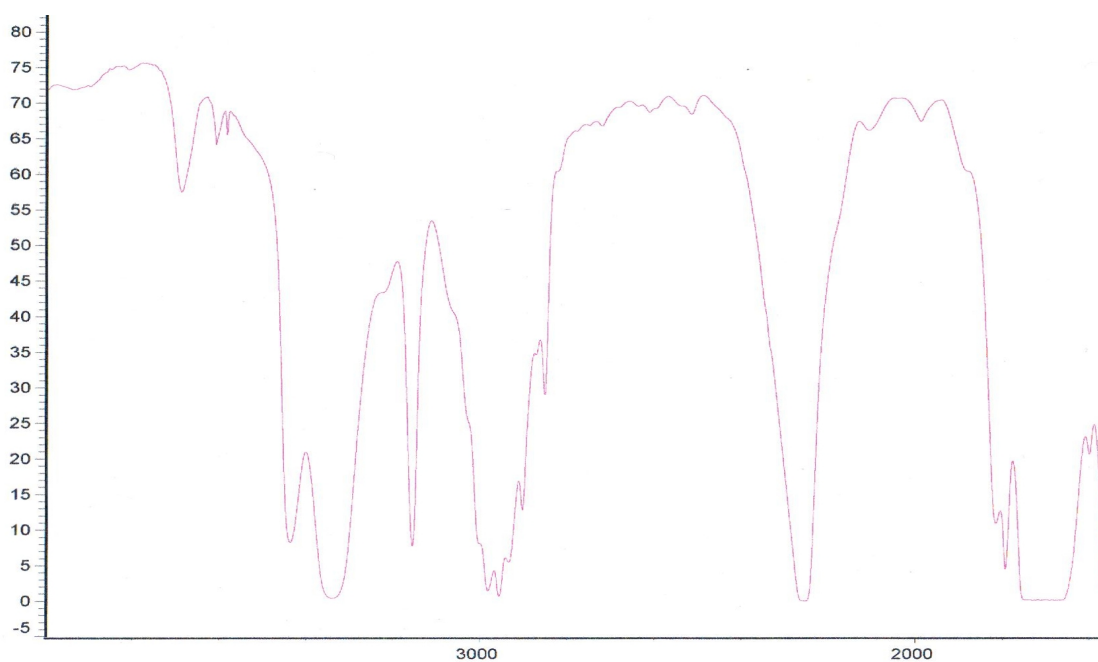


Fig.17 Spettro IR (trasmittanza) del Boc-G2 in CDCl_3 , 75mM.

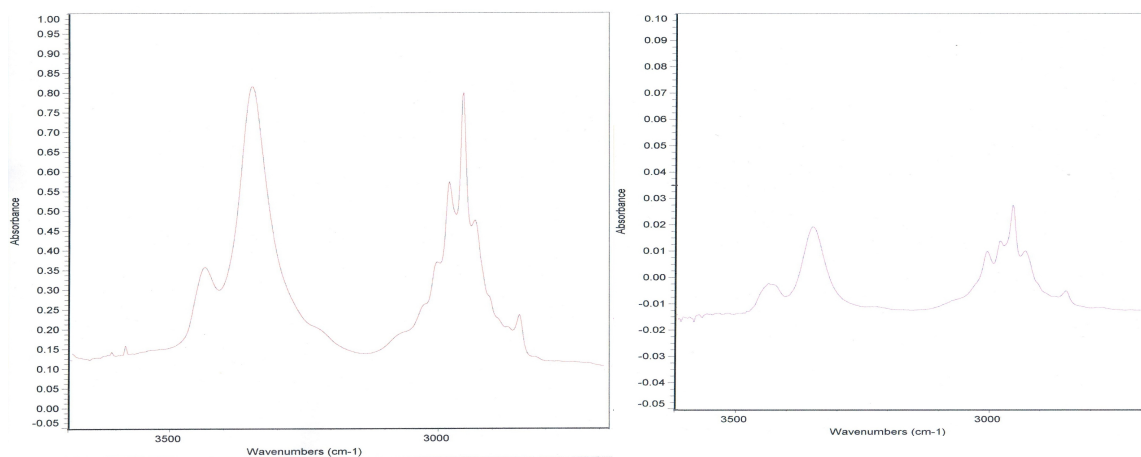


Fig.18 Ingrandimento zona NH. Sol.25mM in CCl_4 (scala di assorbanza da -0.05 a 1) Fig.19 Ingrandimento zona NH. Sol.1mM in CCl_4 (scala di assorbanza da -0.05 a 0.1)

Si nota chiaramente dagli ingrandimenti che, in entrambi i solventi e alle tre concentrazioni, sono presenti due bande di stretching dell'NH, una a circa 3300cm^{-1} attribuibile ai gruppi legati e l'altra a circa 3400cm^{-1} attribuibile ai gruppi liberi.

Con questi spettri si vede quindi che la nostra molecola presenta gruppi ammidici sia legati che non legati ad idrogeno in soluzioni sia concentrate (75mM) che diluite (1mM). Inoltre la proporzione tra

l'area delle due bande rimane costante variando la concentrazione. Perciò facendo riferimento a quanto detto in precedenza sulla certezza di non avere legami intermolecolari in soluzioni di concentrazione circa millimolare, possiamo dire che i legami ad idrogeno presenti in tutti i nostri spettri sono esclusivamente intramolecolari. Inoltre, considerando che la forma degli spettri non varia molto da soluzioni concentrate a diluite né da CDCl_3 a CCl_4 , possiamo affermare che i segnali dovuti a legame ad idrogeno presenti negli spettri NMR sono dovuti anch'essi a legami intramolecolari.

Per confermare del tutto quest'ultima affermazione abbiamo effettuato uno spettro ^1H NMR della soluzione 1mM in CCl_4 (con lo svantaggio di non poter fare l'aggancio del Lock). La forte somiglianza con lo spettro di figura 1, soprattutto per quanto riguarda i segnali dei protoni ammidici, conferma la nostra ipotesi.

5. Effetti della temperatura e del solvente.

Effetto della temperatura.

Dai lavori presenti in letteratura, in sistemi simili al Boc-G2 [5,6] che a temperatura ambiente mostrano la presenza di legami ad idrogeno, alzando la temperatura questi ultimi si scindono. I comportamenti non sono sempre prevedibili, alcuni sistemi già a 310K sono completamente scissi altri anche a 330K mostrano ancora legami. I legami a idrogeno in questione possono essere sia di natura intramolecolare che intermolecolare, nel primo caso l'innalzamento di temperatura provoca una rottura dei cicli, nel secondo caso il gel dovuto ai legami tra le molecole subisce una transizione di fase.

Noi abbiamo effettuato sei spettri ^1H NMR a temperatura variabile, da 25° a 50°C con un passo di 5°C.

Il risultato è riportato di seguito:

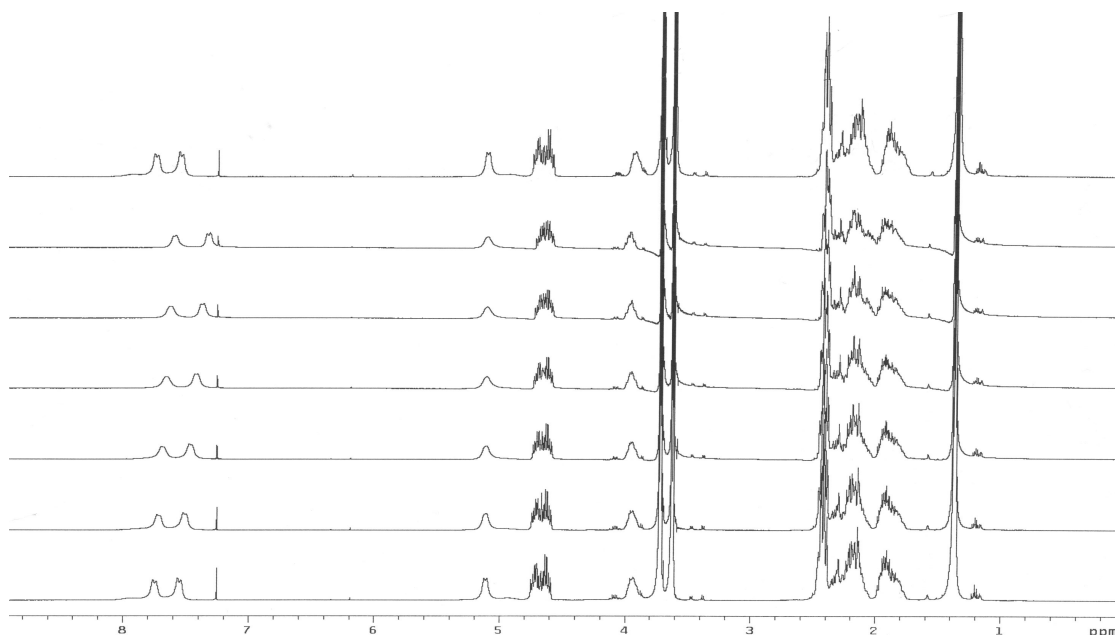


Fig.20 Spettri ^1H a varie temperature. Dal basso(°C): 25, 30, 35, 40, 45, 50, 25.

Dalle prove si nota un leggero shift dei gruppi ammidici legati verso campi più schermati di circa -10ppb/K (vedi figura 21) in pieno accordo con i dati in letteratura che presentano per sistemi ciclici dei coefficienti dell'ordine di -(6-13)ppb/K [5].

Inoltre c'è una lieve perdita di risoluzione, in particolare dei gruppi ammidici.

Analizzando più approfonditamente lo spettro a 25° si possono notare delle piccole gobbe ai piedi dei segnali di tutti gli NH. Questi segnali alzando la temperatura si

appiattiscono fino a scomparire. Poiché all'analisi allo spettrometro di massa, effettuata dopo la sintesi, è stato dedotto che non ci sono impurezze sintetiche significative nel composto, questo fatto si potrebbe spiegare con la presenza di due isomeri conformazionali o comunque di uno stato diversamente legato. Le ipotesi in questo senso sono essenzialmente due: il conformero principale ha un equilibrio di scambio lento con un suo isomero, oppure a 25°C ci troviamo vicini alla transizione di fase e quello che vediamo è il segnale incipiente della frazione aggregata intermolecolarmente, che potrebbe emergere a temperature più basse.

Abbiamo effettuato anche spettri del ^{13}C a 30°C e a 50°C. Le differenze sono poche ai campi bassi, i segnali fino a 150ppm rimangono praticamente invariati. Delle differenze si notano nei picchi della zona dei 175ppm, in particolare sembra che si sdoppi il picco estremo a 174.5ppm. La separazione sembra essere proporzionale alla temperatura, a 30° si slarga molto e a 50° si separa in maniera netta.

Riportiamo l'ingrandimento dello spettro ^{13}C a 50°C nella zona interessata:

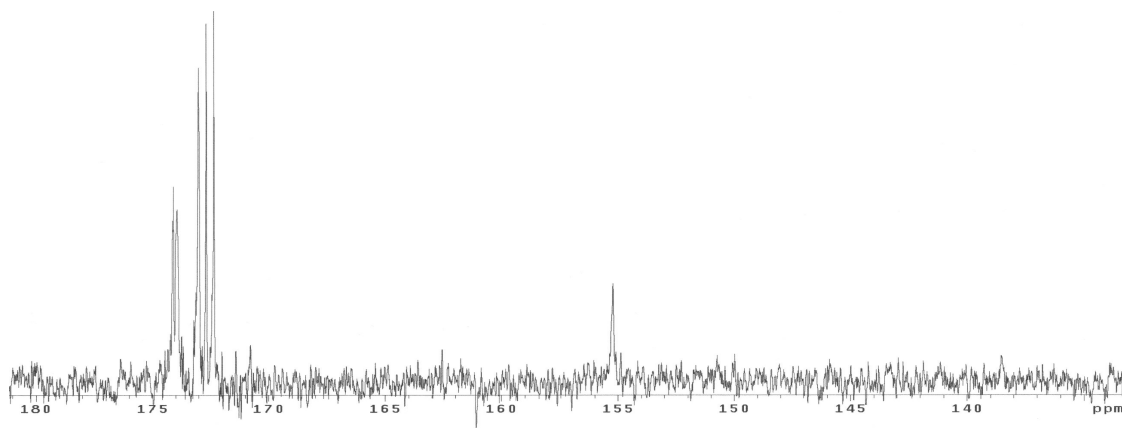


Fig.22 Sezione da 150 a 176ppm dello spettro ^{13}C a 50°C del Boc-G2.

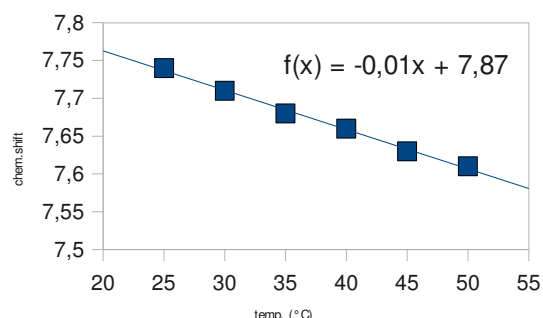


Fig.21 C.s. del segnale "a" in funzione della temperatura.

Effetto solvente.

I legami ad idrogeno del nostro dendrimero devono ovviamente risentire della polarità del solvente. E' naturale che con solventi poco polari la molecola tenderà ad assumere conformazioni opportune o (a seconda delle concentrazioni) tenderà ad aggregarsi per minimizzare l'esposizione dei gruppi polari al solvente. In caso contrario, in un solvente polare, i legami ad idrogeno sia intra che intermolecolari saranno in competizione con quelli che la molecola potrà formare con il solvente.

Il solvente che abbiamo utilizzato finora è mediamente polare ma incapace di formare legami ad idrogeno e non ha ostacolato la formazione di legami H intramolecolari nel Boc-G2. La prova che abbiamo effettuato è stata registrare degli spettri al ^1H e ^{13}C in un solvente più polare. Per rendere l'ambiente più polare abbiamo aggiunto alla soluzione due diverse quantità di dimetilsolfossido (DMSO/ CDCl_3 , 5/95 in peso, DMSO/ CDCl_3 , 20/80 in peso) [9].

Con la soluzione poco concentrata lo spettro ^1H non varia molto: i protoni ammidici legati non si muovono, il protone non legato si sposta da 5.17 a 5.8ppm, quindi viene più deschermato, segno che è esposto al solvente polare.

Si nota anche una semplificazione della regione dei metileni e un loro shift verso regioni più basse, il che può essere spiegato tramite un piccolo riarrangiamento conformazionale che sposta i metileni verso zone più schermate (alifatiche, apolari) e in una situazione più mobile che porta ad una apparente semplificazione. Questa ipotesi è sorretta indirettamente da un dato di cromatografia HPLC: in fase inversa di dendrimeri di varie generazione, si nota che i dendrimeri di generazioni elevate escono prima di quelli più piccoli, segno che la loro mobilità è così alta che i riarrangiamenti portano le frazioni polari della molecola all'interno e lasciano le parti apolari all'esterno, permettendo un'eluizione più veloce [9].

Con la concentrazione più elevata di DMSO, i cambiamenti dello spettro sono più marcati.

I segnali degli idrogeni ammidici 3 e 13 si spostano leggermente verso campi bassi e si fondono in un unico picco slargato e leggermente frastagliato.

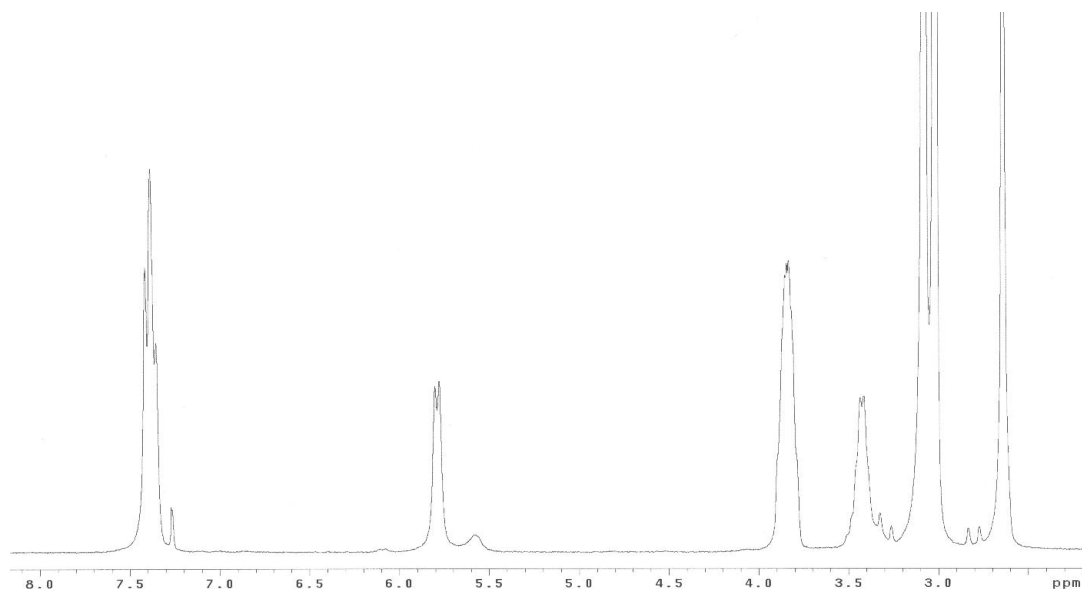


Fig.23 Ingrandimento della zona a campi alti dello spettro ^1H in CDCl_3 -DMSO 20%.

Anche la zona dei metini, metileni e metili si sposta verso campi più bassi, seguendo l'andamento preso con la soluzione blandamente polare.

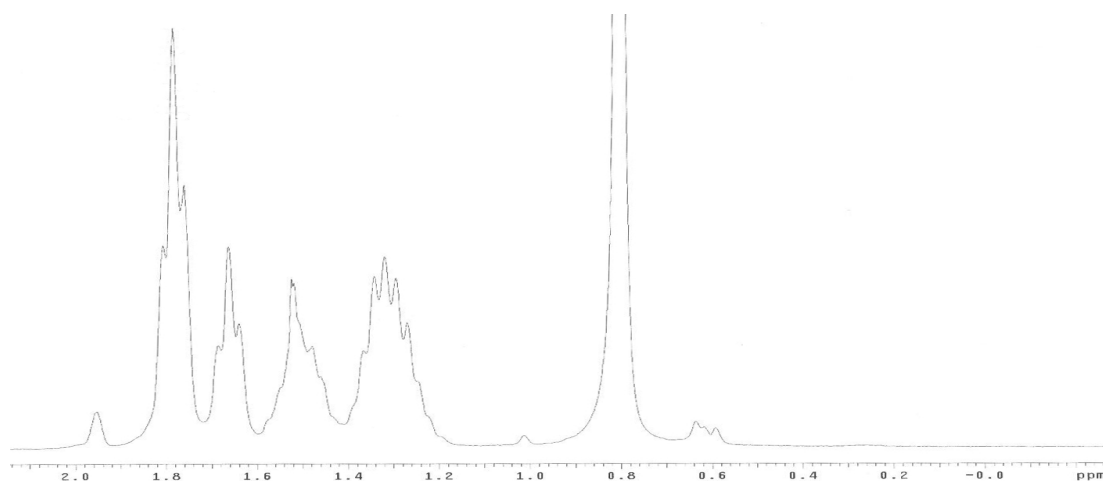


Fig.24 Ingrandimento della zona a campi bassi dello spettro ^1H in CDCl_3 -DMSO 20%.

L'avvicinarsi dei protoni ammidici 3 e 13 all' 1 denota un cambiamento verso un ambiente comune, il che fa pensare che, qualsiasi tipo di legame ad idrogeno facciano i protoni 3 e 13, in DMSO si produca un aumento della frazione libera, il cui equilibrio di scambio con la

frazione legata risulta veloce.

In un solvente meno polare, invece, l'effetto dovrebbe essere opposto. Abbiamo dunque effettuato delle prove con una soluzione in CCl_4 . Un primo effetto della maggiore tendenza all'aggregazione l'abbiamo incontrato tentando di dissolvere il dendrimero nel solvente: il soluto ha bisogno di essere scaldato per sciogliersi, la soluzione poi appare limpida.

Lo spettro ^1H di una soluzione 25mM in CCl_4 è pressappoco identico in figura 1 nella regione degli NH, il segnale "e" a temperatura ambiente si nasconde sotto il doppietto dei metili metossidici, fatto confermato dall'integrazione del doppietto che presenta un'unità in più. Alzando la temperatura il segnale emerge.

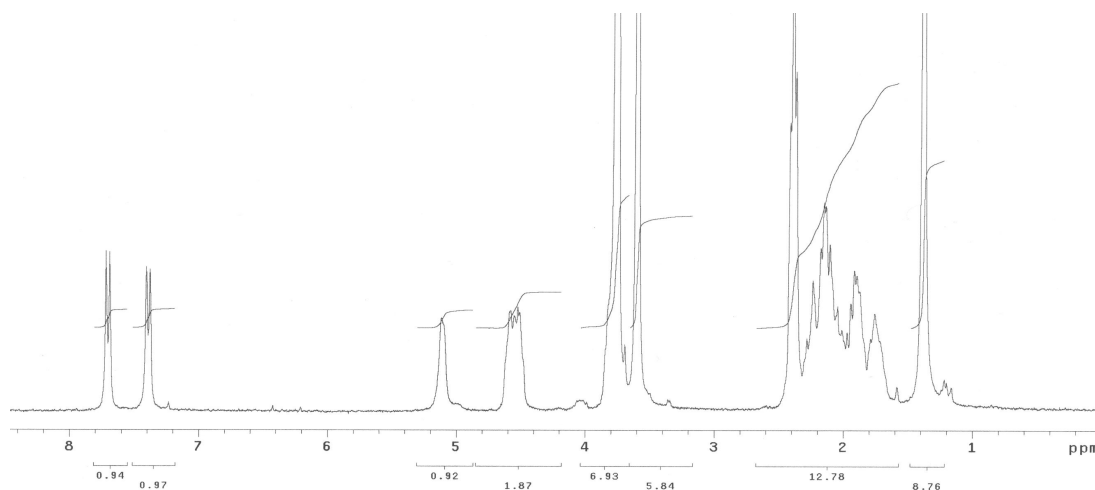


Fig.25 Spettro ^1H della soluzione 25mM in CCl_4 a 25°C.

Ciascuno dei due segnali relativi ai quattro metossili è qui sdoppiato leggermente, la parte alifatica infine presenta la separazione di un gruppo di segnali metilenici, probabilmente di quelli più a contatto con il solvente.

6. Ipotesi conformazionale e conclusioni.

A questo punto dovremmo avere informazioni sufficienti per intraprendere lo studio di una possibile conformazione.

Partiremo dal dato più importante: la formazione di legami ad idrogeno intramolecolari.

Sappiamo bene quali sono i siti donatori di idrogeno, dobbiamo quindi individuare quali sono i più probabili accettori di legame nella molecola. Ci sono due gruppi carbonilici e uno carbossilico dei gruppi ammidici e quattro gruppi esterei, tutti capaci di accettare un idrogeno. Il passo successivo è stabilire quali legami portano a strutture relativamente stabili, per fare questo ci serviamo della letteratura presentata all'inizio del lavoro.

Ogni legame intramolecolare porterebbe alla formazione di uno o più cicli. Nel capitolo inerente alla letteratura abbiamo elencato una serie di cicli stabili creati da legami ad idrogeno intramolecolari, ora utilizzeremo questi dati per selezionare gli anelli stabili a disposizione.

Tra tutti i cicli possibili riuniamo in una tabella quelli che secondo la letteratura hanno una buona probabilità di esistere - anelli a 8, 9, 10, 11 termini - associando ad ogni coppia idrogeno-carbonio il numero di unità costituenti l'anello.

8 termini:	9 termini:	10 termini:	11 termini:
H 1 con CO 29'	H 13 con CO 27'	H 1 con CO 28'	H 3 con CO 32'
H 3 con CO 31'		H 1 con CO 32'	H 13 con CO 29'

Il ciclo intramolecolare a 8 termini è il più piccolo che offra una buona geometria per l'angolo N--H--O (che dovrebbe essere di 160° [5]). Questo tipo di ciclo però comporta una conformazione eclissata degli idrogeni dei metileni e ciò rende la struttura poco stabile alle temperature ordinarie.

I cicli a 9 e 10 termini invece offrono un buon compromesso tra

geometria di legame e angoli torsionali dell'anello.

Per gli anelli a 11 termini i dati sono molto variabili, in alcune molecole a temperatura ambiente essi non si formano, per altre invece essi risultano stabili come i cicli a 10 termini.

Dai dati spettrali del Boc-G2 sappiamo che formano legami ad idrogeno i protoni 3 e 13. Quindi, escludendo gli anelli a 8 termini, rimangono solo due possibili combinazioni di strutture cicliche: H13-CO27'/H3-CO32' e H13-CO29'/H3-CO32'. Abbiamo provato a costruire con un modellino molecolare le due strutture. Entrambe sembrano essere ragionevoli (non sono tensionate né comportano l'avvicinamento di gruppi ingombranti). Nella prima struttura, però, il protone 2 che, in base alla mappa NOESY, dovrebbe essere particolarmente vicino ad un protone legato a idrogeno non presenta questa caratteristica (punta verso l'esterno del ciclo).

La seconda struttura, invece, appare decisamente convincente in quanto:

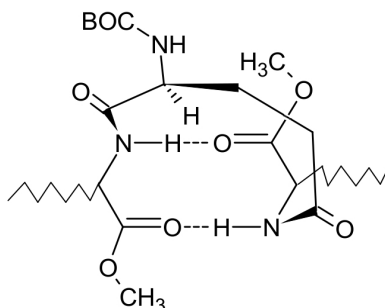
- la formazione dei due cicli a 11 termini comporta la presenza di un ulteriore anello a 10 termini;

- le catene periferiche sono libere, in accordo con i dati spettroscopici in base ai quali esse si differenziano poco;

- l'idrogeno 2 è vistosamente vicino al 3, a sua volta legato ad idrogeno col carbonile 32' (quindi il segnale "a" dello spettro ^1H NMR del Boc-G2 è da assegnarsi all'idrogeno 3);

- la porzione di molecola dal carbonio 2 al carbonio 11 risulta la più vincolata e rigida, come dedotto in precedenza da varie evidenze spettrali.

Tentiamo di riportare schematicamente il risultato:



Abbiamo in programma di cercare conferma a questa ipotesi strutturale tramite calcolo "ab initio".

7. Bibliografia

- [1] (a) *Dendrimers*, Topic in Current Chemistry, Vol.197, Springer, vol.ed. F. Vogtle; (b) W.Tansey, S.Ke, X.-Y.Cao, Marites J.Pasuelo, S.Wallace, Chun Li, *J. Contr. Release*, 2004, **94**, 39-51; (c) M.Diriffield, D.M.Goodal, S.Klute, D.K.Smith, K.Wilson, *Langmuir*, 2002, **18**, 8660-8665 e riferimenti contenuti;
- [2] (a) B.Romagnoli e W.Hayes, *J. Matter. Chem.*, 2002, **12**, 767-799; (b) H.W.I.Peerlings e E.W.Meijer, *Chem.Eur. J.*, 1997, **3**, 1563-1570; (c) D.Seebach, P.B.Rheiner, G.Greiveldinger, T.Butz e H.Sellner, *Top. Current Chem.*, 1998, Vol.197, 125-164;
- [3] (a) W.Jang, D.Jiang, T.Aida, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 3232-3233; (b) W.Jang, D.Jiang, T.Aida, *Macromolecules*, 2003, **36**, 8461-8469;
- [4] (a) D.K.Smith e F.Diederich, *Chem. Eur. J.*, 1998, **4**, 1353-1361; (b) A.Barron e R.N.Zuckermann, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1999, **3**, 681-687;
- [5] S.H.Gellman, G.P.Dado, Gui-Bai Liang, B.R.Adams, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 1164-1173;
- [6] (a) B.W.Gung, Z.Zhu, *Tetr. Lett.*, Vol.37, 1996, **13**, 2189-2192; (b) B.W.Gung, Z.Zhu, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 6482-6483; B.W.Gung, Z.Zhu, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 6100-6101;
- [7] Andrew E. Derome, *Modern NMR Techniques for Chemistry Reserarch*, Org. Chem. Series, Vol.6, 1987, Pergamon Pres;
- [8] D.Neuhaus e M.P.Williamson, *The NOE in Structural and Conformation Analysis*, 1989, VCH Publishers;
- [9] F.E.Appoh, D.S.Thomas e H.-B.Kraatz, *Macromol.*, 2005, **38**, 7562-7570;

Ringraziamenti.

-Ringrazio la Professoressa Rita Menicagli e il suo gruppo di ricerca per aver fornito il materiale di questa tesi.

-Ringrazio il Dr. Alberto Marini per aver offerto un gradito aiuto nello svolgimento del lavoro.

-Ringrazio tutte le persone che passano un significativo tempo nello studio della Catalano per l'accoglienza e la disponibilità dimostrata.

-Ringrazio le persone che passano con il sottoscritto un significativo tempo per le risa, le battute ironiche, e anche per la pazienza nell'affrontare i piccoli "damages" che mi caratterizzano.

-Ringrazio il Professor Pietro Diversi, il mio *Tutor*, per le utili chiacchierate e i consigli dati.

-Ringrazio per ultima, ma non meno importante, la mia relatrice, la dr. Donata Catalano, per il lavoro svolto insieme che ricorderò come interessante, piacevole, e soprattutto avvincente, per l'infinita disponibilità e pazienza dimostrata, ed infine per i deliziosi episodi esilaranti che non si risparmia di raccontare.

Per tutto questo grazie!