

RESÚMENES DE TESIS DOCTORALES

BASES DE SCHIFF DERIVADAS DE 3-HIDROXI-4-PIRIDINCARBOXALDEHÍDO: SÍNTESIS Y ESTUDIO ESTRUCTURAL

Almudena Perona Requena. *Autora*

Dionisia Sanz del Castillo y Rosa M^a Claramunt Vallespí.

Directoras

Departamento de Química Orgánica y Bio-Orgánica

Fecha de lectura: 14 de mayo de 2008

Calificación: Sobresaliente cum laude por unanimidad

Mención Doctorado Europeo

La vitamina B₆, cuya forma activa es el piridoxal, PL, en forma de fosfato, PLP, juega un papel central en el metabolismo de los

aminoácidos. La clave en el “*modus operandi*” es la formación de bases de Schiff con su grupo aldehído y un grupo amino (de la propia enzima o del sustrato) encargándose de estabilizar el exceso de carga que se crea en la reacción, para ello la protonación del nitrógeno piridínico es un factor dominante (Figura 1).

La Tesis Doctoral se enmarca en la formación de Bases de Schiff a partir de una molécula modelo del PLP, 3-hidroxi-4-piridincarboxaldehído (1) y una serie de aminas (Esquema 1), imitando la unión que existe entre el piridoxal y el grupo amino del centro activo de la proteína; así como del estudio de la tautomería y la transferencia de protón a través del enlace de hidrógeno intramolecular y/o intermolecular.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Se ha iniciado el proyecto con la preparación del aldehído 1. La síntesis de sus bases de Schiff (2-22) con anilinas, N-aminoazoles y benzazoles, aminoésteres y aminas homólogas se ha realizado en tolueno con muy buenos rendimientos.

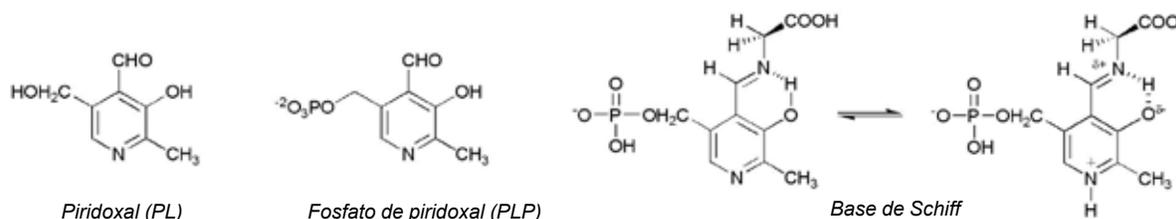
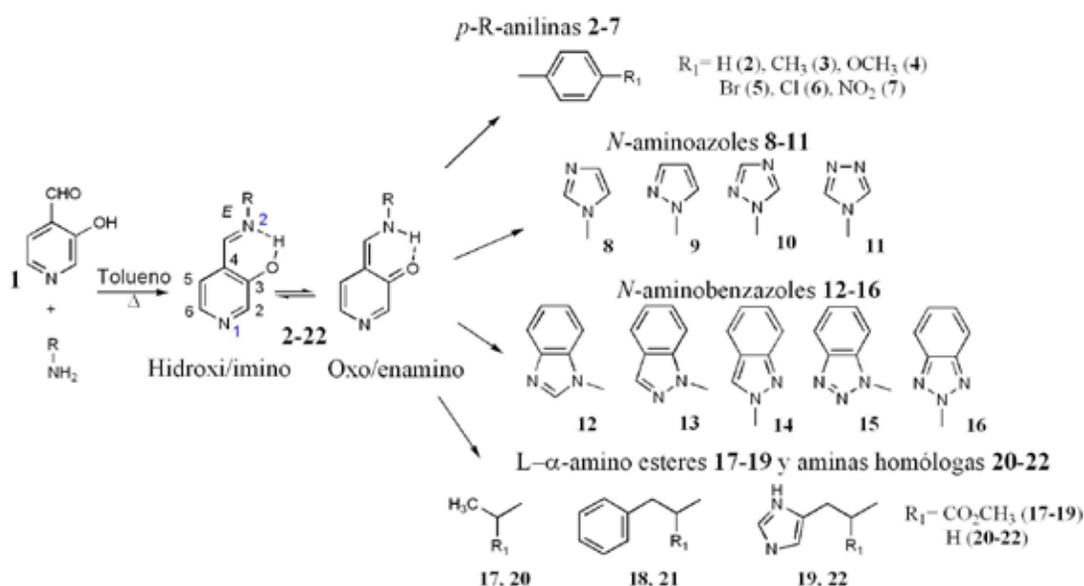


Figura 1. Estructuras de piridoxal (PL), fosfato de piridoxal (PLP) y base de Schiff del PLP.



Esquema 1. Síntesis de bases de Schiff derivadas de 3-hidroxi-4-piridincarboxaldehído(1).

Se ha realizado el estudio de la estabilidad relativa de los isómeros *E* (**a**) / *Z* (**γ**) y de las formas tautoméricas *E*-hidroxil/imino (**a**), *E*-oxo/enamino (**β**), *E*-zwitteriónica (**δ**) (Figura 2) mediante cálculos teóricos DFT al nivel B3LYP/6-31G**, obteniendo que la estructura más estable es la *E*-hidroxil/imino con enlace de hidrógeno intramolecular, seguida de la *E*-oxo/enamino cuyo valor de energía es 22 kJ mol⁻¹ (**2-7**, **17-22**) y 50 kJ mol⁻¹ (**8-16**) mayor que en **a**. Las estructuras **γ** y **δ**, están desfavorecidas en 55-100 kJ mol⁻¹ frente a la **a**.

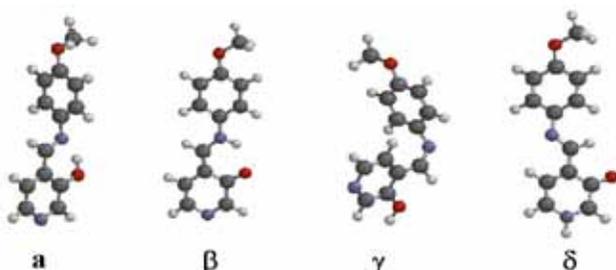


Figura 2. Geometrías optimizadas de las estructuras calculadas para el compuesto 4.

De las bases de Schiff derivadas de *N*-aminoazoles (**8-11**) y *N*-aminobenzazoles (**12-16**) que pueden adoptar dos conformaciones con enlace de hidrógeno intramolecular y que presentan más núcleos susceptibles de asociaciones intermoleculares se han determinado las energías relativas de los seis conformeros que se muestran en la Figura 3. La más estable es la **a**, con enlace de hidrógeno intramolecular y el anillo azólico orientado hacia el protón imínico. De las conformaciones sin interacción intramolecular, la más estable es la **e**, que sitúa al protón del grupo imínico CH=N entre los dos átomos de mayor densidad electrónica.

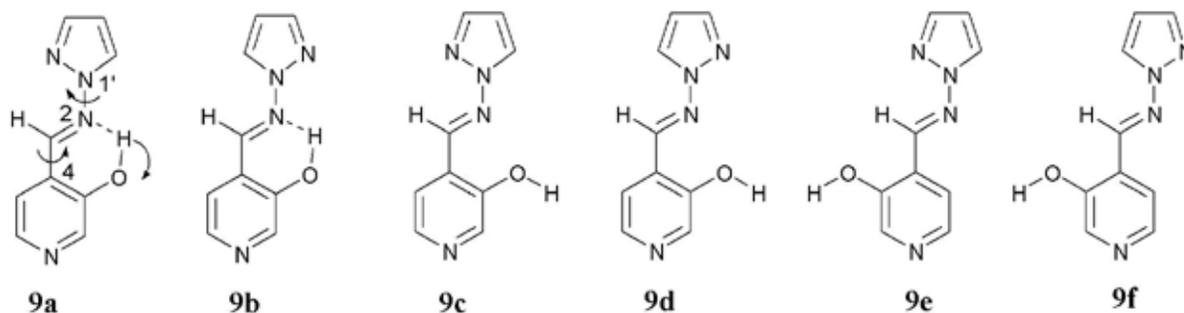


Figura 3. Conformaciones calculadas para el compuesto 9.

RMN multinuclear en medio neutro

¹H-RMN: Los desplazamientos químicos de los protones del anillo de piridina cumplen la secuencia δH2 > δH6 > δH5 y la constante de acoplamiento ³J_{5,6} ≈ 5 Hz. El protón hidroxílico aparece en un intervalo de 10 a 13 ppm como singlete ancho. El protón imínico presenta valores típicos para este grupo funcional, alrededor de 9 ppm y aparece en la mayoría de los compuestos como un singlete, aunque en algunos casos ha sido posible observar su acoplamiento con los protones del sustituyente R.

El estudio de los espectros 2D NOESY muestran que el isómero formado en la síntesis es el *E* y la existencia del enlace de hidrógeno intramolecular depende del tipo de disolvente como se muestra en la Figura 4 para la imina derivada de 1-aminoindazol. La existencia del puente de hidrógeno intramolecular se pone de manifiesto en CDCl₃ con la correlación entre H7' y OH (Figura 4a), interacción que desaparece en el espectro 2D NOESY en DMSO-*d*₆ (Figura 4b).

¹³C-RMN: Los desplazamientos químicos de carbono se han asignado sin ambigüedad por medio de experimentos 2D de correlación heteronuclear. El anillo de piridina presenta valores de δ similares en todas las series de compuestos y en general se cumple que: δC3 > δC2 ≈ δC6 > δC4 ≈ δC5. C3 aparece en todos los casos alrededor de 155 ppm, que corresponde a un carbono unido a un grupo OH, indicando que la estructura tautomérica es la hidroxil/imino. El desplazamiento químico del carbono imínico depende del sustituyente R, siendo el efecto más acusado en las bases de Schiff derivadas de *N*-aminoazoles y *N*-aminobenzazoles. Al pasar de CDCl₃ a DMSO-*d*₆ se produce un desapantallamiento en CH=N y C5 y un apantallamiento el resto de las señales.

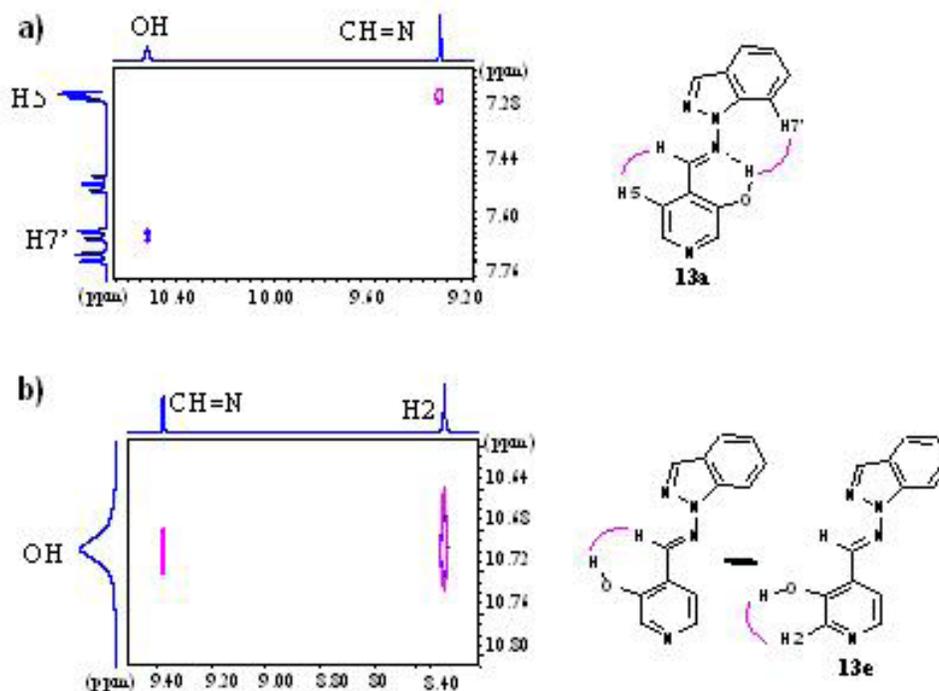


Figura 4. Ampliación de los espectro 2D NOESY del compuesto 13: a) CDCl₃ y b) DMSO-d₆.

¹⁵N-RMN y ¹⁷O-RMN: Para el estudio de la tautomería hidroxil/imino vs oxo/enamino los núcleos que dan mayor información son el nitrógeno y el oxígeno debido a la gran diferencia que presentan los valores de los desplazamientos químicos de las dos formas (Figura 5).

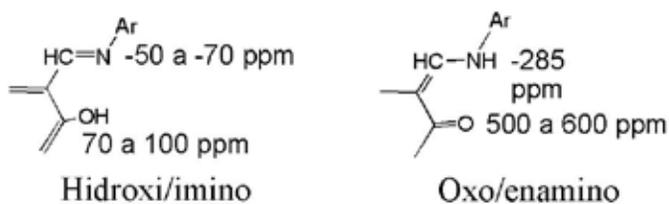


Figura 5. Desplazamientos químicos de ¹⁵N y ¹⁷O-RMN para hidroxil/iminas y oxo/enaminas.

Los valores de los desplazamientos químicos de ¹⁵N son de ~ -55 ppm para el nitrógeno piridínico (N1) y un intervalo de -60 a -90 ppm para el nitrógeno imínico (N2) que corresponde al tautómero hidroxil/imino (a) confirmando así los resultados obtenidos teóricamente (Figura 6a).

El estudio de ¹⁷O-RMN se ha realizado en las bases de Schiff derivadas de anilinas 2-8, y presentan valores de δ ~ 86

ppm como corresponde a un grupo fenólico (Figura 6b).

CPMAS RMN: En el estudio de ¹³C y ¹⁵N de las bases de Schiff 2-22 los resultados son similares a los obtenidos en disolución, encontrando en algunos casos señales desdobladas que indican la existencia de más de un conformero en estado sólido (Figura 7).

RMN multinuclear en medio ácido

Con el fin de verificar si para que se produzca la transferencia protónica intramolecular y observar así el tautómero oxo/enamino es necesario que el nitrógeno piridínico esté protonado, como ocurre en el fosfato de piridoxal (PLP), se procedió a analizar por RMN el comportamiento de las bases de Schiff 2-7, 9, 12 y 20, en medio ácido (TFA).

¹H-RMN: La protonación del anillo de piridina produce, fundamentalmente, el desapantallamiento de 1 ppm en H5 y un aumento en el valor de su constante de acoplamiento con H6.

¹³C-RMN: El efecto del medio ácido en los valores de desplazamiento químico de carbono es el apantallamiento de las señales de C2 y C6 y el desapantallamiento en el resto.

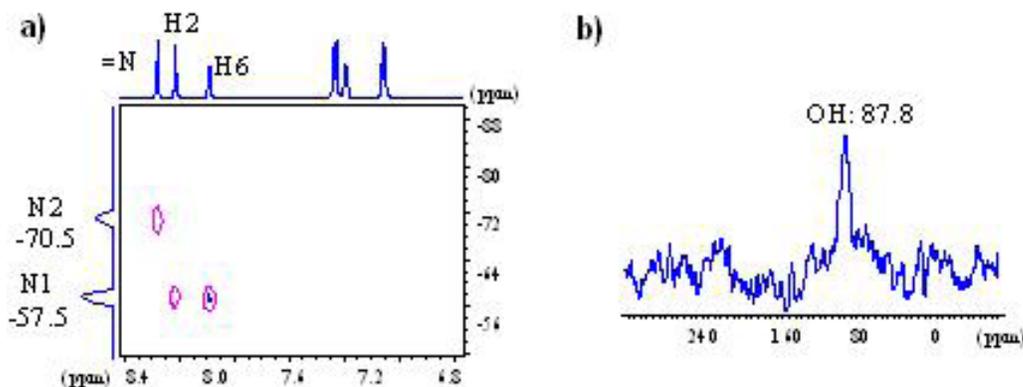


Figura 6. Espectros de RMN (CDCl_3) del compuesto **10**: a) 2D (^1H - ^{15}N) *gs*-HMBC y b) ^{17}O .

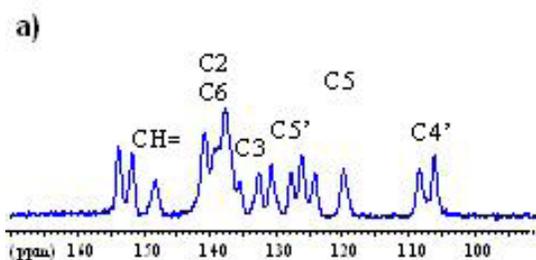


Figura 7. Espectro de ^{13}C CPMAS RMN de **9**:
a) cristalizado en $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$.

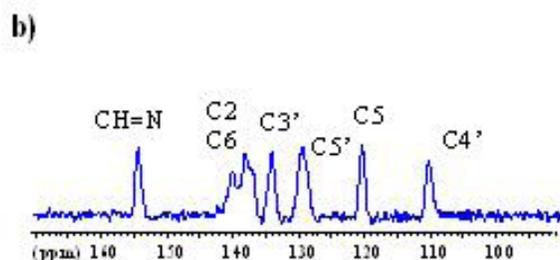


Figura 7. Espectro de ^{13}C CPMAS RMN de **9**: b) disuelto en CHCl_3 y evaporado.

Destacar que en las bases de Schiff **2H⁺-7H⁺** y **20H⁺** $\delta\text{C}5 > \delta\text{C}6$ mientras que en **9H⁺** y **12H⁺** C5 sigue siendo la señal de carbono del fragmento iminometilpiridinol más apantallada, al igual que sucedía en medio neutro.

^{15}N -RMN: Todos los compuestos estudiados, presentan el nitrógeno piridínico protonado con valores de desplazamiento químico alrededor de -178 ppm. El valor del desplazamiento químico de N2 en las bases de Schiff **2H⁺-6H⁺** y **20H⁺** presenta

un apantallamiento de 90 ppm con valores de $\delta\text{N}2 \approx -160$ ppm, que corresponden a un valor intermedio entre un nitrógeno imino y enamino, por lo que existirá el equilibrio tautomérico hidroxil/imino vs oxo/enamino (Figura 8).

En las iminas **7H⁺**, **9H⁺** y **12H⁺**, a pesar de que N1 está totalmente protonado no se produce la transferencia de protón en el enlace de hidrógeno intramolecular, observando solamente el tautómero hidroxil/imino, como confirma el valor de $\delta\text{N}2 \approx -65$ ppm.

Cristalografía de Rayos X

El estudio en estado sólido se completa con las estructuras de rayos X, en todos los casos estudiados los cristales corresponden al tautómero *E*-hidroxil/imino asociado por enlace de hidrógeno intermolecular con los nitrógenos de una molécula vecina (Figura 9a) o con alguna molécula de H_2O . El enlace de hidrógeno intramolecular solo se ha observado en el compuesto **TFB5H⁺** (Figura 9b).

CONCLUSIONES

1. Se ha optimizado la síntesis de la molécula modelo del piridoxal, 3-hidroxi-4-piridincarboxaldehído (**1**) y el procedimiento de preparación de sus bases de Schiff con anilinas *p*-sustituidas, *N*-aminoazoles, *N*-aminobenzazoles, *L*- α -aminoésteres y homólogos.
2. Se ha demostrado que la RMN multinuclear (^1H , ^{13}C , ^{15}N y ^{17}O) tanto en disolución como en estado sólido (CPMAS) es la mejor técnica para el estudio de la transferencia de protón en estas moléculas.

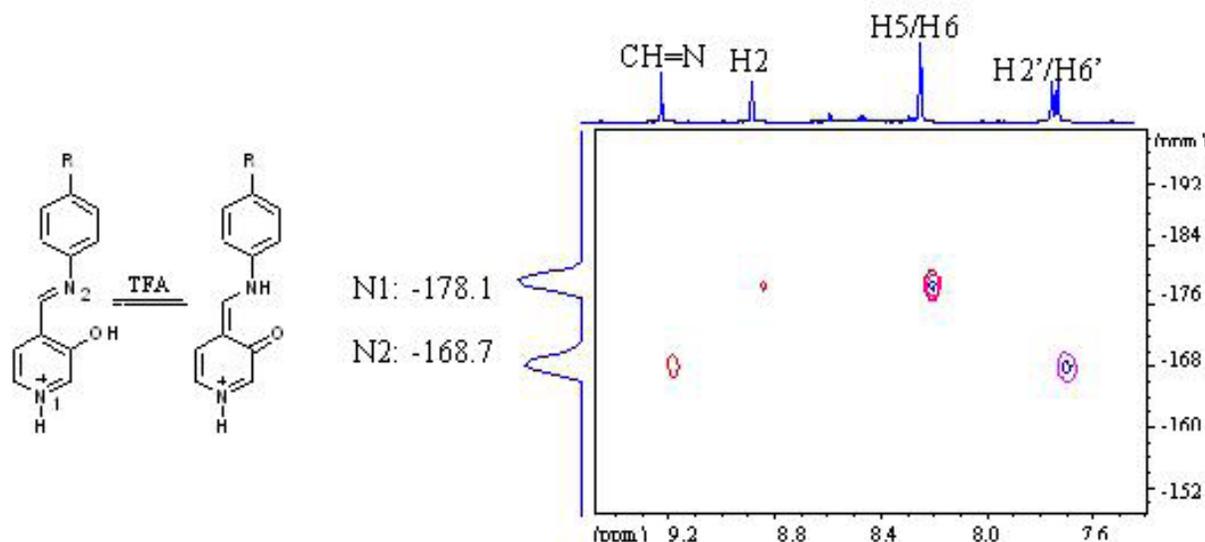


Figura 8. Espectro 2D (^1H - ^{15}N) gs-HMBC RMN (TFA) de **4H**^{*}.

— Todas ellas adoptan la estructura del tautómero hidroxil/imino con configuración de doble enlace *E*. La existencia de enlace de hidrógeno intramolecular se ve favorecida en disolventes poco polares (CDCl_3), frente a otras estructuras sin enlace de hidrógeno intramolecular las cuales se ven favorecidas en disolventes polares ($\text{DMSO}-d_6$).

— En medio ácido (TFA) se ha comprobado la coexistencia de los dos tautómeros hidroxil/imino y oxo/enamino en disolución, en las bases de Schiff **2-7** y **17**, demostrando que la transferencia de protón está asistida por la protonación del anillo de piridina.

— En el estudio RMN CPMAS los resultados son similares a los obtenidos en disolución encontrando en algunos casos señales desdobladas que indican la existencia de más de una orientación de la molécula.

- La cristalografía de rayos X ha permitido confirmar que las bases de Schiff estudiadas pueden interaccionar formando enlaces de hidrógeno intra- e intermoleculares.
- Los cálculos teóricos realizados por el método DFT al nivel B3LYP/6-31G** apoyan en todos los casos los resultados obtenidos experimentalmente.

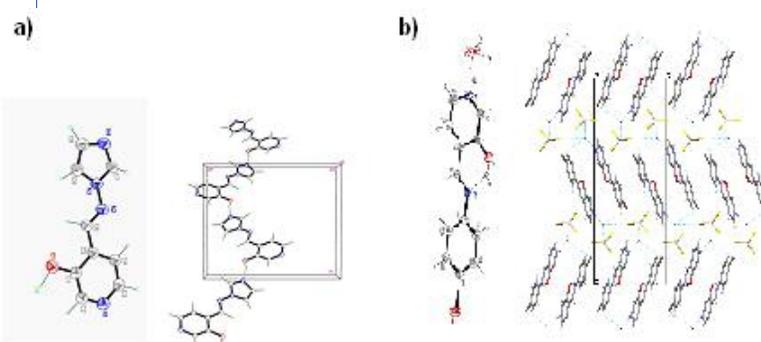


Figura 9. Estructura molecular de: **8e** con interacción de enlace de hidrógeno intermolecular (a) y **TFB5H**^{*} con interacción de enlace de hidrógeno intramolecular (b).

BIBLIOGRAFÍA

- Sanz, D., Perona, A., Claramunt, R.M., and Elguero, J.: *Tetrahedron*, **61**, 145-154 (2005).
- Perona, A., Sanz, D., Claramunt, R.M. and Elguero, J.: *Molecules*, **11**, 453-463 (2006).
- Sanz, D., Perona, A., Claramunt, R.M., Pinilla, E., Torres, M.R. and Elguero, J.: *Helv. Chim. Acta*, **89**, 1290-1303 (2006).
- Perona, A., Sanz, D., Claramunt, R.M., Pinilla, E., Torres, M.R., and Elguero, J.: *J. Phys. Org. Chem.*, **20**, 610-623 (2007).

— Perona, A., Sanz, D., Claramunt, R.M. and Elguero, J.:
Magn. Reson. Chem., **46**, 930-938 (2008).

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una beca FPI del MEC y a la financiación económica de los proyectos BQU2003-00976 y CTQ2006-02586.



Figura 10. Los miembros del Tribunal de Tesis con la nueva Doctora (de izquierda a derecha): Dra. D.^a Rosario Torres (Univ. Complutense de Madrid), Dra. D.^a Isabelle Forfar (Univ. Bordeaux 2, Francia), D.^a Almudena Perona, Dr. Francisco Sánchez (Univ. Autònoma de Barcelona), Dra. D.^a M.^a del Carmen Pardo (Univ. Complutense de Madrid) y Dra. D.^a Dolores Santa María (UNED).