

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Deivid Metzker da Silva

**AVALIAÇÃO ESTRUTURAL POR RMN DE ALCALOIDES
CICLOPEPTÍDICOS DE 14 MEMBROS: DISCARINA-C,
ADOUTINA-X E CONDALINA-A**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do Grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda
Caro

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Deivid Metzker da
Avaliação estrutural por rnm de alcaloides
ciclopeptídicos de 14 membros: Discarina-C, Adoutina-X e
Condalina-A / Deivid Metzker da Silva ; orientador, Miguel
Soriano Balparda Caro - Florianópolis, SC, 2014.
99 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Alcaloides Ciclopeptídicos. 3. Estrutura e
estereoquímica. 4. RMN. 5. Raios-X. I. Caro, Miguel Soriano
Balparda. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Deivid Metzker da Silva

**AVALIAÇÃO ESTRUTURAL POR RMN DE ALCALOIDES
CICLOPEPTÍDICOS DE 14 MEMBROS: DISCARINA-C,
ADOUTINA-X E CONDALINA-A**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do Título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 22 de agosto de 2014.

Prof. Dr. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo
Coordenador do Curso

BANCA EXAMINADORA:

Prof., Dr. Miguel S. B. Caro
Orientador **Morel**

(UFSC-SC)

Prof., Dr. Ademir Morel

Prof., Dr. José Carlos Gesser
(UFSC-SC)

**Prof.^a. Mariada Graça
Nascimento**
(UFSC-SC)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar até aqui, e me fortalecer durante esse caminho trilhado.

Aos meus pais Estácio e Diacuí, por nunca desistirem de mim em nenhum momento, me dando uma base de vida, princípios e valores que jamais perderei.

Ao professor Miguel Caro, pela atenção, ensinamento, apoio e amizade.

Ao Professor Ademir Farias Morel, por fornecer as amostras estudadas.

Aos meus amigos Priscila, Edson, Tânia, Henrique, Guilherme, Samuel, e Helena, que de uma maneira especial, estiveram do meu lado nesses últimos momentos.

Aos professores que compõe a banca por aceitarem o convite.

À Central de Análises, em especial Eliane, pelas análises feitas e espaço utilizado.

Ao professor Jorge Alejandro Palermo do Instituto de Química da UBA pelas análises feitas em RMN de 500MHz.

Ao CNPQ e CAPES pelo suporte financeiro.

À UFSC e aos professores que fizeram a diferença na minha formação não tão somente pelo ensino, mas pela amizade formada.

RESUMO

Os alcaloides ciclopeptídicos Adoutina-X, Condalina-A e Discarina-C tiveram as configurações relativas e absolutas para os carbonos C-3 e C-4 determinadas através de métodos mono (^1H e ^{13}C) e bidimensionais (COSY, HSQC, NOESY) de RMN juntamente com análise por difração de raios-x para a Condalina-A e Discarina-C. Os dados de RMN juntamente com valores de acoplamento e deslocamentos químicos auxiliaram também nas relações entre as conformações das moléculas em solução. Estudos do efeito do campo magnético sobre a Adoutina-X foram feitos, aplicando uma análise geral para alcaloides desta classe. Além disso, foi feita análise do efeito do solvente e temperatura sobre a Condalina-A utilizando CDCl_3 e $\text{DMSO}-d_6$, observando os efeitos sobre as ligações de hidrogênio da molécula e seus deslocamentos químicos.

Palavras-chave: *Condalina-A, Adoutina-X, Discarina-C, alcaloides ciclopeptídicos, RMN, raios-x.*

ABSTRACT

The cyclopeptides alkaloids Adoutine-X, Condaline-A and Discarine-C had their relative and absolute configurations for carbons C-3 and C-4 were determined by single (^1H e ^{13}C) and two-dimensional (COSY, HSQC, NOESY) NMR methods along with diffraction of x-rays to Condaline-A and Discarine-C. NMR data together with values of chemical shifts and coupling also assisted in the relationship between the conformations of the molecules in solution. Studies of the magnetic field effect on the Adoutina-X were made by applying a general analysis of alkaloids of this class. Furthermore, analysis of the solvent and temperature effect on the Condalina-A using CDCl_3 and DMSO-d_6 , observing the effects on the hydrogen bonds of the molecule and its chemical shifts were realized.

Keywords: *Condaline-A, Adoutine-X, Discarine-C, cyclopeptides alkaloids, NMR, X-rays.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
COSY	Correlated spectroscopy
DC	Dicroísmo circular
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplodupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
HMBC	Heteronuclear multiple Bond coherence
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
mg	Miligramas
mL	Mililitro
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
ppm	Partes por milhão
TMS	Tetrametilsilano
T.M.	Tempo de mistura para NOESY
δ	Deslocamento químico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas gerais dos alcalóidesciclopeptídicos 4(13)-, 5(13)-, 4(14)-, 5(14)-, 4(15)-membros.....	23
Figura 2 – Possíveis aminoácidos precursores dos alcaloides ciclopeptídicos.....	24
Figura 3 – Estrutura geral dos ciclopeptídicosdividida em unidades..	25
Figura 4 – Alcaloides ciclopeptídicosdiastereoisoméricos.....	27
Figura 5 – Magnitude do valor de J em função do ângulo diedro.....	28
Figura 6 – Modelos de configurações relativas <i>eritroe treo</i>	29
Figura 7 - Estrutura da Adoutina-X, Condalina-A e Discarina-C.....	31
Figura 8 – Estrutura da Adoutina-X.....	32
Figura 9 – Estrutura da Condalina-A.....	35
Figura 10 - Estrutura da Discarina-C.....	38
Figura 11 – Gráfico da variação de energia (separação de spins) em função do campo magnético aplicado.....	40
Figura 12 – Variação na intensidade do campo para o 2-metil-2-butanol, δ plotado em Hz.....	41
Figura 13 – Estruturas da Discarina B e Franganina.....	42
Figura 14 – Espectro expandido de RMN de ^1H da Discarina-C $\delta = 4,70\text{-}6,20$ ppm. (CDCl_3 , 400 MHz).....	51
Figura 15 – Espectro expandido de RMN de COSY da Discarina-C. (CDCl_3 , 400 MHz).....	52
Figura 16 – Espectro expandido de RMN de HSQC da Discarina-C. (CDCl_3 , 400 MHz).....	53

Figura 17 – Espectro expandido de RMN de NOESY da Discarina-C. (CDCl ₃ , 400 MHz).....	54
Figura 18 – Estrutura do sal da Discarina-C obtida através da difração de raios-x.....	56
Figura 19 - Estrutura do alcaloide Adoutina-X.....	57
Figura 20 – Espectro de RMN de ¹ H da Adoutina-X. (CDCl ₃ , 500 MHz).....	58
Figura 21 – Espectro de RMN de ¹ H da Adoutina-X. (CDCl ₃ , 400 MHz).....	59
Figura 22 – Espectro de RMN de ¹ H expandido da Adoutina-X δ = 0,67-1,33 ppm. (CDCl ₃ , 400 MHz).....	60
Figura 23 – Espectro de RMN de ¹ H expandido da Adoutina-X δ = 0,65-1,35 ppm. (CDCl ₃ , 500 MHz).....	61
Figura 24 – Espectro de RMN de ¹ H expandido da Adoutina-X δ = 5,6-8,0 ppm. (CDCl ₃ , 400 MHz).....	62
Figura 25 – Espectro de RMN de ¹ H expandido da Adoutina-X δ = 5,6-8,0 ppm. (CDCl ₃ , 500 MHz).....	63
Figura 26 Espectro de RMN de ¹ H expandido da Adoutina-X δ = 7,02-7,22 ppm. (CDCl ₃ , 400 MHz).....	64
Figura 27 – Espectro expandido de RMN de ¹ H da Adoutina-X δ = 6,8-7,4 ppm. (CDCl ₃ , 500 MHz).....	65
Figura 28 –Espectro expandido de RMN de COSY da Adoutina-X para 500 e 400 MHz. (CDCl ₃).....	67
Figura 29 –Espectro expandido de RMN de HSQC da Adoutina-X δ ₁ = 6,0-7,4 ppm e δ ₂ = 110-135 ppm. (CDCl ₃ , 500 MHz).....	68
Figura 30 –Espectro expandido de RMN de NOESY da Adoutina-X δ =3,8-8,0 ppm. (CDCl ₃ , 500 MHz).....	69

Figura 31 –Estrutura da Adoutina-X e interações espaciais dos hidrogênios aromáticos.....	70
Figura 32 –Espectro expandido de RMN de ¹ H da Adoutina-X. (CDCl ₃ , 500 MHz).....	72
Figura 33 –Espectro expandido de COSY da Adoutina-X, δ= 3,5 a 8,5 ppm.(CDCl ₃ , 500 MHz).....	73
Figura 34 – Espectro expandido de HSQC da Adoutina-X, δ= 2,6 a 5,3 ppm.(CDCl ₃ , 500 MHz).....	74
Figura 35 – Curva de Karplus.....	75
Figura 36 –Espectro de NOESY da Adoutina-X, δ= 1,0 a 8,0 ppm.(CDCl ₃ , 500 MHz).....	76
Figura 37 –Espectro expandido de NOESY da Adoutina-X δ= 4,0 a 8,0 ppm.(CDCl ₃ , 500 MHz).....	77
Figura 38 –Interações espaciais NOESY de H-3 e H-4 para Adoutina-X.....	78
Figura 39 –Espectro de RMN de ¹ H da Condalina-A. (CDCl ₃ , 400 MHz).....	79
Figura 40 –Espectro de RMN de ¹ H da Condalina-A. (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).....	80
Figura 41 – Espectro de RMN de ¹ H da Condalina-A a diferentes temperaturas. (CDCl ₃ , 400 MHz).....	82
Figura 42 – Espectro de RMN de ¹ H da Condalina-A a 25° C. (DMSO- <i>d</i> ₆ /D ₂ O, 400 MHz).....	83
Figura 43 – Estrutura da Condalina-Aprotonada obtida através da difração de raios-x.....	86
Figura 44 – Espectro expandido de RMN de ¹ H da Condalina-A. (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).....	87
Figura 45 – Espectro expandido de RMN de COSY da Condalina-A. (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).....	88

Figura 46 – Espectro expandido de RMN de HSQC da Condalina-A. (DMSO-*d*₆, 400 MHz).....89

Figura 47 – Espectro de RMN de NOESY da Condalina-A. (DMSO-*d*₆, 400 MHz).....90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C para a Adoutina-X.....	33
Tabela 2 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C para a Condalina-A.....	36
Tabela 3 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C para a Discarina-C.....	38
Tabela 4 - Deslocamentos químicos de ^1H em RMN da Discarina B e Franganina em $\text{DMSO-}d_6$ e CDCl_3	43
Tabela 5 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e métodos 2D na determinação dos hidrogênios aromáticos.....	71
Tabela 6 - Deslocamentos químicos de ^1H em RMN da Condalina-A em $\text{DMSO-}d_6$ e CDCl_3	85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Alcalóides.....	22
1.1.1 <i>Alcalóidesciclopeptídicos</i>.....	22
1.1.1.1 <u>Alcalóidesciclopeptídicos de 14-membros</u>..	25
1.1.2 <i>Atividades Biológicas</i>.....	26
1.2 Métodos Espectroscópicos.....	26
1.3 Elucidação Estrutural.....	26
1.4 Adoutina-X.....	31
1.5 Condalina-A.....	34
1.6 Discarina-C.....	37
1.7 Efeito do Campo Magnético nos Alcaloides Ciclopeptídicos.....	40
1.8 Efeito do Solvente no deslocamento químico...42	
2 OBJETIVOS.....	45
2.1 Objetivo Geral.....	45
2.1.1 <i>Objetivos específicos</i>.....	45
3 METODOLOGIA.....	47
3.1 Obtenção da Amostra.....	47
3.2 Preparação da Amostra.....	47
3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C.....	47
3.4 Dados relativos à Adoutina-X, Condalina-A e Discarina-C.....	48

3.4.1 Adoutina-X.....	48
3.4.2 Condalina-A.....	49
3.4.3 Discarina-C.....	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
4.1 Análise por NOESY e difração de raios-X da Discarina-C.....	51
4.2 Efeito do Campo Magnético aplicado à Adoutina-X.....	56
4.3 Determinação dos H's aromáticos da Adoutina- X.....	65
4.4 Análise por NOESY e determinação da configuração relativa da Adoutina-X.....	71
4.5 Condalina-A em DMSO-d ₆ e CDCl ₃	78
4.6 Análise por NOESY e difração de raios-X da Condalina-A.....	85
5 CONCLUSÕES.....	93
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

A química dos produtos naturais (QPN) tem uma grande importância no meio científico. Mesmo com o desenvolvimento da química orgânica sintética, a QPN não perdeu seu valor, devido em grande parte, a complexidade de se obter sinteticamente os compostos ativos (estruturas com grandes dimensões e complexas).

Desde os primórdios, o uso de plantas como forma terapêutica é conhecido, propagando-se através dos tempos pela cultura popular. Estas plantas são de grande importância, devido a sua composição, onde encontramos compostos ativos distribuídos, quase que em toda sua estrutura (raiz, caule, casca, folhas, etc.). Estes “ativos” são quase que na sua totalidade, produtos de metabolismo secundário (transformações bioquímicas que não estão ligadas diretamente a manutenção da vida, geração de novas células e energia, mas sim a sua defesa, proteção, dispersão de sementes, etc.).

Os metabólitos secundários são únicos e específicos para cada espécie de vegetais, representando a individualidade química de cada uma. Como exemplo temos: alcalóides, flavonóides, taninos, pigmentos, ceras, entre outros. Dentre estas classes os alcalóides têm uma grande importância medicinal, destacando dentro do grupo de alcaloides ciclopeptídicos, os ciclopeptídicos de 14 membros.

A determinação e análise estrutural dos metabólitos secundários ativos são de grande importância, podendo auxiliar na compreensão da relação atividade biológica/estrutura, e no planejamento de produtos sintéticos com tais atividades entre outras aplicações de grande importância. Este trabalho tem como enfoque o estudo dos alcaloides ciclopeptídicos extraídos, por exemplo, de plantas como a *Scutia Buxifolia* Reiss, pertencente à família Rhamnaceae, nativa da América do Sul. Estes alcaloides tornaram-se objetos de aprofundados estudos nas últimas décadas pela sua larga utilização na medicina popular e pelas várias atividades biológicas tais como: bactericida, antiplasmódico, antiinflamatório, diurético, entre outros.¹

Para o estudo estrutural destes alcaloides pode-se utilizar vários métodos espectroscópicos e quando possível cristalográficos. Um dos mais eficientes e importantes é o de ressonância magnética nuclear. As variadas técnicas de RMN mono e bidimensionais são ferramentas indispensáveis na determinação estrutural, no caso específico deste

trabalho, na determinação da estereoquímica de partes de alcalóides ciclopeptídicos, como a Adoutina X e Condalina-A e a Discarina-C.

1.1 Alcalóides

Alcalóides podem ser definidos como substâncias de caráter básico, classificados de acordo com sua estrutura, segundo o grupo amina contido nestas estruturas^{2,3,4}. A grande maioria dos alcalóides é isolada de plantas, mas é possível encontrar estes compostos em esponjas, fungos, sapos, entre outros. Segundo Pelletier (1983), “Um alcalóide é uma substância orgânica cíclica contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos.”

Os alcalóides são classificados em três grupos: alcalóides verdadeiros (são aqueles em que o nitrogênio faz parte do heterociclo e sua biossíntese é proveniente de aminoácido), prótoalcalóides (se originam de aminoácidos, mas o nitrogênio não faz parte do heterociclo) e pseudo-alcalóides (tem características de alcalóides, bases nitrogenadas, mas não se originam de aminoácidos e sim de terpenos ou esteróis, por exemplo)^{5,6}.

1.1.1 *Alcaloides ciclopeptídicos*

Os alcalóidesciclopeptídicos são compostos com bases poliamídicas, encontrados em diversas plantas⁷. Esta classe é classificada conforme o número de átomos que fazem parte do macrociclo, 13-, 14-, 15-membros, onde fazem parte da estrutura genérica dois aminoácidos e uma unidade de estirilamina⁸. (Figura 1)

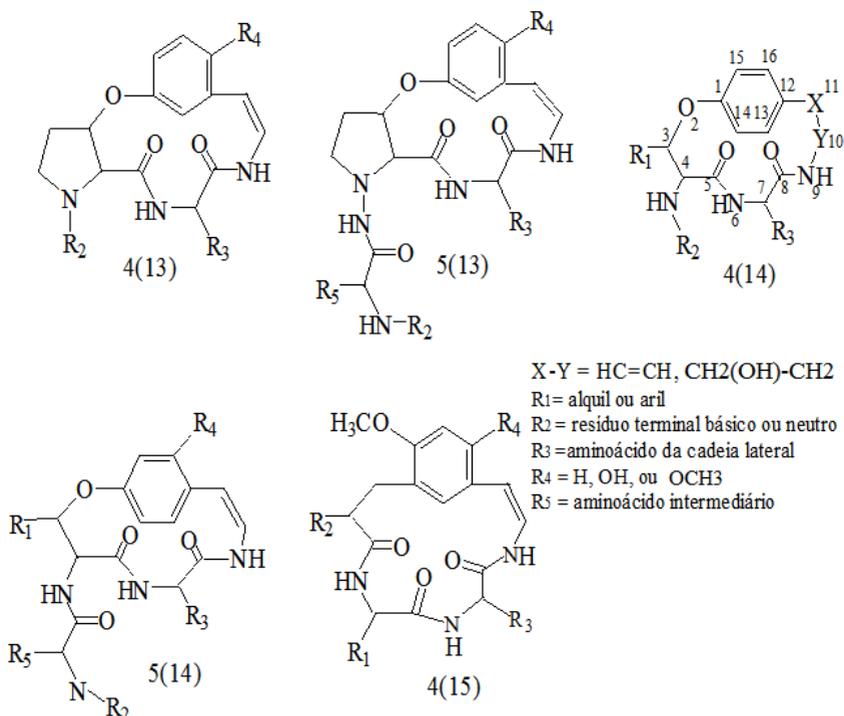
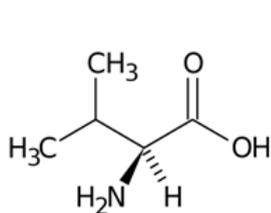


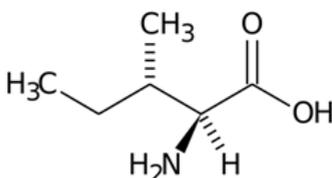
Figura 1 – Estruturas gerais dos alcalóidesciclopeptídicos 4(13)-, 5(13)-, 4(14)-, 5(14)-, 4(15)-membros.

A biossíntese dos alcalóidesciclopeptídeos não é relatada na literatura, mas se tem evidências conseguidas dos seus precursores, de que na formação dos ciclopeptídeos há uma etapa anterior de formação de tetra peptídeos e posteriormente a ciclização.⁹Baig et al. (1993), através de estudos do metabolismo secundário em plantas da espécie *Ceanothus americanus*(Rhamnaceae), relatou a formação de tetra peptídeos. Foi usado uma mistura de aminoácidos, valina, leucina, isoleucina, tirosina, fenilalanina e triptofano (Figura 2), obtendo uma série de novostetra peptídeos Phe-Phe-Ile-Tyr, Phe-Phe-Leu-Tyr, Ile-Leu-

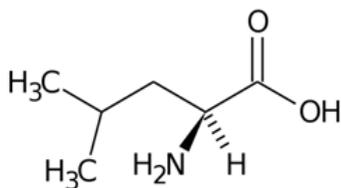
Leu-Tyr, Val-Leu-Leu-Tyr, podendo ser estes os precursores dos alcalóides adouetina Y, ceanotina E, frangulanina, americana.¹⁰



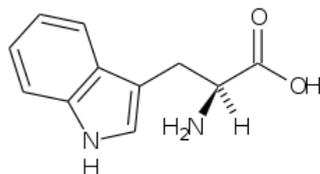
Valina



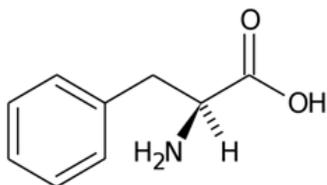
Iso-leucina



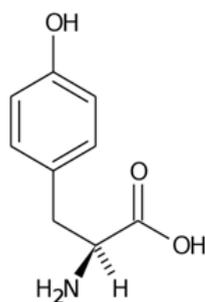
Leucina



Triptofano



Fenilalanina

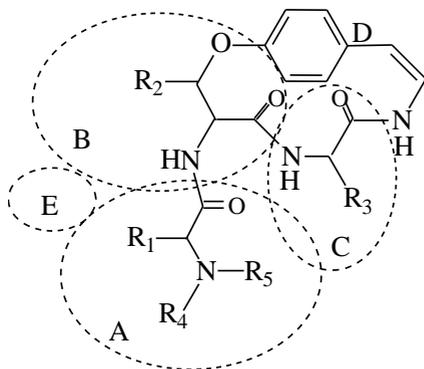


Tirosina

Figura 2. Possíveis aminoácidos precursores dos alcalóides ciclopeptídicos.

1.1.1.1 Alcalóides ciclopeptídicos de 14-membros

O interesse em se estudar a química desta classe de alcalóides está relacionado com a suas diversas atividades biológicas, as que levaram a estudos sintéticos, espectroscópicos, conformacionais e configuracionais^{11,12,13,14}, e dentre estes um interesse em especial aos que possuem anel macrocíclico de 14-membros⁷. Sua estrutura é composta de bases poliamídicas macro cíclicas definidas por um α -aminoácido, um β -hidróxi aminoácido (3-hidróxi prolina, 3-hidróxileucina ou β -fenilserina) e um aminoácido N-terminal básico mono ou dimetilado formando o macro ciclo com um derivado não aminoácido da tirosina (p-hidróxiestirilamina) (Figura 3). Sua importância se dá por dois motivos principais: sua abundância é relativamente maior do que os macrociclos de 13- e 15-membros e de encontrar-se ainda, somente este tipo de alcaloide no Brasil, mesmo assim sua abundância total é muito pequena (rendimento quase sempre menor que 1% em plantas secas).⁹



A= aminoácido terminal básico

B = β -hidróxi aminoácido

C = aminoácido ligado ao anel

D = unidade hidróxiestirilamina

E = aminoácido adicional

Figura 3 – Estrutura geral dos ciclopeptídicos dividida em unidades.

1.1.2 Atividades Biológicas

Muitas plantas são usadas na medicina popular, dentre elas as Rhamnáceas, as que na sua grande maioria apresentam alcalóidesciclopeptídicos. Como exemplo o gênero *Zizyphus* é usado tradicionalmente como: sedativo, antimicrobiano, hipoglicêmico, antiplasmódico, anti-infeccioso, anti-diabético, diurético, anticonvulsionante, analgésico e antiinflamatório. Estes alcalóides têm uma variedade imensa de atividades biológicas, dentre elas antimicrobiano, imunoestimulante, inseticidas, sedativos.^{8,15}

1.2 Métodos Espectroscópicos

Além de se conhecer as constantes físicas e químicas de compostos, pode-se compreender um pouco mais sobre as substâncias e suas características, e para isto, os métodos espectroscópicos são grandemente utilizados, na determinação, identificação e quantificação estrutural. Dentre estes métodos temos espectroscopia no ultravioleta (UV-Vis), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM), atividade óptica, e para casos mais particulares, como estruturas mais complexas de produtos naturais e organometálicos, temos a difração de raios-X.

1.3 Elucidação Estrutural

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é muito utilizada na elucidação estrutural de alcalóidesciclopeptídicos, com o auxílio das técnicas de 2D. Os experimentos mais largamente utilizados na elucidação de produtos naturais são: COSY, NOESY, HSQC e HMBC.¹⁶ Muitas outras técnicas são utilizadas para elucidação como análise por difração de raios-X, espectrometria de massa (MS), UV, IV, DC, entre outros.

Espectros de RMN ¹H, foram utilizados para confirmação de estruturas de alcaloides, principalmente em 1967. No alcalóidecrenatina

A, fez-se a identificação da estrutura com poucas atribuições de hidrogênio.¹⁷

A discarina B, por exemplo, foi isolada e feita sua elucidação somente com o espectro monodimensional de carbono RMN ¹³C.¹⁸

As técnicas de 2D também são importantes na determinação de estruturas, como no estudo da discarina L, onde foi usado o espectro de COSY para atribuição dos sinais de hidrogênio do macrociclo.^{19,20}

Para que a síntese desses metabólitos secundários, com interesse biológico, seja possível, se deve conhecer a estereoquímica dos carbonos assimétricos e da conformação da molécula.

Muitas vezes estes alcaloides, apresentam diastereoisômeros, como no caso da scutianina D e scutianina E, que apresentaram deslocamentos diferentes para os carbonos α e β da β -hidroxileucina da unidade β -hidróxi aminoácido. Assim, sugeriu-se que estas moléculas eram diastereoisômeras²¹, representadas na Figura 4.

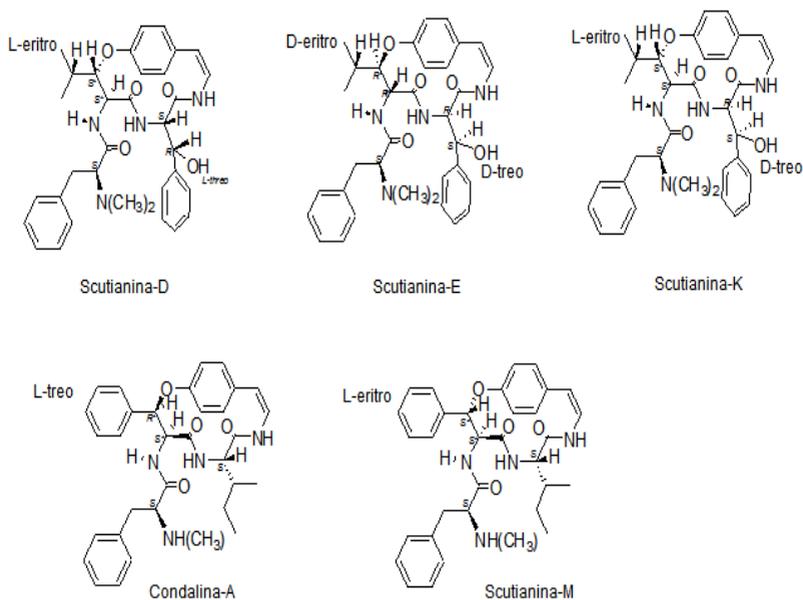
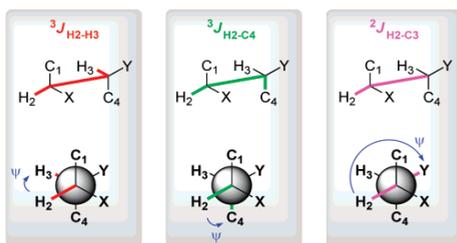


Figura 4 – Alcaloides ciclopeptídicosdiastereoisoméricos.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C , também são importantes para estabelecer a configuração relativa e absoluta do β -hidróxiaminoácido. Um método muito utilizado pelos grupos de pesquisa para determinação da estereoquímica absoluta das unidades dos aminoácidos presentes nos alcaloides ciclopeptídicos é a cromatografia gasosa enantiosseletiva, mas esta ferramenta não permite a determinação da unidade β -hidróxiaminoácido, pois ocorre a decomposição da mesma durante o processo de hidrólise ácida, motivo pelo qual se utiliza os dados de RMN.²²

As constantes de acoplamento vicinal entre hidrogênios ($^3J_{\text{HH}}$), nos fornecem informações sobre o ângulo diedro entre os hidrogênios que acoplam.²³ Na Figura 5, podemos observar a relação entre o ângulo diedro e a dimensão entre esses acoplamentos, separados em pequenos, médios ou grandes.



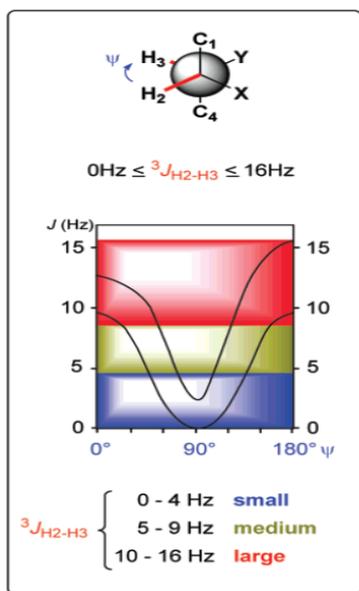


Figura 5 – Magnitude do valor de J em função do ângulo diedro.²⁴

Através destas análises, podem-se obter dois tipos de configurações relativas, *treo* e *eritro*. (Figura 6)

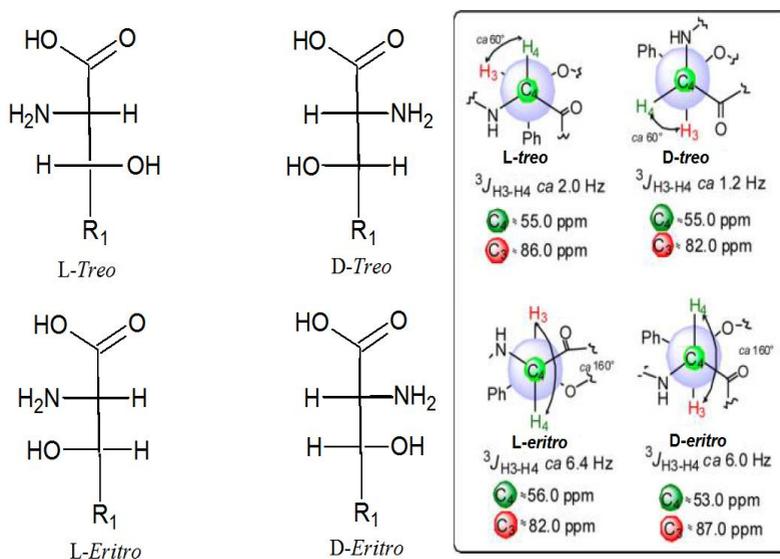


Figura 6 – Modelos de configurações relativas *eritro* e *treo*.²⁵

Para alcaloides que possuem uma constante de acoplamento entre os hidrogênios 3 e 4 de 8 Hz ($J_{\alpha\beta} = 8$ Hz), é visto uma configuração *eritrona* unidade β -hidroxiaminoácido, e para compostos *treo*, um valor de acoplamento de 2 Hz ($J_{\alpha\beta} = 2$ Hz). Para determinação da configuração absoluta dessa unidade β -hidroxi aminoácido pode-se também utilizar a espectroscopia de RMN de ^{13}C . Para a série *L-eritro* o sinal de carbono alfa (C_4) é observado em 55 ppm e o *D-eritro* observado em 53,8 ppm. Para o carbono beta (C_3) para *L-eritro*, aparece em 81,5 ppm e para configuração *D-eritro* aparece em um campo mais baixo, 87 ppm.²⁴ Para a série *D-treo* o carbono $C-3$ é observado em 82,0 ppm enquanto o $C-4$ aparece em 55,0 ppm. Na série *L-treo*, o carbono alfa $C-3$ aparece em 86,0 ppm enquanto $C-4$ é observado em 55,0 ppm.²⁵

Outra técnica que pode ser de grande utilidade na atribuição da estereoquímica é o uso de experimentos de RMN que avaliam o efeito nuclear de Overhauser. Este efeito (uma interação dipolo-dipolo) pode ser detectado em hidrogênios próximos espacialmente, numa distância

de até 5 Å independentemente de acoplarem escalarmente (interação spin-spin). Na modalidade 2D deste experimento (NOESY) existe a possibilidade de hidrogênios fortemente acoplados no espectro de COSY, mostrarem estes sinais de cruzamento como artefato no NOESY.²⁶ Para eliminar estes inconvenientes podem ser utilizados programas de pulsos específicos (quando disponíveis) ou variação no tempo de mistura.²⁷

Muitos trabalhos em torno da aplicação destas técnicas de RMN para determinação da configuração relativa e/ou absoluta foram realizados, entre eles, um estudo feito com os dados de RMN para a Franganina juntamente com o cristal do seu derivado, mostrou uma configuração absoluta *eritroentre* H-3 e H-4 com um ângulo de 157°.²⁴ Outro estudo foi feito com o sal da scutianina C, verificando a mesma configuração para os hidrogênios H-3 e H-4, neste caso uma configuração relativa e obteve-se um resultado como sendo *L-eritro* com um ângulo de aproximadamente 169°.²⁸

Conhecendo as informações estruturais destes alcaloides ciclopeptídicos, sua estrutura e formas de elucidação, pode-se então a partir delas determinar a estereoquímica de moléculas do mesmo grupo. Neste trabalho as estruturas a serem estudadas serão a Adoutina-X, Condalina-A e Discarina-C.(Figura 7)

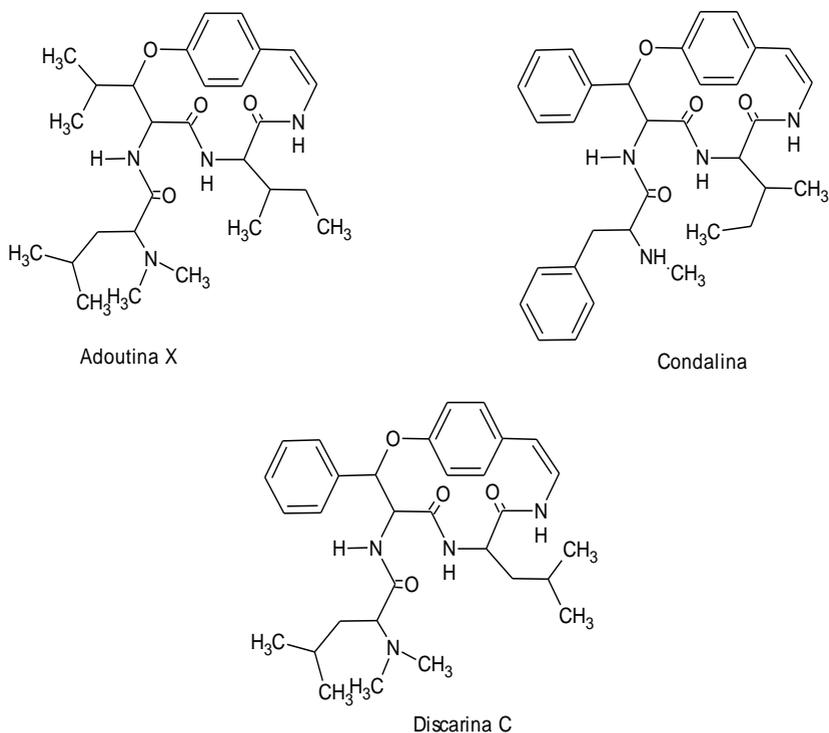


Figura 7 - Estrutura da Adoutina-X, Condalina-A e Discarina-C.

1.4 Adoutina-X

A Adoutina-X (Figura 8), integra o grupo dos alcaloides ciclopeptídicos que apresenta um anel macrocíclico de 14 membros e composto por 4 unidades em sua estrutura, sendo assim denominado de um alcaloide 4(14). Estudos relatam o isolamento deste alcaloide em plantas das espécies *Ceanothus americanus* (Rhamnaceae)^{29,30} e *Waltheria americana* (Sterculiaceae).³¹

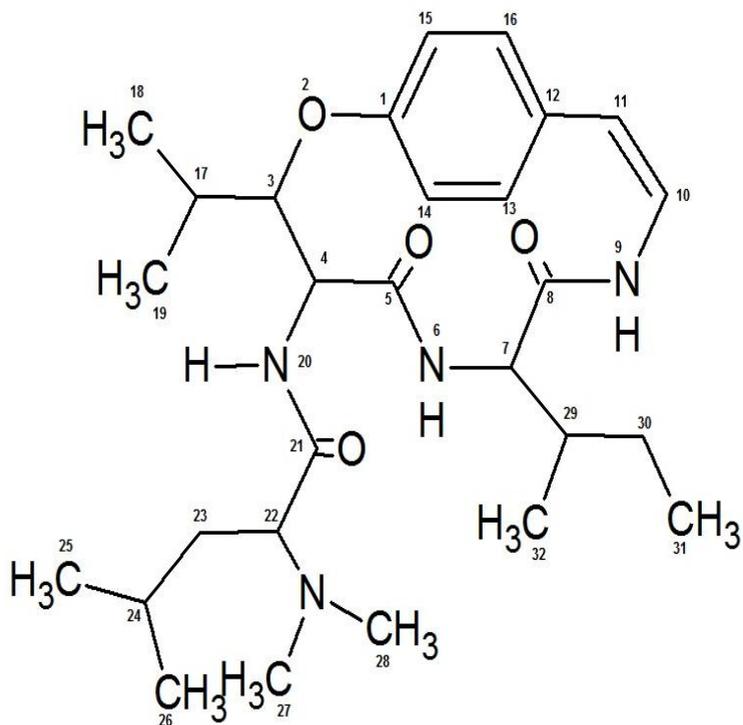


Figura 8- Estrutura da Adoutina-X.

Dados de RMN ^1H e ^{13}C referentes a sua elucidação estrutural estão listados na Tabela 1.³²

Tabela 1 – Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C para a Adoutina-X.

H/C	δ ^1H (ppm)	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	-		156,18
3	4,99	$J_{3,4} = 7,0$ $J_{3,17} = 2,1$	81,79
4	4,77		59,36
5	-		172,11
6	5,86		-
7	3,98		55,37
8	-		167,07
9	6,41		-
10	6,64		125,80
11	6,33		116,63
12	-		131,98
13	7,02-7,24	Aromáticos	130,12
14	7,02-7,24	$J_{\text{orto}} = 7,8$ $J_{\text{meta}} = 2,8$	122,66
15	7,02-7,24		123,09
16	7,02-7,24		131,79
17	1,94		19,04
18	1,25		15,14
19	0,98		11,70
20	7,63		-
21	-		173,87
22	2,81		29,70

23	1,35/1,60	34,88
24	1,79	26,25
25	0,86	21,83
26		21,83
27	2,22	41,94
28	2,22	41,94
29	2,09	-
30	1,21/1,30	35,29
31	0,80	15,94
32	0,71	20,36

Dados: 400,1 e 100,2 MHz, CDCl₃.³²

1.5 Condalina-A

A Condalina-A (figura 9), faz parte do grupo dos alcaloides ciclopeptídicos apresentando um anel macrociclo de 14 membros e é composta por 4 unidades básicas, fazendo parte do grupo 4(14). Esse alcaloide foi isolado pela primeira vez da espécie *Condaliabuxifolia*, pertencente à família Rhamnaceae juntamente com outros alcaloides já conhecidos.³³

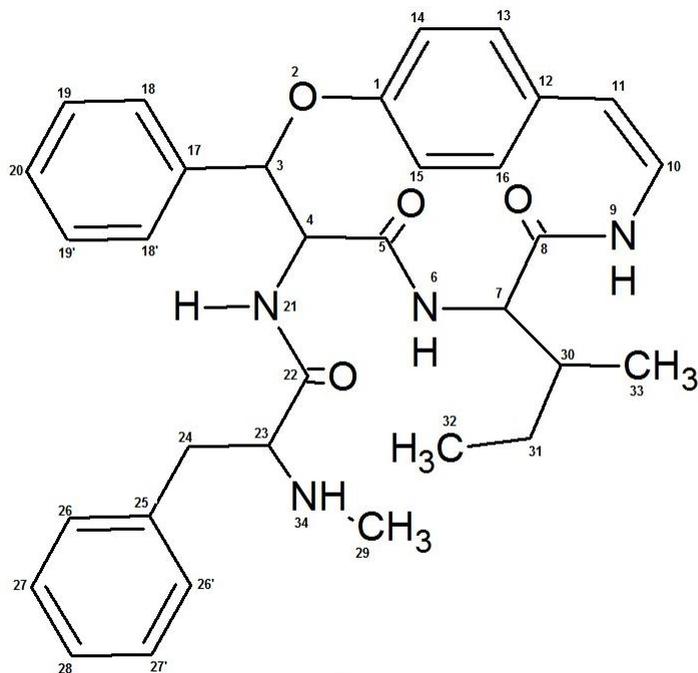


Figura 9- Estrutura da Condalina-A.

A elucidação estrutural desse alcaloide foi realizada através de métodos espectroscópicos de RMN. Na tabela 2 os deslocamentos químicos de ^1H e de ^{13}C .^{33,22}

Tabela 2 – Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C para a Condalina-A.

H/C	δ ^1H (ppm)	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	-		158,6
3	5,75		86,3
4	4,69	$J_{4,21} = 9,2$	55,3
5	-		167,0
6	8,03	$J_{6,7} = 9,0$	-
7	3,95	$J_{7,6} = 9,0$ $J_{7,30} =$ 4,4	56,8
8	-		169,2
9	8,49		-
10	5,96	$J_{10,11} = 7,3$ $J_{10,9} =$ 9,0	131,4
11	6,74	$J_{11,10} = 7,3$	126,9
12	-		132,4
13	7,00		129,4
14	6,93		124,4
15	7,14		119,8
16	6,91		121,7
17	-		139,7
18	7,58		126,0
19	7,34		127,6
20	7,24		127,0
21	8,76	$J_{21,4} = 9,3$	-
22	-		176,6

23	3,85	$J_{23,24} = 5,6$	$J_{23,24}' = 64,5$
		13,6	
24	3,02		39,2
25	-		-
26	7,0-7,5		138,2
27	7,0-7,5		128,0
28	7,0-7,5		129,9
29	1,89		37,6
30	1,33		34,2
31	0,92/1,29		24,4
32	0,78	$J_{33,30} = 6,5$	15,2
33	0,75	$J_{32,33} = 6,5$	10,8

Dados: 400,1 e 100,2 MHz, DMSO- d_6 .^{33,22}

1.6 Discarina-C

A Discarina-C (Figura10), também faz parte do grupo dos alcaloides ciclopeptídicos de 14 membros 4(14). Esse alcaloide foi isolado pela primeira vez da espécie *Discaria febrífuga* pertencente à família Rhamnaceae. Posteriormente isolada também da espécie *Discaria americana*. Dados da literatura para os deslocamentos de RMN de ^1H e ^{13}C estão listados na Tabela 3.³⁴

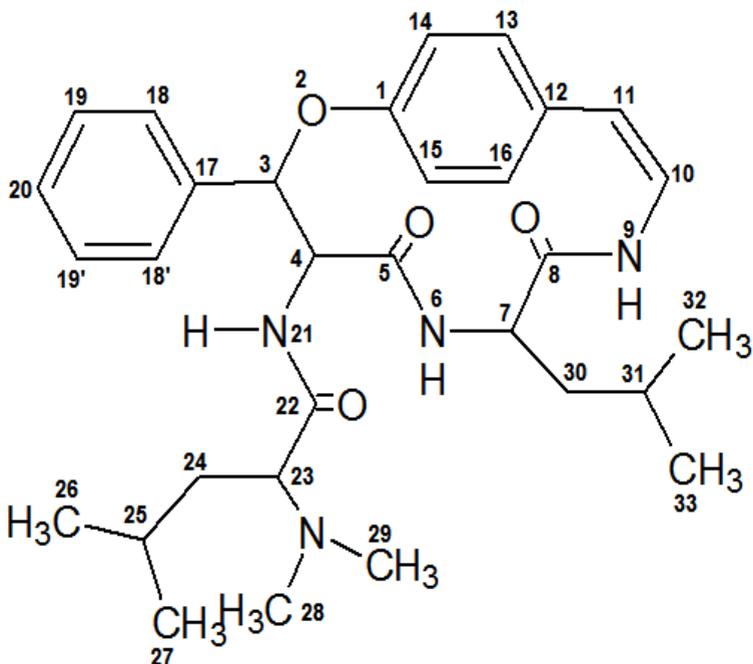


Figura 10- Estrutura da Discarina-C.

Tabela 3 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C para a Discarina-C

H/C	δ ^1H (ppm)	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	-		155,3
3	6,16	$J = 6,4$	81,9
4	4,74	$J = 6,4, 8,8$	55,9
5	-		171,1
6	6,26	$J = 8,0$	
7	4,14		54,0

8	-		167,5
9	6,61	J = 10,4	
10	6,73	J = 7,6, 10,4	125,6
11	6,37	J= 7,6	115,0
12	-		132,7
13	7,12-7,55		123,6-132,1
14	7,12-7,55		123,6-132,1
15	7,12-7,55		123,6-132,1
16	7,12-7,55		123,6-132,1
17	-		137,2
18/18'	7,12-7,55		127,8-129,0
19/19'	7,12-7,55		127,8-129,0
20	7,12-7,55		127,8-129,0
21	7,32		
22			173,8
23	2,61	J= 4,8, 5,2	65,4
24/24'	1,00/1,31		33,7
25	1,23		24,4
26	0,71	J = 6,8	20,5
27	0,79	J = 6,8	21,8
28	1,66		
29	1,66		40,9
30/30'	1,27/1,77		40,9
31	1,61		26,1
32	0,79	J= 6,8	23,2

33	0,87	J= 6,4	22,8
----	------	--------	------

Dados: 400,13 e 100,62 MHz, CDCl_3 .³⁴

1.7 Efeito do Campo Magnético nos Alcaloides Ciclopeptídicos

Sabe-se que o campo magnético (B_0) tem grande influência sobre a qualidade (resolução) e análise de um espectro em RMN, além dos fatores concentração, pureza da amostra, entre outros. Os alcaloides ciclopeptídicos apresentam uma complexidade estrutural elevada, sendo necessária assim, obtenção de espectros que apresentem uma alta resolução.

O fenômeno de ressonância magnética nuclear ocorre quando um campo magnético é aplicado, alinhando os núcleos e induzindo uma absorção de energia modificando a orientação de *spin* em relação ao campo. Ao ser aplicada essa energia através de B_0 , cria-se uma diferença de energia entre os spins ($-1/2$, $+1/2$), diretamente proporcional ao campo magnético.³⁵ (Figura 11)

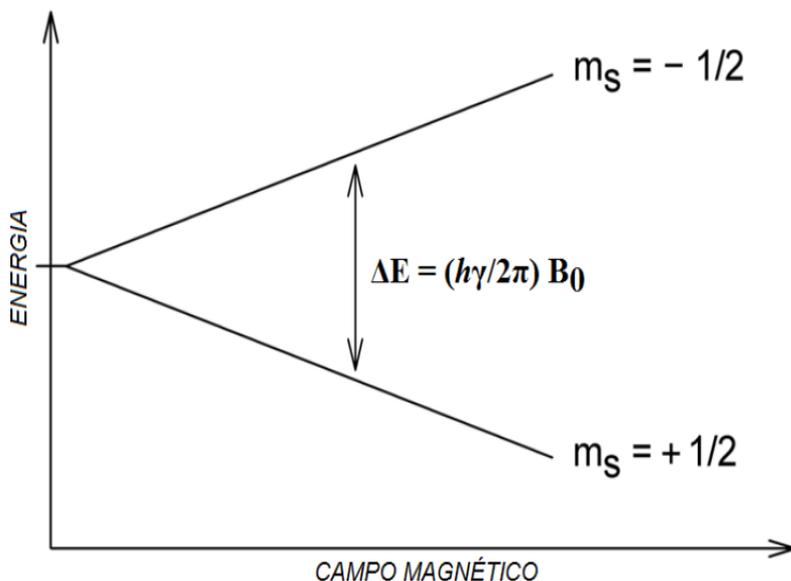


Figura 11– Gráfico da variação de energia (separação de spins) em função do campo magnético aplicado.

Quanto maior a intensidade do campo, maior se dará a separação dos níveis energéticos. Dada então uma energia ao sistema na forma de radiofrequência, ocorre uma transição entre esses níveis, iniciando o processo de ressonância. Essa energia radiada então é captada e transformada em sinais no espectro. Se a energia radiada for alta (maior intensidade de B_0) a sensibilidade do aparelho de RMN será maior, apresentando ao final, espectros com sinais bem definidos, finos e em alta resolução. O aumento da intensidade do campo também melhora a relação sinal/ruído, que, principalmente nos espectros de RMN de 2D, garante uma melhor visualização dos picos de cruzamento mais fracos (como no NOESY), isto é, aumenta a sensibilidade. Para melhor compreensão pode-se comparar como exemplo espectros de um mesmo composto, aplicado a diferentes intensidades de campo magnético (B_0). (Figura 12)

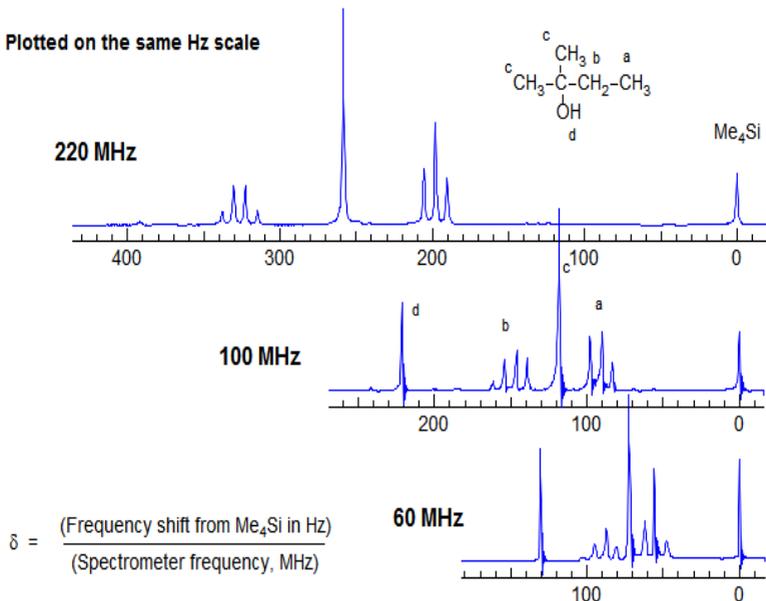


Figura 12 – Variação na intensidade do campo para o 2-metil-2-butanol, δ plotado em Hz.

1.8 Efeito do Solvente no Deslocamento Químico

Sabe-se que na ressonância magnética nuclear o deslocamento químico de hidrogênios e carbonos pode ser afetado por uma série de fatores tais como: presença de átomos eletronicamente carregados (oxigênio, nitrogênio, etc.), interações com solventes, temperatura. Os hidrogênios em específico, ligados a átomos diferentes de carbono, podem sofrer mais com alterações feitas na temperatura, concentração e solventes utilizados. Sabe-se que em muitas estruturas ocorrem ligações de hidrogênio intramoleculares, que diminuem a densidade eletrônica em torno dos hidrogênios causando-lhes uma maior desblindagem. Nestes casos o uso de solventes polares ou apolares deve ser feito com cautela sendo que os mesmos afetam na interação das ligações de hidrogênio. Solventes apolares diminuem a formação de ligações de hidrogênio.³⁶

Solventes apróticos como DMSO-*d*₆desfavorecem a formação de ligação de hidrogênio intramolecular.³⁷

Por isso ao analisarmos compostos iguais em solventes diferentes, como por exemplo, CDCl₃ e DMSO- *d*₆, pode-se observar uma diferença nos deslocamentos químicos principalmente nos hidrogênios amídicos (para os alcaloides ciclopeptídicos). Na Tabela 4pode-se observar estes fatos para a discarina B e Franganina (Figura 13).³⁸

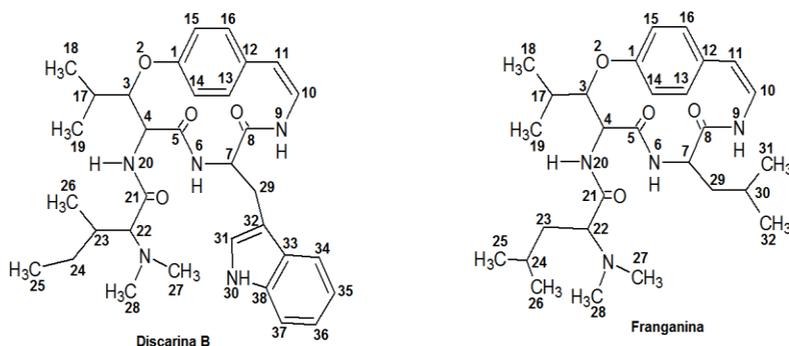


Figura 13– Estruturas da Discarina B e Franganina.

Tabela 4– Deslocamentos químicos de ^1H em RMN da discarina B e franganina em DMSO- d_6 e CDCl_3 .

(ppm)	Discarina B				Franganina			
	δ ^1H	δ ^{13}C						
	CDCl_3		DMSO- d_6		CDCl_3		DMSO- d_6	
3	4,91 dd	81,6	4,90 dd	81,4	5,05	81,94	4,79 dd	82,62
4	4,44 dd	55,7	4,52 dd	54,2	4,51 dd	55,25	4,43 dd	55,21
6	5,96 d		6,50 d		5,91 d		7,56 d	
7	4,26 m	54,3	4,20 m	53,0	4,12 ddd	52,80	3,89 dd	52,11
9	6,13 d		6,85 d		6,53 d		7,02 d	
10	6,48	125,6	6,20 dd	124,7	6,73 dd	125,90	6,37 dd	126,74
11	6,29 d	114,0	6,40 d	122,9	6,42 d	115,98	6,48 d	121,16
17	1,99 m	29,1	2,10 m	27,3	1,98 m	29,52	2,16 m	28,56
18	1,23 d	20,1	1,25 d	21,3	1,33 d	20,60	1,12 d	21,08
19	0,98 d	14,9	1,05 d	13,9	1,03 d	15,19	0,90 d	15,65
20	7,07		7,80 d		7,93 d		8,33 d	
22	2,44 d	74,0	2,63	71,5	2,87 dd	66,27	3,07 dd	64,30

Dado: 400 MHz.³⁵

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da variação de condições experimentais de análises por RMN na determinação da estereoquímica, configuração relativa e/ou absoluta da Discarina-C, Adoutina-X e Condalina-A (C-3 e C-4) e suas conformações.

2.1.1 *Objetivos específicos*

- Avaliar o efeito no aumento da intensidade do campo magnético na qualidade dos dados de RMN obtidas para a Adoutina-X.
- Atribuição dos sinais de RMN de ^1H da Adoutina-X para a região dos aromáticos e confirmação dos respectivos carbonos, utilizando as técnicas mono (^1H e ^{13}C) e bidimensionais (COSY, NOESY e HSQC).
- Comparar os dados teóricos da literatura com os obtidos para a Discarina-C, Condalina-A e Adoutina-X.
- Analisar o efeito da troca de solventes CDCl_3 e $\text{DMSO-}d_6$ nos espectros da Condalina-A, observando as variações de deslocamento químico.
- Comparar as informações obtidas por RMN para a Discarina-C e Condalina-A com a análise cristalográfica por raios-X.

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção da Amostra

As amostras foram gentilmente fornecidas (isoladas e cedidas) pelo Prof. Dr. Ademir Farias Morel, do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN), da Universidade Federal de Santa Maria, através de um projeto de cooperação interinstitucional.

Os alcaloides ciclopeptídicos foram analisados através da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear na central de análise da UFSC (NMR-400) e no Instituto de Química da Universidade de Buenos Aires – Argentina (NMR-500) pelo professor Jorge Alejandro Palermo. Dados já existentes na literatura auxiliaram na atribuição da estereoquímica sendo incorporados dados novos e de suma importância.

3.2 Preparação da Amostra

As análises de RMN foram realizadas utilizando 37 mg de composto em solvente deuterado clorofórmio (CDCl_3) e dimetilsulfóxido (DMSO-d_6), (CIL – Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA) em 0,7 mL de solvente em tubos de 5 mm.

3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram realizados em um espectrômetro Varian Mercury Plus AS400 e em equipamento Bruker AM 500 MHz. As frequências observadas para o ^1H e ^{13}C foram respectivamente 400,1 MHz e 100,32 MHz em aparelho de 400MHz e 500,1 MHz e 125,77 MHz em aparelho de 500 MHz. Para calibração dos espectros foi utilizado como referência interna o TMS 0,01% v/v (δ 0,00) para os espectros de hidrogênio, e para a calibração dos espectros de carbono utilizou-se DMSO-d_6 (δ 39,50) e CDCl_3 (δ 77,00). Os deslocamentos foram registrados em ppm (partes por milhão) e as constantes de acoplamento (J) foram calculadas em Hertz (Hz). Os espectros 1D e 2D foram processados em um software VNMR 6.1 C.

Dados de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C :

^1H a 400 MHz: 32 scans, pulso de observação de 45 graus e tempo entre pulsos de 1s. Interferogramas obtidos com 32 K de memória em transformadas com fator de linha de 0,1 Hz.

^{13}C a 100 MHz: 5000 scans, pulso de observação de 45 graus e tempo entre pulsos de 2 s. Interferogramas obtidos com 65 K de memória de transformadas com fator de linha de 1 Hz.

Medidas de NOESY a 400 MHz: nas condições experimentais de 16 scans, DS = 16, SW = 10 ppm, número de experimentos = 256, LB = 0 Hz em F1 e F2, SI = 2 k, tempo de mistura = 0,2 s.

Medidas de NOESY a 500 MHz: nas condições experimentais de 4 scans, DS = 16, SW = 10 ppm, número de experimentos = 256, LB = 0 Hz em F1 e F2, SI = 2 k, tempo de mistura = 0,2 s.

Medidas de HMBC: nas condições experimentais de 32 scans, DS= 16, SW ^1H = 10 ppm, SW ^{13}C = 240 ppm, número de experimentos = 512, LB= 0 Hz em F1 e F2, SI ^1H = 1 k, SI ^{13}C = 2 k.

Medidas de HSQC a 400 MHz: nas condições experimentais de 32 scans, DS = 16, SW ^1H = 10 ppm, SW ^{13}C = 160 ppm, número de experimentos = 512, LB = 0 Hz em F1 e F2, SI = 2 k.

Medidas de HSQC a 500 MHz: nas condições experimentais de 2 scans, DS = 16, SW ^1H = 10 ppm, SW ^{13}C = 165 ppm, número de experimentos = 512, LB = 0 Hz em F1 e F2, SI = 1 k.

Medidas de COSY a 400 MHz: nas condições experimentais de 2 scans, DS = 4, SW = 10 ppm, número de experimentos = 512, LB = 0 Hz em F1 e F2, SI = 2 k.

Medidas de COSY a 500 MHz: nas condições experimentais de 4 scans, DS = 8, SW = 10 ppm, número de experimentos = 512, LB = 0 Hz em F1 e F2, SI = 2 k.

3.4 Dados relativos à Adoutina-X, Condalina-A e Discarina-C

3.4.1. Adoutina-X: Sólido branco, amorfo de Pf.: 277 – 279 °C; $[\alpha]_D = -316^\circ$ e -370° (em CDCl_3) e Rf.: 0,5 ($\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$, 98:2).

Dados de RMN de ^1H em ppm a 500,1 MHz, em CDCl_3 : δ (ppm) 5,01 (d/d, $J_{3,7} = 2$ $J_{3,4} = 7$, H-3), 4,46 (d/d, $J_{4,3} = 6,85$; $J_{4,20} = 7,2$, H-4), 5,96 (d, $J_{6,7} = 8,0$, H-6), 3,98 (d/d, $J = 8,4$, 4,0, H-7), 6,46 (d, $J_{9,11} = 9,2$, H-9), 6,66 (d/d, $J_{10,9} = 10$ $J_{10,11} = 7,6$, H-10), 6,38 (d, $J_{11,10} = 7,6$, H-11), 7,14 (H-13), 7,06 (m, H-14), 7,07 (m, H-15), 7,20 (H-16), 1,94 (m, H-17), 1,28 (d, $J_{18,17} = 6,8$, H-18), 0,98 (d, $J_{19,17} = 6,8$, H-19), 7,80 (d, $J_{20,4} = 8,8$, H-20), 2,83 (d/d $J = 8,8/6,3$, H-22), 1,60/1,32 (m, H-23), 1,80 (m, H-24), 0,88 (d, $J_{25,24} = 6,4$, H-25), 0,95 (d, $J_{26,24} = 6,4$, H-26), 2,21 (s, H-27), 2,21 (s, H-28), 2,14 (m, H-29), 1,20 (m, H-30), 0,81 (t, $J = 7,2$, H-31), 0,70 (d, $J_{32,29} = 6,8$, H-32).

Dados de RMN de ^{13}C em ppm a 125,77 MHz, em CDCl_3 : δ (ppm) 156,10 (C-1), 81,42 (C-3), 55,08 (C-4), 174,12 (C-5), 59,43 (C-7), 167,21 (C-8), 114,47 (C-10), 116,59 (C-11), 123,40 (C-13), 132,00 (C-14), 130,27 (C-15), 123,00 (C-16), 29,52 (C-17), 20,36 (C-18), 15,03 (C-19), 172,35 (C-21), 66,31 (C-22), 21,92 (C-23), 26,41 (C-24), 21,70 (C-25), 23,16 (C-26), 41,89 (C-27), 41,89 (C-28), 43,10 (C-29), 11,83 (C-31), 15,86 (C-32).

3.4.2 Condalina-A: Sólido branco, amorfo de Pf.: 115 – 116 °C; $[\alpha]_D^{25} = -73^\circ$ (c 0,08 em MeOH) e ($\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$).

Dados de RMN de ^1H em ppm a 400,1 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$: δ (ppm) 5,75 (s, H-3), 4,68 (d, $J_{4,21} = 9,2$, H-4), 8,03 (d, $J_{6,7} = 9,0$, H-6), 3,95 (dd, $J_{7,6} = 9,0$, $J_{7,30} = 4,4$, H-7); 8,49 (NH-9), 5,96 (d, $J_{10,11} = 7,3$; $J_{10,9} = 9,0$, H-10), 6,74 (d, $J_{11,10} = 7,24$, H-11), 7,00 (H-13), 6,93 (H-14), 7,14 (H-15), 6,91 (H-16), 7,58 (H-18), 7,34 (H-19), 7,24 (H-20), 8,76 (d, $J_{21,4} = 9,3$, H-21), 3,85 (dd, $J_{23,24} = 5,6$; $J_{23,24'} = 13,6$, H-23), 3,02 (H-24), 7,0-7,5 (H-26 – H-28), 1,89 (s, H-29), 1,33 (m, H-30), 0,92/1,29 (m, H-31), 0,78 (d, $J_{33,30} = 6,5$, H-32), 0,75 (t, $J_{32,33} = 6,5$, H-33).

Dados de RMN de ^{13}C em ppm a 100,32 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$: δ (ppm) 159,2 (C-1), 87,0 (C-3), 56,0 (C-4), 166,7 (C-5), 57,2 (C-7), 168,4 (C-8), 131,9 (C-10), 127,3 (C-11), 132,8 (C-12), 130,0 (C-13), 125,0 (C-14), 120,2 (C-15), 122,2 (C-16), 139,9 (C-17), 126,5 (C-18), 127,9 (C-19), 127,6 (C-20), 173,0 (C-22), 63,0 (C-23), 38,4 (C-24), 137,0 (C-25),

129,0 (C-26), 129,8 (C-27), 36,9 (C-29), 33,6 (C-30) 24,7 (C-31), 15,6 (C-32), 11,1 (C-33).

3.4.3 Discarina-C: Sólido branco, amorfo de Pf.: 241 – 242 °C; $[\alpha]_D^{20} = -239^\circ$ (c 0,1 em CDCl_3) e Rf.: 0,57 ($\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$, 98:2).

Dados de RMN de ^1H em ppm a 400,1 MHz, em CDCl_3 : δ (ppm) 7.32 (H-21, s), 7.12-7.55 (H-18,18',19,19',20, m), 7.12-7.55 (H-13,14,15,16, m), 6.73 (H-10, dd, $J_{10,11} = 7.6$, $J_{10,9} = 10.4$ Hz), 6.61 (H-9, d, $J_{9,10} = 10.4$ Hz), 6.37 (H-11, d, $J_{11,10} = 7.6$ Hz), 6.16 (H-3, d, $J_{3,4} = 6.4$ Hz), 6.26 (H-6, d, $J_{6,7} = 8.0$ Hz), 4.74 (H-4, dd, $J_{4,3} = 6.4$, $J_{4,21} = 8.8$ Hz), 4.14 (H-7, m), 2.61 (H-23, dd, $J_{23,24} = 4.8$, $J_{23,24'} = 5.2$ Hz), 1.66 (H-28,29, s), 1.77/1.27 (H-30,30', m), 1.61 (H-31, m), 1.31/1.00 (H-24,24', m), 1.23 (H-25, t), 0.87 (H-33, d, $J_{33,31} = 6.4$ Hz), 0.79 (H-27, d, $J_{27,25} = 6.8$ Hz), 0.79 (H-32, d, $J_{32,31} = 6.8$ Hz), 0.71 (H-26, d, $J_{26,25} = 6.8$ Hz).

Dados de RMN de ^{13}C em ppm a 100,32 MHz, em CDCl_3 : δ (ppm) 173.8(C-22), 171.1 (C-5), 167.5 (C-8), 155.3 (C-1), 137.2 (C-17), 132.7 (C-12), 132.1-123.6 (C13-16), 127.8-129.0 (C-18-20), 125.6 (C-10), 115.0 (C-11), 81.9 (C-3), 65.4 (C-23), 55.9 (C-4), 54.0 (C-7), 40.9 (C-28,29), 39.1 (C-30), 33.7 (C-24), 26.1 (C-31), 24.4 (C-25), 23.2 (C-32), 22.8 (C-33), 21.8 (C-27), 20.5 (C-26).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise por NOESY e difração de raios-X da Discarina-C

Utilizando dos dados e das técnicas descritas na literatura para determinação da estereoquímica (relação das constantes de acoplamento e curva de Karplus, interações espaciais, deslocamentos químicos) e conformação para os carbonos C-3 e C-4 e seus respectivos hidrogênios, pode-se determinar a configuração da unidade β -fenilserina de Discarina-C. De acordo com os dados de RMN de ^1H , a constante de acoplamento para os hidrogênios metínicos H-3 e H-4 é de $J_{3,4} = 6,4$ Hz com deslocamentos químicos de 6,16 e 4,74 ppm respectivamente. (Figura 14)

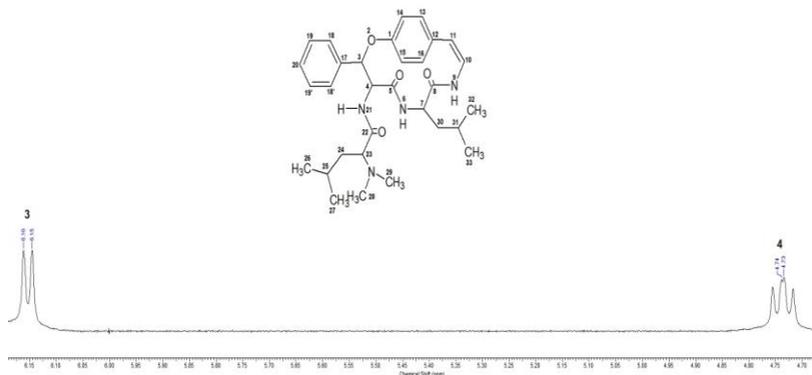


Figura 14- Espectro expandido de RMN de ^1H da Discarina-C $\delta = 4,70\text{-}6,20$ ppm. (CDCl_3 , 400 MHz)

Para confirmação da existência do acoplamento entre estes hidrogênios utilizou-se o espectro de RMN de 2D COSY. (Figura 15)

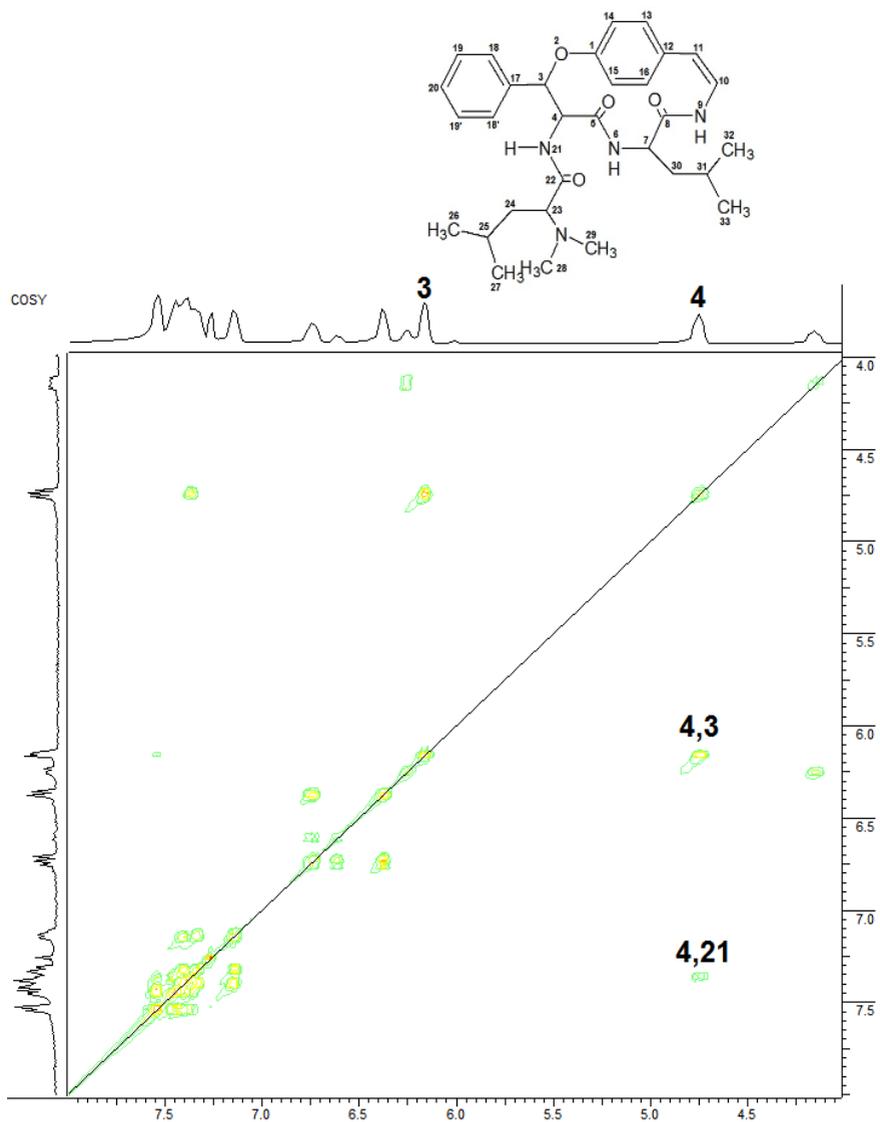


Figura 15- Espectro expandido de RMN de COSY da Discarina-C. (CDCl₃, 400 MHz)

Como esperado, os sinais de cruzamento para H-3 e H-4 aparecem no espectro de COSY e ainda pode ser visto o sinal de H-4 com H-21 ($\delta_{H21} = 7,32$ ppm), concordando com a existência de uma unidade β -fenilserina.

Através do espectro de RMN de 2D de HSQC constata-se que o hidrogênio H-3 está correlacionado com o carbono de $\delta = 81,9$ ppm e H-4 com carbono de $\delta = 55,9$ ppm, o que está de acordo com a literatura para os carbonos C-3 e C-4. (Figura 16)

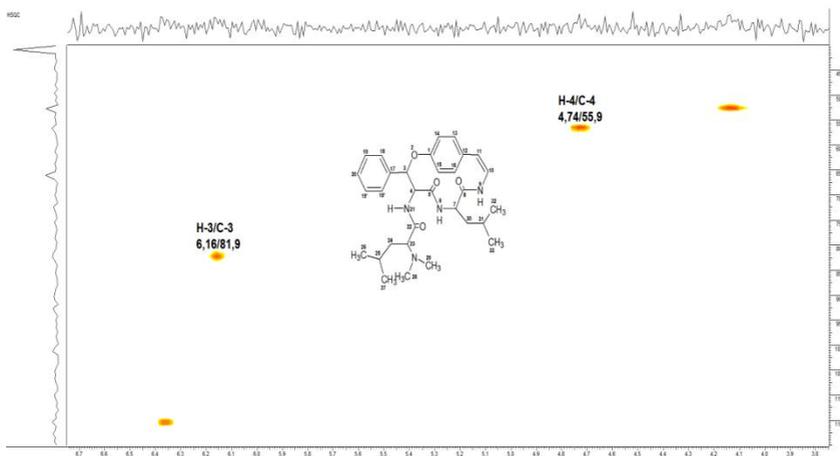


Figura 16- Espectro expandido de RMN de HSQC da Discarina-C. ($CDCl_3$, 400 MHz)

A partir dos dados de deslocamento de C-3 e C-4 (81,9 e 55,9 ppm) e da constante de acoplamento entre H-3 e H-4 de $J = 6,4$ Hz pode-se comparar com os dados teóricos de Karplus constatando-se uma configuração *L-eritro* com duas possibilidades de ângulo diedro de aproximadamente $27,5^\circ$ ou $134,0^\circ$. Para confirmar essa configuração deve-se analisar as correlações espaciais no espectro de NOESY. Além da configuração da unidade e conformação entre os hidrogênios 3 e 4, espera-se observar interações com hidrogênios próximos que participam da unidade β -fenilserina. (Figura 17)

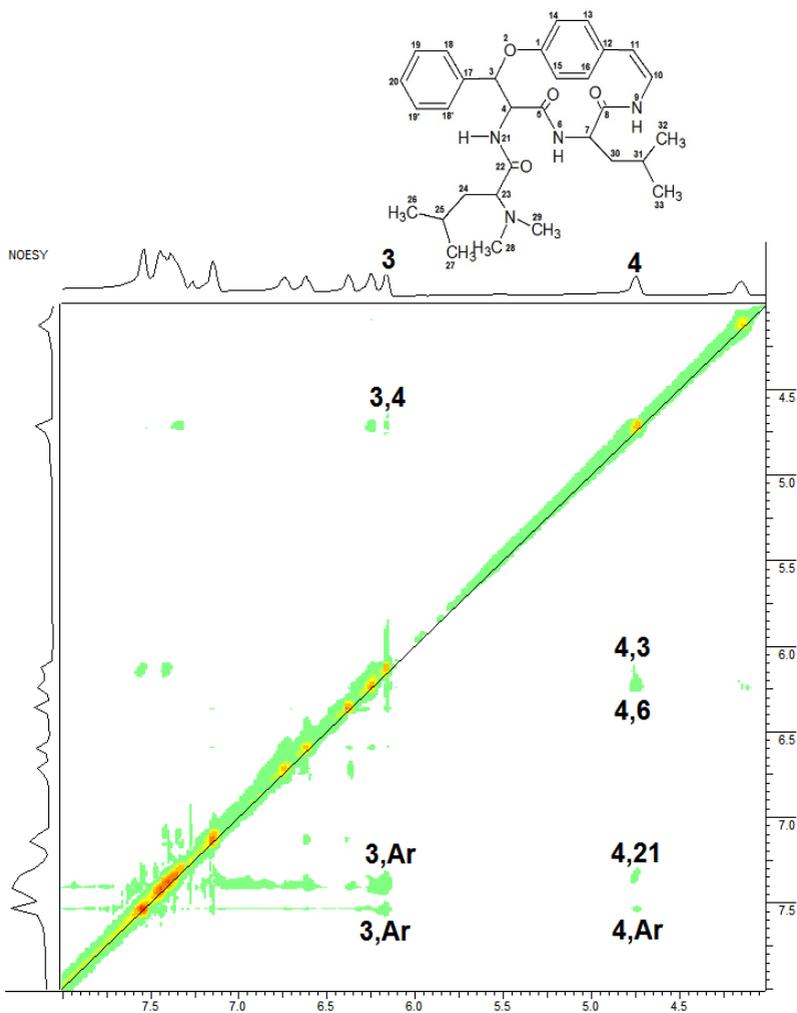


Figura 17- Espectro expandido de RMN de NOESY da Discarina-C. (CDCl_3 , 400 MHz)

No espectro de NOESY deve-se tomar certo cuidado ao determinar o resultado para a configuração da unidade. O esperado para

o espectro de NOESY é que não fosse observado um sinal forte entre H-3 e H-4 para que os resultados teóricos obtidos através da curva de Karplus fossem corroborados. Como pode ser visto na Figura 17, o sinal para estes hidrogênios é bem pouco intenso em relação a outros sinais vistos no espectro. Afirmar que o ângulo diedro para H-3 e H-4 é de $27,5^\circ$ somente porque existe um sinal de NOE é incorreto. Primeiramente não seria coerente com as aproximações teóricas de Karplus um ângulo de $27,5^\circ$ e a configuração *L-eritro*. Mas como são apenas aproximações sem levar em consideração vários fatores físicos e químicos, poderia ser esperado algum tipo de erro. Mas outro fato determinante e que não pode ser esquecido, é a intensidade dos sinais. A intensidade do sinal como já comentado, é bem pequena em relação a outros sinais, por exemplo, entre o hidrogênio metínico H-4 e o hidrogênio amídico H-6, ainda pode ser observado que o corte do espectro foi baixo, apresentando um forte ruído observado na região dos aromáticos. Finalizando, de acordo com o conjunto de dados apresentados, o esperado para a configuração relativa dessa unidade é como sendo *L-eritro* com um ângulo diedro de aproximadamente $138,0^\circ$, sendo que a conformação destes hidrogênios está num equilíbrio *anti/gauche*.

A literatura nos dá informações sobre os dados de raios-X e estrutura (Figura 18) da Discarina-C e assim pode-se obter a configuração absoluta e comparar se a mesma está de acordo com os dados obtidos pelos métodos de RMN.³⁹

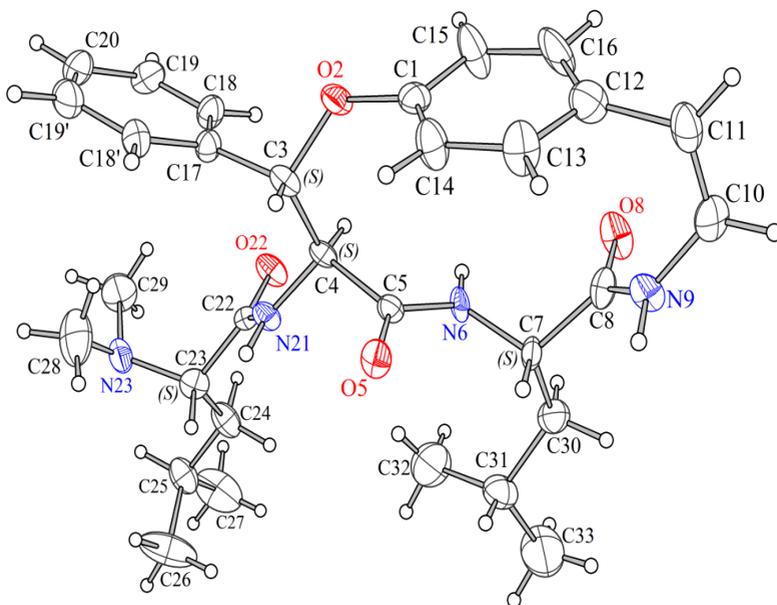


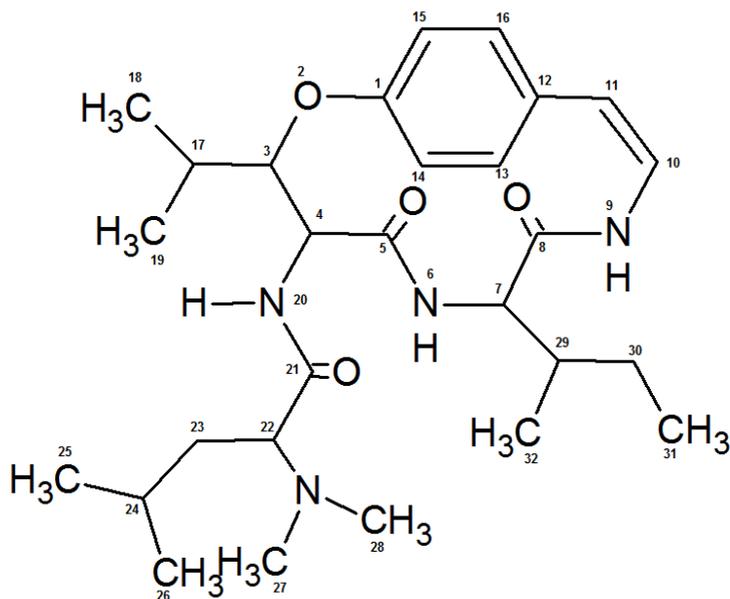
Figura 18 – Estrutura do sal da Discarina-C obtida através da difração de raios-X.³⁹

De acordo com os dados de raios-X, observou-se que os hidrogênios estão numa conformação próxima a *anti*, não foi fornecido o valor de ângulo mas a estrutura apresenta uma configuração *L-eritro*, como o previsto pelos dados de RMN. A distância entre H-3 e H-4 foi de 3,49 Å, uma distância menor que 5 Å, assim, confirmando a presença do sinal de NOESY, além do fato de os hidrogênios estarem numa conformação *anti/gauche*.

4.2 Efeito do campo sobre o alcaloide Adoutina-X

Sabendo do efeito que o campo magnético (B_0) causa na qualidade dos espectros (aumento da resolução e definição), analisou-se

os espectros do alcaloide ciclopeptídico Adoutina X, representado pela Figura 19, com interesse especial nas regiões compreendidas entre $\delta = 0,5-2,5$ ppm (região onde se concentram os hidrogênios metílicos (CH_3), metilênicos (CH_2) e metínicos (CH), e $\delta = 6,7-7,5$ ppm região dos aromáticos.



Adoutina X

Figura 19. Estrutura do alcaloide Adoutina-X.

O espectro de RMN de ^1H da Adoutina-X é mostrado nas figuras 20 e 21, para as frequências de 400 MHz e 500 MHz.

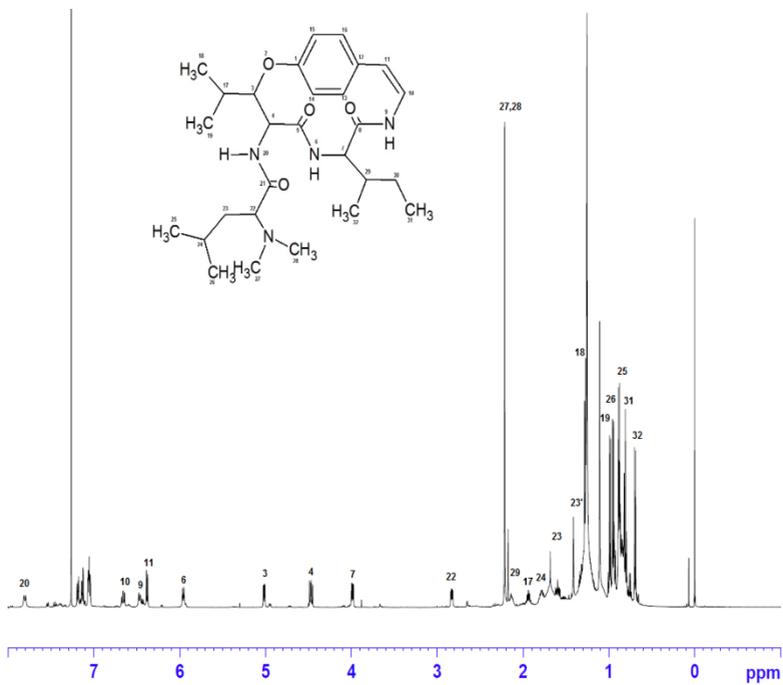


Figura 20 – Espectro de RMN de ^1H da Adoutina-X. (CDCl_3 , 500 MHz)

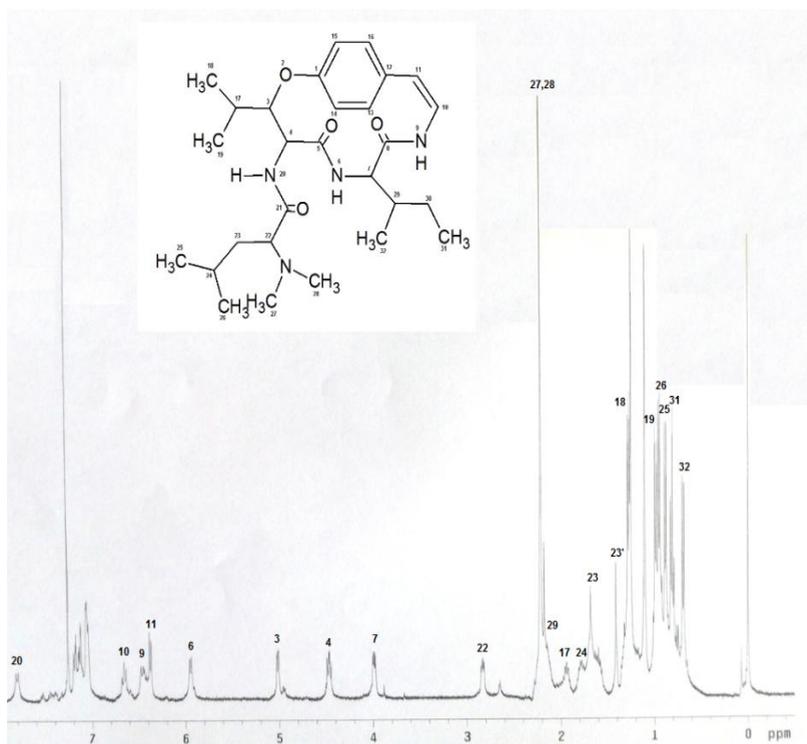


Figura 21 – Espectro de RMN de ^1H da Adoutina-X. (CDCl_3 , 400 MHz)

Dos espectros completos de RMN de ^1H de 500 MHz e 400 MHz, a mudança de campo não afetou significativamente a qualidade dos mesmos num primeiro momento de análise. Percebem-se algumas diferenças como na região dos aromáticos onde há uma melhor separação dos picos e aparentemente uma definição maior dos acoplamentos. Outra diferença visível está na região entre $\delta = 1,4-2,0$ ppm, uma resolução e definição de picos maior para o espectro de 500 MHz, o que era de se esperar. No conjunto, depois desta primeira análise, todos os picos apresentam uma melhor definição, portanto seus acoplamentos devem ser mais bem visualizados e até determinados com maior facilidade.

Através das expansões poderá ser feita uma análise mais detalhada para cada pico e região do espectro. Da região compreendida

entre $\delta = 0,65$ e $1,35$ ppm situam-se basicamente os sinais dos hidrogênios metínicos e metilênicos. (Figuras 22 e 23)

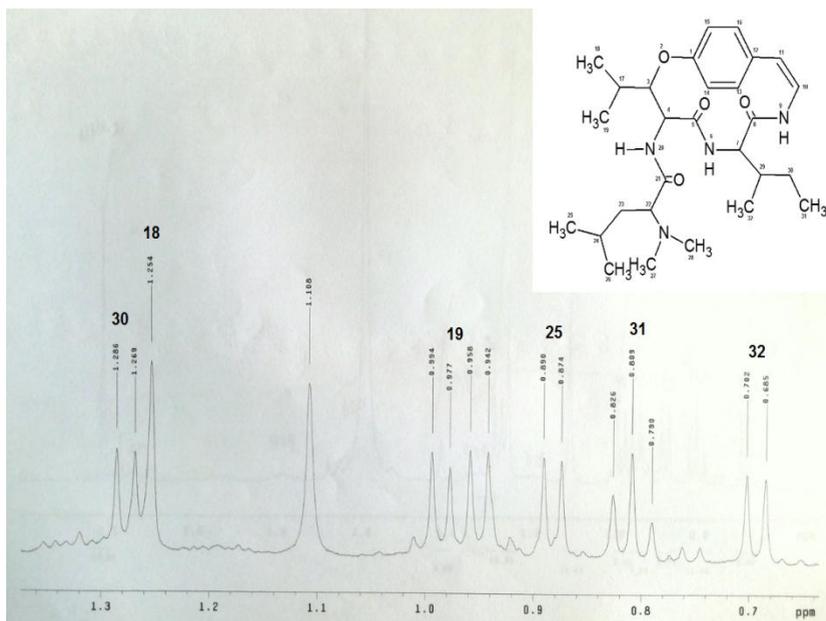


Figura 22 – Espectro de RMN de ^1H expandido da Adoutina-X $\delta = 0,67$ - $1,33$ ppm. (CDCl_3 , 400 MHz)

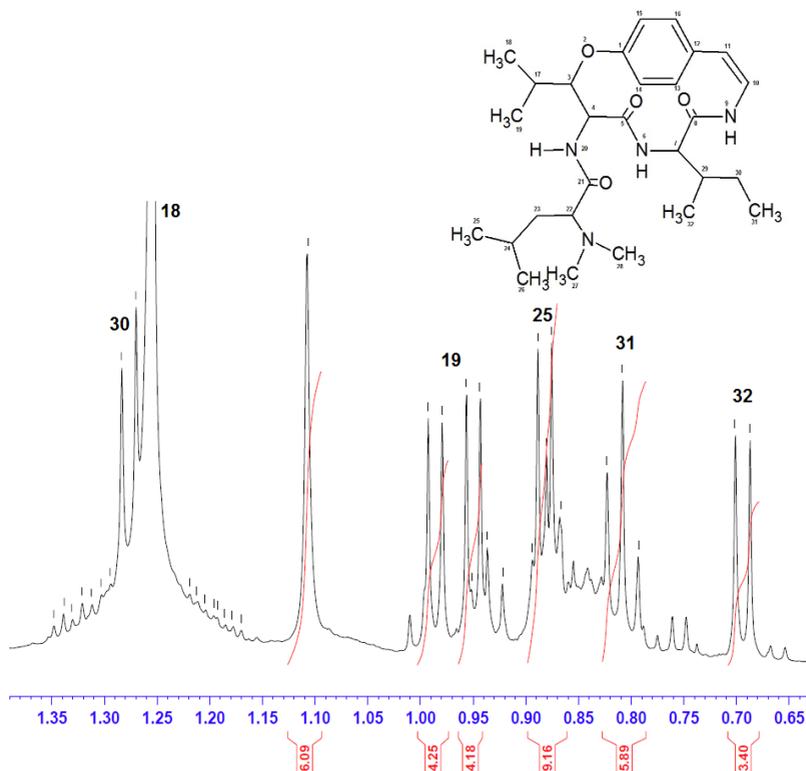


Figura 23 – Espectro de RMN de ¹H expandido da Adoutina-X $\delta = 0,65-1,35$ ppm. (CDCl₃, 500 MHz)

Para o primeiro conjunto de expansões verificou-se a presença de outros picos que até então no espectro de 400 MHz não podia ser observados. A determinação destes hidrogênios não é afetada pela presença destes novos picos. Esse aparecimento se deve ao fato de o composto estar sob influência de um campo magnético mais forte, assim, impurezas que não foram totalmente eliminadas no processo de purificação, devem aparecer sob o efeito deste campo mais forte. Essas impurezas podem ser estereoisômeros devido ao fato de apresentarem picos bem característicos ao do composto majoritário ou de alcaloides

do mesmo grupo. As técnicas de extração e purificação foram orientadas no sentido de se obter apenas a Adoutina-X.

Outra expansão importante está compreendida no deslocamento entre $\delta = 5,6-8,0$ ppm, região dos hidrogênios amídicos, olefínicos e aromáticos. (Figura 24 e 25)

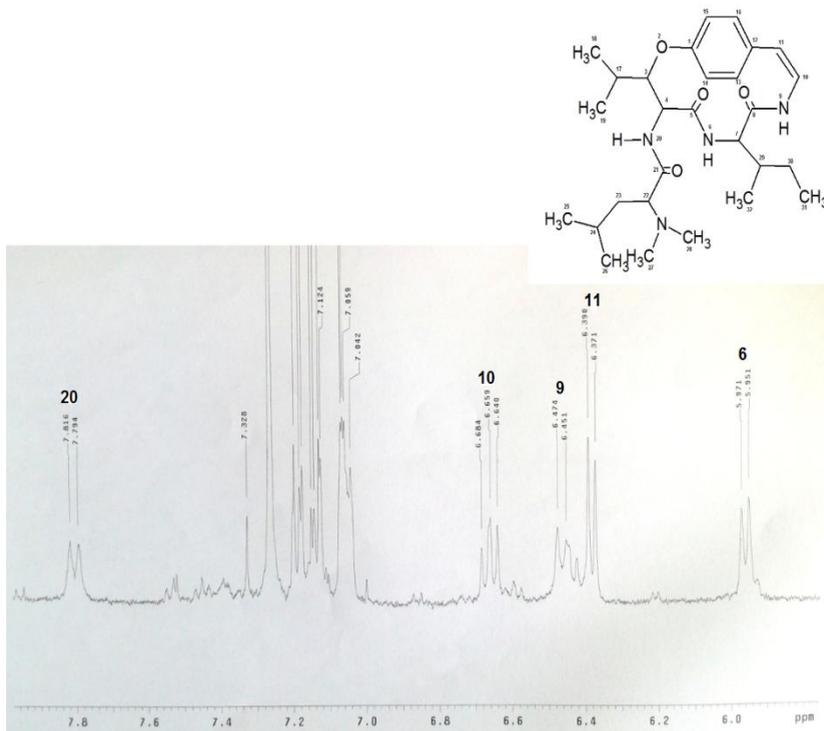


Figura 24 – Espectro de RMN de ^1H expandido da Adoutina-X $\delta = 5,6-8,0$ ppm. (CDCl_3 , 400 MHz)

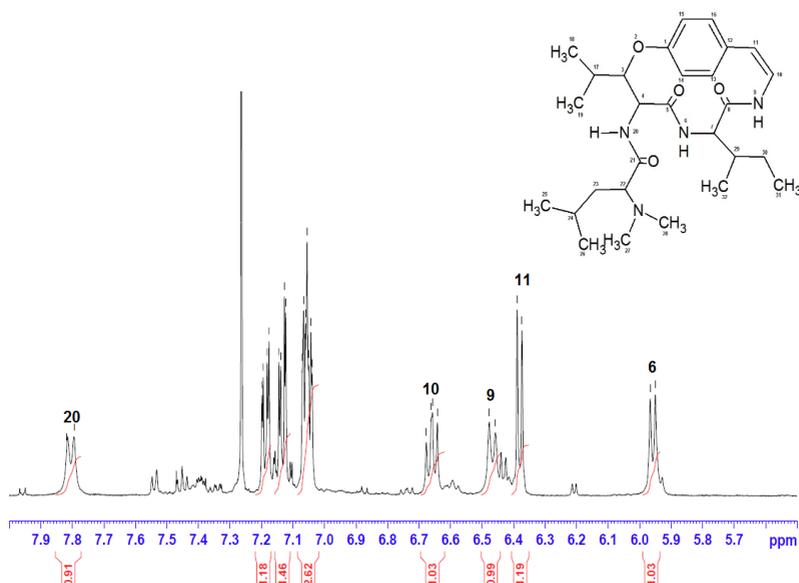


Figura 25 – Espectro de RMN de ^1H expandido da Adoutina-X $\delta = 5,6-8,0$ ppm. (CDCl_3 , 500 MHz)

Para o hidrogênio amídico H-9, pode ser observado que em 400 MHz existe somente o conjunto de três picos diferente do visto em 500 MHz que define 4 picos. Outra fator região importante a ser analisada é referente aos aromáticos entre $\delta = 7,0$ e 7,2 ppm. Essa região nos fornece dados para a determinação dos quatro hidrogênios aromáticos. Comparando os espectros percebe-se que para os hidrogênios de deslocamento químico em 7,20 e 7,14 o número de desdobramentos não se alterou, ocorrendo uma mudança somente na resolução dos picos.

A região compreendida entre $\delta = 7,0$ e 7,1 ppm, o conjunto de desdobramentos apresentado é insuficiente para a determinação dos outros dois hidrogênios que compõe o anel aromático da estrutura, além de estarem muito próximos apresentando quase que um pico alargado. Para esta região, pode-se determinar 4 sinais de desdobramento em RMN de 400 MHz diferentemente do obtido para o RMN de 500 MHz, o número de desdobramentos quase que dobra, apresentando 7 sinais.

A expansão para a região dos aromáticos referente ao espectro feito em RMN de 400 MHz pode ser verificada na Figura 26.

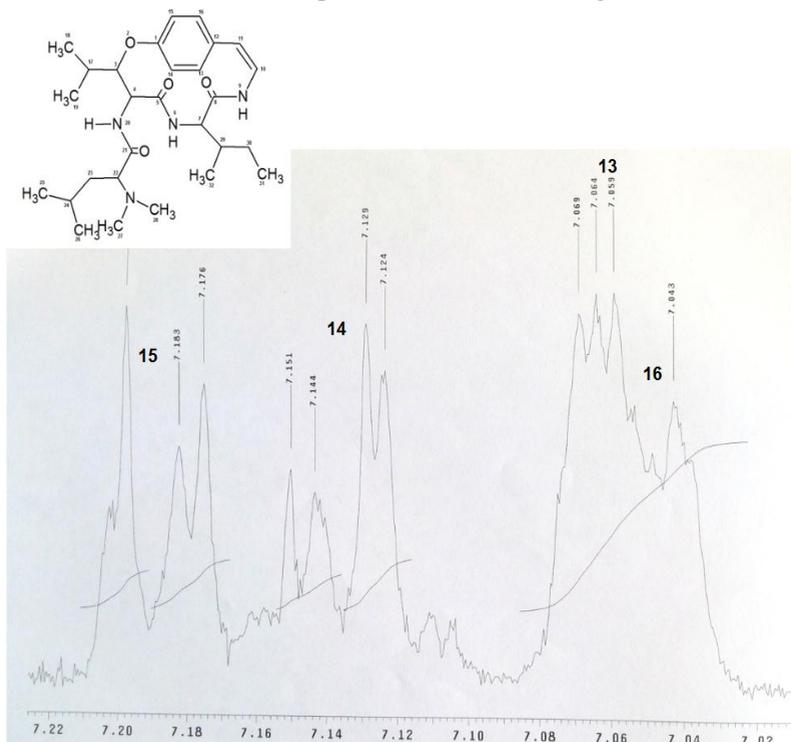


Figura 26 – Espectro de RMN de ^1H expandido da Adoutina-X $\delta = 7,02\text{-}7,22$ ppm. (CDCl_3 , 400 MHz)

No espectro apresentado na Figura 26 percebe-se os poucos desdobramentos e baixa resolução, principalmente na região já discutida de deslocamento químico entre 7,02 e 7,08. Outra diferença vista é que não existem quatro sinais de desdobramento para o hidrogênio de deslocamento 7,20 ppm e sim três.

Mesmo com o auxílio dos métodos de RMN 2D, não é possível a determinação desses hidrogênios aromáticos utilizando espectros feitos num aparelho de RMN de 400 MHz, pois a maior parte destes métodos utiliza matrizes de espectros de 1D de ^1H . Nesses casos, os

sinais são muito próximos entre si, impossibilitando a determinação dos mesmos.

Desta maneira, utilizou-se os espectros de RMN de 500 MHz de ^1H e os métodos bidimensionais para determinação dos hidrogênios aromáticos da Adoutina-X.

4.3 Determinação dos H's aromáticos da Adoutina X

Após análise do efeito do campo sobre a Adoutina-X, pode-se determinar os sinais exatos para cada um dos quatro hidrogênios aromáticos. Do espectro de ^1H de RMN expandido na região entre $\delta = 7,0$ e $7,3$ ppm (figura 27), observa-se os seguintes sinais de acoplamento característicos de aromáticos dissubstituídos-1,4, $J_{\text{orto}} = 7,8$ Hz e $J_{\text{meta}} = 2,8$ Hz, em relação a função éter.

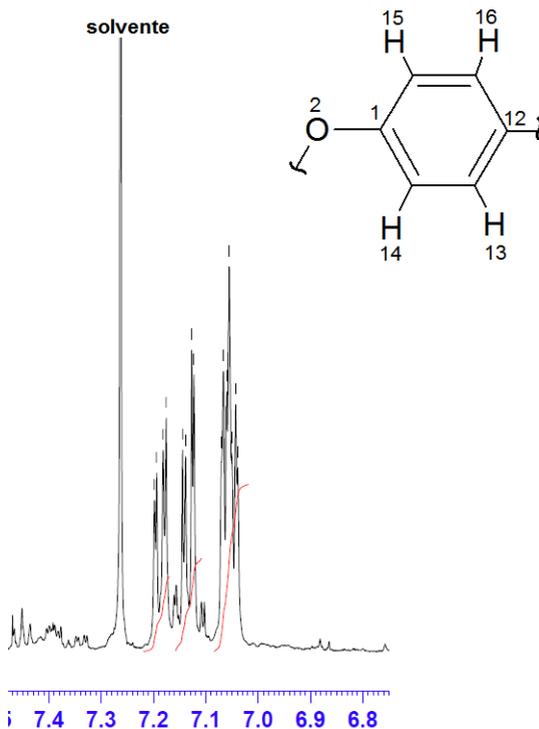


Figura 27 – Espectro expandido de RMN de ^1H da Adoutina-X, $\delta = 6,8-7,4$ ppm. (CDCl_3 , 500 MHz)

Analisando somente estas constantes de acoplamento ainda não é possível determinar os sinais específicos para cada hidrogênio. Para isso, os métodos de RMN 2D podem ser úteis.

Do espectro de COSY, pode ser obtido os sinais de cruzamento 3J (por ligações) entre hidrogênios. Além disso, pode-se comparar os espectros para 500 MHz e 400 MHz (Figura 28)

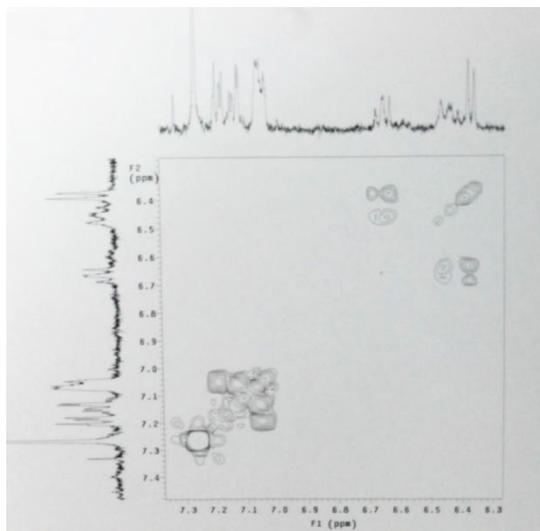
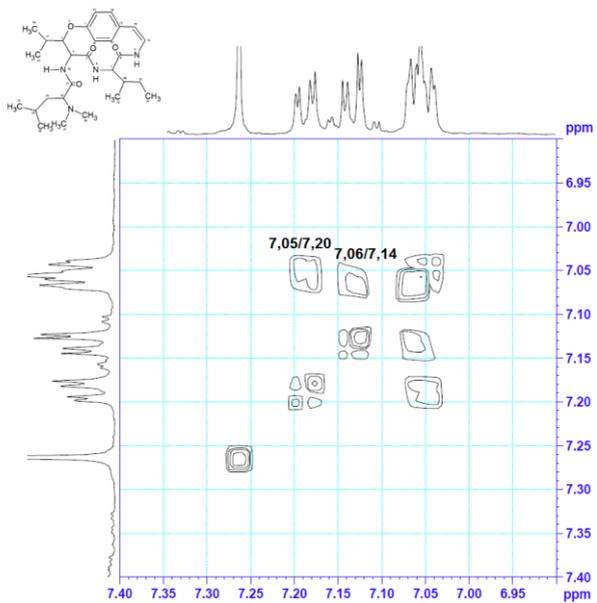


Figura 28 – Espectro expandido de RMN de COSY da Adoutina-X para 500 e 400 MHz. (CDCl₃)

Verificou-se que o hidrogênio em 7,05 ppm correlaciona-se com o hidrogênio em 7,20 ppm e o hidrogênio em 7,06 ppm com o de deslocamento 7,14 ppm. Essas correlações mostram que estes hidrogênios que apresentaram sinais de cruzamento devem estar ligados a carbonos vizinhos. Confirma-se também que a partir do espectro de COSY de 400 MHz, seria impossível a determinação desses hidrogênios aromáticos devido a sua proximidade, sendo somente possível quando analisados em um campo de maior intensidade.

Ainda não é possível determinar utilizando somente o espectro de COSY, por isso observou-se também o espectro 2D de HSQC. No método HSQC é possível identificar quais são os carbonos que estão ligados aos seus respectivos hidrogênios. (Figura 29)

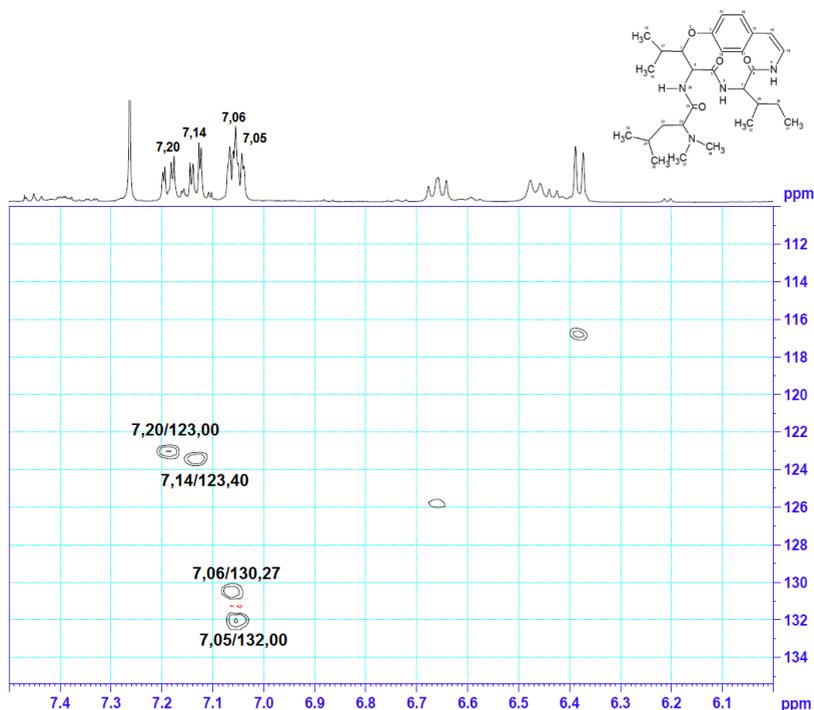


Figura 29 – Espectro expandido de RMN de HSQC da Adoutina-X $\delta_1 = 6,0\text{-}7,4$ ppm e $\delta_2 = 110\text{-}135$ ppm. (CDCl_3 , 500 MHz)

Nesse espectro constataram-se os seguintes sinais: o hidrogênio em 7,20 ppm acoplado com o carbono em 123,00 ppm, 7,14 ppm que acopla com 123,40 ppm, 7,06 ppm acopla com 130,27 ppm e por fim 7,05 que acopla com o sinal de carbono em 132,00 ppm. De acordo com os dados da literatura e os estudos feitos os seguintes carbonos são respectivamente: δ 123,00 (C-15), 123,40 (C-14), 130,27 (C-13) e 132,00 (C-16).

Para que haja confirmação real desses hidrogênios e carbonos, pode-se verificar ao final o espectro de NOESY, que faz a correlação espacial entre hidrogênios próximos (distância menor que 5 Å). (Figura 30)

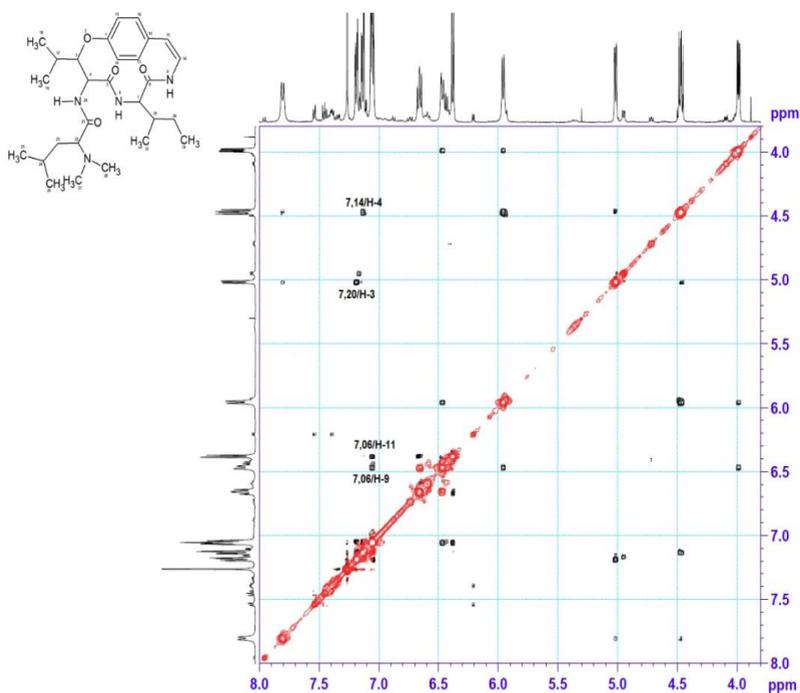


Figura 30 – Espectro expandido de RMN de NOESY da Adoutina-X $\delta = 3,8-8,0$ ppm. (CDCl_3 , 500 MHz)

Finalmente do espectro de NOESY, pode-se confirmar os hidrogênios aromáticos com seus respectivos deslocamentos assim como seus carbonos. O sinal em 7,14 ppm apresenta proximidade espacial com o hidrogênio H-4, confirmando que este é o H-14, o sinal em 7,20 apresenta uma interação com H-3, portanto, este sinal é relativo ao H-15. Já o sinal em 7,06 correlaciona-se com H-11 e H-9, portanto este sinal refere-se ao hidrogênio H-13. Por fim o sinal em 7,05 é relativo ao H-16. Os hidrogênios aromáticos se relacionam entre si, apresentando sinais entre H-15/H-16 e H-14/H-13. Podem ser observadas estas interações na figura 31 e um resumo dos sinais na Tabela 5.

H/C	$\delta^1\text{H}$ (ppm) 500MHz	$\delta^1\text{H}$ (ppm) 400 MHz	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) 500 MHz	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) 400 MHz	COSY(ppm) 500MHz	HSQC(ppm) 500MHz	NOESY 500MHz
H-13	7,06	7,02-7,24	130,27	130,12	7,06/7,14	7,06/130,27	H-9; H-11; H-14
H-14	7,14	7,02-7,24	123,40	122,66	7,14/7,06	7,14/123,40	H-4; H-13
H-15	7,20	7,02-7,24	123,00	123,09	7,20/7,05	7,20/123,00	H-3; H-16
H-16	7,05	7,02-7,24	132,00	131,79	7,05/7,20	7,05/132,00	H-15

4.4 Análise do NOESY e determinação da configuração relativa da Adoutina-X

O alcaloide ciclopeptídico Adoutina-X teve sua estereoquímica relativa confirmada através dos dados de NOESY, que mostra os hidrogênios próximos no espaço, e análise da Curva de Karplus através das constantes de acoplamento, além de dados obtidos dos métodos mono e outros bidimensionais de RMN. Assim, pode-se determinar a configuração para C-3 e C-4 que são os de maior interesse e também para seus respectivos hidrogênios.

Do espectro monodimensional de RMN de ^1H atribuiu-se o valor do hidrogênio metínico H-3 (δ 5,01 ppm) com uma constante de acoplamento de $J_{3,4} = 6,85$ Hz e o hidrogênio metínico H-4 (δ 4,46 ppm) com $J_{4,3} = 6,85$ Hz (Figura 32). Em seguida foram confirmados com o espectro de RMN de COSY. (Figura 33).

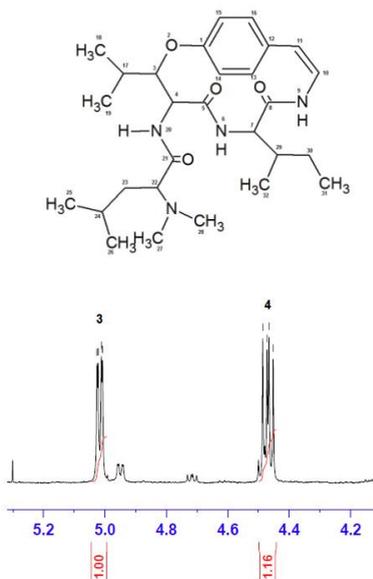


Figura 32 – Espectro expandido de RMN de ¹H da Adoutina-X. (CDCl₃, 500 MHz)

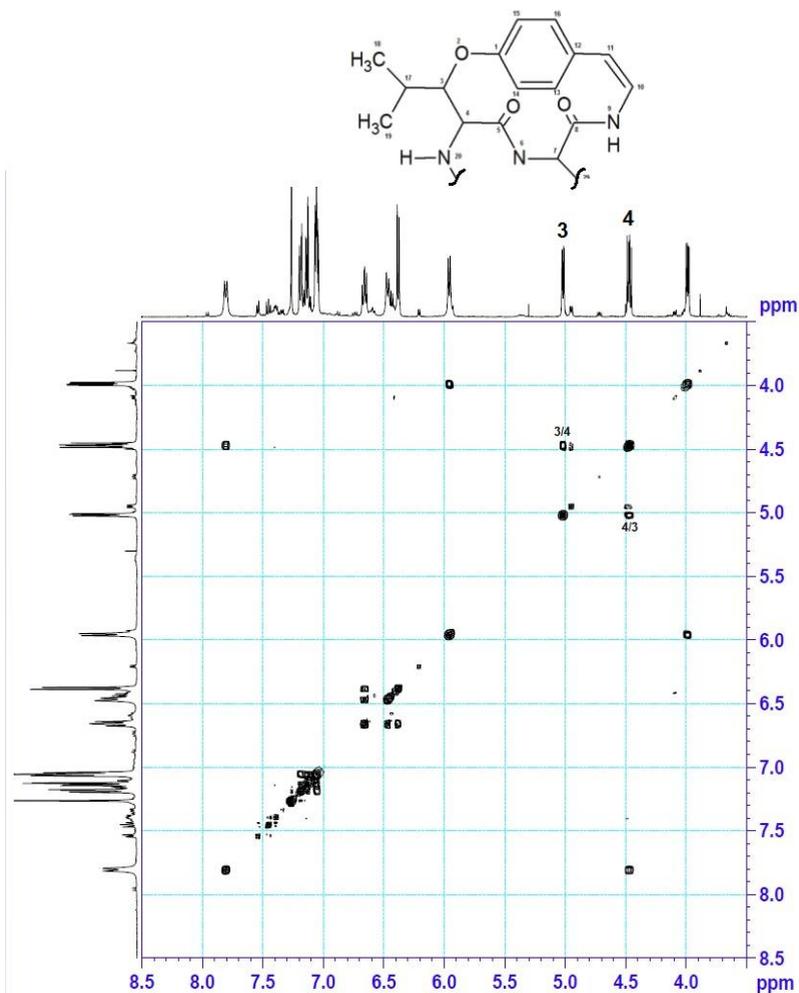


Figura 33 – Espectro expandido de COSY da Adoutina-X, $\delta = 3,5$ a $8,5$ ppm.(CDCl_3 , 500 MHz)

Já o espectro de RMN de ^{13}C mostrou que para o C-3 o deslocamento químico foi de $\delta = 81,42$ ppm e C-4 de $\delta = 55,08$ ppm, confirmados pelo método heteronuclear HSQC (Figura 34).

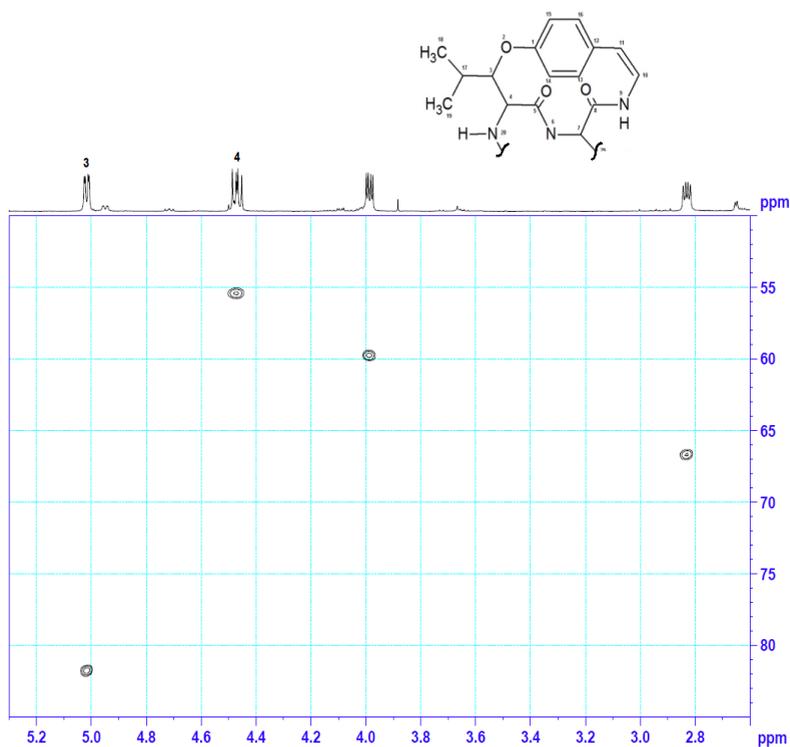


Figura 34 – Espectro expandido de HSQC da Adoutina-X, $\delta = 2,6$ a $5,3$ ppm. (CDCl_3 , 500 MHz)

Então para o sistema β -hidroxileucina na Adoutina-X, a forma apresentada é a *eritro* (deslocamentos de C-3 e C-4 condizentes com o esperado na literatura) e pela constante de acoplamento ($J = 6,85$ Hz) entre os hidrogênios H-3 e H-4 que está próximo de um acoplamento de 8 Hz. Pela equação de Karplus temos duas alternativas para o valor do ângulo diedro: 22° ou 138° (Figura 35)

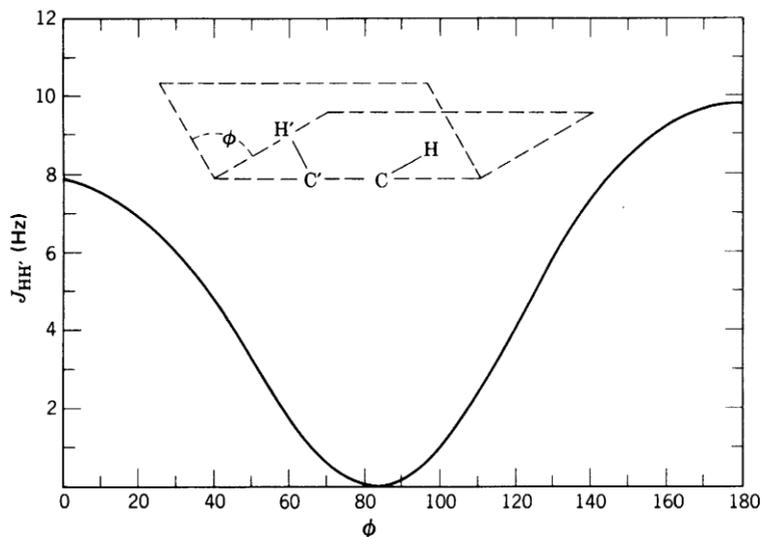


Figura 35 – Curva de Karplus.

Como observado, tem-se duas possibilidades de ângulo diedro para a unidade β -hidroxileucina. Para auxiliar na determinação da conformação dessa unidade, utilizar-se-á o espectro de NOESY (Figuras 36e37).

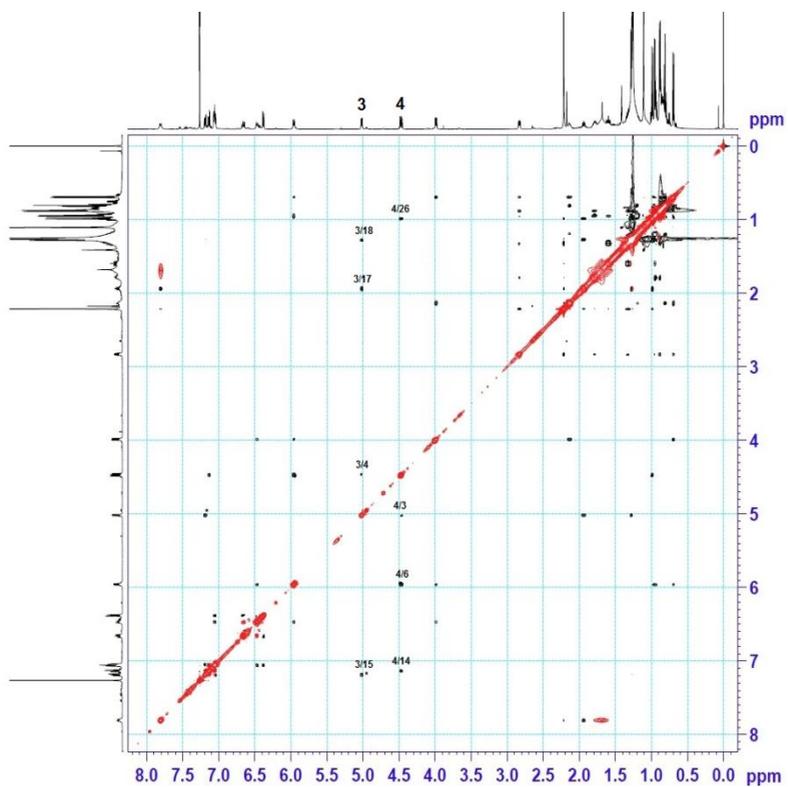
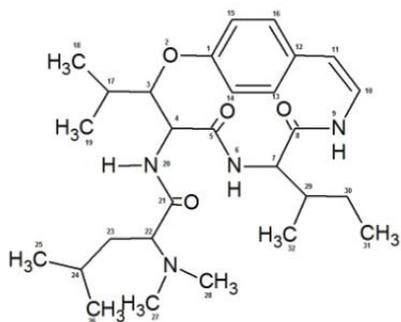


Figura 36 – Espectro de NOESY da Adoutina-X, $\delta = 1,0$ a $8,0$ ppm.(CDCl_3 , 500 MHz)

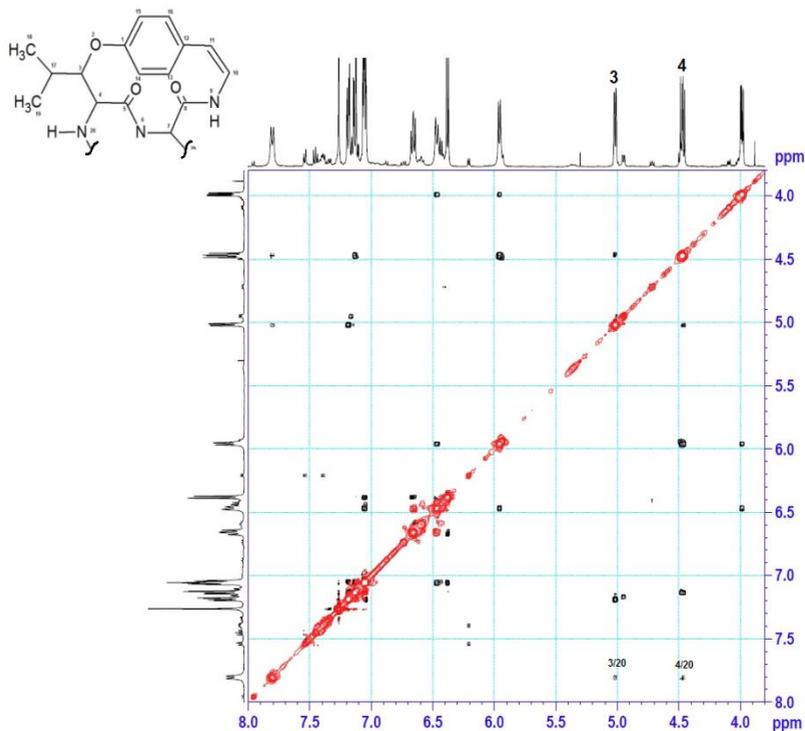


Figura 37 – Espectro expandido de NOESY da Adoutina-X $\delta = 4,0$ a $8,0$ ppm.(CDCl_3 , 500 MHz)

Os espectros de NOESY acima mostram todas as possíveis interações dos hidrogênios H-3 e H-4 com os respectivos hidrogênios espacialmente próximos. H-3 nos mostra uma interação com os hidrogênios (H-17, H-18, H-4, H-15 e H-20), enquanto H-4 apresenta uma relação com os hidrogênios (H-26, H-3, H-6, H-14 e H-20) Figura 38.

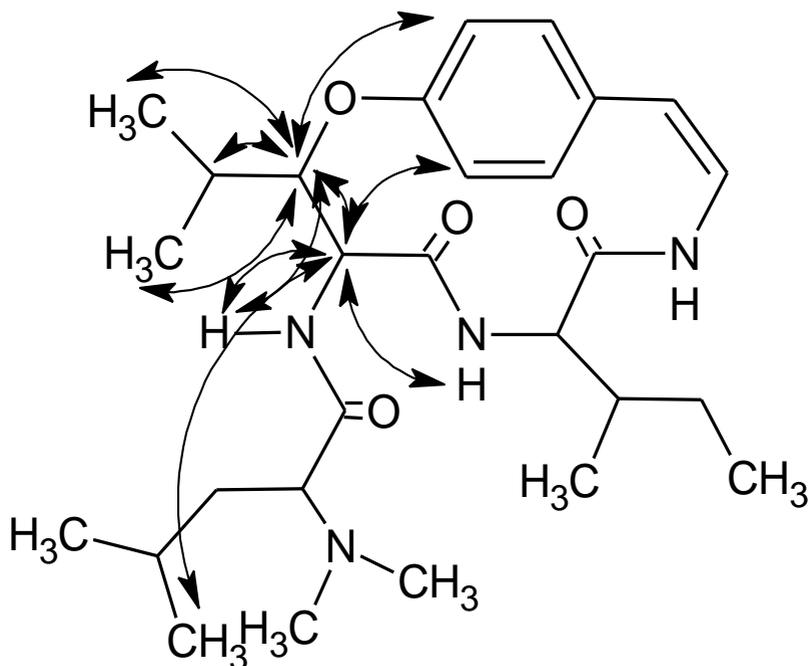


Figura 38 – Interações espaciais NOESY de H-3 e H-4 para Adoutina-X.

Além de comprovarem que realmente existe uma unidade β -hidroxileucina pelas correlações existentes, pode-se observar o sinal entre H-3 e H-4 que comprovaria a conformação *gauche* entre os hidrogênios e o ângulo diedro no valor de 22° . Mas, sabe-se que a configuração sugerida é *eritroque* condiz com um ângulo próximo de 138° . Assim sendo a configuração existente é *L-eritro*, ângulo de 138° e com uma conformação de H-3 e H-4 resultante de um equilíbrio *anti/gauche*, podemos atribuir a presença do sinal no NOESY pelo fato de os hidrogênios estarem a uma distância menor que 5 \AA e não necessariamente por estarem numa conformação *gauche*.

4.5 Condalina-A em DMSO- d_6 e $CDCl_3$

Ao se analisar um grupo de moléculas como os alcaloides ciclopeptídicos, por exemplo, todos os fatores utilizados na sua elucidação estrutural são importantes. Como citado na literatura, a mudança de solvente é um desses fatores. Essa alteração na análise via RMN, provoca mudanças, principalmente nas interações de ligações de hidrogênio.

Com auxílio da literatura e de dados novos, verificou-se a alteração observada na estrutura da Condalina-A e seus deslocamentos químicos, principalmente para os hidrogênios amídicos conforme visto em outros alcaloides ciclopeptídicos quando se muda o solvente, conforme os espectros abaixo (Figuras 39 e 40) de ^1H de RMN, em CDCl_3 e $\text{DMSO}-d_6$, da Condalina-A.

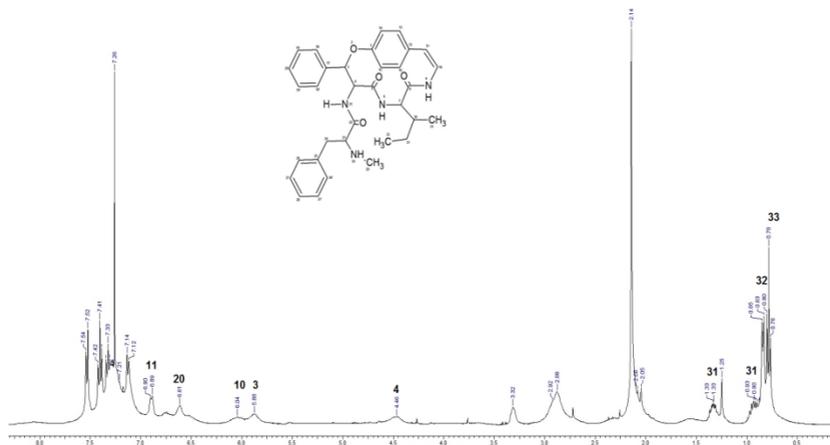


Figura 39 – Espectro de RMN de ^1H da Condalina-A. (CDCl_3 , 400 MHz)

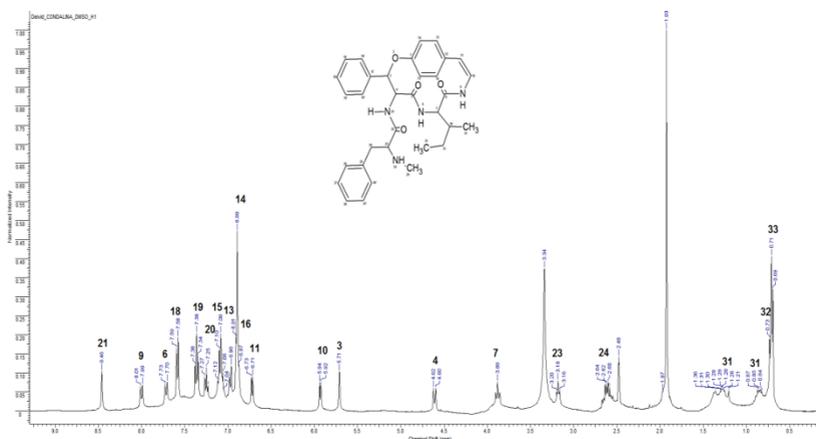


Figura 40 – Espectro de RMN de ^1H da Condalina-A. ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz)

No estudo do efeito da troca de solvente para a Condalina-A, verificou-se algumas limitações nas determinações dos hidrogênios principalmente nos amídicos.

A utilização do solvente deuterado clorofórmio numa primeira análise deve ser evitada para a Condalina-A. Comparando os espectros de ^1H para a Condalina-A, percebe-se a ausência visível de sinais amídicos H-6, H-9 e H-21 para o solvente CDCl_3 enquanto para H-20 apresenta um sinal de deslocamento em 6,61 ppm, quando comparados ao espectro feito em dimetilsulfóxido. Como visto na literatura o DMSO interfere nas ligações de hidrogênio causando uma desblindagem nesses hidrogênios. Por este motivo, no espectro feito em CDCl_3 H-6, H-9 e H-21 podem estar na região dos aromáticos, impossibilitando a sua determinação, já que apresenta uma grande quantidade de hidrogênios com múltiplos desdobramentos (CDCl_3). O H-20 em DMSO como visto, teve uma desblindagem sendo observado na região dos aromáticos com um deslocamento de $\delta = 7,25$ ppm

Se pode inferir também que os deslocamentos dos outros hidrogênios não mostraram grandes variações o que corrobora com a literatura. Para os hidrogênios H-3, H-4, H-10 e H-11 o deslocamento em CDCl_3 foi de $\delta = 5,88$, 4,46, 6,04 e 6,89 ppm respectivamente enquanto que para o solvente deuterado DMSO obteve-se os seguintes deslocamentos $\delta = 5,71$, 4,61, 5,94 e 6,73 ppm.

A utilização de CDCl_3 em RMN para a Condalina-A não é muito útil devido a alguns fatores como: o alcaloide em estudo apresenta sinais muito próximos, hidrogênios amídicos apresentam deslocamento na região dos aromáticos e seu ponto de ebulição (solvente) é relativamente baixo, tornando inviável a utilização do gradiente de temperatura para melhorar a resolução do espectro e a solubilidade da amostra. Além do aumento da solubilidade o aumento da temperatura diminuí a rigidez da molécula tendendo a uma rotação livre das ligações.⁴⁰

O fator temperatura está intrinsecamente relacionado com o solvente nas análises em RMN. Dependendo da molécula em estudo e de sua solubilidade, é possível utilizar solventes com um ponto de ebulição elevado, facilitando a determinação estrutural. Como exemplo dentro do contexto analisado, observou-se espectros da Condalina-A a três temperaturas diferentes (25°C, 60°C e 100°C) em $\text{DMSO}-d_6$, solvente com alta solubilidade para este alcaloide e que suporta temperaturas mais elevadas. (Figura 41)

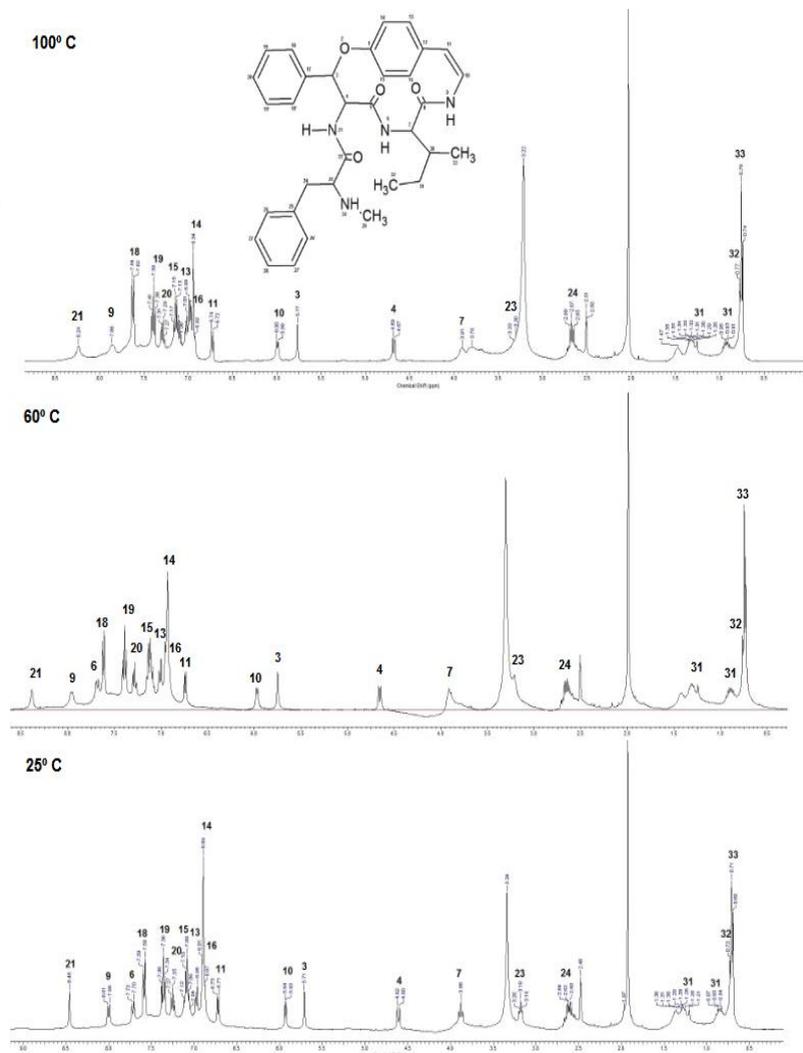


Figura 41 – Espectro de RMN de ¹H da Condalina-A a diferentes temperaturas. (CDCl₃, 400 MHz)

De acordo com a Figura 41, observaram-se os seguintes fatos: com o aumento da temperatura ocorre uma desblindagem na molécula como um todo, fazendo com que os sinais apareçam num deslocamento químico mais alto. Como exemplo, temos o sinal do hidrogênio H-23, em uma temperatura de 25° C ele aparece com um deslocamento de 3,18 ppm, chegando a um deslocamento químico a 100° C de 3,30 ppm. Outra observação feita foi o desaparecimento de alguns acoplamentos nos sinais do espectro com o aumento da temperatura. Isto se deve a fato de que as rotações das ligações se tornam menos rígidas, tendendo a rotações livres, com isso os sinais de acoplamento de alguns hidrogênios desaparece. Pode-se observar este efeito nos hidrogênios H-7 metínico e H-6, H-9 e H-21 que são hidrogênios amídicos. Por fim, analisou-se também o comportamento destes hidrogênios amídicos, que tiveram seus deslocamentos químicos diminuídos com o aumento da temperatura. Para confirmação dos sinais destes hidrogênios, obteve-se um espectro em solvente DMSO- d_6 com uma gota de D₂O, utilizado para que os sinais desses hidrogênios não sejam observados pela troca com o deutério. (Figura 42)

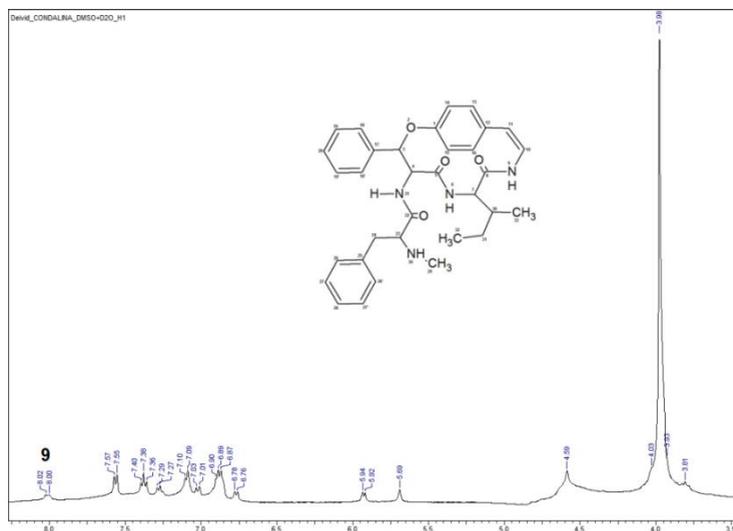


Figura 42 – Espectro de RMN de ¹H da Condalina-A a 25° C. (DMSO- d_6 /D₂O, 400 MHz)

Como esperado os hidrogênios amídicos H-6 e H-21 não foram observados no espectro pela rápida velocidade de troca com o deutério. Somente pode ser visto um sinal pouco intenso referente ao H-9 comparado com o espectro à mesma temperatura em solvente DMSO- d_6 puro. A velocidade de troca para este hidrogênio amídico não foi rápida o suficiente, provocada muitas vezes por impedimentos estéricos, ou seja, impedimento do solvente de chegar até este hidrogênio.

Após confirmação dos hidrogênios amídicos, pode-se então concluir que a blindagem ocorrida com o aumento da temperatura, se deve ao fato de que as ligações de hidrogênio antes muito fortes, foram obstruídas pela movimentação da própria molécula e liberdade de giro, causando um bloqueio físico impedindo essa interação entre solvente e hidrogênios.

Para a Condalina-A, a utilização do solvente DMSO- d_6 no lugar de $CDCl_3$ foi positiva, além da alta solubilidade o dimetilsulfóxido ainda suporta análises em altas temperaturas. Mas para este alcaloide em específico, a utilização de gradiente de temperatura não melhorou a aparência do espectro, pois dificulta na determinação dos hidrogênios amídicos e desfaz alguns acoplamentos.

Um resumo comparando os deslocamentos da Condalina-A para $CDCl_3$ e DMSO- d_6 pode ser visualizado na Tabela 6.

Tabela 6 - Deslocamentos químicos de ^1H em RMN da Condalina-A em DMSO- d_6 e CDCl_3 .

Condalina-A		
	δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm)
H/C	CDCl_3	DMSO- d_6
3	5,88	5,71
4	4,46	4,61
6	7,0-7,5	7,72
7	3,32	3,88
9	7,0-7,5	8,00
10	6,04	5,94
11	6,89	6,73
20	6,61	7,25
21	7,0-7,5	8,46

Dado: 400 MHz.

4.6 Análise por NOESY e difração de raios-X da Condalina-A

A Condalina-A teve sua estrutura confirmada pela análise de difração de raios-x, assim, pôde ser feita a determinação da sua estereoquímica absoluta e configuração, comparando com os dados de RMN mono e bidimensionais. O composto foi cristalizado após reação com iodeto de metila para a formação do sal de amônio quartenário. Obteve-se o cristal com a formação do sal, mas não ocorreu a metilação e sim protonação do nitrogênio N-34. (Figura 43)

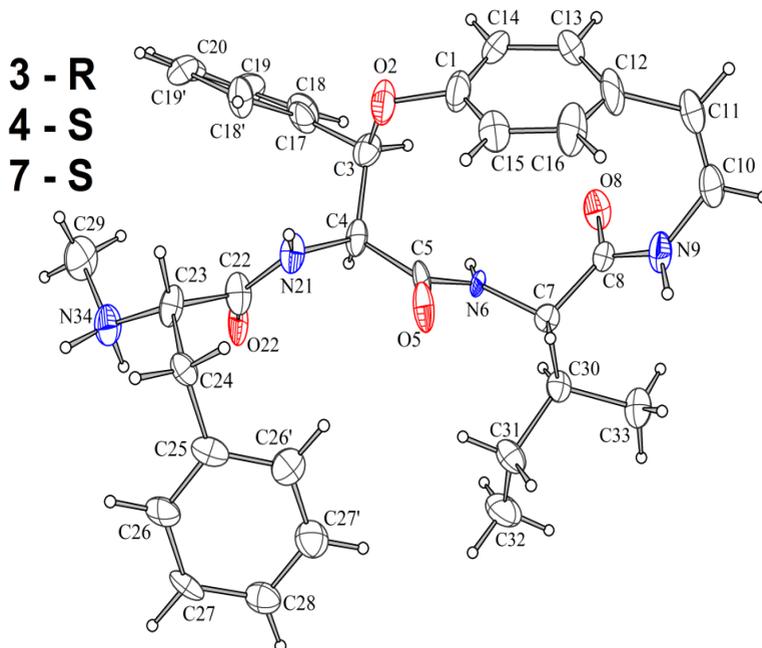


Figura 43 – Estrutura da Condalina-Aprotonada obtida através da difração de raios-x.

As atribuições feitas para a Condalina-A seguem os mesmos princípios das aplicadas a Adoutina-X e Discarina-C. Como o interesse é para os carbonos C-3 e C-4 e seus respectivos hidrogênios, foram feitas as atribuições necessárias baseando-se nos valores de deslocamento químico encontrados em DMSO- d_6 .

Para os hidrogênios H-3 e H-4 foram atribuídos os valores de $\delta = 5,75$ e $4,68$ ppm estando de acordo com a literatura. H-3 apresenta um simpleto mostrando que não existe acoplamento entre o mesmo com H-4. (Figura 44) Para confirmação de que estes sinais são realmente dos hidrogênios metínicos 3 e 4, utilizou-se os métodos de RMN 2D (COSY, HSQC e NOESY).

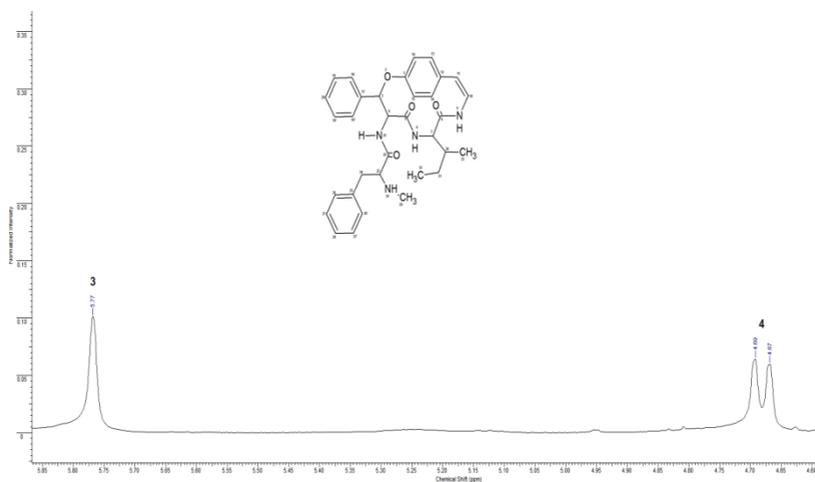


Figura 44 – Espectro expandido de RMN de ¹H da Condalina-A. (DMSO-*d*₆, 400 MHz).

Utilizou-se então o método COSY para identificação dos hidrogênios e observar se existe correlação vicinal.(Figura 45)

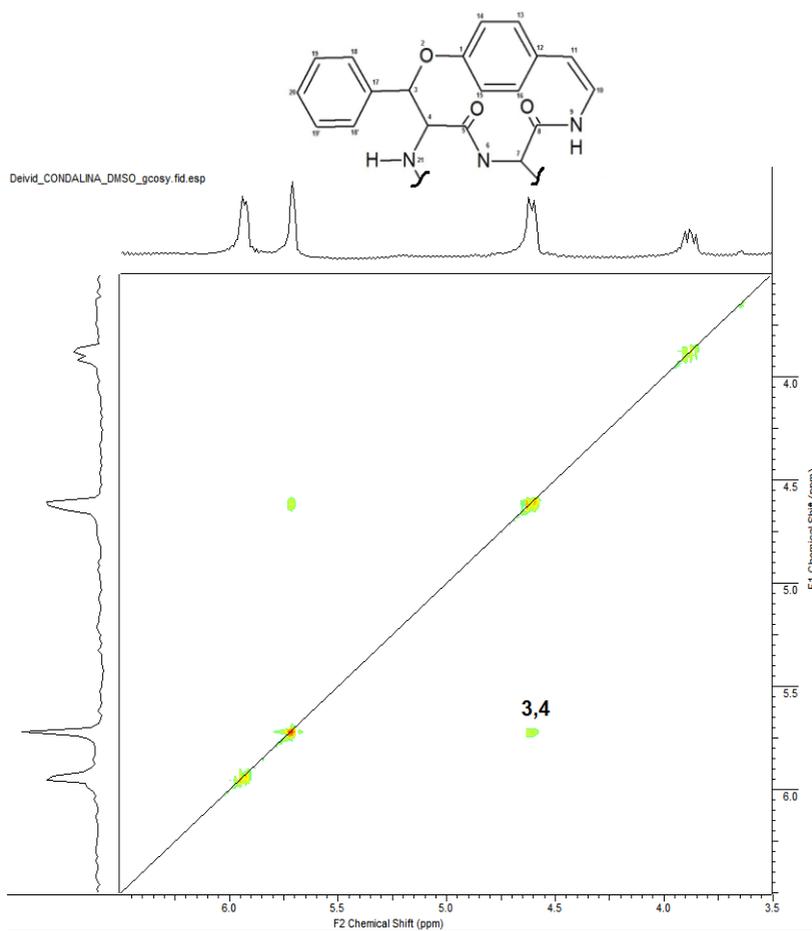


Figura 45 – Espectro expandido de RMN de COSY da Condalina-A. (DMSO- d_6 , 400 MHz)

O espectro de COSY mostrou correlação entre H-3 e H-4, assim pode-se determinar que estes hidrogênios apresentam acoplamento, mas muito pequeno próximo a zero ou ângulo de $\theta = 90^\circ$, aparentando assim no espectro de ^1H como singlete para H-3. Pode-se inferir que a configuração determinada para a unidade β -fenilserina é *treo* (acoplamento próximo à zero).

Para confirmar os deslocamentos dos carbonos com os respectivos hidrogênios, fez-se a análise do HSQC para a molécula. (Figura 46)

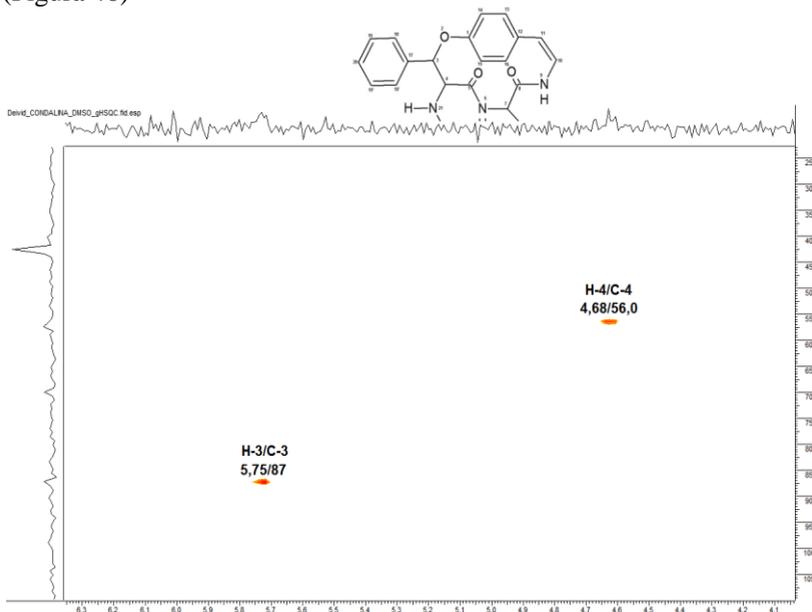


Figura 46 – Espectro expandido de RMN de HSQC da Condalina-A. (DMSO- d_6 , 400 MHz)

O espectro heteronuclear HSQC da Condalina-A mostrou que existe acoplamento do hidrogênio H-3 com um sinal de 87,0 ppm definido como sendo do C-3 e H-4 acoplando com um sinal de 56,0 ppm do C-4. Para confirmar então a configuração da unidade e a conformação dos hidrogênios analisou-se o espectro de NOESY relacionando os sinais de acoplamento espacial entre os hidrogênios de interesse. (Figura 47)

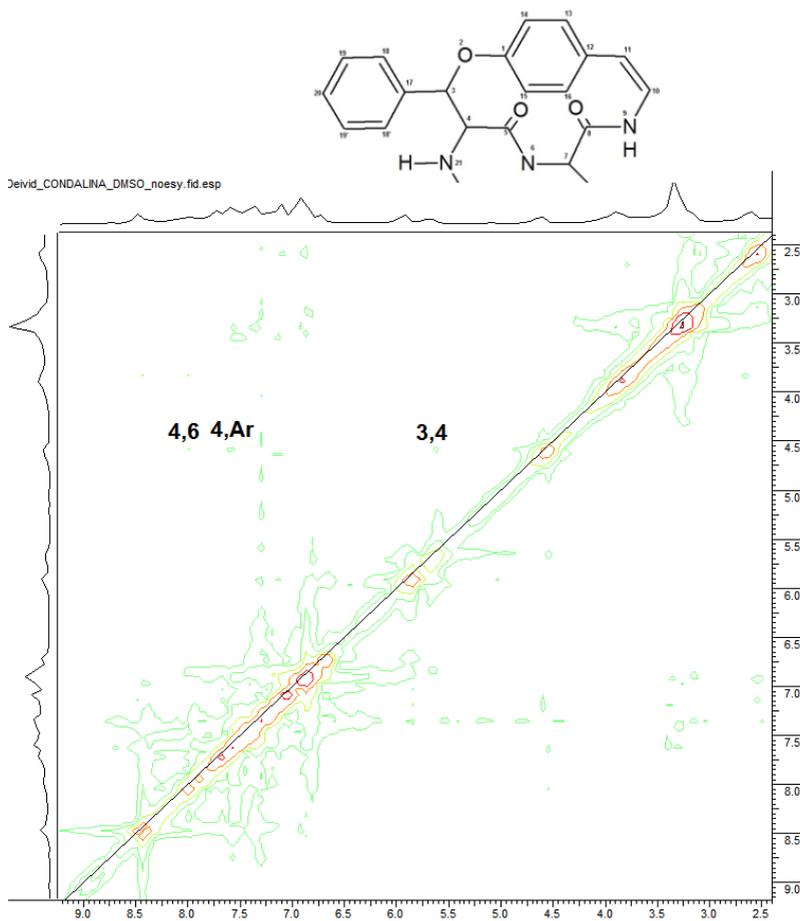


Figura 47 – Espectro de RMN de NOESY da Condalina-A. (DMSO- d_6 , 400 MHz)

O espectro de NOESY mostrou que existe correlação entre os hidrogênios H-3 e H-4. Já H-4 apresenta uma correlação com H-6 e um dos hidrogênios aromáticos em aproximadamente 7,6 ppm. Não mostra correlação com H-7 evidenciando assim e confirmando uma configuração absoluta para a unidade β -fenilserina como sendo *L-treo* (3R/4S). Dos dados obtidos do espectro de raios-X, tem-se um ângulo

diedro entre H-3 e H-4 de $\theta = 58,20^\circ$ que vem de encontro com os dados obtidos experimentalmente de RMN e teoria de Karplus.

Observando os espectros de RMN de ^1H da Condalina-A é possível afirmar que o ângulo diedro entre H-3/H-4 deveria ser próximo de 90° , pois H-3 não apresenta desdobramento aparente pelo acoplamento com H-4. Isto sugere um acoplamento de aproximadamente 0 Hz. A solução deste problema pode ser obtida com uma medida de campo maior que forneceria uma melhor resolução. Outra forma de verificar se $^3J_{\text{H-3/H-4}} = 0$ Hz é através do COSY, onde observa-se sinal de cruzamento, o que indica que o ângulo diedro não é exatamente 90° mas próximo o bastante disso para se ter um acoplamento menor do que 2 Hz e portanto não provoca desdobramento visível.

Estas conclusões estão de acordo com o observado no estado cristalográfico e no NOESY, onde H-3 e H-4 apresentam sinal de cruzamento indicando proximidade espacial.

6 CONCLUSÕES

- Para a Discarina-C, obteve-se a configuração relativa, através das técnicas de RMN e confirmadas sua configuração absoluta através dos dados cristalográficos e dados de RMN apresentados na literatura. A configuração para os carbonos C-3 e C-4 foi *L-eritro* com um ângulo de aproximadamente 138°. O espectro de NOESY apresentou sinal entre H-3 e H-4 que foi confirmado pelo fato de estarem numa conformação em equilíbrio *anti/gauche* e também por estarem a uma distância de 3,49 Å menor que 5 Å.

- Para alcaloides ciclopeptídicos como a Adoutina-X campos magnéticos com alta intensidade, frequências maiores que 500 MHz, são ideais, pois possibilitam a determinação de hidrogênios em deslocamentos químicos muito próximos. Utilizando um RMN de 500 MHz, foi possível determinar os hidrogênios aromáticos da Adoutina-X juntamente com seus carbonos.

- Confirmou-se a configuração relativa para a unidade β -hidroxileucina da Adoutina-X como sendo *L-eritro*, apresentando um ângulo diedro entre H-3 e H-4 de aproximadamente 138°.

- A análise do efeito do solvente para a Condalina-A utilizando CDCl_3 e DMSO, mostrou diferenças nos deslocamentos, principalmente nos hidrogênios amídicos que foram maiores quando feitas em dimetilsulfóxido deuterado. A utilização de clorofórmio deuterado para análise deste alcaloide deve ser evitado, pois o mesmo apresenta hidrogênios amídicos e aromáticos com deslocamentos químicos muito próximos, impossibilitando a determinação dos mesmos. Outro fator é a impossibilidade de usar um gradiente de temperatura para auxiliar na resolução do espectro, pois apresenta um baixo ponto de ebulição.

- Solventes como DMSO- d_6 são úteis ao se utilizar gradientes de temperatura, mas se deve tomar certo cuidado de acordo com a molécula em estudo, pois o aumento da temperatura pode provocar um

deslocamento químico contrário ao desejado impedindo a determinação de alguns sinais, como no caso da Condalina-A.

- Determinou-se também a configuração relativa para a Condalina-A que apresentou para a unidade β -fenilserina uma configuração *L-treo* (3R/4S) corroborando com o apresentado na literatura. Com o auxílio dos dados da difração de raios-x, pode-se confirmar a configuração absoluta e um ângulo diedro entre H-3 e H-4 como sendo $\theta = 58,20^\circ$.

- Apesar de o DMSO- d_6 desfavorecer possíveis ligações de hidrogênio intramoleculares na estrutura, uma presumível mudança conformacional não altera o ângulo diedro H-3/H-4, como vemos pela constante de acoplamento observada nos espectros de ^1H em CDCl_3 e DMSO- d_6 . Este ângulo não foi grandemente alterado no cristal do derivado protonado observado no raio-X.

- Os métodos de elucidação estrutural e determinação da estereoquímica utilizando dados de acoplamento, deslocamentos químicos e correlações com ângulos diedro através de RMN, demonstraram mais uma vez fidelidade em seus resultados, podendo ser utilizados como um parâmetro para obtenção de configurações relativas em alcaloides ciclopeptídicos.

SREFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MOREL, A. F.; MALDANER, G.; ILHA, V. **“The alkaloids, Chemistry and Pharmacology”**. New York: Academic Press, 2009.
2. CARDOSO, C. M. Z. **Manual de controle de qualidade de matérias-primas vegetais para farmácia magistral**. 1. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2009. 49-75 p.
3. BIAVATTI, M. W., LEITE, S. N. **Práticas de Farmacognosia**. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2005. 31- 41p.
4. MATOS, J. M. D., MATOS, E. O. **Farmacognosia curso teórico-prático**. Fortaleza: Edições UFC, 1989.
5. SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade /UFRGS / Ed. Da UFSC, 2002.
6. BRUNETON, J. **Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales**. 2. ed. Zaragoza: Acribia. 2001.
7. SCHMIDT, U.; LIEBERKNECKT, A.; HASLINGER, E. in: “The Alkaloids, Chemistry and Pharmacology” (A. Brossi , ed.), 26, 299. **Academic Press**, New York, (1985).
8. MALDANER, G. : “Estudo dos metabólitos secundários de *Scutiabuxifoliae* suas atividades biológicas” (Tese de Doutorado), Santa Maria- RS, 2010.

9. ILHA, V.; “Síntese de Peptídeos Lineares Precursores dos Alcalóides Condalina-A, Scutianina-M, Scutianina-L e Adoutina-Y: Estudos Estruturais e Suas Atividades Biológicas” (Tese de Doutorado) Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal de Santa Maria, 2011.
10. BAIG, M. A., BANTHORPE, D. V., COLEMAN, A. A., TAMPION, M. D., J Tampion., White J. J., **Phytochemistry** 1993, 34, 171.
11. TSCHESCHE, R.; KAUSSMANN, R. in: “The Alkaloids, Chemistry and Pharmacology” (R. H. F. Manske , ed.),15, 165. **Academic Press**, New York, (1975).
12. JOULLIE, M. M.; NUTT, R. F.; in: “Alkaloids, Chemical and Biological Perspectives” (S. W. Pelletier, ed.), 3,113. **Wiley Interscience**, New York, (1985).
13. TAN, N.-H.; ZHOU, J. **Chem. Rev.** 106, 840 (2006).
14. SCHMIDT, U.; LIEBERKNECKT, A.; GRIESSER, H.; HAUSER, J. **Liebigs Ann. Chem.** 2153 (1982).
15. MOREL, A. F.; MACHADO, E. C.; WESSJOHANN, L. A. Cyclopeptide alkaloids of *Scutiabuxifolia*. **Phytochemistry**, v.47, p.125-129, 1998.
16. REYNOLDS, W. F.; ENRÍQUEZ, R. G. Choosing the Best pulse sequences, acquisition parameters, post acquisition processing strategies, and probes for natural product structure elucidation by nmr spectroscopy. **Journal of Natural Products**, v.65, p.221-224, 2002.

17. SILVA, M.; BHAKUNI, D. S.; SAMMES, P. G.; PAIS, M.; JARREAU, F. X. A new peptidealkaloidfrom *Discaria crenata*. **Phytochemistry**, v.13, p.861-863, 1974.

18. PAÏS, M.; MONSEUR, X.; LUSINCHI, X.; GOUTAREL, R. Alcaloïdespeptidiques. II. – Structure de lapandamine, alcaloïdedu *Panda oleosa* Pierre (Pandacées). **Bulletin de La SocieteChimique de France**, p. 817, 1964.

19. MENEZES, A. S.; MOSTARDEIRO, M. A.; ZANATTA, N.; MOREL, A. F. Scutianine-J, a cyclopeptidealkaloidisolatedfrom *Scutiabuxifolia*. **Phytochemistry**, v.38, p.783-786, 1995.

20. MOREL, A. F.; MACHADO, E. C.; WESSJOHANN, L. A. Cyclopeptide alkaloids of *Discariafebrifuga* (Rhamnaceae). **Phytochemistry**, v.39, p.431-434, 1995.

21. MOREL, A. F.; BRAVO, R. V. F.; REIS, F. A. M.; RÚVEDA, E. A. Peptide alkaloids of *Scutiabuxifolia*. **Phytochemistry**, v.18, p. 473-477, 1979.

22. MALDANER, G. : “Estudo dos metabólitos secundários de *Condaliabuxifoliae Scutiabuxifoliae* suas atividades antimicrobianas” (Dissertação de Mestrado), Santa Maria- RS, 2005.

23. KARPLUS, M. Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. **Journal of Chemical Physics**, v.30, p.11-15, 1959.

24. OLIVEIRA, L. H.; CARO, M. S. B.; ILHA, V.; BURROW, R. A.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. Absolute Configuration of Franganine. **Journal of Natural Products**, 75 (6), pp 1220-1222, 2012.

25. MOSTARDEIRO, M. A.; ILHA, V.; DAHMER, J.; CARO, M. S. B.; DALCOL, I. I.; SILVA, U., F.; MOREL, A. F. Cyclopeptide Alkaloids: Stereochemistry and Synthesis of the Precursors of Discarines C and D and Myrianthine A. **Journal of Natural Products**, 76, pp 1343-1350, 2013.

26. KIM, G. S.; Lin, L. J.; Reid, B. R. Determination of Nucleic Acid Backbone Conformation by ^1H NMR. **Biochemistry**, v.31, p.3564-3574, 1992.

27. SUMMERS, M. F.; SOUTH, T. L.; KIM, B.; HARE, D. R. High-Resolution Structure of an HIV Zinc Fingerlike Domain via a New NMR-Based Distance Geometry Approach. **Biochemistry**, v.29, p.329-340, 1990.

28. SILVA, M. D.: "Análise Conformacional de Ciclopeptídeos de 14 Membros: Estudo da Conformação do Metil Iodeto de Scutianina C". Florianópolis-SC, 2012.

29. PAÍS, M., et. al., Ann. Pharm. Franc, **21(2)**, p. **139**, 1963.

30. PAÍS, M., et. al., Bull. Soc. Chim. Fr., v. **3**, p. **1145**, 1968.

31. SERVIS, R. E., et. al. J. Am. Chem. Soc., **91:20**, **24(9)**, 1969.

32. DIAS, G. O. C.: “Estudo fitoquímico da raiz da espécie *Melochiachamaedrys* St. Hil.” (Tese de Doutorado), Santa Maria-RS, 2005.
33. MOREL, A. F., ARAÚJO, C. A., SILVA, U. F., HOELZEL, S. C. S. M., BASTOS, N. R., *Phytochemistry*, 61, 561-566, 2002.
34. GIACOMELLI, S. R.: “Estudo fitoquímico de três espécies pertencentes à família Rhamnaceae: *Discaria americana*, *Colletia paradoxa* e *Gouania ulmifolia*.” (Tese de Doutorado), Santa Maria- RS, 2005.
35. PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; **Introdução à Espectroscopia**. Quarta Edição, Cengage Learning, EUA, 2010.
36. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7 Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 508p.**
37. KO, H.; SHIM, G.; KIM, Y. Evidences that β -Lactose forms hydrogen bonds in DMSO. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v.26, p.2001-2006, 2005.
38. OLIVEIRA, L. H.: “Alcaloides Ciclopeptídicos: Diversas Abordagens no Estudo da Estereoquímica Baseados na Franganina” (Dissertação de Mestrado), Florianópolis - SC, 2011.
39. DAHMER, J.: “Alcalóides ciclopeptídicos da espécie *Discaria febrifuga*: Gilles e Hooker: Estereoquímica e atividade

biológica". Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

40. ROTZLER, J., et. Al., Atropisomerization of di-*para*-substituted propyl-bridged biphenylcyclophanes. **Journal Organic&Biomolecular Chemistry**, 11, 110-118, 2013.