

ATRIBUIÇÃO DA ESTEREOQUÍMICA DA α -SANTONINA ATRAVÉS DAS MEDIDAS DO ACOPLAMENTO DIPOLAR RESIDUAL

Rubens R. Teles^{a,b}, José A. A. França^{a,c}, Armando Navarro-Vázquez^a e Fernando Hallwass^{a,*}

^aDepartamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife – PE, Brasil

^bInstituto Federal da Paraíba, Campus Princesa Isabel, Rodovia PB 426, s/nº, 58755-000 Princesa Isabel – PB, Brasil

^cInstituto Federal de Alagoas, Campus Piranhas, Avenida Sergipe, s/nº, Xingó, 57460-000 Piranhas – AL, Brasil

Recebido em 18/06/2015; aceito em 13/08/2015 publicado na web em 30/09/2015

STEREOCHEMICAL ASSIGNMENT OF α -SANTONIN USING RESIDUAL DIPOLAR COUPLING. The measurement of nuclear magnetic resonance parameters in an anisotropic media, such as residual dipolar coupling (RDC), has proven to be an excellent methodology for the refinement of chemical structures, being used as a complementary tool in the determination of the relative configuration, conformation, and constitution of organic compounds. In this study, we applied this methodology to determine the relative configuration of α -santonin, a natural product with four stereocenters, while assigning its prochiral methylene protons using only the RDCs obtained in a polyacrylonitrile polymer gel swollen in DMSO- d_6 .

Keywords: RDC; NMR; α -santonin; natural products.

INTRODUÇÃO

A determinação da estereoquímica das moléculas orgânicas de origem natural ou sintética tem um papel muito importante nos processos bioquímicos, uma vez que a atividade biológica apresenta uma grande dependência com a estrutura molecular tridimensional. Portanto, a determinação correta da configuração e/ou conformação das estruturas químicas recebe destaque nos estudos da relação estrutura-atividade, se tornando um desafio para os químicos.¹ A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma ferramenta poderosa para a elucidação estrutural.^{2,3} Entretanto, em algumas situações os experimentos tradicionais de RMN, como aqueles que exploram o efeito Overhauser nuclear (NOE) e a análise do acoplamento escalar (J), são insuficientes para determinar a estrutura sem ambiguidades.

Nos últimos anos houve grandes avanços na aplicação da RMN em meios orientados, como metodologia complementar, para resolver problemas estruturais. Apesar dos parâmetros de RMN possuírem um caráter tensorial, ou seja, dependerem da orientação molecular em relação ao campo magnético externo, no estado líquido a rotação molecular rápida provoca o cancelamento (no caso do acoplamento dipolar ou quadrupolar) ou a observação de um valor médio destes parâmetros (no caso do acoplamento escalar ou do deslocamento químico). A RMN em meios orientados, também conhecidos como meios de alinhamento, possibilita a recuperação de uma pequena parte dos parâmetros anisotrópicos que são perdidos no meio isotrópico. Esta metodologia fornece informações adicionais capazes de refinar a determinação da estrutura molecular. Entre os parâmetros obtidos desta forma encontramos: Acoplamento Dipolar Residual (RDC, do inglês - *Residual Dipolar Coupling*), Anisotropia do Deslocamento Químico Residual (RCSA, do inglês - *Residual Chemical Shift Anisotropy*) e Acoplamento Quadrupolar Residual (RQC, do inglês - *Residual Quadrupolar Coupling*).⁴ Inicialmente, esta metodologia foi aplicada com sucesso para o refinamento da estrutura de macromoléculas biológicas,⁵ e nos últimos anos têm sido explorada também para análise de moléculas orgânicas pequenas e de tamanho médio.⁶ Para

este tipo de compostos as medidas de RDC têm sido utilizadas para resolver problemas de conformação,⁷⁻⁹ configuração relativa (CR)¹⁰ e, por fim, problemas de constituição.¹¹ Além disso, para compostos rígidos e semirrígidos as medidas de RDCs têm sido aplicadas na atribuição de prótons pró-quirais.^{12,13} Recentemente, o uso de RCSAs também provou ser capaz de estender a aplicação da RMN em meios orientados às moléculas com escasso número de hidrogênios.¹⁴

Para entender como as medidas de RDC são realizadas é preciso conhecer, inicialmente, a origem do acoplamento dipolar. Considerando um par de spins I e S na presença de um campo magnético externo (B_0), a constante de acoplamento dipolar é dada pela equação 1, na qual r_{IS} é a distância entre os spins I e S , γ_I e γ_S são as suas respectivas razões magnetogíricas. O ângulo θ_{IS} é o ângulo formado entre o vetor r_{IS} e o campo magnético (Figura 1), μ_0 é a permeabilidade no vácuo e $\hbar = h/2\pi$, sendo h a constante de Planck. O símbolo $\langle \rangle$ representa a média temporal sobre todas as orientações possíveis experimentadas pelo vetor internuclear.

$$D_{IS} = -\frac{\mu_0 \gamma_I \gamma_S \hbar}{4\pi^2} \left\langle \frac{3\cos^2\theta_{IS} - 1}{2} \frac{1}{r_{IS}^3} \right\rangle \quad (1)$$

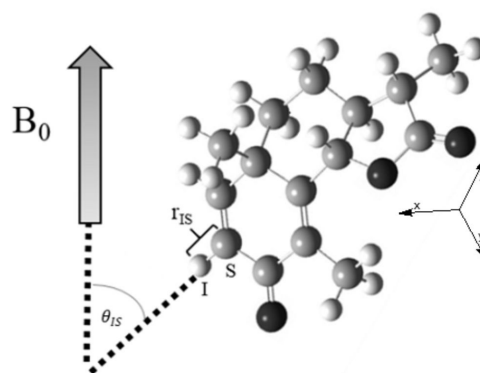


Figura 1. Acoplamento dipolar entre dois spins I e S , representados na molécula da α -santonina, é proporcional à distância internuclear r_{IS} e do ângulo θ_{IS} entre o eixo internuclear e o campo magnético

*e-mail: hallwass@ufpe.br

A grandeza do acoplamento dipolar pode alcançar a ordem de 10^4 Hz,¹⁵ causando alargamento do sinal de RMN no estado sólido. Entretanto, em experimentos no meio líquido isotrópico, devido ao movimento randômico, o acoplamento dipolar é zerado. Porém, se os experimentos forem realizados em um meio fracamente orientado, será gerado um pequeno grau de alinhamento na molécula hóspede, recuperando parcialmente o acoplamento dipolar (0,01 a 0,1%), com a vantagem de não perder a resolução dos sinais de RMN. Neste caso, a magnitude da constante de acoplamento irá mudar (aumentar ou diminuir) por uma quantidade que dependerá do grau de alinhamento e da estrutura da molécula. Portanto, a constante de acoplamento total (T) medida para um par de spins I e S , contém a contribuição do valor do RDC e da constante de acoplamento (J), sendo a diferença $D = T - J$ o valor de RDC.

Considerando moléculas rígidas, nas quais as distâncias internucleares podem ser consideradas fixas, a orientação média das mesmas pode ser expressa em termos de uma matriz 3 x 3, simétrica e com traço igual a zero, chamada matriz de ordem ou matriz de Saupe (equação 2).^{16,17} Essa matriz é a chave para gerar as informações estruturais.

$$\hat{S} = \begin{pmatrix} S_{xx} & S_{xy} & S_{xz} \\ S_{xy} & S_{yy} & S_{yz} \\ S_{xz} & S_{yz} & S_{zz} \end{pmatrix} \quad (2)$$

Os elementos S_{ij} da matriz são definidos como $S_{ij} = \frac{3}{2}C_i C_j - \frac{1}{2}\delta_{ij}$, em que C_i é o cosseno do ângulo formado por cada um dos eixos $i=x,y,z$ num sistema de referência rigidamente unido à molécula em respeito ao campo magnético externo B_0 . Como a matriz de ordem \hat{S} possui cinco elementos independentes, ela só pode ser determinada se existirem cinco valores conhecidos de RDC, correspondentes a vetores internucleares não paralelos. Esta exigência nem sempre é fácil de ser cumprida quando são estudadas pequenas moléculas.

Por meio da matriz de Saupe a equação (1) pode ser expressa na forma tensorial como

$$D_{IS} = -\frac{\gamma_I \gamma_S \mu_0 \hbar}{4\pi^2 r_{IS}^3} (x, y, z) \begin{pmatrix} S_{xx} & S_{xy} & S_{xz} \\ S_{xy} & S_{yy} & S_{yz} \\ S_{xz} & S_{yz} & S_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \quad (3)$$

em que x , y e z são os cossenos diretores do vetor unitário \vec{r}_{IS} . A forma mais comum de extrair informações estruturais das medidas de RDC é determinar o tensor de alinhamento de um conjunto de propostas estruturais e compará-las com os dados experimentais. Se forem medidos N acoplamentos dipolares (D_1, D_2, \dots, D_N), pode-se construir o seguinte sistema de equações

$$\begin{pmatrix} D_1 \\ D_2 \\ \dots \\ D_N \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\frac{\gamma_I \gamma_S \mu_0 \hbar}{4\pi^2 r_{IS(1)}^3} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -\frac{\gamma_I \gamma_S \mu_0 \hbar}{4\pi^2 r_{IS(2)}^3} & 0 & 0 & 0 \\ \dots & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ \dots & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & -\frac{\gamma_I \gamma_S \mu_0 \hbar}{4\pi^2 r_{IS(N)}^3} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_1^2 - z_1^2 & 2x_1 y_1 & 2x_1 z_1 & 2y_1 z_1 & y_1^2 - z_1^2 \\ x_2^2 - z_2^2 & 2x_2 y_2 & 2x_2 z_2 & 2y_2 z_2 & y_2^2 - z_2^2 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_N^2 - z_N^2 & 2x_N y_N & 2x_N z_N & 2y_N z_N & y_N^2 - z_N^2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_{xx} \\ S_{xy} \\ S_{xz} \\ S_{yy} \\ S_{yz} \\ S_{zz} \end{pmatrix} \quad (4)$$

Se N for igual a cinco o problema é determinado e reduz-se a um problema de valores próprios. Porém, se o número de acoplamentos dipolares determinados experimentalmente for maior que cinco o problema está sobredeterminado e não possui solução. Entretanto, usando o tratamento da decomposição de valores singulares (SVD, do inglês - *Singular Value Decomposition*),¹⁸ o problema pode ser resolvido em termos do ajuste dos mínimos quadrados. Ou seja, o tensor de alinhamento é obtido a partir do melhor ajuste dos valores

experimentais dos RDCs. O ajuste é usualmente expresso em termos do fator de qualidade de Cornilescu (Q)¹⁹ (equação 5), que indica a concordância entre os valores experimentais de RDC (D_{exp}) e os valores recalculados (D_{calc}), escalonados das diferenças quadráticas com o valor experimental.

$$Q = \sqrt{\frac{\sum (D_{exp}^i - D_{calc}^i)^2}{\sum D_{exp}^i{}^2}} \quad (5)$$

O cálculo do fator Q é realizado para todas as propostas estruturais e a condição ideal é que este apresente um valor significativamente pequeno e próximo a zero para a estrutura correta. A geometria do conjunto das estruturas propostas é usualmente obtida por métodos usuais de modelagem molecular, como aqueles baseados em campo de força, ou métodos de mecânica quântica, como DFT.

A análise dos valores de RDC para compostos flexíveis pode ser ainda uma tarefa difícil, uma vez que as propriedades do alinhamento molecular não são independentes dos estados conformacionais.²⁰ Entretanto, em muitos casos as mudanças estruturais entre as possíveis conformações não alteram a forma global da molécula, e portanto, o sistema pode ser analisado usando coordenadas comuns de referência escolhidas apropriadamente. Este procedimento é denominado aproximação do tensor-único²¹ e tem sido aplicado com sucesso em alguns casos complexos como o da *Sagittamida A*, um composto linear com oito estereocentros que aparecia como um desafio para os métodos tradicionais de RMN. Experimentos de correlações bidimensionais H-H e H-C, medidas do acoplamento escalar e NOEs, complementados com medidas de RDCs H-C, permitiram determinar a configuração relativa deste composto, bem como o seu espaço conformacional.²² Nos casos mais complexos, nos quais a aproximação do tensor-único não é apropriada, têm sido utilizadas análises mais sofisticadas, como o tensor-múltiplo.²¹ Essa abordagem foi usada com êxito para a determinação da configuração relativa do Sulfato de Fibrosterol A, um esteroide pseudodimérico, por Sun *et al.*²³

Um dos pontos fundamentais para o sucesso da técnica tem sido o desenvolvimento dos chamados meios de alinhamento fraco, em que é recuperada somente uma parte muito pequena da anisotropia dos observáveis. Para isso, diferentes famílias de materiais têm sido empregadas para pequenas moléculas orgânicas.²⁴ Por exemplo: cristais líquidos liotrópicos,^{25,26} géis indutores de alinhamento (*SAG*, do inglês - *Strain-induced Alignment in a Gel*)²⁷⁻²⁹ e sondas paramagnéticas de íons lantanídeos.³⁰⁻³² O método *SAG* tem mostrado grande eficiência devido à possibilidade de controlar o grau de alinhamento e também devido à compatibilidade com solventes orgânicos polares e apolares, permitindo a análise de um grande número de sistemas. Neste caso a orientação é produzida mediante a deformação mecânica das cavidades de um polímero com ligações cruzadas. No caso das fases liotrópicas a orientação preferencial no campo magnético, devido à alta anisotropia da susceptibilidade magnética destes materiais, é transmitida ao soluto.

As medidas de RDC realizadas em um meio de alinhamento quiral pode permitir a resolução de enantiômeros em uma mistura racêmica ou escalêmica. Todavia, deve se levar em consideração que as propriedades de RMN são invariantes sobre operações de inversões centrossimétricas e RDCs não podem ser usados para atribuição da configuração absoluta por si só. Recentemente este assunto foi discutido minuciosamente por Berger *et al.*³³ Além disso, o desenvolvimento de géis poliméricos compatíveis com microtubos de RMN mostraram que os parâmetros de RDC podem ser obtidos em uma faixa de micromolar, como mostrado na determinação da configuração relativa do produto natural Vatiaparol.³⁴ Este trabalho foi um excelente exemplo de como a complementação entre as medidas

de RDC com métodos espectroscópicos ótico-quirais pode ser uma estratégia de sucesso para determinação da configuração absoluta.

Conforme mostrado anteriormente, o RDC aparece no espectro como variações no valor da constante de acoplamento escalar, fornecendo um acoplamento efetivo total T . Assim, qualquer experimento capaz de medir o valor do acoplamento escalar pode, em princípio, ser utilizado para medir os valores de RDC. As medidas de RDC mais citadas na literatura para pequenas moléculas envolvem o acoplamento entre o ^1H ligado diretamente ao ^{13}C . Estas podem ser facilmente medidas diretamente em um experimento unidimensional de ^{13}C acoplado ou na dimensão do ^{13}C em um experimento 2D HETCOR acoplado. Entretanto, o mais conveniente é realizar experimentos de detecção indireta, usando sequências como HSQC acoplados em F1³⁵ ou F2. Nos experimentos acoplados em F2 os valores de RDCs são extraídos na dimensão direta, tirando vantagem da maior resolução digital nesta dimensão. O habitual na medida de RDCs é usar o experimento chamado CLIP-HSQC para obter sinais em fase independentemente da grandeza do acoplamento T efetivo.³⁶ Por outro lado, nos experimentos HSQC acoplados em F1 o valor do RDC é obtido da dimensão indireta. A resolução digital menor no experimento acoplado em F1 pode ser compensado pelo uso de um bloco de evolução do acoplamento escalar (J -scaling),³⁷ às vezes combinado com um filtro BIRD.³⁸ Sobre estas sequências básicas outros experimentos foram desenvolvidos, tratando de minimizar o impacto do acoplamento próton-próton na medida dos RDCs^{39,40} ou o uso de experimentos ultrarrápidos.⁴¹

O objetivo desta comunicação é mostrar o potencial da técnica de RDC para determinar a configuração relativa de produtos naturais que possuem estereocentros, bem como atribuir os sinais de hidrogênios diastereotópicos. Para isso foi escolhida a molécula da α -santonina (**1**), que apresenta quatro estereocentros (Figura 2). A determinação da configuração relativa por meio dos valores de RDC coincidiu perfeitamente com os valores observados através das medidas do NOE e do acoplamento escalar. Além disso, os valores de RDC permitiram avançar na atribuição de um dos metileno pró-quirais da α -santonina, que não estava atribuído anteriormente na literatura.

A α -santonina é um composto natural, pertencente à família das lactonas de sesquiterpenos e apresenta atividade anti-helmíntica e antipirética. Este composto foi isolado pela primeira vez da planta *Artemisia Santonica* por Kahler *et al.* em 1830.⁴² A sua estrutura foi determinada baseada em reações de derivatização por Clemo *et al.* em 1929.⁴³ Ruikar *et al.* isolou e atribuiu os sinais nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da α -santonina **1**, porém os prótons diastereotópicos não foram atribuídos.⁴⁴ Estudos bioquímicos mostram que o isômero- β (**2**) (Figura 2) tem atividade antipirética mais pronunciada que o isômero- α (**1**).⁴⁵ Esta classe de compostos também tem sido largamente utilizada como precursores de outros compostos com atividade biológica sintetizados por processos fotoquímicos.^{46,47} Portanto, a determinação correta da estereoquímica é um ponto decisivo para caracterização e estudo das moléculas sintetizadas. Embora a configuração da α -santonina seja conhecida, a proposta deste trabalho

é destacar a importância das medidas dos parâmetros anisotrópicos, especificamente aqui o RDC, como ferramenta para refinar a estrutura de moléculas orgânicas, bem como um experimento alternativo para fornecer mais informações sobre a geometria molecular.

PARTE EXPERIMENTAL

Poliacrilonitrila (PAN), peso molecular médio 150.000, e α -santonina: (3S,3aS,5aS,9bS)-3,5a,9-trimetil-3a,5,5a,9b-tetrahidronafto[1,2-b]furano-2,8(3H,4H)-diona (**1**), com 99% de pureza, foram obtidos comercialmente da empresa Sigma-Aldrich.

Todos os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Agilent, operando na frequência de 399,75 MHz para o ^1H e 100,51 MHz para o ^{13}C , à temperatura de 298 K, usando DMSO- d_6 (99,9% deuterado) como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna em um tubo de RMN de 5 mm. Para medir os valores experimentais de RDCs foram adquiridos espectros acoplados de gHSQC ^1H - ^{13}C acoplados em F2 no meio isotrópico e anisotrópico (no gel). Em ambos os casos foi utilizada uma solução de α -santonina (25 mg; 0,08 mmol) em DMSO- d_6 (0,6 mL). Os detalhes experimentais referentes à aquisição dos espectros estão na seção do Material Suplementar (MS). Os sinais dos espectros de ^1H e ^{13}C da α -santonina foram atribuídos, exceto os prótons metilênicos pró-quirais, conforme descrito a seguir, utilizando os seguintes experimentos: ^{13}C DEPT, gCOSY ^1H - ^1H , gHSQC ^{13}C - ^1H , e gHMBC ^{13}C - ^1H (ver MS).

O gel do polímero reticulado de PAN foi utilizado como meio de alinhamento.⁴⁸ Para produzir o gel foi preparada uma solução do polímero em concentração de 2,80 g mL⁻¹ em DMSO- d_6 . Esta solução foi aquecida a 60 °C para garantir a dissolução e diminuição da viscosidade, permitindo a sua transferência para o tubo de RMN com diâmetro interno de 5 mm. Depois disso, o tubo foi selado e irradiado no acelerador de elétrons com uma dose de 480 kGy. O polímero adquiriu uma coloração amarelada. O tubo foi quebrado e o gel foi recuperado na forma de pequenos bastões. Por fim, 25 mg de α -santonina foram dissolvidas em 0,6 mL de DMSO- d_6 , esta solução foi adicionada ao tubo de RMN contendo o bastão do gel e deixada em repouso para o intumescimento do gel.

As estruturas dos oito diferentes diastereoisômeros foram sujeitas à busca conformacional, usando o campo de força MMFF94,⁴⁹ implementado no programa Macromodel.⁵⁰ As conformações selecionadas foram otimizadas, aplicando o nível da teoria do funcional de densidade (DFT), usando o funcional híbrido B3LYP e a base 6-31G* conforme implementado no programa Gaussian 09.⁵¹ Sobre as geometrias otimizadas, usando o funcional PBE0⁵² e a base especializada pcS-1,⁵³ foram realizados cálculos de deslocamento químico (GIAO)^{54,55} e de constantes de acoplamento escalar (ver MS, Tabela 2S e 3S). Nesse último foi empregado não só o termo de contato de Fermi mas também os termos dipolar e spin-órbita diamagnético e paramagnético.^{56,57} As análises dos RDCs foram realizadas utilizando o programa MSpin-RDC.⁵⁸

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A α -santonina é um produto natural com quatro estereocentros designados por C3, C3a, C5a e C9b (Figura 2). De acordo com o número de estereocentros este composto apresenta potencialmente dezesseis estereoisômeros, sendo oito diferentes diastereoisômeros que serão denominados: (i) 5a(S/R), 9b(S/R), 3a(S/R), 3(S/R); (ii) 5a(S/R), 9b(R/S), 3a(R/S), 3(R/S); (iii) 5a(S/R), 9b(S/R), 3a(R/S), 3(R/S); (iv) 5a(S/R), 9b(R/S), 3a(S/R), 3(S/R); (v) 5a(S/R), 9b(S/R), 3a(S/R), 3(R/S); (vi) 5a(S/R), 9b(R/S), 3a(S/R), 3(R/S); (vii) 5a(S/R), 9b(R/S), 3a(R/S), 3(S/R); (viii) 5a(S/R), 9b(S/R), 3a(R/S), 3(S/R) (ver MS, Figura 11S).

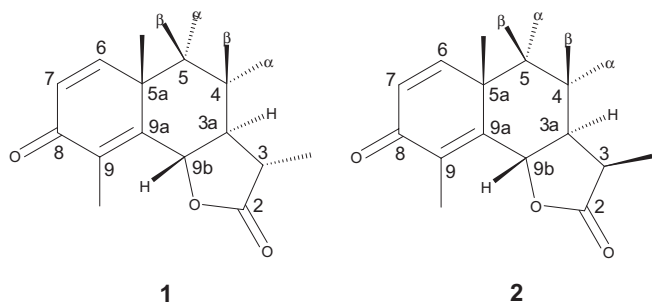


Figura 2. Estruturas da α -santonina (**1**) e da β -santonina (**2**)

A análise do espectro de RMN de ^1H mostrou quatro dupletos em δ_{H} 6,92 (d, 1H, J 9,8 Hz, H6); 6,14 (d, 1H, J 9,8 Hz, H7); 5,07 (d, 1H, J 11,3 Hz, H9b) e 1,10 (d, 3H, J 6,9 Hz, C3- CH_3); dois simpletos em δ_{H} 1,98 (s, 3H, C9- CH_3) e 1,28 (s, 3H, C5a- CH_3); um sinal em δ_{H} 2,60 (dq, 1H, J 6,9 Hz/11,3 Hz, H3) e um multipletto em δ_{H} 1,78 (m, 1H, H3a). O experimento gCOSY ^1H - ^1H confirmou esta atribuição. Na região entre δ_{H} 1,88 e 1,64 observa-se a sobreposição de alguns sinais. Estes sinais, e ainda o sinal em δ_{H} 1,32, correspondem aos prótons diastereotópicos H4 α , H4 β , H5 β e H5 α , os quais não puderam ser atribuídos inicialmente.

O espectro de RMN de ^{13}C da α -santonina mostrou sinais em δ_{C} 185,67 e 178,05 atribuídos aos grupos carbonila C8 e C2, respectivamente. Os sinais na região entre δ_{C} 156,63 e 124,73 foram atribuídos ao C6 (156,63 ppm), C9a (153,32 ppm), C9 (126,37 ppm) e C7 (124,73 ppm). Os sinais dos carbonos metinos aparecem em δ_{C} 80,69 (C9b), 53,06 (C3a) e 40,00 (C3). O sinal do carbono C5a absorve em δ_{C} 41,55 ppm. Os sinais das metilas foram atribuídos como δ_{C} 24,57 (C5a- CH_3), 12,22 (C3- CH_3) e 10,66 (C9- CH_3). Por fim, os dois carbonos metilênicos mostram sinais em δ_{C} 37,41 (C5) e 22,03 (C4) (as Tabelas 4S e 5S resumem as atribuições dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da α -santonina, respectivamente).

O espectro gHSQC-acoplado em F2 do composto **1** no meio anisotrópico (gel de PAN) foi adquirido para obter os valores da constante de acoplamento total (T). Estes valores foram comparados com os valores das constantes de acoplamento escalar (J) obtidas anteriormente no meio isotrópico, realizando o mesmo experimento de RMN. A diferença entre estes dois valores forneceu o valor do RDC. Experimentalmente, isto foi feito comparando-se as fatias extraídas em F2 destes dois espectros gHSQC-acoplado obtidos nos dois diferentes meios. A Figura 3 exemplifica como são medidos os valores de RDC, mostrando o exemplo do par de spins carbono C9- CH_3 / próton C9- CH_3 . O mesmo procedimento foi adotado para outros pares de spins, sendo possível medir sete valores de RDC que variaram de $-3,2$ a $+5,9$ Hz (Tabela 1). As medidas dos erros foram estimadas através da superposição visual dos picos.⁴⁸

Uma vez obtidos os valores experimentais de RDC foram realizados os cálculos teóricos para otimização da geometria molecular. A geometria dos diferentes diastereoisômeros da α -santonina foram otimizadas por um campo de força MMFF94.⁴⁹ Como potencialmente as moléculas podem apresentar um certo grau de flexibilidade por pseudorotação do anel central de seis membros, foi realizado, inicialmente, uma busca conformacional de cada um dos diastereoisômeros. As estruturas foram mantidas dentro de uma janela de 5 kcal mol $^{-1}$. Os diastereoisômeros da α -santonina apresentaram somente uma única conformação abaixo do nível de 5 kcal mol $^{-1}$, exceto a estrutura **viii** que apresentou duas conformações diferentes (ver MS). A seguir estas estruturas foram refinadas ao nível DFT B3LYP/6-31G*. O próximo passo foi associar estes dados aos valores experimentais de RDCs para calcular o tensor de alinhamento e obter os valores de RDCs recalculados.

Os valores recalculados de RDC foram gerados usando o programa MSpin-RDC, que realiza o ajuste do SVD entre os valores experimentais de RDCs e as estruturas propostas por DFT. O acoplamento $^1D_{\text{CH}}$ dos grupos metila foram tratados no SVD usando o procedimento proposto por Navarro-Vázquez conforme está implementado no MSpin-RDC.⁵⁹ No caso da estrutura **viii**, devido à presença de duas conformações, foi necessário usar a aproximação do tensor-único, em que o alinhamento das duas conformações é considerado independente das suas estruturas particulares. As populações das estruturas foram simultaneamente otimizadas, junto com os elementos do tensor, durante o processo de ajuste.⁵⁹ Esta aproximação de tensor-único pode ser feita nos casos em que a troca conformacional não envolve grande mudança na forma global da

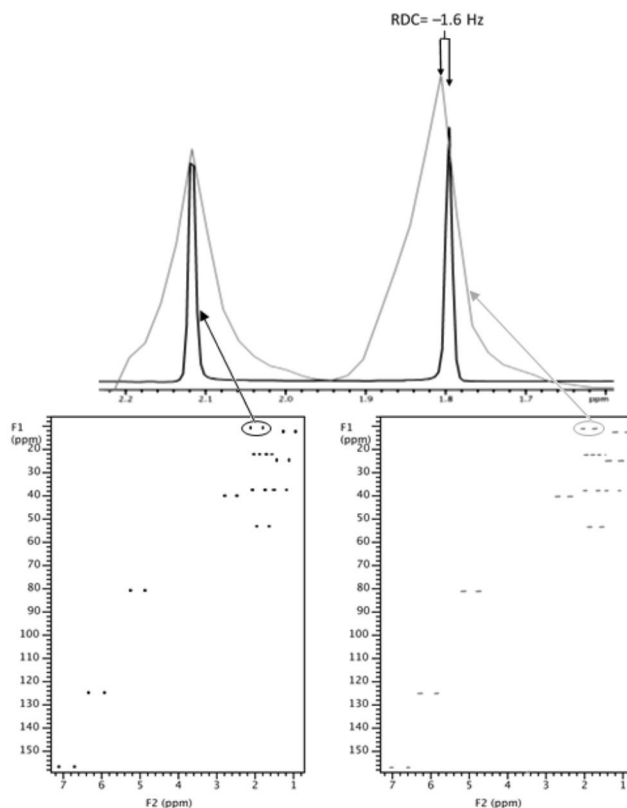


Figura 3. Espectro gHSQC ^1H - ^{13}C acoplado da α -santonina no meio isotrópico (esquerda) e no meio anisotrópico com gel PAN (direita). Acima está representada a sobreposição das projeções em F2 do acoplamento C9- CH_3 /C9- CH_3 , sendo a projeção correspondente ao meio isotrópico em preto e ao meio anisotrópico em cinza. O valor do RDC corresponde à diferença $D = T - J$

Tabela 1. Valores experimentais de RDC obtidos para diferentes pares de spins e os seus respectivos erros estimados

Par de spins	Valor do RDC (Hz)
C6-H6	$5,7 \pm 0,3$
C7-H7	$-3,2 \pm 0,5$
C3- CH_3 -C3- CH_3	$4,8 \pm 0,9$
C9- CH_3 -C9- CH_3	$-1,6 \pm 0,4$
C5a- CH_3 -C5a- CH_3	$-1,8 \pm 0,2$
C3-H3	$3,3 \pm 0,5$
C3a-H3a	$3,5 \pm 0,9$
C5-H ($\delta=1,85$ ppm)	$-1,3 \pm 0,2$
C5-H ($\delta=1,32$ ppm)	$5,9 \pm 1,0$
C4-H ($\delta=1,70$ ppm)	$5,4 \pm 1,0$
C4-H ($\delta=1,88$ ppm)	$3,6 \pm 1,0$

molécula como é o caso particular da estrutura **viii**, na qual as duas conformações surgem da pseudorotação do fragmento ciclohexila. É importante salientar que a aproximação do tensor-único exige a definição de um sistema de eixos comum para todas as conformações. Isto é normalmente realizado por meio da superposição das coordenadas atômicas por mínimos quadrados.²¹ Neste caso particular isso foi implementado por meio da superposição dos átomos de carbono do anel semiquinona. A qualidade do ajuste dos valores de RDCs entre os dados experimentais e os dados recalculados foi expressa em termos do fator Q .

A α -santonina apresenta dois grupos metílicos pró-quirais que não haviam sido atribuídos inicialmente, os valores de RDC correspondentes a estes vetores particulares podem ser atribuídos para qualquer um dos dois vetores CH metilênicos (H α ou H β). Isso resulta em quatro combinações possíveis para cada estrutura proposta, denominadas: A, B, C e D, nas quais são alternadas as atribuições dos deslocamentos químicos dos prótons diastereotópicos, ainda não atribuídos, e consequentemente os valores de RDCs (Tabela 2).

Tabela 2. Combinação das atribuições possíveis dos prótons diastereotópicos do C4 e C5 da α -santonina

Possíveis atribuições	C4		C5	
	δ (1,70ppm)	δ (1,88ppm)	δ (1,85ppm)	δ (1,32ppm)
A	β	α	β	α
B	β	α	α	β
C	α	β	β	α
D	α	β	α	β

Desta forma, cada uma das combinações foi submetida ao programa MSpin-RDC para o cálculo do fator Q de cada diastereoisômero. Na Figura 4 estão agrupados os valores do fator Q obtidos para as quatro diferentes combinações para os oito diastereoisômeros. Para considerar o impacto do erro experimental usou-se o procedimento do *bootstrapping*. Seguindo este protocolo, fez-se uma nova amostragem, gerada por meio de uma distribuição gaussiana de N dados, em que a média da distribuição correspondeu ao valor experimental reportado e o desvio padrão ao erro experimental estimado. N novos conjuntos de dados foram gerados mediante a escolha aleatória de dados em cada uma destas distribuições. O cálculo de SVD em cada um destes conjuntos fornece uma distribuição de tensores de alinhamento e fatores de qualidade, permitindo avaliar o impacto da incerteza experimental nos parâmetros calculados. O valor mostrado na Figura 4 corresponde ao valor médio dos valores de Q para as N distribuições.

O melhor ajuste foi observado para o diastereoisômero *i*, que corresponde efetivamente à estrutura da α -santonina e às combinações A e C. Portanto, o ajuste dos dados de RDC pôde, além de fornecer a estrutura correta, simultaneamente informar a atribuição correta da posição dos prótons metilênicos pró-quirais do carbono 5. Por fim, não foi possível atribuir os prótons metilênicos do carbono 4 porque os valores de RDC medidos, neste caso, foram muito próximos, não sendo diferenciáveis conforme mostram os valores do fator Q (0,286 contra 0,277 para *i*-A e *i*-C respectivamente, Tabela 6S)

Para confirmar a atribuição da configuração relativa definida pelas medidas de RDC foram realizadas análises adicionais do

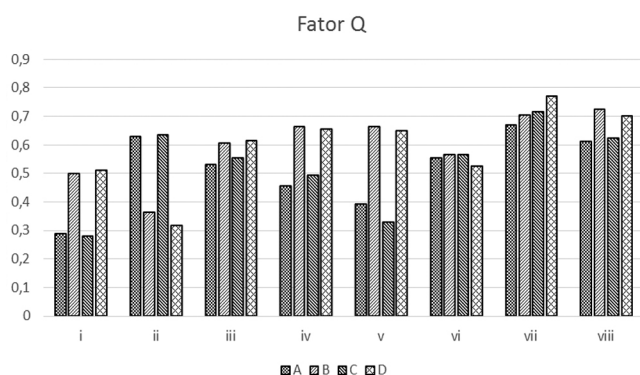


Figura 4. Fator Q para as oito estruturas propostas com as diferentes combinações de atribuição para os prótons metilênicos dos carbonos C4 e C5

deslocamento químico, das constantes de acoplamento J e do efeito Overhauser nuclear. Os valores corroboram os resultados obtidos por RDC (ver MS).

CONCLUSÃO

As medidas do acoplamento dipolar residual são uma excelente ferramenta para a determinação da configuração relativa de compostos orgânicos, especialmente para produtos naturais. Isto foi provado por meio da determinação da configuração relativa da α -santonina, um composto que possui quatro estereocentros, o qual foi alinhado em um gel de poliácridonitrila em DMSO- d_6 . Com os valores de RDC foi possível ainda atribuir o deslocamento químico dos prótons diastereotópicos do grupo metilênico do C5 pró-quiral, que ainda não estava atribuído na literatura. Os resultados foram confirmados com dados da análise de NOE e acoplamento J .

MATERIAL SUPLEMENTAR

Os dados suplementares deste trabalho (Figuras 1S-12S e Tabelas 1S-6S) estão disponíveis em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Rubens Rodrigues Teles e José Adonias Alves de França agradecem ao CNPq e à FACEPE, respectivamente, pela bolsa de doutorado. Armando Navarro-Vázquez agradece à UFPE pelo contrato de professor visitante. Nós agradecemos ao CENAPAD – Campinas e CENAPAD - Recife pelo tempo de computador destinado para este trabalho. Ao GAMALAB (DEN/UFPE) pela irradiação dos géis no acelerador de elétrons. À Fundação Alexander von Humboldt pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Cid, M.; Bravo, J.; *Structure Elucidation in Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, 2015.
- Kwan, E. E.; Huang, S. G.; *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2671.
- Breton, R. C.; Reynolds, W. F.; *Nat. Prod. Rep.* **2013**, 30, 501.
- Dong, R. Y.; *NMR Spectroscopy in Liquid Crystalline and Ordered Phases*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2006.
- Prestegard, J. H.; Bougault, C. M.; Kishore, A. I.; *Chem. Rev.* **2004**, 104, 3519.
- Gil, R. R.; Griesinger, C.; Navarro-Vázquez, A.; Sun, H. Em *Structure Elucidation in Organic Chemistry*; Cid, M.-M.; Bravo, J., eds.; Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2015; cap. 8.
- Vrzal, L.; Flídrová, K.; Tobrman, T.; Dvořáková, H.; Lhoták, P.; *Chem. Commun.* **2014**, 50, 7590.
- Trigo-Mouriño, P.; Santamaría-Fernández, R.; Sánchez-Pedregal, V. M.; Navarro-Vázquez, A.; *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 3101.
- Gayathri, C.; la Fuente, de, M. C.; Luy, B.; Gil, R. R.; Navarro-Vázquez, A.; *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5879.
- Böttcher, B.; Thiele, C. M.; *eMagRes. Determining the Stereochemistry of Molecules from Residual Dipolar Couplings (RDCs)*, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2012. Volume 1.
- Kummerlöwe, G.; Crone, B.; Kretschmer, M.; Kirsch, S. F.; Luy, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2643.
- Gil, R. R.; Gayathri, C.; Tsarevsky, N. V.; Matyjaszewski, K.; *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 840.
- García, M. E.; Pagola, S.; Navarro-Vázquez, A.; Phillips, D. D.; Gayathri, C.; Krakauer, H.; Stephens, P. W.; Nicotra, V. E.; Gil, R. R.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 5670.

14. Hallwass, F.; Schmidt, M.; Sun, H.; Mazur, A.; Kummerlöwe, G.; Luy, B.; Navarro-Vázquez, A.; Griesinger, C.; Reinscheid, U. M.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9487.
15. Aguiar, M. R. M. P. de; Gemal, A. L.; San Gil, R. A. D. S. *Quim. Nova* **1999**, *22*, 553.
16. Saupe, A.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1968**, *7*, 97.
17. Kramer, F.; Deshmukh, M. V.; Kessler, H.; Glaser, S. J.; *Concepts Magn. Reson., Part A* **2004**, *21A*, 10.
18. Losonczy, J. A.; Andreac, M.; Fischer, M. W.; Prestegard, J. H.; *J. Magn. Reson.* **1999**, *138*, 334.
19. Cornilescu, G.; Bax, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10143.
20. Burnell, E. E.; De Lange, C. A.; *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *76*, 268.
21. Thiele, C. M.; Schmidts, V.; Böttcher, B.; Louzao, I.; Berger, R.; Maliniak, A.; Stevensson, B.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6708.
22. Schuetz, A.; Junker, J.; Leonov, A.; Lange, O. F.; Molinski, T. F.; Griesinger, C.; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15114.
23. Sun, H.; Reinscheid, U. M.; Whitson, E. L.; d'Auvergne, E. J.; Ireland, C. M.; Navarro-Vázquez, A.; Griesinger, C.; *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14629.
24. Thiele, C. M.; *Concepts Magn. Reson. A* **2007**, *30A*, 65.
25. Troche-Pesqueira, E.; Cid, M.-M.; Navarro-Vázquez, A.; *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 1957.
26. Marx, A.; Thiele, C.; *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 254.
27. Luy, B.; Kobzar, K.; Knör, S.; Furrer, J.; Heckmann, D.; Kessler, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6459.
28. Gayathri, C.; Tsarevsky, N. V.; Gil, R. R.; *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 3622.
29. Kummerlöwe, G.; McCord, E. F.; Cheatham, S. F.; Niss, S.; Schnell, R. W.; Luy, B.; *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7087.
30. Erdélyi, M.; d'Auvergne, E.; Navarro-Vázquez, A.; Leonov, A.; Griesinger, C.; *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9368.
31. Mallagaray, A.; Canales, A.; Domínguez, G.; Jiménez-Barbero, J.; Pérez-Castells, J.; *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7179.
32. Yamamoto, S.; Yamaguchi, T.; Erdélyi, M.; Griesinger, C.; Kato, K.; *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9280.
33. Berger, R.; Courtieu, J.; Gil, R. R.; Griesinger, C.; Köck, M.; Lesot, P.; Luy, B.; Merlet, D.; Navarro-Vázquez, A.; Reggelin, M.; Reinscheid, U. M.; Thiele, C. M.; Zweckstetter, M.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8388.
34. Ge, H. M.; Sun, H.; Jiang, N.; Qin, Y. H.; Dou, H.; Yan, T.; Hou, Y. Y.; Griesinger, C.; Tan, R. X.; *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 5213.
35. Thiele, C. M.; *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7403.
36. Enthart, A.; Freudenberger, J. C.; Furrer, J.; Kessler, H.; Luy, B.; *J. Magn. Reson.* **2008**, *192*, 314.
37. Furrer, J.; John, M.; Kessler, H.; Luy, B.; *J. Biomol. NMR* **2007**, *37*, 231.
38. Thiele, C. M.; Bermel, W.; *J. Magn. Reson.* **2012**, *216*, 134.
39. Castañar, L.; Sistaré, E.; Virgili, A.; Williamson, R. T.; Parella, T.; *Magn. Reson. Chem.* **2015**, *53*, 115.
40. Kaltschnee, L.; Kolmer, A.; Timári, I.; Schmidts, V.; Adams, R. W.; Nils-son, M.; Kövér, K. E.; Morris, G. A.; Thiele, C. M.; *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 15702.
41. Becker, J.; Luy, B.; *Magn. Reson. Chem.* (2015). doi: 10.1002/mrc.4276.
42. Kahler, M.; *Arch. Pharm.* **1830**, *34*, 318.
43. Clemo, G. R.; Haworth, R. D.; Walton, E.; *J. Chem. Soc.* **1929**, 2368.
44. Ruikar, A. D.; Kulkarni, M. M.; Phalgune, U. D.; Puranik, V. G.; Desphande, N. R.; *Orient. J. Chem.* **2010**, *26*, 143.
45. Mabtin, M. L.; Morán, A.; Carrón, R.; Montero, M. J.; Roman, L. S.; *J. Ethnopharmacol.* **1988**, *23*, 285.
46. Alvarenga, E. S.; Barbosa, L. C. A.; Saliba, W. A.; Arantes, F. F. P.; Demuner, A. J.; Silva, A. A.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 401.
47. Klochkov, S. G.; Afanas'eva, S. V.; Pushin, A. N.; Gerasimova, G. K.; Vlasenkova, N. K.; Bulychev, Y. N.; *Chem. Nat. Compd.* **2009**, *45*, 817.
48. Kummerlöwe, G.; Auernheimer, J.; Lendlein, A. A.; Luy, B.; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6080.
49. Halgren, T. A.; *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490.
50. Schrödinger Release 2015-1: MacroModel, *Version 10.7*, Schrödinger, LLC, New York, NY, USA, 2015.
51. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09, Revision D.01* Gaussian, Inc., Wallingford CT, USA, 2009.
52. Adamo, C.; Barone, V.; *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *298*, 113.
53. Jensen, F.; *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 719.
54. Ditchfield, R.; *Mol. Phys.* **2006**, *27*, 789.
55. Wolinski, K.; Hinton, J. F.; Pulay, P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8251.
56. Helgaker, T.; Watson, M.; Handy, N. C.; *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 9402.
57. Sychrovský, V.; Gräfenstein, J.; Cremer, D.; *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 3530.
58. Navarro-Vázquez, A.; *Magn. Reson. Chem.* **2012**, *50*, S73.
59. Sánchez-Pedregal, V. M.; Santamaría-Fernández, R.; Navarro-Vázquez, A.; *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1471.