



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Rubens Rodrigues Teles

**PARÂMETROS ANISOTRÓPICOS DE RMN COMO
FERRAMENTA PARA A DETERMINAÇÃO
ESTRUTURAL DE MOLÉCULAS ORGÂNICAS**

Recife

2015

Rubens Rodrigues Teles

**PARÂMETROS ANISOTRÓPICOS DE RMN COMO
FERRAMENTA PARA A DETERMINAÇÃO
ESTRUTURAL DE MOLÉCULAS ORGÂNICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPE como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Hallwass

Co-orientador: Prof. Dr. Armando Navarro Vázquez

***Bolsista CNPq**

Recife

2015

Catálogo na fonte
Bibliotecária Joana D'Arc Leão Salvador CRB 4-572

T269p Teles, Rubens Rodrigues.
Parâmetros anisotrópicos de RMN como ferramenta para a determinação estrutural de moléculas orgânicas / Rubens Rodrigues Teles . – 2015.
144 f.: fig., tab.

Orientador: Fernando Hallwass.
Tese (Doutorado)– Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química. Recife, 2015.
Inclui referências e anexos.

1. Ressonância magnética nuclear. 2. Estereoquímica. 4. Produtos naturais. I. Hallwass, Fernando (Orientador). II. Título.

538.362 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2016-33

RUBENS RODRIGUES TELES

"PARÂMETROS ANISOTRÓPICOS DE RMN COMO FERRAMENTA PARA A DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE MOLÉCULAS ORGÂNICAS"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovado em: 18/12/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Fernando Hallwass (Orientador)

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Sebastião José de Melo

Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Wilson Barros Junior

Departamento de Física
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Giovannia Araújo de Lima Pereira

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Ricardo Oliveira da Silva

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à minha esposa
Kátia, minha mãe e meus filhos
Miguel e Daniel.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa, pelo companheirismo, força e carinho incondicional.

Aos meus filhos Miguel e Daniel, por serem a minha inspiração e me darem toda a motivação para conclusão deste trabalho.

Aos meus pais pela educação, caráter, amor.

À minha família, pelo apoio e incentivo.

Ao meu orientador prof. Dr. Fernando Hallwass, que tem atuado como um grande mestre, desde o início da minha formação acadêmica, e tornando-se referência de pessoa e acima de tudo sendo um grande amigo.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Armando Navarro-Vázquez pela grande contribuição para a evolução do nosso trabalho e pela atenção e paciência.

À central analítica da UFPE e seus funcionários, em especial à senhora Eliete de Fátima Vasconcelos Barros pelo carinho e simpatia.

Ao GAMALAB (DEN/UFPE) em especial à professora Dr(a). Helen Jamil Khoury pela irradiação dos géis no acelerador de elétrons.

Ao Hialotecnista Celso Luiz Lima da Silva (DQF), pela selagem dos tubos de RMN.

Ao professor Dr. Roberto Gil e seu grupo de pesquisa pelas amostras do gel PMMA cedidas.

Aos CENAPAD da UFPE e da UNICAMP pelos Cluster para realização dos cálculos teóricos

Ao professor Dr. Wilson Barros Junior pela realização dos experimentos de imagem de ressonância magnética.

A todas as pessoas que contribuíram direto ou indiretamente para este trabalho.

Ao programa de pós-graduação em química da UFPE.

Aos órgãos de fomento CNPq e PRONEX pelo apoio financeiro.

RESUMO

Neste trabalho foram estudados parâmetros anisotrópicos de Ressonância Magnética Nuclear, como o acoplamento dipolar residual (do inglês, *Residual Dipolar Coupling* – RDC) e anisotropia do deslocamento químico residual (do inglês, *Residual Chemical Shift Anisotropy*), com a finalidade de refinar a elucidação estrutural molecular. A molécula teste escolhida para realização deste estudo foi a α -Santonina, um produto natural com quatro estereocentros, portanto oito diastereoisômeros. Inicialmente, os sinais dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram atribuídos, com auxílio de experimentos uni e bidimensionais. Foram realizados cálculos de mecânica molecular para determinação do espaço conformacional de todos os diastereoisômeros, usando o campo de força MMFF94. As estruturas obtidas, numa janela de 5 kcal/mol foram refinadas com cálculos mecano-quânticos ao nível DFT/B3LYP/6-31G*. As anisotropias do deslocamento químico, foram derivadas do cálculo do tensor de blindagem química calculado com o método GIAO/PBE0/pcS-1. Os meios de alinhamento utilizados foram baseados na metodologia dos géis indutores de alinhamento (do inglês, *strain-induced alignment in a gel* – SAG), sendo avaliada a eficiência de três meios de alinhamento diferentes: poliacrilonitrila (PAN), poliacrilamida (PH) em DMSO- d_6 , e polimetilmetacrilato (PMMA) em CDCl_3 . O experimento realizado com o gel PAN forneceu onze valores de RDC na faixa entre $-3,2$ e $+5,9$ Hz. O ajuste dos valores experimentais com as estruturas otimizadas permitiu a determinação da configuração relativa correta da α -Santonina, (5a(S/R), 9b(S/R), 3a(S/R), 3(S/R)), bem como realizar a atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios pró-quirais do carbono-5. O experimento usando o gel PH forneceu seis valores de RDC, na faixa de $-25,5$ a $+12,7$ Hz. A baixa qualidade dos dados não possibilitou a determinação da configuração relativa da α -Santonina. Por fim, os experimentos com o gel PMMA permitiram a determinação da configuração relativa e da atribuição completa dos sinais de RMN ^1H , inclusive dos hidrogênios diastereotópicos $\text{H}4\alpha$, $\text{H}4\beta$, $\text{H}5\alpha$ e $\text{H}5\beta$ que ainda não haviam sido atribuídos na literatura. Foram realizadas medidas de RCSA da molécula teste no gel PMMA. Os valores obtidos ficaram na faixa de $-0,05$ a $+0,01$ ppm. Com estes dados não foi possível determinar a configuração relativa da mesma. Entretanto, foi realizado um tratamento associando os valores de RDC e RCSA, na qual obteve-se sucesso, chegando à correta configuração relativa com um fator Q igual a 0,606. Nesta amostra foram observados dois sinais para

cada carbono, sendo um atribuído à molécula dentro do gel e outro fora do gel. Para estudar esta observação foram realizadas medidas do tempo de relaxação longitudinal, T_1 , medidas do coeficiente de difusão, bem como imagens de ressonância magnética do tubo de RMN contendo o gel. Foram realizados diferentes cálculos de química quântica para verificar a influência destes no resultado dos valores de RDCs e RCSAs calculados. Para a otimização da geometria foram testadas três classes de métodos, totalizando vinte e oito cálculos. Deste total foram realizados vinte cálculos DFT, quatro cálculos Hartree-Fock e quatro cálculos Semi-empírico. Observou-se que a qualidade da otimização da estrutura não apresentou grande impacto no ajuste dos dados de RDC. Entretanto, a qualidade do ajuste obtido quando foram usados os métodos Semi-empírico foi levemente inferior. Em relação ao RCSA foram testados três níveis de cálculo, PBE0, MP2 e B3LYP, usando sempre o método GIAO. Foi verificada também a importância da inclusão da solvatação implícita com clorofórmio, totalizando nove cálculos. Os resultados mostram que a escolha do método DFT ou MP2 é relevante para os valores calculados de RCSA, por outro lado, a escolha da base e a inclusão da solvatação exerce menor efeito.

Palavras Chave: RDC. RCSA. NMR. Estereoquímica. Configuração Relativa. α -Santonina. Produtos Naturais. Elucidação Estrutural.

ABSTRACT

In this work we studied the application of anisotropic parameters of Resonance Magnetic Nuclear, namely Residual Dipolar Coupling (RDC) and Residual Chemical Shift Anisotropy (RCSA), to the refinement of molecular structure elucidation. The test molecule chosen for this study was α -Santonin, a natural product with four stereogenic carbons and therefore eight possible diastereoisomeric structures. In the first step, the ^1H and ^{13}C NMR spectra were fully assigned by a combination of 1D and 2D experiments. The conformational space of each possible diastereoisomer was explored by means of molecular mechanics computations using the MMFF94 force field. The obtained structures, in an energy window of 5 kcal/mol, were refined at the DFT /B3LYP/6-31G* level method. Chemical shielding anisotropies were derived from chemical shift tensor computations at the DFT GIAO/PBE0/pcS-1 level on the previous B3LYP structures. The alignment media employed in this work used were based on the methodology of strain-induced alignment in a gel (SAG). We evaluated the performance of three different gels: polyacrylonitrile (PAN), polyacrylamide (PH) in $\text{DMSO-}d_6$, and polymethyl methacrylate (PMMA) in CDCl_3 . The experiment carried out in PAN gel provided eleven RDC values in the range of -3.2 and $+5.9$ Hz. Fitting of this experimental values to the computed structures allowed us to determine the correct relative configuration of α -Santonin as (5a(S/R), 9b(S/R), 3a(S/R), 3(S/R)), as well as the assignment of chemical shifts of the prochiral hydrogens from carbon-5. The experiment using PH gel provided six RDC values in the range of -25.5 a $+12.7$ Hz. The lower quality of these data did not allow an unambiguous determination of the relative configuration of α -Santonin. Finally, experiments using the PMMA gel allowed to attribute the relative configuration and the complete assignment of NMR signals, including the diastereotopics hydrogens $\text{H4}\alpha$, $\text{H4}\beta$, $\text{H5}\alpha$ e $\text{H5}\beta$, that were not assigned before in the literature. We performed RCSA measurements of the test molecule in PMMA gel. The values obtained were in the range of -0.05 a $+0.01$ ppm. It was not possible however to select the correct configuration of α -Santonin by fitting these RCSAs to the computed chemical shielding tensors. Nevertheless, when RDC and RCSA values were fitted together the correct structure was selected, arriving to the correct structure with a Q factor equal to 0.606. In this sample was observed two signals for each carbon, being assigned to the molecule within the gel and outside the gel. To further study this behavior were performed measurements of the

longitudinal relaxation time (T_1), diffusion coefficient and magnetic resonance imaging experiments of the gel. Different methods of quantum chemistry calculations were carried out to evaluate their influence on the outcome of the RDC and RCSA backcalculated values. For the geometry optimization were tested three classes of methods, totaling twenty-eight calculations, twenty DFT based, four Hartree-Fock and four Semiempirical. It was observed that the quality of the structure optimization does not have a strong impact on the fitting of the RDC data. Nevertheless, slightly worse fittings were consistently obtained when using Semiempirical geometries. Regarding the RCSAs we tested three classes of GIAO methods: PBEO, MP2 and B3LYP. It was also evaluated the importance of the inclusion of implicit solvation, totaling nine calculations. The results shown that the choice of DFT or MP2 method is relevant to the RCSA back-calculated values, on the other hand the choice of the basis set or the inclusion of solvation have small effects.

Keywords: RDC. RCSA. NMR. Stereochemistry. Relative Configuration. α -Santonin. Natural Products. Structure Elucidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O acoplamento dipolar entre dois spins I e S , representados na molécula da α -santonina, é proporcional à distância internuclear \vec{R}_{IS} e do ângulo θ entre o eixo internuclear e o campo magnético.	24
Figura 2. Cone do acoplamento dipolar entre dois spins I e S .	25
Figura 3. Duplete de Pake para os spins I e S no estado sólido (pó policristalino).	25
Figura 4. Representação dos espectros de HSQC (A) desacoplado; (B) acoplado na dimensão direta ($F2$); (C) acoplado na dimensão indireta ($F1$).	28
Figura 5. Representação dos componentes principais do tensor de deslocamento químico.	29
Figura 6. Efeitos do movimento molecular randômico em solução para a molécula rígida α -Santonina: no sistema de coordenadas de referência A, localizado no laboratório (X^L , Y^L e Z^L), o vetor internuclear \vec{R} possui uma dependência temporal, e o vetor do campo magnético \vec{B} é constante, apontando na direção Z; no sistema de coordenadas de referência B, localizado arbitrariamente na molécula, o vetor internuclear \vec{R} é constante, e o vetor do campo magnético \vec{B} possui uma dependência temporal. Em ambos os eixos de referência o acoplamento dipolar também possuirá uma dependência temporal.	32
Figura 7. Esquema geral para a obtenção de informações estruturais em moléculas rígidas pequenas ou semirrígidas baseadas nos parâmetros de RDCs e RCSAs.	39
Figura 8. Exemplos de moléculas na qual foram aplicados os parâmetros anisotrópicos de RMN para resolução de problemas de configuração e conformação: Estricnina, Sphaeropsidina A, Spiroindeno, Ludartina, Vatiparol, Colato de Sódio, Archazolida A, 2-fenil-3-Benzazepina, α -Metileno- γ -Butirolactona, Lorcaserina.	40
Figura 9. Estrutura da Sagittamida A.	41
Figura 10. Estrutura de três compostos sintetizados (A, B e C) da classe de produtos naturais Meloheninas.	41
Figura 11. Reação de ciclização eletrofílica de uma azida contendo 1,5-enina, formando três produtos: um areno, um ciclohexadieno e um produto desconhecido, determinado posteriormente (círculo vermelho).	42
Figura 12. Estrutura da Estrona e 13-epi-estrona.	43
Figura 13. Estrutura química do poliestireno (PS) reticulado.	44
Figura 14. Estrutura química do poliacrilamida (PH) reticulado.	45
Figura 15. Estrutura química do polivinil acetato (PVAc) reticulado.	45
Figura 16. Estrutura química do poliacrilonitrila (PAN) reticulado.	46

Figura 17. Estrutura química do polimetilmetacrilato (PMMA) reticulado.	46
Figura 18. Dispositivo para medida de RDCs e RCSAs. Adaptado da referência ⁶⁶ .	47
Figura 19. Dispositivo para ajuste rápido e reversível do alinhamento pelo método SAG (aparato de Kuchel).	48
Figura 20. Estrutura dos compostos α -santonina (1) e β -santonina (2).	49
Figura 21. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 399,75 MHz) do composto α -Santonina a 298K.	61
Figura 22. Espectro de RMN gCOSY ^1H - ^1H (DMSO- d_6 , 399,75 MHz) do composto α -Santonina a 298K.	62
Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100,51 MHz) do composto α -Santonina a 298K.	63
Figura 24. Espectro de RMN DEPT ^{13}C (DMSO- d_6 , 100,51 MHz) do composto α -Santonina a 298K.	64
Figura 25. Espectro de RMN gHSQC $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6 , 399,75 MHz) do composto α -Santonina a 298K.	65
Figura 26. Espectro de RMN gHSQC ^1H - ^{13}C acoplado em F_2 da molécula α -Santonina no meio isotrópico (esquerda) e no meio anisotrópico, no gel PAN (direita). Acima, é mostrada a sobreposição das projeções em F_2 do acoplamento C9- $\underline{\text{CH}_3}$ /C9- $\underline{\text{CH}_3}$, no meio isotrópico (linha preta) e anisotrópico (linha cinza). Os valores de RDC são dados pela diferença $D = T - J$.	67
Figura 27. Geometria dos oito diastereoisômeros otimizadas da molécula α -Santonina, utilizando o programa Gaussian09.	70
Figura 28. Fatores de qualidade Q , para o alinhamento no gel PAN, dos diferentes diastereoisômeros, e para as quatro combinações dos grupos metilênicos. *O resultado para o diastereoisômero viii representa uma média da solução para duas conformações.	72
Figura 29. Fatores de qualidade Q , para o alinhamento no gel PH, dos diferentes diastereoisômeros, e para as quatro combinações dos grupos metilênicos. *O resultado para o diastereoisômero viii representa uma média da solução para duas conformações.	74
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H (CDCl ₃ , 399,75 MHz) do composto α -Santonina alinhado no gel PMMA a 298K. A ampliação mostra o sinal do CHCl ₃ . O espectro foi realizado imediatamente após a adição da solução de α -santonina ao gel PMMA.	75
Figura 31. Espectro de RMN de ^1H (CDCl ₃ , 399,75 MHz) do composto α -Santonina alinhado no gel PMMA a 298K. A ampliação mostra o sinal do CHCl ₃ . O espectro foi realizado um dia após a adição da solução de α -Santonina ao gel PMMA.	76
Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl ₃ , 100,51 MHz) do composto α -Santonina alinhado no gel PMMA a 298K. O espectro mostra também a ampliação de alguns sinais, mostrando que estes apareceram duplicados com diferentes intensidades.	77

Figura 33. Microimagens de RM do gel PMMA comprimido da solução de α -Santonina. As imagens foram obtidas usando a sequência de pulsos MEMS. Foram realizadas duas sequências de experimentos com TE=11 ms e TE=160 ms. Para cada sequência foram obtidas três fatias consecutivas de 5 mm. A resolução das imagens foi de 40 μ m e FOV de 10 mm. 77

Figura 34. Forma ondulada que o gel PMMA adquire após ser comprimido dentro do tubo de RMN de 5 mm. As fatias selecionadas correspondem às imagens de RM obtidas com TE=11 ms. 78

Figura 35. Espectro de RMN de ^2H (CDCl_3 , 61,36 MHz) da solução de α -Santonina a 298K: (A) espectro com o gel PMMA comprimido; (B) espectro como o gel PMMA relaxado; (C) espectro sem o gel PMMA (isotrópico). 80

Figura 36. Espectro de RMN gHSQC ^1H - ^{13}C acoplado em *F1* com pulso adiabático da α -Santonina alinhado no gel PMMA (CDCl_3 , 399,75 MHz) a 298K. O espectro foi realizado com uma evolução em *J* de $k=3$ e rebatido. 81

Figura 37. Fatores de qualidade Q , para o alinhamento no gel PMMA, dos diferentes diastereoisômeros, para as quatro combinações dos grupos metilênicos. *O resultado para o diastereoisômero **viii** representa uma média da solução para duas conformações. 84

Figura 38. Fatores de qualidade Q , para o alinhamento no gel PMMA, dos diferentes diastereoisômeros, para as quatro combinações dos grupos metilênicos. A barra de erros mostra o desvio padrão dos valores de Q obtidos a partir do procedimento de *bootstrapping* com $N=256$ distribuições. *O resultado para o diastereoisômero **viii** representa uma média da solução para duas conformações. 85

Figura 39. Fatores de qualidade Q , para o alinhamento no gel PMMA, dos diferentes diastereoisômeros usando apenas os valores de $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ mostrados na Tabela 8. *O resultado para o diastereoisômero **viii** representa uma média da solução para duas conformações. 87

Figura 40. Fatores de qualidade Q , para o alinhamento no gel PMMA, dos diferentes diastereoisômeros usando os valores de $\Delta\text{RDCs}+\Delta\Delta\text{RCSA}_i$. *O resultado para o diastereoisômero **viii** representa uma média da solução para duas conformações. 88

Figura 41. Fatores de qualidade Q , para o alinhamento no gel PMMA, dos diferentes diastereoisômeros usando apenas os valores de $\Delta\Delta\delta_i$ experimentais. Estes resultados de Q foram obtidos com as correções posteriores. *O resultado para o diastereoisômero **viii** representa uma média da solução para duas conformações. 91

Figura 42. Fatores de qualidade Q , para o alinhamento no gel PMMA, dos diferentes diastereoisômeros usando os valores de $\Delta\text{RDCs}+\Delta\Delta\delta_i$. Estes resultados de Q foram obtidos com as correções posteriores. *O resultado para o diastereoisômero **viii** representa uma média da solução para duas conformações. 92

Figura 43. Gráfico dos valores do DQM obtidos pela sobreposição das estruturas, para a configuração relativa *i* da molécula α -Santonina, obtida pelo método de referência, e as estruturas obtidas por outros métodos de química quântica. Em azul é mostrado o valor médio de DQM obtido para os 19 cálculos DFT. Em amarelo é mostrado o valor médio de DQM obtido para os 4 cálculos 94

Hartree-Fock. Em vermelho é mostrado o valor médio do DQM obtido para os 4 cálculos Semi-empírico. A barra de erros mostra o valor do desvio padrão para cada classe de métodos.

Figura 44. Sobreposição das estruturas da configuração relativa *i*, da molécula α -Santonina, otimizadas a partir de cálculos de química quântica utilizando o método DFT, com diferentes combinações de funcionais e bases. 95

Figura 45. Sobreposição das estruturas da configuração relativa *i*, da molécula α -Santonina, otimizadas a partir de cálculos de química quântica utilizando o método Hartree-Fock, com diferentes combinações de funcionais e bases. 95

Figura 46. Sobreposição das estruturas da configuração relativa *i*, da molécula α -Santonina, otimizadas a partir de cálculos de química quântica utilizando o método Semi-empírico, com diferentes combinações de funcionais e bases. 96

Figura 47. Gráfico dos diferentes valores do fator Q em função do método de química quântica utilizado para a otimização da geometria, da configuração relativa *i* da molécula α -Santonina: em azul são mostrados os cálculos baseados na classe de métodos DFT; em amarelo são mostrados os cálculos baseados na classe Hartree-Fock; em vermelho são mostrados os cálculos baseados na classe Semi-empírico. 97

Figura 48. Gráfico dos valores médios do fator Q em função da classe de métodos de química quântica utilizado para a otimização da geometria, da configuração relativa *i* da molécula α -Santonina: em azul são mostrados os cálculos baseados na classe DFT; em amarelo são mostrados os cálculos baseados na classe Hartree-Fock; em vermelho são mostrados os cálculos baseados na classe Semi-empírico. A barra de erros indica o desvio padrão obtido para cada classe. 98

Figura 49. Gráfico dos diferentes valores do fator Q em função do método de química quântica GIAO utilizado para o cálculo das anisotropias do deslocamento químico, da configuração relativa *i* da molécula α -Santonina: em azul são mostrados os cálculos baseados nos funcionais PBE0; em amarelo são mostrados os cálculos baseados nos funcionais MP2; em vermelho são mostrados os cálculos baseados nos funcionais B3LYP. 101

Figura A1. Espectro de RMN gHMBC $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6 , 399,75 MHz) do composto α -Santonina a 298K. 117

Figura A2. Expansão do espectro de RMN J -resolvido (DMSO- d_6 , 399,75 MHz) na região entre 1,88 e 1,32ppm do composto α -Santonina a 298K. 118

Figura A3. Parte do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 399,75 MHz) do composto α -Santonina **1** (espectro inferior). O espectro superior mostra o espectro simulado do sistema de spins envolvendo os hidrogênios H9b, H3, H4 β , H4 α , H5 β , H5 α , H3a, e C3-CH $_3$ usando o programa SpinWorks. 119

Figura A4. Espectro de RMN NOESY ^1H - ^1H (DMSO- d_6 , DMSO- d_6 MHz) do composto α -Santonina a 298K. 123

Figura A5. Representação dos eixos principais dos tensores de alinhamento computados para os sessenta e quatro *bootstrapping* conjunto de dados; azul, Az; verde, Ay; vermelho, Ax 141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos de química quântica utilizados para a otimização da geometria da configuração relativa <i>i</i> , da molécula α -Santonina, no programa Gaussian.	57
Tabela 2. Métodos de química quântica utilizados para a realização de cálculos de RMN GIAO da configuração relativa <i>i</i> , da molécula α -Santonina, no programa Gaussian.	58
Tabela 3. RDCs medidos experimentalmente, para o gel PAN, onde seus erros estimados são apresentados entre parênteses.	68
Tabela 4. Possíveis atribuições dos hidrogênios diastereotópicos ligados aos carbonos C4 e C5.	71
Tabela 5. RDCs medidos experimentalmente, para o gel PH, e seus erros estimados são apresentados entre parênteses.	73
Tabela 6. Valores medidos do tempo de relaxação longitudinal T_1 do ^1H e do coeficiente de difusão, para os sinais de clorofórmio dentro e fora do PMMA, da amostra com o gel comprimido.	79
Tabela 7. ΔRDCs medidos experimentalmente, para o alinhamento no gel PMMA.	83
Tabela 8. $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ medidos experimentalmente, para o alinhamento no gel PMMA e $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ previstos a partir do cálculo do tensor de alinhamento utilizando apenas os ΔRDCs e tendo como <i>input</i> a estrutura da α -Santonina (diastereoisômero <i>i</i>).	86
Tabela 9. Valores de $\Delta\Delta\delta_i$ medidos experimentalmente, para o alinhamento da α -Santonina no gel PMMA e valores de $\Delta\Delta\delta_i^{\text{solv}(\text{min})}$ medidos nos mesmos espectros.	91
Tabela 10. Anisotropias do deslocamento químico calculadas utilizando diferentes métodos de química quântica para o diastereoisômero <i>i</i> da molécula α -Santonina.	100
Tabela A1. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δ_{H} em ppm) e constantes de acoplamento (J em Hz) do composto α -Santonina em $\text{DMSO}-d_6$.	120
Tabela A2. Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (δ_{C} em ppm) do composto α -Santonina em $\text{DMSO}-d_6$.	121
Tabela A3. Análise do acoplamento escalar 3J dos oito diferentes diastereoisômeros da molécula α -Santonina*.	122
Tabela A4. Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C experimentais e calculados para os oito diferentes diastereoisômeros da α -Santonina. Além disso, estão incluídos os valores de DQM, R^2 , a e b para o ajuste linear entre os dados experimentais e calculados.	134
Tabela A5. Comparação das constantes de acoplamento escalar experimentais e calculadas para os oito diferentes diastereoisômeros da α -Santonina. Além disso, estão incluídos os valores de DQM, R^2 , a e b para o ajuste linear entre os valores experimentais e calculados.	135

Tabela A6. Valores do fator de qualidade (Q) obtidos para as quatro permutações possíveis dos oito diastereoisômeros do composto 1 alinhado no gel PAN.	136
Tabela A7. Valores do fator de qualidade (Q) obtidos para as quatro permutações possíveis dos oito diastereoisômeros do composto 1 alinhado no gel PH.	136
Tabela A8. Valores do fator de qualidade (Q) obtidos para as quatro permutações possíveis dos oito diastereoisômeros do composto 1 alinhado no gel PMMA. Sem procedimento <i>bootstrapping</i> .	137
Tabela A9. Valores do fator de qualidade (Q) obtidos para as quatro permutações possíveis dos oito diastereoisômeros do composto 1 alinhado no gel PMMA. Com procedimento <i>bootstrapping</i> com $N=256$ e erro superestimado coletivamente como 1,5Hz.	138
Tabela A10. Valores do fator de qualidade (Q) obtidos para o cálculo apenas com os valores de $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$, para os oito diastereoisômeros do composto 1 alinhado no gel PMMA.	139
Tabela A11. Valores do fator de qualidade (Q) obtidos para o cálculo com os valores de $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ e ΔRDCs associados, para os oito diastereoisômeros do composto 1 alinhado no gel PMMA.	139

LISTA DE ABREVIATURAS

RMN – Ressonância Magnética Nuclear
NOE – Efeito Nuclear Overhauser
RDC – *Residual Dipolar Coupling*
RCSA – *Residual Chemical Shift Anisotropy*
RQC – *Residual Quadrupolar Coupling*
MAS – *Magic Angle Spinning*
HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*
CLIP/CLAP-HSQC – *Clean in phase/Clean antiphase-HSQC*
CSA – *Chemical Shift Anisotropy*
SVD – *Singular Value Decomposition*
DFT – *Density functional theory*
CR – Configuração Relativa
AMPS – Ácido 2-Acrilamida-2-Metil-1-PropanoSulfônico
PBLG – *Poli- γ -(Benzil-L-Glutamato)*
PS – Poliestireno
DMSO – *Dimethyl Sulfoxide*
DCE – Dicroísmo Circular Eletrônico
DOR – Dispersão Ótica Rotacional
APS – Ácido (S)-2-acrilamida-1-propanosulfônico
SAG – *Strain-induced Alignment in a Gel*
PAA – Para-Azoxianisol
THF – Tetrahidrofurano
PH – Poliacriloamida
DMF – Dimetilformamida
PVAc – Polivinilacetato
PAN – Poliacrilonitrila
PMMA – Polimetilmetacrilato
PDMS – Polidimetilsiloxano
DI – Diâmetro Interno
NOESY – *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
DMMA – N,N-Dimetilacrilamida

BIS – N,N'-Metilenobisacrilamida

TMS – Tetrametilsilano

ppm – Parte por milhão

DEPT – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*

gCOSY – *Correlation Spectroscopy with gradient*

gHMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Coherence with gradient*

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

GIAO – *Gauge-including-atomic-orbital*

MEMS – *Multi-Echo Multi-Slice*

DQM – Desvio Quadrático Médio

VMD – *Virtual Molecular Dynamics*

RM – Ressonância Magnética

FOV – *Field of view*

DOSY – *Diffusion-ordered spectroscopy*

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	21
1 – INTRODUÇÃO	22
1.1 – ACOPLAMENTO DIPOLAR	23
1.1.1 – ACOPLAMENTO DIPOLAR RESIDUAL (RDC)	26
1.1.2 – MEDIDAS EXPERIMENTAIS DE RDC	27
1.2 – ANISOTROPIA DO DESLOCAMENTO QUÍMICO (CSA)	29
1.2.1 – ANISOTROPIA DO DESLOCAMENTO QUÍMICO RESIDUAL (RCSA)	30
1.2.2 – MEDIDAS EXPERIMENTAIS DE RCSA	30
1.3 – A OBTENÇÃO DE INFORMAÇÕES ESTRUTURAIS BASEADA EM MEDIDAS DE RDCs E RCSAs	31
1.3.1 – O TENSOR DE ALINHAMENTO	31
1.3.2 – CÁLCULO DO TENSOR DE ALINHAMENTO A PARTIR DE DADOS EXPERIMENTAIS	34
1.4 – APLICAÇÕES DOS PARÂMETROS ANISOTRÓPICOS	39
1.5 – MEIOS DE ALINHAMENTO	43
1.5.1 – DISPOSITIVOS PARA O AJUSTE DO GRAU DE ALINHAMENTO PELO MÉTODO SAG	47
1.6 – α -SANTONINA	48
1.7 – OBJETIVOS	50
1.7.1 – OBJETIVOS GERAIS	50
1.7.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
CAPÍTULO 2	51
2 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	52
2.1 – PROCEDIMENTOS GERAIS	52

2.2 – ANÁLISES DE RMN NO MEIO ISOTRÓPICO	52
2.3 – ANÁLISES DE RMN NO MEIO ALINHADO	54
2.3.1 – OBTENÇÃO DO GEL PAN RETICULADO	54
2.3.2 – OBTENÇÃO DO GEL PH RETICULADO	54
2.3.3 – OBTENÇÃO DO GEL PMMA RETICULADO	54
2.3.4 – MEDIDAS EXPERIMENTAIS DE RDCS	55
2.3.4.1 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	55
2.3.4.2 – EXPERIMENTOS DE RMN g HSQC ACOPLADOS EM F_2	55
2.3.4.3 – EXPERIMENTOS DE RMN g HSQC ACOPLADOS EM F_1	56
2.3.4.4 – EXPERIMENTOS DE RMN DE DEUTÉRIO	56
2.4 – CÁLCULOS TEÓRICOS	56
2.4.1 – OTIMIZAÇÃO ESTRUTURAL	56
2.4.2 – CÁLCULOS TEÓRICOS DOS DESLOCAMENTO QUÍMICO E DAS CONSTANTES DE ACOPLAMENTO ESCALAR	58
2.5 – IMAGENS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DO GEL PMMA	59
2.6 – OBTENÇÃO DOS RDCS E RCSAS CALCULADOS	59
2.7 – SOBREPOSIÇÃO DE ESTRUTURAS	59
2.8 – SIMULAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H	59
CAPÍTULO 3	60
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
3.1 – MEDIDAS DE RDC NO GEL PAN	66
3.2 – MEDIDAS DE RDC NO GEL PH	73
3.3 – MEDIDAS DE RDC E RCSA NO GEL PMMA	74
3.3.1 – OBTENÇÃO DOS VALORES EXPERIMENTAIS DE RDC E RCSA NO GEL PMMA	79
3.3.2 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA FASE ISOTRÓPICA NAS MEDIDAS DE ΔRCSAS	88

3.4 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES MÉTODOS DE QUÍMICA QUÂNTICA NOS RESULTADOS DE RDC	93
3.5 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES MÉTODOS DE QUÍMICA QUÂNTICA NAS MEDIDAS DAS ANISOTROPIAS DO DESLOCAMENTO QUÍMICO	99
CAPÍTULO 4	103
4 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	104
4.1 – CONCLUSÕES	104
4.2 – PERSPECTIVAS	105
REFERÊNCIAS	106
ANEXOS	116
A.1 – ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DE RMN ^1H e ^{13}C DO COMPOSTO α -SANTONINA	117
A.2 – ATRIBUIÇÃO DOS HIDROGÊNIOS DIASTEREOTÓPICOS	118
A.3 – DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO RELATIVA DA MOLÉCULA α -SANTONINA BASEADO NOS VALORES DAS CONSTANTES DE ACOPLAMENTO $^3J(\text{H,H})$ E DO EFEITO NOE	121
A.4 – CÁLCULOS TEÓRICOS DE DESLOCAMENTO QUÍMICO E CONSTANTES DE ACOPLAMENTO	124
A.4.1 – CORRELAÇÃO DOS VALORES DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPERIMENTAIS VS. CALCULADOS	125
A.4.2 – CORRELAÇÃO DOS VALORES DAS CONSTANTES DE ACOPLAMENTO ESCALAR EXPERIMENTAIS VS. CALCULADOS	129
A.5 – ANÁLISE DE RDC	136
A.6 – EXEMPLO DO TENSOR DE ALINHAMENTO OBTIDO PARA O CÁLCULO DA α -SANTONINA (ESTRUTURA <i>i</i>) ALINHADA NO GEL PAN	140

CAPÍTULO 1

Introdução

1 – INTRODUÇÃO

A 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 químicos¹.

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tem se consolidado como uma das técnicas mais importantes para a determinação estrutural de moléculas orgânicas^{2,3}. Os parâmetros tradicionalmente medidos para este fim são: o deslocamento químico (δ), que informa sobre o ambiente eletrônico em que os núcleos se encontram; e a constante de acoplamento escalar (J), que fornece informações geométricas. Quando estas informações, obtidas em experimentos unidimensionais, não são suficientes para elucidar a estrutura, recorre-se a experimentos bidimensionais, homo e heteronucleares, que permitem obter a conectividade entre os núcleos, e aos experimentos que se baseiam no Efeito Nuclear Overhauser (NOE)⁴, que fornecem informações espaciais da molécula. Este conjunto de dados em muitos casos permite a determinação da estrutura tridimensional da molécula.

Embora estes experimentos de RMN possibilitem a elucidação estrutural de um grande número de compostos orgânicos, algumas vezes não permitem a determinação estrutural tridimensional de moléculas mais complexas, pois possuem algumas limitações, por exemplo: o deslocamento químico é influenciado principalmente pela densidade eletrônica dos átomos mais próximos; as análises das constantes de acoplamento escalar 3J limitam-se a determinação dos ângulos diedros através de ligações covalentes, e são bastante dependentes da presença de heteroátomos; e por fim, o NOE limita-se as interações entre spins separados espacialmente até no máximo 5 Å. Desta forma, na maioria das vezes a tarefa de correlacionar partes remotas da molécula é difícil, e estas informações a longo alcance são perdidas.

As interações observáveis em RMN compreendem um total de quatro: o deslocamento químico, o acoplamento escalar, o acoplamento quadrupolar, para núcleos com quadrupolo nuclear, e o acoplamento dipolar. No estado sólido todas estas interações contribuem com sua intensidade máxima e dificultam a interpretação dos espectros⁵.

Todavia, em solução, deste total de interações somente as componentes isotrópicas do deslocamento químico e do acoplamento escalar podem ser observadas diretamente nos espectros. Os outros dois parâmetros são perdidos, pois são dependentes da orientação, e são cancelados pelo movimento randômico das moléculas no meio líquido. Recentemente, a análise de compostos em um meio parcialmente alinhado, tem permitido a recuperação parcial destes parâmetros de RMN que antes eram inacessíveis. Estas novas medidas são denominadas: (i) acoplamento dipolar residual (*Residual Dipolar Coupling* – RDC, do inglês)^{7,8}, (ii) anisotropia do deslocamento químico residual (*Residual Chemical Shift Anisotropy* – RCSA, do inglês)⁷ e (iii) acoplamento Quadrupolar Residual (*Residual Quadrupolar Coupling* – RQC, do inglês)⁹. Estes parâmetros podem agora ser medidos a partir de meios adequados de alinhamento, e permitem a obtenção de informações estruturais capazes de refinar a determinação da estrutura molecular. Os parâmetros de RDC, entre hidrogênios, têm sido medidos em até 8 Å de distância, permitindo a ampliação dos átomos possíveis de serem correlacionados. Mas, ainda mais importante, é a natureza destes parâmetros que permitem a obtenção de informações espaciais, e desta forma tornando geralmente possível correlacionar partes distantes em uma molécula por espectroscopia de RMN¹⁰.

1.1 – ACOPLAMENTO DIPOLAR

Para compreender como surge o RDC, é necessário inicialmente compreender a origem da interação dipolar.

O Hamiltoniano que descreve a interação dipolar estática entre dois spins I e S , interagindo espacialmente, no sistema de coordenadas do laboratório (x^L , y^L e z^L) e na presença do campo magnético B_0 , é dado pela Equação 1.

$$\mathcal{H}_D = 2\pi D \left\{ I_{z^L} S_{z^L} - \frac{1}{2} I_{x^L} S_{x^L} - \frac{1}{2} I_{y^L} S_{y^L} \right\} \quad (1)$$

Onde, por convenção, o campo magnético aponta na direção z^L .⁶

Se os spins que interagem forem pertencentes a heteronúcleos, como por exemplo ^1H e ^{13}C , o segundo e o terceiro termos entre chaves, podem ser desprezados, e o Hamiltoniano do acoplamento dipolar resultará na Equação 2.

$$\mathcal{H}_D = 2\pi D I_z S_z \quad (2)$$

Onde D é a constante de acoplamento dipolar. A constante de acoplamento dipolar para um par de spins nucleares I e S , sob a ação de um campo magnético, e interagindo através do espaço, é dada pela Equação 3, em que R é a distância entre os núcleos com spins I e S , γ_I e γ_S são as respectivas razões giromagnéticas dos dois núcleos. O ângulo θ é o angulo formado entre o vetor internuclear e o campo magnético B_0 , μ_0 é a constante de permeabilidade do vácuo e \hbar é a constante de Planck dividida por 2π .

$$D_{IS} = \frac{k}{R^3} \left\langle \cos^2 \theta - \frac{1}{3} \right\rangle \quad (3)$$

Onde,

$$\kappa = -\frac{3}{8\pi^2} \gamma_I \gamma_S \mu_0 \hbar \quad (4)$$

A Figura 1 ilustra a interação dipolar entre dois spins I e S , presentes em uma molécula.

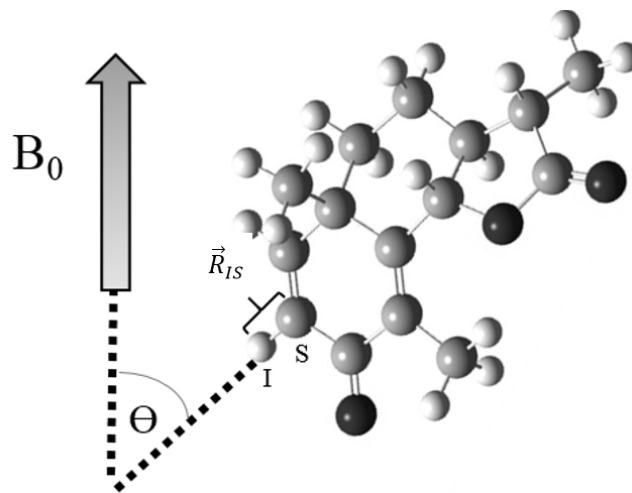


Figura 1. O acoplamento dipolar entre dois spins I e S , representados na molécula da α -santonina, é proporcional à distância internuclear \vec{R}_{IS} e do ângulo θ entre o eixo internuclear e o campo magnético.

O acoplamento dipolar observado pode variar entre valores com sinal positivo a valores negativos, representados pelo termo angular $\left\langle \cos^2 \theta - \frac{1}{3} \right\rangle$ na Equação 3, para um par de spins pertencentes a núcleos com constantes giromagnéticas do mesmo sinal, como ^1H e ^{13}C . O sinal do acoplamento dipolar irá depender do ângulo entre o vetor internuclear e o campo B_0 . As múltiplas orientações possíveis para um determinado acoplamento dipolar podem ser observadas pelo cone de acoplamento dipolar (Figura 2).

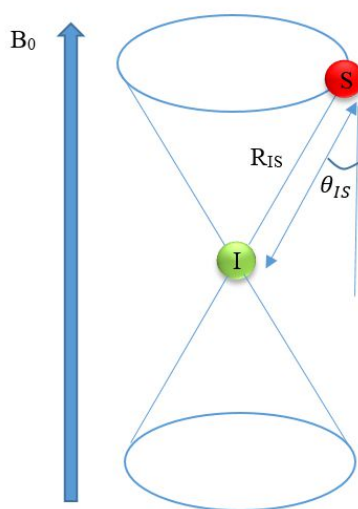


Figura 2. Cone do acoplamento dipolar entre dois spins I e S .

O valor máximo do acoplamento dipolar observado a partir da Equação 3 é para ângulos de 0° e 90° , e o valor zero para o ângulo de $54,7^\circ$, como pode ser observado pelo duplete de Pake¹¹ (Figura 3).

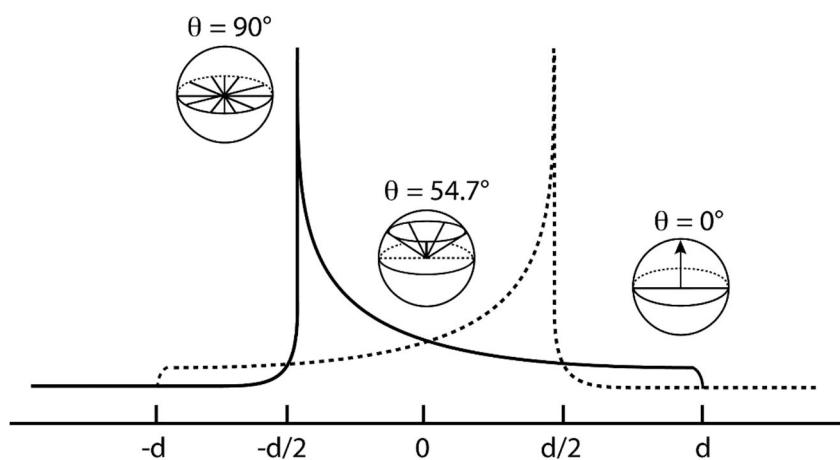


Figura 3. Duplete de Pake para os spins I e S no estado sólido (pó policristalino).

A constante de acoplamento dipolar se parece com o acoplamento escalar J , portanto, também contribui para o desdobramento dos sinais de ressonância. Para núcleos conectados por acoplamento escalar, o acoplamento dipolar e escalar se somarão algebricamente, como mostrado na Equação 5.

$$T = J + D \quad (5)$$

No estado sólido, as moléculas adotarão todas as possíveis orientações em relação ao sistema de coordenadas do laboratório, e portanto diferentes frequências de transições existirão simultaneamente, o que irá gerar sinais alargados na ordem de kHz, como o observado no duplete de Pake¹¹ (Figura 3). Portanto, as interações dipolares irão dificultar a interpretação dos espectros de RMN no estado sólido. Porém, para tornar viável (interpretável) as análises no estado sólido, uma das técnicas mais utilizadas é girar a amostra sólida, em um rotor em alta frequência, no ângulo mágico (*Magic Angle Spinning* (MAS)) de $54,7^\circ$. Esta rotação induz uma média temporal causando o desaparecimento das interações dipolares¹².

No estado líquido, as moléculas podem se mover livremente em todas as direções (movimento randômico), e, portanto, todas as orientações do vetor internuclear estão presentes em igual proporção. Neste caso, o termo angular do acoplamento dipolar entre brackets $\left\langle \cos^2\theta - \frac{1}{3} \right\rangle$, na Equação 3, representa a média de todas estas orientações possíveis na escala de tempo do experimento de RMN. Desta forma, na média, a resultante destas orientações irá se cancelar, e em solução isotrópica o acoplamento dipolar será zerado, e esse não aparecerá diretamente na análise de RMN no estado líquido. Porém, este tipo de interação será importante, contribuindo para a relaxação dos spins nucleares, e na construção do NOE.

1.1.1 – ACOPLAMENTO DIPOLAR RESIDUAL (RDC)

O acoplamento dipolar residual (RDC) é definido como apenas uma pequena fração da interação dipolar total. Os RDCs podem ser medidos quando a amostra é submetida a um alinhamento fraco, onde neste caso, em média apenas 0,01 a 0,1% das moléculas solúveis se orientam, gerando um pequeno grau de anisotropia na amostra. Este alinhamento faz com que o acoplamento dipolar seja reduzido da ordem de kHz, para um

resíduo do seu valor na ordem de dezenas de Hertz. Esta redução permite as medidas dos RDCs, mas faz com que a alta resolução do espectro ainda seja mantida, ou seja, apesar dos espectros mostrarem um pequeno alargamento dos sinais ainda são interpretáveis^{5,10}.

1.1.2 – MEDIDAS EXPERIMENTAIS DE RDC

A constante de acoplamento total (T) medida no estado parcialmente alinhado, entre o par de spins I e S , engloba as contribuições do RDC e do acoplamento escalar (J). Neste caso, a magnitude desta constante de acoplamento T dependerá do grau de alinhamento e da estrutura da molécula. A diferença entre os valores de T e J fornece o RDC, que pode ser descrito pela Equação 6.

$$RDC = T - J \quad (6)$$

O acoplamento dipolar residual pode ser obtido para qualquer núcleo detectável por RMN, porém, os núcleos de carbono e hidrogênio $^1D_{C-H}$ e $^2D_{C-H}$, são os mais comumente usados para as análises de pequenas moléculas.

A princípio, qualquer experimento de RMN 1D ou 2D capaz de medir acoplamentos C-H uma ligação de distância, podem ser aplicados para medir $^1D_{C-H}$.

O experimento mais simples para a medida de RDCs $^1D_{C-H}$ é o experimento de RMN ^{13}C acoplado. Todavia, a sobreposição de sinais e o alargamento dos sinais, devido aos acoplamentos a longas distâncias, dificultam a medida dos acoplamentos. O estado da arte para a medida de RDCs $^1D_{C-H}$ são os experimentos baseados em correlações heteronucleares bidimensionais, como por exemplo o HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*). Os experimentos acoplados de HSQC podem ser realizados com a detecção do acoplamento C-H na dimensão direta ($F2$) ou indireta ($F1$) (Figura 4)⁵.

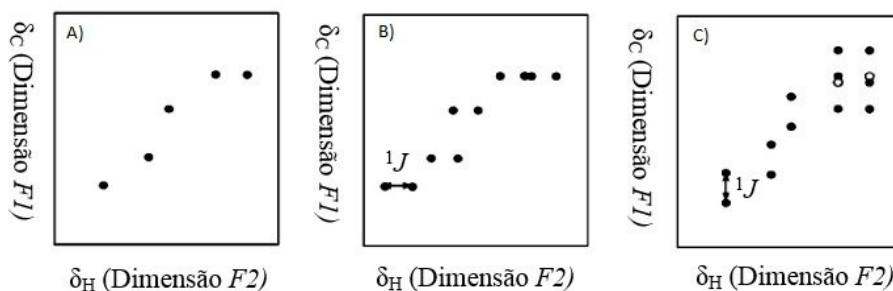


Figura 4. Representação dos espectros de HSQC (A) desacoplado; (B) acoplado na dimensão direta ($F2$); (C) acoplado na dimensão indireta ($F1$).

Outras sequências de pulso HSQC modificadas comuns são CLIP/CLAP-HSQC e BIRD-HSQC, as quais permitem a diminuição de distorções dos sinais e redução dos acoplamentos a longa distância, respectivamente⁵.

O experimento HSQC acoplado em $F2$ é apenas um experimento HSQC comum, porém sendo realizado com o desacoplador do canal de ^{13}C desligado durante a aquisição. Neste experimento, cada sinal de hidrogênio é desdobrado em dois sinais, devido ao acoplamento hidrogênio-carbono. Quando este experimento é realizado para sistemas de spins que acoplam fortemente, as medidas das constantes de acoplamento são imprecisas devido às distorções nos sinais. Nestes casos torna-se mais indicado a realização de experimentos acoplados em $F1$.

Os experimentos acoplados em $F1$ são obtidos com a remoção de um pulso de inversão (180°) durante o tempo t_1 na sequência do experimento HSQC. Desta forma, um acoplamento ^{13}C - 1H irá evoluir, dando origem ao desdobramento dos sinais de RMN na dimensão $F1$. Este tipo de experimento apresenta baixa resolução digital. Para minimizar esta limitação, dois procedimentos podem ser realizados: Primeiramente, o experimento pode ser realizado com uma janela espectral menor na dimensão $F1$. Isto faz com que, usualmente, os sinais apareçam rebatidos (*folding*), ou seja, os sinais dos carbonos com hibridização sp^2 (região entre 100 e 220ppm), irão aparecer na mesma região dos carbonos com hibridização sp^3 (região entre 0 e 100ppm)¹³. Portanto, o espectro obtido terá, aproximadamente, o dobro da sua resolução digital. Outra modificação usualmente realizada é a multiplicação das constantes de acoplamento por um fator k arbitrário (k usual igual a 3 ou 4). Isto é possível a partir da realização de experimentos que permitam a evolução em J , como é o caso do experimento HSQC acoplado em $F1$.

1.2 – ANISOTROPIA DO DESLOCAMENTO QUÍMICO (CSA)

O deslocamento químico é uma grandeza que depende da densidade eletrônica em torno dos núcleos atômicos. A anisotropia do deslocamento químico resulta do fato de que os átomos em moléculas raramente apresentam uma distribuição simetricamente esférica dos seus elétrons. Como o deslocamento químico é representado como um tensor, dependerá também da orientação molecular em relação ao campo magnético externo. O Hamiltoniano que descreve o deslocamento químico de um núcleo, com spin I , pode ser representado por uma contribuição isotrópica e outra anisotrópica, como descrito na Equação 7.

$$\mathcal{H}_{CS} = \gamma B_0 I_z \left(\delta_{iso} + \frac{1}{2} \delta_{CSA} (3 \cos^2 \theta - 1) \right) \quad (7)$$

Em uma solução isotrópica, a média do movimento molecular randômico leva à observação de um deslocamento químico isotrópico (δ_{iso}), sendo esta grandeza a média dos elementos da diagonal da matriz que representa o tensor de deslocamento químico do núcleo (Equação 8).

$$\delta_{iso} = \frac{1}{3} (\delta_{11} + \delta_{22} + \delta_{33}) \quad (8)$$

As contribuições dos deslocamentos químicos δ_{11} , δ_{22} e δ_{33} podem ser ilustradas pela Figura 5.

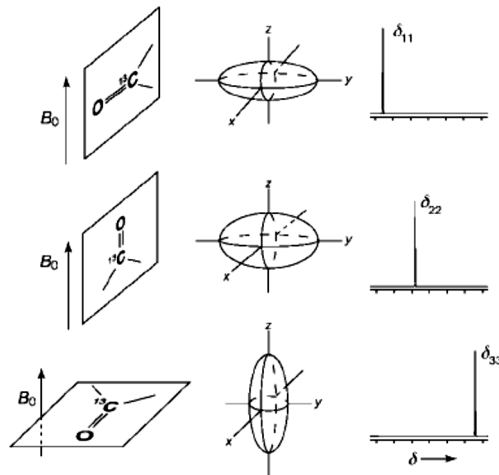


Figura 5. Representação dos componentes principais do tensor de deslocamento químico.

Este termo isotrópico equivale a 1/3 do traço do tensor de blindagem e é invariante a qualquer transformação do sistema de coordenadas, ou seja, sobre movimento randômico, encontrado em meios isotrópicos, este valor se mantém constante. Desta forma, as contribuições antissimétricas (anisotrópicas) da matriz se cancelam^{12,14}.

1.2.1 – ANISOTROPIA DO DESLOCAMENTO QUÍMICO RESIDUAL (RCSA)

Ao realizarmos análises de RMN, no meio parcialmente alinhado, é observado um desvio dos deslocamentos químicos dos sinais de RMN ($\Delta\delta$) do seu valor no meio isotrópico (δ_{iso}). Este desvio é resultante de uma contribuição anisotrópica ao deslocamento químico (δ_{an}). Sendo que este desvio será apenas um resíduo do valor total da anisotropia do deslocamento químico, denominado Anisotropia do deslocamento químico residual (RCSA)^{14,15}. Onde δ_{an} é dado pela Equação 9.

$$\delta_{an} = \frac{2}{3} \sum_{j=\{x,y,z\}} \left\langle \frac{3\cos^2\theta_j - 1}{2} \right\rangle \delta_{jj} \quad (9)$$

Na qual, δ_{jj} representa os elementos da diagonal do tensor de deslocamento químico, e θ_j é o ângulo entre o principal eixo do tensor do deslocamento químico e o campo magnético externo. Novamente, o símbolo $\langle \rangle$ representa a média de movimento molecular em solução.

1.2.2 – MEDIDAS EXPERIMENTAIS DE RCSA

A anisotropia do deslocamento químico residual (RCSA) poderia ser extraída pela comparação entre os valores dos deslocamentos químicos medidos no meio anisotrópico e isotrópico. Entretanto, a medida do deslocamento químico é sensível aos efeitos do solvente e às interações intermoleculares com o meio de alinhamento. Logo, devem-se levar em consideração estes efeitos quando os RCSAs forem medidos. Várias metodologias estão em desenvolvimento para se encontrar a melhor forma de obter estes valores e evitar um erro de interpretação. Um exemplo é o uso de aparelhos de estiramento, como o desenvolvido por Kuchel¹⁶. Com este aparelho são canceladas estas

interações através da realização, de duas medidas de deslocamento químico, em dois diferentes graus de alinhamento, utilizando a mesma amostra. Posteriormente, serão discutidos outros dispositivos que permitem a obtenção de diferentes condições de alinhamento.

RCSAs medem a anisotropia de cada núcleo individualmente, sendo uma vantagem frente aos RDCs que necessitam da existência de pares de spins na molécula. Para as medidas de RCSAs isto não é necessário, uma vez que cada núcleo na molécula apresentará um valor de RCSA. Isto possibilita a obtenção de um número maior de dados. Sendo importante, principalmente, quando os compostos analisados apresentarem insaturações e, portanto, não permitem a medida de um maior número de RDCs C-H. A CSA de carbonos com hibridização sp^3 costumam ser muito pequenas em consequência da sua distribuição eletrônica esférica. A assimetria da distribuição eletrônica em carbonos com hibridização sp^2 e sp induzem CSA maiores. CSA na ordem de mais de 1000ppm podem ser encontrados em átomos mais pesados¹².

1.3 – A OBTENÇÃO DE INFORMAÇÕES ESTRUTURAIS BASEADA EM MEDIDAS DE RDCs E RCSAs

Devido à sua dependência angular, os parâmetros RDCs e RCSAs podem ser utilizados para a determinação da estrutura tridimensional de pequenas moléculas orgânicas. O grande desafio da utilização de RCSAs e RDCs está na correta interpretação dos dados experimentais, e a tradução destes parâmetros adicionais em informações que auxiliem a elucidação estrutural das moléculas. Para moléculas rígidas (sem dinâmica interna), onde a distância entre os pares de spins e os ângulos internucleares podem ser considerados fixos, as propriedades do alinhamento molecular podem ser expressas matematicamente em termos de uma matriz simétrica 3 x 3, com traço nulo, chamada de matriz de ordem ou de tensor de alinhamento⁶. Este tensor de alinhamento é a chave para a geração de informações estruturais.

1.3.1 – O TENSOR DE ALINHAMENTO

A seguir serão deduzidas as principais equações para definição do tensor de alinhamento⁶:

Considerando dois spins I e S , fazendo parte de uma molécula em solução, tendo como referencial um sistema de coordenadas do laboratório, o vetor do campo magnético \vec{B} é constante (apontando preferencialmente no eixo Z^L), mas o vetor internuclear \vec{R} possui uma dependência temporal. Será assumido nas discussões posteriores, por simplicidade, que a molécula é rígida (sem dinâmica interna e com as distâncias R constantes). Como consequência, a dependência temporal de \vec{R} será somente devido ao movimento molecular randômico em solução. Já para um sistema de coordenadas arbitrariamente localizado na molécula ocorre o oposto, como descrito na Figura 6.

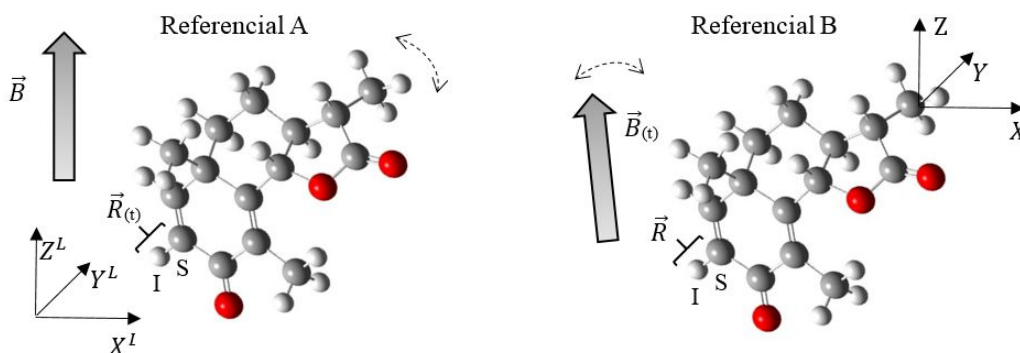


Figura 6. Efeitos do movimento molecular randômico em solução para a molécula rígida α -Santonina: no sistema de coordenadas de referência A, localizado no laboratório (X^L , Y^L e Z^L), o vetor internuclear \vec{R} possui uma dependência temporal, e o vetor do campo magnético \vec{B} é constante, apontando na direção Z ; no sistema de coordenadas de referência B, localizado arbitrariamente na molécula, o vetor internuclear \vec{R} é constante, e o vetor do campo magnético \vec{B} possui uma dependência temporal. Em ambos os eixos de referência o acoplamento dipolar também possuirá uma dependência temporal.

Em ambos os casos, a dependência temporal de \vec{R} ou de \vec{B} irá resultar na dependência temporal do acoplamento dipolar como mostrado na Equação 10.

$$\langle D_{IS} \rangle_t = \frac{k}{R^3} \left\langle \cos^2 \theta - \frac{1}{3} \right\rangle_t \quad (10)$$

Portanto, o acoplamento dipolar residual dependerá da média de alinhamento da molécula.

O ângulo θ entre o campo magnético externo e o vetor internuclear \vec{r} pode ser obtido a partir do produto escalar $\cos \theta = \vec{b} \cdot \vec{r}$, onde \vec{b} é um vetor unitário apontando na

mesma direção do campo magnético externo \vec{B}_0 . Como descrito anteriormente, para o sistema de coordenadas localizado na molécula, tem-se:

$$\cos \theta(t) = \vec{b}(t)\vec{r} = b_x(t)r_x + b_y(t)r_y + b_z(t)r_z \quad (11)$$

Desta forma,

$$\begin{aligned} \cos^2 \theta(t) = & b_x^2(t)r_x^2 + b_x(t)b_y(t)r_xr_y \\ & + b_x(t)b_z(t)r_xr_z + b_y(t)b_x(t)r_yr_x \\ & + b_y^2(t)r_y^2 + b_y(t)b_z(t)r_yr_z \\ & + b_z(t)b_x(t)r_zr_x + b_z(t)b_y(t)r_zr_y \\ & + b_z^2(t)r_z^2 \end{aligned} \quad (12)$$

Podemos reescrever a Equação 12 usando a notação de matriz, e inserindo a dependência temporal do termo angular.

$$\cos^2 \theta(t) = (r_x \ r_y \ r_z) \begin{pmatrix} \overline{b_x^2(t)} & \overline{b_x(t)b_y(t)} & \overline{b_x(t)b_z(t)} \\ \overline{b_y(t)b_x(t)} & \overline{b_y^2(t)} & \overline{b_y(t)b_z(t)} \\ \overline{b_z(t)b_x(t)} & \overline{b_z(t)b_y(t)} & \overline{b_z^2(t)} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_x \\ r_y \\ r_z \end{pmatrix} \quad (13)$$

O produto matricial mostrado na Equação 13 pode ser reescrito de forma simples como:

$$\overline{\cos^2 \theta} = \vec{r}^T \hat{P} \vec{r} \quad (14)$$

Onde, o tensor \hat{P} é definido como o tensor de probabilidade. Este tensor é representado por uma matriz simétrica e com traço 1, ou seja, $\overline{b_x^2(t)} + \overline{b_y^2(t)} + \overline{b_z^2(t)} = 1$. O tensor \hat{P} representa a probabilidade do campo magnético apontar em uma

direção particular no espaço no sistema de coordenadas presente na molécula. Portanto, representa as propriedades de alinhamento molecular. No caso de um sólido, na qual a molécula está fixa no espaço (completamente alinhada), $P_{xx} = 0$, $P_{yy} = 0$ e $P_{zz} = 1$, em um caso particular onde a matriz de probabilidade possui uma representação diagonal. Já para o caso de um ambiente isotrópico todas as direções são igualmente prováveis e portanto, $P_{xx} = P_{yy} = P_{zz} = \frac{1}{3}$.

A matriz de probabilidade não é usada diretamente, mais sim uma derivação chamada de tensor de alinhamento \hat{A} , onde $\hat{A} = \hat{P} - \frac{1}{3}$. Este novo tensor é uma matriz simétrica, mas com traço zero. Portanto, esta matriz possui $A_{xx} + A_{yy} + A_{zz} = 0$, de acordo com a Equação 15.

$$\hat{A} = \begin{pmatrix} A_{xx} & A_{xy} & A_{xz} \\ A_{xy} & A_{yy} & A_{yz} \\ A_{xz} & A_{yz} & A_{zz} \end{pmatrix} = \left\langle \cos^2 \theta - \frac{1}{3} \right\rangle_t = \vec{r}^T \hat{A} \vec{r} \quad (15)$$

Deve ser dada uma atenção para o eixo principal de ordem. A convenção usual é que a ordem do principal valor esteja de acordo com seus valores absolutos, isto é

$$|A_z| \geq |A_y| \geq |A_x| \quad (16)$$

Usualmente, por convenção, o eixo z é a direção onde os maiores valores de acoplamento são esperados, porém nem sempre isto é correto.

1.3.2 – CÁLCULO DO TENSOR DE ALINHAMENTO A PARTIR DE DADOS EXPERIMENTAIS

Para determinar o tensor de alinhamento é necessário obter cinco elementos da matriz de alinhamento (Equação 15). Portanto, somente cinco RDCs, medidos experimentalmente, seriam necessários para calcular o tensor de alinhamento. Abaixo será visto como obter o tensor de alinhamento, matematicamente, a partir dos RDCs e/ou RCSAs⁶:

$$D = \frac{k}{R^3} \vec{r}^T \hat{A} \vec{r} \quad (17)$$

Primeiro, define-se o acoplamento dipolar reduzido, $D_{red} = \frac{R_{IS}^3 D_{IS}}{k}$, que será substituído na Equação 17.

$$D_{red} = \vec{r}^T \hat{A} \vec{r} = \left\langle \cos^2 \theta - \frac{1}{3} \right\rangle_t \quad (18)$$

Portanto, o acoplamento dipolar reduzido só contém as informações angulares presentes na equação que define o acoplamento dipolar. Expressando na forma matricial tem-se.

$$D_{red} = (r_x \ r_y \ r_z) \begin{pmatrix} A_{xx} & A_{xy} & A_{xz} \\ A_{xy} & A_{yy} & A_{yz} \\ A_{xz} & A_{yz} & A_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_x \\ r_y \\ r_z \end{pmatrix} \quad (19)$$

Fazendo a multiplicação das matrizes obtém-se,

$$D_{red} = A_{xx}X^2 + 2A_{xy}XY + 2A_{xz}XZ + A_{yy}Y^2 + 2A_{yz}YZ + A_{zz}Z^2 \quad (20)$$

Onde $X = r_x$, $Y = r_y$ e $Z = r_z$.

Sabendo-se que, $A_{xx} = -A_{yy} - A_{zz}$. Multiplicando-se a expressão anterior por X^2 , obtem-se $A_{xx}X^2 = -A_{yy}X^2 - A_{zz}X^2$, e substituindo na Equação 20, tem-se.

$$D_{red} = 2A_{xy}XY + 2A_{xz}XZ + A_{yy}(Y^2 - X^2) + 2A_{yz}YZ + A_{zz}(Z^2 - X^2) \quad (21)$$

Voltando a expressar a Equação 21 na forma matricial, e representando o acoplamento dipolar na forma genérica para um dado RDC, tem-se.

$$D_{red(j)} = (2X_jY_j + 2X_jZ_j + Y_j^2 - X_j^2 + 2Y_jZ_j + Z_j^2 - X_j^2) \begin{pmatrix} A_{xy} \\ A_{xz} \\ A_{yy} \\ A_{yz} \\ A_{zz} \end{pmatrix} \quad (22)$$

Se estiverem disponíveis n acoplamentos dipolares (RDCs), pode-se construir um sistema de equações lineares.

$$\begin{pmatrix} D_1 \\ D_2 \\ D_3 \\ \vdots \\ D_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 2X_1Y_1 + 2X_1Z_1 + (Y_1^2 - X_1^2) + 2Y_1Z_1 + (Z_1^2 - X_1^2) \\ 2X_2Y_2 + 2X_2Z_2 + (Y_2^2 - X_2^2) + 2Y_2Z_2 + (Z_2^2 - X_2^2) \\ 2X_3Y_3 + 2X_3Z_3 + (Y_3^2 - X_3^2) + 2Y_3Z_3 + (Z_3^2 - X_3^2) \\ \vdots \\ 2X_nY_n + 2X_nZ_n + (Y_n^2 - X_n^2) + 2Y_nZ_n + (Z_n^2 - X_n^2) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A_{xy} \\ A_{xz} \\ A_{yy} \\ A_{yz} \\ A_{zz} \end{pmatrix} \quad (23)$$

Deste modo, se n RDCs forem medidos experimentalmente, um sistema de n equações lineares estarão disponíveis, Equação 24.

$$\vec{d} = \hat{M}\vec{A} \quad (24)$$

Onde, \vec{d} é um vetor coluna contendo os acoplamentos dipolares residuais experimentais, \hat{M} é uma matriz modelo que contém informações geométricas da estrutura molecular e \vec{A} é um vetor coluna contendo os cinco elementos independentes da matriz do tensor de alinhamento.

Portanto, de acordo com a Equação 23, os cálculos dos tensores de alinhamento envolvem um sistema de “filas” geradas pelos dados de RDCs experimentais. Como os RCSAs possuem a mesma dependência angular que os RDCs, eles também poderão gerar um sistema de filas (n) necessários para computar o tensor de alinhamento (Equação 25). Os valores de RCSAs podem ser utilizados sozinhos ou em conjunto com os valores de RDCs. Porém, esta dependência estará intimamente ligada à orientação dos tensores de blindagem química em relação ao tensor de alinhamento¹⁴.

$$\begin{pmatrix} D_1 \\ D_2 \\ \vdots \\ D_n \\ \delta_{an}^1 \\ \delta_{an}^2 \\ \vdots \\ \delta_{an}^n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 2X_1Y_1 + 2X_1Z_1 + (Y_1^2 - X_1^2) + 2Y_1Z_1 + (Z_1^2 - X_1^2) \\ 2X_2Y_2 + 2X_2Z_2 + (Y_2^2 - X_2^2) + 2Y_2Z_2 + (Z_2^2 - X_2^2) \\ \vdots \\ 2X_nY_n + 2X_nZ_n + (Y_n^2 - X_n^2) + 2Y_nZ_n + (Z_n^2 - X_n^2) \\ (-\delta_{11}^1 + -\delta_{22}^1) + (-\delta_{11}^1 + -\delta_{33}^1) + (-\delta_{12}^1 + -\delta_{21}^1) + (-\delta_{13}^1 + -\delta_{31}^1) + (-\delta_{23}^1 + -\delta_{32}^1) \\ (-\delta_{11}^2 + -\delta_{22}^2) + (-\delta_{11}^2 + -\delta_{33}^2) + (-\delta_{12}^2 + -\delta_{21}^2) + (-\delta_{13}^2 + -\delta_{31}^2) + (-\delta_{23}^2 + -\delta_{32}^2) \\ \vdots \\ (-\delta_{11}^n + -\delta_{22}^n) + (-\delta_{11}^n + -\delta_{33}^n) + (-\delta_{12}^n + -\delta_{21}^n) + (-\delta_{13}^n + -\delta_{31}^n) + (-\delta_{23}^n + -\delta_{32}^n) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A_{xy} \\ A_{xz} \\ A_{yy} \\ A_{yz} \\ A_{zz} \end{pmatrix} \quad (25)$$

Em um sistema com $n < 5$, não será possível determinar o tensor de alinhamento. Já um sistema com $n > 5$ será um sistema sobredeterminado, e não terá solução. Todavia, este sistema pode ainda ser resolvido a partir da minimização em termos de mínimos quadrados, encontrando desta forma o melhor tensor de alinhamento que se ajusta com os dados de RDCs calculados (previstos), a partir deste tensor. O melhor ajuste será o que apresentar a melhor similaridade entre os RDCs medidos experimentalmente e os valores calculados a partir do tensor de alinhamento, para uma determinada geometria otimizada da molécula. Este ajuste (problema de mínimos quadrados) é realizado utilizando a ferramenta matemática SVD (*Singular Value Decomposition*)¹⁴. O mesmo procedimento pode ser adotado para as análises dos RCSAs, sendo que desta vez se utiliza das anisotropias do deslocamento químico. Desta forma, o caminho mais utilizado para geração de informações estruturais baseados em RDCs e/ou RCSAs, calcula o tensor de alinhamento, mas não o utiliza diretamente, e sim, a partir deste tensor obtém os valores de RDCs e/ou RCSAs calculados, para esta condição de alinhamento, e compara com os valores medidos experimentalmente. A concordância entre os valores de RDCs e RCSAs experimentais e calculados são estimados usando o fator de qualidade Q de Cornilescu¹⁵ (Equação 26).

$$Q = \sqrt{\frac{\sum (D_{\text{exp}} - D_{\text{calc}})^2}{\sum D_{\text{exp}}^2} + \frac{\sum (\delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{calc}})^2}{\sum \delta_{\text{exp}}^2}} \quad (26)$$

Onde, D_{exp} e D_{calc} são os valores de RDCs experimentais e calculados, respectivamente, e δ_{exp} e δ_{calc} são os valores de RCSAs experimentais e calculados, respectivamente. Quanto mais próximo de zero o fator Q , melhor será o ajuste.

O conjunto destes cálculos citados anteriormente são realizados utilizando-se programas específicos, como por exemplo PALES¹⁷ ou MSpin-RDC¹⁸.

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 *Density functional theory* (DFT). As geometrias que apresentarem o menor fator Q , serão as prováveis soluções para os problemas estruturais (atribuição de hidrogênios pró-quirais, conformação, configuração e constituição). A correta proposição deste conjunto de geometrias é fundamental para a obtenção de informações estruturais. Este conjunto deve ser construído levando-se em conta todas as prováveis configurações, e representando de forma significativa todo o espaço conformacional do sistema.

Quanto maior o grau de flexibilidade da molécula em estudo, maior será a complexidade do problema estrutural. Visto que, torna-se mais difícil a representação correta do conjunto de estruturas para este problema, já que as propriedades de alinhamento molecular não são independentes dos estados conformacionais¹⁹. Portanto, moléculas rígidas e semirrígidas representam o maior número de exemplos da aplicação de RDCs e RCSAs para pequenas moléculas. Porém, 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 único²⁰. Esta aproximação permite a determinação de um tensor único para as conformações preferenciais da molécula. Quando existe uma maior flexibilidade, a aproximação do tensor único não pode ser mais aplicada e uma nova aproximação que envolva múltiplos tensores deve ser aplicada.²¹ Vale ressaltar que, estas aproximações, só podem ser aplicadas quando o meio de alinhamento não altera significativamente a dinâmica conformacional.

A Figura 7 mostra um esquema geral para a obtenção de informações estruturais baseadas nas medidas dos parâmetros de RDCs e RCSAs, em moléculas rígidas e semirrígidas.

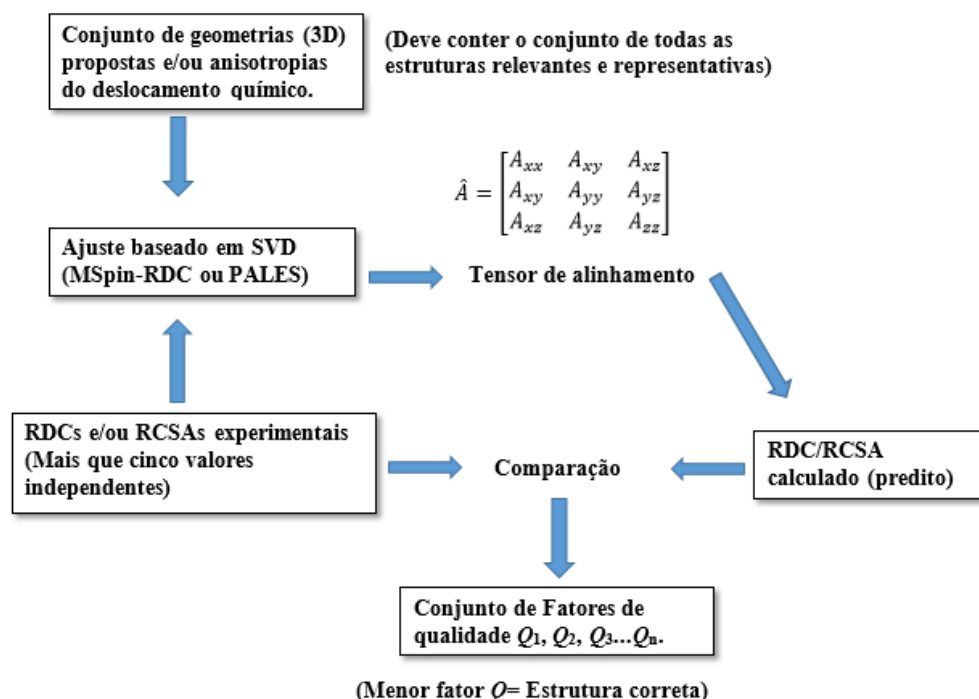


Figura 7. Esquema geral para a obtenção de informações estruturais em moléculas rígidas pequenas ou semirrígidas baseadas nos parâmetros de RDCs e RCSAs.

1.4 – APLICAÇÕES DOS PARÂMETROS ANISOTRÓPICOS

O parâmetro RDC tem sido bastante usado no refinamento da estrutura de macromoléculas com importância biológica por RMN, como por exemplo proteínas e ácidos nucleicos^{7,8,22,23,24,25,26,27}. A aplicação à análise de moléculas orgânicas pequenas e de tamanho médio é recente, e tem como objetivo principal resolver problemas de configuração relativa (CR), conformação, e da constituição de moléculas sintéticas ou naturais. Além disso, para compostos rígidos e semirrígidos as medidas de RDCs têm sido aplicadas na atribuição de hidrogênios pró-quirais.

Em muitos casos é possível a determinação da configuração relativa de moléculas com múltiplos estereocentros, ou da atribuição dos sinais de RMN de hidrogênios diastereotópicos. Alguns destes exemplos são mostrados na Figura 8.

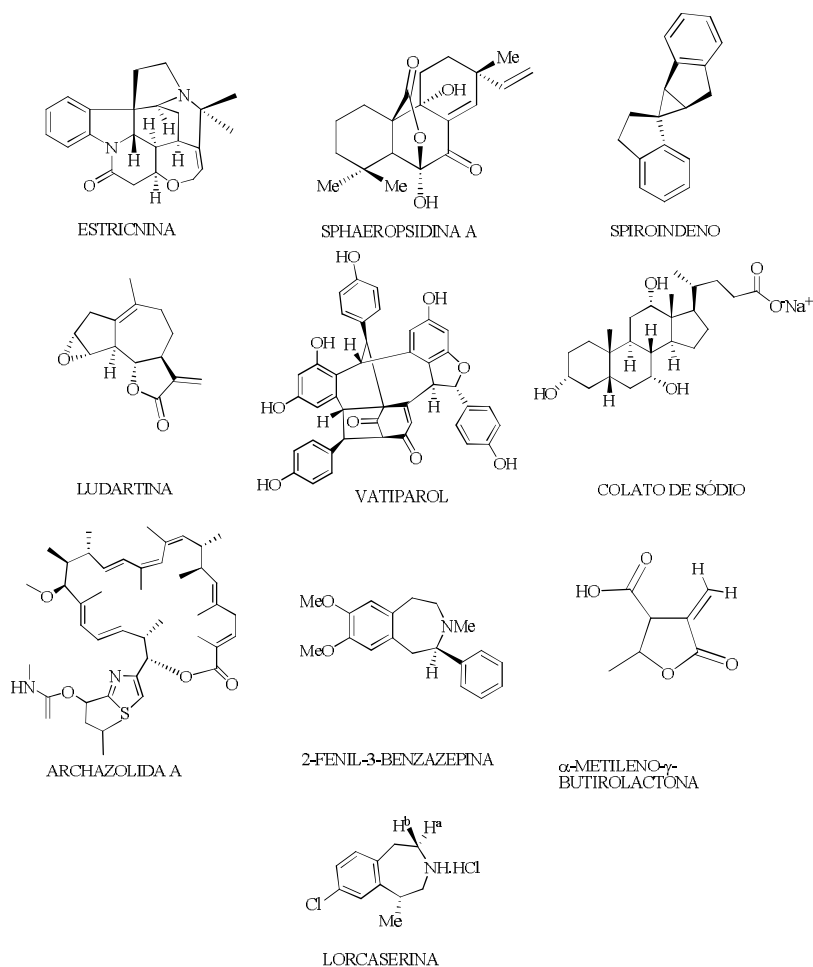


Figura 8. Exemplos de moléculas na qual foram aplicados os parâmetros anisotrópicos de RMN para resolução de problemas de configuração e conformação: Estricnina²⁸, Sphaeropsidina A²⁹, Spiroindeno³⁰, Ludartina³¹, Vatiparol³², Colato de Sódio³³, Archazolida A³⁴, 2-fenil-3-Benzazepina³⁵, α -Metileno- γ -Butirolactona³⁶, Lorcaserina³⁷.

Os trabalhos que envolvem a determinação da conformação molecular merecem atenção especial, visto que a flexibilidade molecular dificulta o cálculo e a interpretação dos parâmetros de RDC e RCSA. Consequentemente, trabalhos como o da atribuição da estereoquímica e conformação da Sagittamida A³⁸ (Figura 9) representam o potencial dos RDCs para determinação da estrutura de pequenas moléculas orgânicas. Esta molécula era um grande desafio aos métodos tradicionais de RMN, pois possui no total oito estereocentros, além de certo grau de flexibilidade, o que permitia a presença de mais de uma conformação, e a CR não havia sido determinada. Todavia, a associação das medidas do NOE, acoplamento J e RDCs permitiram a atribuição inequívoca de sua configuração e do seu espaço conformacional.

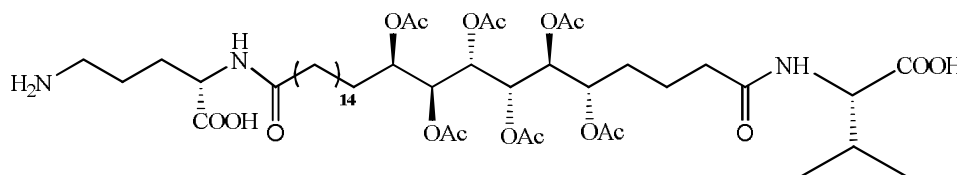


Figura 9. Estrutura da Sagittamida A.

Trigo-Mouriño e colaboradores³⁷ estudaram a droga anti-obesidade Lorcaserina (Figura 8) e observaram que esta molécula apresenta uma única conformação na forma *crown-chair*, pela análise no estado sólido, utilizando a técnica de Raios X. Porém, informações sobre sua conformação, em solução, eram de fundamental importância para compreensão do seu mecanismo de atuação no organismo. A partir do alinhamento no gel ácido 2-acrilamida-2-metil-1-propanosulfônico (AMPS), em D₂O, foi possível a extração dos RDCs $^1D_{CH}$ e a longa distância ($^2D_{CH}$ e $^3D_{CH}$), e também do NOE e $^3J_{HH}$. A combinação deste conjunto de dados permitiu a determinação da conformação preferencial como um equilíbrio conformacional, na forma *crown-chair*, na qual a posição do grupo metila, na orientação equatorial, apresentou a maior população. Os dados experimentais mostraram também uma concordância com os cálculos de DFT.

Em um outro exemplo, foram sintetizados três compostos da classe de produtos naturais Meloheninas (Figura 10)³⁹.

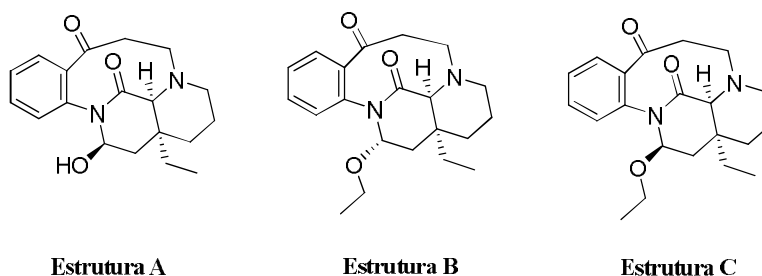


Figura 10. Estrutura de três compostos sintetizados (A, B e C) da classe de produtos naturais Meloheninas.

Motivados por diferenças nos espectros de RMN de 1H dos compostos obtidos na síntese, foram estudadas as suas conformações preferenciais. A associação de diferentes técnicas experimentais e teóricas, incluindo RDCs, mostraram que os três compostos adotam a mesma conformação preferencial no estado sólido (análises de cristalografia de raio X). Entretanto, em solução (CDCl₃) as análises de RDC, alinhado em Poli- γ -(Benzil-L-Glutamato (PBLG), associado as análises tradicionais de RMN mostram que as estruturas A e C apresentam uma forte preferência por uma única conformação, sendo que a conformação em A difere da sua conformação encontrada no estado sólido, e

também difere da principal conformação encontrada para **B** e **C** em solução. Diferentemente, a molécula **B** mostra em solução um equilíbrio de três conformações.

Um dos avanços mais recentes em termos de aplicações foi a determinação da constituição de um produto reacional descrito por Kummerlöwe *et al.*⁴⁰. Estudando a reação de uma azida contendo 1,5-enina na presença de iodo, dissolvido em CH₂Cl₂ a temperaturas acima de 0°C, foram gerados três produtos, sendo um deles desconhecido (Figura 11).

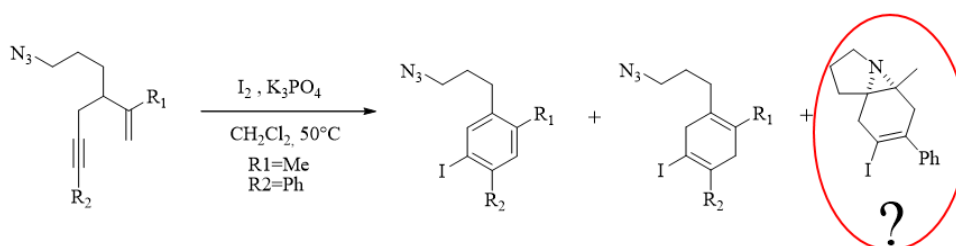


Figura 11. Reação de ciclização eletrofílica de uma azida contendo 1,5-enina, formando três produtos: um areno, um ciclohexadieno e um produto desconhecido, determinado posteriormente (círculo vermelho).

Métodos clássicos para determinação estrutural (espectrometria de massa, espectroscopia de infravermelho, e experimentos tradicionais de RMN) não foram capazes de determinar a estrutura do produto desconhecido, mas permitiram propor 14 prováveis estruturas. A partir do alinhamento no gel poliestireno (PS) em CDCl₃ foram medidos 17 RDCs. Os ajustes para cada estrutura, somados a permutação dos grupos metilênicos, aumentaram o número de ajustes por SVD para 896. Os cálculos mostraram que a estrutura, indicada em vermelho, mostrou a melhor concordância com os dados experimentais, e foi determinado como o provável produto desconhecido da reação (Figura 11). Além disso, com estes dados, os autores foram capazes de propor um mecanismo para a reação.

A determinação estrutural de produtos naturais, em muitos casos, é dificultada pela pouca quantidade de material. Porém, a recente introdução de análises de RMN em microtubos de 1,7 mm, resolveu parcialmente este problema, permitindo a realização de medidas de RDCs em DMSO com apenas 1 mg do composto Vatiparol³² (Figura 8). O melhor ajuste foi determinado em termos do fator *Q* e dos desvios de cada estrutura em relação aos NOE medidos. Apenas um diastereoisômero mostrou melhor compatibilidade com os dados experimentais. Foi possível determinar também a conformação preferencial baseado em RDCs, e a configuração absoluta a partir da comparação dos valores

experimentais e calculados usando a técnica de dicroísmo circular eletrônico (DCE) e do experimento de dispersão ótica rotacional (DOR).

A aplicação de RCSA para determinação estrutural de moléculas orgânicas limitava-se a determinação da estrutura de proteínas e ácidos nucleicos^{15,41}. O primeiro trabalho que descreveu a utilização de RCSAs como ferramenta para a determinação da configuração de uma pequena molécula orgânica foi descrito por Hallwass *et al.*⁴². Neste trabalho, os autores diferenciaram a correta estereoquímica da Estrona em relação ao seu diastereoisômero 13-epi-Estrona (Figura 12), mostrando o potencial deste parâmetro, principalmente quando associado aos RDCs. Para solucionar a interferência do meio de alinhamento (gel ácido (S)-2-acrilamida-1-propanosulfônico (APS)) foram realizadas análises em duas condições de alinhamentos diferentes, obtidos com o auxílio do aparato de Kuchel¹⁶.

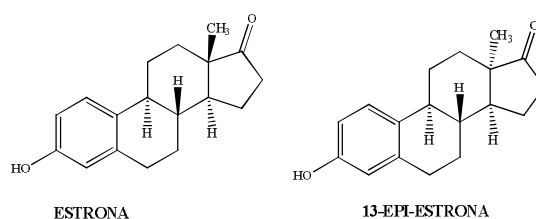


Figura 12. Estrutura da Estrona e 13-epi-estrone.

1.5 – MEIOS DE ALINHAMENTO

O crescente interesse nas análises de RMN, em meios parcialmente alinhados, para a determinação estrutural de pequenas moléculas, está intimamente ligado ao desenvolvimento de novos meios de alinhamento fraco, que apresentem maior compatibilidade com os solventes orgânicos mais comuns (clorofórmio, metanol, DMSO etc.)⁵. Diferentes famílias de materiais têm sido desenvolvidos para este fim: cristais líquidos liotrópicos^{28,43,44,45,46,47}, géis indutores de alinhamento (*strain-induced alignment in a gel* (SAG))^{48,49,50,51,52,53,54} e sondas paramagnéticas de íons lantanídeos^{55,56}. Entre muitas contribuições significativas para o desenvolvimento das aplicações dos meios de alinhamento em RMN, algumas são descritas abaixo.

Em 1963, Saupe e Englert⁵⁷ detectaram o primeiro caso de alinhamento de moléculas em cristais líquidos nemáticos por RMN, estudando compostos aromáticos dissolvidos em para-azoxyanisole (PAA). Um ano mais tarde, Saupe⁵⁸ propôs a teoria

completa sobre o acoplamento dipolar em amostras parcialmente alinhadas, e um estudo sistemático de moléculas dissolvidas em cristais líquidos tornou-se evidente. Logo em seguida, foram descritos diversos trabalhos que relataram o alinhamento em novos materiais, como por exemplo, *p,p'*-di-*n*-hexiloxiazobenzeno⁵⁹ e derivados do colesterol⁶⁰. Em 1997, Tjandra e Bax⁸ introduziram a aplicação de RDCs para análise estrutural de macromoléculas biológicas. Em 1997, Meddour e colaboradores introduziram o uso de PBLG (poli- γ -(benzil-L-glutamato) alinhado em clorofórmio, e este foi o primeiro meio compatível com solventes orgânicos⁴³. Em 1981, Deloche e Samulski⁴⁸ relatam a abordagem conceitual do método SAG. Somente em 2000, o método SAG foi colocado em prática por Tycko e colaboradores⁴⁹, onde alinharam o gel poliacrilamida em água, e posteriormente, induziram a compressão e estiramento da amostra. Em 2003, os grupos de Thiele²⁸ e Griesinger⁶¹ realizaram simultaneamente, e independentemente, grande contribuição para a elucidação estrutural de pequenas moléculas orgânicas por RDCs, usando PBLG em soluções de solventes orgânicos. Posteriormente, foram desenvolvidos outros cristais líquidos com baixo grau de alinhamento compatíveis com solventes orgânicos^{44,45}.

Em 2005, Luy expandiu o método SAG para solventes orgânicos, onde foi alinhado o polímero poliestireno (PS) reticulado em clorofórmio (Figura 13)⁵². O gel PS reticulado é compatível com uma grande faixa de solventes orgânicos, incluindo clorofórmio, benzeno e tetraidrofurano (THF). Este gel pode intumescer em alguns dias.

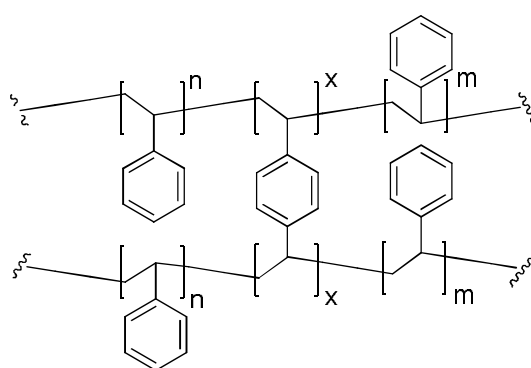


Figura 13. Estrutura química do poliestireno (PS) reticulado.

Outros trabalhos desenvolveram novos géis compatíveis com solventes orgânicos, entre eles:

O gel poliacrilamida (PH) reticulado (Figura 14) é um copolímero que foi introduzido como o primeiro meio de alinhamento compatível com DMSO, por Griesinger e colaboradores⁶². Este gel também é compatível com dimetilformamida (DMF) e D₂O. O intumescimento do gel atinge o equilíbrio em poucos dias.

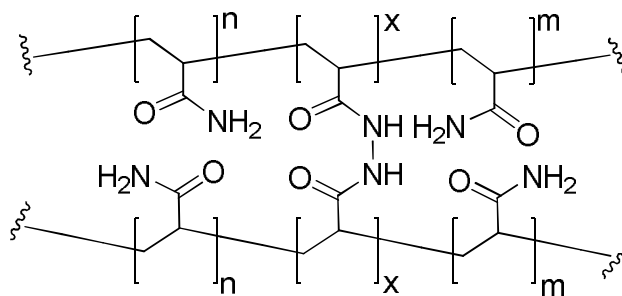


Figura 14. Estrutura química do poliacrilamida (PH) reticulado.

O gel polivinil acetato (PVAc) reticulado (Figura 15) foi introduzido como um gel compatível com solventes orgânicos polares, por Luy e colaboradores²⁹. Este gel intumescer em uma variedade de solventes orgânicos, como DMSO, metanol, THF, dioxano, acetona, acetonitrila e clorofórmio, atingindo o equilíbrio em menos de duas semanas.

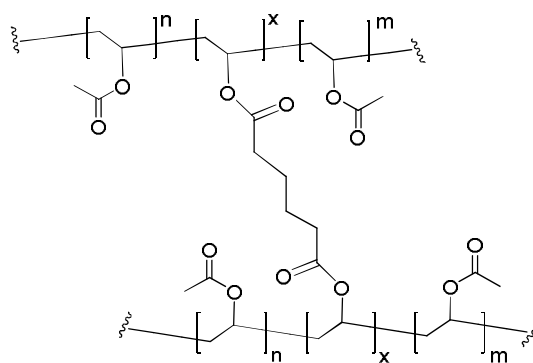


Figura 15. Estrutura química do polivinil acetato (PVAc) reticulado.

O gel poliacrilonitrila (PAN) reticulado (Figura 16) foi utilizado por Kummerlöwe e colaboradores⁶³ como um polímero que intumescer bem em DMSO, com poucos sinais nos espectros de RMN. O polímero reticulado é obtido pela irradiação com elétrons acelerados (radiação β). O processo de intumescimento dura algumas semanas.

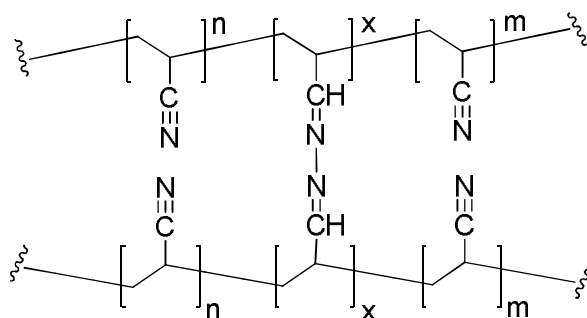


Figura 16. Estrutura química do poliacrilonitrila (PAN) reticulado.

O gel polimetilmetacrilato (PMMA) reticulado (Figura 17) foi introduzido por Gil e colaboradores³¹. Este gel, além de barato e de fácil de preparação, apresenta uma estrutural mais rígida, e pode intumescer em poucos dias.

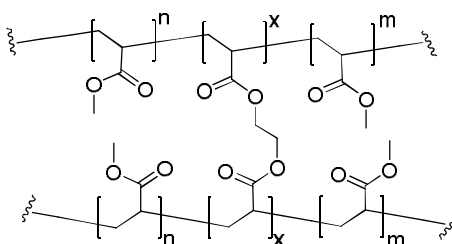


Figura 17. Estrutura química do polimetilmetacrilato (PMMA) reticulado.

Podem ser citados ainda o gel polidimetilsiloxano (PDMS)³⁰, e a gelatina⁶⁴ como meios de alinhamento compatíveis com água. Em 2006, Kuchel desenvolveu um dispositivo para estiramento rápido e reversível da gelatina¹⁶. Em 2008, Luy e colaboradores estenderam conceitualmente a aplicação do aparato de Kuchel para poliacrilamida (PH) no meio aquoso e poliacrilonitrila (PAN) em DMSO⁶⁵.

Entre as três metodologias citadas, o método SAG tem demonstrado maior eficiência, pois é possível realizar um maior controle do grau de alinhamento, principalmente utilizando dispositivos de ajuste do alinhamento, ou modificando o número de ligações cruzadas (reticulação) no gel polimérico. Todavia sua maior vantagem é a compatibilidade com solventes orgânicos, que permitem a dissolução tanto do gel, como de uma gama de moléculas orgânicas sintéticas ou naturais.

Os géis utilizados no método SAG, com suas ligações cruzadas, geram pequenas cavidades, que a partir da formação de interações intermoleculares e efeitos estéricos,

com as moléculas da amostra e do solvente, induzem um alinhamento fraco na amostra. Neste caso a orientação é produzida mediante a deformação mecânica das cavidades de um polímero com ligações cruzadas. Alguns dos métodos mais aplicados para este fim são mostrados a seguir.

1.5.1 – DISPOSITIVOS PARA O AJUSTE DO GRAU DE ALINHAMENTO PELO MÉTODO SAG

A necessidade do ajuste rápido e reversível do grau de alinhamento tem permitido o desenvolvimento de dispositivos de ajuste no próprio tubo de RMN, sendo desta forma uma vantagem para o método SAG. Os dispositivos desenvolvidos visam a obtenção dos parâmetros anisotrópicos de RMN, reduzindo a interferência do meio alinhado nos deslocamentos químicos e nas constantes de acoplamento medidos. Dependendo do gel, e do dispositivo, podem ser obtidos duas condições de alinhamento: pela compressão, ou pelo estiramento do gel. Entre os dispositivos desenvolvidos podem ser citados:

- O primeiro (Figura 18) é um tubo de RMN com um diâmetro interno (DI) diferente para cada metade do tubo. O superior de 4,2 mm e o inferior com menos de 4,2 mm. Um pistão é usado para pressionar a solução que contém o gel, e desta forma permite a obtenção de dois estados de alinhamento diferentes na mesma amostra⁶⁶;

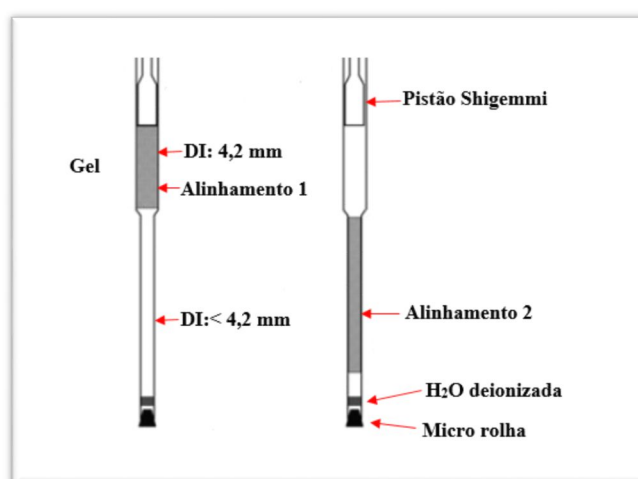


Figura 18. Dispositivo para medida de RDCs e RCSAs. Adaptado da referência⁶⁶.

- O segundo é o chamado aparato de Kuchel¹⁶ (Figura 19) que consiste em uma borracha de silicone inserida em um tubo padrão de RMN (5 mm), com a solução que contém o gel. A partir do estiramento mecânico da borracha, pode-se controlar o grau do alinhamento.

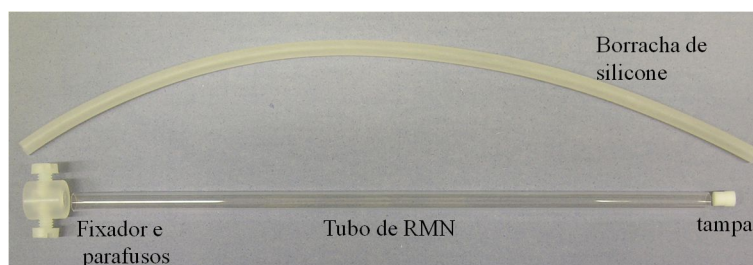


Figura 19. Dispositivo para ajuste rápido e reversível do alinhamento pelo método SAG (aparato de Kuchel).

1.6 – α -SANTONINA

O composto α -Santonina é um produto natural, pertencente à família das lactonas sesquiterpenicas. A α -Santonina apresenta atividade anti-helmíntica e antipirética, e foi primeiramente isolado da planta *Artemisia Santonica* por Kahler *et al.* em 1830⁶⁷. Sua estrutura foi determinada baseando-se em reação de derivatização e foi corretamente estabelecida por Clemo *et al.* em 1929⁶⁸. Estudos bioquímicos mostraram que o isômero β (Figura 20 (2)) tem atividade anti-helmíntica mais pronunciada do que o isômero α (Figura 20 (1))⁶⁹. Esta classe de compostos tem sido muito usada como precursor para síntese fotoquímica de outros compostos com atividade biológica.^{70,71} Portanto, a determinação correta da estereoquímica destes compostos é um ponto decisivo no estudo da estrutura das moléculas sintetizadas. Ruikar *et al.*⁷² isolou e atribuiu os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da α -Santonina **1**, mas a determinação dos hidrogênios diastereotópicos permaneceram sem atribuição.

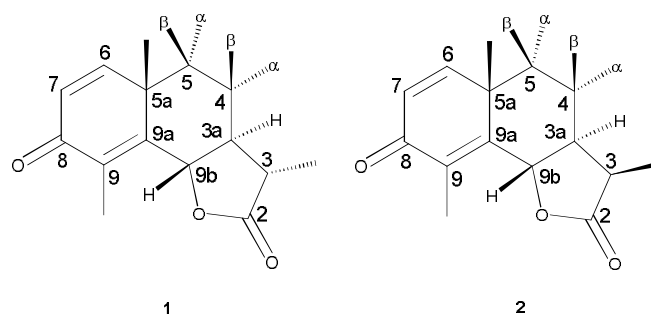


Figura 20. Estrutura dos compostos α -Santonina (1) e β -Santonina (2).

As análises de RMN em meios alinhados aplicados à determinação da conformação, configuração e constituição de moléculas orgânicas têm ampliado as possibilidades de aplicação das técnicas de RMN, despertando o interesse de vários grupos de pesquisa. Todavia, ainda existem algumas lacunas, principalmente envolvendo a interpretação dos parâmetros de RCSAs, que devem ser investigadas.

1.7 – OBJETIVOS

1.7.1 – OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho foi investigar os fatores envolvidos na obtenção e interpretação dos parâmetros de RDCs e principalmente os RCSAs, utilizando a α -Santonina como molécula teste.

1.7.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar a atribuição completa dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto α -Santonina a partir de experimentos de RMN uni e bidimensionais.
2. Determinar o espaço conformacional de todos os diastereoisômeros da α -Santonina.
3. Refinar as estruturas significativas, obtidas anteriormente, a partir da realização de cálculos de química quântica para a otimização estrutural e para a obtenção dos parâmetros de RMN (deslocamentos químicos e constantes de acoplamento).
4. Realizar a síntese dos géis PAN e PH.
5. Submeter a molécula α -Santonina a condição de alinhamento nos géis PAN e PH e medir os valores de RDC.
6. Submeter a molécula α -Santonina à condição de alinhamento no gel PMMA e medir os valores de RDC e RCSA.
7. Determinar a configuração relativa, bem como atribuir o deslocamento químico dos hidrogênios diastereotópicos da α -Santonina através das medidas de RDC e RCSA nas três diferentes condições de alinhamento.
8. Investigar a influência dos cálculos de química quântica nos valores previstos de RDC e RCSA.

CAPÍTULO 2

Procedimento Experimental

2 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 – PROCEDIMENTOS GERAIS

Todos os reagentes: α -Santonina-(3S,3aS,5aS,9bS)-3,5a,9-trimetil-3a,5,5a,9b-tetrahidronafto[1,2-b]furano-2,8(3H,4H)-diona 99%; ácido 2-Acrilamida-2-metil-1-propanosulfônico 99% (AMPS); N,N-dimetilacrilamida 99% (DMMA); N,N'-metilenobisacrilamida 99% (BIS); persulfato de amônia 98%; poliacrilonitrila, com peso molecular médio de 150.000, DMSO- d_6 (D, 99,9%) e $CDCl_3$ (D, 99,8%) foram obtidos comercialmente da marca SIGMA-ALDRICH.

Todos os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Agilent de 400 MHz, operando a temperatura de 298K, com frequências de ressonância de 399,75 MHz para o 1H , 61,36 MHz para o 2H e 100,51 MHz para o ^{13}C . Os experimentos foram realizados utilizando o solvente DMSO- d_6 (D, 99,9%) ou $CDCl_3$ (D, 99,8%), utilizando tubo de RMN padrão de 5 mm ou tubo Shigemi 5mm de susceptibilidade magnética de DMSO. Como referência interna para calibração dos espectros foi utilizado o tetrametilsilano (TMS).

Os valores dos deslocamentos químicos foram expressos em partes por milhão (ppm), e as constantes de acoplamento escalar (J) em Hertz (Hz).

2.2 – ANÁLISES DE RMN NO MEIO ISOTRÓPICO

Os experimentos de RMN de 1H , ^{13}C , DEPT, gCOSY 1H - 1H , gHSQC 1H - ^{13}C , gHMBC 1H - ^{13}C , J -resolvido e NOESY 1H - 1H foram necessários para realizar a atribuição completa dos sinais de RMN de 1H e ^{13}C do composto α -Santonina.

α -Santonina é um composto natural que apresenta quatro estereocentros designados como C5a, C9b, C3a e C3 (Figura 20). Com base no número de estereocentros este composto possui, potencialmente, oito diastereoisômeros, nomeados como: (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).

A sequência de pulsos utilizada para obtenção do espectro de RMN de ^1H foi a de pulso simples (*single pulse*) com pulso de $5,35 \mu\text{s}$, correspondente a 45° , tempo de aquisição de 2,049 s, 32 transientes, largura espectral de 6,4 kHz, 26 k pontos de memória e tempo total de aquisição de 1min 38s.

O espectro de RMN de ^{13}C foi adquirido aplicando-se desacoplamento de ^1H , em banda larga, durante a aquisição, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, pulso de $4,75 \mu\text{s}$, correspondente a 45° , tempo de aquisição de 1,3 s, 1000 transientes, largura espectral de 24,5 kHz, 63,7 k pontos de memória e tempo total de aquisição de 38min 21s.

O espectro de RMN DEPT foi adquirido com pulso de $9,5 \mu\text{s}$, correspondente a 90° , tempo de aquisição de 1,0 s, 512 transientes, largura espectral de 24,5 kHz, 49 k pontos de memória e tempo total de aquisição de 1h 8min.

O espectro de RMN gCOSY ^1H - ^1H foi adquirido com tempo de aquisição de 0,16 s, 2 k pontos de memória, tempo de espera de 1,0s, 8 transientes, 128 incrementos em $t1$, largura espectral de 6 kHz e tempo total de aquisição de 20min 22s.

O espectro gHSQC ^1H - ^{13}C foi adquirido com tempo de aquisição de 0,199 s, 6,4 k pontos de memória, tempo de espera de 1,0 s, 16 transientes, 200 incrementos em $t1$, largura espectral de 17 kHz em $F1$ e 3,6 kHz em $F2$ e tempo total de aquisição de 2h 13min.

O espectro gHMBC ^1H - ^{13}C foi adquirido com tempo de aquisição de 0,620 s, 2 k pontos de memória, tempo de espera de 1,0 s, 32 transientes, 256 incrementos em $t1$, largura espectral de 19,6 kHz em $F1$ e 3,3 kHz em $F2$ e tempo total de aquisição de 3h 41min.

O espectro J -resolvido foi adquirido com tempo de aquisição de 1,037 s, 8 k pontos de memória, tempo de espera de 1,0 s, 16 transientes, 128 incrementos em $t1$, largura espectral de 3,8 kHz e tempo total de aquisição de 1h 43min.

O espectro de RMN NOESY ^1H - ^1H foi adquirido com tempo de aquisição de 0,479 s, 6 k pontos de memória, tempo de espera de 8,5 s, 32 transientes, tempos de mistura de 0,5 s, 1,5 s e 2,5 s, 128 incrementos em $t1$, largura espectral de 6,0 kHz. Porém, o experimento com tempo de mistura de 1,5 s permitiu a obtenção do maior número de correlações NOE. Portanto, este espectro foi escolhido para realização da atribuição do composto α -Santonina e o tempo total de aquisição foi de 23h 57min.

2.3 – ANÁLISES DE RMN NO MEIO ALINHADO

2.3.1 – OBTENÇÃO DO GEL PAN RETICULADO

Foi preparado uma solução de concentração $2,80 \text{ g mL}^{-1}$ do polímero poliacrilonitrila (comercial) em DMSO- d_6 . Esta solução foi aquecida a 60°C para garantir a dissolução e diminuição da viscosidade, permitindo a sua transferência para um 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 de radiação β , no Departamento de Energia Nuclear (UFPE). O polímero adquiriu uma coloração amarelada. Por fim, o tubo foi quebrado e o gel foi recuperado na forma de pequenos bastões⁶³.

2.3.2 – OBTENÇÃO DO GEL PH RETICULADO

O polímero PH foi sintetizado utilizando-se (S)-2-Acrilamida-1-ácido-propanosulfônico (APS), N, N-dimetilacrilamida (DMMA), N, N'-metilenobisacrilamida (BIS) e persulfato de amônio, na proporção molar respectiva de (1:1:0,03:0,008). Estes compostos foram dissolvidos em água destilada para obter uma concentração de monômero de $1,2 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, a solução foi colocada em um banho de ultrassom por 30 minutos para remoção de bolhas de ar. A solução foi inserida em um cilindro de 7 mm de diâmetro interno e a reação de polimerização foi realizada por 12 minutos a uma temperatura de aproximadamente 70°C . Os géis foram imersos em uma solução de HCl 0,02 molar, e posteriormente, com água destilada 5 vezes. Durante este processo ocorreu o intumescimento do gel, que em seguida foi deixado neste estado por 24 horas. Após este período foram secos à temperatura de aproximadamente 50°C , formando pequenos bastões⁶².

2.3.3 – OBTENÇÃO DO GEL PMMA RETICULADO

O gel PMMA reticulado foi cedido pelo grupo do professor Roberto Gil (Universidade Carnegie Mellon, Pittsburgh, EUA). Este gel foi sintetizado aplicando-se uma nova metodologia de reticulação química. O gel foi cortado em pequenos bastões de 2,8 cm de comprimento. Em seguida, o gel foi deixado imerso, por um dia, com uma solução 1:1 acetona/metanol. Em seguida, o gel foi deixado imerso três vezes com

clorofórmio, sendo o solvente trocado a cada dia. O gel obtido foi seco sobre um papel absorvente. Este processo tem como objetivo a retirada dos monômeros remanescentes.

2.3.4 – MEDIDAS EXPERIMENTAIS DE RDCs

2.3.4.1 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para as medidas experimentais de RDCs, foram obtidos experimentos de RMN gHSQC ^1H - ^{13}C acoplados em *F2* no meio isotrópico e anisotrópico, em ambos os casos foi preparada uma solução de α -Santonina (25 mg, 0,08 mmol) em DMSO- d_6 (0,6 mL). Foram preparados dois diferentes meios de alinhamento pela inserção dos géis poliácrlonitrila (PAN)⁶³ e o polímero reticulado poliacrilamida (PH)⁶². Após a preparação dos géis na forma de bastões com diâmetro adequado ao tubo de RMN (5 mm), os géis foram inseridos dentro do tubo de RMN junto com a solução descrita acima. Em ambos os casos o intumescimento dos géis atingiu o seu equilíbrio em aproximadamente 20 dias.

Foram também medidos RDCs com o alinhamento no gel PMMA, para isso foram obtidos experimentos de RMN gHSQC ^1H - ^{13}C acoplados em *F1* com pulso adiabático, com janela espectral rebatida e com multiplicação das constantes de acoplamento, por um fator $k=3$. Este experimento foi realizado para a amostra relaxada (sem compressão do gel) e comprimida (com compressão do gel). A amostra analisada foi preparada com uma solução de α -Santonina (25 mg, 0,08 mmol) em CDCl_3 (0,6 mL). O gel PMMA atingiu o equilíbrio de intumescimento em poucas horas.

Para medida dos RCSAs no gel PMMA foram realizados experimentos de RMN de ^{13}C nas duas condições de alinhamento descritas acima.

2.3.4.2 – EXPERIMENTOS DE RMN gHSQC ACOPLADOS EM *F2*

O espectro gHSQC acoplado em *F2* para o meio isotrópico foi adquirido com tempo de aquisição de 8,806 s, 6 k pontos de memória, tempo de espera de 1 s, 16 transientes, 200 incrementos em *t1*, largura espectral de 17 kHz em *F1* e 3,6 kHz em *F2* e tempo total de aquisição de 17h 35min. O espectro gHSQC acoplado em *F2* para o gel PH foi adquirido com tempo de aquisição de 3,277 s, 3 k pontos de memória, tempo de espera de 0,5 s, 64 transientes, 256 incrementos em *t1*, largura espectral de 17 kHz em *F1*

e 4,8 kHz em $F2$ e tempo total de aquisição de 37h 47min. O espectro gHSQC acoplado em $F2$ para o gel PAN foi adquirido com tempo de aquisição de 0,150 s, 1 k pontos de memória, tempo de espera de 1 s, 64 transientes, 400 incrementos em $t1$, largura espectral de 17 kHz em $F1$ e 4,0 kHz em $F2$ e tempo total de aquisição de 18h 24min.

2.3.4.3 – EXPERIMENTOS DE RMN gHSQC ACOPLADOS EM $F1$

Para o estudo do alinhamento no gel PMMA foram realizados espectros de RMN de ^{13}C com os mesmos parâmetros utilizado para o experimento de RMN de ^{13}C no meio isotrópico. Os espectros gHSQC acoplado em $F1$, com pulso adiabático, rebatido e com multiplicação das constantes de acoplamento por um fator $k=3$, foram adquiridos com tempo de aquisição de 0,150 s, 1 k pontos de memória, tempo de espera de 3 s, 8 transientes, 1024 incrementos em $t1$, largura espectral de 3,2 kHz em $F1$ e 9 kHz em $F2$ e tempo total de aquisição de 15h 34min. Os mesmos parâmetros foram usados para os dois meios de alinhamento.

2.3.4.4 – EXPERIMENTOS DE RMN DE DEUTÉRIO

Experimentos de RMN de ^2H foram realizados para a amostra no meio isotrópico (CDCl_3) e para as amostras com a presença do gel PMMA (comprimido e relaxado). A sequência de pulsos utilizada para obtenção do espectro de RMN de ^2H foi a de pulso simples (*single pulse*) com pulso de 150,0 μs , correspondente a 45° , tempo de aquisição de 1,645 s, 8 transientes, largura espectral de 2,4 kHz, 8 k pontos de memória e tempo total de aquisição de 22s.

2.4 – CÁLCULOS TEÓRICOS

2.4.1 – OTIMIZAÇÃO ESTRUTURAL

As estruturas dos oito diastereoisômeros propostos para o composto α -Santonina foram sujeitas à busca conformacional, usando o campo de força MMFF94⁷³, implementado no programa Macromodel⁷⁴. As estruturas conformacionais foram escolhidas a partir de uma janela de energia de 5 kcal/mol. Posteriormente, as conformações selecionadas, para todos os diastereoisômeros, foram otimizadas,

aplicando o nível DFT, usando o funcional híbrido B3LYP e a base 6-31G* conforme implementado no programa Gaussian 09⁷⁵. Este foi denominado como método de referência.

Além do cálculo de otimização estrutural citado acima, foram realizados um total de 27 cálculos adicionais variando os métodos, os funcionais e as bases. As combinações de cálculos são mostradas na Tabela 1. Porém, estes cálculos foram realizados apenas para o diastereoisômero *i*.

Tabela 1. Métodos de química quântica utilizados para a otimização da geometria da configuração relativa *i*, da molécula α -Santonina, no programa Gaussian.

<i>Estrutura</i>	<i>Método</i>	<i>Estrutura</i>	<i>Método</i>
1	B3LYP/6-31G*	15	M062X/LANL2DZ
2	B3LYP/6-311G/++dp	16	WB97XD/6-311G/++dp
3	B3LYP/6-31G/++dp	17	WB97XD/6-31G/++dp
4	B3LYP/3-21G	18	WB97XD/3-21G
5	B3LYP/STO-3G	19	WB97XD/STO-3G
6	B3LYP/LANL2DZ	20	WB97XD/LANL2DZ
7	B3PW91/6-31G/++dp	21	Hartree-Fock/6-311G/++dp
8	B3PW91/3-21G	22	Hartree-Fock/6-31G/++dp
9	B3PW91/STO-3G	23	Hartree-Fock/STO-3G
10	B3PW91/LANL2DZ	24	Hartree-Fock/LANL2DZ
11	M062X/6-311G/++dp	25	semi-empírico/AM1
12	M062X/6-31G/++dp	26	semi-empírico/PM6
13	M062X/3-21G	27	semi-empírico/PM3
14	M062X/STO-3G	28	semi-empírico/PDDG

2.4.2 – CÁLCULOS TEÓRICOS DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS E DAS CONSTANTES DE ACOPLAMENTO ESCALAR

Os cálculos de RMN foram aplicados às estruturas otimizadas anteriormente, para obtenção dos valores de deslocamentos químicos (GIAO)⁷⁶ e das constantes de acoplamento escalar. O método definido como referência usou o funcional PBE0⁷⁷ e a base especializada pcS-1⁷⁸. Neste último, foi empregado não só o termo de contato de Fermi, mas também os termos dipolar e spin-órbita diamagnético e paramagnético^{79,80}.

Além dos cálculos de RMN, utilizando o método de referência, foram também realizados um total de 8 cálculos adicionais variando os métodos, e incluindo a solvatação em alguns deles. As combinações dos cálculos são mostradas na Tabela 2. Porém, estes cálculos foram realizados apenas para o diastereoisômero *i*.

Tabela 2. Métodos de química quântica utilizados para a realização de cálculos de RMN GIAO da configuração relativa *i*, da molécula α -Santonina, no programa Gaussian.

<i>Estrutura</i>	<i>Método</i>
1	PBE0/pcS-1
2	PBE0/6-31G*
3	PBE0/pcS-1/Solvente (clorofórmio)
4	MP2/pcS-1
5	MP2/6-31G*
6	MP2/pcS-1/Solvente (clorofórmio)
7	B3LYP/pcS-1
8	B3LYP/6-31G*
9	B3LYP/pcS-1/Solvente (clorofórmio)

2.5 – IMAGENS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DO GEL PMMA

Foram realizadas microimagens de ressonância magnética do gel PMMA comprimido na solução de α -Santonina em CDCl_3 . As imagens foram obtidas usando a sequência de pulsos *Multi-echo multi-slice* (MEMS). Foram realizadas duas sequências de experimentos com tempo entre pulsos (TE) de 11 ms e 160 ms. Para cada um desses valores de TE foram obtidas três fatias consecutivas de 5 mm. A resolução das imagens foi de 40 μm com campo de visão (do inglês - *Field of view*) de 10 mm. As imagens obtidas foram baseadas na densidade de hidrogênios da amostra. Os experimentos de microimagem de ressonância magnética foram realizados no espectrômetro Agilent de 400 MHz, utilizando uma sonda específica para microimagens.

2.6 – OBTENÇÃO DOS RDCs E RCSAs CALCULADOS

O programa MSpin-RDC¹⁸ foi usado para realizar o melhor ajuste (SVD) entre os RDCs e RCSAs obtidos experimentalmente e as estruturas propostas, gerando desta forma valores calculados (previstos). Este programa também permite a obtenção dos fatores de qualidade Q .

2.7 – SOBREPOSIÇÃO DE ESTRUTURAS

As sobreposições das estruturas para a obtenção do desvio quadrático médio (DQM) foram realizadas utilizando o programa *Virtual Molecular Dynamics* (VMD)⁸¹.

2.8 – SIMULAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H

Para realizar a simulação de uma parte do espectro de RMN de ^1H , da molécula α -Santonina, foram usados como dados de entrada os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento do sistema de spins simulado no programa SpinWorks⁸², e usando a análise espectral de rotina NUMMRIT⁸³.

CAPÍTULO 3

Resultados e discussão

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram realizados uma série de experimentos de RMN uni e bidimensionais, no intuito de realizar a completa atribuição dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto α -Santonina. Os experimentos de RMN realizados foram ^1H , ^{13}C , DEPT, gCOSY ^1H - ^1H , gHSQC ^1H - ^{13}C , gHMBC ^1H - ^{13}C , J -resolvido e NOESY ^1H - ^1H .

A Figura 21 mostra o espectro de RMN de ^1H do composto α -Santonina, sendo observados os seguintes sinais: 6,92ppm (d, 9,8 Hz, 1H); 6,14ppm (d, 9,8 Hz, 1H); 5,07ppm (d, 11,3 Hz, 1H); 3,49ppm (água); 2,60ppm (dq, 6,9 Hz/11,3 Hz, 1H); 2,5ppm (DMSO- d_6); 1,98ppm (s, 3H); 1,78 (m, 1H). Os sinais sobrepostos na região espectral entre δ_{H} 1,88 e 1,64, e o sinal em δ_{H} 1,32, correspondem aos hidrogênios diastereotópicos H4 α , H4 β , H5 β e H5 α que, inicialmente, não puderam ser atribuídos.

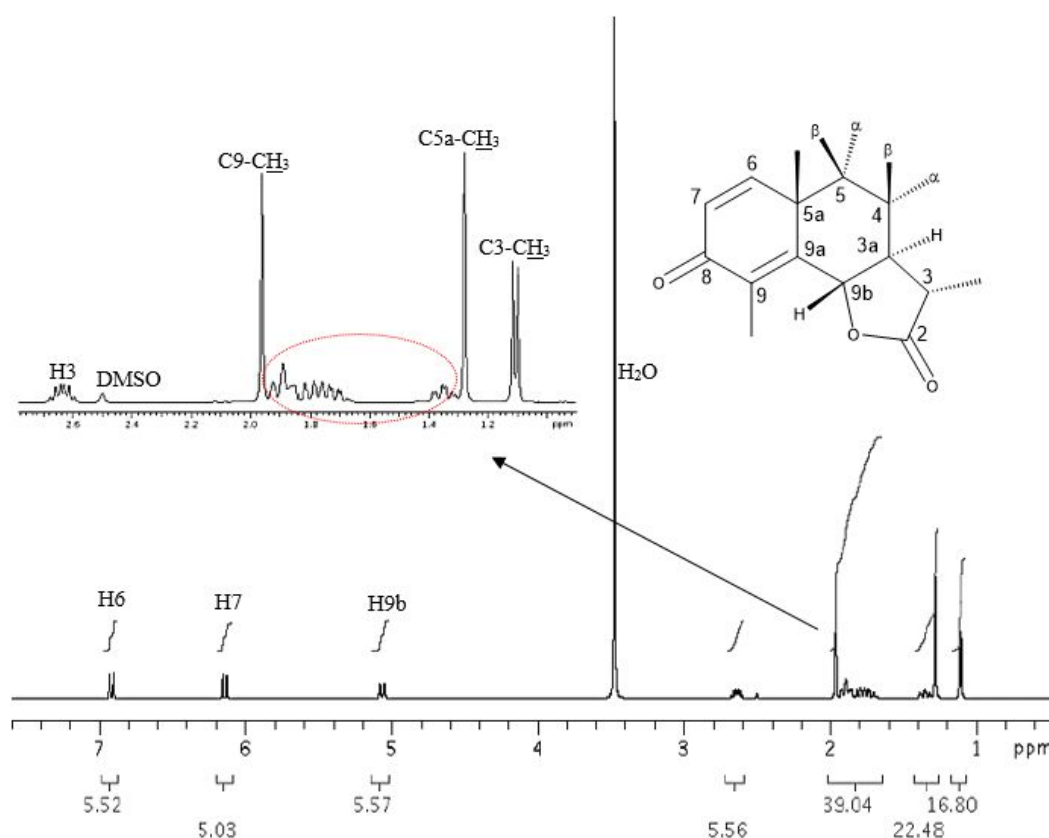


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 399,75 MHz) do composto α -Santonina a 298K.

Os sinais em 6,92 e 6,14ppm são atribuídos aos hidrogênios H6 e H7, respectivamente. O sinal em 5,07ppm é atribuído ao hidrogênio H9b. O sinal em 2,6ppm é atribuído ao hidrogênio H3. Os simpletos em 1,98 e 1,28ppm representam as metilas

C9-CH₃ e C5a-CH₃, respectivamente. O duplete em 1,10ppm é atribuído a metila C3-CH₃. Os sinais na região entre 1,88 e 1,32ppm (círculo vermelho) são atribuídos aos cinco hidrogênios que compõem o sistema de spins que contém o hidrogênio H3a e os hidrogênios diastereotópicos H4 β , H4 α , H5 β e H5 α . Todavia, sua atribuição não foi realizada devido à sobreposição destes sinais.

Para confirmar a atribuição dos sinais no espectro de RMN de ¹H foi realizado o experimento de RMN gCOSY ¹H-¹H (Figura 22).

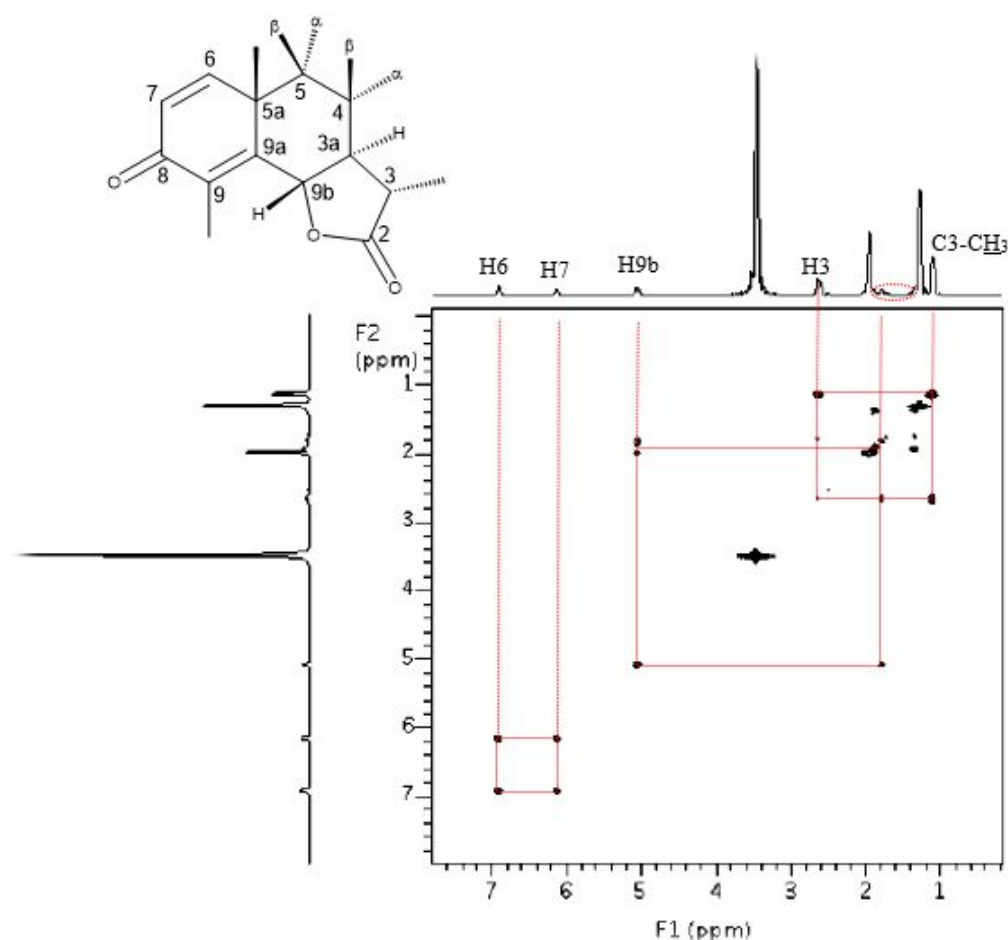


Figura 22. Espectro de RMN gCOSY ¹H-¹H (DMSO-*d*₆, 399,75 MHz) do composto α -Santonina a 298K.

No espectro gCOSY ¹H-¹H são observados dois sistemas de spins. O primeiro sistema mostra um pico de correlação entre os sinais dos hidrogênios em 6,92 e 6,14ppm, correspondente ao acoplamento entre os hidrogênios H6 e H7.

O segundo sistema de spins mostra um pico de correlação entre o sinal do hidrogênio em 5,07ppm referente ao hidrogênio H9b e o hidrogênio H3a na região dos sinais que se encontram sobrepostos (círculo vermelho pontilhado). O mesmo hidrogênio

H3a mostra também um pico de correlação com o sinal em 2,60ppm referente ao hidrogênio H3. O hidrogênio H3 também mostra uma outra correlação com o sinal em 1,10ppm que corresponde aos hidrogênios da metila C3-CH₃. Os outros picos de correlação presentes são referentes aos acoplamentos entre os sinais dos hidrogênios sobrepostos citados anteriormente. Desta forma, o experimento bidimensional gCOSY ¹H-¹H confirma a atribuição realizada no espectro de RMN de ¹H (Figura 21) para o composto α -Santonina.

A Figura 23 mostra o espectro de RMN de ¹³C do composto α -Santonina, sendo observados os seguintes sinais: 185,67ppm; 178,05ppm; 156,63ppm; 153,32ppm; 126,37ppm; 124,73ppm; 80,69ppm; 53,06ppm; 41,55ppm; 40,00ppm (sobreposto ao sinal do solvente); 39,5ppm (DMSO-*d*₆) 37,41ppm; 24,57ppm; 22,03ppm; 12,22ppm; 10,66ppm.

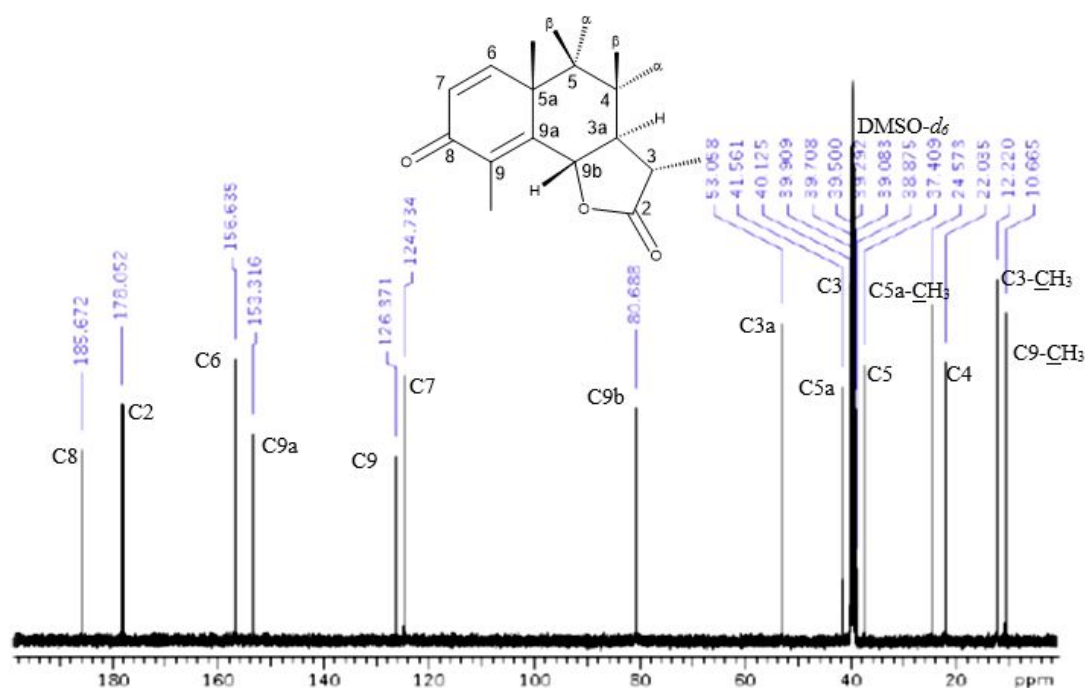


Figura 23. Espectro de RMN de ¹³C (DMSO-*d*₆, 100,51 MHz) do composto α -Santonina a 298K.

O espectro mostra sinais em 185,67 e 178,05ppm referentes aos carbonos carbonílicos C8 e C2, mais desblindados, respectivamente. Os sinais na região entre 156,63 e 124,73ppm são atribuídos aos carbonos *sp*²: C6, C9a, C9 e C7. Os sinais em 80,69, 53,06 e 40,00ppm são atribuídos aos carbonos metínicos C9b, C3a e C3 respectivamente, sendo que o sinal do carbono C3 encontra-se sobreposto aos sinais do

solvente (DMSO- d_6). O carbono quaternário C5a aparece em 41,55ppm. Os sinais em 24,57, 12,22 e 10,66ppm são atribuídos aos carbonos metílicos C5a-CH₃, C3-CH₃ e C9-CH₃, respectivamente. Por último os carbonos metilênicos C5 e C4 aparecem em 37,41 e 22,03ppm, respectivamente.

A Figura 24 mostra o espectro de RMN de DEPT ^{13}C do composto α -Santonina.

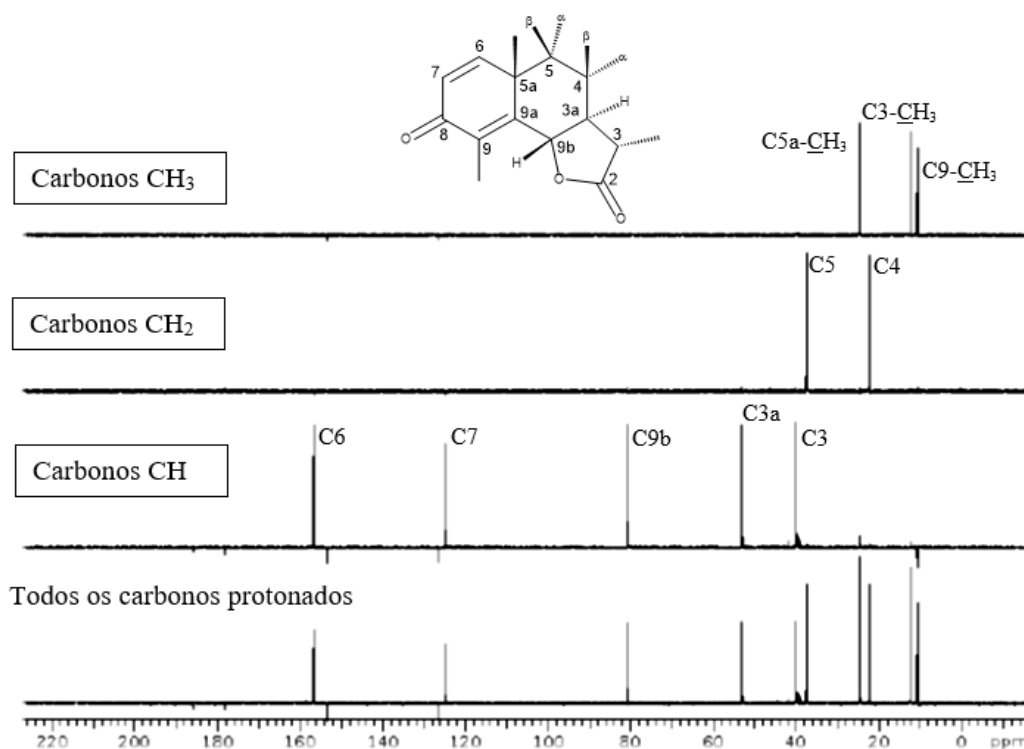


Figura 24. Espectro de RMN DEPT ^{13}C (DMSO- d_6 , 100,51 MHz) do composto α -Santonina a 298K.

Este experimento permitiu a distinção entre todos os carbonos protonados: metílicos (C5a-CH₃, C3-CH₃ e C9-CH₃), metilênicos (C4 e C5) e metínicos (C6, C7, C9b, C3a e C3), e ajudou a confirmar a atribuição do espectro de RMN de ^{13}C .

Para confirmar a atribuição dos sinais no espectro de RMN de ^{13}C foi realizado também o experimento de RMN gHSQC $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (Figura 25).

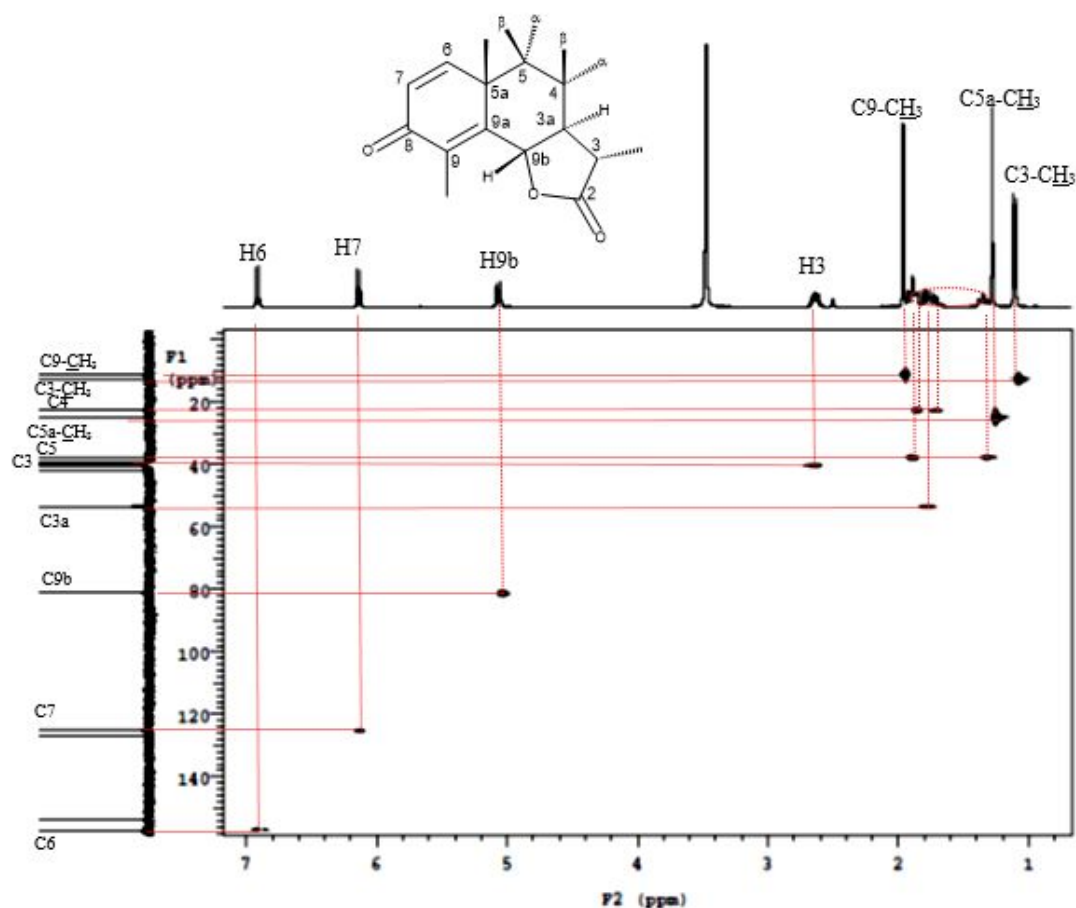


Figura 25. Espectro de RMN gHSQC $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6 , 399,75 MHz) do composto α -Santonina a 298K.

No espectro são observadas correlações entre o hidrogênio H6 em 6,92ppm e o carbono C6 em 156,63ppm. Outra correlação entre o hidrogênio H7 em 6,14ppm e o carbono C7 em 124,73ppm. Correlação entre o hidrogênio H9b em 5,07ppm e o carbono C9b em 80,69ppm. O hidrogênio H3 em 2,6ppm mostra um pico de correlação com o carbono C3 em 40,00ppm. Os hidrogênios metílicos C9-CH₃, C5a-CH₃ e C3-CH₃ em 1,98, 1,28 e 1,10ppm, respectivamente, mostram picos de correlação com seus carbonos C9-CH₃, C5a-CH₃ e C3-CH₃. Os hidrogênios da região entre 1,88 e 1,32ppm (círculo vermelho pontilhado) que se encontram sobrepostos mostram dois picos de correlação com cada um dos carbonos C5 e C4 em 37,41 e 22,03ppm, respectivamente, e um pico de correlação com o carbono C3a em 53,06ppm. Desta forma, o experimento bidimensional gHSQC confirma a atribuição realizada no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 23) para o composto α -Santonina. Em especial, foi possível confirmar neste espectro que a região que apresenta sinais sobrepostos (círculo vermelho pontilhado), se

refere ao hidrogênio H3a e os hidrogênios diastereotópicos H4 β , H4 α , H5 β e H5 α , os quais não puderam ser atribuídos inicialmente.

Um outro experimento de RMN realizado foi o gHMBC $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, o qual foi também importante para a atribuição dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , este espectro encontra-se no Anexo (A1).

3.1 – MEDIDAS DE RDC NO GEL PAN

Os bastões do gel PAN obtidos apresentaram uma aparência homogênea. O gel após o completo intumescimento, na solução de α -Santonina em DMSO- d_6 , mostrou um pequeno crescimento axial e ocupou todo o diâmetro interno, na região de análise, no tubo de RMN. Para a obtenção dos RDCs foi realizado o espectro de RMN gHSQC acoplado em F_2 da amostra de α -Santonina alinhada no gel PAN, para a obtenção das constantes de acoplamento total (T). Estes valores foram comparados, com os respectivos valores, das constantes de acoplamento escalar (J), obtidos ao realizar o mesmo experimento para a amostra α -Santonina no meio isotrópico. A diferença entre estes dois valores forneceu o RDC experimental (Tabela 3). Isto foi feito comparando as projeções em F_2 dos espectros de RMN gHSQC acoplados para a amostra na presença e ausência do gel. A Figura 26 mostra como foi medido o RDC para o par de spins do carbono C9- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ / e do hidrogênio C9- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$.

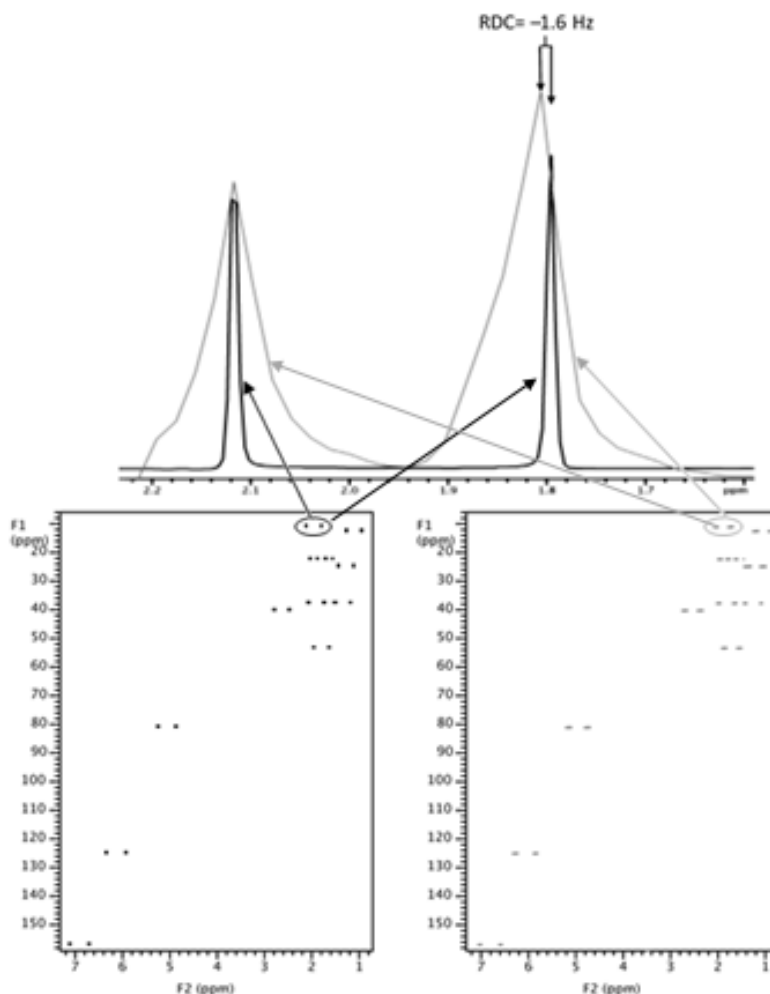


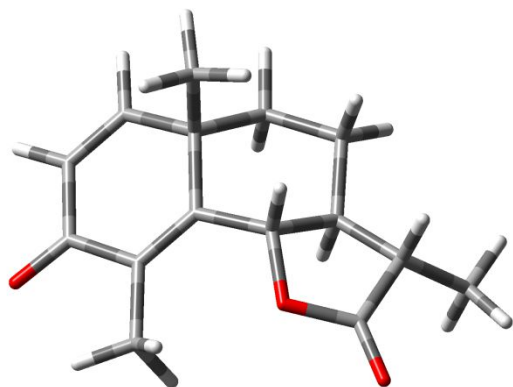
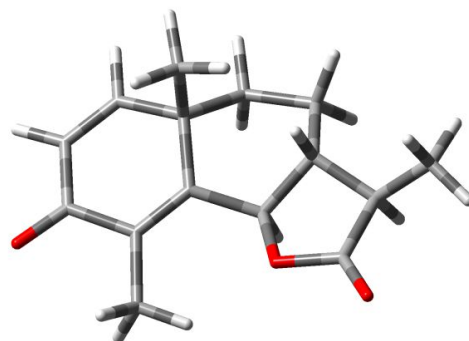
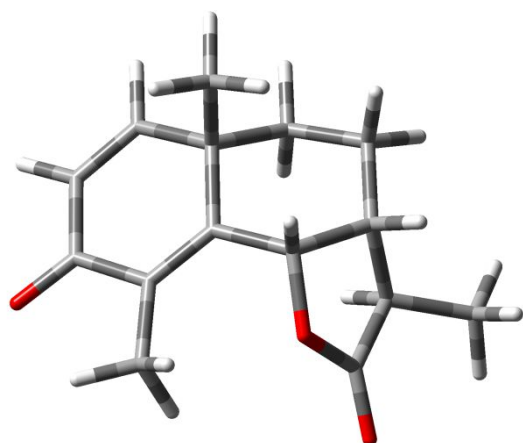
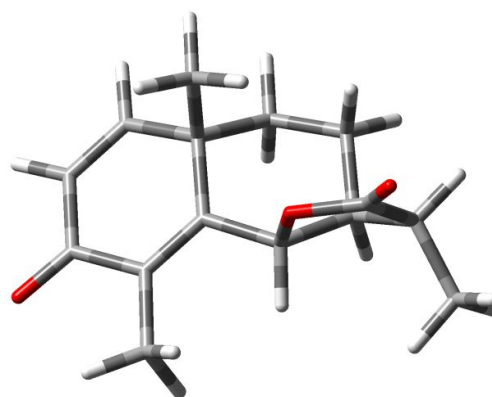
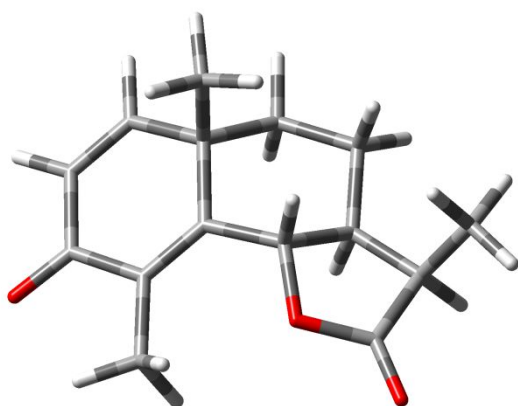
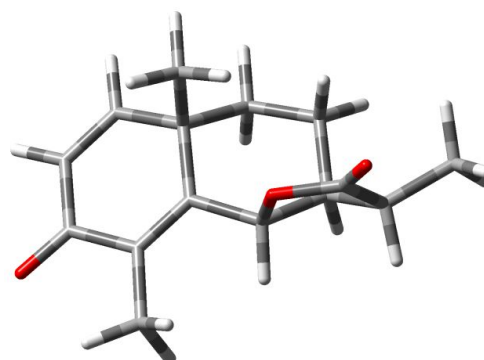
Figura 26. Espectro de RMN gHSQC ^1H - ^{13}C acoplado em $F2$ da molécula α -Santonina no meio isotrópico (esquerda) e no meio anisotrópico, no gel PAN (direita). Acima, é mostrada a sobreposição das projeções em $F2$ do acoplamento $\text{C9-CH}_3/\text{C9-CH}_3$, no meio isotrópico (linha preta) e anisotrópico (linha cinza). Os valores de RDC são dados pela diferença $D = T - J$.

Desta maneira foi possível medir onze valores de RDCs para o alinhamento no gel PAN, que variaram entre valores de $-3,2$ a $+5,9$ Hz como mostrado na Tabela 3. Os erros nas medidas experimentais de RDC, para o gel PAN, foram estimados, individualmente, baseados nas análises visuais da sobreposição dos picos⁸⁴.

Tabela 3. RDCs medidos experimentalmente, para o gel PAN, onde seus erros estimados são apresentados entre parênteses.

Pares C-H	Valores de RDC (Hz)
C6-H6	5,7(0,3)
C7-H7	-3,2(0,5)
C3- <u>C</u> H ₃ -C3- <u>C</u> H ₃	4,8(0,9)
C9- <u>C</u> H ₃ -C9- <u>C</u> H ₃	-1,6(0,4)
C5a- <u>C</u> H ₃ -C5a- <u>C</u> H ₃	-1,8(0,2)
C3-H3	3,3(0,5)
C3a-H3a	3,5(0,9)
C5-H ($\delta=1,85$)	-1,3(0,2)
C5-H ($\delta=1,32$)	5,9(1,0)
C4-H ($\delta=1,70$)	5,4(1,0)
C4-H ($\delta=1,88$)	3,6(1,0)

As geometrias dos diferentes diastereoisômeros da molécula α -Santonina foram inicialmente submetidas a cálculos de otimização baseados em mecânica molecular, utilizando o campo de força MMFF94⁷³. Isto foi necessário, uma vez que as moléculas, apesar de possuírem certa rigidez, podem apresentar um certo grau de flexibilidade por pseudorrotação do anel de seis membros central. Portanto, os cálculos descritos acima, realizam uma busca conformacional, para cada um dos diastereoisômeros. As estruturas conformacionais foram escolhidas a partir de uma janela de energia de 5 kcal/mol. Nesta janela os diferentes diastereoisômeros da molécula α -Santonina apresentaram somente uma única conformação, com exceção do diastereoisômero *viii* que apresentou duas diferentes conformações. Posteriormente, todas as estruturas obtidas foram refinadas a partir de cálculos de química quântica, usando o método DFT B3LYP/6-31G* (Figura 27).

*i*- 5a(S), 9b(S), 3a(S), 3(S)*ii*- 5a(S), 9b(R), 3a(R), 3(R)*iii*- 5a(S), 9b(S), 3a(R), 3(R)*iv*- 5a(S), 9b(R), 3a(S), 3(S)*v*- 5a(S), 9b(S), 3a(S), 3(R)*vi*- 5a(S), 9b(R), 3a(S), 3(R)

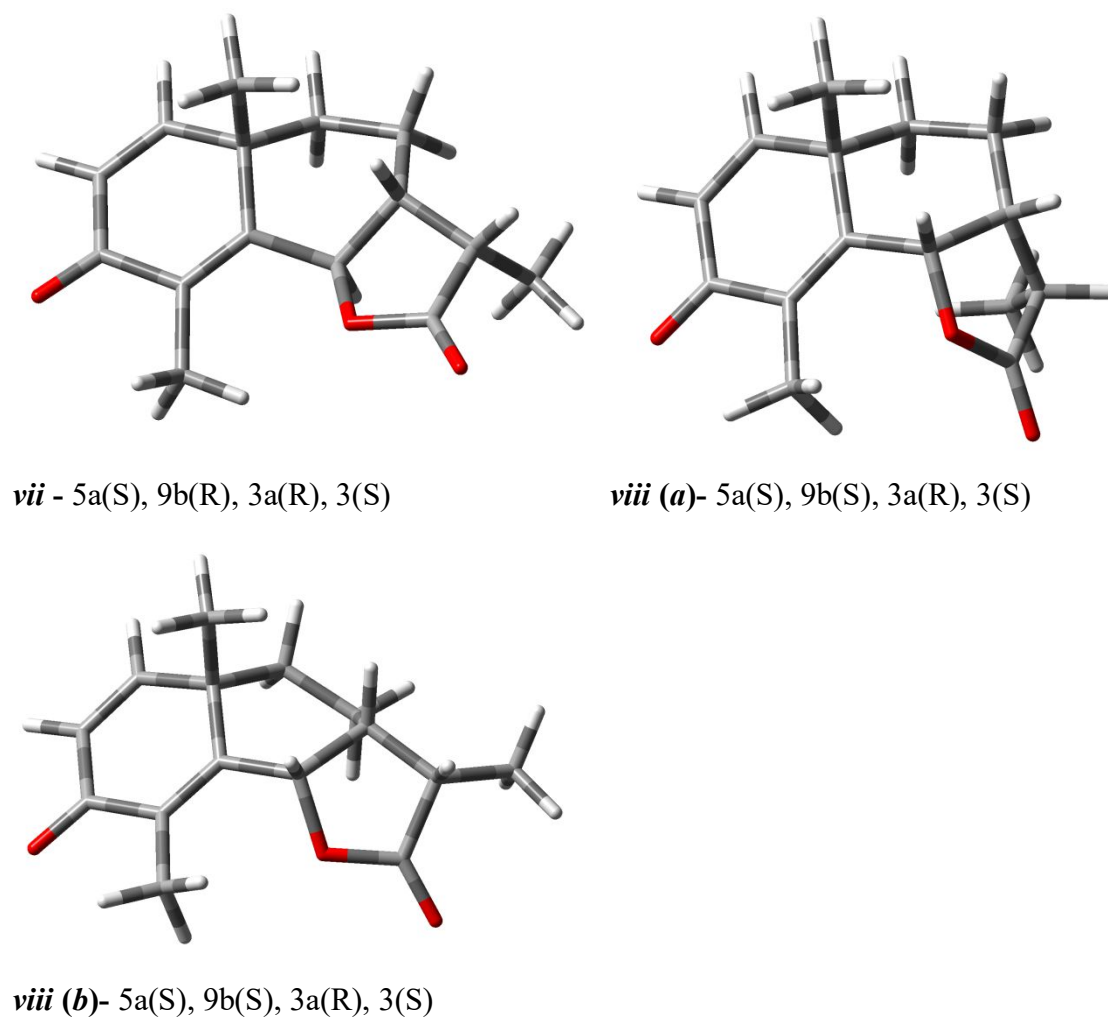


Figura 27. Geometria dos oito diastereoisômeros otimizadas da molécula α -Santonina, utilizando o programa Gaussian09⁷⁵.

O programa MSpin-RDC¹⁸ foi usado para realizar o ajuste, baseado em SVD¹⁴, entre os RDCs experimentais e as estruturas propostas, que foram refinadas a partir de cálculos de química quântica DFT. Deste modo, foram gerados RDCs calculados (previstos). Os acoplamentos $^1D_{CH}$ dos grupos metila foram tratados, no ajuste baseado em SVD, usando o procedimento desenvolvido por Navarro-Vázquez⁸⁵ e que está implementado no programa MSpin-RDC, na qual considera-se os grupos metila como rotores livres.

No caso da estrutura *viii*, que apresentou duas conformações, foi necessário utilizar a média correta das estruturas durante o processo de ajuste. Isto foi feito usando a aproximação do tensor único, onde o alinhamento das duas conformações foi suposto como sendo independente das suas estruturas particulares, sendo possível assim definir

um único tensor que represente as duas conformações. As populações das duas estruturas foram, simultaneamente, otimizadas durante o processo de ajuste e foram determinadas como de 0,62 para a conformação de menor energia **viii(a)** e de 0,38 para a de maior energia **viii(b)**⁸⁵. Esta aproximação pode ser utilizada em casos onde a mudança conformacional não envolve uma grande variação na forma global da molécula. No caso particular destas duas conformações a mudança conformacional não é significativa, pois apenas ocorre uma pseudorrotação do anel ciclohexil (Figura 27, **viii(a)** e **viii(b)**), estando, portanto, de acordo com a aproximação imposta. Note, todavia, que a aproximação do tensor único requer a definição de um eixo de referência comum a todas as conformações. Isto é feito, usualmente, pela sobreposição, por mínimos quadrados, das coordenadas atômicas²⁰. Neste caso particular, isto foi feito por superposição dos átomos, de carbono, do anel semiquinona. O melhor ajuste entre os RDCs experimental e calculados foi expresso em termos do fator de qualidade Q ¹⁵.

Além da atribuição da configuração foi realizada a atribuição dos dois centros metilênicos pró-quirais C4 e C5 presentes na molécula α -Santonina. Estes hidrogênios não foram atribuídos anteriormente devido à sobreposição dos seus sinais e sua atribuição não foi encontrada na literatura⁷². Os valores de RDCs correspondentes a estes vetores particulares podem ser atribuídos para qualquer um dos dois vetores CH metilênicos ($H\alpha$ e $H\beta$). Isto resulta em quatro combinações para cada estrutura proposta, denominadas: A, B, C, D, onde são alternadas as atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios diastereotópicos, ainda não atribuídos, e consequentemente os valores dos RDCs (Tabela 4).

Tabela 4. Possíveis atribuições dos hidrogênios diastereotópicos ligados aos carbonos C4 e C5.

Atribuição	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-RDC¹⁸ para o cálculo do fator Q para cada diastereoisômero. Na Figura 28 estão

agrupados os valores do fator Q obtidos para as quatro diferentes combinações dos oito diastereoisômeros. Para considerar o impacto do erro experimental usou-se o procedimento do *bootstrapping*. Seguindo este protocolo, fez-se uma nova amostragem mediante a geração das distribuições gaussianas de N dados, onde a média da distribuição corresponde 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. Os valores obtidos de Q mostrados na Figura 28 correspondem aos valores médios de Q para $N=64$ distribuições. Os valores de Q mostrados para o diastereoisômero *viii* correspondem a média da solução para duas conformações obtidas.

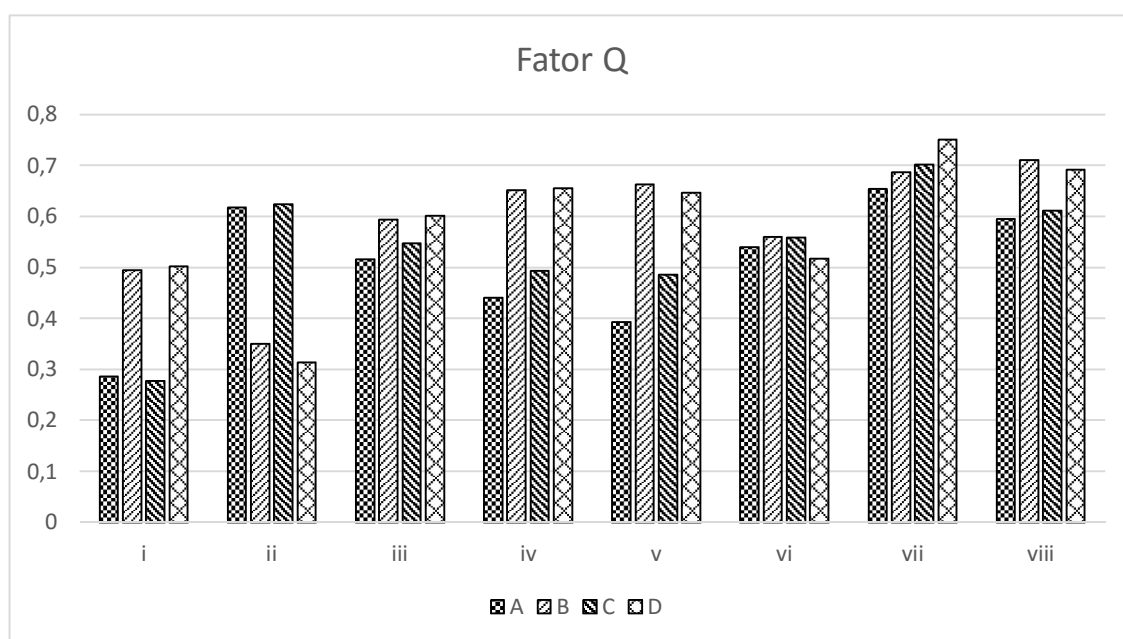


Figura 28. Fatores de qualidade Q , para o alinhamento no gel PAN, dos diferentes diastereoisômeros, e para as quatro combinações dos grupos metilênicos. *O resultado para o diastereoisômero *viii* representa uma média da solução para duas conformações.

Os menores valores de Q foram obtidos para o diastereoisômero *i* com as combinações *i*-A=0,286 e *i*-C=0,277, e os maiores valores para o diastereoisômero *vii* com a combinação *vii*-D=0,750. Comparando-se todos os diastereoisômeros, o melhor ajuste para o alinhamento no gel PAN, correspondeu ao diastereoisômero *i*, estando de acordo com a CR correta da molécula α -Santonina. Em relação a atribuição dos hidrogênios diastereotópicos foram obtidos os menores valores de Q para as combinações

i-A e *i*-C. Isto permite confirmar a atribuição dos hidrogênios ligados ao carbono C5. Todavia, não foi possível determinar a correta atribuição dos hidrogênios metilênicos na posição C4, já que os valores de Q para *i*-A e *i*-C são muito próximos, pois os vetores C-H associados ao carbono C4 possuem uma distribuição espacial similar, gerando RDCs de mesma magnitude. A tabela completa com os valores de Q obtidos está presente nos Anexos (A5 - Tabela A6)⁸⁶.

3.2 – MEDIDAS DE RDC NO GEL PH

Os bastões do gel PH obtidos não mostraram uma aparência homogênea devido à quantidade de bolhas de ar presentes no gel. O gel após o completo intumescimento, na solução de α -Santonina em DMSO- d_6 , ocupou todo o volume interno, na região de análise, no tubo de RMN.

O alinhamento no gel PH permitiu medir somente seis valores de RDCs, que variaram entre valores de $-25,5$ a $+12,7$ Hz (Tabela 5). A faixa de valores de RDC medidos no gel PH foi maior que a apresentada no caso do gel PAN isto é consequência do maior grau de alinhamento no gel PH. Entretanto, a pouca homogeneidade do gel causou o alargamento dos sinais dificultando as medidas das constantes de acoplamento, resultando na pequena quantidade de RDCs medidos.

Tabela 5. RDCs medidos experimentalmente, para o gel PH, e seus erros estimados são apresentados entre parênteses.

Pares C-H	Valores de RDC (Hz)
C6-H6	12,7(1,0)
C7-H7	-25,5(1,0)
C9- $\underline{\text{CH}_3}$ -C9- $\underline{\text{CH}_3}$	-4,5(0,4)
C5a- $\underline{\text{CH}_3}$ -C5a- $\underline{\text{CH}_3}$	-7,6(0,5)
C5-H ($\delta=1.85$)	6,4(1,0)
C4-H ($\delta=1.88$)	-4,3 (0,3)

Os ajustes no programa MSpin-RDC e a obtenção dos fatores Q foram realizados da mesma forma que para o alinhamento do gel PAN e foram utilizadas as mesmas estruturas obtidas nos cálculos de DFT. Os resultados obtidos de Q são mostrados na Figura 29.

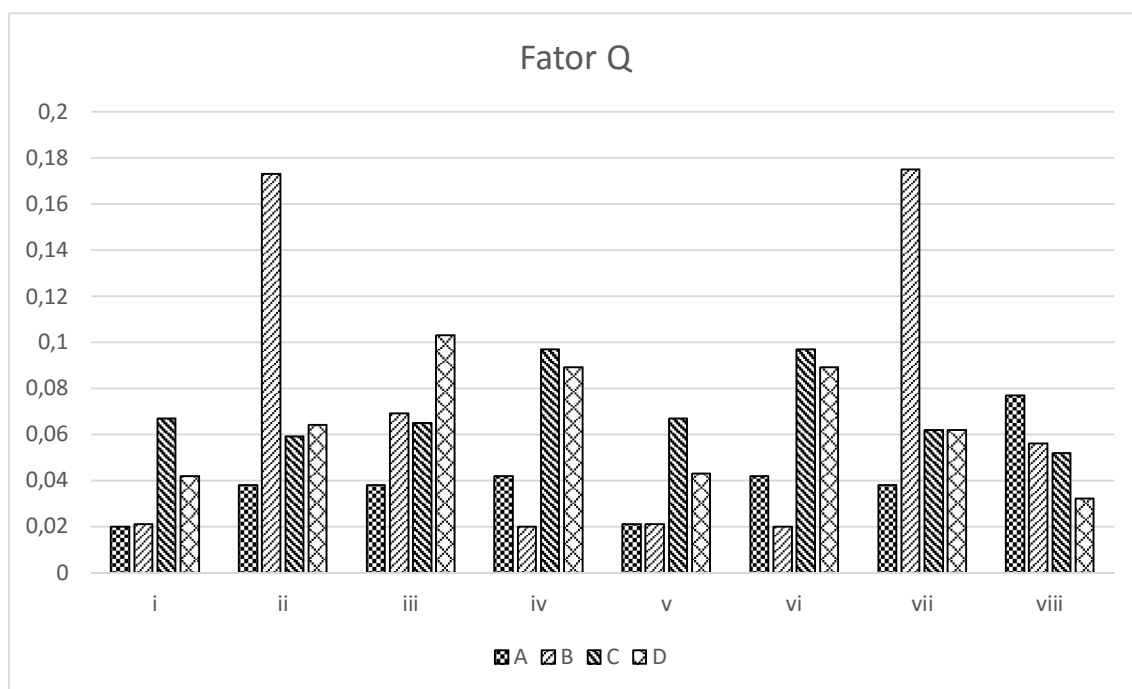


Figura 29. Fatores de qualidade Q , para o alinhamento no gel PH, dos diferentes diastereoisômeros, e para as quatro combinações dos grupos metilênicos. *O resultado para o diastereoisômero *viii* representa uma média da solução para duas conformações.

A média dos valores de Q obtidos para o alinhamento no gel PH foram menores que para o gel PAN. Isto é resultado da baixa homogeneidade do gel sintetizado, o qual dificultou a medida dos RDCs, levando a um número reduzido de dados. Observou-se também que os menores valores foram obtidos para os diastereoisômeros e combinações *i*-A=0,020, *i*-B=0,021, *iv*-B=0,020, *v*-A=0,021, *v*-B=0,021 e *vi*-B=0,020. Esta proximidade entre os valores de Q não permitiram a atribuição da configuração relativa correta e do assinalamento dos hidrogênios diastereotópicos no gel PH. A tabela completa com os valores de Q obtidos está presente nos Anexos (A5 - Tabela A7).

3.3 – MEDIDAS DE RDC E RCSA NO GEL PMMA

O alinhamento da molécula α -Santonina também foi realizado no gel PMMA a partir da adição, em um tubo Shigemi de 5 mm, de uma solução (1,3 M) em CDCl_3 . O tubo apresenta um pistão que permite a compressão do gel, e, conseqüentemente, a modificação das condições de alinhamento.

Inicialmente, foram realizados experimentos de RMN de ^1H , deste sistema, imediatamente após a adição da solução ao gel PMMA (Figura 30) e depois de

transcorrido um dia após a preparação do sistema (Figura 31). Uma das vantagens do gel PMMA em relação aos anteriores é que este gel intumescce mais rapidamente.

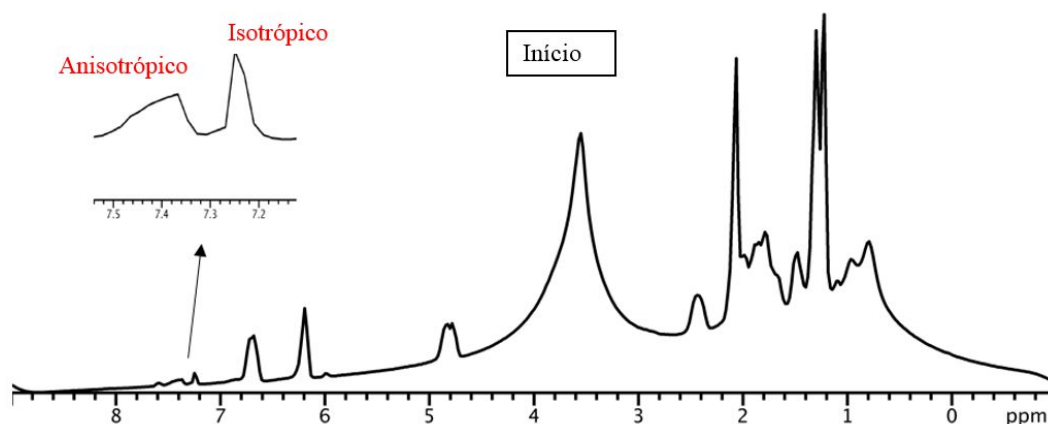


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 399,75 MHz) do composto α -Santonina alinhado no gel PMMA a 298K. A ampliação mostra o sinal do CHCl_3 . O espectro foi realizado imediatamente após a adição da solução de α -santonina ao gel PMMA.

O experimento de RMN de ^1H realizado após a preparação do sistema mostra o alargamento dos sinais de RMN gerado pela presença do gel no sistema. O bastão do gel PMMA utilizado possui um diâmetro menor que o diâmetro interno do tubo (5 mm), mesmo após o seu completo intumescimento. Assim, é possível observar os sinais de RMN de ^1H oriundos da presença da solução dentro do gel (anisotrópico) e fora do gel (isotrópico), na mesma amostra. A ampliação na Figura 30, mostra dois sinais para os hidrogênios do clorofórmio: um em 7,26ppm correspondente ao sinal no meio isotrópico e outro em 7,4ppm do meio anisotrópico, este efeito é observado também para os sinais da molécula α -Santonina.

Imediatamente após a adição da solução ao gel PMMA, praticamente a mesma quantidade da solução está na fase anisotrópica e isotrópica, isto pode ser comprovado pela integração relativa dos sinais 0,51 e 0,48, respectivamente (Figura 30).

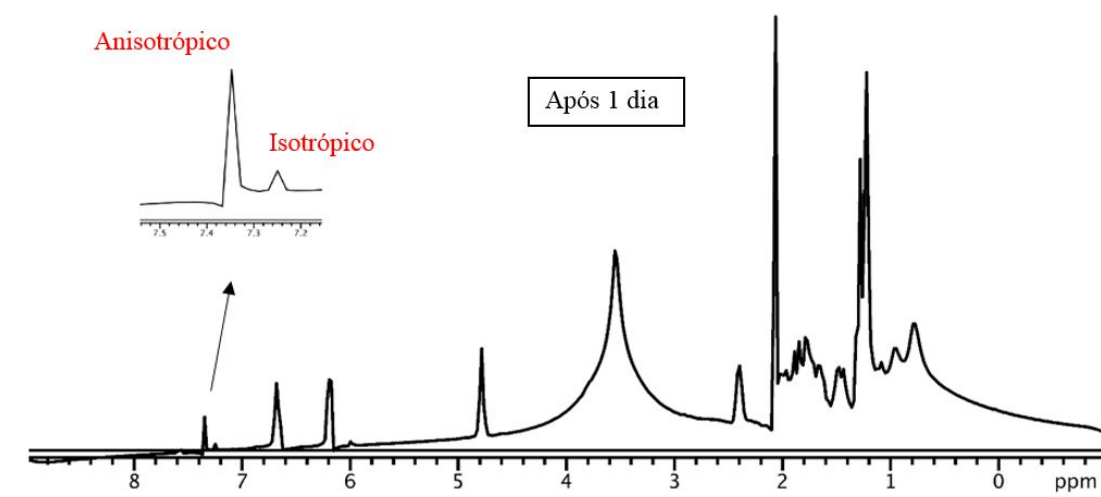


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 399,75 MHz) do composto α -Santonina alinhado no gel PMMA a 298K. A ampliação mostra o sinal do CHCl_3 . O espectro foi realizado um dia após a adição da solução de α -Santonina ao gel PMMA.

Todavia, um dia após a preparação do sistema, uma parte da solução difundiu no gel, e este atingiu o equilíbrio de intumescimento. Este efeito pode ser comprovado pelo aumento da intensidade do sinal anisotrópico do clorofórmio em relação ao isotrópico, no espectro de RMN de ^1H realizado após o equilíbrio ser atingido no sistema. A integração relativa obtida foi de 0,69 para o sinal anisotrópico e 0,31 para o sinal isotrópico, confirmando esta observação (Figura 31). Estas quantidades não modificam mais com o passar do tempo. A Figura 32 mostra o espectro de RMN de ^{13}C do sistema descrito anteriormente, após o intumescimento.

O espectro mostra a presença de sinais de ^{13}C duplicados para a molécula α -Santonina, sempre mostrando um sinal com maior intensidade e outro com menor. Assim, os sinais duplicados de ^{13}C se referem às moléculas dentro do gel PMMA, com maior intensidade, e fora do gel PMMA menos intensos, como mostrado na ampliação dos sinais (Figura 32).

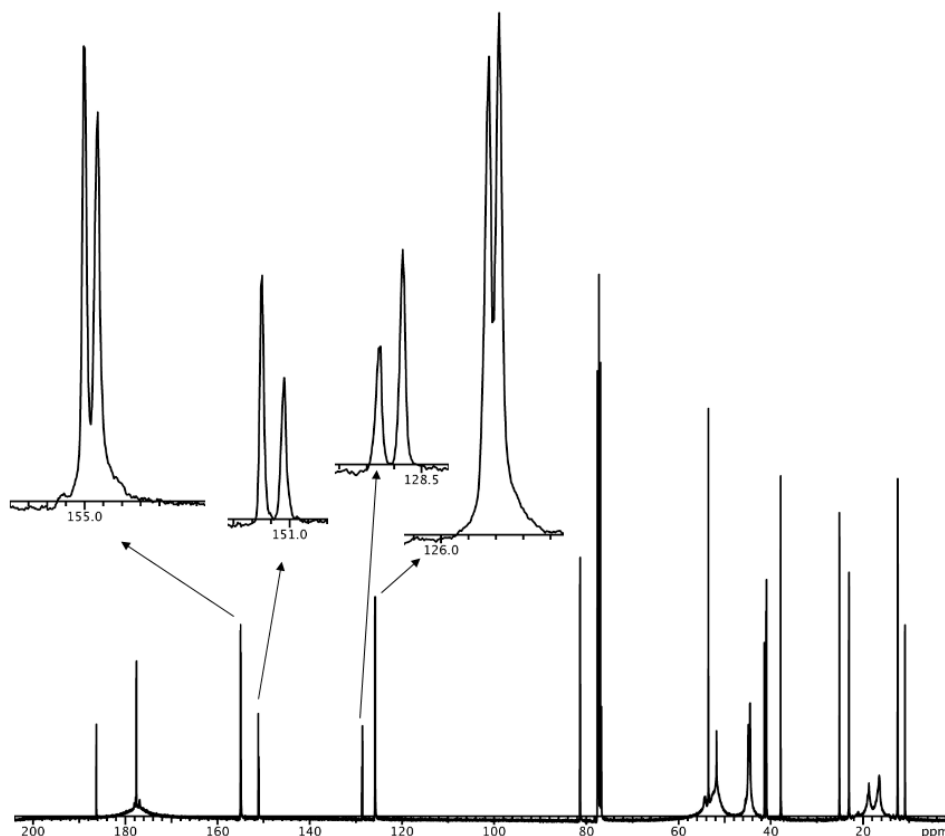


Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100,51 MHz) do composto α -Santonina alinhado no gel PMMA a 298K. O espectro mostra também a ampliação de alguns sinais, mostrando que estes apareceram duplicados com diferentes intensidades.

Para uma melhor identificação das fases isotrópica e anisotrópica presentes na amostra foram realizadas imagens de RM do sistema comprimido (Figura 33).

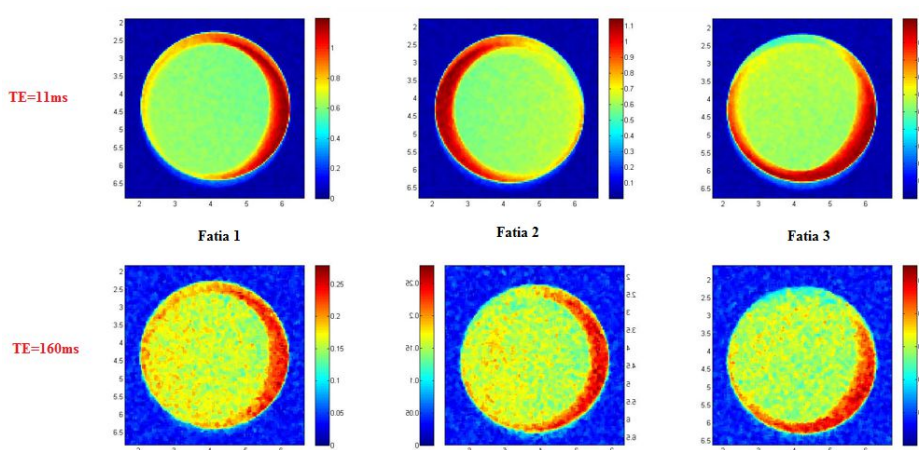


Figura 33. Microimagens de RM do gel PMMA comprimido da solução de α -Santonina. As imagens foram obtidas usando a sequência de pulsos MEMS. Foram realizadas duas sequências de experimentos com TE=11 ms e TE=160 ms. Para cada sequência foram obtidas três fatias consecutivas de 5 mm. A resolução das imagens foi de 40 μm e FOV de 10 mm.

As imagens de RM foram obtidas utilizando a sequência MEMS com dois valores para o núcleo de hidrogênio do TE (tempo de eco) (11 ms e 160 ms) e para cada um destes foram obtidas três fatias consecutivas de 5 mm. As cores nas imagens representam o contraste em termos de densidade de spins (^1H) presentes no sistema, sendo que quanto mais próximas da cor vermelha, maior é a densidade de spins, e ao contrário a menor densidade de spins é representada pelas cores próximas ao azul. As imagens que apresentaram melhor relação sinal ruído foram obtidas no experimento com TE de 11 ms (Figura 33). Nestas imagens foi possível observar duas regiões bem distintas: a primeira com coloração verde, que contém o gel, e mostrou uma menor densidade de spins, indicando um menor número de moléculas do solvente. A segunda região apresentou uma coloração vermelha, indicando uma maior densidade de spins, o qual é resultado de um número maior de moléculas do solvente.

Na Figura 33 foi possível observar que a parte mais densa está localizada: a direita na primeira fatia, a esquerda na segunda fatia e mais abaixo na terceira fatia. Isto mostra que a compressão do gel PMMA induziu uma deformação com formato ondulado, este efeito pode ser observado, nas imagens, pela mudança na posição do gel nas fatias consecutivas. A Figura 34 ilustra o formato ondulado da deformação sofrida pelo gel PMMA, onde estão estimadas as prováveis posições das três fatias.

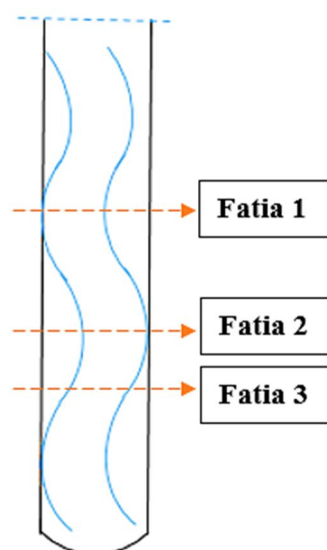


Figura 34. Forma ondulada que o gel PMMA adquire após ser comprimido dentro do tubo de RMN de 5 mm. As fatias selecionadas correspondem às imagens de RM obtidas com TE=11 ms.

Para melhor compreender a dinâmica do sistema da solução de α -Santonina/ CDCl_3 no gel PMMA comprimido, foram realizados experimentos DOSY ^1H para a medida do coeficiente de difusão, dos sinais de clorofórmio, dentro e fora do gel. Nas mesmas circunstâncias foram medidos também os tempos de relaxação longitudinal T_1 , a partir da sequência de pulsos de inversão recuperação, para os mesmos sinais (Tabela 6).

Tabela 6. Valores medidos do tempo de relaxação longitudinal T_1 do ^1H e do coeficiente de difusão, para os sinais de clorofórmio dentro e fora do PMMA, da amostra com o gel comprimido.

Sinal do CHCl_3	Tempo de relaxação T_1 (s)	Coeficiente de difusão* ($10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$)
Dentro do PMMA	5,7	7
Fora do PMMA	7,8	15

*valores relativos

Os valores obtidos para o tempo de relaxação T_1 mostram que as moléculas relaxam mais rapidamente no interior do gel. Isto é esperado já que dentro do gel o tempo de correlação molecular é maior, levando a uma relaxação mais rápida⁸⁷.

Os valores obtidos para o coeficiente de difusão (Tabela 6) mostram que as moléculas do clorofórmio difundem mais lentamente dentro do gel. Este comportamento também é esperado, já que dentro do gel ocorre um maior confinamento das moléculas nas cavidades do gel.

Estas observações corroboram a atribuição dos sinais de clorofórmio isotrópico e anisotrópico realizadas anteriormente.

3.3.1 – OBTENÇÃO DOS VALORES EXPERIMENTAIS DE RDC E RCSA NO GEL PMMA

Para a obtenção dos valores de RDCs e RCSAs, da molécula α -Santonina alinhada no gel PMMA em CDCl_3 , foram realizados experimentos de RMN, aplicados a mesma amostra, com dois graus de alinhamento distintos, uma para o gel relaxado (sem compressão) e outro para o gel comprimido. Esta variação no grau de alinhamento foi possível a partir da compressão do gel com a ajuda de um pistão no tubo Shigemi. Para confirmar que houve variação no grau de alinhamento, foram realizados experimentos de RMN de ^2H como mostrado na Figura 35.

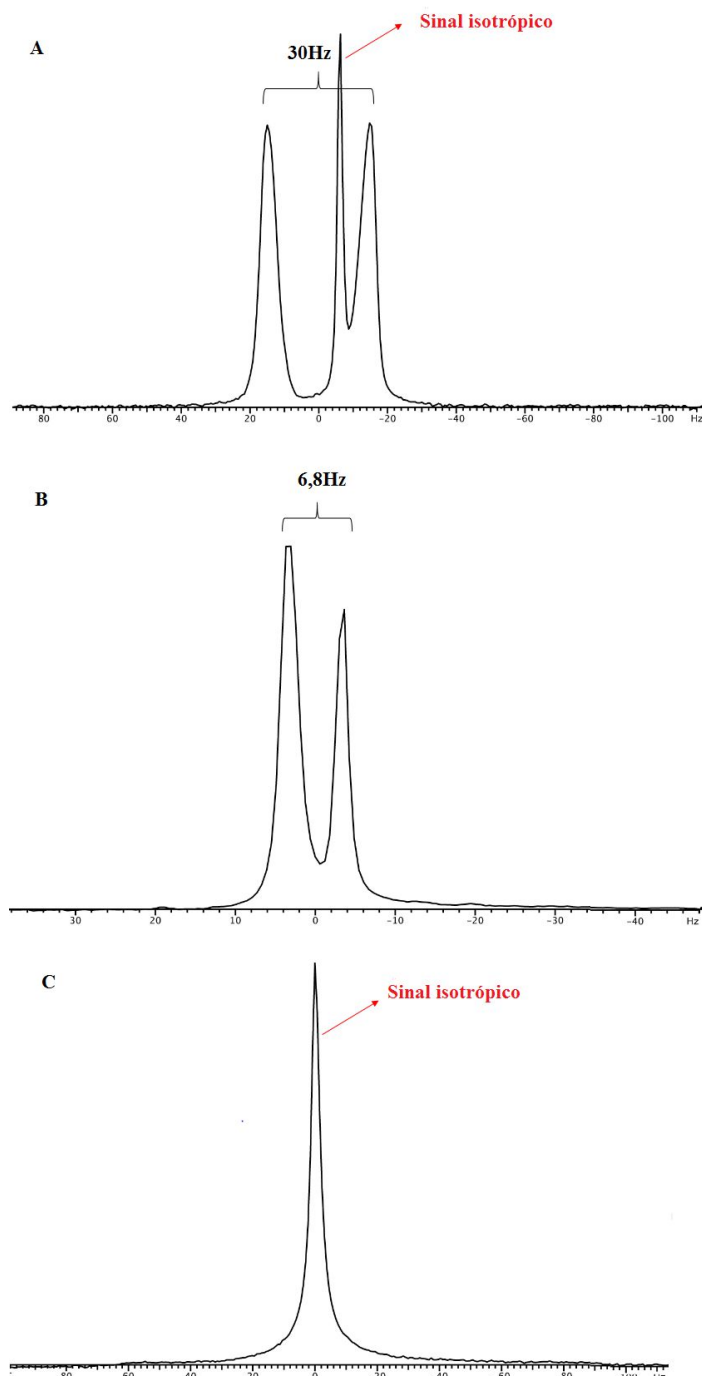


Figura 35. Espectro de RMN de ^2H (CDCl_3 , 61,36 MHz) da solução de α -Santonina a 298K: (A) espectro com o gel PMMA comprimido; (B) espectro como o gel PMMA relaxado; (C) espectro sem o gel PMMA (isotrópico).

A Figura 35 mostra que para o espectro sem o gel PMMA (isotrópico), apenas um sinal de ^2H é observado (Figura 35, C). Porém, quando são realizados experimentos com a presença do gel, ocorre uma separação dos sinais de deutério devido ao aparecimento do acoplamento quadrupolar, induzido pelo ambiente anisotrópico gerado pelo gel PMMA. Para o gel relaxado, a separação dos sinais de ^2H é de 6,8 Hz, onde é possível

observar a sobreposição dos sinais alinhados (dentro do gel) e o sinal isotrópico, que ainda se encontra presente (Figura 35, B). Quando é realizada a compressão do sistema é possível observar uma nova condição de alinhamento, na qual a separação dos sinais de ^2H foi de 30 Hz. Nesta condição, o sinal isotrópico não se encontra sobreposto aos anisotrópicos (Figura 35, A).

Os valores de RDCs e RCSAs foram obtidos a partir da realização de experimentos de RMN nestas duas condições de alinhamento. Ao obter os valores de RDCs comparando estas duas condições de alinhamento os RDCs foram denominados de ΔRDCs . Para as medidas de ΔRDCs foram realizados experimentos de RMN gHSQC ^1H - ^{13}C acoplado em *F1* como mostrado na Figura 36. Este experimento é diferente dos experimentos utilizados para a obtenção dos valores de RDCs realizados anteriormente para os géis PAN e PH (gHSQC acoplados em *F2*).

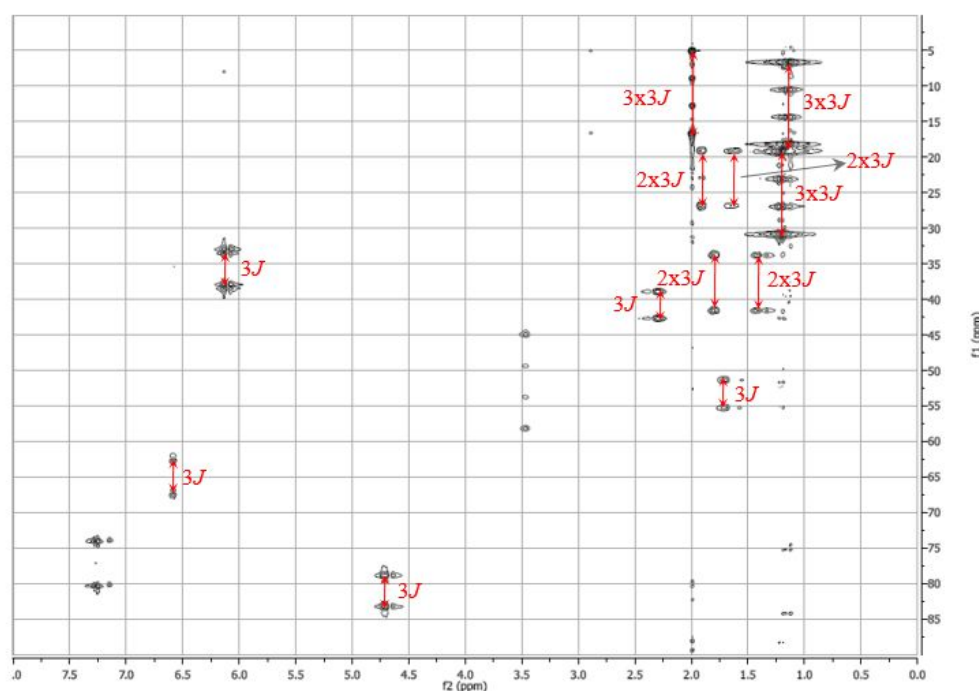


Figura 36. Espectro de RMN gHSQC ^1H - ^{13}C acoplado em *F1* com pulso adiabático da α -Santonina alinhado no gel PMMA (CDCl_3 , 399,75 MHz) a 298K. O espectro foi realizado com uma evolução em *J* de $k=3$ e rebatido.

Conforme descrito na introdução, o espectro gHSQC acoplado em *F1* permite a medida mais precisa das constantes de acoplamento para sistemas de spins com acoplamento forte, como é o caso da molécula α -Santonina. Porém, estes experimentos apresentam uma baixa resolução digital, que pode ser minimizada pela diminuição da janela espectral em *F1*. A Figura 36 mostra um exemplo em que a janela espectral foi

reduzida de 170ppm para uma janela de apenas 90ppm em $F1$, isto fez com que os sinais mais desblindados fossem reatados.

Os experimentos acoplados em $F1$ permitem ainda que seja implementado na sequência de pulsos um tempo de evolução J , ou seja, todas as constantes de acoplamento serão multiplicadas por um fator k . Esta multiplicação faz com que os erros nas medidas das constantes de acoplamento sejam minimizados. A Figura 36 ilustra um espectro adquirido com um valor de $k=3$.

Neste tipo de experimento os grupos CH aparecem como um duplete com acoplamento J multiplicado pelo $k=3$ (Figura 36, sinais indicados com $3J$). Os grupos CH_2 aparecem como tripleto, porém os sinais centrais estão sobrepostos e com fases contrárias, e, portanto, podem ser cancelados, sendo que o cancelamento será completo para grupos CH_2 homotópicos. Neste caso, a constante medida será o dobro da constante de acoplamento J , multiplicado ainda pelo fator k . Para grupos CH_2 diastereotópicos o cancelamento não será completo e a constante medida equivalerá a aproximadamente o dobro de J , multiplicado ainda pelo fator k (Figura 36, sinais indicados com $2 \times 3J$). Os grupos CH_3 aparecem como um quarteto e suas constantes de acoplamento medidas são o triplo de J , ainda multiplicadas pelo fator k (Figura 36, sinais indicados com $3 \times 3J$).

No caso da α -Santonina os grupos CH_2 são diastereotópicos, e, portanto, só foi possível a medida da média das constantes de acoplamento individuais no espectro da Figura 36. Assim, os valores das constantes de acoplamento C-H mostrados na Tabela 7, para estes hidrogênios, foram previstos utilizando os outros valores de RDCs, medidos experimentalmente, para o cálculo do tensor de alinhamento.

A Tabela 7 mostra os $\Delta RDCs$ medidos experimentalmente e previstos para o alinhamento no gel PMMA, extraídos do experimento gHSQC acoplado em $F1$ e descrito acima.

Tabela 7. Δ RDCs medidos experimentalmente, para o alinhamento no gel PMMA.

Pares C-H	Valores de Δ RDCs (Hz)
C6-H6	-0,29
C7-H7	10,41
C3- <u>C</u> H ₃ -C3- <u>C</u> H ₃	-1,21
C9- <u>C</u> H ₃ -C9- <u>C</u> H ₃	0,50
C5a- <u>C</u> H ₃ -C5a- <u>C</u> H ₃	2,37
C3-H3	-13,71
C3a-H3a	-14,82
C9b-H9b	-16,49
C5-H ($\delta=1,85$) (previsto)	-3,18
C5-H ($\delta=1,32$) (previsto)	-14,88
C4-H ($\delta=1,70$) (previsto)	-15,14
C4-H ($\delta=1,88$) (previsto)	5,44

A Tabela 7 mostra um total de doze valores de Δ RDCs para o alinhamento no gel PMMA, sendo oito medidos experimentalmente e quatro previstos. Os valores de Δ RDCs variaram entre -16,49 a +10,41 Hz.

Os ajustes no programa MSpin-RDC e a obtenção dos fatores Q foram realizados da mesma forma que para o alinhamento do gel PAN e PH, porém o erro no cálculo foi realizado sem o procedimento do *bootstrapping*. Foram utilizadas as mesmas estruturas obtidas nos cálculos de DFT para o gel PAN e PH. Os resultados obtidos de Q são mostrados na Figura 37.

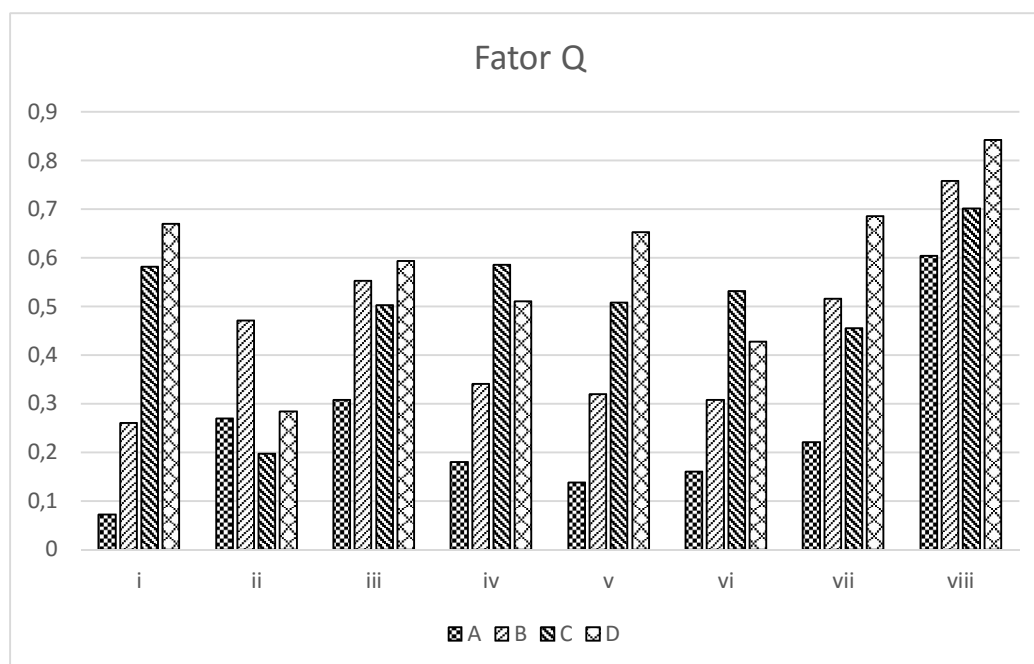


Figura 37. Fatores de qualidade Q , para o alinhamento no gel PMMA, dos diferentes diastereoisômeros, para as quatro combinações dos grupos metilênicos. *O resultado para o diastereoisômero *viii* representa uma média da solução para duas conformações.

O menor valor de Q obtido foi para o diastereoisômero *i* com as combinações *i*-A=0,072. Este resultado permite uma atribuição de forma inequívoca da correta configuração relativa da molécula α -Santonina, e da atribuição dos seus hidrogênios diastereotópicos.

Para estimar a influência do erro nos cálculos de Q foram realizados, posteriormente, o mesmo cálculo com a utilização do procedimento de *bootstrapping* com $N=256$ distribuições. Os erros nas medidas dos Δ RDCs experimentais não foram estimados individualmente, como no caso do alinhamento nos géis PAN e PH, mas foram realizados coletivamente, e superestimados como aproximadamente 10% do maior valor de Δ RDC (erro de 1,5Hz). Os valores de Q obtidos são mostrados na Figura 38.

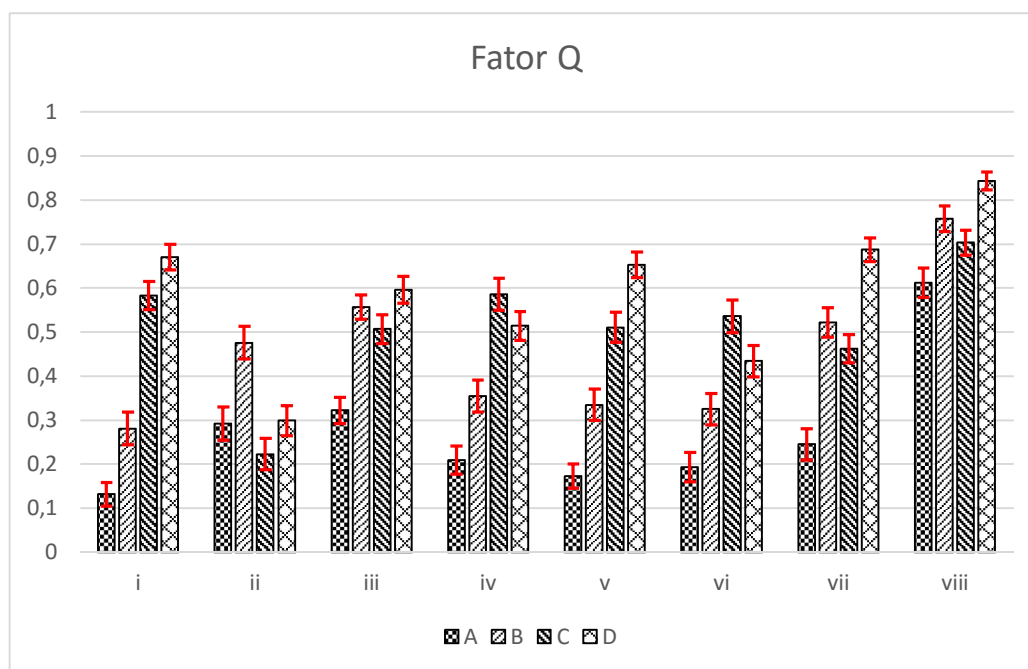


Figura 38. Fatores de qualidade Q , para o alinhamento no gel PMMA, dos diferentes diastereoisômeros, para as quatro combinações dos grupos metilênicos. A barra de erros mostra o desvio padrão dos valores de Q obtidos a partir do procedimento de *bootstrapping* com $N=256$ distribuições. *O resultado para o diastereoisômero *viii* representa uma média da solução para duas conformações.

O menor valor de Q obtido foi para o diastereoisômero *i* com as combinações *i*-A=0,132±0,027. Este resultado, mesmo levando em conta uma distribuição dos erros, também permite uma atribuição de forma inequívoca da configuração relativa correta da molécula α -santonina, e da atribuição dos seus hidrogênios diastereotópicos.

Para as medidas dos valores de RCSAs no gel PMMA foram realizadas medidas do deslocamento químico de cada carbono no espectro de RMN de ^{13}C nas duas condições de alinhamento descritas acima. Foram comparados os deslocamentos químicos dos sinais anisotrópicos nas condições de alinhamento com o gel relaxado e comprimido. Os valores de RCSAs medidos experimentalmente são mostrados na Tabela 8. A referência interna para as medidas dos RCSAs experimentais foi a metila C3-CH₃, este sinal foi escolhido por apresentar a menor CSA calculada teoricamente. Nestas condições, onde utiliza-se um núcleo de referência, as medidas de RCSAs para um núcleo *i* é denominada de ΔRCSA_i . A Tabela 8 mostra também valores de ΔRCSA_i previstos a partir do cálculo do tensor de alinhamento usando somente os valores de ΔRDC s mostrados na Tabela 7.

Tabela 8. $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ medidos experimentalmente, para o alinhamento no gel PMMA e $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ previstos a partir do cálculo do tensor de alinhamento utilizando apenas os ΔRDCs e tendo como *input* a estrutura da α -Santonina (diastereoisômero *i*).

Carbono	Valores de $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ experimentais (ppm)	Valores de $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ previstos usando os valores de ΔRDCs (ppm)
C8	-0,05	-0,02
C2	-0,05	-0,02
C6	-0,02	-0,02
C9a	-0,04	-0,03
C9	-0,05	-0,02
C7	-0,04	-0,02
C9b	0,01	0,00
C3a	0,01	0,01
C5a	0,01	0,000
C5	0,00	0,01
C4	0,01	0,000

* O carbono da metila C3- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ foi usado como sinal de referência para a sobreposição dos espectros de ^{13}C , nos dois meios de alinhamento.

Foram medidos um total de onze $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ com valores que variam de -0,05 a +0,01ppm. Ao comparar os valores de $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ experimentais e os valores de $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ previstos usando os valores de ΔRDCs para o cálculo do tensor de alinhamento, observa-se que os valores previstos são de menor intensidade, mas não apresentam sinais contrários (Tabela 8). Este resultado mostra que o tensor de alinhamento obtido através dos valores de $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ mostra a mesma orientação espacial que o tensor de alinhamento obtido a partir dos valores de ΔRDCs , mas com intensidades diferentes.

Em seguida, os valores de $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ experimentais (Tabela 8) foram usados para o ajuste no programa MSpin-RDC para a obtenção dos fatores Q como mostrado na Figura 39. As estruturas dos oito diastereoisômeros obtidas a partir de cálculos DFT foram submetidas a cálculos de RMN GIAO com o método PBE0/pcS-1. Estes cálculos permitiram a obtenção das anisotropias do deslocamento químico para cada estrutura, os quais foram usados como *input* para o cálculo dos fatores Q .

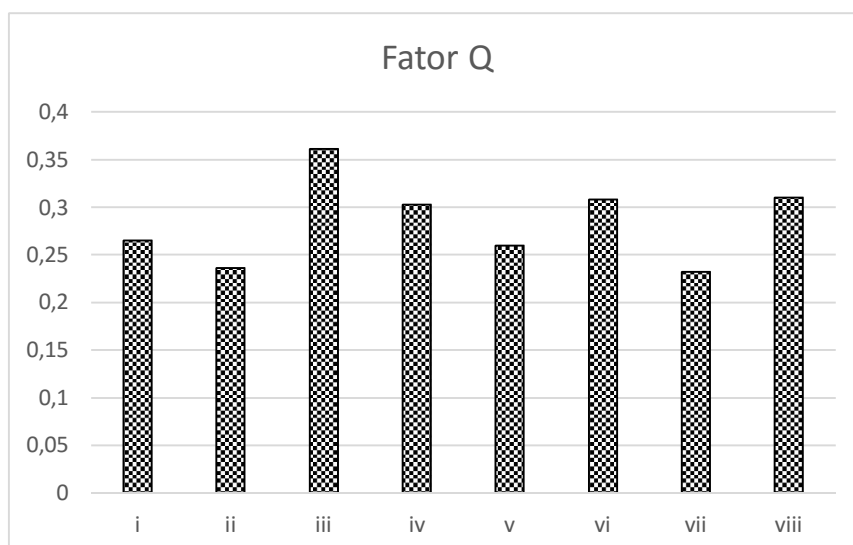


Figura 39. Fatores de qualidade Q , para o alinhamento no gel PMMA, dos diferentes diastereoisômeros usando apenas os valores de $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ mostrados na Tabela 8. *O resultado para o diastereoisômero **viii** representa uma média da solução para duas conformações.

Os menores valores de Q foram obtidos para os diastereoisômeros **ii** ($Q=0,236$) e **vii** ($Q=0,323$). Estes resultados mostram que ao realizar o ajuste apenas com os valores de $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ não é possível determinar a correta atribuição da configuração relativa da α -Santonina. Dois fatores podem estar relacionados com a impossibilidade de atribuir a configuração relativa da α -Santonina, o primeiro é a mudança da concentração das fases isotrópica e anisotrópica quando o gel é comprimido. Isto pode estar ocasionando variações nos valores dos $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$. O segundo poderia ser relacionado a influência do método de química quântica utilizado no cálculo das anisotropias do deslocamento químico que podem estar modificando os valores de Q . Ambos fatores serão investigados mais adiante.

A Figura 40 mostra os valores de Q obtidos quando foram utilizados os valores de ΔRDCs e $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ combinados para o cálculo do tensor de alinhamento. Os ΔRDCs e $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ foram utilizados com o mesmo peso no cálculo de Q .

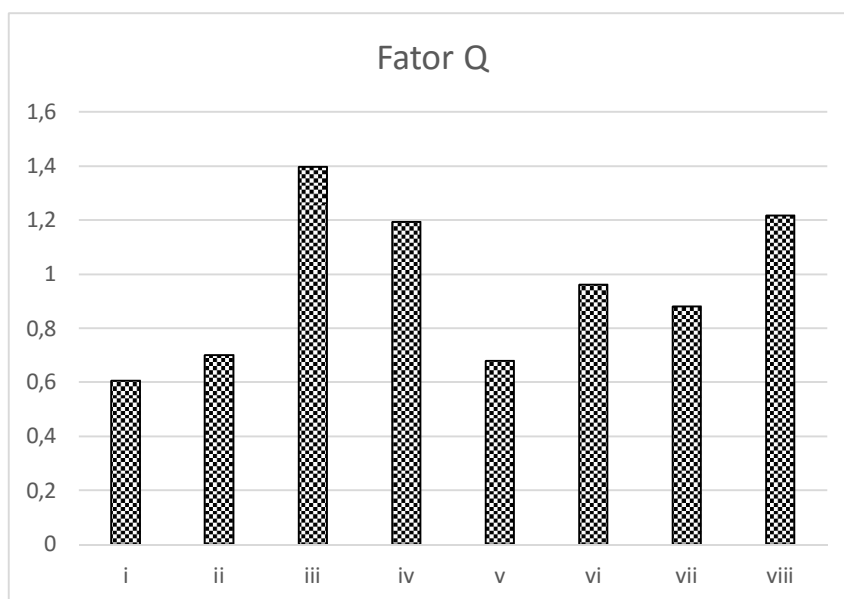


Figura 40. Fatores de qualidade Q , para o alinhamento no gel PMMA, dos diferentes diastereoisômeros usando os valores de $\Delta RDCs + \Delta \Delta RCSA_i$. *O resultado para o diastereoisômero **viii** representa uma média da solução para duas conformações.

O menor valor de Q foi obtido para o diastereoisômero **i** ($Q=0,606$). Este resultado mostra que a combinação dos $\Delta RDCs$ e $\Delta \Delta RCSA_i$ para o cálculo de Q permitem a atribuição inequívoca da configuração relativa da α -Santonina. Porém, os valores de Q obtidos são muito intensos, indicando que o ajuste realizado não é o ideal.

Para confirmar a atribuição da configuração relativa, e dos hidrogênios diastereotópicos realizados para a α -Santonina, foi realizada a mesma atribuição baseada nas análises dos parâmetros tradicionais de RMN (Acoplamento escalar e NOE (ANEXOS - A2 e A3)), e as duas metodologias de atribuição estão em concordância.

3.3.2 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA FASE ISOTRÓPICA NAS MEDIDAS DE $\Delta \Delta RCSAS$

As duas condições de alinhamento obtidas a partir do gel PMMA em $CDCl_3$ podem ser denominadas de máximo para o gel comprimido e mínimo para o gel relaxado. Estas duas condições de alinhamento podem ser representadas por dois tensores de alinhamento \hat{A}^{max} e \hat{A}^{min} . No trabalho de Hallwass *et. al.*⁴² foram medidos os RCSAs de cada núcleo i a partir da diferença do seu deslocamento químico (δ_i) em relação a um núcleo de referência (δ_{ref}). Este núcleo de referência foi escolhido a partir do núcleo que apresentou a menor CSA calculada teoricamente. Consequentemente, o valor de

$\Delta\Delta RCSA_i$ pôde ser medido a partir da diferença do deslocamento químico do núcleo i , nas duas condições de alinhamento $[(\delta_i^{aniso})^{max}, (\delta_i^{aniso})^{min}]$ referenciada pelo deslocamento químico do núcleo de referência $[(\delta_{ref}^{aniso})^{max}, (\delta_{ref}^{aniso})^{min}]$. Todavia, de acordo com a Equação 27, o que foi medido foram efetivamente os valores de $\Delta\Delta\delta_i$ de cada núcleo.

$$\Delta\Delta\delta_i = (\delta_i - \delta_{ref})^{max} - (\delta_i - \delta_{ref})^{min} = \Delta\Delta RCSA_i + \Delta\Delta\delta_i^{solv} \quad (27)$$

O termo $\Delta\Delta\delta_i^{solv}$ corresponde à variação do deslocamento químico do núcleo i devido a variações na composição do gel entre o estados de compressão mínimo e máximo. O dispositivo de estiramento utilizado por Hallwass *et. al.* para mudar a condição de alinhamento, não modificava a concentração relativa da molécula dissolvida na fase isotrópica e anisotrópica quando o estiramento era realizado, e, consequentemente o termo $\Delta\Delta\delta_i^{solv}$ é nulo.

Desta forma, os valores de $\Delta\Delta RCSA_i$ são simplificados como mostrado na Equação 28.

$$\Delta\Delta RCSA_i = \Delta\Delta\delta_i \quad (28)$$

Entretanto, Griesinger e colaboradores⁸⁸, utilizando o gel PMMA e um dispositivo de alinhamento *New Era Enterprise*, similar ao utilizado neste trabalho, perceberam através da integração dos sinais de RMN de ^{13}C nas fases isotrópica e anisotrópica uma variação, dependente do grau de compressão, na relação molar gel/solvente. A diferença no ambiente de solvatação entre distintos graus de compressão pode resultar em uma mudança no deslocamento químico de RMN de ^{13}C . Portanto, a contribuição isotrópica $\Delta\Delta\delta_i^{solv} \neq 0$ e não pode ser desprezada. Esta contribuição do meio de solvatação $\Delta\Delta\delta_i^{solv}$ afeta cada núcleo individualmente e é difícil de ser predita.

A contribuição devida às variações na composição gel/solvente entre os estados de compressão pode ser estimada a partir da variação do deslocamento químico entre os

sinais na fase de solvente isotrópico que fica ao redor do gel e os sinais correspondentes à molécula no gel no seu estado de compressão mínima. Seguindo uma proposta de Griesinger e colaboradores o termo $\Delta\Delta\delta_i^{solv}$ seria diretamente proporcional à diferença de deslocamento químico $\Delta\Delta\delta_i^{solv(min)}$ observada entre a faixa isotrópica e o gel no seu estado de mínima compressão Equação 29.

$$\Delta\Delta\delta_i^{solv(min)} = ((\delta_i^{aniso})^{min} - \delta_i^{iso}) - ((\delta_{ref}^{aniso})^{min} - \delta_{ref}^{iso}) \quad (29)$$

E, portanto $\Delta\Delta\delta_i^{solv} = c * \Delta\Delta\delta_i^{solv(min)}$.

Substituindo na Equação 27, tem-se

$$\Delta\Delta RCSA_i = \Delta\Delta\delta_i - c * \Delta\Delta\delta_i^{solv(min)} \quad (30)$$

Os valores de $\Delta\Delta\delta_i^{solv(min)}$ são experimentalmente conhecidos e o valor ótimo de c é determinado mediante um ajuste de mínimos quadrados minimizando o valor do fator de qualidade Q . O tensor de alinhamento é otimizado mediante SVD em cada passo do processo de otimização. Este algoritmo foi implementado no programa MSpin-RDC pelo seu autor o Dr. Navarro-Vázquez. Onde os valores de $\Delta\Delta\delta_i^{solv(min)}$ são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores de $\Delta\Delta\delta_i$ medidos experimentalmente, para o alinhamento da α -Santonina no gel PMMA e valores de $\Delta\Delta\delta_i^{solv(min)}$ medidos nos mesmos espectros.

Carbono	Valores de $\Delta\Delta\delta_i$ experimentais (ppm)	$\Delta\Delta\delta_i^{solv(min)}$ medidos (ppm)
C8	-0,05	-0,04
C2	-0,05	0
C6	-0,02	0,07
C9a	-0,04	0,12
C9	-0,05	-0,08
C7	-0,04	-0,04
C9b	0,01	-0,03
C3a	0,01	0
C5a	0,01	0,03
C5	0,00	0
C4	0,01	0,02

A Figura 41 mostra os valores de Q obtidos para o cálculo utilizando somente os valores de $\Delta\Delta\delta_i$ experimentais com as correções posteriores, onde o valor ótimo de c foi 0,150.

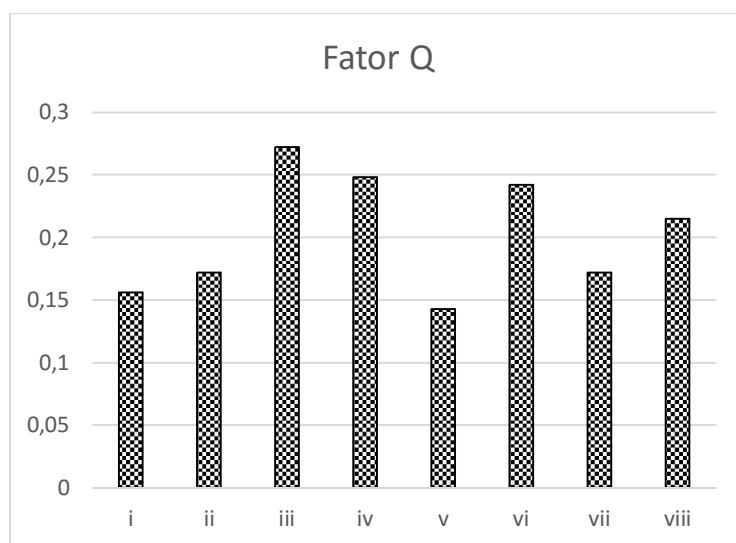


Figura 41. Fatores de qualidade Q , para o alinhamento no gel PMMA, dos diferentes diastereoisômeros usando apenas os valores de $\Delta\Delta\delta_i$ experimentais. Estes resultados de Q foram obtidos com as correções posteriores. *O resultado para o diastereoisômero *viii* representa uma média da solução para duas conformações.

Os valores de Q obtidos foram menores que os valores obtidos anteriormente sem as correções (Figura 39), mostrando que houve uma melhora no ajuste. Porém, as correções não permitiram a atribuição inequívoca da configuração relativa da α -Santonina.

A Figura 42 mostra os valores de Q obtidos para o cálculo utilizando os valores de $\Delta RDCs$ e $\Delta\Delta\delta_i$ experimentais combinados, e implementando as correções posteriores para os valores de $\Delta\Delta\delta_i$, onde o valor ótimo de c foi 0.

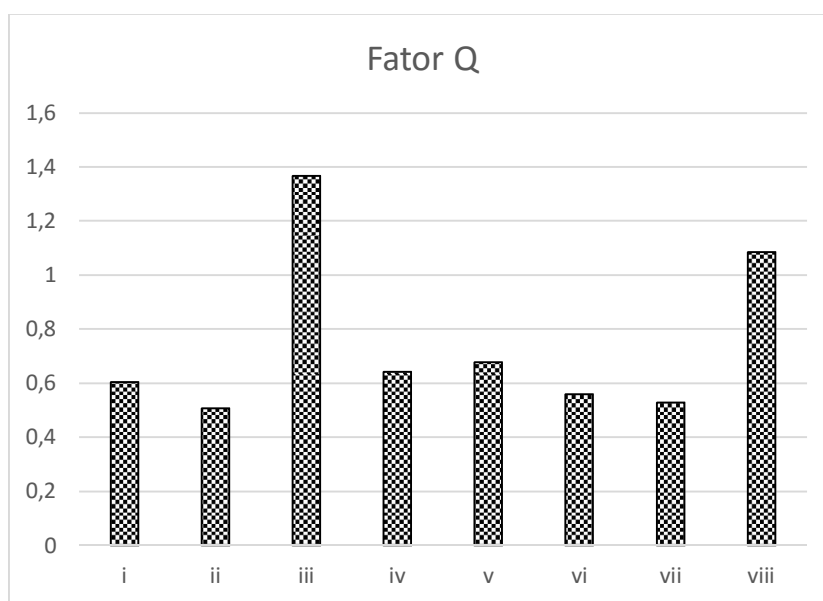


Figura 42. Fatores de qualidade Q , para o alinhamento no gel PMMA, dos diferentes diastereoisômeros usando os valores de $\Delta RDCs + \Delta\Delta\delta_i$. Estes resultados de Q foram obtidos com as correções posteriores. *O resultado para o diastereoisômero **viii** representa uma média da solução para duas conformações.

Os valores de Q obtidos foram da mesma ordem que os valores obtidos anteriormente sem as correções (Figura 40), mostrando que não houve uma melhora no ajuste. Sendo que as correções não permitiram a atribuição inequívoca da configuração relativa da α -Santonina.

Pode-se concluir que as correções posteriores implementadas aos resultados de $\Delta RCSA_i$ medidos no alinhamento da α -Santonina no gel PMMA embora forneçam fatores Q menores não permitiram uma melhor discriminação entre as estruturas. Isto mostra que é necessário aprofundar o conhecimento sobre a influência do meio de solvatação nas medidas dos $\Delta RCSA_i$ realizando estudos em um maior número de sistemas moleculares.

3.4 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES MÉTODOS DE QUÍMICA QUÂNTICA NOS RESULTADOS DE RDC

A geração de informações estruturais, a partir das medidas experimentais de RDC e/ou RCSAs, seguida do cálculo para determinar o tensor de alinhamento se utiliza de informações da geometria das moléculas otimizadas (comprimentos das ligações e ângulos entre as ligações), como mostra o procedimento geral na Figura 7. A escolha do método de química quântica utilizado para otimizar a geometria das moléculas pode fornecer variações entre os valores de comprimentos de ligação e ângulos entre estas ligações, e portanto podem modificar os valores que compõem a matriz \hat{M} (Equação 24). A modificação destes valores afeta a determinação do tensor de alinhamento, e consequentemente, os valores calculados para os RDCs, os quais irão também afetar o fator de qualidade Q obtido.

Para determinar a influência do método de química quântica, utilizado para a otimização da geometria, em relação ao fator de qualidade Q obtido, foram realizados cálculos de otimização da geometria, para a configuração relativa correta da molécula α -Santonina **i**, com diferentes métodos implementados no programa Gaussian. Na Tabela 1 estão descritos os métodos utilizados, sendo um total de vinte e quatro cálculos *ab-initio*, incluindo o método DFT B3LYP/6-31G* (Tabela 1, entrada 1), considerado como de referência. Deste total foram realizados vinte cálculos da classe DFT e quatro da classe Hartree-Fock. Além disto, foram realizados quatro cálculos da classe Semi-empírico.

Para realizar uma avaliação em termos de comprimentos e ângulos das ligações, as estruturas obtidas a partir dos cálculos foram sobrepostas, uma a uma, ao método definido como de referência. As diferenças entre as estruturas foram estimadas em termos do cálculo dos mínimos quadrados, a partir do valor do desvio quadrático médio (DQM). Quanto mais próximo de zero for este valor, maior a similaridade das estruturas entre si.

A Figura 43 mostra os valores médios do DQM obtidos para cada classe de métodos de química quântica, e a barra de erros descreve o desvio padrão medido para cada classe individualmente.

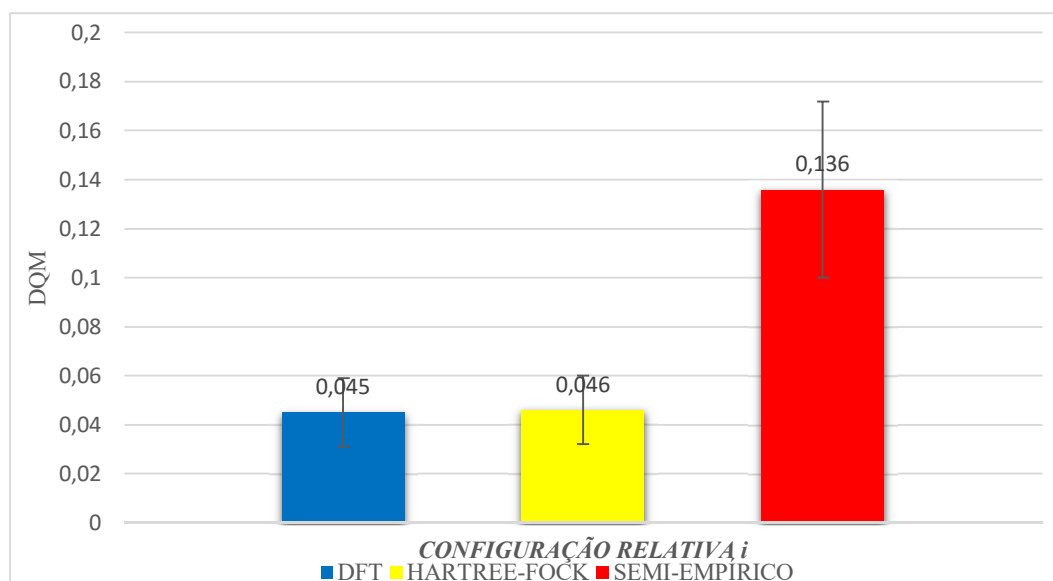


Figura 43. Gráfico dos valores do DQM obtidos pela sobreposição das estruturas, para a configuração relativa *i* da molécula α -Santonina, obtida pelo método de referência, e as estruturas obtidas por outros métodos de química quântica. Em azul é mostrado o valor médio de DQM obtido para os 19 cálculos DFT. Em amarelo é mostrado o valor médio de DQM obtido para os 4 cálculos Hartree-Fock. Em vermelho é mostrado o valor médio do DQM obtido para os 4 cálculos Semi-empírico. A barra de erros mostra o valor do desvio padrão para cada classe de métodos.

Os cálculos da classe DFT (em azul) mostraram um valor médio do DQM de 0,045 e um desvio padrão de 0,014. Semelhantemente, os cálculos da classe Hartree-Fock (em amarelo) mostraram um valor médio do DQM de 0,046 e um desvio padrão de 0,014.

Os valores pequenos de DQM e do desvio padrão mostram que os cálculos *ab-initio* apresentaram grande similaridade entre as geometrias otimizadas, em relação ao método de referência. Isto pode ser confirmado pela sobreposição das estruturas obtidas pelos cálculos da classe DFT (Figura 44) e Hartree-Fock (Figura 45).

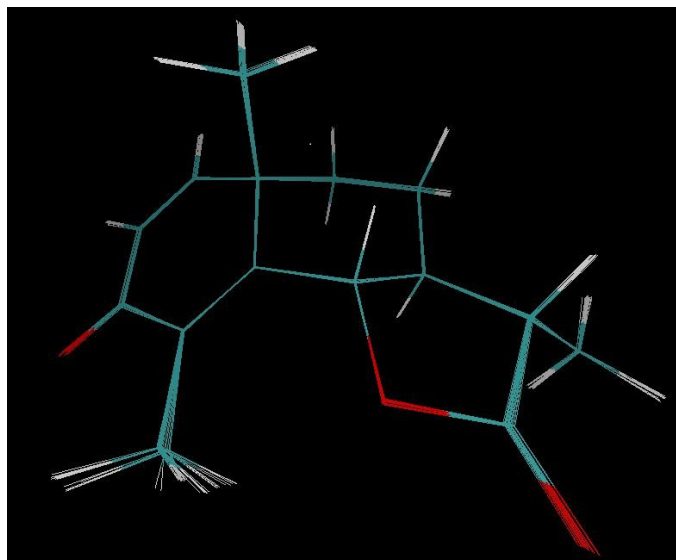


Figura 44. Sobreposição das estruturas da configuração relativa *i*, da molécula α -Santonina, otimizadas a partir de cálculos de química quântica utilizando o método DFT, com diferentes combinações de funcionais e bases.

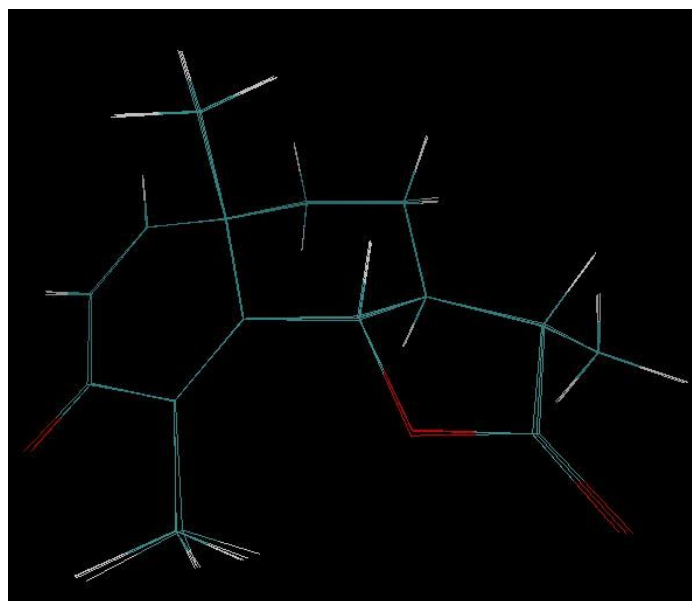


Figura 45. Sobreposição das estruturas da configuração relativa *i*, da molécula α -Santonina, otimizadas a partir de cálculos de química quântica utilizando o método Hartree-Fock, com diferentes combinações de funcionais e bases.

As estruturas obtidas a partir de cálculos das classes DFT e Hartree-Fock sobrepostas ao método de referência mostraram mudanças pequenas entre os ângulos de ligação dos anéis e comprimentos das ligações. As mudanças mais significativas foram observadas na disposição espacial dos três grupos metila. Portanto, espera-se que esta variação não afete significativamente os valores de Q , os quais devem apresentar uma maior similaridade entre estas duas classes de métodos.

Porém, os cálculos da classe Semi-empírico (em vermelho) mostraram um valor médio do DQM de 0,136 e um desvio padrão de 0,036 (Figura 43). Estes valores médios elevados de DQM e do desvio padrão mostram que estes cálculos apresentam uma menor similaridade entre as geometrias obtidas em relação ao método de referência. Isto pode ser confirmado pela sobreposição das estruturas obtidas a partir dos cálculos da classe de métodos Semi-empírico (Figura 46).

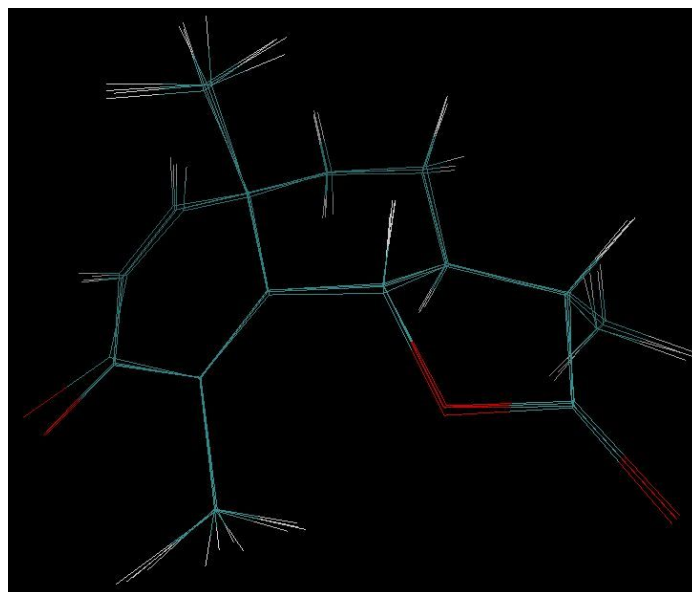


Figura 46. Sobreposição das estruturas da configuração relativa *i*, da molécula α -Santonina, otimizadas a partir de cálculos de química quântica utilizando o método Semi-empírico, com diferentes combinações de funcionais e bases.

As estruturas obtidas a partir de cálculos da classe de métodos Semi-empírico sobrepostas ao método de referência mostraram mudanças significativas entre os ângulos e comprimentos das ligações. Portanto, espera-se uma maior divergência entre os valores de Q comparados aos valores obtidos pelos métodos das classes *ab-initio*.

A próxima etapa foi a utilização de todas as estruturas obtidas para realização dos cálculos do fator Q . Foram realizados cálculos de Q utilizando os mesmos parâmetros e aproximações que o cálculo realizado para o gel PAN. Os resultados são mostrados na Figura 47. Em relação ao cálculo definido como de referência, os valores de Q não sofreram variação significativa, com exceção de três dos cálculos Semi-empírico.

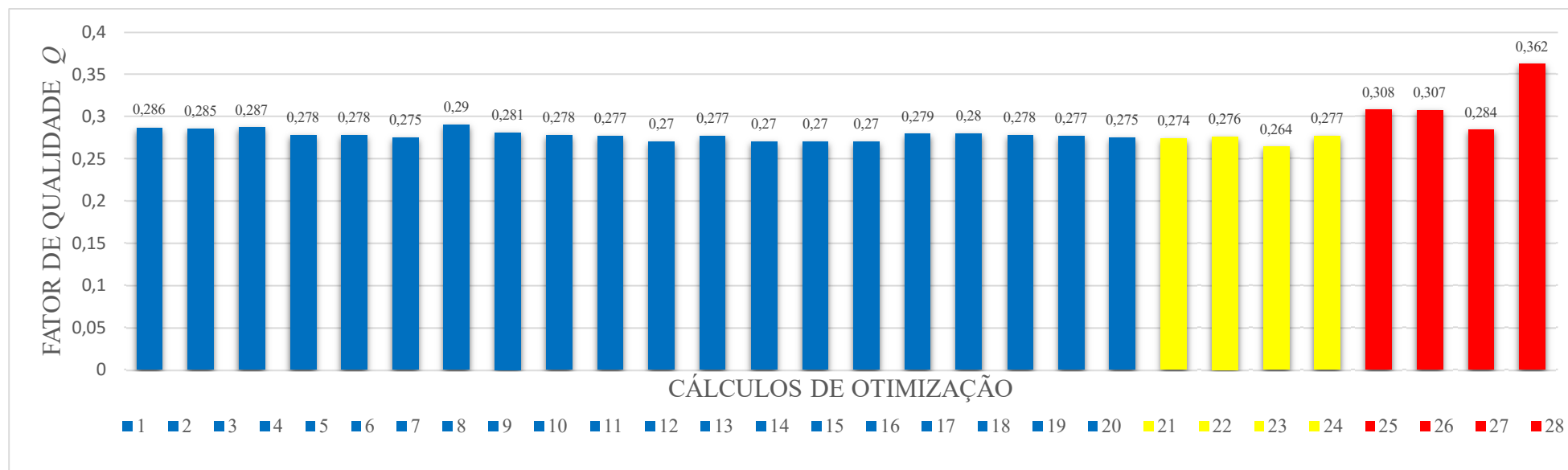


Figura 47. Gráfico dos diferentes valores do fator Q em função do método de química quântica utilizado para a otimização da geometria, da configuração relativa i da molécula α -Santonina: em azul são mostrados os cálculos baseados na classe de métodos DFT; em amarelo são mostrados os cálculos baseados na classe Hartree-Fock; em vermelho são mostrados os cálculos baseados na classe Semi-empírico.

A Figura 48 mostra a média dos valores de Q obtidos para cada classe, e a barra de erros indica o seu desvio padrão.

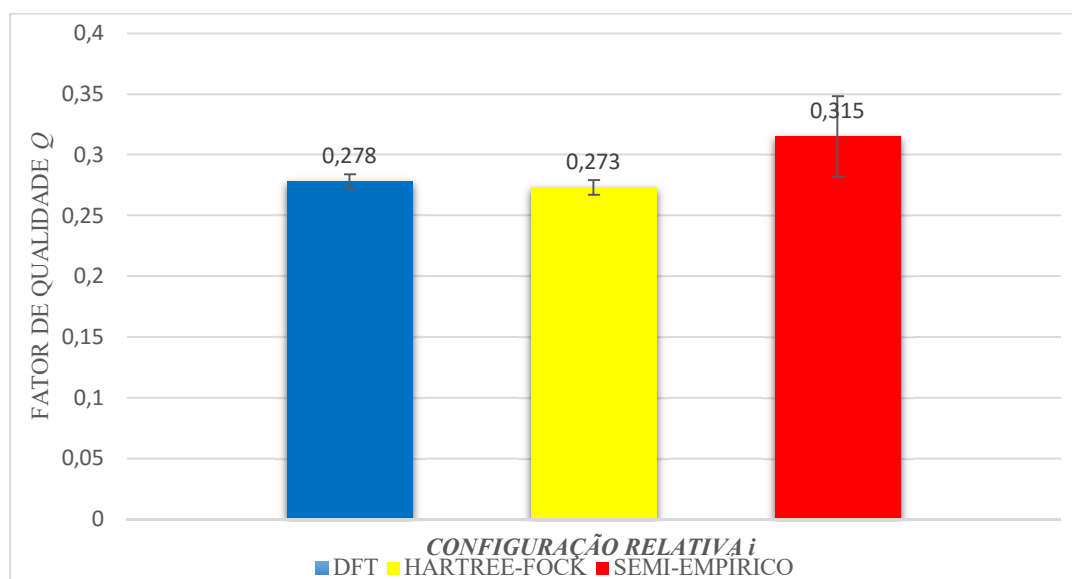


Figura 48. Gráfico dos valores médios do fator Q em função da classe de métodos de química quântica utilizado para a otimização da geometria, da configuração relativa i da molécula α -Santonina: em azul são mostrados os cálculos baseados na classe DFT; em amarelo são mostrados os cálculos baseados na classe Hartree-Fock; em vermelho são mostrados os cálculos baseados na classe Semi-empírico. A barra de erros indica o desvio padrão obtido para cada classe.

Os cálculos da classe DFT (em azul) mostraram um valor médio do fator Q de 0,278 e um desvio padrão de 0,006. Semelhantemente, os cálculos da classe Hartree-Fock (em amarelo) mostraram um valor médio do fator Q de 0,273 e um desvio padrão de 0,006. Estes valores médios de Q , muito próximos ao método de referência e com menor desvio padrão, mostram que estas duas classes de métodos *ab-initio* são similares ao método de referência, e apresentam uma maior precisão entre si. Isto é resultado do menor número de aproximação realizadas para este tipo de cálculo. Desta forma, a escolha do método *ab-initio* tem pouca influência no cálculo do fator Q .

Os cálculos da classe Semi-empírico (em vermelho) mostraram um valor médio do Q de 0,315 e um desvio padrão de 0,033. Este valor médio de Q maior que o método de referência, e com desvio padrão maior, mostra que os cálculos Semi-empírico não apresentam grande similaridade com o método de referência e precisão entre si. Isto é esperado já que os cálculos Semi-empírico realizam um maior número de aproximações, mostrando uma menor precisão entre seus métodos. Portanto, a escolha

por um método de cálculo da classe Semi-empírico não é indicada para a interpretação dos parâmetros anisotrópicos de RMN.

3.5 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES MÉTODOS DE QUÍMICA QUÂNTICA NAS MEDIDAS DAS ANISOTROPIAS DO DESLOCAMENTO QUÍMICO

Da mesma forma que os métodos de química quântica, utilizados para realizar a otimização da geometria dos diastereoisômeros da molécula α -Santonina, poderiam influência nos valores de Q obtidos, os métodos de química quântica GIAO, utilizados para a obtenção das anisotropias do deslocamento químico, também podem influenciar na magnitude deste parâmetro. No intuito de investigar esta dependência foram realizados nove cálculos GIAO com diferentes funcionais e bases, sendo que foram utilizados como dados experimentais os valores de $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ medidos para o gel PMMA e mostrados na Tabela 8. Os cálculos foram realizados apenas para o diastereoisômero i . Sendo que foram realizados três cálculos para cada funcional PBE0, MP2 e B3LYP. Em cada um destes funcionais foram realizados cálculos com a base especializada para cálculos de RMN pcS-1⁷⁸, e com a base 6-31G*. Para avaliar a influência do solvente no cálculo foram realizados cálculos com a base pcS-1 e o solvente clorofórmio (Tabela 2). O método denominado como de referência foi o PBE0/pcS-1 (Tabela 2, Entrada 1).

Os valores das anisotropias obtidas são mostrados na Tabela 10. Estes valores foram calculados seguindo a seguinte definição (Equação 31).

$$|\Delta\sigma| = \sigma_{zz} - \frac{\sigma_{xx} + \sigma_{yy}}{2} \quad (31)$$

Onde, σ_{xx} , σ_{yy} e σ_{zz} são os valores principais do tensor de blindagem química ordenados segundo a convenção de Haeberlen-Mehr-Spiess⁸⁹.

Tabela 10. Anisotropias do deslocamento químico calculadas utilizando diferentes métodos de química quântica para o diastereoisômero *i* da molécula α -Santonina.

Carbono	PBE0-pcS-1	PBE0-6-31G*	PBE0-pcS- 1/solvente	MP2-pcS-1	MP2-6-31G*	MP2-pcS- 1/solvente	B3LYP-pcS-1	B3LYP-6-31G*	B3LYP-pcS- 1/solvente
C8	166,9	153,1	170,4	189,7	177,1	193,9	167,5	150,5	171,1
C2	145,6	126,9	139,9	171,2	153,1	163,7	145,9	125,9	140,1
C6	195,6	170,9	198,9	215,9	195,0	219,6	197,1	170,1	200,4
C9a	171,3	153,8	179,6	193,1	174,4	195,7	172,8	153,7	181,2
C9	154,8	142,1	150,9	158,4	155,6	152,8	155,8	150,3	151,9
C7	149,6	133,1	145,6	169,9	154,5	164,7	149,2	131,4	145,3
C9b	48,0	46,3	48,8	45,7	51,6	46,6	48,4	52,1	49,2
C3a	25,7	26,3	29,2	18,1	21,8	20,6	24,9	25,6	28,6
C5a	33,7	30,5	35,9	26,9	24,2	28,9	34,1	30,7	36,3
C5	24,3	22,9	25,9	19,8	23,7	19,4	24,7	27,2	26,3
C4	18,8	17,1	18,7	14,9	12,7	14,8	19,3	15,2	19,1

Ao realizar cálculos com o mesmo funcional ou método, mas trocando as bases, as variações médias nos valores das anisotropias foram de 10%. Em relação à inserção da solvatação nos cálculos ocorreu um aumento médio de apenas 4% nas anisotropias, sendo que as variações percentuais mais significativas foram observadas para os carbonos *sp*². Quando foram comparados os funcionais PBE0 e B3LYP contra o método MP2 usando a mesma base, observa-se que o método da classe MP2 mostrou anisotropias percentuais 12% maiores para os carbonos *sp*² em relação aos cálculos DFT (PBE0 e B3LYP). Quando comparados os carbonos *sp*³ as anisotropias percentuais médias foram 20% maiores para os cálculos DFT em relação ao MP2. Isto mostra que a escolha do método DFT ou pós Hartree-Fock (MP2) tem bastante relevância em relação aos CSAs calculados, porém a base escolhida ou a inclusão da solvatação são fatores menos relevantes. Os resultados de *Q* obtidos são mostrados na Figura 49.

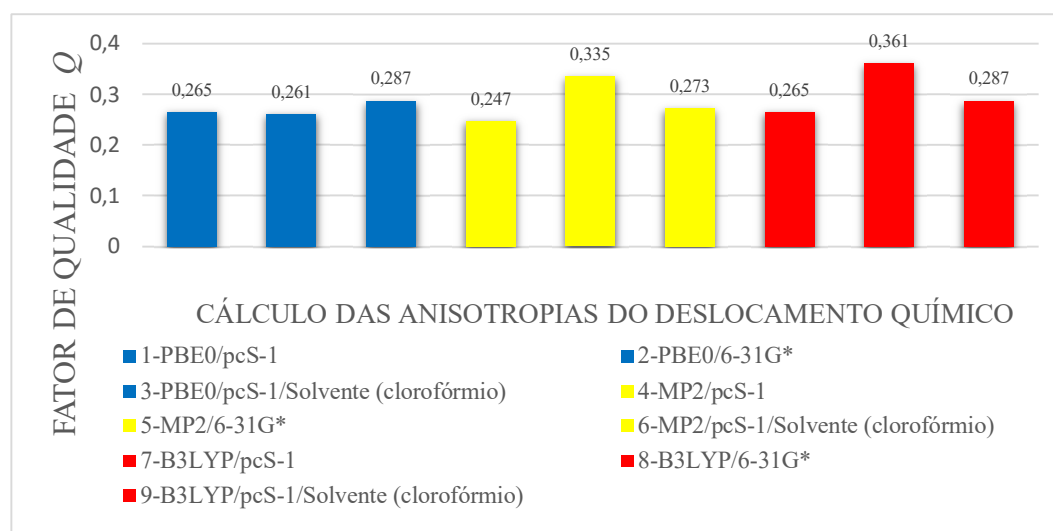


Figura 49. Gráfico dos diferentes valores do fator *Q* em função do método de química quântica GIAO utilizado para o cálculo das anisotropias do deslocamento químico, da configuração relativa *i* da molécula α -Santonina: em azul são mostrados os cálculos baseados nos funcionais PBE0; em amarelo são mostrados os cálculos baseados nos funcionais MP2; em vermelho são mostrados os cálculos baseados nos funcionais B3LYP.

Primeiramente, será comparado os valores de *Q* obtidos para os cálculos com a mesma base pcS-1 (1, 4 e 7) e diferentes métodos. Esta modificação não alterou significativamente os valores de *Q*.

Em seguida, comparou-se os valores de *Q* obtidos para os cálculos com a mesma base 6-31G* (2, 5, 8) e diferentes métodos. Esta mudança modificou os valores de *Q*.

Posteriormente, foram comparados os valores de Q para os cálculos com a modificação apenas da solvatação (1, 4 e 7 comparados com 3, 6 e 9 respectivamente), onde são mantidos os métodos PBE0, MP2 e B3LYP respectivamente, e a base pcS-1. Os valores mostram que a inserção da solvatação aumenta os valores de Q para todos os métodos.

Estes resultados mostram que a escolha do método de química quântica pode alterar o ajuste de SVD, e consequentemente o cálculo do tensor de alinhamento, levando a valores diferentes de Q .

CAPÍTULO 4

Conclusões e Perspectivas

4 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

4.1 – CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizado a atribuição completa dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto α -Santonina, a partir da realização de uma série de experimentos de RMN uni e bidimensionais. Observou-se que o espectro de RMN de ^1H apresentava uma região de difícil atribuição, que foi resolvida com o auxílio do experimento de RMN *J*-Resolvido, e confirmada a partir de uma simulação deste sistema de spins usando o programa SpinWorks.

A partir de cálculos de mecânica molecular, foi realizada uma busca conformacional para todos os oito diastereoisômeros derivados da α -Santonina. Determinou-se que apenas a configuração relativa *viii* apresentou duas conformações de energia mais baixa, considerando uma janela de 5 kcal mol^{-1} , enquanto as outras estruturas foram representadas por uma única conformação de mais baixa energia.

Foram sintetizados os géis PAN e PH reticulados, e posteriormente foram utilizados como meio de alinhamento em uma solução de α -Santonina/DMSO-*d*₆. Os parâmetros de RDC foram medidos em ambos os géis. O alinhamento no gel PAN forneceu onze valores de RDC, que variaram entre $-3,2$ e $+5,9 \text{ Hz}$. Desta forma, foi possível a atribuição correta da sua CR (5a(S/R), 9b(S/R), 3a(S/R), 3(S/R)) e a atribuição dos hidrogênios diastereotópicos ligados ao carbono C5. Por outro lado, os dados de RDC obtidos para a amostra no gel PH não permitiram a determinação da CR. Esta dificuldade foi decorrente da falta de homogeneidade do gel PH sintetizado, resultando em um pequeno número de RDCs, ao todo seis valores, medidos experimentalmente.

O gel PMMA foi utilizado como meio de alinhamento compatível com CDCl_3 . Neste sistema, foram observados sinais duplicados para o solvente e para a α -Santonina, um no meio anisotrópico e outro no meio isotrópico. Este efeito foi observado porque o intumescido do gel não preencheu todo o diâmetro interno do tubo de RMN. O reconhecimento destes sinais foi realizado a partir de imagens de Ressonância Magnética, pela medida do coeficiente de difusão e medidas de T_1 . O gel comprimido mostrou uma distribuição ondulada.

A compressão do gel permitiu a obtenção de dois estados de alinhamento que foram confirmados com os experimentos de RMN de ^2H . Posteriormente, foram medidos os ΔRDCs e $\Delta\Delta\text{RCSAi}$, variando de $-17,49$ a $+10,48 \text{ Hz}$ e de $-0,05$ a $+0,01$

ppm, respectivamente. Os valores de $\Delta RDCs$ permitiram a atribuição inequívoca da CR e da atribuição de todos os hidrogênios diastereotópicos da α -Santonina. O tratamento considerando a análise dos valores de $\Delta\Delta RCSA_i$ não permitiu a atribuição da CR. Porém, o ajuste utilizando os dois parâmetros combinados possibilitou a atribuição da CR correta, porém o valor de Q obtido foi de 0.606, maior que para a análise individual do $\Delta RDCs$.

A correção posterior dos dados de $\Delta\Delta RCSA_i$, para eliminação da contribuição $\Delta\Delta\delta_i^{solv(min)}$ permitiram uma melhora no ajuste porém não foi possível a diferenciação do diastereoisômero correto.

A avaliação da influência dos métodos de química quântica sobre os valores de RDC calculados mostrou que os métodos *ab-initio* apresentaram pouca variação entre si, porém os métodos Semi-empírico não são indicados para este tipo de cálculo, pois apresentaram grande divergência entre seus resultados para diferentes métodos. Enquanto, os cálculos das anisotropias do deslocamento químico GIAO mostraram que a escolha dos métodos DFT ou MP2 são relevantes para os RCSAs calculados, todavia o efeito da escolha da base ou da inclusão da solvatação no cálculo tem menor efeito.

4.2 – PERSPECTIVAS

As correções posteriores realizadas sobre os resultados de $\Delta\Delta RCSA_i$ permitiram uma melhora no ajuste, porém não levaram a determinação da correta configuração relativa da α -Santonina. Portanto, a realização de uma investigação mais aprofundada permitiria compreender melhor as aproximações realizadas. Uma proposta importante a ser realizada seria a realização de cálculos GIAO para a obtenção das anisotropias do deslocamento químico de todas as estruturas dos diastereoisômeros derivados da α -Santonina.

Por fim, tem-se como perspectiva a ampliação do número de sistema moleculares para estudo da metodologia descrita neste trabalho, principalmente aplicando os parâmetros de RDCs e RCSAs a problemas estruturais reais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- (1) Cid, M.; Bravo, J. *Structure Elucidation in Organic Chemistry*, John Wiley.; 2015.
- (2) Kwan, E. E.; Huang, S. G. Structural Elucidation with NMR Spectroscopy: Practical Strategies for Organic Chemists. *European J. Org. Chem.* **2008**, 16, 2671–2688.
- (3) Breton, R. C.; Reynolds, W. F. Using NMR to Identify and Characterize Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, 30 (4), 501–524.
- (4) F. A. Anet, A. J. R. Carter, S. W. Nuclear Magnetic Resonance Spectral Assignments from Nuclear Overhauser Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 120, 5250–5251.
- (5) Thiele, C. M. Residual Dipolar Couplings (RDCs) in Organic Structure Determination. *European J. Org. Chem.* **2008**, 5673–5685.
- (6) Kramer, F.; Deshmukh, M. V.; Kessler, H.; Glaser, S. J. Residual Dipolar Coupling Constants: An Elementary Derivation of Key Equations. *Concepts Magn. Reson. Part A Bridg. Educ. Res.* **2004**, 21, 10–21.
- (7) Prestegard, J. H.; Bougault, C. M.; Kishore, A. I. Residual Dipolar Couplings in Structure Determination of Biomolecules. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 3519–3540.
- (8) Tjandra, N.; Bax, A. Direct Measurement of Distances and Angles in Biomolecules by NMR in a Dilute Liquid Crystalline Medium. *Science* **1997**, 278, 1111–1114.
- (9) Dong, R. Y. *NMR Spectroscopy in Liquid Crystalline and Ordered Phases*; John Wiley, S., Ed.; UK, 2006.
- (10) Kummerlöwe, G.; Luy, B. Residual Dipolar Couplings as a Tool in Determining the Structure of Organic Molecules. *Trends Anal. Chem.* **2009**, 28 (4), 483–493.
- (11) Pake, G. E. Nuclear Resonance Absorption in Hydrated Crystals: Fine Structure of the Proton Line. *J. Chem. Phys.* **1948**, 16, 327–336.
- (12) Laws, David D., Bitter, H. L., Jerschow, A. Solid-State NMR Spectroscopic Methods in Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 3096–3129.

- (13) Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. Introdução à Espectroscopia, 4^o ed.; Bellingham; Washington.
- (14) Losonczi, J. A.; Andrec, M.; Fischer, M. W. F.; Prestegard, J. H. Order Matrix Analysis of Residual Dipolar Couplings Using Singular Value Decomposition. *J. Magn. Reson.* **1999**, *138*, 334–342.
- (15) Cornilescu, G.; Marquardt, J. L.; Ottiger, M.; Bax, A. Validation of Protein Structure from Anisotropic Carbonyl Chemical Shifts in a Dilute Liquid Crystalline Phase. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (27), 6836–6837.
- (16) Kuchel, P. W.; Chapman, B. E.; Müller, N.; Bubb, W. A.; Philp, D. J.; Torres, A. M. Apparatus for Rapid Adjustment of the Degree of Alignment of NMR Samples in Aqueous Media: Verification with Residual Quadrupolar Splittings in ²³Na and ¹³³Cs Spectra. *J. Magn. Reson.* **2006**, *180*, 256–265.
- (17) Zweckstetter, M.; Bax, A. Prediction of Sterically Induced Alignment in a Dilute Liquid Crystalline Phase: Aid to Protein Structure Determination by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (15), 3791–3792.
- (18) Navarro-Vázquez, A. MSpin-RDC . A Program for the Use of Residual Dipolar Couplings for Structure Elucidation of Small Molecules. *Magn. Reson. Chem.* **2012**, *50*, S73–S79.
- (19) Burnell, E. E.; De Lange, C. A. A ,On the Average Orientation of Molecules Undergoing Large-amplitude Conformational Changes in Anisotropics Liquids. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *76* (2), 268–272.
- (20) Thiele, C. M.; Schmidts, V.; Böttcher, B.; Louzao, I.; Berger, R.; Maliniak, A.; Stevansson, B. On the Treatment of Conformational Flexibility when Using Residual Dipolar Couplings for Structure Determination. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 6708–6712.
- (21) Sun, H.; Reinscheid, U. M.; Whitson, E. L.; D’Auvergne, E. J.; Ireland, C. M.; Navarro-Vázquez, A.; Griesinger, C. Challenge of Large-Scale Motion for Residual Dipolar Coupling Based Analysis of Configuration: The Case of Fibrosterol Sulfate A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14629–14636.
- (22) Blackledge, M. Recent Progress in the Study of Biomolecular Structure and Dynamics in Solution from Residual Dipolar Couplings. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2005**, *46*, 23–61.

- (23) De Alba, E.; Tjandra, N. NMR Dipolar Couplings for the Structure Determination of Biopolymers in Solution. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2002**, *40*, 175–197.
- (24) Tolman, J. R.; Flanagan, J. M.; Kennedy, M. A.; Prestegard, J. H. Nuclear Magnetic Dipole Interactions in Field-Oriented Proteins: Information for Structure Determination in Solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 9279–9283.
- (25) Tolman, J. R.; Ruan, K. NMR Residual Dipolar Couplings as Probes of Biomolecular Dynamics. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1720–1736.
- (26) Prestegard, J. H. New Techniques in Structural NMR-Anisotropic Interactions. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 517–522.
- (27) Bax, A. Weak Alignment Offers New NMR Opportunities to Study Protein Structure and Dynamics. *Protein Sci.* **2003**, *12*, 1–16.
- (28) Thiele, C. M.; Berger, S. Probing the Diastereotopicity of Methylene Protons in Strychnine Using Residual Dipolar Couplings. *Org. Lett.* **2003**, *5* (5), 705–708.
- (29) Freudenberger, J. C.; Knör, S.; Kobzar, K.; Heckmann, D.; Paululat, T.; Kessler, H.; Luy, B. Stretched Poly(vinyl Acetate) Gels as NMR Alignment Media for the Measurement of Residual Dipolar Couplings in Polar Organic Solvents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 423–426.
- (30) Freudenberger, J. C.; Spiteller, P.; Bauer, R.; Kessler, H.; Luy, B. Stretched Poly (Dimethylsiloxane) Gels as NMR Alignment Media for Apolar and Weakly Polar Organic Solvents: An Ideal Tool for Measuring RDCs at Low Molecular Concentrations. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14690–14691.
- (31) Gil, R. R.; Gayathri, C.; Tsarevsky, N. V; Matyjaszewski, K. Stretched Poly (Methyl Methacrylate) Gel Aligns Small Organic Molecules in Chloroform. Stereochemical Analysis and Diasterotopic Protons NMR Assignment in Ludartin Using Residual Dipolar Couplings and 3J Coupling Constants Analysis. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (3), 840–848.
- (32) Ge, H. M.; Sun, H.; Jiang, N.; Qin, Y. H.; Dou, H.; Yan, T.; Hou, Y. Y.; Griesinger, C.; Tan, R. X. Relative and Absolute Configuration of Vatiparol (1 Mg): A Novel Anti-Inflammatory Polyphenol. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 5213–5221.
- (33) Mangoni, A.; Esposito, V.; Randazzo, A. Configuration Assignment in Small

- Organic Molecules via Residual Dipolar Couplings. *Chem. Commun. (Camb)*. **2003**, 154–155.
- (34) Farès, C.; Hassfeld, J.; Menche, D.; Carlomagno, T. Simultaneous Determination of the Conformation and Relative Configuration of Archazolide A by Using Nuclear Overhauser Effects, J Couplings, and Residual Dipolar Couplings. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3722–3726.
- (35) Gayathri, C.; de la Fuente, M. C.; Luy, B.; Gil, R. R.; Navarro-Vázquez, A. Probing Heterocycle Conformation with Residual Dipolar Couplings. *Chem. Commun. (Camb)*. **2010**, *46*, 5879–5881.
- (36) Thiele, C. M.; Marx, A.; Berger, R.; Fischer, J.; Biel, M.; Giannis, A. Determination of the Relative Configuration of a Five-Membered Lactone from Residual Dipolar Couplings. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4455–4460.
- (37) Trigo-Mouriño, P.; de la Fuente, M. C.; Gil, R. R.; Sánchez-Pedregal, V. M.; Navarro-Vázquez, A. Conformational Analysis of the Anti-Obesity Drug Lorcaserin in Water: How To Take Advantage of Long-Range Residual Dipolar Couplings. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19* (44), 14989–14997.
- (38) Schuetz, A.; Junker, J.; Leonov, A.; Lange, O. F.; Molinski, T. F.; Griesinger, C. Stereochemistry of Sagittamide A from Residual Dipolar Coupling Enhanced NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15114–15115.
- (39) Lancefield, C. S.; Slawin, A. M. Z.; Westwood, N. J.; Lebl, T. The Use of Residual Dipolar Coupling for Conformational Analysis of Structurally Related Natural Products. *Magn. Reson. Chem.* **2015**, *53* (6), 467–475.
- (40) Kummerlöwe, G.; Crone, B.; Kretschmer, M.; Kirsch, S. F.; Luy, B. Residual Dipolar Couplings as a Powerful Tool for Constitutional Analysis: The Unexpected Formation of Tricyclic Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2643–2645.
- (41) Choy, W. Y.; Tollinger, M.; Mueller, G. A.; Kay, L. E. Direct Structure Refinement of High Molecular Weight Proteins Against Residual Dipolar Couplings and Carbonyl Chemical Shift Changes Upon Alignment: An Application to Maltose Binding Protein. *J. Biomol. NMR* **2001**, *21* (1), 31–40.
- (42) Hallwass, F.; Schmidt, M.; Sun, H.; Mazur, A.; Kummerlöwe, G.; Luy, B.; Navarro-Vázquez, A.; Griesinger, C.; Reinscheid, U. M. Residual Chemical Shift Anisotropy (RCSA): A Tool for the Analysis of the Configuration of Small Molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9487–9490.

- (43) Meddour, A.; Berdague, P.; Hedli, A.; Courtieu, J.; Lesot, P. Proton-Decoupled Carbon-13 NMR Spectroscopy in a Lyotropic Chiral Nematic Solvent as an Analytical Tool for the Measurement of the Enantiomeric Excess. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (19), 4502–4508.
- (44) Thiele, C. M. Simultaneous Assignment of All Diastereotopic Protons in Strychnine Using RDCs: PELG as Alignment Medium for Organic Molecules. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (22), 7403–7413.
- (45) Bendiak, B. Sensitive Through-Space Dipolar Correlations Between Nuclei of Small Organic Molecules by Partial Alignment in a Deuterated Liquid Solvent. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14862–14863.
- (46) Marx, A.; Thiele, C. Orientational Properties of Poly-Gama-Benzyl-L-Glutamate: Influence of Molecular Weight and Solvent on Order Parameters of the Solute. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 254–260.
- (47) Troche-Pesqueira, E.; Cid, M. M.; Navarro-Vázquez, A. Disodium Cromoglycate: Exploiting its Properties as a NMR Weak-Aligning Medium for Small Organic Molecules. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 1957–1965.
- (48) Delochet, B.; Samulski, E. T. Short-Range Nematic-like Orientational Order in Strained Elastomers: A Deuterium Magnetic Resonance Study. *Macromolecules* **1981**, *14*, 575–581.
- (49) Tycko, R.; Blanco, F. J.; Ishii, Y. Alignment of Biopolymers in Strained Gels: A New Way to Create Detectable Dipole-Dipole Couplings in High-Resolution Biomolecular NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (38), 9340–9341.
- (50) Sass, H. J.; Musco, G.; Stahl, S. J.; Wingfield, P. T.; Grzesiek, S. Solution NMR of Proteins Within Polyacrylamide Gels: Diffusional Properties and Residual Alignment by Mechanical Stress or Embedding of Oriented Purple Membranes. *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 303–309.
- (51) Luy, B.; Kobzar, K.; Kessler, H. An Easy and Scalable Method for the Partial Alignment of Organic Molecules for Measuring Residual Dipolar Couplings. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1092–1094.
- (52) Luy, B.; Kobzar, K.; Knör, S.; Furrer, J.; Heckmann, D.; Kessler, H. Orientational Properties of Stretched Polystyrene Gels in Organic Solvents and the Suppression of Their Residual ¹H NMR Signals. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6459–6465.

- (53) Gayathri, C.; Tsarevsky, N. V.; Gil, R. R. Residual Dipolar Couplings (RDCs) Analysis of Small Molecules Made Easy: Fast and Tuneable Alignment by Reversible Compression/Relaxation of Reusable PMMA Gels. *Chem. A Eur. J.* **2010**, *16*, 3622–3626.
- (54) Kummerlowe, G.; Mccord, E. F.; Cheatham, S. F.; Niss, S.; Schnell, R. W.; Luy, B. Tunable Alignment for All Polymer Gel/Solvent Combinations for the Measurement of Anisotropic NMR Parameters. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7087–7089.
- (55) Erdélyi, M.; D’Auvergne, E.; Navarro-Vázquez, A.; Leonov, A.; Griesinger, C. Dynamics of the Glycosidic Bond: Conformational Space of Lactose. *Chem. A Eur. J.* **2011**, *17*, 9368–9376.
- (56) Mallagaray, A.; Canales, A.; Domínguez, G.; Jiménez-Barbero, J.; Pérez-Castells, J. A Rigid Lanthanide Binding Tag for NMR Structural Analysis of Carbohydrates. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7179–7181.
- (57) Saupe, A.; Englert, G. High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Orientated Molecules. *Phys. Rev. Lett.* **1963**, *11* (10), 462–464.
- (58) Saupe, A. Kernresonanzen in Kristallinen Flüssigkeiten Und in Kristallinflüssigen Lösungen. Teil I. *Z. Naturforsch* **1964**, *19a*, 161–171.
- (59) Snyder, L. C. Analysis of Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Molecules in Liquid Crystal Solvents. *J. Chem. Phys.* **1965**, *43* (11), 4041–4050.
- (60) Sackmann, E.; Meiboom, S.; Snyder, L. C. On the Relation of Nematic to Cholesteric Mesophases. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89* (23), 5981–5982.
- (61) Verdier, L.; Sakhaei, P.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C. Measurement of Long Range H,C Couplings in Natural Products in Orienting Media: A Tool for Structure Elucidation of Natural Products. *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 353–359.
- (62) Haberz, P.; Farjon, J.; Griesinger, C. A DMSO-Compatible Orienting Medium: Towards the Investigation of the Stereochemistry of Natural Products. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 427–429.
- (63) Kummerlowe, G.; Auernheimer, J.; Lendlein, A.; Luy, B. Stretched Poly (Acrylonitrile) as a Scalable Alignment Medium for DMSO. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6080–6081.

- (64) Kobzar, K.; Kessler, H.; Luy, B. Stretched Gelatin Gels as Chiral Alignment Media for the Discrimination of Enantiomers by NMR Spectroscopy. *Angew. Chem.* **2005**, *44*, 3145–3147.
- (65) Kummerlowe, G.; Halbach, F.; Laufer, B.; Luy, B. Precise Measurement of RDCs in Water and DMSO Based Gels Using a Silicone Rubber Tube for Tunable Stretching. *Open Spectrosc. J.* **2008**, *2*, 29–33.
- (66) Liu, Y.; Prestegard, J. H. A Device for the Measurement of Residual Chemical Shift Anisotropy and Residual Dipolar Coupling in Soluble and Membrane-Associated Proteins. *J. Biomol. NMR* **2010**, *47* (4), 249–258.
- (67) Kahler, M. Ueber Einen Neuen Stoff Im Semen Cinae. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **1830**, *34* (3), 318–319.
- (68) Clemo, G. R.; Haworth, R. D.; Walton, E. The Constitution of Santonin. *J. Chem. Soc.* **1929**, 2368–2387.
- (69) Martín, M. L.; Morán, A.; Carrón, R.; Montero, M. J.; San Roman, L. Aantipyretic Activity of Alfa- and Beta-Santonin. *J. Ethnopharmacol.* **1988**, *23*, 285–290.
- (70) Alvarenga, E. S.; Barbosa, L. C. A.; Saliba, W. A.; Arantes, F. F. P.; Demuder, A. J. Síntese e Avaliação da Atividade Fitotóxica de Derivados da Alfa-Santonina. *Quim. Nova* **2009**, *32* (2), 401–406.
- (71) Klochkov, S. G.; Afanas'eva, S. V.; Pushin, A. N.; Gerasimova, G. K.; Vlasenkova, N. K.; Bulychev, Y. N. Synthesis and Cytotoxic Activity of Alfa-Santonin Amino-Derivatives. *Chem. Nat. Compd.* **2009**, *45* (6), 817–823.
- (72) Ruikar, A. D.; Kulkarni, M. M.; Phalgune, U. D.; Puranik, V. G.; Deshpande, N. R. GC-MS Study and Isolation of a Sesquiterpene Lactone from Artemisia Pallens. *Orient. J. Chem.* **2010**, *26* (1), 143–146.
- (73) Halgren, T. A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94*. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490–519.
- (74) Schrödinger. MACROMODEL. New York- NY 2015.
- (75) 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. J.; 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. Wallingford CT, USA **2009**.
- (76) Wolinski, K.; Hinton, J. F.; Pulay, P. Efficient Implementation of the Gauge-Independent Atomic Orbital Method for NMR Chemical Shift Calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (d), 8251–8260.
- (77) Adamo, C.; Barone, V. Toward Chemical Accuracy in the Computation of NMR Shieldings: The PBE0 Model. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *298* (1-3), 113–119.
- (78) Jensen, F. Basis Set Convergence of Nuclear Magnetic Shielding Constants Calculated by Density Functional Methods. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4* (5), 719–727.
- (79) Helgaker, T.; Watson, M.; Handy, N. C. Analytical Calculation of Nuclear Magnetic Resonance Indirect Spin–spin Coupling Constants at the Generalized Gradient Approximation and Hybrid Levels of Density-Functional Theory. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113* (21), 9402.
- (80) Sychrovský, V.; Gräfenstein, J.; Cremer, D. Nuclear Magnetic Resonance Spin–Spin Coupling Constants from Coupled Perturbed Density Functional Theory. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113* (9), 3530.
- (81) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics.* **1996**, 33–38.
- (82) Marat, K. SpinWorks. University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada.
- (83) Quirt, A. R.; Martin, J. S. NMR Spectra of Symmetric Molecules. I. The Spin Hamiltonian for Twofold Symmetry. *J. Magn. Reson.* **1971**, *5*, 318–327.
- (84) Kummerlöwe, G.; Schmitt, S.; Luy, B. Cross-Fitting of Residual Dipolar Couplings. *Open Spectrosc. J.* **2010**, *4*, 16–27.

- (85) Sánchez-Pedregal, V. M.; Santamaría-fernández, R.; Navarro-Vázquez, A. Residual Dipolar Couplings of Freely Rotating Groups in Small Molecules. Stereochemical Assignment and Side-Chain Conformation of 8-Phenylmenthol. *J. Org. Lett.* **2009**, *11* (3), 1471–1474.
- (86) Teles, R. R. .; França, J. A. A. .; Navarro-Vázquez, A. .; Hallwass, F. Atribuição da Estereoquímica da Alfa-Santonina Atravéz das Medidas do Acoplamento Dipolar Residual. *Quim. Nova* **2015**, *00* (00), 00, no prelo.
- (87) Levitt, M. H. *Spin Dynamics* **2008**, 2° ed.
- (88) Nath, N.; Schmidt, M.; Navarro-Vázquez; Gil, R.; Griesinger, C. Residual Chemical Shift Anisotropy: A Method to Determine the Correct Configuration of Small Molecules. In *SMASH 2015* **2015**, Baveno, Italy.
- (89) Widdifield, C. M.; Schurko, R. W. Understanding Chemical Shielding Tensors Using Group Theory, MO Analysis, and Modern Density Functional Theory. *Concepts Magn. Reson. Part A Bridg. Educ. Res.* **2009**, *34A*, 91–123.
- (90) Karplus, M. Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30* (1), 10–15.
- (91) Karplus, M. Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870–2871.

ANEXOS

A.1 – ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DE RMN ^1H e ^{13}C DO COMPOSTO α -SANTONINA

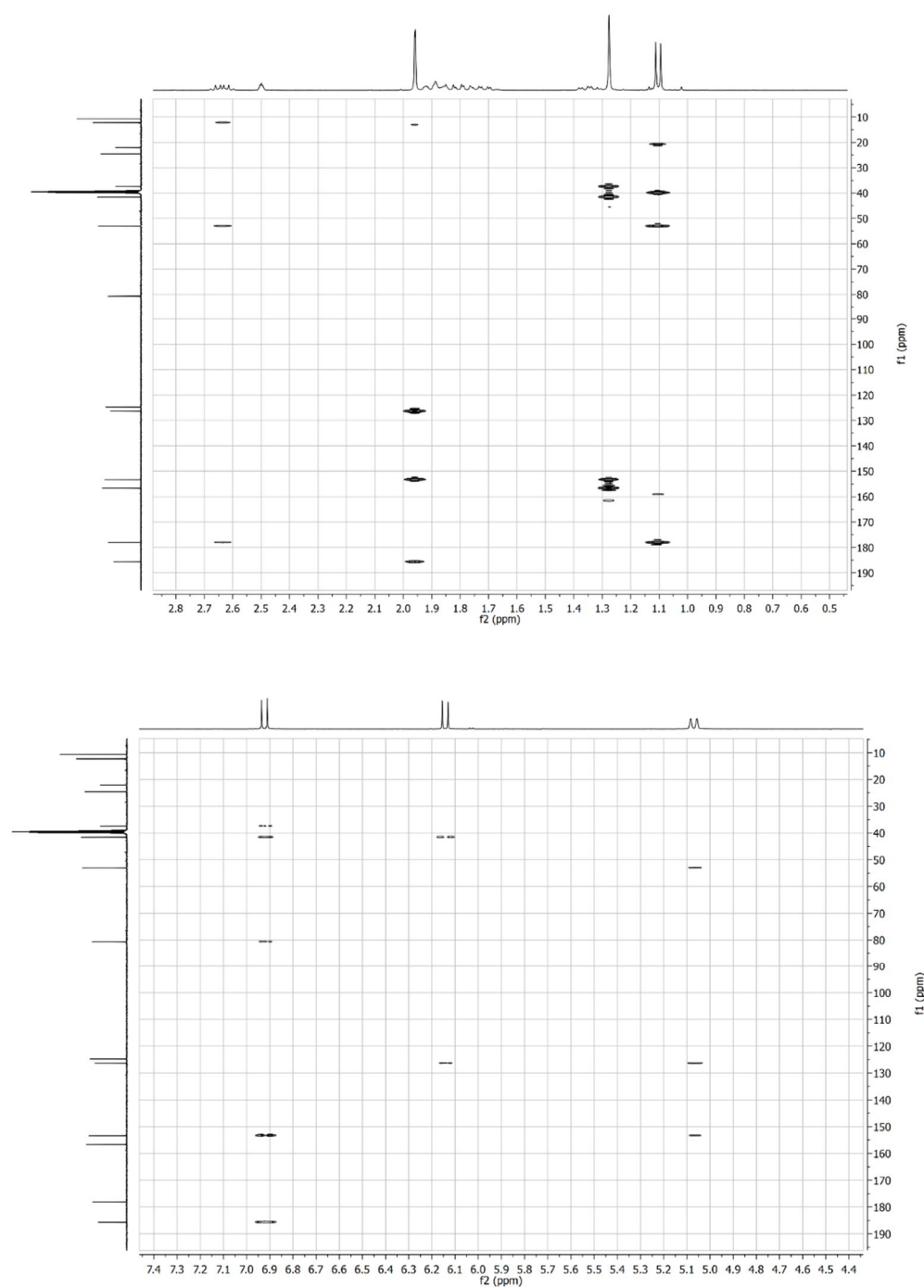


Figura A1. Espectro de RMN gHMBC $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 399,75 MHz) do composto α -Santonina a 298K.

A.2 – ATRIBUIÇÃO DOS HIDROGÊNIOS DIASTEREOTÓPICOS

Para realizar a atribuição dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos H4 β , H4 α , H5 β , H5 α , bem como o sinal de H3a, e consequentemente realizar a completa atribuição do espectro de RMN de ^1H da molécula α -Santonina, foi realizado o experimento de RMN *J*-resolvido ^1H - ^1H (Figura A2).

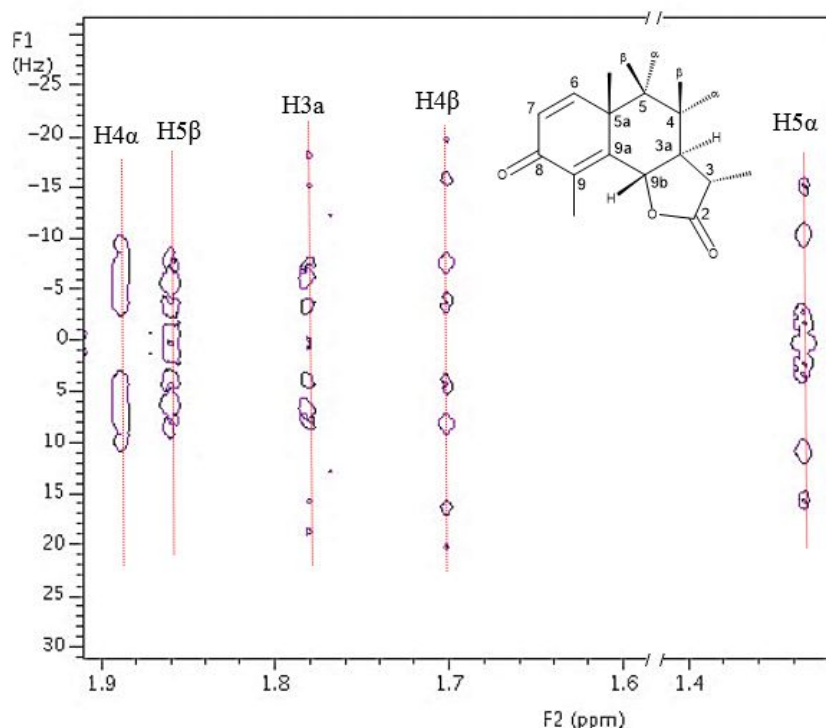


Figura A2. Expansão do espectro de RMN *J*-resolvido (DMSO-*d*₆, 399,75 MHz) na região entre 1,88 e 1,32ppm do composto α -Santonina a 298K.

O experimento *J*-resolvido foi realizado por possibilitar a correlação entre os deslocamentos químicos de RMN de ^1H , com as suas respectivas constantes de acoplamento. Isto permite que as projeções dos sinais de RMN de ^1H , no eixo *F2*, apareçam desacoplados, facilitando a atribuição dos sinais, que não aparecerão sobrepostos. Assim, as medidas das constantes de acoplamento são favorecidas, visto que não se tem mais a sobreposição de sinais. A partir dos valores das constantes de acoplamento foi possível realizar a atribuição dos sinais de RMN de ^1H como: 1,88ppm (H4 α), 1,85ppm (H5 β), 1,78ppm (H3a), 1,70ppm (H4 β) e 1,32ppm (H5 α).

Para confirmar esta atribuição foi realizado uma simulação do espectro de RMN de ^1H , para o sistema de spins H9b, H3a, H3, C3-CH₃, H4 β , H4 α , H5 β e H5 α , aplicando

o programa SpinWorks⁸², e usando a análise espectral de rotina NUMMRIT⁸³. As constantes de acoplamento e os deslocamentos químicos medidos experimentalmente, foram usados como dados de entrada para predição do espectro de RMN de ^1H . Os espectros de RMN de ^1H simulado (superior) e experimental (inferior) são mostrados na Figura A3. A similaridade entre os dois confirma que os valores medidos experimentalmente estão corretos.

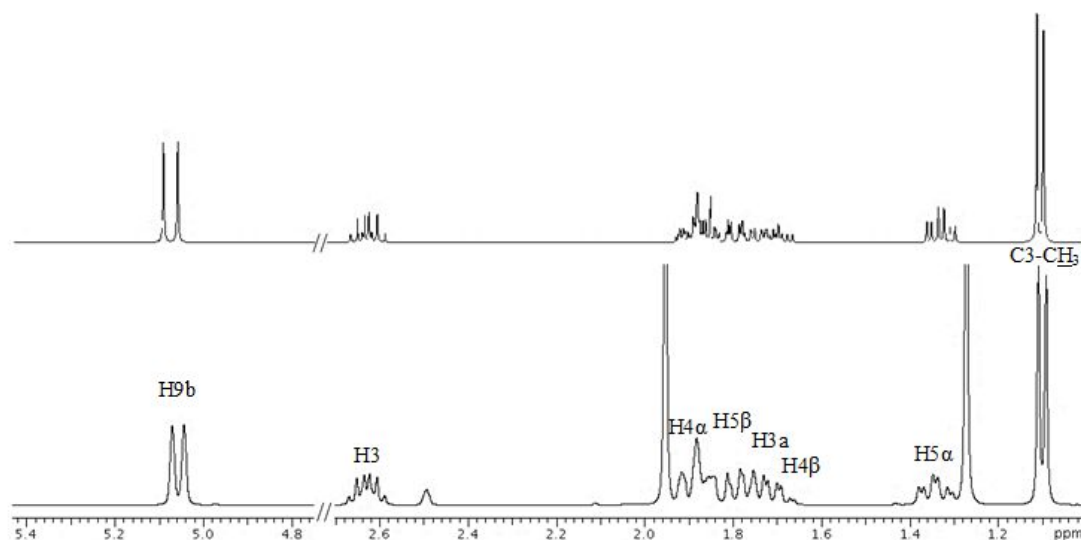


Figura A3. Parte do espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 399,75 MHz) do composto α -Santonina **1** (espectro inferior). O espectro superior mostra o espectro simulado do sistema de spins envolvendo os hidrogênios H9b, H3, H4 β , H4 α , H5 β , H5 α , H3a, e C3-CH $_3$ usando o programa SpinWorks⁸².

As Tabelas A1 e A2 resumem a atribuição final obtida para os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , respectivamente, da molécula α -Santonina **1**.

Tabela A1. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δ_{H} em ppm) e constantes de acoplamento (J em Hz) do composto α -Santonina em $\text{DMSO-}d_6$.

H	δ_{H}
C3-CH ₃	1,10 (d, 6,9 Hz, 3H)
C9-CH ₃	1,98 (s, 3H)
C5a-CH ₃	1,28 (s, 3H)
H9b	5,07 (d, 11,3 Hz, 1H)
H6	6,92 (d, 9,8 Hz, 1H)
H7	6,14 (d, 9,8 Hz, 1H)
H3	2,60 (dq, 6,9 Hz/11,3 Hz, 1H)
H3a	1,78(m, 11,3 Hz/11,3 Hz/2,7 Hz/9,5 Hz, 1H)
H5 α	1,32 (dt, 11,2 Hz/4,5 Hz/10,9 Hz, 1H)
H4 α	1,88 (m, 13,5 Hz/4,5 Hz/4,0 Hz/2,7 Hz, 1H)
H5 β	1,85 (m, 11,2 Hz/4,0 Hz/3,8 Hz, 1H)
H4 β	1,70(m, 13,5 Hz/9,5 Hz/10,9 Hz/3,8 Hz, 1H)

O espectro de RMN de ^1H foi realizado a 399,75 MHz a 298K. A multiplicidade, constante de acoplamento (J , Hz) e o número de hidrogênios são mostrados entre parênteses.

Tabela A2. Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (δ_{C} em ppm) do composto α -Santonina em $\text{DMSO-}d_6$.

C	δ_{C}
C8	185,67
C2	178,05
C9a	153,32
C9	126,37
C3	40,00
C6	156,63
C7	124,73
C9b	80,69
C3a	53,06
C5a	41,55
C5	37,41
C4	22,03
C5a- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	24,57
C3- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	12,22
C9- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	10,66

O espectro de RMN de ^{13}C foi realizado a 100,51 MHz a 298K.

A.3 – DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO RELATIVA DA MOLÉCULA α -SANTONINA BASEADO NOS VALORES DAS CONSTANTES DE ACOPLAMENTO $^3J(\text{H,H})$ E DO EFEITO NOE

A Tabela A3 mostra os valores dos ângulos diedros H9b-C9b-C3a-H3a e H3a-C3a-C3-H3 otimizados por cálculos de química quântica para a molécula α -Santonina *i*, e os outros sete diastereoisômeros. Foi aplicado o nível DFT, usando o funcional híbrido B3LYP e um conjunto de bases 6-31G*, implementados no programa Gaussian 09⁷⁵. Estes ângulos foram escolhidos por serem significativos para a determinação da estereoquímica da molécula, uma vez que eles estão associados com átomos de hidrogénio ligados a dois estereocentros. Os ângulos diedros H6-C6-C7-H7, (H4 β /H4 α)-C4-C5-(H5 β /H5 α), e (H4 β /H4 α)-C4-C3a-H3a são aproximadamente os mesmos em todas as oito estruturas. Portanto, eles não contribuem para diferenciação entre as mesmas.

Tabela A3. Análise do acoplamento escalar 3J dos oito diferentes diastereoisômeros da molécula α -Santonina*.

Configuração Relativa	Ângulo diedro (1) H9b-C9b-C3a-H3a (em graus).	Ângulo diedro (2) H3a-C3a-C3-H3 (em graus).	Acoplamento escalar J (Hz) ^c Ângulo diedro (1)/ Ângulo diedro (2)
<i>i</i>	172.4°	170.1°	10.1/10.0
<i>ii</i>	178.0°	173.9°	10.3/10.2
<i>iii</i>	35.5°	168.7°	5.5/9.9
<i>iv</i>	40.3°	97.4°	5.1/1.7
<i>v</i>	171.8°	35.0°	10.1/5.6
<i>vi</i>	42.2°	40.9°	4.8/5.1
<i>vii</i>	177.5°	38.3°	10.2/5.3
<i>viii</i> ^a	32.9°	32.1°	5.8/6.0
<i>viii</i> ^b	36.7°	38.9°	5.5/5.3

* a) primeira conformação b) segunda conformação c) Acoplamento escalar J previsto no programa MSpin-RDC¹⁸, usando a equação de Karplus^{90,91}, sobre as geometrias otimizadas (DFT- B3LYP/6-31G*).

Comparando os valores das constantes de acoplamento escalar obtidos experimentalmente 3J H9b-H3a e 3J H3a-H3 (ambos 11.3 Hz) e a geometria otimizada das oito estruturas, observa-se que os valores experimentais são compatíveis com ângulos diedros na faixa entre 0°-20° ou 140°-180° como observado para os valores previstos usando a equação de Karplus^{90,91} implementada no programa MSpin-RDC¹⁸. Analisando os dados da Tabela A3, observa-se que a configuração relativa dos diastereoisômeros *i*, *ii* são as únicas que demonstram compatibilidade com as faixas possíveis dos ângulos experimentais. Deste modo, todas as outras configurações relativas podem ser excluídas.

Para obter mais informações sobre as estruturas foi realizado o experimento de RMN NOESY ^1H - ^1H (Figura A4).

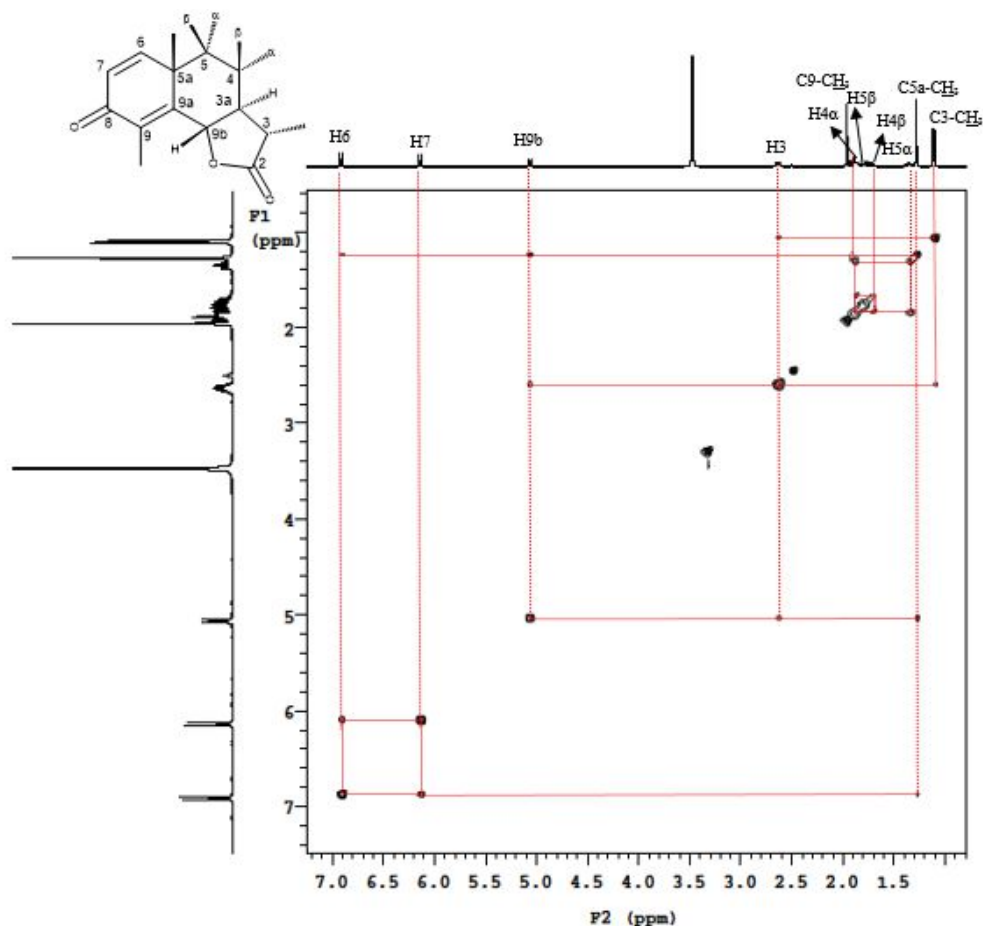


Figura A4. Espectro de RMN NOESY ^1H - ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, $\text{DMSO-}d_6$ MHz) do composto α -Santonina a 298K.

O espectro de RMN NOESY apresentou as seguintes correlações: o hidrogênio H6 com os hidrogênios H7 e C5a-CH₃; o hidrogênio C5a-CH₃ também mostrou uma correlação com o hidrogênio H9b; o hidrogênio H9b mostrou outra correlação com o hidrogênio H3; o hidrogênio H3 também mostrou uma outra correlação com o hidrogênio C3-CH₃; e outras duas correlações presentes foram entre os hidrogênios H4 α e H5 α , e entre H5 β e H4 β .

As correlações entre os hidrogênios C5a-CH₃-H9b e H3-H9b são inconsistentes com a configuração relativa *ii*, porque C5a-CH₃ e H9b estão em lados opostos nesta estrutura, bem como o H3 e o H9b. Por outro lado, a configuração relativa *i* é completamente consistente com as correlações detectadas no espectro de RMN NOESY. Vale salientar que as correlações observadas entre os hidrogênios H6-H7, H6-C5a-CH₃, H3-C3-CH₃, H4 α -H5 α , H5 β -H4 β não são relevantes para a elucidação da estereoquímica da molécula, pois estas interações estão presentes em todos os diastereoisômeros.

Portanto, podemos concluir que a atribuição realizada por RDC, da configuração relativa, está em concordância com as medidas dos valores das constantes de acoplamento escalares 3J e do NOE.

A.4 – CÁLCULOS TEÓRICOS DE DESLOCAMENTO QUÍMICO E CONSTANTES DE ACOPLAMENTO

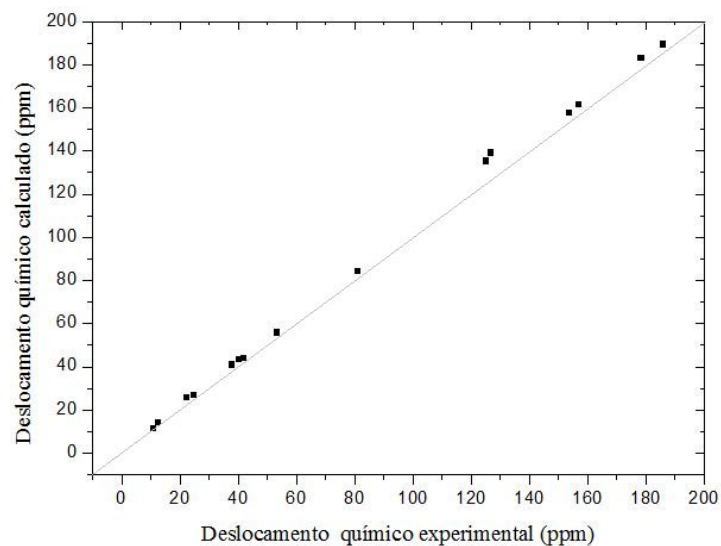
As blindagens químicas foram calculadas ao nível PBE0/pcS-1//B3LYP/6-31G* e convertidos a deslocamentos químicos após calcular a blindagem do TMS ao mesmo nível de cálculo, e logo depois re-escalados mediante regressão linear aos valores experimentais. Os desvios quadráticos médios mais baixos foram obtidos para os diastereoisômeros *i* e *v*, com valores de 5.69 e 5.53ppm respectivamente.

As constantes de acoplamento escalares vizinhas próton-próton foram também calculadas ao mesmo nível, e também escaladas mediante regressão linear aos valores experimentais. Novamente os desvios menores foram para os diastereoisômeros *i* e *v* com valores de 1.7 e 2.1ppm.

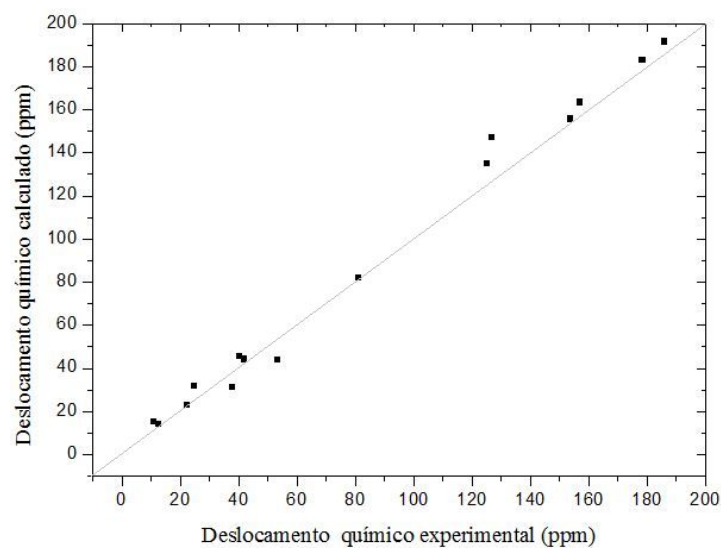
A comparação dos deslocamentos químicos calculados e experimentais e das constantes de acoplamento escalar calculados e experimentais são mostrados nos gráficos a seguir:

A.4.1 – CORRELAÇÃO DOS VALORES DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPERIMENTAIS VS. CALCULADOS

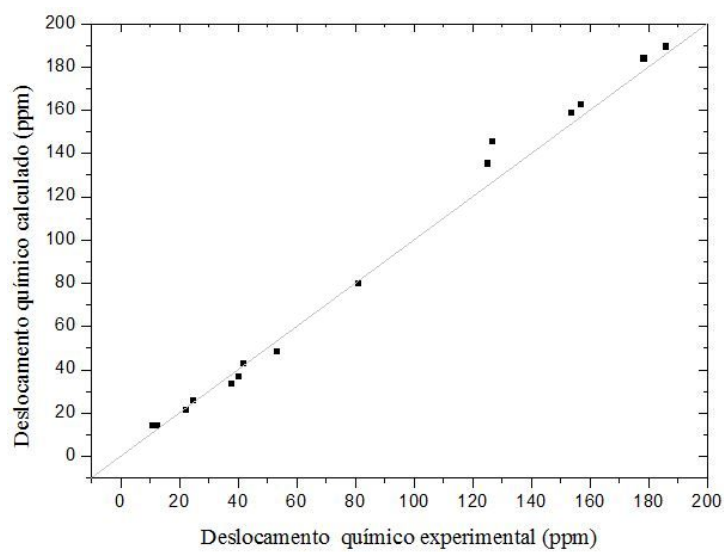
DIASTERIOISÔMEROS *i*:



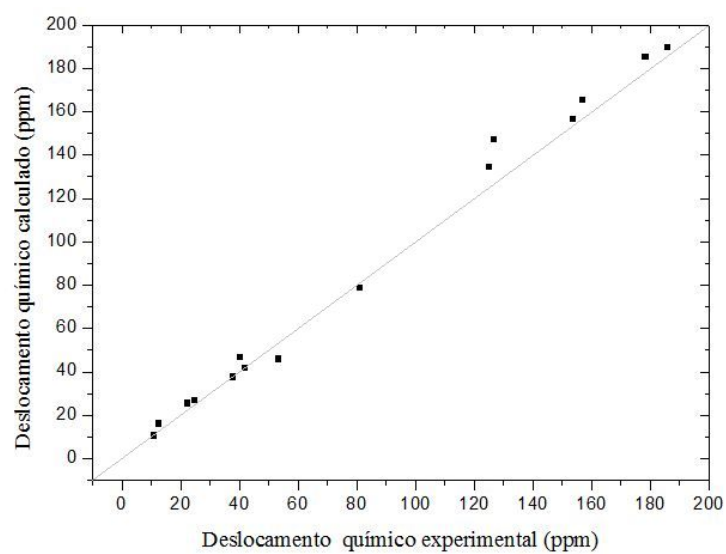
DIASTERIOISÔMEROS *ii*:



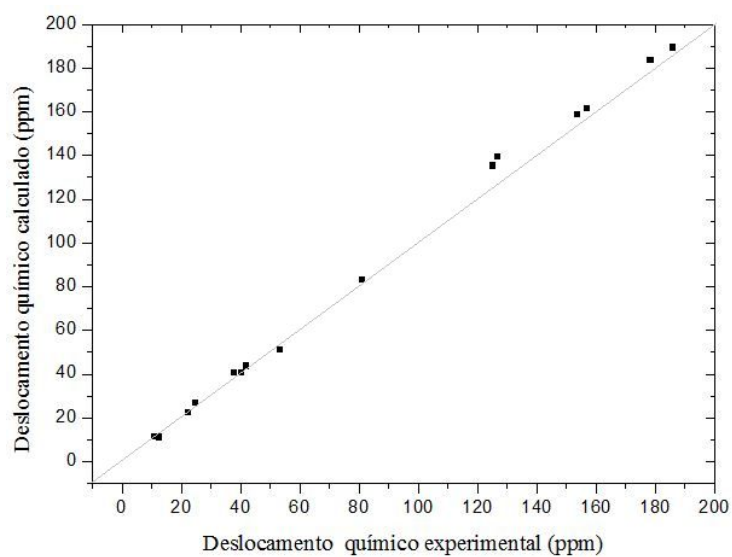
DIASTERIOISÔMEROS *iii*:



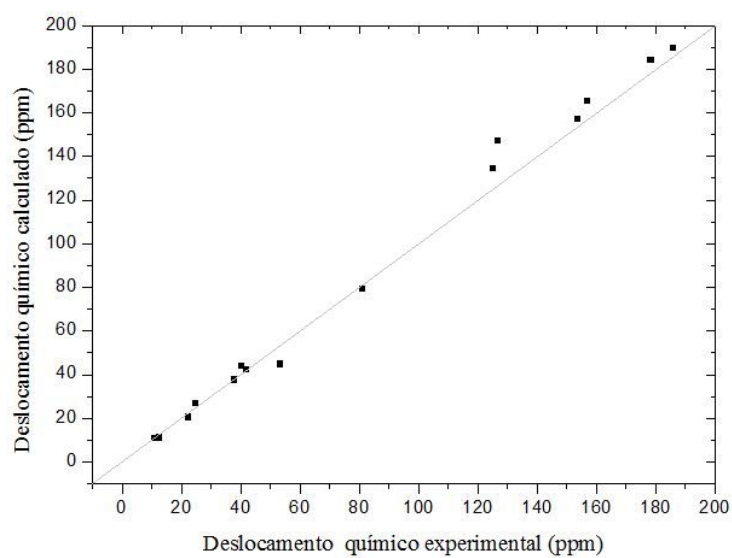
DIASTERIOISÔMEROS *iv*:



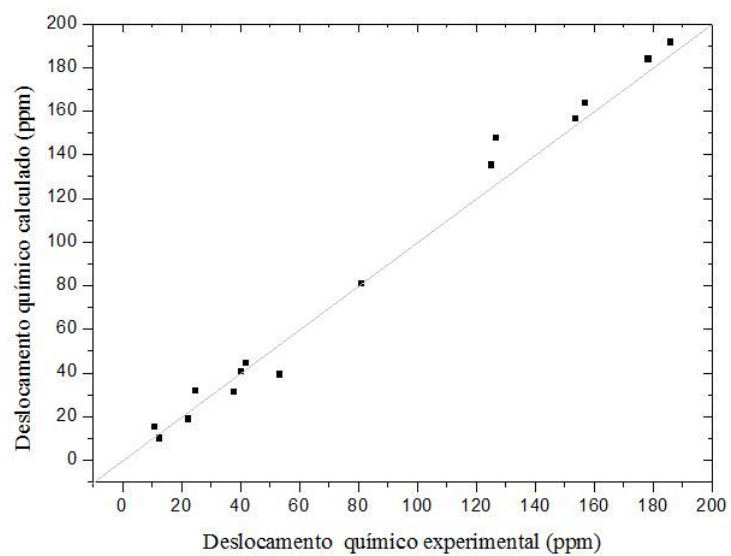
DIASTERIOISÔMEROS *v*:



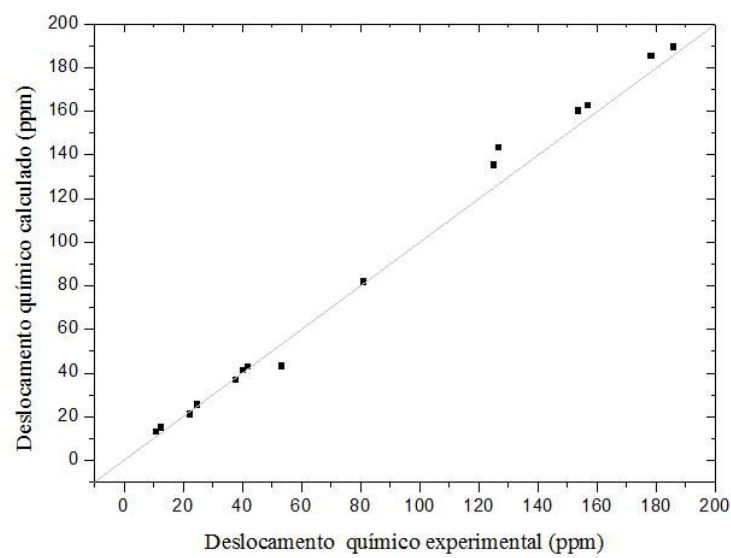
DIASTERIOISÔMEROS *vi*:



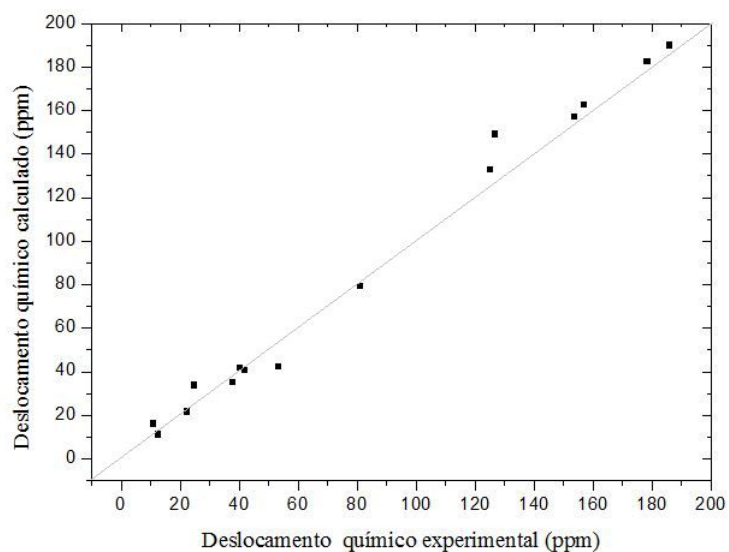
DIASTERIOISÔMEROS *vii*:



DIASTERIOISÔMEROS *viiiA*:

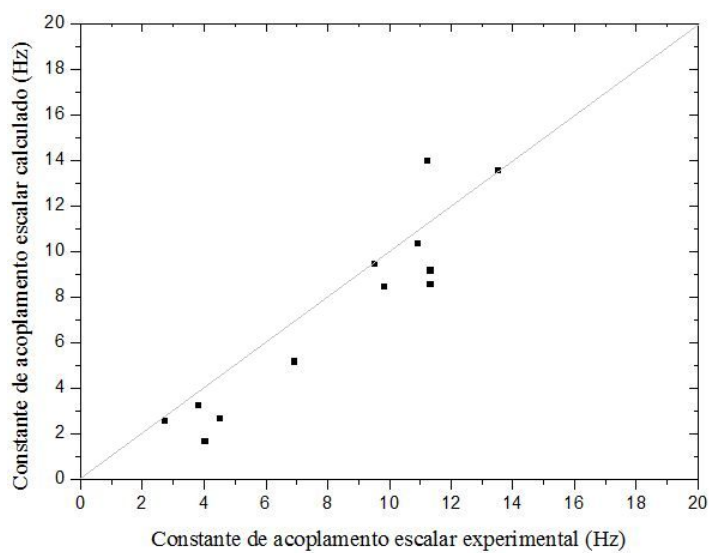


DIASTERIOISÔMEROS *viiiB*:

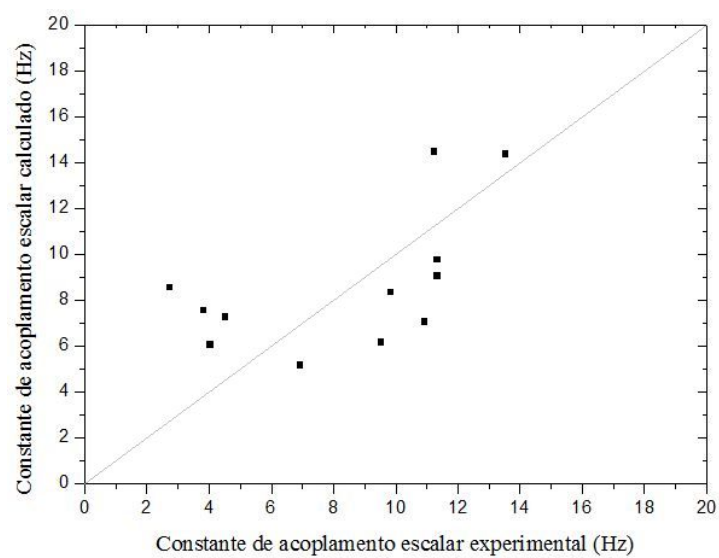


A.4.2 – CORRELAÇÃO DOS VALORES DAS CONSTANTES DE ACOPLAMENTO ESCALAR EXPERIMENTAIS VS. CALCULADOS

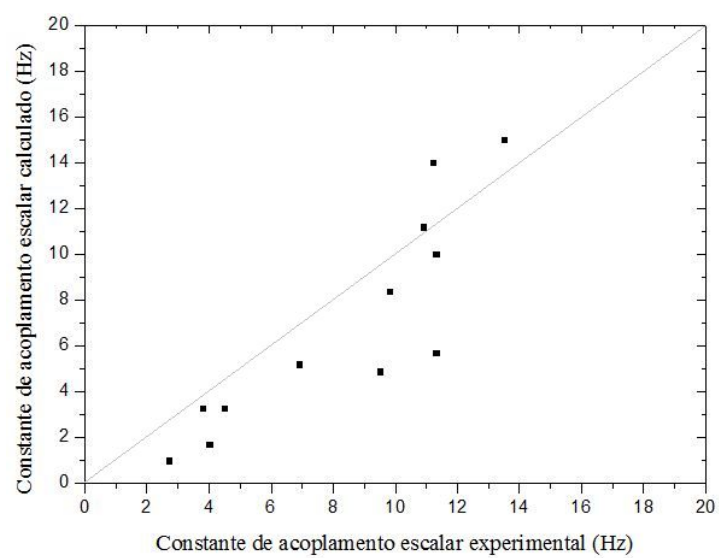
DIASTERIOISÔMEROS *i*:



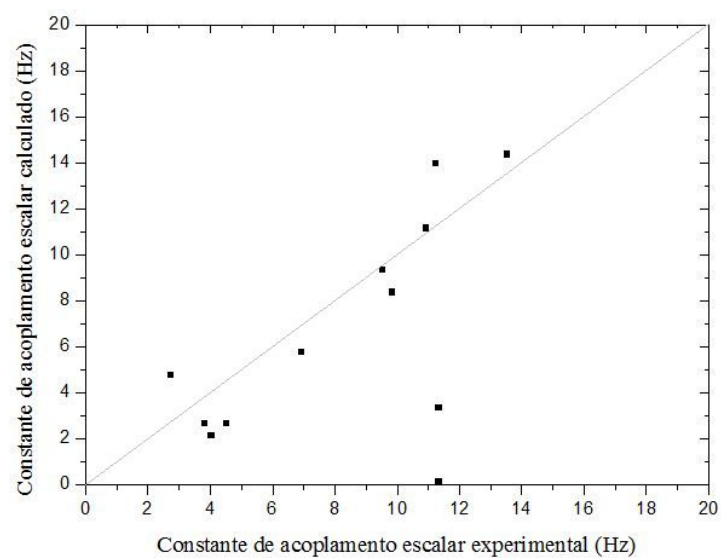
DIASTERIOISÔMEROS *ii*:



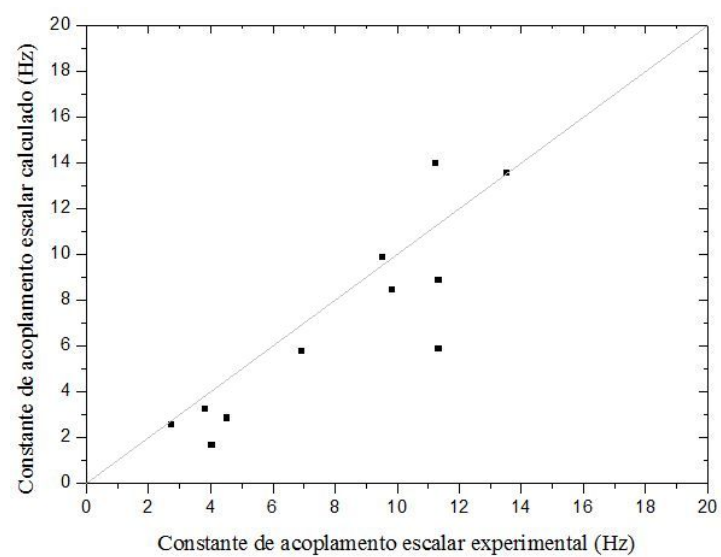
DIASTERIOISÔMEROS *iii*:



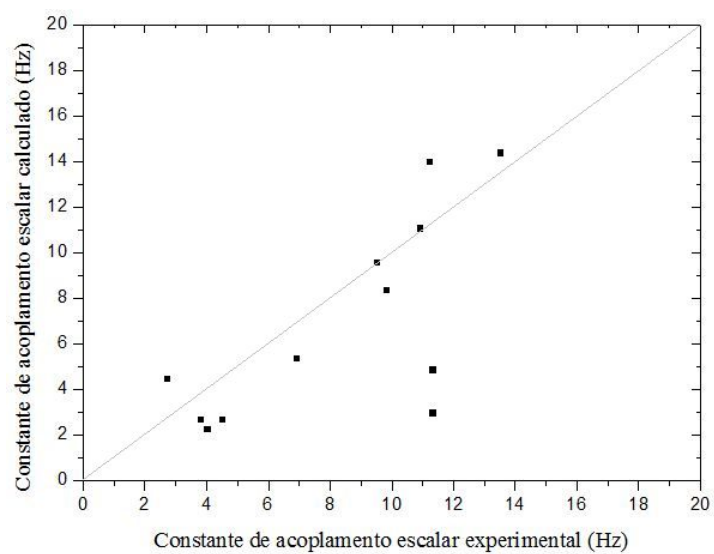
DIASTERIOISÔMEROS *iv*:



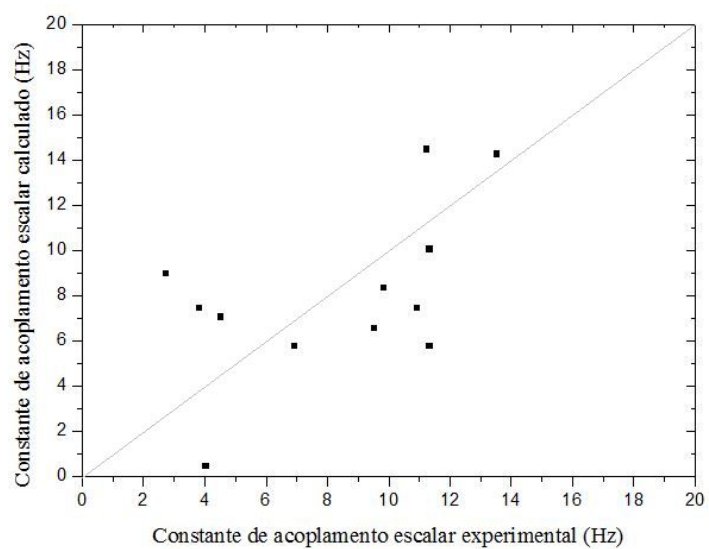
DIASTERIOISÔMEROS *v*:



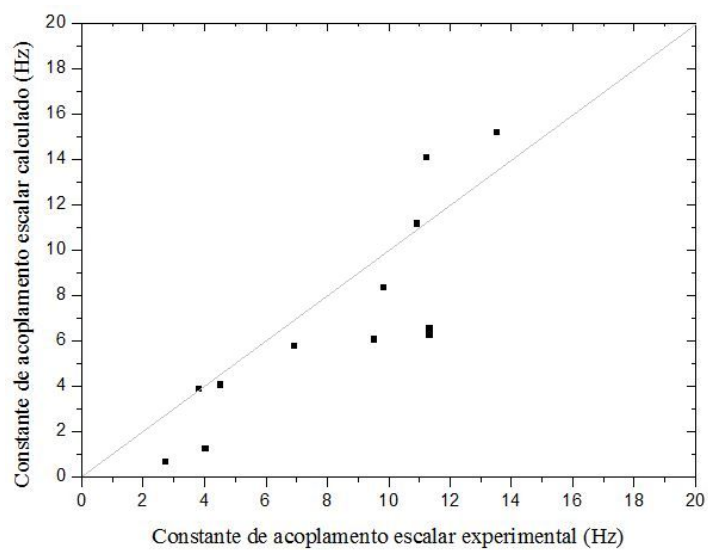
DIASTERIOISÔMEROS *vi*:



DIASTERIOISÔMEROS *vii*:



DIASTERIOISÔMEROS *viiiA*:



DIASTERIOISÔMEROS *viiiB*:

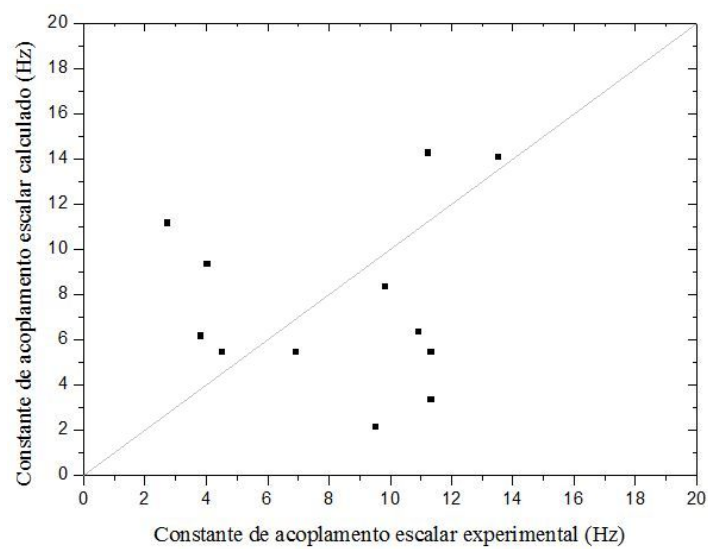


Tabela A4. Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C experimentais e calculados para os oito diferentes diastereoisômeros da α -Santonina. Além disso, estão incluídos os valores de DQM, R^2 , a e b para o ajuste linear entre os dados experimentais e calculados.

Carbonos	Experimental (ppm)	<i>i</i> (ppm)	<i>ii</i> (ppm)	<i>iii</i> (ppm)	<i>iv</i> (ppm)	<i>v</i> (ppm)	<i>vi</i> (ppm)	<i>vii</i> (ppm)	<i>viiiA</i> (ppm)	<i>viiiB</i> (ppm)
C8	185,67	189,75	192,05	189,79	190,16	189,73	190,08	192,09	189,80	190,33
C2	178,05	183,40	183,57	184,27	185,47	184,04	184,64	184,29	185,54	182,9
C9a	153,32	158,22	156,07	159,15	157,06	159,14	157,57	156,83	160,50	157,63
C9	126,37	139,52	147,53	145,78	147,45	139,91	147,57	147,95	143,83	149,46
C3	40,00	43,75	46,12	37,26	47,26	41,26	44,39	41,06	41,61	42,03
C6	156,63	162,00	163,90	162,98	165,72	161,99	165,85	164,21	163,03	163,03
C7	124,73	135,65	135,54	135,81	134,87	135,69	134,97	135,67	135,73	133,36
C9b	80,69	84,69	82,36	80,38	79,09	83,53	79,65	81,23	82,12	79,76
C3a	53,06	56,25	44,27	48,80	46,34	51,70	45,24	39,75	43,62	42,70
C5a	41,55	44,35	44,75	43,33	42,34	44,08	42,63	44,96	43,26	41,00
C5	37,41	41,29	31,54	33,85	38,04	41,02	38,05	31,75	37,30	35,72
C4	22,03	26,32	23,30	21,81	25,82	22,96	20,82	19,38	21,59	21,95
C5a- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	24,57	27,26	32,33	26,22	27,08	27,18	27,10	32,20	25,86	34,15
C3- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	12,22	14,58	14,63	14,75	16,60	11,63	11,56	10,39	15,38	11,58
C9- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	10,66	11,79	15,76	14,58	11,09	11,88	11,19	15,80	13,52	16,45
DQM		5,69	7,97	6,81	7,57	5,53	7,36	8,38	6,87	7,97
R^2		0,99814	0,99039	0,9939	0,99241	0,99761	0,99293	0,98872	0,99417	0,98899
a		1,02535	1,04052	1,05181	1,04418	1,03969	1,05749	1,05888	1,05195	1,04287
b		2,68293	1,08233	-0,85333	0,82424	0,61885	-1,15561	-1,52154	-0,60305	0,10866

Tabela A5. Comparação das constantes de acoplamento escalar experimentais e calculadas para os oito diferentes diastereoisômeros da α -Santonina. Além disso, estão incluídos os valores de DQM, R^2 , a e b para o ajuste linear entre os valores experimentais e calculados.

Hidrogênios acoplando	Experimental (Hz)	<i>i</i> (Hz)	<i>ii</i> (Hz)	<i>iii</i> (Hz)	<i>iv</i> (Hz)	<i>v</i> (Hz)	<i>vi</i> (Hz)	<i>vii</i> (Hz)	<i>viiiA</i> (Hz)	<i>viiiB</i> (Hz)
C3-CH ₃ / H3	6,9	5,2	5,2	5,2	5,8	5,8	5,4	5,8	5,8	5,5
H9b/ H3a	11,3	8,6	9,8	5,7	3,4	8,9	3,0	10,1	6,3	3,4
H6/ H7	9,8	8,5	8,4	8,4	8,4	8,5	8,4	8,4	8,4	8,4
H3/ H3a	11,3	9,2	9,1	10,0	0,2	5,9	4,9	5,8	6,6	5,5
H3a/ H4 α	2,7	2,6	8,6	1,0	4,8	2,6	4,5	9,0	0,7	11,2
H3a/ H4 β	9,5	9,5	6,2	4,9	9,4	9,9	9,6	6,6	6,1	2,2
H4 α / H4 β	13,5	13,6	14,4	15,0	14,4	13,6	14,4	14,3	15,2	14,1
H4 α / H5 α	4,5	2,7	7,3	3,3	2,7	2,9	2,7	7,1	4,1	5,5
H4 α / H5 β	4,0	1,7	6,1	1,7	2,2	1,7	2,3	0,5	1,3	9,4
H4 β / H5 α	10,9	10,4	7,1	11,2	11,2	10,3	11,1	7,5	11,2	6,4
H4 β / H5 β	3,8	3,3	7,6	3,3	2,7	3,3	2,7	7,5	3,9	6,2
H5 α / H5 β	11,2	14,0	14,5	14,0	14,0	14,0	14,0	14,5	14,1	14,3
<i>DQM</i>		1,7	3,0	2,6	4,2	2,1	3,3	3,4	2,7	4,9
R^2		0,87061	0,26620	0,74265	0,27437	0,02601	0,45513	0,23227	0,69574	0,08982
a		1,08472	0,46715	1,11116	0,75620	2,75534	0,85430	0,56084	1,05258	0,10150
b		-1,54343	4,82208	-2,22912	0,33614	-7,20670	-0,15976	3,44605	-1,74390	6,83426

A.5 – ANÁLISE DE RDC

Tabela A6. Valores do fator de qualidade (Q) obtidos para as quatro permutações possíveis dos oito diastereoisômeros do composto **1** alinhado no gel PAN.

Configuração relativa	Permutações			
	A	B	C	D
<i>i</i>	0,286	0,495	0,277	0,502
<i>ii</i>	0,617	0,350	0,624	0,313
<i>iii</i>	0,516	0,593	0,547	0,601
<i>iv</i>	0,440	0,651	0,485	0,646
<i>v</i>	0,382	0,651	0,313	0,642
<i>vi</i>	0,540	0,560	0,559	0,517
<i>vii</i>	0,654	0,687	0,701	0,750
<i>viii</i>	0,595	0,710	0,611	0,691

Tabela A7. Valores do fator de qualidade (Q) obtidos para as quatro permutações possíveis dos oito diastereoisômeros do composto **1** alinhado no gel PH.

Configuração relativa	Permutações			
	A	B	C	D
<i>i</i>	0,020	0,021	0,067	0,042
<i>ii</i>	0,038	0,173	0,059	0,064
<i>iii</i>	0,038	0,069	0,065	0,103
<i>iv</i>	0,042	0,020	0,097	0,089
<i>v</i>	0,021	0,021	0,067	0,043
<i>vi</i>	0,042	0,020	0,097	0,089
<i>vii</i>	0,038	0,175	0,062	0,062
<i>viii</i>	0,077	0,056	0,052	0,032

Tabela A8. Valores do fator de qualidade (Q) obtidos para as quatro permutações possíveis dos oito diastereoisômeros do composto **1** alinhado no gel PMMA. Sem procedimento *bootstrapping*.

Configuração relativa	Permutações			
	A	B	C	D
<i>i</i>	0,072	0,26	0,581	0,67
<i>ii</i>	0,27	0,471	0,197	0,284
<i>iii</i>	0,308	0,552	0,502	0,594
<i>iv</i>	0,18	0,341	0,585	0,511
<i>v</i>	0,138	0,319	0,508	0,653
<i>vi</i>	0,16	0,308	0,531	0,427
<i>vii</i>	0,221	0,516	0,455	0,685
<i>viii</i>	0,564	0,796	0,452	0,636

Tabela A9. Valores do fator de qualidade (Q) obtidos para as quatro permutações possíveis dos oito diastereoisômeros do composto **1** alinhado no gel PMMA. Com procedimento *bootstrapping* com $N=256$ e erro superestimado coletivamente como 1,5Hz.

	Configuração relativa		Permutações	
	A	B	C	D
<i>i</i>	0,132($\pm 0,027$)	0,281($\pm 0,037$)	0,583($\pm 0,032$)	0,67($\pm 0,029$)
<i>ii</i>	0,292($\pm 0,038$)	0,476($\pm 0,037$)	0,223($\pm 0,035$)	0,299($\pm 0,034$)
<i>iii</i>	0,322($\pm 0,03$)	0,557($\pm 0,028$)	0,507($\pm 0,033$)	0,596($\pm 0,03$)
<i>iv</i>	0,209($\pm 0,032$)	0,355($\pm 0,036$)	0,586($\pm 0,036$)	0,514($\pm 0,033$)
<i>v</i>	0,173($\pm 0,028$)	0,335($\pm 0,035$)	0,511($\pm 0,034$)	0,653($\pm 0,029$)
<i>vi</i>	0,193($\pm 0,033$)	0,325($\pm 0,036$)	0,536($\pm 0,037$)	0,434($\pm 0,036$)
<i>vii</i>	0,245($\pm 0,036$)	0,522($\pm 0,034$)	0,463($\pm 0,032$)	0,687($\pm 0,027$)
<i>viii</i>	0,612($\pm 0,033$)	0,757($\pm 0,029$)	0,703($\pm 0,028$)	0,843($\pm 0,02$)

Tabela A10. Valores do fator de qualidade (Q) obtidos para o cálculo apenas com os valores de $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$, para os oito diastereoisômeros do composto **1** alinhado no gel PMMA.

Configuração Relativa	Fator Q
<i>i</i>	0,265
<i>ii</i>	0,236
<i>iii</i>	0,361
<i>iv</i>	0,303
<i>v</i>	0,26
<i>vi</i>	0,308
<i>vii</i>	0,232
<i>viii</i>	0,31

Tabela A11. Valores do fator de qualidade (Q) obtidos para o cálculo com os valores de $\Delta\Delta\text{RCSA}_i$ e ΔRDCs associados, para os oito diastereoisômeros do composto **1** alinhado no gel PMMA.

Configuração Relativa	Fator Q
<i>i</i>	0,606
<i>ii</i>	0,7
<i>iii</i>	1,396
<i>iv</i>	1,193
<i>v</i>	0,678
<i>vi</i>	0,96
<i>vii</i>	0,881
<i>viii</i>	1,218

A.6 – EXEMPLO DO TENSOR DE ALINHAMENTO OBTIDO PARA O CÁLCULO DA α -SANTONINA (ESTRUTURA *i*) ALINHADA NO GEL PAN

Distribution size=64

Distribution type=Gaussian

RDC general Std.Dev=0,5 Hz

Alignment tensor

$\langle A_x \rangle = 1,328\text{e-}06$ Std.Dev = $2,849\text{e-}05$

$\langle A_y \rangle = -1,892\text{e-}05$ Std.Dev = $3,659\text{e-}04$

$\langle A_z \rangle = 1,759\text{e-}05$ Std.Dev = $3,873\text{e-}04$

Quality factors statistic

$\langle Q \rangle = 0,286$

StdDev(Q) = 0,044

Highest Q = 0,412

Lowest Q = 0,196

	Exp [Std.Dev] Hz	Comp [Std.Dev] Hz*
C6,H6	5,70[0,30]	4,96[0,28]
C7,H7	-3,20[0,50]	-3,20[0,47]
C3- <u>C</u> H ₃ , C3-CH ₃	4,80[0,90]	5,02[0,47]
C9- <u>C</u> H ₃ , C9-CH ₃	-1,60[0,40]	-1,43[0,09]
C5a- <u>C</u> H ₃ , C5a-CH ₃	-1,80[0,20]	0,75[0,35]
C3,H3	3,30[0,50]	3,11[0,56]
C3a,H3a	3,50[0,90]	4,70[0,44]
C5,H5 β	-1,30[0,20]	-0,41[0,39]
C5,H5 α	5,90[1,00]	6,44[0,67]
C4,H4 β	5,40[1,00]	3,97[0,43]
C4,H4 α	3,60[1,00]	3,63[0,77]

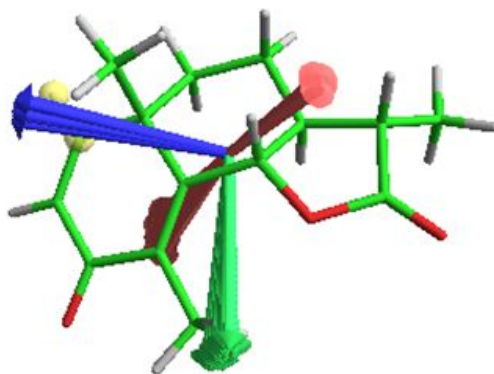


Figura A5. Representação dos eixos principais dos tensores de alinhamento computados para os sessenta e quatro *bootstrapping* conjunto de dados; azul, Az; verde, Ay; vermelho, Ax