

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais - PGMTR

Cleyton Marcos de Melo Sousa

**SÍNTESE E APLICAÇÃO DE FASES CROMÔNICAS USADAS NA
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE PEQUENAS MOLÉCULAS
ORGÂNICAS EM RMN**

Recife

2019

Cleyton Marcos de Melo Sousa

**SÍNTESE E APLICAÇÃO DE FASES CROMÔNICAS USADAS NA
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE PEQUENAS MOLÉCULAS
ORGÂNICAS EM RMN**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Materiais.

Área de concentração: Materiais Não Metálicos

Orientador: Prof. Dr. Armando Navarro-Vázquez

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique Lago Falcão

Recife

2019

Catálogo na fonte
Bibliotecária Arabelly Ascoli CRB4-2068

S725s Sousa, Cleyton Marcos de Melo
 Síntese e aplicação de fases cromônicas usadas na elucidação
 estrutural de pequenas moléculas orgânicas em RMN / Cleyton
 Marcos de Melo Sousa. – 2019.
 186 f.: il. fig., tab.

 Orientador: Armando Navarro-Vázquez
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
 CCEN. Ciência de Materiais. Recife, 2019.
 Inclui referências e apêndices.

 1. Fases cromônicas. 2. TP6EO2M. 3. Cromoglicato de sódio.
 4. RDC. I. Navarro-Vázquez, Armando (orientador). II. Título.

 620.19 CDD (22. ed.) UFPE-CCEN 2020-121

CLEYTON MARCOS DE MELO SOUSA

**SÍNTESE E APLICAÇÃO DE FASES CROMÔNICAS USADAS NA
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE PEQUENAS MOLÉCULAS
ORGÂNICAS EM RMN**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 20/12/2019.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Armando Navarro-Vázquez (Orientador)
Departamento de Química Fundamental – UFPE

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria (Examinador Externo)
Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPE

Prof. Dr. Jefferson Luiz Princival (Examinador Externo)
Departamento de Química Fundamental – UFPE

Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva (Examinador Externo)
Departamento de Química Fundamental – UFPE

Prof. Dr. Wilson Barros Júnior (Examinador Externo)
Departamento de Física – UFPE

Aos meus pais Antônia Carreiro e Raimundo Pacheco e minha irmã Maria de Melo que me deram todo apoio durante minha carreira acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Para entrar no mundo acadêmico é preciso, antes de mais nada, ousadia e, depois, ter consciência que muitas dificuldades serão enfrentadas ao longo de toda jornada, podendo levá-lo ao recuo ou na menor das hipóteses a reflexões que sem o outro não é possível construir quase nada. Sendo assim, venho através destas poucas linhas estender meus agradecimentos a quem tenha contribuído para minha formação, além de acadêmica, também mais humanizada:

A Deus-Pai pela ajuda espiritual presente em minha vida em todos os momentos;

À minha esposa, Francisca Vânia da Silva, pelo companheirismo, compreensão e ajuda em todos os instantes em que mais preciso;

Às minhas filhas, Dávila Gabriela Silva de Melo e Ayla Maria Silva de Melo, pelas brincadeiras encantadoras e revigorantes aos finais de semana;

Aos meus pais, Antônia Carreiro e Raimundo Pacheco, pelas pessoas que são em minha vida;

Ao meu orientador, Professor Dr. Armando Navarro-Vázquez, pela contribuição em minha formação acadêmica e pela disposição incansável de ajudar-me;

Ao meu co-orientador, Professor Dr. Eduardo Falcão, pelas orientações concedidas principalmente no início do doutorado;

Ao Professor Dr. Fernando Hallwass pelas explicações valiosas sempre que solicitado;

Ao Professor Dr. Cláudio Tormena do IQ-Unicamp por ter-me aceitado no seu laboratório para um estágio, bem como, aos seus orientandos Thaís Mendonça e Kahlil Salome por terem-me auxiliado durante todo o estágio;

À professora Dra. Magdalena Cid da Universidade de Vigo (UVigo-Espanha) por suas valiosas orientações e pelo espaço cedido no seu laboratório para um estágio, bem como, todos os seus orientandos: Fernán García, Jonathan García, Maria Silva e Victor Rubio pelo companheirismo e os momentos de descontração;

Aos professores do Departamento de Química Fundamental da UFPE Dra. Giovannia Pereira, Dra. Ivani Malvestiti e Dr. Jorge Neves pela participação na banca examinadora de qualificação e suas sugestões;

Aos meus amigos de laboratório da UFPE Adonias França, Danilo Bernardo, Daiane Carvalho, Eric Braga, Gabriela Cavalcante, Higor Melo e Letícia Correa pelos momentos de descontração;

À central analítica do departamento de química da UFPE e aos técnicos pelo trabalho prestado sempre que necessitamos;

Em nome da professora Elaine Rocha, atual diretora do Campus Caruaru do Instituto Federal de Pernambuco, gostaria também de agradecer ao IFPE pela concessão do afastamento do trabalho;

Ao programa de pós-graduação em Ciência de Materiais da UFPE;

À CAPES pela bolsa concedida obtida pelo programa de formação doutoral docente do edital de 06/2017 do IFPE;

À FACEPE pela ajuda financeira (APQ-0507-1.06/15).

RESUMO

O presente trabalho visa o desenvolvimento de fases cromônicas e sua aplicação à RMN em meios orientados. Na primeira seção, foi otimizada a síntese do mesógeno discótico trifenilênico TP6EO2M a partir da condensação do 2,3,6,7,10,11-hexahidroxitriifenileno com o mesilato de polietilenoglicol. As melhores condições reacionais consistiram no uso de K_2CO_3 dissolvido em DMF ou EtOH e recristalização de *tert*-butilmetil éter (*t*BME) atingindo-se um rendimento de 52 % de cristais com elevado grau de pureza quando a reação foi realizada em DMF e 32 % quando a reação foi realizada em EtOH. Na segunda seção, foi avaliada a possível aplicação das fases cromônicas, nomeadamente o TP6EO2M e o cromoglicato de sódio (DSCG), para a determinação da conformação de diversos compostos naturais (sacarose, cefuroxima e monocrotalina) em solvente aquoso mediante o uso de fases cromônicas. O sistema escolhido para sacarose e cefuroxima foi o uso da fase cromônica formada pelo TP6EO2M em D_2O , enquanto a molécula de monocrotalina foi submetida a alinhamento na fase liotrópica formada pelo cromoglicato de sódio. Os parâmetros anisotrópicos como acoplamento dipolar residual (RDC) e anisotropia do deslocamento químico residual (RCSA) foram medidos, respectivamente, por diferença dos acoplamentos totais e deslocamentos químicos a temperaturas tão próximas quanto possível à temperatura de transição entre as fases nemática e isotrópica. A formação completa das fases nemática e isotrópica no sistema TP6EO2M/ D_2O /sacarose foi atingida a temperaturas, respectivamente, de 16 °C e 19 °C, enquanto no sistema TP6EO2M/ D_2O /cefuroxima estas temperatura foram de 12 °C e 17 °C. Já as fases nemática e isotrópica foram atingidas a uma temperatura de 23 °C e 28 °C para um sistema de cromoglicato de sódio (7,7 % m/m)/NaCl (0,3 M)/ D_2O . Os sinais dos espectros de RMN 1H e ^{13}C da sacarose, cefuroxima e monocrotalina foram atribuídos com o auxílio de experimentos de RMN uni e bidimensionais. Os espaços conformacionais da sacarose, cefuroxima e da monocrotalina foram explorados mediante mecânica molecular. A análise dos *ensemble* conformacionais obtidos para as três moléculas estudadas mostraram ao menos duas conformações limites. Para a sacarose estas conformações apresentaram ângulos torsonais Φ na faixa de 90 a 110° e Ψ no intervalo entre 300 a 340°, enquanto a cefuroxima mostrou elevada mobilidade das cadeias laterais, já a monocrotalina o espaço conformacional mostrou duas conformações limite onde as carbonilas nas posições C11 e C15 do macrociclo têm orientações paralelas ou antiparalelas.

Palavras-chave: Fases Cromônicas. TP6EO2M. Cromoglicato de Sódio. RDC. RCSA.

ABSTRACT

The present work aims at the development of chromonic phases and their application to NMR in oriented media. In the first section, the synthetic procedure for the obtention of the TP6EO2M discotic mesogen through condensation of 2,3,6,7,10,11-hexahydroxytriphenylene with polyethylene glycol mesylate was optimized. The best conditions for the key condensation step consisted in the use of K_2CO_3 dissolved in DMF or EtOH and recrystallization with *tert*-butyl methyl ether (*t*BME). A 52 % yield of high purity crystals was achieved when the reaction was carried out in DMF and 32 % when the reaction was performed in EtOH. In the second section, the chromonic phases formed by the TP6EO2M and sodium cromoglycate (DSCG) mesogens were evaluated as possible aligning media to be used in conformational studies of natural compounds (sucrose, cefuroxime and monocrotaline) in aqueous solution. The system chosen for sucrose and cefuroxime was the TP6EO2M/D₂O system while the monocrotaline molecule was aligned in the lyotropic phase formed by sodium cromoglycate/NaCl. Anisotropic parameters such as residual dipolar coupling (RDC) and residual chemical shift anisotropy (RCSA) were measured, respectively, by difference of total couplings and chemical displacements at temperatures as close as possible to the transition temperature between the nematic and isotropic phases. The nematic and isotropic phases in the TP6EO2M/D₂O/sucrose system were reached at temperature of 16 °C and 19 °C respectively, while in the TP6EO2M/D₂O/cefuroxime system the respective temperatures were of 12 °C and 17 °C. In the sodium cromoglycate (7,7 % w / w)/NaCl (0,3 M)/D₂O system the anisotropic and isotropic phases were fully formed at 23 °C and 28 °C. Signals of the ¹H and ¹³C NMR spectra of sucrose, cefuroxime and monocrotaline were assigned with the aid of one and two-dimensional NMR experiments. The conformational spaces of sucrose, cefuroxime and monocrotaline were explored through molecular mechanics conformational search procedures. The analysis of the conformational ensemble obtained for the three studied molecules showed at least two limit conformations. For sucrose these conformations presented torsional angles Φ in the range of 90 to 110° and Ψ in the range between 300 to 340°. Cefuroxime showed high mobility of the side chains, whereas in monocrotaline the conformational space showed two limit conformations where the carbonyls at positions C11 and C15 of the macrocycle present parallel or anti-parallel orientations.

Keywords: Chromonic Phases. TP6EO2M. Sodium Cromoglycate. RDC. RCSA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1–	Relação de Karplus – dependência da constante de acoplamento 3J com ângulo diedro (θ).	26
Figura 2–	Anotação de Altona: posições dos substituintes “positivos” e “negativos” em relação aos prótons acoplados. Adaptada de Haasnoot et al. ⁴	27
Figura 3–	Padrão geral para o butano e pentano. Todos os 2157 modelos foram construídos variando em cada etapa o ângulo de torção (θ) e mudando o padrão de substituição nas posições $Si \pm$ como também permutando os substituintes X, Y e Z. Adaptada de Palermo et al. ⁵	28
Figura 4–	Estrutura molecular hipotética onde não seria possível determinar a configuração relativa dos dois centros estereogênicos através da medida dos acoplamentos escalares ou efeitos NOE. Fonte de Gil et al. ⁶	29
Figura 5–	Moléculas estudadas mediante alinhamento em fases cromônicas por Navarro-Vázquez e colaboradores. ⁵⁷⁻⁵⁹	34
Figura 6–	Estruturas discóticas do ácido fenatrenossulfônico e do cromoglicato de sódio...35	35
Figura 7–	Representação ilustrativa do mesôgeno do cristal líquido discótico com centro rígido trifenilênico.	35
Figura 8–	Exemplos de mesógenos cromônicos não-iônicos (2,3,6,7,10,11-hexa-(1,4,7-trioxaoctil)-trifenileno), aniônicos (Benzopurpurina 4 B) e catiônico ([(Terpiridil)PtC≡CC ₆ H ₅]Cl).	36
Figura 9–	Unidades básicas de mesógenos monoméricos, diméricos, oligoméricos e poliméricos dos cristais líquidos discóticos.....	37
Figura 10–	Estruturas propostas para as fases cromônicas nemáticas N e M. Adaptada de Lydon. ⁶⁰	39
Figura 11–	Modelos postulados por Harrison, et al., 1996 para a coluna da mesofase do corante de cianina aniônico em meio aquoso; (A) cilindro oco uniaxial e (B) pilha retangular biaxial. Adaptada de Harrison et al. ⁷²	40
Figura 12–	Mesógenos cromônicos iônicos com presença de carboxilato e sulfonato.....	41
Figura 13–	Diagrama de fases do sistema cromoglicato de sódio/água. Adaptada de Lydon. ⁶¹	41
Figura 14–	Variedades de estruturas discóticas baseadas no esqueleto trifenilênico.	42
Figura 15–	(A) A molécula 2,3,6,7,10,11-hexa-(1,4,7-trioxaoctil)-trifenileno, TP6EO2M; (B) Projecção do eixo a da molécula mostrando o centro trifenilênico com as cadeias de	

	etilenoglicol estendidas e não-estendidas; (C) Projeção do eixo b mostrando o ângulo de inclinação do centro trifenilênico. Fonte de Boden et al. ⁷⁹	43
Figura 16–	Diagrama de fases do sistema TP6EO2M/D ₂ O adquirido mediante observação de espectros de RMN- ² H mostrando a fase isotrópica (I), a fase nemática (Nc) e a fase hexagonal (C _H). Fonte de Boden et al. ⁸⁰	44
Figura 17–	Sobreposição de dados entre o diagrama de fases para TP6EO2M/D ₂ O determinado por espectroscopia de RMN- ² H e a transição de temperatura para o TP6EO2M analisada em EWE. Fase isotrópica (I); fase nemática colunar (Nc); fase nemática colunar hexagonal (Col _h). Adaptada de Al-Lawati <i>et al.</i> ⁷⁷	45
Figura 18–	Série de moléculas TP6EO _n M simuladas em dinâmica de partículas dissipativas no meio aquoso para observar o comportamento de agregação.	46
Figura 19–	Rota sintética convencional para obtenção do TP6EO2M.	47
Figura 20–	Tempo de retenção das impurezas na fração do TP6EO2M em HPLC preparativo (eluente isocrático água/Aetonitrila 40 %) após purificação em cromatografia em coluna de sílica gel. Fonte de Herbaut et al. ⁸⁷	48
Figura 21–	Acoplamento dipolar entre dois spins <i>I</i> e <i>S</i> . θ é o ângulo formado entre os vetores da ligação heteronuclear ¹ H – ¹³ C da molécula α -santonina e a direção do campo magnético externo B_0 . Adaptada de Teles <i>et al.</i> ¹²	51
Figura 22–	Cone de acoplamento dipolar entre os spins <i>I</i> e <i>S</i> . Adaptada de Thiele. ²⁶	52
Figura 23–	Linhas espectrais observadas nos meios isotrópico e anisotrópico.	53
Figura 24–	Ângulo θ formado entre os vetores <i>R</i> e <i>B</i>	54
Figura 25–	(A) Coordenadas de referência de laboratório x_L, y_L, z_L com <i>B</i> constante fixado no eixo z_L e <i>R</i> variando com o tempo; (B) Coordenadas de referência x, y, z fixadas na molécula com <i>B</i> variando com o tempo e <i>R</i> constante. Adaptada de Kramer et al. ⁹⁶	57
Figura 26–	Sistema principal de coordenadas x, y, z fixado no eixo principal da elipsoide. Adaptada de Kramer <i>et al.</i> ⁹⁶	64
Figura 27–	Representação gráfica do tensor de probabilidade <i>P</i> projetado no eixo do sistema de coordenada principal. (A) $P_x = P_y = 0,25$ e $P_z = 0,5$; (B) $P_x = 0,2$; $P_y = 0,3$ e $P_z = 0,5$; (C) tem $P_x = P_y = P_z = 1/3$. Adaptada de Kramer <i>et al.</i> ⁹⁶	65
Figura 28–	Moléculas alinhadas no meio anisotrópico $A \neq 0$ para as situações A e B; e não-alinhadas no meio isotrópico $A = 0$ para situação C.	66

Figura 29–	Projeção do vetor unitário r nos eixos do sistema principal de coordenadas x, y, z .	67
Figura 30–	Esquema geral para obtenção de informações estruturais usando RDCs.	73
Figura 31–	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 2,3,6,7,10,11-hexametoxitritifenileno (1).	83
Figura 32–	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 2,3,6,7,10,11-hexametoxitritifenileno (1).	83
Figura 33–	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do 2,3,6,7,10,11-hexahiroxitritifenileno (2).	85
Figura 34–	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do 2,3,6,7,10,11-hexahiroxitritifenileno (2).	85
Figura 35–	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 2-(2-metoxietoxi)etil metanosulfonato (3).	86
Figura 36–	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 2-(2-metoxietoxi)etil metanosulfonato (3).	87
Figura 37–	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do TP6EO2M (4).	89
Figura 38–	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do TP6EO2M (4).	89
Figura 39–	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 1,2-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)benzeno (5).	90
Figura 40–	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da reação purificada constatando a permanência do reagente de partida (5) sem a formação de TP6EO2M.	91
Figura 41–	Diagrama de fases do TP6EO2M em D_2O . Adaptado de Al-Lawati et al. ⁷⁷	98
Figura 42–	Quantidade em massa do TP6EO2M adicionado em D_2O contido em tubos de RMN de 3 e 5 mm para formar fase nemática.	98
Figura 43–	Substâncias coletadas em mistura nas primeiras frações da coluna cromatográfica de sílica gel.	105
Figura 44–	Cromatografia em camada delgada de sílica gel da reação (placa 1) e das frações 7 à 12 da coluna cromatográfica de sílica gel (placa 2 e 2'); A placa 2 e 2' é a mesma sendo primeiramente revelada em luz UV 254 nm e depois mergulhada na solução reveladora de KMnO_4 ; R.: Fração coletada da mistura reacional depois de 24h; 2: É o composto 2,3,6,7,10,11-hexahidroxitritifenileno (2); M.: Ponto misto.	107
Figura 45–	Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) das frações reunidas F7 à 12 proveniente da cromatografia em coluna de sílica gel da reação de síntese do TP6EO2M.	108

Figura 46– Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) das frações reunidas F7 à 12 proveniente da cromatografia em coluna de sílica gel da reação de síntese do TP6EO2M especificando os picos respectivamente para os componentes da mistura.	108
Figura 47– Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) das frações reunidas F7 à 12 provenientes da segunda cromatografia em coluna de sílica gel da reação de síntese do TP6EO2M.....	109
Figura 48– Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) das frações reunidas F7 à 12 provenientes da cromatografia em coluna de sílica gel da reação de síntese do TP6EO2M com indicação dos sinais no espectro para cada um dos componentes na mistura.	110
Figura 49– Reação principal de formação do TP6EO2M e secundária de formação do subproduto 2DEGCO ₃ (Composto 6).	110
Figura 50– Monitoramento do sinal quadrupolar do D ₂ O em RMN- ² H para observar transição de fase isotrópica (I)/anisotrópica (A) no sistema TP6EO2M/D ₂ O à medida que diminui à temperatura. (a) Meio completamente isotrópico; (b) Meio com presença de fases isotrópica e anisotrópica; (c) Meio completamente anisotrópico.	115
Figura 51– Monitoramento da transição de fase (isotrópica (I)/anisotrópica (A)) do sistema TP6EO2M/D ₂ O através do sinal D ₂ O ($\Delta\nu_Q$) em diferentes condições.	118
Figura 52– Estrutura da sacarose com a numeração identificando as posições dos carbonos. G e F são referentes, respectivamente, aos anéis glucopiranosil e frutofuranosil. ...	119
Figura 53– Espectro de RMN- ¹ H (600 MHz) da molécula de sacarose dissolvida em D ₂ O e analisada no meio isotrópico (23 °C).	120
Figura 54– Espectro de RMN- ¹³ C (150 MHz) da molécula de sacarose dissolvida em D ₂ O e analisada no meio isotrópico (23 °C).	120
Figura 55– Medida do desdobramento quadrupolar de ² H no sistema anisotrópico TP6EO2M/D ₂ O/sacarose em 16 °C realizada em RMN com campo de 9,4 T. (a) antes do HSQC-F1; (c) Depois da medida de HSQC-F1 e imediatamente antes de ¹³ C- ¹ H}.....	123
Figura 56– Espectros de HSQC (400 MHz) da sacarose acoplados em F1 nas temperaturas 16 °C (anisotrópico) e 19 °C (isotrópico) no sistema TP6EO2M/D ₂ O.	124
Figura 57– HSQC-F1 (400 MHz) dos sinais de contorno dos acoplamentos entre hidrogênios na região metilênica da sacarose.....	125
Figura 58– Espectro de RMN- ¹ H (600 MHz, D ₂ O) da sacarose.....	128
Figura 59– Espectros de ¹³ C- ¹ H} (100 MHz) da sacarose dissolvida no sistema TP6EO2M/D ₂ O evidenciando o carbono de referência 6g (60,100 ppm). (a) Meio	

	isotrópico obtido na temperatura de 19 °C; (b) Meio anisotrópico obtido na temperatura de 16 °C.	129
Figura 60–	Comparação entre fator Q adquiridos ao implementar a combinação de parâmetros M1-S2 e M2-S2 para os dados de RDCs da sacarose das permutações P ₁ à P ₈ . .	134
Figura 61–	Comparação entre fator Q adquiridos ao implementar a combinação de parâmetros M2-S1 e M2-S2 para os dados de RDCs da sacarose das permutações P ₁ à P ₈ . .	135
Figura 62–	Confórmeros da sacarose ajustados mediante uso dos RDCs implementados no método do tensor único no programa StereoFitter.	136
Figura 63–	Confórmeros da sacarose ajustados mediante uso dos RCSAs implementados no método do tensor único no programa StereoFitter.	137
Figura 64–	Estrutura da cefuroxima com a numeração identificando as posições dos carbonos.	138
Figura 65–	Espectros de RMN- ¹ H (300 MHz, D ₂ O) da molécula de cefuroxima.....	139
Figura 66–	Espectros de RMN- ¹³ C (300 MHz, D ₂ O) da molécula de cefuroxima.....	140
Figura 67–	Monitoramento da transição de fases isotrópica/anisotrópica no sistema TP6EO2M/D ₂ O/cefuroxima através do splitting quadrupolar de D ₂ O em diferentes temperaturas.....	142
Figura 68–	Espectros de HSQC-F1 (campo de 9,4 T) da cefuroxima dissolvida no sistema TP6EO2M/D ₂ O. (a) Espectro registrado na temperatura do sistema em 17 °C (isotrópico); (b) Espectro registrado na temperatura do sistema em 12 °C (anisotrópico).....	143
Figura 69–	Espectros de RMN- ¹ H (400 MHz) da cefuroxima dissolvida no sistema TP6EO2M/D ₂ O registrado em 12 °C (meio anisotrópico).....	143
Figura 70–	Espectro de ¹³ C- ¹ H (100 MHz) da cefuroxima dissolvida no sistema TP6EO2M/D ₂ O e mantida a 17 °C.....	145
Figura 71–	Espectro de ¹³ C- ¹ H (100 MHz) da cefuroxima dissolvida no sistema TP6EO2M/D ₂ O e mantida a 12 °C.....	145
Figura 72–	Confórmeros da cefuroxima ajustados mediante uso dos RCSAs implementados no método do tensor único no programa StereoFitter.	148
Figura 73–	Estrutura da monocrotalina com a numeração identificando as posições dos carbonos.....	149
Figura 74–	Espectro de RMN- ¹ H (600 MHz, D ₂ O) da molécula de monocrotalina.....	150
Figura 75–	Espectro de RMN- ¹³ C (150 MHz, D ₂ O) da molécula de monocrotalina.	150

Figura 76– Monitoramento da transição de fases isotrópica/anisotrópica no sistema DSCG/NaCl/D ₂ O/monocrotalina através do splitting quadrupolar de D ₂ O em diferentes temperaturas.....	152
Figura 77– Espectros de HSQC-F2 (campo de 9,4 T) da monocrotalina registrados nas temperaturas 23 °C (anisotrópico) e 28 °C (isotrópico).	153
Figura 78– Espectro de ¹³ C- ¹ H} (100 MHz) da monocrotalina dissolvida no sistema DSCG/NaCl/D ₂ O e mantida a 28 °C.	156
Figura 79– Espectro de ¹³ C- ¹ H} (100 MHz) da cefuroxima dissolvida no sistema TP6EO2M/D ₂ O e mantida a 23 °C.....	156
Figura 80– Conformações limites da monocrotalina.	158
Figura 81– Confórmeros syn (#1 e #4) para as carbonilas da monocrotalina computadas mediante o método do tensor único no programa MagNes.	159
Figura 82– Representação dos RCSAs calculados em MSpin contra os experimentais.....	162

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1–	Resumo das quatro etapas para síntese do TP6EO2M (4).....	99
Esquema 2–	Experimento de rota alternativa para adquirir o TP6EO2M a partir da trimerização oxidativa do 1,2-bis(2-(2-metoxietoxi)-etoxi) benzeno (5).	104
Esquema 3–	Proposta do mecanismo de síntese da obtenção do produto 2,3,6,7,10,11-hexametoxitrifenileno (composto 1).....	112
Esquema 4–	Proposta do mecanismo de síntese para obtenção do produto 2,3,6,7,10,11-hexahidrotрифenileno (composto 2).....	113
Esquema 5–	Proposta do mecanismo de síntese do 2-(2-metoxietoxi)etil metanosulfonato (MsODEG).....	114
Esquema 6–	Proposta do mecanismo de síntese do TP6EO2M (composto 4).....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Diferentes condições reacionais usadas na síntese do TP6EO2M (4).....	102
Tabela 2–	Diferentes condições de elaboração usadas na obtenção do TP6EO2M (4).	103
Tabela 3–	Atribuições dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para a molécula de sacarose dissolvida em D_2O e analisada no meio isotrópico ($23\text{ }^\circ\text{C}$).	121
Tabela 4–	Valores experimentais de RDCs obtidos em HSQC-F1 para sacarose no sistema TP6EO2M/ D_2O	127
Tabela 5–	Permutações dos RDCs adquiridos da sacarose no sistema TP6EO2M/ D_2O	128
Tabela 6–	RCSAs adquiridos da sacarose no sistema TP6EO2M/ D_2O	130
Tabela 7–	Fator de qualidade (Q) e ângulos torsonais (Φ ; Ψ) dos confórmeros obtidos dos RDCs da sacarose no sistema TP6EO2M/ D_2O na implementação M1-S1/M1-S2.	132
Tabela 8–	Fator de qualidade (Q) e ângulos torsonais (Φ ; Ψ) dos confórmeros obtidos dos RDCs da sacarose no sistema TP6EO2M/ D_2O na implementação M2-S1.	133
Tabela 9–	Fator de qualidade (Q) e ângulos torsonais (Φ ; Ψ) dos confórmeros obtidos dos RDCs da sacarose no sistema TP6EO2M/ D_2O na implementação M2-S2.	133
Tabela 10–	Fator de qualidade (Q) e ângulos torsonais (Φ ; Ψ) dos confórmeros obtidos dos RCSAs da sacarose no sistema TP6EO2M/ D_2O	137
Tabela 11–	Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C , δ (ppm), acoplamento escalar $^n\text{J}_{\text{H-H}}$ (Hz) da cefuroxima.	141
Tabela 12–	RCSAs adquiridos da cefuroxima dissolvida no sistema TP6EO2M/ D_2O	146
Tabela 13–	Fator de qualidade (Q) e porcentagem das populações dos confórmeros obtidos dos RCSAs da cefuroxima no sistema TP6EO2M/ D_2O	147
Tabela 14–	Atribuições dos deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C (ppm) e medida de acoplamento escalar, $\text{J}_{\text{H-H}}$ (Hz) para molécula de monocrotalina dissolvida em D_2O	151
Tabela 15–	Valores calculados de RDCs (HSQC-F2) para monocrotalina no sistema DSCG/ $\text{NaCl}/\text{D}_2\text{O}$	154
Tabela 16–	Permutações de RDCs da monocrotalina no sistema DSCG/ $\text{NaCl}/\text{D}_2\text{O}$ calculados em HSQC acoplados em F2.....	155
Tabela 17–	RCSAs adquiridos da monocrotalina dissolvida no sistema DSCG/ $\text{NaCl}/\text{D}_2\text{O}$..	157

Tabela 18– RDC experimental e calculado para monocrotalina em DSCG/NaCl/D₂O com os valores de Q, AIC, χ^2 , χ^2NRDC e porcentagem populacional dos conformeros para cada permutação. 160

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Fase anisotrópica
Aa	Componente axial
AcOEt	Acetato de etila
AIC	<i>Akaike Information Criterion</i>
ACN	Acetonitrila
Ar	Componente rômica
C	Quantidade em termos do número de condição
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CLIP-HSQC	<i>Clean in Phase – Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
CLL	Cristais líquidos liotrópicos
CLT	Cristais líquidos termotrópicos
Cmc	Concentração micelar crítica
Col	Colunar
Col _h	Colunar hexagonal
CR	Configuração relativa
CSA	<i>Chemical Shift Anisotropy</i>
DCM	Diclorometano
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
D _{IS}	Acoplamento dipolar entre os spins I e S
DLC	<i>Discotic Liquid Crystals</i>
DMF	Dimetilformamida
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DPD	Dinâmica de partícula dissipativa
DSCG	<i>Disodium Cromoglycate</i>
EB	<i>Ethidium Bromide</i>
EtOH	Etanol
EWE	<i>Evanescent Wave Ellipsometry</i>
F1	Dimensão indireta
F2	Dimensão direta
H	Rombicidade
HETCOR	<i>Heteronuclear Correlation</i>

HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
GIAO	<i>Gauge-Including Atomic Orbitals</i>
<i>I</i>	Fase isotrópica
<i>J</i>	Acoplamento escalar
LC	<i>Liquid Crystal</i>
M	Tipo de fase cromônica que aparece em concentração mais elevada
MeOH	Metanol
MsODEG	2-(2-Metoxietoxi)-etil metanosulfonato
N	Nemática
NOE	<i>Nuclear Overhauser effect</i>
PAN	poli-Acrilonitrila
PBLG	poli- γ -(Benzil-L-Glutamato)
PCBLL	poli- ϵ -(Carboxibenzil-L-lisina)
PEG	Polietilenoglicol
PELG	poli- γ -(Etil-L-glutamato)
Poli-DEGMEMMA	di-(Etilenoglicol) metil éter metacrilato
Poli-HEMA	poli-(2-Hidroxi-etil-metacrilato)
PMMA	poli-(Metil-metacrilato)
PS	Poliestireno
<i>Q</i>	Fator de qualidade
RCSA	<i>Residual Chemical Shift Anisotropy</i>
RDC	<i>Residual Dipolar Coupling</i>
RQC	<i>Residual Quadrupolar Coupling</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
SAG	<i>Strain-induced alignment in gels</i>
SAM	<i>Assembled Monolayer</i>
SVD	<i>Singular Value Decomposition</i>
<i>T</i>	Acoplamento total
T.A.	Temperatura ambiente
<i>t</i> BME	<i>tert</i> -Butilmetil éter
TFEMA	<i>Trifluoroethyl Methacrylate</i>
TMS	Tetrametilsilano
TP	<i>Triphenylene</i>

TP6EO2M	2,3,6,7,10,11-hexa-(1,4,7-Trioxaoctil)-trifenileno
2DEGCO ₃	bis-(2-(2-Metoxietoxi)-etil
6HOTPh	2,3,6,7,10,11-Hexahidrotifenileno
6MeOTPh	2,3,6,7,10,11-Hexametoxitifenileno

LISTA DE SÍMBOLOS

\hat{A}	Tensor de alinhamento
B_0	Campo magnético aplicado
\vec{b}	Vetor unitário do campo magnético aplicado
d	Constante de acoplamento dipolar
d_{IS}	Acoplamento dipolar reduzido
\vec{n}	Eixo diretor
\hat{P}	Tensor de probabilidade
r	Distância entre os spins de diferentes núcleos
\vec{r}	Vetor unitário da distância internuclear
γ	Razão giromagnética
δ	Deslocamento químico
δ_{an}	Deslocamento químico anisotrópico
δ_{CSA}	Deslocamento químico em meio anisotrópico
δ_{iso}	Deslocamento químico em meio isotrópico
\hbar	Constante de Plank dividida por 2π
μ_0	Constante de permeabilidade do vácuo
η	Assimétria do tensor de alinhamento
ϑ	Ângulo polar
φ	Ângulo azimutal
θ	Ângulo de torção
Φ	Ângulo de torção da sacarose
Ψ	Ângulo de torção da sacarose
$\Delta\nu_Q$	Desdobramento quadrupolar
\mathcal{H}	Hamiltoniano
\mathcal{H}_D	Hamiltoniano do acoplamento dipolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
1.1	Meios de Alinhamento Baseados em Cristais Líquidos Liotrópicos e Géis de Polímeros Reticulados	31
1.2	Cristais Líquidos Liotrópicos Discóticos ou Fases Cromônicas	34
1.2.1	Fases Cromônicas Iônicas (DSCG).....	40
1.2.2	Fases Cromônicas não-Iônicas (TP6EO2M) à Base de Trifenileno (TP)	41
1.3	Aplicação dos Meios Orientados em RMN para Extração de Observáveis Anisotrópicos na Elucidação de Moléculas Orgânicas	49
1.4	Acoplamento Dipolar	50
1.4.1	Fundamentação Teórica do Acoplamento Dipolar.....	53
1.4.1.1	<i>Hamiltoniano do Acoplamento Dipolar Estático</i>	53
1.4.1.2	<i>Dependência do Acoplamento Dipolar com a Mobilidade Molecular</i>	56
1.4.1.3	<i>Uso da Decomposição do Valor Singular para Resolver o Acoplamento Dipolar Reduzido</i>	60
1.4.1.4	<i>Expressando o Tensor de Probabilidade no Sistema Principal de Coordenadas</i>	63
1.4.1.5	<i>Cálculo do Valor Médio do Acoplamento Dipolar em Meio Anisotrópico e Isotrópico</i>	65
1.4.1.6	<i>Expressando o Acoplamento Dipolar Reduzido em Termos de Coordenadas Polares</i>	67
1.4.1.7	<i>Parâmetros de Assimetria: Componente Axial e Rombicidade</i>	69
1.4.2	Medidas Experimentais de RDCs.....	71
1.4.3	Como os Acoplamentos Dipolares Residuais são Usados na Análise Estrutural de Pequenas Moléculas Rígidas ou Semirrígidas.....	72
1.5	Anisotropia do Deslocamento Químico Residual (RCSA)	73
1.5.1	Medidas Experimentais de RCSAs	75
1.5.2	Fator de Correção Usado para Eliminar Contribuições Isotrópicas nas Medidas de RCSAs	77
1.6	Objetivos	80
1.6.1	Objetivos Gerais	80
1.6.2	Objetivos Específicos	80
2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	81
2.1	Equipamentos, Solventes e Reagentes	81

2.2	Síntese do 2,3,6,7,10,11-Hexa-(1,4,7-trioxaocetil)-trifenileno (TP6EO2M)	82
2.2.1	Síntese do 2,3,6,7,10,11-Hexametoxitriifenileno (1)	82
2.2.2	Síntese do 2,3,6,7,10,11-Hexahidroxitriifenileno (2).....	84
2.2.3	Síntese do 2-(2-Metoxietoxi)etil Metanosulfonato (3).....	86
2.2.4	Síntese do 2,3,6,7,10,11-Hexa-(1,4,7-trioxaocetil)-trifenileno (4)	87
2.3	Síntese do 1,2-Bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi) Benzeno (5)	90
2.3.1	Síntese do 2,3,6,7,10,11-Hexa-(1,4,7-trioxaocetil)-trifenileno (4) Usando o 1,2-Bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi) Benzeno (5) como Reagente de Partida	91
2.4	Análise em RMN no Meio Isotrópico	92
2.5	Medidas Experimentais em RMN para Aquisição de RDCs e RCSAs	92
2.5.1	Preparação do Meio TP6EO2M/D ₂ O/Amostra para Medidas Anisotrópicas	93
2.5.2	Monitoramento da Formação das Fases Anisotrópico e Isotrópico no Meio TP6EO2M/D ₂ O/Amostra	93
2.5.2.1	<i>Experimentos de RMN HSQC Acoplados em F1 Realizados com a Sacarose no Meio TP6EO2M/D₂O/Amostra.....</i>	94
2.5.2.2	<i>Experimentos de RMN ¹³C-{¹H} Realizados com a Sacarose no Meio TP6EO2M/D₂O/Amostra.....</i>	94
2.5.2.3	<i>Experimentos de RMN HSQC Acoplados em F1 Realizados com a Cefuroxima no Meio TP6EO2M/D₂O/Amostra.....</i>	95
2.5.2.4	<i>Experimentos de RMN ¹³C-{¹H} Realizados com a Cefuroxima no Meio TP6EO2M/D₂O/Amostra.....</i>	95
2.5.3	Preparação de uma Amostra de Monocrotalina no Meio Anisotrópico DSCG/NaCl/D ₂ O.....	95
2.5.4	Medidas Experimentais de RDCs e RCSAs Realizadas com Monocrotalina	95
2.5.4.1	<i>Experimentos de RMN HSQC Acoplados em F2 Realizados com a Monocrotalina no Meio DSCG/D₂O/NaCl/Amostra</i>	96
2.5.4.2	<i>Experimentos de RMN ¹³C-{¹H} Realizados com a Monocrotalina no Meio DSCG/D₂O/NaCl/Amostra</i>	96
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
3.1	Aprimoramento da Síntese do Mesógeno Cromônico TP6EO2M.....	97
3.1.1	Diferentes Condições de Síntese e Purificação do TP6EO2M.....	99
3.1.2	Síntese do TP6EO2M Através de Trimerização Oxidativa do 1,2-Bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi) Benzeno (5).....	104

3.2	Formação do Subproduto Bis-(2-(2-Metoxietoxi)-Etil) Carbonato na Síntese do TP6EO2M	105
3.3	Tipos de Rotas para a Síntese do Mesógeno Discótico TP6EO2M	111
3.3.1	Proposta do Mecanismo da Trimerização Oxidativa para Formação do 2,3,6,7,10,11-Hexametoxitriifenileno (1)	111
3.3.1.1	<i>Comparação do Rendimento da Síntese do Composto 1 na Presença e Ausência do H₂SO₄.....</i>	112
3.3.2	Proposta do Mecanismo de Síntese do Composto 2,3,6,7,10,11-Hexahidroxitriifenileno (2)	113
3.3.3	Proposta de Mecanismo de Síntese do TP6EO2M (composto 4)	113
3.4	Avaliação da Transição de Fases Isotrópica-Anisotrópica no Sistema TP6EO2M/D₂O	115
3.5	Estudo Conformacional da Sacarose na Fase Cromônica TP6EO2M/D₂O.....	118
3.5.1	Atribuição de ¹ H e ¹³ C da Molécula de Sacarose Mediante Técnicas Convencionais de RMN	118
3.5.2	Medidas anisotrópicas no Sistema TP6EO2M/D ₂ O/Sacarose	121
3.5.2.1	<i>Medição dos RDCs da Sacarose no Sistema TP6EO2M/D₂O</i>	123
3.5.2.2	<i>Medição de RCSAs da Sacarose no Sistema TP6EO2M/D₂O</i>	129
3.5.3	Modelagem Molecular da Sacarose	130
3.5.4	Análise Conformacional da Sacarose Mediante RDCs/RCSAs Adquiridos no Sistema TP6EO2M/D ₂ O	131
3.6	Estudo Conformacional da Cefuroxima na Fase Cromônica TP6EO2M/D₂O	138
3.6.1	Atribuição de ¹ H e ¹³ C da Molécula de Cefuroxima Mediante Técnicas Convencionais de RMN	138
3.6.2	Medidas Anisotrópicas no Sistema TP6EO2M/D ₂ O/Cefuroxima	141
3.6.2.1	<i>Medição dos RDCs da Cefuroxima no Sistema TP6EO2M/D₂O</i>	142
3.6.2.2	<i>Medição dos RCSAs da Cefuroxima no Sistema TP6EO2M/D₂O</i>	144
3.6.3	Modelagem Molecular da Cefuroxima.....	146
3.6.4	Análise Conformacional da Cefuroxima Mediante RCSAs Adquiridos no Sistema TP6EO2M/D ₂ O	147
3.7	Estudo Conformacional da Monocrotalina na Fase Cromônica DSCG/NaCl/D₂O	148
3.7.1	Atribuição de ¹ H e ¹³ C da Molécula de Monocrotalina Mediante Técnicas Convencionais de RMN	148

3.7.2	Medidas Anisotrópicas no Sistema DSCG/NaCl/D ₂ O/Monocrotalina	151
3.7.2.1	<i>Medição dos RDCs da monocrotalina no sistema DSCG/NaCl/D₂O</i>	152
3.7.2.2	<i>Medição dos RCSAs da monocrotalina no sistema DSCG/NaCl/D₂O</i>	155
3.7.3	Modelagem Molecular da Monocrotalina	157
3.7.4	Análise Conformacional da Monocrotalina Mediante RDCs e RCSAs.....	158
4	CONCLUSÕES	163
	REFERÊNCIAS	164
	APÊNDICE A– DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DO TP6EO2M	173
	APÊNDICE B– DADOS DE RMN BIDIMENSIONAIS DA SACAROSE, CEFUROXIMA E MONOCROTALINA	174
	APÊNDICE C– DADOS DE RDC EXPERIMENTAL E CALCULADO DA SACAROSE OBTIDOS EM TP6EO2M/D₂O	179
	APÊNDICE D– INPUT DA SACAROSE E CEFUROXIMA	181

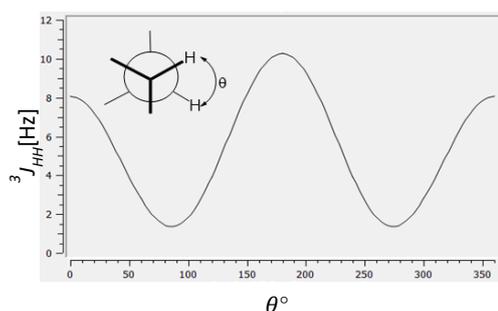
1 INTRODUÇÃO

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é sem dúvida a técnica mais empregada pelos químicos orgânicos na elucidação estrutural de compostos orgânicos tanto de origem natural como sintética. A natureza dos grupos funcionais presentes e a conectividade da molécula podem ser determinadas mediante análise dos deslocamentos químicos, e a ajuda dos experimentos bidimensionais homo e heteronucleares. A configuração relativa (CR) e a conformação dos compostos podem ser determinadas pelo uso, muitas vezes de forma combinada, do efeito nuclear Overhauser (NOE)¹ e as constantes de acoplamento escalares homonucleares (${}^nJ_{AA}$) ou heteronucleares (${}^nJ_{AB}$).² Estas técnicas podem ser consideradas de rotina em análise estereoquímica.³

A magnitude dos acoplamentos escalares vicinais 3J tem uma forte dependência com o valor do ângulo diedro formado pelos núcleos acoplados. Esta dependência pode ser modelada mediante uma série de Fourier conhecida como equação de Karplus (*Equação 1*) que descreve a dependência da constante de acoplamento vicinal do tipo ${}^3J_{H-H}$ com o ângulo diedro (θ) (*Figura 1*). Isto possibilita a determinação da orientação relativa entre ligações químicas fornecendo, portanto, informações conformacional e configuracional.

Figura 1– Relação de Karplus – dependência da constante de acoplamento 3J com ângulo diedro (θ).

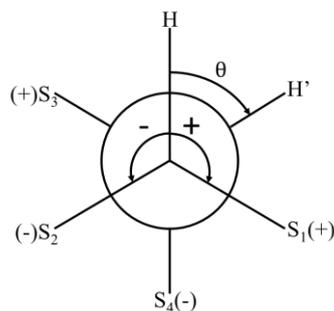
$$\text{Equação 1} \quad {}^3J_{H-H} = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C$$



As constantes A, B e C da *Equação 1* são valores empíricos que dependem dos átomos envolvidos no acoplamento. Diversas variações da equação de Karplus podem ser encontradas na bibliografia científica. Altona e colaboradores,⁴ por exemplo, trabalharam por longo tempo na modificação desta equação e formularam uma outra que tem em conta tanto o ângulo diedro como a influência da eletronegatividade dos substituintes na posição geminal aos prótons acoplados H-C-C-H (*Equação 2*).

$$\text{Equação 2} \quad {}^3J_{H-H}(\theta) = P_1 \cos^2 \theta + P_2 \cos \theta + P_3 + \sum \Delta\chi (P_4 + P_5 \cos^2(\xi_i \theta + P_6 |\Delta\chi|))$$

Figura 2– Anotação de Altona: posições dos substituintes “positivos” e “negativos” em relação aos prótons acoplados. Adaptada de Haasnoot *et al.*⁴



Fonte: HAASNOOT (1980, p. 2787)

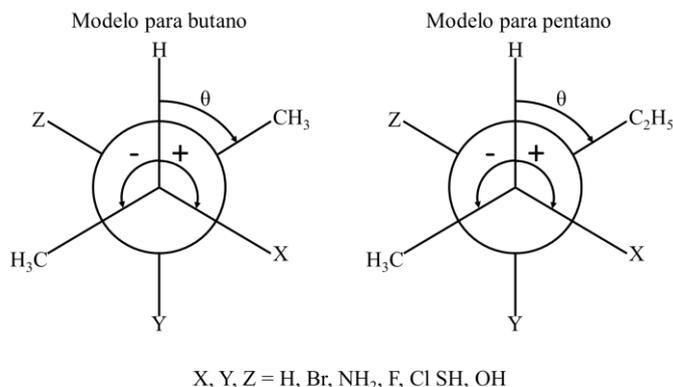
Os parâmetros P_1 a P_6 foram determinados empiricamente, a partir de uma base de dados de 315 modelos que apresentavam entre si uma alta variabilidade dos ângulos diedros e padrão de substituição. Já $\Delta\chi$ é a diferença de eletronegatividade entre o substituinte S_i e o próton geminal, enquanto ξ_i é um parâmetro que representa a posição relativa dos substituintes geminais. ξ_i é igual a +1 ou -1, respectivamente, dependendo da posição do substituinte conforme é definido na *Figura 2*.

Recentemente, Bifulco e co-autores⁵ desenvolveram novos parâmetros para a equação de Altona adaptando-a à predição de acoplamentos heteronucleares $^3J_{H-C}$ (*Equação 3*). Estes parâmetros foram definidos com base em 2157 acoplamentos obtidos mediante cálculos de DFT (MPW1PW91/6-31G**) a partir de um conjunto de modelos baseados em butano e pentano (*Figura 3*), e considerando variações de 30° do ângulo de torção para cada etapa e explorando sistematicamente o efeito do padrão de substituição inserido nas posições $S_i(+)$ e $S_i(-)$ nos carbonos β (carbono adjacente ao carbono envolvido no acoplamento) e γ (carbono que contém o hidrogênio envolvido no acoplamento). O número de substituintes para o butano foram dois, enquanto para o pentano três. Já os substituintes eletronegativos usados nos modelos foram os mais comuns das moléculas orgânicas (F, Cl, Br, OH, NH₂, SH).

Equação 3

$$^3J_{C-H}(\theta) = P_1 \cos^2 \theta + P_2 \cos \theta + P_3 + \sum \Delta\chi_{H(+/-)} \left(P_4 + P_5 \cos^2(\xi_i \theta + P_6 |\Delta\chi_{H(+/-)}|) \right) \\ + \sum \Delta\chi_{C(+/-)} \left(P_4' + P_5' \cos^2(\xi_i \theta + P_6' |\Delta\chi_{C(+/-)}|) \right)$$

Figura 3– Padrão geral para o butano e pentano. Todos os 2157 modelos foram construídos variando em cada etapa o ângulo de torção (θ) e mudando o padrão de substituição nas posições $S_i(\pm)$ como também permutando os substituintes X, Y e Z. Adaptada de Palermo *et al.*⁵



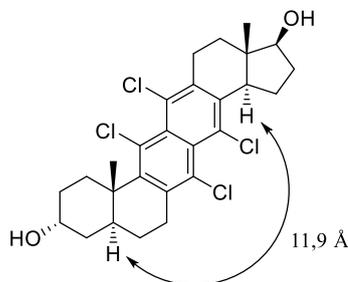
Fonte: PALERMO (2010, p. 1985)

Os três primeiros termos da *Equação 3* são correlacionados com a clássica curva de Karplus (*Figura 1*), enquanto o quarto e o quinto termos são correlacionados, respectivamente, ao efeito eletronegativo dos substituintes $S_i(\pm)$ no ^1H e ^{13}C envolvidos no acoplamento.

Como no exemplo anterior, muitas deduções empíricas, nas equações do tipo Karplus acima, são derivadas de cálculos teóricos, uma vez que não está disponível um banco de dados completos de valores experimentais de 3J . Além do mais, as equações são baseadas em modelos simples e específicos e por isso sofrem pela falta de aplicabilidade geral a moléculas orgânicas complexas, embora de algum modo aplicadas com sucesso em estruturas moleculares mais simples. Ademais, quando porções magneticamente inativas surgem no esqueleto da cadeia molecular (*Figura 4*) impedindo o acoplamento entre prótons diastereotópicos a determinação da configuração relativa fica impossibilitada.

Por outro lado, com a finalidade de contornar este problema o experimento NOE (Efeito Nuclear Overhauser, do inglês - *Nuclear Overhauser effect*) pode ser extremamente útil, porque o efeito nuclear Overhauser não é transmitido através das ligações químicas, mas por proximidade espacial (acoplamento dipolar) entre os spins. Contudo, vale ressaltar que a magnitude do NOE é inversamente proporcional à sexta potência da distância entre os spins (r^{-6}). Conseqüentemente, em moléculas pequenas é muito pouco provável observar efeitos NOE entre núcleos separados por mais de 5 Å. Além do mais, em diversas ocasiões, os valores de 3J e NOE disponíveis não oferecem uma resposta categórica ao problema estrutural considerado.

Figura 4– Estrutura molecular hipotética onde não seria possível determinar a configuração relativa dos dois centros estereogênicos através da medida dos acoplamentos escalares ou efeitos NOE. Fonte de Gil *et al.*⁶



Fonte: GIL (2017, p. 119)

Com o propósito de desenvolver novas estratégias para auxiliar as técnicas preexistentes na determinação da configuração relativa, nos últimos anos, foram desenvolvidas, mediante RMN, múltiplas ferramentas para o estudo estereoquímico de moléculas orgânicas. Nesse sentido, o cálculo do deslocamento químico e da constante de acoplamento escalar, por métodos quânticos, representam uma estratégia poderosa. Conforme os resultados vêm sendo satisfatórios, isso tem sido estimulador para o aprimoramento de novos métodos *ab initio*. Desde quando a mecânica quântica computacional foi usada para a predição de parâmetros de RMN, diferentes níveis de teoria foram utilizados, mas a maioria dos estudos químicos realizados hoje em dia utiliza métodos baseados na teoria do funcional da densidade (DFT, do inglês - *Density Functional Theory*).⁷⁻⁹

Outra metodologia para determinar a configuração relativa de moléculas rígidas ou semirrígidas e que vem sendo recentemente usada de forma complementar as já existentes, embora os seus princípios fossem estabelecidos nos anos sessenta,¹⁰ é o uso da RMN em meios alinhados. Esta técnica apenas emergiu nos últimos quinze anos, como uma nova ferramenta na elucidação estrutural de compostos orgânicos, e tem revelado resultados satisfatórios em casos difíceis de elucidação estrutural mediante as técnicas tradicionais.¹¹

A técnica de RMN, em meios alinhados, consiste em recuperar uma fração dos acoplamentos observáveis em meios anisotrópicos, que são normalmente ocultos em solução, como Acoplamento Dipolar Residual (RDC, do inglês - *Residual Dipolar Coupling*), Anisotropia do Deslocamento Químico Residual (RCSA, do inglês - *Residual Chemical Shift Anisotropy*) e Acoplamento Quadrupolar Residual (RQC, do inglês - *Residual Quadrupolar Coupling*). A técnica baseia-se na imposição de um pequeno grau de anisotropia na rotação da molécula. Nestas condições, a parte anisotrópica dos observáveis não se anula, mas é

recuperada parcialmente, com a vantagem de não perder a resolução dos sinais intrínseca à RMN de líquidos.^{12,13} Desta forma, por exemplo, os RDCs contêm ainda toda a informação estrutural acerca dos ângulos relativos dos vetores internucleares, que podem ser usados para estabelecer a configuração relativa mesmo em moléculas com muitos centros estereogênicos. No caso de moléculas rígidas, a técnica é bem estabelecida e já foi empregada com sucesso na elucidação de compostos complexos de origem natural.¹⁴⁻¹⁷ Além disso, para moléculas com apenas um estado conformacional, a análise pode ser considerada simples.^{18,19} Já para moléculas com um alto grau de flexibilidade é ainda um campo de pesquisa em desenvolvimento.^{14,20-22}

Há moléculas que podem ter o acoplamento dipolar recuperado mesmo sem a necessidade de um meio de interação que force seu alinhamento. Tais moléculas, como o DNA ou moléculas paramagnéticas, apresentam valores grandes da anisotropia da susceptibilidade magnética, e podem-se “auto-alinhar”²³ na presença dos campos magnéticos comuns em RMN. Esse fenômeno foi empregado recentemente no estudo conformacional de moléculas pequenas.^{22,24,25} Porém, na maior parte dos compostos diamagnéticos de baixa massa molecular, o autoalinhamento induzido pela susceptibilidade magnética é negligenciável. Portanto, o uso da técnica para recuperar interações anisotrópica como, por exemplo, acoplamento dipolar é condicionada ao alinhamento da molécula em análise, do contrário nenhum parâmetro anisotrópico consegue ser medido. Para conseguir este objetivo, uma forma de obter o alinhamento da molécula é a orientação prévia do meio onde esta esteja em dissolução, de modo que, por interação com o meio previamente orientado, possa-se obter um grau de alinhamento adequado. Este seria o chamado grau de alinhamento fraco onde o valor do acoplamento dipolar é o suficientemente pequeno para a obtenção de um espectro de alta resolução e a determinação inequívoca do seu sinal positivo ou negativo.

Portanto, muitas pesquisas voltaram-se, durante as últimas duas décadas, para desenvolver meios, capazes de fornecerem alinhamento fraco, que permitissem a extração precisa e simples dos observáveis anisotrópicos (RDCs e RCSAs) e fossem compatíveis com os solventes deuterados comuns em RMN.^{26,27}

1.1 Meios de Alinhamento Baseados em Cristais Líquidos Liotrópicos e Géis de Polímeros Reticulados

Sabe-se, desde 1964, através dos estudos de Alfred Saupe,²⁸ que a magnitude e o sinal das interações anisotrópicas, em uma fase cristalina líquida, podem ser escalados alterando o ângulo θ existente entre o eixo diretor da mesofase e o campo magnético estático de acordo com a expressão $\left(\frac{3}{2}\cos^2\theta - \frac{1}{2}\right)$. A mesma relação é válida para o alinhamento induzido por géis esticados, para os quais o ângulo do eixo de alongamento em relação a B_0 deve ser variado.²⁹ Existem várias maneiras de alterar o ângulo θ em relação ao campo externo. Mais adiante, iremos comentar alguns dos dispositivos usados para conseguir tal mudança.

Há duas principais famílias de meios de alinhamento que diferem entre si pela maneira como é obtido o alinhamento molecular, são elas: os cristais líquidos liotrópicos (CLL), por exemplo, polímeros helicoidais,³⁰ que se orientam de maneira espontânea na presença do campo magnético, e a outra são os géis poliméricos reticulados que, após serem inchados dentro de tubos de RMN com solvente deuterado na presença do analito, são deformados mecanicamente (alongamento,³¹ estreitamento^{32,33} e compressão³⁴) para gerarem um pequeno grau de alinhamento. No caso dos géis, a molécula estudada entra nos poros por difusão e é parcialmente alinhada por conta da deformação mecânica sofrida pelo gel, enquanto nos cristais líquidos, o alinhamento do analito é consequência da interação deste com a fase nemática, orientada pelo campo magnético por motivo da sua alta anisotropia da susceptibilidade magnética. Os dois métodos geram um grau de alinhamento suficiente para medir os RDCs ou outros observáveis anisotrópicos.³⁵⁻³⁸

Os cristais líquidos liotrópicos mais comuns, usados como meio de alinhamento em RMN de moléculas pequenas, são os cristais líquidos poliméricos que são, em sua maioria, dissolvidos em clorofórmio deuterado. São exemplos destes homopolipeptídeos, o poli- γ -(benzil-L-glutamato) (PBLG), o poli- γ -(etil-L-glutamato) (PELG) e a poli- ϵ -(carboxibenil-L-lisina) (PCBLL). Estes homopolipeptídeos, em solução, adotam uma disposição helicoidal que gera uma anisotropia de fase suficiente a observação de parâmetros anisotrópicos no analito em solução.³⁰ Outros polímeros helicoidais, baseados em sistemas liotrópicos, têm sido, nos últimos anos, reportados na literatura,³⁹ tais como: polímeros de poliguanidinas,⁴⁰ que apresentam um elevado grau de alinhamento, e também poliisocianatos ou poliacetilenos.⁴¹

Mais recentemente, Lei e colaboradores⁴² usaram folhas de óxido de grafeno, enxertado com metacrilato de trifluoretila (TFEMA, do inglês - *trifluoroethyl methacrylate*), como meio de alinhamento compatível com DMSO-*d*₆.

Quanto aos géis poliméricos reticulados, já há vários sendo utilizados em diferentes solventes orgânicos, tais como: gel de poliestireno (PS)⁴³ que é inchado em CDCl₃; géis de poli(acrilonitrila) (PAN)^{34,36} e de poli-(2-hidroxietil-metacrilato) (poli-HEMA)⁴⁴ ambos intumescidos em DMSO-*d*₆; gel de di-(etilenoglicol)-metil-éter metacrilato (poli-DEGMEMMA)⁴⁵ intumescido em metanol deuterado e gel de poli-(metil-metacrilato) (PMMA)⁴⁶ inchado na mistura CDCl₃/diclorometano deuterado ou apenas em CDCl₃, entre outros. Este tipo de protocolo, usando gel polimérico reticulado, é chamado método SAG (do inglês - *strain-induced alignment in gels*), que consiste em alongar e comprimir o polímero reticulado contendo o analito que sofre orientação decorrente da deformação mecânica do gel.⁴⁷ O método SAG foi proposto, originalmente e independentemente em 2000 por Tycko *et al.*⁴⁸ e Grzesiek e colaboradores,⁴⁹ para alinhar biopolímeros em gel de poli(acrilamida) que foi inchado com água e, em seguida, tensionado, esticado ou comprimido mecanicamente. Essa abordagem estava conceitualmente relacionada a experimentos de Deloche e Samulski⁵⁰ reportada em 1981. Há diferentes metodologias usadas no SAG para imprimir o alinhamento parcial no gel, entre todas, a diferença se dar basicamente nos diferentes dispositivos desenvolvidos e o tipo de tensão exercida sobre o gel no interior do tubo de RMN.

Em 2006, Kuchel e colaboradores³¹ desenvolveram um dispositivo engenhoso para discriminar enantiômeros usando parâmetros anisotrópicos de RMN. Este dispositivo era um tubo à base de borracha de silicone e permitia escalar o alinhamento do analito inserido no gel, através do alongamento rápido e reversível deste gel de polímero contido dentro deste dispositivo. A principal vantagem dessa abordagem é que equipamentos convencionais de RMN de estado líquido podem ser usados. Além do mais, devido ao alongamento do gel no interior do tubo de borracha, nenhuma alteração na concentração do polímero é observada o que implica utilizar este método de alongamento do gel para adquirir anisotropia do deslocamento químico residual sem se preocupar com a componente isotrópica do deslocamento químico. A desvantagem do tubo de borracha de silicone é a aplicabilidade limitada em relação aos solventes de RMN, pois amostras baseadas em CDCl₃, por exemplo, não são compatíveis com o tubo de silicone e a abordagem não pode ser aplicada.²⁹

Outro método para dimensionar o alinhamento é baseado no uso de um tubo de RMN de duas seções de diâmetro diferente interno para comprimir géis ou no uso de do aparelho de compressão descrito por Gil *et al.*³² para PMMA.⁵¹⁻⁵³ O método de compressão é mais fácil de

aplicar, porém produz uma mudança da concentração relativa do polímero/solvente, Como será visto na seção 1.5.1, isso pode ter um efeito profundo nas mudanças químicas do soluto e sinais de referência.^{29,51}

Os dispositivos propostos por Kuchel e Gil, especialmente o primeiro, evitam a necessidade da medida isotrópica do analito, em uma amostra líquida convencional, maximizando a semelhança em ambiente químico entre as medidas isotrópica e anisotrópica. O uso direto da amostra isotrópica tem a desvantagem de que a molécula de interesse é medida em dois ambientes químicos diferentes que resultam em deslocamentos químicos, significativamente, distintos. Essa diferença também pode aparecer *a priori* quando a amostra passa por uma transição de fase de primeira ordem, como, por exemplo, para amostras medidas nas fases bicelulares, abaixo e acima da temperatura de transição correspondente para a mesofase liotrópica.²⁹

Entretanto, no dispositivo de compressão de Gil, quando se mede RCSAs, precisa-se de uma correção *a posteriori* da componente isotrópica do tensor de deslocamento químico para explicar o aumento da razão polímero/solvente no interior do gel inchado.⁵⁴

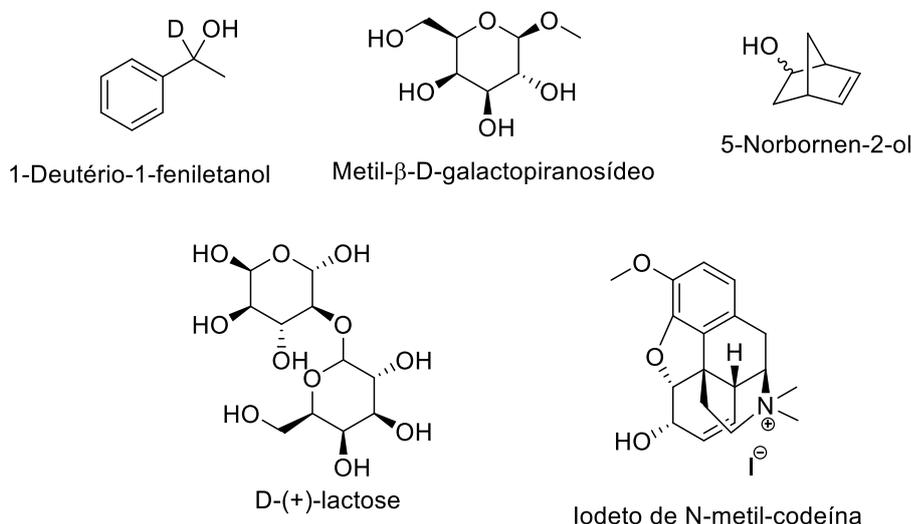
Uma abordagem mais precisa, mas com a necessidade de hardware especializado, é o uso de géis esticados em sondas de ângulo variável. Aqui, as medições são feitas em diferentes ângulos θ . Este procedimento mantém exatamente as mesmas condições ambientais do sistema e simplesmente escala o efeito anisotrópico de acordo com $\frac{3}{2}\cos^2\theta - \frac{1}{2}$. Porém, o hardware especializado necessário não está rotineiramente disponível para a maioria dos químicos.^{29,54}

Contudo, essas duas classes de meios de alinhamento (cristais líquidos liotrópicos de polímeros helicoidais e géis poliméricos reticulados) apresentam, além das que já foram citadas, algumas outras dificuldades que comprometem seu uso na elucidação estrutural. Nas fases liotrópicas, em diversas ocasiões, há dificuldade de preparação do meio, falta de reprodutibilidade, pouca estabilidade e, em muitos casos, especialmente PBLG, falta de homogeneidade que gera distintas zonas de alinhamento, sendo muito difícil de fazer a homogeneização do campo (*shimming*) da amostra.⁵⁵ Já nos polímeros reticulados, as dificuldades são: recuperação da amostra, lenta difusão do analito nas microcavidades que pode levar horas ou mesmo alguns dias, dificuldade de serem sintetizados e, em alguns casos, também há falta de homogeneidade do material.

Uma outra classe de cristais líquido liotrópicos, solúveis em água, com potencial para atingir um grau ótimo de alinhamento, são aqueles pertencentes à família denominada cromônica. Com os cristais líquidos pertencentes a esta família é possível, em um só sistema,

realizar as medidas isotrópicas e anisotrópicas, alterando apenas a temperatura, de modo que os espectros continuem sendo interpretáveis. Existem poucos trabalhos usando fases cromônicas como meio de alinhamento. Reportam-se os trabalhos de Courtieu e colaboradores,⁵⁶ que usaram a fase cromônica formada pelo mesógeno cromoglicato de sódio (DSCG, do inglês - *Disodium Cromoglycate*) para resolver os enantiômeros do 1-deutério-1-feniletanol (*Figura 5*), e de Navarro-Vázquez e colaboradores que usaram também DSCG, porém dopado com cloreto de sódio, para estudar a configuração e conformação de diversas moléculas pequenas (*Figura 5*).⁵⁷⁻⁵⁹

Figura 5– Moléculas estudadas mediante alinhamento em fases cromônicas por Navarro-Vázquez e colaboradores.⁵⁷⁻⁵⁹

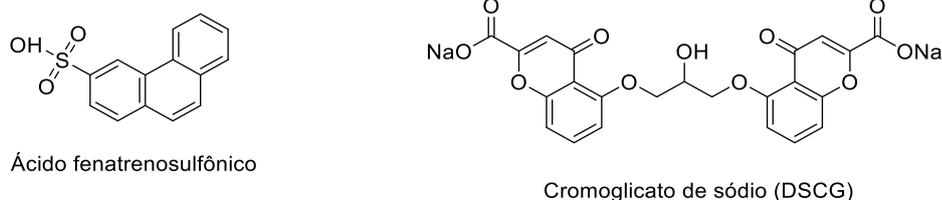


1.2 Cristais Líquidos Liotrópicos Discóticos ou Fases Cromônicas

Historicamente, o início dos trabalhos científicos com os cristais líquidos liotrópicos discóticos remete ao ano de 1915, quando H. Sandquist descreveu a textura óptica de uma fase em meio aquoso do ácido fenatrenossulfônico (*Figura 6*). Anos mais tarde, outros pesquisadores estudando alguns corantes afirmaram, com base nos resultados, que as moléculas deveriam formar agregados moleculares empilhados como “cartas”. Mas, foi apenas por volta da década de 70 do século XX, com o fármaco cromoglicato de sódio (*Figura 6*), que os cristais líquidos liotrópicos discóticos passaram a ser bem documentados, reforçando a ideia da existência de uma nova mesofase liotrópica.⁶⁰

Diversos líquidos liotrópicos discóticos podem ser chamados de fases cromônicas. Entre os mesôgenos que geram fases cromônicas há diversas drogas, corantes, ácidos nucleicos e outras moléculas aromáticas.^{61,62}

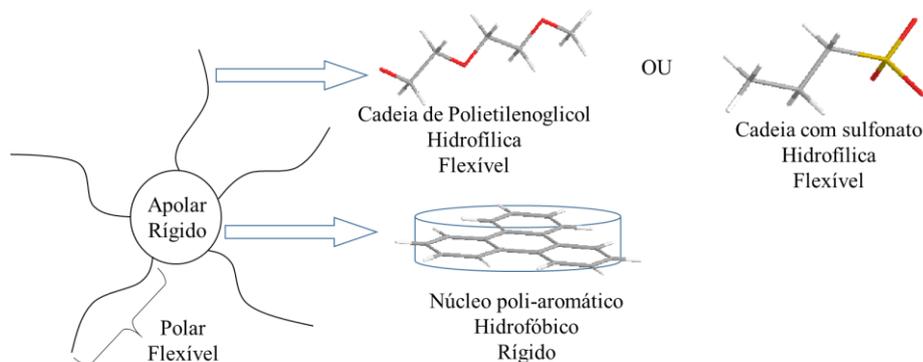
Figura 6– Estruturas discóticas do ácido fenatrenossulfônico e do cromoglicato de sódio.



O nome “cromônico”, indicado para os cristais líquidos liotrópicos discóticos, foi sugerido pelo pesquisador J. E. Lydon em referência à estrutura do cromoglicato de sódio (Figura 6). Esta substância é o princípio ativo para o tratamento e profilaxia da rinite e está presente no medicamento conhecido no Reino Unido como INTAL e nos EUA pelo nome Chromolyn. O nome “cromônico” faz referência tanto aos corantes, uma classe de substâncias com as quais formam fases cromônicas, como também aos cromossomas, os quais tem como referência os ácidos nucleicos e que, portanto, podem resultar em fases cromônicas.^{63,64}

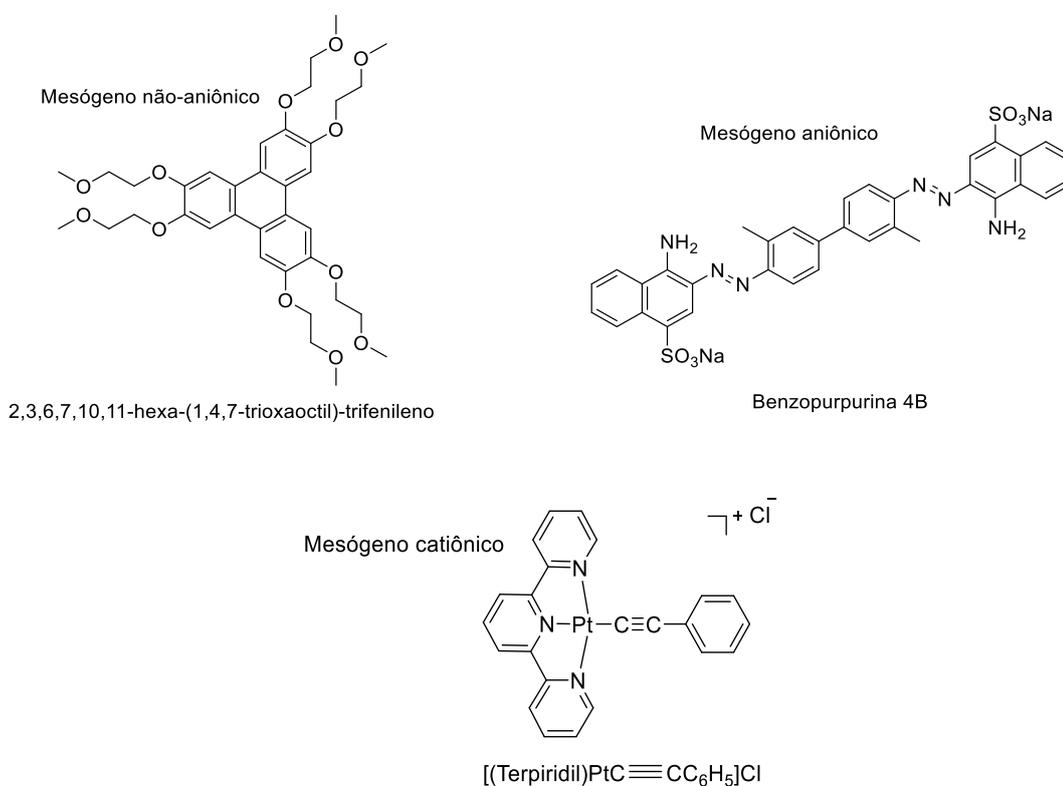
As moléculas cromônicas ou discóticas têm uma infinidade de formas e tamanhos, porém apresentam entre si duas características que se repetem entre todas, a saber, um núcleo aromático rígido em forma de disco e na periferia grupos flexíveis. Enquanto o núcleo, normalmente, é formado por múltiplos anéis aromáticos apolares, as cadeias flexíveis, por sua vez, são formadas por grupos polares (Figura 7).

Figura 7– Representação ilustrativa do mesôgeno do cristal líquido discótico com centro rígido trifenílico.



As fases cromônicas mais conhecidas são aquelas que têm em sua periferia grupos iônicos, geralmente aniônicos, ligados aos anéis aromáticos. Contudo, há exemplos catiônicos.^{65,66} Há também moléculas cromônicas que não têm grupos solubilizantes iônicos e são chamadas de cromônicas não-iônicas, nessas moléculas o grupo de solubilização é, por exemplo, cadeias de polietilenoglicol (*Figura 8*).^{64,67,68}

Figura 8– Exemplos de mesógenos cromônicos não-iônicos (2,3,6,7,10,11-hexa-(1,4,7-trioxaoctil)-trifenileno), aniônicos (Benzopurpurina 4 B) e catiônico ($[(\text{Terpiridil})\text{PtC}\equiv\text{CC}_6\text{H}_5]\text{Cl}$).

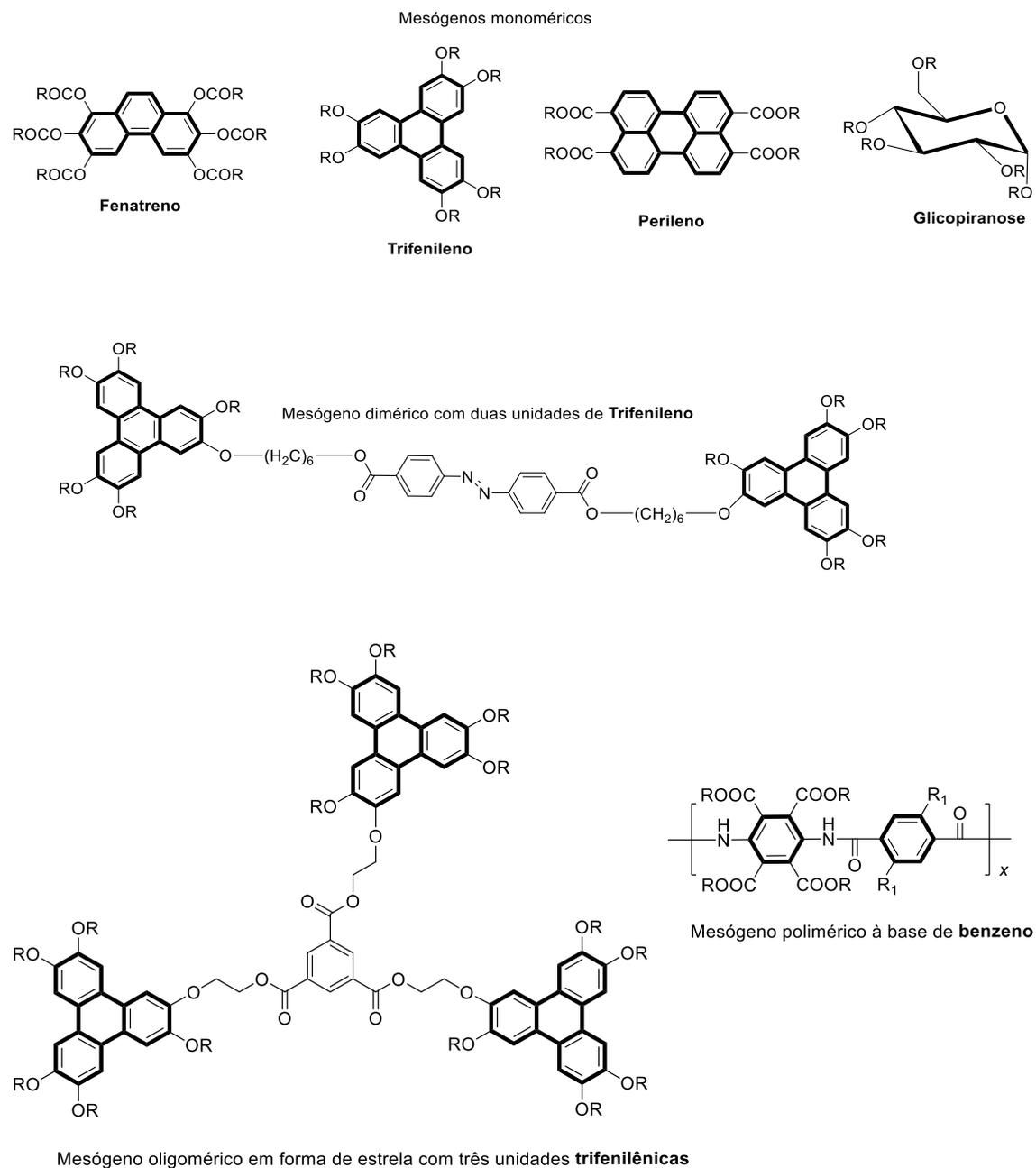


Os mesógenos dos cristais líquidos discóticos, dependendo do número de unidades que se repetem na estrutura molecular, podem ser classificados em monomérico, dimérico, oligomérico e polimérico (*Figura 9*). Tal classificação é baseada na quantidade de grupos hidrofóbicos presentes neste mesógeno.

Para cada subclassificação há uma diversidade de unidades que podem gerar, conforme diferentes cadeias laterais, uma variedade expressiva de novas estruturas. São exemplos de grupos hidrofóbicos monoméricos: benzeno, naftaleno, fenatreno, antraquinona, pireno, trifenileno, perileno, triazina, ciclohexano, glicopiranosose, etc. Estas unidades, por sua vez, podem estar ligadas entre si, ou seja, duas unidades, por exemplo, de trifenileno podem estar

presentes na macromolécula mesogênica e dar origem a um dímero, ou pode haver três unidades e resultar em um oligômero, cujo formato pode ser linear, de estrela ou de três andares (*triple deckers*). Se o desfecho for uma macromolécula com muitas unidades de repetição obtém-se um cristal líquido discótico polimérico (*Figura 9*).

Figura 9– Unidades básicas de mesógenos monoméricos, diméricos, oligoméricos e poliméricos dos cristais líquidos discóticos.



Acredita-se que essas moléculas em forma de disco quando formam cristais líquidos no meio aquoso são organizadas face-a-face formando agregados colunares. Com este

empilhamento não há possibilidade da água ter contato com o centro rígido de natureza hidrofóbica e permite a interação da água com a periferia da molécula que tem natureza hidrofílica. À medida que a concentração de moléculas cromônicas aumenta, o número de agregados bem como o comprimento das colunas também crescem e observa-se a transição de fase de uma dispersão isotrópica para a fase anisotrópica. Em concentrações mais baixas, a fase anisotrópica, primeiramente, é uniaxial, com alinhamento paralelo dos agregados (nemática), e depois bidimensional quando a concentração do mesógeno estiver mais elevada, ou seja, as colunas dos agregados paralelos formam uma rede hexagonal.⁶⁹

Uma forma de explicar o tipo de empilhamento dessas moléculas planares são as interações π entre os resíduos aromáticos das unidades moleculares empilhadas. Acredita-se que as forças existentes entre os anéis de moléculas adjacentes são uma combinação de forças de Van-der-Waals e interações eletrostáticas suficientes para manter a estabilidade das moléculas na coluna.^{64,67} Não só essas forças, mas também há estudos que mostram o quanto as interações quadrupolares, segregação de microfase, e contribuições entrópicas são significativas para explicar a automontagem e estabilidade dos mesógenos cromônicos.⁶⁶

Não existe um tamanho ótimo para as colunas, além do mais, a acumulação ou a remoção de uma unidade mesogênica é associada ao mesmo incremento de energia livre (agregação isodésmica).⁷⁰ Outras características interessantes das fases cromônicas e de destaque quando comparadas aos anfífilos convencionais são: ausência análoga a uma concentração micelar crítica (cmc) ou ponto de Krafft, as forças para agregação das moléculas nas colunas serem entálpicas em vez de entrópicas e o diagrama de fases destes mesógenos serem peritéticos em vez de eutéticos.⁶⁴

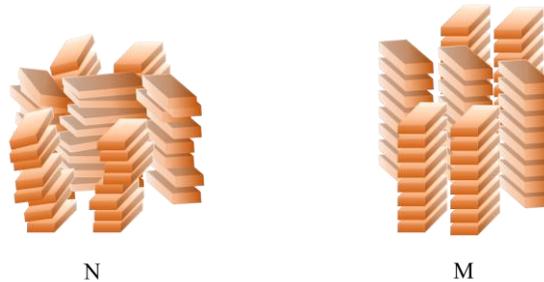
Um espaçamento de 3,4 Å entre cada mesógeno molecular existente na coluna foi estimado para o corante azo C.I. Direct Blue 67 usando difração de raio X. Esse valor foi verificado mesmo em soluções diluídas (5 % em peso) e é independente da temperatura.⁷¹

Existem duas fases cromônicas clássicas que são identificadas por N (nemático) e M (médio) (*Figura 10*). A letra N faz referência à semelhança da textura ótica da fase cromônica com aquela observada pelos sistemas nemáticos termotrópicos. Já a letra M é referente a aparência da textura obtida na fase cromônica com aquela encontrada nas fases “médias” dos sistemas anfífilicos convencionais.⁶⁰

A fase M é encontrada em concentrações mais elevadas do que a fase N. As colunas na fase M estão situadas em uma rede com simetria estatística hexagonal, enquanto, a fase N apresenta-se com as colunas mais ou menos paralelas, sem uma ordem de posição e sem orientação das colunas sobre seus longos eixos.⁶⁰ Além destes arranjos, há propostas de

estruturas bem diferentes, como estruturas em chaminés cilíndricas ocas e pilha retangular biaxial (*brickwork layer*).⁶¹

Figura 10– Estruturas propostas para as fases cromônicas nemáticas N e M. Adaptada de Lydon.⁶⁰

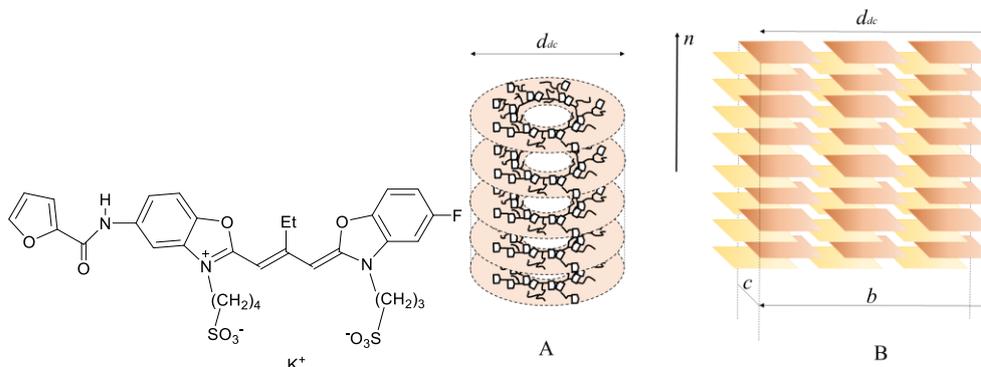


Fonte: LYDON (2011, p. 1664)

A caracterização estrutural das fases cromônicas é um problema ainda não resolvido e diversas propostas estruturais estão presentes na bibliografia. Harrison e colaboradores em 1996, ao estudar a mesofase de quatro corantes de cianina aniônicos em água, detectaram, em um dos corantes (*Figura 11*), uma área de secção transversal da coluna igual a $1310 \pm 51 \text{ \AA}^2$. Este resultado foi muito além da área de uma molécula $\sim 151 \text{ \AA}^2$ que seria o esperado para uma coluna unimolecular. Isso fez com que os autores postulassem dois modelos de mesofases cromônicas: cilindro oco (chaminé oca) uniaxial (*Figura 11-A*) e pilha retangular biaxial (*Figura 11-B*). Segundo os autores, poderia também imaginar que uma coluna seria polimolecular, ou seja, uma coluna seria formada pela união de mais de uma molécula, no entanto, essa sugestão ia de encontro a todos os outros resultados de difração de raio-X.⁷²

No modelo do “cilindro oco”, esperava-se que os grupos iônicos periféricos ligados ao anel aromático residissem no exterior da coluna, já no modelo da pilha retangular biaxial, ainda que proposto pelos mesmos autores, foi deixado de lado por acreditarem na dificuldade que o empilhamento retangular teria em formar um empacotamento hexagonal. Para eles, em vez da formação do empacotamento hexagonal, a pilha retangular biaxial, provavelmente, resultaria na formação de uma estrutura ortorrômbica.⁷²

Figura 11– Modelos postulados por Harrison, et al., 1996 para a coluna da mesofase do corante de cianina aniônico em meio aquoso; (A) cilindro oco uniaxial e (B) pilha retangular biaxial. Adaptada de Harrison *et al.*⁷²



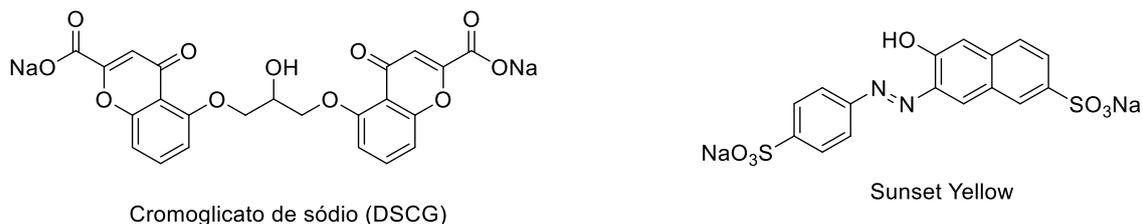
Fonte: HARRISON (1996, p. 2320)

Um aspecto importante a ser observado é a miscibilidade em fases cromônicas. Há trabalhos que mostram que a miscibilidade nas fases cromônicas ocorre quando as moléculas hospedes se intercalam nas pilhas cromônicas de forma aleatória, não apresentando um padrão definido de intercalação. Um desses estudos foi feito adicionando ao sistema DSCG/água (fase cromônica) uma solução do agente intercalante brometo de etídio (EB). A intercalação do EB na fase cromônica foi iniciada por mudança de efeito óptico. Como o EB atuou no sistema DSCG/água semelhantemente ao que ocorre quando este reagente marca DNA, os autores fortaleceram sua teoria de que a base central do DNA poderia ser considerada de natureza cromônica.⁷³

1.2.1 Fases Cromônicas Iônicas (DSCG)

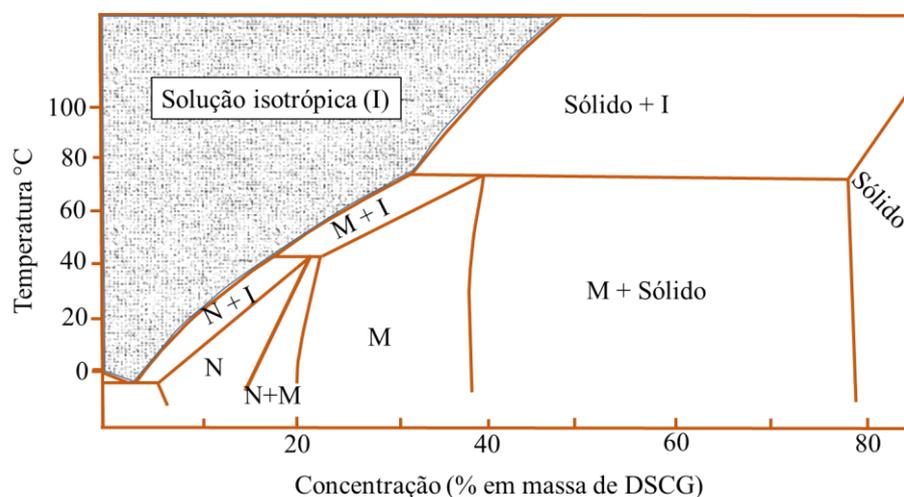
As fases cromônicas iônicas têm na periferia do mesógeno estruturas carregadas. Como exemplo temos o DSCG com carboxilatos e o *sunset yellow* com presença de sulfonatos (*Figura 12*). A estrutura destas moléculas e as suas mesofases foram já estudadas. Por causa do grupo iônico presente na periferia do mesógeno, estas moléculas, em geral, são solúveis no meio aquoso e formam cristais líquidos liotrópicos dependendo da concentração e temperatura do meio. Conforme já foi relatado, tais propriedades fisicoquímicas são determinantes para a passagem entre as mesofases anisotrópicas e a solução isotrópica destes cristais líquidos.

Figura 12– Mesógenos cromônicos iônicos com presença de carboxilato e sulfonato.



O diagrama de fases do DSCG (*Figura 13*) mostra formação das fases N e M, além de regiões onde há coexistência das duas mesofases.

Figura 13– Diagrama de fases do sistema cromoglicato de sódio/água. Adaptada de Lydon.⁶¹



Fonte: LYDON (1998, p. 461)

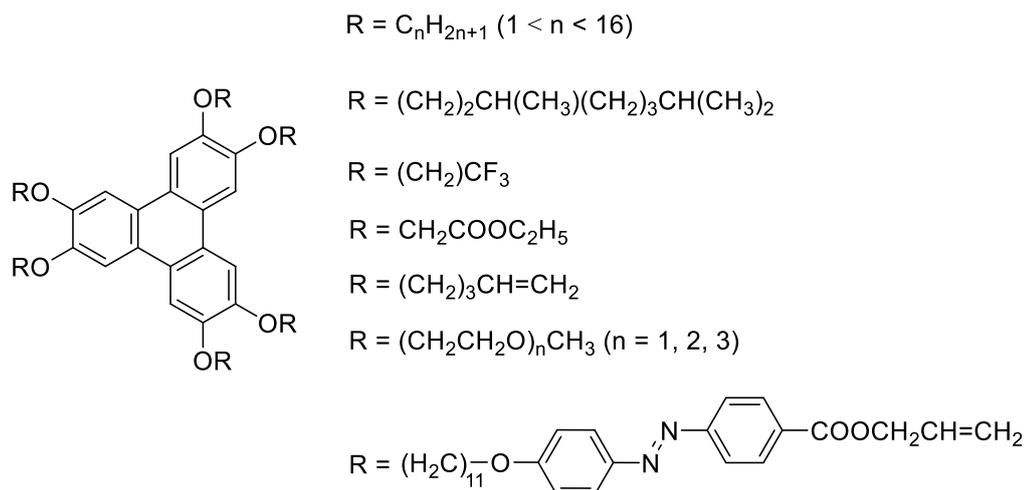
Em geral, cristais líquidos liotrópicos cromônicos com características iônicas têm sido aplicados para sensores de diferentes natureza,⁷⁴ como também usados em polarizadores ópticos e compensadores ópticos em *displays* com cristais líquidos.⁷⁵ Uma nova abordagem para o uso do DSCG foi realizada recentemente por Navarro-Vázquez e colaboradores⁷⁶ que o empregaram como meio de alinhamento para obtenção de RDCs de pequenas moléculas.

1.2.2 Fases Cromônicas não-Iônicas (TP6EO2M) à Base de Trifenileno (TP)

Uma variedade de estruturas discóticas são baseadas no esqueleto trifenilênico (TP, do inglês - *Triphenylene*), as quais podem ser encontradas na literatura (*Figura 14*). O número de estruturas reportadas é significativamente elevado considerando a facilidade para obter novas

estruturas alterando apenas as cadeias laterais (R). Estas podem apresentar ramificações, insaturações, ou diversos heteroátomos. Em geral, formam cristais discóticos termotrópicos, mas alguns como aqueles com cadeias laterais pegiladas ($R = (CH_2CH_2O)_nCH_3$ com $n = 1, 2, 3$) formam fases liotrópicas.

Figura 14– Variedades de estruturas discóticas baseadas no esqueleto trifenilênico.



Um exemplo de cristais líquidos liotrópicos discóticos à base do trifenileno é a molécula 2,3,6,7,10,11-hexa-(1,4,7-trioxaóctil)-trifenileno, TP6EO2M (*Figura 15-A*), que faz parte do grupo não-iônico. Esta molécula possui um núcleo trifenilênico, o qual fornece rigidez e caráter hidrofóbico, e uma parte periférica, com seis cadeias laterais flexíveis, contendo óxido de etileno que confere-lhe hidroflicidade suficiente para proporcionar solubilidade em água.^{66,77}

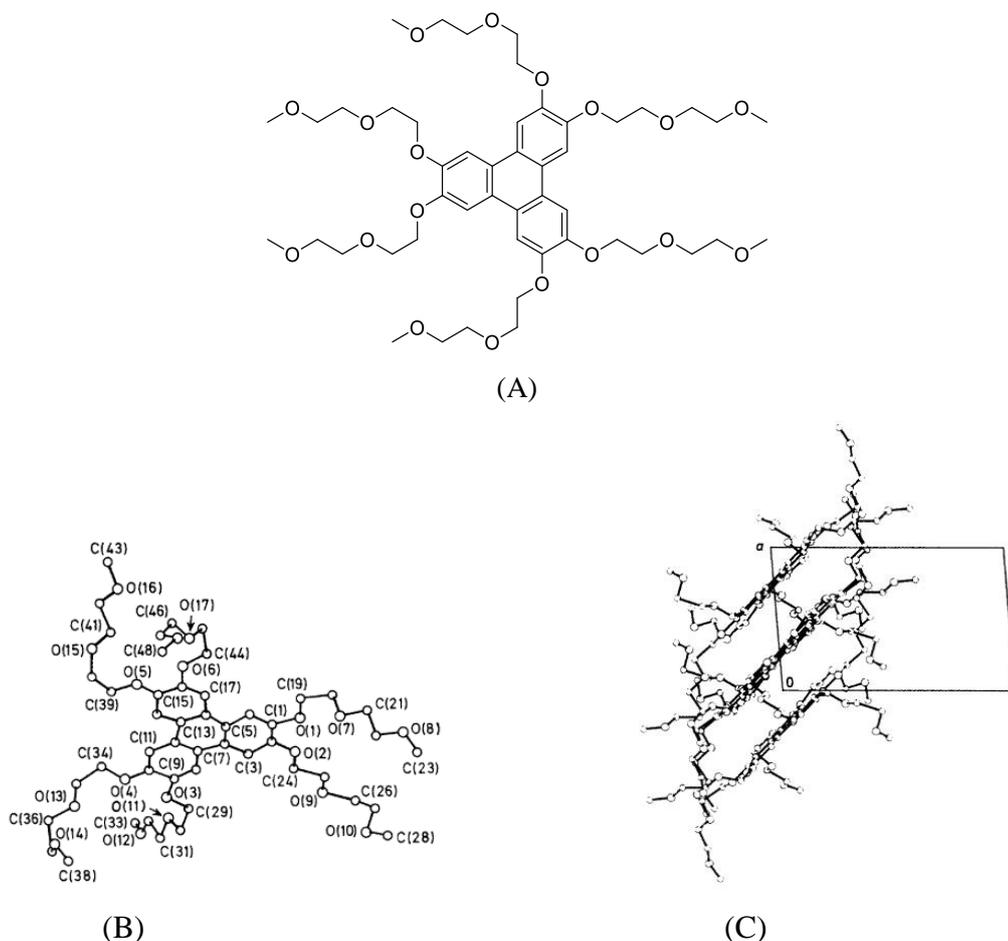
Boden e colaboradores foram os primeiros a sintetizar o TP6EO2M em 1985, sendo os mesmos nos anos seguintes a se debruçarem para caracterizar esta substância.⁷⁸ Os autores relataram a dificuldade na obtenção de bons dados de difração de raio-X do TP6EO2M, pois cristais adequados para difração eram difíceis de serem obtidos devido ao seu formato em forma de agulhas, assemelhando-se a cabelos finos, e também ao seu baixo ponto de fusão.

Superando estas dificuldades, os autores conseguiram resolver a estrutura cristalina do TP6EO2M para todos os oxigênios e carbonos, mas para um grande número de hidrogênios suas posições só puderam ser calculadas. O resultado foi uma molécula com anéis trifenilênico planos circundados por quatro cadeias estendidas e duas não-estendidas de etilenoglicol (*Figura 15-B*).

A célula cristalina foi definida como sendo monoclinica com *space group* $P2_1/a$, parâmetros de rede $a = 9,28(1)$, $b = 36,59(8)$, $c = 14,88(3)$ Å e ângulo $\beta = 94,9(2)^\circ$.⁷⁹ Uma

característica interessante observada na estrutura cristalina do TP6EO2M é o arranjo das moléculas que estão posicionadas uma sobre a outra formando uma coluna inclinada (*Figura 15-C*).⁷⁹

Figura 15– (A) A molécula 2,3,6,7,10,11-hexa-(1,4,7-trioxaoctil)-trifenileno, TP6EO2M; (B) Projeção do eixo *a* da molécula mostrando o centro trifenilênico com as cadeias de etilenoglicol estendidas e não-estendidas; (C) Projeção do eixo *b* mostrando o ângulo de inclinação do centro trifenilênico. Fonte de Boden *et al.*⁷⁹



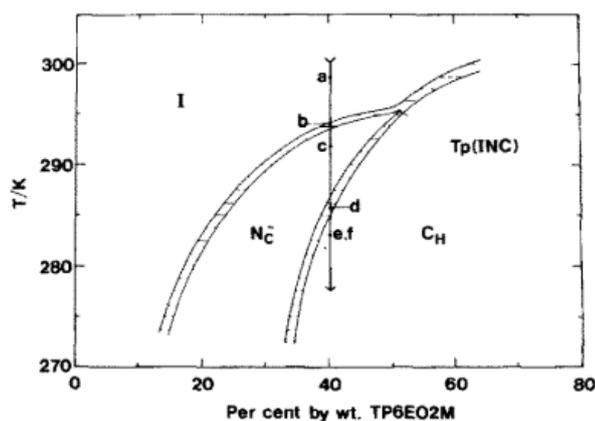
Fonte: BODEN (1988, p. 1342)

O diagrama de fases experimental do TP6EO2M/D₂O foi estabelecido por uma combinação de espectroscopia de deutério e de difração de raios-X.⁸⁰ Pode-se encontrar a fase nemática, numa faixa de 10 à 51 % em massa do composto em meio aquoso. O ponto triplo isotrópico-nemática-colunar acha-se no ponto correspondente a uma concentração de $51,2 \pm 0,4$ % em massa de TP6EO2M e uma temperatura de $24,2 \pm 0,2$ °C. Ademais, observou-se que

por cima de 25 °C apenas é observada a fase isotrópica independentemente da concentração do mesógeno.

Ao seguirmos a linha evidenciada no diagrama de fases (*Figura 16*) de **a** até **e**, para uma composição com 40 % em massa do TP6EO2M em D₂O, passamos de um meio completamente isotrópico, numa temperatura de 25,4 °C, para um meio completamente anisotrópico (a 10 °C) correspondente a uma fase é hexagonal colunar. Entretanto, antes de atingir a fase hexagonal colunar, o diagrama mostra formação da fase nemática, em 18,6 °C (**c**), e duas regiões que mostram uma coexistência de fases evidenciadas pelas curvas isotrópica-nemática à 21 °C (**b**) e nemática-hexagonal à 12,4 °C (**d**).

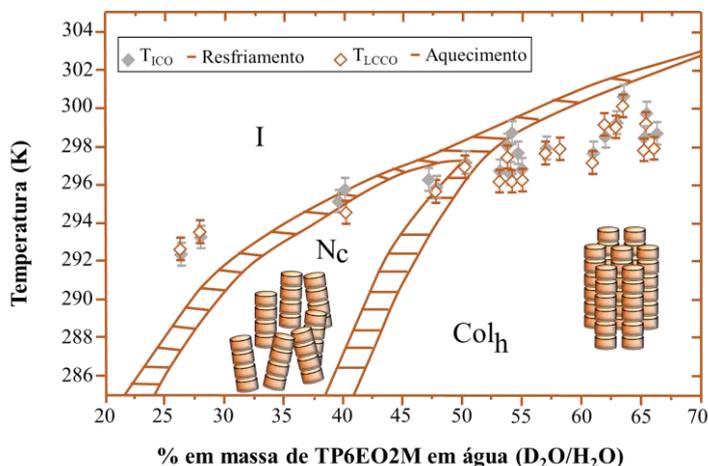
Figura 16– Diagrama de fases do sistema TP6EO2M/D₂O adquirido mediante observação de espectros de RMN-²H mostrando a fase isotrópica (I), a fase nemática (N_c) e a fase hexagonal (C_H). Fonte de Boden *et al.*⁸⁰



Fonte: BODEN (1986, p. 360)

Mais recentemente, em 2012, Al-Lawati e co-autores⁷⁷ compararam o diagrama de fases do TP6EO2M/D₂O determinado por Boden e colaboradores⁸⁰ com os dados experimentais da temperatura de transição do TP6EO2M/H₂O medida por elipsometria de ondas evanescentes (EWE, do inglês - *Evanescent Wave Ellipsometry*). O resultado foi um diagrama semelhante ao adquirido mais de duas décadas antes (*Figura 17*).

Figura 17– Sobreposição de dados entre o diagrama de fases para TP6EO2M/D₂O determinado por espectroscopia de RMN-²H e a transição de temperatura para o TP6EO2M analisada em EWE. Fase isotrópica (I); fase nemática colunar (N_c); fase nemática colunar hexagonal (Col_h). Adaptada de Al-Lawati *et al.*⁷⁷

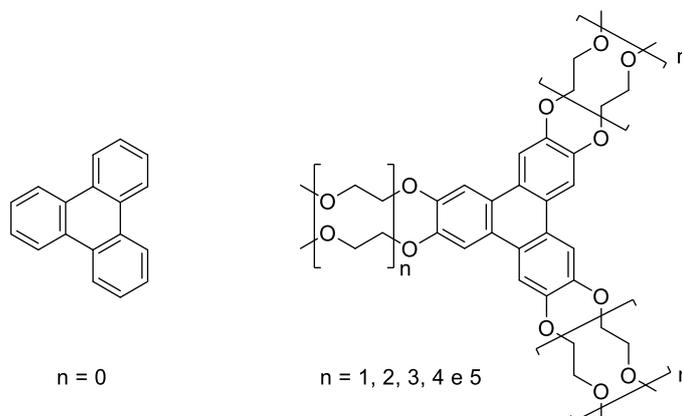


Fonte: AL-LAWATI (2012, p. 12630)

Em estudos de dinâmica molecular, Wilson e colaboradores⁸¹ relacionaram a dependência da temperatura de transição de fases, entre o meio isotrópico e o meio cristalino, com o tipo e tamanho da cadeia lateral de polietilenoglicol [(CH₂CH₂O)_nCH₃]. Para tanto, usaram a dinâmica de partículas dissipativas (DPD) ao nível *coarse-graining* (Figura 18). Os autores observaram que quanto maior o tamanho da cadeia de etilenoglicol, menor a interação entre as colunas vizinhas que se formam por empilhamento do TP6EOnM. Isto traz como consequência o aumento da permeabilidade de moléculas de H₂O situadas entre estas colunas.

Eles observaram, também, que o grau do empilhamento de moléculas TP6EOnM está diretamente relacionado com o tamanho das cadeias laterais, pois constataram que quanto menor a cadeia maior o empilhamento.⁸¹ Isto, para eles, é confirmado por outros estudos,^{82,83} reflete o aumento da solubilidade do TP6EOnM em decorrência do maior número de etilenoglicol nas cadeias laterais, ou seja, quando o número de etilenoglicol em cada cadeia lateral aumenta, conseqüentemente, a solubilidade do mesógeno também aumenta. Sendo assim, é de se esperar que o TP6EO3M seja mais solúvel do que o TP6EO2M em meio aquoso, portanto, o TP6EO2M atingiria mesofases em menores concentrações e temperaturas mais elevadas do que aquele com uma unidade a mais de etilenoglicol em cada cadeia lateral.

Figura 18– Série de moléculas TP6EO_nM simuladas em dinâmica de partículas dissipativas no meio aquoso para observar o comportamento de agregação.

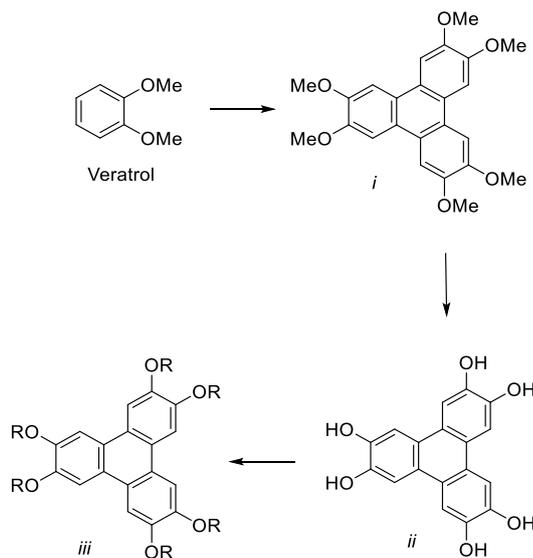


Em geral, o TP6EO2M é preparado por alquilação do 2,3,6,7,10,11-hexahidroxi-TP (*Figura 19-ii*) que, por sua vez, é preparado por desmetilação do 2,3,6,7,10,11-hexametoxi-TP (*Figura 19-i*),⁸⁴ enquanto o composto (*i*), da mesma *Figura 19*, é obtido por trimerização oxidativa que é um método clássico para a formação de ligações arila-arila a partir do veratrol.

A trimerização oxidativa do veratrol é uma etapa essencial na síntese do TP6EO2M. Ela pode ser realizada de forma eletroquímica em eletrodo de platina⁸⁵ ou usando agentes oxidantes,⁸⁶ como cloranil/H₂SO₄,⁷⁸ ou o FeCl₃, em DCM/H₂SO₄.⁸⁷⁻⁸⁹ Além destes dois exemplos de agentes oxidantes usados na trimerização oxidativa, existem outros,⁹⁰⁻⁹³ mas apresentam rendimentos inferiores quando comparados ao sistema FeCl₃/DCM.

Se comparamos na literatura as duas rotas de síntese para o composto (*i*) perceberemos que a rota eletroquímica é menos vantajosa, pois ela é muito mais lenta. Além do mais, a quantidade em massa do produto sintetizado é menor do que a obtida mediante reagentes oxidantes.^{84,89} Por exemplo, Chapuzet e Simonet⁸⁵ usando a trimerização eletroquímica obtiveram aproximadamente 140 mg do composto (*i*) (rendimento de 35 %), bem como Boden e colaboradores⁸⁹ afirmaram que durante todas as suas tentativas nunca obtiveram mais do que 1 g. Por outro lado, a trimerização oxidativa, além de ser mais rápida, consegue rendimentos mais favoráveis, a saber, com o agente oxidante cloranil, em solução acidificada com 70 % de H₂SO₄, o rendimento obtido para o 2,3,6,7,10,11-hexametoxi-TP (*Figura 19-i*) purificado chega a 45 %, ⁸⁴ enquanto com o FeCl₃/DCM/H₂SO₄ o rendimento atingiu 78 % do produto sem, no entanto, ser submetido a processos de purificação.⁸⁷

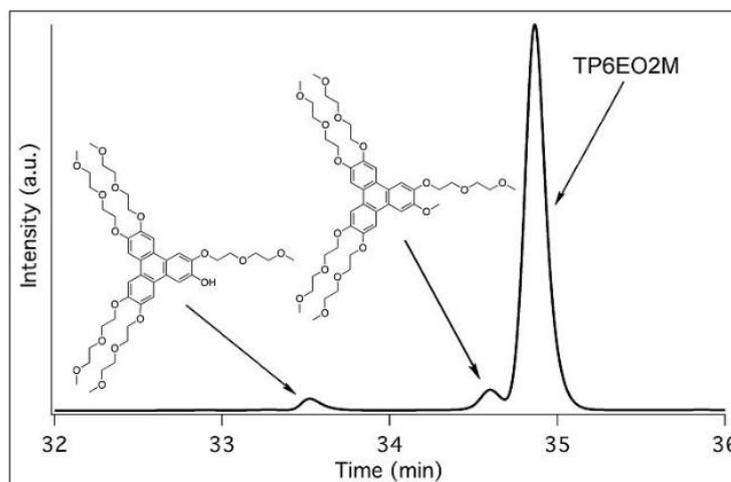
Figura 19– Rota sintética convencional para obtenção do TP6EO2M.



Já a etapa para adquirir o 2,3,6,7,10,11-hexahidroxi-TP não mostra complicações, pois depois de purificado o rendimento chega próximo a 90 %, por outro lado a etapa final, para conseguir o TP6EO2M (*Figura 19-iii*) com grau de purificação analítico, é problemática, atingindo, no melhor dos casos, um rendimento de 37 %. Para obter este resultado, Baranoff e colaboradores⁸⁷ submeteram a mistura reacional com TP6EO2M à sucessivas cromatografia em coluna de sílica gel com gradiente crescente de polaridade (CHCl₃ até CHCl₃/MeOH 5 %), mas ainda assim alcançaram o TP6EO2M misturado à duas impurezas (*Figura 20*).

Ao analisar estas impurezas, por espectrometria de massa, revelou-se que aquela com comportamento mais similar ao produto, com tempo de retenção de aproximadamente 35 minutos, corresponderia ao trifenileno com cinco cadeias de 2-(2-metoxietoxi)-etoxi o qual seria originado da desmetilação incompleta do 2,3,6,7,10,11-hexametoxi-TP (*Figura 19-i*). Enquanto a outra, com tempo de retenção de aproximadamente 34 minutos, teria, bem como a primeira, cinco cadeias de 2-(2-metoxietoxi)-etoxi, porém gerada da alquilação incompleta do 2,3,6,7,10,11-hexahidroxi-TP (*Figura 19-ii*). Foi necessário para separar estes subprodutos do TP6EO2M o uso de HPLC preparativo com eluente isocrático de acetonitrila (40 %) em meio aquoso.

Figura 20– Tempo de retenção das impurezas na fração do TP6EO2M em HPLC preparativo (eluente isocrático água/Aetonitrila 40 %) após purificação em cromatografia em coluna de sílica gel. Fonte de Herbaut *et al.*⁸⁷



Fonte: HERBAUT (2015, p. 521)

A capacidade de controlar a ancoragem de materiais de cristal líquido nas superfícies é importante para muitas aplicações, principalmente, na indústria de displays, mas também potencialmente para o desenvolvimento de novos sensores químicos e biológicos.

Cristais líquidos liotrópicos são comuns em sistemas biológicos e o controle sobre seu alinhamento pode ser útil para o desenvolvimento de novos sensores. Os cristais líquidos cromônicos liotrópicos têm sido usados como um sensor microbiano em tempo real para detectar complexos imunes.⁹⁴

Al-Lawati *et al.*⁷⁷ investigou o tipo de alinhamento do TP6EO2M existente em monocamadas automontadas em substratos hidrofílicos (superfície de alcanotiol com terminação carboxílica $-\text{CO}_2\text{H}$) e hidrofóbicos (superfície de alcanotiol com terminação alquila $-\text{CH}_3$) usando a técnica SAM (do inglês – *Self-Assembled Monolayer*). Segundo este estudo, o TP6EO2M alinha-se de maneira plana na fase nemática colunar, tanto em superfície hidrofílica como hidrofóbica, embora a fase colunar hexagonal tenha tido resultados ligeiramente favorecidos para uma ancoragem homeotrópica na superfície hidrofóbica.

Os estudos com TP6EO2M, em grande parte, são voltados para uso desta estrutura como molécula modelo em simulação computacional.^{59,81,75,95} Ela é usada muitas vezes para entender a formação de mesofases de cristais líquidos em sistemas cromônicos não-iônicos, de modo a demonstrar o empilhamento auto-organizado dos mesógenos. Nesta pesquisa, traremos uma outra abordagem na qual o TP6EO2M será explorado como meio de alinhamento para aquisição

de acoplamento dipolar residual e anisotropia do deslocamento químico residual da cefuroxima e da sacarose.

1.3 Aplicação dos Meios Orientados em RMN para Extração de Observáveis Anisotrópicos na Elucidação de Moléculas Orgânicas

Toda a matéria no universo é magnética, mas a maioria só manifesta esta propriedade quando submetida a um campo magnético externo, com exceção dos materiais ferromagnéticos que apresentam espontaneamente propriedades magnéticas.

Um núcleo atômico de número quântico de spin $I = 1/2$ na presença de um campo magnético passa a ter dois diferentes níveis de energia e a diferença entre os dois estados energéticos é proporcional à força do campo magnético em que o núcleo está inserido, isto é conhecido como efeito Zeeman. Embora a interação de Zeeman seja útil para identificar diferentes tipos de núcleos colocados em campo magnético, apresentando cada um deles uma frequência própria de ressonância, informações estruturais e dinâmicas podem ser melhor obtidas considerando outras interações magnéticas e eletrônicas que, em campos magnéticos intensos, podem ser consideradas perturbações da interação de Zeeman, a saber: acoplamento escalar, anisotropia do deslocamento químico, acoplamento dipolar e acoplamento quadrupolar.

Num meio líquido isotrópico, a rotação molecular zera tanto o valor médio dos acoplamentos dipolar e quadrupolar, como também a parte anisotrópica do deslocamento químico e acoplamento escalar. A fim de contornar esse problema, pode-se inserir os núcleos, a serem analisados, em meios orientados para permitir que as propriedades de RMN anisotrópicas possam ser medidas em meios líquidos.

Fazendo uso dessa ideia Saupe e Englert¹⁰, usaram fases termotrópicas como solvente de pequenas moléculas orgânicas. Na presença de campos magnéticos suficientemente fortes, estes cristais líquidos alinham-se espontaneamente e uma parte deste alinhamento é transmitido às moléculas em solução resultando na observação do acoplamentos dipolares.

Todavia, os valores do acoplamento dipolar obtidos por Saupe e Englert, resultado do alto grau de ordem introduzido pela fase nemática termotrópica, foram da ordem de várias centenas a milhares de Hertz. Os espectros mostraram-se portanto fortemente acoplados e inviáveis de serem interpretados exceto nos casos mais simples como moléculas muito pequenas e com alto grau de assimetria. Os anos seguintes foram de aprimoramento da técnica e aplicação a problemas conformacionais simples.

Porém, o uso de mesógenos liotrópicos, ao invés da termotrópicos, permite obter a fase nemática em baixas concentrações do mesógeno na presença de um cossolvente como, por exemplo, água ou até mesmo solventes orgânicos. Tal mudança possibilitou a obtenção de um grau de ordem muito menor que, conseqüentemente, resultou em acoplamento dipolar entre 0,01 a 0,1 %. Isto permitiu a extração de informações a respeito da configuração relativa de uma molécula através do RDC sem a perda de resolução do espectro, que são ainda facilmente interpretáveis.³⁰

Nesses meios de acoplamento fraco, os acoplamentos dipolares observados têm uma magnitude similar ou principalmente menor do que os correspondentes escalares, facilitando a determinação dos resultados espectrais e determinação do sinal positivo ou negativo do acoplamento.

1.4 Acoplamento Dipolar

O acoplamento dipolar surge da interação entre momentos magnéticos de dois diferentes spins nucleares que, por convenção, são rotulados como I para o spin nuclear mais abundante, por exemplo, os prótons ^1H , e S para o spin com menor abundância tal como ^{13}C ou ^{15}N . O acoplamento dipolar é simplesmente a interação do dipolo magnético do núcleo I com o campo magnético gerado pelo núcleo S e vice-versa. Esse efeito é inversamente proporcional ao cubo da distância entre núcleos sem a necessidade de eles estarem ligados. O acoplamento dipolar pode ser um acoplamento homonuclear, quando os núcleos são iguais ($I - I$; $S - S$), ou heteronuclear, quando os dois núcleos que estão interagindo são diferentes ($I - S$).

A abundância natural dos núcleos ativos em RMN e o espaço entre eles são fatores que influenciam a magnitude do acoplamento dipolar. Para uma interação heteronuclear ente os spins I e S , o campo produzido pelo spin I afetará o campo do spin S de modo a somar ou subtrair dependendo da orientação do spin I em relação ao spin S . O grau do efeito sentido pelo campo magnético do spin S , dentro do alcance do campo magnético do spin I , é caracterizado pela força do acoplamento dipolar heteronuclear o qual é expresso pelo Hamiltoniano na *Equação 4* em condições de acoplamento fraco.

$$\text{Equação 4} \quad \mathcal{H}_{IS} = \kappa \left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right) \mathbf{I}_Z \mathbf{S}_Z = 2\pi D_{IS} \mathbf{I}_Z \mathbf{S}_Z$$

Aqui, θ é o ângulo que descreve a orientação formada entre o vetor internuclear e a direção apontada pelo campo magnético externo B_0 (Figura 21), I_z e I_s são, respectivamente, os operadores de I e S do momento angular do spin nuclear na componente Z , enquanto κ é a constante de acoplamento dipolar que é definida segundo a Equação 5.

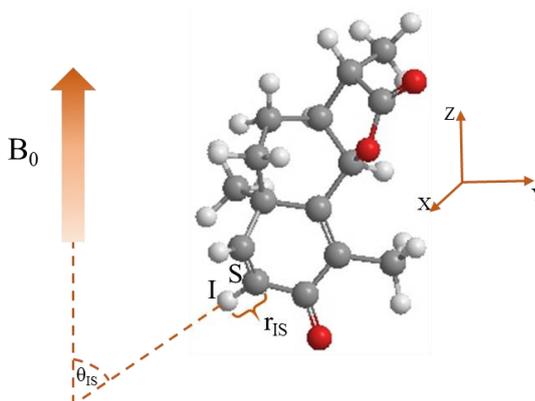
Equação 5
$$\kappa = -\left(\frac{\mu_0}{4\pi^2}\right) \frac{\hbar\gamma_I\gamma_S}{r_{IS}^3}$$

E D_{IS} é o acoplamento dipolar que é definido como:

Equação 6
$$\langle \bar{D}_{IS} \rangle = -\left(\frac{\mu_0}{4\pi^2}\right) \frac{\hbar\gamma_I\gamma_S}{r_{IS}^3} \left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{2}\right)$$

Onde, μ_0 é a constante de permeabilidade do vácuo ($4\pi \times 10^{-7}$ H/m), \hbar é a constante de Planck dividida por 2π , γ_I e γ_S são as respectivas razões giromagnéticas dos spins nucleares I e S , r_{IS} é a distância internuclear entre I e S . É importante observar que o decaimento do acoplamento dipolar é proporcional ao cubo da distância e não à sexta-potência, como é o caso da relaxação dipolar (efeito NOE).

Figura 21– Acoplamento dipolar entre dois spins I e S . θ é o ângulo formado entre os vetores da ligação heteronuclear $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ da molécula α -santonina e a direção do campo magnético externo B_0 . Adaptada de Teles *et al.*¹²



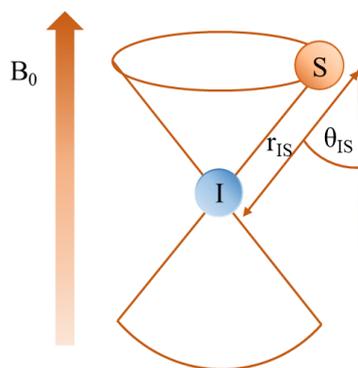
Fonte: TELES (2015, p. 1345)

O acoplamento dipolar (D) é uma interação através do espaço e não depende da existência de ligações químicas entre os núcleos acoplados, diferentemente, do acoplamento escalar (J). Isso nos leva a concluir que D pode surgir entre núcleos situados a várias ligações

de distância, ou mesmo entre diferentes moléculas, enquanto J está confinado, na maioria das ocasiões, a uma, duas ou três ligações de distância.

Observando a *Equação 6* percebe-se que o acoplamento dipolar D_{IS} é dependente da orientação existente entre o vetor internuclear e o campo magnético B_0 , através do termo $(3\cos^2\theta - 1)$. No caso do acoplamento entre dois spins diretamente ligados quimicamente, como é o caso do acoplamento $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ $^1D_{\text{CH}}$, as razões giromagnéticas são constantes e a distância internuclear é igual à média vibracional do comprimento da ligação. Nesta circunstância, a magnitude da interação dipolar $^1D_{\text{CH}}$ será portanto, exclusivamente, dependente do ângulo θ ou seja, uma consequência da diferente orientação espacial entre o vetor $I-S$ com o campo B_0 (*Figura 22*).

Figura 22– Cone de acoplamento dipolar entre os spins I e S . Adaptada de Thiele.²⁶

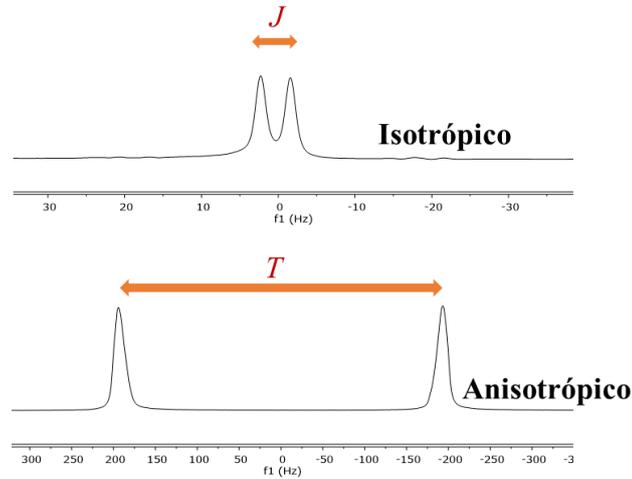


Fonte: THIELE (2007, p. 67)

Em meio isotrópico, o termo $(3\cos^2\theta - 1)$ é zero, pois as moléculas em meio líquido podem mover-se livremente em todas as direções (movimento randômico), em um intervalo de tempo muito curto e sem restrição de orientação, cancelando o acoplamento dipolar. Isso é um limitante para o uso do acoplamento dipolar como ferramenta de elucidação estrutural de moléculas orgânicas usando a técnica de RMN em solução isotrópica.

Para contornar o cancelamento do acoplamento dipolar faz-se necessário o uso de meios orientados, também conhecidos como meios alinhados, capazes de recuperar uma pequena parte dos parâmetros anisotrópicos. Quando isto acontece a constante de acoplamento dipolar é similar em magnitude ao acoplamento escalar. O resultado é um desdobramento das linhas espectrais igual à soma dos acoplamentos escalar e dipolar (*Figura 23*), ou seja, um acoplamento total (T) (*Equação 7*).

Figura 23– Linhas espectrais observadas nos meios isotrópico e anisotrópico.



Equação 7

$$T = J + D$$

A seguir iremos aprofundar um pouco mais na teoria que respalda o acoplamento dipolar e, em seguida, procuraremos compreender o uso dos RDCs para obter um tensor de alinhamento, no qual representa a densidade de estados rotacionais da molécula, com base na metodologia da decomposição do valor singular (SVD, do inglês - *Singular Value Decomposition*).

1.4.1 Fundamentação Teórica do Acoplamento Dipolar

1.4.1.1 Hamiltoniano do Acoplamento Dipolar Estático

Consideremos dois spins nucleares denominados I e S (Figura 24) separados por um vetor internuclear \vec{R} o qual pode ser expresso conforme a Equação 8:

Equação 8

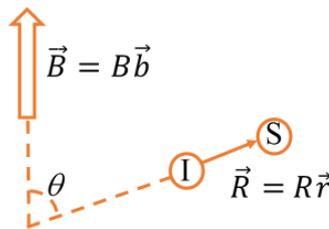
$$\vec{R} = R\vec{r} = R \begin{bmatrix} r_x \\ r_y \\ r_z \end{bmatrix}$$

Onde, R é a distância entre os dois núcleos e \vec{r} corresponde ao vetor unitário na direção do vetor \vec{R} . Da mesma forma podemos representar o vetor do campo magnético externo como sendo (Equação 9):

$$\text{Equação 9} \quad \vec{B} = B\vec{b} = B \begin{bmatrix} b_x \\ b_y \\ b_z \end{bmatrix}$$

Em que B é a magnitude do campo magnético externo e \vec{b} é o vetor unitário apontando na direção do campo magnético. Sendo que o ângulo formado entre os dois vetores é denominado de θ .

Figura 24– Ângulo θ formado entre os vetores \vec{R} e \vec{B} . Adaptada de Kramer *et al.*⁹⁶



Fonte: KRAMER (2004, p. 11)

O Hamiltoniano do acoplamento dipolar heteronuclear fraco (\mathcal{H}_D), desse par de spins I e S presente em um campo magnético externo (B_0) que aponta ao longo do eixo z^L (coordenada de laboratório no eixo z), é expresso pela Equação 10.

$$\text{Equação 10} \quad \mathcal{H}_D = 2\pi D I_{z^L} S_{z^L}$$

Sendo que D é o acoplamento dipolar (Equação 11) que pode ser calculado experimentalmente como sendo a diferença entre os picos adquiridos nos meios isotrópico e anisotrópico (Figura 23) e é dado por:

$$\text{Equação 11} \quad D = \frac{\kappa}{R^3} \left(\cos^2 \theta - \frac{1}{3} \right)$$

Onde, o termo κ é dependente apenas de constantes, por conseguinte, ele também é uma constante sendo expresso como:

$$\text{Equação 12} \quad \kappa = -\frac{3}{8\pi^2} \gamma_I \gamma_S \mu_0 \hbar$$

Onde, γ_I e γ_S são as constantes giromagnéticas dos spins nucleares I e S , μ_0 é a constante de permeabilidade do vácuo ($4\pi \times 10^{-7} \text{ NA}^{-2}$) e \hbar é a constante de Planck dividida por 2π . As constantes giromagnéticas dos spins nucleares são características de cada núcleo, sendo assim, κ é um valor característico para cada par de spins nucleares I e S da molécula. Por exemplo, para o acoplamento entre ^{13}C - ^1H seu valor é igual a $-90,6 \text{ KHz } \text{Å}^3$, enquanto para ^1H - ^1H é igual a $-360,3 \text{ KHz } \text{Å}^3$. Diante do exposto e considerando a distância internuclear entre I e S invariável (estático), podemos afirmar que D (Equação 11) é dependente apenas da variação do ângulo θ para o mesmo par de spins nucleares da mesma molécula.

O $\cos^2\theta$ está definido no intervalo de valores $[0,1]$ tal qual os valores máximo ($D_{IS}^{\text{máx}}$) e mínimo ($D_{IS}^{\text{mín}}$) do acoplamento dipolar correspondem à situação onde o vetor internuclear é, respectivamente, paralelo ao campo magnético, ($\cos^2\theta = 1$), (Equação 13) e perpendicular, ($\cos^2\theta = 0$), (Equação 14).

$$\text{Equação 13} \quad D_{IS}^{\text{máx}} = \frac{\kappa}{R^3} \left(\cos^2\theta - \frac{1}{3} \right) = \frac{\kappa}{R^3} \left(1 - \frac{1}{3} \right) = \frac{2\kappa}{3R^3}$$

$$\text{Equação 14} \quad D_{IS}^{\text{mín}} = \frac{\kappa}{R^3} \left(\cos^2\theta - \frac{1}{3} \right) = \frac{\kappa}{R^3} \left(0 - \frac{1}{3} \right) = -\frac{1\kappa}{3R^3}$$

O intervalo da variação do ângulo θ pode ser expressado em função da multiplicação escalar dos vetores unitários \vec{b} e \vec{r} (Equação 15), onde \vec{b}^T é a transposta da matriz do vetor \vec{b} .

$$\text{Equação 15} \quad \vec{b}^T \cdot \vec{r} = \cos \theta$$

1.4.1.2 Dependência do Acoplamento Dipolar com a Mobilidade Molecular

Considere uma molécula rígida cuja distância R entre os spins nucleares I e S é independente do tempo. Considere ainda que I e S façam parte de uma estrutura molecular em solução e que o campo magnético aplicado está apontado ao longo do eixo z^L . Nessas condições, temos \vec{B} constante, enquanto a direção de \vec{R} , mas não o seu módulo, é dependente do tempo devido à difusão rotacional da molécula no seio da solução. Por conseguinte, o termo $\cos^2\theta$ da Equação 11 também fica dependente do tempo e a expressão da média temporal \bar{D} do acoplamento dipolar (onde o traço representa a média no tempo) deve ser reescrita como:

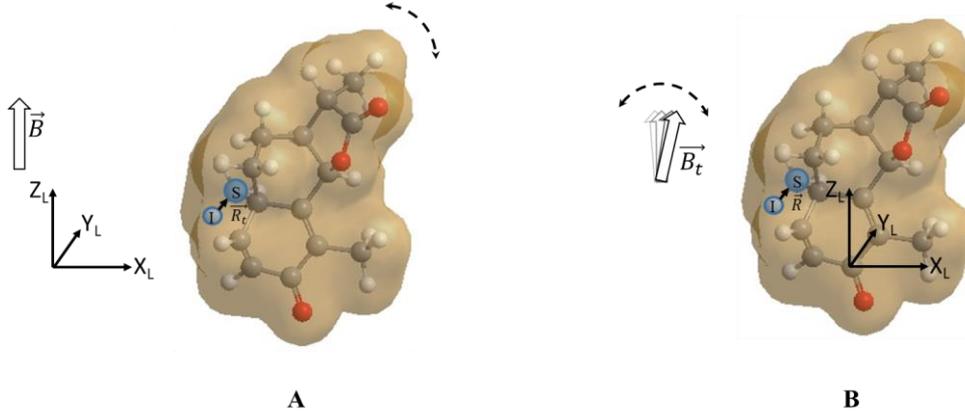
$$\text{Equação 16} \quad \bar{D} = \frac{\kappa}{R^3} \left(\overline{\cos^2\theta} - \frac{1}{3} \right)$$

Podemos fixar um sistema de coordenadas de referência (x, y, z) na molécula (*Figura 25-B*). Nessa situação, \vec{R} passa a ser constante, enquanto \vec{B} varia com o tempo. Dessa forma, o termo $\overline{\cos^2\theta}$, que agora depende de \vec{B} , pode convenientemente ser expressado em termos de um tensor de probabilidade (\hat{P}). Portanto, o vetor do campo magnético, antes constante, passa a depender do tempo e \hat{P} é a probabilidade da distribuição da direção desse campo magnético externo nas coordenadas de referência fixadas na molécula. No geral, \hat{P} corresponde a uma matriz simétrica real 3 x 3 (*Equação 17*) com traço igual a 1 (*Equação 18*).

$$\text{Equação 17} \quad \hat{P} = \begin{bmatrix} P_{xx} & P_{xy} & P_{xz} \\ P_{xy} & P_{yy} & P_{yz} \\ P_{xz} & P_{yz} & P_{zz} \end{bmatrix}$$

$$\text{Equação 18} \quad P_{xx} + P_{yy} + P_{zz} = 1$$

Figura 25– (A) Coordenadas de referência de laboratório (x^L, y^L, z^L) com \vec{B} constante fixado no eixo z^L e \vec{R} variando com o tempo; (B) Coordenadas de referência (x, y, z) fixadas na molécula com \vec{B} variando com o tempo e \vec{R} constante. Adaptada de Kramer *et al.*⁹⁶



Fonte: KRAMER (2004, p. 12)

Assim sendo, o acoplamento dipolar (\bar{D}) pode ser expresso dependente de \hat{P} , que por sua vez, é a variação da projeção do vetor campo magnético no sistema de coordenadas de referência fixadas na molécula em função do tempo. Entretanto, na *Equação 16* não está clara a relação de dependência do acoplamento dipolar com \hat{P} . A fim de adquirir uma expressão matemática que consiga evidenciar essa interdependência, podemos elevar ao quadrado ambos os membros da *Equação 15* e avançar a resolução para obtermos uma outra expressão do acoplamento dipolar pela qual fique mais evidente sua relação com a matriz de probabilidade do campo magnético externo que está refletido nas coordenadas cartesianas fixadas na molécula.

$$\cos \theta = \vec{b}^T \cdot \vec{r} = [b_x(t) \quad b_y(t) \quad b_z(t)] \begin{bmatrix} r_x \\ r_y \\ r_z \end{bmatrix} = (b_x(t)r_x + b_y(t)r_y + b_z(t)r_z)$$

$$\cos^2 \theta = (b_x(t)r_x + b_y(t)r_y + b_z(t)r_z)^2$$

$$\cos^2 \theta = [b_x(t)r_x + b_y(t)r_y + b_z(t)r_z] \cdot [b_x(t)r_x + b_y(t)r_y + b_z(t)r_z]$$

$$\cos^2 \theta = \begin{pmatrix} b_x^2(t)r_x^2 + & b_x(t)b_y(t)r_xr_y + & b_x(t)b_z(t)r_xr_z + \\ b_x(t)b_y(t)r_xr_y + & b_y^2(t)r_y^2 + & b_y(t)b_z(t)r_yr_z + \\ b_x(t)b_z(t)r_xr_z + & b_y(t)b_z(t)r_yr_z + & b_z^2(t)r_z^2 \end{pmatrix}$$

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

Levando-se em consideração a média do tempo, podemos simplificar a expressão anterior como está reescrita na *Equação 19*:

$$\text{Equação 19} \quad \overline{\cos^2 \theta} = \begin{bmatrix} r_x & r_y & r_z \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \overline{b_x^2} & \overline{b_x b_y} & \overline{b_x b_z} \\ \overline{b_x b_y} & \overline{b_y^2} & \overline{b_y b_z} \\ \overline{b_x b_z} & \overline{b_y b_z} & \overline{b_z^2} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} r_x \\ r_y \\ r_z \end{bmatrix}$$

Nesta expressão podemos observar que $\overline{\cos^2 \theta}$ é igual à multiplicação de matrizes, sendo que os elementos da matriz intermediária são os valores do campo magnético projetados no sistema de coordenadas fixado na molécula.

$$\text{Equação 20} \quad \overline{\cos^2 \theta} = \vec{r}^T \hat{P} \vec{r}$$

Em seguida, substitui-se a *Equação 20* na *Equação 16* conduzindo-nos, finalmente, à equação matemática que mostra a relação da constante do acoplamento dipolar com a matriz de probabilidade do campo magnético em relação ao sistema de coordenadas fixada na molécula:

$$\text{Equação 21} \quad \bar{D} = \frac{\kappa}{R^3} \left(\overline{\cos^2 \theta} - \frac{1}{3} \right) \quad \Rightarrow \quad \bar{D} = \frac{\kappa}{R^3} \left(\vec{r}^T \hat{P} \vec{r} - \frac{1}{3} \right)$$

A *Equação 21* pode ser usada para a medida de acoplamento dipolar. Entretanto, o acoplamento dipolar na literatura é mais comumente expresso em termos de tensor de alinhamento (\hat{A}), *Equação 22*, ao invés de tensor de probabilidade (\hat{P}).

$$\text{Equação 22} \quad \hat{A} = \hat{P} - \frac{1}{3} \hat{1}$$

Onde, $\hat{1}$ é a matriz identidade de mesma ordem da matriz de probabilidade \hat{P} e \hat{A} é a matriz do tensor de alinhamento também de ordem 3x3.

$$\hat{A} = \begin{bmatrix} A_{xx} & A_{xy} & A_{xz} \\ A_{xy} & A_{yy} & A_{yz} \\ A_{xz} & A_{yz} & A_{zz} \end{bmatrix}$$

Devemos, a partir de então, buscar uma expressão que relacione acoplamento dipolar com \hat{A} . Para tanto, primeiramente multiplica-se ambos os membros da *Equação 22* por \vec{r} e sua transposta, assim temos:

$$\vec{r}^T \hat{A} \vec{r} = \vec{r}^T \left(\hat{P} - \frac{1}{3} \right) \vec{r} = \vec{r}^T \hat{P} \vec{r} - \frac{1}{3} \vec{r}^T \vec{r}$$

De posse dessa expressão, podemos recorrer à *Equação 20* onde vemos que $\vec{r}^T \hat{P} \vec{r} = \overline{\cos^2 \theta}$. Assim, ao substituir na expressão acima e sabendo que $(\vec{r}^T \vec{r})$ é igual a 1, adquirimos $\vec{r}^T \hat{A} \vec{r} = \overline{\cos^2 \theta} - \frac{1}{3}$ que pode ser substituída na *Equação 16* fornecendo-nos a *Equação 23*.

$$\text{Equação 23} \quad \bar{D} = \frac{\kappa}{R^3} \vec{r}^T \hat{A} \vec{r}$$

A *Equação 23* mostra a relação do acoplamento dipolar com a variação do tensor de alinhamento, portanto, o acoplamento é determinado quando se conhece os elementos da matriz quadrática \hat{A} que tem um total de nove elementos. Assim como \hat{P} , essa matriz \hat{A} é simétrica e, conseqüentemente, sua resolução é reduzida à determinação de seis elementos ($A_{xx}, A_{yy}, A_{zz}, A_{xy}, A_{xz}, A_{yz}$). Podemos ainda diminuir a dependência da resolução da matriz \hat{A} para cinco elementos. Isso pode ser mostrado usando o traço da matriz do tensor de alinhamento (*Equação 24*).

O traço dessa matriz é determinado usando a combinação da *Equação 18* com a *Equação 22*, esta última, pode ser reescrita isolando o tensor de probabilidade, em vez do tensor de alinhamento fixado nos eixos da molécula $P_{xx} = A_{xx} + \frac{1}{3}$; $P_{yy} = A_{yy} + \frac{1}{3}$ e $P_{zz} = A_{zz} + \frac{1}{3}$. Essas projeções de \hat{P} são substituídas na *Equação 18*.

$$1 = P_{xx} + P_{yy} + P_{zz} = A_{xx} + \frac{1}{3} + A_{yy} + \frac{1}{3} + A_{zz} + \frac{1}{3} \Rightarrow$$

$$1 = A_{xx} + A_{yy} + A_{zz} + 3 \frac{1}{3} \Rightarrow$$

Equação 24
$$A_{xx} + A_{yy} + A_{zz} = 0$$

E assim a matriz simétrica do tensor de alinhamento passa a ser determinada por cinco variáveis, em vez de seis, porque ao conhecer duas variáveis da diagonal principal implica necessariamente determinar a terceira $A_{xx} = -A_{yy} - A_{zz}$.

1.4.1.3 *Uso da Decomposição do Valor Singular para Resolver o Acoplamento Dipolar Reduzido*

A resolução do acoplamento dipolar está condicionada a solucionar $\overline{\cos^2\theta} - \frac{1}{3}$ cujo resultado é igual ao valor da expressão $\vec{r}^T \hat{A} \vec{r}$, a qual de agora em diante denominaremos de acoplamento dipolar reduzido (d_{IS}), conforme a *Equação 25*:

Equação 25
$$d_{IS} = \overline{\cos^2\theta} - \frac{1}{3} = \vec{r}^T \hat{A} \vec{r}$$

Dessa forma, calcular o acoplamento dipolar reduzido (d_{IS}) é conhecer uma fração do acoplamento dipolar (\overline{D}_{IS}) eliminando-se a dependência com a distância internuclear (R) e a razão giromagnética (γ_I e γ_S). Porém, sem perder as informações vetoriais dos spins internucleares que são usadas para determinar a configuração, bem como, a conformação das moléculas.⁶

A expressão do acoplamento dipolar reduzido (*Equação 25*) em função da matriz do tensor de alinhamento pode ser reescrita em função da multiplicação matricial entre os cinco elementos que descrevem o plano tridimensional e a matriz com os elementos da projeção do tensor de alinhamento nas coordenadas de referência da molécula obtendo a *Equação 28*.

$$d_{IS} = \left(\overline{\cos^2\theta} - \frac{1}{3} \right) = \vec{r}^T \hat{A} \vec{r}$$

$$d_{IS} = [x \quad y \quad z] \begin{bmatrix} A_{xx} & A_{xy} & A_{xz} \\ A_{xy} & A_{yy} & A_{yz} \\ A_{xz} & A_{yz} & A_{zz} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix}$$

$$d_{IS} = [xA_{xx} + yA_{xy} + zA_{xz} \quad xA_{xy} + yA_{yy} + zA_{yz} \quad xA_{xz} + yA_{yz} + zA_{zz}] \begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix}$$

$$d_{IS} = x(xA_{xx} + yA_{xy} + zA_{xz}) + y(xA_{xy} + yA_{yy} + zA_{yz}) + z(xA_{xz} + yA_{yz} + zA_{zz})$$

$$d_{IS} = x^2A_{xx} + xyA_{xy} + xzA_{xz} + xyA_{xy} + y^2A_{yy} + yzA_{yz} + xzA_{xz} + yzA_{yz} + z^2A_{zz}$$

$$\text{Equação 26} \quad d_{IS} = x^2A_{xx} + 2xyA_{xy} + 2xzA_{xz} + y^2A_{yy} + 2yzA_{yz} + z^2A_{zz}$$

Fazendo referência à *Equação 24*, podemos isolar $A_{xx} = -A_{yy} - A_{zz}$ e substituir na *Equação 26* que fica:

$$d_{IS} = x^2(-A_{yy} - A_{zz}) + 2xyA_{xy} + 2xzA_{xz} + y^2A_{yy} + 2yzA_{yz} + z^2A_{zz}$$

$$d_{IS} = -x^2A_{yy} - x^2A_{zz} + 2xyA_{xy} + 2xzA_{xz} + y^2A_{yy} + 2yzA_{yz} + z^2A_{zz}$$

$$\text{Equação 27} \quad d_{IS} = 2xyA_{xy} + 2xzA_{xz} + (y^2 - x^2)A_{yy} + 2yzA_{yz} + (z^2 - x^2)A_{zz}$$

A *Equação 27* pode ser reescrita na forma de multiplicação de matrizes (*Equação 28*):

$$\text{Equação 28} \quad d_{IS} = [2xy \quad 2xz \quad y^2 - x^2 \quad 2yz \quad z^2 - x^2] \begin{bmatrix} A_{xy} \\ A_{xz} \\ A_{yy} \\ A_{yz} \\ A_{zz} \end{bmatrix}$$

Para resolver \hat{A} , precisamos portanto de pelo menos cinco ($N \geq 5$) acoplamentos dipolares reduzidos (*Equação 28*) entre diferentes pares de spins internucleares que sejam independentes entre si. Para não serem dependentes os vetores internucleares não podem ser paralelos, porque senão d_{IS} desses vetores são os mesmos, e também três vetores não podem pertencer ao mesmo plano, porque do contrário o terceiro vetor é na verdade obtido por combinação linear de outros dois vetores. Caso houver menos de cinco acoplamentos independentes o sistema passa a ser indeterminado.

$$\text{Equação 29} \quad \begin{bmatrix} d_{IS}^1 \\ \vdots \\ \dots \\ d_{IS}^N \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 2xy_1 & 2xz_1 & (y^2 - x^2)_1 & 2yz_1 & (z^2 - x^2)_1 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 2xy_N & 2xz_N & (y^2 - x^2)_N & 2yz_N & (z^2 - x^2)_N \end{bmatrix} \begin{bmatrix} A_{xy} \\ A_{xz} \\ A_{yy} \\ A_{yz} \\ A_{zz} \end{bmatrix}$$

A *Equação 29* pode ser reescrita em uma forma mais compactada (*Equação 30*), onde \hat{d} é a coluna que contém acoplamento dipolar experimental, \hat{M} é a matriz que tem informações geométricas da estrutura molecular e \hat{T} é a coluna que apresenta cinco elementos independentes da matriz do tensor de alinhamento.

$$\text{Equação 30} \quad \hat{d} = \hat{M}\hat{T}$$

Em geral, mais de cinco acoplamentos dipolares estarão disponíveis na molécula e, nesse caso, o sistema estará sobredeterminado e não tem solução. Entretanto, pode ser adquirido o tensor de alinhamento, que proporciona o melhor ajuste entre os valores experimentais e calculados, através do cálculo dos mínimos quadrados usando o método da decomposição em valores singulares (SVD).^{6,97} Dessa forma a matriz $\hat{M}_{N \times 5}$ pode ser decomposta como $\hat{M} = \hat{U}\hat{\Sigma}\hat{V}^T$, onde as matrizes unitárias $\hat{U}_{N \times N}$ e $\hat{V}_{5 \times 5}^T$ contêm, respectivamente, os vetores singulares esquerdo e direito e $\hat{\Sigma}_{N \times 5}$ é uma matriz diagonal que contém os valores singulares ($\sigma_1 \geq \sigma_2 \geq \dots \geq \sigma_p > 0$) de \hat{M} . Assim, a melhor solução será dada pela *Equação 31* que é o tensor com melhor ajuste para um conjunto de dados com a menor soma dos quadrados da diferença entre o valor do d_{IS} calculado e o experimental. Para chegarmos a essa equação, primeiramente substitui-se \hat{M} na *Equação 30* por $\hat{U}\hat{\Sigma}\hat{V}^T$ e, em seguida, multiplicamos ambos os membros por $(\hat{U}\hat{\Sigma}\hat{V}^T)^{-1}$, então teremos:

$$(\hat{U}\hat{\Sigma}\hat{V}^T)^{-1}\hat{d} = (\hat{U}\hat{\Sigma}\hat{V}^T)^{-1}\hat{U}\hat{\Sigma}\hat{V}^T\hat{T} \Rightarrow \hat{V}\hat{\Sigma}^{-1}\hat{U}^T\hat{d} = \hat{V}\hat{\Sigma}^{-1}\hat{U}^T\hat{U}\hat{\Sigma}\hat{V}^T\hat{T}$$

Por definição, como uma matriz $\hat{\Sigma}$ multiplicada por sua pseudoinversa $\hat{\Sigma}^{-1}$ é igual a matriz identidade $\hat{\Sigma}^{-1}\hat{\Sigma} = \hat{\Sigma}\hat{\Sigma}^{-1} = \hat{I}$; e \hat{U} e \hat{V} são matrizes unitárias, logo $\hat{U}^T\hat{U} = \hat{U}\hat{U}^T = \hat{I}$; $\hat{V}\hat{V}^T = \hat{V}^T\hat{V} = \hat{I}$, então o resultado da expressão no segundo membro $(\hat{V}\hat{\Sigma}^{-1}\hat{U}^T\hat{U}\hat{\Sigma}\hat{V}^T\hat{T})$ resume-se apenas a \hat{T} .

Equação 31

$$\hat{T} = \hat{V}\hat{\Sigma}^{-1}\hat{U}^T\hat{d}$$

Se o sistema não estiver bem condicionado qualquer pequena mudança dos dados inseridos pode causar grande variação do tensor de alinhamento. A condição do problema pode ser quantificada em termos do número de condição (C) que é dado pela razão entre o maior e o menor valor singular $C = \frac{\sigma_{maior}}{\sigma_{menor}}$. Como regra geral, se a condição de número for acima de 100, então o problema é considerado mal condicionado. Por outro lado, valores entre 30 e 100 indicam um sistema aceitavelmente condicionado, mas a aceitação depende se o tensor está bem definido na região onde o problema estrutural estiver localizado, por fim, se a condição de número for menor que 30 é considerado geralmente bom condicionado.

A qualidade do ajuste representa-se comumente através do fator de qualidade de Cornilescu (Q) que é calculado entre os resultados do acoplamento dipolar reduzido experimentais (d_{IS}^{exp}) frente aos calculados (d_{IS}^{calc}) usando a Equação 32. O Q é ideal quando for igual a zero, ou seja, quanto mais próximo a zero melhor o ajuste entre dados experimentais e calculados.⁹⁸

Equação 32

$$Q = \sqrt{\sum_{IS} \frac{(d_{IS}^{exp} - d_{IS}^{calc})^2}{(d_{IS}^{exp})^2}}$$

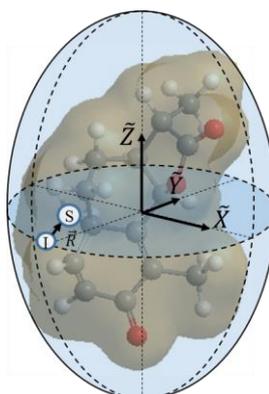
1.4.1.4 Expressando o Tensor de Probabilidade no Sistema Principal de Coordenadas

A diagonalização da matriz do tensor de probabilidade \hat{P} resulta em uma matriz diagonal \hat{P}_{\sim} , de mesma ordem 3x3, na qual tem os autovalores ($P_{\tilde{x}}, P_{\tilde{y}}, P_{\tilde{z}}$) pertencentes à matriz de origem \hat{P} situados na diagonal principal de \hat{P}_{\sim} . Cada autovalor tem seu autovetor ($\vec{v}_{\tilde{x}}, \vec{v}_{\tilde{y}}, \vec{v}_{\tilde{z}}$) que forma uma nova base vetorial que corresponde ao sistema principal de coordenadas ($\tilde{x}, \tilde{y}, \tilde{z}$). Se os autovalores da matriz simétrica \hat{P} forem diferentes entre si ($P_{\tilde{x}} \neq P_{\tilde{y}} \neq P_{\tilde{z}}$), então os autovetores serão ortogonais ($\vec{v}_{\tilde{x}} \perp \vec{v}_{\tilde{y}} \perp \vec{v}_{\tilde{z}}$) e sua representação geométrica será uma elipsoide (Figura 26) com o comprimento dos semi-eixos ($P_{\tilde{x}}, P_{\tilde{y}}, P_{\tilde{z}}$; onde $P_{\tilde{z}} > P_{\tilde{y}} > P_{\tilde{x}}$) correspondendo aos elementos da diagonal principal da matriz diagonalizada.

$$\hat{P} = \begin{bmatrix} P_{xx} & P_{xy} & P_{xz} \\ P_{xy} & P_{yy} & P_{yz} \\ P_{xz} & P_{yz} & P_{zz} \end{bmatrix} \xrightarrow{\text{Diagonalização}} \hat{P}_{\sim} = \begin{bmatrix} P_{\tilde{x}} & 0 & 0 \\ 0 & P_{\tilde{y}} & 0 \\ 0 & 0 & P_{\tilde{z}} \end{bmatrix}$$

Os autovalores da matriz diagonal representam a magnitude da probabilidade do campo magnético projetado no sistema principal $(\tilde{x}, \tilde{y}, \tilde{z})$, então se tivermos $P_{\tilde{x}} = P_{\tilde{y}}$ significa que a probabilidade do campo magnético é a mesma no plano transversal da elipsoide e se $P_{\tilde{z}} > P_{\tilde{x}} = P_{\tilde{y}}$ a maior probabilidade aponta no eixo \tilde{z} , então dizemos que a probabilidade é axialmente simétrica sem nenhum grau de rombicidade. Se o meio for isotrópico a probabilidade do campo será a mesma em todos os sentidos, neste caso, todos os autovalores serão iguais entre si ($P_{\tilde{x}} = P_{\tilde{y}} = P_{\tilde{z}}$), como consequência a elipsoide passa a ter um formato de uma esfera.

Figura 26– Sistema principal de coordenadas $(\tilde{x}, \tilde{y}, \tilde{z})$ fixado no eixo principal da elipsoide. Adaptada de Kramer *et al.*⁹⁶



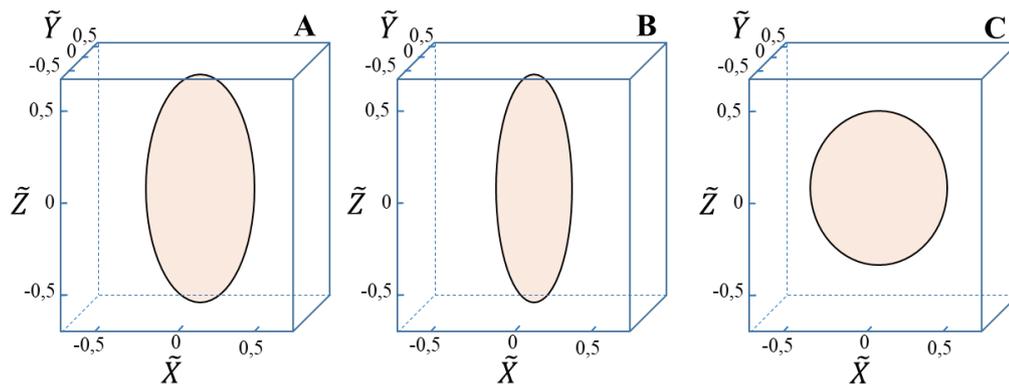
Fonte: KRAMER (2004, p. 13)

Todas as equações, obtidas até então, que tiveram como referência o sistema cartesiano fixado na molécula (*Figura 25-B*), podem ser redefinidas usando o sistema principal de coordenadas, isso facilita a compreensão do comportamento do acoplamento dipolar a respeito da probabilidade do campo magnético, pois quanto mais próxima a elipsoide se assemelha a uma esfera, mais o meio é isotrópico. Isso será melhor observado nos cálculos na seção seguinte

1.4.1.5 Cálculo do Valor Médio do Acoplamento Dipolar em Meio Anisotrópico e Isotrópico

Para melhor entendermos, iremos mencionar três situações hipotéticas da probabilidade de \hat{P} em relação aos eixos do sistema principal de coordenadas. Primeiramente, quando $P_{\tilde{x}} = P_{\tilde{y}} = 0,25$ e $P_{\tilde{z}} = 0,5$, nesta circunstância temos uma elipse de probabilidade axialmente simétrica (*Figura 27-A*); depois para uma elipse com probabilidade rômbrica com $P_{\tilde{x}} = 0,2, P_{\tilde{y}} = 0,3$ e $P_{\tilde{z}} = 0,5$ (*Figura 27-B*) e finalmente para um sistema isotrópico onde a elipse de probabilidade é uma esfera que tem $P_{\tilde{x}} = P_{\tilde{y}} = P_{\tilde{z}} = \frac{1}{3}$ (*Figura 27-C*).

Figura 27– Representação gráfica do tensor de probabilidade (\hat{P}) projetado no eixo do sistema de coordenada principal. (A) $P_{\tilde{x}} = P_{\tilde{y}} = 0,25$ e $P_{\tilde{z}} = 0,5$; (B) $P_{\tilde{x}} = 0,2$; $P_{\tilde{y}} = 0,3$ e $P_{\tilde{z}} = 0,5$; (C) tem $P_{\tilde{x}} = P_{\tilde{y}} = P_{\tilde{z}} = \frac{1}{3}$. Adaptada de Kramer *et al.*⁹⁶



Fonte: KRAMER (2004, p. 13)

As duas primeiras situações representadas pelos gráficos da *Figura 27-A e B* são exemplos típicos para um meio anisotrópico, enquanto no gráfico da *Figura 27-C* é um exemplo de meio isotrópico. Usando a *Equação 22*, podemos calcular quanto equivale cada tensor de alinhamento correspondente a cada tensor de probabilidade nas três situações hipotéticas.

- (A) Para $P_{\tilde{x}} = P_{\tilde{y}} = 0,25$ e $P_{\tilde{z}} = 0,5$, temos:

$$\hat{A}_{\tilde{x}} = \hat{P}_{\tilde{x}} - \frac{1}{3}\hat{1} \Rightarrow \hat{A}_{\tilde{x}} = \frac{1}{4} - \frac{1}{3} = -\frac{1}{12}$$

$$P_{\tilde{x}} = P_{\tilde{y}} \Rightarrow \hat{A}_{\tilde{y}} = \hat{A}_{\tilde{x}} = -\frac{1}{12}$$

$$\hat{A}_z = \hat{P}_z - \frac{1}{3}\hat{1} \Rightarrow \hat{A}_z = \frac{1}{2} - \frac{1}{3} = \frac{1}{6}$$

- (B) Para $P_x = 0,2$, $P_y = 0,3$ e $P_z = 0,5$, temos:

$$\hat{A}_x = \hat{P}_x - \frac{1}{3}\hat{1} \Rightarrow \hat{A}_x = \frac{1}{5} - \frac{1}{3} = -\frac{2}{15}$$

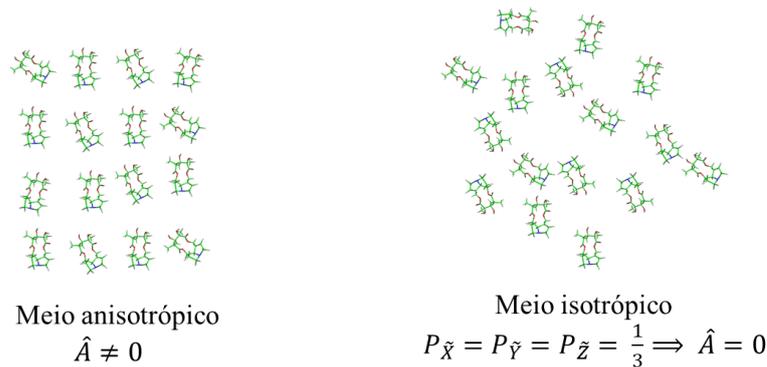
$$\hat{A}_y = \hat{P}_y - \frac{1}{3}\hat{1} \Rightarrow \hat{A}_y = \frac{3}{10} - \frac{1}{3} = -\frac{1}{30}$$

$$\hat{A}_z = \hat{P}_z - \frac{1}{3}\hat{1} \Rightarrow \hat{A}_z = \frac{1}{2} - \frac{1}{3} = \frac{1}{6}$$

- (C) Para $P_x = P_y = P_z = \frac{1}{3}$, temos:

$$P_x = P_y = P_z = \frac{1}{3} \Rightarrow \hat{A}_x = \hat{A}_y = \hat{A}_z = \frac{1}{3} - \frac{1}{3} = 0$$

Figura 28– Moléculas alinhadas no meio anisotrópico ($\hat{A} \neq 0$) para as situações A e B; e não-alinhadas no meio isotrópico ($\hat{A} = 0$) para situação C. Adaptada de Gil *et al.*⁶



Fonte: GIL (2017, p. 142)

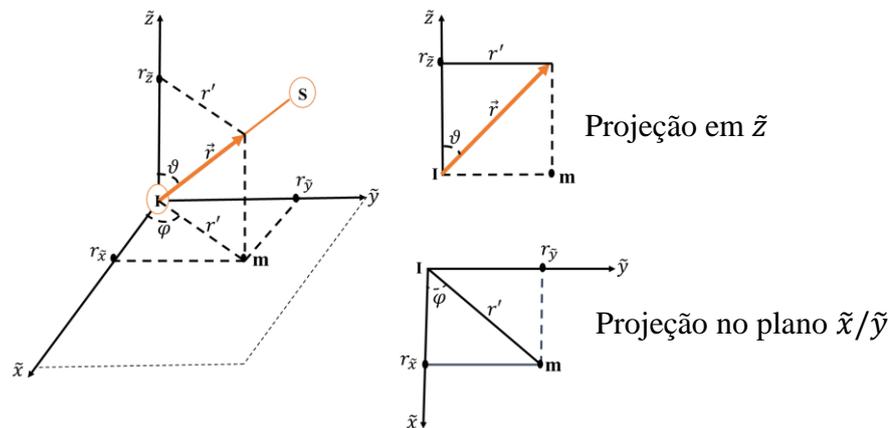
Observe a condição C onde a probabilidade do campo magnético é equivalente nos três eixos principais da elipsoide, retratando um meio isotrópico (Figura 28) e, portanto, um tensor de alinhamento nulo. Ao fazermos uso dos resultados do tensor de alinhamento é possível prever pela Equação 23 que a média do acoplamento dipolar é diferente de zero ($\bar{D} \neq 0$) para

a hipótese de meio anisotrópico (A e B), mas é igual a zero ($\bar{D} = 0$) no meio isotrópico, ou seja, em meio anisotrópico há possibilidade de adquirirmos a média do acoplamento dipolar, ao passo que em meio isotrópico isso não é possível. Portanto, para que se possa medir a média do acoplamento dipolar é imprescindível meios orientados.

1.4.1.6 Expressando o Acoplamento Dipolar Reduzido em Termos de Coordenadas Polares

O acoplamento dipolar pode ser expresso em outras formas, uma bastante comum na literatura é em termos de coordenadas polares. Para tanto, define-se o vetor unitário \vec{r} em termos dos ângulos polar (ϑ) e azimutal (φ) no sistema principal de coordenadas (*Figura 29*).

Figura 29– Projeção do vetor unitário \vec{r} nos eixos do sistema principal de coordenadas ($\tilde{x}, \tilde{y}, \tilde{z}$).



Relações trigonométricas obtidas na projeção em \tilde{z} :

$$r_{\tilde{z}} = \|\vec{r}\| \cos \vartheta = 1 \cos \vartheta = \cos \vartheta$$

$$r' = \|\vec{r}\| \sin \vartheta = 1 \sin \vartheta = \sin \vartheta$$

Relações trigonométricas obtidas na projeção no plano \tilde{x}/\tilde{y} :

$$r_{\tilde{x}} = r' \cos \varphi = \sin \vartheta \cos \varphi$$

$$r_{\tilde{y}} = r' \sin \varphi = \sin \vartheta \sin \varphi$$

Com as relações trigonométricas adquiridas anteriormente, substitui-se nas componentes do vetor unitário \vec{r} (Equação 33):

$$\text{Equação 33} \quad \vec{r} = \begin{bmatrix} r_{\tilde{x}} \\ r_{\tilde{y}} \\ r_{\tilde{z}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sin \vartheta \cos \varphi \\ \sin \vartheta \sin \varphi \\ \cos \vartheta \end{bmatrix}$$

Ao desenvolvermos a multiplicação de matrizes ($\vec{r}^T \hat{A} \vec{r}$) da Equação 25, tendo como referência os eixos do sistema principal de coordenadas que têm o tensor de alinhamento expresso por uma matriz diagonal, veremos que o resultado será a Equação 34.

$$d_{IS} = \left(\overline{\cos^2 \theta} - \frac{1}{3} \right) = \vec{r}^T \hat{A} \vec{r} = [r_{\tilde{x}} \quad r_{\tilde{y}} \quad r_{\tilde{z}}] \begin{bmatrix} A_{\tilde{x}} & 0 & 0 \\ 0 & A_{\tilde{y}} & 0 \\ 0 & 0 & A_{\tilde{z}} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} r_{\tilde{x}} \\ r_{\tilde{y}} \\ r_{\tilde{z}} \end{bmatrix}$$

$$\text{Equação 34} \quad d_{IS} = A_{\tilde{x}} r_{\tilde{x}}^2 + A_{\tilde{y}} r_{\tilde{y}}^2 + A_{\tilde{z}} r_{\tilde{z}}^2$$

Em seguida, substitui-se as componentes do vetor unitário (\vec{r}) da Equação 33, escritas na forma de coordenadas polares, na Equação 34:

$$d_{IS} = A_{\tilde{x}} (\sin \vartheta \cos \varphi)^2 + A_{\tilde{y}} (\sin \vartheta \sin \varphi)^2 + A_{\tilde{z}} (\cos \vartheta)^2 \Rightarrow$$

$$d_{IS} = A_{\tilde{x}} \sin^2 \vartheta \cos^2 \varphi + A_{\tilde{y}} \sin^2 \vartheta \sin^2 \varphi + A_{\tilde{z}} \cos^2 \vartheta \Rightarrow$$

Fazendo uso das seguintes relações trigonométricas: $\cos^2 \varphi = \left(\frac{1 + \cos 2\varphi}{2} \right)$ e $\sin^2 \varphi = \left(\frac{1 - \cos 2\varphi}{2} \right)$, podemos substituí-las na expressão anterior:

$$d_{IS} = A_{\tilde{x}} \sin^2 \vartheta \left(\frac{1 + \cos 2\varphi}{2} \right) + A_{\tilde{y}} \sin^2 \vartheta \left(\frac{1 - \cos 2\varphi}{2} \right) + A_{\tilde{z}} \cos^2 \vartheta \Rightarrow$$

$$d_{IS} = A_{\tilde{x}} \sin^2 \vartheta + \frac{A_{\tilde{x}}}{2} \sin^2 \vartheta \cos 2\varphi + A_{\tilde{y}} \sin^2 \vartheta - \frac{A_{\tilde{y}}}{2} \sin^2 \vartheta \cos 2\varphi + A_{\tilde{z}} \cos^2 \vartheta \Rightarrow$$

$$d_{IS} = \left(\frac{A_{\tilde{x}} + A_{\tilde{y}}}{2} \right) \text{sen}^2 \vartheta + \left(\frac{A_{\tilde{x}} - A_{\tilde{y}}}{2} \right) \text{sen}^2 \vartheta \cos 2\varphi + A_{\tilde{z}} \cos^2 \vartheta \Rightarrow$$

O traço do tensor de alinhamento (*Equação 24*) da matriz diagonalizada é $A_{\tilde{x}} + A_{\tilde{y}} + A_{\tilde{z}} = 0 \Rightarrow A_{\tilde{x}} + A_{\tilde{y}} = -A_{\tilde{z}}$, então podemos reescrever a expressão anterior.

$$d_{IS} = -\frac{A_{\tilde{z}}}{2} \text{sen}^2 \vartheta + \left(\frac{A_{\tilde{x}} - A_{\tilde{y}}}{2} \right) \text{sen}^2 \vartheta \cos 2\varphi + A_{\tilde{z}} \cos^2 \vartheta \Rightarrow$$

$$d_{IS} = A_{\tilde{z}} \left(\cos^2 \vartheta - \frac{\text{sen}^2 \vartheta}{2} \right) + \left(\frac{A_{\tilde{x}} - A_{\tilde{y}}}{2} \right) \text{sen}^2 \vartheta \cos 2\varphi \Rightarrow$$

Fazendo uso da seguinte relação trigonométrica: $\text{sen}^2 \vartheta = 1 - \cos^2 \vartheta$. É possível chegar nessa igualdade: $\left(\cos^2 \vartheta - \frac{\text{sen}^2 \vartheta}{2} \right) = \frac{1}{2}(3 \cos^2 \vartheta - 1)$. Em seguida, substitui-se na expressão anterior e, finalmente, temos a *Equação 35* que é a relação do acoplamento dipolar reduzido a respeito do tensor de alinhamento e das coordenadas polares:

$$\text{Equação 35} \quad d_{IS} = \frac{A_{\tilde{z}}}{2} (3 \cos^2 \vartheta - 1) + \left(\frac{A_{\tilde{x}} - A_{\tilde{y}}}{2} \right) \text{sen}^2 \vartheta \cos 2\varphi$$

1.4.1.7 Parâmetros de Assimetria: Componente Axial e Rombicidade

Os parâmetros de assimetria serão definidos a seguir, sendo importantes para indicar, por meio da componente axial, o grau de orientação $A_{\tilde{z}}$ e, através da rombicidade, o grau de assimetria do tensor de alinhamento. Para tanto, iremos primeiramente reescrever a *Equação 35* em termos dos valores principais da matriz de Saupe $(S_{\tilde{x}}, S_{\tilde{y}}, S_{\tilde{z}})$, sabendo que esses valores são simplesmente a matriz do tensor de alinhamento fatorado por 3/2. O resultado dessa substituição é a *Equação 36*:

$$\hat{S} = \frac{3}{2} \hat{A} \Rightarrow \begin{cases} S_{\tilde{x}} = \frac{3}{2} A_{\tilde{x}} \Rightarrow A_{\tilde{x}} = \frac{2}{3} S_{\tilde{x}} \\ S_{\tilde{y}} = \frac{3}{2} A_{\tilde{y}} \Rightarrow A_{\tilde{y}} = \frac{2}{3} S_{\tilde{y}} \\ S_{\tilde{z}} = \frac{3}{2} A_{\tilde{z}} \Rightarrow A_{\tilde{z}} = \frac{2}{3} S_{\tilde{z}} \end{cases}$$

Conseqüentemente,

$$d_{IS} = \frac{1}{3} S_{\tilde{z}} (3 \cos^2 \vartheta - 1) + \frac{1}{3} (S_{\tilde{x}} - S_{\tilde{y}}) \operatorname{sen}^2 \vartheta \cos 2\varphi$$

Equação 36
$$d_{IS} = \frac{1}{3} \{ S_{\tilde{z}} (3 \cos^2 \vartheta - 1) + (S_{\tilde{x}} - S_{\tilde{y}}) \operatorname{sen}^2 \vartheta \cos 2\varphi \}$$

A componente axial (A_a), bem como, a componente rômbrica (A_r) do tensor de alinhamento são definidas como:

$$A_a = \frac{3}{2} A_{\tilde{z}} = S_{\tilde{z}}$$

$$A_r = A_{\tilde{x}} - A_{\tilde{y}} \Rightarrow A_r = \frac{2}{3} S_{\tilde{x}} - \frac{2}{3} S_{\tilde{y}} \Rightarrow A_r = \frac{2}{3} (S_{\tilde{x}} - S_{\tilde{y}})$$

Portanto, a *Equação 36* que descreve o acoplamento dipolar reduzido, em termos de coordenadas polares e matriz de Saupe, pode incorporar os parâmetros assimétricos e a rombicidade atingindo a *Equação 37*.

$$d_{IS} = \frac{1}{3} \left\{ A_a (3 \cos^2 \vartheta - 1) + \frac{3}{2} A_r \operatorname{sen}^2 \vartheta \cos 2\varphi \right\}$$

Equação 37
$$d_{IS} = \frac{A_a}{3} \left\{ (3 \cos^2 \vartheta - 1) + \frac{3}{2} H \operatorname{sen}^2 \vartheta \cos 2\varphi \right\}$$

Onde H é chamado de rombicidade e η é chamado de parâmetro assimétrico.

$$H = \frac{A_r}{A_a}$$

$$\eta = \frac{A_{\tilde{x}} - A_{\tilde{y}}}{A_{\tilde{z}}} \Rightarrow \eta = \frac{A_r}{\frac{2}{3} A_a} \Rightarrow \eta = \frac{3 A_r}{2 A_a} \Rightarrow \eta = \frac{3}{2} H$$

Se η for igual a zero significa que a elipsoide é simétrica no plano transversal, tal resultado ocorre quando o tensor de alinhamento é equivalente nos eixos (\tilde{x}, \tilde{y}) e, por conseguinte, $A_{\tilde{x}} - A_{\tilde{y}}$ expresso pela componente rômbrica é nulo.

1.4.2 Medidas Experimentais de RDCs

O acoplamento residual surge em meios parcialmente orientados onde, na verdade, o acoplamento existente entre o par de spin I e S é a soma do acoplamento escalar com o acoplamento dipolar em que a resultante identificamos como T , assim, para podermos adquirir o RDC (Equação 38), basta subtrair T , obtido em meio anisotrópico, do acoplamento escalar apanhado em meio isotrópico.

$$\text{Equação 38} \qquad RDC = T - J$$

Sendo assim, são necessários dois experimentos, um em meio parcialmente orientado, onde serão observados os acoplamentos totais T , e o outro em meio não orientado, para medir os acoplamentos escalares J . Os núcleos, que podem ser determinados os RDCs, podem ser quaisquer uns presentes na estrutura molecular, porém, os mais comumente calculados são os de carbono e hidrogênio a uma ($^1D_{C-H}$) ligação de distância. Tais acoplamentos podem ser medidos diretamente em um experimento unidimensional de ^{13}C acoplado ou na dimensão do ^{13}C em um experimento 2D HETCOR acoplado.

Entretanto, o mais conveniente é realizar experimentos de detecção indireta usando o HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) como experimento de interação heteronuclear com acoplamento entre os spins de hidrogênio e carbono em meios parcialmente orientado e não-orientado. Os experimentos HSQC podem ser realizados com acoplamento tanto na dimensão direta (F2) como na dimensão indireta (F1).

Nos experimentos acoplados em F2, o desacoplador do canal de ^{13}C é desligado durante a aquisição observando-se, portanto, o acoplamento de hidrogênio com o carbono, além do mais, há vantagens em adquirir o sinal em F2, pois nessa dimensão a resolução digital é maior. É habitual na medida de RDCs $^1D_{CH}$ em F2 usar o experimento chamado CLIP-HSQC para obter sinais em fase independentemente da grandeza do acoplamento T efetivo. Contudo, quando os experimentos acoplados em F2 são realizados para sistemas de spin que acoplam fortemente, as medidas de acoplamento são imprecisas devido às distorções nos sinais. Se isto ocorrer é mais indicado a realização do experimento HSQC acoplado em F1.

O experimento HSQC acoplado em F1 tem uma resolução digital inferior ao obtido em F2, para compensar esta deficiência na resolução usam-se diferentes técnicas, como o uso de um bloco de evolução do acoplamento escalar (*J-scaling*) que às vezes é combinado com um

filtro BIRD⁹⁹ ou a técnica de rebatimento (*folding*). Como a janela espectral é menor do que a largura espectral em F1, os sinais acima desta janela aparecem rebatidos ou seja, para uma janela espectral com 100 ppm os sinais de carbono com hibridização sp^2 irão surgir na mesma região dos carbonos sp^3 . O rebatimento permite portanto aumentar a resolução digital em um fator ~ 2 .

Na técnica de *J-scaling* pode-se multiplicar a constante de acoplamento por um fator k arbitrário (k usualmente é igual a 3 ou 4). Se o fator k for usado tem que haver o cuidado quando estiver calculando o RDC, pois o resultado deve ser dividido por k quando se trata de um acoplamento CH, por $2k$ ao se tratar de um acoplamento CH₂ e por $3k$ quando for CH₃. Sobre essas sequências básicas houve o desenvolvimento de outros experimentos que tentam minimizar o impacto do acoplamento próton-próton na medida dos RDCs ou também o uso de experimentos ultrarrápidos.¹⁰⁰

1.4.3 Como os Acoplamentos Dipolares Residuais são Usados na Análise Estrutural de Pequenas Moléculas Rígidas ou Semirrígidas

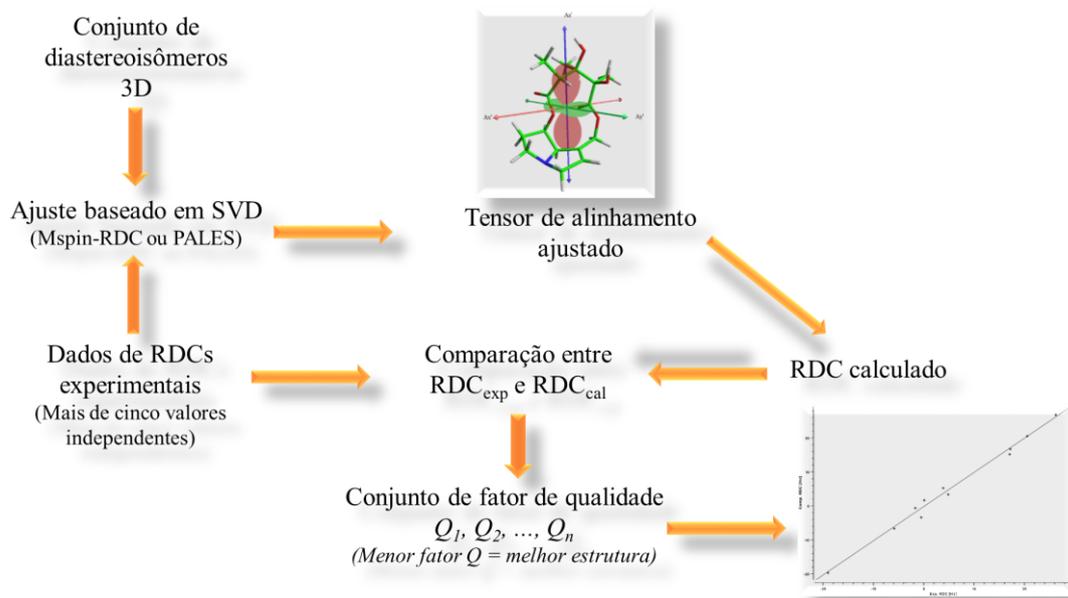
Quando tivermos um grupo de possibilidades de diastereoisômeros conformacionalmente rígidos ou semirrígidos, podemos usar o acoplamento dipolar residual para discriminar a estrutura correta. A *Figura 30* mostra um esquema geral para obtenção de informações estruturais, usando a metodologia do acoplamento dipolar residual.

Para tanto, primeiramente gera-se um conjunto de estruturas 3D da molécula que está sendo estudada, tais estruturas são usualmente obtidas por métodos de modelagem molecular, como aqueles baseados em campos de força, ou através de métodos de mecânica quântica como, por exemplo, a teoria do funcional da densidade (DFT). Em seguida, usam-se os dados de RDCs experimentais (mais de cinco) – quantos mais melhor – com as coordenadas de cada vetor internuclear extraídas de cada estrutura gerada computacionalmente para obter o tensor de alinhamento calculado que mais se ajuste a uma das estruturas moleculares computacionais. Esse ajuste (problemas de mínimos quadrados) é realizado utilizando o método matemático SVD.⁹⁷

Posteriormente faz-se o caminho inverso, ou seja, aplica-se o tensor de alinhamento calculado sobre as coordenadas de cada vetor internuclear extraídas de cada estrutura gerada computacionalmente para obter os RDCs calculados. O melhor ajuste será aquele que apresentar a melhor similaridade entre os RDCs medidos experimentalmente e os valores

calculados a partir do tensor de alinhamento, sendo que o melhor ajuste é comumente expresso em termos de Q (Equação 32).

Figura 30– Esquema geral para obtenção de informações estruturais usando RDCs. Adaptada de Gil *et al.*⁶



Fonte: GIL (2017, p. 150)

1.5 Anisotropia do Deslocamento Químico Residual (RCSA)

Em um campo magnético aplicado, os elétrons de valência de elementos como, por exemplo, ^1H ou ^{13}C são forçados a circular gerando uma corrente diamagnética local que causa um campo magnético, de direção habitualmente oposta ao campo magnético aplicado, sendo denominada blindagem diamagnética ou anisotrópica. Portanto, o campo magnético sofrido pelo núcleo atômico depende da magnitude da blindagem diamagnética.

O deslocamento químico (δ) do núcleo atômico é uma grandeza que depende dessa densidade eletrônica, isso significa que uma densidade eletrônica variável ao redor do núcleo tem como consequência deslocamentos químicos também distintos. A camada de valência de cada elemento tem um valor diferente de elétrons, portanto, cada núcleo tem uma blindagem distinta e que pode variar dependendo da eletronegatividade do elemento, da presença de sistemas π nas proximidades desse núcleo ou mesmo do meio onde a molécula analisada está inserida.

O deslocamento químico observado (δ_{obs}) é uma grandeza que é descrita como a soma de parâmetros isotrópico (δ_{iso}) e anisotrópico (δ_{CSA}), conforme anotado na *Equação 39*.¹⁰¹ Entretanto, quando a molécula é dissolvida em um meio isotrópico, o valor médio da componente anisotrópica do deslocamento químico é zero e o deslocamento químico observado fica dependente apenas da componente isotrópica. Por outro lado, se o meio for orientado, além do parâmetro isotrópico, o parâmetro anisotrópico também contribui ao δ_{obs} .

A anisotropia do deslocamento químico é o resultado de uma distribuição eletrônica não simetricamente esférica e só modifica a posição das linhas espectrais no estado sólido ou em soluções com algum grau de anisotropia. Em soluções isotrópicas, a anisotropia do deslocamento químico não afeta a posição das linhas espectrais afetando somente os parâmetros de relaxação.^{47,97,101}

$$\text{Equação 39} \quad \delta_{obs} = \frac{1}{3}(\delta_{11} + \delta_{22} + \delta_{33}) + \frac{2}{3}\delta_{CSA}$$

Em sistemas orientados o δ_{obs} difere do deslocamento isotrópico por uma contribuição anisotrópica que pode ser expressada como:

$$\text{Equação 40} \quad \delta_{CSA} = \frac{2}{3} \sum_{j=\{x,y,z\}} \left\langle \frac{3\cos^2\theta_j - 1}{2} \right\rangle \delta_{jj}$$

Onde, o δ_{jj} são os elementos da diagonal do tensor de deslocamento químico, após a diagonalização, θ é o ângulo formado entre o eixo do sistema principal do deslocamento químico e o campo magnético externo.⁹⁷

Conforme a *Equação 40*, fica evidente que a componente anisotrópica do deslocamento químico é uma fonte de informação estrutural através da sua dependência com a média do termo angular em θ , o que a torna uma ferramenta muito importante para obter informações estruturais de longo alcance. A média deste parâmetro anisotrópico, para uma molécula com coordenadas em um sistema cartesiano arbitrário, pode ser representada por uma matriz de Saupe com seus elementos definidos conforme a *Equação 41*.⁹⁷

$$\text{Equação 41} \quad S_{ij} = \left\langle \frac{3\cos\theta_i \cos\theta_j - 1}{2} \right\rangle$$

Onde, θ_i é referente à orientação instantânea do eixo molecular i com relação ao campo magnético aplicado. Sendo assim, a expressão da componente anisotrópica do deslocamento químico (*Equação 40*) pode ser reescrita da seguinte forma:

$$\text{Equação 42} \quad \delta_{CSA} = \frac{2}{3} \sum_{ij=\{x,y,z\}} S_{ij} \delta_{ij}$$

Como já definido para o RDC, a matriz de Saupe corresponde ao tensor de alinhamento (\hat{A}) fatorado por $\frac{3}{2}$. Logo, a *Equação 42* pode ser reescrita mostrando a anisotropia do deslocamento químico como sendo o resultado da multiplicação escalar entre o tensor de alinhamento e o tensor de deslocamento químico (*Equação 43*).

$$\text{Equação 43} \quad \delta_{CSA} = \sum_{ij=\{x,y,z\}} A_{ij} \delta_{ij}$$

Esta componente anisotrópica residual do deslocamento químico δ_{CSA} contém informação estrutural altamente valiosa, ao correlacionar a orientação relativa dos tensores de deslocamento químico, e poderia, de forma análoga aos RDCs, ser empregada para a determinação da geometria molecular e, portanto, da configuração relativa ou conformação da molécula.¹⁰²

1.5.1 Medidas Experimentais de RCSAs

Em RMN, o deslocamento químico é o parâmetro mais facilmente medido^{33,54} e sua componente anisotrópica, teoricamente, poderia ser revelada para qualquer elemento. No entanto, para moléculas orgânicas a componente anisotrópica é medida para carbono. Para tanto, o experimento convencional para adquirir os dados de RCSAs é um simples experimento 1D $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}$.

Enquanto os RDCs fornecem informações sobre a orientação dos vetores internucleares, tipicamente ligação $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ direto, os RCSAs fornecem a orientação do tensor de blindagem química dos ^{13}C individuais na molécula e, portanto, podem relatar tanto carbonos protonados como carbonos não-protonados em qualquer estrutura orgânica.^{47,103}

Sendo assim, em comparação com os RDCs, os RCSAs têm a vantagem adicional de fornecer informações de orientação sobre carbonos quaternários que, de outra forma, só

poderiam ser alcançadas através de medições de RDCs de longo alcance que apresentam mais dificuldade para a sua medição. Portanto, os RCSAs são extremamente úteis para a determinação da configuração de moléculas deficientes em hidrogênios.³³ Vale ressaltar que os dados da anisotropia do deslocamento químico residual podem ser analisados de forma isolada como também combinados com RDCs para avaliar com mais robustez a estrutura molecular.⁴¹

De forma similar aos RDCs é necessário realizar duas medidas para a aquisição dos dados de RCSAs, uma em condições isotrópicas e outra em condições parcialmente orientadas.

Também há possibilidade de as medidas serem realizadas em duas condições anisotrópicas com diferentes tensores de alinhamento. Desta forma, o RCSA pode ser determinado medindo a diferença no deslocamento químico entre duas condições de alinhamento, definidas pelos respectivos tensores de alinhamento. Para tanto, é conveniente selecionar arbitrariamente um núcleo de carbono na molécula como referência interna (*ref*) para que a medição do RCSA se torne independente da calibração do deslocamento químico respeito a uma referência externa. Logo, o RCSA pode ser expressado na forma:¹⁰³

$$\begin{aligned}
 \text{Equação 44} \quad RCSA_k &= (\delta^{(1,k)} - \delta^{(1,ref)}) - (\delta^{(2,k)} - \delta^{(2,ref)}) \\
 &= \sum_{i,j=x,y,z} (A_{ij}^{(1)} - A_{ij}^{(2)}) (\delta_{ij}^{CSA_k} - \delta_{ij}^{CSA_{ref}}) \\
 &= \sum_{i,j=x,y,z} (A_{ij}^{(1)} - A_{ij}^{(2)}) \delta_{ij}^{CSA_k} - (A_{ij}^{(1)} - A_{ij}^{(2)}) \delta_{ij}^{CSA_{ref}}
 \end{aligned}$$

Onde, $RCSA_k$ representa o RCSA do núcleo k , enquanto que $\delta^{(1,k)}$, $\delta^{(1,ref)}$, $\delta^{(2,k)}$ e $\delta^{(2,ref)}$ representam os deslocamentos químicos do núcleo k e do núcleo de referência interna, ambos submetidos às condições anisotrópicas (1) e isotrópicas (2), $\delta_{ij}^{CSA_k}$ e $\delta_{ij}^{CSA_{ref}}$ são os elementos dos tensores de deslocamento químico do k e do núcleo de referência.

Ao invés de tomarmos como referência o núcleo ^{13}C interno da molécula, há também a possibilidade de acrescentar ao sistema um composto de referência como, por exemplo, o tetrametilsilano (TMS) que, por ser altamente simétrico, tem um alinhamento desprezível nas condições usadas de alinhamento fraco e portanto a diferença do tensor de alinhamento nos diferentes meios $(A_{ij}^{(1,TMS)} - A_{ij}^{(2,TMS)})$ é praticamente igual a zero. Além do mais, o carbono do TMS tem uma pequena anisotropia de deslocamento químico, fornecida somente por contribuições vibracionais. Portanto, espera-se que o RCSA de ^{13}C do TMS seja desprezível

em comparação com os RCSAs de um composto típico sob condições de alinhamento idênticas. Consequentemente se o TMS for usado para referência de carbono, a *Equação 44* passa a ser reescrita como:

$$\text{Equação 45} \quad \text{RCSA}_k = \sum_{i,j=x,y,z} (A_{ij}^{(1)} - A_{ij}^{(2)}) \delta_{ij}^{\text{RCSA}_k}$$

1.5.2 Fator de Correção Usado para Eliminar Contribuições Isotrópicas nas Medidas de RCSAs

Os tensores de blindagem química, diferentemente dos acoplamentos dipolares, têm uma parte isotrópica e, portanto, a medição dos RCSAs requer um cuidado redobrado, pois pequenas variações da componente isotrópica podem obscurecer a pequena contribuição da anisotropia de blindagem, tornando difícil distinguir no deslocamento químico o que é realmente RCSA da componente isotrópica. Estas variações da componente isotrópica são decorrentes das mudanças ambientais (solvatação, temperatura ou pH) durante a passagem entre as condições dos meios isotrópico e anisotrópico.⁵¹

Esta dificuldade em medir os RCSAs, decorrente do problema de aquisição de um espectro de referência isotrópico adequado, pode justificar o uso quase que exclusivo de RDCs como ferramenta anisotrópica na determinação estrutural de biomoléculas e moléculas orgânicas com tamanho variando entre médio e pequeno.

Portanto, o uso dos RCSAs, como ferramenta usual de laboratório para determinação configuracional de pequenas moléculas, está basicamente condicionado ao desenvolvimento de meios que se alinhem parcialmente, mas que interfiram o minimamente possível no tensor de blindagem química do núcleo em estudo. Há diversas maneiras de alcançar condições de alinhamento parcial (veja-se o item 1.1), mas em geral há o problema da mudança na magnitude da componente isotrópica que consequentemente incrementa o valor do deslocamento químico devido à passagem entre meios com diferentes grau de alinhamento, isto impede de revelar diretamente a magnitude da componente anisotrópica.

Uma forma de contornar este problema, no caso dos géis reticulados submetidos a compressão, foi proposta por Griesinger e colaboradores.³³ Eles estimaram a variação da componente isotrópica do deslocamento químico conforme o meio é sujeito à mudanças no grau de compressão (gel comprimido (*comp*) e gel relaxado(*rel*)). Para tanto, eles assumiram que tal variação seria proporcional à alteração da componente isotrópica do deslocamento

químico observado entre às medidas do deslocamento químico obtidas dentro e fora do gel relaxado.

Este procedimento só foi possível porque no estado relaxado há uma camada de solução isotrópica que envolve o gel, permitindo, no mesmo experimento, observar sinais de carbono do analito dentro (sem alteração da componente anisotrópica - $\Delta\delta_{rel}^i$) e fora (isotrópico, $\Delta\delta_{iso}^i$) do gel relaxado.

Ao medir a diferença de desvio químico entre os sinais ($\Delta\delta_{rel}^i - \Delta\delta_{iso}^i$), o efeito do gel no desvio químico isotrópico de cada sinal i pode ser estimado. Assim, um fator de proporcionalidade comum c (Equação 46) pode ser usado para corrigir o deslocamento isotrópico indesejado.

$$\text{Equação 46} \quad \Delta RCSA_i = \Delta\delta_{comp}^i - \Delta\delta_{rel}^i - c(\Delta\delta_{rel}^i - \Delta\delta_{iso}^i)$$

Onde, cada termo $\Delta\delta^i$ representa a diferença de desvio químico que se dá entre um núcleo i e um pico escolhido de referência (ref), ambos na mesma condição (ou seja, $\Delta\delta_{comp}^i = \delta_{comp}^i - \delta_{comp}^{ref}$; $\Delta\delta_{rel}^i = \delta_{rel}^i - \delta_{rel}^{ref}$; $\Delta\delta_{iso}^i = \delta_{iso}^i - \delta_{iso}^{ref}$). Para um número suficientemente grande de sinais de carbono sp^3 , e que espalhem todo o espaço 5D, anulando a constante de proporcionalidade c pode ser determinada com base em uma média dos tensores CSA associados aos carbonos sp^3 sendo que o valor médio da contribuição anisotrópica é anulada para esses carbonos.

Sob estas condições, a constante c pode ser calculada a partir da Equação 46 que pode ser reescrita isolando c (Equação 47) tomando como referências apenas os carbonos sp^3 presentes na estrutura da molécula.^{33,54}

$$0 = \Delta\delta_{comp}^i - \Delta\delta_{rel}^i - c(\Delta\delta_{rel}^i - \Delta\delta_{iso}^i)$$

$$\text{Equação 47} \quad c = \frac{\overline{\Delta\delta_{comp}^i - \Delta\delta_{rel}^i}^{sp^3}}{\overline{\Delta\delta_{rel}^i - \Delta\delta_{iso}^i}^{sp^3}}$$

Acontece que para compostos pequenos com pouca quantidade de carbonos sp^3 , a hipótese de partida pode não se cumprir e esta estimativa pode nos levar a um erro. Navarro-Vázquez e colaboradores⁵⁴ automatizaram a determinação do fator de escala c sem a necessidade da Equação 46. Para tanto, desenvolveram um algoritmo capaz de remover a

interferência isotrópica do deslocamento químico, automaticamente, durante o ajuste SVD no programa MSpin.

Já quando o meio de alinhamento são os cristais líquidos poliméricos helicoidais, Liu e colaboradores¹⁰⁴ propuseram uma expressão para medir anisotropia do deslocamento químico residual, associando esta expressão a um fator de correção (*Equação 48*).

Equação 48

$$RCSA_i = (\delta_{A1}^i - \delta_{A1}^{TMS}) - (\delta_{I0}^i - \delta_{I0}^{TMS}) - \frac{[PBLG]_{A1}}{[PBLG]_{I1}} [(\delta_{I1}^i - \delta_{I1}^{TMS}) - (\delta_{I0}^i - \delta_{I0}^{TMS})]$$

Onde, δ^i e δ^{TMS} são, respectivamente, medidas de deslocamento químico para um carbono i e composto de referência TMS; enquanto os subíndices indicam os experimentos realizados sem PBLG no meio isotrópico ($I0$); com PBLG, mas numa concentração abaixo da concentração crítica, portanto, no meio isotrópico ($I1$) e finalmente com PBLG, mas acima da concentração crítica no meio anisotrópico ($A1$). Por último, $[PBLG]$ é a concentração do mesógeno.

Os autores partiram da premissa de que a mudança da componente isotrópica varia linearmente com a concentração de PBLG. Desta forma, na medida de RCSA dos deslocamento químicos, a uma concentração ($I1$) por baixo da concentração crítica do mesógeno, permite extrapolar a componente isotrópica do deslocamento químico a concentrações onde a fase anisotrópica já foi formada.

Uma outra abordagem dos cristais líquidos como meios de alinhamento requer a mudança da temperatura para passar de uma fase isotrópica para anisotrópica ou vice-versa. Usando esta metodologia, a componente isotrópica do deslocamento químico é afetada como consequência da variação da temperatura e gera o mesmo problema de referência citado para os géis reticulados, bem como, para os cristais líquidos liotrópicos helicoidais. No entanto, a dependência do tensor de blindagem com a temperatura poderia ser estimada e, consequentemente, corrigido.⁵¹ Vale salientar que os nossos estudos consistem no desenvolvimento da formação de um cristal líquido sem que haja grande variação da temperatura (3 ou 5 °C) para acontecer a transformação completa da fase isotrópica à anisotrópica ou vice-versa, reduzindo *a priori* o efeito da variação da temperatura sobre o tensor de blindagem química no cálculo do RCSA.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivos Gerais

Estudar a aplicabilidade e limitações do uso de fases cromônicas iônicas e não-iônicas para estudo estrutural de moléculas orgânicas em meio aquoso.

Desenvolver novos meios de alinhamento com base em estruturas cromônicas que possam ser compatíveis com água. Exploraremos, também, o possível uso desses meios na medição de RDCs e RCSAs de diferentes moléculas orgânicas e os fatores que controlam o grau e o modo de alinhamento.

1.6.2 Objetivos Específicos

1. Aprimoramento da síntese do mesógeno cromônico 2,3,6,7,10,11-hexa-(1,4,7-trioxaoctil)-trifenileno (TP6EO2M);
2. Avaliar a formação de fases liotrópicas pelo mesógeno TP6EO2M em solução para formar meios parcialmente orientados que possam ser usados em solução aquosa;
3. Submeter pequenas moléculas orgânicas a condições parcialmente orientadas em TP6EO2M para medir valores de RDCs e RCSAs;
4. Avaliar a conformação preferencial da sacarose e da cefuroxima em meio aquoso usando as medidas anisotrópicas adquiridas em TP6EO2M;
5. Determinar a conformação preferida da monocrotalina em água mediante RDCs e RCSAs obtidos no sistema cromoglicato de sódio/NaCl.

2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Equipamentos, Solventes e Reagentes

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Agilent DD2, com frequências de ressonância magnética de 100,52 MHz para ^{13}C , 61,36 MHz para ^2H e 399,74 MHz para o ^1H . Espectrômetros da Bruker tipo Avance III também foram usados: um com frequências de ressonância de 100,63 MHz para ^{13}C , 61,43 MHz para ^2H e 400,16 MHz para ^1H em um caso o outro com frequências de ressonância de 150,91 MHz para ^{13}C , 92,12 MHz para ^2H e 600,09 MHz para ^1H .

Os experimentos no RMN foram realizados usando tubos de RMN de 5 mm da Wilmard com as amostras dissolvidas em CDCl_3 (grau de deuteração de 99,8 %), D_2O (grau de deuteração de 99,9 %) e $\text{DMSO}-d_6$ (grau de deuteração de 99,9 %). Os espectros de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C foram referenciados ao sinal do solvente. Os valores tanto do deslocamento químico (δ) quanto da anisotropia do deslocamento químico residual (RCSA) foram expressos em partes por milhão (ppm), enquanto as constantes de acoplamento escalar (J) e acoplamento dipolar residual (RDC) foram expressas em Hertz (Hz).

Os dados cristalográficos analisados por difração de raio-X foram coletados a 100 K, usando um difratômetro da Bruker D8 Venture com um detector Photon 100 CMOS. A radiação $\text{Mo-K}\alpha$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) foi gerada por uma fonte de microfoco de alto brilho Incoatec equipada com óptica multicamada Incoatec Helios.

Os espectros de massa por ionização por eletrospray foram registrados com um APEX-Qe FT-ICR MS (Bruker, Daltonics, Billerica, MA) equipado com um campo magnético de 7T. Os íons foram gerados usando fonte de ionização por eletrospray Combi MALD.

A análise elementar foi realizada em um analisador Elementar Carlo Erba 1108 / combustão cromatográfica - tendo medidas de hidrogênio de acetanilida e sulfanilida intercaladas entre as amostras para comprovar o bom funcionamento do equipamento.

O equipamento usado para evaporar os solventes à baixa pressão foi um rotaevaporador da Buchi modelo R-200 acoplado a um banho-maria da Buchi B-490 e a uma bomba de vácuo Welch Ilmvac LVS 610 T. Já o liofilizador foi um Telstar Lyoquest acoplado a uma bomba de vácuo modelo RV5 da Edwards.

As colunas cromatográficas foram empacotadas com sílica gel 60 (40-63 microns) adquirida da PanReac AppliChem. Todos os solventes, bem como, reagentes utilizados nas reações ou preparo de soluções foram de grau analítico ou HPLC das marcas Merck, Vetec,

Synth, Dinâmica, Cinética, Moderna, Quimex ou Sigma-Aldrich. A amostra de monocrotalina foi fornecida pela professora Raquel Giordanni da UFRN.

2.2 Síntese do 2,3,6,7,10,11-Hexa-(1,4,7-trioxaoctil)-trifenileno (TP6EO2M)

A síntese do 2,3,6,7,10,11-hexa-(1,4,7-trioxaoctil)-trifenileno ou simplesmente TP6EO2M (composto **4**) foi elaborada conforme a metodologia aplicada por Herbaut e Baranoff,⁸⁷ porém foram realizadas importantes modificações para melhorar o rendimento da reação.

2.2.1 Síntese do 2,3,6,7,10,11-Hexametoxitriifenileno (**1**)

A uma solução de veratrol (12 mL, 94 mmol, 1 equiv.) em DCM (200 mL) sob banho de gelo foram adicionados 0,5 mL de H₂SO₄ e, gota à gota, 46 g de FeCl₃ (284 mmol, 3 equiv.) suspenso em 170 mL de DCM. A mistura reacional permaneceu por 3 horas em temperatura ambiente (23 °C) reagindo sob forte agitação. Ao final desse tempo, retornou-se a mistura reacional para o banho de gelo e acrescentou-se, lentamente, metanol, até formação de uma emulsão. Esta mistura permaneceu por mais 30 minutos em temperatura ambiente sob forte agitação. Finalmente, o sólido suspenso foi filtrado a vácuo, usando um funil de Buchner com placa porosa sinterizada de número 4 e, em seguida, lavado exaustivamente com metanol. Na sequência, o sólido foi seco a vácuo, obtendo-se 9,2 g (71 % de rendimento) do 2,3,6,7,10,11-Hexametoxitriifenileno (6MeOTPh) na forma de um sólido cinza.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,74 (s, 1H), 4,12 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 148,70 (ArC), 123,14 (ArC), 104,21 (ArCH), 56,04 (-OCH₃).

LRMS (ESI-TOF): m/z 409,16 (calculado 408,16).

Análise elementar por combustão cromatográfica equipado com analisador elementar Carlo Erba detectou: <0,08 % de N; 70,12 % de C (calculado 70,58 %); 5,85 % de H (calculado 5,92 %); <0,30 % de S.

Figura 31– Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 2,3,6,7,10,11-hexametoxitritifenileno (1).

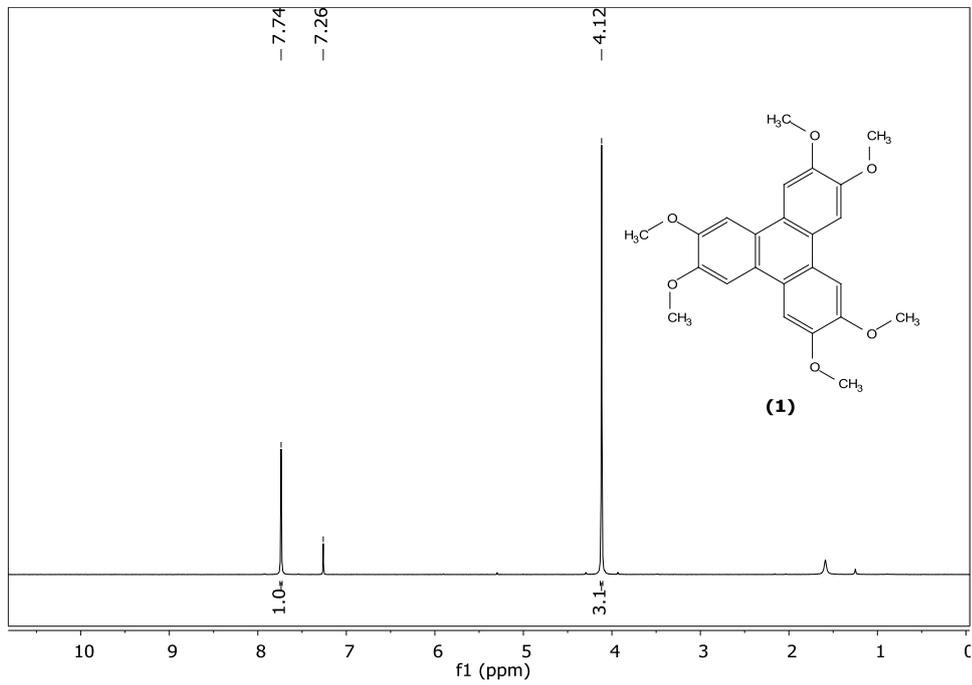
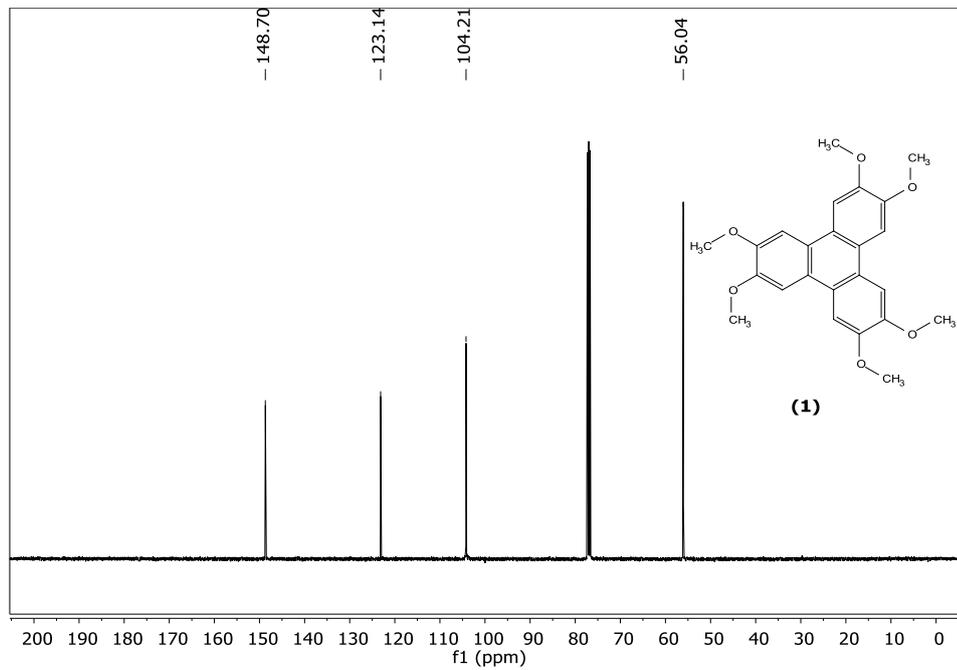


Figura 32– Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 2,3,6,7,10,11-hexametoxitritifenileno (1).



2.2.2 Síntese do 2,3,6,7,10,11-Hexahidroxitriifenileno (2)

O substrato **1** (7,2 g; 17,6 mmol; 1 equiv.) obtido na etapa anterior foi adicionado a uma mistura de CH₃COOH (250 mL)/HBr_(aq) 48 % w/w (250 mL) que foi previamente desgaseificada com N₂ por 15 minutos. Em seguida, deixou-se a suspensão por mais 15 minutos desgaseificando com N₂, sob agitação e em temperatura ambiente. Posteriormente, a suspensão sob agitação e atmosfera inerte com N₂ permaneceu reagindo em refluxo (120 °C) por 15 h. Depois, a mistura foi arrefecida e deixada em repouso até haver a formação de uma suspensão que foi filtrada a vácuo usando funil de Buchner com placa porosa sinterizada de número 4 e lavada com água destilada à temperatura ambiente. Finalmente, o sólido cinza retido foi liofilizado por 24 h, obtendo-se 5,7 g de um sólido com coloração verde esmeralda (100 % de rendimento), após ter sido caracterizado identificou-o como sendo 2,3,6,7,10,11-Hexahidroxitriifenileno (6HOTPh).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,26 (s, 1H, -OH), 7,59 (s, 1H, ArCH).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 145,69 (ArC), 122,29 (ArC), 108,23 (ArCH).

LRMS (ESI-TOF): m/z 324,06 (calculado 324,06).

Análise elementar por combustão cromatográfica equipado com analisador elementar Carlo Erba detectou: <0,08 % de N; 64,50 % de C (calculado 66,67 %); 3,77 % de H (calculado 3,73 %); <0,30 % de S.

Figura 33– Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do 2,3,6,7,10,11-hexahiroxitrifeníleno (2).

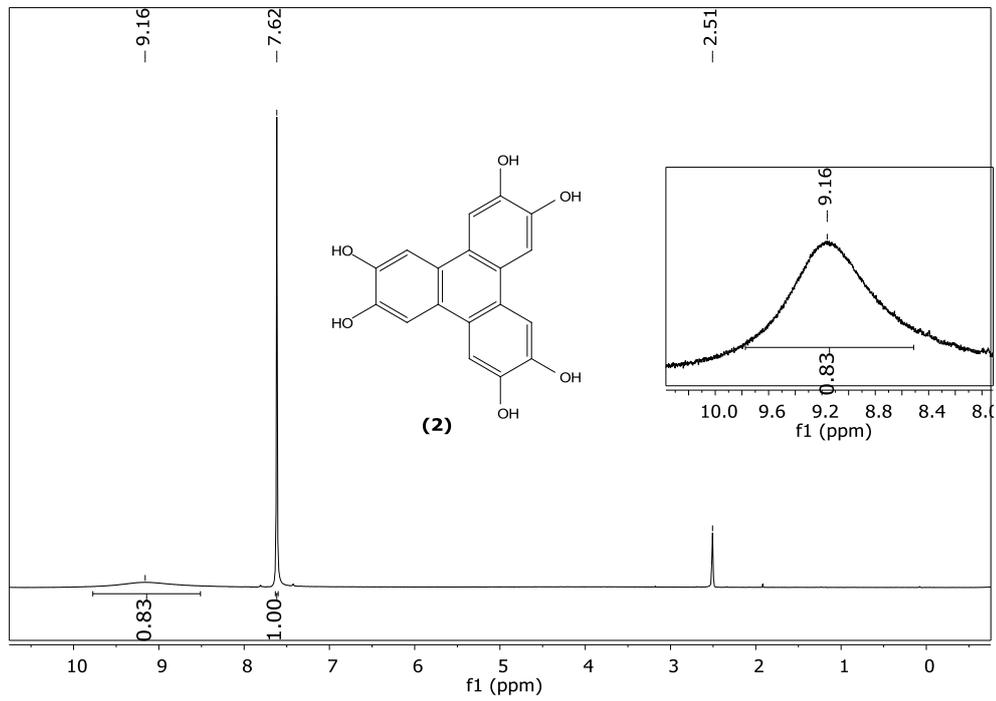
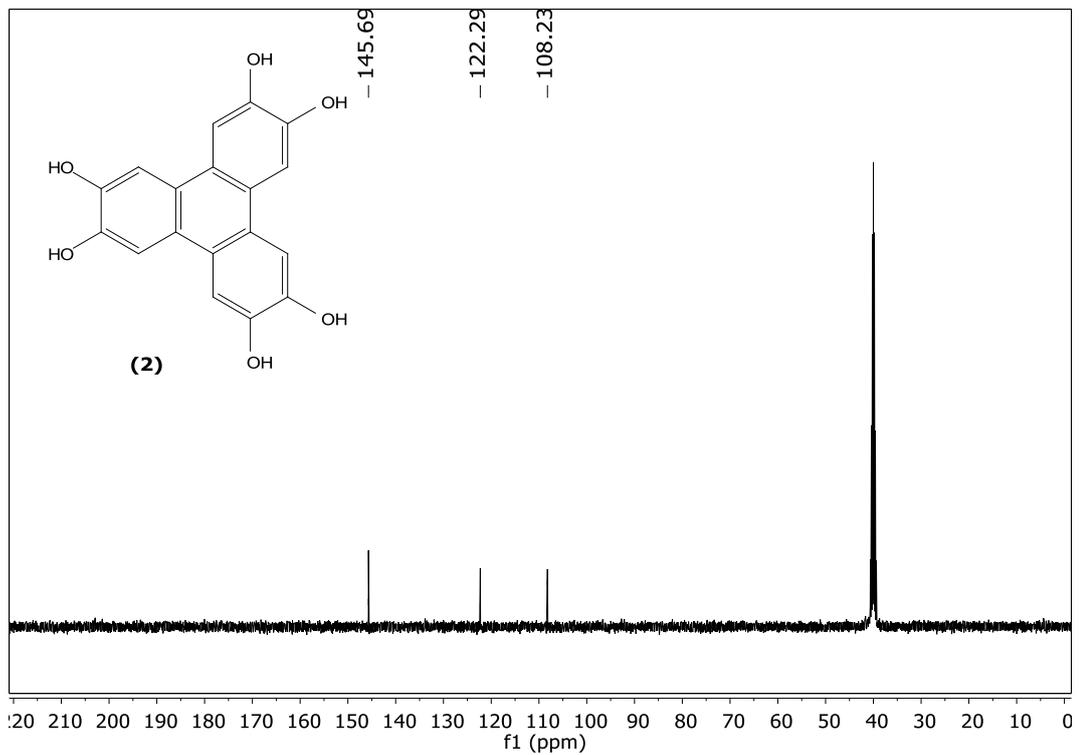


Figura 34– Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do 2,3,6,7,10,11-hexahiroxitrifeníleno (2).



2.2.3 Síntese do 2-(2-Metoxietoxi)etil Metanosulfonato (**3**)

O monometil éter de dietilenoglicol (39,5 mL, 336 mmol, 1 equiv.) foi diluído em acetato de etila (600 mL) e, em seguida, o balão de reação foi esta solução foi posto em um banho de gelo para, posterior adição, gota à gota, sequencialmente, da trietilamina (95 mL) e do cloreto de metanossulfonila (31 mL, 403 mmol, 1,2 equiv.). Depois, retirou-se o balão do banho de gelo e deixou-se a mistura em temperatura ambiente reagindo por 45 minutos sob forte agitação, pois houve formação de uma suspensão em flocos de cor levemente amarela. Finalmente, elaborou-se a reação lavando a fase orgânica em triplicata com água destilada (3 x 100 mL), em seguida, a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrada e rotaevaporada a vácuo com o controle de temperatura a 40 °C. O líquido amarelo levemente viscoso foi pesado totalizando 49,2 g (74 % de rendimento), após ter sido caracterizado observou que correspondia ao 2-(2-metoxietoxi)etil metanosulfonato (MsODEG).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,35 (m, 2H) 3,74 (m, 2H), 3,63 (m, 2H), 3,51 (m, 2H), 3,34 (s, 3H), 3,04 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 71,81 (-CH₂-); 70,58 (-CH₂-); 69,21 (-CH₂-); 69,03 (-CH₂-); 58,97 (-OCH₃); 37,62 (-SCH₃).

LRMS (ESI-TOF): m/z 199,06 (calculado 198,05).

Figura 35– Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 2-(2-metoxietoxi)etil metanosulfonato (**3**).

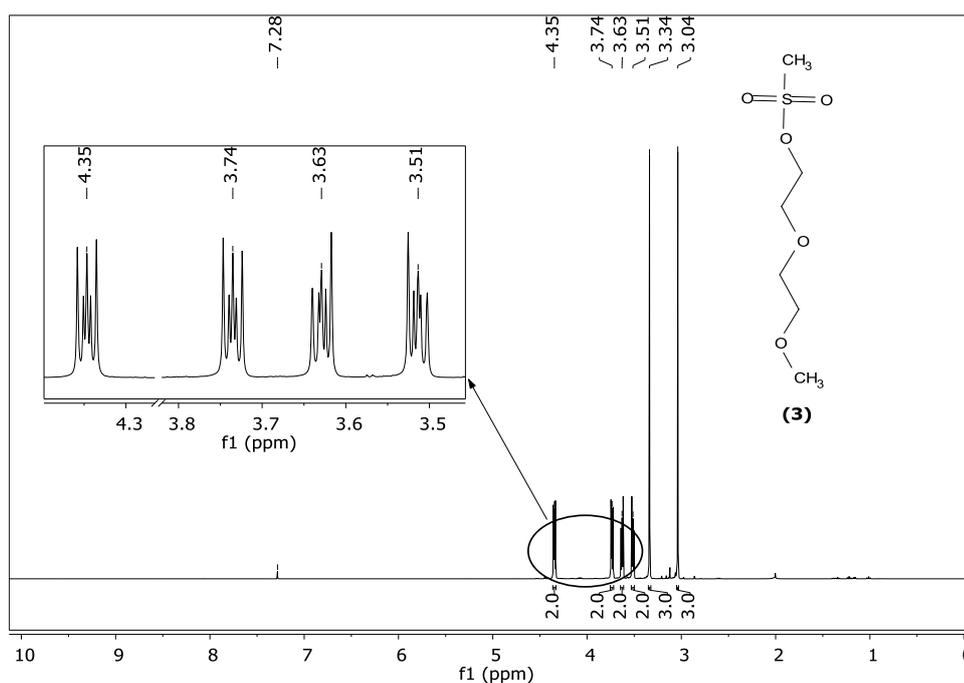
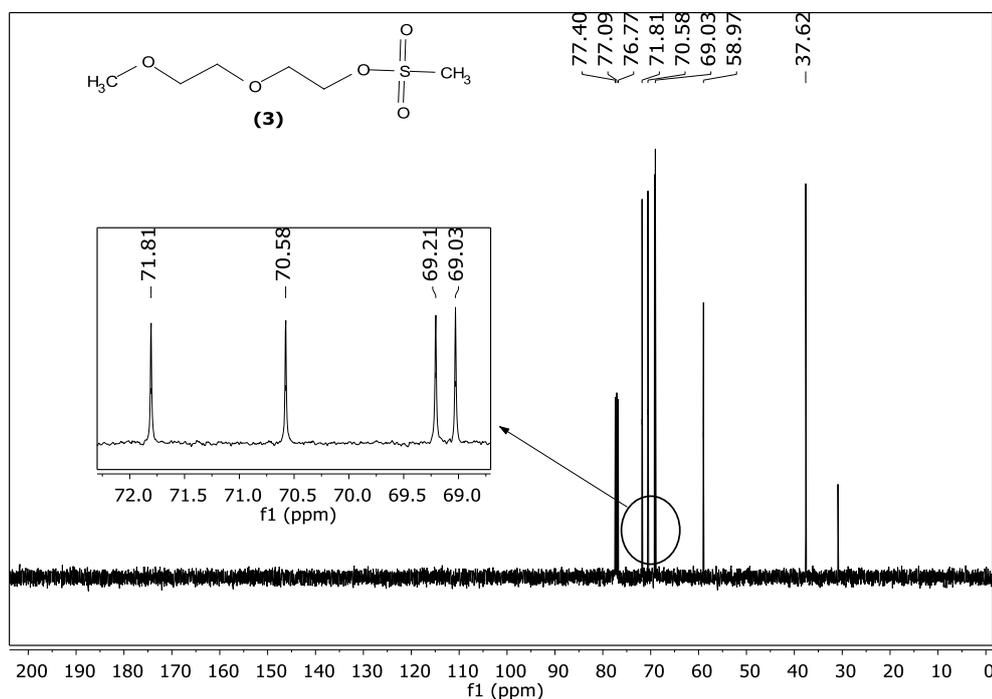


Figura 36– Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 2-(2-metoxietoxi)etil metanosulfonato (3).



2.2.4 Síntese do 2,3,6,7,10,11-Hexa-(1,4,7-trioxaoctil)-trifenileno (4)

Inicialmente, o sistema montado para a reação (condensador e balão de fundo redondo contendo a barra magnética) foi flambeado em triplicata usando N_2 como gás de arraste. Em seguida, a DMF (350 mL) anidra, contendo peneiras moléculares de fábrica e com grau de pureza de 99,5 %, foi inserida no sistema e, imediatamente, desgaseificada com N_2 por 10 minutos. A seguir, de uma só vez, foi adicionado K_2CO_3 anidro (33,4 g; 241,9 mmol; 14 equiv.) à DFM e continuou-se a desgaseificar a suspensão pelo mesmo tempo anterior, sob agitação e temperatura ambiente. Logo depois, acrescentou-se o composto **2** (5,6 g; 17,3 mmol; 1 equiv.) e continuou-se a desgaseificação por mais 10 minutos. Logo após, aumentou-se a temperatura do sistema até 70 °C e adicionou-se, gota à gota, o composto **3** (47,9 g; 241,9 mmol; 14 equiv.). Ao final da adição do agente alquilante, aumentou-se a temperatura do sistema a 85 °C e permaneceu assim por 2 dias reagindo sob agitação.

Ao término, a reação foi arrefecida e elaborada, primeiramente, filtrando-se com funil de Buchner equipado com placa sinterizada de número 4 e depois eliminando-se DMF, tanto quanto possível, por evaporação em regime de vácuo (10 mbar). Sem demora, o líquido pastoso obtido da rotaevaporação foi liofilizado para garantir a completa eliminação do DMF, que ainda

restava. Para tanto, foi adicionada água destilada ao líquido pastoso na proporção de 10:1 v/v (água/material pastoso). Em seguida, o material, completamente, seco foi dissolvido em DCM (450 mL) para ser lavado em triplicata com salmoura (3 x 200 mL). Na sequência, a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrada e rotaevaporada, resultando em 21,4 g de um líquido pastoso preto que foi purificado por cromatografia de sílica gel (8,5 x 18 cm).

O eluente isocrático usado na coluna cromatográfica foi uma mistura de DCM/MeOH (95:5), fluindo através da coluna com fluxo de 3 cm/min. As alíquotas foram coletadas a um volume de 100 mL. Finalmente, as frações reunidas de F15 à F26 foram rotaevaporadas, obtendo-se 9,45 g (58,4 % de rendimento) de um sólido marrom claro que cristalizava na parede do balão.

Para obter um grau de pureza mais elevado, o sólido foi dissolvido em *tert*-butilmetil éter (*t*BME) e recristalizado em banho de gelo alcançando-se 8,4 g (51,9 % de rendimento) do 2,3,6,7,10,11-hexa-(1,4,7-trioxaoctil)-trifenileno (TP6EO2M) como cristais amarelo claros em forma de agulhas finas.

Para alcançar cristais de tamanho e qualidade suficiente para medidas cristalográficas de DRX, o produto foi recristalizado lentamente em *tert*-butilmetil éter permitindo a lenta evaporação do solvente mediante o uso de septo e agulha.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,90 (s, 6H), 4,43 (m, 12H), 4,02 (m, 12H), 3,82 (m, 12H), 3,63 (m, 12H), 3,42 (s, 18H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 148,75 (ArC); 123,96 (ArC); 108,07 (ArCH); 72,05 (-CH₂-); 70,84 (-CH₂-); 69,93 (-CH₂-); 69,24 (-CH₂-); 59,08 (-OCH₃).

LRMS (ESI-TOF): *m/z* 937,48 (calculado 936,47).

DRX: *a* = 14,69(2) Å; *b* = 36,42(3) Å; *c* = 9,13(8) Å; α = 90°; β = 96,161°; γ = 90° (Anexo - A I)

Figura 37– Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do TP6EO2M (4).

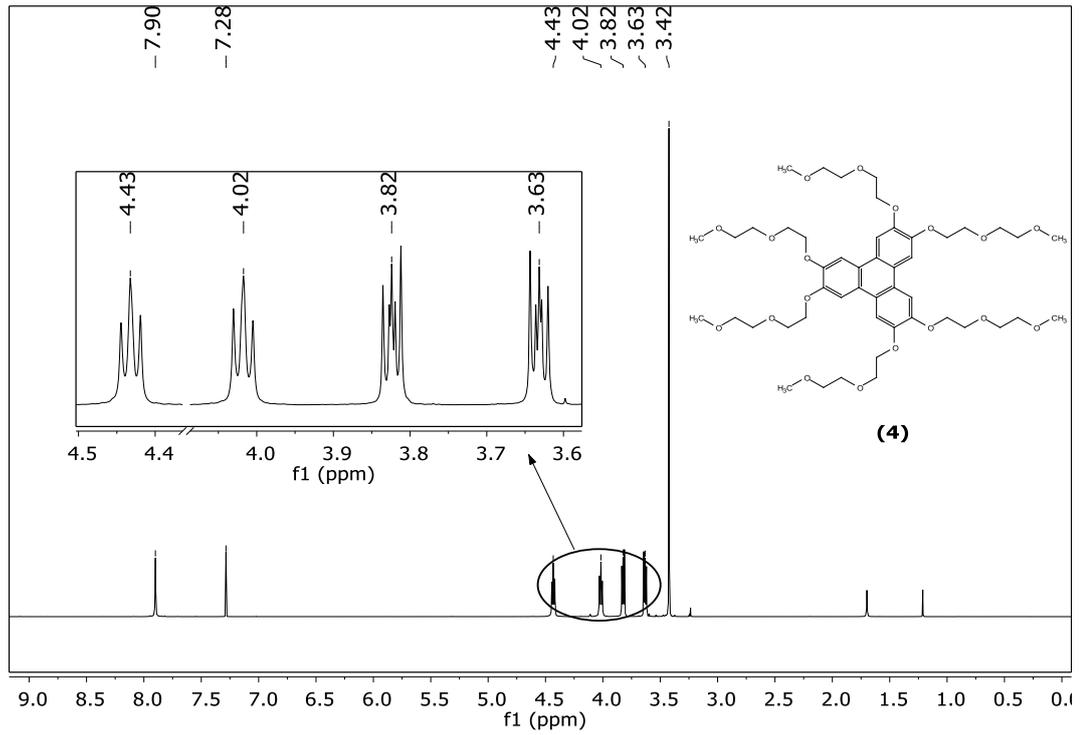
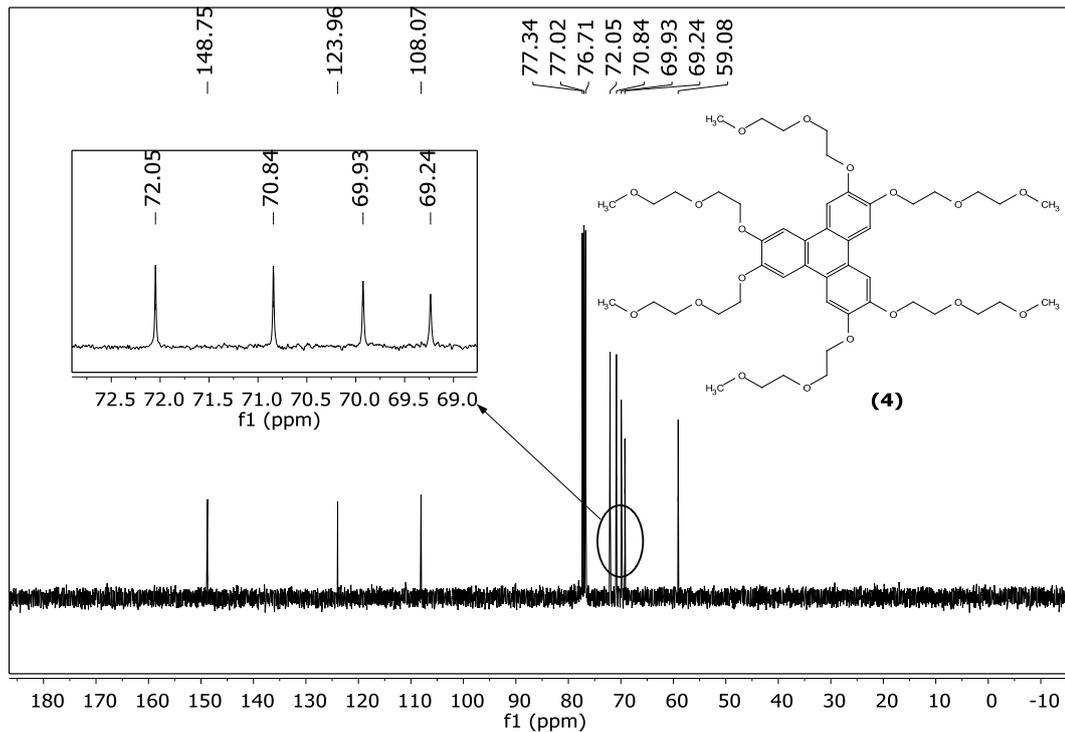


Figura 38– Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do TP6EO2M (4).



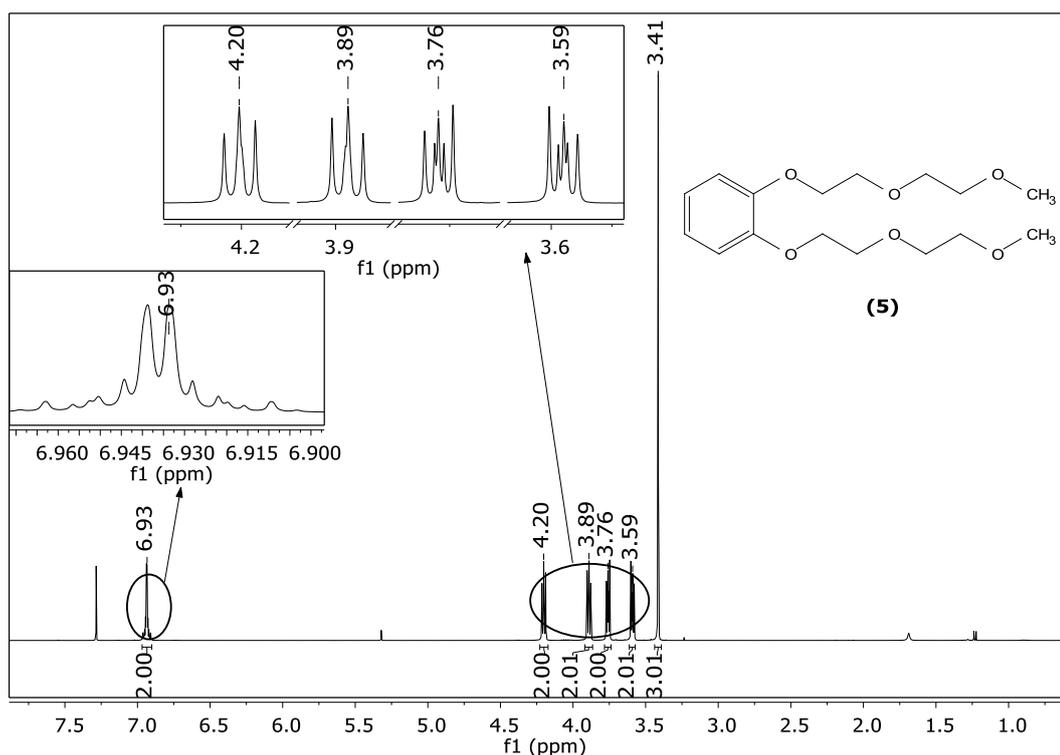
2.3 Síntese do 1,2-Bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi) Benzeno (5)

A vidraria foi primeiramente flambada em triplicata. Na sequência, foram adicionados K_2CO_3 (627 mg; 4,53 mmol; 2,5 equiv.) e catecol (200 mg; 1,81 mmol; 1 equiv.) a 20 mL de metanol, tudo à temperatura ambiente. Logo depois, aqueceu-se a mistura reacional até à temperatura de refluxo e acrescentou-se ao meio o composto **3** (899 mg; 4,53 mmol; 2,5 equiv.). A mistura reacional permaneceu sob agitação e em atmosfera inerte de N_2 por 18 h.

Em seguida, a mistura reacional foi filtrada sob uma estreita camada de celite, concentrada por rotaevaporação, dissolvida em DCM e lavada em triplicata com solução aquosa de NaOH 10 %. Logo em seguida, a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 , filtrada, rotaevaporada e cromatografada em coluna de sílica gel (4 x 19 cm) com eluente isocrático DCM/MeOH (98:2) fluindo a 5 cm/min através da coluna. As frações foram coletadas em aliquotas de 30 mL. Finalmente, as frações F17 à F20 foram reunidas conseguindo-se 357 mg (62,6 % de rendimento) de um líquido com aspecto de óleo com coloração amarela clara que após ter sido analisado foi identificado como sendo o 1,2-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi) benzeno.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6,93 (m, 4H), 4,20 (m, 4H), 3,89 (m, 4H), 3,76 (m, 4H), 3,59 (m, 4H), 3,41 (s, 6H).

Figura 39– Espectro de RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) do 1,2-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi) benzeno (**5**).

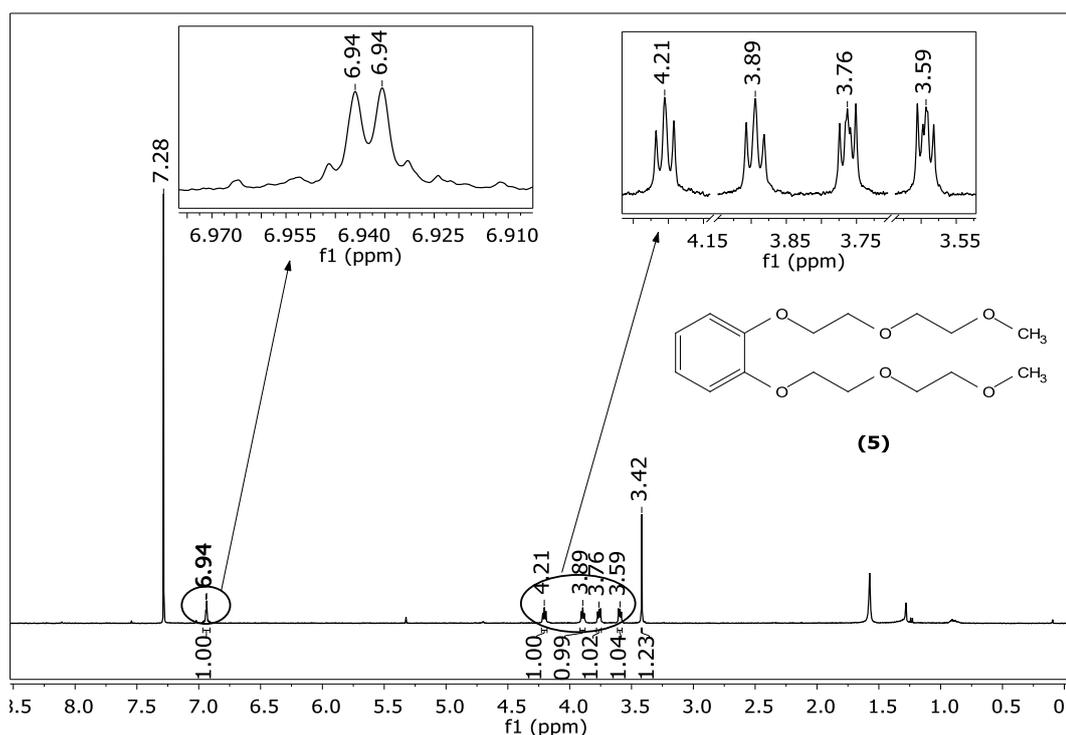


2.3.1 Síntese do 2,3,6,7,10,11-Hexa-(1,4,7-trioxaoctil)-trifenileno (**4**) Usando o 1,2-Bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi) Benzeno (**5**) como Reagente de Partida

Uma alíquota (143 mg; 0,45 mmol; 1 equiv.) do 1,2-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi) benzeno (**5**) foi dissolvida em 10 mL de DCM, previamente desgaseificado com N₂ por 5 minutos. Em seguida, foram acrescentados, sequencialmente, uma gota de H₂SO₄ concentrado e, numa única vez, FeCl₃ (221 mg; 1,36 mmol; 3 equiv.). Esta mistura reacional permaneceu por 5 dias, sob agitação, sendo monitorada por meio de cromatografia em camada delgada. Durante as primeiras 24 h a mistura reacional ficou à temperatura ambiente e o restante do tempo à temperatura de refluxo. Ao final do procedimento reacional, a mistura foi filtrada, usando funil de Buchner contendo placa porosa de número 4, sendo o retido no filtro lavado exaustivamente com DCM. Na sequência, o filtrado foi lavado com salmoura em duplicata e, finalmente, a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e rotaevaporada, resultando em 34 mg de um óleo que após RMN ¹H constatou ser o reagente de partida (**5**) sem, no entanto, ter a presença de TP6EO2M.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,94 (m, 4H), 4,21 (m, 4H), 3,89 (m, 4H), 3,76 (m, 4H), 3,59 (m, 4H), 3,42 (s, 6H).

Figura 40– Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) da reação purificada constatando a permanência do reagente de partida (**5**) sem a formação de TP6EO2M.



2.4 Análise em RMN no Meio Isotrópico

Os experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C foram usados para confirmar, respeito à literatura, a atribuição dos hidrogênios e carbonos nos compostos **1**, **2**, **3**, **4**, **5** e **6**. Já para as atribuições completa dos sinais de hidrogênio e carbono na monocrotalina, cefuroxima e sacarose foram necessários, além dos experimentos padrões de RMN, os espectros bidimensionais HSQC, HMBC e COSY.

O espectro HSQC ^1H - ^{13}C foi adquirido com tempo de aquisição de 0,150 s, 601 pontos de memória, tempo de espera de 1,0 s, 4 transientes, 256 incrementos em $t1$, largura espectral de 15 kHz em F1 e 4 kHz em F2.

O espectro HMBC ^1H - ^{13}C foi adquirido com tempo de aquisição de 0,150 s, 601 pontos de memória, tempo de espera de 1,0 s, 16 transientes, 256 incrementos em $t1$, largura espectral de 20,1 kHz em F1 e 4,0 kHz em F2.

2.5 Medidas Experimentais em RMN para Aquisição de RDCs e RCSAs

Em nossas análises para obter os parâmetros anisotrópicos RDCs e RCSAs é necessário que o analito esteja num meio isotrópico e, em seguida, num meio anisotrópico ou vice-versa. Sendo que, em cada meio são realizados dois registros de espectros, sendo um para cada tipo de parâmetro. Vale salientar que, no nosso caso, a permutação entre os meios isotrópico/anisotrópico consiste numa alteração de temperatura do sistema onde o analito encontra-se, isto significa que num mesmo tubo de RMN são realizados todos os experimentos necessários para se conseguir os RDCs e RCSAs, além de que as concentrações, tanto do mesógeno cromônico como do analito, permanecem constantes.

Os RDCs são adquiridos fazendo a diferença entre a constante de acoplamento total (T), que é obtida quando o meio é anisotrópico, e escalar (J), quando o meio é isotrópico conforme a *Equação 38*, ambas obtidas por detecção indireta usando o HSQC acoplados em F1.

Já os RCSAs foram obtidos fazendo a diferença dos valores em ppm dos sinais de carbono registrados no experimento de ^{13}C em meio anisotrópico frente ao registro num meio isotrópico, ou seja, para cada sinal de carbono registrado no meio anisotrópico tem seu correspondente no meio isotrópico, no entanto, os valores são levemente diferentes devido à diferença da anisotropia entre os dois meios, esta diferença resulta nos RCSAs conforme a

Equação 44. Quanto a referência interna, foi escolhido um núcleo de um carbono presente no analito situado a campo alto no espectro de RMN ^{13}C .

Em nossos estudos, foram preparados dois distintos meios de alinhamento usando fases cromônicas: o primeiro TP6EO2M/D₂O foi usado para alinhar as moléculas de sacarose e cefuroxima, já o segundo meio DSCG/NaCl/D₂O foi usado para monocrotalina.

2.5.1 Preparação do Meio TP6EO2M/D₂O/Amostra para Medidas Anisotrópicas

Foi preparada uma solução com concentração 40 % m/m do TP6EO2M em D₂O. Para homogeneizar o meio foi necessário submeter a mistura à agitação em vortex e aquecê-la em banho-maria a uma temperatura por volta de 40 °C, tomando o cuidado para não atingir temperaturas superiores a 50 °C, pois, de acordo com os testes, quando isso aconteceu houve separação em duas fases imiscíveis: uma amarela, mais densa, e outra clara opaca, portanto, tornando a mistura inviável de ser usada como meio anisotrópico. Em seguida, foi adicionado o analito (sacarose, cefuroxima) ao meio TP6EO2M/D₂O e, assim como na primeira etapa, esta mistura foi agitada e aquecida, resultando no sistema TP6EO2M/D₂O/amostra. A quantidade de massa do analito que deve ser adicionada ao meio depende da sua solubilidade na mistura TP6EO2M/D₂O e também da perturbação que a fase anisotrópica pode sofrer com uma concentração elevada dele. No caso em questão, foram usados 50 mg de sacarose e 25 mg de cefuroxima em tubos de RMN de 5 mm. O monitoramento através da medida de *splitting* quadrupolar em D₂O mostrou a formação completa da fase anisotrópica, às temperaturas de 16 °C e 12 °C quando na presença, respectivamente, da sacarose e cefuroxima.

2.5.2 Monitoramento da Formação das Fases Anisotrópico e Isotrópico no Meio TP6EO2M/D₂O/Amostra

Após adição do analito ao meio TP6EO2M/D₂O faz-se necessário identificar quais as temperaturas limites para a formação completa das fases nemática e isotrópica. Esta mudança de fase é monitorada através do desdobramento do sinal de ^2H do solvente, conforme a temperatura do meio altera-se. O desdobramento do sinal de deutério da D₂O em um duplete quadrupolar evidencia a formação de uma fase nemática, porém, se este duplete colapsa a um simpleto isto é resultado da formação de fase isotrópica. Tal observação deve ser sempre

realizada para cada analito, pois o comportamento do meio TP6EO2M/D₂O altera-se conforme o tipo de analito devido a diferentes graus de interação entre o analito e a fase anisotrópica, como consequência, a temperatura de transição entre as fases é diferente para cada composto estudado.

Para a sacarose, a fase nemática foi completamente formada quando a temperatura do sistema registrava 16 °C, sendo o desdobramento quadrupolar de 769 Hz. Após o aquecimento a 19 °C, o duplete colapsou evidenciando a formação de fase isotrópica. No intervalo entre as temperaturas limites houve a presença de um duplete e um simpleto indicando a existência simultânea das fases nemática e isotrópica, característica própria das fases cromônicas. Isto aconteceu em todos os monitoramentos dos sistemas TP6EO2M/D₂O/amostra.

Com a cefuroxima a fase nemática foi formada quando a temperatura do sistema registrava 12 °C, com *splitting* do duplete de 816 Hz. Após o aquecimento a 17 °C, o duplete colapsou, evidenciando a formação da fase isotrópica.

2.5.2.1 Experimentos de RMN HSQC Acoplados em F1 Realizados com a Sacarose no Meio TP6EO2M/D₂O/Amostra

Os espectros HSQC¹⁰⁵ acoplados em F1, com pulso adiabático, desacoplamento homonuclear de ¹H (*pure shift*) e com multiplicação das constantes de acoplamento por um fator $k = 4$, foram adquiridos para a sacarose com os seguintes parâmetros: tempo de aquisição de 0,02 s, tempo de espera de 1,5 s, 32 transientes, 256 pontos adquiridos em modo NUS (*non-uniform sampling*) sobre um tamanho espectral total de 1024 pontos em F1, 1598 pontos em F2, largura espectral de 20,16 kHz em F1 e 4,00 kHz em F2. Os mesmos parâmetros foram usados para as condições anisotrópica (16 °C) e isotrópica (19 °C).

2.5.2.2 Experimentos de RMN ¹³C-¹H Realizados com a Sacarose no Meio TP6EO2M/D₂O/Amostra

Os espectros ¹³C desacoplados foram adquiridos para a sacarose com tempo de aquisição de 0,57 s, tempo de espera de 2 s, 2048 transientes, 32768 pontos de memória, largura espectral de 28,41 kHz. Os mesmos parâmetros foram usados para as condições anisotrópica (16 °C) e isotrópica (19 °C).

2.5.2.3 Experimentos de RMN HSQC Acoplados em F1 Realizados com a Cefuroxima no Meio TP6EO2M/D₂O/Amostra

Os espectros HSQC acoplados em F1, com pulso adiabático, desacoplamento homonuclear tipo *pure shift* e com multiplicação das constantes de acoplamento por um fator $k = 4$, foram adquiridos para a cefuroxima com os seguintes parâmetros: tempo de aquisição de 0,02 s, tempo de espera de 1,5 s, 40 transientes, 256 pontos adquiridos em modo NUS de um tamanho espectral de 1024 em F1, 2048 pontos em F2, largura espectral de 28,41 kHz em F1 e 8,01 kHz em F2. Os mesmos parâmetros foram usados nas condições anisotrópica (12 °C) e isotrópica (17 °C).

2.5.2.4 Experimentos de RMN ¹³C-{¹H} Realizados com a Cefuroxima no Meio TP6EO2M/D₂O/Amostra

Os espectros ¹³C desacoplados foram adquiridos para a cefuroxima com tempo de aquisição de 0,57 s, tempo de espera de 2 s, 10240 transientes, 32768 pontos de memória, largura espectral de 28,41 kHz. Os mesmos parâmetros foram usados para as condições anisotrópica (12 °C) e isotrópica (17 °C).

2.5.3 Preparação de uma Amostra de Monocrotalina no Meio Anisotrópico DSCG/NaCl/D₂O

Foi preparada inicialmente uma solução com concentração 7,7 % m/m do DSCG em D₂O dopado com 0,3 M de NaCl. Aproximadamente 15 mg de monocrotalina foram, então, dissolvidas na solução de DSCG/NaCl/D₂O. Porém, a monitorização do espectro de ²H mostrou que a fase anisotrópica não estava formada na sua totalidade e foi necessário adicionar DSCG até a formação completa da fase anisotrópica à temperatura alvo (23 °C).¹⁰⁶

2.5.4 Medidas Experimentais de RDCs e RCSAs Realizadas com Monocrotalina

A medida em condição anisotrópica foi realizada no meio DSCG/NaCl/D₂O a uma temperatura de 23 °C. Para monitorar a formação da fase nemática usou-se espectroscopia de

^2H que, em 23 °C, indicou a presença de um duplete e um simpleto, respectivamente, integrando numa relação 9:1. O duplete quadrupolar de 89 Hz confirmava a fase nemática, enquanto o simpleto pertencia ao que restava de fase isotrópica no meio. Após o aquecimento a 28 °C, este duplete colapsou a um simpleto restando exclusivamente a fase isotrópica.

2.5.4.1 Experimentos de RMN HSQC Acoplados em F2 Realizados com a Monocrotalina no Meio DSCG/D₂O/NaCl/Amostra

Os espectros HSQC acoplados em F2 foram adquiridos com tempo de aquisição de 0,249 s, 1024 pontos de memória, tempo de espera de 1 s, 8 transientes, 194 incrementos em t_1 , largura espectral de 10,05 kHz em F1 e 4,01 kHz em F2. Os mesmos parâmetros foram usados para as condições anisotrópica (23 °C) e isotrópica (28 °C).

2.5.4.2 Experimentos de RMN $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ Realizados com a Monocrotalina no Meio DSCG/D₂O/NaCl/Amostra

Para a medição dos RCSAs, foram registrados espectros $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ nas temperaturas de 23 e 28 °C correspondentes às fases nemática e isotrópica, respectivamente. Os parâmetros para aquisição dos espectros foram tempo de aquisição de 1,311 s, tempo de espera de 1 s, 4096 transientes, largura espectral de 20,161 kHz.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Aprimoramento da Síntese do Mesógeno Cromônico TP6EO2M

Uma substância para ter potencial factível de agente alinhador de fase em RMN de líquido com objetivo de extrair parâmetros anisotrópicos como os RDCs ou RCSAs deve, primeiramente, ter condição de atingir grau de orientação parcial suficiente para fornecer uma medida precisa dos parâmetros anisotrópicos, mas sem perda excessiva de resolução. Além do mais, o custo econômico da sua preparação deve ser suficientemente baixo para ter condição de tornar o seu uso rotineiro.

O TP6EO2M é um mesógeno cromônico não-iônico, sintetizado pela primeira vez há mais de trinta anos, que poderia ter condições de se tornar um bom meio orientador em meio aquoso. Sua temperatura de transição nemática-isotrópica foi reportada próxima de 24 °C, conforme é possível observar no diagrama de fases do TP6EO2M/D₂O reportado por Boden e colaboradores⁸⁰ e posteriormente confirmado por Al-Lawati *et al.*⁷⁷ (*Figura 41*).

A fase nemática do TP6EO2M é obtida numa faixa de concentrações do mesógeno de 10 à 51 % (*Figura 41*). Com base neste diagrama de transição de fase da substância em evidência, podemos dividir a faixa de concentrações do mesógeno para obter a fase nemática em três regiões: uma com concentração do mesógeno abaixo de 30 %, onde observa-se uma queda significativa da temperatura de transição, outra região com concentrações superiores a 40 %, na qual a região, para o sistema permanecer nemático, é mais estreita e, por último, a região cujas concentrações estão situadas entre 30-40 % do mesógeno.

A região que compreende 30-40 % (destaque verde no diagrama de fases) da *Figura 41* é a mais indicada para o propósito de agente orientador com objetivo de adquirir dados anisotrópicos. Isto porque concentrações abaixo de 30 % é preciso diminuir muito a temperatura, enquanto concentrações acima de 40 % haveria a possibilidade de haver uma mistura de fases nemática/hexagonal durante a aquisição dos espectros.

Uma vez que escolhemos a faixa de quantidade em massa do agente alinhador para conseguir a fase anisotrópica, precisávamos medir esta quantia em mg necessária para empregarmos em tubos de RMN. A quantidade em massa total da mistura TP6EO2M/D₂O, para atingir a altura mínima necessária de aproximadamente 2 cm exigidos pelos aparelhos de ressonância magnética nuclear, é 340 mg e 500 mg, respectivamente, para tubos de RMN de 3 e 5 mm. Sendo assim, se considerarmos os extremos 30-40 % (*Figura 41*), podemos observar pelo gráfico de barras (*Figura 42*) que ao usar tubos de 3mm a quantidade necessária do

mesógeno cromônico é respectivamente 102 e 136 mg; e 150 e 200 mg para tubos de 5 mm. Portanto, é necessária uma quantidade significativa de agente alinhador e, conseqüentemente, o custo econômico da síntese do mesógeno torna-se uma variável importante para o uso prático deste meio de alinhamento.

Figura 42– Quantidade em massa do TP6EO2M adicionado em D₂O contido em tubos de RMN de 3 e 5 mm para formar fase nemática.

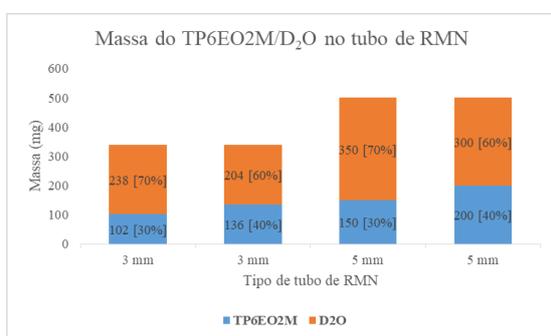
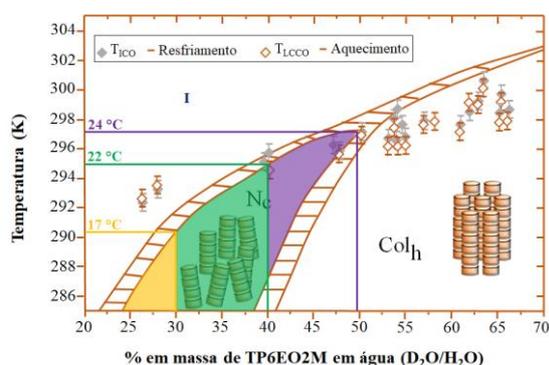


Figura 41– Diagrama de fases do TP6EO2M em D₂O. Adaptado de Al-Lawati *et al.*⁷⁷



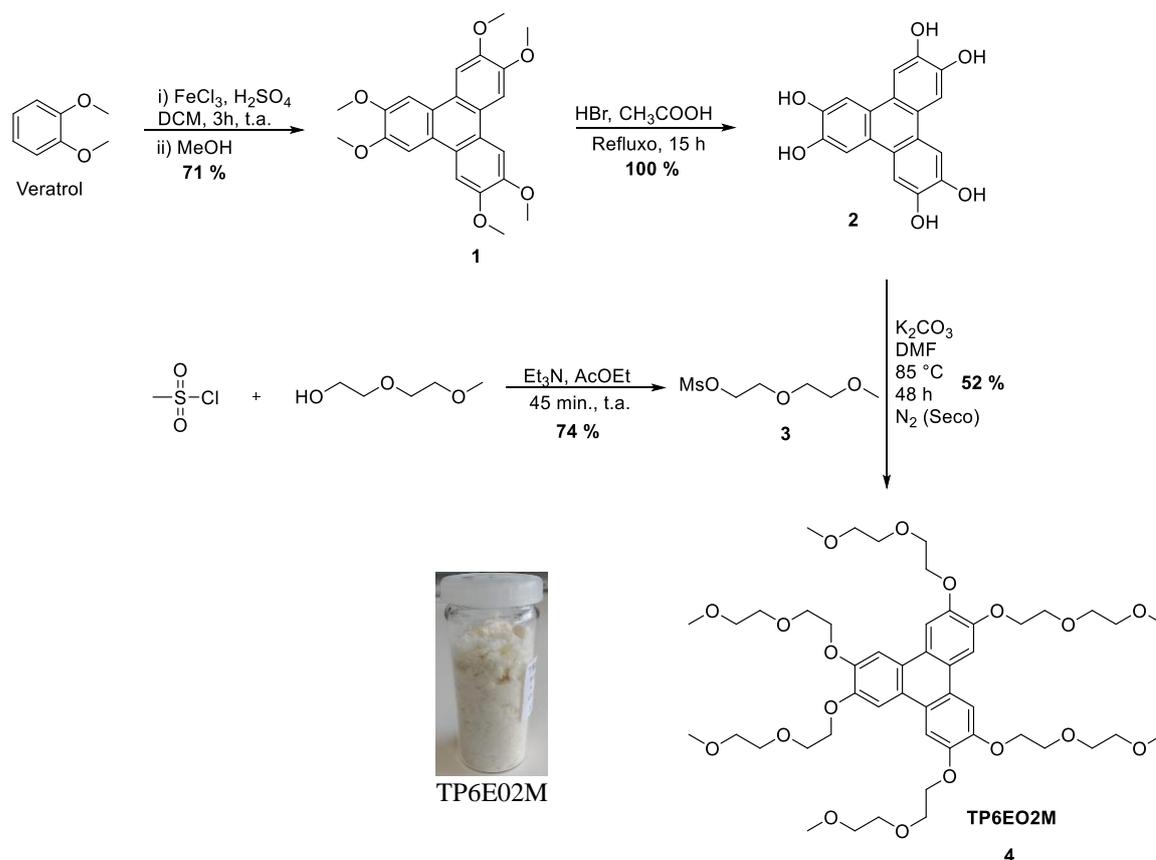
Fonte: AL-LAWATI (2012, p. 12630)

Nessas circunstâncias, um rendimento inferior a 20 %, do ponto de vista econômico, deixa o provável candidato à agente alinhador de fase TP6EO2M em uma situação desvantajosa, do contrário, um rendimento superior a 50 % coloca-o em destaque. O rendimento mais alto publicado para o TP6EO2M é de 37 % (cristais marrons),⁸⁷ isto é um avanço se comparado ao rendimento de 22 % quando ele foi sintetizado pela primeira vez.⁷⁸

Sendo assim, nossos esforços foram no intuito de aumentar ainda mais o rendimento e simplicidade da síntese do TP6EO2M, para tanto, foram realizadas várias modificações na metodologia usada por Herbaut e Baranoff,⁸⁷ sobretudo na etapa de purificação para obtenção do TP6EO2M.

Depois que obtivemos as melhores condições para a rota sintética, o rendimento do TP6EO2M atingiu uma porcentagem de 52 % na sua forma cristalina (*Esquema 1*), portanto, acima do até então registrado na literatura e com grau de pureza melhor. Entretanto, a etapa de purificação do TP6EO2M, por mais que tenhamos tido grandes avanços, ainda é um limitador, isto porque a separação deste composto da mistura reacional é muito complicada, tendo em vista, o comportamento cromatográfico muito parecidos entre o produto principal e os subprodutos da reação.

Esquema 1– Resumo das quatro etapas para síntese do TP6EO2M (4).



3.1.1 Diferentes Condições de Síntese e Purificação do TP6EO2M

Os relatos que constam na literatura para o TP6EO2M indicam que a purificação deste produto é complicada. Após as etapas de filtração, rotaevaporação e partição, o produto é obtido na forma de um óleo com coloração marrom escura que em cromatografia de camada delgada indica a mistura do produto em meio a pelo menos dois ou mais componentes. Para ser separada esta mistura de componentes é necessário o uso de sucessivas cromatografias em coluna de sílica gel ou submetê-la à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a obtenção do produto na forma cristalina.

Tudo isto foi constatado ao tentarmos reproduzir as condições de síntese e elaboração descritas na literatura. Tais dificuldades levaram-nos a fazer inúmeras modificações tanto nas condições de síntese, como também, na etapa de purificação e até mesmo nas rotas sintéticas alternativas foram testadas. O procedimento experimental mais recente descrito na literatura⁸⁷ para etapa final de alquilação usava DMF, K_2CO_3 , temperatura de 120 °C e 72 horas de reação. A princípio este procedimento não foi satisfatório para obtenção de cristais de TP6EO2M. Ao

contrário sempre obtivemos frações que tinham um aspecto de óleo com coloração marrom escura e um rendimento de 15 % inferior ao 37 % descrito na literatura.

Em virtude disso, várias mudanças nas condições da síntese foram testadas, veja a seguir (*Tabela 1*):

- Para facilitar a remoção do solvente reacional, foi trocada a DMF por outros solventes de menor ponto de ebulição, quer próticos, como etanol (EtOH), quer apróticos, como acetonitrila (ACN) ou acetona;
- Houve também uma busca por uma base que fosse mais solúvel nos solventes empregados para aumentar a concentração dos grupos fenóxidos nucleofílicos em solução. Para tanto, foram testadas bases inorgânicas (K_2CO_3 , Cs_2CO_3 , NaOH) e bases orgânicas ($(CH_3CH_2)_3N$, imidazol);
- A fim de aumentar a solubilidade do K_2CO_3 em ACN, usou-se, também, um agente transferidor de fases catalítico como tetrafluorborato de tetrabutilamônio, $(C_4H_9)_4NBF_4$. Além do mais, testou-se o $(C_4H_9)_4NBF_4$ com iodeto de potássio (KI) que poderia agir como agente catalítico por substituição nucleofílica sobre o mesilato de dietilenoglicol;
- Além de modificar os componentes da reação como solvente e bases, testaram-se várias condições de temperatura (80-95 °C) combinadas com diferentes tempos de reação que variaram de algumas horas (4 h) a mais de 4 dias (110 h). Acreditava-se que uma temperatura elevada, acima de 100 °C, pudesse causar degradação do reagente de partida hexahidroxitriifenileno limitando o rendimento. Esta hipótese baseava-se na ausência do reagente hexahidroxitriifenileno ao final da reação, mesmo com um rendimento do TP6EO2M menor que 20 %.

Além das modificações no procedimento de síntese, realizaram-se mudanças e ampliações na etapa de purificação do produto (*Tabela 2*):

- Introduziu-se uma etapa de partição para extrair sais da mistura reacional, tal procedimento, em geral, foi realizado com diclorometano/salmoura;
- Quando a reação foi sintetizada na presença da DMF, acrescentou-se uma etapa de liofilização para remover completamente o solvente antes da partição e, assim, aumentar a eficiência da separação dos componentes orgânicos frente à fase inorgânica aquosa durante o procedimento de partição;
- Testaram-se vários solventes na etapa de recristalização do TP6EO2M (benzeno, DCM, éter etílico, *tert*-butilmetil éter (*t*BME), AcOEt, acetona, isopropanol, EtOH e MeOH).

Dentre todos os testes com diferentes condições de reações realizados (*Tabela 1*), aqueles empregando K_2CO_3 em EtOH (teste #8) e em DMF⁸⁷ (teste #12) mostraram as melhores respostas para síntese do composto (**4**). O rendimento para o teste #8 foi de um 32 % de cristais amarelo claro em forma de agulhas finas, adquiridos por recristalização em *tert*-butilmetil éter sem a necessidade de uma etapa de purificação em coluna cromatográfica. O teste #12 atingiu 52 % de rendimento após liofilização, purificação em coluna cromatográfica e recristalização usando também *tert*-butilmetil éter.

As modificações que nos levaram a ter um resultado expressivamente diferente entre os testes #1 e #12 (*Tabela 1*) que usaram os mesmo componentes na reação foi o procedimento de elaboração da reação na etapa de purificação (*Tabela 2*). Estamos convencidos de que a grande diferença de rendimento entre 15 e 52 %, respectivamente, para os procedimentos #1 e #12 (*Tabela 2*), é em grande parte decorrente, primeiramente, da eliminação do DMF na etapa de liofilização, empregada no teste #12 antes de submeter a mistura reacional para purificação cromatográfica, e, em segundo, a eficiente recristalização em *t*BME.

A DMF, solvente utilizado nos procedimentos #1 e #12, ao mesmo tempo que é um solvente aprótico padrão e ideal para síntese de reações nucleofílicas apróticas, é difícil de ser excluída na elaboração, por seu alto ponto de ebulição. O produto TP6EO2M como também o agente alquilante são muito solúveis em DMF e, uma vez que, não se consiga eliminar definitivamente o solvente da mistura reacional, todo o procedimento de purificação, sobretudo na etapa da cromatografia em coluna, fica comprometido.

Antes de conseguirmos obter as melhores condições de reação e purificação, outros testes de síntese foram realizados, a saber, nas condições #9, #10 e #11 houve formação de produto observado por cromatografia em camada delgada (CCD). No entanto, as reações não foram elaboradas, pois comparativamente por CCD entre estas condições e aquela observada para os testes #8 e #12, os resultados foram mais favoráveis para estas últimas condições. A única condição reacional que não resultou em produto foi aquela usando imidazol (teste #6 - *Tabela 1*), como base dissolvida em ACN. Mesmo depois de 24h de reação a 90 °C não houve manchas em CCD que indicassem a formação do produto.

Tabela 1– Diferentes condições reacionais usadas na síntese do TP6EO2M (4).

Nº	Condições Reacionais					Rend. (%)	Aspecto do produto
	Solvente	Base	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Atmosfera		
†1 ^a	DMF	K ₂ CO ₃	120	72	N ₂	<15	Óleo
2 ^a	ACN	K ₂ CO ₃ (C ₄ H ₉) ₄ NBF ₄ *	95	110	N ₂	15–20	Óleo
3 ^a	ACN	K ₂ CO ₃ (C ₄ H ₉) ₄ NBF ₄ KI	90	48	N ₂	15–20	Óleo
4 ^a	ACN	(CH ₃ CH ₂) ₃ N	94	18	N ₂	<15	Óleo
5 ^a	ACN	Cs ₂ CO ₃	94	48	N ₂	15–20	Óleo
6 ^a	ACN	Imidazol	90	24	N ₂	-	NP
7 ^a	DMF	Cs ₂ CO ₃	65	30	N ₂	>40	Óleo
8 ^a	EtOH	K ₂ CO ₃	85	4	N ₂	32	Cristais
9 ^a	EtOH	NaOH	80	24	N ₂	ND	ND
10 ^a	Acetona	K ₂ CO ₃	65	18	N ₂	ND	ND
11 ^a	Acetona	Cs ₂ CO ₃	65	18	N ₂	ND	ND
‡12 ^a	DMF	K ₂ CO ₃	85	48	N ₂	52	Cristais

†Procedimento experimental conforme descrito por Herbaut e Baranoff;⁸⁷ ‡Procedimento experimental descrito nesta tese para obtenção dos cristais de TP6EO2M; *Tetrafluorborato de tetrabutilamônio usado como transferidor de fase; Rend.: Rendimento; ACN: Acetonitrila; DMF: Dimetilformamida; EtOH: Etanol; ND: Não determinado; NP: Não formou produto.

Tentou-se recrystalizar o produto obtido pelo procedimento #8 (Tabela 2) em vários solventes, mas só pôde ser cristalizado em *t*BME, isopropanol ou éter. O resultado mais satisfatório obteve-se com *t*BME cujos cristais podem-se obter à temperatura ambiente, enquanto com isopropanol os cristais precipitam somente a baixa temperatura (0 °C), e dissolvem-se rapidamente à temperatura ambiente. Também houve formação de cristais quando testou-se com éter, porém, os cristais só permaneciam quando a mistura estava aproximadamente a 0 °C, fundindo-se a temperaturas superiores, um resultado similar foi observado em MeOH e EtOH. Quanto a acetona e benzeno não houve formação dos cristais, mesmo a baixa temperatura. Ainda com relação à condição #8, pôde-se obter os cristais de TP6EO2M sem a necessidade de realizar coluna cromatográfica quando a reação foi particionada com *t*BME e salmoura, nessa situação os cristais foram adquiridos logo depois que uma parte do solvente da fase orgânica foi parcialmente rotaevaporada e acondicionada em banho de gelo por aproximadamente 15 minutos.

Tabela 2– Diferentes condições de elaboração usadas na obtenção do TP6EO2M (4).

Nº	Solvente	Base	Condições de Elaboração				Aspecto do produto
			Partição	Liofilização	Eluente Cromatográfico	Recristalização	
1 ^a	DMF	K ₂ CO ₃	AcOEt/NaCl _(aq)	-	CHCl ₃ /MeOH ou CH ₂ Cl ₂ /MeOH	Éter (PR) Éter/EtOH (PR) CH ₂ Cl ₂ (NR) AcOEt (NR)	Óleo
2 ^a	ACN	K ₂ CO ₃ (C ₄ H ₉) ₄ NBF ₄ *	CH ₂ Cl ₂ /NaOH _(aq) (0,1M)	-	-	Éter (NR) EtOH (NR)	Óleo
3 ^a	ACN	K ₂ CO ₃ (C ₄ H ₉) ₄ NBF ₄ KI	CH ₂ Cl ₂ /NaOH _(aq) (0,1M)	-	-	-	Óleo
4 ^a	ACN	(CH ₃ CH ₂) ₃ N	-	-	-	-	Óleo
5 ^a	ACN	Cs ₂ CO ₃	CH ₂ Cl ₂ /NaCl _(aq)	-	-	-	Óleo
6 ^a	ACN	Imidazol	-	-	-	-	NP
7 ^a	DMF	Cs ₂ CO ₃	CH ₂ Cl ₂ /NaCl _(aq)	-	CH ₂ Cl ₂ /MeOH	Éter (PR)	Óleo
8 ^a	EtOH	K ₂ CO ₃	CH ₂ Cl ₂ /NaCl _(aq) Ou <i>t</i> BME/NaCl _(aq)	-	CHCl ₃ /MeOH	Éter (R) Acetona (NR) Benzeno (NR) MeOH (PR) EtOH (PR) Isopropanol (R) <i>t</i> BME (R)	Cristais
9 ^a	EtOH	NaOH	-	-	-	-	ND
10 ^a	Acetona	K ₂ CO ₃	-	-	-	-	ND
11 ^a	Acetona	Cs ₂ CO ₃	-	-	-	-	ND
12 ^a	DMF	K ₂ CO ₃	CH ₂ Cl ₂ /NaCl _(aq)	S	CHCl ₃ /MeOH CH ₂ Cl ₂ /MeOH	<i>t</i> BME (R) EtOH (NR)	Cristais

[†]Procedimento experimental conforme descrito por Herbaut e Baranoff;⁸⁷ [‡]Procedimento experimental descrito nesta tese para obtenção dos cristais de TP6EO2M *Tetrafluorborato de tetrabutilamônio usado como transferidor de fase; ACN: Acetonitrila; AcOEt: Acetato de etila; DMF: Dimetilformamida; EtOH: Etanol; MeOH: Metanol; NR: Não recristalizou; ND: Não determinado; NP: Não formou produto; PR: Parcial recristalização; R: Recristalizado; S: Liofilização realizada; *t*BME: *terc*-Butilmetil éter.

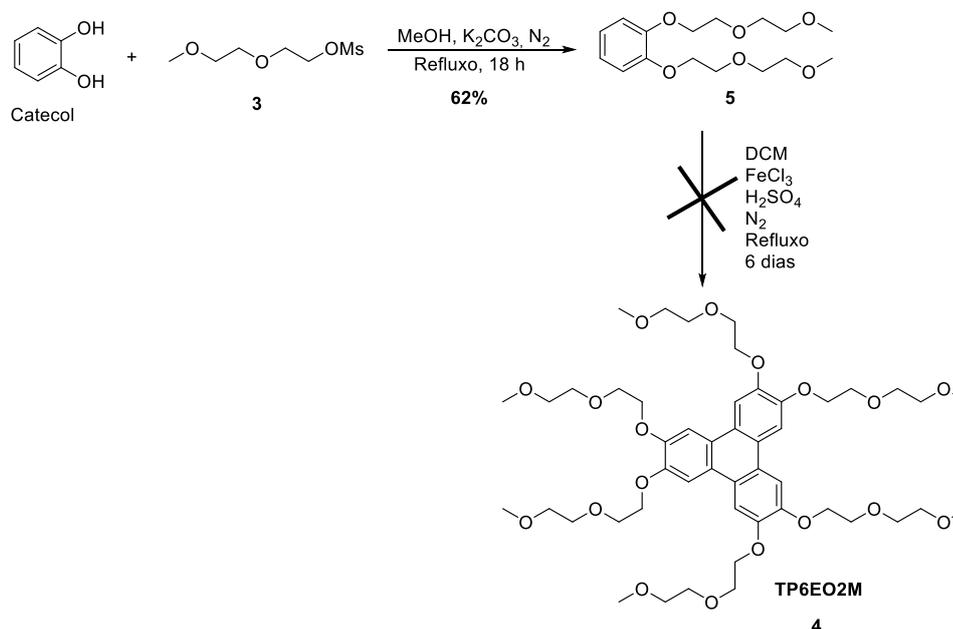
3.1.2 Síntese do TP6EO2M Através de Trimerização Oxidativa do 1,2-Bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi) Benzeno (5)

Uma rota sintética alternativa para a síntese do TP6EO2M usaria diretamente o 1,2-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi) benzeno (5) em uma reação de trimerização oxidativa (*Esquema 2*) aos moldes do que era feito com a reação para adquirir o 2,3,6,7,10,11-hexametoxitritifenileno (1) (*Esquema 1*).

Esta rota foi sugerida porque cromatograficamente observávamos dois ou mais componentes com praticamente mesmo fator de retenção do TP6EO2M em CCD. A primeira hipótese era de que tais produtos seriam derivados de alquilação parcial do composto 2. Por isso, uma rota que tivesse o reagente de partida com as cadeias laterais de etilenoglicol já presentes evitaria que os componentes parcialmente alquilados fossem formados. Como a trimerização oxidativa do veratrol era bem sucedida, a hipótese era de que com o composto 5 para formar o TP6EO2M também teríamos resultados satisfatórios com base na trimerização oxidativa.

Inicialmente foi obtido o composto 5 empregando-se as mesmas condições de Sessler *et al.*¹⁰⁷ que sintetizou uma estrutura homóloga ao composto sintetizado em nossos trabalhos. Porém, aqui o composto tem sua cadeia lateral uma unidade a menos de etilenoglicol do que aquele registrado na literatura.

Esquema 2– Experimento de rota alternativa para adquirir o TP6EO2M a partir da trimerização oxidativa do 1,2-bis(2-(2-metoxietoxi)-etoxi) benzeno (5).



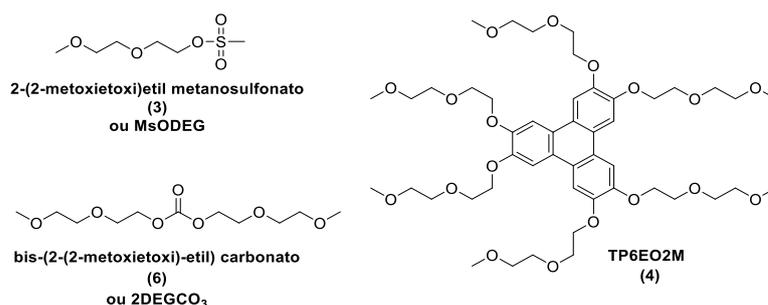
O 1,2-bis(2-(2-metoxietoxi)-etoxi) benzeno foi obtido a partir da reação do catecol com o 2-(2-metoxietoxi)etil metanosulfonato (**3** ou MsODEG) (*Esquema 2*). Tal reação foi bem sucedida, atingindo um rendimento de 62 %. Entretanto, a trimerização oxidativa do 1,2-bis(2-(2-metoxietoxi)-etoxi) benzeno não teve resultado satisfatório que mostrasse a obtenção, mesmo em pequena quantidade, do produto TP6EO2M. A princípio poderíamos acreditar que tal reação deveria acontecer, haja vista a síntese do 2,3,6,7,10,11-hexametoxitriifenileno ter como precursor o veratrol que, diferente do 1,2-bis(2-(2-metoxietoxi)-etoxi) benzeno, tem dois grupos a menos de etilenoglicol inseridos em cada cadeia lateral ligadas ao anel benzênico.

Este resultado, em certa medida, já foi evidenciado por Bushby e colaboradores⁸⁸ que relataram dificuldades em realizar a preparação do TP6EO2M mediante a trimerização eletroquímica partindo de um 1,2-alcoixibenzeno de cadeia lateral mais longa. Segundo os mesmos autores, implementando esta rota, a quantidade sintetizada do produto foi insuficiente para escala desejada. Todavia, em nossos testes, mesmo depois de 6 dias de reação, não foi observado presença de TP6EO2M no meio reacional, sendo possível conseguir recuperar o reagente de partida 1,2-bis(2-(2-metoxietoxi)-etoxi) benzeno (*Esquema 2*).

3.2 Formação do Subproduto Bis-(2-(2-Metoxietoxi)-Etil) Carbonato na Síntese do TP6EO2M

O bis-(2-(2-metoxietoxi)-etil) carbonato (**6** ou 2DEGCO₃) foi identificado como subproduto da síntese do TP6EO2M. Este composto é coletado nas primeiras frações da coluna cromatográfica de sílica gel numa mistura com o 2-(2-metoxietoxi)etil metanosulfonato (**3**) (reagente excedente da reação) e TP6EO2M (*Figura 43*).

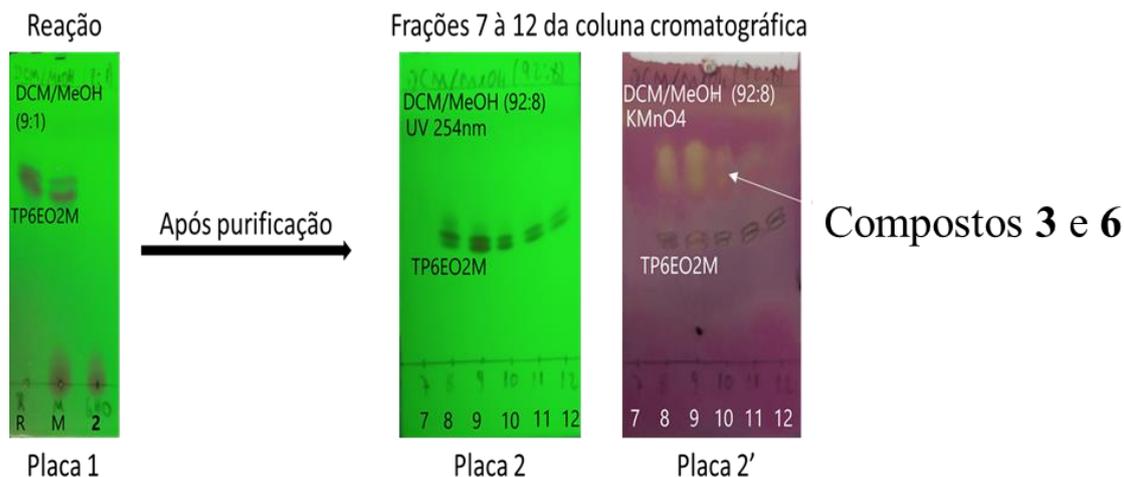
Figura 43– Substâncias coletadas em mistura nas primeiras frações da coluna cromatográfica de sílica gel.



Inicialmente, não é clara a presença do bis-(2-(2-metoxietoxi)-etil) carbonato em CCD, poderíamos supor, com base nas placas cromatográficas (placa 2 e 2'), certamente a presença de dois componentes nas primeiras frações (*Figura 44*) que poderiam corresponder ao TP6EO2M e o MsODEG. A existência do TP6EO2M nestas frações é indicada pelas manchas escuras na placa 2 reveladas em 254 nm (*Figura 44*), devido à presença dos anéis trifenilênicos. Obviamente que estas manchas também poderiam ser o resultado da presença do composto **2** que ainda não tenha reagido. Entretanto, podemos descartar esta hipótese ao analisar a placa 1 da CCD (*Figura 44*) que foi realizada com uma alíquota após 24h de reação e também revelada em 254 nm. Nesta placa, há três pontos de aplicações: R (alíquota depois de 24h de reação), **2** (reagente hexahidroxitrifenileno ou 6HOTPh) e M (ponto misto que contem R e **2**). Observa-se claramente no ponto de aplicação R que o hexahidroxitrifenileno está completamente ausente, portanto todo o reagente foi consumido na reação, ou seja, as manchas reveladas no comprimento de onda 254 nm da placa 2 não podem ser consequência da existência do hexahidroxitrifenileno remanescente da reação. Logo, a única estrutura que poderia ter duplas ligações em ressonância capazes de absorver neste comprimento de onda seria o produto da reação TP6EO2M.

Quanto ao MsODEG, por não apresentar estruturas que absorvam no comprimento de onda de 254 nm, não é possível ser revelado desta forma como acontece com TP6EO2M. Para tanto, este reagente remanescente para ser observado nas frações foi necessário mergulhar a placa 2 em solução reveladora de KMnO_4 . Após este procedimento foi possível identificar manchas amarelas com fator de retenção superior às manchas escuras reveladas em 254 nm. Estas manchas amarelas foram, primeiramente, associadas exclusivamente ao MsODEG.

Figura 44— Cromatografia em camada delgada de sílica gel da reação (placa 1) e das frações 7 à 12 da coluna cromatográfica de sílica gel (placa 2 e 2'); A placa 2 e 2' é a mesma sendo primeiramente revelada em luz UV 254 nm e depois mergulhada na solução reveladora de KMnO_4 ; R.: Fração coletada da mistura reacional depois de 24h; 2: É o composto 2,3,6,7,10,11-hexahidroxitrifetileno (2); M.: Ponto misto.



A natureza das impurezas pôde ser resolvida mediante espectroscopia de RMN- ^1H . Foram analisados os espectros da fração reunida F7 a F12 e comparados com os espectros das substâncias purificadas MsODEG e TP6EO2M. Observando o espectro de RMN- ^1H (Figura 45) das frações reunidas, vemos os simpletos em 3,09 ppm e 3,39 ppm que são, respectivamente, característicos para a metila ligada ao grupo sulfônico e para a metila da metoxila, ambas pertencentes ao reagente alquilante MsODEG, confirmando sua presença nas frações. Seguindo esta mesma linha de raciocínio, podemos confirmar a presença do TP6EO2M quando observamos os seguintes sinais: simpleto em 3,42 ppm referente à metila da metoxila, o multiplete largo em 4,01 ppm situado na região correspondente às cadeias de etilenoglicol tanto do TP6EO2M como também MsODEG, sendo que a posição deste multiplete isolado dos demais sinais é indicativo para o TP6EO2M e, finalmente, o simpleto em 7,89 ppm na região aromática pertencente ao único hidrogênio dos anéis trifenilênicos (Figura 45), confirmando a presença do TP6EO2M nas frações (F7 à 12).

O RMN- ^1H destas frações revela ainda um simpleto intenso em 3,40 ppm e dois nítidos multipletos não sobrepostos na região dos grupos $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ que não pertencem ao TP6EO2M e, tampouco, ao composto MsODEG (Figura 46). O primeiro e mais evidente, dentre os dois multipletos diastereotópicos, situa-se em 4,31 ppm e o segundo em 3,74 ppm, ambos integram por 3, ou seja, seguramente não podem pertencer ao TP6EO2M que integraria os sinais diastereotópicos por 2, como, por exemplo, é observado no sinal 4,01 ppm típico do

TP6EO2M. Estes simpleto e multipletos levantaram a suspeita da existência de ao menos um terceiro componente na mistura.

Figura 45– Espectro de RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) das frações reunidas F7 à 12 proveniente da cromatografia em coluna de sílica gel da reação de síntese do TP6EO2M.

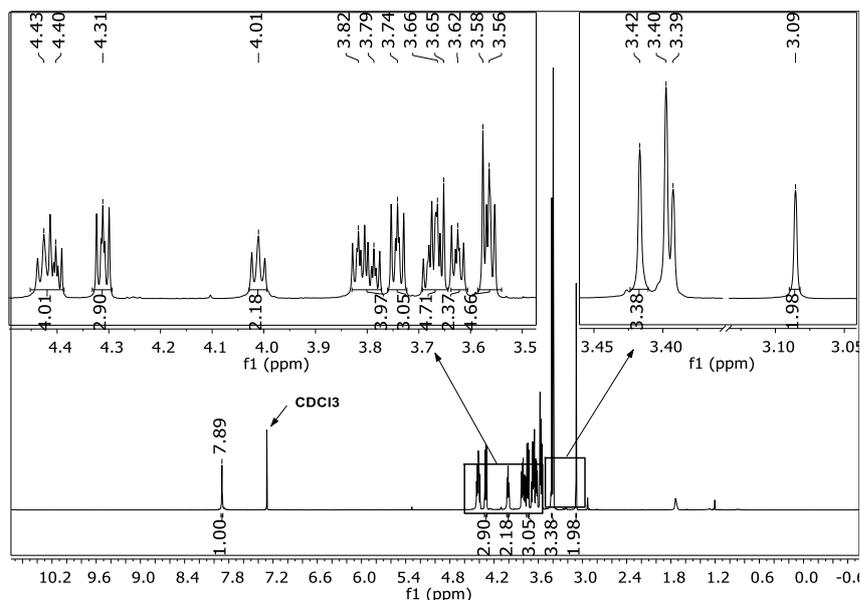
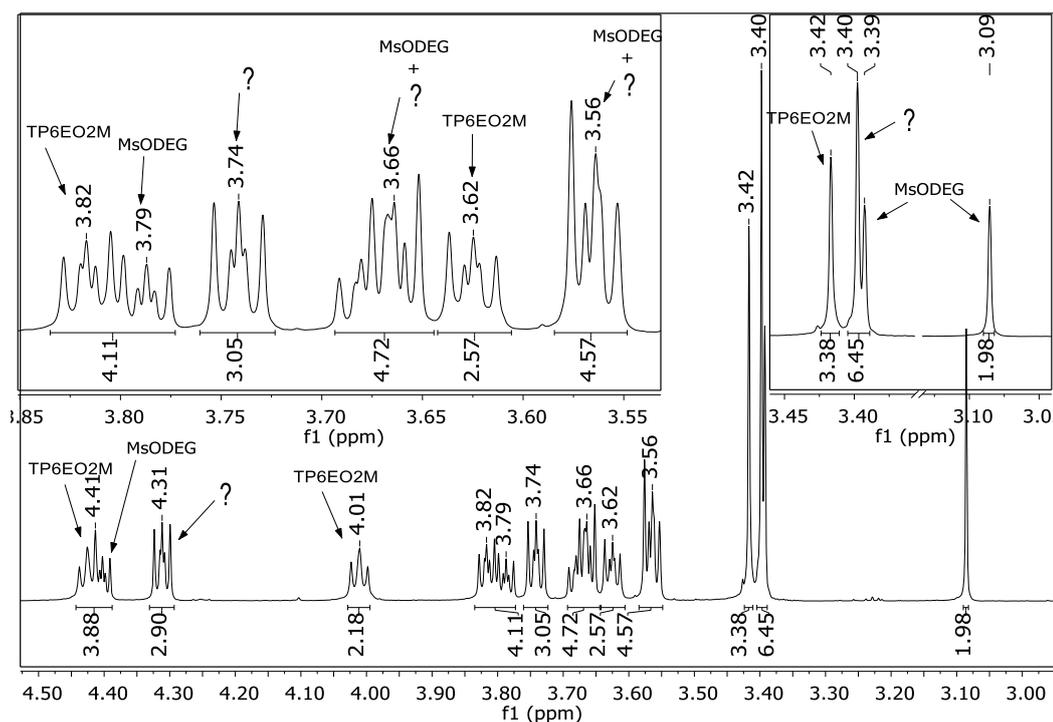
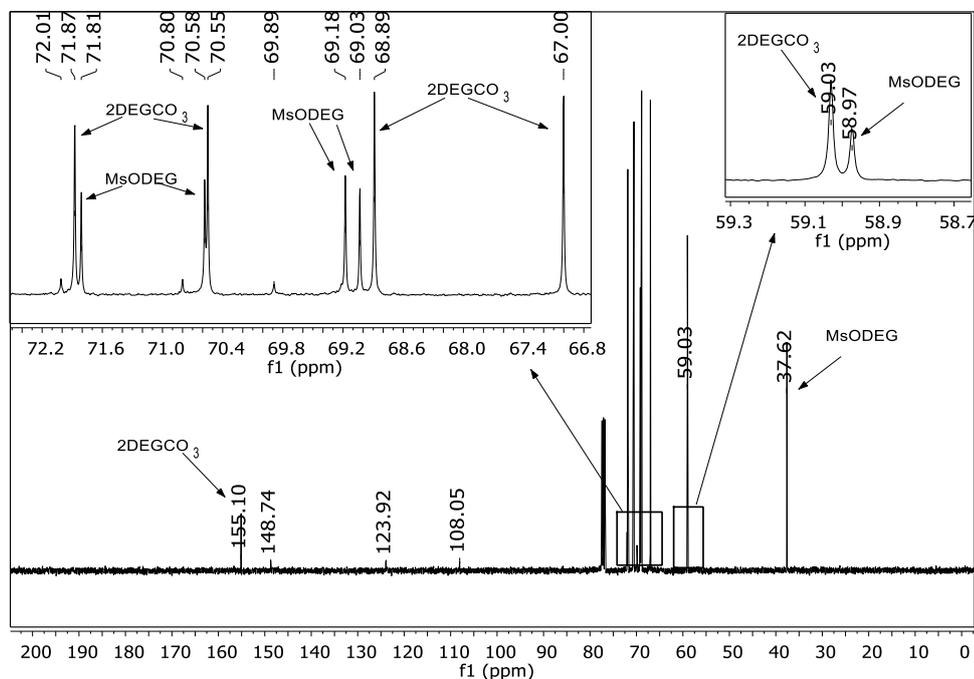


Figura 46– Espectro de RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) das frações reunidas F7 à 12 proveniente da cromatografia em coluna de sílica gel da reação de síntese do TP6EO2M especificando os picos respectivamente para os componentes da mistura.



Com intuito de evidenciar e identificar o terceiro componente da mistura, a fração reunida (F7-12) foi submetida à purificação em coluna cromatográfica nas mesmas condições da anterior. Isto fez com que a quantidade de TP6EO2M diminuísse nas frações coletadas, mas ainda assim não foi possível separar os componentes da mistura. Entretanto, com o RMN- ^{13}C da mistura foi possível observar a presença de um sinal em 155 ppm (*Figura 47*) que nos levou à hipótese da existência de um carbonato, nomeadamente o bis-(2-(2-metoxietoxi)-etil) (6) (2DEGCO₃) (*Figura 49*). Supondo a existência deste composto presente nas frações e desconsiderando os sinais do TP6EO2M no espectro de RMN- ^{13}C (*Figura 47*), que estão com menor intensidade, há 12 sinais de carbono, isto concordaria com a quantidade de carbonos presentes nas estruturas do MsODEG e 2DEGCO₃. Sendo assim, já conhecendo os sinais de carbono do MsODEG e TP6EO2M poderíamos por exclusão afirmar que o sinal em 59,03 ppm pertenceria à metila da metoxila do 2DEGCO₃, enquanto 58,97 ppm à metoxila do MsODEG. Os outros sinais do 2DEGCO₃ na região dos carbonos ligados aos hidrogênios diastereotópicos são: 71,87; 70,55; 68,89 e 67,00 ppm.

Figura 47– Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) das frações reunidas F7 à 12 provenientes da segunda cromatografia em coluna de sílica gel da reação de síntese do TP6EO2M.



Portanto, considerando a presença do 2DEGCO₃, MsODEG e TP6EO2M na fração reunida (F7 à 12) o espectro de RMN- ^1H mostrado na *Figura 46* tem os respectivos sinais dos hidrogênios diastereotópicos, bem como, os hidrogênios da metoxila atribuídos a cada um dos

componentes da mistura conforme é apontado na *Figura 48*. Não há relatos na literatura que reportem a formação do carbonato de dietilenoglicol (2DEGCO₃) como subproduto da síntese do TP6EO2M.

A formação do 2DEGCO₃ pode ser explicada como consequência do ataque nucleofílico do íon carbonato (CO₃²⁻) ao agente alquilante (**3**), como segue na *Figura 49*.

Figura 48– Espectro de RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) das frações reunidas F7 à 12 provenientes da cromatografia em coluna de sílica gel da reação de síntese do TP6EO2M com indicação dos sinais no espectro para cada um dos componentes na mistura.

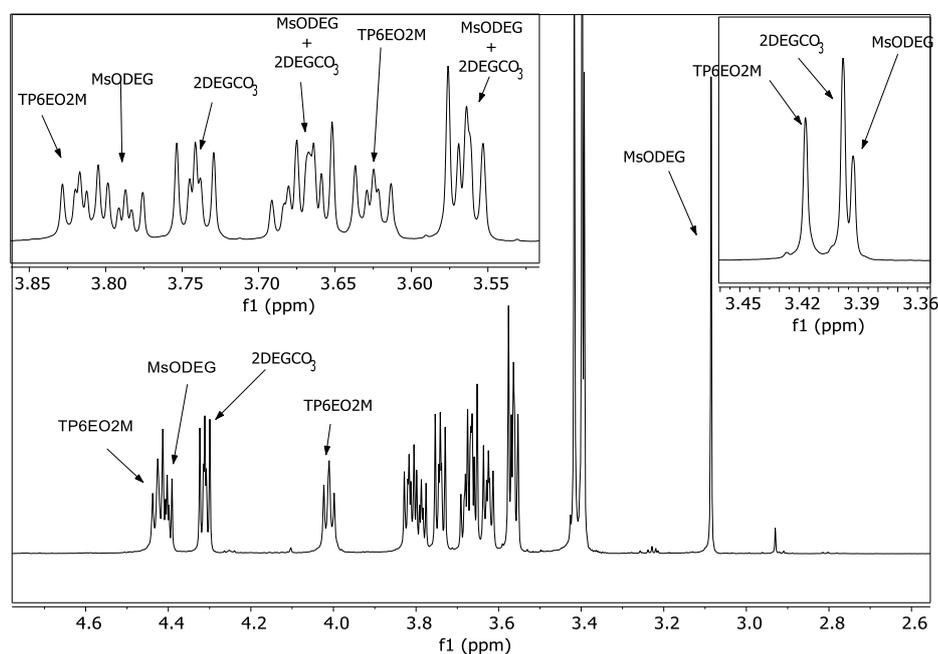
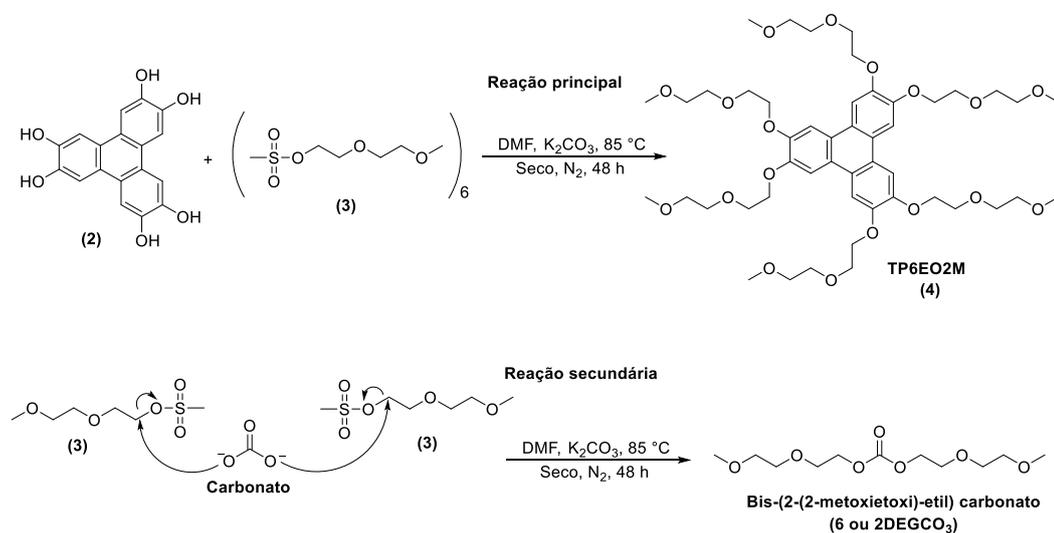


Figura 49– Reação principal de formação do TP6EO2M e secundária de formação do subproduto 2DEGCO₃ (Composto **6**).



3.3 Tipos de Rotas para a Síntese do Mesógeno Discótico TP6EO2M

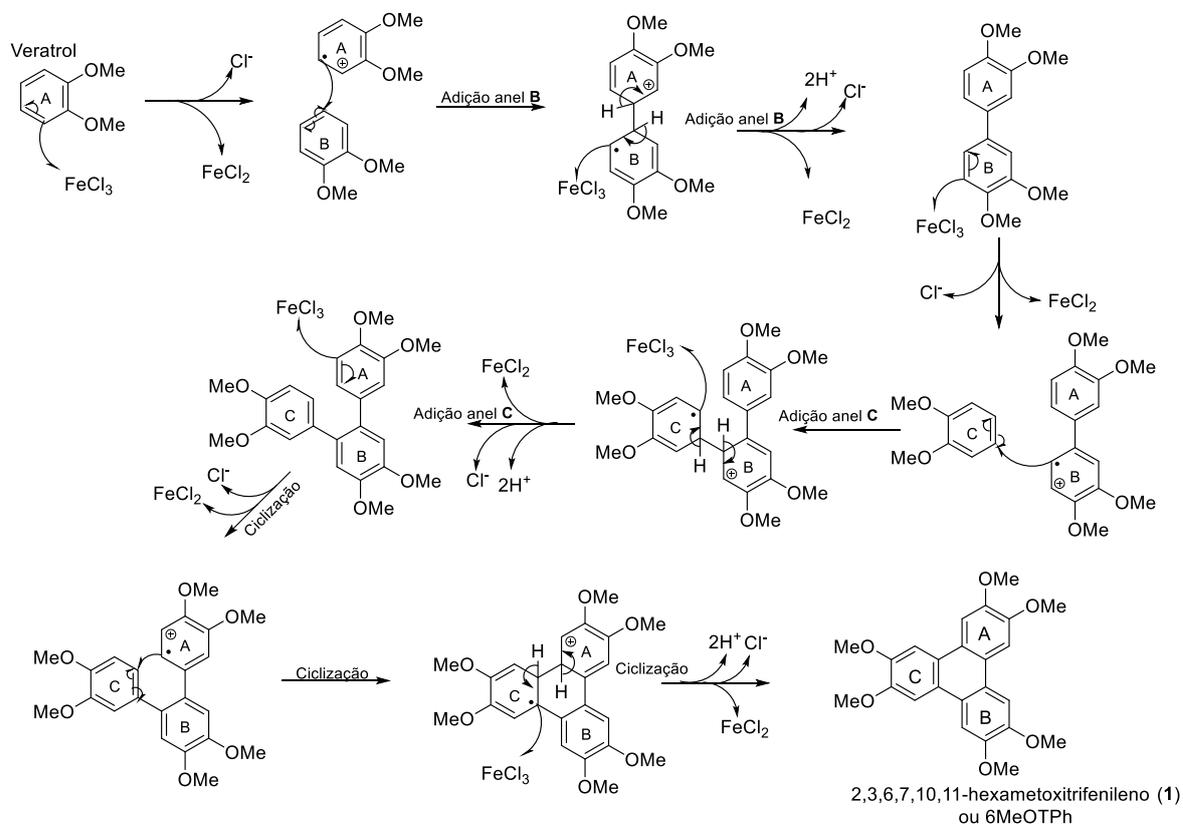
3.3.1 Proposta do Mecanismo da Trimerização Oxidativa para Formação do 2,3,6,7,10,11-Hexametoxitriifenileno (**1**)

Para obtermos o composto (**1** ou 6MeOTPh) tivemos como reagente de partida o 1,2-dimetoxibenzeno (veratrol), composto aromático, que tem os elétrons não ligantes do grupo metoxila conjugados por ressonância com os elétrons do anel aromático, conferindo-lhe maior estabilidade quando este reagente sofre oxidação. Esta característica faz do veratrol um reagente susceptível à oxidação na presença de oxidantes como, por exemplo, cloreto de ferro (III), FeCl_3 .

A reação inicia quando o FeCl_3 oxida o veratrol a um cátion-radical (*Esquema 3*). Este produto intermediário altamente reativo inicia uma reação radicalar com outra molécula de veratrol (**B**), resultando em dois anéis ligados em posições 1,4. Em seguida, o composto intermediário perde 2 prótons (H^+) e 1 elétron, reestabelecendo a ressonância ao produzir o tetrametoxibifenil derivado com dois anéis (**A** e **B**), sem elétron desemparelhado. Até a formação deste produto, observa-se perda de 2 H^+ e redução de duas moléculas de FeCl_3 .

Com a continuação da reação, há a adição de uma terceira molécula de veratrol (**C**) gerando o hexametoxitriifenil derivado que, por sua vez, sofre ciclização resultando no produto 2,3,6,7,10,11-hexametoxitriifenileno (**1**). Cada etapa (adição do anel B, adição do anel C e ciclização) acontece com a liberação de 2 H^+ e redução de 2 FeCl_3 , sendo que, até chegar ao 6MeOTPh são liberados 6 equivalentes de H^+ e reduzidos 6 FeCl_3 a FeCl_2 .

Esquema 3– Proposta do mecanismo de síntese da obtenção do produto 2,3,6,7,10,11-hexametoxitrifenileno (composto **1**).



3.3.1.1 Comparação do Rendimento da Síntese do Composto **1** na Presença e Ausência do H₂SO₄

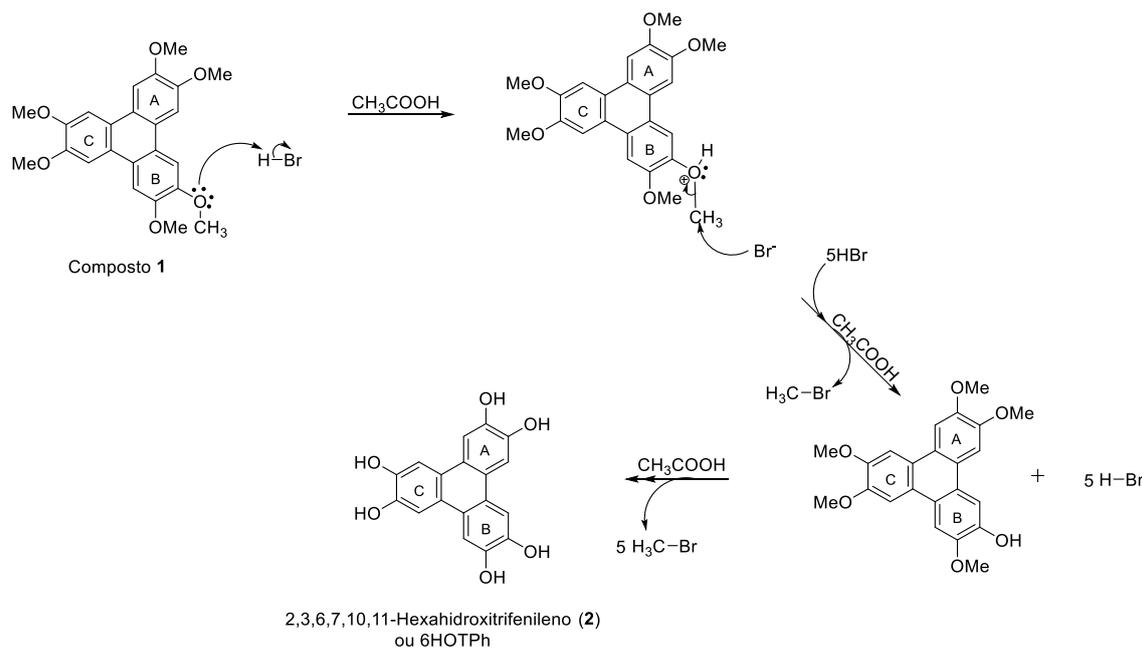
A presença do H₂SO₄ no início da reação, segundo Boden e colaboradores,⁸⁹ serve para ativar o veratrol⁸⁸ tornando o rendimento da reação levemente maior. Boden e colaboradores, além de analisarem o rendimento da reação na presença do H₂SO₄ (rendimento 86 %), ainda analisaram outros ácidos, tais como: ácido trifluoroacético (rendimento 73 %), ácido trifluorometanossulfônico (78 %) e ácido clorossulfônico (76 %).

Nossa síntese do 6MeOTPh foi realizada na ausência do H₂SO₄ e presença do ácido. Na primeira situação, o rendimento chegou a 47 %, já quando a reação foi realizada na presença do ácido, repetindo as demais condições da primeira situação, o rendimento atingiu um 71 %. Esse resultado corroborou com aqueles relatados por Boden e colaboradores.

3.3.2 Proposta do Mecanismo de Síntese do Composto 2,3,6,7,10,11-Hexahidroxitrifenileno (**2**)

O 6HOTPh foi sintetizado a partir do 6MeOTPh na presença do ácido bromídrico dissolvido em ácido acético. O provável mecanismo de síntese é mostrado no *Esquema 4*.

Esquema 4– Proposta do mecanismo de síntese para obtenção do produto 2,3,6,7,10,11-hexahidroxitrifenileno (composto **2**).

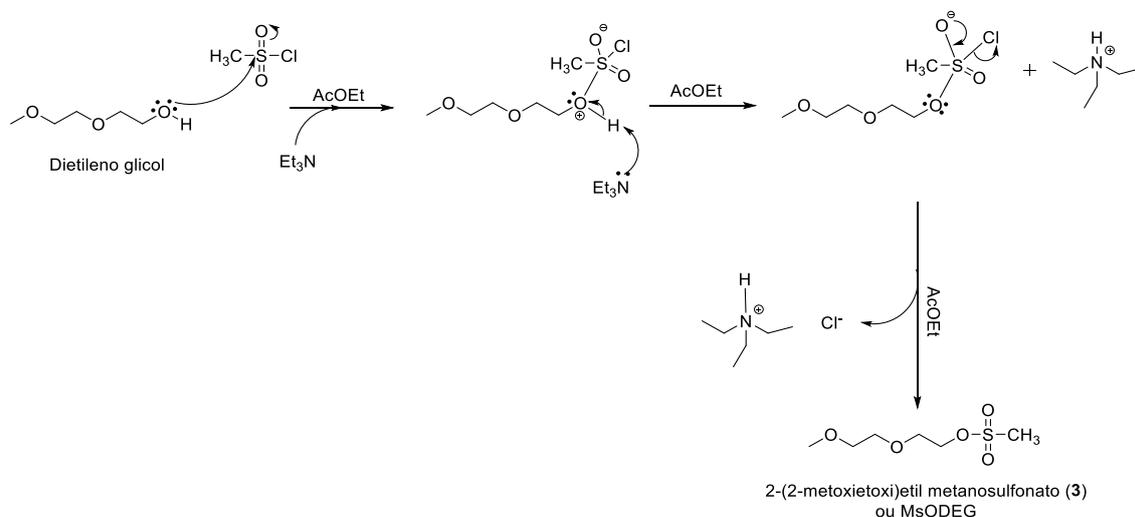


A reação inicia quando a metoxila, presente no 6MeOTPh, é protonada em meio fortemente ácido. Depois, o ânion bromídrico ataca a metila da metoxila catiônica ligada no trifenileno e os resultados são a formação do 6HOTPh e liberação do brometo de metila.

3.3.3 Proposta de Mecanismo de Síntese do TP6EO2M (composto **4**)

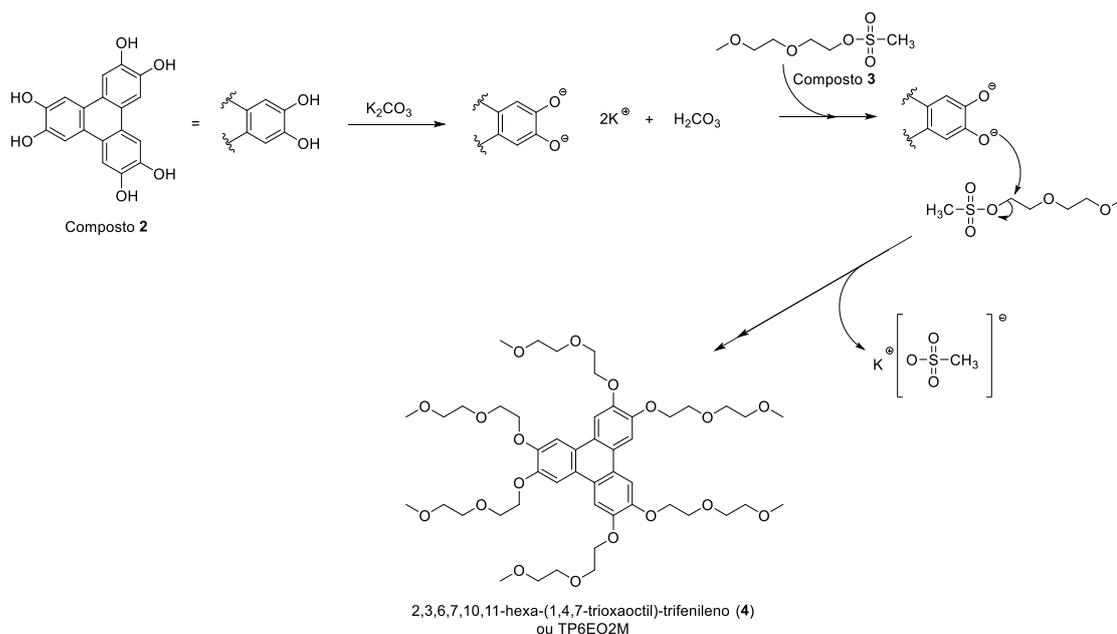
A formação do mesilato de polietileno glicol (composto **3** ou MsODEG) acontece muito provavelmente através do mecanismo de reação descrito no *Esquema 5*.

Esquema 5– Proposta do mecanismo de síntese do 2-(2-metoxietoxi)etil metanosulfonato (MsODEG).



A seguir temos o provável mecanismo de síntese para a formação do composto **4** usando a base K_2CO_3 dissolvida em DMF (*Esquema 6*). A reação inicia-se quando o 6HOTPh é desprotonado havendo formação do ânion do composto, bem como, o H_2CO_3 . A seguir, o MsODEG (**3**) sofre ataque nucleofílico da forma aniônica do 6HOTPh. Após sucessivas etapas de alquilação é formado o TP6EO2M.

Esquema 6– Proposta do mecanismo de síntese do TP6EO2M (composto **4**).

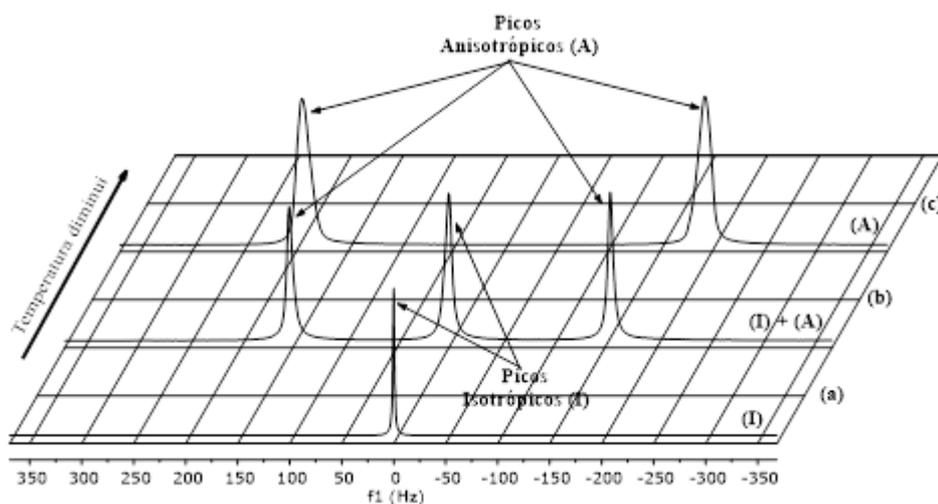


3.4 Avaliação da Transição de Fases Isotrópica-Anisotrópica no Sistema TP6EO2M/D₂O

A fase nemática formada pelo TP6EO2M em meio aquoso em determinadas condições, como poderemos confirmar a seguir de acordo com os experimentos realizados, pode alcançar um grau de orientação adequado para permitir a medida de acoplamentos dipolares, bem como, a medida da anisotropia do deslocamento químico em moléculas hóspede. Os parâmetros que influenciam a formação de fases orientadas foram investigados. Tais foram: variação da temperatura; concentração do analito; concentração do mesógeno; e natureza do analito.

Para realizar este estudo, o grau de orientação do sistema TP6EO2M/D₂O foi monitorado através do sinal de D₂O no espectro RMN-²H em espectrômetros de RMN de 400 ou 600 MHz. Quando no espectro há apenas um simpleto subentende-se a presença de um meio completamente isotrópico (I) (Figura 50-a), se o sinal for um duplete indica 100 % de fase anisotrópica (A) (Figura 50-c) e, por sua vez, a observação simultânea de duplete e simpleto indica uma mistura de fases anisotrópica e isotrópica (Figura 50-b) onde a proporção entre elas presente no sistema é refletida na integral da área dos respectivos picos. Vale salientar que a aparição dos sinais no espectro da mistura de fases assemelha-se a um tripleto, porém, o pico no centro deste pseudotripleto é na verdade o simpleto correspondente ao deutério do D₂O presente na fase isotrópica e os picos laterais são resultados do duplete da água deuterada presente na fase cromônica (Figura 50-b).

Figura 50– Monitoramento do sinal quadrupolar do D₂O em RMN-²H para observar transição de fase isotrópica (I)/anisotrópica (A) no sistema TP6EO2M/D₂O à medida que diminui a temperatura. (a) Meio completamente isotrópico; (b) Meio com presença de fases isotrópica e anisotrópica; (c) Meio completamente anisotrópico.



Ainda em relação ao espectro de RMN-²H é possível estimar o grau de ordem da fase orientada mediante o deslocamento quadrupolar ($\Delta\nu Q$) do duplete. Conforme este parâmetro, quanto maior o valor de $\Delta\nu Q$, maior o grau de orientação da fase anisotrópica, além disso, a aparência dos picos do duplete quadrupolar nos indica o grau de homogeneidade das fases, ou seja, quando os picos estão simétricos e finos indicam fase homogênea, enquanto picos largos e não simétricos indicam diferentes condições de alinhamento em diferentes pontos da amostra. É preciso salientar que o grau de alinhamento é uma variável decisiva para a medição dos RDCs e RCSAs.

Uma fase fortemente alinhada é favorável para adquirir RCSAs, por outro lado, RDCs tornam-se difíceis de serem interpretados em sistemas assim. Isto porque, numa fase com um grau de alinhamento excessivamente grande surgem, a duas ou três ligações, muitos RDCs homonucleares ¹H-¹H prejudicando a resolução espectral. Todavia, num alinhamento muito pequeno os RCSAs tornam-se suscetíveis a erros de medidas.¹⁰⁸

Usando o diagrama de fases previamente conhecido do sistema TP6EO2M/D₂O⁷⁸ foram testadas as concentrações 30 e 40 % em massa de TP6EO2M para alcançar condições de alinhamento adequadas. A quantidade de agente alinhador deve ser, tal qual, não esteja muito concentrado a ponto de dificultar a solubilização do analito que será adicionado ao sistema TP6EO2M/D₂O, porém não pode ser muito diluído a ponto de ser preciso diminuir muito a temperatura para alcançar uma temperatura de transição de fases muito baixa. A condição ideal para o sistema TP6EO2M/D₂O será aquela onde a temperatura de obtenção da fase nemática no sistema fique em torno dos 20 °C e que a diferença de temperatura de transição entre os limites da fase anisotrópica e isotrópica seja a menor possível, haja vista a anisotropia do deslocamento químico ser muito sensível à mudança de temperatura entre os dois distintos ambientes. Quanto menor esta diferença de temperatura entre as duas fases, menor a probabilidade de incremento de erros nos resultados dos parâmetros de RCSAs.

Todos os espectros da *Figura 51* mostram que a transição de fase isotrópica-nemática é atingida variando a temperatura do sistema TP6EO2M/D₂O. Na concentração mais baixa de TP6EO2M testada (30 %), a transição de fase isotrópica (*I*) para fase anisotrópica (*A*) inicia-se próxima de 17 °C, com presença das duas fases (*A + I*), atingindo-se a formação total da fase anisotrópica quando a temperatura registra 15 °C (*Figura 51-a*).

Quando aumentamos a concentração do TP6EO2M para 40 % a temperatura de transição da fase anisotrópica também aumentou para 22 °C (*Figura 51-b*). Além do mais, a diferença de temperatura entre a fase nemática e a fase isotrópica, com esta concentração do agente alinhador, registrou apenas 1 °C, diante dos 2 °C quando a concentração testada foi 30

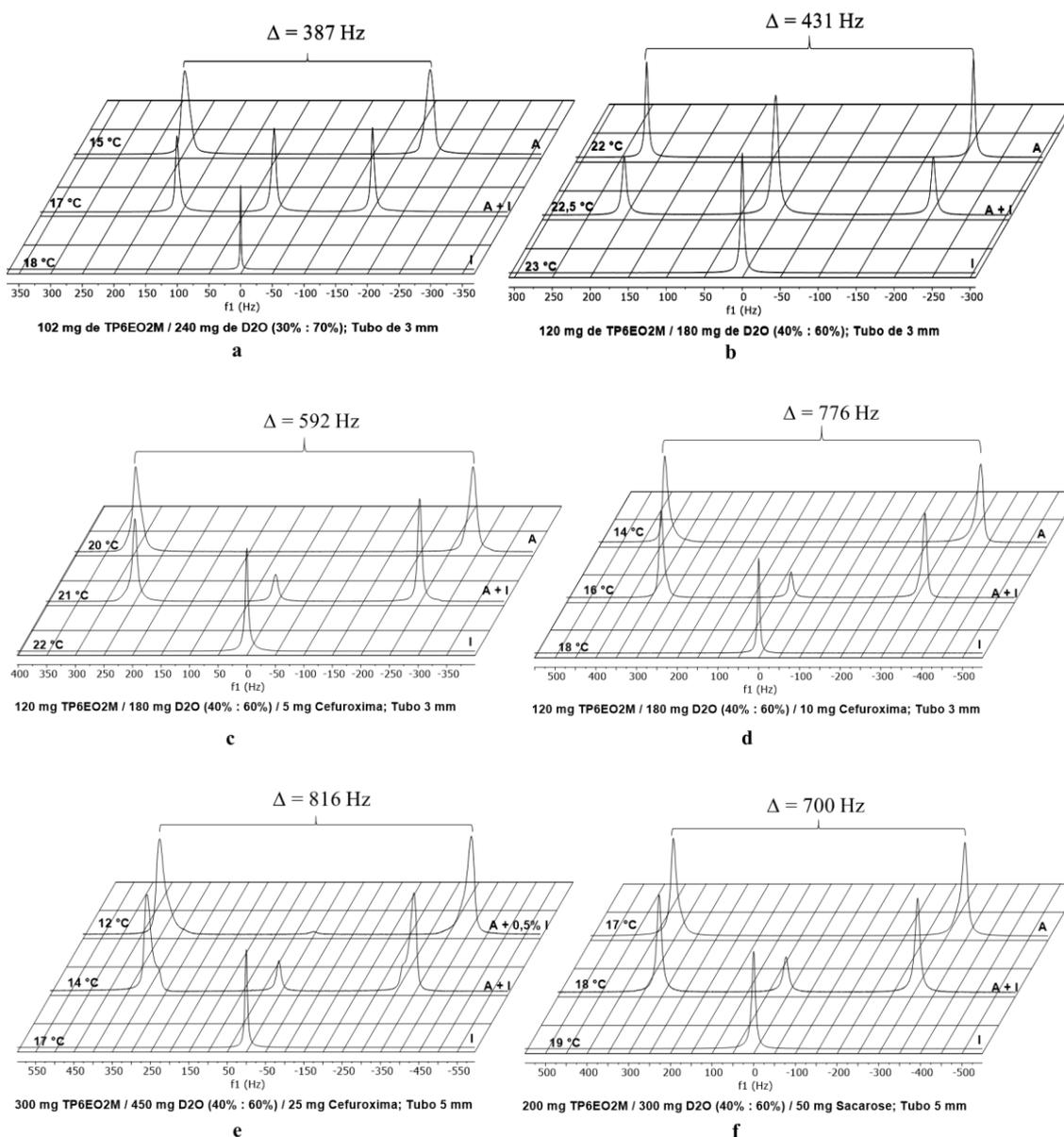
%. Houve também, como consequência da concentração mais elevada, um aumento do grau de ordem da fase que é refletido pelo $\Delta\nu_Q = 431$ Hz. O aumento da ordem da fase é mais favorável à medida de RCSAs. Desta forma, a concentração de 40 % do TP6EO2M mostrou-se mais favorável do que quando testada a concentração de 30 %, pois além de podermos medir os RDCs, o incremento de erro na medida de RCSAs associado à diferença de temperatura entre as fases também diminui.

Ao mantermos as mesmas condições do experimento registrado na *Figura 51-b*, porém acrescentado 5 mg de cefuroxima ao sistema TP6EO2M/D₂O (*Figura 51-c*), vemos que a fase anisotrópica só é obtida em sua plenitude aos 20 °C, ou seja, é necessário diminuir 2 °C daquela temperatura quando o sistema está sem cefuroxima. Isto, portanto, nos leva a acreditar que a cefuroxima dificulta a obtenção da fase nemática, ficando ainda mais evidente, quando aumentamos a concentração de cefuroxima para 10 mg (*Figura 51-d*) e 25 mg (*Figura 51-e*), sendo preciso diminuir a temperatura até 14 e 12 °C, respectivamente, para a formação total da fase orientada. Ademais, fica evidente que a temperatura, assim como a concentração do TP6EO2M, também, afeta o grau de organização da fase, haja vista o aumento do desdobramento quadrupolar quando diminuimos a temperatura do sistema (*Figura 51-c, d, e*).

No resultado do alinhamento da fase obtida na presença de 25 mg de cefuroxima a 12 °C de temperatura (*Figura 51-e*), resta um pouco de fase isotrópica. Vale salientar que a presença de meios distintos, isotrópico e anisotrópico, pode dificultar a interpretação dos resultados por causa da possível sobreposição dos sinais espectroscópicos. Entretanto, em sistemas onde as fases isotrópica e anisotrópica têm a susceptibilidade magnéticas muito diferentes, a probabilidade de colapso dos sinais diminui porque os deslocamentos em fases distintas tendem a cair em regiões diferentes do espectro. Desta forma, a presença do mesmo analito nos dois meios pode ser uma vantagem porque num único experimento poderíamos medir o acoplamento escalar (J) e os parâmetros anisotrópicos (RDCs e RCSAs) obtidos numa mesma temperatura e num único experimento.

O tipo de analito também determina a formação e o grau de organização da fase nemática no sistema estudado. Observa-se os espectros da *Figura 51-e, f* que têm, respectivamente, 25 mg de cefuroxima e 50 mg de sacarose. A quantidade de sacarose é o dobro de cefuroxima, no entanto, a temperatura para atingir a fase nemática é 17 °C, enquanto com cefuroxima a temperatura do sistema deve atingir 12 °C, ou seja, há uma clara dificuldade na formação da fase anisotrópica quando a cefuroxima está presente no sistema. Provavelmente, isto acontece porque a cefuroxima tem uma interação mais forte com agente alinhador de fase do que a sacarose, dificultando o empilhamento do mesógeno TP6EO2M.

Figura 51– Monitoramento da transição de fase (isotrópica (I)/anisotrópica (A)) do sistema TP6EO2M/D₂O através do sinal D₂O ($\Delta\nu_D$) em diferentes condições.



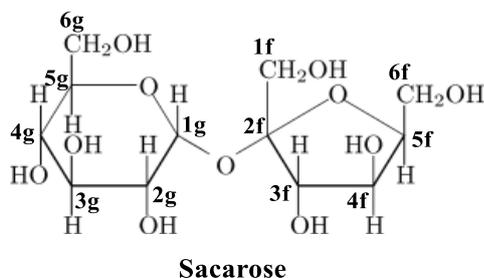
3.5 Estudo Conformacional da Sacarose na Fase Cromônica TP6EO2M/D₂O

3.5.1 Atribuição de ¹H e ¹³C da Molécula de Sacarose Mediante Técnicas Convencionais de RMN

Os átomos de ¹H e ¹³C da molécula de sacarose (Figura 52) foram atribuídos mediante interpretação dos espectros do tipo ¹H, ¹³C, HSQC, HMBC e COSY. Sendo que os espectros 1D estão reportados nas Figura 53 e Figura 54. Já os espectros 2D podem ser encontrados nos

Anexos (B 1 à B 3). Todas as informações obtidas nos espectros 1D estão reunidas na *Tabela 3*.

Figura 52– Estrutura da sacarose com a numeração identificando as posições dos carbonos. G e F são referentes, respectivamente, aos anéis glucopiranosil e frutofuranosil.



Os espectros de RMN- ^1H e ^{13}C mostram, respectivamente, a presença de todos os sinais de hidrogênio e carbono pertencentes à molécula de sacarose. Por exemplo, é facilmente observável a presença do hidrogênio anomérico (H_{1g}) com deslocamento químico em 5,40 ppm na forma de um duplete. A separação entre os picos do duplete do hidrogênio anomérico foi medida como sendo igual a 3,87 Hz, consequência do acoplamento escalar com o hidrogênio vicinal ligado ao carbono 2g (3,55 ppm). Por sua vez, H_{2g} acopla com H_{3g} (3,75 ppm) formando um duplete-duplete, porém, aqui, com uma constante de acoplamento 3J igual a 10,0 Hz (constante de acoplamento característica de posição axial-axial).

Pode-se observar que os hidrogênios 5g e 6g, no monômero glicose, e 5f e 6f, no monômero frutose, são os mais difíceis de serem atribuídos. Isto porque o ambiente químico entre seus pares assemelha-se e conseqüentemente as aparições no espectro de hidrogênio são praticamente equivalentes. Associado a esta dificuldade tem-se também o fato de suas multiplicidades serem as mesmas, isto é, 6g e 6f são dupletos, enquanto 5g e 5f apresentam-se com múltiplos acoplamentos. No entanto, pelo HMBC (Anexos - B 2) observa-se que o multiplete 3,88 ppm pode-se atribuí-lo ao H_{5f} , pois este sinal acopla apenas com o carbono de deslocamento químico igual a 73,93 ppm pertencente ao C_{4f} . Por exclusão, logo, o multiplete em 3,84 ppm é atribuído ao H_{5g} e confirmado no HMBC.

Ao passo que os dupletos atribuídos a H_{6g} e H_{6f} praticamente colapsam formando um pseudo tripleto em aproximadamente 3,81 ppm. No entanto, é fácil perceber pelo HSQC (Anexos - B 1) que há uma leve diferença de deslocamento químico entre os hidrogênios 6g e 6f. Recorrendo novamente ao HMBC é possível notar-se que há um forte acoplamento entre o

hidrogênio com deslocamento químico sutilmente maior que 3,81 ppm e o C_{5f} (81,31 ppm). Portanto, podemos atribuir a H_{6f} um deslocamento químico relativamente superior a H_{6g}.

Figura 53– Espectro de RMN-¹H (600 MHz) da molécula de sacarose dissolvida em D₂O e analisada no meio isotrópico (23 °C).

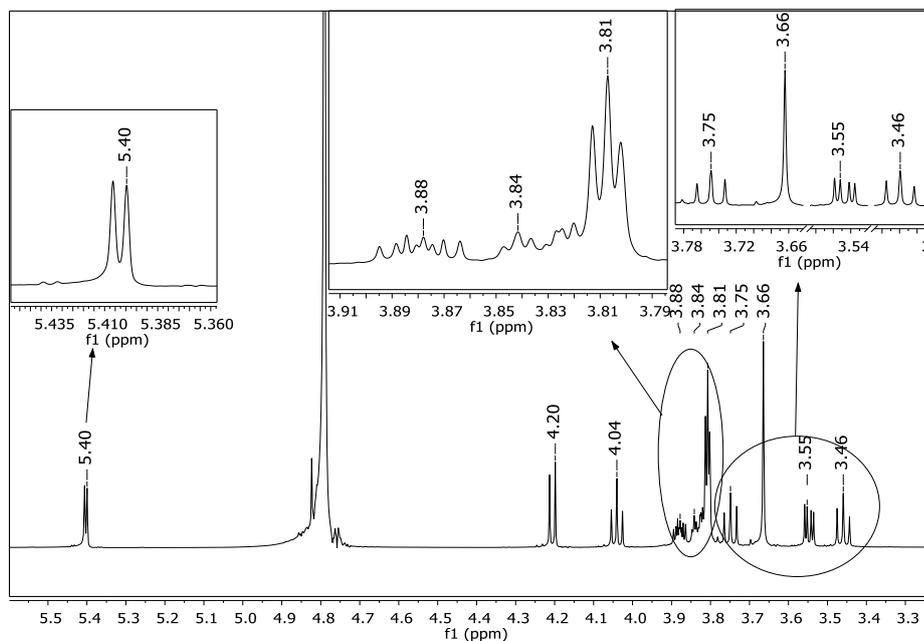


Figura 54– Espectro de RMN-¹³C (150 MHz) da molécula de sacarose dissolvida em D₂O e analisada no meio isotrópico (23 °C).

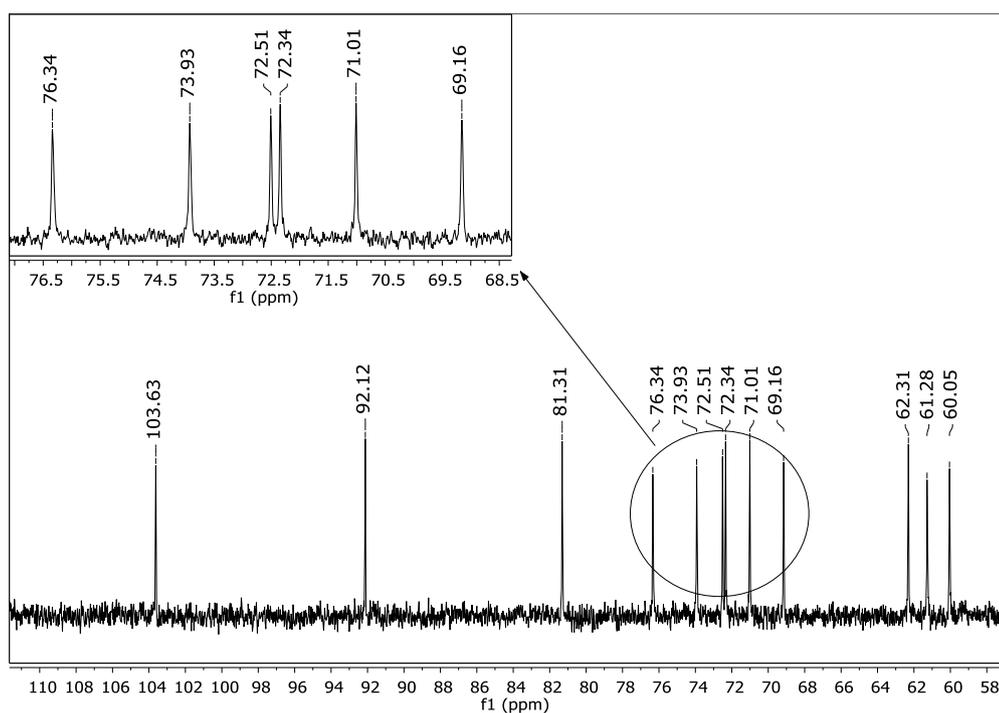


Tabela 3– Atribuições dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para a molécula de sacarose dissolvida em D_2O e analisada no meio isotrópico (23 °C).

Tipo de Carbono	Identificação	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	$^3J_{H-H}$ (Mult.) / Hz^{-1}
CH	1g	92,12	5,40	3,87 (d)
CH	2g	71,01	3,55	10,0; 3,87 (dd)
CH	3g	72,51	3,75	9,93 (t)
CH	4g	69,16	3,46	9,52 (t)
CH	5g	72,34	3,84	m
CH ₂	6g	60,05	3,81	3,0 (d)
CH ₂	1f	61,28	3,66	s
C	2f	103,63	-	-
CH	3f	76,34	4,20	8,79 (d)
CH	4f	73,93	4,04	8,59 (t)
CH	5f	81,31	3,88	m
CH ₂	6f	62,31	3,81	3,5 (d)

δ : Deslocamento químico; J : Acoplamento escalar; d: duplete; dd: duplete-duplete; m: multiplete; Mult.: Multiplicidade; s: simpleto; t: tripleto.

3.5.2 Medidas anisotrópicas no Sistema TP6EO2M/D₂O/Sacarose

O sistema TP6EO2M/D₂O/sacarose foi preparado para aquisição de parâmetros anisotrópicos (RDCs e RCSAs) da sacarose, conforme reportado no item 2.5.1. Os espectros HSQC acoplados em F1 (*Figura 56*) para medidas de RDCs e $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ (*Figura 59*) para medidas de RCSAs foram registrados nas duas temperaturas alvos: 16 °C (anisotrópica) e 19 °C (isotrópica). No caso dos espectros acoplados em F1, um *splitting* dos sinais registrados num espectro foi medido como a separação entre picos dividido do fator de escala $k = 4$ ou 8 , respectivamente, para grupos metínicos e metilênicos, tais fatores foram usados no bloco de evolução de J no experimento HSQC-F1. Depois faz-se a diferença entre cada um dos *splitting* correspondentes obtidos no meio isotrópico e anisotrópico através da *Equação 38* para adquirir os RDCs. Enquanto os RCSAs foram medidos usando a *Equação 44* tomando como referência o carbono 6g da sacarose.

O desdobramento quadrupolar de ^2H , para o sistema TP6EO2M/D₂O/sacarose à 16 °C, registrou 776 Hz (*Figura 55-a*), indicando, portanto, um grau de alinhamento relativamente

grande. Para medidas de RDCs, o elevado grau de ordem, indicado pelo elevado valor do desdobramento quadrupolar, traz importantes complicações como, por exemplo, um forte acoplamento homonuclear entre hidrogênios à curta distância e dificuldade de atingir uma transferência INEPT efetiva nos experimentos HSQC. Estas complicações podem ser mais pronunciadas em estruturas com elevado grau de hidrogenação como é o caso da sacarose. Porém, para medidas de RCSAs, um elevado grau de orientação pode ser favorável para a medição de anisotropia em carbonos com hibridização sp^3 .

Para impedir o acoplamento entre os hidrogênios geminais e vicinais da sacarose foram realizadas algumas observações em relação a potência mais adequada do desacoplador de $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ durante aquisição dos espectros de HSQC-F1. Foi observado, também, o tempo de duração da aquisição de sinais que melhor satisfizesse a fase anisotrópica, ou seja, uma condição que não afetasse a estabilidade da fase anisotrópica durante a aquisição de sinais decorrente do aquecimento do sistema devido a potência do desacoplador que inevitavelmente pode aquecer o sistema a ponto de desestabilizar a fase anisotrópica

No caso da potência do desacoplador, quando se aumentava a valores acima de 2,18 W a estabilidade da fase anisotrópica era perdida, passando o sistema para uma fase isotrópica ou no melhor dos casos uma mistura de fases isotrópica/anisotrópica, conseqüentemente as dipolares residuais poderiam ser afetadas fora do nosso controle. Isto acontecia porque o sistema aquecia-se internamente decorrente do aumento de temperatura devido a potência de radiação emitida pelo desacoplador, convertendo a fase anisotrópica em fase isotrópica. Do contrário, nos casos quando diminuiu-se a potência do desacoplador, a valores menores do que 2,18 W, o espectro tornava-se irresolúvel, pois a potência irradiada na frequência de hidrogênio não era suficiente para impedir os acoplamentos homonucleares.

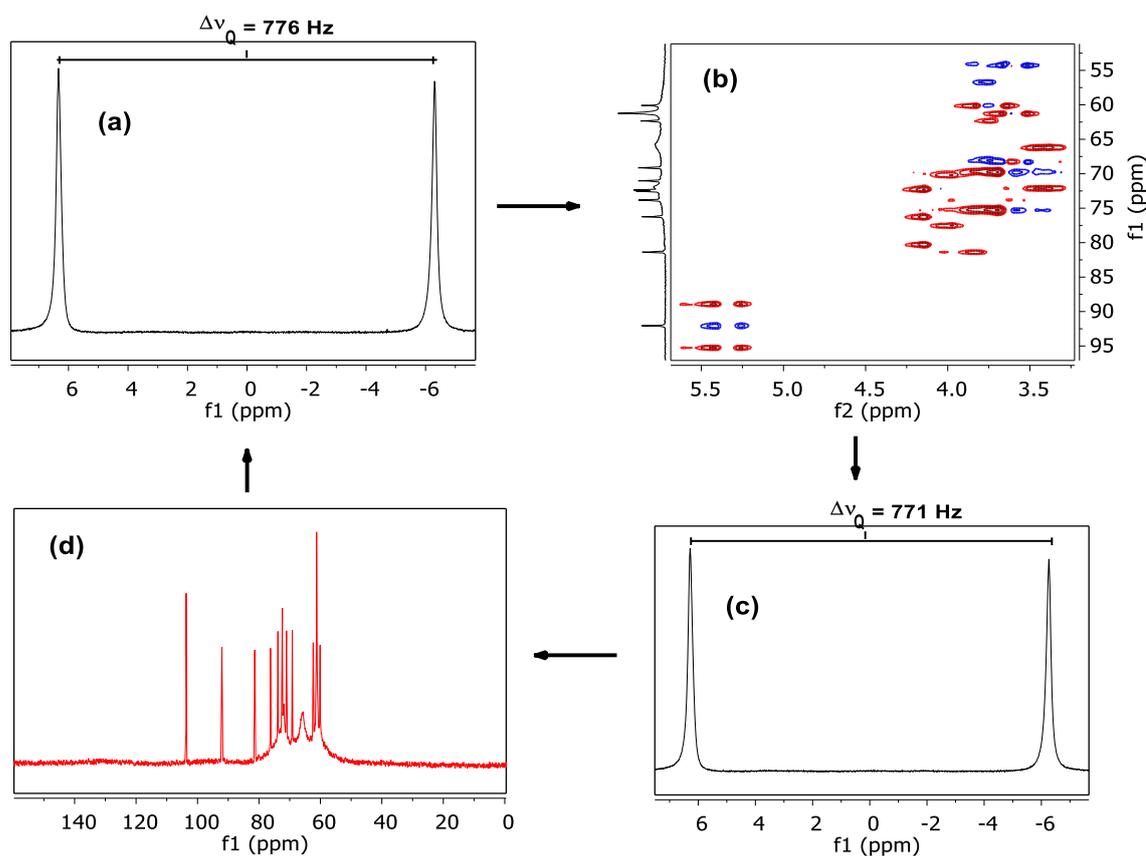
Para impedir que a fase anisotrópica se convertesse em fase isotrópica devido um aumento da potência do desacoplador, poderíamos diminuir a temperatura para além dos 16 °C, desta forma, a fase anisotrópica não seria convertida em fase isotrópica. Porém, isto implicaria em um aumento da diferença entre as temperaturas limites das duas fases (isotrópica/anisotrópica), como conseqüência, as medidas de RCSAs poderiam ser menos precisas.

A outra observação monitorada para impedir a conversão da fase anisotrópica em fase isotrópica foi diminuir o tempo de aquisição dos sinais que foi de 0,19 ms para HSQC-F1 e 0,57 ms para $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$, tendo em vista que o desacoplador é ligado durante este intervalo de tempo, ou seja, quanto menor o tempo de aquisição dos sinais menos tempo a potência do

desacoplador permanece ligada e, conseqüentemente, a temperatura do sistema não é tão afetada.

Por último, para confirmar que a fase anisotrópica continuava estável durante a aquisição dos espectros HSQC-F1 e $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$, realizaram-se medidas do desdobramento quadrupolar de ^2H antes e depois de cada um dos espectros, conforme a *Figura 55*. Se ao final dos experimentos para medidas anisotrópicas o duplete do quadrupolo de deutério permanecesse invariável, significava que a fase anisotrópica ficou inalterada durante a realização do experimento.

Figura 55– Medida do desdobramento quadrupolar de ^2H no sistema anisotrópico TP6EO2M/D₂O/sacarose em 16 °C realizada em RMN com campo de 9,4 T. (a) antes do HSQC-F1; (c) Depois da medida de HSQC-F1 e imediatamente antes de $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$.



3.5.2.1 Medição dos RDCs da Sacarose no Sistema TP6EO2M/D₂O

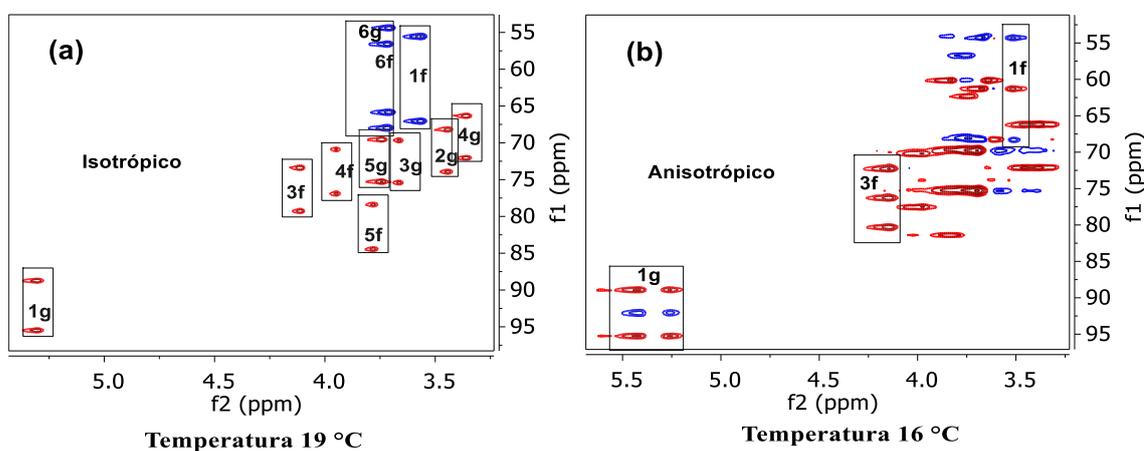
Para medição dos RDCs são realizados os espectros de HSQC-F1 nos ambientes isotrópico e anisotrópico. O espectro HSQC-F1 no ambiente isotrópico é facilmente

interpretável, pois as espécies acopladas a uma ligação $^{13}\text{C}-^1\text{H}$, que tem os sinais desdobrados em F1, são observados claramente resultando em 11 acoplamentos escalares (*Figura 56-a*).

Em contrapartida, em meio anisotrópico, a interpretação foi bem mais complexa devido a, provavelmente, *mismatching* da transferência de magnetização durante o período $1/2J$ de INEPT, pois parte da magnetização não evolui com acoplamento escalar, isto resulta no surgimento de um artefato inesperado centrado entre alguns dos dupletos, como fica evidente para os acoplamento nas posições 1g e 3f (*Figura 56-b*), e com menor clareza nos hidrogênios metilênicos 1f, 6f e 6g. Estes sinais extras aparecem no espectro anisotrópico porque os valores muito grandes das constantes de acoplamento dipolar tornam o acoplamento total bem diferente do valor considerado para a transferência INEPT.

Outro fator que dificultou a interpretação dos espectros foi decorrente do surgimento de sinais de acoplamento homonuclear de longa alcance entre os hidrogênios $\text{H}_{1\text{g}}-\text{H}_{2\text{g}}$, $\text{H}_{1\text{f}}-\text{H}_{1\text{f}}$ e $\text{H}_{6\text{g}}-\text{H}_{6\text{g}}$, sendo isto, uma consequência do elevado grau de alinhamento da fase. Este efeito fica mais evidente na região do espectro, onde aparecem os hidrogênios metilênicos, onde há uma importante sobreposição de sinais.

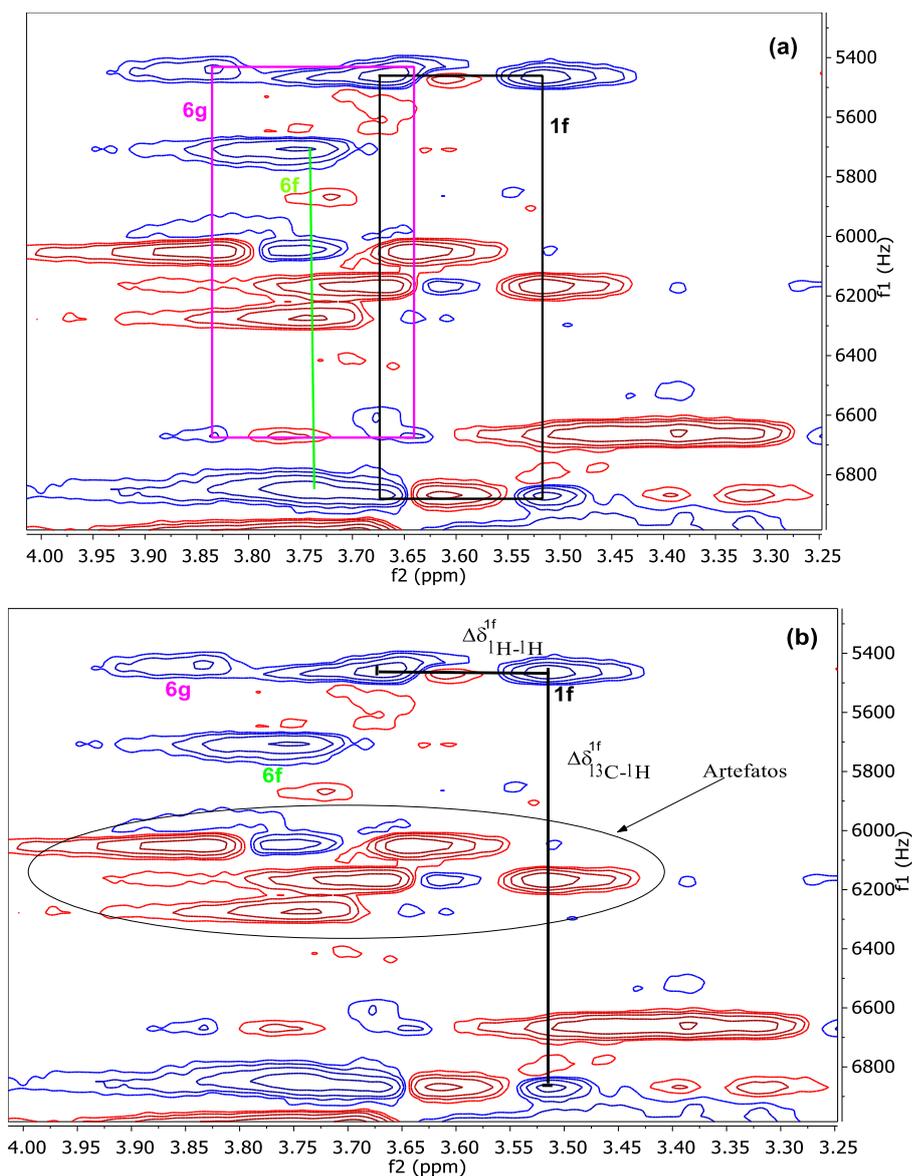
Figura 56– Espectros de HSQC (400 MHz) da sacarose acoplados em F1 nas temperaturas 16 °C (anisotrópico) e 19 °C (isotrópico) no sistema TP6EO2M/D₂O.



As *Figura 57 (a)* e *(b)* são as mesmas da *Figura 56-b* (HSQC-F1), porém evidenciando-se a região de acoplamento homonuclear de longo alcance entre os hidrogênios metilênicos obtidos no meio anisotrópico. Os sinais de contorno pertencentes ao mesmo hidrogênio são apontados por uma figura retangular, ou seja, para os hidrogênios metilênicos $\text{H}_{1\text{f}}$, há ao menos oito sinais de contorno, o mesmo acontece com o $\text{H}_{6\text{g}}$ (*Figura 57-a*). O número elevado de sinais é decorrente não apenas dos artefatos, circundados por uma elipse (*Figura 57-b*), como

também dos acoplamentos geminais ^1H - ^1H em F2. Na *Figura 57-(b)*, como exemplo, são mostrados os desdobramentos dos sinais de acoplamento entre ^{13}C - ^1H em F1, bem como, para hidrogênios geminais ^1H - ^1H , em F2, ambos na posição *1f* da sacarose.

Figura 57– HSQC-F1 (400 MHz) dos sinais de contorno dos acoplamentos entre hidrogênios na região metilênica da sacarose.



Ao todo foi possível determinar nove medidas de RDCs ^{13}C - ^1H em F1 compreendendo o intervalo de 48,22 à -152,26 Hz, conforme *Tabela 4*. Além destes, observaram-se também efeitos de acoplamento homonuclear entre os hidrogênios vicinais (H_{1g} - H_{2g}) e geminais (H_{1f} - H_{1f}) e (H_{6g} - H_{6g}). Quando os acoplamentos dipolares residuais homonucleares são maiores do que o acoplamento escalar correspondente, deve-se tomar cuidado. Pois nesta situação há

ambiguidade na interpretação do acoplamento total, tendo dois possíveis resultados, ou seja, tanto podemos imaginar a magnitude do acoplamento total sendo positiva, no caso em que o RDC contribui para o *splitting* do acoplamento total positivamente, como negativa, quando o RDC é negativo. Acontece que apenas observando o espectro não é possível distinguir qual das duas situações é factível porque em ambas o *splitting* observado no meio anisotrópico aumenta, quando comparado com o isotrópico, e poderíamos pensar que o acoplamento total é positivo, quando na verdade, em algumas situações, o valor pode ser negativo.

Por exemplo, a magnitude do RDC homonuclear entre H_{1g} - H_{2g} é 59,50 Hz ($T = D + J$) ou -67,24 Hz ($T = -D + J$), enquanto H_{6g} - H_{6g} é 51,32 Hz ou -51,32 Hz. Williamson e colaboradores¹⁰⁹ resolveram esta ambiguidade medindo o acoplamento total sob diferentes graus de alinhamento. Aqui nós preferimos permutar os diferentes RDCs com o intuito de testar todos os valores em busca do conjunto de RDCs que atingisse o melhor fator de qualidade de Cornilescu (Q).

Tabela 4– Valores experimentais de RDCs obtidos em HSQC-F1 para sacarose no sistema TP6EO2M/D₂O.

Tipo de carbono	Identificação	Splitting HSQC-F1		RDC (Hz)
		Anisotrópico T (Hz)	Isotrópico J (Hz)	
CH	1g	159,19	169,39	-10,20
CH	2g	ND	143,39	ND
CH	3g	138,35	143,75	-5,39
CH	4g	149,68	143,84	5,84
CH	5g	ND	143,98	ND
CH ₂	6g	153,56	144,07	9,49
CH ₂	1f	175,62	144,69	30,93
CH	3f	201,08	152,85	48,22
CH	4f	184,25	151,13	33,12
CH	5f	0	152,26	-152,26
CH ₂	6f	143,85	143,44	0,41
CH-CH	H _{1g} -H _{2g}	63,37 ^a	3,87 ^c	59,50 ^a
		-63,37 ^{ab}	3,87 ^c	-67,24 ^a
CH ₂	H _{6g} -H _{6g}	76,98 ^a	0,00 ^c	51,32 ^a
		-76,98 ^{ab}	0,00 ^c	-51,32 ^a
CH ₂	H _{1f} -H _{1f}	60,98 ^a	0,00 ^c	40,65 ^a
		-60,98 ^{ab}	0,00 ^c	-40,65 ^a

a: Acoplamento dipolar adquirido em F2 no experimento de HSQC-F1; b: Simulação do acoplamento total com os sinais de dupletos trocados; c: Medido no espectro RMN-¹H (600 MHz); J: Acoplamento escalar; RDC: Acoplamento dipolar residual; T: Acoplamento total.

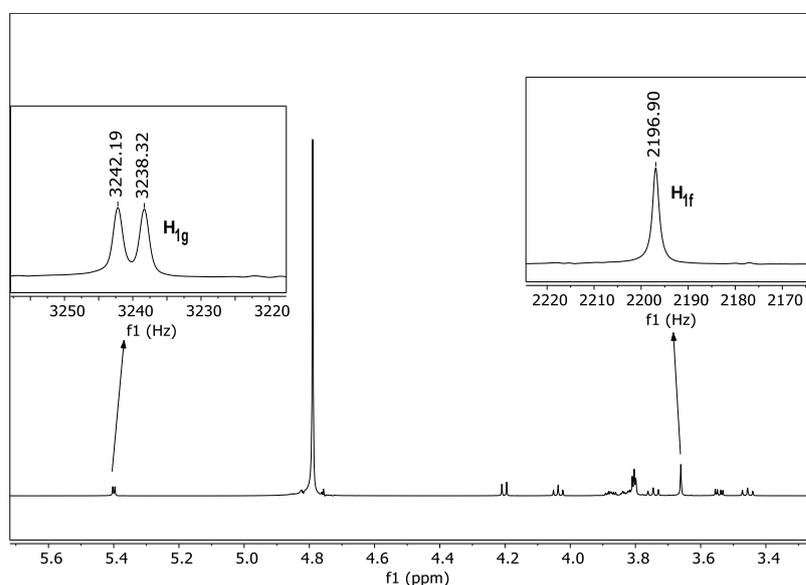
Para tanto, reunimos o conjunto de RDCs em 8 permutações (Tabela 5), sendo que a diferença entre estes conjuntos se dá apenas nos RDCs homonucleares. Vale salientar que o acoplamento escalar $^3J = 3,87$ Hz entre H_{1g}-H_{2g} no meio isotrópico não foi medido no espectro HSQC-F1 (Figura 56-a), mas obtido no espectro RMN-¹H convencional da sacarose dissolvida em D₂O (Figura 58), isto, porque a resolução espectral na dimensão direta do experimento HSQC acoplado em F1 não é suficiente para resolver a separação entre os dupletos no espectro bidimensional. No caso dos hidrogênios geminais (H_{1f}-H_{1f} e H_{6g}-H_{6g}) síncronos com acoplamento dipolar homonuclear forte (Figura 56-b), o acoplamento escalar não é observável

(Figura 58), enquanto o acoplamento total torna-se igual a $3/2D$ ($T = 3/2D$ ou $-T = 3/2D$) (Tabela 4).¹¹⁰

Tabela 5– Permutações dos RDCs adquiridos da sacarose no sistema TP6EO2M/D₂O.

Tipo de carbono	Identificação	Permutações de RDCs Experimentais (Hz)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
CH	1g	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2
CH	2g	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CH	3g	-5,39	-5,39	-5,39	-5,39	-5,39	-5,39	-5,39	-5,39
CH	4g	5,84	5,84	5,84	5,84	5,84	5,84	5,84	5,84
CH	5g	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CH ₂	6g	9,49	9,49	9,49	9,49	9,49	9,49	9,49	9,49
CH ₂	1f	30,93	30,93	30,93	30,93	30,93	30,93	30,93	30,93
CH	3f	48,22	48,22	48,22	48,22	48,22	48,22	48,22	48,22
CH	4f	33,12	33,12	33,12	33,12	33,12	33,12	33,12	33,12
CH	5f	-152,26	-152,26	-152,26	-152,26	-152,26	-152,26	-152,26	-152,26
CH ₂	6f	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41
CH-CH	H_{1g}-H_{2g}	59,5	59,5	59,5	59,5	-67,24	-67,24	-67,24	-67,24
CH₂	H_{6g}-H_{6g}	51,32	-51,32	51,32	-51,32	51,32	-51,32	51,32	-51,32
CH₂	H_{1f}-H_{1f}	40,65	40,65	-40,65	-40,65	40,65	40,65	-40,65	-40,65

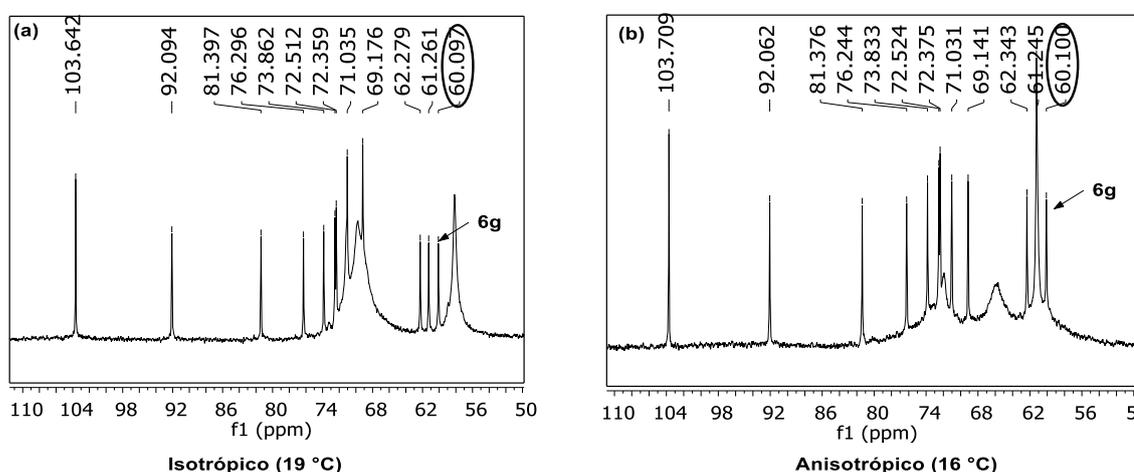
Figura 58– Espectro de RMN-¹H (600 MHz, D₂O) da sacarose.



3.5.2.2 Medição de RCSAs da Sacarose no Sistema TP6EO2M/D₂O

Os RCSAs são adquiridos como a diferença de deslocamento químico entre o sinal *i* e um sinal de referência interno da própria molécula que no caso da sacarose foi escolhido o carbono mais blindado 6g (Figura 59). As medidas são realizadas em meio isotrópico e anisotrópico e depois é simplesmente fazer a diferença para cada um dos sinais.

Figura 59– Espectros de ¹³C-¹H} (100 MHz) da sacarose dissolvida no sistema TP6EO2M/D₂O evidenciando o carbono de referência 6g (60,100 ppm). (a) Meio isotrópico obtido na temperatura de 19 °C; (b) Meio anisotrópico obtido na temperatura de 16 °C.



Ao todo foi possível determinar todos os RCSAs da sacarose totalizando 12 medidas, em uma faixa de 6,44 à -5,54 Hz (Tabela 6).

Tabela 6– RCSAs adquiridos da sacarose no sistema TP6EO2M/D₂O.

Identificação	Isotrópico		Anisotrópico		RCSA	
	δ_{ppm}	$\delta^i - \delta^{6g}$	δ_{ppm}	$\delta^i - \delta^{6g}$	(ppm)	(Hz)
2f	103,642	43,545	103,709	43,609	0,064	6,44
1g	92,094	31,997	92,062	31,962	-0,035	-3,52
5f	81,397	21,300	81,376	21,276	-0,024	-2,42
3f	76,296	16,199	76,244	16,144	-0,055	-5,54
4f	73,862	13,765	73,833	13,733	-0,032	-3,22
3g	72,512	12,415	72,524	12,424	0,009	0,91
5g	72,359	12,262	72,375	12,275	0,013	1,31
2g	71,035	10,938	71,031	10,931	-0,007	-0,70
4g	69,176	9,079	69,141	9,041	-0,038	-3,82
6f	62,279	2,182	62,343	2,243	0,061	6,14
1f	61,261	1,164	61,245	1,145	-0,019	-1,91
6g*	60,097	0,000	60,100	0,000	0,000	0,000

*: Referência interna; RCSA: Anisotropia de deslocamento químico; δ : Deslocamento químico.

3.5.3 Modelagem Molecular da Sacarose

A molécula de sacarose foi objeto de uma busca conformacional tipo Monte Carlo usando o campo de força MMFF94 conforme implementado no *MacroModel*, com uma janela de 10 kcal/mol no qual resultou em um conjunto com 355 estruturas. Em seguida, o ensemble foi refinado ao nível de teoria de M062X¹¹¹/6-31+G** implementado no Gaussian09 e carregado em IEFPCM¹¹² com os parâmetros de solvatação em água. O tensor de blindagem química foi computado ao nível GIAO/PBE0¹¹³/6-311+G** na geometria M062X usando o programa Gaussian09. Além do mais, os tensores de blindagem química¹¹⁴ foram calculados também ao nível PBE0 com a base especializada pcS-1.¹¹⁵

3.5.4 Análise Conformacional da Sacarose Mediante RDCs/RCSAs Adquiridos no Sistema TP6EO2M/D₂O

Os dados de RDCs e RCSAs foram ajustados ao *ensemble* conformacional obtido para sacarose usando a metodologia CASE-3D como implementada no programa StereoFitter. Na metodologia CASE-3D as componentes do tensor de alinhamento são otimizadas simultaneamente com as amplitudes de diferentes modelos conformacionais. Para evitar o problema do *overfitting*, constroem-se modelos conformacionais com um número crescente de conformações até atingir um mínimo na função de Akaike $AIC = \chi^2 + 2(m-1)$, onde m é o número de conformações no *ensemble*. Por motivos de custo computacional só foram testados *ensembles* conformacionais com um máximo de duas conformações. Este ajuste dos parâmetros anisotrópicos foram realizados individualmente para todas as permutações dos RDCs e todos os *input* estão disponíveis nos Anexos (D 1).

O ajuste a várias conformações precisa do uso da chamada aproximação de tensor único cujo tensor comum de alinhamento é compartilhado por várias conformações. Essa aproximação demanda a sobreposição prévia das coordenadas moleculares com o intuito de definir um único sistema de referência. A princípio a sobreposição buscou o melhor ajuste considerando toda a molécula, subtraindo os elementos de massa pequena como os hidrogênios (esta simulação ficou denominada como S1). Entretanto, como a sacarose tem elevado grau de flexibilidade também testou-se a sobreposição restrita numa parte da molécula, para tanto, foi escolhido as coordenadas dos elementos do ciclo glucopiranosil (S2). Além do mais, a busca conformacional foi baseada na máxima conformação para um confórmero (esta simulação ficou denominada como M1), testou-se também para dois confórmeros (M2). Além disso, acrescentou-se aos valores dos RDCs um erro de 1,2 Hz para todos os dados obtidos experimentalmente.

Os parâmetros de sobreposição (S1 e S2) e número de confórmeros ajustáveis (M1 e M2) lançados nos arquivos de entrada foram combinados de quatro formas diferentes (M1-S1; M1-S2; M2-S1 e M2-S2) a fim de adquirir o espaço conformacional mais adequado para sacarose com base no ajuste do tensor único. Os resultados são expressos em termos de fator de qualidade (Q), sabendo-se que, um valor mais próximo a zero de Q indica um melhor ajuste.

Os resultados do tensor de alinhamento, considerando o ajuste em um único confórmero (M1), tanto para sobreposição localizada no ciclo glucopiranosil (S2), como para toda molécula (S1), apontaram para os mesmos resultados, sendo mostrados na *Tabela 7*. Ou seja, independente do tipo de sobreposição (S1 ou S2), quando o ajuste é realizado considerando a

melhor conformação para um único confórmero, os resultados não variam. Entretanto, conforme podemos observar, Q foi elevado variando entre 0,312 à 0,556, respectivamente, para as permutações P_5 e P_4 . Entretanto, podemos notar que o resultado adquirido para permutação P_5 , que apresentou melhor Q , indicou o espaço conformacional para sacarose com ângulos torsonais Φ e Ψ , respectivamente, $110,99^\circ$ e $298,97^\circ$. Estes ângulos são semelhantes aos adquiridos por Freedberg e colaboradores¹¹⁶ e também aos ângulos obtidos na estrutura de raio-X da sacarose ($\Phi = 107,82^\circ$ e $\Psi = 315,26^\circ$).

Tabela 7– Fator de qualidade (Q) e ângulos torsonais (Φ ; Ψ) dos confórmeros obtidos dos RDCs da sacarose no sistema TP6EO2M/D₂O na implementação M1-S1/M1-S2.

	Permutações							
	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈
Q^*	0,372	0,435	0,427	0,556	0,312	0,376	0,341	0,423
Confórmeros	115	218	162	76	183	61	183	46
Φ (°)	94,71	109,05	99,18	95,89	110,99	106,98	110,99	105,04
Ψ (°)	306,59	314,65	50,32	311,04	298,97	313,54	298,97	322,98

*Resultados para ajuste a um confórmero considerando a sobreposição dos átomos pesados da molécula ou a sobreposição no ciclo glucopiranosil.

Na implementação considerando duas conformações simultâneas (M2) combinadas com S1 ($Q = 0,104$; P5) (Tabela 8) ou S2 ($Q = 0,085$; P5) (Tabela 9), o fator de qualidade foi significativamente melhor do que M1-S1/M1-S2 ($Q = 0,312$) (Tabela 7). Em ambas combinações M2-S1/M2-S2, os confórmeros foram os mesmos #35 ($\Phi = 92,53^\circ$; $\Psi = 339,51^\circ$) e #224 ($\Phi = 89,2^\circ$; $\Psi = 317,69^\circ$) tendo uma pequena diferença em relação às populações, como podem ser observados pelas Tabela 8 e Tabela 9. Isto nos indica que a conformação da sacarose em solução pode não ser estática, apresentando múltiplas conformações com interconversão, representadas nos nossos resultados através das conformações #35 e #224.

Tabela 8– Fator de qualidade (Q) e ângulos torsonais (Φ ; Ψ) dos confórmeros obtidos dos RDCs da sacarose no sistema TP6EO2M/D₂O na implementação M2-S1.

	Permutações							
	P ₁		P ₂		P ₃		P ₄	
Q	0,105		0,129		0,157		0,183	
Confórmeros	120	221	58	166	120	221	143	261
(Popul. %)	(46%)	(54%)	(60%)	(40%)	(46%)	(54%)	(45%)	(55%)
Φ	79,1°	102,4°	105,3°	97,54°	79,1°	102,4°	78,36°	100,3°
Ψ	180,8°	310,45°	315,26°	208,4°	180,8°	310,45°	177,05°	319,61°

	Permutações							
	P ₅		P ₆		P ₇		P ₈	
Q	0,104		0,111		0,216		0,175	
Confórmeros	35	224	155	299	178	224	155	298
(Popul. %)	(28%)	(72%)	(47%)	(53%)	(27%)	(73%)	(41%)	(59%)
Φ	92,53°	89,2°	99,48°	98,26°	82,36°	89,2°	99,48°	100,34°
Ψ	339,51°	317,69°	209,17°	336,94°	274,43°	317,69°	209,17°	333,51°

Tabela 9– Fator de qualidade (Q) e ângulos torsonais (Φ ; Ψ) dos confórmeros obtidos dos RDCs da sacarose no sistema TP6EO2M/D₂O na implementação M2-S2

	Permutações							
	P ₁		P ₂		P ₃		P ₄	
Q	0,178		0,181		0,206		0,190	
Confórmeros	47	164	65	285	275	317	21	83
(Popul. %)	(34%)	(66%)	(60%)	(40%)	(54%)	(44%)	(53%)	(47%)
Φ	81,14°	99,14°	108,77°	64,87°	65,06°	106,37°	79,58°	64,75°
Ψ	180,66°	51,84°	313,76°	286,75°	286,52°	314,35°	178,46°	280,86°

Tabela 9– Continuação.

	Permutações							
	P ₅		P ₆		P ₇		P ₈	
Q	0,085		0,130		0,160		0,192	
Confórmeros	35	224	24	155	127	335	195	331
(Popul. %)	(26%)	(74%)	(67%)	(33%)	(41%)	(59%)	(46%)	(54%)
Φ	92,53°	89,2°	104,02°	99,48°	101,51°	115,57°	93,63°	113,34°
Ψ	339,51°	317,69°	312,76°	209,17°	73,8°	305,22°	198,30°	323,60°

Vale ressaltar, baseado no melhor fator de qualidade, que independente do ajuste a um ou dois confórmeros, o conjunto de RDCs representado pela permutação P₅ indica o melhor espaço conformacional da sacarose (*Figura 60 e Figura 61*). Portanto, acreditamos que a dinâmica molecular da sacarose assemelha-se aos confórmeros apontados pelo conjunto de RDCs da permutação P₅.

Figura 60– Comparação entre fator *Q* adquiridos ao implementar a combinação de parâmetros M1-S2 e M2-S2 para os dados de RDCs da sacarose das permutações P₁ à P₈.

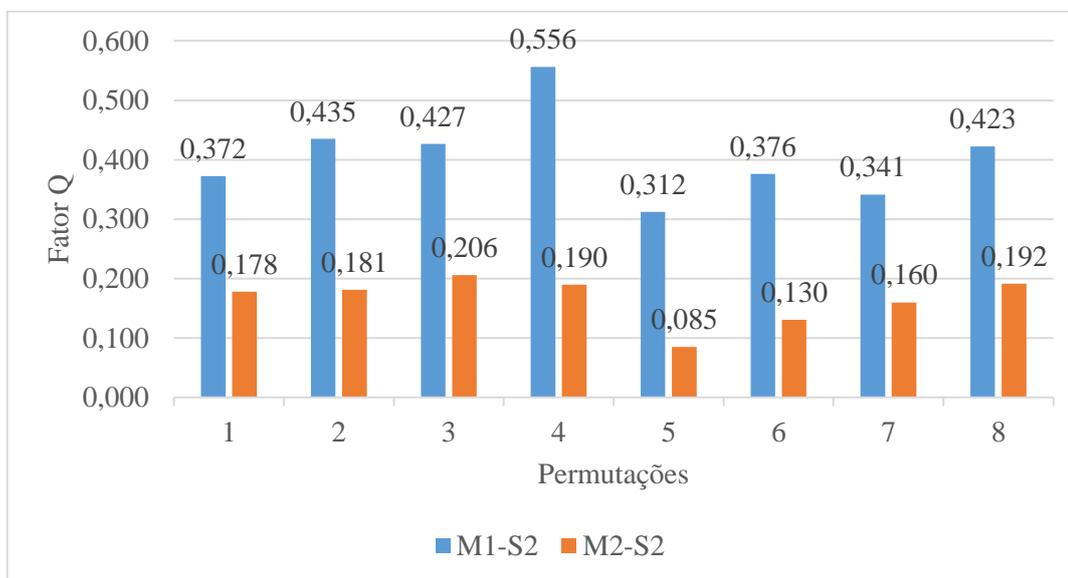
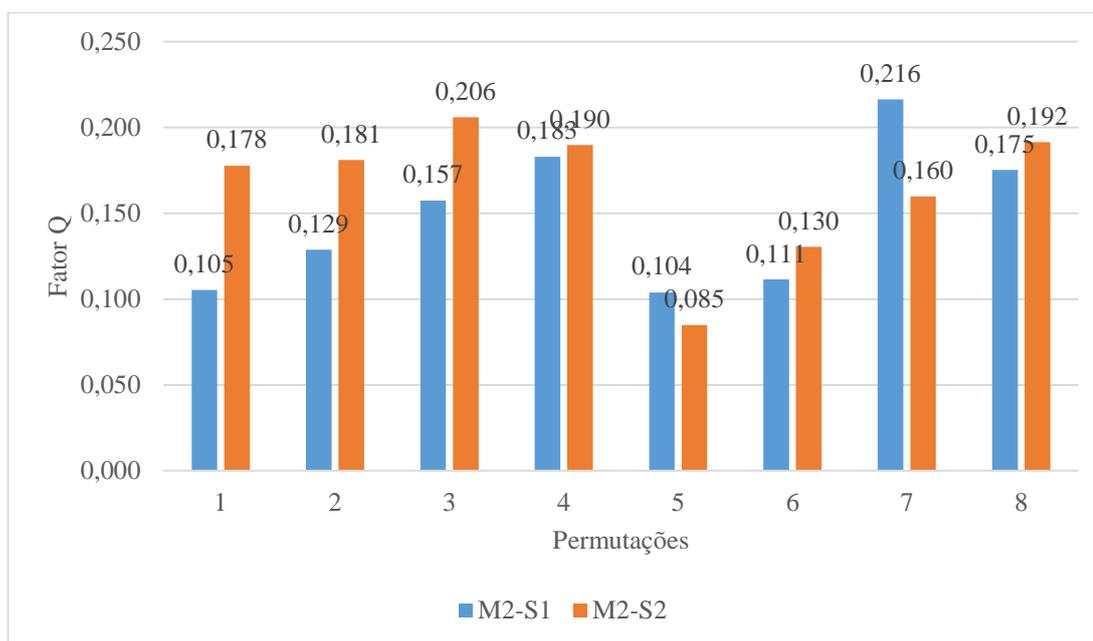
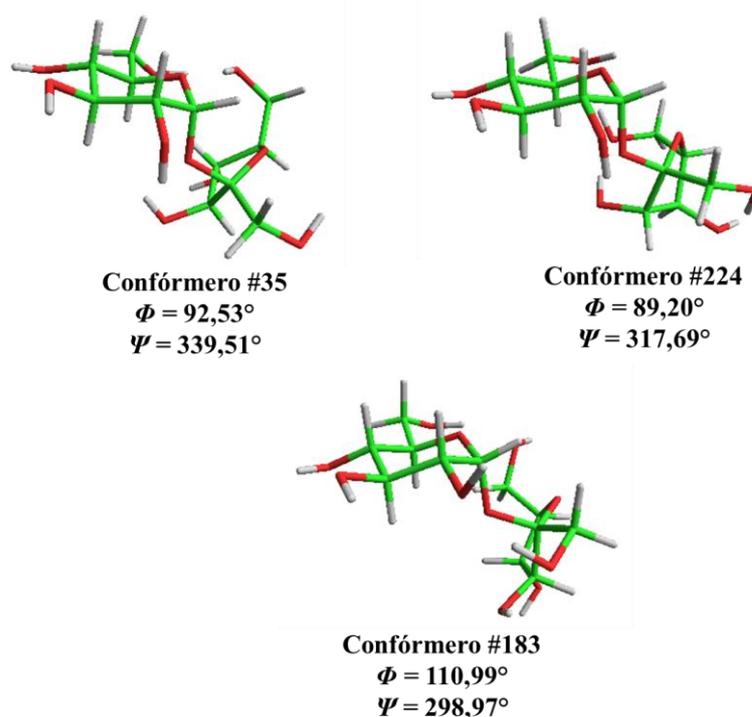


Figura 61– Comparação entre fator Q adquiridos ao implementar a combinação de parâmetros M2-S1 e M2-S2 para os dados de RDCs da sacarose das permutações P_1 à P_8 .



A seguir, na *Figura 62*, são mostrados os confórmeros #35, #183 e #224 que foram indicados pelo conjunto de RDCs da permutação P_5 . Podemos observar que os três confórmeros são pertencentes à mesma família de conformações possíveis para sacarose, com algumas poucas mudanças no espaço conformacional do ciclo frutofuranosil. Isto nos indica que a conformação da sacarose em solução tem características dinâmicas, ou seja, não há uma única conformação possível para a sacarose. Além do mais, podemos afirmar com base nos resultados que, em geral, os confórmeros indicados pelo conjunto de dados de RDCs da P_5 , há pouca diferença em relação aos ângulos torsonais. Em geral, estes ângulos se mantem Φ na faixa de 90 a 110° e Ψ com ângulos no intervalo entre 300 a 340° .

Figura 62– Confórmeros da sacarose ajustados mediante uso dos RDCs implementados no método do tensor único no programa StereoFitter.



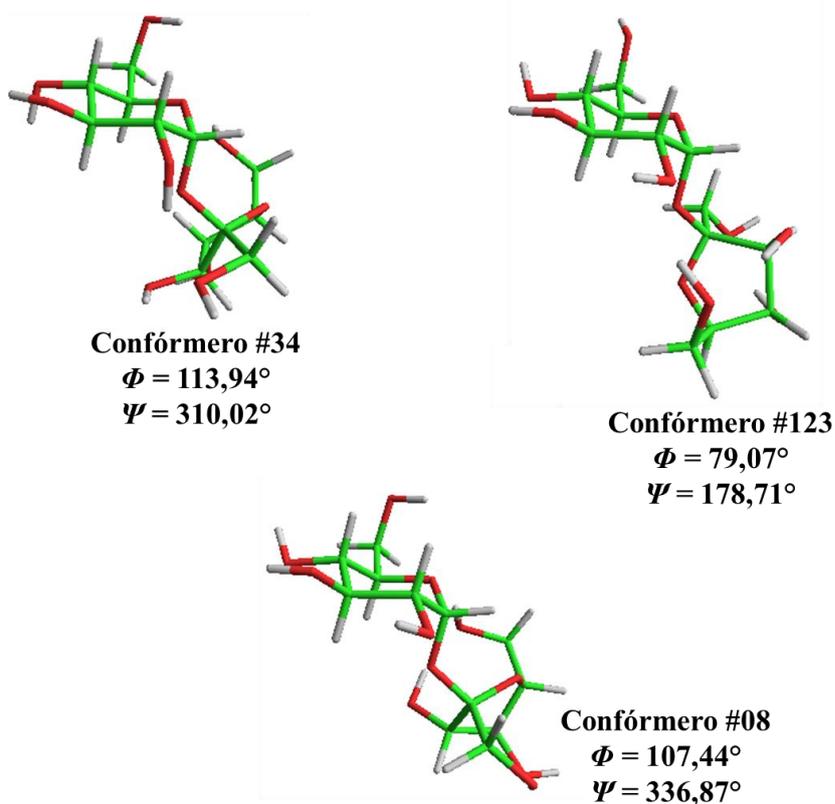
Além dos estudos da conformação da sacarose com os dados anisotrópicos de RDCs, também foi realizado o mesmo ajuste do tensor único para os dados de RCSAs. Os resultados são concordantes com os adquiridos para os RDCs, pois o melhor fator de qualidade ($Q = 0,067$) também foi obtido quando o ajuste foi realizado levando-se em consideração a máxima conformação limite para dois confórmeros, enquanto o ajuste considerando a máxima conformação para um único confórmero teve-se um fator de qualidade mais elevado ($Q = 0,315$) (Tabela 10).

Os confórmeros indicados pelos RCSAs para o melhor dos casos indicou as conformações limites #34 ($\Phi = 113,94^\circ$; $\Psi = 310,20^\circ$) e #123 ($\Phi = 79,07^\circ$; $\Psi = 178,01^\circ$) com as populações, respectivamente, iguais a 51 e 49 %. O confórmero #34 é aquele que mais se aproxima aos resultados dos ângulos torsonais da estrutura de raio-X. Entretanto, o confórmero #123 apresenta os ângulos torsonais muito diferente daqueles tomados como referência da literatura. A imagem do confórmero #123 mostra que o espaço conformacional do ciclo frutofuranosil é completamente diferente das demais conformações observadas para os outros confórmeros, consequência da grande diferença dos ângulos de torção em relação aos demais confórmeros (Figura 63).

Tabela 10– Fator de qualidade (Q) e ângulos torsonais (Φ ; Ψ) dos conformémeros obtidos dos RCSAs da sacarose no sistema TP6EO2M/D₂O.

	RCSA	
	M1-S2	M2-S2
Q	0,315	0,067
Conformémeros		34 123
(Popul. %)	8	(51 %) (49 %)
Φ (°)	107,44	113,94 79,07
Ψ (°)	336,87	310,02 178,01

Figura 63– Conformémeros da sacarose ajustados mediante uso dos RCSAs implementados no método do tensor único no programa StereoFitter.

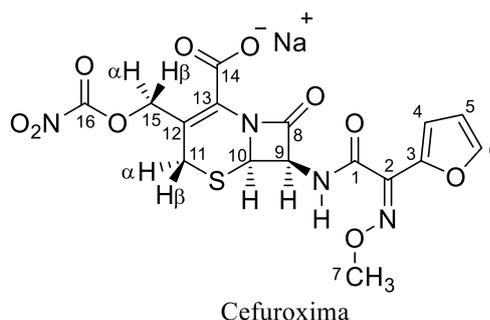


3.6 Estudo Conformacional da Cefuroxima na Fase Cromônica TP6EO2M/D₂O

3.6.1 Atribuição de ¹H e ¹³C da Molécula de Cefuroxima Mediante Técnicas Convencionais de RMN

Os sinais de ¹H e ¹³C da molécula de cefuroxima (*Figura 64*) foram atribuídos mediante coleção de espectros tipo ¹H, ¹³C, HSQC, HMBC e COSY. Sendo que os espectros unidimensionais estão reportados nas *Figura 65* e *Figura 66*, ao passo que os demais espectros encontram-se nos Anexos (B 4 à B 6). Todas as informações obtidas nos espectros 1D estão reunidas na Tabela *II*. A seguir, vamos atribuir os sinais de hidrogênio e carbono na molécula de cefuroxima.

Figura 64— Estrutura da cefuroxima com a numeração identificando as posições dos carbonos.



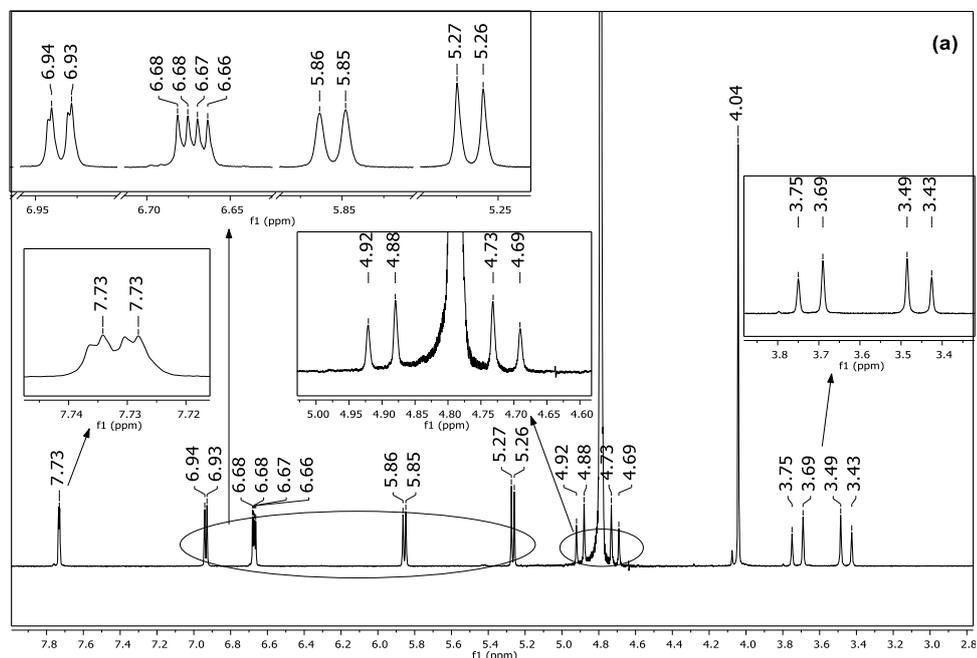
Os hidrogênios diastereotópicos ligados aos carbonos 11 e 15 são identificados no espectro de RMN-¹H, como sendo, respectivamente, os dupletos em 3,72 ppm (H11) e 3,45 ppm (H11'); 4,71 ppm (H15) e 4,90 ppm (H15'). Observa-se que a proximidade com o oxigênio dos hidrogênios ligados em C15 torna-os mais desblindados do que os hidrogênios ligados em C11. Observa-se, também, que os hidrogênios geminais ligados ao carbono C11 acoplam entre si com uma constante de acoplamento $^2J_{H-H} = 17,9$ Hz, enquanto na posição C15 o acoplamento geminal é $^2J_{H-H} = 12,20$ Hz. Estes acoplamentos geminais são típicos, respectivamente, para hidrogênios em anéis de seis membros e em cadeias alifáticas.

Os sinais dos hidrogênios presentes no anel furano da estrutura da cefuroxima são identificados como sendo o duplete em 6,93 ppm atribuído ao H4, que acopla em orto com o H5 ($^3J_{H4-H5} = 3,59$ Hz); o duplete-duplete em 6,67 ppm atribuído a H5 que acopla em orto tanto com H4 ($^3J_{H5-H4} = 3,58$ Hz), como também com H6 ($^3J_{H5-H6} = 1,84$ Hz) e, finalmente, o duplete largo em 7,73 ppm, típico do hidrogênio situado mais próximo ao oxigênio do anel furano,

portanto, atribuído ao H6 acoplado com H5 ($^3J_{H6-H5} = 1,81$ Hz). Todas estas atribuições dos sinais de hidrogênio, bem como, os acoplamentos escalares homonucleares de hidrogênios a três ligações ($^3J_{H-H}$) são típicos para o anel furano.

Quanto aos H9 e H10 foram atribuídos, respetivamente, como sendo os dupletos em 5,85 e 5,26 ppm que estão acoplados entre si com $^3J_{H9-H10} = 3,70$ Hz. A atribuição para o H9, deslocado a uma região de campo mais baixo do que o H10, foi decorrente da sua ligação direta com o carbono da carbonila C8. Finalmente, o simpleto em 4,04 ppm foi atribuído aos hidrogênios da metila da metoxila situados no C7.

Figura 65– Espectros de RMN- 1H (300 MHz, D $_2$ O) da molécula de cefuroxima.



Todos os carbonos ligados diretamente a hidrogênio foram atribuídos através do HSQC, quanto aos demais carbonos suas atribuições foram possíveis por meio do HMBC. Os picos em 116,8 e 131,0 ppm no RMN- ^{13}C estão correlacionados no HMBC com os hidrogênios diastereotópicos H11 e H15, portanto é fácil perceber em que região da molécula de cefuroxima estes picos podem ser atribuídos. Sabe-se que deslocamento, aproximadamente, em 130 ppm são típicos para carbonos α,β -insaturados à carbonila de ácidos carboxílicos. Sabe-se, também, que, em geral, este C_β encontra-se mais blindado do que C_α devido efeito ressonante entre a dupla ligação com a insaturação da carbonila. No caso da cefuroxima, a dupla ligação dos carbonos também entra em ressonância com a carbonila do grupo amida situado em C8, incrementando o deslocamento de C_β para campo mais alto do espectro, portanto podemos atribuir o pico 116,8 ppm para o C12 e 131,0 ppm para C13.

Os picos 143,8 ppm e 144,7 ppm são atribuídos, respectivamente, a C3 e C2, pois observa-se no HMBC correlação a três ligações entre C3-H5, ambos pertencentes ao anel furano, e C2-H4.

Os demais picos 159,1; 163,6; 163,8 e 168,5 ppm são todos pertencentes a carbonos de carbonilas de diferentes grupos funcionais. O pico em 159,1 ppm foi atribuído ao carbono da carbonila C16 que tem no HMBC correlação com o H15. Já o pico 163,6 ppm foi atribuído a C8, tendo em vista correlações observadas a duas ligações com H9, como também, a três ligações com H10.

Os dois picos (163,8 e 168,5 ppm) em campo mais baixo não mostraram no HMBC correlação com nenhum hidrogênio. No entanto, os únicos carbonos que faltam ser atribuídos são carbonos de carbonila de amida (C1) e de ácido carboxílico (C14). Observa-se pela estrutura molecular da cefuroxima que ambos estão ligados em C α a carbonos do tipo sp², sendo assim, a diferença de deslocamento químico entre C1 e C14 consiste na ligação da carbonila com o oxigênio da hidroxila em C14 e nitrogênio para o grupo amida em C1. Como o oxigênio é mais eletronegativo que o nitrogênio, atribui-se o pico em 163,8 ppm para o C1 e 168,5 ppm para o C14.

Figura 66– Espectros de RMN-¹³C (300 MHz, D₂O) da molécula de cefuroxima.

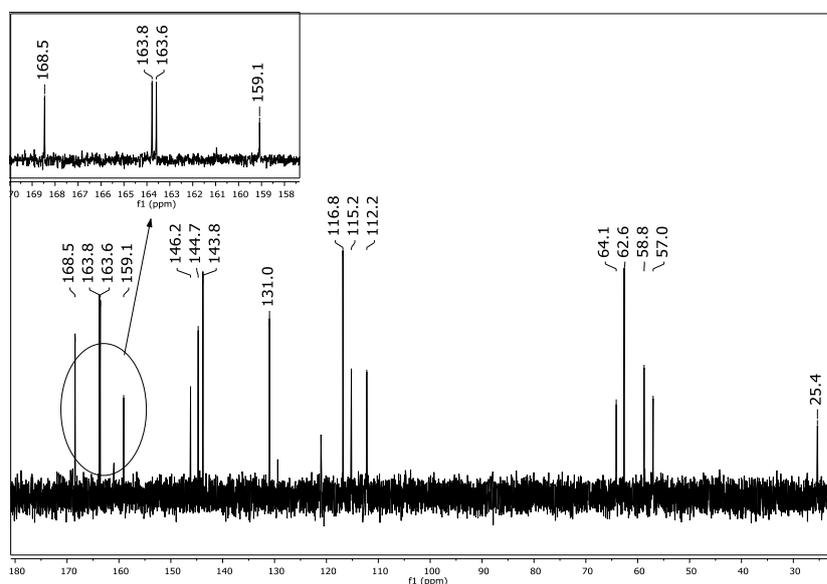


Tabela 11– Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C , δ (ppm), acoplamento escalar $^nJ_{\text{H-H}}$ (Hz) da cefuroxima.

Átomo C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{H-H}}$ (Mult.) / Hz^{-1}	$^3J_{\text{H-H}}$ (Mult.) / Hz^{-1}
1	163,8	-	-	-
2	144,7	-	-	-
3	143,8	-	-	-
4	115,2	6,93	-	3,59 (d)
5	112,2	6,67	-	3,58 e 1,84 (dd)
6	146,2	7,73	-	1,81 (d)
7	62,6	4,04	-	-
8	163,6	-	-	-
9	58,8	5,85	-	4,67 (d)
10	57	5,26	-	4,71 (d)
11		3,45	17,90 (d)	-
11'	25,4	3,72	17,96 (d)	-
12	116,8	-	-	-
13	131	-	-	-
14	168,5	-	-	-
15		4,71	12,20 (d)	-
15'	64,1	4,90	12,23 (d)	-
16	159,1	-	-	-

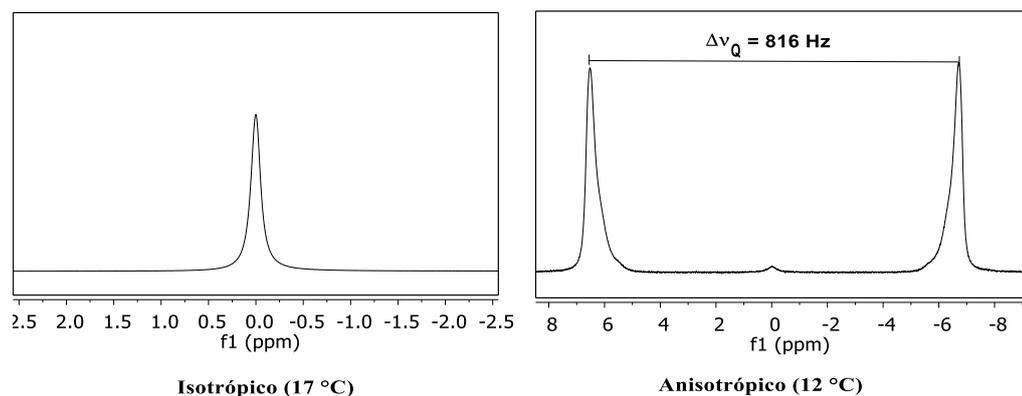
d: duplete; J : Constante de acoplamento escalar; Mult.: Multiplicidade; δ : Deslocamento químico.

3.6.2 Medidas Anisotrópicas no Sistema TP6EO2M/D₂O/Cefuroxima

O sistema TP6EO2M/D₂O/cefuroxima foi preparado para aquisição de parâmetros anisotrópicos (RDCs e RCSAs) da cefuroxima, conforme reportado no item 2.5.1. Os espectros HSQC-F1 (*Figura 68*), para medidas de RDCs, e $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ (*Figura 70 e Figura 71*), para

medidas de RCSAs, foram registrados nas duas temperaturas alvo de: 12 °C (anisotrópica) e 17 °C (isotrópica) as quais foram apontadas pelo monitoramento da separação quadrupolar de deutério (*Figura 67*). Os RCSAs foram medidos usando a *Equação 44* tomando como referência o sinal C11 do carbono da cefuroxima.

Figura 67– Monitoramento da transição de fases isotrópica/anisotrópica no sistema TP6EO2M/D₂O/cefuroxima através do *splitting* quadrupolar de D₂O em diferentes temperaturas.



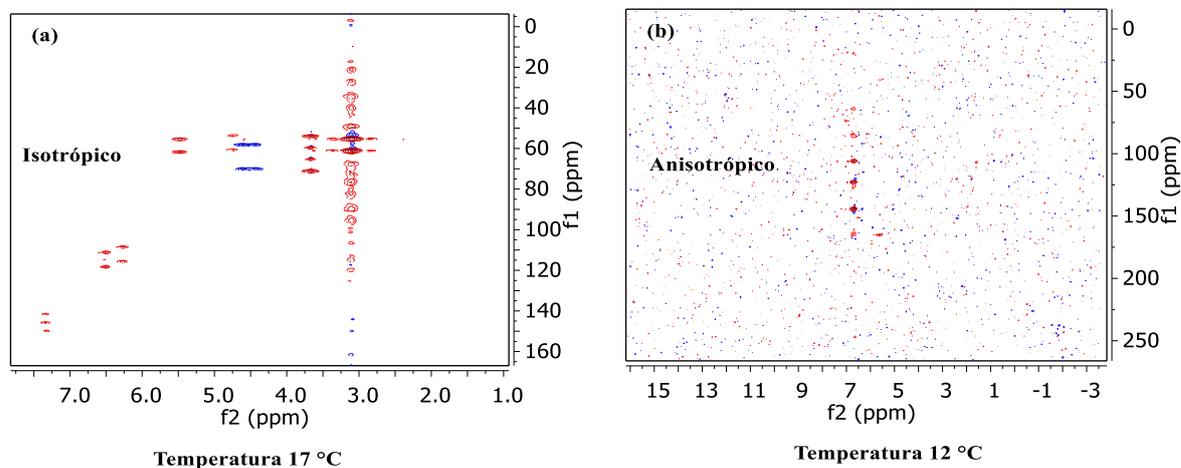
3.6.2.1 Medição dos RDCs da Cefuroxima no Sistema TP6EO2M/D₂O

Como foi comentado anteriormente, os RDCs são alcançados fazendo a diferença entre o acoplamento total e o acoplamento escalar, ambos registrados nos espectros de HSQC acoplados em F1, respectivamente, adquiridos nos meios anisotrópico e isotrópico (*Equação 38*). Quando um dos espectros não é adquirido, por dificuldade inerente à análise, a medida de RDC, conseqüentemente, fica comprometida.

Em geral, a medida do acoplamento total é mais difícil de ser obtida, dentre algumas razões podemos citar: a interação acentuada do analito com a fase alinhada pode reduzir drasticamente o T_2 do analito, ou até mesmo provocar a destruição da fase orientada.

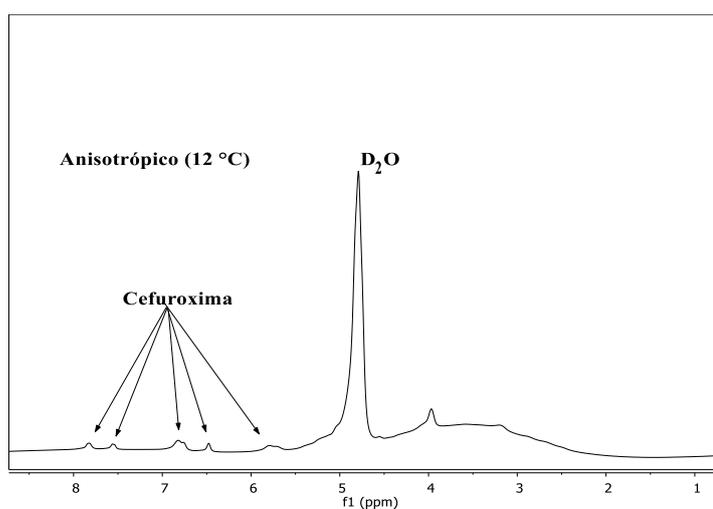
No caso da cefuroxima dissolvida no sistema TP6EO2M/D₂O tivemos dificuldades de obter os espectros de HSQC acoplados em F1, sobretudo, no meio anisotrópico, onde extraímos os acoplamentos totais, como podemos observar pela *Figura 68*. O espectro de HSQC-F1 no meio isotrópico registrou o *splitting* entre os sinais de contorno dos hidrogênios acoplados com carbonos com ligação direta, ainda que não tenha conseguido registrar todos os picos. Porém, o espectro na fase alinhada não foi observado sinal.

Figura 68– Espectros de HSQC-F1 (campo de 9,4 T) da cefuroxima dissolvida no sistema TP6EO2M/D₂O. (a) Espectro registrado na temperatura do sistema em 17 °C (isotrópico); (b) Espectro registrado na temperatura do sistema em 12 °C (anisotrópico).



O espectro de RMN-¹H da cefuroxima também foi adquirido e podemos observar nele a existência de alguns sinais provenientes desta molécula (*Figura 69*). Portanto, isto pode nos indicar que provavelmente a ausência dos sinais no espectro de HSQC-F1 no meio anisotrópico possa ser uma consequência de um T_2 da cefuroxima na fase TP6EO2M/D₂O muito curto provavelmente por causa de uma forte agregação desta molécula com o mesógeno.

Figura 69– Espectros de RMN-¹H (400 MHz) da cefuroxima dissolvida no sistema TP6EO2M/D₂O registrado em 12 °C (meio anisotrópico).



3.6.2.2 Medição dos RCSAs da Cefuroxima no Sistema TP6EO2M/D₂O

Uma forma de obtermos os RCSAs é, primeiramente, escolhermos um carbono de referência interna contido na própria molécula para, em seguida, fazermos a diferença entre os deslocamentos químicos dos demais sinais (δ^i) em relação a esta referência. Em geral, escolhe-se o deslocamento químico do carbono mais blindado que no caso da cefuroxima é o δ^{C11} . Estas medidas são realizadas nos dois diferentes meios isotrópico/anisotrópico do sistema TP6EO2M/D₂O/cefuroxima.

Quanto maior o número de RCSAs medidos o problema ficará melhor condicionado. Como podemos observar pelos espectros de RMN ¹³C-¹H} adquiridos nos meios isotrópico (*Figura 70*) e anisotrópico (*Figura 71*), todos os picos puderam ser identificados, possibilitando a medição dos dezesseis RCSAs na molécula de cefuroxima (*Tabela 12*). Os valores de RCSAs compreenderam um intervalo extenso (157,30 à -62,20 Hz), provavelmente, resultado do elevado grau de alinhamento da fase (*Figura 67*), mas não podemos descartar que haja variações isotrópicas, entre as duas fases limites isotrópica/anisotrópica, decorrente da largura da faixa de temperatura de transição (5 °C).

Ressalte-se que os picos mais intensos 58,108 ppm no espectro isotrópico e 61,245 ppm no espectro anisotrópico são referentes a sinais de carbono da metoxila do TP6EO2M, bem como, os sinais largos próximos de 70 ppm, que pertencem aos carbonos posicionados nas cadeias laterais pegiladas (CH₂CH₂O) do TP6EO2M.

Figura 70– Espectro de $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ (100 MHz) da cefuroxima dissolvida no sistema TP6EO2M/D₂O e mantida a 17 °C.

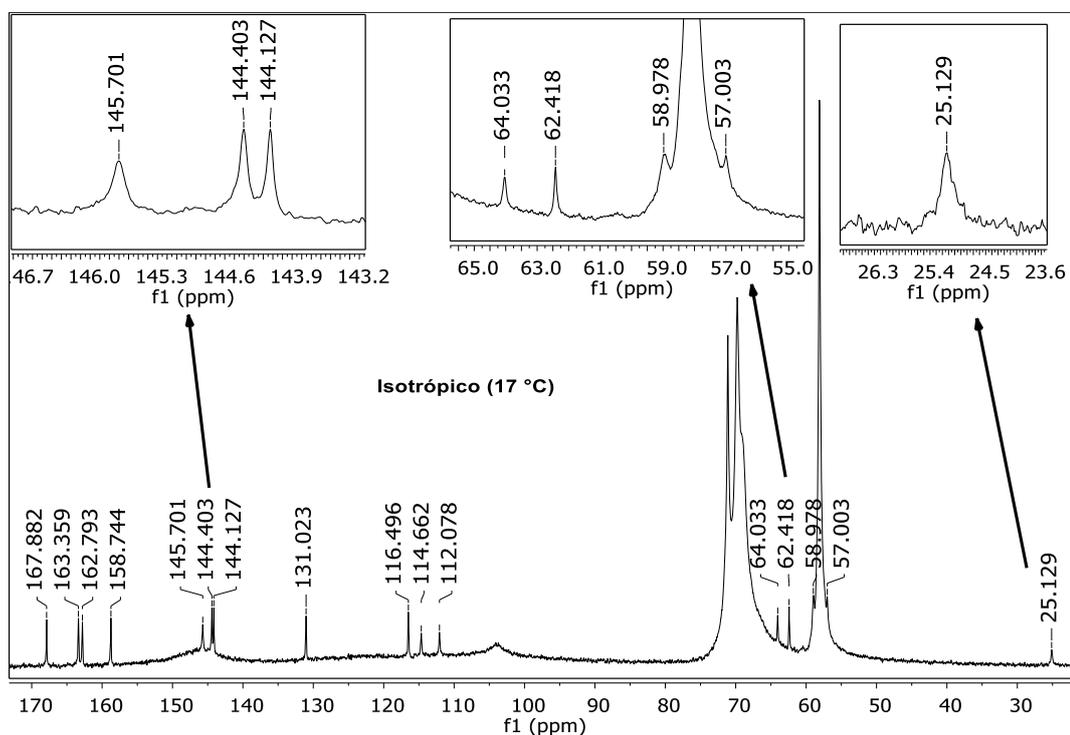


Figura 71– Espectro de $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ (100 MHz) da cefuroxima dissolvida no sistema TP6EO2M/D₂O e mantida a 12 °C.

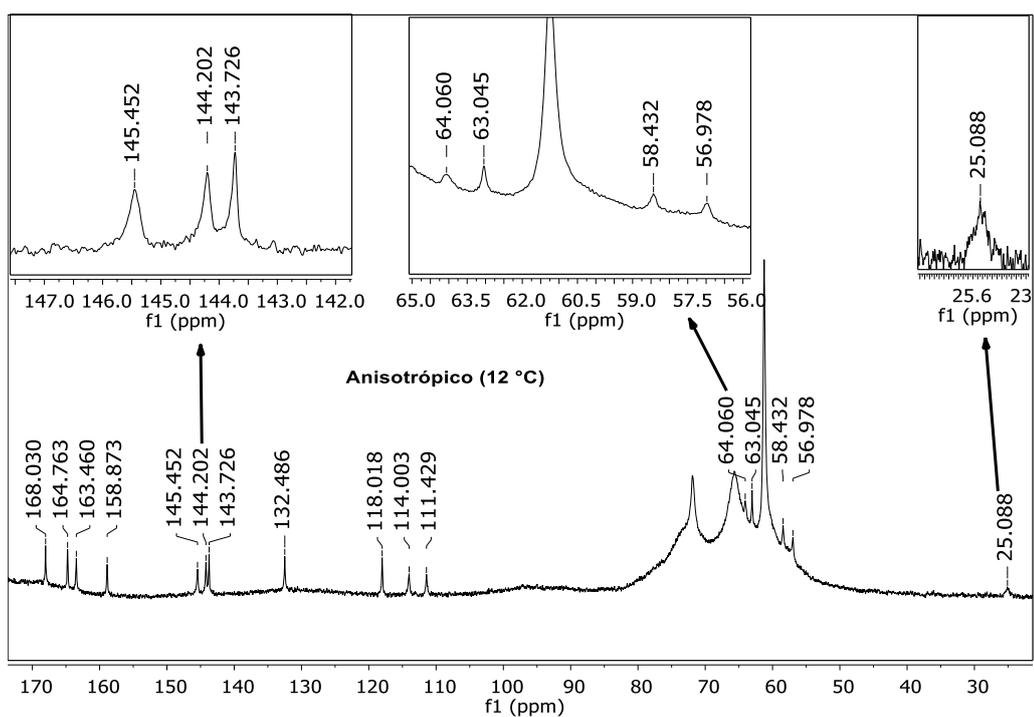


Tabela 12– RCSAs adquiridos da cefuroxima dissolvida no sistema TP6EO2M/D₂O.

Carbono	Isotrópico (ppm)		Anisotrópico (ppm)		RCSA	
	δ	$\delta^i - \delta^{C11}$	δ	$\delta^i - \delta^{C11}$	ppm	Hz
1	163,359	138,230	164,763	139,675	1,445	145,42
2	144,403	119,274	144,202	119,114	-0,160	-16,10
3	144,127	118,998	143,726	118,638	-0,360	-36,23
4	114,662	89,533	114,003	88,915	-0,618	-62,20
5	112,078	86,949	111,429	86,341	-0,608	-61,19
6	145,701	120,572	145,452	120,364	-0,208	-20,93
7	62,418	37,289	63,045	37,957	0,668	67,23
8	162,793	137,664	163,460	138,372	0,708	71,25
9	58,978	33,849	58,432	33,344	-0,505	-50,82
10	57,003	31,874	56,978	31,890	0,016	1,61
11*	25,129	0,000	25,088	0,000	0,000	0,00
12	116,496	91,367	118,018	92,930	1,563	157,30
13	131,023	105,894	132,486	107,398	1,504	151,36
14	167,882	142,753	168,030	142,942	0,189	19,02
15	64,033	38,904	64,060	38,972	0,068	6,84
16	158,744	133,615	158,873	133,785	0,170	17,11

*: Referência interna; RCSA: Anisotropia de deslocamento químico; δ : Deslocamento químico.

3.6.3 Modelagem Molecular da Cefuroxima

O espaço conformacional de cefuroxima foi modelado mediante um método Monte Carlo mecânica molecular (MMF94) conservando-se aquelas conformações por baixo de 21 kJ./mol. Os tensores de blindagem química foram obtidos mediante cálculos GIAO/B3LYP/6-31+G* diretamente sobre as geometrias de mecânica molecular.

3.6.4 Análise Conformacional da Cefuroxima Mediante RCSAs Adquiridos no Sistema TP6EO2M/D₂O

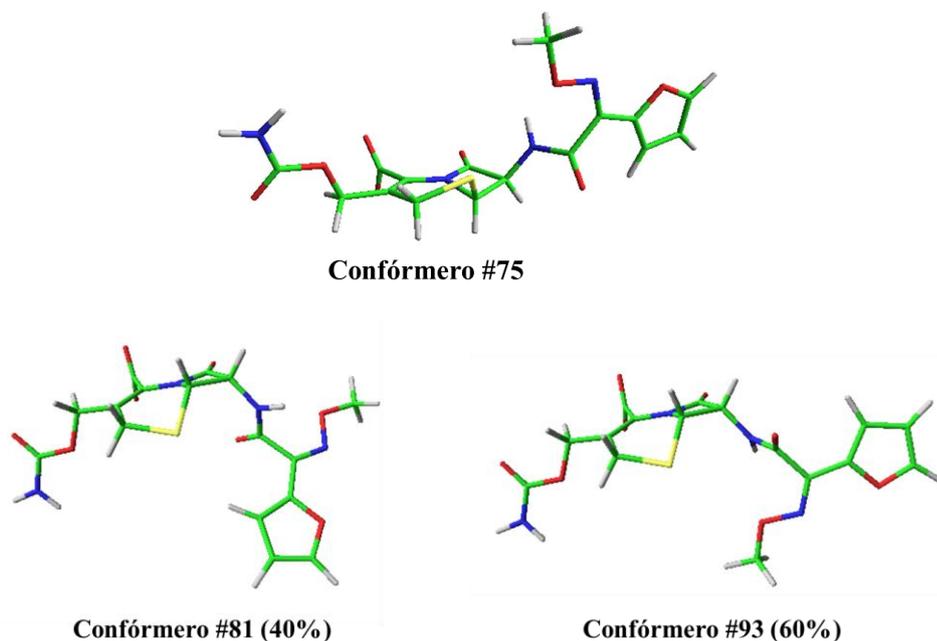
Os RCSAs foram ajustados a diferentes combinações de confórmeros de cefuroximas no programa StereoFitter para, em seguida, fazer um ajuste de decomposição do valor singular (SVD) dos RCSAs. Os dados do *input* podem ser conferidos no Anexo (D 2). O ajuste baseado em várias conformações necessita do uso de uma aproximação de tensor único de alinhamento, este tensor é comum entre todas as conformações do *ensemble*. Essa aproximação demanda a sobreposição prévia das coordenadas moleculares com o intuito de definir um único sistema de referência. Foram implementadas três diferentes formas de máxima sobreposição dos confórmeros: uma busca automática (S0), sobreposição considerando os elementos mais pesados da molécula (S1) e sobreposição considerando a região com menor flexibilidade da cefuroxima situada no anel quaternário (S2). Além do mais, a busca conformacional foi baseada na máxima conformação entre duas conformações limites (M2) ou considerando o ajuste individualmente (M1).

As diferentes formas de máxima sobreposição dos confórmeros, quando o ajuste foi considerado a modelos duas conformações (M2), tiveram o fator de qualidade sempre igual a 0,141, selecionando os confórmeros limites # 81 e #93 (*Figura 72*) com populações, respectivamente, iguais a 40 e 60 % (*Tabela 13*). Porém, quando o ajuste foi realizado considerando um único confórmero, o fator de qualidade foi sempre muito elevado, isto indica que a cefuroxima deve apresentar várias conformações derivadas da mobilidade das cadeias laterais.

Tabela 13– Fator de qualidade (Q) e porcentagem das populações dos confórmeros obtidos dos RCSAs da cefuroxima no sistema TP6EO2M/D₂O.

	RCSA	
	M1-S0/S1/S2	M2-S0/S1/S2
Q	0,286	0,141
Confórmeros	75	81 93
(População)	-	40 % 60 %

Figura 72– Confórmeros da cefuroxima ajustados mediante uso dos RCSAs implementados no método do tensor único no programa StereoFitter.

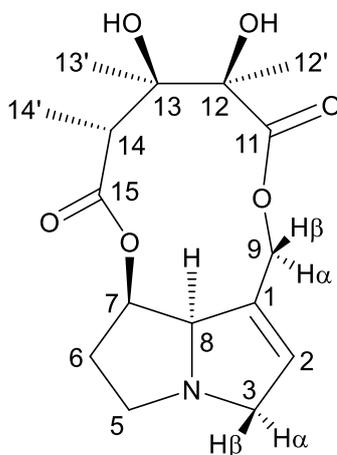


3.7 Estudo Conformacional da Monocrotalina na Fase Cromônica DSCG/NaCl/D₂O

3.7.1 Atribuição de ¹H e ¹³C da Molécula de Monocrotalina Mediante Técnicas Convencionais de RMN

Os átomos de ¹H e ¹³C da molécula de monocrotalina (*Figura 73*) foram atribuídos mediante a coleção de espectros do tipo ¹H, ¹³C, HSQC, HMBC e COSY. Sendo que os espectros 1D estão reportados nas *Figura 74* e *Figura 75*. Já os espectros bidimensionais podem ser encontrados nos Anexos (B 7). Todas as informações obtidas nos espectros monodimensionais estão reunidas na *Tabela 14*. A seguir iremos mencionar a atribuição de alguns destes sinais.

Figura 73– Estrutura da monocrotalina com a numeração identificando as posições dos carbonos.



Os espectros de RMN- ^1H e ^{13}C evidenciam, respectivamente, a presença de todos os sinais de hidrogênios e carbonos que formam a molécula de monocrotalina. No RMN- ^1H as integrais dos picos são todas equivalentes ao número de hidrogênio localizado em cada posição da molécula.

Os sinais na forma de simpleto situados em campo mais alto do espectro de ^1H pertencem às metilas ligadas ao macrociclo da monocrotalina nas posições H12' (1,46 ppm) e H13' (1,35 ppm). Enquanto o duplete igual a 1,18 ppm foi atribuído à metila H14', o quadrupeto em 3,05 ppm foi atribuído ao H14, ambos hidrogênios vicinais acoplando entre si com $^3J_{\text{H14-H14}'} = 7,1$ Hz. Ainda em relação ao macrociclo, podemos atribuir os hidrogênios diastereotópicos H9(a,b) como sendo os picos em 4,88 e 4,60 ppm, ambos acoplando entre si com $^2J = 11,8$ Hz. Já no espectro de RMN- ^{13}C podemos observar claramente na região de carbonila os sinais em 176,54 e 174,82 ppm correspondentes, respectivamente, a C15 e C11. Todas estas atribuições são confirmadas pelo HMBC que mostram correlações entre carbono e hidrogênio a duas ou três ligações.

Quanto aos hidrogênios posicionados no anel pirrolizidina foram atribuídos conforme segue: um sinal em 6,18 ppm, em região de hidrogênios com hibridização sp^2 , foi, portanto, conferido a H2. O sinal deste hidrogênio no espectro de RMN- ^1H encontra-se na forma de um quadrupeto largo com constante de acoplamento igual a 2 Hz, indicando acoplamento com os hidrogênios diastereotópicos vicinais (H3). Já os hidrogênios diastereotópicos na posição H3(a,b), com maior deslocamento químico que seus pares H5(a,b) e H6(a,b), foram atribuídos como sendo 3,80 e 3,49 ppm acoplando entre si com constante de acoplamento de 16,7 Hz, acoplamento característico de hidrogênios geminais.

Figura 74– Espectro de RMN- ^1H (600 MHz, D_2O) da molécula de monocrotalina.

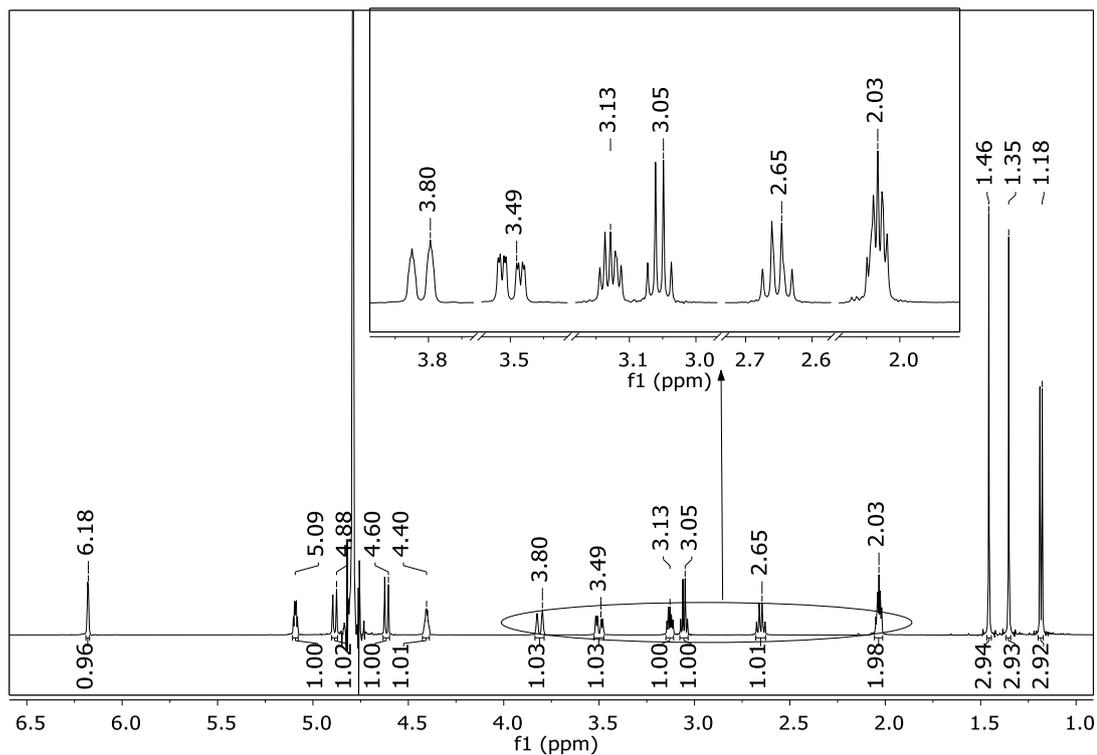


Figura 75– Espectro de RMN- ^{13}C (150 MHz, D_2O) da molécula de monocrotalina.

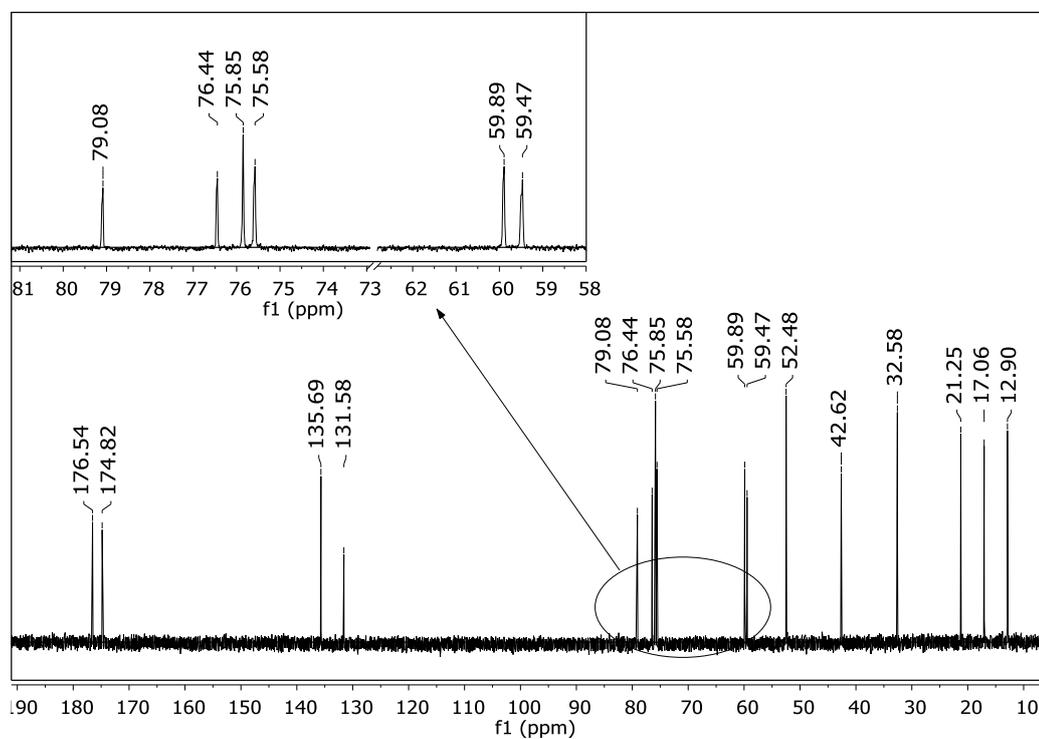


Tabela 14– Atribuições dos deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C (ppm) e medida de acoplamento escalar, J_{H-H} (Hz) para molécula de monocrotalina dissolvida em D_2O .

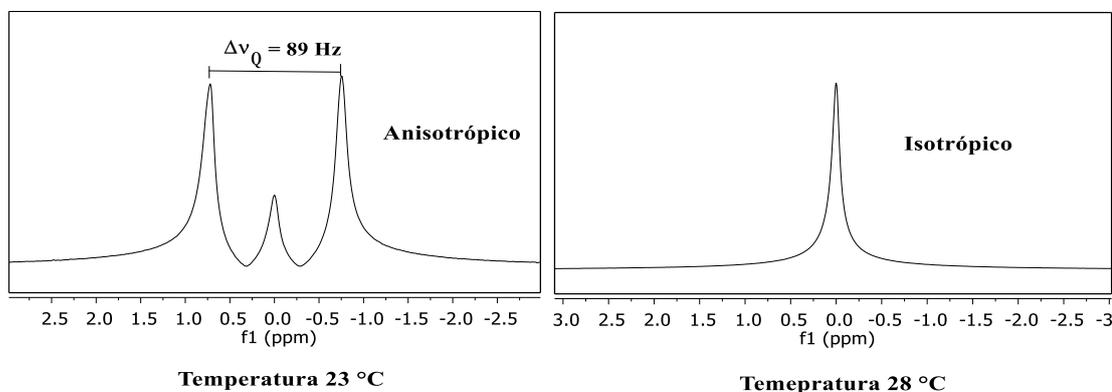
Átomo	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	J_{H-H} (Mult.) / Hz^{-1}
C1	131,58	-	-
C2-H2	135,69	6,18	2,0 (ql)
C3-H3a	59,47	3,81	16,7 (dm)
C3-H3b		3,5	16,7; 5,2; 2,0 (ddd)
C5-H5a	52,48	3,13	m
C5-H5b		2,65	8,9 (q)
C6-H6a	32,58	2,03	m
C6-H6b			
C7-H7	75,58	5,09	m
C8-H8	75,85	4,40	m
C9-H9a	59,89	4,89	11,8 (d)
C9-H9b		4,61	11,8 (d)
C11	174,82	-	-
C12	79,08	-	-
C12'-H12' (CH_3)	21,25	1,46	s
C13	76,44	-	-
C13'-H13' (CH_3)	17,06	1,35	s
C14-H14	42,62	3,05	7,1 Hz (q)
C14'-H14' (CH_3)	12,90	1,18	7,1 Hz (d)
C15	176,54	-	-

d: dupleteo; J : Constante de acoplamento escalar; m: multipleteo; Mult.: Multiplicidade; q: quatripleteo; ql: quatripleteo largo; s: simpleto; δ : Deslocamento químico.

3.7.2 Medidas Anisotrópicas no Sistema DSCG/NaCl/ D_2O /Monocrotalina

O sistema DSCG/NaCl/ D_2O /monocrotalina foi preparado para aquisição de parâmetros anisotrópicos (RDCs e RCSAs) de acordo com o procedimento 2.5.3. Os espectros HSQC-F2, para medidas de RDCs (*Figura 77*), e $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$, para medidas de RCSAs (*Figura 78 e Figura 79*), foram registrados nas duas temperaturas alvos: 23 °C (anisotrópica) e 28 °C (isotrópica) conforme indicadas pelo monitoramento da separação quadrupolar de deutério (*Figura 76*).

Figura 76– Monitoramento da transição de fases isotrópica/anisotrópica no sistema DSCG/NaCl/D₂O/monocrotalina através do *splitting* quadrupolar de D₂O em diferentes temperaturas.



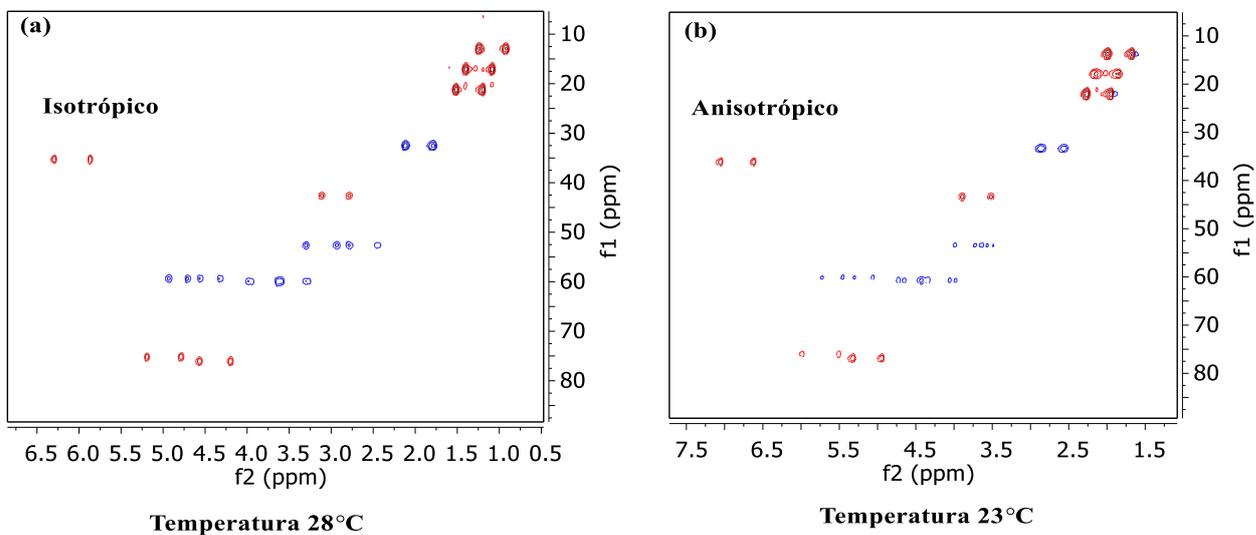
Quando os acoplamentos no espectro de HSQC são registrados no eixo F2, a medida do *splitting* é simplesmente a separação entre os picos dos dupletos, ou seja, sem a necessidade de dividi-los por um fator de escalar k . Depois de medir a diferença entre cada um dos *splitting*, obtidos nos meios isotrópico e anisotrópico, obtêm-se os RDCs através da *Equação 38*. Enquanto os RCSAs foram medidos usando a *Equação 44* tomando como referência o carbono 12 da monocrotalina.

Assim como aconteceu com a sacarose, tivemos para a monocrotalina os dados de RDCs experimentais com oito combinações, resultado da permutação dos dados anisotrópicos dos hidrogênios situados nas posições 3, 6 e 9 do esqueleto carbônico da monocrotalina.

3.7.2.1 Medição dos RDCs da monocrotalina no sistema DSCG/NaCl/D₂O

A molécula de monocrotalina foi sujeita a alinhamento no meio DSCG/NaCl/D₂O para extração de parâmetros anisotrópicos. Para tanto, foram realizados experimentos que podem ser usados para medir acoplamentos entre as entidades de carbono e hidrogênio. O mais comum dentre estes experimentos é o uso do HSQC acoplado em F1, mas também pode-se medir em F2 (*Figura 77*), como foi realizado com a monocrotalina.

Figura 77– Espectros de HSQC-F2 (campo de 9,4 T) da monocrotalina registrados nas temperaturas 23 °C (anisotrópico) e 28 °C (isotrópico).



Após os experimentos de HSQC-F2 nos meios anisotrópico e isotrópico, mediu-se a maioria dos RDCs da monocrotalina, em um total de 12 dipolares, sendo que o intervalo destes RDCs variaram entre 26,23 à -19,32 Hz (*Tabela 15*). Os picos dos sinais de contorno dos H5(a,b) e H6(a,b) não foram, suficientemente, intensos a ponto de permitir a medição dos acoplamentos totais no ambiente anisotrópico e/ou acoplamento escalar no experimento isotrópico.

Tabela 15– Valores calculados de RDCs (HSQC-F2) para monocrotalina no sistema DSCG/NaCl/D₂O.

Átomos	<i>Splitting HSQC-F2</i>		RDC (Hz)
	Anisotrópico	Isotrópico	
	T (Hz)	J (Hz)	
C2-H2	172,49	167,8	4,69
C3-H3a	121,8	141,12	-19,32
C3-H3b	148,35	131,37	16,98
C5-H5a	ND	135,87	
C5-H5b	ND	147,91	
C6-H6a	122,51	135,3	-12,79
C6-H6b	ND	ND	
C7-H7	187,1	160,87	26,23
C8-H8	147,4	147,51	-0,11
C9-H9a	167,7	147,21	20,49
C9-H9b	156,14	152,45	3,69
C12-H12' (CH ₃)	129,09	129,79	-0,7
C13-H13' (CH ₃)	121,26	127,37	-6,11
C14-H14	150,95	133,84	17,11
C14-H14' (CH ₃)	128,8	130,74	-1,94

J: Acoplamento escalar; ND.: Não determinado; RDC: Acoplamento dipolar residual; *T*: Acoplamento total.

A atribuição dos RDCs para os hidrogênios diastereotópicos da monocrotalina gera uma ambiguidade. Desta forma, teve-se que permutar as dipolares adquiridas para os H3(a,b), H6(a,b) e H9(a,b), o que resultou em 8 conjuntos de dipolares (*Tabela 16*).

Tabela 16– Permutações de RDCs da monocrotalina no sistema DSCG/NaCl/D₂O calculados em HSQC acoplados em F2.

Átomos	Permutação de RDCs Experimentais (Hz)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
C2-H2	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7
C3-H3a	-19,3	-19,3	-19,3	-19,3	16,98	16,98	16,98	16,98
C3-H3b	16,98	16,98	16,98	16,98	-19,3	-19,3	-19,3	-19,3
C5-H5(a, b)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C6-H6a	-12,8	-	-12,8	-	-	-12,8	-12,8	-
C6-H6b	-	-12,8	-	-12,8	-12,8	-	-	-12,8
C7-H7	26	26	26	26	26	26	26	26
C8-H8	-0,11	-0,11	-0,11	-0,11	-0,11	-0,11	-0,11	-0,11
C9-H9a	20,49	20,49	3,69	3,69	3,69	3,69	20,49	20,49
C9-H9b	3,69	3,69	20,49	20,49	20,49	20,49	3,69	3,69
C12'-H12' (CH ₃)	-0,7	-0,7	-0,7	-0,7	-0,7	-0,7	-0,7	-0,7
C13'-H13' (CH ₃)	-6,11	-6,11	-6,11	-6,11	-6,11	-6,11	-6,11	-6,11
C14-H14	17,11	17,11	17,11	17,11	17,11	17,11	17,11	17,11
C14'-H14' (CH ₃)	-1,94	-1,94	-1,94	-1,94	-1,94	-1,94	-1,94	-1,94

ND: Não determinado.

3.7.2.2 Medição dos RCSAs da monocrotalina no sistema DSCG/NaCl/D₂O

Os RCSAs foram medidos como a diferença de deslocamento químico entre um sinal *i* e um sinal de referência interno da própria molécula que foi o carbono 12 nos meios isotrópico (*Figura 78*) e anisotrópico (*Figura 79*). Ao todo mediu-se 16 RCSAs que compreenderam um intervalo estreito de 9,65 à 3,32 Hz (*Tabela 17*), provavelmente, resultado do pequeno grau de orientação da fase anisotrópica retratada pelo splitting do quadrupolo de deutério (*Figura 76*).

Figura 78– Espectro de $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ (100 MHz) da monocrotalina dissolvida no sistema DSCG/NaCl/D₂O e mantida a 28 °C.

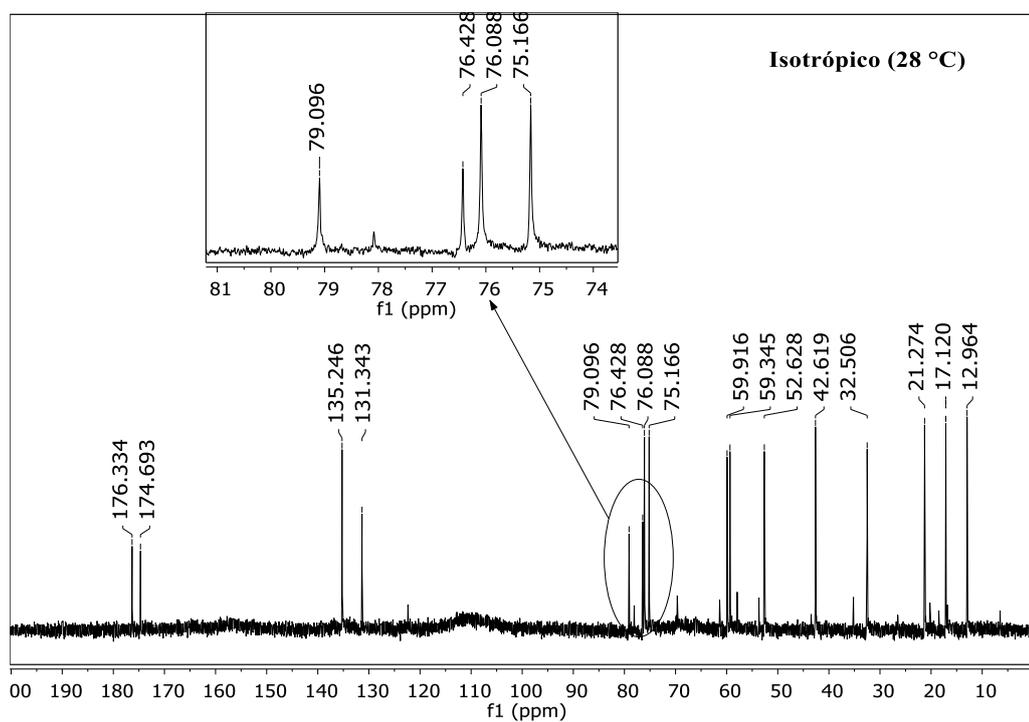


Figura 79– Espectro de $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ (100 MHz) da cefuroxima dissolvida no sistema TP6EO2M/D₂O e mantida a 23 °C.

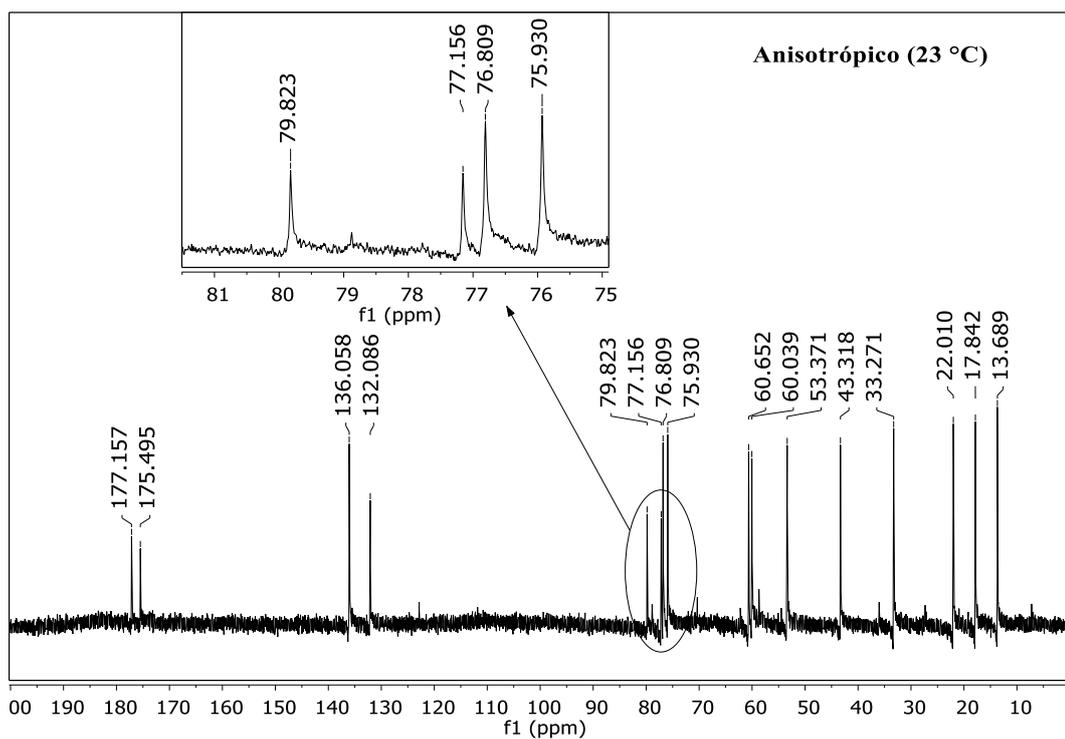


Tabela 17– RCSAs adquiridos da monocrotalina dissolvida no sistema DSCG/NaCl/D₂O.

Carbono	Isotrópico (ppm)		Anisotrópico (ppm)		RCSA	
	δ	$\delta^i - \delta^{C12}$	δ	$\delta^i - \delta^{C12}$	ppm	Hz
1	131,343	52,247	132,086	52,263	0,016	1,61
2	135,246	56,150	136,058	56,235	0,085	8,54
3	59,345	-19,751	60,039	-19,784	-0,033	-3,32
5	52,628	-26,468	53,371	-26,452	0,016	1,61
6	32,506	-46,590	33,271	-46,552	0,038	3,82
7	75,166	-3,930	75,930	-3,893	0,037	3,72
8	76,088	-3,008	76,809	-3,014	-0,006	-0,60
9	59,916	-19,180	60,652	-19,171	0,009	0,90
11	174,693	95,597	175,495	95,672	0,075	7,54
12*	79,096	0,000	79,823	0,000	0,000	0,00
12'	21,274	-57,822	22,010	-57,813	0,009	0,90
13	76,428	-2,668	77,156	-2,667	0,001	0,10
13'	17,120	-61,976	17,842	-61,981	-0,005	-0,50
14	42,619	-36,477	43,318	-36,505	-0,028	-2,81
14'	12,964	-66,132	13,689	-66,134	-0,002	-0,20
15	176,334	97,238	177,157	97,334	0,096	9,65

*: Referência interna; RCSA: Anisotropia de deslocamento químico; δ : Deslocamento químico.

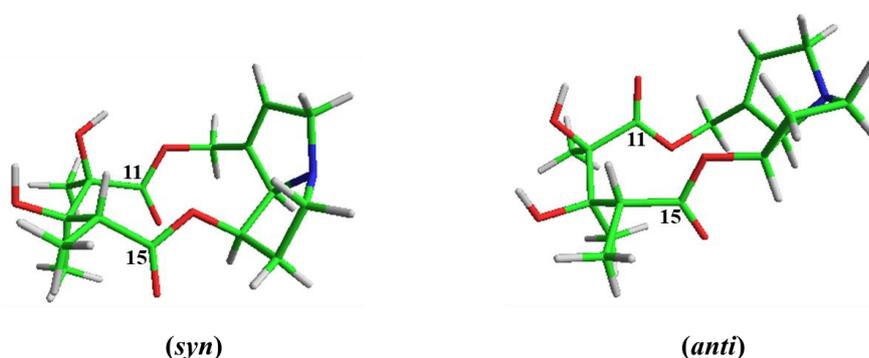
3.7.3 Modelagem Molecular da Monocrotalina

A molécula de monocrotalina foi objeto de uma busca conformacional explorada no campo de força MMFF94 usando o algoritmo dos mínimo múltiplo de Monte Carlo conforme implementado no *MacroModel* com uma janela de 21 kcal/mol. A análise do *ensemble* conformacional obtido mostrou duas conformações limites (*Figura 80*) cujas carbonilas C11 e C15 do macrociclo têm orientações *syn*-paralelas ou *anti*-paralelas relativas à orientação do

grupo carbonila dos ésteres. Estudos de raio-X mostraram que no estado sólido a monocrotalina prefere uma conformação *syn*-paralela.¹¹⁷

Em seguida, o *ensemble* foi refinado ao nível de teoria de M062X¹¹¹/6-31+G** implementado no Gaussian09 e carregado em IEFPCM¹¹² com os parâmetros de solvatação em água. O tensor de blindagem química foi computado ao nível GIAO/PBE0¹¹³/6-311+G** na geometria M062X usando o Gaussian09. Além do mais, os tensores de blindagem química¹¹⁴ foram calculados também ao nível PBE0 com a base especializada pcS-1.¹¹⁵

Figura 80– Conformações limites da monocrotalina.



3.7.4 Análise Conformacional da Monocrotalina Mediante RDCs e RCSAs

As duas conformações limites (*Figura 80*) foram carregadas no programa StereoFitter para fazer um ajuste de decomposição do valor singular (SVD) dos RDCs e RCSAs às estruturas moleculares do *ensemble*. Porém, devemos ter em conta vários aspectos. O ajuste a várias conformações precisa do uso da chamada aproximação de tensor único onde um tensor comum de alinhamento é compartilhado por várias conformações. Essa aproximação demanda a sobreposição prévia das coordenadas moleculares com o intuito de definir um único sistema de referência. Entretanto, nesse caso, simplesmente, sobreposemos as estruturas usando o algoritmo de Kersley baseado em quatérnios implementados no software StereoFitter.

O programa StereoFitter permite as otimizações simultâneas dos elementos do tensor de alinhamento e das populações do *ensemble* conformacional.²⁰ Dois cenários foram usados na nossa análise: uso exclusivo de RDCs e uso exclusivo de RCSAs.

No primeiro cenário usamos os valores medidos mediante o experimento HSQC-F2 (*Figura 77*) que resulta nos RDCs reportados na *Tabela 15*. No entanto, os RDCs com uma

fraca relação sinal ruído no espectro anisotrópico, como C5-H5 α e C5-H5 β (Figura 77), foram excluídos e não fizeram parte do *input* de dados de RDCs permutados implementados no MagNes no modo CASE-3D.

Os resultados obtidos dos dados de RDCs permutados são reunidos na Tabela 18. Observa-se que as permutações P₁, P₂ e P₇ tiveram as melhores respostas em termos de fator de qualidade (Q), critério de informação de Akaike (AIC , do inglês – *Akaike Information Criterion*), χ^2 e $\frac{\chi^2}{N_{RDC}}$. Sendo que o melhor resultado foi obtido para a permutação P₁ que selecionou os confórmeros #1 e #4 (Figura 81) do *ensemble* original. Ambos tem as carbonilas (11 e 15) em posição *syn* e pertencem à mesma família de confórmeros com conformações semelhantes, diferenciando entre si levemente na posição rotacional da hidroxila ligada ao C12. A conformação do anel de pirrolizidina foi a E₆ *exo-puckered*.

Figura 81– Confórmeros *syn* (#1 e #4) para as carbonilas da monocrotalina computadas mediante o método do tensor único no programa MagNes.

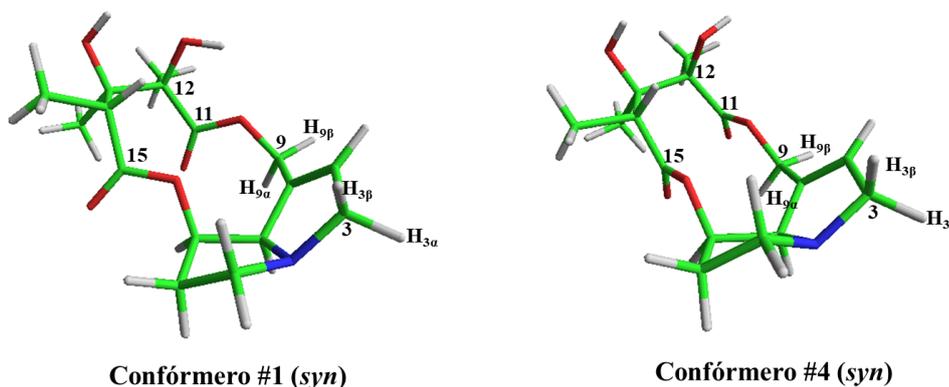


Tabela 18– RDC experimental e calculado para monocrotalina em DSCG/NaCl/D₂O com os valores de Q , AIC , χ^2 , $\frac{\chi^2}{N_{RDC}}$ e porcentagem populacional dos conformeros para cada permutação.

Permutação	P ₁		P ₂		P ₃		P ₄	
Confórmero (% população)	1 (69 %)		1 (58 %)		1 (21 %)		2 (41 %)	
	4 (31 %)		4 (42 %)		6 (21 %)		10 (21 %)	
					10 (8 %)		13 (23 %)	
					13 (29 %)		17 (15 %)	
					18 (22 %)			
$\frac{\chi^2}{N_{RDC}}$	0,884		1,246		4,322		4,753	
χ^2	10,602		14,956		51,858		57,032	
Q	0,082		0,101		0,181		0,189	
AIC	12,607		20,933		60,298		63,114	
RDC experimental e calculado	RDC _{exp}	RDC _{cal}						
C ₂ -H ₂	4,7	3,35	4,7	3,39	4,7	5,55	4,7	3,01
C ₃ -H _{3α}	-19,3	-20,25	-19,3	-21,82	-19,3	-20,18	-19,3	-22,11
C ₃ -H _{3β}	16,98	15,09	16,98	14,74	16,98	17,53	16,98	18,81
C ₆ -H _{6α}	-12,8	-13,61	-	-	-12,8	-13,39	-	-
C ₆ -H _{6β}	-	-	-12,8	-10,49	-	-	-12,8	-10,64
C ₇ -H ₇	26	25	26	25,23	26	22,05	26	22,66
C ₈ -H ₈	-0,11	1,77	-0,11	0,67	-0,11	-1,1	-0,11	-0,25
C ₉ -H _{9α}	20,49	20,95	20,49	20,7	3,69	6,59	3,69	7,75
C ₉ -H _{9β}	3,69	4,43	3,69	2,94	20,49	17,37	20,49	16,7
C ₁₂ '-H ₁₂ '	-0,7	-1,02	-0,7	-1,38	-0,7	-3,6	-0,7	-3,41
C ₁₃ '-H ₁₃ '	-6,11	-7,15	-6,11	-7,31	-6,11	-6,11	-6,11	-3,92
C ₁₄ -H ₁₄	17,11	17,37	17,11	17,87	17,11	19,03	17,11	18,51
C ₁₄ '-H ₁₄ '	-1,94	-0,61	-1,94	0,19	-1,94	-7,01	-1,94	-4,63

AIC: Critério de informação de Akaike; Q : Fator de qualidade de Colinescu.

Tabela 18– Continuação.

Permutação	P ₅		P ₆		P ₇		P ₈	
Confórmero (% população)	8 (45 %)		2 (5 %)		9 (45 %)		8 (17 %)	
	18 (55 %)		5 (58 %)		13 (55 %)		17 (3 %)	
			15 (25 %)				18 (80 %)	
			17 (12 %)					
$\frac{\chi^2}{N_{RDC}}$	9,024		5,477		1,489		3,639	
χ^2	108,291		65,729		17,865		43,669	
<i>Q</i>	0,261		0,203		0,106		0,166	
<i>AIC</i>	110,326		71,754		19,828		47,671	
RDC experimental e calculado (Hz)	RDC _{exp}	RDC _{cal}						
C ₂ -H ₂	4,7	7,8	4,7	6,97	4,7	7,36	4,7	3,21
C₃-H_{3α}	16,98	16,36	16,98	18,11	16,98	17,75	16,98	15,09
C₃-H_{3β}	-19,3	-14,36	-19,3	-22,2	-19,3	-19,13	-19,3	-17,88
C₆-H_{6α}	-	-	-12,8	-13,36	-12,8	-13,92	-	-
C₆-H_{6β}	-12,8	-12,67	-	-	-	-	-12,8	-11,47
C ₇ -H ₇	26	24,88	26	20,21	26	24,02	26	26,59
C ₈ -H ₈	-0,11	-8,44	-0,11	2,65	-0,11	0,61	-0,11	-4,92
C₉-H_{9α}	3,69	5,17	3,69	5,48	20,49	19,9	20,49	19,2
C₉-H_{9β}	20,49	15,28	20,49	16,29	3,69	4,36	3,69	2,37
C ₁₂ '-H ₁₂ '	-0,7	1,01	-0,7	-4,22	-0,7	0,15	-0,7	3,46
C ₁₃ '-H ₁₃ '	-6,11	-5,5	-6,11	-6,42	-6,11	-3,09	-6,11	-7,38
C ₁₄ -H ₁₄	17,11	21,11	17,11	19,35	17,11	18,22	17,11	18,67
C ₁₄ '-H ₁₄ '	-1,94	-3,44	-1,94	-1,86	-1,94	-1,26	-1,94	-4,19

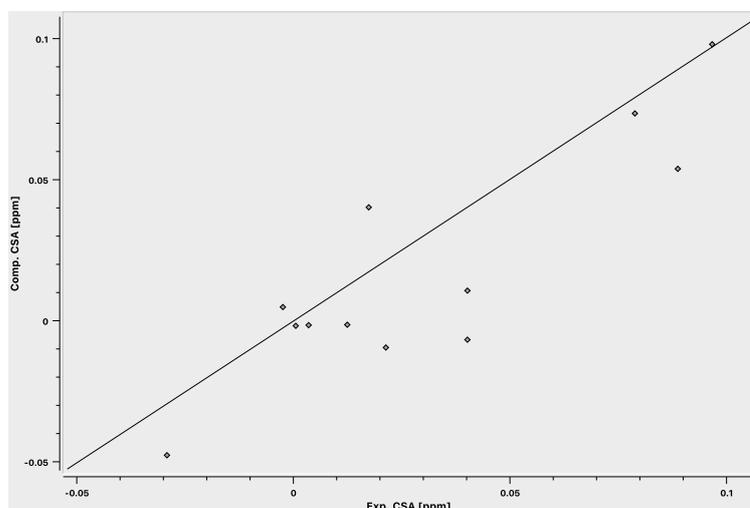
AIC: Critério de informação de Akaike; *Q*: Fator de qualidade de Colinescu.

Simultaneamente com o nosso trabalho no sistema DSCG/D₂O/NaCl, o professor Hallwass¹¹⁸ adquiriu e analisou dados de RDCs e RCSAs de monocrotalina em diferentes solventes orgânicos. Os seus resultados, mais os apresentados nesta tese, constataram que nos solventes mais polares como, por exemplo, água e DMSO há diferentes confórmeros, porém, todos com a mesma conformação limite mais polar *syn*, por outro lado, quando a monocrotalina foi dissolvida em CDCl₃ as duas conformações limites coexistiam, porém com conformação *anti* (75 %) prevalecendo sobre a conformação *syn* (25 %) e ao ser dissolvida em benzeno o resultado foi 100 % conformação *anti*. Uma vez que a conformação *syn* tem uma dipolar maior

do que a conformação *anti*, os resultados são perfeitamente concordantes do ponto de vista da polaridade do solvente e a polaridade da molécula.

Finalmente, fez-se o ajuste dos valores medidos de RCSA usando novamente o método do tensor único. Porém, o fator de qualidade obtido foi alto ($Q = 0,477$), esta falta de correlação entre os dados obtidos experimentalmente e a resposta calculada computacionalmente podem ser visualizadas na *Figura 82*, no entanto, os resultados populacionais para a conformação *syn* (65 %) e *anti* (35 %) são concordantes com os resultados adquiridos com os dados de RDCs.

Figura 82– Representação dos RCSAs calculados em MSpin contra os experimentais.



Embora os sinais de RCSAs obtidos experimentalmente sejam qualitativamente corretos, possivelmente a perturbação sobre a componente isotrópica do deslocamento químico causada pelo incremento de temperatura e/ou a passagem de uma fase nemática a uma isotrópica não permite a precisão necessária para a obtenção de RCSAs quantitativos, isto traz como consequência uma grande imprecisão na determinação da estrutura conformacional.

4 CONCLUSÕES

O uso de *tert*-butilmetil éter (*t*BME) como solvente para recristalização de TP6EO2M, bem como, as mudanças nas condições mais suaves de síntese permitiu melhorar drasticamente o rendimento de reação (52 % de cristais) se comparado com dados reportados na literatura. Além do mais, encontramos outras condições de reação usando etanol em substituição ao DMF que evita-se, durante a elaboração, processos de separação em coluna cromatográfica, porém com rendimento menor de 32 % de cristais TP6EO2M. Acreditamos que o uso deste novo procedimento seja da máxima utilidade para utilização deste composto como meio orientador ou nas diversas aplicações dos agentes cromônicos.

O TP6EO2M mostrou um elevado grau de alinhamento em meio aquoso, sendo possível sua utilização como meio orientador para aquisição de parâmetros anisotrópicos em RMN de meio líquido, sobretudo, os RCSAs.

Devido ao elevado grau de alinhamento na fase nemática do TP6EO2M, os RDCs são mais complexos de serem extraídos devido fortes acoplamentos vicinais e geminais entre hidrogênios presentes na molécula do analito, tornando difícil estudos conformacionais de estruturas com elevado grau de hidrogenação.

O sistema TP6EO2M/D₂O alterando a temperatura de transição entre as fases nemática e isotrópica nos permitiu, com apenas uma única amostra, extrair parâmetros anisotrópicos suficientes para o estudo do espaço conformacional das substâncias sacarose e cefuroxima. A interpretação dos resultados mostraram que a sacarose em meio líquido apresenta-se com múltiplas conformações com ângulos torsonais Φ e Ψ variando, respectivamente, 90-110° e 300-340°. Ao passo que a cefuroxima mostrou-se com elevado grau de mobilidade situada principalmente nas cadeias laterais.

O sistema DSCG/NaCl/D₂O permitiu a extração de parâmetros anisotrópicos (RDCs e RCSAs) em RMN de meio líquido da monocrotalina. Os resultados mostraram a preferência conformacional do macrociclo pela forma *syn* em solventes polares. Verificou-se também a preferência pela conformação E_6 *exo-puckered* do anel de pirrolizidina.

Este procedimento para extração de componentes anisotrópicas abre um caminho para o uso de RCSA na análise conformacional de compostos com atividade biológica sob condições próximas às fisiológicas.

REFERÊNCIAS

1. Gil, R. R. & Navarro-Vázquez, A. Application of the Nuclear Overhauser Effect to the Structural Elucidation of Natural Products. in *Modern NMR Approaches to the Structure Elucidation of Natural Products: Volume 2: Data Acquisition and Applications to Compound Classes* (eds. Williams, A., Martin, G. & Rovnyak, D.) 1–38 (Royal Society of Chemistry, 2017).
2. Altona, C. Vicinal Coupling Constants and Conformation of Biomolecules. *Encycl. Magn. Reson.* 1–14 (2007).
3. Breton, R. C. & Reynolds, W. F. Using NMR to identify and characterize natural products. *Nat. Prod. Rep.* **30**, 501–24 (2013).
4. Haasnoot, C. A. G., Leeuw, F. A. A. M. & Altona, C. The relationship between proton-proton coupling constants and substituent electronegativities-i: an empirical generalization of the karplus equation. *Tetrahedron* **36**, 2783–2792 (1980).
5. Palermo, G., Riccio, R. & Bifulco, G. Effect of electronegative substituents and angular dependence on the heteronuclear spin-spin coupling constant $^3J_{C-H}$ an empirical prediction equation derived by density functional theory calculations. *J. Org. Chem.* **75**, 1982–1991 (2010).
6. Gil, R. R. & Navarro-Vázquez, A. Application of Residual Dipolar Couplings to the Structural Analysis of Natural Products. in *Modern NMR Approaches to the Structure Elucidation of Natural Products: Volume 2: Data Acquisition and Applications to Compound Classes* 117–176 (2017).
7. Bifulco, G., Dambruoso, P., Gomez-paloma, L. & Riccio, R. Determination of Relative Configuration in Organic Compounds by NMR Spectroscopy and Computational Methods. *Chem. Rev.* **107**, 3744–3779 (2007).
8. Tantillo, D. J. Walking in the woods with quantum chemistry--applications of quantum chemical calculations in natural products research. *Nat. Prod. Rep.* **30**, 1079–86 (2013).
9. Kutateladze, A. G. & Mukhina, O. A. Relativistic Force Field: Parametrization of ^{13}C - 1H Nuclear Spin-Spin Coupling Constants. *J. Org. Chem.* **79**, 8397–8406 (2014).
10. Saupe, A. & Englert, G. High-resolution nuclear magnetic resonance spectra of orientated molecules. *Phys. Rev. Lett.* **11**, 462–466 (1963).
11. Gil, R. R. Constitutional, configurational, and conformational analysis of small organic molecules on the basis of NMR residual dipolar couplings. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 7222–7224 (2011).
12. Teles, R. R., França, J. A. A., Navarro-Vázquez, A. & Hallwass, F. Atribuição da Estereoquímica da α -Santonina Através das Medidas do Acoplamento Dipolar Residual. *Quim. Nova* **38**, 1345–1350 (2015).

13. Cid, M.-M. *et al.* Structural Elucidation of Small Organic Molecules Assisted by NMR in Aligned Media. in *Structure elucidation in organic chemistry: the search for the right tools* 279–323 (2015).
14. Sun, H. *et al.* Challenge of large-scale motion for residual dipolar coupling based analysis of configuration: The case of fibrosterol sulfate A. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 14629–14636 (2011).
15. Schuetz, A. *et al.* Stereochemistry of sagittamide a from residual dipolar coupling enhanced NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 15114–15115 (2007).
16. Liu, Y. *et al.* Unequivocal determination of complex molecular structures using anisotropic NMR measurements. *Science (80-.)*. **356**, 1–7 (2017).
17. García, M. E. *et al.* Stereochemistry determination by powder X-ray diffraction analysis and NMR spectroscopy residual dipolar couplings. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 5670–5674 (2009).
18. 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)*. **46**, 5879–5881 (2010).
19. Thiele, C. M. & Berger, S. Probing the diastereotopicity of methylene protons in strychnine using residual dipolar couplings. *Org. Lett.* **5**, 705–708 (2003).
20. 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. *Org. Lett.* **11**, 1471–1474 (2009).
21. Thiele, C. M. *et al.* On the treatment of conformational flexibility when using residual dipolar couplings for structure determination. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 6708–6712 (2009).
22. Canales, Á. *et al.* Lanthanide-chelating carbohydrate conjugates are useful tools to characterize carbohydrate conformation in solution and sensitive sensors to detect carbohydrate-protein interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 8011–8017 (2014).
23. Bothner-By, A. A., Domaille, P. J. & Gayathri, C. Ultra-high field NMR spectroscopy: observation of proton-proton dipolar coupling in paramagnetic bis[tolyltris(pyrazolyl)borato]cobalt(II). *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 5602–5603 (1981).
24. Kruck, M., Wadepohl, H., Enders, M. & Gade, L. H. Giant residual dipolar ¹³C-¹H couplings in high-spin organoiron complexes: Elucidation of their structures in solution by ¹³C NMR spectroscopy. *Chem. - A Eur. J.* **19**, 1599–1606 (2013).
25. 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.* **17**, 9368–9376 (2011).

26. Thiele, C. M. Use of RDCs in rigid organic compounds and some practical considerations concerning alignment media. *Concepts Magn. Reson. Part A* **30A**, 65–80 (2007).
27. Kummerlöwe, G. & Luy, B. Residual dipolar couplings as a tool in determining the structure of organic molecules. *Trends Anal. Chem.* **28**, 483–493 (2009).
28. Saupe, V. A. Kernresonanzen in kristallinen Flüssigkeiten und in kristallinflüssigen Lösungen. Teil I. *Z. Naturforsch* **19**, 161–171 (1964).
29. Kummerlöwe, G. *et al.* Variable angle NMR spectroscopy and its application to the measurement of residual chemical shift anisotropy. *J. Magn. Reson.* **209**, 19–30 (2011).
30. Gil, R. R., Griesinger, C., Navarro-Vázquez, A. & Sun, H. Structural Elucidation of Small Organic Molecules Assisted by NMR in Aligned Media. in *Structure Elucidation in Organic Chemistry: The Search for the Right Tools* 279–323 (2015).
31. Kuchel, P. W. *et al.* 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.* **180**, 256–265 (2006).
32. 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.* **16**, 3622–3626 (2010).
33. Nath, N. *et al.* Determination of Relative Configuration from Residual Chemical Shift Anisotropy. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 9548–9556 (2016).
34. Carvalho, D. S., Silva, D. G. B., Hallwass, F. & Navarro-vázquez, A. Chemically cross-linked polyacrylonitrile . A DMSO compatible NMR alignment medium for measurement of residual dipolar couplings and residual chemical shift anisotropies. *J. Magn. Reson.* **302**, 21–27 (2019).
35. Merle, C. *et al.* Crosslinked poly(ethylene oxide) as a versatile alignment medium for the measurement of residual anisotropic NMR parameters. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 10309–10312 (2013).
36. Kummerlöwe, G., Auernheimer, J., Lendlein, A. & Luy, B. Stretched poly(acrylonitrile) as a scalable alignment medium for DMSO. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 6080–6081 (2007).
37. Luy, B. *et al.* Orientational properties of stretched polystyrene gels in organic solvents and the suppression of their residual ¹H NMR signals. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 6459–6465 (2005).
38. Freudenberger, J. C., Spittler, 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.* **126**, 14690–14691 (2004).

39. Thiele, C. M., Pomerantz, W. C., Abbott, N. L. & Gellman, S. H. Lyotropic liquid crystalline phases from helical β -peptides as alignment media. *Chem. Commun.* **47**, 502–504 (2011).
40. Arnold, L., Marx, A., Thiele, C. M. & Reggelin, M. Polyguanidines as chiral orienting media for organic compounds. *Chem. - A Eur. J.* **16**, 10342–10346 (2010).
41. Dama, M. & Berger, S. Polyisocyanides as a new alignment medium to measure residual dipolar couplings for small organic molecules. *Org. Lett.* **14**, 241–243 (2012).
42. Zong, W. *et al.* An Alignment Medium for Measuring Residual Dipolar Couplings in Pure DMSO: Liquid Crystals from Graphene Oxide Grafted with Polymer Brushes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **55**, 3690–3693 (2016).
43. Luy, B., Kobzar, K. & Kessler, H. An easy and scalable method for the partial alignment of organic molecules for measuring residual dipolar couplings. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **43**, 1092–1094 (2004).
44. Gil-Silva, L. F., Santamaría-Fernández, R., Navarro-Vázquez, A. & Gil, R. R. Collection of NMR Scalar and Residual Dipolar Couplings Using a Single Experiment. *Chem. - A Eur. J.* **22**, 472–476 (2016).
45. García, M. E., Woodruff, S. R., Hellemann, E., Tsarevsky, N. V. & Gil, R. R. Di(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (DEGMEMA)-derived gels align small organic molecules in methanol. *Magn. Reson. Chem.* **55**, 206–209 (2017).
46. Gil, R. R., Gayathri, C., Tsarevsky, N. V. & Matyjaszewski, K. Stretched poly(methyl methacrylate) gel aligns small organic molecules in chloroform. Stereochemical analysis and diastereotopic proton NMR assignment in ludartin using residual dipolar couplings and 3J coupling constant analysis. *J. Org. Chem.* **73**, 840–848 (2008).
47. Liu, Y. *et al.* Application of anisotropic NMR parameters to the confirmation of molecular structure. *Nat. Protoc.* **14**, 217–247 (2019).
48. 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 [23]. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9340–9341 (2000).
49. Sass, H. J., Musco, G., J. Stahl, S., T. Wingfield, P. & 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* **18**, 303–309 (2000).
50. Deloche, B. & Samulski, E. T. Short-Range Nematic-like Orientational Order in Strained Elastomers: A Deuterium Magnetic Resonance Study. *Macromolecules* **14**, 575–581 (1981).
51. 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* **47**, 249–258 (2010).

52. Nath, N. *et al.* Determination of Relative Configuration from Residual Chemical Shift Anisotropy. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 9548–9556 (2016).
53. Hellemann, E. & Gil, R. R. New Stretching Method for Aligning Gels: Its Application to the Measurement Residual Chemical Shift Anisotropies (RCSAs) without the Need for Isotropic Shift Correction. *Chem. - A Eur. J.* **24**, 3689–3693 (2018).
54. Hallwass, F. *et al.* Measurement of residual chemical shift anisotropies in compressed polymethylmethacrylate gels. Automatic compensation of gel isotropic shift contribution. *Magn. Reson. Chem.* **56**, 321–328 (2018).
55. Trigo-Mouriño, P., Merle, C., Koos, M. R. M., Luy, B. & Gil, R. R. Probing spatial distribution of alignment by deuterium NMR imaging. *Chem. - A Eur. J.* **19**, 7013–7019 (2013).
56. Péchiné, J.-M., Meddour, A. & Courtieu, J. Monitoring the differential ordering of enantiomers included into cyclodextrins through deuterium NMR in lyotropic liquid crystals. *Chem. Commun. (Camb)*. **33**, 1734–1735 (2002).
57. Troche-Pesqueira, E., Anklin, C., Gil, R. R. & Navarro-Vázquez, A. Computer-Assisted 3D Structure Elucidation of Natural Products using Residual Dipolar Couplings. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **56**, 3660–3664 (2017).
58. Troche-Pesqueira, E. NMR in Oriented Media. New Methodologies and Studies on New Alignment media. (2015).
59. Berride, F. *et al.* Chiral amplification of disodium cromoglycate chromonics induced by a codeine derivative. *Soft Matter* (2017).
60. Lydon, J. Chromonic liquid crystalline phases. *Liq. Cryst.* **38**, 1663–1681 (2011).
61. Lydon, J. Chromonic liquid crystal phases. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **3**, 458–466 (1998).
62. Lydon, J. Chromonic review. *J. Mater. Chem.* **20**, 10071–10099 (2010).
63. Attwood, T. K. & Lydon, J. E. Lyotropic Mesophase Formation by Anti-Asthmatic Drugs. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **108**, 349–357 (1984).
64. Lydon, J. Chromonic mesophases. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **8**, 480–490 (2004).
65. Lu, W., Chen, Y., Roy, V. A. L., Chui, S. S. Y. & Che, C. M. Supramolecular polymers and chromonic mesophases self-organized from phosphorescent cationic organoplatinum(II) complexes in water. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 7621–7625 (2009).
66. Walker, M. & Wilson, M. R. A Simple Model for Chromonic Aggregation. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **612**, 117–125 (2015).

67. Hunter, C. A. Arene- Arene Interactions: Electrostatic or Charge Transfer? *Angew. Chem. Int. Ed.* **32**, 1584–1586 (1993).
68. Sonin, A. S. Inorganic lyotropic liquid crystals. *J. Mater. Chem.* **8**, 2557–2574 (1998).
69. Runa, K., Li, B.-X. & Lavrentovich, O. D. Effect of Crowding Agent Polyethylene Glycol on Lyotropic Chromonic Liquid Crystal Phases of Disodium Cromoglycate. *Crystals* **9**, 160 (2019).
70. Maiti, P. K., Lansac, Y., Glaser, M. A. & Clark, N. A. Isodesmic self-assembly in lyotropic chromonic systems. *Liq. Cryst.* **29**, 619–626 (2002).
71. Ruslim, C., Matsunaga, D., Hashimoto, M., Tamaki, T. & Ichimura, K. Structural characteristics of the chromonic mesophases of C.I. Direct Blue 67. *Langmuir* **19**, 3686–3691 (2003).
72. Harrison, W. J., Mateer, D. L. & Tiddy, G. J. T. Liquid-Crystalline J-Aggregates Formed by Aqueous Ionic Cyanine Dyes. *J Phys Chem* **100**, 2310–2321 (1996).
73. Mundy, K., Sleep, J. C. & Lydon, J. E. The intercalation of ethidium bromide in the chromonic lyotropic phases of drugs and nucleic acids. *Liq. Cryst.* **19**, 107–112 (1995).
74. Shiyanovskii, S. V. *et al.* Real-time microbe detection based on director distortions around growing immune complexes in lyotropic chromonic liquid crystals. *Phys. Rev. E* **71**, 020702 (2005).
75. Lavrentovich, M., Sergan, T. & Kelly, J. Planar and twisted lyotropic chromonic liquid crystal cells as optical compensators for twisted nematic displays. *Liq. Cryst.* **30**, 851–859 (2010).
76. Berride, F. *et al.* Chiral amplification of disodium cromoglycate chromonics induced by a codeine derivative. *Soft Matter* **13**, 6810–6815 (2017).
77. Al-Lawati, Z. H. *et al.* Alignment of discotic lyotropic liquid crystals at hydrophobic and hydrophilic self-assembled monolayers. *J. Phys. Chem. C* **116**, 12627–12635 (2012).
78. Boden, N., Bushby, R. J., Ferris, L., Hardy, C. & Sixl, F. Designing new lyotropic amphiphilic mesogens to optimize the stability of nematic phases. *Liq. Cryst.* **1**, 109–125 (1986).
79. Boden, N., Bushby, R. J., Jesudason, M. V. & Sheldrick, B. The X-Ray Crystal Structure of the Discoid Amphiphile 2,3,6,7,10,11 -Hexa-(1,4,7,-trioxaoctyl)triphenylene (TP6E02M) Neville. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1342–1343 (1988).
80. Boden, N., Bushby, R. J., Hardy, C. & Sixl, F. Phase behaviour and structure of a non-ionic discoidal amphiphile in water. *Chem. Phys. Lett.* **123**, 359–364 (1986).

81. Walker, M., Masters, J. & Wilson, M. R. non-ionic chromonic liquid crystal system : insights from dissipative particle dynamics simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 23074–23081 (2014).
82. Akinshina, A. *et al.* Thermodynamics of the self-assembly of non-ionic chromonic molecules using atomistic simulations. The case of TP6EO2M in aqueous solution. *Soft Matter* **11**, 680–91 (2015).
83. Walker, M., Masters, A. J. & Wilson, M. R. Self-assembly and mesophase formation in a non-ionic chromonic liquid crystal system: insights from dissipative particle dynamics simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 23074–81 (2014).
84. Naarmann, H., Hanack, M. & Mattmer, R. A High Yield Easy Method for the Preparation of Alkoxy-Substituted Triphenylenes. *Synthesis (Stuttg)*. **1994**, 477–478 (1994).
85. Chapuzet, J. & Simonet, J. The anodic trimerization of aromatic orthodiethers: new developments. *Tetrahedron* **47**, 791–798 (1991).
86. Grzybowski, M., Skonieczny, K., Butenschön, H. & Gryko, D. T. Comparison of Oxidative Aromatic Coupling and the Scholl Reaction. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 2–33 (2013).
87. Herbaut, A. & Baranoff, E. UV-visible Absorption Study of the Self-association of Non-ionic Chromonic Triphenylenes TP6EOnM (n = 2, 3, 4) in Dilute Aqueous Solutions: Impact of Chain Length on Aggregation. *Chimia (Aarau)*. **69**, 520–523 (2015).
88. Borner, R. C. *et al.* Ferric chloride/methanol in the preparation of triphenylene-based discotic liquid crystals. *Liq. Cryst.* **33**, 1439–1442 (2006).
89. Boden, N., Borner, R. C., Bushby, R. J., Cammidge, a. N. & Jesudason, M. V. The synthesis of triphenylene-based discotic mesogens New and improved routes. *Liq. Cryst.* **15**, 851–858 (1993).
90. Kumar, S. & Lakshmi, B. A convenient and economic method for the synthesis of monohydroxy- pentaalkoxy- and hexaalkoxytriphenylene discotics. *Tetrahedron Lett.* **46**, 2603–2605 (2005).
91. Cooke, G., Sage, V. & Richomme, T. Synthesis of hexa-alkyloxytriphenylenes using FeCl₃ supported on alumina. *Synth. Commun.* **29**, 1767–1771 (1999).
92. Kumar, S. & Manickam, M. Oxidative trimerization of o-dialkoxybenzenes to hexaalkoxytriphenylenes: molybdenum(v) chloride as a novel reagent. *Chem. Commun.* 1615–1616 (1997).
93. Kumar, S. & Varshney, S. K. Synthesis of triphenylene and dibenzopyrene derivatives: Vanadium oxytrichloride a novel reagent. *Synthesis (Stuttg)*. 305–311 (2001).
94. Shiyanovskii, S. V. *et al.* Lyotropic chromonic liquid crystals for biological sensing

- applications. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **434**, 259–270 (2005).
95. Potter, T. D., Tasche, J., Barrett, E. L., Walker, M. & Wilson, M. R. Development of new coarse-grained models for chromonic liquid crystals: insights from top-down approaches. *Liq. Cryst.* **44**, 1979–1989 (2017).
 96. 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* **21A**, 10–21 (2004).
 97. Losonczi, J. A., Andrec, M., Fischer, M. W. & Prestegard, J. H. Order Matrix Analysis of Residual Dipolar Couplings Using Singular Value Decomposition. *J. Magn. Reson.* **138**, 334–342 (1999).
 98. 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.* **120**, 6836–6837 (1998).
 99. Furrer, J., John, M., Kessler, H. & Luy, B. J-Spectroscopy in the presence of residual dipolar couplings: Determination of one-bond coupling constants and scalable resolution. *J. Biomol. NMR* **37**, 231–243 (2007).
 100. Yu, B. *et al.* More accurate $1J_{CH}$ coupling measurement in the presence of $3J_{HH}$ strong coupling in natural abundance. *J. Magn. Reson.* **215**, 10–22 (2012).
 101. Sanders, C. R., Hare, B. J., Howard, K. P. & Prestegard, J. H. Magnetically-oriented phospholipid micelles as a tool for the study of membrane-associated molecules. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **26**, 421–444 (1994).
 102. 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.* **120**, 6836–6837 (1998).
 103. Hallwass, F. *et al.* Residual chemical shift anisotropy (RCSA): A tool for the analysis of the configuration of small molecules. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 9487–9490 (2011).
 104. Liu, Y., Cohen, R. D., Gustafson, K. R., Martin, G. E. & Williamson, R. T. Enhanced measurement of residual chemical shift anisotropy for small molecule structure elucidation. *Chem. Commun.* **54**, 4254–4257 (2018).
 105. Furrer, J., John, M., Kessler, H. & Luy, B. J -Spectroscopy in the presence of residual dipolar couplings : determination of one-bond coupling constants and scalable resolution. *J. Biomol. NMR* **37**, 231–243 (2007).
 106. 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.* **12**, 1957–1965 (2014).
 107. Sessler, J. L. *et al.* Número da patente US005888997A. 43 (1999).

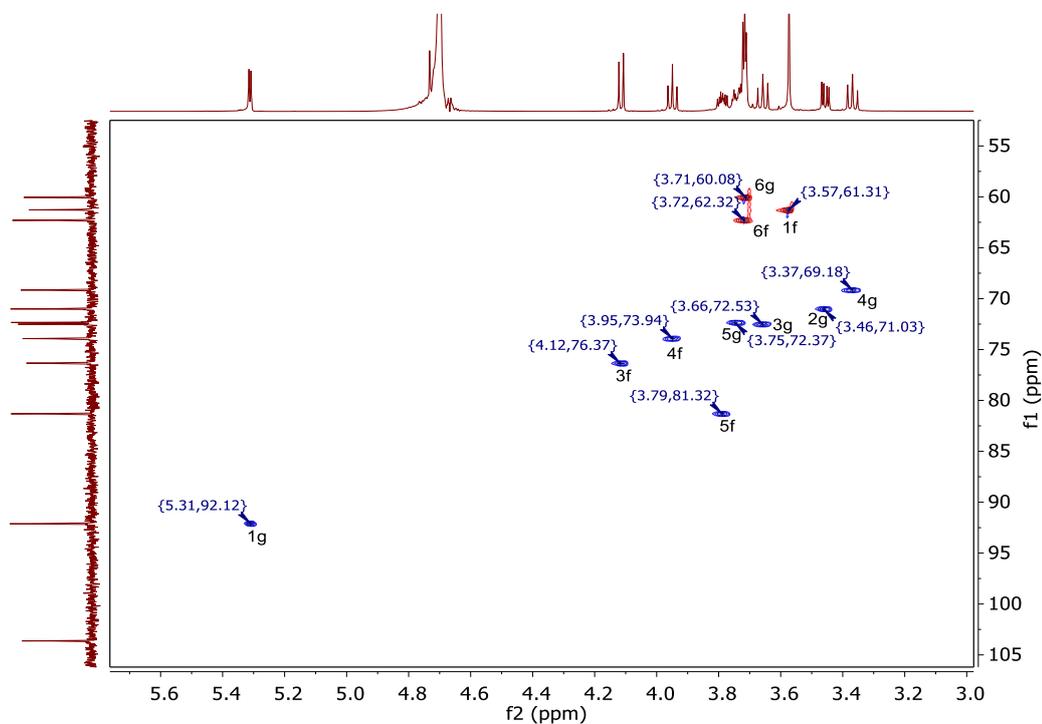
108. Liu, Y., Cohen, R. D., Martin, G. E. & Williamson, R. T. A practical strategy for the accurate measurement of residual dipolar couplings in strongly aligned small molecules. *J. Magn. Reson.* **291**, 63–72 (2018).
109. Liu, Y., Cohen, R. D., Martin, G. E. & Williamson, R. T. A practical strategy for the accurate measurement of residual dipolar couplings in strongly aligned small molecules. *J. Magn. Reson.* **291**, 63–72 (2018).
110. Levitt, M. H. *Spin Dynamics – Basics of Nuclear Magnetic Resonance*. Wiley (2000).
111. Zhao, Y. & Truhlar, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: Two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other function. *Theor. Chem. Acc.* **120**, 215–241 (2008).
112. Tomasi, J., Mennucci, B. & Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* **105**, 2999–3093 (2005).
113. Adamo, C. & Barone, V. Toward chemical accuracy in the computation of NMR shieldings: The PBE0 model. *Chem. Phys. Lett.* **298**, 113–119 (1998).
114. Willoughby, P. H., Jansma, M. J. & Hoyer, T. R. A guide to small-molecule structure assignment through computation of (¹H and ¹³C) NMR chemical shifts. *Nat. Protoc.* **9**, 643–660 (2014).
115. Jensen, F. Basis Set Convergence of Nuclear Magnetic Shielding Constants Calculated by Density Functional Methods. *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 719–727 (2008).
116. Venable, R. M., Delaglio, F., Norris, S. E. & Freedberg, D. I. The utility of residual dipolar couplings in detecting motion in carbohydrates: Application to sucrose. *Carbohydr. Res.* **340**, 863–874 (2005).
117. Stoeckli-Evans, H. Monocrotaline: a pyrrolizidine alkaloid. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* **35**, 231–234 (1979).
118. de Melo Sousa, C. M. *et al.* Effect of the solvent on the conformation of monocrotaline as determined by isotropic and anisotropic NMR parameters. *Magn. Reson. Chem.* 0–3 (2019).

APÊNDICE A– DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIO-X DO TP6EO2M

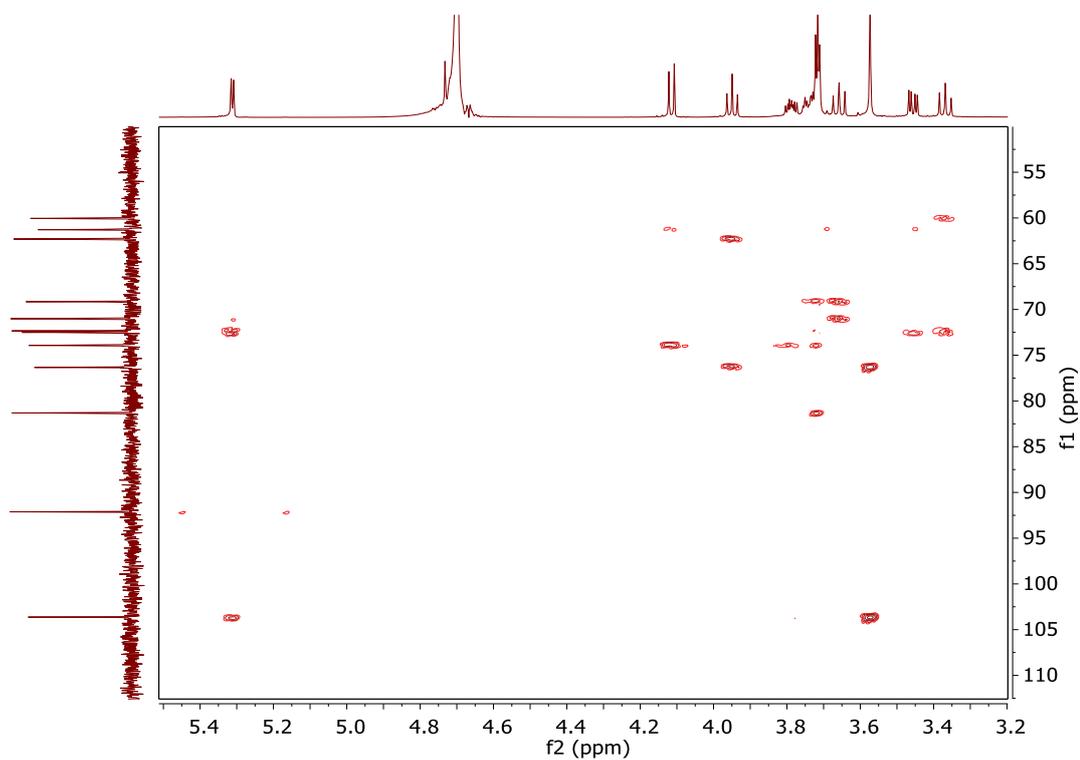
A 1– Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento do TP6EO2M.

Fórmula molecular	$C_{48}H_{72}O_{18}$
Peso molecular	937,05
Temperatura	100,0 K
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	$P 1 2_1/c 1$
a	14,692(3) Å
b	36,423(6) Å
c	9,1388(16) Å
α	90°
β	96,161(5)°
γ	90°
Volume	4862,1(14) Å ³
Z	4
Densidade (calculada)	1,280 Mg/m ³
Coefficiente de absorção	0,097 mm ⁻¹
F(000)	2016
Tamanho do cristal	0,173 x 0,057 x 0,024 mm ³
Faixa do θ	2,181 a 25,455°
Reflexões coletadas	76099
Reflexões independentes	8925 [R(int) = 0,1039]
Completude	100 %
Correção de absorção	Semi-empírico de equivalentes
Max. e min. transmissão	0,7368 e 0,5878
Método de refinamento	Quadrados mínimos da matriz completa em F ²
Dados / restrições / parâmetros	8925 / 0 / 601
Goodness-of-fit on F ²	1,114
Índice final R [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0833$, $wR_2 = 0,1800$
Índices R (todos os dados)	$R_1 = 0,1218$, $wR_2 = 0,1948$
Coefficiente de extinção	n/a

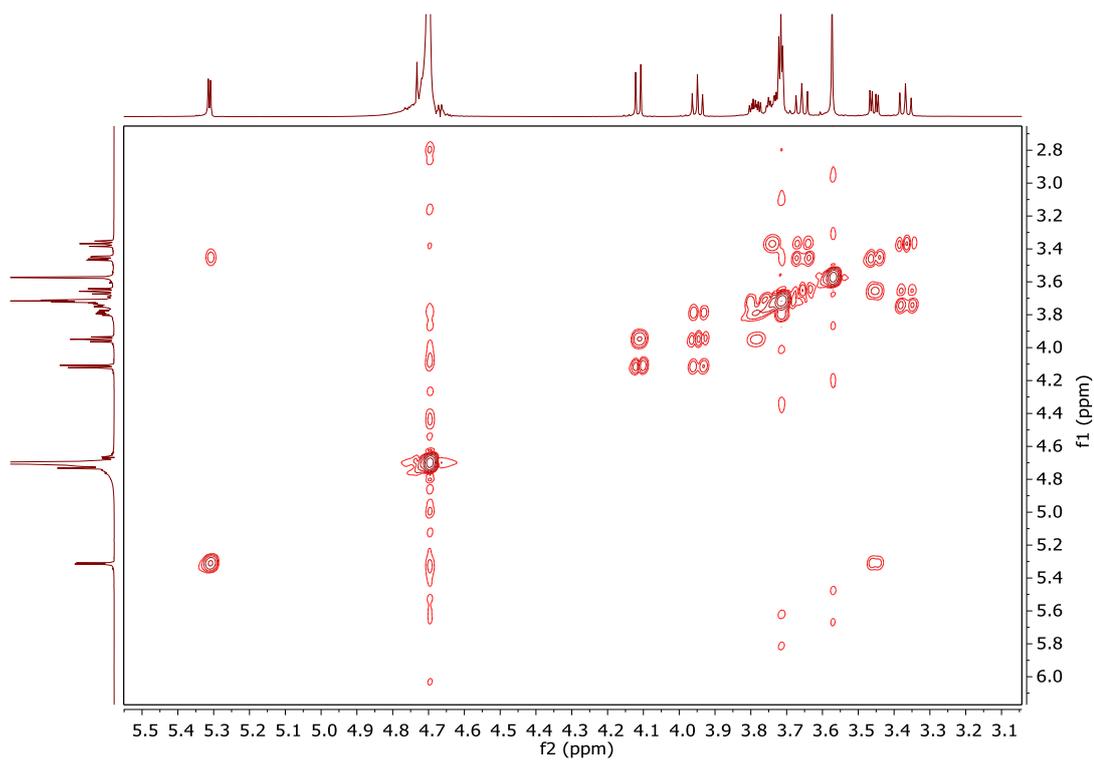
APÊNDICE B– DADOS DE RMN BIDIMENSIONAIS DA SACAROSE,
 CEFUROXIMA E MONOCROTALINA



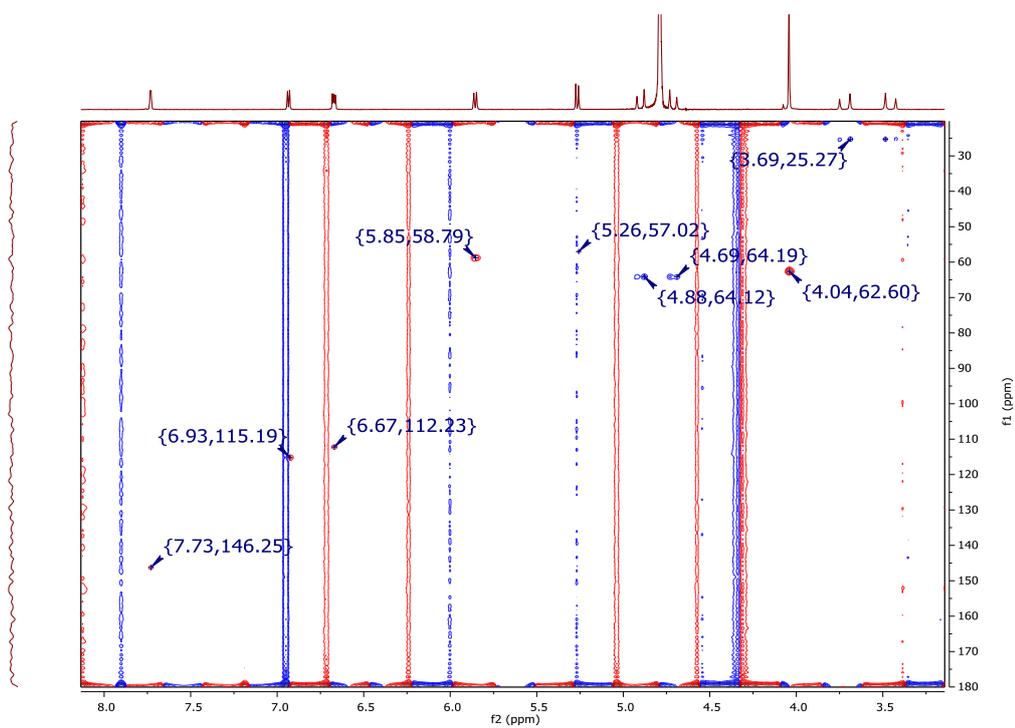
B 1– Espectro de HSQC (campo de 14,1 T) da molécula de sacarose dissolvida em D₂O.



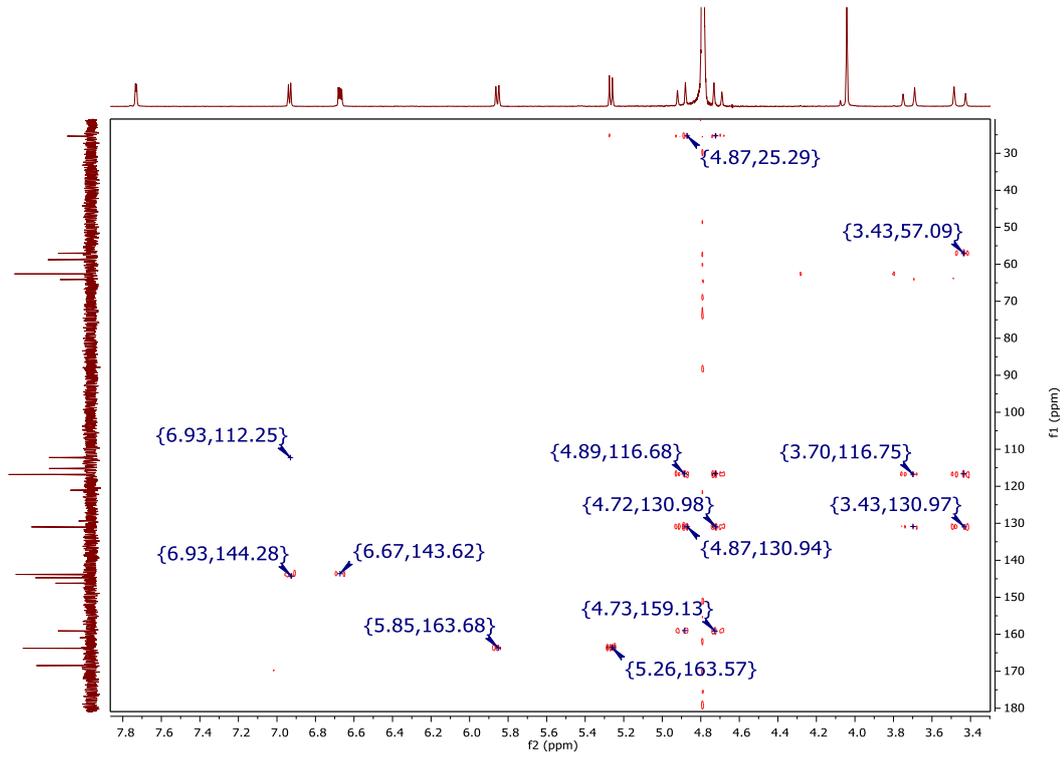
B 2– Espectro de HMBC (campo de 14,1 T) da molécula de sacarose dissolvida em D₂O.



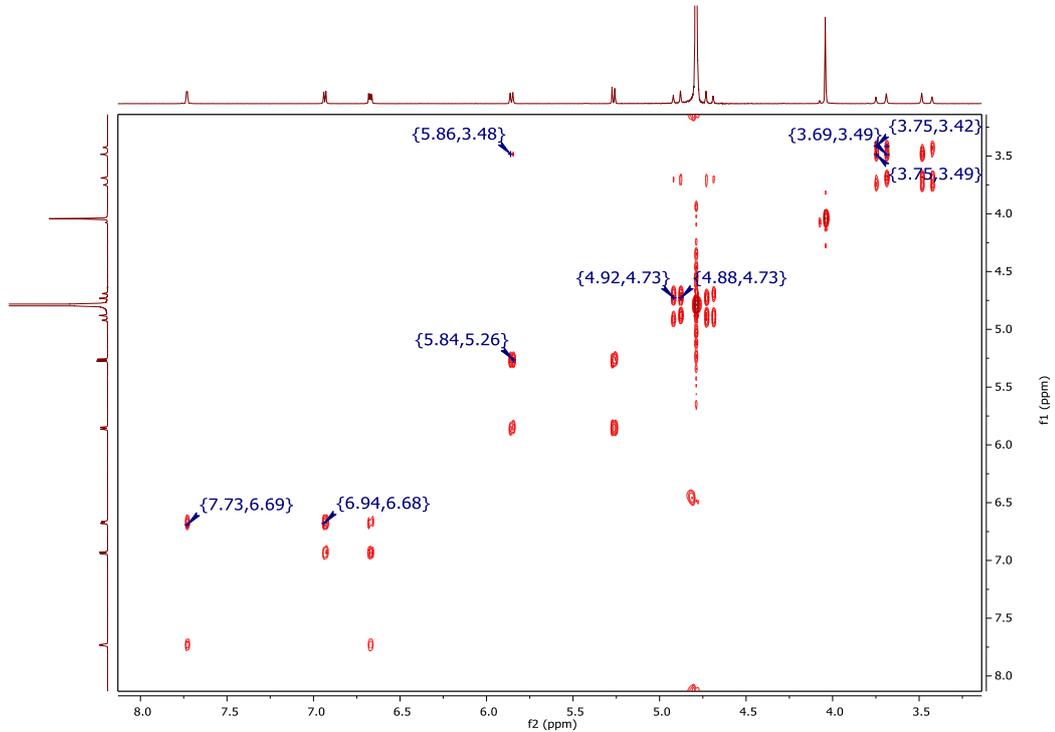
B 3— Espectro COSY (campo de 14,1 T) da molécula de sacarose dissolvida em D₂O.



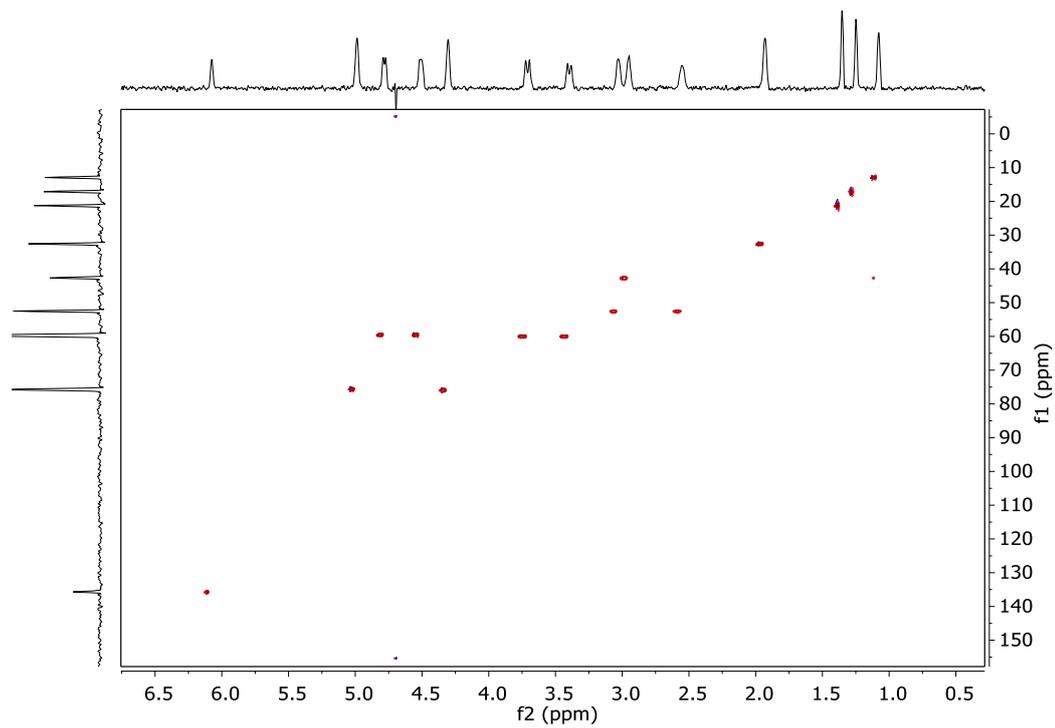
B 4— Espectro de HSQC (campo de 7,0 T) da cefuroxima dissolvida em D₂O.



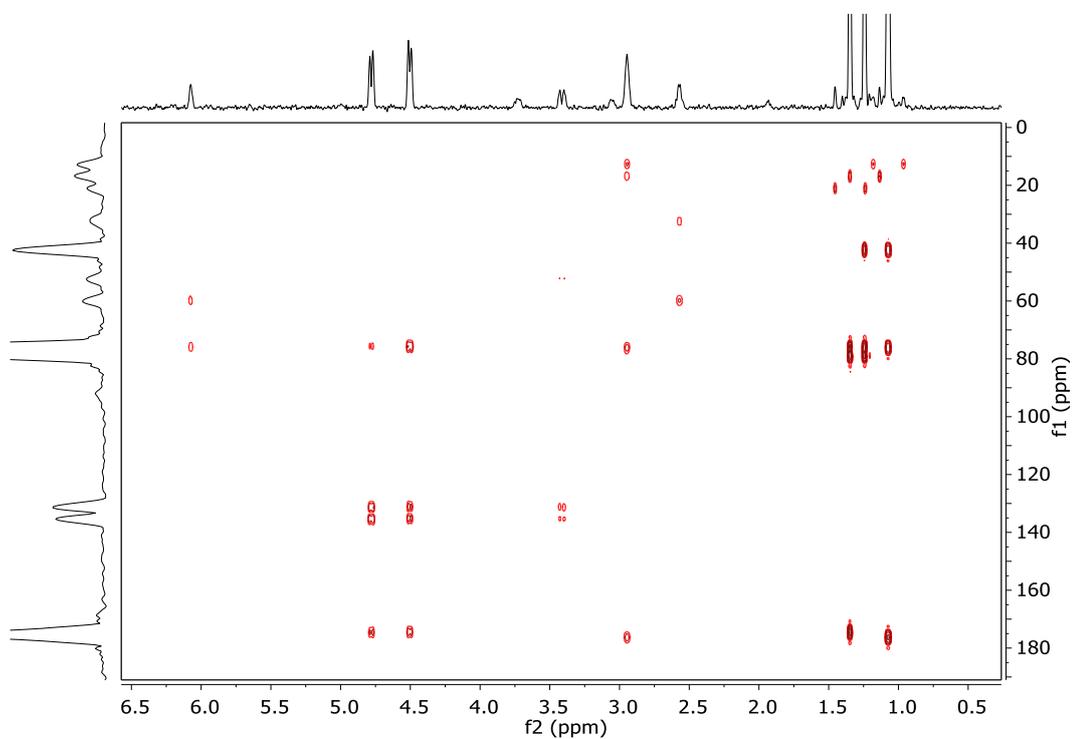
B 5– Espectro de HMBC (campo de 7,0 T) da cefuroxima dissolvida em D₂O.



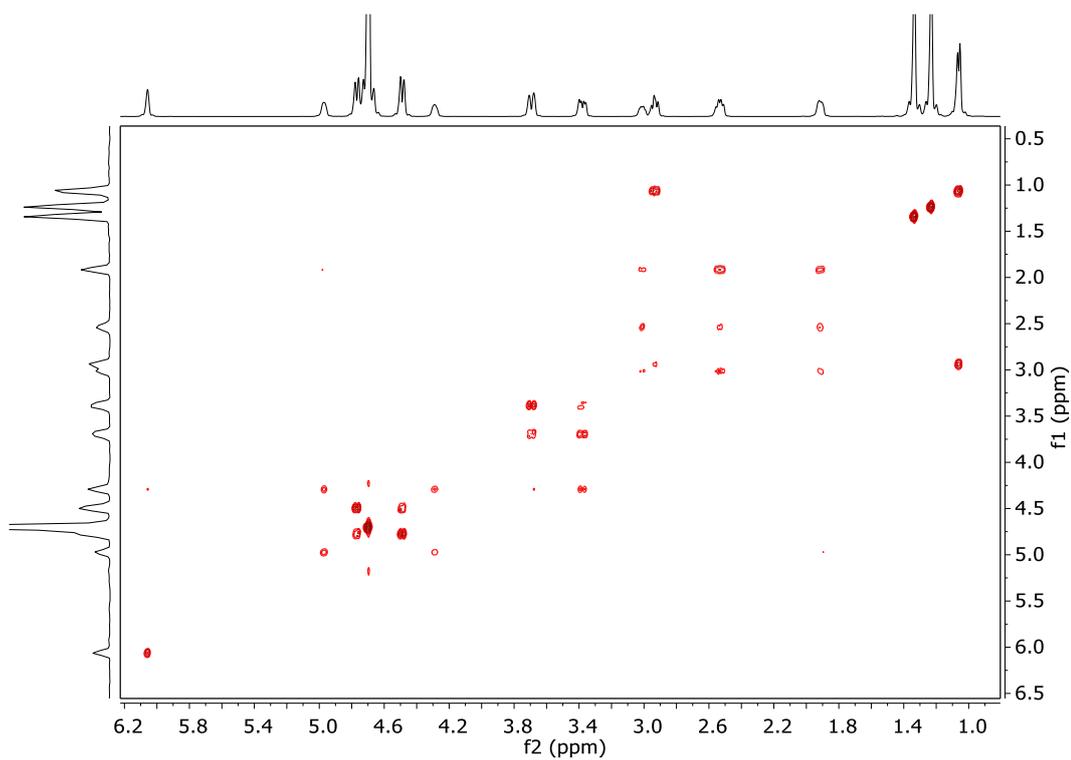
B 6– Espectro COSY (campo de 7,0 T) da cefuroxima dissolvida em D₂O.



B 7– Espectro de HSQC (campo de 14,1 T) da molécula de Monocrotalina dissolvida em D₂O.



B 8– Espectro de HMBC (campo de 14,1 T) da molécula de Monocrotalina dissolvida em D₂O.



B 9– Espectro de HSQC (campo de 14,1 T) da molécula de Monocrotalina dissolvida em D_2O .

**APÊNDICE C– DADOS DE RDC EXPERIMENTAL E CALCULADO DA
SACAROSE OBTIDOS EM TP6EO2M/D₂O**

C 1– RDCs experimental e calculado para sacarose em TP6EO2M/D₂O com os valores de Q, AIC, χ^2 , $\frac{\chi^2}{N_{RDC}}$, porcentagem populacional dos conformeros para cada permutação e ângulos torsonais Φ e Ψ . Combinação M2-S2

Permutação	P ₁		P ₂		P ₃		P ₄	
Confórmero (% população)	47 (34 %) $\Phi = 81,14^\circ$ $\Psi = 180,66^\circ$		65 (60 %) $\Phi = 108,77^\circ$ $\Psi = 313,76^\circ$		275 (54 %) $\Phi = 65,06^\circ$ $\Psi = 286,52^\circ$		21 (53 %) $\Phi = 79,58^\circ$ $\Psi = 178,46^\circ$	
	164 (66 %) $\Phi = 99,14^\circ$ $\Psi = 51,84^\circ$		285 (40 %) $\Phi = 64,87^\circ$ $\Psi = 286,75^\circ$		317 (44 %) $\Phi = 106,37^\circ$ $\Psi = 314,35^\circ$		83 (47 %) $\Phi = 64,75^\circ$ $\Psi = 280,86^\circ$	
$\frac{\chi^2}{N_{RDC}}$	65,17		7,67		87,45		74,32	
χ^2	782,02		812,04		1049,36		891,86	
AIC	784,02		814,04		1051,36		893,86	
Q	0,178		0,181		0,206		0,190	
RDC experimental e calculado	RDC _{exp}	RDC _{cal}	RDC _{exp}	RDC _{cal}	RDC _{exp}	RDC _{cal}	RDC _{exp}	RDC _{cal}
C _{1g} -H _{1g}	-10,2	-18,19	-10,2	-12,12	-10,2	-4,21	-10,2	-5,64
H _{1g} -H _{2g}	59,5	45,1	59,5	41,14	59,5	43,22	59,5	36,09
C _{3g} -H _{3g}	-5,39	1,67	-5,39	-3,72	-5,39	-5,35	-5,39	-10,87
C _{4g} -H _{4g}	5,84	-1,56	5,84	5,73	5,84	4,51	5,84	12,94
C _{6g} -H _{6g} (CH ₂)	9,49	22,57	9,49	16,47	9,49	5,94	9,49	6,98
H _{6g} -H _{6g}	51,32	54,42	-51,32	-57,6	51,32	58,91	-51,32	-56,15
C _{1f} -H _{1f} (CH ₂)	30,93	13,66	30,93	37,16	30,93	13,53	30,93	34,35
H _{1f} -H _{1f}	40,65	39,49	40,65	30,44	-40,65	-27,12	-40,65	-45,7
C _{3f} -H _{3f}	48,22	56,02	48,22	35,1	48,22	37,05	48,22	40,48
C _{4f} -H _{4f}	33,12	33,25	33,12	19,67	33,12	16	33,12	11,2
C _{5f} -H _{5f}	-152,26	-149,91	-152,26	-157,72	-152,26	-161,19	-152,26	-156,51
C _{6f} -H _{6f} (CH ₂)	0,41	14,68	0,41	-14,14	0,41	12,85	0,41	3,53

AIC: Critério de informação de Akaike; Q: Fator de qualidade de Colinescu; Φ é definido pelos átomos O_g-C_{1g}-O-C_{2f}; Ψ é definido pelos átomos O_f-C_{2f}-O-C_{1g}.

C 1– Continuação.

Permutação	P ₅		P ₆		P ₇		P ₈	
Confórmero (% população)	35 (26 %) Φ = 92,53° Ψ = 339,51°		24 (67 %) Φ = 104,02° Ψ = 312,76°		127 (41 %) Φ = 101,51° Ψ = 73,8°		195 (46 %) Φ = 93,63° Ψ = 198,30°	
	224 (74 %) Φ = 89,2° Ψ = 317,69°		155 (33 %) Φ = 99,48° Ψ = 209,17°		335 (59 %) Φ = 115,57° Ψ = 305,22°		331 (54 %) Φ = 113,34° Ψ = 323,60°	
$\frac{\chi^2}{N_{RDC}}$	15,26		36,08		54,19		77,77	
χ^2	183,10		432,93		650,29		933,27	
<i>AIC</i>	185,10		434,93		652,29		935,27	
<i>Q</i>	0,085		0,130		0,160		0,192	
RDC experimental e calculado	RDC _{exp}	RDC _{cal}	RDC _{exp}	RDC _{cal}	RDC _{exp}	RDC _{cal}	RDC _{exp}	RDC _{cal}
C _{1g} -H _{1g}	-10,2	-11,48	-10,2	-8,06	-10,2	-4,7	-10,2	-6,21
H _{1g} -H _{2g}	-67,24	-73,12	-67,24	-56,24	-67,24	-55,49	-67,24	-53,06
C _{3g} -H _{3g}	-5,39	3,34	-5,39	-1,85	-5,39	-11,58	-5,39	-2,06
C _{4g} -H _{4g}	5,84	-2,78	5,84	3,02	5,84	15,38	5,84	-1,12
C _{6g} -H _{6g} (CH ₂)	9,49	7,79	9,49	11,54	9,49	-8,61	9,49	25,25
H _{6g} -H _{6g}	51,32	46,83	-51,32	-58,27	51,32	59,17	-51,32	-58,52
C _{1f} -H _{1f} (CH ₂)	30,93	28,37	30,93	31,01	30,93	27,61	30,93	24,69
H _{1f} -H _{1f}	40,65	45,39	40,65	49,08	-40,65	-37,77	-40,65	-48,98
C _{3f} -H _{3f}	48,22	45,83	48,22	61,61	48,22	44,55	48,22	62,01
C _{4f} -H _{4f}	33,12	36	33,12	41,7	33,12	27,46	33,12	46,35
C _{5f} -H _{5f}	-152,26	-149,48	-152,26	-142,57	-152,26	-153,44	-152,26	-138,71
C _{6f} -H _{6f} (CH ₂)	0,41	2,18	0,41	-2,23	0,41	-13,13	0,41	10,9

AIC: Critério de informação de Akaike; *Q*: Fator de qualidade de Colinescu; Φ é definido pelos átomos O_g-C_{1g}-O-C_{2f}; Ψ é definido pelos átomos O_f-C_{2f}-O-C_{1g}.

APÊNDICE D– INPUT DA SACAROSE E CEFUROXIMA

D 1– Input da sacarose (RDCs e RCSAs) obtido no sistema TP6EO2M/D₂O e implementado no MagNes.

Input sacarose (Permutação 1)	Input sacarose (Permutação 2)	Input sacarose (Permutação 3)	Input sacarose (Permutação 4)
<code>rdc_data { #1g CH 12 13 -10.2</code>			
<code>#1gH 2gH 11 13 59.50</code>			
<code>#3g CH 8 9 -5.39</code>			
<code>#4g CH 6 7 5.84</code>			
<code>#6g CH2 (3,4) (3,5) 9.49</code>			
<code>#6gH 6gH 4 5 51.32</code>	<code>#6gH 6gH 4 5 -51.32</code>	<code>#6gH 6gH 4 5 51.32</code>	<code>#6gH 6gH 4 5 -51.32</code>
<code>#1f CH2 (24,25) (24,26) 30.93</code>			
<code>#1fH 1fH 25 26 40.65</code>	<code>#1fH 1fH 25 26 40.65</code>	<code>#1fH 1fH 25 26 -40.65</code>	<code>#1fH 1fH 25 26 -40.65</code>
<code>#3f CH 19 20 48.22</code>			
<code>#4f CH 17 18 33.12</code>			
<code>#5f CH 15 16 -152.26</code>			
<code>#6f CH2 (21,22) (21,23) 0.41 }</code>			
<code>superimpose { true }</code>	<code>superimpose { true }</code>	<code>superimpose { true }</code>	<code>superimpose { true }</code>
<code>superimpose_atoms { 1,6,8,10,12,27 }</code>	<code>superimpose_atoms { 1,6,8,10,12,27 }</code>	<code>superimpose_atoms { 1,6,8,10,12,27 }</code>	<code>superimpose_atoms { 1,6,8,10,12,27 }</code>
<code>max_conformations { 2 }</code>	<code>max_conformations { 2 }</code>	<code>max_conformations { 2 }</code>	<code>max_conformations { 2 }</code>
<code>rdc_standard_error { 1.2 }</code>	<code>rdc_standard_error { 1.2 }</code>	<code>rdc_standard_error { 1.2 }</code>	<code>rdc_standard_error { 1.2 }</code>

Input sacarose (Permutação 5)	Input sacarose (Permutação 6)	Input sacarose (Permutação 7)	Input sacarose (Permutação 8)
rdc_data { #1g CH 12 13 -10.2			
#1gH 2gH 11 13 -67.24			
#3g CH 8 9 -5.39			
#4g CH 6 7 5.84			
#6g CH2 (3,4) (3,5) 9.49			
#6gH 6gH 4 5 51.32	#6gH 6gH 4 5 -51.32	#6gH 6gH 4 5 51.32	#6gH 6gH 4 5 -51.32
#1f CH2 (24,25) (24,26) 30.93			
#1fH 1fH 25 26 40.65	#1fH 1fH 25 26 40.65	#1fH 1fH 25 26 -40.65	#1fH 1fH 25 26 -40.65
#3f CH 19 20 48.22			
#4f CH 17 18 33.12			
#5f CH 15 16 -152.26			
#6f CH2 (21,22) (21,23) 0.41 }			
superimpose { true }	superimpose { true }	superimpose { true }	superimpose { true }
superimpose_atoms { 1,6,8,10,12,27 }	superimpose_atoms { 1,6,8,10,12,27 }	superimpose_atoms { 1,6,8,10,12,27 }	superimpose_atoms { 1,6,8,10,12,27 }
max_conformations { 2 }	max_conformations { 2 }	max_conformations { 2 }	max_conformations { 2 }
rdc_standard_error { 1.2 }	rdc_standard_error { 1.2 }	rdc_standard_error { 1.2 }	rdc_standard_error { 1.2 }

Input sacarose (Permutação 1)	Input sacarose (Permutação 2)	Input sacarose (Permutação 3)	Input sacarose (Permutação 4)
rdc_data { #1g CH 12 13 -10.2	dc_data { #1g CH 12 13 -10.2	rdc_data { #1g CH 12 13 -10.2	rdc_data { #1g CH 12 13 -10.2
#1gH 2gH 11 13 59.50			
#3g CH 8 9 -5.39			
#4g CH 6 7 5.84			
#6g CH2 (3,4) (3,5) 9.49			
#6gH 6gH 4 5 51.32	#6gH 6gH 4 5 -51.32	#6gH 6gH 4 5 51.32	#6gH 6gH 4 5 -51.32
#1f CH2 (24,25) (24,26) 30.93			
#1fH 1fH 25 26 40.65	#1fH 1fH 25 26 40.65	#1fH 1fH 25 26 -40.65	#1fH 1fH 25 26 -40.65
#3f CH 19 20 48.22			
#4f CH 17 18 33.12			
#5f CH 15 16 -152.26			
#6f CH2 (21,22) (21,23) 0.41 }			
superimpose { true }	superimpose { true }	superimpose { true }	superimpose { true }
superimpose_atoms { 1,6,8,10,12,27 }	superimpose_atoms { 1,6,8,10,12,27 }	superimpose_atoms { 1,6,8,10,12,27 }	superimpose_atoms { 1,6,8,10,12,27 }
max_conformations { 1 }	max_conformations { 1 }	max_conformations { 1 }	max_conformations { 1 }
rdc_standard_error { 1.2 }	rdc_standard_error { 1.2 }	rdc_standard_error { 1.2 }	rdc_standard_error { 1.2 }

Input sacarose (Permutação 5)	Input sacarose (Permutação 6)	Input sacarose (Permutação 7)	Input sacarose (Permutação 8)
rdc_data { #1g CH 12 13 -10.2			
#1gH 2gH 11 13 -67.24			
#3g CH 8 9 -5.39			
#4g CH 6 7 5.84			
#6g CH2 (3,4) (3,5) 9.49			
#6gH 6gH 4 5 51.32	#6gH 6gH 4 5 -51.32	#6gH 6gH 4 5 51.32	#6gH 6gH 4 5 -51.32
#1f CH2 (24,25) (24,26) 30.93			
#1fH 1fH 25 26 40.65	#1fH 1fH 25 26 40.65	#1fH 1fH 25 26 -40.65	#1fH 1fH 25 26 -40.65
#3f CH 19 20 48.22			
#4f CH 17 18 33.12			
#5f CH 15 16 -152.26			
#6f CH2 (21,22) (21,23) 0.41 }			
superimpose { true }	superimpose { true }	superimpose { true }	superimpose { true }
superimpose_atoms { 1,6,8,10,12,27 }	superimpose_atoms { 1,6,8,10,12,27 }	superimpose_atoms { 1,6,8,10,12,27 }	superimpose_atoms { 1,6,8,10,12,27 }
max_conformations { 1 }	max_conformations { 1 }	max_conformations { 1 }	max_conformations { 1 }
rdc_standard_error { 1.2 }	rdc_standard_error { 1.2 }	rdc_standard_error { 1.2 }	rdc_standard_error { 1.2 }

Input Sacarose**rca_data {**#1g CH
12 -0.035#2g CH
10 -0.007#3g CH
8 0.009#4g CH
6 -0.038#5g CH
1 0.013#1f CH2
24 -0.019#2f C
14 0.064#3f CH
19 -0.055#4f CH
17 -0.032#5f CH
15 -0.024#6f CH2
21 0.062
}rca_reference {
3
}superimpose {
true
}superimpose_atoms {
1,6,8,10,12,27
}**max_conformations {**
2
}**Input Sacarose****rca_data {**#1g CH
12 -0.035#2g CH
10 -0.007#3g CH
8 0.009#4g CH
6 -0.038#5g CH
1 0.013#1f CH2
24 -0.019#2f C
14 0.064#3f CH
19 -0.055#4f CH
17 -0.032#5f CH
15 -0.024#6f CH2
21 0.062
}rca_reference {
3
}superimpose {
true
}superimpose_atoms {
1,6,8,10,12,27
}**max_conformations {**
1
}

D 2– Input da cefuroxima (RCSAs) obtidos no sistema TP6EO2M/D₂O e implementados no MagNes.

```

Input Cefuroxima      true      Input Cefuroxima      }
rcsa_data {          }      rcsa_data {          }
#C1                    }      #C1                    superimpose_atoms {
19 1.445               superimpose_atoms {    19 1.445             1,2,3,5
                       1,2,3,5      }
#C2                    }      #C2                    }
21 -0.16              }      21 -0.16             max_conformations {
                       }      1
max_conformations {    }      #C3                    }
#C3                    2      #C3                    }
23 -0.36              }      23 -0.36
#C4                    }      #C4                    }
26 -0.618             }      26 -0.618
#C5                    }      #C5                    }
29 -0.608             }      29 -0.608
#C6                    }      #C6                    }
28 -0.208             }      28 -0.208
#C7                    }      #C7                    }
25 0.668              }      25 0.668
#C8                    }      #C8                    }
1 0.708               }      1 0.708
#C9                    }      #C9                    }
3 -0.505              }      3 -0.505
#C10                   }      #C10                   }
5 0.016               }      5 0.016
#C11 ref              }      #C11 ref
#C12                   }      #C12                   }
9 1.563               }      9 1.563
#C13                   }      #C13                   }
6 1.504               }      6 1.504
#C14                   }      #C14                   }
10 0.189              }      10 0.189
#C15                   }      #C15                   }
12 0.068              }      12 0.068
#C16                   }      #C16                   }
16 0.170              }      16 0.170
}
rcsa_reference {      }      rcsa_reference {
11                    }      11
}
superimpose {         }      superimpose {
true                  }

```