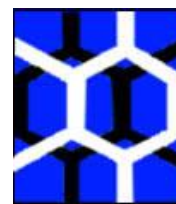


UFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



IQB

DANIEL INÁCIO DE LIMA

IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS NA QUÍMICA DE PRODUTOS
NATURAIS POR TÉCNICAS DE RMN

Maceió

2013

DANIEL INÁCIO DE LIMA

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS NA QUÍMICA DE PRODUTOS
NATURAIS POR TÉCNICAS DE RMN**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do Título de Doutor na área de Química.

Orientador: Prof. Dr. Edson de Souza Bento

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart
Sant'Ana

Maceió-AL

2013

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

L732c Lima, Daniel Inácio de.
 Identificação de compostos orgânicos na química de produtos naturais
 por técnicas de RMN / Daniel Inácio de Lima, 2013.
 111 f. : il. gráfs. tabs.

 Orientador: Edson de Souza Bento.
 Coorientador: Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.
 Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de
 Alagoas. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Maceió, 2013.

 Bibliografia: f. 108-111.

 1. Ressonância Magnética Nuclear. 2. Produtos Naturais. 3. *Melloa*
 quadrivalvis. 4. *Serjania lethalis*. 5. *Curvularia eragrostidis*. I. Título.

CDU: 547.9



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **Daniel Inácio de Lima**, intitulada: **“Identificação de Compostos Orgânicos na Química de Produtos Naturais por Técnicas de RMN”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 02 de outubro de 2013, às 09 horas, na Sala de Reuniões IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Edson de Souza Bento
Orientador - PPGQB/IQB/UFAL

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
Coorientador - PPGQB/IQB/UFAL

Prof. Dr. Fernando Hallwass
UFC

Prof.ª Dr.ª Josiane de Souza Luna
IFAL

Prof. Dr. Ricardo Porto
IQB/UFAL

Prof.ª Dr.ª Maria Raquel Ferreira de Lima
IQB/UFAL

Ao Grande Deus e aos seus enviados que me acompanharam durante toda a jornada.

À minha esposa, Elisângela, pelo grande apoio e companheirismo constante,

Aos meus cinco filhos: Phiama, Thiago, Marielle, Daniela e Maria Helena que muitas vezes foram privados da minha companhia,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor DR. Edson de Souza Bento pela orientação, paciência e amizade;

Ao Professor Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, , pela coorientação, pelo conhecimento transmitido, pela amizade e apoio;

Ao Professor Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti, pelo apoio, conhecimentos transmitidos, por ter iniciado a orientação e pela amizade;

Aos Professores da Pós-Graduação, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade;

Ao Adilson e aos demais companheiros de laboratório e amigos da Universidade Federal de Alagoas;

Aos amigos do laboratório de ensino: Isis Souza, Júlio, Karen e Cida pelo apoio e compreensão sempre quando necessário;

À Edjane e ao Professor Dr. Gauss Andrade, pelas amostras cedidas;

À minha mãe e ao meu pai, por terem aberto mão, em um ato de amor para que eu pudesse crescer;

À minha família por sempre ter acreditado em mim;

Aos amigos que torceram por mim, meus sinceros agradecimentos.

A CAPES pela bolsa de Doutorado.

RESUMO

A identificação estrutural de substâncias orgânicas sempre foi um desafio para a química, desde o seu surgimento como ciência. Inicialmente as técnicas empregadas induziam a erro, pois empregavam técnicas destrutivas que geravam derivados que nada tinham a ver com a substância de partida. A partir da metade do século XX houve uma evolução da espectroscopia e da espectrometria, juntamente com novas metodologias de isolamento e de purificação, aumentando a confiabilidade dos resultados obtidos. A espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica muito usada no estudo estrutural e na dinâmica de compostos orgânicos em solução. A RMN além de ser uma técnica empregada na determinação estrutural, pode também ser aplicada no acompanhamento de reações de síntese. Este trabalho teve como objetivo a identificação de compostos orgânicos na Química de Produtos Naturais por técnicas de RMN uni e bidimensionais. Foram estudados metabólitos da casca do tronco de *Melloa quadrivalvis*, uma planta da família das *Bignoniaceae* conhecida como cipó de cesto, onde foi feita elucidação estrutural de um composto, um flavonoide glicosilado. Foram ainda estudadas duas frações isoladas de *Serjania lethalis* St. Hil, sendo identificados e quantificados por RMN, uma mistura de sitosterol glicosilado e estigmasterol, em uma das frações, e na outra fração, a estrutura de uma saponina foi elucidada. Adicionalmente, foi feito estudo de metabólitos secundários de *Curvularia eragrostidis* (Henn.) Meyer, um fungo que é um dos responsáveis pela queima da folha do inhame e pode causar a perda total de uma produção.

Palavras-chave: Ressonância Magnética Nuclear. Produtos Naturais. *Melloa quadrivalvis*. *Serjania lethalis*. *Curvularia eragrostidis*.

ABSTRACT

The structural identification of organic substances has always been a challenge for chemistry, since its emergence as a science. Initially, the techniques employed induced error, because it used destructive techniques to generate derivatives that had nothing to do with the starting material. From the mid-twentieth century there was an evolution of spectroscopy and spectrometry, along with new methods of isolation and purification, increasing the reliability of the results. Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR) is a technique widely used to study the structure and dynamic of organic compounds in solution. The NMR technique is not only used in structural determination, but also to track the performance of a synthetic reaction. The present study aimed the identification of organic compounds in the Chemistry of Natural Products by uni- and bi-dimensional NMR. We studied metabolites from *Melloa quadrivalvis*, a plant of the *Bignoniaceae* family, known as vine basket, through the structural elucidation of a compound, one flavonoid glycoside. The study was conducted in two fractions isolated from *Serjania lethalis* St. Hil, and it was possible to identify and quantify by NMR, a mixture of sitosterol and stigmasterol glycoside, in one of the fractions. The analysis of the NMR spectra of a compound isolated from the other fraction of *Serjania* gave evidence for a saponin structure. Additionally, a study was made on secondary metabolites from *Curvularia eragrostidis* (Henn.) Meyer, a fungus that is responsible for burning the yam leaf and can cause total loss of production.

Keywords: Nuclear Magnetic Resonance. Natural Products. *Melloa quadrivalvis*. *Serjania lethalis*. *Curvularia eragrostidis*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - a). Núcleo de hidrogênio sofrendo precessão em um campo magnético B_0 . O eixo magnético terá um movimento de precessão ao redor do eixo z alinhado com o campo magnético B_0 . Figura 1b) Número quântico de spin dos núcleos de $^1\text{H}_1$ ($I = 1/2$) e $^2\text{H}_1$ ($I = 1$) quando colocados em um campo B_0 . 21
- Figura 2 - Núcleos de hidrogênio colocados em um campo magnético e comparação com barras de ímãs. 22
- Figura 3 - Níveis de energia dos núcleos de hidrogênio em um campo magnético B_0 . N_β representa a população no estado de energia mais alta, N_α população no estado energético mais baixo. 23
- Figura 4 - Variação entre os níveis de energia dos estados de spin para o hidrogênio em função da potência do campo magnético aplicado (B_0). 24
- Figura 5 - Conjunto de núcleos em movimento de precessão com magnetização resultante M_0 na direção do campo magnético estacionário B_0 . 25
- Figura 6 - (a e b) O oscilador gera um componente rotacional de campo magnético aplicado B_1 . A magnetização resultante M_0 é empurrada para M , que sofre precessão em torno do eixo z, gerando um componente de magnetização no plano horizontal. (c) a relaxação longitudinal de M a M_0 segue uma espiral decrescente. A relaxação transversal T_2 (fora de fase) foi omitida. As coordenadas cartesianas estão fixas. 26
- Figura 7 - A relaxação de T_2 faz M diminuir no plano xy e ocorre transferência de energia para o plano z. 27
- Figura 8 - (a) Espectro em função do tempo (FID) e em função da frequência (FT) de hidrogênios da acetona. (b) Espectro FID e FT de hidrogênios do acetato de etila. Ambos em CDCl_3 em 300 MHz 27
- Figura 9 - No centro: escala de deslocamento químico para hidrogênio. No alto: como calcular o deslocamento químico de acordo com a frequência do aparelho. 31
- Figura 10 - Espectro de RMN ^1H de acetato de etila mostrando as correlações e multiplicidade dos sinais. 32
- Figura 11 - Acoplamento spin-spin entre dois hidrogênios com deslocamentos químicos muito diferentes. 33
- Figura 12 - Triângulo de Pascal. Intensidades relativas dos multipletos de primeira ordem; n = número de núcleos equivalentes de spin $1/2$ que se acoplam (para núcleos de hidrogênio). 33

Figura 13 - Quarteto, dupletto de dupletto, pseudo triplete e dupletto de dupletto de dupletto.	34
Figura 14 - Um sistema com dois tipos de spin AB com a diminuição da diferença dos deslocamentos químicos e um grande valor J (10 Hz).	34
Figura 15 - Espectro parcial de alguns fragmentos estruturais com sistema A_mX_n .	35
Figura 16 - Na estrutura 1 observam-se dois hidrogênios muito próximos em uma estrutura fechada. Quando o hidrogênio HA sofre uma segunda irradiação, o seu sinal de RMN pode ser suprimido e causa um aumento na intensidade do hidrogênio HB; Na estrutura 2 a irradiação nos hidrogênios das metilas indicadas causa um aumento na intensidade do hidrogênio do grupo formila conforme setas; Em 3 observamos efeitos semelhantes com a estrutura 2	36
Figura 17 - Molécula de 4-nitroanisol.	37
Figura 18 - Átomos de hidrogênio Enantiotópicos e Diasteretópicos.	38
Figura 19 - Molécula do ipsenol. Observa-se que os hidrogênios dos grupos metilênicos 3 e 5 e as metilas 1 e 9 podem apresentar deslocamento químico diferente.	39
Figura 20 - Sequência padrão de pulsos para o desacoplamento de hidrogênio no espectro de ^{13}C . Rd é o tempo de espera para relaxação; θ é o ângulo variável de pulso e $t2$ é o tempo de aquisição do sinal.	40
Figura 21 - Alguns grupos funcionais faixas de deslocamento químico provável.	41
Figura 22 - Alguns grupos funcionais e comparação das faixas de deslocamento químico de ^1H e de ^{13}C .	42
Figura 23 - Espectros de alguns compostos pertencentes a classes de produtos naturais diferentes.	43
Figura 24 - (a) Espectro de ^{13}C com desacoplamento padrão do ipsenol em CDCl_3 , em 75,5 MHz. (b) Subespectro DEPT: DEPT 135° CH e CH_3 para cima e CH_2 para baixo. (c) DEPT 90° somente CH	45
Figura 25 - Intensidade do sinal de ^{13}C versus ângulo de fase para uma série de espectros DEPT. Observe que a 45° todos os sinais de carbono têm sinal positivo, em 90° apenas carbonos terciários possuem sinal e para 135° carbonos secundários têm sinal negativo e carbonos primários e terciários têm sinal positivo.	45
Figura 26 - a) Espectro COSY simples do ipsenol; b) espectro DFQ-COSY.	47

Figura 27 - Espectro parcial NOESY do α -pineno mostrando correlação dos sinais de 1,27 com 2,34 ppm, como forma de estabelecer geometria da molécula. Fonte:	48
Figura 28 - Espectro TOCSY2-D da β -lactose. As linhas de correlação e algumas correlações são dadas como ajuda para a interpretação.	50
Figura 29 - Estrutura básica dos flavonoides, em (a) é mostrado sistema de numeração.	51
Figura 30 - Anel A de flavonoide substituído nas posições 5 e 7.	52
Figura 31 - Anel A de flavonoide substituído nas posições 5, 6 e 7 e nas posições 5, 7 e 8.	52
Figura 32 - Fragmento de flavonoide mostrando ligação de hidrogênio intramolecular.	53
Figura 33 - Anel B de flavonoide substituído em 4'. R = O ou Me.	53
Figura 34 - Anel B de flavonoide substituído em 3', 4' e 5'. R = O ou Me.	54
Figura 35 - Anel B de flavonoide substituído em 4' e 5'. R = O ou Me.	54
Figura 36 - Esqueleto básico de um esteroide.	55
Figura. 37 - Constantes de acoplamento para a glicose e ângulo de diedro de acordo com a conformação α ou β e Curva de Karplus.	57
Figura 38 - Exemplos de esqueletos de esteroide e triterpenos presentes em saponinas.	59
Figura 39 - R = CH ₃ : β -amirina; R = CO ₂ CH ₃ : oleanolato de metila.	60
Figura 40 - R = CH ₃ : α -amirina; R = CO ₂ CH ₃ : ursolato de metila.	62
Figura 41 - Fragmento da substância presente na fração Mq-13	66
Figura 42 - Fragmento da substancia presente na fração Mq-13 mostrando ligação de hidrogênio intramolecular.	66
Figura 43 - Estrutura preliminar da flavona, presente em Mq-13.	67
Figura 44 - Espectro de RMN de ¹ H com expansão da amostra Mq - D.	68
Figura 45 - Comparação dos espectros de RMN de ¹ H com expansão da região 4,2 a 5,6 ppm. Experimento superior realizado em DMSO/D ₂ O e inferior realizado em DMSO/MeOD	69

Figura 46 - Expansões do espectro de RMN de ^1H compreendendo as seguintes regiões: a) de 5,0 a 7,92 ppm; b) de 6,50 a 7,92 ppm e c) de 2,70 a 3,90 ppm.	70
Figura 47 - Sobreposição dos espectros de carbono ^{13}C e DEPT – 135 da amostra Mq-13.	72
Figura 48 - Expansão do espectro de correlação heteronuclear ($^{13}\text{C} - ^1\text{H}$) HMBC de Mq-13 mostrando principais correlações.	74
Figura 49 - Estrutura da flavona mostrando correlações do HMBC.	74
Figura 50 - Estrutura da flavona presente em Mq-13.	75
Figura 51 - Mapa de contorno TOCSY.	76
Figura 52 - Mapa de contorno NOESY mostrando as principais correlações.	77
Figura 53 - Estrutura do flavonoide com as correlações espaciais obtidas do NOESY.	77
Figura 54 - Esqueleto oleanano com sistema de numeração.	79
Figura 55 - Espectro de RMN ^1H da amostra SLR em MeOD.	80
Figura 56 - (a) Expansão do espectro de RMN de ^1H da região correspondente aos sinais de metilas da amostra SLR; (b) Expansão do espectro de RMN de ^1H da região correspondente aos sinais de hidrogênios anoméricos de açúcares da amostra SLR.	81
Figura 57 - Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135 da amostra SLR sobrepostos mostrando correlações.	82
Figura 58 - Mapa de contorno HSQC da amostra SLR.	83
Figura 59 - Mapa de contornos TOCSY da amostra SLR.	84
Figura 60 - Mapa de contorno HMBC da amostra SLR.	85
Figura 61 - Estrutura da saponina presente na fração SLR.	87
Figura 62 - Espectro de RMN de ^1H da amostra SLE.	89
Figura 63 - RMN ^{13}C e DEPT -135 da fração SLE.	90
Figura 64 - Estruturas dos compostos presentes na amostra SLE.	91

Figura 65 - Mapa de contorno HMBC da amostra SLE.	92
Figura 66 - Expansão do mapa de contornos HMBC com sobreposição dos experimentos de ^1H e de ^{13}C mostrando intensidades e correlações heteronucleares de ^1H e ^{13}C da fração SLE.	93
Figura 67 - Integração dos sinais de H-23 do estigmasterol e H-6 da mistura para quantificação.	95
Figura 68 - Estrutura da $\alpha\beta$ -dehydrocurvularina produzida por <i>Curvularia eragrostidis</i> .	96
Figura 69 - Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 , em uma análise preliminar.	97
Figura 70 - Espectro de RMN de ^1H do composto isolado.	98
Figura 71 - Experimento DOSY editado com adição do experimento de RMN de ^1H na parte superior mostrando correlações dos sinais do solvente (CDCl_3), do composto principal (a) e das impurezas (i) da amostra a-11.	99
Figura 72 - Espectros de ^{13}C e DEPT – 135 da amostra a-11.	101
Figura 73 - Mapa de contorno HSQC com sobreposição de espectros de ^1H e ^{13}C da amostra a-11.	102
Figura 74 - Mapa de contorno COSY da amostra a-11.	103
Figura 75 - Mapa de contorno HMBC da amostra a-11.	104
Figura 76 - Estrutura do composto isolado.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de números de spins, I , com várias combinações de massas e de número atômico.	22
Tabela 2 - Variação do excesso de núcleos de ^1H com a variação da frequência, tendo como referencia 2 milhões de núcleos.	26
Tabela 3 - Solventes usados em RMN mostrando suas características principais como deslocamento químico em ppm para ^1H e ^{13}C e multiplicidade dos sinais.	28
Tabela 4 - Estereoquímica do glicosídeo e relação com a constante de acoplamento.	58
Tabela 5 - Deslocamentos químicos de ^{13}C da β -amirina e do oleanolato de metila	61
Tabela 6 - Deslocamentos químicos de ^{13}C da α -amirina e do ursolato de metila	62
Tabela 7 - Dados de RMN ^1H , ^{13}C e de correlação heteronuclear HSQC, HMBC e COSY (homonuclear) em DMSO do flavonoide de Mq-13. Deslocamentos químicos de H1 e C13 e atribuições. δ em ppm, e constantes de acoplamento (J) em Hz.	78
Tabela 8 - Dados de RMN de ^{13}C e RMN de ^1H para o composto presente na amostra SLR [δC (1) dados obtidos experimentalmente, δC (2) dados da literatura]. (400 MHz, CDCl_3).	86
Tabela 9 - Dados de RMN de ^{13}C e RMN de ^1H para os compostos β -sitosterol glicosilado ($3\beta\text{-O}\beta\text{-D-glicopiranosil sitosterol}$) e estigmasterol glicosilado (400 MHz, CDCl_3).	94
Tabela 10 - Dados de HSQC, HMBC e COSY para o composto isolado.	105

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
3D	Três dimensões
Å	Angstrom
APT	Teste do próton ligado
B	Campo magnético
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CG	Cromatografia gasosa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	Homonuclear CORrelation SpectroscopY (Espectroscopia de Correlação)
CPD	Desacoplamento com Pulso Composto
dd	Dupleto de dupleto
ddd	Dupleto de dupleto de dupleto
DEPT	Intensificação da distorção por transferência de polarização
DFQ-COSY	Double Quantum Filtered – COSY (espectroscopia de correlação com filtro de duplo quantum)
DL₅₀	Dose letal em 50 %
EM	Espectrometria de massas
FID	Free induction decay (decaimento livre da indução)
FT	Transformada de Fourier
h	Constante de Planck
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence (coerência heteronuclear em várias ligações)
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation (coerência heteronuclear de múltiplo-quantum)
HOHAHA	Homonuclear Hartmann-Hahn
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence (coerência heteronuclear de simples-quantum)
Hz	Hertz
<i>I</i>	Número quântico de spin
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
m	Multiplete
M₀	Magnetização resultante

mg	Miligrama
<i>Mq</i>	<i>Melloa quadrivalvis</i>
NOE	Nuclear Overhauser Effect (Efeito Overhauser Nuclear)
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy (Espectroscopia com Efeito Overhauser Nuclear)
°C	Grau Celsius
ppm	Partes por milhão
rf	Rádio Frequência
ROESY	Espectroscopia com Efeito Overhauser Nuclear com eixos giratórios
s	Simpleto
t	Tripleto
T	Tesla
T_2	Tempo de aquisição
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Totally Correlated Spectroscopy (espectroscopia de correlação total)
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
μ	Momento magnético nuclear
Φ	Ângulo diedro

SUMÁRIO

1	JUSTIFICATIVA	18
2	OBJETIVOS	19
2.1	Geral	19
2.2	Específicos	19
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE RMN	20
3.1	Introdução	20
3.2	Propriedades magnéticas dos núcleos	21
3.3	Preparo da amostra	28
3.4	Origem do sinal	29
3.5	Deslocamento químico	30
3.6	Acoplamento spin-spin	31
3.7	Número de linhas de um sinal	32
3.8	Efeito Overhauser Nuclear (NOE)	35
3.9	Equivalência química e magnética	37
3.10	Quiralidade	38
3.11	Desacoplamento de ^{13}C e de ^1H	39
3.12	Classes químicas e deslocamentos químicos.	40
3.13	Tipos de experimentos de ^{13}C em uma dimensão	44
3.14	Espectroscopia de RMN em duas dimensões	46
3.15	COSY: Correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COrrrelation SpectroscopY)	46
3.16	NOESY e ROESY	48
3.17	HMQC	49
3.18	HMBC	49
3.19	TOCSY	49

4	APLICAÇÃO DA RMN NA ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE PRODUTOS NATURAIS	51
4.1	Identificação de Flavonoides	51
4.2	Identificação de Esteroides	55
4.3	Identificação de Carboidratos	56
4.4	Identificação de Saponinas	58
5	EXPERIMENTAL	64
5.1	Obtenção do Material	64
5.2	Purificação da amostra a-11	64
5.2	Obtenção dos espectros de RMN	65
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	66
6.1	Amostra Mq-13 de <i>Melloa quadrivalvis</i>	66
6.2	Amostra SLR de <i>Serjania lethalis</i> .	79
6.3	Fração SLE de <i>Serjania lethalis</i> .	88
6.4	Amostra a-11 de <i>Curvularia eragrostidis</i> .	99
7	CONCLUSÕES	111
	REFERENCIAS	112

1 JUSTIFICATIVA

Técnicas de análises espectrométricas e espectroscópicas como RMN tem revolucionado o setor da química nas mais diversas áreas. A RMN tem se mostrado muito útil não apenas para a elucidação estrutural, mas também, na determinação da estereoquímica absoluta, na quantificação de um produto em mistura e no acompanhamento do rendimento de uma reação química em indústria. A elucidação estrutural dos constituintes das plantas medicinais, executada por RMN abre novos caminhos para a farmacologia e a quimioterapia. Novas moléculas podem ser sintetizadas enriquecendo o catálogo atual de medicamentos. Pesquisadores de várias instituições de pesquisa têm investido em pesquisas para extrair, isolar, purificar e determinar a estrutura de produtos naturais que futuramente servirão de modelo para a indústria. O mercado de trabalho necessita de profissionais com conhecimento e habilidade para trabalhar com RMN, seja nas instituições de ensino e pesquisa, como também na indústria.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O trabalho de doutorado tem como objetivo principal a aplicação da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) no estudo químico e físico-químico de compostos com interesse farmacológico, medicinal e industrial.

2.2 Objetivos Específicos

Elucidação estrutural de substâncias orgânicas, através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear;

Aplicações e aperfeiçoamento da técnica de difusão molecular bidimensional - DOSY, na separação e identificação de compostos presentes em misturas.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE RMN

3.1 Introdução

A identificação da estrutura de compostos orgânicos é um desafio bem antigo para a Química Orgânica. No princípio, o procedimento para elucidação estrutural era baseado em observações de experimentos simples que usavam técnicas de análises destrutivas que geravam derivados que muitas vezes induziam a erros na identificação da substância de partida. (STEFANI; BARBONI, 2007).

A partir da metade do século XX com o desenvolvimento científico e tecnológico dos métodos espectrométricos e espectroscópicos, aliado às novas metodologias de isolamento e de purificação de compostos orgânicos, houve um ganho muito grande na precisão e na confiabilidade dos métodos espectrométricos e espectroscópicos de compostos orgânicos (STEFANI; BARBONI, 2007).

A espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) é também uma forma de espectroscopia de absorção, como ocorre com o infravermelho e ultravioleta. Uma amostra contendo ^1H e ^{13}C quando colocada em um campo magnético sob condições especiais, pode absorver radiação eletromagnética na região de radio frequência (rf), onde a absorção é determinada pelos núcleos das moléculas. O espectro de RMN é a representação gráfica dos sinais pela sua intensidade e apresenta informações complementares junto às técnicas de infravermelho e de ultravioleta (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMBLER, 2006).

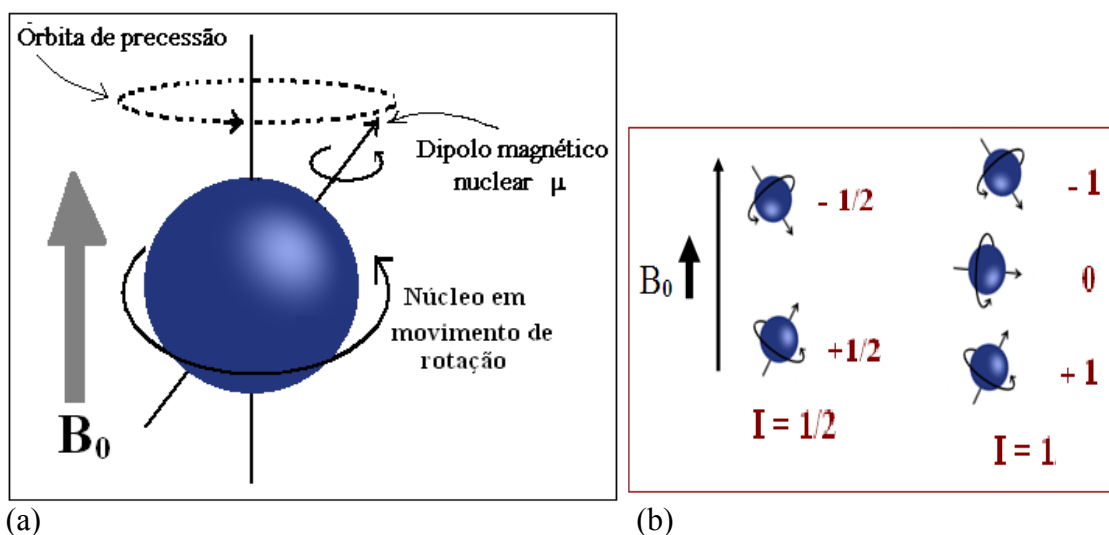
A RMN é uma das técnicas espectroscópicas mais poderosas utilizada no estudo estrutural e de dinâmica de compostos orgânicos em solução. Desde a década de 90 os aparelhos de RMN têm evoluído consideravelmente com magnetos supercondutores, campos magnéticos mais homogêneos e hardwares que permitem programação de sequências de pulsos com mais precisão de modo a acomodar as variadas técnicas 1D, 2D e até 3D (KAISER, 2000)

Hoje a espectroscopia de RMN é uma técnica da química analítica muito utilizada não só para determinar estrutura molecular, mas também, para verificar o teor de pureza de uma determinada amostra, acompanhar rendimento de uma reação de síntese e analisar quantitativamente amostras contendo misturas de compostos cuja estrutura é conhecida (PAULI, 2005).

3.2 Propriedades magnéticas dos núcleos

Os núcleos de hidrogênio e de alguns isótopos têm algum tipo de carga e giram em torno do eixo nuclear gerando um dipolo magnético ao longo desse mesmo eixo o que faz com que ele se comporte como um ímã. Esses núcleos, semelhantemente aos elétrons, possuem o número quântico de spin (I). O spin, I , determina o momento angular da carga e pode assumir valores de 0, $\frac{1}{2}$; 1; $\frac{3}{2}$; etc. A magnitude do dipolo é expressa em termos do momento magnético nuclear (μ) (**Figura 1a**). Um núcleo com número de spin, I , pode assumir o número de $2I+1$ orientações quando submetido a um campo externo, o ^1H , por exemplo, pode assumir o número de orientações igual a dois (**Figura 1b**).

Figura 1 – a) Núcleo de hidrogênio sofrendo precessão em um campo magnético B_0 . O eixo magnético terá um movimento de precessão ao redor do eixo z alinhado com o campo magnético B_0 . b) Número quântico de spin dos núcleos de $^1\text{H}_1$ ($I = 1/2$) e $^2\text{H}_1$ ($I = 1$) quando colocados em um campo B_0 .



Fonte: Autor, 2013 – Adaptado de BERLINK, 2013.

A partir da massa e do número atômico, pode-se prever o número de spin nuclear (I), **Tabela 1**. Núcleos que possuem número de spin igual a $\frac{1}{2}$, possuem distribuição de carga esférica e seus espectros são facilmente obtidos por RMN, como é o caso do ^1H e do ^{13}C , que são os mais usados (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMBLER, 2006).

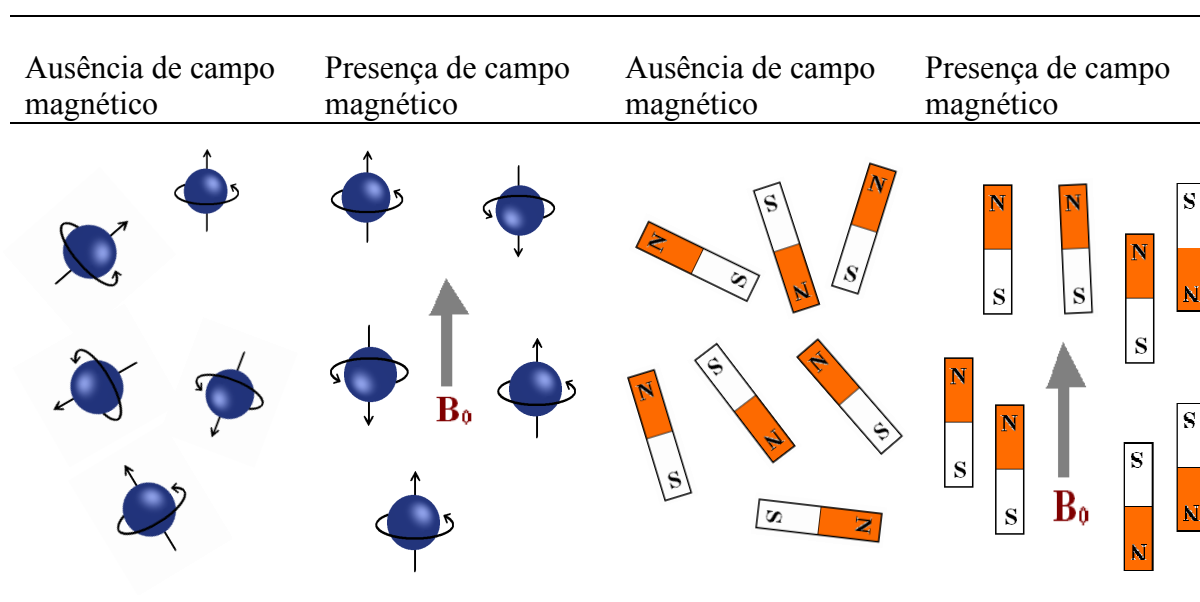
Tabela 1 - Tipos de números de spins, I , com várias combinações de massas e de número atômico.

I	Massa atômica	Número atômico	Exemplo de núcleo
Meio inteiro	Ímpar	Ímpar	$^1\text{H}_1 (1/2)$, $^3\text{H}_1 (1/2)$, $^{15}\text{N}_7 (1/2)$,
Meio inteiro	Ímpar	Par	$^{13}\text{C}_6 (1/2)$, $^{17}\text{O}_8 (1/2)$, $^{29}\text{Si}_{14} (1/2)$
Inteiro	Par	Ímpar	$^2\text{H}_1 (1)$, $^{14}\text{N}_7 (1)$, $^{10}\text{B}_5 (3)$,
Zero	Par	Par	$^{12}\text{C}_6 (0)$, $^{16}\text{O}_8 (0)$, $^{34}\text{S}_{16} (0)$

Fonte: BERLINK, 2013.

Normalmente os momentos magnéticos dos núcleos estão orientados ao acaso e sem direção, mas quando colocados em um campo magnético externo, podem assumir as orientações paralela ou antiparalela ao campo magnético externo, onde esse efeito pode ser comparado com barras de ímãs colocados sob a influência de um campo magnético (**Figura 2**).

Figura 2 - Núcleos de hidrogênio colocados em um campo magnético e comparação com barras de ímãs.

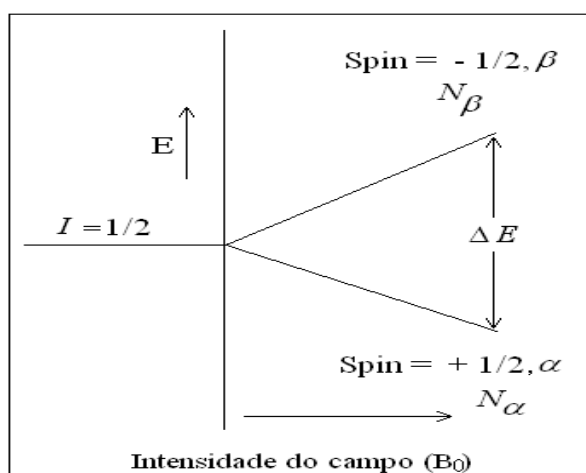


Fonte: Autor, 2013 - Adaptado de BERLINK, 2013.

Os estados de spins são dois, definidos como α (+) ou β (-). Os núcleos com spins positivos, ou em α , estão em um pequeno excesso de população, ($N\alpha > N\beta$). A variação da Energia é dada por $\Delta E = (h\gamma / 2\pi) B_0$, em que h é a constante de Planck, o que indica que ΔE é proporcional ao campo B_0 , já que h , γ e π são constantes e o campo B_0 é o campo magnético (**Figura. 3**). Podemos observar que o próton que está alinhado paralelamente ao campo (α) B_0

possui energia mais baixa e o que está alinhado contra o campo magnético (β) tem energia mais alta (FRIEBOLIN, 1991).

Figura 3 - Níveis de energia dos núcleos de hidrogênio em um campo magnético B_0 . N_β representa a população no estado de energia mais alta, N_α população no estado energético mais baixo.



Fonte: FRIEBOLIN, 1991.

A diferença de energia entre os spins só ocorre quando é aplicado um campo magnético externo com uma quantidade de energia suficiente para causar as transições. No espectrômetro de RMN, a energia é aplicada como um pulso na ordem de microssegundos na forma de radiofrequência (ν_1) que faz os núcleos absorverem energia e entrar em ressonância com a radiação.

Cessada a radiação, o spin volta ao estado inicial e emite a mesma energia que absorveu na mesma intensidade e frequência. A emissão dessa energia pode ser detectada, amplificada e registrada como um sinal de RMN.

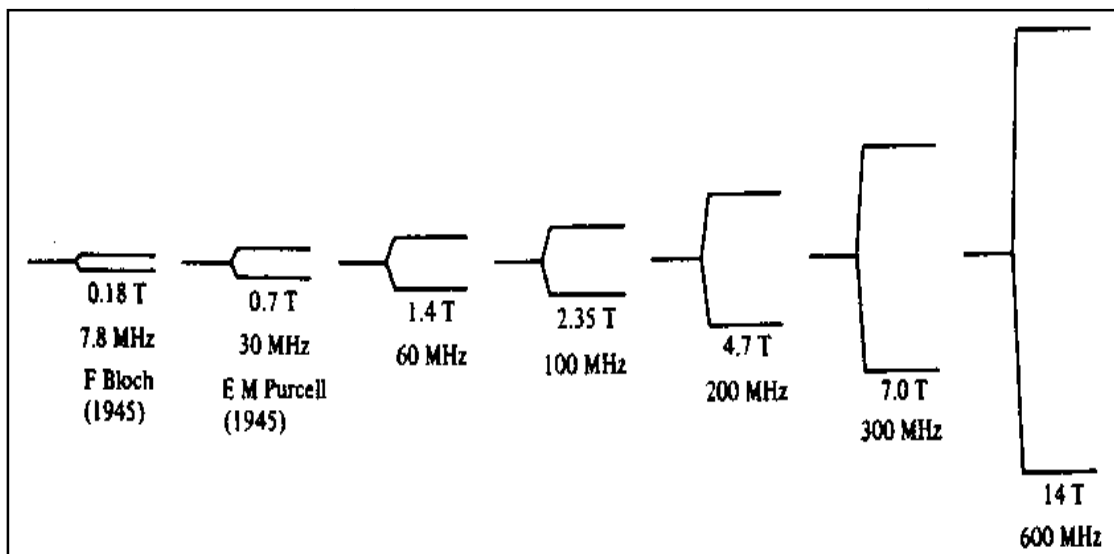
As densidades populacionais dos spins de níveis de energia variam de maneira direta com o aumento da frequência. Um pequeno excesso de spins com menor energia permite observar o fenômeno na ressonância. Podemos citar como exemplo, que para uma frequência de 60 Hz e um campo de 1,41 T, há aproximadamente nove núcleos com estado de spins de menor energia para cada dois milhões de núcleos (**Tabela 2**). O espaçamento entre os níveis de energia dos estados de spins também aumenta conforme o aumento da frequência, ressaltando-se que quanto maior a frequência, maior deve ser a potência do campo magnético aplicado B_0 (**Figura 4**) (MULLER, 2005).

Tabela 2 - Variação do excesso de núcleos de ^1H com a variação da frequência, tendo como referencia 2 milhões de núcleos.

Variação do excesso de núcleos de ^1H com a operação da frequência	
Frequência (Mz)	Excesso de núcleos
20	3
40	6
60	9
80	12
100	16
200	32
300	48
600	96

Fonte: MULLER, 2005.

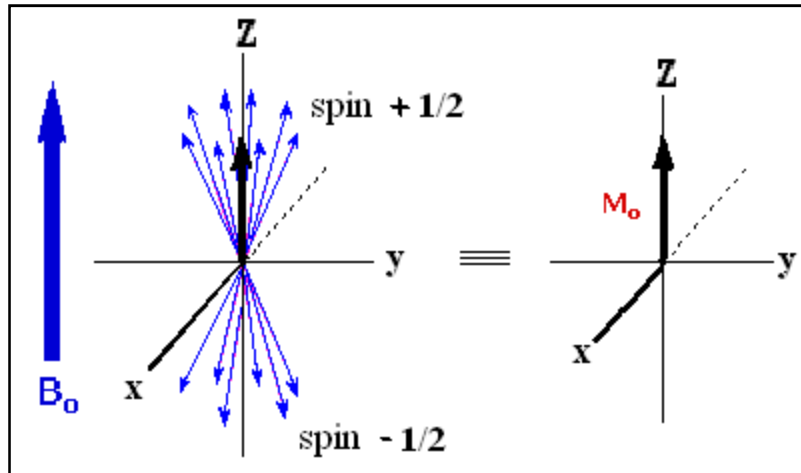
Figura 4 - Variação entre os níveis de energia dos estados de spin para o hidrogênio em função da potência do campo magnético aplicado (B_0).



Fonte: MULLER, 2005.

Um conjunto de núcleos em movimento de precessão aleatória em torno do eixo z gera uma resultante de magnetização M_0 (Figura. 5).

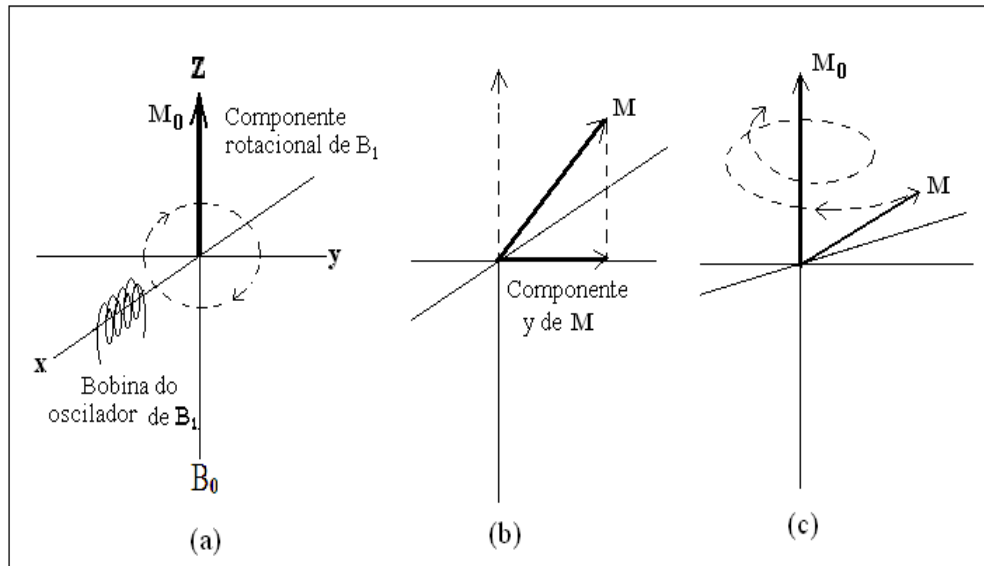
Figura 5 - Conjunto de núcleos em movimento de precessão com magnetização resultante M_0 na direção do campo magnético estacionário B_0 .



Fonte: Autor, 2013 - Adaptado de MULLER, 2005.

A transferência da magnetização resultante M_0 para o plano horizontal xy do sistema cartesiano pode ser feita através de uma varredura de frequência de um oscilador de rf colocado na direção do eixo x . Quando a frequência de varredura entra em ressonância com a frequência de Larmor induz a coerência de fases e a resultante M_0 se alinha com o plano horizontal que pode ser detectado pela bobina receptora colocada no plano xy (**Figura. 6**) e coletado por um computador durante um período de tempo chamado tempo de aquisição (t_2). Como a detecção é feita no eixo y e a magnetização é tida como uma projeção nesse eixo, ao longo do tempo, e, devido à relaxação da indução, vai diminuindo de intensidade até que os núcleos retornem ao equilíbrio. Esse efeito é chamado decaimento livre da indução (FID – *free induction decay*) que é representado como um interferograma em decaimento. (MULLER, 2005).

Figura 6 - (a e b) O oscilador gera um componente rotacional de campo magnético aplicado B_1 . A magnetização resultante M_0 é empurrada para M , que sofre precessão em torno do eixo z , gerando um componente de magnetização no plano horizontal. (c) a relaxação longitudinal de M a M_0 segue uma espiral decrescente. A relaxação transversal T_2 (fora de fase) foi omitida. As coordenadas cartesianas estão fixas.

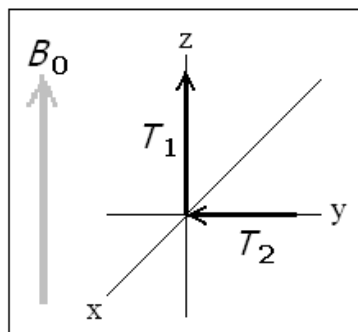


Fonte: PAVIA, 1996.

O processo de relaxação ocorre através de dois processos. O primeiro é um processo de relaxação longitudinal, ou spin-rede, caracterizado pela constante de tempo T_1 , que envolve a transferência de energia do núcleo excitado para moléculas mais próximas que estão vibrando em frequências apropriadas. A magnetização retorna ao eixo z em uma espiral decrescente (**Figura 6**) (PAVIA, 1996).

O segundo tipo de relaxação (**Figura. 7**) é caracterizado pela constante de tempo T_2 onde ocorre a transferência de energia de um núcleo para o outro (spin – spin) e tem como consequência um alargamento e perda do sinal de absorção. Para um bom sinal o tempo de relaxação T_2 deve ser relativamente longo para obtenção de sinais bem estreitos e T_1 curto para que os picos sejam proporcionais ao número de hidrogênios envolvidos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMBLER, 2006).

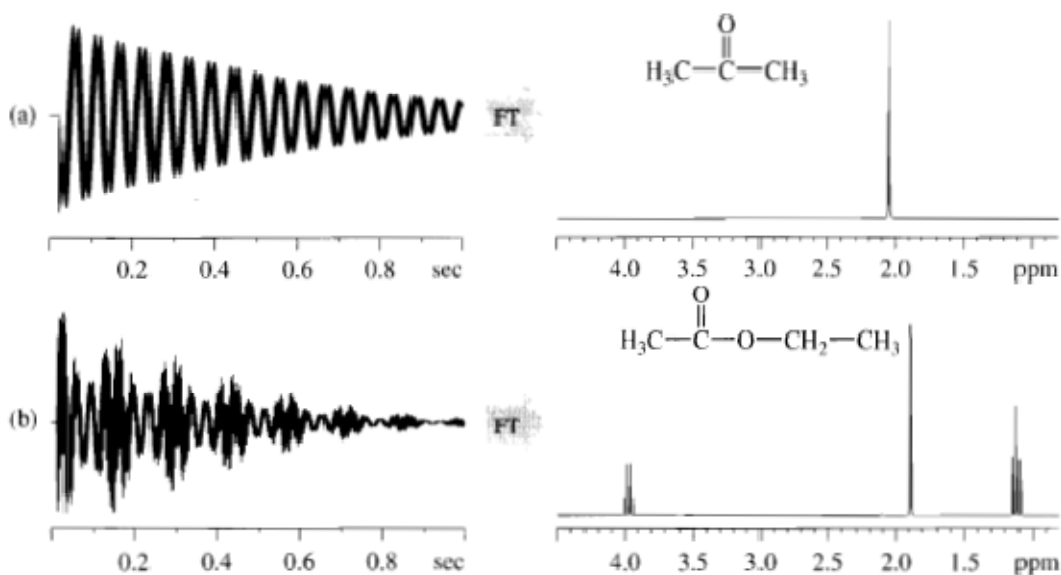
Figura 7 - A relaxação de T_2 faz M diminuir no plano xy e ocorre transferência de energia para o plano z .



Fonte: MULLER, 2005.

Após o pulso, os núcleos retornam ao estado fundamental e irradiam a energia recebida. Essa energia liberada provoca um fluxo de uma pequena corrente elétrica em uma bobina que está ligada ao detector e envolve a amostra. Essa corrente é amplificada e convertida em um sinal pelo computador que efetua a transformada de Fourier e exibe um espectro (**Figura 8**). O sinal recebido pelo computador constitui o FID, que também é um espectro, mas em domínio do tempo, que através da Transformada de Fourier é convertido matematicamente em um espectro no domínio da frequência (PAVIA, 1996).

Figura 8 - (a) Espectro em função do tempo (FID) e em função da frequência (FT) de hidrogênios da acetona. (b) Espectro FID e FT de hidrogênios do acetato de etila. Ambos em $CDCl_3$ em 300 MHz.



Fonte: SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMBLER, 2006.

3.3 Preparo da amostra

O ideal é que os solventes usados não tenham átomos de hidrogênios e, além disso, sejam inertes, tenham baixo ponto de ebulição (sejam voláteis) e baratos. Mas há dois problemas: primeiro que os solventes não hidrogenados são apolares como o CCl_4 e o CS_2 e não dissolvem os compostos polares, segundo que os instrumentos modernos dependem do deutério para calibrar e manter estável o campo \mathbf{B}_0 . Por isso usam-se solventes deuterados como o clorofórmio deuterado (CDCl_3) para a maioria dos compostos apolares e o metanol deuterado (CD_3OD) para a maioria dos compostos polares (PAVIA, 1996). A **Tabela 3** mostra alguns solventes importantes usados em RMN.

Tabela 3 - Solventes usados em RMN mostrando suas características principais como deslocamento químico em ppm para ^1H e ^{13}C e multiplicidade dos sinais.

Solvente	δ ^1H (ppm) (multipl)	δ ^{13}C (ppm) (multipl)	Extensão líquida ($^{\circ}\text{C}$)	Constante dielétrica	δ HOD (ppm) em RMN de ^1H
Ácido acético – d_4	11,65 (1)	179,0 (1)	17 - 118	6,1	11,6
	2,04 (5)	20,0 (7)			
Acetona – d_6	2,05 (5)	206,7 (13)	- 94 - 57	20,7	2,0
		29,9 (7)			
Acetonitrila – d_3	1,94 (5)	118,7 (1)	- 45 - 82	37,5	2,1
		1,4 (7)			
Benzeno – d_6	7,16 (1)	128,4 (3)	5 - 80	2,3	0,4
Clorofórmio – d	7,27 (1)	77,23 (3)	- 64 - 62	4,8	1,5
Cicloexano - -d_{12}	1,38 (1)	26,4 (5)	6 - 81	2,0	-
	D_2O				
Diclorometano – d_2	5,32 (3)	54,0 (5)	- 95 - 40	8,9	1,5
<i>p</i> - Dioxano – d_8	3,53 (m)	66,7 (5)	12 - 101	2,2	2,4
DMF – d_7	8,03 (1)	163,2 (3)	- 61 - 153	36,7	3,5
	2,92 (5)	34,9 (7)			
	2,75 (5)	29,8 (7)			
DMSO – d_6	2,50 (5)	39,5 (5)	18 - 189	46,7	3,3
Metanol – d_4	4,87 (1)	49,2 (7)	- 95 - 65	32,7	5,0
	3,31 (5)				
Piridina – d_5	8,74 (1)	150,4 (3)	- 42 - 116	12,4	5,0
	7,58 (1)	135,9 (3)			
	7,22 (1)	123,9 (5)			
THF – d_8	3,58 (1)	67,6 (5)	- 109 - 66	7,6	2,5
	1,73 (1)	25,4 (1)			
Tolueno – d_8	7,09 (m)	137,9 (1)	- 95 - 111	2,4	0,4
	7,00 (1)	129,2 (3)			
	6,98 (m)	128,3 (3)			
	2,09 (5)	125,5 (3)			
TFA - d	11,50 (1)	20,4 (7)	- 15 - 72	39,5	11,5
		164,2 (4)			
		116,6 (4)			

Fonte: SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMBLER, 2006.

Alguns cuidados a serem tomados no preparo da amostra é eliminar bem os resíduos de solventes de laboratório, ter cuidado com contaminação por graxas plastificantes como ftalatos e impurezas ferromagnéticas por causarem alargamento dos sinais devido à redução do tempo de relaxação de T_2 . Essas impurezas ferromagnéticas podem ser provenientes de água da torneira, espátulas, ou esponjas de aço usadas nas limpezas (PAVIA, 1996).

3.4 Origem do sinal

Uma substância quando é colocada em um campo magnético se torna magnetizada e afeta o campo magnético. Os elétrons são induzidos a circular em volta do núcleo e ao redor do campo magnético B_0 com uma velocidade angular específica. Esse movimento por se tratar de cargas, criará um momento magnético μ_e que induzirá um campo magnético B_e em oposição ao campo magnético aplicado B_0 . Observa-se que o campo B_0 induz a circulação de cargas eletrônicas que produzem uma magnetização B_e oposta ao campo B_0 . Os elétrons, dessa forma, criam uma espécie de blindagem (shield) para os núcleos. Para esta blindagem deve ser levado em consideração o campo efetivo sentido pelo núcleo (KLEIN, 1987).

O campo magnético efetivo é calculado pela equação $B = B_0 (1-\sigma)$, onde σ é um número adimensional denominado constante de blindagem, expresso geralmente em partes por milhão (ppm). Núcleos com vizinhanças eletrônicas diferentes estão em ambientes químicos diferentes e, portanto, possuem constantes de blindagens diferentes. Para que ocorra o fenômeno da ressonância é necessário que a condição dada pela equação $\nu_j = (\gamma / 2\pi) |B_0(1-\sigma_j)|$ seja satisfeita. Onde os fatores ν_j e σ_j referem-se à frequência de ressonância (frequência de Larmor) e constante de blindagem (shielding), respectivamente, para o núcleo j . Variações de σ , portanto, causam variações nas frequências de ressonância e são razões para a ocorrência dos deslocamentos químicos (KLEIN, 1987).

Podemos dizer quando um elemento em análise estiver próximo a um elemento muito eletronegativo, maior será a sua frequência de ressonância. Essa eletronegatividade pode causar também um efeito indutivo, isto é, o elemento estar ligado a um elemento mais ou menos eletronegativo que pode causar uma maior desblindagem pelo efeito retirador de elétron ou uma blindagem pelo efeito doador de elétron. Outros fatores que também influenciam no deslocamento químico são a anisotropia (geralmente relacionado a anel aromático), o efeito mesomérico e ligações duplas e triplas.

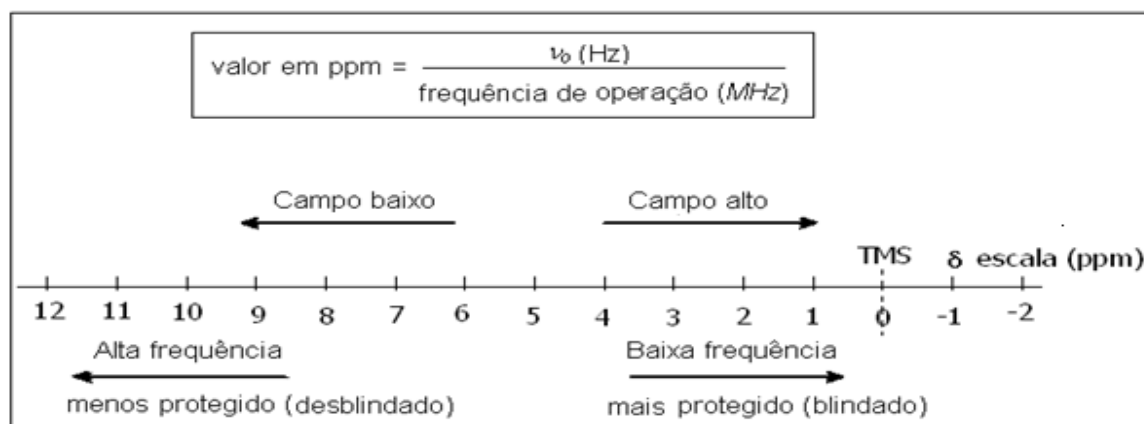
A frequência de ressonância depende de B_0 , de modo que quando B_0 aumenta, também aumenta a diferença de todos os deslocamentos químicos do espectro. O valor do deslocamento químico é expresso em uma unidade adimensional, geralmente designada por δ e definida em partes por milhão (ppm), para que possa ser usado como uma constante da molécula independentemente da frequência do aparelho de RMN utilizado. A operação é feita dividindo-se a frequência observada pela frequência do aparelho (EWING, 1972).

3.5 Deslocamento químico

Cada elemento químico é envolvido por uma nuvem de elétrons que se movimentam constantemente. O campo magnético aplicado a esses elementos força seus elétrons a circularem no sentido em oposição ao campo. O campo magnético criado pelo movimento dos elétrons gera um pequeno campo magnético que blindará parcialmente seus núcleos. Isso ocorre com todos os elementos da molécula, mas essa blindagem pode ocorrer com maior ou menor intensidade de acordo com o ambiente químico em que o elemento se encontra. Essa blindagem altera a frequência ou a força do campo magnético local para causar ressonância do núcleo blindado dando origem a diferenças no deslocamento químico. (EWING, 1972).

As frequências de ressonância dos vários tipos de hidrogênio de uma amostra são referenciadas com base em substâncias padrões colocadas em pequenas quantidades diretamente na amostra (padrão interno) junto com o solvente. A substância usada é o tetrametilsilano (TMS), $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, porque todos os seus átomos de hidrogênios apresentam idêntica vizinhança química originando no espectro de ^1H e de ^{13}C apenas um sinal não interferindo nos sinais da amostra, é quimicamente inerte não reagindo com a amostra, seus hidrogênios são mais blindados que qualquer outro de um composto puramente orgânico, e também é muito volátil tornando a recuperação da amostra mais facilitada (**Figura 9**). O TMS recebe um valor arbitrário de zero para a escala δ no espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C (FRIEBOLIN, 1991; EWING, 1972).

Figura 9 - No centro: escala de deslocamento químico para hidrogênio. No alto: como calcular o deslocamento químico de acordo com a frequência do aparelho.



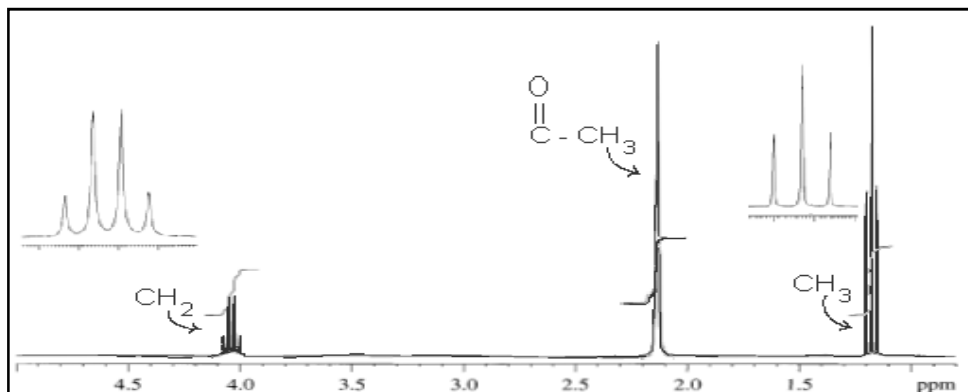
Fonte: Autor, 2013.

Em alguns casos quando a amostra é muito polar não é possível usar o TMS como padrão interno devido a sua insolubilidade em água. Nesses casos, pode-se colocar o TMS em um tubo capilar selado dentro da amostra com o solvente adequado. Para isso, são utilizados adaptadores coaxiais disponíveis no mercado que permitem colocar o tubo capilar com o TMS dentro do tubo com a amostra (FRIEBOLIN, 1991). Outros solventes também podem ser usados como referências como, por exemplo, o clorofórmio-d, metanol-d₄, acetona-d₆, etc. a escolha deve ser feita de modo que o sinal do padrão não sobreponha ao sinal da amostra.

3.6 Acoplamento spin-spin

Em substâncias como CHBr₃, CH₂Br₂, CH₃Br e TMS, observamos apenas um sinal (um simpleto) para cada composto, isso porque em cada composto seus hidrogênios são quimicamente equivalentes. Em outros tipos de amostras, como acetato de etila, podem ser observados vários outros sinais (**Figura 10**). A interação do spin de um hidrogênio com os *spins* de outros hidrogênios, ligados geralmente a carbonos vizinhos, podem causar desdobramento de sinais. Esse acoplamento é chamado de acoplamento *spin-spin* e ocorre através dos dipolos formados pelas ligações químicas. No acetato de etila, os hidrogênios do grupo metileno estão acoplados com os três hidrogênios do grupo metila (FRIEBOLIN, 1991).

Figura 10 - Espectro de RMN ^1H de acetato de etila mostrando as correlações e multiplicidade dos sinais.



Fonte: SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMBLER, 2006.

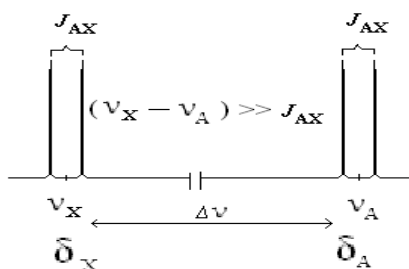
A constante de acoplamento J é a diferença em Hz entre duas linhas de um multipletto (dupletto, tripleto, quarteto, etc). A constante de acoplamento não depende da força do campo magnético e podem ocorrer a uma ligação (1J), duas ligações (2J , acoplamento geminal), a três ligações (3J , acoplamento vicinal), quatro ou cinco ligações (4J e 5J , acoplamentos a longa distância) (BREITMAIER, 1993).

3.7 Número de linhas de um sinal

O número de linhas de um multipletto pode ser calculado através da equação $M = 2nI + 1$, onde n é o número de núcleos que interagem e I o número de spin. A equação pode ser simplificada para $M = n + 1$ para núcleos com $I = \frac{1}{2}$, como no caso de hidrogênios (FRIEBOLIN, 1991). O número de linhas de um sinal pode ser chamado de simpleto (s), dupletto (d), tripleto (t), quarteto (q), quinteto (qui), sexteto (sxt) ou hepteto (hep), observando-se que as distâncias entre uma linha e outra de um mesmo multipletto geralmente apresenta o mesmo valor, como pode ser visto na Figura 13. (BREITMAIER, 1993).

Espectros de primeira ordem podem ser observados quando a diferença de deslocamento químico em hertz ($\Delta\nu$) é muito maior que a constante de acoplamento, ou seja, quando $\Delta\nu/J$ for maior que a constante de acoplamento (**Figura 11**). Esse sistema de spin é classificado como A_mX_n , onde o núcleo A possui um deslocamento químico muito menor que o núcleo X (BREITMAIER, 1993).

Figura 11 - Acoplamento spin-spin entre dois hidrogênios com deslocamentos químicos muito diferentes.



Fonte: Autor, 2013.

Um sistema de spin de primeira ordem é formado por multipletos que se acoplam uns com os outros dentro de um sistema. O acoplamento geralmente ocorre a duas ou três ligações, mas pode ocorrer também a longa distância em até cinco ligações (estrutura em *W*, estruturas rígidas, super conjugação, etc.). As constantes de acoplamento a longa distância são geralmente muito pequenas. As intensidades relativas dos picos de um multipletto simples de primeira ordem dependem de n . Os picos de um dupletto ($n = 1$) estão na proporção de 1:1; de um triplete ($n = 2$), 1:2:1; de um quarteto ($n = 2$), 1:3:3:1, etc. O triângulo de pascal (**Figura 12**) mostra bem essas e outras situações (BREITMAIER; VOELTER, 1990).

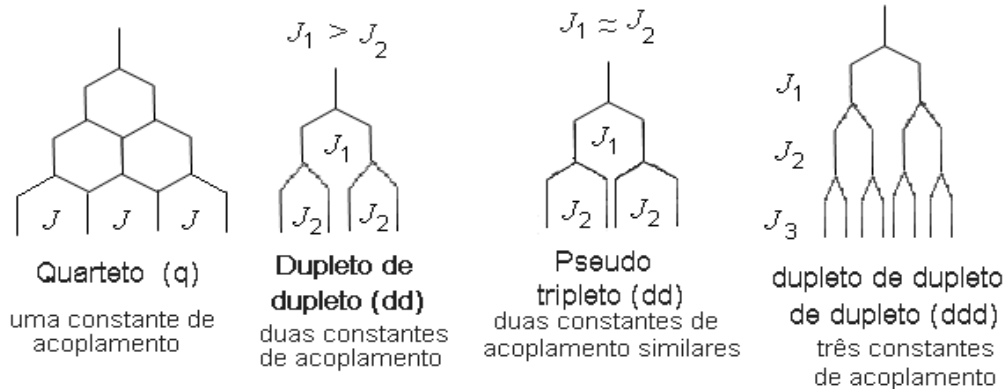
Figura 12 - Triângulo de Pascal. Intensidades relativas dos multipletos de primeira ordem; n = número de núcleos equivalentes de spin $\frac{1}{2}$ que se acoplam (para núcleos de hidrogênio).

n - Multiplicidade	Intensidade relativa
0- Simpleto (s)	1
1- Dupletto (d)	1 1
2-Triplete (t)	1 2 1
3-Quarteto (q)	1 3 3 1
4 - Quinteto	1 4 6 4 1
5 - Sexteto	1 5 10 10 5 1
6- Hepteto	1 6 15 20 15 6 1
7- Octeto	1 7 21 35 35 21 7 1
8 - Noneto	1 8 28 56 70 56 28 8 1

Fonte: Autor, 2013.

Quando duas ou três constantes de acoplamento diferentes produzem um multipletto dobrado, teremos um dupletto de dupletto (ou duplo-dupletto dd), ou dupletto de dupletto de dupletto (ddd), observa-se que nesses casos as distâncias entre uma linha e outra pode variar (**Figura 13**) (BREITMAIER, 1993).

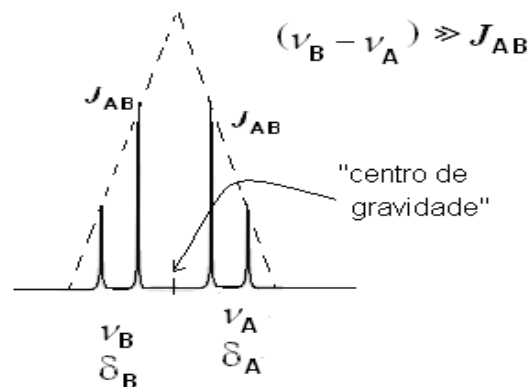
Figura 13 - Quarteto, dupletto de dupletto, pseudo triplete e dupletto de dupletto de dupletto.



Fonte: BREITMAIER, 1993.

Quando $\Delta\nu/J$ é pequeno os multipletos se aproximam, os sinais externos de ambos sofrem uma atenuação enquanto os sinais internos são aumentados. Esse exemplo é típico de um sistema AB, onde A forma um dupletto e B forma outro dupletto. O deslocamento químico de cada hidrogênio não estará mais localizado entre os dois dupletos, mas no "centro de gravidade" (**Figura 14**) (BREITMAIER, 1993).

Figura 14 - Um sistema com dois tipos de spin AB com a diminuição da diferença dos deslocamentos químicos e um grande valor J (10 Hz).

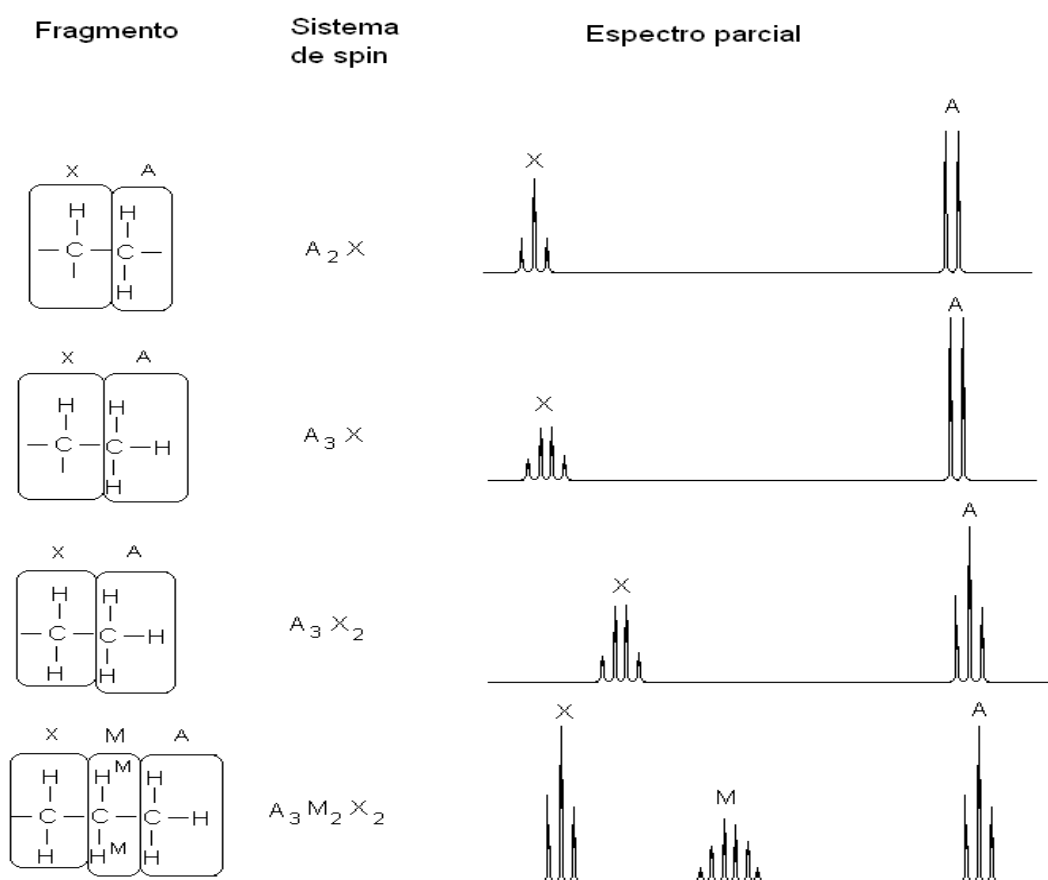


Fonte: BREITMAIER, 1993.

A multiplicidade dos sinais de RMN de ^1H ocorre devido às influências magnéticas de hidrogênios vizinhos sobre hidrogênios responsáveis pelo sinal e pode ser feita usando a regra

$n + 1$ (Figura 15). Hidrogênios com mesmo deslocamento químico ou enantiotópicos não acoplam e não sofrem desdobramento de sinal. As áreas dos picos são proporcionais ao número de hidrogênio que eles representam e são medidos por um integrador eletrônico que traça uma linha em degraus com altura proporcional às áreas dos picos (BREITMAIER; VOELTER, 1990).

Figura 15 - Espectro parcial de alguns fragmentos estruturais com sistema A_nX_n .



Fonte: Autor, 2013.

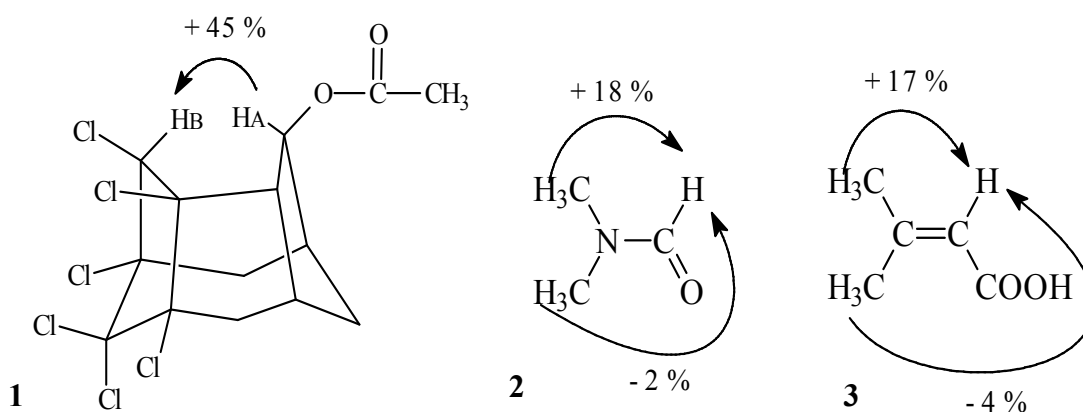
3.8 Efeito Overhauser Nuclear (NOE)

Em um experimento de RMN é possível irradiar um determinado núcleo de hidrogênio em sua frequência de ressonância e observar seu desacoplamento com os outros núcleos com os quais estava acoplado. O Efeito Overhauser Nuclear (NOE) é um fenômeno em que também se opera com uma dupla irradiação, como ocorre com o desacoplamento de sinal, embora seu efeito seja de bem menor intensidade que não chega a causar seu desacoplamento com os demais hidrogênios. Os efeitos são distintos, um causa desacoplamento e outro causa

mudança na intensidade do sinal. O NOE ocorre através do espaço entre núcleos cuja separação seja de até 4 Å e causa uma polarização aumentando a diferença na população dos níveis de energia mais alta nos hidrogênios vizinhos não irradiados. O resultado é o aumento da intensidade que ocorre em média, de 13 %, podendo chegar até próximo de 50 % (FIEBOLIN, 1991).

Dois núcleos de hidrogênios A e X quando estão próximos o suficiente, podem interagir através do espaço por um mecanismo dipolo-dipolo, a irradiação do núcleo A pode modificar a distribuição dos níveis de energia do núcleo X e modificar a intensidade do sinal de ressonância (**Figura 16**). Experimento de RMN de ^1H obtido com NOE é muito importante para determinação de estruturas, principalmente quando se tratar de isômeros. Se a irradiação for forte o suficiente, o efeito vai além de um simples desacoplamento, podendo haver a supressão do sinal e um consequente aumento na intensidade dos sinais dos hidrogênios próximos (FRIEBOLIN, 1991).

Figura 16 - Na estrutura 1 observam-se dois hidrogênios muito próximos em uma estrutura fechada. Quando o hidrogênio H_A sofre uma segunda irradiação, o seu sinal de RMN pode ser suprimido e causa um aumento na intensidade do hidrogênio H_B ; Na estrutura 2 a irradiação nos hidrogênios das metilas indicadas causa um aumento na intensidade do hidrogênio do grupo formila conforme setas; Em 3 observamos efeitos semelhantes com a estrutura 2.



Fonte: FRIEBOLIN, 1991.

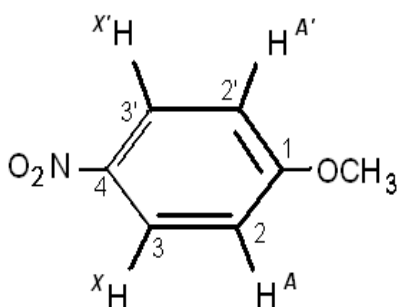
O efeito NOE é muito útil nas técnicas de RMN não apenas nas técnicas homonucleares, mas também, nas técnicas bidimensionais de ^1H , ^{13}C . Na espectrometria de RMN de ^{13}C o efeito NOE produz um aumento de mais de 200 % na intensidade do sinal dos espectros de RMN de ^{13}C (FRIEBOLIN, 1991). O NOE heteronuclear é o resultado do

desacoplamento de hidrogênios com banda larga dos espectros de RMN de ^{13}C . Os NOE aumentam a intensidade dos sinais dos carbonos ligados a hidrogênios, no entanto, em carbonos quaternários o efeito não é observado, devido a não existência de hidrogênios ligados, responsáveis pela transferência de polarização (GIL; GERALDES, 1987).

3.9 Equivalência química e magnética.

Quando os átomos de uma substância se encontram em um mesmo ambiente químico, eles são quimicamente equivalentes e apresentam o mesmo deslocamento químico. Átomos quimicamente equivalentes apresentam também equivalência magnética, a **Figura 17** mostra a molécula de 4-nitroanisol com os pares de hidrogênios 2,2' – (A, A') e 3,3' – (X, X') quimicamente equivalentes (BREITMAIER, 1993).

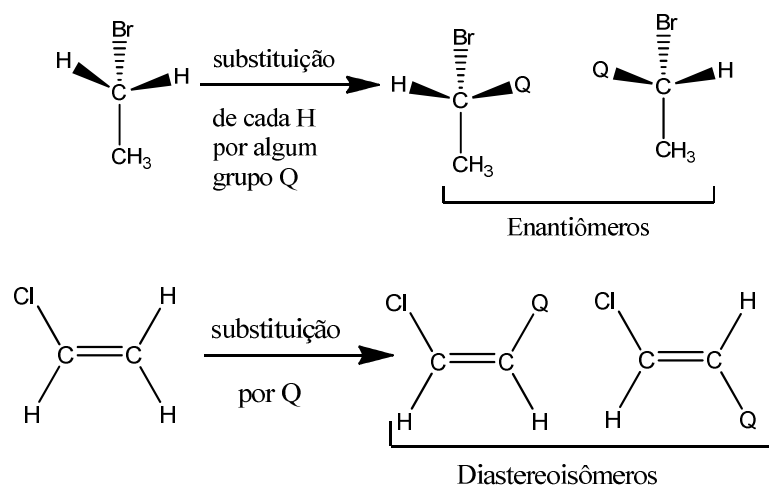
Figura 17 - Molécula de 4-nitroanisol.



Fonte: BREITMAIER, 1993.

Átomos de hidrogênios enantiotópicos têm o mesmo deslocamento químico e apenas um sinal de RMN ^1H . Quando esses hidrogênios enantiotópicos (pró-quirais) estão vizinhos a um centro quiral, seus deslocamentos químicos podem ser diferentes e fornecerem dois sinais de RMN de ^1H , porém os dois sinais podem ser muito próximos e se sobreporem. Os diastereotópicos, salvo algumas exceções, não têm o mesmo deslocamento químico e dão origem a sinais diferentes de RMN de ^1H (**Figura 18**). (SOLOMONS, 2005).

Figura 18 - Átomos de hidrogênio Enantiotópicos e Diasteretópicos.



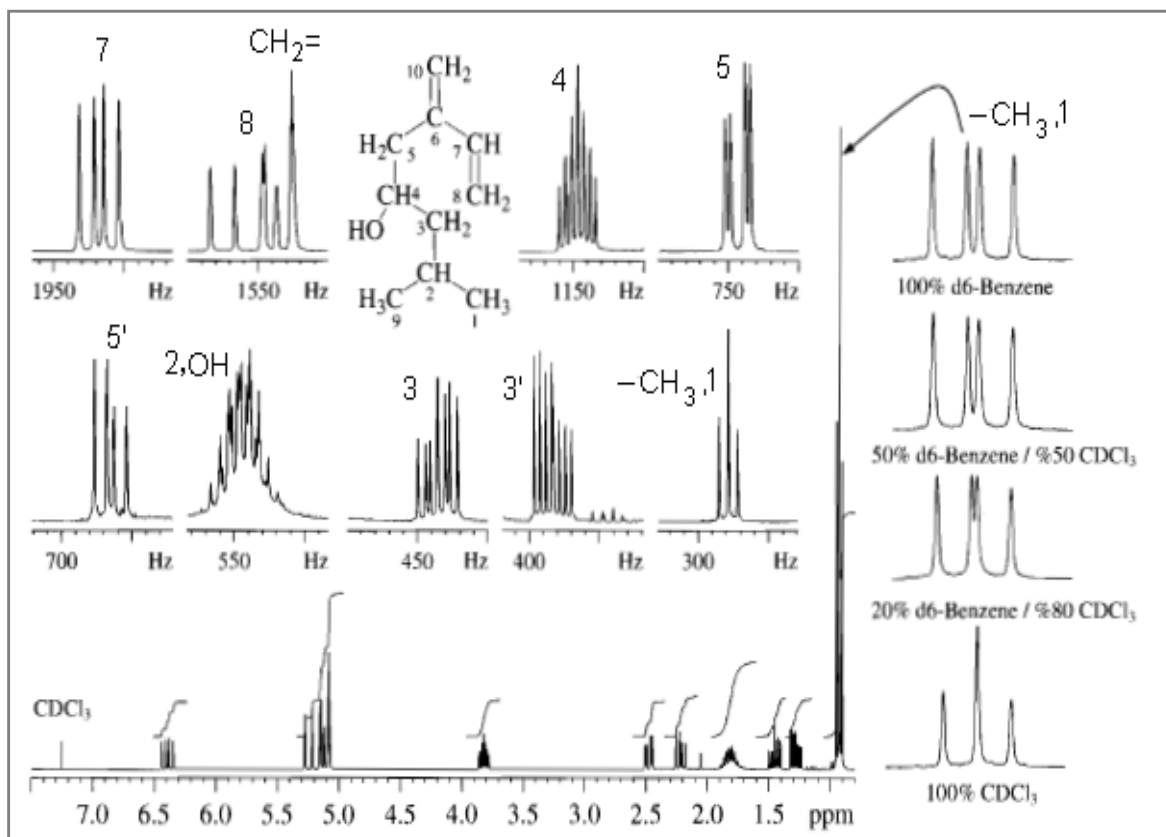
Fonte: SOLOMONS, 2005

3.10 Quiralidade

Uma molécula é quiral quando possui propriedade de lateralidade, ou seja, quando a molécula e sua imagem especular não coincidir em todas as partes quando sobreposta. Duas moléculas que são imagens especulares não sobreponíveis são chamadas de par de enantiômeros. (SOLOMONS, 2005).

Moléculas quirais não possuem elementos de simetria e isso faz com que grupos metilênicos vizinhos de um carbono quiral, apresentem deslocamentos químicos diferentes. Esse efeito pode ser encontrado até a longa distância em até sete ligações entre o centro quiral e os hidrogênios de metila (**Figura 19**) como ocorrem com as metilas do ipenol mostrando que esses grupos citados não são magneticamente equivalentes. (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMBLER, 2006).

Figura 19 - Molécula do ipsenol. Observa-se que os hidrogênios dos grupos metilênicos 3 e 5 e as metilas 1 e 9 podem apresentar deslocamento químico diferente.



Fonte: SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMBLER, 2006.

3.11 Desacoplamento de ^{13}C e de ^1H

Em espectro de RMN de ^1H não se percebe o acoplamento com núcleo de carbono 13 devido à sua baixa abundância natural (1,1 %), no entanto em espectro de RMN de ^{13}C o acoplamento com núcleos de hidrogênio, que tem uma abundância natural de 99 %, o efeito é bem visível. As constantes de acoplamento são na faixa de 0 a 60 Hz para $^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$ e maiores para $^1J_{\text{CH}}$ (~110-320 Hz). Espectros de ^{13}C com acoplamento com hidrogênio podem mostrar uma sobreposição complexa de sinais de difícil interpretação, principalmente para macromoléculas (BREITMAIER; VOELTER, 1990).

O desacoplamento de banda larga consiste em irradiar e saturar os hidrogênios ligados a carbono e detectar os sinais de ^{13}C . O Desacoplamento com Pulso Composto (CPD) é uma irradiação dos hidrogênios em uma faixa larga de frequência por meio de um gerador de banda larga que remove o acoplamento. Uma programação para desacoplamento é feita com uma sequência de atraso de relaxação (R_d), um pulso rf (θ) e a aquisição do sinal (**Figura 20**).

Enquanto um pulso de curta duração e de grande intensidade excita todos os núcleos de ^{13}C , é ligado o desacoplador no canal do hidrogênio que remove o acoplamento $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMBLER, 2006).

Figura 20 - Sequência padrão de pulsos para o desacoplamento de hidrogênio no espectro de ^{13}C . R_d é o tempo de espera para relaxação; θ é o ângulo variável de pulso e t_2 é o tempo de aquisição do sinal.



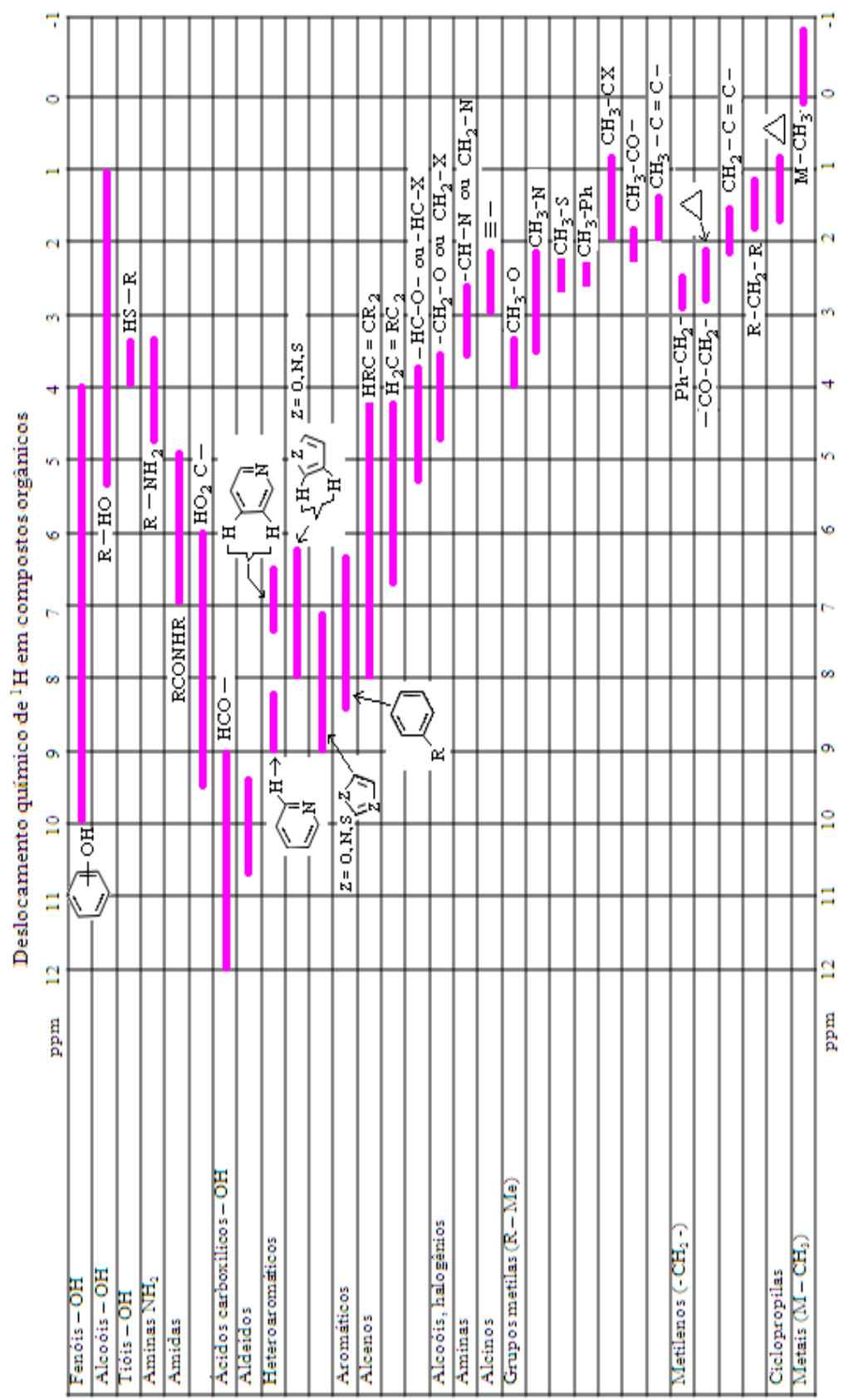
Fonte: Autor, 2013.

3.12 Classes químicas e deslocamentos químicos.

Alguns grupos podem ser identificados com uma boa precisão através do seu deslocamento químico de ^1H e ^{13}C . A presença de elementos eletronegativos ou eletropositivos na molécula causa diminuição ou aumento nas densidades eletrônicas através de efeito indutivo retirador ou doador de elétrons, respectivamente, que funcionam como um escudo de proteção contra o campo magnético B_0 resultando na variação do deslocamento químico.

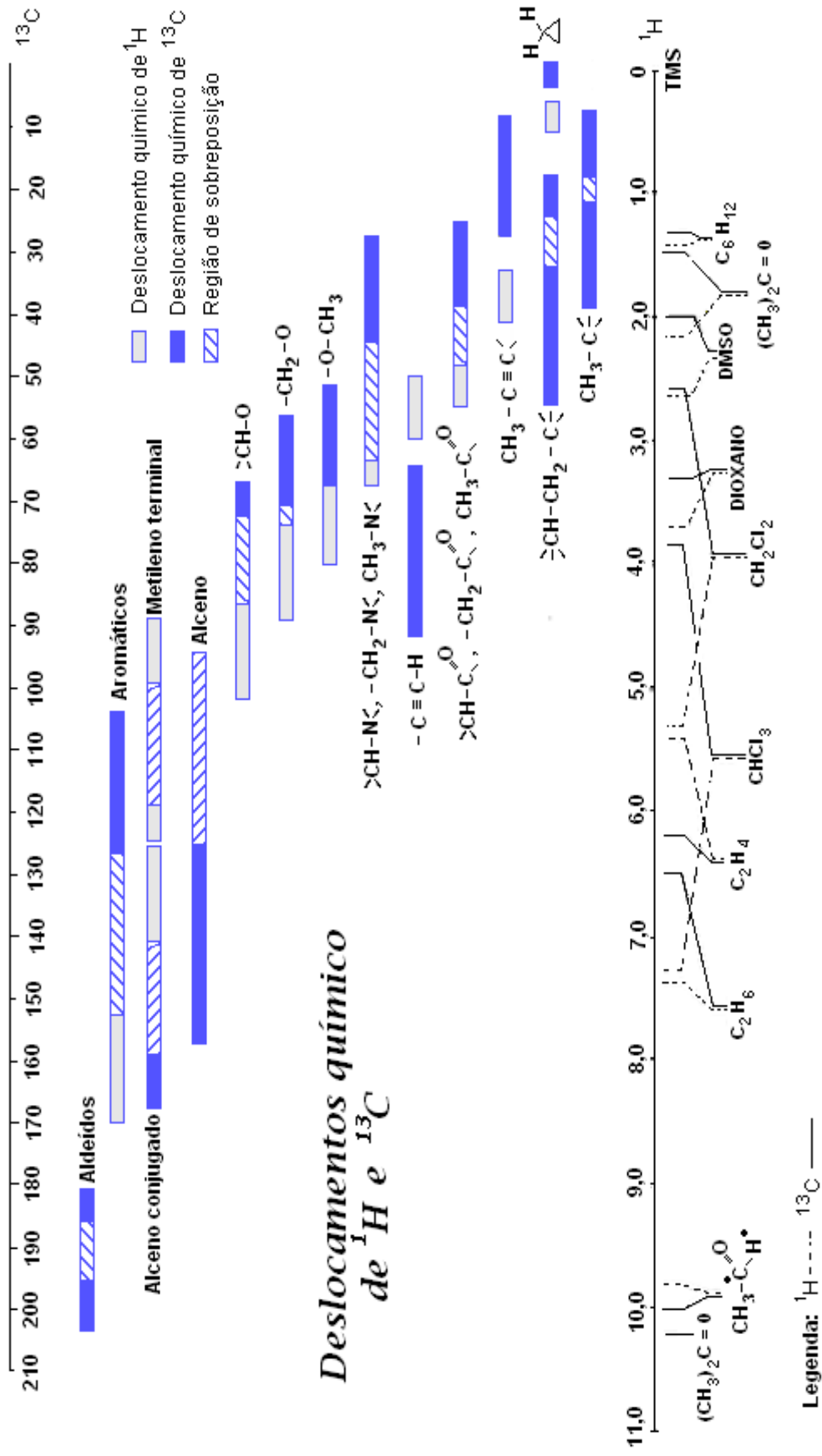
Para facilitar a identificação de compostos orgânicos por RMN muitas publicações apresentam tabelas de deslocamentos químicos de grupos funcionais de ^1H e de ^{13}C (**Figuras 21 e 22**). Classes de compostos de produtos naturais apresentam um perfil de deslocamentos químicos que são bem característicos e que facilitam na identificação estrutural fornecendo uma ideia de qual classe de composto o espectro em análise pode representar (**Figura 23**), como por exemplo, artigo de Bross-Walch, 2005.

Figura 21 - Alguns grupos funcionais e faixas de deslocamento químico provável.



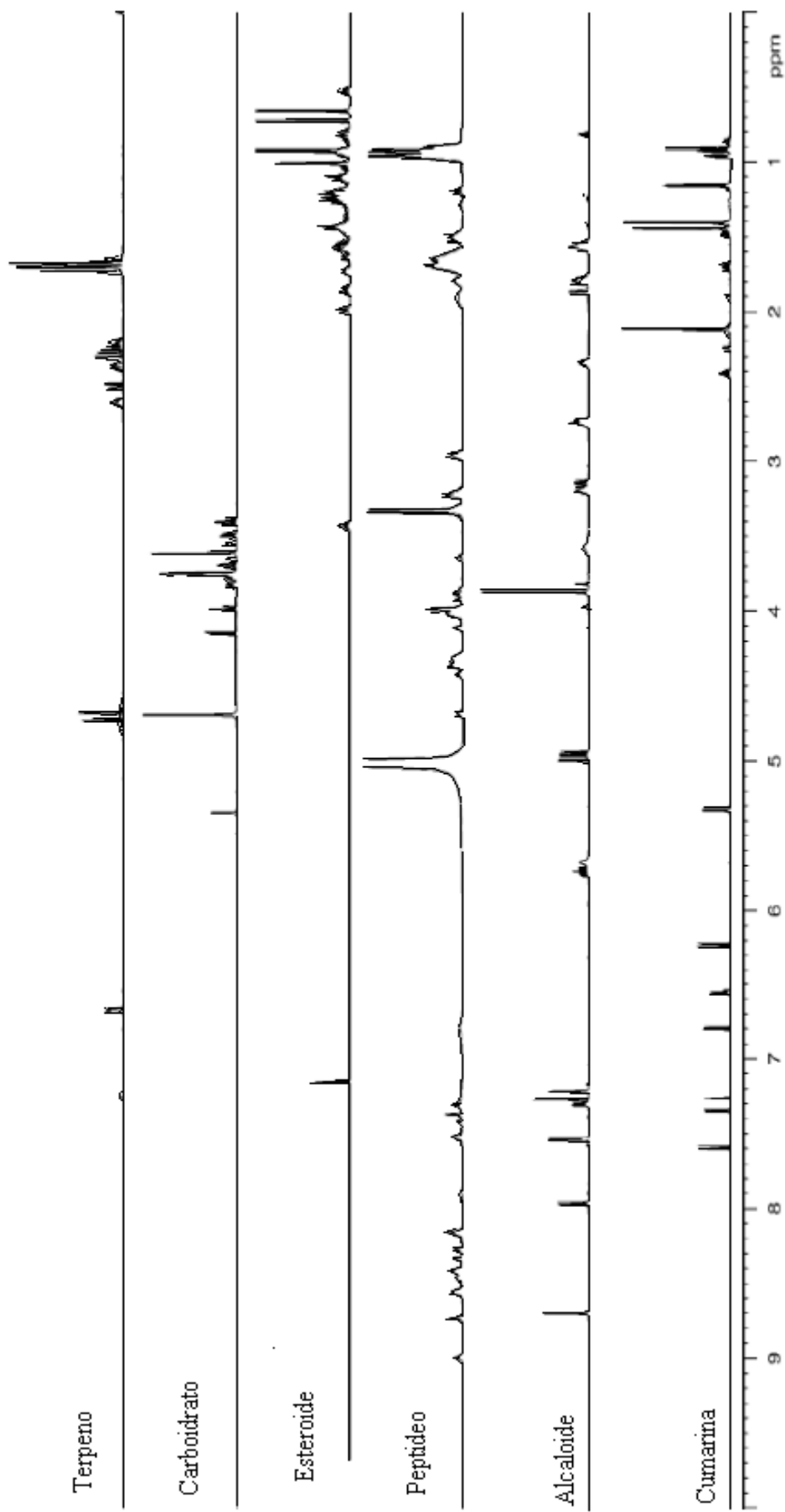
Fonte: MULLER, 2005

Figura 22 - Alguns grupos funcionais e comparação das faixas de deslocamento químico de ^1H e de ^{13}C .



Fonte: SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMBLER, 2006.

Figura 23 - Espectros de alguns compostos pertencentes a classes de produtos naturais diferentes.



Fonte: BROSS-WALCH, 2005.

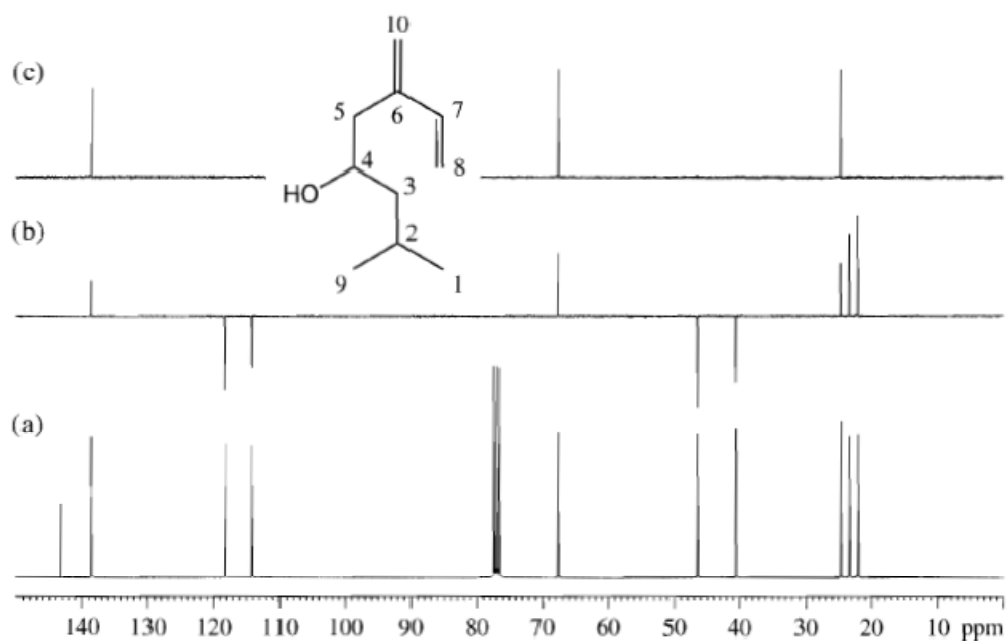
3.13 Tipos de experimentos de ^{13}C em uma dimensão

Inicialmente os experimentos por espectroscopia de RMN ^{13}C eram todos acoplados e forneciam espectros complexos devido à grande sobreposição de sinais. Hoje, os experimentos de RMN ^{13}C têm simplificado os espectros eliminando completamente os acoplamentos, embora o acoplamento de ^1H - ^{13}C forneça informações muito úteis sobre o padrão de hidrogenação da molécula. Um experimento muito usado, mas hoje obsoleto é chamado espectro com desacoplamento de ^1H fora de ressonância onde o acoplamento restringe-se apenas a uma ligação. Nesse experimento, é aplicada a regra de $n + 1$ em que o carbono sem hidrogênio dá um singlete, com um hidrogênio fornece um duplete, com dois um triplete e com três um quarteto (BREITMAIER; VOELTER, 1990).

Outro experimento muito conhecido é o teste do próton ligado ou APT. Nesse experimento há um ajuste na sequência de pulsos e os diferentes acoplamentos ^1H - ^{13}C para grupos metino, metileno e metila são detectados. Os sinais dos carbonos quaternários e de metileno aparecem em uma fase (positiva ou negativa) e os sinais referentes aos grupos metino e metila em outra fase. As fases são consideradas positivas quando aparecem para cima no espectro e as negativas, para baixo (BREITMAIER; VOELTER, 1990).

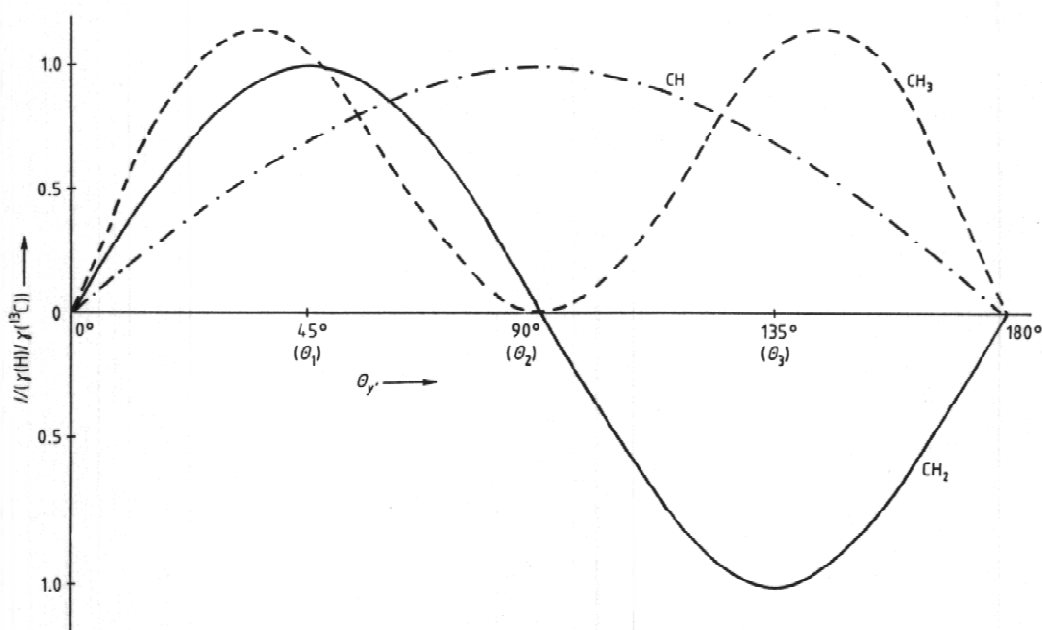
A sequência de pulso DEPT (intensificação da distorção por transferência de polarização) é o experimento preferido para determinar o número de hidrogênios diretamente ligados a um carbono. Esse experimento é mais sensível do que o APT e até mesmo do que o próprio ^{13}C (**Figura 24**). O DEPT é ajustado para o ângulo θ variável do pulso de hidrogênio, geralmente é ajustado para 90° ou 135° (**Figura 25**). No espectro de DEPT 90° aparecem apenas sinais correspondentes a CH e no DEPT 135° aparecem sinais de CH e CH_3 na fase positiva (para cima) e CH_2 na fase negativa (para baixo). Sinais para carbonos quaternários não aparecem nos subespectros de DEPT (PAVIA, 1996).

Figura 24 - (a) Espectro de ^{13}C com desacoplamento padrão do ipsenol em CDCl_3 , em 75,5 MHz. (b) Subespectro DEPT: DEPT 135° CH e CH_3 para cima e CH_2 para baixo. (c) DEPT 90° somente CH.



Fonte: SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMBLER, 2006.

Figura 25 - Intensidade do sinal de ^{13}C versus ângulo de fase para uma série de espectros DEPT. Observe que a 45° todos os sinais de carbono têm sinal positivo, em 90° apenas carbonos terciários possuem sinal e para 135° carbonos secundários têm sinal negativo e carbonos primários e terciários têm sinal positivo.



Fonte: SASAKI, 2010.

3.14 Espectroscopia de RMN em duas dimensões

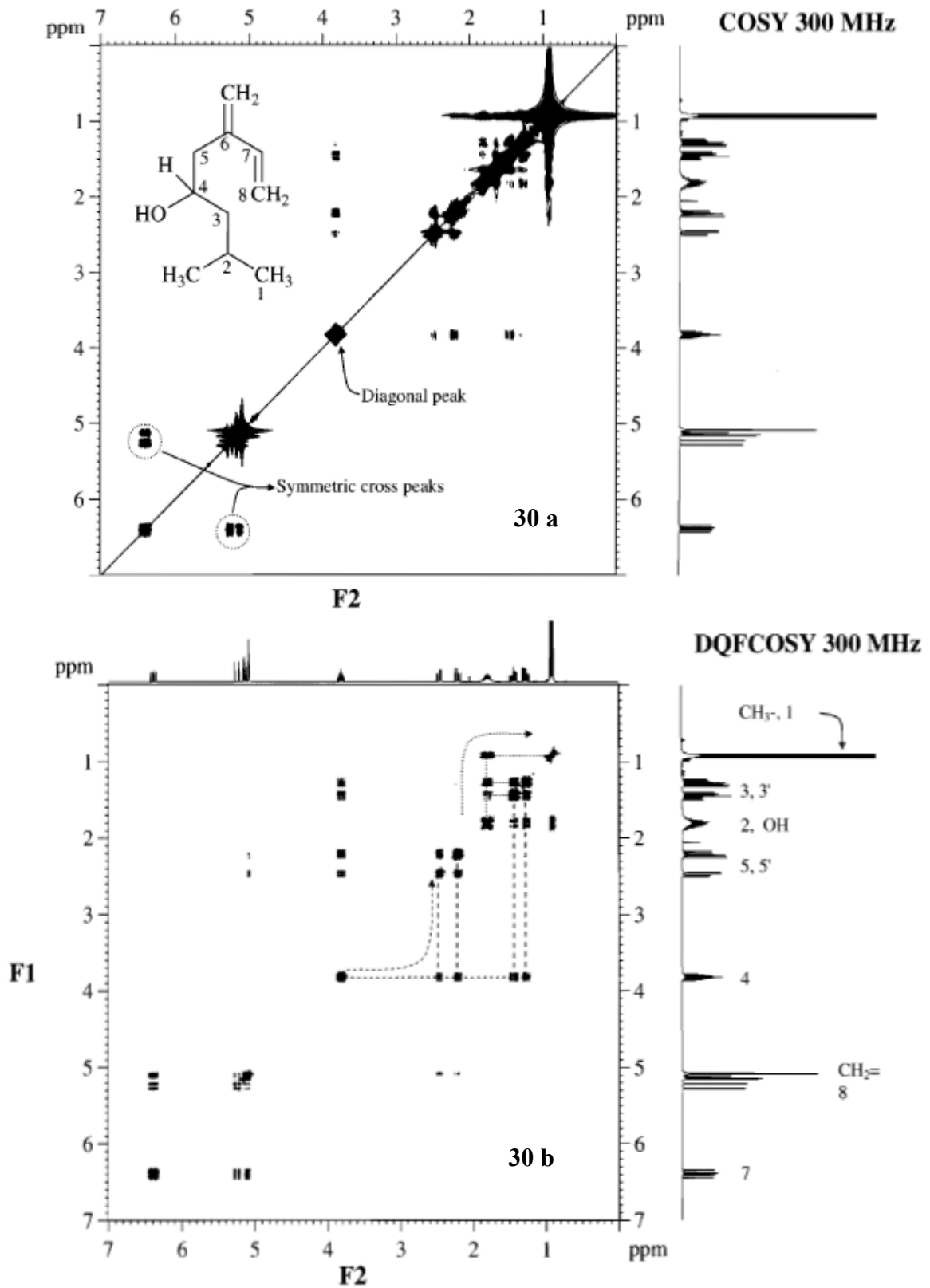
Todos os espectros anteriormente mostrados nesta Tese são do tipo unidimensional, com o deslocamento químico (frequência) posicionado no eixo das abscissas e as intensidades no eixo das ordenadas. Na RMN bidimensional (2D) em ambos os eixos podem estar representados os deslocamentos químicos e as intensidades constituem uma terceira dimensão. Em alguns espectros, como no DOSY, pode ser diferente, o eixo das abscissas representa o deslocamento químico e o das ordenadas, o coeficiente de difusão. O espectro de RMN 2D pode ser de correlação homonuclear $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ou heteronuclear de $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$. O método 2D baseia-se no acoplamento entre núcleos que podem ocorrer de maneira escalar (através das ligações) ou através do espaço pelo efeito Overhauser (FRIEBOLIN, 1991).

As técnicas de RMN em duas dimensões (2D) permitem a elaboração de um mapa estrutural na análise de compostos de estruturas complexas de uma maneira mais precisa do que usar apenas as técnicas mais simples unidimensionais e dados da literatura. É importante também conhecer a influência de outros fatores como anisotropia magnética, eletronegatividade, estereoquímica, etc. (KAISER, 2000). Algumas das técnicas mais usadas são relatadas a seguir:

3.15 COSY: Correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (*CORrelation SpectroscopY*)

Esta técnica pode determinar correlações entre hidrogênios geminais e vicinais ($^2J_{\text{H,H}}$), já observadas através de espectros 1D. Os acoplamentos a longa distância ($^4-6J_{\text{H,H}}$) também podem ser observados o que raramente é observado nos espectros em 1D (KAISER, 1999). Os deslocamentos químicos dos hidrogênios estão plotados no eixo horizontal e no vertical formando um diagrama com uma simetria quadrada. As projeções dos espectros unidimensionais de RMN de ^1H formam uma diagonal (**Figura 26 a**). Espectros do tipo DFQ-COSY (*Double Quantum Filtered*) utilizam um filtro duplo-quântico que reduz a intensidades dos sinais da diagonal simplificando o espectro (**Figura 26 b**) (GIL; GERALDES, 1987).

Figura 26 a) - Espectro COSY simples do ipsenol; b) espectro DFQ-COSY.



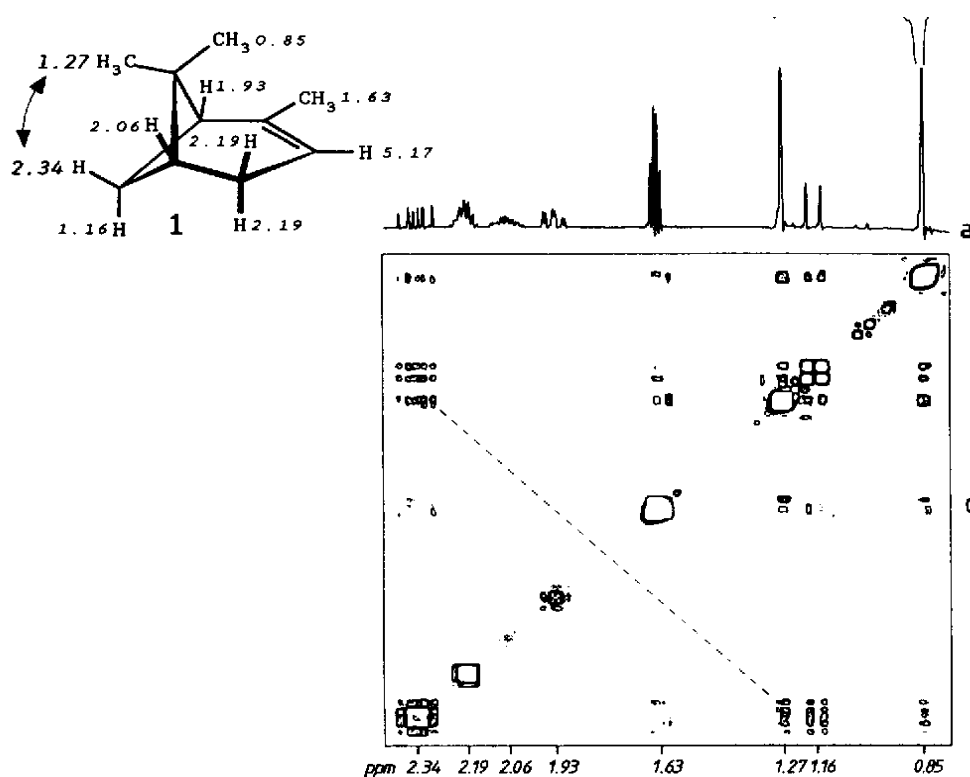
Fonte: SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMBLER, 2006.

3.16 NOESY e ROESY

São experimentos que fornecem informações sobre proximidade $^1\text{H} - ^1\text{H}$ através do espaço com distâncias próximas de 4 Å usando o Efeito Overhauser Nuclear. A técnica permite estabelecer configurações relativas de cada hidrogênio e a geometria da molécula (**Figura 27**), procedimento que também é possível executar através da difração de raio X para compostos na forma cristalina (KAISER, 2000).

O experimento NOESY é bastante útil para moléculas pequenas e grandes, para moléculas de tamanho médio (massa molecular entre 750 e 1500) o efeito é praticamente nulo, nesse caso é preferível executar o experimento ROESY. O NOESY dependendo do tamanho da molécula pode apresentar valores positivos ou negativos enquanto que o ROESY apresenta apenas valores positivos e não nulos, sendo este último muito empregado em análises de macromoléculas biológicas (GIL; GERALDES, 1987; WEI, 2013).

Figura 27 - Espectro parcial NOESY do α -pineno mostrando correlação dos sinais de 1,27 com 2,34 ppm, como forma de estabelecer geometria da molécula.



Fonte: MULLER, 2005.

3.17 HMQC

O experimento HMQC – *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation* fornece informação sobre a correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ diretamente ligados (a uma ligação). Os acoplamentos a longa distância são eliminados. Substituiu o antigo experimento HETCOR (*HETeronuclear CORrelation* – correlação heteronuclear) com a principal diferença que no experimento HETCOR a detecção é feita no canal do carbono e no HMQC é feita no canal do hidrogênio. Como a abundância natural do hidrogênio é muito superior ao carbono, o tempo de experimento é muito menor (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMBLER, 2006).

3.18 HMBC

O experimento HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence* – Coerência Heteronuclear através de Muitas Ligações) utiliza acoplamento de duas ($^2J_{\text{CH}}$), três ($^3J_{\text{CH}}$) e até de quatro ligações ($^4J_{\text{CH}}$), embora algumas correlações a duas ou três ligações possam estar ausentes. A detecção também é feita no canal de hidrogênio como no HSQC e no HMQC. De maneira indireta também podemos encontrar correlações carbono-carbono e correlações entre carbonos tetrassubstituídos e hidrogênios próximos. Antes de analisar um experimento HMBC é muito importante ver antes as correlações do (observadas no HSQC ou no HMQC) para facilitar as correlações (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMBLER, 2006).

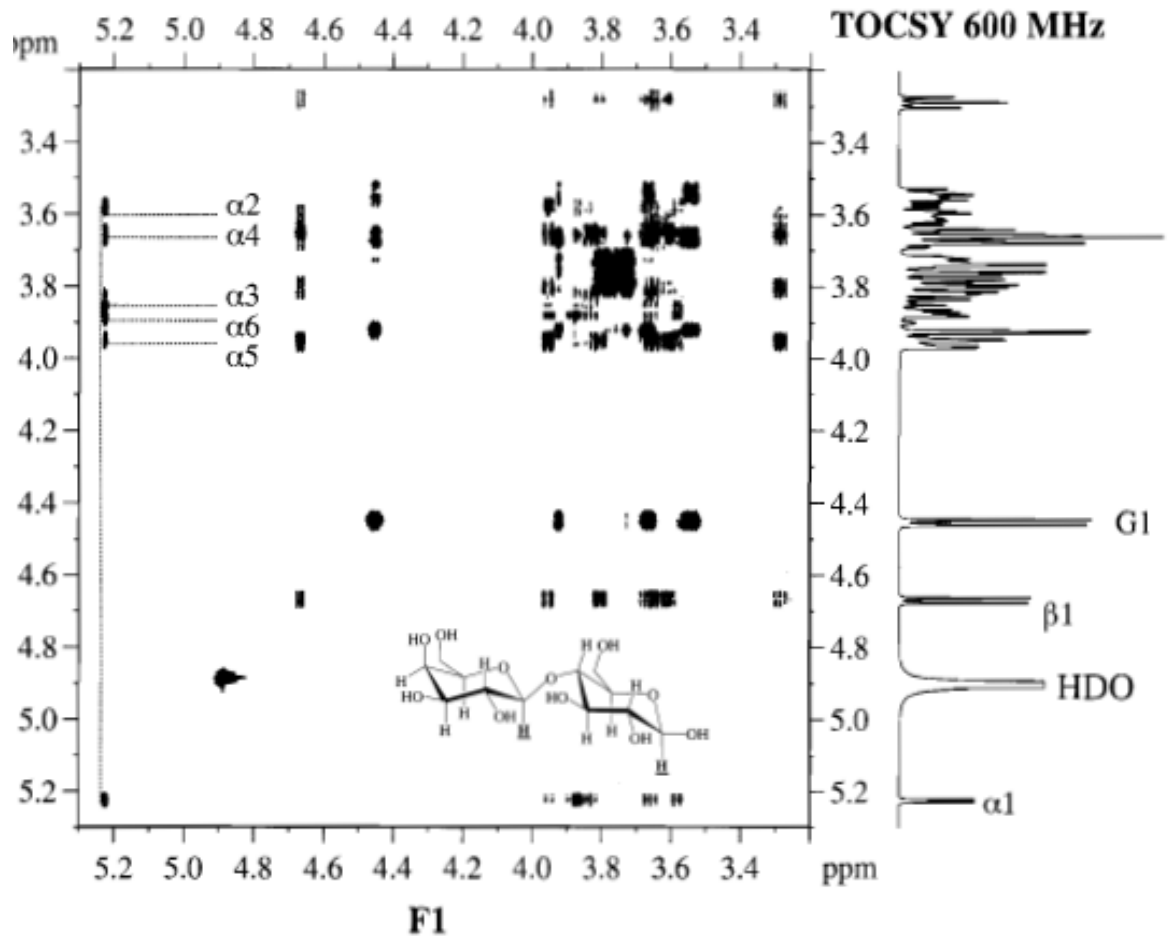
3.19 TOCSY

O experimento TOCSY (**T**otally **C**orrelated **S**pectroscop**Y** - Transferência Coerente Modulada) tem como função a transferência de magnetização para núcleos vizinhos e distantes dentro de um mesmo sistema de spin que podem ou não estarem diretamente acoplados mas que possuem um hidrogênio vizinho comum em que ambos estão acoplados. O experimento é útil quando uma molécula tem um heteroátomo ou um carbono sem hidrogênio formando dois ou mais subsistemas, dessa forma, permite estabelecer correlações entre todos os núcleos que fazem parte de um mesmo sistema de spin e as correlações envolvem a condição HOHAHA - *HO*monuclear *HA*rtmann-*HA*hn (KAISER, 2000).

A sequência de pulso do experimento TOCSY 2-D é semelhante ao 2-D original com a diferença de que em vez de um segundo pulso $\pi/2$ é inserido um período de mistura que trava o spin no eixo y . O resultado é que a magnetização é transferida de um spin para o seu vizinho, depois para o seguinte e assim sucessivamente. O espectro lembra o COSY, com a

diferença principal de que os sinais cruzados do COSY são provenientes dos spins acoplados e no TOCSY (Figura 28) os sinais são da transferência coerente modulada (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMBLER, 2006).

Figura 28 - Espectro TOCSY 2-D da β -lactose. As linhas de correlação e algumas correlações são dadas como ajuda para a interpretação.



Fonte: SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMBLER, 2006.

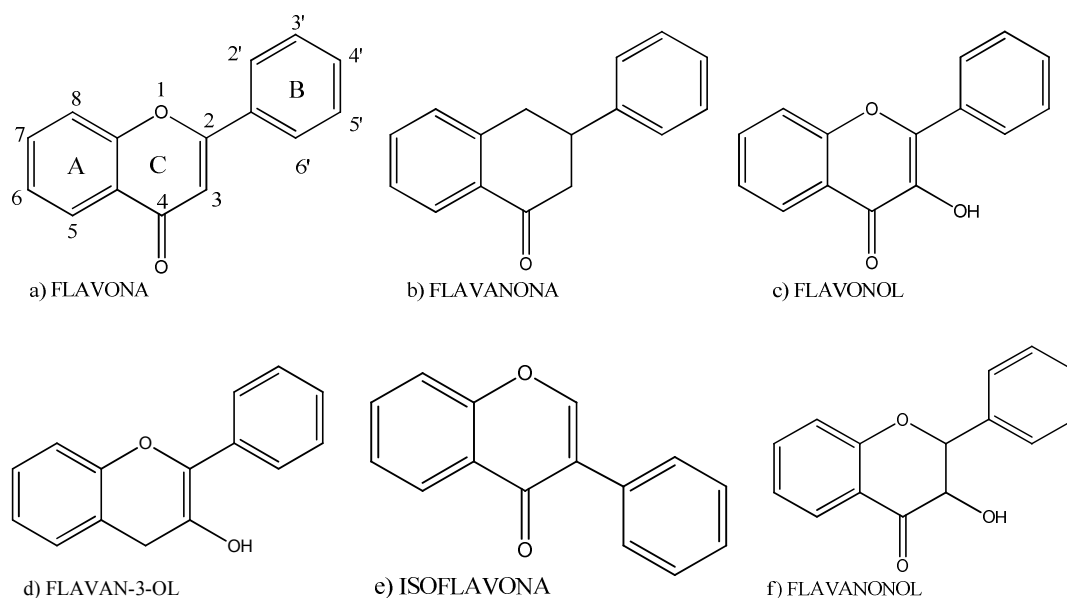
4 APLICAÇÃO DA RMN NA ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE PRODUTOS NATURAIS.

4.1 Identificação de Flavonoides

Os flavonoides são uma classe de compostos fenólicos que vem apresentando uma grande variedade de atividades farmacológicas como atividade antialérgica, anti-inflamatória, antimicrobiana e potencial atividade antioxidante no combate aos radicais livres que causam envelhecimento (KHAN, 2010), há relatos de alguns serem analgésicos e hipotensores (GALLEGOS-OLEA, e col. 2008).

Os flavonoides podem ser considerados como derivados de 2-fenilcromona, com três anéis A, B e C, e variados níveis de hidroxilação e metoxilação, podendo ainda ter outros grupos como substituintes. A classificação pode ser feita de acordo com sua estrutura química principal que é geralmente dividido em seis grupos: a) *flavonas*, b) *flavanonas*, c) *flavonóis*, d) *flavan-3-ol*, e) *isoflavonoides* e f) *flavanonóis*, de acordo com os substituintes dos carbonos 3 e 4 (**Figura 29**) (LI; JIANG, 2007).

Figura 29 - Estrutura básica dos flavonoides, em (a) é mostrado sistema de numeração.

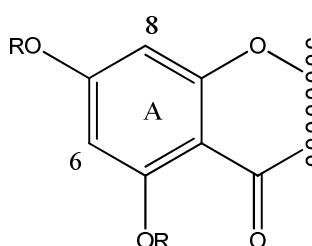


Fonte: Autor, 2013.

Técnicas de RMN têm sido muito empregadas na determinação estrutural de flavonoides. O tipo de flavonoide é estabelecido analisando os sinais do anel C e definindo o padrão de substituição dos anéis A e B.

O anel A pode apresentar vários padrões de substituição, como uma ou mais hidroxilas, metoxilas, etc. Alguns exemplos são representados nas Figuras 30 e 31. No exemplo da **Figura 30** os sinais dos hidrogênios 6 e 8 apresentam-se como dois dupletos com integração para um hidrogênio cada, na região de aromáticos e constante de acoplamento *meta* ($J = 2,5$ Hz). O sinal de H-6 apresenta deslocamento químico menor do que o de H-8, (6,2 ppm para H – 6 e 6,4 ppm para H – 8), por estar protegido pelos grupamentos – OR de C- 5 e C-7 (HARBONE e col, 1975).

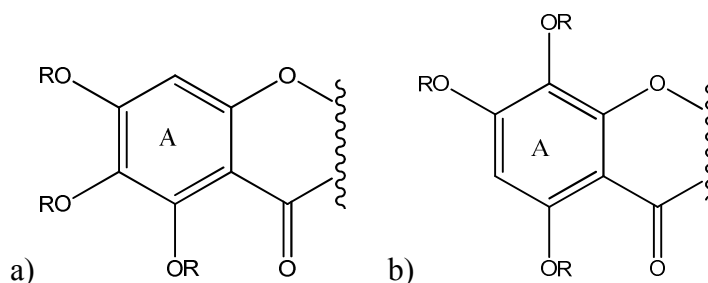
Figura 30 - Anel A de flavonoide substituído nas posições 5 e 7.



Fonte: Autor, 2013.

Nos casos destacados na **Figura 31** (a) e (b), cada hidrogênio apresenta no espectro um simpleto na região de aromáticos com integração para um hidrogênio, sendo que o sinal de H-6 aparece próximo de 6,4 ppm e o sinal de H-8 aparece em torno de 6,8 ppm, também devido ao efeito da proteção dos grupamentos em C- 5 e C – 7.

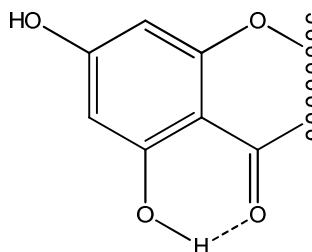
Figura 31 - Anel A de flavonoide substituído nas posições 5, 6 e 7 e nas posições 5, 7 e 8.



Fonte: Autor, 2013.

Um sinal acima de 12 ppm indica a presença de um grupo hidroxila quelatogênico em anel de seis membros, sugerindo participação em forte ligação de hidrogênio intramolecular (**Figura 32**), a presença desse sinal é muito comum em flavonóides (MOCCELINI et al, 2009; MABRY, 1970, PIZZOLATTI, 2003).

Figura 32 - Fragmento de flavonoide mostrando ligação de hidrogênio intramolecular.

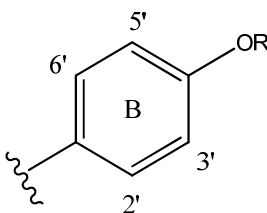


Fonte: Autor, 2013.

O anel B pode apresentar substituintes em várias posições, como por exemplo, 3', 4' e 5'; 3' e 4'; 4' e 5'; ou apenas em uma das posições. Quando o anel B apresentar um substituinte na posição 4', os sinais de RMN de ^1H possuem um padrão equivalente a um anel aromático *p*-dissubstituído (**Figura 33**).

Os sinais aparecem como dois dupletos na região de aromáticos com constante de acoplamento em *orto* ($J = 8,5$ Hz) e integração para dois hidrogênios, devido à livre rotação do anel B em torno da ligação com o anel C e equivalência química dos hidrogênios 2' e 6' e dos hidrogênios 3' e 5' (HARBONE e col. 1975; MOREIRA e col, 2003). O duplete referente aos hidrogênios 3' e 5', apresentam um deslocamento químico menor do que 2' e 6' pois esses hidrogênios estão mais protegidos pelo grupo em C-4' devido ao efeito mesomérico (MOREIRA e col, 2003).

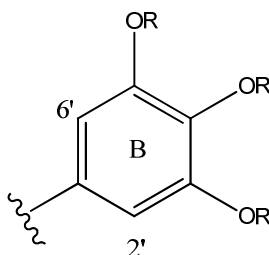
Figura 33 - Anel B de flavonoide substituído em 4'. R = H ou Me.



Fonte: Autor, 2013.

Para o exemplo mostrado na **Figura 34**, os hidrogênios 2' e 6', são equivalentes e os sinais referentes a eles se apresentam como um simpleto com integração para dois hidrogênios na região de aromáticos entre 6,7 e 7,5 ppm (HARBONE e col. 1975).

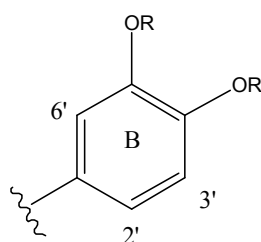
Figura 34 - Anel B de flavonoide substituído em 3', 4' e 5'. R = H ou Me.



Fonte: Autor, 2013.

Flavonoides substituídos nas posições 4' e 5', não possuem hidrogênios equivalentes e, portanto, aparecem três sinais, sendo um para cada hidrogênio (**Figura 35**). O sinal do H-6' se apresenta como um duplete com $J = 2,5$ Hz, aproximadamente, devido ao acoplamento meta com H-2'. O sinal de H-3', se apresenta também como um duplete com $J = 8,5$ Hz devido ao acoplamento orto, também com H-2'. O H-2' acopla em orto com H-3' ($J=8,5$ Hz) e em meta com H-6' ($J=2,5$ Hz) produzindo um duplete duplo (HARBONE e col. 1975).

Figura 35 - Anel B de flavonoide substituído em 4' e 5'. R = H ou Me.



Fonte: Autor, 2013.

Metoxilas em flavonoides são caracterizadas pela presença de simpletos intensos na região entre 3,5 e 4,0 ppm. Açúcares apresentam sinais próximos de 5,0 ppm sendo estes referentes aos hidrogênios anoméricos que é reforçado pela presença de sinais entre 3,0 e 4,0 ppm que são os sinais referentes aos hidrogênios metínicos. Dupletos na região próxima de 1,0 ppm, com integração para três hidrogênios e constante de acoplamento em torno de 6,0 Hz

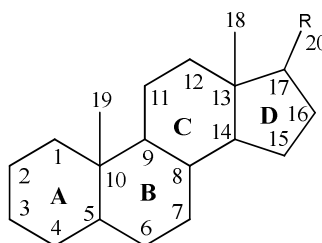
indicam ramnose. Sinais largos e intensos entre 4,0 e 5,0 ppm podem estar presentes e são referentes aos hidrogênios das hidroxilas das unidades glicosídicas. A presença destes é devido à troca química entre os hidrogênios dos grupos OH com a água presente no solvente, isso faz com que o hidrogênio não permaneça ligado à estrutura por tempo suficiente para uma boa definição do sinal. A adição de água deuterada (D₂O) simplifica o espectro eliminando os sinais, pois a troca passa a ocorrer entre OH e D₂O atenuando ou removendo o sinal (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMBLER, 2006).

A presença de flavonoides é reforçada pela observação de sinais com deslocamentos químicos próximos de 180 ppm em experimentos de RMN de ¹³C, típicos de carbonilas em flavonoides e uma grande quantidade de sinais em região de aromáticos. Quando glicosilado, observam-se sinais com deslocamentos químico próximo de 100 ppm para sinais de carbonos anoméricos, que podem ser confirmados por sinais em torno de 61 ppm, para grupos metilênicos da glicose e 17 ppm para metilas da ramnose (BREITMAIER, 1990).

4.2 Identificação de Esteroides

Os esteroides são alcoóis, sólidos à temperatura ambiente, possuem de 27 a 29 átomos de carbono e natureza apolar quando livres ou polar quando glicosilados. Alguns são de origem animal, como o colesterol, e outros são de origem vegetal como os fitosteróis (estigmasterol, β-sitosterol, ergosterol). Possuem um esqueleto básico (**Figura 36**) correspondente ao ciclopentano peridrofentreno, que é comum a todos os esteroides, e uma cadeia lateral (DOMÍNGUEZ, 1975).

Figura 36 - Esqueleto básico de um esteroide.



Fonte: Autor, 2013.

Os espectros de RMN de ^1H apresentam um perfil que é muito típico para esteroides. A região compreendida entre 1,0 e 3,0 ppm contém uma grande quantidade de sinais correspondente aos grupos metila e metileno do núcleo esteroidal. Entre 0,7 e 1,2 ppm, estão presentes sinais bastante intensos correspondente aos hidrogênios dos grupos metílicos de C-18 (0,73 ppm) e C-19 (1,20 ppm). Em 0,89 e 0,87 ppm, aparecem dupletos para os hidrogênios em C-21 e C-26, respectivamente. Os hidrogênios vinílicos produzem um simpleto largo entre 5,2 e 5,5 ppm (DOMÍNGUEZ, 1975).

4.3 Identificação de Carboidratos

Até a década de 80, as configurações anoméricas dos açúcares eram presumidas devido ao fato de que D-açúcares ocorriam naturalmente com ligações β -glicosídicas e L-açúcares com ligações α -glicosídicas. Atualmente, dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e constantes de acoplamento (J) de hidrogênio permitem determinar a configuração dos hidrogênios anoméricos. Após a década de 80, tanto a presença de carboidratos, quanto as configurações α e β passaram a ser estabelecidas com a utilização de dados de deslocamento químico.

Sinais de RMN de ^1H em torno de 4,5 a 5,0 ppm podem indicar a presença de hidrogênios anoméricos de açúcares que são reforçados com a presença de multipletos, que às vezes aparecem alargados, entre 3,0 e 4,0 ppm. Em espectros de RMN de ^{13}C a presença dos carboidratos pode ser confirmada pela presença de sinais com deslocamento químico entre 90 a 115 ppm, correspondentes aos carbonos anoméricos e sinais em torno de 70 a 80 ppm, relativos aos carbonos hidroxilados (BORGES, 2006; GIL; e GERALDES, 1987).

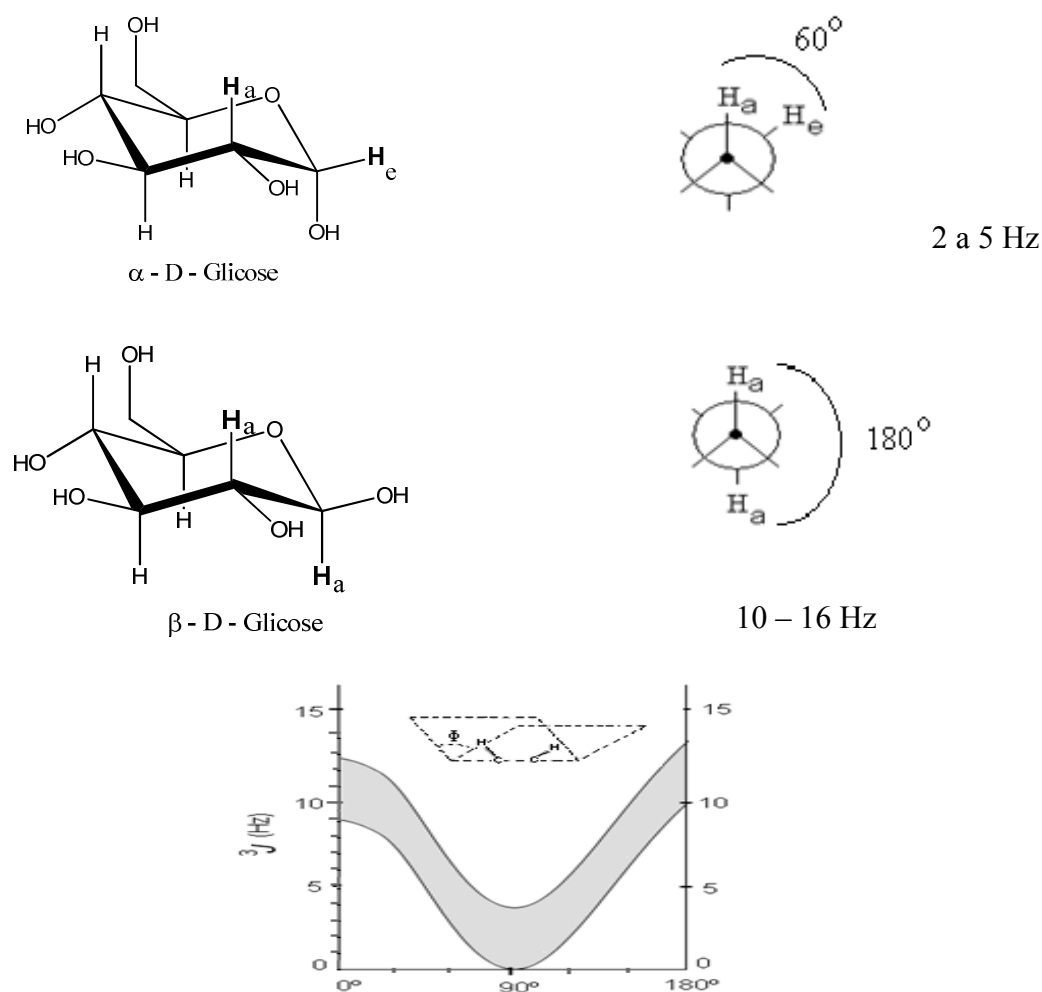
A presença de glicosídeos pode ser destacada ainda pela existência de um sinal em torno de 61 ppm e de açúcares da classe 6-desoxi, como por exemplo para a ramnose, poderá ser observado um sinal em frequência mais baixa, em torno de δ_{H} 1,1 – 1,3 ppm (d , 5-8 Hz) e de δ_{C} 17-20 ppm. (BORGES, 2006; GIL e GERALDES, 1987).

A observação do ângulo de diedro (Φ) é um fator muito importante para entender o acoplamento de hidrogênios vicinais em sistemas saturados. Esse ângulo pode ser visto através da projeção de Newman dos hidrogênios vicinais que mostra o ângulo de diedro formado (**Figura 37**). As deduções do ângulo de diedro podem ser observadas através da curva de Karplus, mas só são confiáveis quando comparados com compostos semelhantes,

como os ciclo-pentanos, ciclo-hexanos, carboidratos e sistema policíclicos em ponte (FRIEBOLIN, 1991).

Uma aplicação muito importante para a curva de Karplus é a análise conformacional de compostos cíclicos, principalmente dos derivados do ciclo-hexano e carboidratos do tipo piranose. Para todos os compostos de seis membros a conformação em cadeira é a preferida. Nessa conformação a distinção é feita entre hidrogênios de posição axial (a) e equatorial (e). Dependendo da posição relativa entre eles, os possíveis acoplamentos podem ser: ${}^3J_{aa}$, ${}^3J_{ae}$, ${}^3J_{ee}$ (Figura 37). Entre eles, a maior constante de acoplamento esperada é de 10 – 16 Hz para ${}^3J_{aa}$, que forma um ângulo de diedro de 180°. Para ${}^3J_{ae}$ e ${}^3J_{ee}$ a constante de acoplamento é de 2 a 5 Hz (FRIEBOLIN, 1991).

Figura. 37 - Constantes de acoplamento para a glicose e ângulo de diedro de acordo com a conformação α ou β e Curva de Karplus.



Fonte: FRIEBOLIN, 1991

A configuração da glicose pode ser determinada pelas constantes de acoplamento dos sinais dos hidrogênios anoméricos. Para configuração α de H1 e H2 são encontrados valores entre 1 e 4 Hz devido à interação equatorial - equatorial e para configurações β , valores entre 6 e 8 Hz devido à interação axial – axial. A **Tabela 4** mostra alguns tipos de configurações relacionadas com a constante de acoplamento (GIL e GERALDES, 1987).

Tabela 4 - Estereoquímica do glicosídeo e relação com a constante de acoplamento.

<i>Grupo</i>	<i>Glicosídeo</i>	<i>Configuração</i>	<i>J (Hz)</i>
Piranosídeo	D – glicose, galactose, xilose	β	7 - 8
	D – glicose, galactose, xilose	α	3 - 4
	L - ramnose	β	1
	L - ramnose	α	2
	L - arabinose	β	2,5
	L - arabinose	α	8
Furanosídeo	D – glicose, galactose, xilose	β	0 - 2
	D – glicose, galactose, xilose	α	4 – 4,5
	L - arabinose	β	4
	L - arabinose	α	1

Fonte: ALMEIDA, 2007.

4.4 Identificação de Saponinas

As saponinas estão amplamente distribuídas pelo reino vegetal. Estima-se são encontradas mais de 90 famílias e 500 gêneros diferentes de plantas. As saponinas são encontradas em muitas plantas utilizadas na alimentação humana, como soja, amendoim, inhame, cebola, alho, aveia, berinjela, batata, vagem, chás, espinafre, etc. (BORGES, 2006).

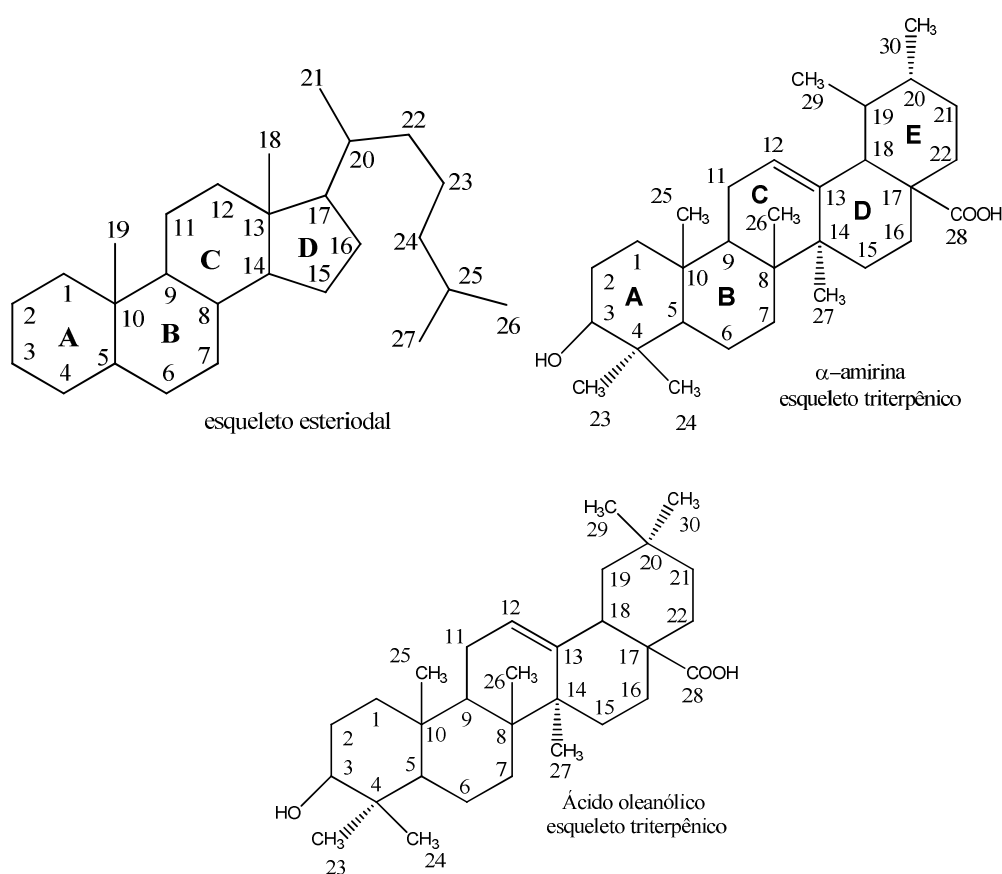
A classificação de uma saponina era baseada em propriedades emulsificantes, atividades hemolíticas, toxicidade para peixes e sabor amargo, mas devido a uma gama de exceções, a classificação agora é feita com base na estrutura química. Algumas características das saponinas são: solubilidade em álcool e solvente aquoso, (principalmente levemente básico); propriedade hemolítica; sabor amargo; complexação com colesterol e emulsificante (BORGES, 2006).

Muitas espécies diferentes de plantas possuem uma alta concentração de saponinas, a explicação para isso é que estas substâncias funcionam como meio de defesa contra o ataque de fungos, bactérias ou vírus. As saponinas são tóxicas para muitos animais, principalmente para os de sangue frio, podendo atuar como moluscicida, piscicida, antifúngica,

antibacteriana, antiviral, etc. Pode atuar ainda como anti-inflamatória, espermicida, analgésica, e redutora de colesterol (SPARG et. al., 2004; MURGU, 2002; MAHATO et. al., 1988).

A identificação completa de uma saponina é muito difícil, devido ao tamanho das moléculas que são muito grandes e complexas. As saponinas podem ser classificadas como esteroidais, com um esqueleto de 27 carbonos em um sistema tetracíclico ou triterpênicas, com um esqueleto de 30 carbonos em um sistema pentacíclico, ligadas a um ou mais resíduos de carboidratos (**Figura 38**).

Figura 38 - Exemplos de esqueletos de esteroide e triterpenos presentes em saponinas.



Fonte: Autor, 2013.

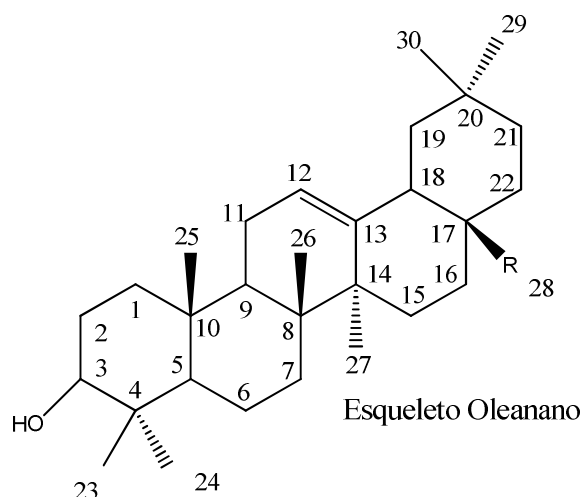
A espectroscopia de RMN ^1H , RMN ^{13}C e RMN 2D é uma técnica muito útil para a identificação de saponinas que são moléculas grandes e de difícil elucidação estrutural devido ao grande número de sinais que geralmente ficam sobrepostos. Para uma identificação

completa é necessário determinar a estrutura da aglicona (esteroide ou triterpeno), identificar os monossacarídeos na parte carboidratos, com a configuração anomérica de cada monossacarídeo e como estão ligados. (GUTERRES, 2005).

Muitas publicações trazem assinalações de deslocamentos químicos de ^1H e de ^{13}C de triterpenos pentacíclicos como nos casos de oleananos, ursanos, lupanos e hopanos. Apenas esses dados podem não serem suficientes para a elucidação estrutural de novos triterpenos, mas servem como base para identificação para essa classe de produtos naturais quando analisada juntamente com experimentos de RMN bidimensionais (MONTE; OLIVEIRA, 2001).

A **Figura 39** e **Tabela 5** mostram alguns dados de deslocamento químico para alguns triterpenos da série oleanano e **Figura 40** junto com a **Tabela 5**, mostram dados da série ursano (NAKANISHI, 1983).

Figura 39 - R = CH₃: β-amirina; R = CO₂CH₃: oleanolato de metila.



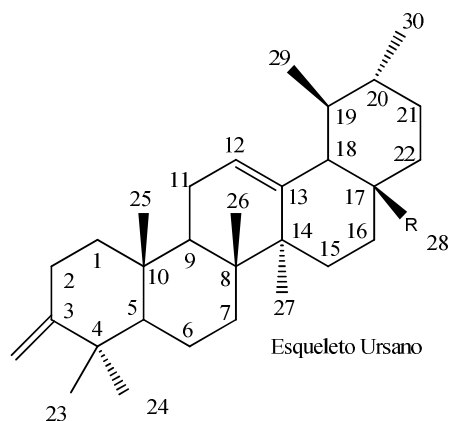
Fonte: NAKANISHI, 1983.

Tabela 5 - Deslocamentos químicos de ^{13}C da β -amirina e do oleanolato de metila

C	β -amirina	oleanolato de metila
1	38,5	38,5
2	27,0	27,1
3	78,9	78,7
4	38,7	38,7
5	55,1	55,2
6	18,3	18,3
7	32,6	32,6
8	39,7	39,3
9	47,6	47,6
10	37,0	37,0
11	23,4	32,1
12	121,7	122,1
13	145,0	143,3
14	41,7	41,6
15	26,2	27,7
16	27,3	23,4
17	32,5	46,6
18	47,2	41,3
19	46,8	45,8
20	31,1	30,6
21	34,8	33,8
22	37,2	32,3
23	28,1	28,1
24	15,5	15,6
25	15,5	15,3
26	16,8	16,8
27	26,0	26,0
28	28,3	177,9
29	33,2	33,1
30	23,6	23,6

Fonte: NAKANISHI, 1983.

Figura 40 - R = CH₃: α -amirina; R = CO₂CH₃: ursolato de metila.



Fonte: NAKANISHI, 1983.

Tabela 6 - Deslocamentos químicos de ¹³C da α -amirina e do ursolato de metila

(Continua)

C	α -amirina	ursolato de metila
1	38,7	38,8
2	27,2	27,3
3	78,8	78,8
4	38,7	38,8
5	55,2	55,4
6	18,3	18,4
7	32,9	33,0
8	40,0	39,6
9	47,7	47,5
10	36,9	37,0
11	23,3	23,3
12	124,3	125,5
13	139,3	138,0
14	42,0	42,0
15	28,7	28,2
16	26,6	24,3
17	33,7	48,1
18	58,9	52,8
19	39,6	39,1
20	39,6	38,8
21	31,2	30,7

Tabela 6 - Deslocamentos químicos de ^{13}C da α -amirina e do ursolato de metila

(Continuação)

22	41,5	36,7
23	28,1	28,2
24	15,6	15,5
25	15,6	15,7
26	16,8	16,9
27	23,3	23,6
28	28,1	177,7
29	17,4	16,9
30	21,3	21,1

Fonte: NAKANISHI, 1983.

É muito difícil fazer o isolamento e a purificação das saponinas porque elas são muito polares, possuem massa molecular muito elevada e qualquer modificação na aglicona ou nas unidades glicosídicas, seja na sequência em que estão ligadas ou posição dos carboidratos na aglicona gera uma nova substância resultando uma mistura muito complexa nos extratos (GUTERRES, 2005).

5 EXPERIMENTAL

5.1 Obtenção do material

O flavonoide glicosilado foi obtido do isolamento dos constituintes químicos de *Melloa quadrivalvis* feito por Regina Lúcia Pinheiro de Carvalho durante suas pesquisas de Mestrado, no IQB-UFAL. Os processos de extração e isolamento encontram-se descritos em sua Dissertação de Mestrado defendida em 1996. A amostra recebeu o código Mq-13.

As amostras contendo a saponina triterpênica e os esteroides foram cedidas por Edjane Vieira Pires que isolou esses compostos de *Serjanea lethalis*, durante seu trabalho de mestrado. Os processos de extração e isolamento encontram-se descritos em sua Dissertação de Mestrado defendida em 2008 onde receberam os códigos SLR e SLE, respectivamente.

A amostra para estudo do metabólito secundário de *Curvularia eragrostidis* foi cedida pelo Prof. Gauss Andrade do CECA, UFAL e foi codificada como amostra a-11.

5.2 Purificação da amostra a-11

A amostra a-11 apresentou um aspecto gelatinoso de cor marrom. O material (60 mg) foi fracionado em coluna cromatográfica com 3,0 g de gel de sílica e eluído com 250 mL de etanol:acetato de etila 5:2 e recolhido em 30 frascos de 10 mL numerados de 1 a 30. As frações dos frascos 14 e 15 foram reunidas e após a eliminação do solvente, a amostra obtida foi analisada por RMN e CG/EM.

5.3 Obtenção dos espectros de RMN

Os experimentos de RMN foram obtidos em um espectrômetro BRUKER Avance 400 MHz. (RMN-¹H: 400 MHz, NMR-¹³C: 100 MHz) com transformada de Fourier; os deslocamentos químicos estão expressos em δ (ppm) e constantes de acoplamentos (J) descritos em Hertz (Hz) à temperatura de 20 °C.

- Foram realizados experimentos de RMN de ¹H, RMN de ¹³C, DEPT 135, DEPT 90, HSQC, HMBC, COSY, NOESY, TOCSY e DOSY no Laboratório de RMN do IQB, UFAL.

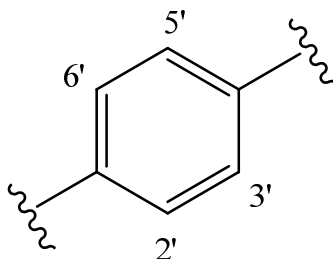
- Os solventes usados na obtenção dos espectros foram todos deuterados: CDCl_3 , CD_3OD , D_2O e $\text{DMSO}-d_6$.
- Os espectros foram processados pelo programa TOPSPIN 1.3 da BRUKER.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Amostra Mq-13 de *Melloa quadrivalvis*

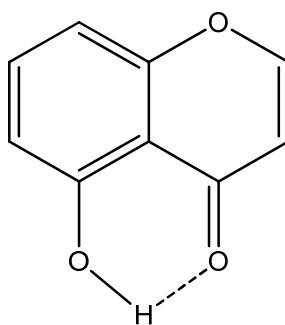
O espectro de RMN de ^1H mostra em 6,89 e 7,87 ppm dois dupletos com constantes de acoplamento de 8,22 Hz e integração para dois hidrogênios cada sinal, sugerindo a presença de um sistema aromático para-dissubstituído (**Figura 41**) (MABRY, 1970). Um sinal em 12,74 ppm, pouco intenso, indica a existência de um grupo hidroxila quelatogênico em anel de seis membros, sugerindo participação em forte ligação de hidrogênio intramolecular (**Figura 42**) (MOCCELINI et al, 2009; MABRY, 1970, PIZZOLATTI, 2003).

Figura 41 - Fragmento da substância presente na fração Mq-13



Fonte: Autor, 2013.

Figura 42 - Fragmento da substancia presente na fração Mq-13 mostrando ligação de hidrogênio intramolecular.



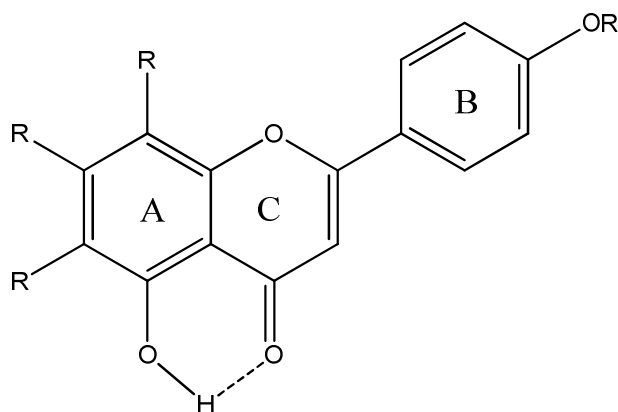
Fonte: Autor, 2013.

Um simpleto em 3,72 ppm com integração para três hidrogênios sugere a presença de uma metoxila. Dois outros simpletos estão presentes, um em 6,65 e outro em 6,92 ppm, com integração para um hidrogênio cada. O espectro revela também, sinais característicos

hidrogênios anoméricos de açúcares, com um duplete em 5,24 ppm ($J = 7,40$ Hz), outro duplete em 5,18 ppm ($J = 1,5$ Hz), mais um duplete em 1,05 ppm ($J=6,08$ Hz), típico de metila de ramnose e vários sinais na região entre 3,12 ppm e 3,70 ppm referentes a sinais de hidrogênios metínicos de açúcares.

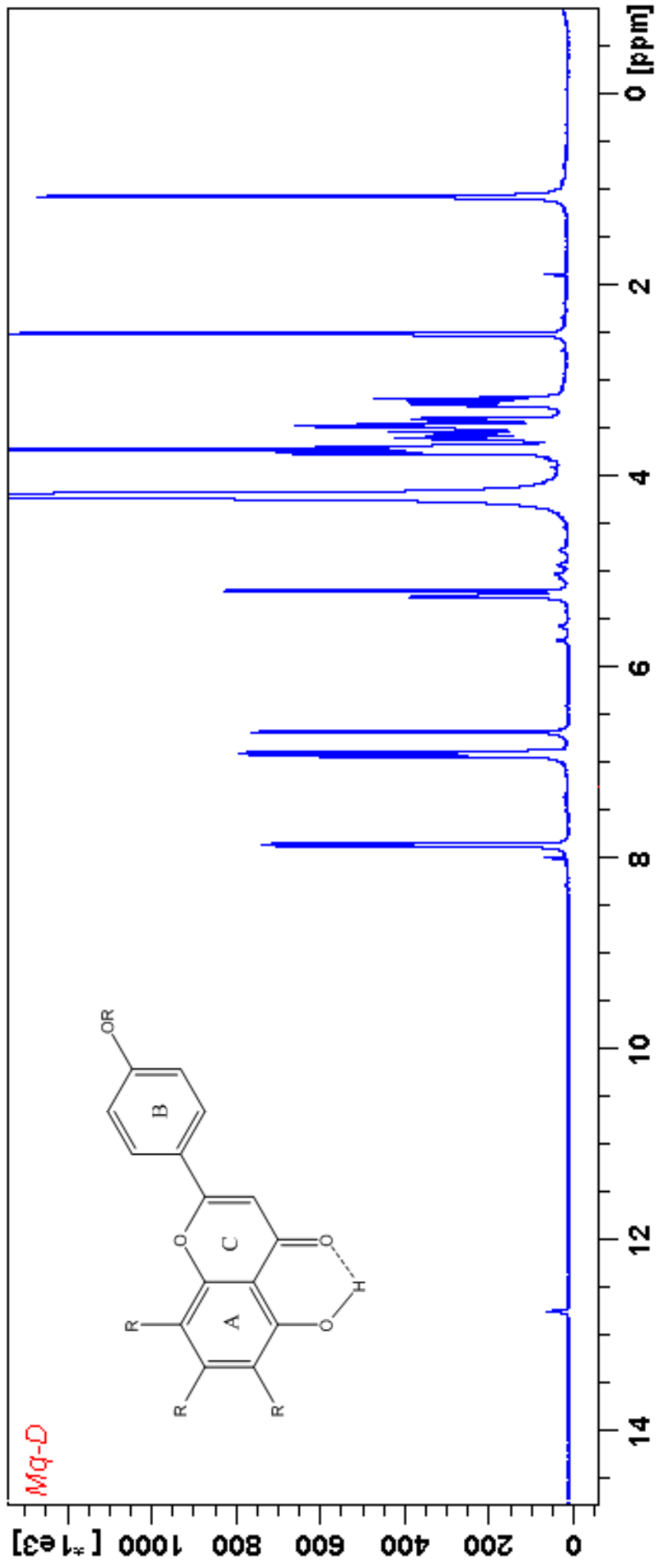
Os dados de RMN de ^1H são sugestivos para flavonoide ($\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$) do tipo flavona com um substituinte na posição 4' (anel B) e três substituintes no anel A, ou seja, há apenas um hidrogênio no anel A, não sendo possível em uma análise preliminar precisar a sua posição (**Figura 43**). O espectro de RMN de ^1H para a amostra Mq-13 pode ser visto na **Figura 44**.

Figura 43 - Estrutura preliminar da flavona, presente em Mq-13.



Fonte: Autor, 2013.

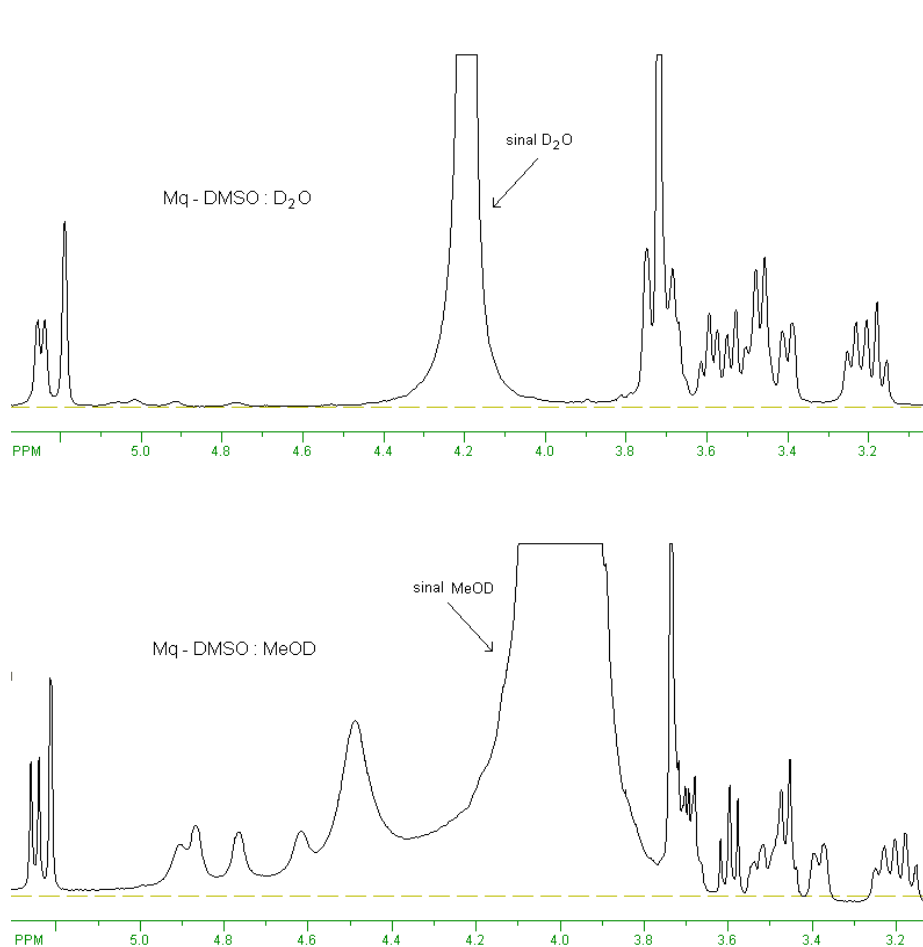
Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H da amostra Mq - 13. DMSO/ D_2O .



Fonte: Autor, 2013.

O experimento realizado em DMSO/metanol mostrou sinais largos na forma de simpletos na região entre 4,2 e 5,6 ppm, característicos de hidroxilas alifáticas. Esses sinais largos tornaram-se ausentes quando o experimento foi realizado em DMSO/D₂O (**Figura 45**).

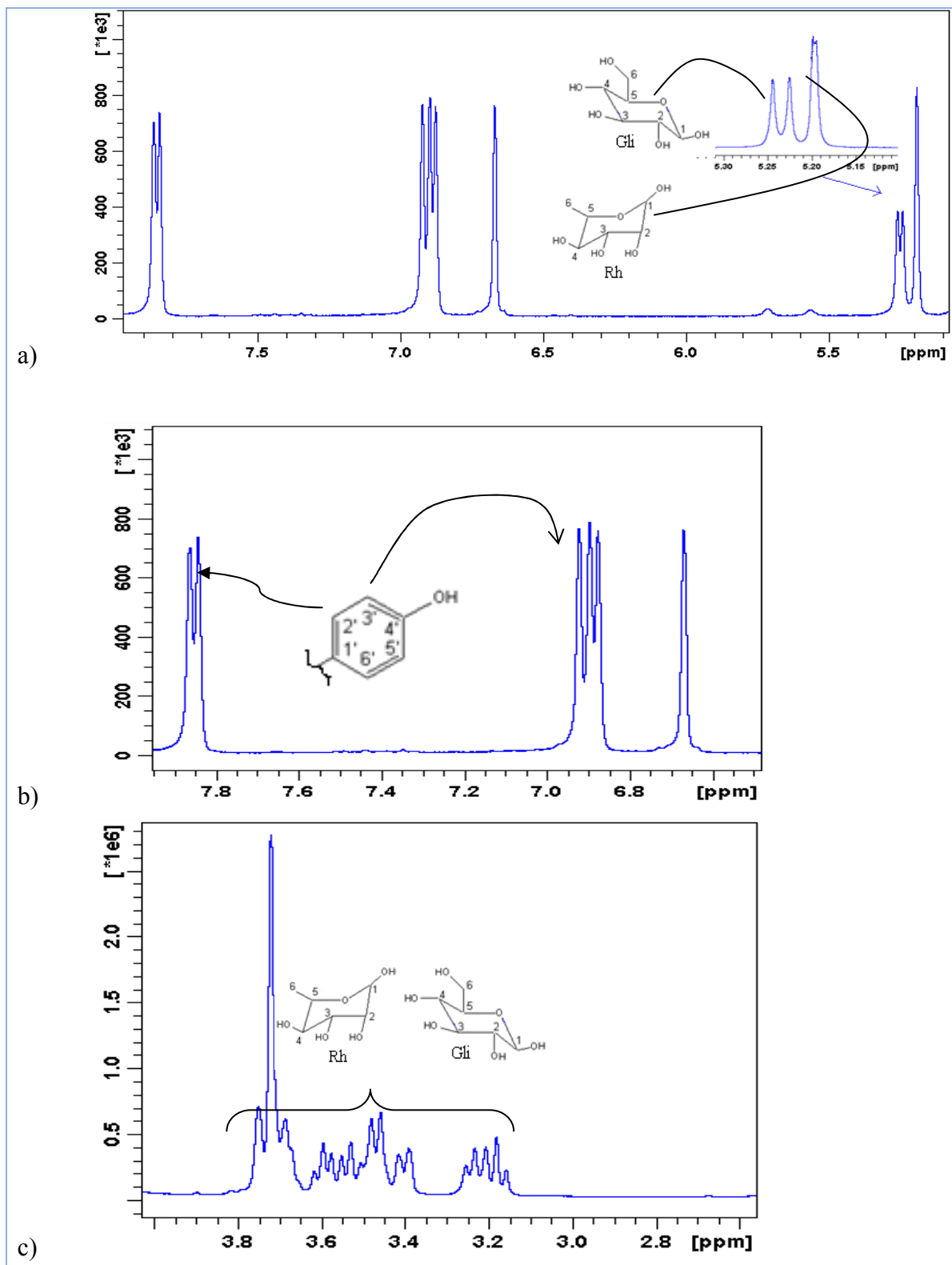
Figura 45 - Comparação dos espectros de RMN de ¹H com expansão da região 4,2 a 5,6 ppm. Experimento superior realizado em DMSO/D₂O e inferior realizado em DMSO/MeOD.



Fonte: Autor, 2013.

O primeiro dos açúcares é reconhecido como a β-glicose apresentando um sinal característico em 5,24 ppm com constante de acoplamento de $J = 7,40$ Hz do hidrogênio anomérico com interação axial – axial com H_G-2. O Segundo é a α-ramnose que apresenta um duplete em 5,18 ppm e constante de acoplamento de $J = 1,5$ Hz da interação do hidrogênio anomérico com a interação equatorial – equatorial (**Figura 46**).

Figura 46 - Expansões do espectro de RMN de ^1H compreendendo as seguintes regiões: a) de 5,0 a 7,92 ppm; b) de 6,50 a 7,92 ppm e c) de 2,70 a 3,90 ppm.



Fonte: Autor, 2013.

Os dados de RMN de ^1H foram analisados juntamente com dados de RMN de ^{13}C , DEPT 135, HSQC, HMBC, COSY e NOSY. A análise dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135 indicou a presença total de 28 átomos de carbono que puderam ser classificados como sendo: nove carbonos quaternários, dezesseis grupos metínicos, um grupo metilênico, um grupo metila e uma metoxila (**Figura 47**).

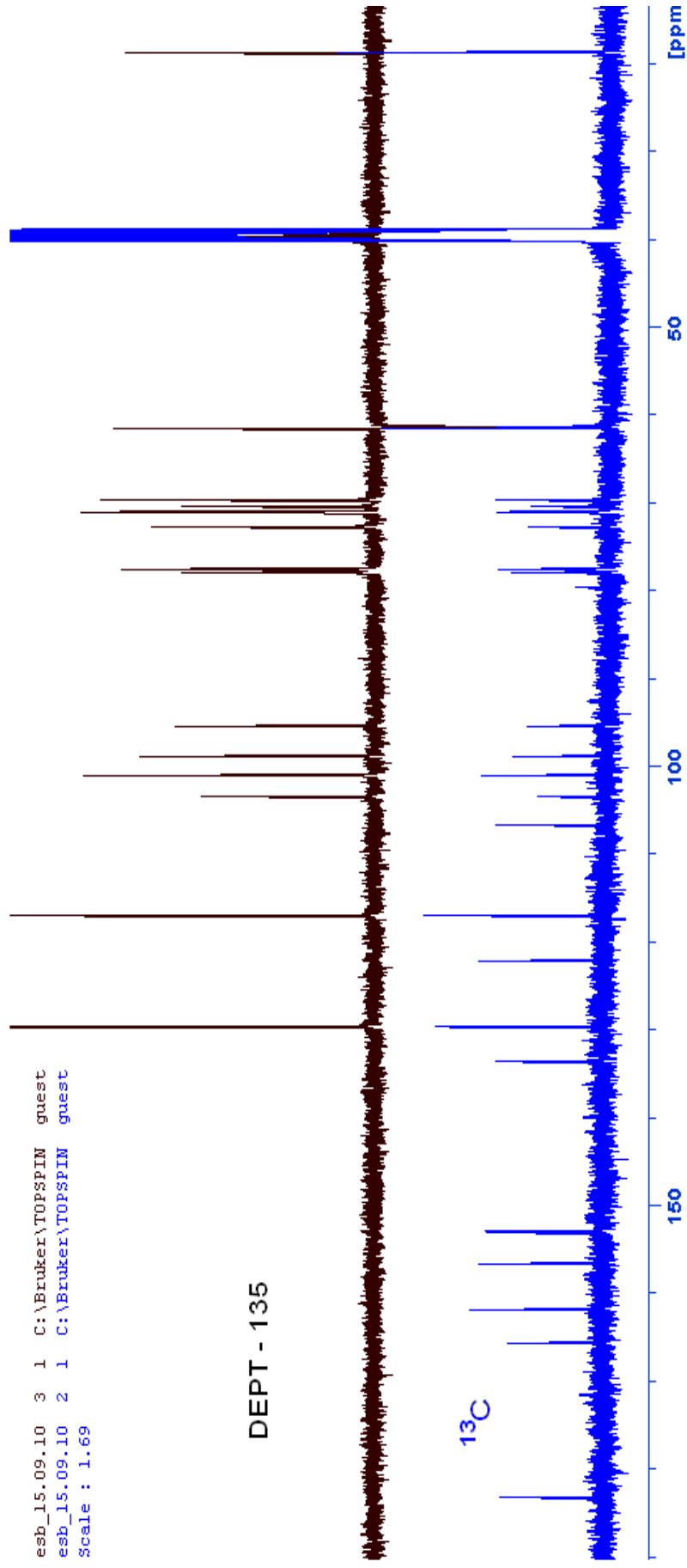
Um sinal em 183,22 ppm foi atribuído a um carbono carbonílico e o padrão de deslocamento químico dos carbonos com deslocamentos químicos em 165,61; 103,44; 106,66; 152,87; 133,61; 156,57; 95,43 e 153,04 ppm, analisados juntamente com dados do espectro de hidrogênio sugerem um flavonoide ($\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$) com uma metila e duas unidades de açúcar, glicose e ramnose.

Os deslocamentos químicos dos espectros de ^1H e de ^{13}C foram comparados com dados da literatura (MOREIRA, 2003; PIZZOLATTI, 2003; MOCCELINI et al, 2009) que mostraram haver coerência com estrutura de flavonoide. Um simpleto em 6,65 e outro em 6,92 ppm com integração para um hidrogênio cada, foram atribuídos aos hidrogênios das posições 3 do anel C e posição 8 do anel A do flavonoide, respectivamente.

A β -glicose foi confirmada através da análise do espectro HSQC que apresentou as seguintes correlações: um duplete em 5,24 ppm ($J = 7,40$ Hz) atribuído ao hidrogênio, anomérico que está correlacionado ao carbono em 98,82 ppm, além de um sinal em 3,46 ppm ($J=9$ Hz) atribuído a um hidrogênio correlacionado com o carbono C-6'', em 61,32 ppm.

A α -ramnose teve sua presença confirmada pela análise do espectro HSQC, que apresentou as seguintes correlações: um duplete em 5,18 ppm ($J = 1,5$ Hz) de um hidrogênio correlacionado diretamente com um carbono anomérico em 101,00 ppm e um duplete em 1,05 ppm ($J=6,08$ Hz), com integração para três hidrogênios, correlacionado com o carbono C-6''' em 18,7 ppm, observados também através do espectro HSQC, que foi atribuído a um grupo metila.

Figura 47 - Espectros de carbono 13 e DEPT - 135 da amostra Mq-13.



Fonte: Autor, 2013.

Esses sinais estão de acordo com dados da literatura, onde o hidrogênio anomérico da glicose apresenta um duplete em aproximadamente 5,0 ppm ($J=7$ Hz) referente a interação axial-axial de H-1 com H-2 e ramnose 5,0 ppm ($J=1,5$ Hz) equatorial-equatorial e metila com duplete em 1,0 ppm ($J=7$ Hz) (MABRY, 1970). Entre 3,1 e 3,8 ppm observa-se sobreposição de vários sinais, que foram elucidados através do experimento de correlação de $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ (HSQC). Os sinais em 98,82 e em 101,00 ppm foram atribuídos aos carbonos anoméricos C-1'' e C-1''', respectivamente, β -glicose e α -ramnose e estão correlatos aos prótons 5,24 ($J = 7,40$ Hz) e 5,18 ($J = 1,5$ Hz).

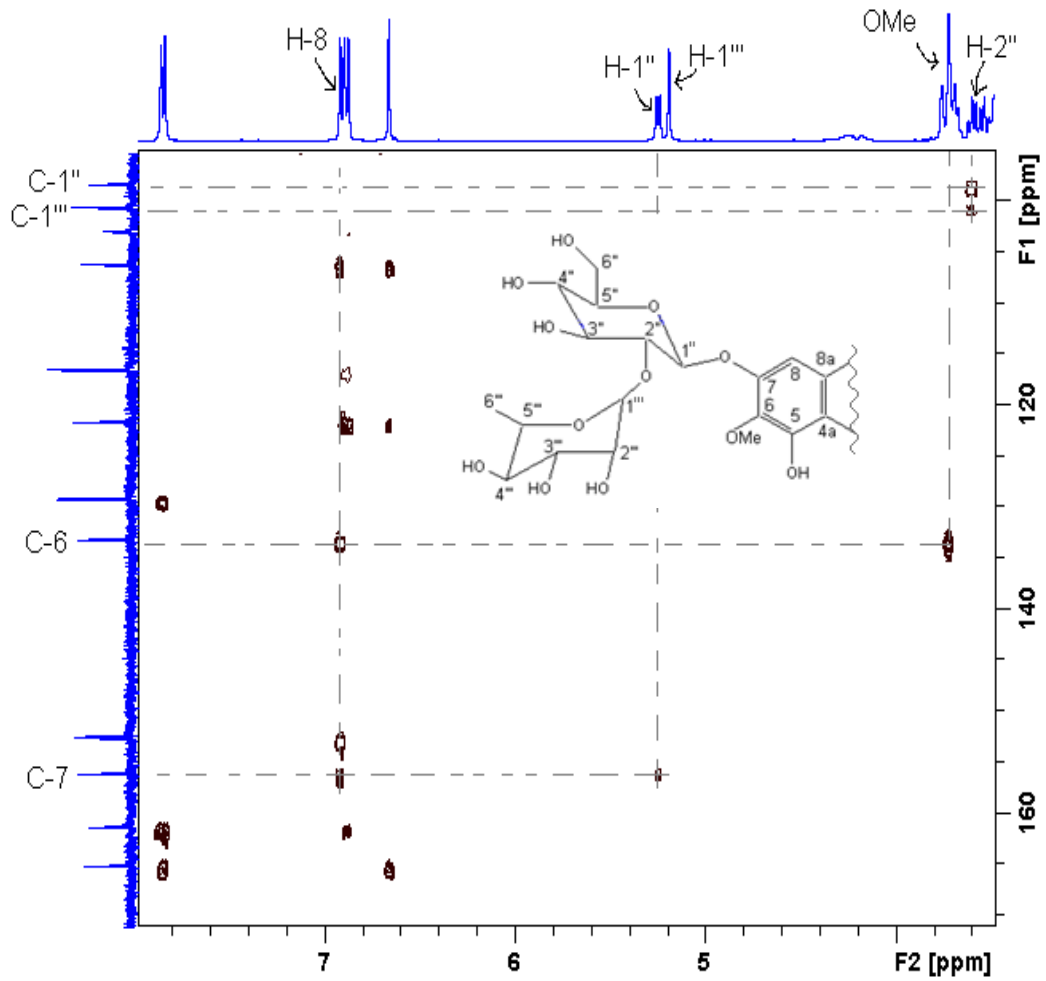
O sinal em 183,22 ppm foi atribuído ao carbono carbonílico da γ -pirona (anel C). Os carbonos C-5 e C-4' são hidroxilados e aos seus sinais foram atribuídos deslocamentos químicos de 152,87 e 161,78 ppm, respectivamente. O sinal em 133,60 ppm foi atribuído ao carbono C-6 que sustenta um grupo metoxila em 61,48 ppm. A confirmação foi feita através do espectro HMBC (**Figuras 48 e 49**) que mostra correlação entre o sinal dos hidrogênios da metoxila com o sinal do C-6 e com o sinal 6,92 ppm atribuídos ao H-8.

O sinal em 156,57 ppm mostrou correlação no espectro HMBC, com o hidrogênio anomérico da glicose em 5,24 ppm sugerindo que o carbono C-7 que sustenta a molécula de açúcar. O sinal do carbono anomérico da ramnose em 101,00 ppm mostrou correlação com o sinal em 3,59 ppm do H-2''' da glicose estabelecendo padrão de ligação (1 \rightarrow 2) (**Figuras 48 e 49**).

Seis grupos metínicos foram atribuídos aos núcleos da flavona, quatro no anel B; C-2' e C-6', em 129,63 ppm e o sinal em 116,97 ppm de C-3' e 5'. Em 103,44 ppm foi atribuído um sinal como sendo do carbono C-3 no anel C da flavona e o sinal em 95,43 ppm do C-8 no anel A.

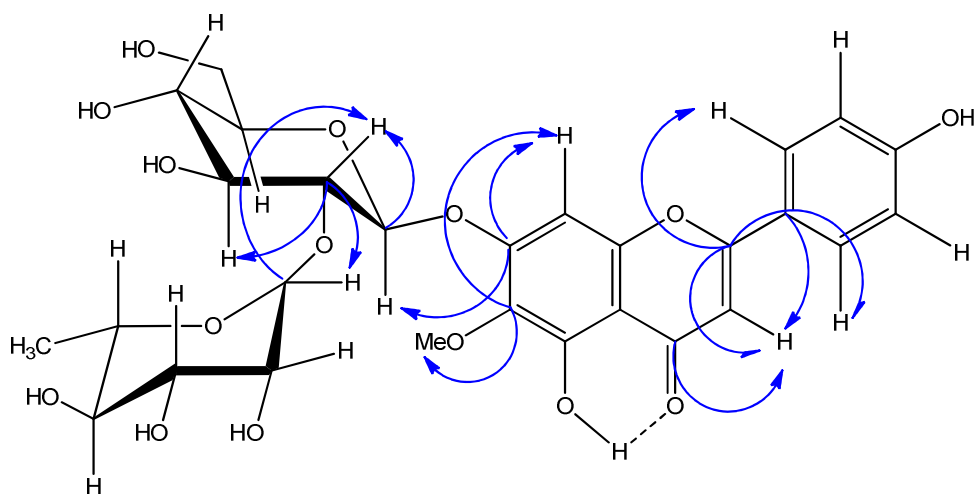
O espectro de RMN de ^{13}C , mostrou sinais em 98,82 e em 101,00 ppm que foram atribuídos aos carbonos anoméricos C-1'' e C-1''', respectivamente, β -glicose e α -ramnose e o experimento HSQC mostrou correlação com prótons 5,24 ($J = 7,40$ Hz) e 5,18 ($J = 1,5$ Hz). O sinal em campo alto (baixa frequência) em 18,70 ppm foi atribuído ao C-6''' da α -ramnose, correlato com o duplete em 1,05 ppm ($J = 6,08$ Hz) que confirma a presença da ramnose.

Figura 48 - Expansão do espectro de correlação heteronuclear (^{13}C - ^1H) HMBC de Mq-13 mostrando principais correlações.



Fonte: Autor, 2013.

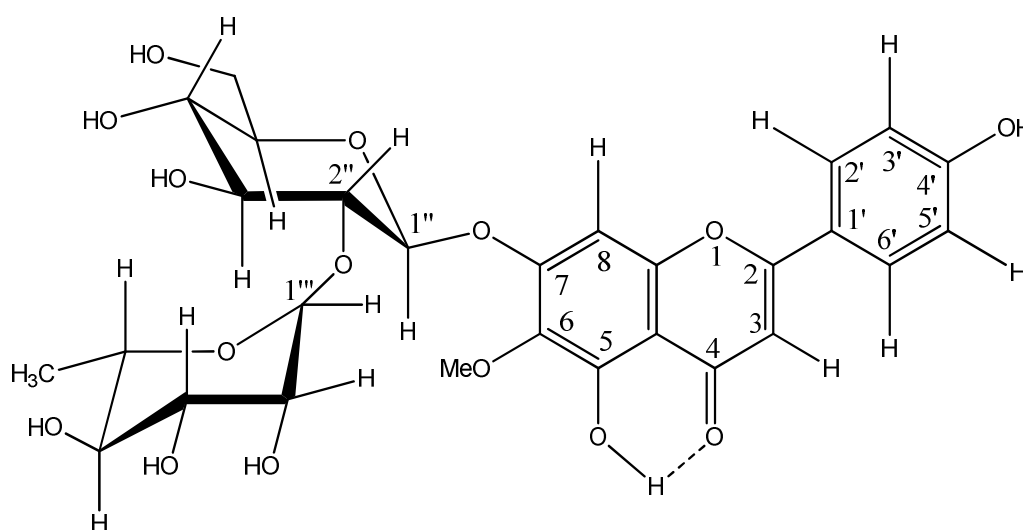
Figura 49 - Estrutura da flavona mostrando correlações do HMBC.



Fonte: Autor, 2013.

O sinal em campo alto (baixa frequência) em 18,70 ppm foi atribuído ao C-6''' da α -ramnose, correlato com o duplete em 1,05 ppm ($J = 6,08$ Hz) que confirma a presença da ramnose. Os sinais dos glicosídeos β -glicose e α -ramnose foram comparados com dados da literatura, o núcleo flavona mostrou compatibilidade quando comparados com dados da hispidulina e feitos a proposta da estrutura do flavonol (**Figura 49**). (MOREIRA, 2003; PIZZOLATTI, 2003; MOCCELINI et al, 2009).

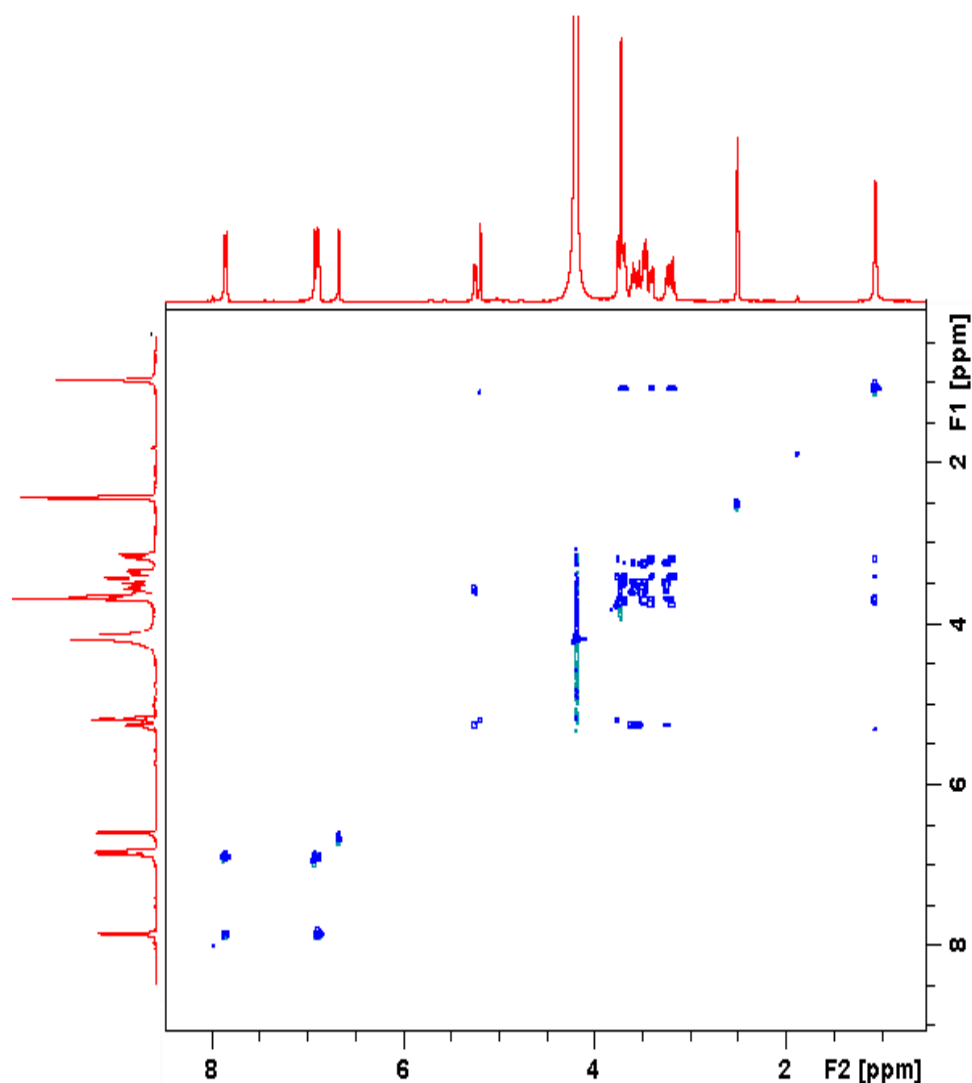
Figura 50 - Estrutura da flavona presente em Mq-13.



Fonte: Autor, 2013.

Os espectros de correlação homonuclear – ^1H - ^1H COSY e TOCSY foram usados para estabelecer as sequencias de correlações confirmando padrões de substituição do anel B no núcleo flavona que mostraram correlação do duplete em 6,89 com outro duplete em 7,87 ppm, típicos de substituição em anel aromático para-dissubstituído. O espectro TOCSY (**Figura 51**) mostrou sinais de correlação relativos aos anéis da glicose com as seguintes correlações: 5,24 \rightarrow 3,59 \rightarrow 3,52 \rightarrow 3,23 \rightarrow 3,46 \rightarrow 3,46 ppm e para a ramnose 5,18 \rightarrow 3,74 \rightarrow 3,40 \rightarrow 3,18 \rightarrow 3,68 \rightarrow 1,05 ppm

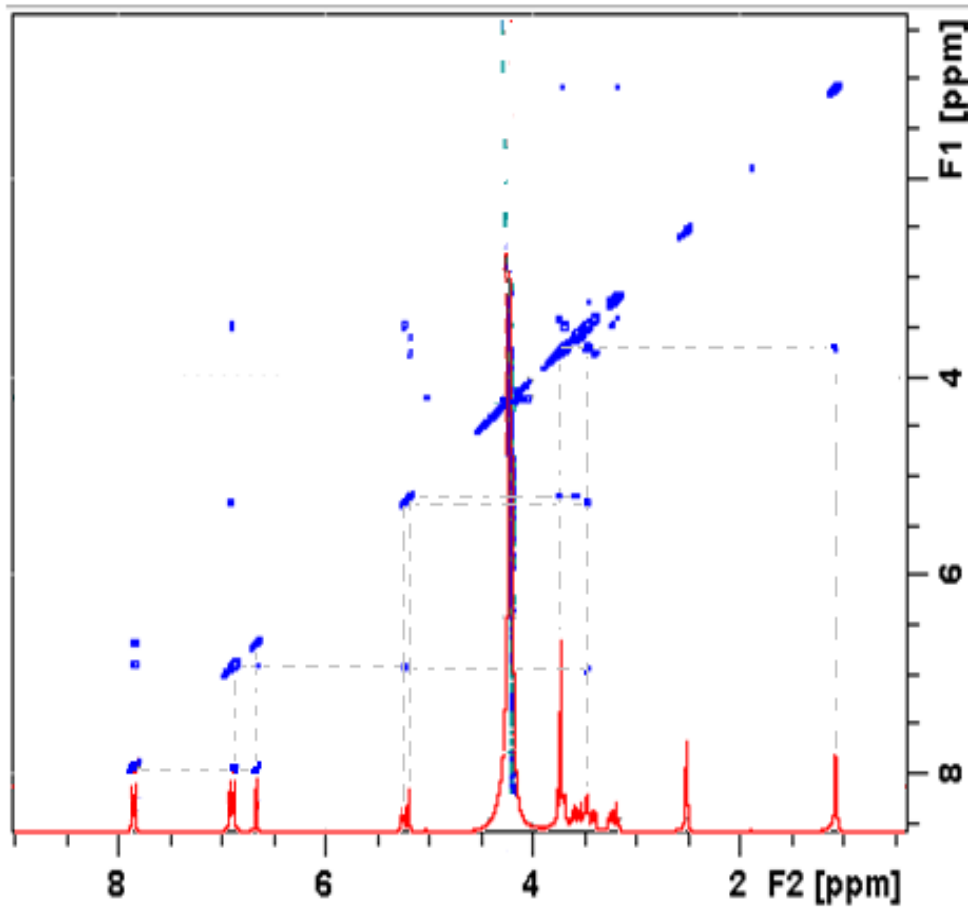
Figura 51 - Mapa de contorno TOCSY da amostra Mq-13.



Fonte: Autor, 2013.

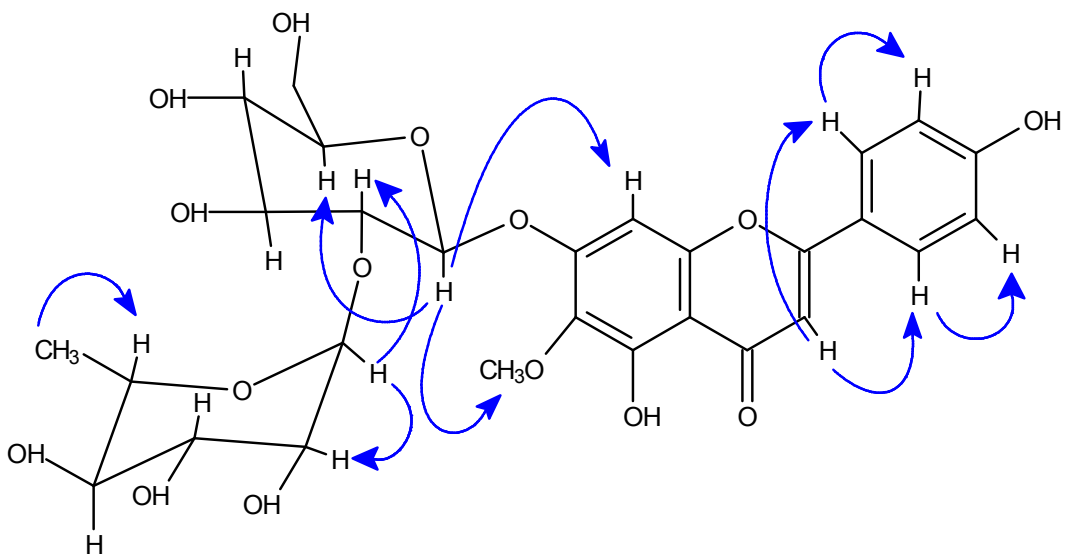
O sítio de glicosilação em C-7 foi confirmado através dos espectros HMBC (**Figura 48**, pag. 74) e NOESY (**Figura 52**), com a observação da proximidade espacial do hidrogênio anomérico da glicose H-1'' com o H-8 e H-3'' (5,24; 6,92 e 3,52 ppm, respectivamente). A posição da metoxila em C-6, também foi confirmada através do espectro NOESY (**Figura 53**), o simpleto em 3,72 ppm com atribuição para três hidrogênios mostrou correlação espacial com os hidrogênios anomérico H-1'' (5,24 ppm) e H-3''' (3,40 ppm) da glicose. O H-3 (6,65 ppm) mostrou aproximação espacial com H-6' (7,87 ppm) e com H-5' (6,89 ppm).

Figura 52 - Mapa de contorno NOESY da amostra Mq-13 mostrando as principais correlações.



Fonte: Autor, 2013.

Figura 53 - Estrutura do flavonoide com as correlações espaciais obtidas do NOESY.



Fonte: Autor, 2013.

As atribuições dos sinais foram feitas com base na análise de espectros de correlação heteronuclear ^{13}C - ^1H , HSQC e HMBC e correlação homonuclear ^1H - ^1H COSY, TOCSY e NOESY, descritas na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Dados de RMN ^1H , ^{13}C e de correlação heteronuclear HSQC, HMBC e COSY (homonuclear) em DMSO do flavonoide de Mq-13. Deslocamentos químicos de H^1 e C^{13} e atribuições. δ em ppm, e constantes de acoplamento (J) em Hz.

C	δ_{C}	δ_{H}	HMBC $^3\text{J}_{\text{CH}}$	COSY $^3\text{J}_{\text{HH}}$
2	165,61	-	H-3; H-2'	-
3	103,44	6,65 s	-	-
4	183,22	-	H-8; H-3	-
4 ^a	106,66	-	H-8; H-3	-
5	152,87	-	H-8	-
6	133,60	-	H-8; Ome	-
7	156,57	-	H-8; H-1''	-
8	95,43	6,92 s	-	-
8 ^a	153,04	-	H-8	-
1'	122,08	-	H-3'; H-5'; H-3	-
2'	129,63	7,87 (d, 8,22)	H-6'	H-3'
3'	116,97	6,89 (d, 8,22)	H-5'	H-2'
4'	161,78	-	H-2'; H-6'; H-3'; H-5'	-
5'	116,97	6,89 (d, 8,22)	H-3'	H-6'
6'	129,63	7,87 (d, 8,22)	H-2'	H-5'
1''	98,82	5,24 (d, 7,40)	H-2''	H-2''
2''	77,51	3,59 (t, 8,22)	H-3''; H-1'''	H-3''; H-1''
3''	77,95	3,52 (t, 8,50)	H-2''; H-4''	H-2''; H-4''
4''	70,37	3,23 (t, 8,50)	H-1''	H-3''; H-5''
5''	77,58	3,46 (m)	H-1''; H-3''	H-4''; H-6''
6''	61,32	3,68	H-3''	H-5''
1'''	101,00	5,18 (d, 1,5)	H-2''	H-2'''
2'''	71,10	3,74	H-1'''	H-1'''; H- 3'''
3'''	70,95	3,40 (dd)	H-1'''; H- 4'''	H-1'''; H- 4'''
4'''	72,70	3,18 (t, 9,6)	H-6'''; H-3'''	H-3'''; H-5'''
5'''	60,65	3,68 (m)		H-5'''; H-6'''
6'''	18,7	1,05 (d, 6,08)	H-4'''	H-5'''
Ome	61,48	3,72 (s)	-	

Fonte: Autor, 2013.

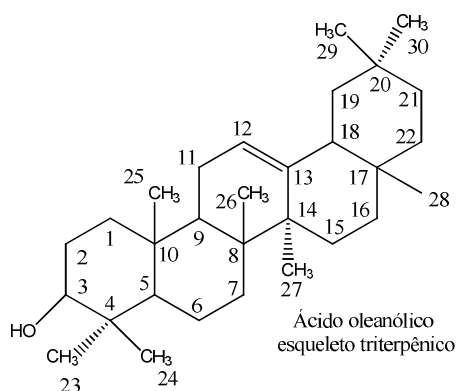
6.2 Amostra SLR de *Serjania lethalis*.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 55**) apresentou como sinais, nove grupos CH_3 na região típica de metilas (entre 0,70 e 1,25 ppm) que são eles: 0,94; 0,77; 0,88; 0,75; 1,08; 0,87; 0,83; 1,16 e 1,22 ppm (**Figura 56**), um duplete duplo em δ 2,78 ($J = 4,12; 14,0$ Hz); outro duplete duplo em δ 3,04 ($J = 4,8; 11,6$ Hz) e um sinal em δ 5,16. A presença destes sinais é sugestiva para uma estrutura de um triterpeno com esqueleto oleanano (**Figura 54**) (MARQUI, 2008).

A presença de dois sinais, um duplete em δ 4,98 ($J = 1,8$ Hz) e outro duplete em δ 5,17 ($J = 1,6$ Hz) podem ser atribuídos a sinais de hidrogênios anoméricos que juntamente com outros dois dupletos, um em δ 1,16 ($J = 6,15$ Hz) e outro em 1,22 ($J = 6,15$ Hz) sugerem a presença de duas unidades de ramnose. Essas ramnoses foram denominadas neste trabalho como Rh-A e Rh-B.

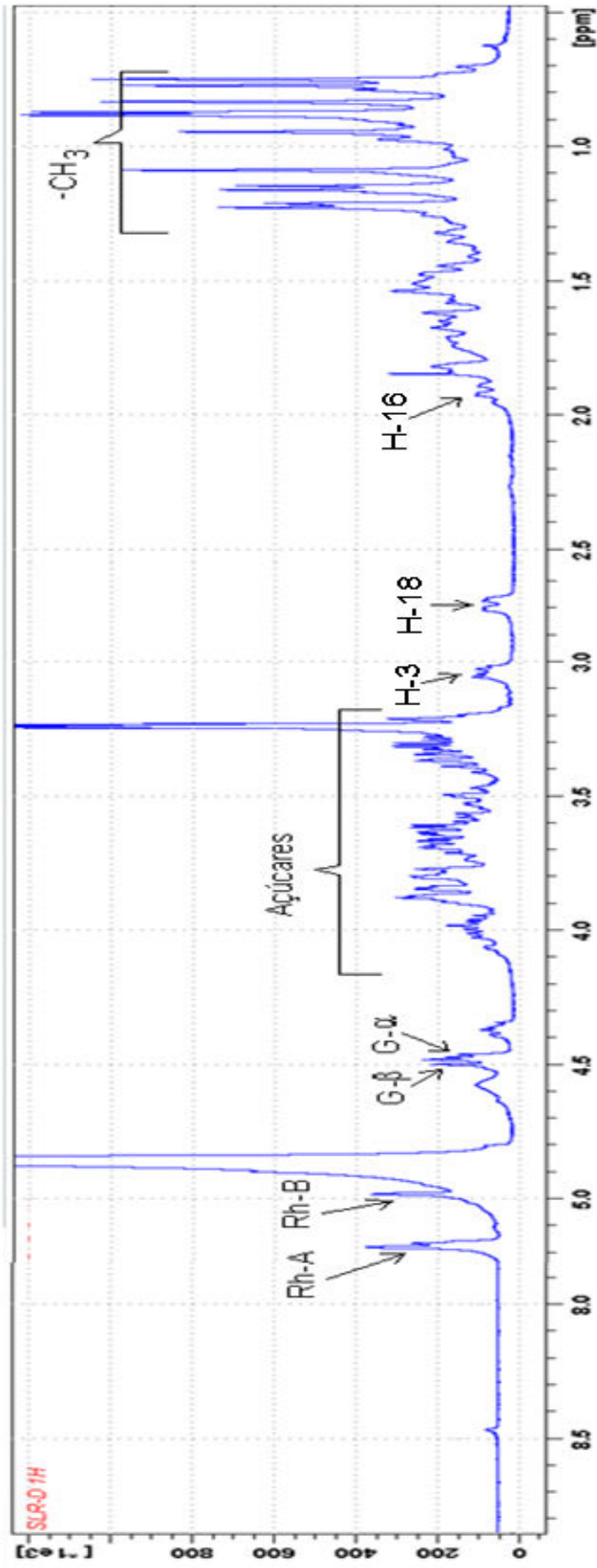
Um duplete em δ 4,46 ($J = 4,55$ Hz) e outro em δ 4,49 ($J = 7,40$ Hz) são típicos de hidrogênios anoméricos de glicose e foram atribuídos para duas unidades glicosídicas, uma α -D-glicose onde os hidrogênios apresentam uma constante de acoplamento menos devido às interações axial – equatorial, e outra β -D-glicose com uma constante de acoplamento maior devido às interações axial - axial (G- α e G- β), respectivamente. O indício da presença desses açúcares é reforçado pelos sinais compreendidos na região de 3,2 a 4,0 ppm (**Figuras 55, 56.a e 56.b**).

Figura 54 - Esqueleto oleanano com sistema de numeração.



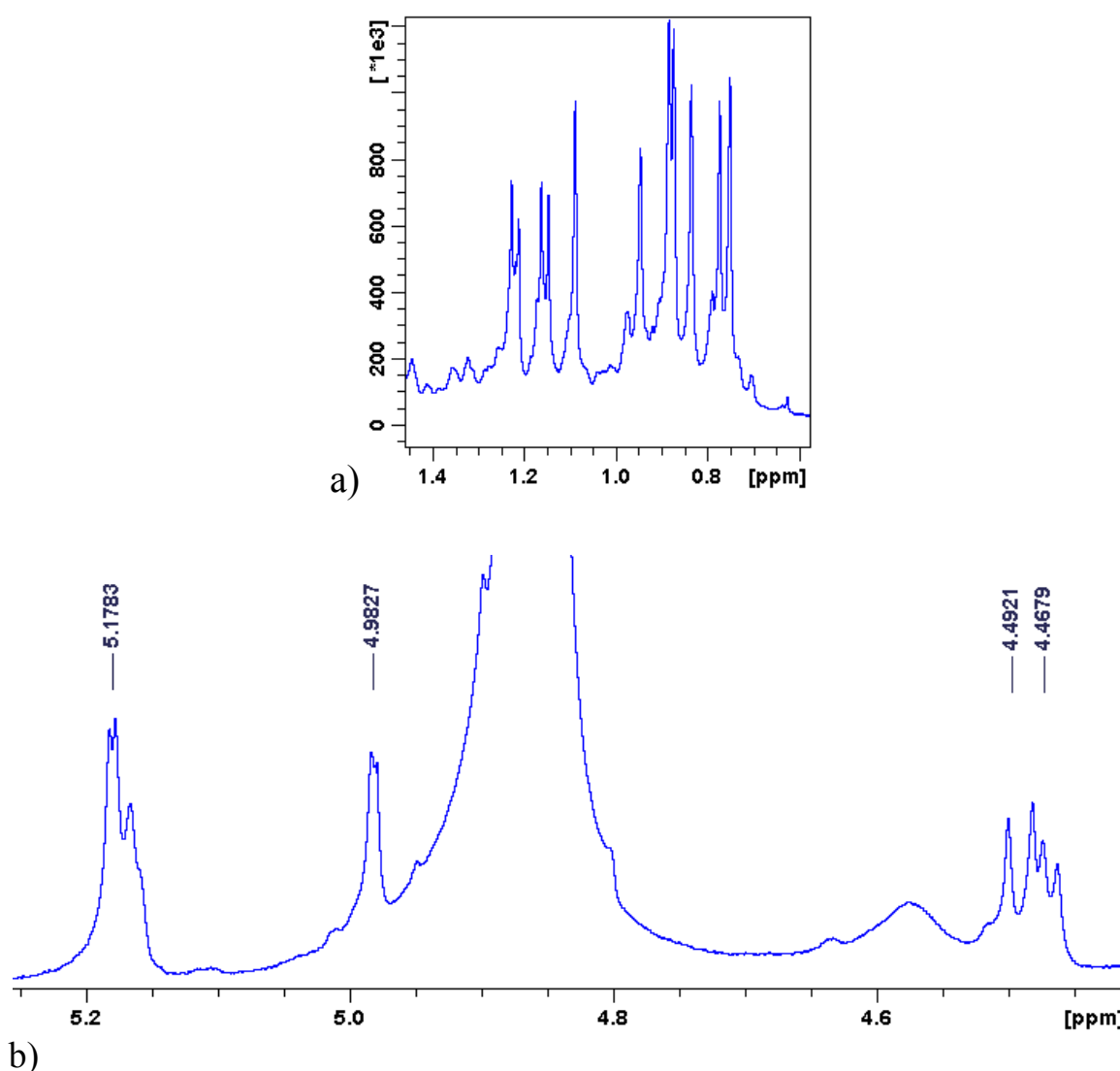
Fonte: MARQUI, 2008.

Figura 55 - Espectro de RMN ^1H da amostra SLR em MeOD.



Fonte: Autor, 2013.

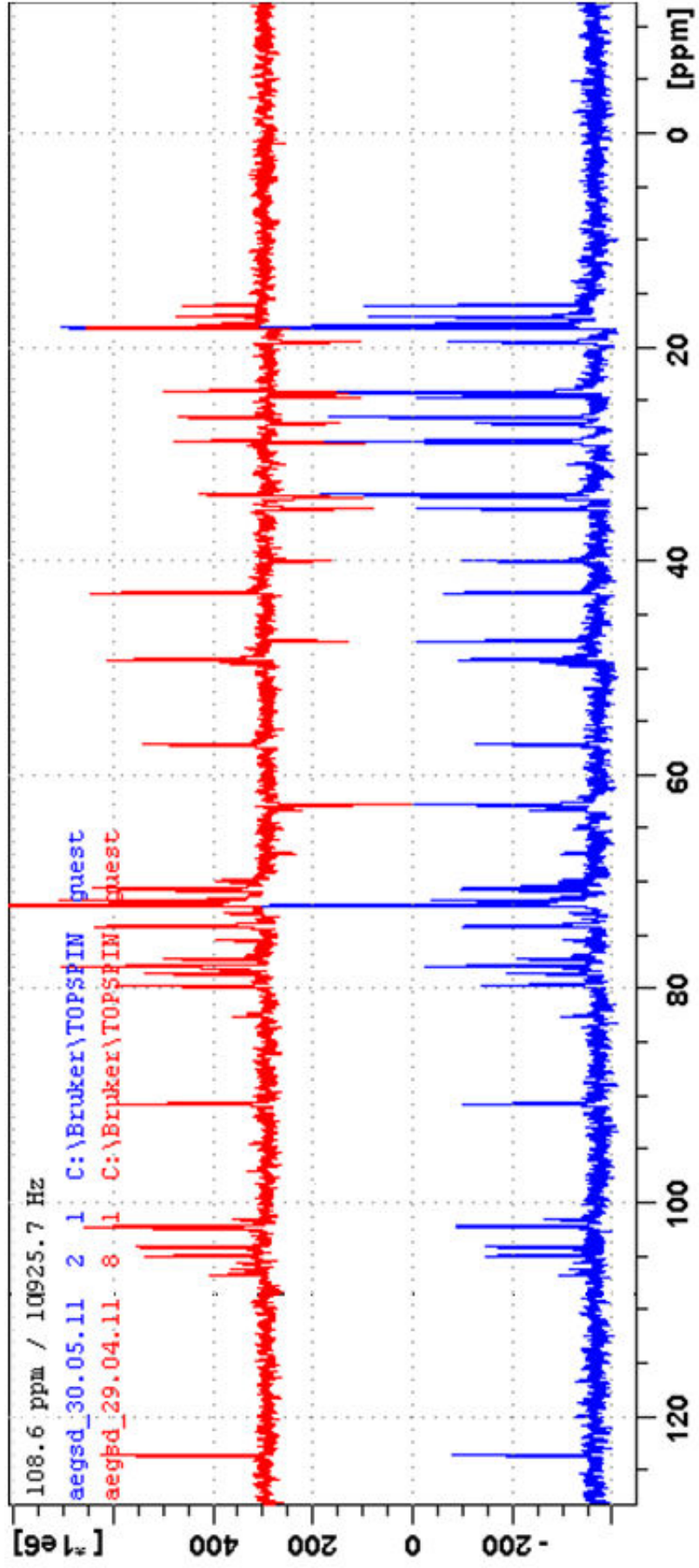
Figura 56 - (a) Expansão do espectro de RMN de ^1H da região correspondente aos sinais de metilas da amostra SLR; (b) Expansão do espectro de RMN de ^1H da região correspondente aos sinais de hidrogênios anoméricos de açúcares da amostra SLR.



Fonte: Autor, 2013.

O espectro de RMN de ^{13}C juntamente com DEPT 135, DEPT 90 (Figura 57) e correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C HSQC mostraram 50 sinais referentes a carbonos que foram classificados como: oito carbonos quaternários, vinte e dois grupos metínicos, doze grupos metilênicos e dez grupos metilas. Os sinais de ^{13}C em 90,82; 123,69; 145,50 e 179,5 ppm reforçam a tese de que a amostra possui um esqueleto oleanano (MARQUI, 2008), sendo esses sinais referentes aos C-3, C-12, C-13 e à carbonila C-28.

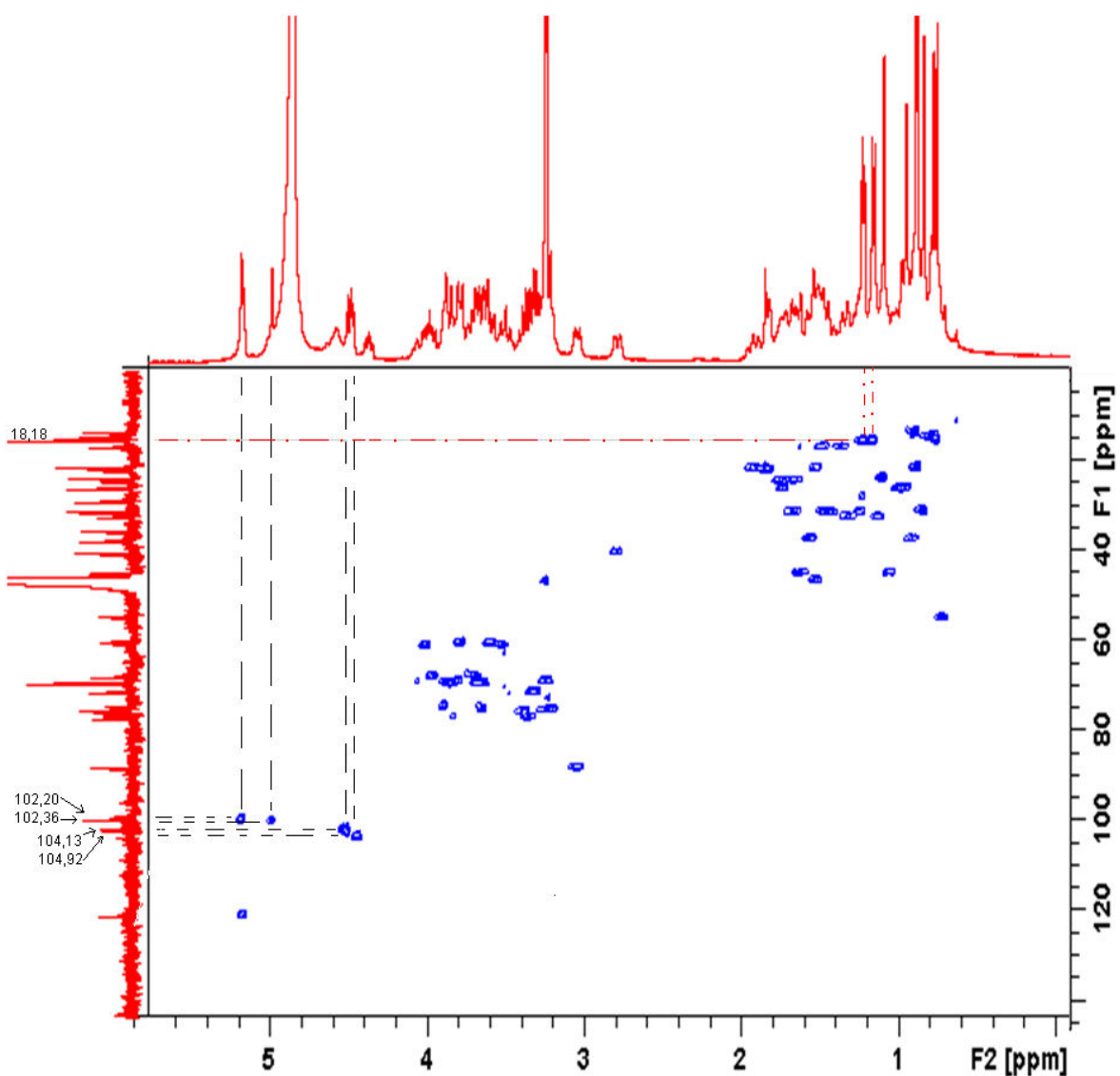
Figura 57 - Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135 da amostra SLR.



Fonte: Autor, 2013.

Através do experimento HSQC (**Figura 58**), foi possível estabelecer as correlações dos sinais de ^{13}C com ^1H que puderam ser destacados: um sinal em δ_{C} 104,92 mostrou correlação com duplete em δ_{H} 4,46 ($J = 4,80$ Hz) confirmando a presença de uma unidade glicosídica com configuração em α , outro sinal em δ_{C} 104,13 correlacionado ao δ_{H} 4,49 ($J = 7,35$ Hz) sugeriu outra unidade glicosídica com configuração em β . Um sinal em δ_{C} 102,20 correlacionado com δ_{H} 5,17 ($J = 1,8$ Hz) e outro em δ_{C} 102,36 correlacionado ao sinal δ_{H} 4,98 ($J = 1,8$ Hz) sugerem duas unidades ramnosídicas.

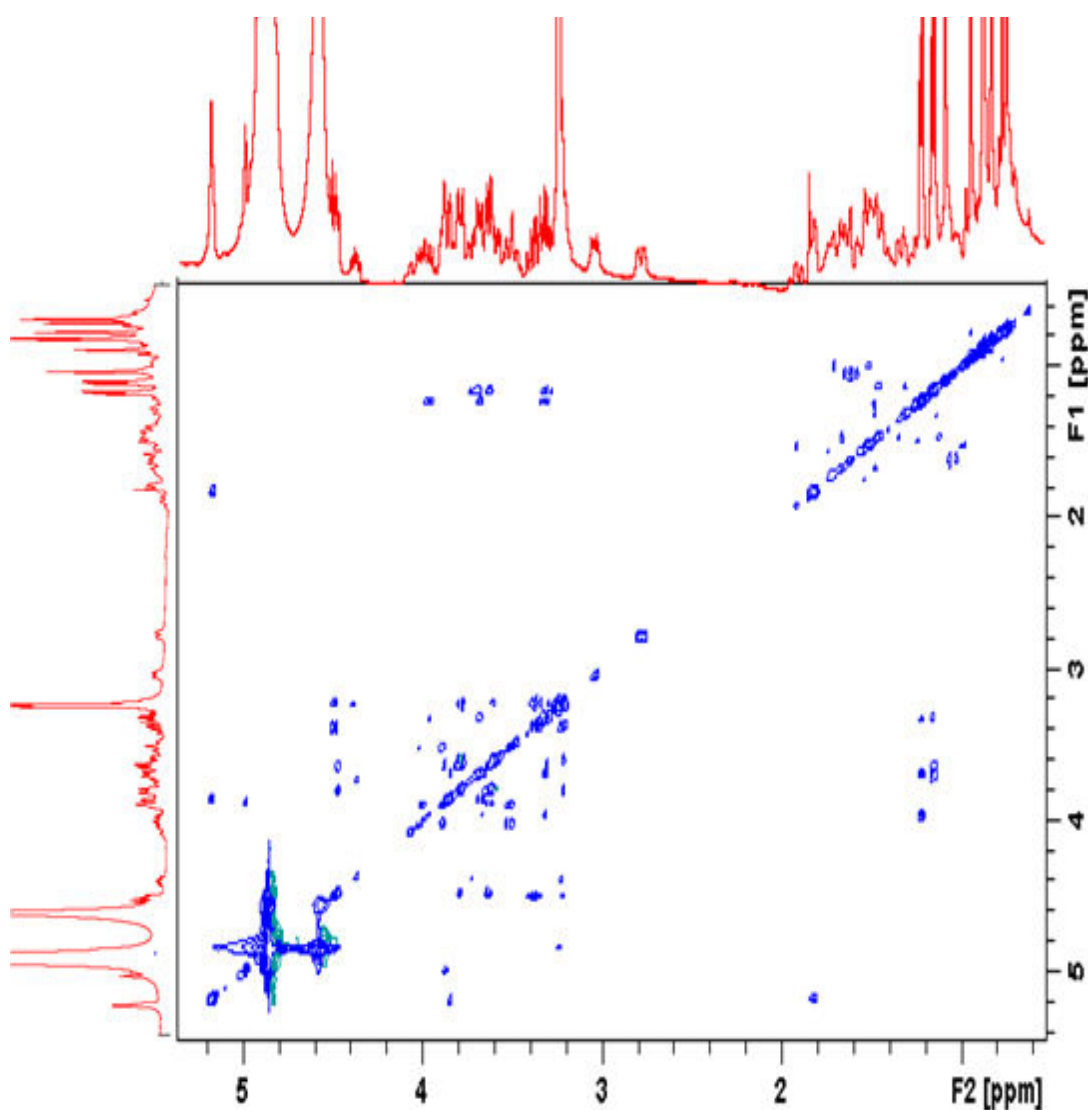
Figura 58 - Mapa de contorno HSQC da fração SLR.



Fonte: Autor, 2013.

A grande sobreposição dos sinais na região entre δ_H 3,2 e 4,0 dificultou a identificação dos sinais e a fazer atribuições aos seus respectivos açúcares nos experimentos de RMN anteriores. O experimento TOCSY (**Figura 59**) mostrou sinais de correlação relativos aos anéis glicosídicos e possibilitou atribuir os valores relativos aos hidrogênios das glicoses (G1 e G2) e das ramnoses (Rh1 e Rh2). Para G1 (4,46; 3,89; 3,64; 3,79; 3,24; 3,68; 3,60 ppm), para G2 (4,49; 3,36; 3,38; 3,22; 3,63; 3,51; 4,0 ppm), para Rh1 (5,17; 3,84; 3,64; 3,32; 3,96; 1,22 ppm) e Rh2 (4,98; 3,64; 3,89; 3,32; 3,69; 1,16 ppm).

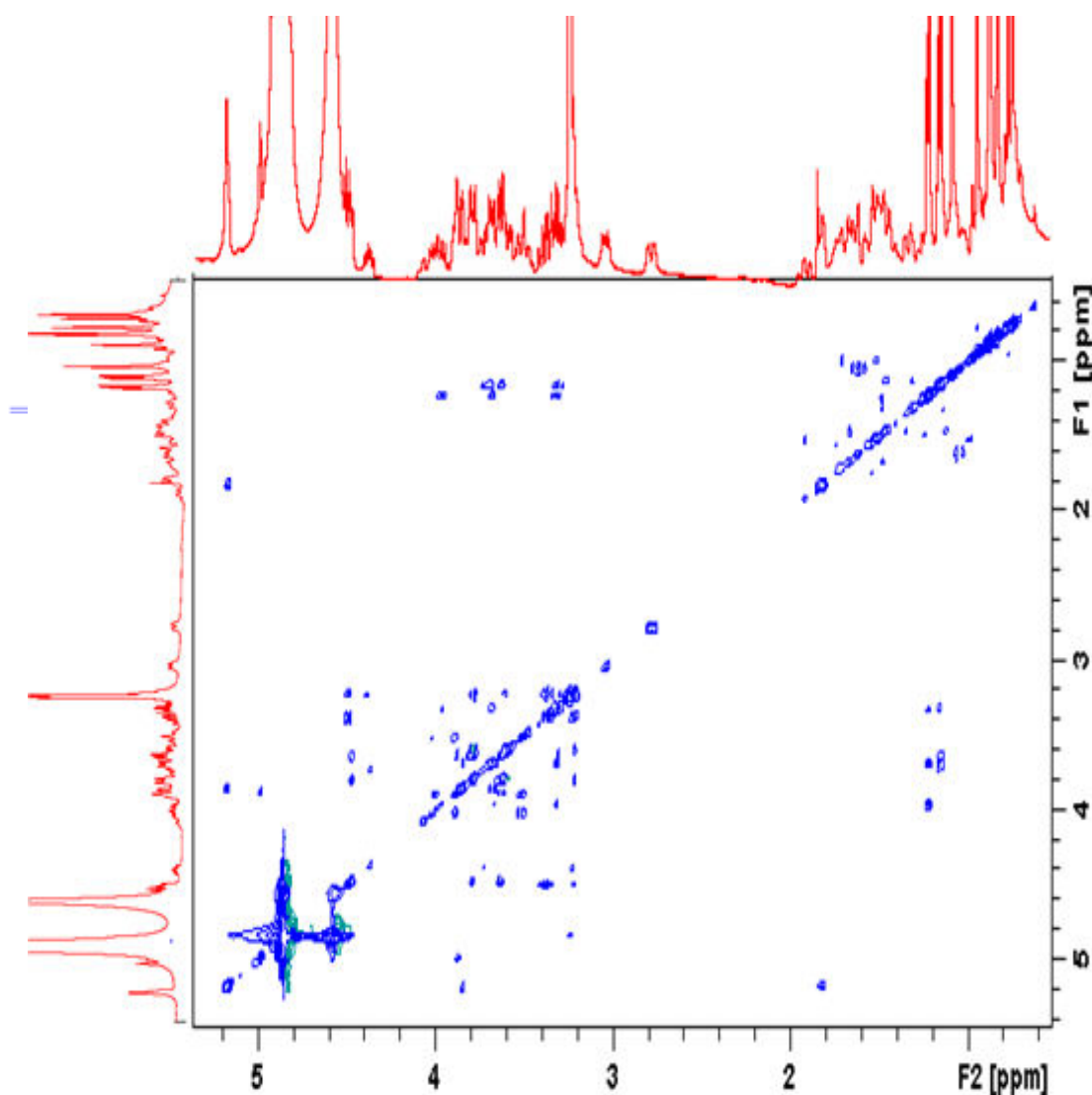
Figura 59 - Mapa de contornos TOCSY da amostra SLR. Fonte: Autor, 2013.



Fonte: Autor, 2013.

O experimento de correlação heteronuclear ^{13}C - ^1H HMBC ($^{2-3}J_{\text{CH}}$) mostrou correlações que permitiram estabelecer o padrão de conectividade entre as unidades glicosídicas (**Figura 59**). O sinal de C-3 (δ_{C} 90,82) mostrou correlação com o duplete em δ_{H} 4,46 referente ao hidrogênio anomérico da H-1' α -glicose. O sinal de C-2' δ_{C} 77,22 mostrou correlação com o duplete em δ_{H} 4,49 que corresponde ao hidrogênio anomérico H-1'' da β -glicose; o sinal de C-2'' em δ_{C} 79,75, com o duplete em δ_{H} 5,17 do H-1''' e o sinal de C-2''' em δ_{C} 72,19 com o duplete em δ_{H} 4,98 do H-1'''''. Os dados de RMN 1D e 2D permitiram correlacionar os sinais conforme **Tabela 8** e propor a estrutura da saponina B-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil]. (**Figura 60**).

Figura 60 - Mapa de contorno HMBC da amostra SLR.



Fonte: Autor, 2013.

Tabela 8 - Dados de RMN de ^{13}C e RMN de ^1H para o composto presente na amostra SLR [δ_{C} (1) dados obtidos experimentalmente, δ_{C} (2) dados da literatura]. (400 MHz, CDCl_3).

(Continua)

C	δ_{C} (1)	δ_{H}	δ_{C} (2)	HMBC
1	39,98	0,91; 1,56	38,2	0,88
2	24,65	1,81	27,2	0,94
3	90,82	3,04 (dd, 11,6; 4,8)	87,8	4,46; 0,77; 0,94; 0,97
4	40,40	-	38,7	0,70; 0,77; 0,94
5	57,14	0,71	55,0	0,77; 0,88; 0,94
6	19,50	1,47	17,8	
7	34,13	1,25; 1,42	31,8	0,75
8	43,03	-	39,0	1,05; 1,62
9	49,1	1,53	47,1	0,75; 0,88
10	38,05	-	36,3	0,70; 0,73; 0,88; 1,48; 1,53;
11	24,20	1,50	22,4	
12	123,60	5,16	121,7	2,79
13	145,50	-	143,4	2,79; 1,09
14	40,69	-	41,3	0,75; 1,08; 1,53
15	27,13	1,53; 1,92	27,2	
16	24,25	1,66; 1,75	23,0	
17	47,94	-	45,9	2,78; 1,05f
18	42,96	2,78 (dd, 13,3; 3,3)	40,7	0,75; 1,05; 1,62
19	47,50	1,62	45,6	0,83; 0,87; 2,78
20	31,77	-	30,3	0,83; 0,87; 1,62; 1,65
21	35,11	1,13; 1,33	33,1	0,83; 0,87
22	34,01	1,67; 1,47	32,1	0,75
23	28,77	0,94	27,6	0,77; 1,09; 3,04
24	17,18	0,77	16,7	0,61; 0,71; 0,94
25	16,11	0,88	15,2	0,73; 1,53; 0,71; 1,04
26	17,91	0,75	16,5	0,59; 0,90; 1,53
27	26,56	1,08	25,5	0,94; 1,53;
28	179,5	-	175,3	1,84
29	33,76	0,87	32,8	0,71; 0,83; 1,02; 1,61
30	24,16	0,83	23,4	0,67; 0,87; 0,99; 1,61
1'	104,92	4,46 (d, 4,55)		3,04; 3,64;
2'	77,22	3,89		3,64; 4,49; 4,0
3'	77,85	3,64		3,24; 3,79;
4'	71,81	3,79		3,64;
5'	77,94	3,24		3,79; 3,60
6'	62,73	3,78; 3,60		3,24
1''	104,13	4,49 (d, 7,40)		3,32; 3,36
2''	79,75	3,36		5,17; 3,38; 3,22
3''	78,54	3,38		3,36
4''	71,71	3,22		3,63; 4,0
5''	72,19	3,63		3,51
6''	63,30	3,51; 4,0		4,46

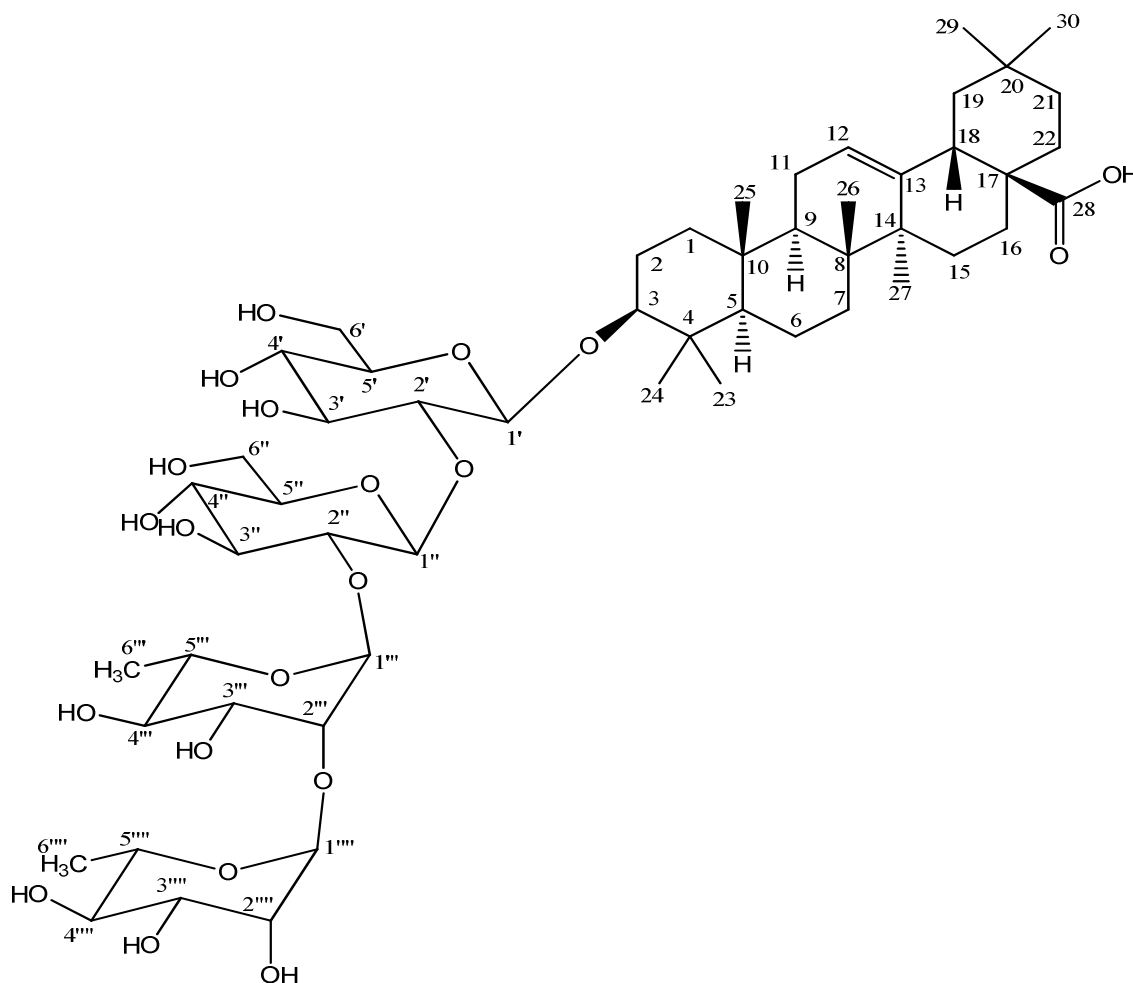
Tabela 8 - Dados de RMN de ^{13}C e RMN de ^1H para o composto presente na amostra SLR [δ_{C} (1) dados obtidos experimentalmente, δ_{C} (2) dados da literatura]. (400 MHz, CDCl_3).

(Continuação)

1'''	102,2	5,17 (d, 1,8)	3,32
2'''	72,19	3,84	5,17; 3,32; 4,98
3'''	72,19	3,64	3,32; 3,84
4'''	74,15	3,32	1,22; 3,84
5'''	70,79	3,96	3,32; 1,22; 5,17
6'''	18,18	1,22	3,32
1''''	102,36	4,98 (d, 1,8)	3,63; 5,17
2''''	77,94	3,64	4,98
3''''	72,23	3,87	
4''''	74,04	3,32	1,16; 3,69; 3,64
5''''	70,54	3,69	3,32; 4,98; 1,18
6''''	18,18	1,16	3,32

Fonte: Autor, 2013.

Figura 61 - Estrutura da saponina presente na fração SLR.



Fonte: Autor, 2013.

6.3 Fração SLE de *Serjania lethalis*.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 62**) da amostra SLE mostrou sinais na região entre δ 0,59 e δ 0,92 referentes a metilas, um multipletto em δ 3,48 ppm, típico de hidrogênio ligado a carbono oximetínico, um simpleto largo em δ 5,28 foi atribuído a hidrogênios olefinicos. Estiveram presentes também mais dois duplos dupletos, um em δ 4,92 (1H, dd, 8,50/15,20 Hz) e outro em δ 5,05 (1H, dd, 8,50/15,20 Hz). A presença desses sinais no espectro de hidrogênio é sugestiva para a presença de esteroide (SANTANA, 2010).

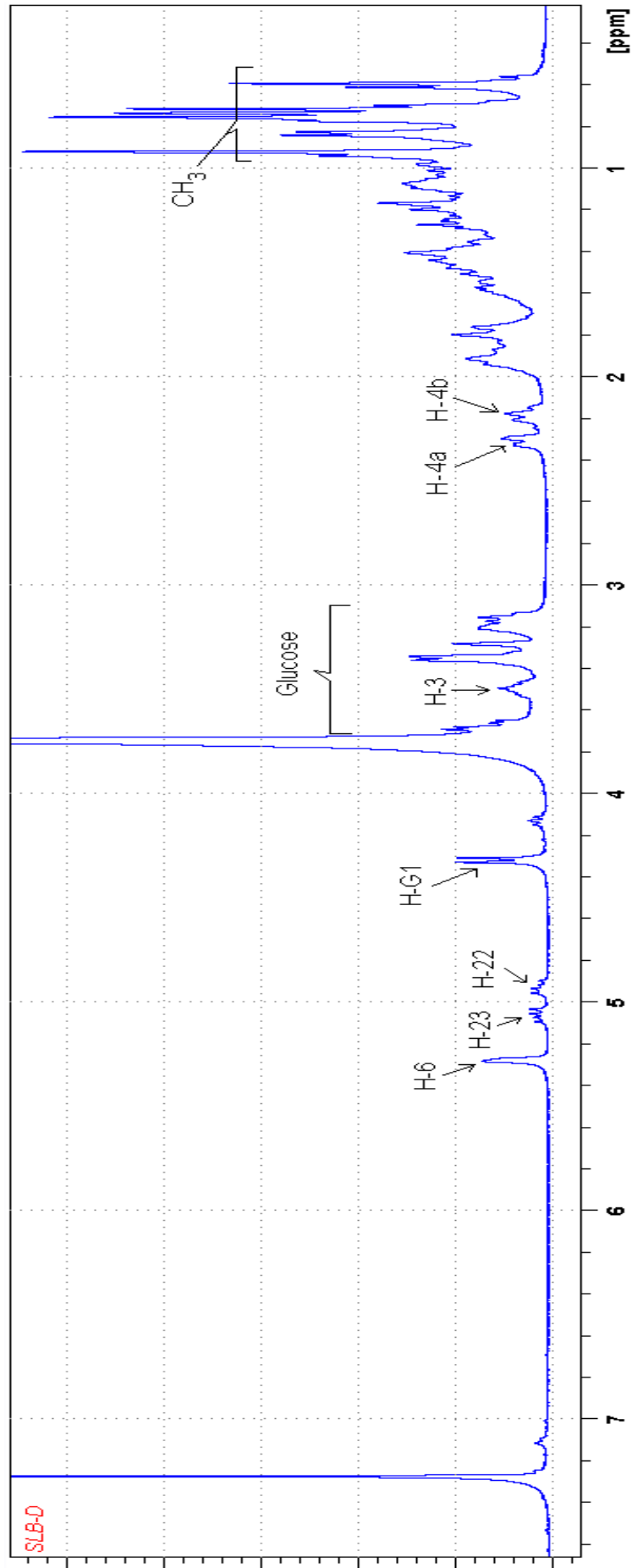
Por meio das integrações dos sinais, no espectro de hidrogênio, pode-se perceber que há mais de um composto na amostra e pelo perfil apresentado, evidenciam a presença de uma mistura de sitosterol e estigmasterol. O sinal em δ 3,48 ppm foi atribuído ao hidrogênio na posição 3 (H-3), em δ 5,28 (simpleto largo ou dupletto) foi atribuído ao hidrogênio na posição 6 (H-6) e os sinais em δ 4,92 e em δ 5,05 foram, respectivamente, atribuídos aos hidrogênios H-22 e H-23 do estigmasterol.

Um dupletto em δ 4,31 (1H, $J = 7,67$ Hz) é típico de hidrogênio anomérico com interação axial-axial de H-1 com H-2 e uma sobreposição de sinais na região entre δ 3,14 e δ 3,70 são sugestivos da presença de uma molécula de glicose com configuração β (MABRY, 1970; PIZZOLATTI, 2003).

Os dados de RMN de ^1H sugerem a presença de dois esteroides: sitosterol e estigmasterol e uma unidade de açúcar, a β -glicose, mas não são suficientes para estabelecer o padrão de conectividade da glicose com os esteroides.

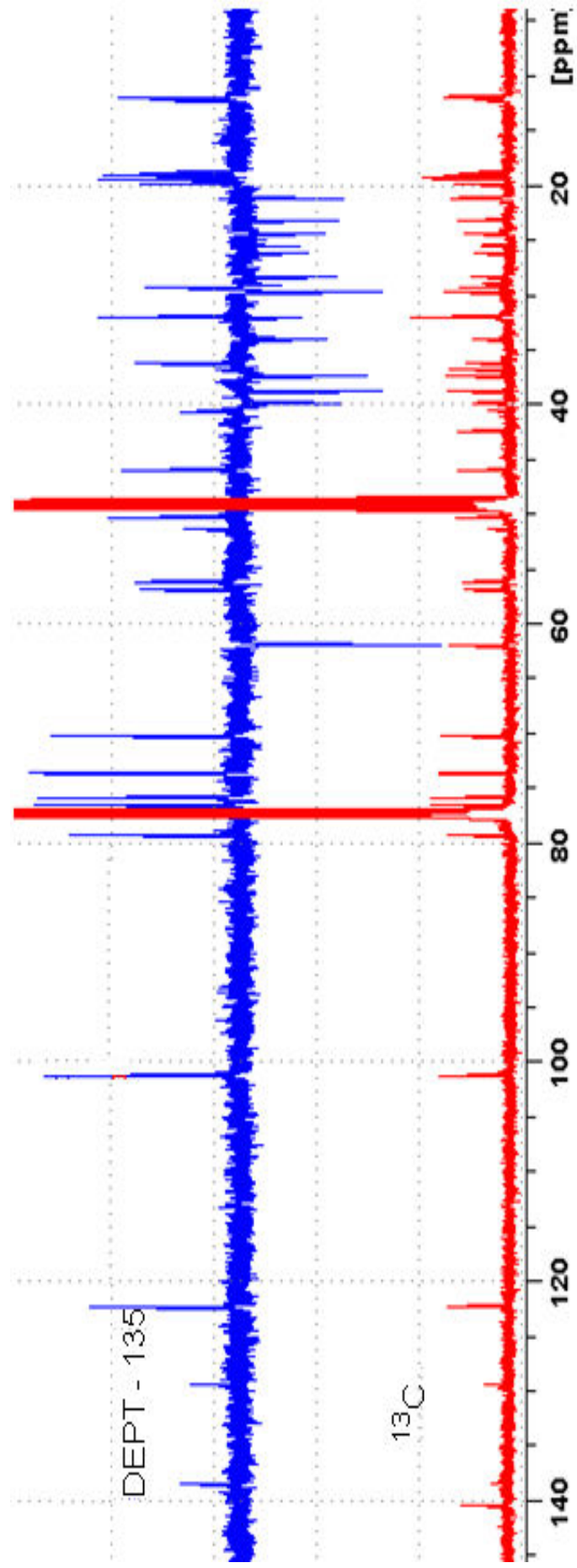
A análise dos espectros de RMN de ^{13}C apresentou 49 sinais e, com a ajuda do espectro DEPT 135 (**Figura 63**) foi possível identificar 5 sinais referentes a carbonos não hidrogenados, 20 carbonos metínicos, 15 carbonos metilênicos e 8 carbonos metílicos. Os deslocamentos químicos de ^{13}C são coerentes com os dados obtidos na literatura para sitosterol glicosilado e estigmasterol glicosilado (**Figura 64**) (MONTRUCCHIO, 2005).

Figura 62 - Espectro de RMN de ^1H da amostra SLE.



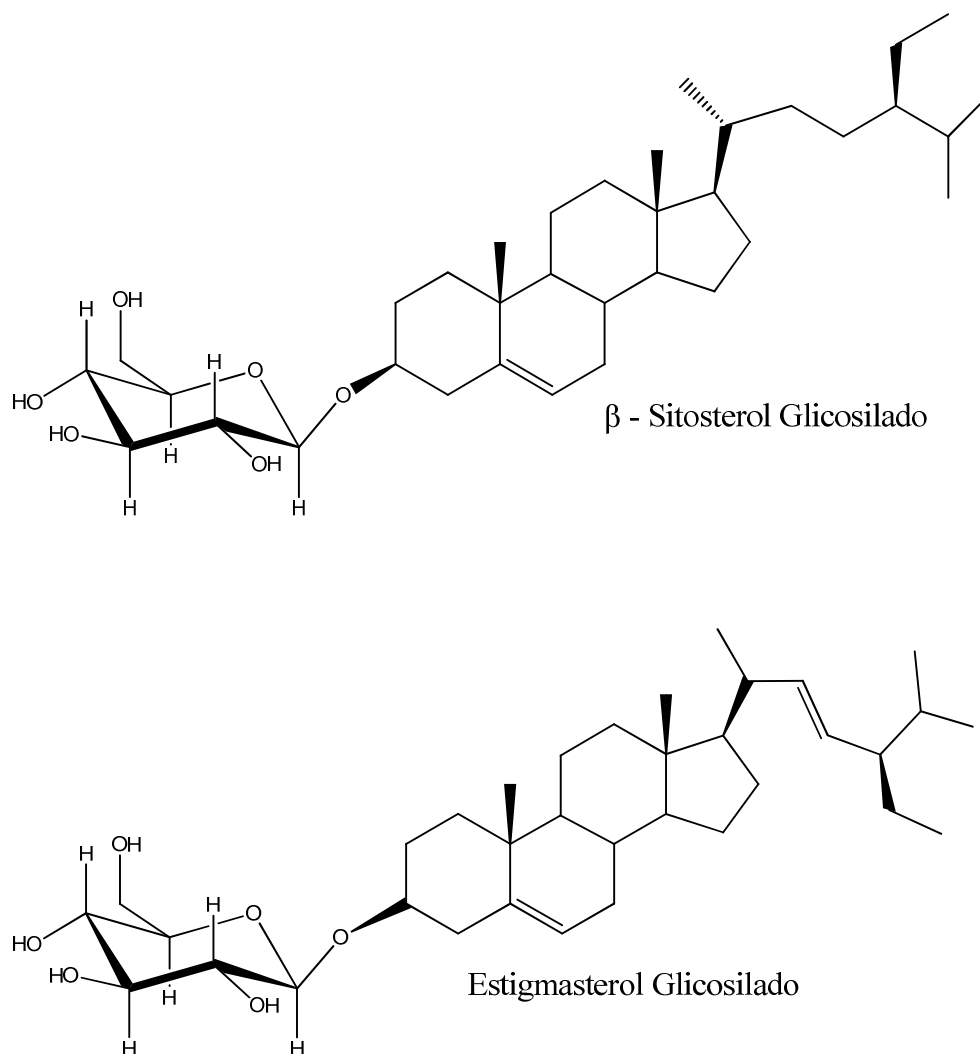
Fonte: Autor, 2013.

Figura 63 - Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT -135 da fração SLE.



Fonte: Autor, 2013.

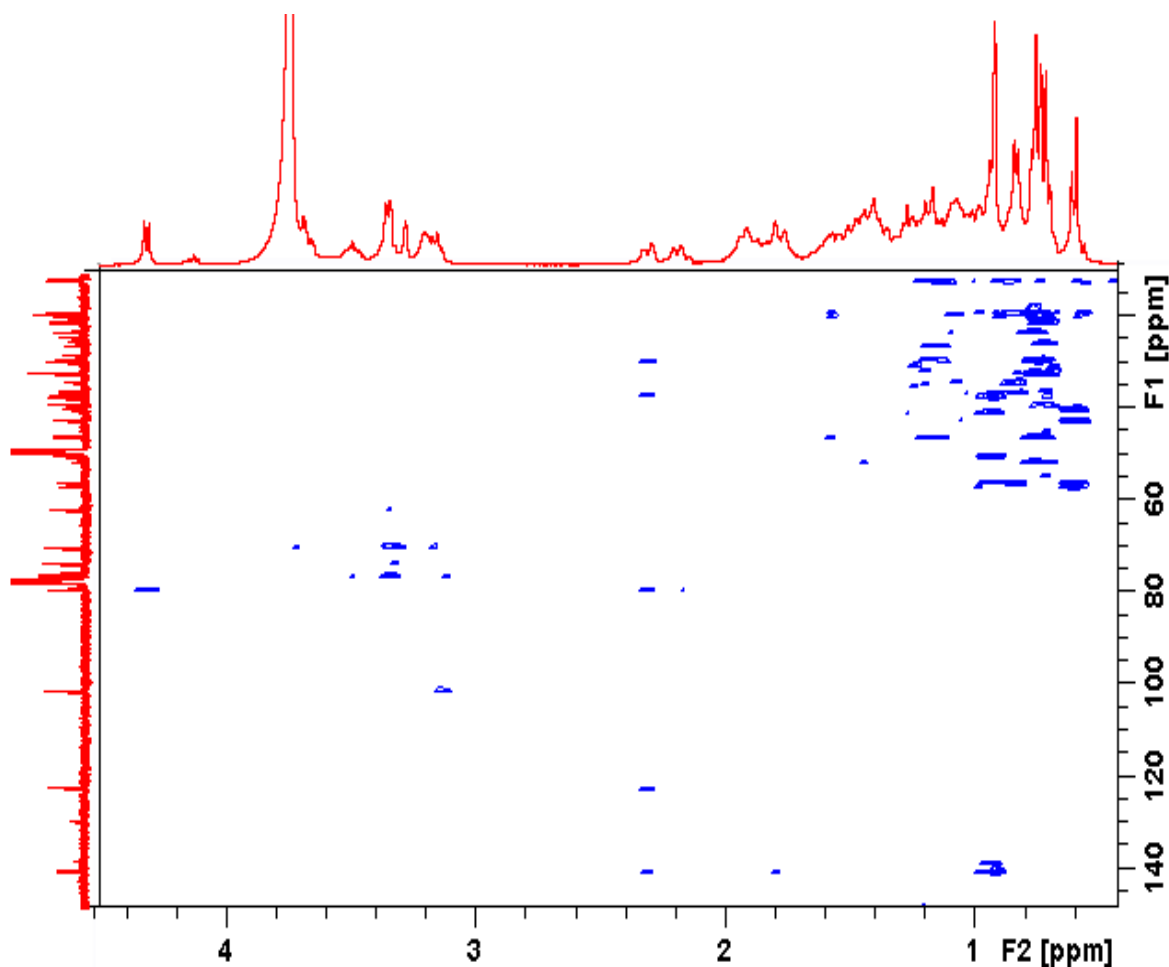
Figura 64 - Estruturas dos compostos presentes na amostra SLE.



Fonte: Autor, 2013.

O espectro de correlação à longa distância, HMBC (**Figura 65**), apresentou como principais correlações: carbono C-3 do sitosterol e do estigmasterol (δ 79,27) com hidrogênio H -1' da glicose (δ 4,31), H_a -2 (δ 1,16) e H_a -4 (δ 2,30), que confirma a ligação 3-O- β -glicose; hidrogênio H-6 do sitosterol e do estigmasterol (δ 5,28) com C-4 (δ 38,75), C-7 (δ 32,00) e C-10 (δ 36,76); carbono C-5 (δ 138,38) do estigmasterol com os hidrogênios H-19 (δ 0,93) e carbono C-5 (δ 140,35) do sitosterol com os hidrogênios H-19 (δ 0,91).

Figura 65 - Mapa de contorno HMBC da amostra SLE.

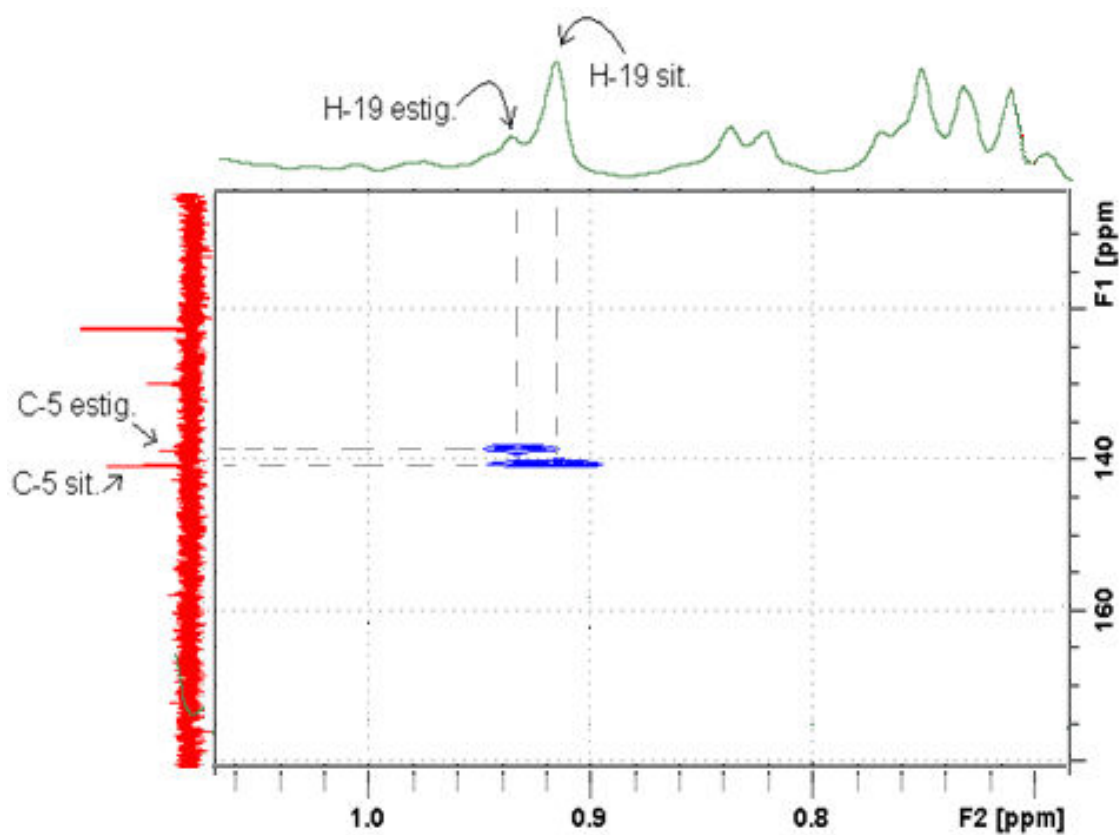


Fonte: Autor, 2013.

A análise dos espectros de ^{13}C , DEPT 135, de ^1H e expansão do mapa de contorno HMBC (**Figura 66**) forneceram evidências para uma mistura de sitosterol e estigmasterol glicosilados, onde a maior quantidade na mistura é de sitosterol devido às intensidades dos sinais observados em cada espectro. A análise comparativa desses espectros permitiu atribuir as absorções aos elementos correspondentes com as estruturas propostas (**Tabela 9**).

A sobreposição de sinais e a falta de proporcionalidade dos valores das integrações no espectro de RMN de ^1H , principalmente quando analisado conjuntamente com dados de RMN de ^{13}C e HMBC, evidenciam a presença de uma mistura de sitosterol e estigmasterol glicosilados na amostra SLE. Pode ser percebido também que nessa mistura o sitosterol está em maior quantidade que o estigmasterol.

Figura 66 - Expansão do mapa de contornos HMBC com sobreposição dos experimentos de ^1H e de ^{13}C mostrando intensidades e correlações heteronucleares de ^1H e ^{13}C da fração SLE.



Autor, 2013.

Tabela 9 - Dados de RMN de ^{13}C e RMN de ^1H para os compostos β -sitosterol glicosilado (3β - $\text{O}\beta$ -D-glicopiranosil sitosterol) e estigmasterol glicosilado (400 MHz, CDCl_3).

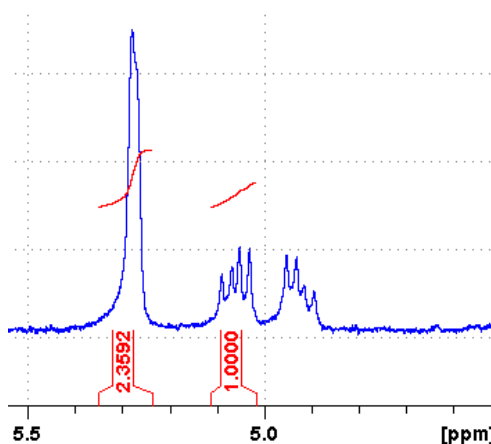
C	β -sitosterol glicosilado			Estigmasterol		
	^{13}C (1)	^{13}C (2)	^1H	^{13}C (1)	^{13}C (2)	^1H
1	37,31	37,24	0,99; 1,78	37,31	37,2	0,99; 1,78
2	29,64	29,26	1,16; 1,80	29,64	31,6	1,16; 1,80
3	79,27	78,51	3,48 (1-H, m)	79,27	71,8	
4	38,75	39,15	2,18; 2,30	38,75(42,5)	42,3	
5	140,35	140,91	-	138,38	140,7	-
6	122,21	121,90	5,28	122,21	121,7	5,28
7	32,00	31,86	1,40; 1,90	32,00	31,9	1,40; 1,90
8	31,94	31,98	1,45	31,94	31,9	1,40
9	50,25	50,17	0,82	50,25	50,1	0,82
10	36,76	36,74	-	36,76	36,5	-
11	21,09	21,07	0,75	21,09	21,2	0,75
12	39,82	39,76	1,92	39,82	39,6	1,92
13	42,38	42,30	-	42,29	42,3	-
14	56,80	56,67	0,92	56,91	56,8	
15	24,31	24,30	1,48	24,39	24,3	
16	28,26	28,34	1,75; 1,78	28,93	28,9	
17	56,11	56,09	1,02	56,04	55,9	
18	11,85	11,75	0,59	12,03	12,0	
19	21,13	19,20	0,91	21,21	19,4	
20	40,56	36,21	1,09	40,56	40,5	1,09
21	19,30	18,79	0,91	21,05 ou 19,02	21,2	
22	34,01	34,01	0,92; 1,23	138,38	138,3	
23	39,72	26,18	1,09	129,37	129,2	
24	45,98	45,86	0,84	51,29	51,2	1,43
25	29,21	30,07	1,56	31,94	31,9	
26	18,99	18,99	0,71	21,21	21,0	
27	19,76	19,76	0,73	19,02	19,0	
28	23,10	23,18	1,16	25,44	25,4	
29	11,96	11,93	0,76	12,19	12,2	
1'	100,16	102,52	4,31 (1-H, d, 7,67)	4,31 (1-H, d, 7,67)		
2'	73,60	75,25	3,14 (1-H, t, 7,67)	3,14 (1-H, t, 7,67)		
3'	75,79	77,98	3,19	3,19		
4'	70,18	71,58	3,33	3,33		
5'	76,44	78,40	3,35	3,35		
6'	61,90	62,71	3,65; 3,68	3,65; 3,68		

Fonte: Autor, 2013.

(1) Valores encontrados experimentalmente; (2) valores encontrados na literatura, (MEDINA, 2006).

A quantificação foi feita a partir dos valores das integrações dos sinais de hidrogênio. O sinal correspondente ao H-23 em δ 5,06 do estigmasterol ($\int_1 = 1.0000$) foi tomado como referência porque nessa região não há sobreposição de sinais e a partir deste, foi feita a integração do sinal em δ 5,28 ($\int_2 = 2.3592$) pertencente ao H-6 do sitosterol e do estigmasterol (**Figura 67**). O valor correspondente \int_2 foi considerado como 100 % da mistura tornando o valor de \int_1 (H-23 do estigmasterol) proporcional a 42,4%, restando 57,6 % para o sitosterol.

Figura 67 - Integração dos sinais de H-23 do estigmasterol e H-6 da mistura para quantificação.

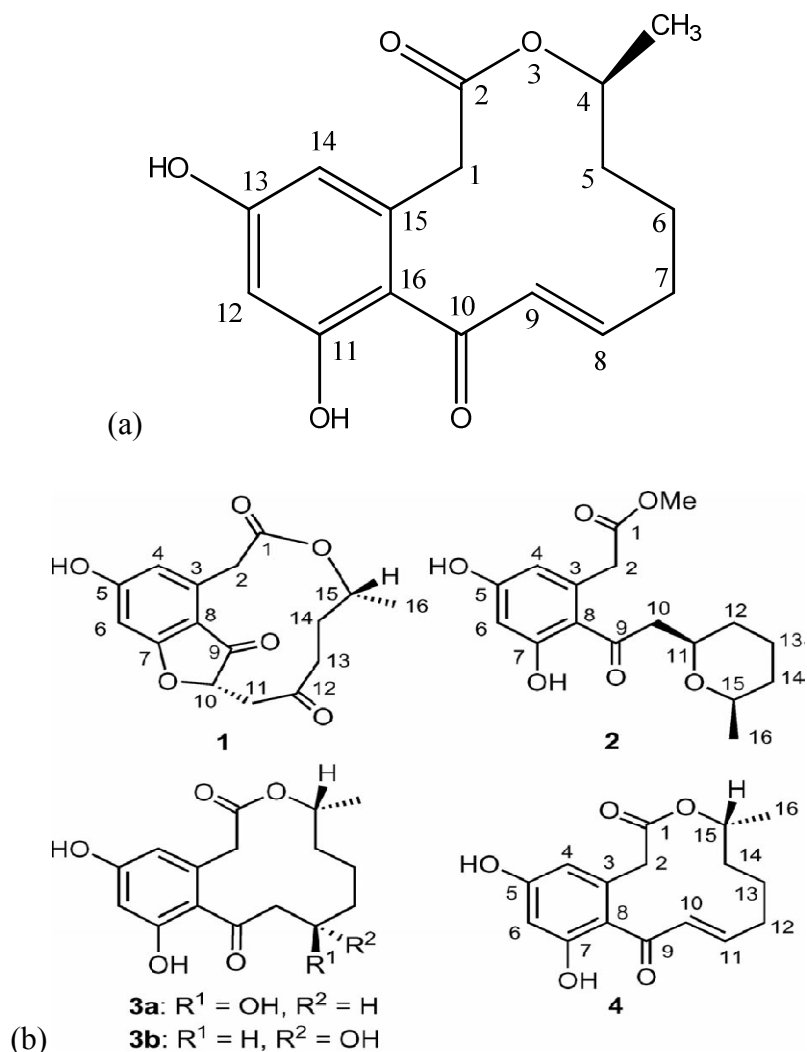


Fonte: Autor, 2013.

6.4 Amostra a-11 de *Curvularia eragrostidis*.

Curvularinas (**Figura 68**) são lactonas macrocíclicas bem conhecidas produzidas por fungos do gênero *Curvularia* e por mais uma variedade de fungos do gênero *Penicillium* e *Alternaria*. Foram isoladas pela primeira vez em 1967 por Munro e colaboradores e identificadas por Hyeon e colaboradores em 1976 (JIANG, 2008). Há relato de possuírem muitas atividades biológicas como fitotoxicidade, citotoxicidade, antifúngico, inibição de divisão celular, necrose hepática, entre outras (ZHAN, 2005; JIANG, 2008). Podem ser usadas também como herbicida natural para controle de pragas (JIANG, 2008).

Figura 68 - Estruturas da α,β -dehydrocurvularina produzida por *Curvularia eragrostidis* (a) e curvularinas (b), produzidas por *Curvularia* sp.

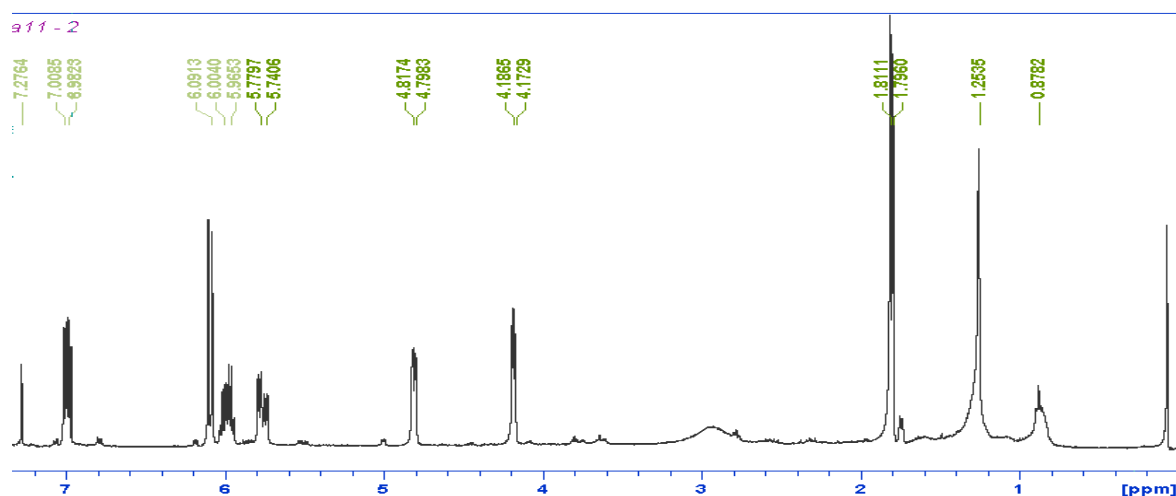


Fonte: DAI, 2010.

Nesta etapa foi investigada a presença de *Curvularia eragrostidis* nos cultivos de inhame (*Dioscorea* spp.) da Zona da Mata do estado de Alagoas, isolar e identificar metabólitos secundários através da RMN em experimentos 1D e 2D, como por exemplo, a curvularina em meios de cultura com esse fungo.

Inicialmente, durante o processo de elucidação estrutural, em uma análise preliminar em RMN de ¹H (**Figura 69**), alguns dos sinais não mostraram ter correlação com os outros sinais, devido a diferenças em suas constantes de acoplamento dificultando a definição de uma estrutura. A amostra foi então submetida a mais um processo de purificação sendo passada em uma coluna de gel de sílica.

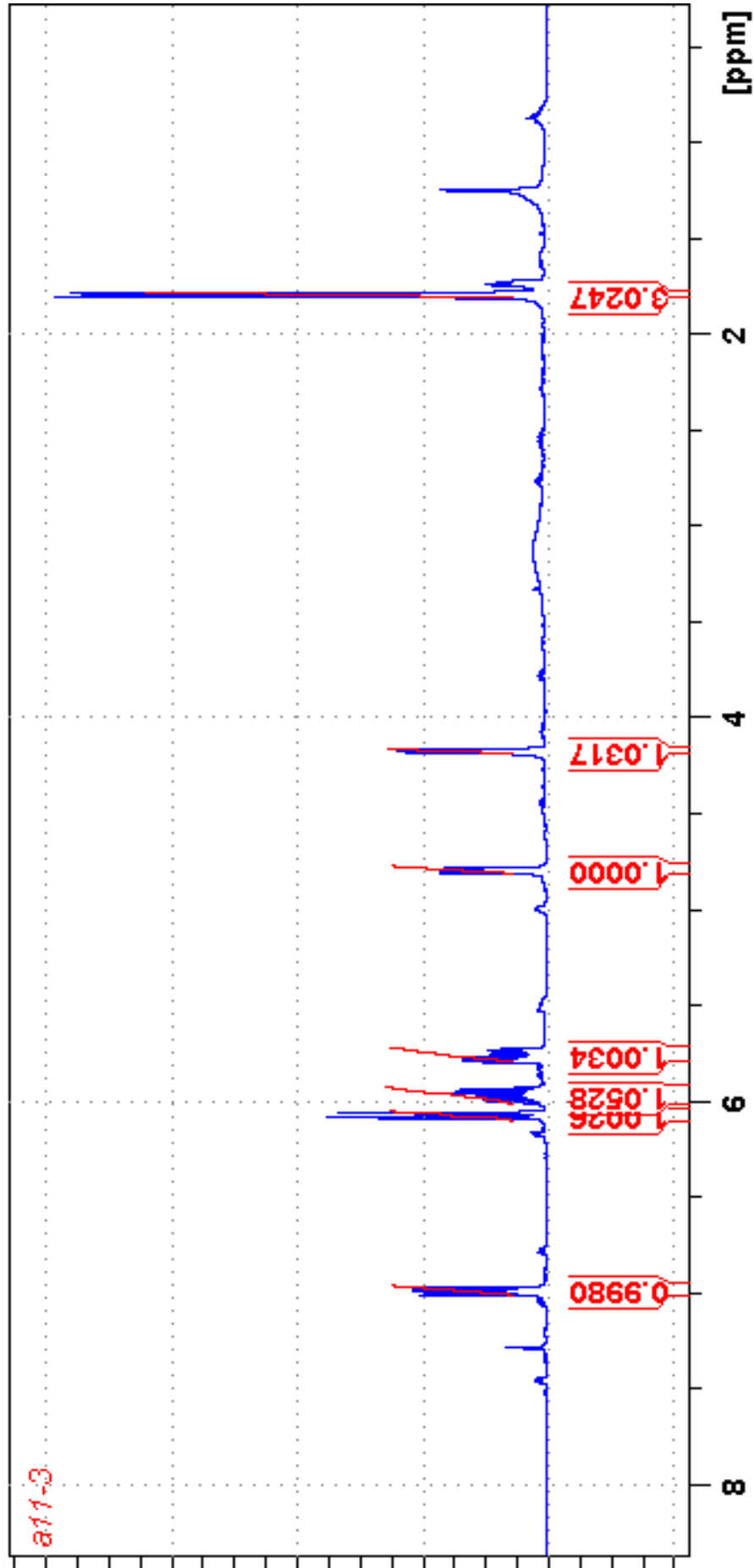
Figura 69 - Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 .



Fonte: Autor, 2013.

Após purificação em coluna cromatográfica, a amostra foi submetida à nova análise por RMN. O espectro de RMN de ^1H apresentou onze sinais de hidrogênios, sendo quatro deles em região do espectro característico de hidrogênios ligados a carbonos saturados δ_{H} 0,87 (m), δ_{H} 1,25 (s), δ_{H} 1,75 (d, $J = 6,50$) e δ_{H} 1,78 (3H, d, $J = 6,65$) e seis referentes a hidrogênios olefinicos δ_{H} 4,15 (1H, dd, $J = 5,5/ 3,15$), δ_{H} 4,78 (1H, dd, $J = 7,5/ 2,5$), δ_{H} 6,05 (1H, d, $J = 9,80$), δ_{H} 5,75 (1H, qd, $J = 15,45/ 7,5/ 1,5$), δ_{H} 5,93 (1H, m) e δ_{H} 6,98 (1H, dd, $J = 9,8; 5,5$) (**Figura 70**).

Figura 70 - Espectro de RMN ¹H do composto isolado.

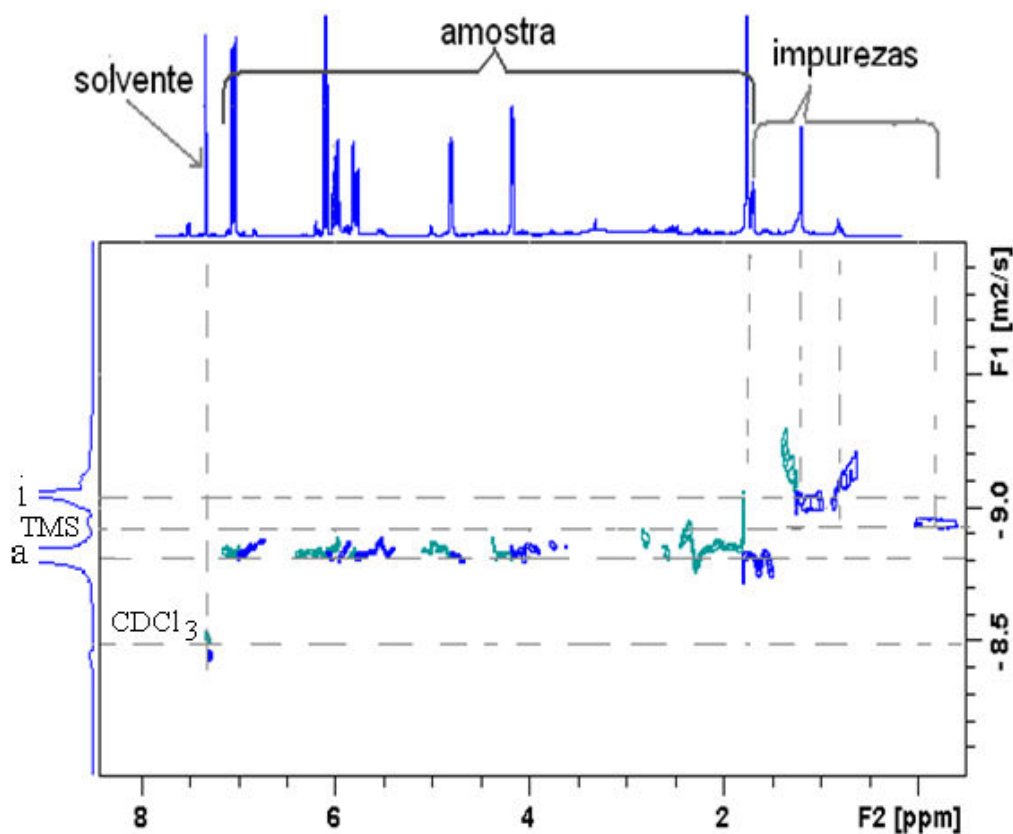


Fonte: Autor, 2013.

Os sinais presentes na região compreendida entre 0,87 e 1,75 ppm, não mostraram coerência de haver ligação com os demais sinais do espectro devido às diferenças nos valores das integrações e das constantes de acoplamento levando à suspeita de que a amostra era constituída por uma mistura de compostos.

O experimento DOSY (**Figura 71**) foi executado, revelando a presença de sinais que não fazem parte do composto principal, ou seja, a presença de mais de um composto na amostra, além do solvente usado na obtenção dos espectros (CDCl_3) com coeficiente de difusão de $-8,5 \text{ m}^2/\text{s}$, o experimento revela também a presença de impurezas com coeficiente de difusão entre $-9,0$ e $-9,3 \text{ m}^2/\text{s}$, que não puderam ser removidas no processo de purificação levando a constatar que realmente se tratava de uma mistura. Este experimento revela em que região do espectro aparece os sinais que fazem parte do composto principal e, a partir dele, estabelecer quais os sinais de hidrogênio pertencem à substância em análise.

Figura 71 - Experimento DOSY editado com adição do experimento de RMN de ^1H na parte superior mostrando correlações dos sinais do solvente (CDCl_3), do composto principal (a) e das impurezas (i) da amostra a-11.



Fonte: Autor, 2013.

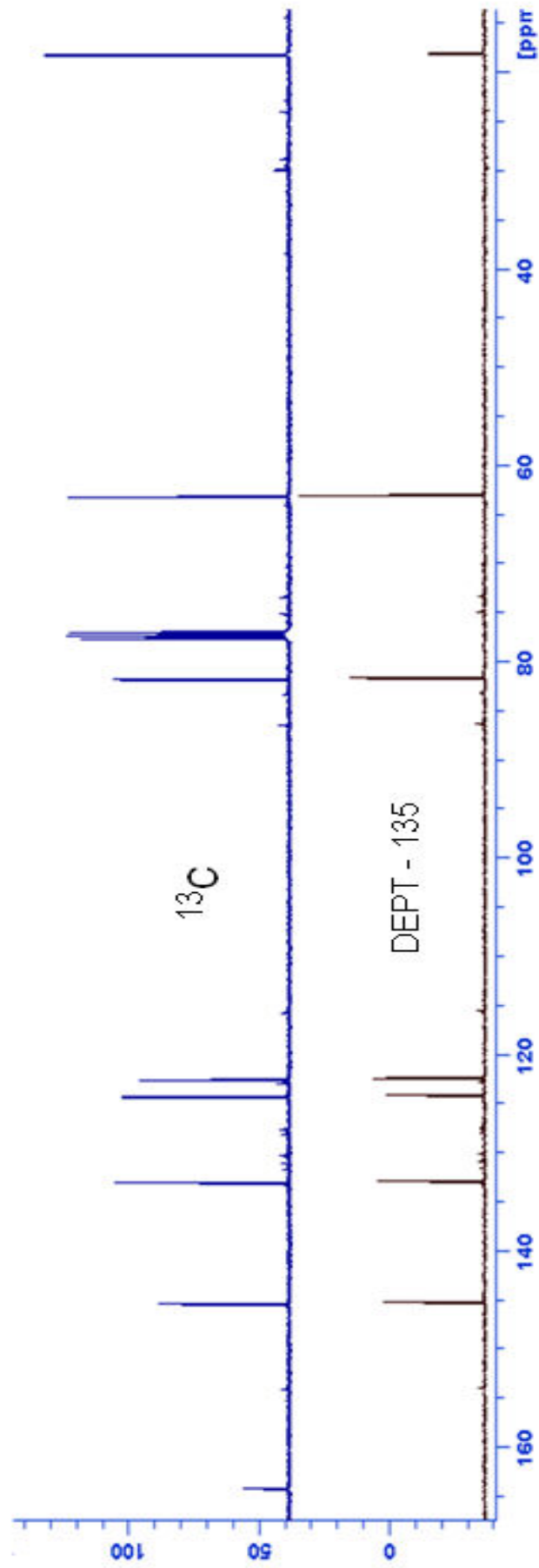
O espectro de RMN- C^{13} , incluindo DEPT 135 indicou a presença total de oito carbonos que puderam ser classificados como sendo: um carbono carbonílico (δ 164,18), seis grupos metínicos (δ_C 63,14; 81,78; 122,55; 124,29; 133,02; 145,37) e um grupo metila (δ_C 18,18) (**Figura 72**). Estes experimentos revelaram que a substância em análise possui uma estrutura bem menos complexa do que sugere o experimento de RMN 1H quando analisado isoladamente.

O experimento de correlação heteronuclear 1H - ^{13}C HSQC revelou a correlação de sete sinais de hidrogênio a carbono: 1,77 d (-CH₃, 18,18); 4,15 dd (-CH, 63,14); 4,78 dd (-CH, 81,78); 5,75 qd (124,29); 5,96 m (-CH, 132,02); 6,05 d (-CH, 122,05) e 6,98 dd (-CH, 145,37) (**Figura 73**).

Foram realizados ainda experimentos de correlação homonuclear 1H - 1H COSY (**Figura. 73**) e heteronuclear 1H - ^{13}C HMBC (**Figura 74**). O mapa de contorno COSY apresentou as seguintes correlações entre os sinais dos átomos de hidrogênios: 1,78 \rightarrow 5,93 \rightarrow 5,75 \rightarrow 4,78 \rightarrow 4,15 \rightarrow 6,98 \rightarrow 6,05 e mostrou coerência com os dados obtido no experimento DOSY. Os resultados obtidos a partir dos experimentos COSY, HMBC e HSQC, foram analisados e os dados obtidos foram resumidos na **Tabela 10**, que permitiram estabelecer a correlação de deslocamento químico dos átomos de hidrogênio e carbono que serviram para propor a estrutura do componente principal da amostra (**Figura 75**).

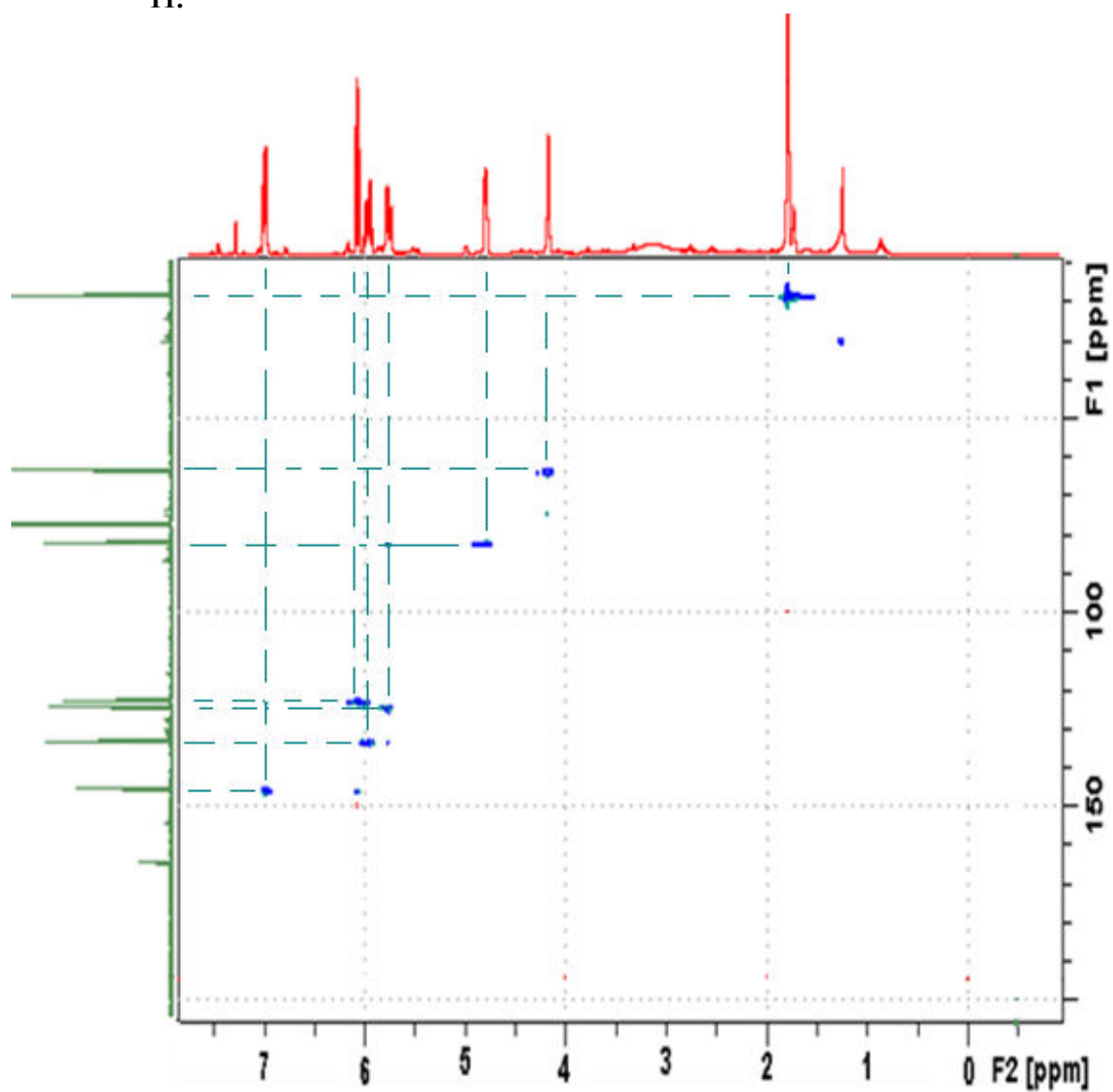
Baseado nos valores das constantes de acoplamento escalar, J , dos sinais referentes a H-6 e H-7 ($J = 15,50$ Hz), a estrutura proposta apresenta uma conformação trans, pois estruturas cis apresentam constantes de acoplamento entre 6 e 8 Hz.

Figura 72 - Espectros de ^{13}C e DEPT - 135 da amostra a-11.



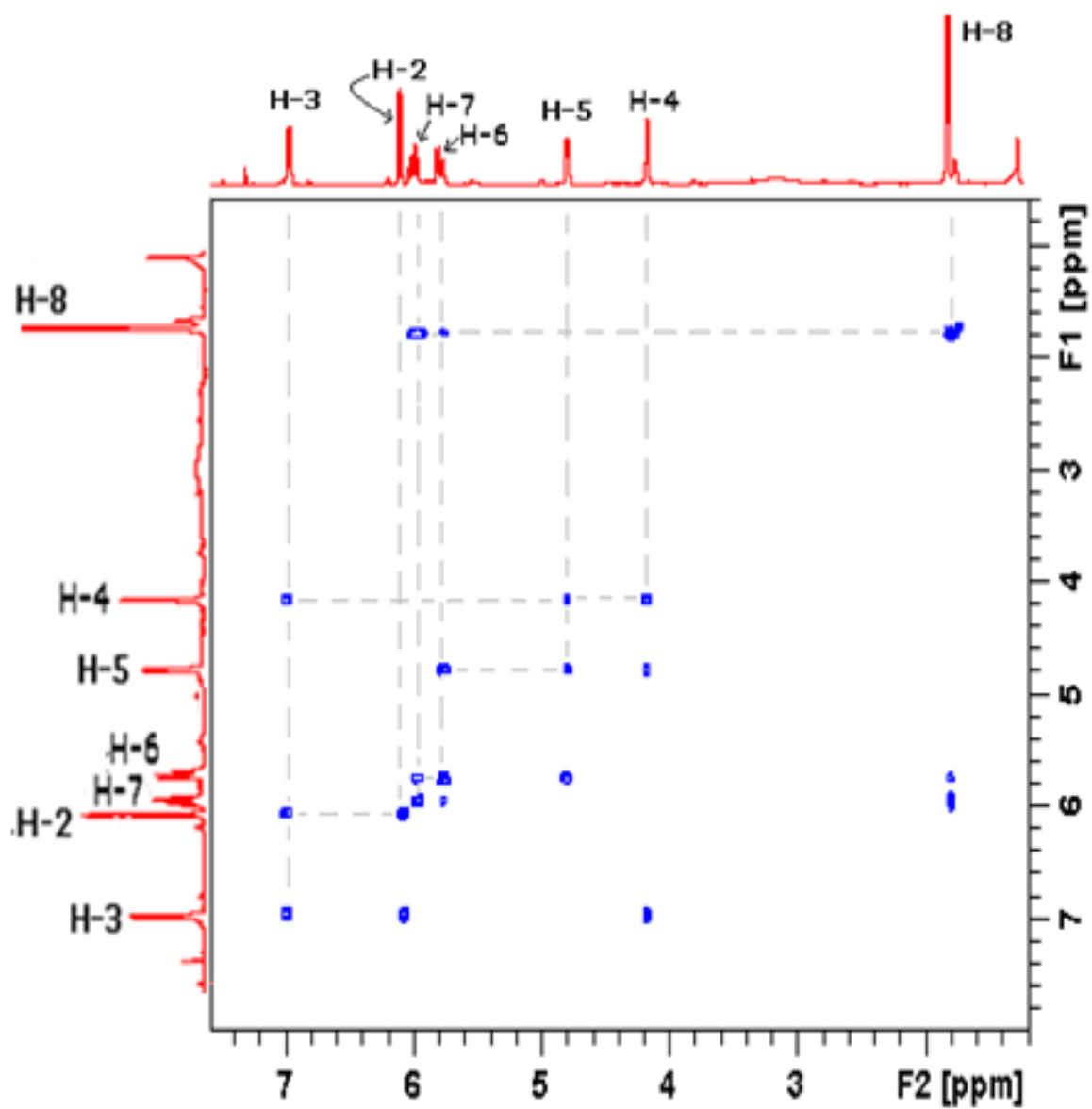
Fonte: Autor, 2013.

Figura 73 - Mapa de contorno HSQC com sobreposição de espectros de ^1H e ^{13}C da amostra a-11.



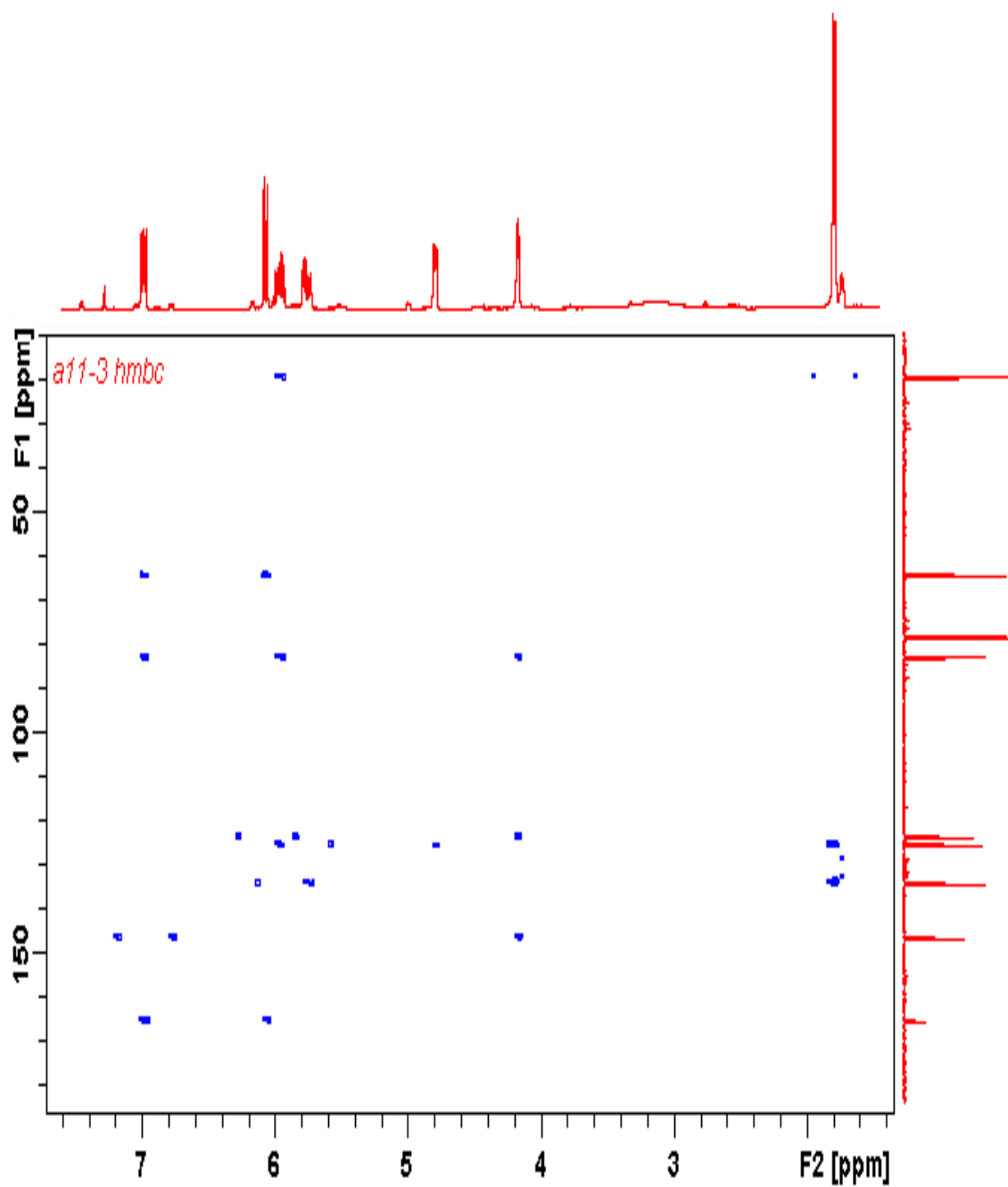
Fonte: Autor, 2013.

Figura 74 - Mapa de contorno COSY da amostra a-11.



Fonte: Autor, 2013.

Figura 75 - Mapa de contorno HMBC da amostra a-11.

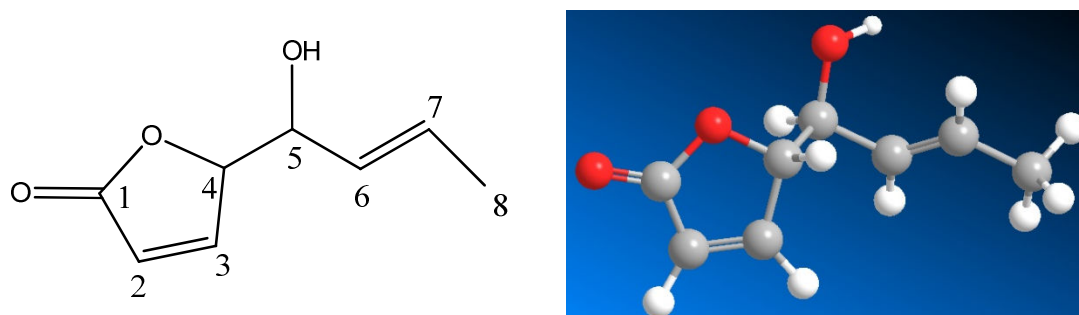


Fonte: Autor, 2013.

Tabela 10 - Dados de HSQC, HMBC e COSY para o composto isolado.

	¹³ C	HSQC ¹ H	HMBC <i>J</i> ^{2:3}	COSY ¹ H x ¹ H
1	164,18	-	6,05; 6,98; 4,78; 4,15	--
2	122,55	6,05 (1H, d, <i>J</i> = 9,80)	6,98; 4,15	6,98
3	145,37	6,98 (1H, dd, <i>J</i> = 9,80; 5,50)	4,15; 4,78; 6,05	6,05; 4,15
4	81,78	4,78 (1H, dd, <i>J</i> = 7,50/ 2,30)	4,15; 6,98; 5,93	5,75; 4,15
5	63,14	4,15 (1H, dd, <i>J</i> = 5,50/ 3,05)	6,05; 6,98	4,78; 6,98
6	124,29	5,75 (1H, qd, <i>J</i> = 15,50/ 7,50/ 1,55)	4,78; 1,78	5,93; 1,78; 4,78
7	133,02	5,93 (1H, dq <i>J</i> = 15,50/ 6,65),	1,78; 5,75	5,75; 1,78
8	18,18	1,78 (3H, d, <i>J</i> = 6,65)	5,93; 5,75	5,75; 5,93

Fonte: Autor, 2013.

Figura 76 - Estrutura do composto isolado da amostra a-11.

Fonte: Autor, 2013.

Foi realizado ainda experimento em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) que confirmou a presença de impurezas e a massa molecular da substância proposta. A substância apresentou m/z 154 $[M]^+$ e índice de Kovats (KI) 1.361,40 (PEREIRA, 2002).

$$IK = 100 \times 13 + 100 \left[\frac{18,747 - 17,422}{19,58 - 17,422} \right] = 1.361,40$$

Onde:

$$IK = 100 \times n + 100 \left[\frac{TR_x - TR_n}{TR_N - TR_n} \right]$$

IK = Índice de retenção de Kovats;

n = n° de carbonos do n-alcano que elui antes da substância analisada;

N = n° de carbonos do n-alcano que elui depois da substância analisada;

TR_x = tempo de retenção da substância analisada;

TR_n = tempo de retenção do n-alcano que elui antes da substância analisada;

TR_N = tempo de retenção do n-alcano que elui depois da substância analisada.

7 CONCLUSÕES

Modernos métodos espectroscópicos, como Ressonância Magnética Nuclear – RMN tem revolucionado a elucidação estrutural de compostos orgânicos. Dados de experimentos de RMN, principalmente ^1H , fornecem informações complementares para validação de estruturas químicas adequadamente, principalmente em análises de misturas.

A aplicação das técnicas de RMN em uma e em duas dimensões permitiram elucidar a estrutura de um flavonol glicosilado na amostra Mq-13 isolada de *Melloa quadrivalvis*, uma fração que apresentou atividade biológica.

O estudo da fração SLR de *Serjania lethalis*, após vários experimentos de RMN de ^1H e de ^{13}C em uma e em duas dimensões permitiram identificar a estrutura de uma saponina triterpenica com quatro unidades glicosídicas.

A fração SLE de *Serjania lethalis*, após vários experimentos de RMN de ^1H e de ^{13}C em uma e em duas dimensões e também com auxílio de experimentos de correlação homo e heteronuclear apresentou uma mistura de esteroides glicosilados. Através dos valores das integrações dos sinais de RMN de ^1H dos dois esteroides foi possível fazer uma quantificação.

A investigação da presença de *Curvularia eragrostidis* nos cultivos de inhame (*Dioscorea spp.*) da Zona da Mata do estado de Alagoas revelou que esse fungo realmente está presente nas plantações pesquisadas. Embora o fungo estivesse presente, o metabólito secundário que se desejava isolar (a curvularina) que não foi encontrada, em vez disso, encontramos uma lactona de massa molecular bem inferior, mas ainda não encontrada referencia sobre ela na literatura.

Através do experimento DOSY, foi possível relacionar todos os sinais de hidrogênio do composto principal, e após nova análise, em conjunto com outros experimentos (^1H , ^{13}C , DEPT 135, HSQC, COSY e HMBC) foram obtidas todas as correlações entre H e C e feita a proposta estrutural mais provável. O experimento em CG/EM confirmou a presença de impurezas e a massa molecular da substância proposta. A substância apresentou m/z 154 $[\text{M}]^+$ e índice de Kovats (KI) 1.361,40.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. S. M. S. **Estudo químico de plantas com atividade sobre insetos sociais**. 2007. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.
- BERLINK, R. **Ressonância magnética nuclear: análise de compostos orgânicos: o retorno de Jedi**. Cap. 3. Disponível em: <<http://qopn.iqsc.usp.br/files/2008/05/cursormn3.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2013.
- BORGES, R. M. **Estudo fitoquímico das raízes de *Chiococca 108lba* (L.) (Rubiaceae)**. 2006. Dissertação. (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
- BREITMAIER, E. **Structure elucidation by NMR in organic chemistry: a practical guide**. Chichester. London: J. Wiley & Sons, 1993.
- BREITMAIER, E; VOELTER, W. **Carbon – ¹³NMR spectroscopy**. 3th. ed. rev. New York: VHC, 1990.
- BROSS-WALCH, N. et al. O. Strategies and tools for structure determination of natural products using modern methods of NMR spectroscopy, (Review). **Chemistry & Biodiversity**, Zürich, v. 2, p.147- 177, 2005.
- DOSY and diffusion by RNM: a tutorial for topspin: version 1.3. Rheinstetten: Bruker BioSpin GmbH, 2006.
- CARVALHO, R. L. P. **Isolamento e caracterização de constituintes da *Melloa quadrivalvis* (Jacq.) A. Gentrys (Bignoniaceae)**. 1996. Dissertação (Mestre em Química e Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 1996.
- DAI, J. et al. Curvularin-type metabolites from the Fungus *Curvularia* sp. Isolated from a Marine Alga. **Eur. J. Org. Chem.**, Weinheim , p. 6928- 6937, 2010.
- DOMÍNGUEZ, X. A. **Métodos de investigación fitoquímica**. Arcos de Belém: Centro Regional de Ayuda Técnica, 1975.
- EWING, Galen Wood. **Métodos instrumentais de análise química**. Tradução de Aurora Giora Albanese e Joaquim Teodoro de Sousa Campos. 6. ed. São Paulo: E. Blücher, 1972.
- FRIEBOLIN, H. **Basic one-and two-dimensional NMR spectroscopy**. Weinheim: VCH, 1991.
- GALLEGOS-OLEA, R. S. et al. Flavonóides de *Calotropis procera* R. Br. (*Asclepiadaceae*). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 29-33, 2008.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância magnética nuclear**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987.

GUTERRES, S. B. **Estudos dos extratos dos frutos de *Sapindus saponaria* enriquecidos em saponinas e outros glicosídeos e sua aplicação em eletroforese capilar**. 2005. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. **The flavonoids**. New York : Academic Press, 1975. Part 1.

JIANG, S. J. et al. Isolation and phytotoxicity of a metabolite from *Curvularia eragrostidis* and 109characterization of its modes of action. **Ann. Appl. Biol.**, v. 152, p. 103-11, 2007.

KAISER, C. R. RMN 2D: detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, 2000.

KHAN, A. L. et al. Secondary metabolites from *Inula 109lba109nnica* L. and their biological activities (review). **Molecules**, v. 15, p.1562-1577, 2010.

KLEIN, S. I. **Ressonância nuclear magnética em química**: conceitos básicos e introdução à R.M.N. Multinuclear. UNESP, Araraquara, 1987. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAeUYAC/ressonancia-magnetica-nuclear>>. Acesso em: 12 nov. 2012.

LI, J.; JIANG, Y. Litchi flavonoids: isolation, identification and biological activity (review). **Molecules**, v. 12, p. 745-758, 2007.

MABRY, T. J.; MARKAN, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Spriger-Verlag, 1970.

MAHATO, S. B., SARKAR, S. K.; PODDAR, G. Triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3037-3067, 1988.

MARQUI, S. R. et al. Saponinas antifúngicas de *Swartzia langsdorffii*, **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 828-831, 2008.

MEDINA, A. J. C. M. **Estudo químico e biológico de espécies vegetais da família Boraginaceae. (Gêneros *Heliotropium* e *Tournefortia*)**. 2006. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual do Maringá, Maringá, 2006.

MENDEZ, J.; BILIA, A. R.; MORELLI, I. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania pittieri*. **Pharmaceutics Acta Helvetiae**, v. 70, p. 223-226, 1995.

MOCCELINI, S. K. et al. Estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. Ex Willd (Rutaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 131-133, 2009.

MONTE, F. J. Q.; OLIVEIRA, E. F. Triterpenóides pentacíclicos de *Mentha villosa*: identificação estrutural e atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 491-500, 2001.

- MONTRUCCHIO, D. P. et al. Componentes químicos e atividades antimicrobiana de *ptychopetalum olacoides* Bentham chemical compounds and antimicrobial activity of *Ptychopetalum olacoides* Benthan. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 6, n. 2, 2005.
- MOREIRA, F. P. M. et al. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 309-311, 2003.
- MOURA, R. M. Doenças do inhame-da-costa (*Dioscorea cayennensis*). In: KIMATI, H. et al (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica, 2005. p. 415-419.
- MULLER, A. H. **Métodos físicos de análise orgânica**: ressonância magnética nuclear-RMN. CESUPA, 2005.
- MURGU, M. **Saponinas e glicosídeos de Sapindus saponaria: metodologias de análise por espectrometria de massas e relação com fungos endofíticos**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de São Paulo, São Carlos, 2002.
- NAKANISHI, K. et al. **Natural products chemistry**. California: University Science Books., 1983. v. 3.
- PAULI, G. F.; JAKI, B. U.; LANKIN, D. C. Quantitative ¹H NMR: development and potential of a method for natural products analysis. **J. Nat. Prod.** v. 68, p. 133-149, 2005.
- PAVIA, D. L.; LAPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy**: a guide for students of organic chemistry. 2. ed. New York: Saunders GoldenSunderst Series, 1996.
- PEREIRA, H. M. G. et al. Análise de glicocorticosteróides por cg-em: uma nova abordagem de derivatização para o controle de dopagem no esporte. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p.1096-1102, 2002.
- PIRES, E. V. **Estudo fitoquímico da espécie *Serjania lethalis* St. Hill**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.
- PIZZOLATTI, M. G. et al. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 466-469, 2003.
- SANTANA, D.C. et al. Potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de *Annona crassiflora*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., 2010, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 2010.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Tradução Ricardo Bicca de Alencastro. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. v. 1.
- SPARG, S.G. et al. **Cultivating the medicinal plant *Merwillia natalensis* as a crop**: a small-scale farming approach. Rio de Janeiro: UFRJ, 2004. No prelo.

STEFANI, R; NASCIMENTO, P. G. B. D. Elucidação estrutural de substâncias orgânicas com auxílio de computador: Evoluções Recentes. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1347-1356, 2007.

WEI, Y. **NOE**: experiments on the Bruker. New York: Rockefeller University. Disponível em: <<http://www.rockefeller.edu/nmr/manuals/noeBruker.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2013.

ZHAN, J.; GUNATILAKA, A. A. L. Microbial Transformation of *Curvularin*. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p.1271-1273, 2005.