

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

BRYAN NICKSON SANTANA PINTO

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS ORGÂNICAS PELO USO
COMBINADO DE EXPERIMENTOS DE RMN E CÁLCULOS COMPUTACIONAIS
DE DFT**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

BRYAN NICKSON SANTANA PINTO

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS ORGÂNICAS PELO USO
COMBINADO DE EXPERIMENTOS DE RMN E CÁLCULOS COMPUTACIONAIS
DE DFT**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Elson Santiago de Alvarenga

Coorientador: Antônio Jacinto Demuner

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

P659i
2022

Pinto, Bryan Nickson Santana, 1992-
Identificação de novas moléculas orgânicas pelo uso combinado
de experimentos de RMN e cálculos computacionais de DFT / Bryan
Nickson Santana Pinto. - Viçosa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (185 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.
Inclui apêndices.
Orientador: Elson Santiago de Alvarenga.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento
de Química, 2022.
Referências bibliográficas: f. 125-137.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.588>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Análise espectral - Instrumentos. 2. Estrutura molecular. 3.
Macromoléculas - Espectros. 4. Reação de Diels-Alder. I. Alvarenga,
Elson Santiago de, 1967-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica. III. Título.

CDD 22. ed. 543.54

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

BRYAN NICKSON SANTANA PINTO

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS ORGÂNICAS PELO USO
COMBINADO DE EXPERIMENTOS DE RMN E CÁLCULOS COMPUTACIONAIS
DE DFT**

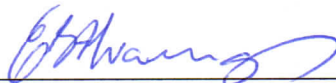
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de julho de 2022.

Assentimento:



Bryan Nickson Santana Pinto
Autor



Elson Santiago de Alvarenga
Orientador

À minha esposa e aos meus pais, dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que, na eternidade, escolheu me amar e, quando eu ainda estava no ventre da minha mãe, já me conhecia pelo meu nome. Ele é o autor da vida que não mediu esforços para me salvar, ao ponto de entregar seu único filho, Jesus Cristo, para me dar uma nova vida. Tudo que tenho, tudo que sou e o que eu vir a ser, é exclusivamente para a glória d'Ele. Todos esses longos anos de estudo, desde o jardim da infância até a conclusão do doutorado, só foram possíveis porque Deus assim desejou. Ele abriu portas, quando não havia portas. Ele me levantou todas as vezes que cai. Ele me levou a conhecer lugares e pessoas que eu nunca imaginei. E, o mais importante, Ele nunca deixou. Toda honra, glória e louvor ao nosso salvador, Jesus Cristo.

Agradeço à Giovana Berbert, minha linda, inteligente e empreendedora esposa, por todo o suporte em mais essa fase da nossa vida. Se ela não estivesse ao meu lado, provavelmente eu não estaria escrevendo essas palavras de agradecimento. Muito obrigado por tudo o que você fez e faz por mim. Vamos continuar lutando juntos e construindo nossos belos sonhos. Se Deus permitir, ainda teremos muito anos juntos nesse barquinho e, quem sabe, com mais tripulantes para colorir nossos dias. Deus não poderia ter me presenteado com alguém mais incrível do que você.

Agradeço aos meus pais, Sonia Alves e Marcos Antônio, por todo amor, educação, exemplo, correção e sacrifícios que fizeram para que eu pudesse estar aqui hoje. Eles que viram potencial em mim enquanto os demais viam o contrário. Espero ser 10% dos pais que vocês foram (e são) para mim.

Agradeço também ao meu irmão, Marlon Brener, por toda a torcida e fé depositada em mim, pelos momentos de alegrias e de ensinamentos que vivemos juntos. Não falta muito para você voar muito alto, meu irmão.

Agradeço aos professores e mestres que tive a honra de conhecer ao longo da vida, que serviram para me guiar pelos caminhos da educação e da ciência. Eles me ensinaram que todas as áreas da ciência são importantes. Agradeço aos professores Jason Taylor, Antônio Demuner e Vanderlúcia Fonseca pelo suporte ao longo desses 4 anos. Agradeço, em especial, ao meu orientador, professor Elson Alvarenga, por me auxiliar nessa caminhada e me mostrar o quão fascinante é a química computacional.

Agradeço aos meus amigos de laboratório do LASA: Sabriny, Tassia, Gabriella, Victor, Kamylla, André, João, Shafiu e Mariana. Todos vocês também fazem parte dessa vitória.

Agradeço à amada igreja IPVSOL de Viçosa, por me acolher e me permitir fazer parte do corpo de Cristo. Obrigado pelas orações durante todo esse tempo.

Agradeço aos colegas de trabalho, no colégio Anglo, pela experiência compartilhada. Também sou grato aos meus estudantes do segundo e terceiro ano do ensino médio: vocês me fazem perder o sono às vezes, mas deixam meu dia a dia muito mais incrível.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de estudar em uma instituição de tamanha excelência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

E, finalmente, a você, leitor dessa tese. Obrigado por dedicar parte do seu tempo apreciando esse singelo trabalho. Espero que a leitura o ajude a chegar a lugares mais longes na Química.

Pois não me envergonho do evangelho, porque é o poder de Deus para a salvação de todo aquele que crê, primeiro do judeu e também do grego.

Romanos 1:16

RESUMO

PINTO, Bryan Nickson Santana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2022. **Identificação de novas moléculas orgânicas pelo uso combinado de experimentos de RMN e cálculos computacionais de DFT.** Orientador: Elson Santiago de Alvarenga. Coorientador: Antônio Jacinto Demuner.

A elucidação da estrutura de um produto natural inédito é o primeiro passo para compreendermos as suas propriedades físico-químicas e suas aplicações, seja enquanto agroquímico ou fármaco. Esse processo, muitas vezes, é moroso, sobretudo em moléculas com alta complexidade e, geralmente, requer o uso combinado de várias técnicas. A espectroscopia de RMN é a principal técnica utilizada na elucidação estrutural de produtos naturais, devido à sua viabilidade e à qualidade dos dados obtidos, porém, é comum encontrarmos situações de moléculas complexas, nas quais a interpretação dos espectros de RMN é árdua. Nos últimos 15 anos, os cálculos computacionais de DFT se tornaram uma ferramenta popular, em conjunto com os dados experimentais de RMN, para auxiliar a elucidação estrutural de novas moléculas orgânicas. Métodos estatísticos – como o MAE, CMAE e, sobretudo, o DP4 – são utilizados para avaliar a qualidade do ajuste entre os dados experimentais e calculados, a fim de confirmar se a metodologia foi realizada de forma correta. Esse trabalho descreve detalhadamente a elucidação estrutural de quatro moléculas utilizando dados experimentais de espectros de RMN (^1H , ^{13}C , COSY, NOESY, HSQC, HMBC) e outras técnicas (massas, IV, VCD), aliados a cálculos computacionais de DFT. Uma das moléculas estudadas tem origem sintética da reação de Diels-Alder, enquanto as demais são produtos naturais extraídos das plantas *Crotalaria retusa* L. e *Conchocarpus mastigophorus* (*Rutaceae*). As moléculas elucidadas nesse trabalho foram: *(rac-(3aR,4S,4aS,5R,8S,8aR,9R,9aS)-3a,9a-dicloro-3a,4,4a,5,8,8a,9,9a-octaidro-4,9:5,8-dimetanonafto[2,3-c]furan-1(3H)-ona)*; *(3S*,4R*,5S*,8a¹R*,13aR*)-3-hidroxi-3,4,5-trimetil-4,5,8,8a¹,10,12,13,13a-octahidro-2H-[1,6]dioxacicloundecino[2,3,4-gh]pirrolizina-2,6(3H)-diona*; *3S(-)-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona*; *1,3,6-triidroxi-2,4,5-trimetoxi-10-metilacridin-9(10H)-ona*. A qualidade do ajuste foi verificada pela análise estatística DP4, bem como outras análises mais simples, como o MAE e CMAE.

Palavras-chave: Crotalina. DFT. Diels-Alder. Identificação estrutural. RMN.

ABSTRACT

PINTO, Bryan Nickson Santana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2022. **Identification of novel organic compounds by the combined use of NMR experiments and computational DFT calculations.** Advisor: Elson Santiago de Alvarenga. Co-advisor: Antônio Jacinto Demuner.

The structural elucidation of a novel natural product is the first step towards comprehending its physicochemical properties and applications, whether as a drug or an agrochemical. Sometimes this is an arduous task, particularly with molecules with higher complexity that requires the use of several combined techniques. The NMR spectroscopy is the leading technique to structure elucidation for natural products because it is widely available and provides high-quality data. Unfortunately, it is quite common to find situations where the interpretation of NMR data of a complex molecule is troublesome. In the last fifteen years, DFT calculations combined with NMR spectroscopy have become a trendy tool to elucidate the chemical structure of new organic compounds. Statistical methods, such as MAE, CMAE, and DP4, have been used to evaluate the best-of-fit between experimental and theoretical data, to confirm that the methodology was performed correctly. This work describes in detail the structure elucidation of four molecules using experimental data from NMR spectra (^1H , ^{13}C , COSY, NOESY, HSQC, HMBC) and other techniques (IR, VCD, GC-MS), combined with DFT calculations. One of the molecules studied has a synthetic origin from the Diels-Alder reaction, while the other three are natural products extracted from the plants *Crotalaria retusa* L. and *Conchocarpus mastigophorus* (Rutaceae). The molecules elucidated in this work were: *rac*-(3*aR*,4*S*,4*aS*,5*R*,8*S*,8*aR*,9*R*,9*aS*)-3*a*,9*a*-dichloro-3*a*,4,4*a*,5,8,8*a*,9,9*a*-octahydro-4,9:5,8-dimethanonaphtho[2,3-*c*]furan-1(3*H*)-one; (3*S*^{*},4*R*^{*},5*S*^{*},8*a*¹*R*^{*},13*aR*^{*})-3-hydroxy-3,4,5-trimethyl-4,5,8,8*a*¹,10,12,13,13*a*-octahydro-2*H*-[1,6]dioxacycloundecino[2,3,4-*gh*]pyrrolizine-2,6(3*H*)-dione; (3*S*)-(-)-3-hydroxy-1-methylpiperidin-2-one; 1,3,6-trihydroxy-2,4,5-trimethoxy-10-methylacridin-9(10*H*)-one. The best-of-fit of the data was examined with DP4 statistical analysis, as well with other simpler methods, such as MAE and CMAE.

Keywords: Crotalina. DFT. Diels-Alder. Structural elucidation. NMR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Moléculas de alguns antibióticos utilizados na medicina.....	18
Figura 2 - Estrutura molecular da morfina e cafeína.....	19
Figura 3 - Estrutura proposta para o colesterol por Wieland e Windaus <i>versus</i> a estrutura correta do colesterol.....	20
Figura 4 - Hexaciclínol e suas estruturas propostas.	21
Figura 5 - Face re e face si da lactona 1	37
Figura 6 - Reação da 3,4-diclorofuran-2(5H)-ona 1 com o ciclopentadieno 2 : representação da aproximação <i>si</i> e <i>re</i> e produtos endo e exo.....	37
Figura 7 - Reação da 3,4-diclorofuran-2(5H)-ona 1 com o ciclopentadieno 2 : estado de transição das estruturas candidatas.	39
Figura 8 - Espectro de infravermelho para o composto 3d	40
Figura 9 - Espectro de massas para o composto 3d	41
Figura 10 - Proposta de fragmentação do composto 3d	41
Figura 11 - Estrutura candidata 3d e a numeração utilizada em seus átomos.....	43
Figura 12 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ , 25 °C) do composto 3d	47
Figura 13 - Correlações COSY para o composto 3d	48
Figura 14 - Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃ , 25 °C) do composto 3d	49
Figura 15 - Correlações HMBC para o composto 3d	50
Figura 16 - Correlações HETCOR para o composto 3d	51
Figura 17 - Correlações NOESY para o composto 3d	52
Figura 18 - Exemplo do cone de blindagem para o eteno.	53
Figura 19 - Alcaloides macrocíclicos isolados da <i>Crotalaria paulina</i> L.	58
Figura 20 - Estruturas candidatas 6a-6h . Entre colchetes é apresentada a estrutura candidata correta (6h).	62
Figura 21 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD, 25 °C) do composto 6h	66
Figura 22 - Correlações COSY para o composto 6h	67
Figura 23 - Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD, 25 °C) do composto 6h	68
Figura 24 - Correlações HSQC para o composto 6h	69
Figura 25 - Espectro DEPT-135 (100 MHz, CD ₃ OD, 25 °C) do composto 6h	70
Figura 26 - Correlações HMBC para o composto 6h	71
Figura 27 - Correlações chaves de COSY e HMBC para o composto 6h	72
Figura 28 - Planta <i>Conchocarpus mastigophorus</i> Kallunki.	77
Figura 29 - Estruturas candidatas 7a-7d e 8a-8b para os dois produtos naturais isolados na <i>Conchocarpus mastigophorus</i> . Entre colchetes são apresentadas as estruturas candidatas corretas (7a e 8b).	79
Figura 30 - Estruturas para as moléculas conhecidas (9-17) isoladas na <i>Conchocarpus mastigophorus</i>	80

Figura 31 - Espectro de infravermelho do composto 7a .	85
Figura 32 - Espectro de massas do composto 7a .	86
Figura 33 - Proposta de fragmentação do composto 7a .	86
Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD , 25 °C) do composto 7a .	91
Figura 35 - Correlações COSY para o composto 7a .	92
Figura 36 - RMN de ^{13}C RMN (150 MHz, CD_3OD , 25 °C) para o composto 7a .	93
Figura 37 - Espectro de DEPTQ135 (150 MHz, CD_3OD , 25 °C) para o composto 7a .	94
Figura 38 - Correlações de HSQC para o composto 7a .	95
Figura 39 - Correlações de HMBC para o composto 7a .	96
Figura 40 - TOCSY em δ 2,10 ppm para o composto 7a .	97
Figura 41 - TOCSY em δ 2,17 ppm para o composto 7a .	98
Figura 42 - Irradiação seletiva de NOESY-1D em δ 2,01 ppm para o composto 7a .	99
Figura 43 - Irradiação seletiva de NOESY-1D em δ 2,51 ppm para o composto 7a .	100
Figura 44 - Irradiação seletiva de NOESY-1D em δ 2,96 ppm para o composto 7a .	101
Figura 45 - Irradiação seletiva de NOESY-1D em δ 3,15 ppm para o composto 7a .	102
Figura 46 - Irradiação seletiva de NOESY-1D em δ 3,76 ppm para o composto 7a .	103
Figura 47 - Irradiação seletiva de NOESY-1D em δ 3,85 ppm para o composto 7a .	104
Figura 48 - Correlações chaves COSY e HMBC para o composto 7a .	106
Figura 49 - Espectros calculados de RMN de ^{13}C para as estruturas candidatas 7a-7d e o RMN de ^{13}C experimental para o composto 7a .	106
Figura 50 - Comparação dos espectros experimentais (linha preta) e teóricos (linha vermelha) de IV e VCD para o composto 7a . O gap no espectro experimental de VCD corresponde a uma banda de alta absorção no IR.	108
Figura 51 - Espectro de massas do composto 8b .	109
Figura 52 - Proposta de fragmentação do composto 8b .	109
Figura 53 - Espectro de IV do composto 8b .	111
Figura 54 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, acetona- d_6 , 25 °C) do composto 8b .	114
Figura 55 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C) do composto 8b .	115
Figura 56 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona- d_6 , 25 °C) do composto 8b .	116
Figura 57 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C) do composto 8b .	117
Figura 58 - Correlações de NOESY (acetona- d_6) para o composto 8b .	118
Figura 59 - Correlações de HSQC (acetona- d_6) para o composto 8b .	119
Figura 60 - Correlações de HMBC (acetona- d_6) para o composto 8b .	120
Figura 61 - Espectro de RMN de ^{13}C calculado para as estruturas candidatas 8a-8c e o espectro experimental para o composto 8b .	121
Figura 62 - Correlações chaves HMBC para o composto 8b .	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise de DP4 dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C para as estruturas candidatas 3a a 3h antes de assinalar os dados experimentais.....	43
Tabela 2 - Dados de RMN do aduto 3d em CDCl_3 : Deslocamentos químicos experimentais (δ_{exp}), multiplicidades (m), constantes de acoplamento (J) de correlações COSY e NOESY.	54
Tabela 3 - Análise de MAE e DP4 para os dados de RMN de ^{13}C e ^1H das estruturas candidatas 3a-3h após a identificação dos sinais.	55
Tabela 4 - Dados de RMN para o composto 6h em CD_3OD : Deslocamento químico experimental (δ_{exp}), multiplicidade (m), constantes de acoplamento (J), picos de correlação COSY e HMBC.	73
Tabela 5 - Análise CMAE e DP4 para os dados de RMN de ^1H e ^{13}C para as estruturas candidatas 6a-6h após assinalar os sinais.	74
Tabela 6 - Análise de DP4 dos dados de RMN de ^{13}C e ^1H para as estruturas candidatas 7a-7d antes de assinalar os dados experimentais.	87
Tabela 7 - Dados de RMN para o composto 7a : Deslocamento químico experimental (δ), multiplicidade (m), constantes de acoplamento (J), correlações COSY e HMBC.....	105
Tabela 8 - Análise de DP4 dos dados de RMN de ^{13}C e ^1H para as estruturas candidatas 7a-7d após assinalar os dados experimentais.	107
Tabela 9 - Análise de DP4 dos dados de RMN de ^{13}C e ^1H para as estruturas candidatas 8a-8c antes de assinalar os dados experimentais.	111
Tabela 10 - Dados de RMN para o composto 8b : Deslocamento químico experimental (δ), multiplicidade (m), constantes de acoplamento (J), correlações HMBC.	122
Tabela 11 - Análise de DP4 dos dados de RMN de ^{13}C e ^1H para as estruturas candidatas 8a-8c após assinalar os dados experimentais.	123
Tabela 12 - Dados de RMN experimental e calculado para as estruturas candidatas 3a-3d para análise de MAE.....	139
Tabela 13 - Dados de RMN experimental e calculado para as estruturas candidatas 3e-3h para análise de MAE	140
Tabela 14 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 3a	141
Tabela 15 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 3b	142
Tabela 16 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 3c	143
Tabela 17 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 3d	144
Tabela 18 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 3e	145

Tabela 19 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 3f .	146
Tabela 20 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 3g .	147
Tabela 21 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 3h .	148
Tabela 22 - Coeficiente linear e angular resultante da regressão linear ^a realizada com os deslocamentos químicos calculados de ¹ H e ¹³ C das estruturas candidatas 6a-6h .	149
Tabela 23 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 6a .	150
Tabela 24 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 6b .	151
Tabela 25 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 6c .	152
Tabela 26 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 6d .	153
Tabela 27 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 6e .	154
Tabela 28 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 6f .	155
Tabela 29 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 6g .	156
Tabela 30 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 6h .	157
Tabela 31 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 7a .	158
Tabela 32 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 7b .	159
Tabela 33 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 7c .	160
Tabela 34 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 7d .	161
Tabela 35 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 8a .	162
Tabela 36 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 8b .	163
Tabela 37 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de 8c .	164

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Reação de Diels-Alder entre a lactona **1** e o ciclopentadieno **2**. Estruturas candidatas **3a-3h**. Entre colchetes é apresentada a estrutura candidata correta (**3d**).35

LISTA DE ABREVIATURAS

AO	Orbital Atômico (Atomic Orbital)
ATR	Reflectância Total Atenuada (Attenuated Total Reflectance)
CCD	Cromatografia Em Camada Delgada
CMAE	Erro Absoluto Médio Corrigido (Corrected Mean Absolute Error)
COSY	Espectroscopia de Correlação (Correlation Spectroscopy)
d	Dupleto
ddd	Duplo Duplo Dupleto
DEPT	Intensificação sem Distorção por Transferência de Polarização (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
DEPTQ	Intensificação sem Distorção por Transferência de Polarização com Retenção de Quaternários (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer With Retention Of Quaternaries)
DFT	Teoria do Funcional de Densidade (Density Functional Theory)
dq	Duplo Quarteto
GGA	Aproximação Generalizada de Gradientes (Generalized Gradient Approximation)
GTO	Orbitais do Tipo Gaussiano (Gaussian-Type Orbitals)
HETCOR	Correlação Heteronuclear (Heteronuclear Correlation)
HF	Hartree-Fock
HMBC	Correlação Heteronuclear a Múltiplas Ligações (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HSQC	Correlação Heteronuclear de Quantum Único (Heteronuclear Single Quantum Correlation)
Hz	Hertz
IEFPCM	Modelo Contínuo Polarizável com Formalismo de Equações Integrais (Integrated Equation Formalism Polarized Continuum Model)
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de Acoplamento Escalar

LCAD	Combinação Linear de Orbitais Atômicos (Linear Combination Of Atomic Orbitals)
LDA	Local Density Approximation
m/z	Razão Massa/Carga
MAE	Erro Absoluto Médio (Mean Absolute Error)
MO	Orbital Molecular (Molecular Orbital)
NOESY	Espectroscopia de Efeito Nuclear Overhauser (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)
ppm	Deslocamento Químico em Partes Por Milhão
R ²	Coeficiente de Correlação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
STO	Orbitais do Tipo Slater (Slater-Type Orbitals)
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Espectroscopia de Correlação Total (Total Correlation Spectroscopy)
UV/VIS	Ultravioleta Visível
VCD	Dicroísmo Circular Vibracional (Vibrational Circular Dichroism)
α	Desvio Padrão
δ	Deslocamento Químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 Identificação de moléculas orgânicas	18
1.2 A química computacional como ferramenta	22
1.2.1 O método Hartree-Fock	24
1.2.2 O método DFT	26
1.2.3 Os métodos semiempíricos	28
1.3 Métodos estatísticos	28
1.4 Justificativa e relevância	30
2 CAPÍTULO I: Síntese e elucidação estrutural de análogo da fitalida utilizando análise de RMN e cálculos de DFT	31
2.1 Introdução	31
2.2 Materiais e métodos	33
2.2.1 Síntese	33
2.2.2 Instrumentação	33
2.2.3 Parte computacional	34
2.3 Dados para o composto 3a	35
2.4 Resultados e discussão	35
2.5 Conclusão	56
3 CAPÍTULO II: Elucidação estrutural de um novo alcaloide pirrolizidínico isolado da <i>Crotalaria retusa</i> L.	57
3.1 Introdução	57
3.2 Materiais e métodos	59
3.2.1 Material vegetal	59
3.2.2 Extração e isolamento	59
3.2.3 Instrumentação	60
3.2.4 Parte computacional	60
3.3 Dados para o composto 6h	61
3.4 Resultados e discussão	61
3.5 Conclusão	74

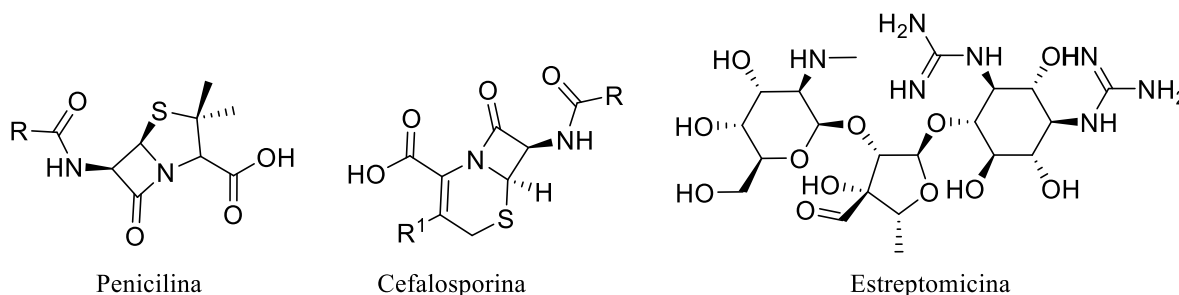
4 CAPÍTULO III: Elucidação estrutural por RMN assistido por cálculos de DFT de um novo produto natural da <i>Conchocarpus mastigophorus</i> (Rutaceae)	76
4.1 Introdução	76
4.2 Materiais e métodos	80
4.2.1 Material vegetal	80
4.2.2 Extração e isolamento	80
4.2.3 Instrumentação	81
4.2.4 Parte computacional	82
4.3 Dados para o composto 7a	83
4.4 Dados para o composto 8b	83
4.5 Resultados e discussão	83
4.5.1 Elucidação estrutural do composto 7a	84
4.5.2 Elucidação estrutural do composto 8b	108
4.6 Conclusão	123
5 CONCLUSÃO	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
APÊNDICES	138

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Identificação de moléculas orgânicas

Muitos grupos de pesquisa ao redor do mundo se empenham na busca por novas moléculas bioativas, a serem aplicadas tanto na área da medicina quanto na da agronomia. Nesse sentido, uma expressiva parte da síntese de novos fármacos e agroquímicos está amparada nos produtos naturais, seja para a sua utilização direta, seja pelo seu uso como base de inspiração para derivados com maior bioatividade. Um dos primeiros exemplos de sucesso dessa estratégia foi a síntese do ácido acetilsalicílico, em 1887, realizada por Felix Hoffmann, posteriormente comercializada como Aspirina, pela Bayer, em 1889 (BIANCONI *et al.*, 2020; MONTINARI; MINELLI; DE CATERINA, 2019). Também podemos citar os antibióticos mais utilizados no mundo - penicilina, estreptomicina e cefalosporina (**Figura 1**, página 18) - como produtos naturais que hoje são sintetizados em larga escala pela indústria farmacêutica (LU *et al.*, 2016).

Figura 1 - Moléculas de alguns antibióticos utilizados na medicina



Fonte: O autor.

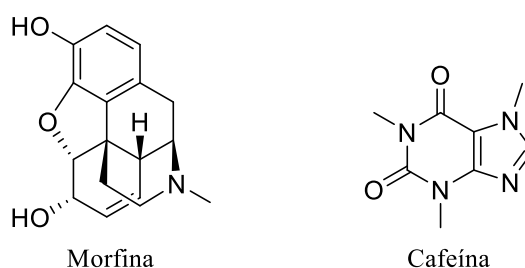
Após 1980, o número de produtos naturais que inspiraram novos fármacos ou defensivos agrícolas foi maior do que em qualquer outro período da história (NEWMAN; CRAGG, 2012), demonstrando, assim, como a natureza continua sendo a principal fonte de referência para os químicos.

Atualmente, pós à pandemia de SARS-CoV-2 que assolou o mundo, a pesquisa de moléculas, de origem natural ou sintética, capazes de combater esse coronavírus, tem demonstrado um empenho sem precedentes por parte da comunidade científica (ANTONIO; WIEDEMANN; VEIGA-JUNIOR, 2020; FAROOQ; NGAINI, 2021; GHOSH *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2021; LIMA; BRITO; DA CRUZ NIZER, 2020; NARKHEDE *et al.*, 2020; ROVIELLO; ROVIELLO, 2021; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2021; WILLIAMSON; KERIMI, 2020). Nesse contexto, o Brasil, enquanto país com a maior biodiversidade no mundo (CALIXTO, 2019), possui uma oportunidade ímpar para contribuir com o desenvolvimento de

novos produtos naturais para o combate ao SARS-CoV-2 ou a outras doenças (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Apesar de o isolamento de produtos naturais pela ciência moderna já acontecer desde o século XIX – como a morfina, descoberta em 1806 por Friedrich Serturner, ou a cafeína, em 1820, por Runge (CALIXTO, 2019) (**Figura 2**, página 19)– ainda há casos de moléculas oriundas da natureza, as quais tornam morosos os processos de isolamento, de purificação e de caracterização da estrutura molecular, mesmo utilizando os recursos disponíveis do século XXI. Os dois principais fatores determinantes dessa dificuldade podem ser apontados como: a pouca quantidade de amostra pura disponível para a análise e a complexidade estrutural, devido à presença de muitos centros quirais ou do grande número de átomos na molécula. Técnicas como a espectroscopia de infravermelho (IV) e a espectrometria de massas fornecem informações úteis, mas que sozinhas não são suficientes para resolverem problemas complexos como esse, enquanto a difração de raios X é extremamente eficaz para tais casos, porém a obtenção de cristais de produtos naturais para a sua utilização nem sempre é uma realidade. Uma alternativa para contornar as limitações das técnicas anteriores, em alguns cenários, é o emprego da espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN), uma vez que possui um saudável balanço entre o custo operacional, robustez dos resultados e facilidade de utilização. Essa técnica fornece três dados básicos: deslocamento químico (δ), constante de acoplamento (J) e a intensidade relativa do sinal integrado (WILLOUGHBY; JANSMA; HOYE, 2014). Entretanto, mesmo em face da robustez fornecida pelos aparelhos modernos de RMN de alta resolução, complementados por outras técnicas de análise, ainda existem contextos de moléculas complexas, como de alguns produtos naturais, em que os dados não são conclusivos e levam a atribuições erradas nos sinais no espectro de RMN.

Figura 2 - Estrutura molecular da morfina e cafeína

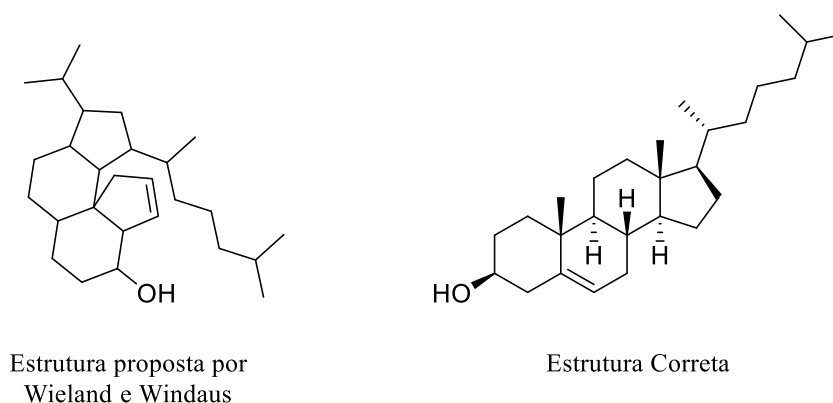


Fonte: O autor.

Para solucionar esses casos, classicamente, havia duas estratégias: difração de raios X ou síntese total. A difração de raios X, ainda que forneça a informação estrutural a nível atômico e seja considerada a técnica mais confiável para determinação estrutural molecular, não pode

ser utilizada nos casos em que não é possível obter um monocristal do produto natural (INOKUMA *et al.*, 2013). A síntese total foi o processo mais utilizado pelos químicos durante os séculos XIX até a metade do século XX para a elucidação de produtos naturais. Porém, ainda assim, é um processo extremamente custoso, o que, na maioria dos casos, inviabiliza a sua aplicação, além de estar sujeito a erros humanos de elucidação da estrutura (NICOLAOU; SNYDER, 2005). Um clássico exemplo é o da estrutura do colesterol, proposta em 1927, pelos ganhadores do Nobel de química, Wieland e Windaus (**Figura 3**, página 20), que basearam sua proposta de estrutura errônea na síntese total dessa molécula (LUNDE, 1930). Contudo, é importante ressaltar as inúmeras contribuições da síntese total na elucidação de produtos naturais, como para a quinina (WOODWARD; DOERING, 1945) e hemina (FISCHER; ZEILE, 1929).

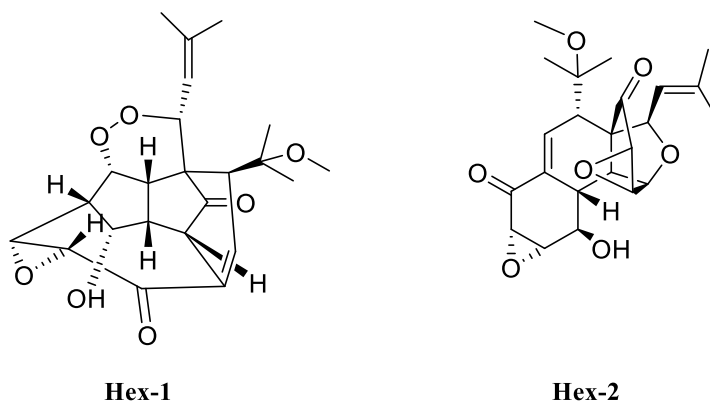
Figura 3 - Estrutura proposta para o colesterol por Wieland e Windaus *versus* a estrutura correta do colesterol.



Fonte: O autor.

A literatura relata que exemplos nos quais a análise da síntese total comparada à análise do produto natural não foi capaz de solucionar o problema, como no caso do hexaciclíno. Esse composto foi isolado do cogumelo *Panus rudis* e sua estrutura foi proposta por Schlege e colaboradores (**Figura 4**, Hex-1, página 21) (2002). Com base no trabalho de Schlege, Clair (2006) realizou a síntese total da estrutura proposta do hexaciclíno, todavia, os dados do espectro de RMN obtidos por Clair não coincidem com os dados do produto isolado por Schlege. Foi, então, necessário um estudo de química computacional para elucidar, com base nos dados de RMN de Schlege, qual era a real estrutura isolada. Rychnovsky (2006) realizou um estudo de mecânica quântica computacional de deslocamentos químicos de ^{13}C e propôs uma nova estrutura para o hexaciclíno (**Figura 4**, Hex-2, página 21), que, posteriormente, foi confirmada por outros estudos (PORCO *et al.*, 2006; SAIELLI; BAGNO, 2009).

Figura 4 - Hexaciclínol e suas estruturas propostas.



Fonte: O autor.

Logo, a partir desse significativo exemplo, pode-se depreender como o desenvolvimento da informática expandiu as fronteiras da ciência, especialmente da química orgânica. Portanto, o melhoramento dos recursos computacionais, tanto em hardware quanto em software, difundiu e facilitou o uso de computadores na pesquisa científica. Programas voltados para a ciência – como ACD/Labs, ChemBioDraw, MestreNova, Gaussian, Origin, Avogadro e Spartan – têm acelerado a pesquisa em todo mundo (WILLOUGHBY; JANSMA; HOYE, 2014). Dessa maneira, nota-se como a química computacional possui um importante papel nesse contexto e pode ser usada para tratar diversos problemas, como: geometria molecular; energia de estados de transição de moléculas; reatividade química; interação entre substrato e enzima; cálculo de espectros de Infravermelho, Ultravioleta Visível (UV/VIS), RMN; dentre outros (LEWARS, 2011).

Nesse ínterim, casos na ciência, como o hexaciclínol, demonstram como a química de produtos naturais e a síntese orgânica podem ser beneficiadas pelas ferramentas da química computacional, sobretudo daquelas que utilizam dados de RMN (GRIMBLAT; SAROTTI, 2016). Em tais ferramentas, o deslocamento químico é o dado mais importante para que essas sejam utilizadas. Apesar de softwares bem difundidos, como o ACD/Labs e ChemDraw, oferecerem ferramentas de fácil utilização para elucidação de moléculas orgânicas via dados de RMN, tais softwares baseiam-se em bancos de dados empíricos e, para casos mais complexos, não são capazes de suprir a necessidade do pesquisador. Desse modo, nem mesmo o programa Mestre Nova (amplamente empregado para tratamento de espectros de RMN), utilizando um método mais robusto do que o visto no ACD/Labs e ChemDraw, é suficiente na elucidação de moléculas mais complexas (WILLOUGHBY; JANSMA; HOYE, 2014).

1.2 A química computacional como ferramenta

Em 1925, a **equação de Schrödinger** marca o início de um novo tempo na ciência: a era da Mecânica Quântica. A partir de sua utilização, é possível determinar a função de onda de um sistema (seja um átomo, uma molécula ou até mesmo uma enzima), a qual contém toda a informação necessária para descrever seu estado. Entretanto, essa equação só pode ser resolvida de forma exata para sistemas como o de uma partícula livre ou de átomos hidrogenóides, pois, para cada N partículas, é necessário $3N$ coordenadas para resolver a equação (MARQUES; BOTTI, 2006). Até com os supercomputadores da atualidade, é praticamente impossível resolver a equação de Schrödinger sem lançar mão de aproximações, tanto devido ao elevado tempo gasto para os cálculos quanto ao custo para armazenar os resultados. A título de exemplo, Marques e Botti (2006) relatam que Walter Kohn, ganhador do prêmio Nobel de Química, em 1998 (FREITAS, 1999), responsável pela **teoria do Funcional de Densidade** (DFT do inglês *Density Functional Theory*), ilustrava que, para armazenar os dados do resultado da equação de Schrödinger para um único átomo de nitrogênio, seria necessária uma unidade de armazenamento com 75,2 zetabytes, o que equivale a utilizar $1,6 \times 10^{13}$ unidades de DVD. Como informação adicional, segundo projeções da empresa International Data Group (IDG), até o ano de 2018, é estimado que todos os dados já gerados pela humanidade seriam de 33 zetabytes, ou seja, menos da metade do espaço previsto para armazenar os resultados da equação de Schrödinger para um átomo de nitrogênio.

A busca por estratégias para contornar tais limitações tecnológicas para a resolução exata da equação de Schrödinger levou os físicos a pensarem de formas criativas, propondo métodos que levam à resolução aproximada da equação de Schrödinger, mas com excelentes resultados para aplicações práticas. Essas metodologias, aliadas ao crescente aumento de poder computacional, viabilizaram a popularização da química computacional, de modo que hoje ela é utilizada em conjunto a outras grandes áreas da química, especialmente, a química orgânica. Para compreendermos melhor como essas metodologias funcionam, precisamos primeiro entender a equação Schrödinger.

A equação de Schrödinger não dependente do tempo pode ser descrita pela equação 1, na qual \hat{H} é o operador Hamiltoniano, Ψ é a função de onda, R_N é posição do núcleo N e r_n a posição do elétron n (BACHRACH, 2014).

$$\hat{H}\Psi(R_1, R_2 \dots R_N, r_1, r_2 \dots r_n) = E\Psi(R_1, R_2 \dots R_N, r_1, r_2 \dots r_n) \quad (1)$$

O operador Hamiltoniano não-relativístico (\hat{H}), para uma molécula contendo n elétrons e N núcleos, é descrita pela equação 2. Ele é composto por uma parte que descreve a energia cinética (termos 1 e 2) e por outra que descreve a energia potencial (termos 3, 4 e 5). Os cinco termos dessa equação podem ser descritos, da esquerda para a direita, como: energia cinética dos núcleos; energia cinética dos elétrons; atração núcleo-elétron; repulsão núcleo-núcleo; repulsão elétron-elétron.

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_I^N \frac{\nabla_I^2}{m_I} - \frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_i^n \nabla_i^2 - \sum_I^N \sum_i^n \frac{Z_I e'^2}{r_{Ii}} + \sum_{I<J}^N \frac{Z_I Z_J e'^2}{r_{IJ}} + \sum_i^n \frac{e'^2}{r_{ij}} \quad (2)$$

Born e Oppenheimer propuseram a primeira aproximação para simplificar a resolução da equação de Schrödinger não-relativística (TOMEČEK; BOUŘ, 2020). A função de onda molecular completa $\Psi(R, r)$ depende da posição de todos os elétrons e núcleos ao mesmo tempo. Como os elétrons são muito mais leves do que os núcleos, eles se movimentam tão rapidamente que podemos considerar que eles respondem instantaneamente a qualquer alteração na posição relativa dos núcleos. Isso permite a separação das variáveis nucleares das variáveis eletrônicas, de modo que podemos rescrever $\Psi(R, r)$ como duas funções de onda: $\psi(r)$ responsável pela parte eletrônica e $\Phi(R)$ responsável pela parte nuclear (equação 3).

$$\Psi(R_1, R_2 \dots R_N, r_1, r_2 \dots r_n) = \Phi(R_1, R_2 \dots R_N) \psi(r_1, r_2 \dots r_n) \quad (3)$$

Fazendo essa separação entre as funções de onda $\psi(r)$ e $\Phi(R)$, podemos considerar que as posições de todos os núcleos são fixas e, então, resolver o operador Hamiltoniano apenas para a função de onda da parte eletrônica. Essa aproximação, conhecida como **aproximação de Born-Oppenheimer**, é válida para a grande maioria das moléculas orgânicas. O operador Hamiltoniano, obtido por essa aproximação, é mais simples do que aquele obtido inicialmente na equação de Schrödinger não-relativística (equação 2). Nesse operador, demonstrado na equação 4, encontramos os termos (da direita para esquerda): energia cinética dos elétrons; atração núcleo-elétron; repulsão elétron-elétron; energia de repulsão núcleo-núcleo.

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_i^n \nabla_i^2 - \sum_I^N \sum_i^n \frac{Z_I}{r_{Ii}} + \sum_{i<j}^n \frac{1}{r_{ij}} + V^{\text{nuc}} \quad (4)$$

O operador Hamiltoniano, descrito na equação 4, é o operador utilizado pela química computacional (BACHRACH, 2014). Com base na aproximação de Born-Oppenheimer, foram desenvolvidos outros métodos para chegar a uma solução aproximada da equação de Schrödinger, sendo dois deles muito utilizados na química computacional: método Hartree

Fock (HF) e a DFT. Como um dos objetivos desse trabalho é utilizar (e não desenvolver) a química computacional como ferramenta a química orgânica, vamos explorar alguns pontos do método HF e a DFT.

1.2.1 O método Hartree-Fock

A função de onda $\psi(r)$ depende das coordenadas de todos os elétrons em uma molécula. O pesquisador Hartree propôs, baseado nas ideias da aproximação de Born-Oppenheimer, que a função de onda eletrônica poderia ser separada em um produto de funções $\phi(n)$ que depende apenas de um elétron (equação 5) (BACHRACH, 2014).

$$\Psi(r_1, r_2 \dots r_n) = \phi_1(r_1)\phi_2(r_2) \dots \phi_n(r_n) \quad (5)$$

Essa função de onda poderia resolver a equação de Schrödinger de forma exata, caso não fosse necessário levar em conta a repulsão elétron-elétron. Para contornar esse problema, Hartree reescreveu o Hamiltoniano de forma a considerar a repulsão que um elétron sente pela média da posição dos demais elétrons do sistema. Dessa forma, o termo da repulsão elétron-elétron foi substituído por um campo efetivo, sendo o termo denominado V_i^{eff} (equação 6). Remover o termo da repulsão elétron-elétron e substituí-lo pelo campo efetivo (V_i^{eff}) no Hamiltoniano é uma aproximação perigosa, pois isso negligencia a habilidade dos elétrons de responder de forma instantânea a mudança de posição de outros elétrons. Fock, em seguida, adequou a metodologia proposta do Hartree para satisfazer o princípio da exclusão de Pauli.

$$\left(-\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_l^N \frac{Z_l}{r_{li}} + V_i^{\text{eff}}\right)\phi_i = E_i\phi_i \quad (6)$$

Para utilizar o Hamiltoniano de HF, precisamos descrever os conjuntos de funções $\phi(n)$. O **princípio variacional** afirma que qualquer função de onda construída como uma combinação linear de funções ortonormais terá a sua energia maior ou igual a energia fundamental do sistema. Se um conjunto de funções ϕ_i é infinito, então, a função de onda resultará na menor energia para aquele Hamiltoniano. Como é impossível trabalharmos com um número infinito de funções, o princípio variacional nos indica que quanto menor a energia encontrada, melhor é a função de onda utilizada. É importante ressaltar que o princípio variacional não é uma aproximação para a equação de Schrödinger. Tendo o conceito do princípio variacional em mente, podemos entender as funções $\phi(n)$, utilizadas no método HF, como Orbitais Moleculares (MO, do inglês *Molecular Orbital*), logo, podemos tratar os MOs como uma combinação linear dos Orbitais Atômicos (AO, do inglês *Atomic Orbital*). Essa combinação dos AOs para formar

MOs é chamada de combinação linear de orbitais atômicos (LCAD, do inglês *Linear Combination Of Atomic Orbitals*) (BACHRACH, 2014).

Para se obter a energia proveniente da função de onda utilizando o método HF, é necessário especificar os AOs utilizados. Os AOs utilizados não são literalmente os AOs presente nos átomos do sistema que está a ser estudado, mas sim “orbitais atômicos artificiais” ou ainda “modelos de orbitais atômicos”, que são denominados como **funções de bases** (do inglês *basis function*). As funções de base para um dado orbital representam todos os orbitais daquele tipo para uma determinada camada eletrônica. Por exemplo, as funções de bases p referem-se às funções para os orbitais p_x , p_y e p_z , simultaneamente, logo, correspondem a três orbitais atômicos. As funções de bases são utilizadas para gerar os orbitais moleculares, que, posteriormente, são utilizados no cálculo computacional. Um grupo de funções de bases recebe o nome de **conjunto de bases** (do inglês *basis sets*). Há dois principais tipos de funções de bases: Orbitais do tipo Slater (STO, do inglês *Slater-Type Orbitals*) e Orbitais do tipo Gaussiano (GTO, do inglês *Gaussian-Type Orbitals*). Os STOs são uma mímica exata da equação de Schrödinger para um elétron, ou seja, para a resolução do átomo de hidrogênio, sendo assim, os STOs são muito similares aos orbitais do hidrogênio. Os STOs, além do elevado poder computacional necessário para sua utilização, podem levar a alguns erros quando são utilizados para modelar átomos de carbono, uma vez que os orbitais presentes nesses átomos não são exatamente iguais àqueles presentes no átomo de hidrogênio. Os GTOs são feitos com base em uma distribuição gaussiana. Os GTOs podem ser combinados por combinação linear de forma fácil e com baixo custo computacional (BACHRACH, 2014).

O uso de apenas um conjunto de base para o método HF não é suficiente para descrever o comportamento dos elétrons, sendo, normalmente, utilizados dois ou até três conjuntos de bases. Há inúmeros conjuntos de bases descritos na literatura, com aplicações específicas para os mais diversos tipos de moléculas. O pesquisador Pople se destaca nessa área, pois foi responsável por desenvolver muitos conjuntos de bases (DITCHFIELD; HEHRE; POPLÉ, 1971; HEHRE; DITCHFIELD; POPLÉ, 1972). A título de exemplo, podemos citar os conjuntos de bases 6-31G (utilização geral), 6-31G(2df,2p) (utilizado em sistemas cíclicos muito tensionados) e 6-31+G (utilizado em ânions ou moléculas com pares de elétrons não ligantes).

O método HF pertence ao grupo dos métodos *ab initio*, assim como outros métodos menos utilizados como MP2 (teoria de perturbação de Møller–Plesset de segunda ordem) e G2 (modelo Gaussiano-2). Apesar das aproximações utilizadas na elaboração da metodologia, o método HF é capaz de alcançar resultados de excelente exatidão, porém, devido ao seu elevado

custo computacional, ele é indicado apenas para sistemas pequenos (como pequenas moléculas orgânicas).

1.2.2 O método DFT

A teoria do Funcional de Densidade (DFT) foi desenvolvida em 1964 por Walter Kohn e Pierre Hohenberg (HOHENBERG; KOHN, 1964). Eles propuseram utilizar a densidade eletrônica ($\rho(\mathbf{r})$) para resolver a equação de Schrödinger. A grande vantagem dessa abordagem é que a densidade eletrônica é uma variável observável física que depende apenas das coordenadas X, Y e Z e ainda contém toda a informação relevante sobre o sistema. De forma resumida, ao conhecer a densidade eletrônica de um sistema, é possível prever todas as propriedades daquele sistema (MARQUES; BOTTI, 2006). Com fins comparativos, um único DVD seria capaz de conter toda a informação necessária para descrever um átomo utilizando o método DFT. Para demonstrar que a densidade eletrônica contém toda a informação do sistema que pode ser obtida pela função de onda, Hohenberg e Kohn propuseram dois teoremas:

Teorema 1: a energia fundamental E_0 é um **funcional** único da densidade eletrônica. Em outras palavras, o potencial externo que é sentido pelos elétrons é uma função exclusiva da densidade eletrônica.

Teorema 2: a energia no estado fundamental $E_0(\rho^0)$ será a mínima para a densidade eletrônica $\rho_0(\mathbf{r})$. Isso atende ao princípio variacional.

Em 1965, Lu Sham, juntamente com Walter Kohn, propôs que o funcional da densidade eletrônica poderia ser escrito como a equação 7 (KOHN; SHAM, 1965). Os termos dessa equação, da esquerda para a direita, são: energia cinética dos elétrons não interagentes; atração núcleo-elétron; repulsão elétron-elétron; funcional de troca e correlação.

$$E[\rho(\mathbf{r})] = T_{e'}[\rho(\mathbf{r})] + V_{ne}[\rho(\mathbf{r})] + V_{ee}[\rho(\mathbf{r})] + E_{xc}[\rho(\mathbf{r})] \quad (7)$$

O termo para o funcional de troca e correlação (E_{xc}) corresponde à junção de todos os termos quânticos que não sabemos como expressar exatamente através do funcional de densidade eletrônica. Como não temos ciência de qual o valor exato do termo E_{xc} , precisamos utilizar **funcionais** que se aproximem desse valor. Os funcionais são aproximações desenvolvidas para substituir o funcional de troca e correlação (E_{xc}). A aproximação mais simples para E_{xc} é a aproximação de densidade local (LDA, do inglês *Local Density Approximation*), proposta por Sham e Kohn, em seu artigo de 1965 (KOHN; SHAM, 1965). A LDA está baseada no paradigma do gás homogêneo de elétrons, um sistema idealizado no qual

os núcleos atômicos são substituídos por uma carga positiva contínua e constante. Ao optar por essa aproximação, os cálculos tornam-se impraticáveis de serem realizados à mão, porém plenamente executáveis em um computador. Além da LDA, outra aproximação comum utilizada, sobretudo no estudo de sólidos, é a aproximação generalizada de gradientes (GGA, do inglês *Generalized Gradient Approximation*) (MARQUES; BOTTI, 2006). Um dos funcionais mais conhecidos e utilizados na química orgânica é o B3LYP (WANG; BRUDVIG; BATISTA, 2010). O “B” refere-se ao termo de troca proposto por Becke e “LYP” ao termo de correlação proposto por Lee, Yang e Parr (BECKE, 1993a, 1993b). Além da B3LYP, há inúmeros outros funcionais, como o M06-2X, mPW1PW91 e CAMB3LYP (KRIVDIN, 2019a).

Os funcionais são utilizados juntamente com os conjuntos de base para a realização do método DFT. Os conjuntos de base utilizados no método HF, como o 6-31G, podem ser empregados com os funcionais da DFT. Para descrever o nível de teoria utilizado na DFT, primeiro se escreve o funcional seguido do conjunto de base escolhido, como B3LYP/6-31G.

A DFT normalmente é empregada para sistemas de 30 a 60 átomos e pode ser utilizada com moléculas que possuem átomos além da segunda linha da tabela periódica. Em especial, a DFT é amplamente aplicada na química orgânica para a obtenção de espectros calculados (ou espectros teóricos) de RMN de moléculas de árdua elucidação. A partir dos mesmos recursos computacionais, o método DFT é capaz de obter os resultados desejados em um tempo menor do que o método HF. A diferença chave entre as metodologias HF e DFT é que a última não contém aproximações em sua teoria (BACHRACH, 2014). Tudo que precisamos na DFT é encontrar a densidade eletrônica para obter toda a informação do sistema, entretanto, Kohn e Hohenberg apenas provaram que o funcional da densidade deve existir, porém não indicaram como seria esse funcional. Como consequência, grande parte da pesquisa desenvolvida para aprimorar a DFT está baseada em encontrar funcionais (como o B3LYP) que se aproximem do funcional da densidade real do sistema. Segundo o autor Christopher J. Cramer (2002), o método HF é uma teoria aproximada, que foi desenvolvida para resolver equações de forma exata, enquanto a DFT é uma teoria exata, mas as suas equações devem ser resolvidas de forma aproximada, pois não conhecemos o funcional de troca e correlação (E_{xc}).

1.2.3 Os métodos semiempíricos

Métodos semiempíricos são configurados com a mesma estrutura geral de um cálculo utilizando o método HF. Nessas metodologias, algumas informações são aproximadas ou omitidas completamente. Os parâmetros empregados para estimar os valores omitidos são provenientes de dados empíricos de experimentos realizados *a priori* ou de cálculos *ab initio* já conhecidos. Estes métodos utilizam menos recursos computacionais quando comparados com os métodos DFT e HF, mas seus resultados são menos confiáveis e retornam menos dados referentes às propriedades físico-químicas do sistema que está sendo analisado. Se o banco de dados utilizado para alimentar o método semiempírico possuir um número expressivo de moléculas similares à molécula que está sendo estudada, o resultado pode retornar valores satisfatórios. Programas químicos simples – como Avogadro, ACD/Labs e ChemBioDraw – lançam mão métodos semiempíricos para fornecer algumas informações físico-químicas para a molécula alvo. Alguns métodos semiempíricos são MSINDO, MNDO, AM1 e PM3 (BRANDENBURG *et al.*, 2014; KASZA *et al.*, 2019; WILLOUGHBY; JANSMA; HOYE, 2014).

1.3 Métodos estatísticos

No contexto da química orgânica, os cálculos computacionais são de grande valia para a identificação de produtos naturais e novas moléculas sintéticas. Todavia, os resultados dos cálculos de DFT, por si só, não são suficientes para dizer se a metodologia aplicada foi correta para o sistema que está sendo analisado. Como qualquer ferramenta desenvolvida e utilizada pelo homem, os cálculos computacionais de DFT são passíveis de erros – no código fonte do programa, na escolha do funcional, na interpretação dos resultados ou até por falhas aleatórias do próprio sistema operacional (BHANDARI NEUPANE *et al.*, 2019). Para garantir que os dados resultantes dos cálculos de DFT estejam em concordância com os dados experimentais, é essencial o uso de métodos de análises estatísticas. Ao avaliar os resultados dos cálculos de DFT, é ideal que sejam utilizados múltiplos métodos de análises estatísticas e que seus resultados sejam convergentes em relação à qualidade do ajuste (do inglês *goodness-of-fit*) dos dados. Para esse trabalho, é necessário métodos estatísticos de análises capazes de avaliar a concordância dos deslocamentos químicos experimentais de RMN com deslocamentos químicos calculados obtidos por meio de cálculos de DFT.

O primeiro conjunto de análises estatísticas à disposição é o de métodos de parâmetros de correlação de simples aplicação, por exemplo, o erro absoluto médio (MAE, do inglês *Mean*

Absolute Error), erro absoluto médio corrigido (CMAE, do inglês *Corrected Mean Absolute Error*), coeficiente de correlação (R^2) e o desvio padrão (α). R^2 e α não são tão utilizados atualmente, por serem métodos mais simples que, em geral, não são suficientes para o tratamento dos dados de moléculas mais complexas. O MAE e CMAE são amplamente utilizados para avaliar quantitativamente a qualidade do ajuste entre os dados experimentais e teóricos (WILLOUGHBY; JANSMA; HOYE, 2014), de modo que quanto menor os valores obtidos a partir do MAE ou CMAE, melhor a qualidade do ajuste dos dados. O MAE representa o desvio médio entre os valores de deslocamentos químicos calculados (δ_{calc}) e experimentais (δ_{exp}) e é calculado pela média do somatório do valor absoluto da diferença entre os deslocamentos químicos calculados e experimentais, conforme a equação 8 (COSTA *et al.*, 2021).

$$MAE = \frac{\sum_n |\delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{exp}}|}{n} \quad (8)$$

A equação de CMAE é muito similar à de MAE, sendo a substituição dos deslocamentos químicos calculados (δ_{calc}) pelos escalonados (δ_{scaled}) a única diferença, conforme a equação 9. O CMAE é utilizado para remover possíveis erros sistemáticos dos deslocamentos químicos calculados (SAROTTI, 2013).

$$CMAE = \frac{\sum_n |\delta_{\text{scaled}} - \delta_{\text{exp}}|}{n} \quad (9)$$

O segundo conjunto de análises estatísticas é utilizado quando os deslocamentos químicos calculados para dois ou mais diastereoisômeros candidatos são tão similares entre si e aos deslocamentos químicos experimentais que é impossível, pelos métodos estatísticos mais simples (MAE, CMAE, R^2 e α), assinalar com exatidão os sinais do espectro de RMN com os respectivos átomos. Esses métodos são mais robustos e requerem o uso do computador para a sua utilização de forma efetiva. Nesse sentido, podemos nomear CP3, DP4 e ANN-PRA como os três principais métodos e, quanto maior o valor resultante dessas análises estáticas, melhor é a qualidade do ajuste. O método CP3, desenvolvido por Smith e Goodman (2009), compara dois conjuntos de dados experimentais com duas (ou mais) estruturas candidatas, de modo a identificar qual conjunto de dados experimentais está relacionado a qual estrutura candidata. Esse método é de grande utilidade na síntese orgânica, pois é comum uma reação química produzir dois (ou mais) diastereoisômeros que não podem ser facilmente identificados pela análise de RMN. O DP4, desenvolvido por Smith e Goodman (2010), compara um conjunto de dados experimentais com duas ou mais estruturas candidatas e é muito utilizado quando um novo produto natural é isolado e é preciso fazer a elucidação da estrutura molecular. Também

é o mais empregado na identificação de novos compostos orgânicos, recebendo otimizações ao longo dos anos (ERMANIS *et al.*, 2016, 2019), como também levando a outras metodologias inspiradas em seu conceito original, como o DP4+ (GRIMBLAT; ZANARDI; SAROTTI, 2015; ZANARDI; SAROTTI, 2021), DP4-AI (HOWARTH; ERMANIS; GOODMAN, 2020) e o DP5 (HOWARTH; GOODMAN, 2022). Por fim, a ANN-PRA, desenvolvida por Sarotti (2013), compara um conjunto de dados experimentais a uma estrutura candidata, de modo a indicar se aquela estrutura corresponde aos dados experimentais. Enquanto o CP3 e o DP4 são metodologias baseadas em comparações, que necessitam obrigatoriamente que a estrutura real da molécula, que está sendo analisada, esteja dentro das estruturas candidatas para gerar o resultado correto, a ANN-PRA funciona independente da estrutura real ser ou não a estrutura candidata (GRIMBLAT; SAROTTI, 2016).

1.4 Justificativa e relevância

Em uma sociedade que almeja, cada vez mais, uma melhor qualidade de vida, suprir a demanda de novos medicamentos e de produtos para aumentar a produtividade agrícola tem sido uma meta recorrente para a química orgânica. Nesse viés, pesquisas sobre novos produtos naturais têm sido desenvolvidas e, à medida que são isolados e sua estrutura molecular é elucidada, levam-nos a uma maior compreensão de suas propriedades físico-químicas e aplicações, que podem atender a tais demandas. Os cálculos de DFT aliados à espectroscopia de RMN têm se destacado nesse contexto do século XXI, sendo responsáveis pela elucidação de muitas moléculas complexas (BAGNO; SAIELLI, 2015; MÁNDI; WU; KURTÁN, 2020; MURUGAVEL *et al.*, 2019).

Considerando a relevância da identificação de novas moléculas orgânicas, o presente trabalho tem como objetivo elucidar a estrutura de produtos naturais e moléculas sintéticas inéditas, mediante o uso, em conjunto, de espectros de RMN e cálculos de DP4, suportado por outras técnicas úteis para a identificação de compostos. Dessa maneira, os capítulos I, II e III tratam de trabalhos já publicados desta pesquisa. O capítulo I (PINTO; TEIXEIRA; ALVARENGA, 2020) aborda a aplicação de cálculos computacionais para elucidação de uma molécula sintética. O capítulo II (PINTO *et al.*, 2022b) apresenta a elucidação de um produto natural inédito extraído da *Crotalaria retusa* L. O capítulo III (PINTO *et al.*, 2022a) aborda a elucidação de duas moléculas advindas de uma planta da flora brasileira, *Conchocarpus mastigophorus*, utilizando ainda cálculos de dicroísmo circular vibracional (VCD, do inglês *vibrational circular dichroism*) para complementar a análise.

2 CAPÍTULO I: Síntese e elucidação estrutural de análogo da ftalida utilizando análise de RMN e cálculos de DFT

2.1 Introdução

Nas últimas décadas, a qualidade de vida da humanidade aumentou de forma significativa devido aos avanços no campo da pesquisa científica. Uma boa parte disso se deve às descobertas de novos produtos químicos de origem natural, combinadas à síntese e modificação desses (RODRIGUES *et al.*, 2016). A necessidade de novos compostos químicos, com menor impacto ambiental e menor toxicidade, para o tratamento de doenças humanas e proteção das plantações, cresce a cada ano (BUSH *et al.*, 2011). Para superar esse desafio, os produtos naturais têm se tornado um excelente ponto de partida para a busca de novas drogas e agroquímicos. Um grupo de produtos naturais que desperta interesse de vários grupos de pesquisa nos últimos anos são as ftalidas (ou isobenzofuranonas) e seus derivados. As ftalidas podem ser encontradas na natureza como metabolitos secundários de várias espécies de fungos, plantas e, nos últimos anos, muitas pesquisas têm sido realizadas para melhorar nossa compreensão de suas propriedades físico-químicas e bioatividades, bem como na busca de rotas sintéticas para elas e suas derivadas (CHARRIS-MOLINA *et al.*, 2017; KARMAKAR; PAHARI; MAL, 2014).

Entre as estratégias de síntese para a obtenção de análogos das ftalidas, a reação de Diels-Alder é uma dos procedimentos mais úteis que os químicos possuem à sua disposição (FUNEL; ABELE, 2013). Ftalidas e outras moléculas complexas podem ser sintetizadas a partir da reação de Diels-Alder, uma vez que essa reação possibilita a formação de duas novas ligações σ e a formação de quatro centros estereogênicos em um única etapa, além de possibilitar ao químico o controle da estereoisomeria do produto final (FRINGUELLI; TATICCHI, 2002; SEGHERS *et al.*, 2017).

Após a síntese de uma nova molécula, é crucial realizarmos a caracterização e elucidação estrutural. Uma das ferramentas mais poderosas que os químicos orgânicos dispõem, nos dias de hoje, para a elucidação e confirmação da estrutura molecular, é a espectroscopia por ressonância magnética (RMN) (JAIN; BALLY; RABLEN, 2009). Infelizmente, a elucidação de uma molécula orgânica pode ser um trabalho árduo mesmo com o auxílio de experimentos sofisticados de RMN, a título de exemplo, quando a quantidade de massa disponível para a análise é limitada ou há sobreposição de muitos sinais (principalmente de ^1H) no espectro de RMN. Os avanços no campo da informática na última década, com computadores cada vez mais sofisticados e economicamente acessíveis, bem como os avanços na química computacional,

possibilitaram a produção de novas ferramentas aos químicos sintéticos para superar essas dificuldades impostas na elucidação da estrutura de novas moléculas complexas (XIN *et al.*, 2017). Dentre os vários métodos desenvolvidos pelas pesquisas na química quântica, os métodos oriundos da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) são os mais utilizados para a previsão de espectros de RMN de moléculas orgânicas (BAGNO; SAIELLI, 2015). Com a DFT, é possível calcular o deslocamento químico e as constantes de complemento para átomos de ^1H e ^{13}C utilizando poucos recursos e tempo, quando comparados com métodos computacionais mais clássicos como os *ab initio* (LEWARS, 2011). Os cálculos de DFT são vastamente empregados para a elucidação de produtos naturais, mas também podem ser empregados na confirmação estrutura de sínteses estereosseletiva de novas moléculas orgânicas (MORAES *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018; TEIXEIRA; ALVARENGA, 2016).

Para aplicarmos o método DFT para uma molécula não identificada, que está sendo estudada, primeiro um grupo de várias possíveis estruturas candidatas recebe um tratamento de otimização de sua geometria e energia e, em seguida, o deslocamento químico teórico de cada átomo (por exemplo ^1H e ^{13}C) é obtido, gerando uma série de espectros teóricos (ou espectros calculados) de RMN para cada estrutura candidata. Após esse processo, os espectros experimentais de RMN (normalmente ^1H e ^{13}C) da molécula não identificada são comparados, aplicando-se métodos estatísticos, com todos os espectros teóricos de RMN obtidos pelos cálculos de DFT. A avaliação desses resultados é feita mediante uma vasta diversidade de métodos estatísticos, tais como: o erro absoluto médio (do inglês, *mean absolute error*, MAE), erro absoluto médio corrigido (do inglês, *corrected mean absolute error*, CMAE) e ajuste linear (R^2), CP3 e DP4. Dentre todos os métodos mencionados, o parâmetro DP4, desenvolvido por Goodman e Smith (SMITH; GOODMAN, 2010), tem se tornado o mais utilizado e confiável, com avanços em sua metodologia feitos de forma constante ao longo dos anos (ERMANIS *et al.*, 2017; MACGREGOR *et al.*, 2016; SAROTTI, 2018). O DP4 é empregado quando há um conjunto de dados experimentais para duas (ou mais) estruturas candidatas, de modo que indicará qual é a estrutura candidata que melhor se adequa aos dados experimentais. Entretanto, se entre elas não houver a estrutura real da molécula não identificada, o DP4 fatalmente indicará uma estrutura candidata errada, mas que possuía a maior similaridade com os dados experimentais. Por essa razão, esse método deve ser utilizado com cautela para não gerar falsos positivos.

Portanto, esse capítulo abordará, de forma breve, a síntese de um derivado de ftalida (**3d**) por uma reação de Diels-Alder – realizada pela pesquisadora Milena Galdino Teixeira –, que ocorre duas vezes em uma única etapa, utilizando apenas o ciclopenta-1,3-dieno e 3,4-

dicloro-2(5H)-furanona como reagentes. Em seguida, será abordada, de forma aprofundada, a elucidação estrutural inequívoca dessa ftalida pela combinação de espectros de RMN e cálculos computacionais de DFT. Essa parte de elucidação da molécula da ftalida foi realizada pelo autor dessa tese.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Síntese

rac-(3*aR*,4*S*,4*aS*,5*R*,8*S*,8*aR*,9*R*,9*aS*)-3*a*,9*a*-dicloro-3*a*,4,4*a*,5,8,8*a*,9,9*a*-octaidro-4,9:5,8- dimetanonafto[2,3-*c*]furan-1(3*H*)-ona (**3d**)

3,4-diclorofuran-2(5*H*)-ona (**1**) (0,50 g, 3,3 mmol) e ciclopentadieno (2,02 g, 30,7 mmol) foram adicionados a um tubo selado. Em seguida, a mistura reacional resultante foi aquecida a 150 °C enquanto era agitada, por meio de um agitador magnético, por 44 horas. Após o término da reação, o excesso de ciclopentadieno foi evaporado e o produto da reação foi purificado por coluna cromatográfica (eluente: hexano/acetato de etila, 15:1 V/V), fornecendo 0,22 gramas do produto como um sólido branco, com 23% de rendimento.

2.2.2 Instrumentação

A reação foi monitorada com placas de cromatografia de camada delgada (CCD) com sílica gel. As placas de CCD foram visualizadas em uma câmera de ultravioleta a 245 nm. A purificação dos produtos da síntese por coluna cromatográfica foi realizada com sílica gel (70-230 mesh). O espectro de massa foi obtido em um equipamento Shimadzu GCMS-QP5050A utilizando impacto eletrônico. O espectro de infravermelho foi obtido por um espectrômetro Varian 660-IR, equipado com PIKE Gladi ATR (*Attenuated Total Reflectance*), utilizando o método de filme fino sólido. O aparelho MQAPF-301 (Microquímica, Brazil) foi utilizado para a medida do ponto de ebulição, porém, não foi possível obtê-lo, uma vez que o produto se degradava antes de atingir o ponto de ebulição.

Espectros de ressonância magnética nuclear de próton (¹H RMN), carbono 13 (¹³C RMN), NOESY e HMBC foram obtidos no espectrômetro Bruker Biospin 400 MHz na Universidade Federal de Ouro Preto. COSY e HETCOR foram obtidos no espectrômetro Varian Mercury 300 MHz na Universidade Federal de Viçosa. Os espectros de RMN foram obtidos com temperatura controlada a 25 °C. O solvente utilizado para as análises foi clorofórmio

deuterado. Os deslocamentos químicos dos resíduos de CHCl_3 ($\delta = 7,26$ ppm) no RMN de ^1H e CDCl_3 ($\delta = 77,0$ ppm) no RMN de ^{13}C foram utilizados como referência.

2.2.3 Parte computacional

As buscas conformacionais foram realizadas por mecânica molecular no programa Maestro 2018-1 (Maestro version 11.5.011) (MAESTRO; SCHRÖDINGER, 2019). A lactona pentacíclica é uma estrutura rígida que possibilita apenas um confôrmero por estrutura candidata. Cada uma dessas estruturas candidatas foram submetidas à otimização de geometria e ao cálculo de frequência utilizando a DFT no nível de teoria M06-2X/6-31+G(d,p). Os deslocamentos químicos foram obtidos pelos valores dos tensores de blindagem de RMN, os quais foram calculados para cada estrutura candidata utilizando o nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p) no programa Gaussian 16 (FRISCH *et al.*, 2016). Os tensores de blindagem de todos os núcleos foram convertidos em valores de deslocamento químico pela subtração dos tensores de blindagem calculados para o tetrametilsilano (TMS), utilizando o mesmo nível de teoria ($^1\text{H} = 31,8816$; $^{13}\text{C} = 183,7262$). Essas operações foram repetidas para cada uma das estruturas candidatas **3a-3h**. A solvatação foi considerada nos cálculos pela utilização do modelo contínuo polarizável com formalismo de equações integrais (IEFPCM, do inglês *Integrated Equation Formalism Polarized Continuum Model*) (TOMASI; MENNUCCI; CANCE`S, 1999) durante os processos de otimização e cálculos dos tensores de blindagem.

O conjunto de dados experimentais de RMN foi comparado aos dados calculados (teóricos) e o valor do MAE foi determinado. O MAE é calculado pelo somatório dos valores absolutos da diferença entre os deslocamentos químicos experimentais (δ_{exp}) e calculados (δ_{calc}) para todos os N-núcleos e dividido pelo total de N-núcleos. Os deslocamentos químicos calculados para ^1H e ^{13}C , utilizando o nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p), de todas as estruturas candidatas (**3a-3h**), bem como as coordenadas cartesianas, estão presentes em tabelas na seção APÊNDICES (**Tabela 12**, página 139 até **Tabela 21**, página 148).

A análise estatística do método DP4 foi executada para encontrar o melhor ajuste entre os dados experimentais e calculados. Essa análise foi realizada organizando os dados de deslocamento químico experimentais e calculados, sendo, em sequência submetidos à ferramenta de análise de DP4 disponível em: <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>.

2.3 Dados para o composto 3a

Fórmula molecular: C₁₄H₁₄Cl₂O₂

Massa molar: 285,16 g/mol

Característica: sólido branco

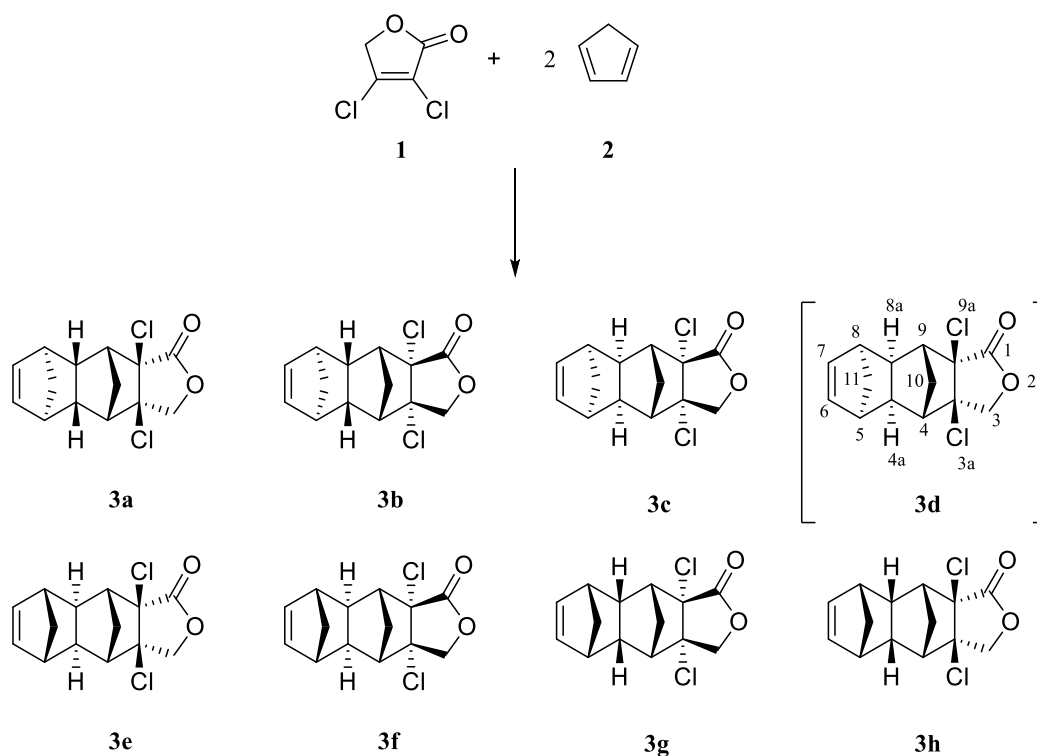
IV (ATR, cm⁻¹) v_{max}: 3052, 2973, 2881, 2042, 1784, 1471, 1367, 1999, 1032, 839, 769, 582

EM m/z (%): 284 ([M]⁺, 0.1), 219 (0.5), 152 (0.9), 115 (1.9), 66 (100)

2.4 Resultados e discussão

Na busca por novas substâncias com potencial atividade agroquímica, nosso grupo de pesquisa focou seus esforços em sintetizar análogos das ftalidas. Um método elegante para a síntese de tais análogos é o emprego da reação de Diels-Alder. A cicloadição da lactona 3,4-dicloro-2(5H)-furanona (**1**) com o ciclopentadieno (**2**), sobre condições reacionais apropriadas, levou à formação da lactona pentacíclica, um sólido branco com oito centros quirais (**Esquema 1**, página 35). Considerando o estado de transição cíclico das reações pericíclicas, as condições reacionais utilizadas e que não foi realizado nenhum controle de enantiosseletividade, até oito pares enantioméricos (estruturas candidatas **3a-3h**) poderiam ter sido formados.

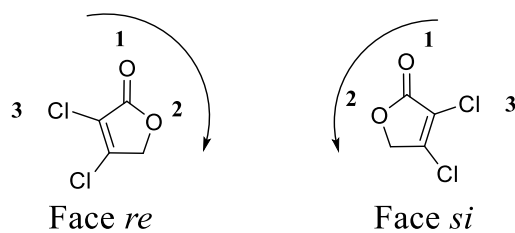
Esquema 1 - Reação de Diels-Alder entre a lactona **1** e o ciclopentadieno **2**. Estruturas candidatas **3a-3h**. Entre colchetes é apresentada a estrutura candidata correta (**3d**).



Fonte: O autor.

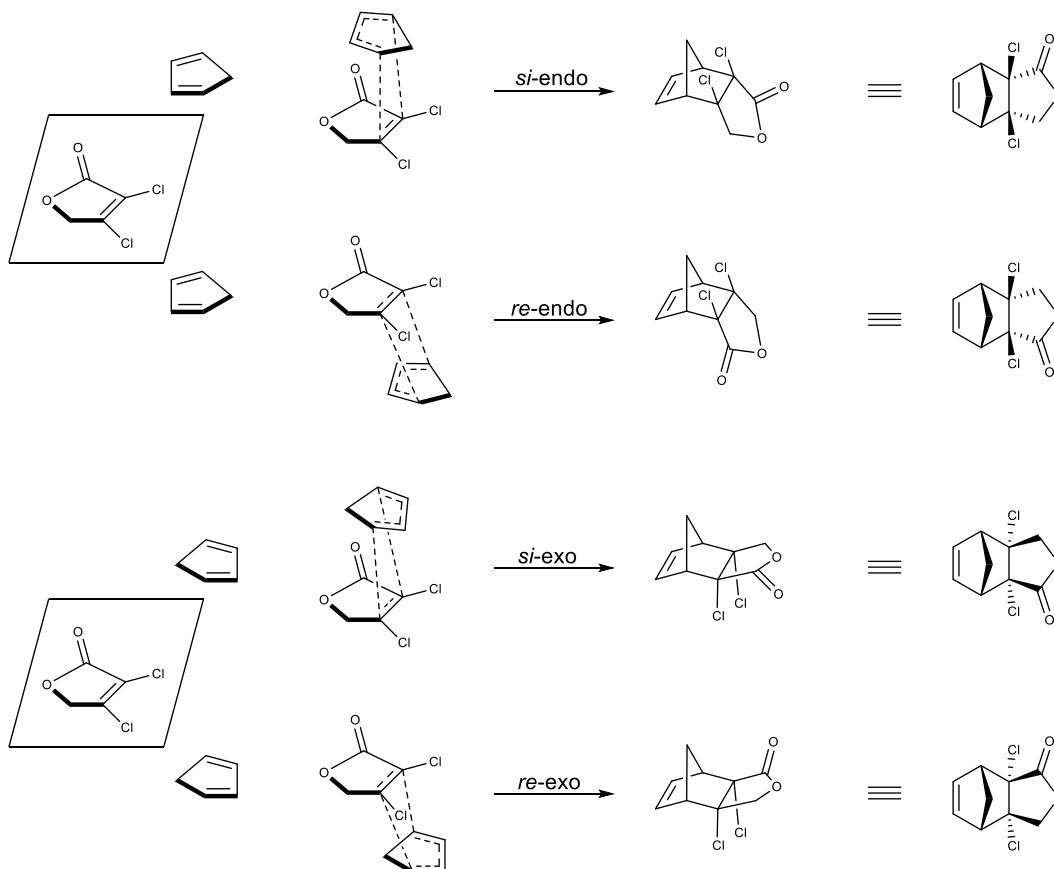
Nessa reação, a lactona **1** atua como dienófilo e o ciclopentadieno **2**, como dieno. O modo como o dieno e o dienófilo se aproximam um do outro define como será o estado de transição de uma reação pericíclica, determinando a estereoquímica do aduto da reação. O aduto *endo* é formado quando o dieno se aproxima do dienófilo enquanto suas duplas ligações estão apontando para o lado dos grupos retiradores de elétrons do dienófilo. Consequentemente, o aduto *exo* é formado quando as duplas ligações do dieno estão apontadas na direção oposta aos grupos retiradores de elétrons do dienófilo. O aduto *endo* normalmente é o produto favorecido nessa reação devido à sua melhor interação com os orbitais dos grupos retiradores de elétrons do dienófilo e o desenvolvimento de orbitais π durante o estado de transição com o dieno, o que leva a uma menor barreira de energia de ativação (CUVELLIER *et al.*, 2019; GARCÍA-RODEJA; FERNÁNDEZ, 2016; WANNERE *et al.*, 2007). Além de considerarmos como as duplas ligações do dieno se aproximarão da dupla ligação do dienófilo, é importante considerarmos por qual face da lactona **1** ocorrerá esta aproximação.

A lactona **1** é uma molécula aquiral plana, que possui apenas um plano de reflexão (σ) na horizontal com elemento de simetria, logo, suas faces são distintas e, no caso dessa reação de Diels-Alder, podem levar à formação de produtos diferentes. Dizemos que as faces da lactona **1** são enantiotópicas, pois podem gerar produtos enantiômeros. Já o ciclopentadieno possui ambas as faces iguais, o que não influencia na estereoquímica do produto nessa análise. Tendo em mente que a lactona **1** possui faces estereotópicas, além de considerarmos a aproximação *endo* e *exo* tradicional às reações de Diels-Alder, também temos que ponderar por qual face o ciclopentadieno **2**, dieno da reação, se aproximará. Para tal, é necessário identificar cada face da lactona utilizando a nomenclatura de face *re* e face *si* (do latim *rectus* e *sinistre*, respectivamente). O primeiro passo é aplicar as regras de Cahn-Ingold-Prelog em duas dimensões, atribuindo prioridades distintas (1, 2 e 3) aos três substituintes ao carbono carbonílico, como se ele fosse um carbono tetraédrico. Posteriormente, observa-se como as atribuições, da maior para a menor, foram realizadas: a face *re* compreende o sentido horário de rotação dos ponteiros do relógio e a face *si* o sentido anti-horário de rotação dos ponteiros do relógio (GONSALVES; SERRA; EUSÉBIO, 2011). Aplicando as regras de Cahn-Ingold-Prelog à lactona **1**, a face *re* é aquela que o oxigênio se encontra à direita da carbonila, enquanto a face *si* é aquela que o oxigênio se encontra à esquerda da carbonila (**Figura 5**, página 37).

Figura 5 - Face *re* e face *si* da lactona **1**.

Fonte: O autor.

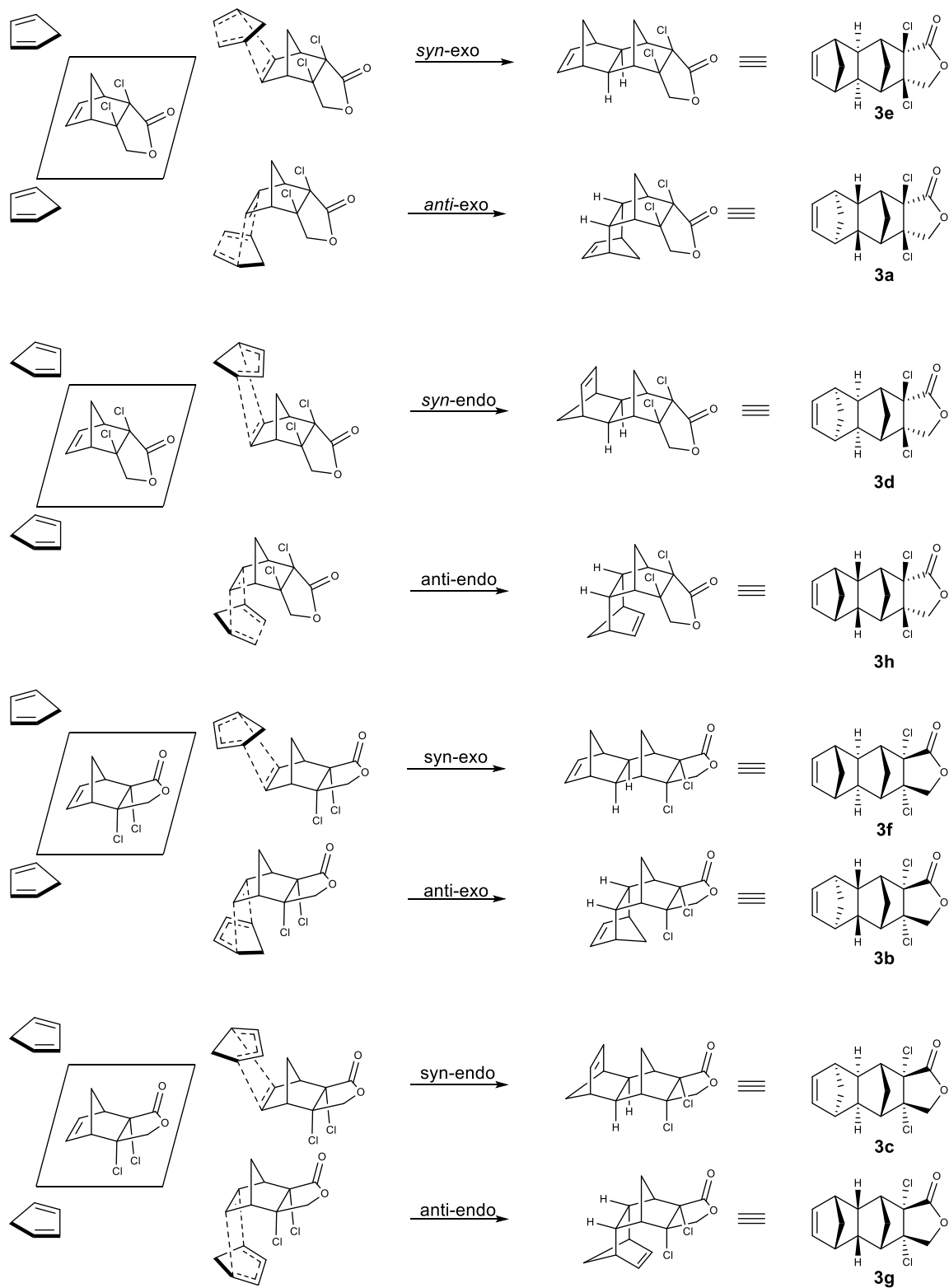
Na primeira etapa da reação, o dieno pode se aproximar tanto pela face *si* quanto pela face *re* do dienófilo, em adição à própria orientação para a formação dos adutos *exo* e *endo* (RESENDE; ALVARENGA; WILLOUGHBY, 2015). A aproximação com a orientação para formas adutos *exo* e *endo* leva à formação de diastereoisômeros. Diante disso, será possível a formação de até quatro adutos no final da primeira etapa, sendo dois pares de enantiômeros (devido à face *re* e face *si* da lactona **1**) e dois pares de diastereoisômeros (devido à forma de aproximação do que leva aos adutos *exo* e *endo*). (**Figura 6**, página 37).

Figura 6 - Reação da 3,4-diclorofuran-2(5H)-ona **1** com o ciclopentadieno **2**: representação da aproximação *si* e *re* e produtos *endo* e *exo*.

Fonte: O autor

Os adutos formados nessa primeira etapa podem voltar a reagir como dienófilos, com o excesso de ciclopentadieno atuando novamente como dieno, para levar à formação de novos produtos. A fim de facilitar a discussão referente à segunda etapa dessa reação, dispensaremos o uso da nomenclatura face *re* e face *si* em prol da nomenclatura *syn* e *anti* para indicar a aproximação do ciclopentadieno **2** da dupla ligação dos adutos formados na primeira etapa da reação. Quando o ciclopentadieno **2** se aproxima pela mesma face da ponte de metileno do dienófilo, utilizamos a nomenclatura *syn*; caso seja pela face oposta à ponte de metileno, utilizaremos a nomenclatura *anti*. Como os adutos formados na primeira etapa também possuem faces distintas (nas quais se encontram a dupla ligação carbono-carbono) e a reação que ocorre na segunda etapa também é uma Diels-Alder, podemos aplicar a mesma linha de raciocínio na primeira etapa para chegarmos ao número de possíveis produtos obtidos na reação. Na segunda etapa dessa reação, cada um dos quatro adutos formados na primeira etapa pode levar à formação de quatro novos adutos, totalizando dezesseis possíveis estereoisômeros como produtos da reação. Posto que enantiômeros apresentam o mesmo espectro de RMN em solventes aquirais (como CDCl₃), apenas oito diastereoisômeros candidatos foram considerados nesse trabalho (**Figura 7**, página 39). Essa análise preliminar da reação nos permitiu poupar recursos computacionais e tempo nesse trabalho, uma vez que limitou de forma significativa as estruturas candidatas plausíveis para a reação.

Figura 7 - Reação da 3,4-diclorofuran-2(5H)-ona **1** com o ciclopentadieno **2**: estado de transição das estruturas candidatas.

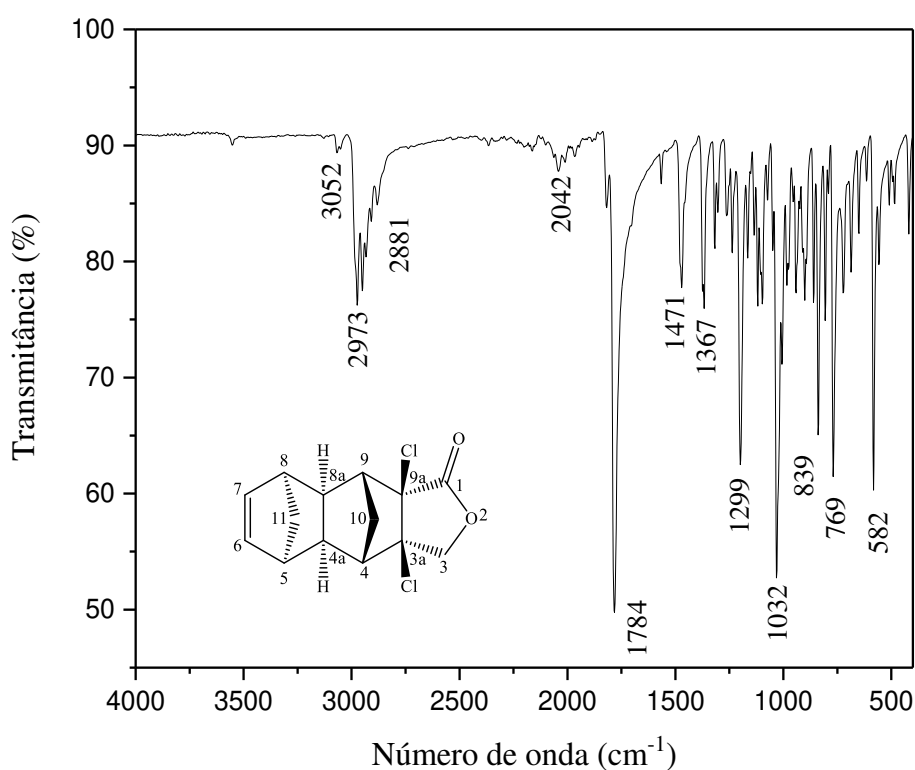


Fonte: O autor.

A caracterização estrutural completa da lactona pentacíclica foi realizada com o auxílio de métodos espectroscópicos, como RMN, IV e espectro de massas. O espectro no IV (**Figura**

8, página 40) do composto (**3d**) apresenta uma banda em 1784 cm^{-1} de estiramento de ligação dupla C=O. O estiramento simétrico da ligação C-H característico de alquenos pode ser observado na banda em 2973 cm^{-1} , bem como uma pequena banda em 3052 cm^{-1} devido ao estiramento assimétrico dessa mesma ligação. A banda em 2881 cm^{-1} demonstra um estiramento simétrico da ligação C-H de alcanos. Duas bandas de estiramento assimétrico características de ésteres são observadas em 1032 cm^{-1} (O-C-C) e 1299 cm^{-1} (C-CO-O). Por fim, a banda forte em 582 cm^{-1} (estiramento simétrico) demonstra a presença de ligações C-Cl.

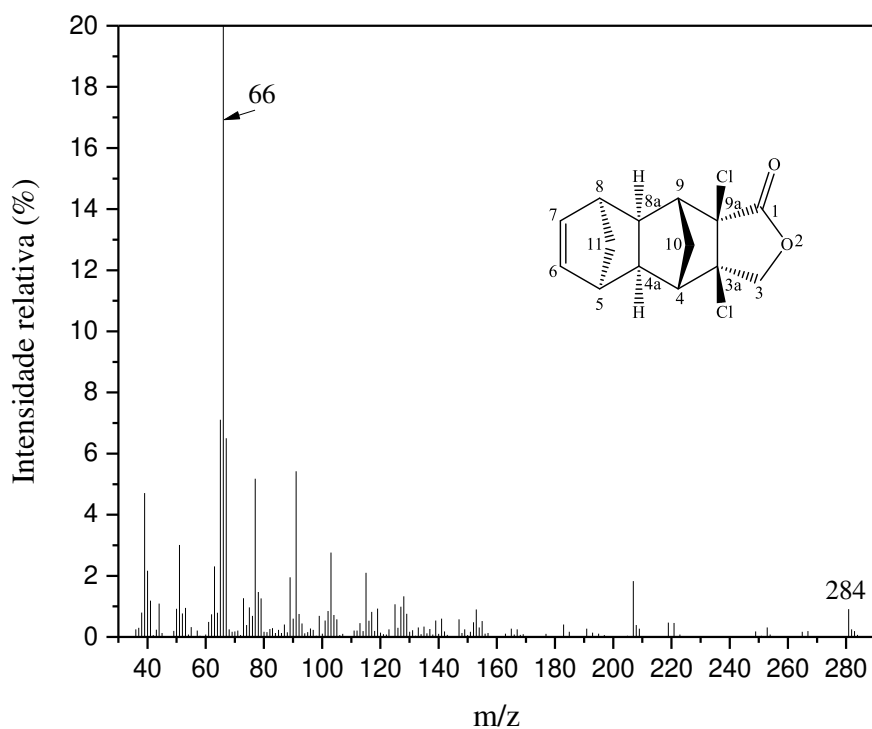
Figura 8 - Espectro de infravermelho para o composto **3d**.



Fonte: O autor.

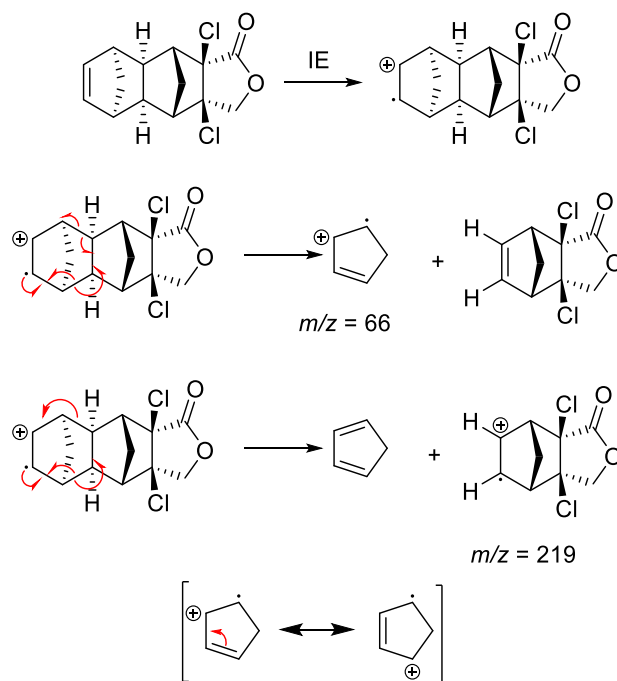
No espectro de massas (**Figura 9**, página 41) observa-se o pico do íon molecular em razão massa/carga (m/z) 284, bem como o pico base em m/z 66 e o pico em m/z 219, referentes a fragmentações por retro Diels-Alder (**Figura 10**, página 41). Além disso, o espectro apresenta os picos dos íons $M+2$ e $M+4$ compatíveis com o padrão esperado para moléculas com dois átomos de cloro.

Figura 9 - Espectro de massas para o composto **3d**.



Fonte: O autor.

Figura 10 - Proposta de fragmentação do composto **3d**.

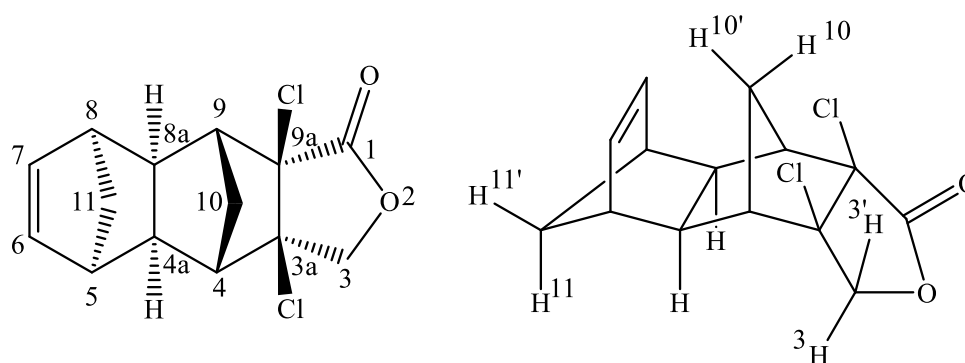


Fonte: O autor.

Após a análise dos espectros de IV e massas, a atribuição inequívoca da estereoquímica relativa da molécula foi realizada combinando com os resultados fornecidos pela interpretação dos espectros de RMN experimentais, bem como os resultados de cálculos teóricos. Um teste preliminar utilizando a análise estatística DP4, sem assinalar os sinais de RMN com seus respectivos átomos, foi realizada comparando os δ de ^1H e ^{13}C experimentais (provenientes da amostra) e calculados (provenientes das oito estruturas candidatas). Nesse teste, os valores de δ experimentais da amostra são organizados por ordem crescente de grandeza, sendo, em seguida, comparados (mediante a análise de DP4) com os valores de δ calculados organizados por ordem crescente de grandeza para cada uma das oito estruturas candidatas. A título de exemplo, o maior δ experimental é comparado com o maior δ calculado para a estrutura **3a**, posteriormente são comparados os segundos maiores pares de δ experimentais e calculados, seguindo assim até completar todos os pares de δ para a estrutura **3a**, dando lugar à repetição dessa análise para as demais estruturas candidatas. Ao final desse teste preliminar, a análise de DP4 indicará dentre as estruturas candidatas qual é aquela que possui a maior probabilidade de ser a estrutura correta para a molécula em análise.

Utilizando essa abordagem, é possível comparar, de forma rápida e simples, se os valores calculados de δ estão em valores próximos aos resultados experimentais. A grande vantagem dessa análise preliminar é validar se a metodologia escolhida para o cálculo computacional está em uma faixa de valores condizentes com o que aponta os dados experimentais, pois, se o resultado do DP4 indicasse que há uma diferença grande entre os dados calculados e experimentais, poderíamos concluir que alguma parte da metodologia escolhida não foi adequada à molécula que está a ser estudada. Por exemplo, imaginemos que o valor da diferença entre os maiores pares de δ de ^1H entre a amostra e todas as estruturas candidatas seja sempre superior a duas partes por milhão (ppm). Com uma diferença tão elevada em δ de próton, é razoável pensar que alguma etapa da metodologia – como a escolha das bases e funcionais – não foi realizada da forma correta.

A análise de DP4, utilizando ambos os núcleos (^1H e ^{13}C), sem assinalar os sinais, indicou que a estrutura candidata **3d** (**Figura 11**, página 43) teria 100% de probabilidade de ser a estrutura correta, segundo os dados combinados de ^1H e ^{13}C (**Tabela 1**, página 43). É importante salientar que como nenhum sinal de RMN foi assinalado nesse teste preliminar, havia a possibilidade de outras estruturas candidatas (como **3a**) serem apontadas pela análise DP4 como possíveis candidatas com alta probabilidade. Logo, o resultado desse teste deve ser visto com cautela, não orientando a análise detalhada dos dados experimentais e calculados.

Figura 11 - Estrutura candidata **3d** e a numeração utilizada em seus átomos.

Fonte: O autor.

Tabela 1 - Análise de DP4 dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C para as estruturas candidatas **3a** a **3h** antes de assinalar os dados experimentais.

Estruturas candidatas	Probabilidade DP4 (%) para os dados de RMN		
	^{13}C e ^1H	^1H	^{13}C
3a	0	6,4	0
3b	0	0	0,5
3c	0	0	0,3
3d	100	93,5	75,2
3e	0	0	0,1
3f	0	0	0
3g	0	0	23,9
3h	0	0	0,1

Com a designação positiva apontada pela análise preliminar dos dados, foi feita a interpretação dos espectros de RMN experimentais, realizados em CDCl_3 . O sinal mais desblindado no espectro de RMN de ^1H (**Figura 12**, página 47) – um multipletto de ordem superior em δ 6,05 ppm, integrado para dois – foi assinalado aos hidrogênios olefínicos H6 e H7. Na faixa de δ 2,14 ppm a 2,28 ppm, observa-se um sinal, integrado para dois, similar a um multipletto, porém, na realidade, são dois duplo duplo dupletos (ddd) parcialmente sobrepostos. Esses duplo duplo dupletos, em δ 2,24 e δ 2,18 ppm, foram assinalados, respectivamente, aos prótons H4a e H8a. O próton H4a está acoplado aos prótons H4, H5 e H8a, ao passo que o próton H8a está acoplado aos prótons H4a, H8 e H9. O sinal do multipletto em δ 2,94 - 3,02 ppm, integrado para dois, foi atribuído aos prótons H5 e H8 devido a uma correção observada na espectroscopia de correlação (COSY, do inglês *Correlation Spectroscopy*, **Figura 13**, página 48) com os prótons H6 e H7.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 14**, página 49) o carbono C1 da carbonila foi prontamente assinalado ao sinal mais desblindado em 171,8 ppm. A partir da identificação de C1, observa-se, no espectro de correlação heteronuclear a múltiplas ligações (HMBC, do inglês *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*, **Figura 15**, página 50), três picos de correlação com C1, sendo eles em δ 2,70-2,72, 4,40 e 4,85 ppm. Tais picos de correlação poderiam indicar, segundo as estruturas candidatas, os prótons: H3, H3' e H9. Pela análise do espectro de correlação heteronuclear (HETCOR, do inglês *Heteronuclear Correlation*, **Figura 16**, página 51), observa-se que os sinais dos dupletos, integrados para um, em δ 4,40 e 4,85 ppm estão correlacionados a um único carbono em δ 73,7 ppm, sendo atribuído a esse sinal o carbono C3 e aos demais sinais (δ 4,40 e 4,85 ppm) o par de hidrogênios H3/H3' (a atribuição inequívoca de H3 e H3' será feita mais adiante no texto). Esses pares de hidrogênios H3/H3' são fortemente desblindados, pois estão entre átomos de cloro e oxigênio, que atuam como grupos retiradores de elétrons. Com a atribuição de C3, foi natural identificar pelo HETCOR (**Figura 16**, página 51) que o sinal em δ 54,3 ppm pertence ao carbono C9. Finalmente, podemos concluir que o multipletto em δ 2,70-2,72 ppm corresponde ao próton H9 através de seu pico de correlação com o carbono C9 no HETCOR (**Figura 16**, página 51). É importante ressaltar que o multipletto de H9 está parcialmente sobreposto com outro multipletto (próton H10'), que será explorado em detalhes posteriormente. Com C9, H9, C3 e o par H3/H3' identificados, foi possível atribuir o multipletto, integrado para um, em δ 2,54-2,60 ppm, como pertencente ao próton H4, devido aos picos de correlação com o par de prótons H3/H3' no HMBC (**Figura 15**, página 50). Por fim, foi observado no HETCOR (**Figura 16**, página 51) um pico de correlação de H4 com o carbono C4 em δ 54,6 ppm. Os hidrogênios H9 e H4 estão a três ligações de distância dos átomos de cloro, o que leva esses prótons a serem mais desblindados que H4a e H8a.

Não foram constatados picos de correlação no COSY (**Figura 13**, página 48) entre os pares H4/H4a e H8a/H9. Essa ausência entre esses prótons já foi descrita na literatura para derivados do tetraciclododeceno (FLID *et al.*, 2018) e indica que a geometria da molécula é tal que os ângulos diedros (α) entre tais átomos devem possuir valores próximos a 90° . Segundo a equação de Karplus (THUREAU *et al.*, 2019), é esperado que átomos de hidrogênios vicinais, com valores de ângulos diedros próximos a 90° , possuam valores pequenos (ou até mesmo nulos) para as constantes de acoplamento (3J) entre si. Em contrapartida, para ângulos diedros próximos a 0° ou 180° , são esperados elevados valores de constantes de acoplamento, normalmente entre 12 até 14 hertz (Hz). Essa é uma informação valiosa para a elucidação da estereoquímica da molécula, uma vez que algumas estruturas candidatas têm ângulos diedros próximos a 90° , enquanto outras terão valores mais afastados. A título de exemplo, ao

observarmos a geometria das estruturas candidatas **3b** e **3d** otimizadas para o cálculo computacional, utilizando as ferramentas disponíveis no programa GAUSSIAN, temos que os ângulos diedros para o par de prótons H4/H4a e H8a/H9 na estrutura candidata **3d** são 78,74° e 74,25°, enquanto que para a estrutura candidata **3b** são 44,05° e 45,74°, logo podemos esperar que as constantes de acoplamento observadas para **3d** sejam muito pequenas ou nulas, o que é similar ao resultado obtido pelo COSY (**Figura 13**, página 48).

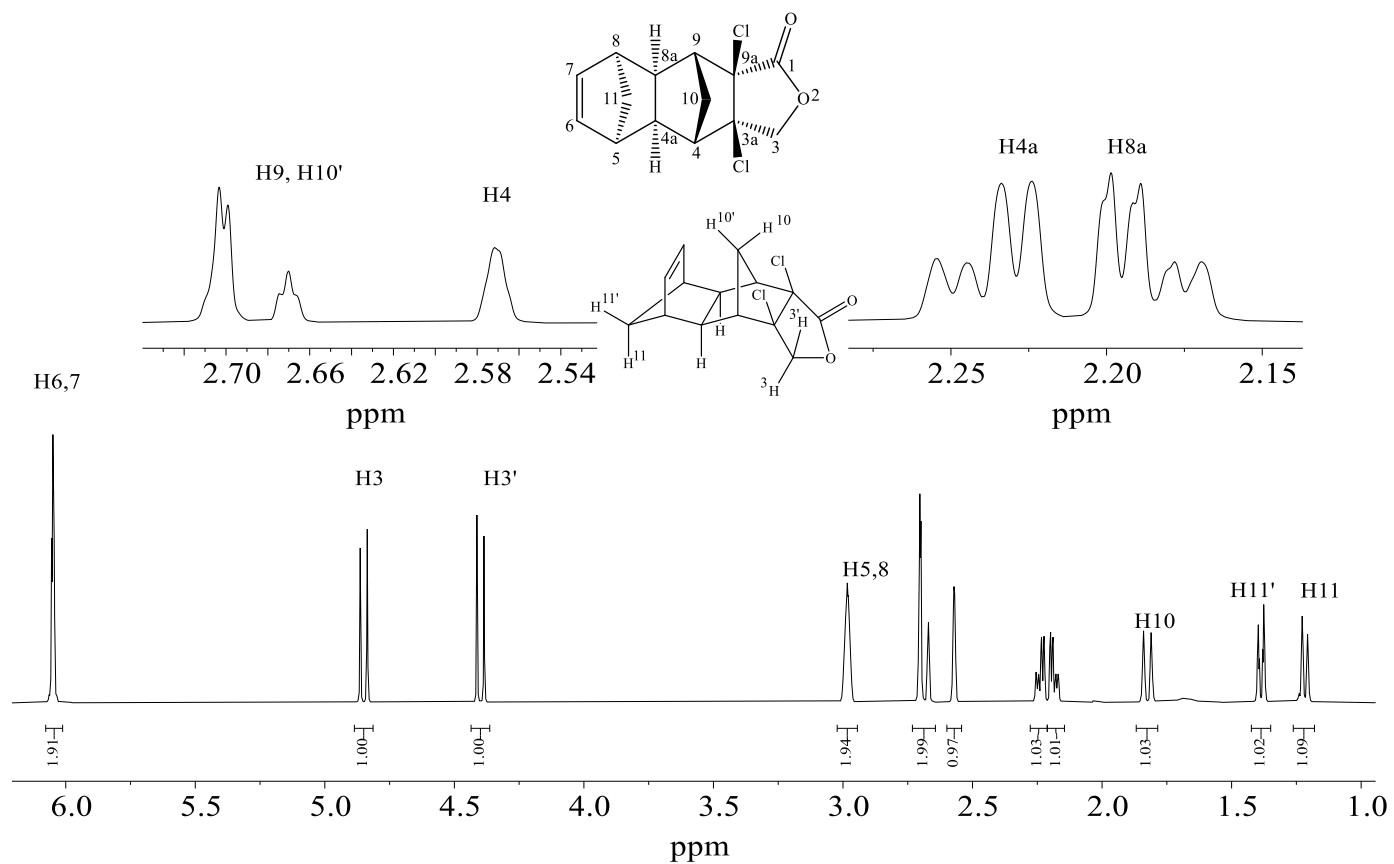
Como mencionado anteriormente, o sinal de H9 está sobreposto com um multipletto de um próton em 2,68 ppm, até então não assinalado. Observando as correlações desse próton (que está sobreposto a H9) no HETCOR (**Figura 16**, página 51), vemos que ele está relacionado ao carbono mais desblindado em δ 33,9 ppm, que, por sua vez, também está relacionado a um multipletto, integrado para um, em δ 1,79-1,87 ppm. Com isso, podemos concluir que esse carbono em δ 33,9 ppm está ligado a dois prótons. Analisando as estruturas candidatas, observamos que apenas três átomos de carbono (cujos sinais são δ 33,9; 53,6 e 73,7 ppm) possuem dois prótons ligados a si: C3 e os carbonos de ponte de metileno, C10 e C11. O átomo C3 já foi identificado como o sinal em δ 73,7 ppm anteriormente, restando, assim, C10 e C11 como possibilidades para os sinais em δ 33,9 ppm e δ 53,6 ppm. Utilizando os mapas de correlação no HMBC (**Figura 15**, página 50) para os carbonos ligados aos cloros, C3a (δ 77,9 ppm) e C9a (δ 76,0 ppm), notamos que ambos possuem picos de correlação com os hidrogênios em δ 1,79 - 1,87 ppm e δ 2,65 - 2,69 ppm. Constatando a estrutura candidata **3d** (**Figura 11**, página 43), os carbonos C3a e C9a estão a três ligações de distância dos prótons de C10, porém, eles estão a seis ligações de distância dos prótons de C11. Logo, concluímos que os sinais em δ 1,79-1,87 ppm e δ 2,65 - 2,69 ppm pertencem ao par de prótons H10 /H10'. Consequentemente, os sinais δ 33,9 e δ 53,6 ppm correspondem a C10 e a C11, respectivamente. Não é observado nenhum pico de correlação no HMBC entre os prótons de C11 e os carbonos C3a e C9a.

Até a atual etapa da interpretação dos dados de RMN, não é possível assinalar com exatidão qual sinal pertence a H10 ou a H10', sendo necessária a interpretação dos resultados da espectroscopia de efeito nuclear Overhauser (NOESY, do inglês *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*, **Figura 17**, página 52). A análise cuidadosa do espectro de NOESY (**Figura 17**, página 52) forneceu informações importantes, tanto para a atribuição inequívoca dos sinais de prótons e carbonos quanto para a confirmação de qual estrutura candidata seria a correta. Ao observarmos o NOESY (**Figura 17**, página 52) para os prótons H3 e H6, constatamos que ambos possuem um pico de correlação com o sinal em δ 2,65 - 2,69 ppm, entretanto, não apresentam correlação com o sinal em δ 1,79 - 1,87 ppm. Isso indica que o próton em δ 2,65 -

2,69 ppm está voltado para a direção da olefina em sua organização no espaço, assim sendo, esse sinal foi assinalado ao próton H10'. Já o sinal em δ 1,79-1,87 ppm foi atribuído ao próton H10. Essa etapa da interpretação foi crucial, pois identificando que H10' está voltado para a direção da olefina, podemos eliminar seis das oito estruturas candidatas, restando apenas as estruturas **3c** e **3d** (**Figura 7**, página 39).

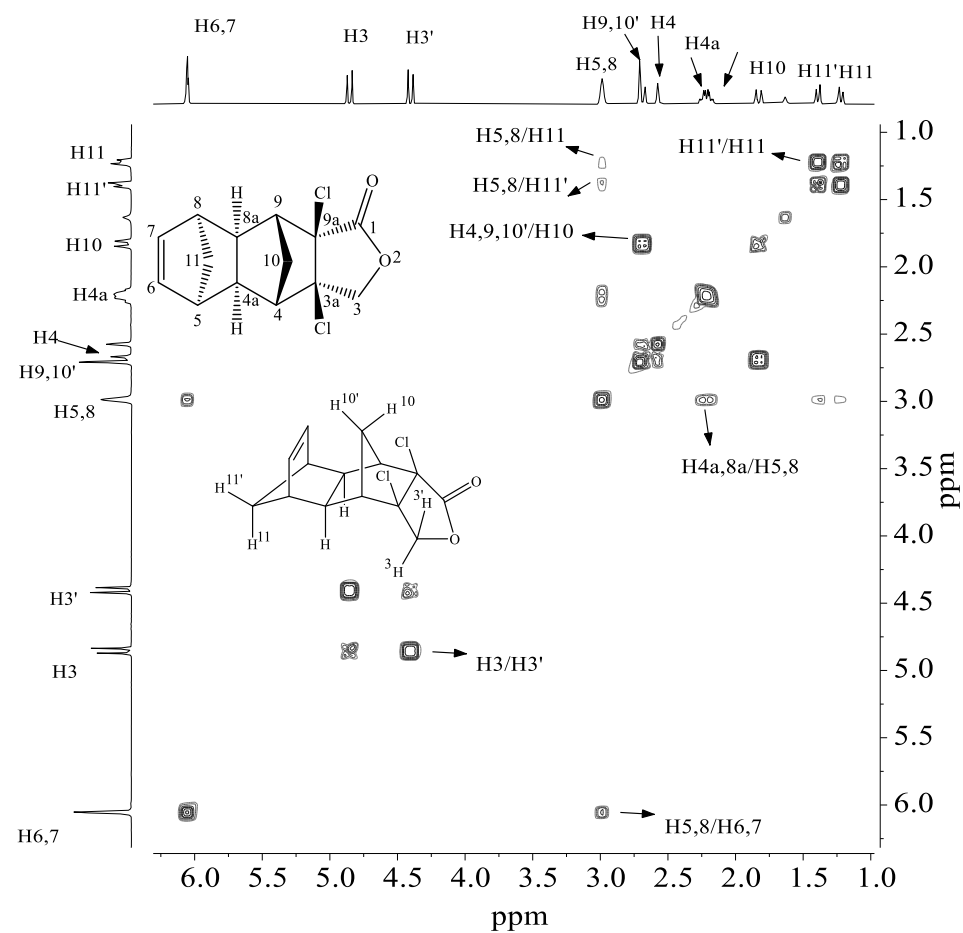
Retomando a atenção para o par de prótons H3/H3' (δ 4,40 e 4,85 ppm), vemos que apenas o duplete mais desblindado, em δ 4,85 ppm, possui uma correlação com o duplete de duplete de duplete de H4a (δ 2,24 ppm) no mapa de contornos NOESY (**Figura 17**, página 52), logo este duplete foi atribuído ao próton H3 e o outro duplete em δ 4,40 ppm, ao próton H3'. Com essas últimas atribuições, é possível, nesse ponto da análise, identificar que a estrutura candidata **3d**, provavelmente, é a estrutura correta, contudo, ainda é preciso terminar a atribuição dos demais átomos restantes.

Figura 12 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C) do composto **3d**.



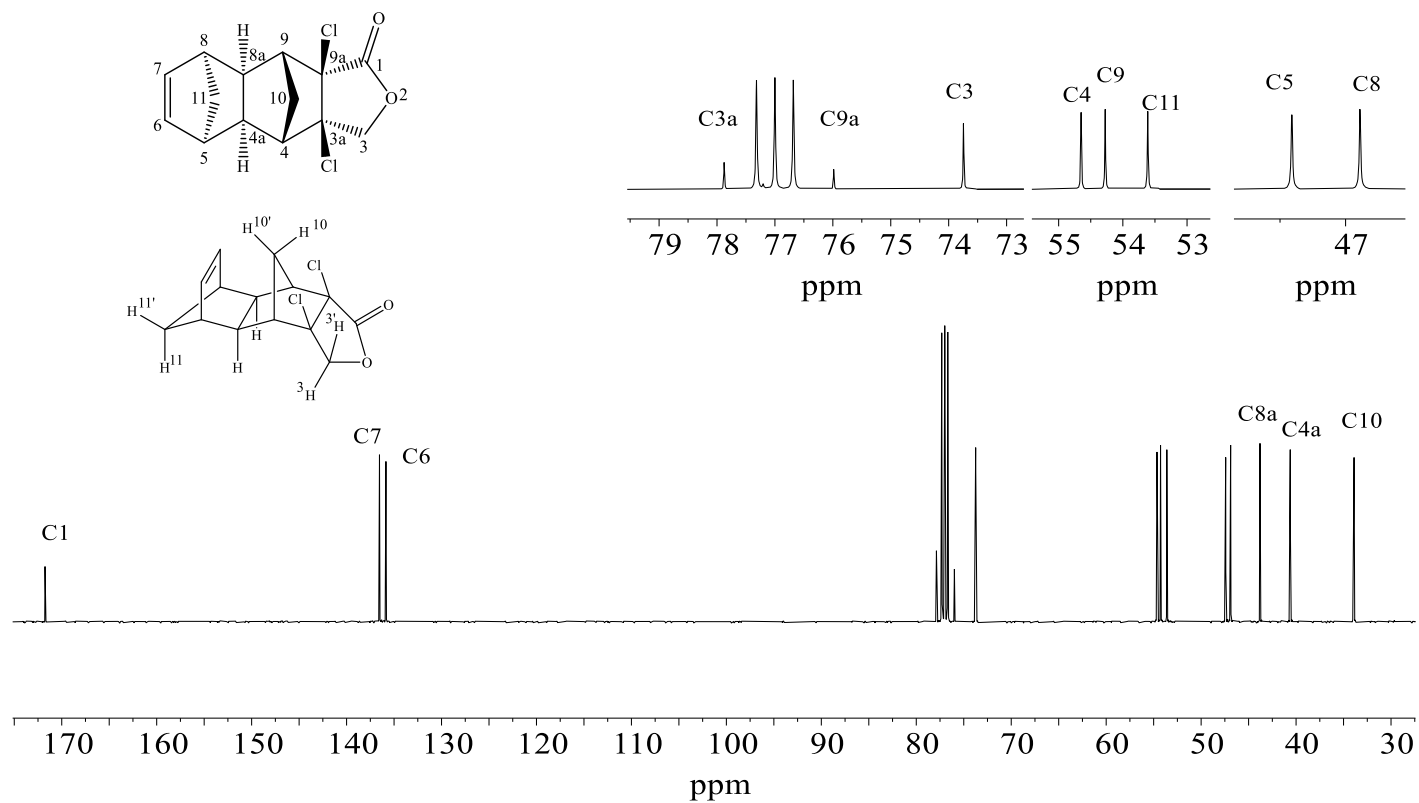
Fonte: O autor.

Figura 13 - Correlações COSY para o composto 3d.



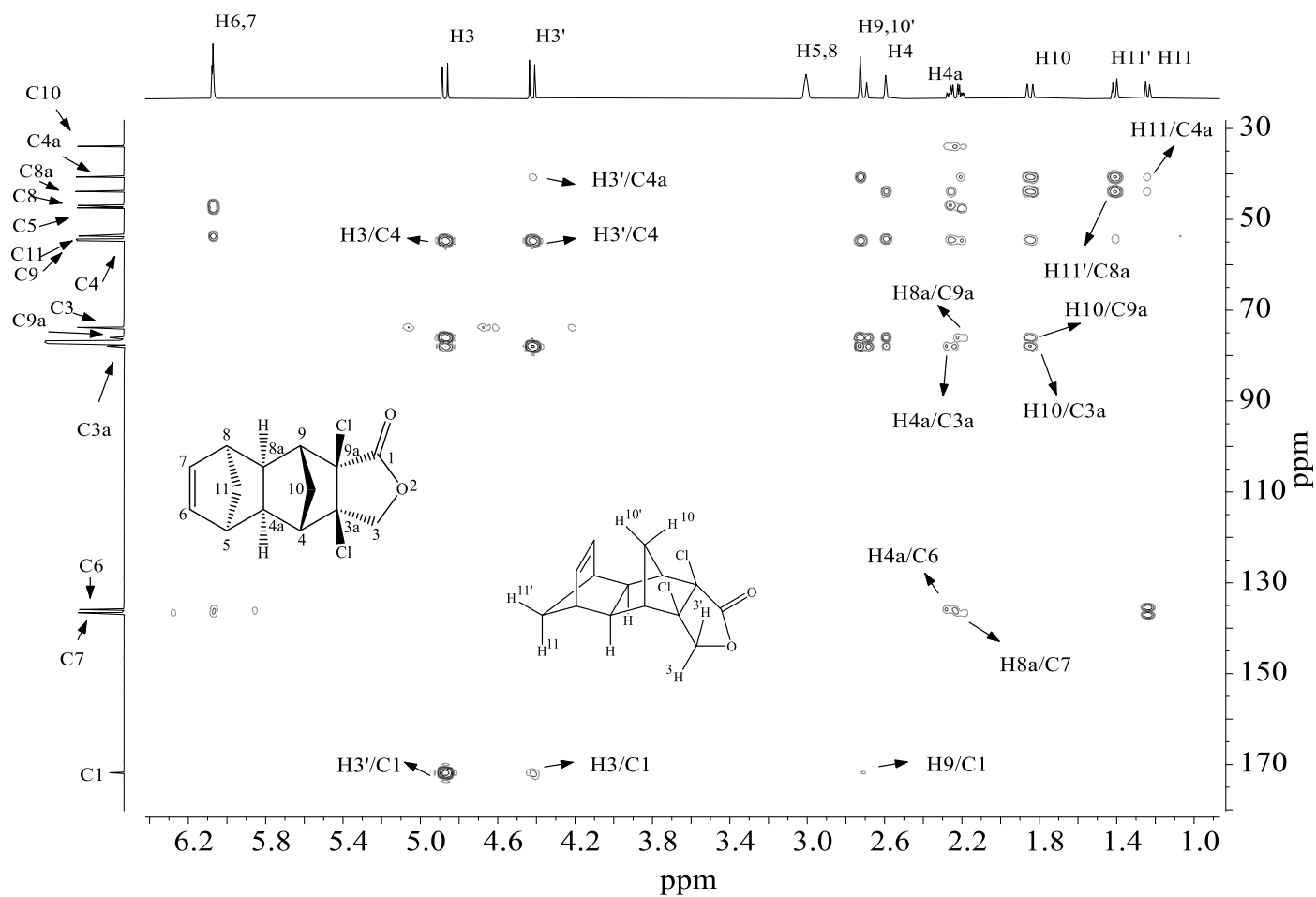
Fonte: O autor.

Figura 14 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C) do composto **3d**.



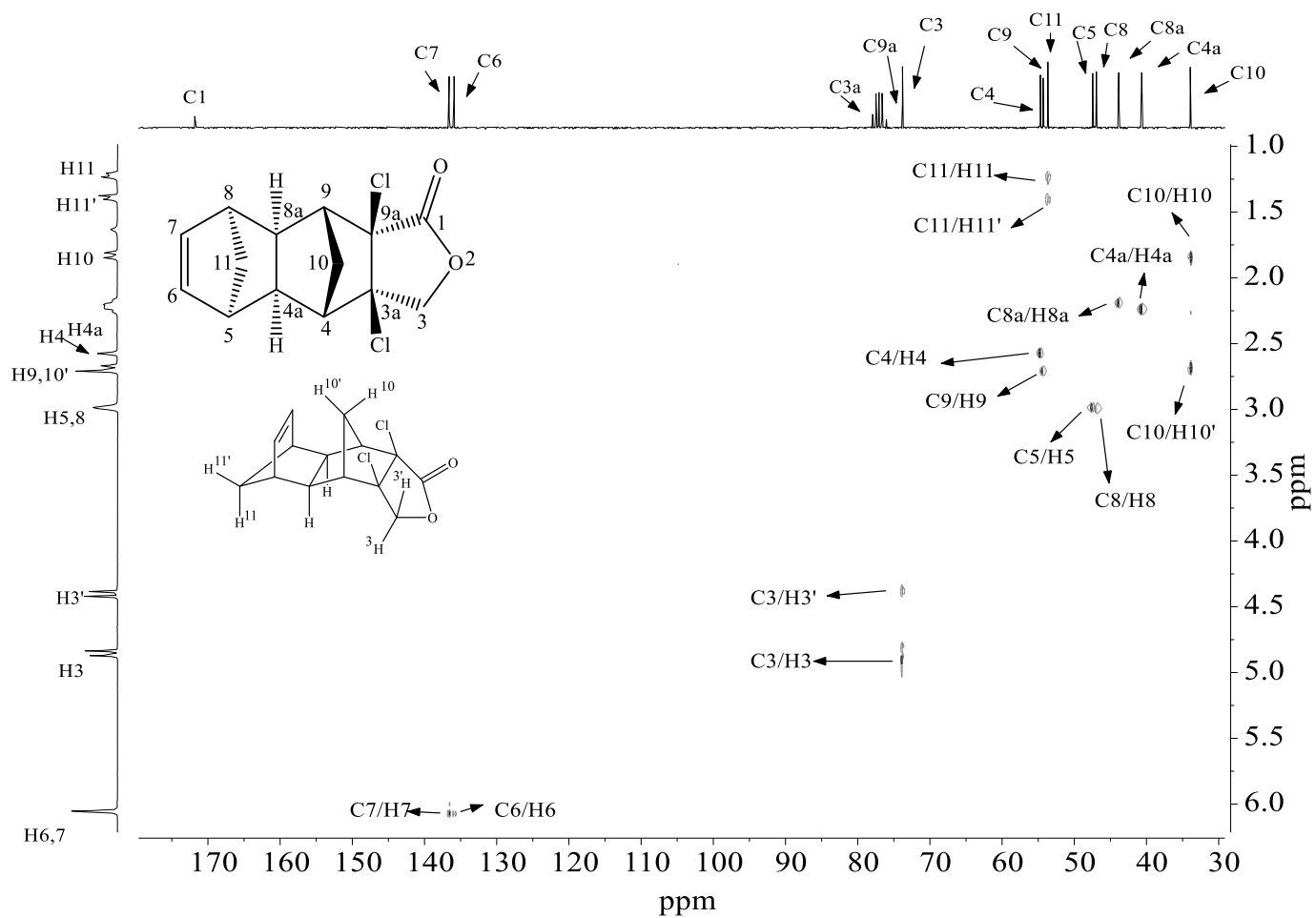
Fonte: O autor.

Figura 15 - Correlações HMBC para o composto **3d**.



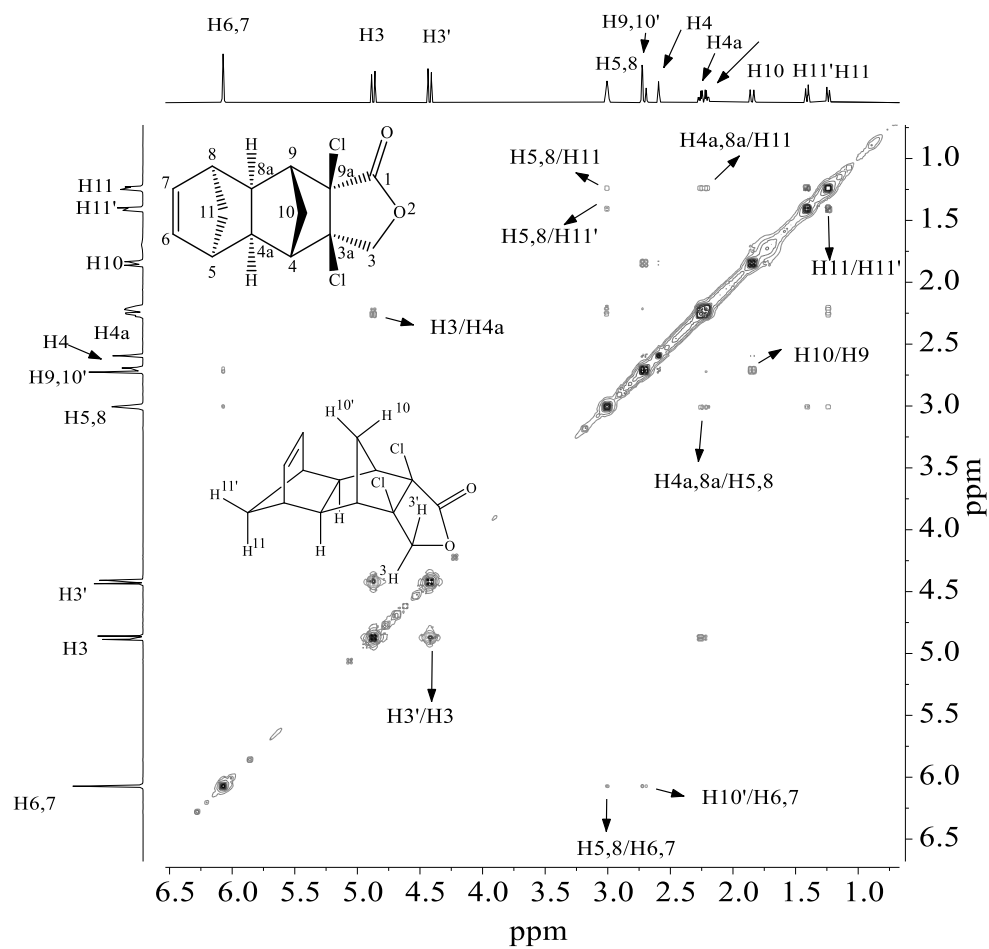
Fonte: O autor.

Figura 16 - Correlações HETCOR para o composto **3d**.



Fonte: O autor.

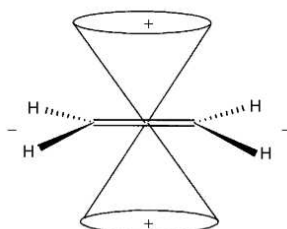
Figura 17 - Correlações NOESY para o composto **3d**.



Fonte: O autor.

Os hidrogênios da ponte de metileno próximo à olefina – H11 e H11' – foram atribuídos aos duplos tripletos, integrados para um, δ 1,22 ppm e δ 1,39 ppm, respectivamente, devido à presença de um pico de correlação no NOESY (**Figura 17**, página 52) entre H11 e H4a, além da ausência de picos de correlação entre H11' e H4a ou H11' e H8a. Os átomos H11 e H11' apresentam um acoplamento geminal de 8,3 Hz e acoplamento vicinal com ambos os prótons H5 e H8, de 1,7 Hz. Em uma primeira análise, sem o auxílio do NOESY, poderíamos pensar que o próton H11', por estar acima da ligação olefínica, deveria possuir um sinal com menor deslocamento químico no espectro de RMN em comparação ao seu próton geminal H11, em virtude da anisotropia diamagnética gerada pelos elétrons π da dupla ligação. Segundo a teoria de Jackman e Pople, podemos imaginar a área de atuação da anisotropia diamagnética como um cone (**Figura 18**, página 53), no qual qualquer próton dentro de sua área sofre uma blindagem adicional, enquanto os prótons fora dela (no plano da ligação C=C) sofrem uma desblindagem (ABRAHAM; CANTON; GRIFFITHS, 2001). Todavia, pesquisas realizadas com derivados de norbornanos ao longo dos anos têm demonstrado que os prótons de ponte de metileno que estão acima da dupla ligação podem possuir um maior valor de deslocamento químico quando comparados com seus prótons geminais (RESENDE; ALVARENGA; WILLOUGHBY, 2015). Cálculos da equação de McConnell, modificados por Nakagawa, demonstram que, para a molécula 2-norborneno, o próton H_{syn} da ponte de metileno está localizado próximo à borda do cone de blindagem, de modo que qualquer adição de grupos à molécula pode fazer com que H_{syn} entre no espaço do cone aumentando a sua blindagem, ou então seja afastado do cone, levando à desblindagem do próton (MAZZOLA; LAMBERT; RIDGE, 2018). De posse dessas informações, podemos inferir que a geometria do aduto da Diels-Alder analisado nesse trabalho contribuiu para afastar H11' do cone de blindagem, tendo como resultado um maior valor de deslocamento químico quando comparado com seu próton geminal H11.

Figura 18 - Exemplo do cone de blindagem para o eteno.



Fonte: ABRAHAM; CANTON; GRIFFITHS, 2001

Com todos os prótons já assinalados, é simples associarmos os carbonos restantes aos seus respectivos sinais utilizando os espectros HETCOR (**Figura 16**, página 51) e HMBC

(**Figura 15**, página 50). C4a e C8a são assinalados aos sinais em δ 40,6 e 43,8 ppm, respectivamente, devido aos picos de correlação com H4a e H8a no HETCOR (**Figura 16**, página 51). Por estarem mais próximos à dupla ligação carbono-carbono, os sinais dos átomos C5 e C8 aparecem na região mais desblindada do espectro de RMN de ^{13}C , quando comparados a seus vizinhos C4a e C8a. Os carbonos C5 e C8 foram assinalados aos sinais em δ 46,9 e 47,4 ppm, respectivamente, por conta de picos de correlação com H5 e H8 no HETCOR (**Figura 16**, página 51). Finalmente, os carbonos olefínicos C6 e C7 foram assinalados aos sinais δ 135,8 e 136,5 ppm, respectivamente, tendo em vista os picos de correlação com os prótons H4a e H8a no HETCOR (**Figura 16**, página 51).

A estrutura candidata **3d**, após a análise completa dos dados espectroscópicos experimentais de RMN, mostrou-se como a estrutura que melhor se adequa aos dados. A atribuição dos sinais de RMN está copilada na **Tabela 2** (página 54).

Tabela 2 - Dados de RMN do aduto **3d** em CDCl_3 : Deslocamentos químicos experimentais (δ_{exp}), multiplicidades (m), constantes de acoplamento (J) de correlações COSY e NOESY.

Carbono	δ_{Cexp} (ppm)	Próton	δ_{Hexp} (ppm) m, J (Hz)	COSY	NOESY
C1	171,8	-	-	-	-
C3	73,7	H3	4,85 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H)	H3'	H3'
		H3'	4,40 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H)	H3	H3, H4a
C3a	77,9	-	-	-	-
C4	54,6	H4	2,57 (m, 1H)	H10'	H4a, H10, H10'
C4a	40,6	H4a	2,24 (ddd, $J = 8,2, 3,9, 1,1$ Hz, 1H)	H5, H8a	H5, H11
C5	46,9	H5	2,98 (m, 1H)	H4a, H6, H11, H11'	H4a, H6, H11, H11'
C6	135,8	H6	6,05 (m, 1H)	H5	H5, H7, H10'
C7	136,5	H7	6,05 (m, 1H)	H8	H6, H8, H10'
C8	47,4	H8	2,98 (m, 1H)	H7, H8a, H11, H11'	H7, H8a, H11, H11'
C8a	43,8	H8a	2,18 (ddd, $J = 8,5, 4,0, 1,1$ Hz, 1H)	H4a, H8	H4a, H8, H11
C9	54,3	H9	2,71 (m, 1H)	H10, H10'	H8a, H10, H10'
C9a	76,0	-	-	-	-
C10	33,9	H10	1,83 (m, 1H)	H4, H9, H10'	H4, H9, H10'
		H10'	2,68 (m, 1H)	H4, H10	H4, H9', H10
C11	53,6	H11	1,22 (dt, $J = 8,3, 1,7$ Hz, 1H)	H5, H8, H11'	H5, H4a, H8, H11'
		H11'	1,39 (dt, $J = 8,3, 1,7$ Hz, 1H)	H5, H8, H11	H5, H8, H11

Após a análise preliminar dos dados experimentais de RMN, foi feito o cálculo teórico com as oito estruturas candidatas (**Esquema 1**, página 35) para confirmar a análise realizada. Os deslocamentos químicos calculados para o RMN de ^{13}C e ^1H , no nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p), foram obtidos para as oito estruturas candidatas (**3a-3h**)

e, em seguida, comparados lado a lado com os dados experimentais de RMN, já com os respectivos carbonos e hidrogênios assinalados. A primeira análise estatística realizada para avaliar a qualidade do ajuste entre os dados calculados e experimentais foi a análise estatística MAE, na qual a estrutura candidata **3d** apresentou 0,07 e 2,4 para os dados de hidrogênio e carbono, respectivamente. Enquanto isso, as outras sete estruturas candidatas apresentaram valores muito superiores, conforme demonstra a **Tabela 3** (página 55). Quanto menores os valores do MAE, mais os dados teóricos assemelham-se aos dados experimentais.

Tabela 3 - Análise de MAE e DP4 para os dados de RMN de ^{13}C e ^1H das estruturas candidatas **3a-3h** após a identificação dos sinais.

Estruturas candidatas	MAE		Probabilidade DP4 (%)		
	^1H	^{13}C	^{13}C e ^1H	^1H	^{13}C
3a	0,24	6,3	0	0,5	0
3b	0,29	4,5	0	0	0
3c	0,27	2,7	0	0	0,1
3d	0,07	2,4	100	99,5	99,9
3e	0,32	3,3	0	0	0
3f	0,31	3,5	0	0	0
3g	0,32	3,7	0	0	0
3h	0,37	5,7	0	0	0

Após a análise estatística pelo MAE, os deslocamentos químicos teóricos calculados para as estruturas candidatas **3a-3h**, no nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p), com solvatação em clorofórmio, juntamente com os deslocamentos químicos experimentais, foram organizados e transferidos para uma aplicação disponível no site <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>. Esse site possui uma ferramenta simples que permite a análise estatística por DP4 e CP3, necessitando apenas de um navegador compatível com JAVA. Os dados foram submetidos à análise estatística de DP4, de modo a avaliar a qualidade do ajuste entre os resultados teóricos e experimentais de RMN. A análise estatística de DP4 compara separadamente os dados de carbono e hidrogênio para, então, fazer uma análise combinada de carbono e hidrogênio dos dados. Sendo assim, quanto maior a probabilidade atribuída pelo DP4, melhor a qualidade do ajuste entre os dados de RMN experimentais e teóricos.

Pelo resultado do DP4, os deslocamentos químicos experimentais de ^{13}C e ^1H estão muito mais próximos aos valores teóricos esperados para a estrutura candidata **3d**, quando comparado às demais estruturas candidatas, tendo uma probabilidade de 100% para os dados

combinados de ^{13}C e ^1H (**Tabela 3**, página 55). As análises estatísticas de MAE e DP4 foram convergentes para indicar que os deslocamentos químicos teóricos de RMN de ^{13}C e ^1H para a estrutura **3d** apresentam o melhor ajuste para com os dados de RMN experimental.

Os dados obtidos pela metodologia do cálculo computacional estão de acordo com a interpretação feita dos dados experimentais de RMN, de modo a indicar que a estrutura candidata **3d** é a estrutura correta para o aduto da reação de Diels-Alder realizado nesse trabalho.

2.5 Conclusão

A estrutura de uma nova lactona pentacíclica foi determinada como *rac*-(3*aR*,4*S*,4*aS*,5*R*,8*S*,8*aR*,9*R*,9*aS*)-3*a*,9*a*-dicloro-3*a*,4,4*a*,5,8,8*a*,9,9*a*-octaidro-4,9:5,8-dimetanonafto[2,3-*c*]furan-1(3*H*)-ona (**3d**). A configuração relativa dos compostos (**3d**) foi determinada pela análise do mecanismo da reação e pelos estudos dos espectros de RMN. Os cálculos teóricos foram realizados para oito diastereoisômeros candidatos (**3a-3h**) e a análise estatística de MAE e DP4 foi empregada para confirmar qual era a estrutura correta (**3d**).

3 CAPÍTULO II: *Elucidación estructural de un novo alcaloide pirrolizidínico isolado da Crotalaria retusa L.*

3.1 Introdução

Alcaloides pirrolizidínicos, ou alcaloides de pirrolizidina, são um grupo de metabolitos secundários encontrados em muitas plantas e conhecidos pela sua elevada toxicidade para animais e humanos, sendo categorizados como citotóxicos, genotóxicos e cancerígenos (HE *et al.*, 2019; JANK; RATH, 2017; KOPP *et al.*, 2019). Estes alcaloides estão presentes em uma grande variedade de angiospermas e mais de seis mil plantas já foram identificadas com a presença desses metabolitos, sendo uma delas a *Crotalaria retusa* L., conhecida popularmente no Brasil como “guizo de cascavel” ou “chocalho de cobra” e, no exterior, como “*rattlebox*” ou “*snake rattle*” (SINAN *et al.*, 2020). Casos de intoxicação de equinos (NOBRE *et al.*, 2004), ovinos (CARVALHO; DANTAS; MEDEIROS, 2011; NOBRE *et al.*, 2005), bovinos (QUEIROZ *et al.*, 2013) e caprinos (MAIA *et al.*, 2013) pela ingestão da *Crotalaria retusa* L. têm sido documentados ao longo dos anos no Brasil. Em contrapartida, essa leguminosa, encontrada em regiões tropicais e subtropicais, também é utilizada em diversas medicinas tradicionais naturais ao redor do mundo (DE FIGUEIREDO; LINDOSO SILVA, 2018; ROUAMBA *et al.*, 2018). Os alcaloides pirrolizidínicos, presentes em plantas como a *Crotalaria retusa* L., já demonstraram na literatura atividades biológicas interessantes, como os nematicidas, o que abre caminho para novas pesquisas com esses produtos naturais, seja para obtenção de novos agroquímicos, seja para síntese de derivados com menor citotoxicidade (BOPPRÉ; THODEN, 2010; MONDAL *et al.*, 2019).

A determinação estrutural de um produto natural inédito é o primeiro passo para compreendermos as propriedades físico-químicas do composto e o seu modo de atuação. Nessa perspectiva, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear tem se tornado a principal técnica para a determinação estrutural de novas moléculas, pois é capaz de fornecer, virtualmente, todos os dados necessários para a interpretação inequívoca da estrutura molecular, desde que seus experimentos sejam conduzidos de forma correta e haja elevado grau de pureza do composto que está sendo estudado. O RMN é uma técnica não destrutiva e, quando aliada a equipamentos de última geração, pode ser realizada com baixa quantidade de amostra, como um miligrama (MCALPINE *et al.*, 2019; NAVARRO-VÁZQUEZ; GIL; BLINOV, 2018).

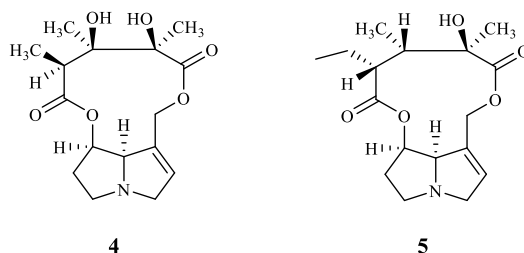
Apesar de apresentarem muitos pontos positivos, os experimentos de RMN possuem limitações e estão sujeitos, como qualquer método, a falhas humanas, tanto na interpretação dos dados quanto no manuseio do equipamento, como provam os diversos casos na literatura de

produtos naturais com atribuições incorretas para suas estruturas. A síntese total é uma alternativa para corrigir tais erros (RAO *et al.*, 2016), todavia, sua implementação demanda o uso de muitos recursos e tempo, o que a torna inviável em inúmeros cenários.

Uma alternativa para a elucidação da estereoquímica de produtos naturais, que requer um uso menor de recursos, é a utilização da química teórica computacional aliada à espectroscopia de RMN (ALVARENGA *et al.*, 2019; DA COSTA RESENDE; ALVARENGA, 2016; KRIVDIN, 2019b; MORAES *et al.*, 2018; RESENDE; ALVARENGA; WILLOUGHBY, 2015; TEIXEIRA; ALVARENGA, 2016). A análise para indicar qual estrutura candidata proposta é a correta para a molécula que está sendo estudada é feita por meio da comparação dos dados experimentais e calculados de RMN, utilizando uma variedade de métodos estatísticos, como o CP3, DP4, CMAE e MAE. Primeiramente, o MAE é uma medida dos erros entre os deslocamentos químicos calculados (δ_{calc}) e experimentais (δ_{exp}) de RMN. O DP4 procura assinalar os deslocamentos químicos calculados de RMN de um conjunto de estruturas candidatas, com os deslocamentos químicos de RMN experimentais de uma única estrutura real, de modo a verificar qual estrutura candidata possui maior similaridade com os dados de RMN experimentais. O CP3 é utilizado quando possuímos os dados de RMN experimental de duas ou mais moléculas que são diastereoisômeros entre si, e estes dados são comparados a um mesmo número de estruturas candidatas das quais possuímos os dados calculados de RMN (ERMANIS *et al.*, 2017; GRIMBLAT; SAROTTI, 2016; SMITH; GOODMAN, 2009, 2010).

Nosso grupo de pesquisa já trabalhou com plantas do gênero *Crotalaria*, nomeadamente a *Crotalaria paulina* L, isolando e identificando, por métodos espectroscópicos auxiliados por cálculos teóricos computacionais, os alcaloides Monocrotalina (**4**) e Etilcrotalina (**5**) (Figura 19, página 58) (OLIVEIRA *et al.*, 2017, 2018). Os alcaloides macrocíclicos possuem uma amina terciária conhecida como “base necina” (FU *et al.*, 2004), que é composta por anéis fundidos de cinco membros com cabeças de ponte contendo átomos de carbono e nitrogênio, além de uma dupla ligação na posição C1-C2.

Figura 19 - Alcaloides macrocíclicos isolados da *Crotalaria paulina* L.



Fonte: O autor

Continuando a linha de nosso grupo de pesquisa – focada em síntese de novas moléculas bioativas (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019), isolamento de produtos naturais (SEIXAS *et al.*, 2018) e elucidação estrutural (CASTANEDA *et al.*, 2019) – nesse trabalho apresentaremos o processo de isolamento e de elucidação estrutural de um novo alcaloide pirrolizidínico (**6h**) extraído da *Crotalaria retusa* L. O isolamento e a purificação do alcaloide, que serão brevemente abordados nesse texto, foram realizados pela pesquisadora Gabriella Almeida de Moura. A combinação de experimentos de RMN com cálculos de DFT foi utilizada para propor a estrutura desse alcaloide. A parte de elucidação do alcaloide foi realizada pelo autor dessa tese.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Material vegetal

As sementes da *Crotalaria retusa* L. foram cultivadas no jardim da Horta Velha, no campus da Universidade Federal de Viçosa, e as partes aéreas foram colhidas entre setembro e novembro de 2017. Uma exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Viçosa sob o número VIC 45165.

3.2.2 Extração e isolamento

As folhas coletadas da *Crotalaria retusa* L. (8 kg) foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar forçada, à temperatura de 50 °C durante o período de 24 horas. Em seguida, as folhas secas (1 kg) foram trituradas em um liquidificador Willy (TECNAL equipment, TE 650, Brasil). Após as folhas serem trituradas, elas foram transferidas para um recipiente, sendo adicionado etanol (1 L) para a realização da extração. Durante 24 horas, a mistura entre o pó das folhas e o solvente foi agitada em intervalos de tempos regulares, à temperatura ambiente. Completado esse tempo, o solvente foi separado por filtração simples e o resíduo foi extraído mais uma vez com um litro de etanol. Esse processo foi repetido três vezes, totalizando três litros de extrato etanólico. O solvente foi removido sobre pressão reduzida, à temperatura de 40 °C, levando a um extrato cru de 98 g. O resíduo foi adicionado a 200 mL de uma mistura 1:1 (V/V) ácido sulfúrico e clorofórmio, a qual foi separada utilizando um funil de separação. A fração ácida resultante foi submetida duas vezes a uma extração com 50 mL de clorofórmio, a fim de separar a fração dos alcaloides ionizados das demais aminas presente na mistura. Logo após, foi adicionado 5 g de pó de zinco à fração ácida, a qual ficou

sobre repouso por cinco horas a pH controlado entre 1 e 2, com a finalidade de reduzir os *N*-óxidos de aminas. Hidróxido de amônio aquoso (25%) foi utilizado para ajustar o pH do meio para valores alcalinos (12 a 14), sendo, em seguida, extraída a mistura com etanol e clorofórmio (4:1, 3 vezes, 25 mL). As frações orgânicas foram concentradas à pressão reduzida e o resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de sílica-gel, levando à obtenção de 32,9 mg do alcaloide pirrolizidínico (OLIVEIRA *et al.*, 2018; TRIGO *et al.*, 1996).

O alcaloide isolado (32,9 mg), obtido após a purificação por coluna de sílica gel, foi submetido à análise no HPLC em modo isocrático, utilizando uma mistura de água:acetonitrila:hidróxido de amônio (65:35:0,5 V/V) a pH $11 \pm 0,5$, pelo período de 16 minutos. Foi injetado manualmente um volume de 20 μ L. O fluxo da mistura foi mantido constante a uma velocidade de 0,7 mL/min utilizando uma coluna de C18, com dimensões 250.00 mm x 3.0 mm 5 μ m. Os dados cromatográficos foram obtidos, analisados e armazenados em 210 nm. As frações foram liofilizadas levando a 5,3 mg do alcaloide pirrolizidínico (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

3.2.3 Instrumentação

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance DRX-400 400 MHz. A temperatura do instrumento de RMN foi controlada em 25 °C durante a aquisição dos espectros. Os deslocamentos químicos foram salvos na unidade de δ em ppm e as constantes de acoplamento em Hz. Os deslocamentos químicos foram referenciados segundo o resíduo de CHD₂OD ($\delta = 3,1$ ppm) para os espectros de ¹H e CD₃OD ($\delta = 49,0$ ppm) para os espectros de ¹³C.

3.2.4 Parte computacional

A busca conformacional foi realizada para as oitos estruturas candidatas **6a-6h** (Figura 20, página 62), valendo-se do programa Maestro 2018-1 (versão 11.5.011) (MAESTRO; SCHRÖDINGER, 2019). Os confôrmeros foram submetidos à otimização de geometria e frequência utilizando a DFT no nível de teoria M06-2X/6-31+G(d,p). Os deslocamentos químicos foram obtidos pelos valores do tensor de blindagem do RMN, o qual foi calculado para cada estrutura candidata utilizando o nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p) no programa Gaussian 16 (FRISCH *et al.*, 2016). Os tensores de blindagem de cada núcleo foram convertidos em deslocamento químicos pela subtração dos tensores de blindagem calculados para o TMS utilizando o mesmo nível de teoria (¹H = 31,8757; ¹³C = 184,0352). Essas operações foram repetidas para cada estrutura candidata (**6a-6h**). A solvatação foi considerada nos cálculos pela

utilização do modelo contínuo IEFPCM (TOMASI; MENNUCCI; CANCÈS, 1999) durante os processos de otimização e cálculos dos tensores de blindagem.

O conjunto dos dados experimentais foi comparado ao dos dados calculados para determinar os valores de CMAE (SAROTTI, 2013). Para obter os valores de CMAE para cada estrutura candidata, uma regressão linear foi realizada em um gráfico dos deslocamentos químicos calculados (δ_{calc}) pelos deslocamentos químicos experimentais (δ_{exp}), utilizando os dados de RMN de ^1H e ^{13}C . Com os valores de coeficiente angular (inclinação da reta) e coeficiente linear (intercepto), o δ_{scaled} de cada estrutura candidata foi obtido.

Finalmente, o CMAE foi calculado pela somatória do valor absoluto de δ_{exp} e δ_{scaled} para todos os N-núcleos, dividido pelo número total de N-núcleos. Os deslocamentos químicos calculados de ^1H e ^{13}C , encontrados utilizando o nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p), bem como dados adicionais, se encontram nas **Tabela 22** (página 149) até a **Tabela 30** (página 157).

A probabilidade da qualidade do ajuste foi determinada usando o método DP4, descrito por Goodman (SMITH *et al.*, 2010). A análise de DP4 foi realizada submetendo os dados de deslocamento químico experimentais e calculados na ferramenta de análise de DP4 disponível em <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>.

3.3 Dados para o composto 6h

Fórmula molecular: $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_5$

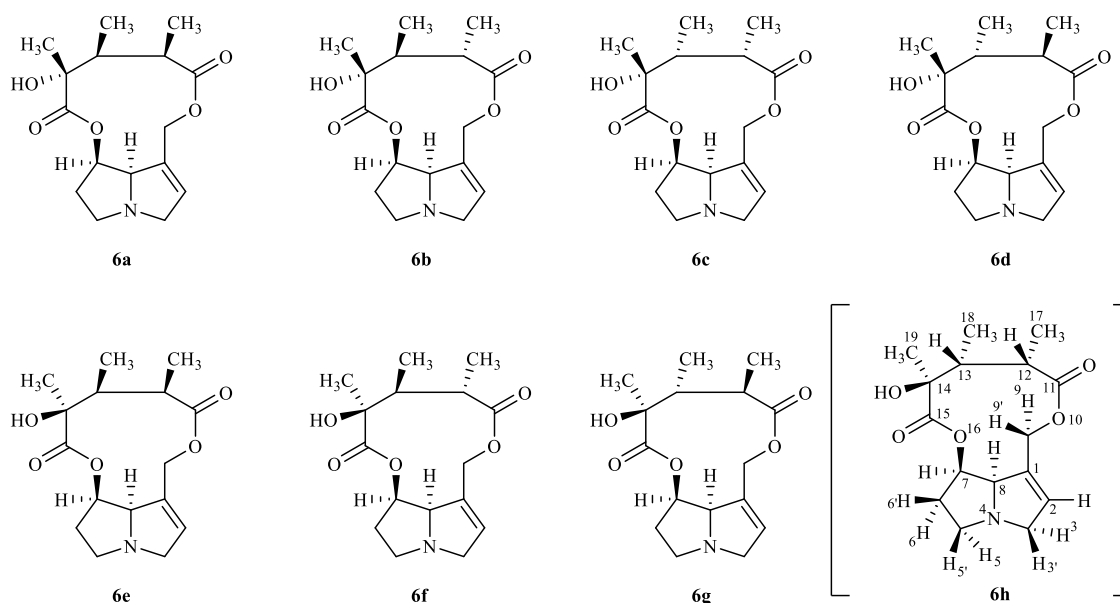
Massa molar: 309,36 g/mol

3.4 Resultados e discussão

A demanda por novas drogas para o tratamento de doenças complexas, como o câncer, tem aumentado exponencialmente no século XXI. Nesse contexto, os produtos naturais têm um papel importante, visto que muitos deles possuem bioatividades fascinantes (em alguns casos, até mesmo indesejadas), estimulando o interesse na pesquisa desses compostos para as suas aplicações farmacológicas ou até servindo como molde para a síntese de novas moléculas orgânicas (THAWABTEH *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2020). Cerca de 3% das plantas floríferas possuem algum alcaloide pirrolizidínico em sua composição, incluído o gênero *Crotalaria* (BABA; UCHENDU; NJOKU, 2019), o qual nosso grupo de pesquisa tem trabalhado nos últimos anos, isolando e identificando novos compostos (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

O extrato da *Crotalaria retusa* L. foi purificado por HPLC, obtendo-se o alcaloide, o qual foi identificado por espectroscopia de RMN associada a cálculos de DFT. Ao realizar uma análise preliminar dos dados de RMN, foi possível reconhecer a similaridade dos espectros do alcaloide isolado com outro alcaloide pirrolizidínico estudado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, a monocrotalina (**Figura 19**, página 58). Desse modo, nosso ponto de partida foi considerar a estrutura do alcaloide isolado como similar à estrutura dos alcaloides de pirrolizidina. Devido à semelhança nos deslocamentos químicos dos núcleos do esqueleto pirrolizidínico do alcaloide isolado com outros compostos reportados na literatura, decidimos alternar a estereoquímica da parte superior do macrocíclico (nos carbonos C12, C13 e C14). Essa estratégia levou a oito estruturas candidatas (**6a-6h**), possibilitando o uso mais efetivo dos recursos para os cálculos teóricos (**Figura 20**, página 62). O alcaloide pirrolizidínico possui um esqueleto de necina atrelado a um derivado do ácido pentanodióico para formar um macrociclo de onze membros. Para maior clareza na interpretação dos espectros de RMN, os hidrogênios representados acima do plano da molécula serão demarcados como Hx' (x é o número do carbono ao qual o hidrogênio está ligado).

Figura 20 - Estruturas candidatas **6a-6h**. Entre colchetes é apresentada a estrutura candidata correta (**6h**).



Fonte: O autor.

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 21**, página 66), o próton olefínico H2 foi observado como um duplete de triplete, integrado para um, em δ 6,10 ppm, com um acoplamento vicinal de 2,2 Hz com os hidrogênios H3 e H3', além de um acoplamento a longa distância (4J) de 2,1 Hz com o hidrogênio H8. Esses acoplamentos podem ser visualizados no espectro de COSY (**Figura 22**, página 67). A mesma constante de acoplamento, observada entre H2/H3 e H2/H3',

ocorre devido ao ângulo diedro ser muito similar entre esses pares de prótons (58,2° e 60,8°). Após assinalarmos o hidrogênio H2, foi simples identificar um dos carbonos olefínicos C2, como o sinal em δ 135,8 ppm no espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 23**, página 68), devido ao forte pico de correlação com H2 no HSQC experimento de correlação heteronuclear de quantum único (HSQC, do inglês *Heteronuclear Single Quantum Correlation*, **Figura 24**, página 70). O outro carbono olefínico C1 foi identificado por exclusão como o pico em δ 134,5 ppm. Além disso, pelos dados da técnica de intensificação sem distorção por transferência de polarização-135 (DEPT, do inglês *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*, **Figura 25**, página 70), o pico em δ 134,5 ppm não aparece no espectro, o que é mais uma forma de confirmar a atribuição desse sinal a C1. Ambos os carbonos – C1 e C2 – aparecem em regiões do espectro de RMN de ^{13}C características de carbonos de ligação dupla.

Prótons H3 e H3' foram assinalados, pela análise dos mapas de contorno COSY (**Figura 22**, página 67), como os multipletos, integrados para um, em δ 3,79 - 3,90 e 3,44 - 3,54 ppm, respectivamente. Esses valores de deslocamentos químicos estão condizentes com valores encontrados na literatura para essa família de produtos naturais (NOORWALA *et al.*, 2000; RYCROFT; STIRLING; ROBINS, 1992). Além disso, ambos os átomos H3 e H3' apresentam um pico de correlação no HSQC (**Figura 24**, página 70), com o sinal assinalado para o carbono C3, em δ 61,7 ppm.

O sinal do multipletos em δ 4,30 - 4,40 ppm, integrado para um, foi atribuído ao próton H8, devido aos picos de correlação no COSY (**Figura 22**, página 67) com os prótons H3 e H3', com destaque ao pico de correção mais intenso entre H3' e H8. Outro pico de correlação forte no mapa de contorno COSY (**Figura 22**, página 67) pode ser observado entre o hidrogênio H8 e o segundo sinal mais desblindado no espectro de RMN de ^1H (**Figura 21**, página 66), δ 5,06 ppm. Esse sinal está um pouco acima da região do espectro referente a prótons α ao oxigênio da ligação simples de ésteres (3,5 a 4,8 ppm) (PAVIA *et al.*, 2010). Ao observamos as estruturas candidatas (**6a-6h**), é possível notar que há apenas três prótons α a oxigênios de grupos ésteres, sendo eles H7, H9 e H9'. Pelo espectro de HSQC (**Figura 24**, página 70), podemos perceber que o sinal em δ 5,06 ppm possui uma correlação com o carbono em δ 76,2 ppm, que, por sua vez, não possui outros picos de correlação. Assim sendo, com base nessas informações, foi possível deduzir que o duplo duplo duplete (ddd), integrado para um, em δ 5,06 ppm, corresponde ao hidrogênio H7, e o sinal em δ 76,2 ppm, ao carbono C7 ligado ao oxigênio de um dos grupos carboxílicos do alcaloide.

Os hidrogênios H6 e H6', enquanto os prótons mais blindados do esqueleto pirrolizidínico, foram assinalados ao multipletos, integrado para dois, em δ 2,03 - 2,12 ppm

graças a um pico de correlação no COSY (**Figura 22**, página 67) com H7. O mapa de contorno COSY (**Figura 22**, página 67) também mostra picos de correção dos prótons H6 e H6' com dois duplo duplo dupletos (ddd), integrados para um, em δ 2,66 ppm e 3,13 ppm. Ao analisarmos o HSQC (**Figura 24**, página 70), vemos que ambos os sinais se acoplam com apenas um carbono, em δ 54,1 ppm, o que indica que esses hidrogênios estão ligados ao mesmo carbono. Finalmente, pelo COSY (**Figura 22**, página 67), constatamos que esses dois sinais de prótons só possuem picos de correlação entre si e com os prótons H6 e H6'. Concluimos, assim, que esses sinais, δ 2,66 ppm e 3,13 ppm, são referentes aos pares de prótons H5/H5'.

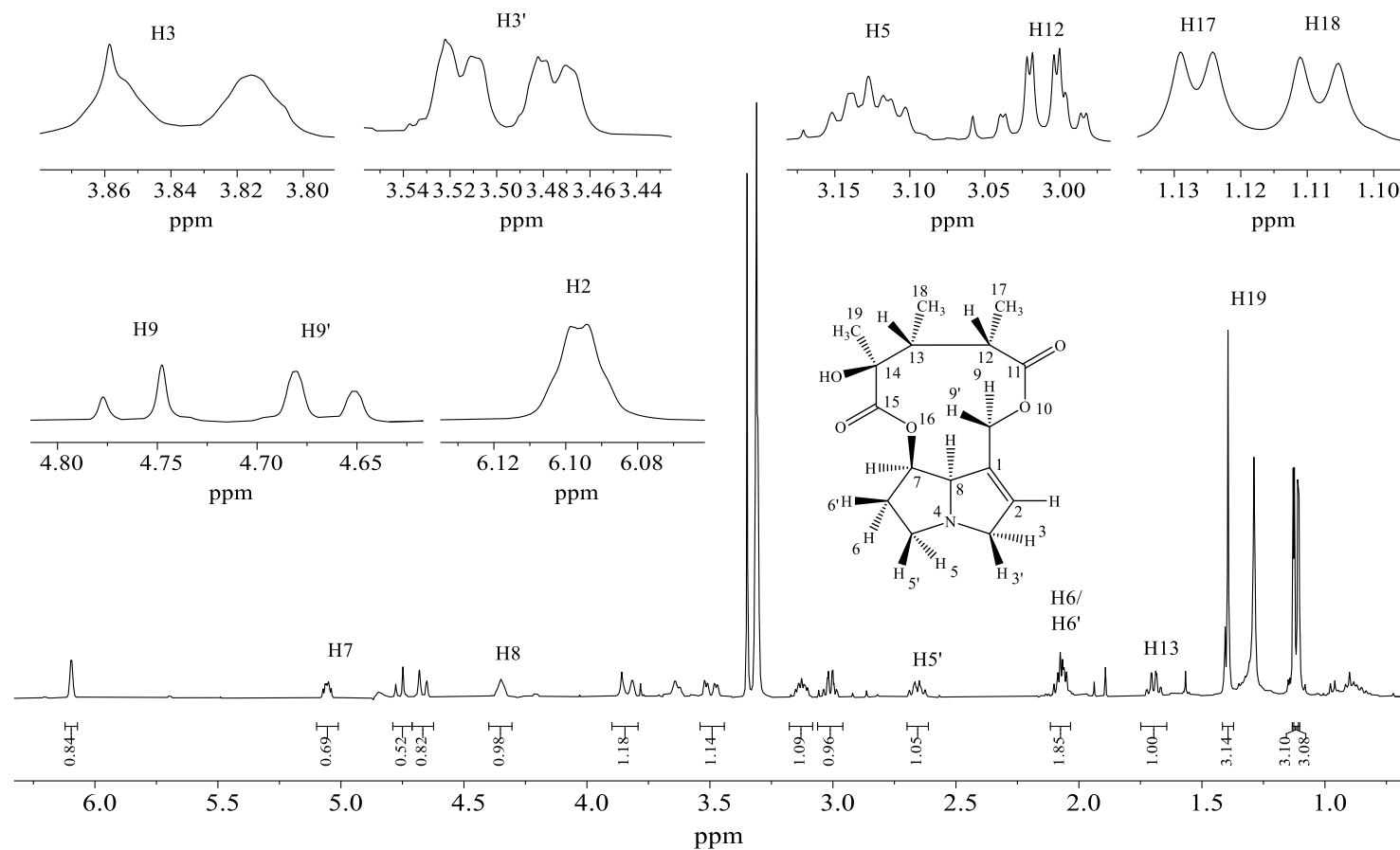
Para discernirmos com exatidão qual sinal pertence a H5 e qual pertence a H5', foi necessário realizar um estudo cuidadoso sobre as constantes de acoplamento apresentadas por seus sinais. O sinal em δ 2,66 ppm possui as seguintes constantes de acoplamento: $J = 6,8$ Hz, $9,4$ Hz e $9,4$ Hz. Já o sinal em δ 3,13 ppm apresenta menores constantes: $J = 3,8$ Hz, $6,1$ Hz e $9,4$ Hz. Com base nesses valores, podemos inferir que o próton em δ 2,66 ppm se acopla mais fortemente com seus vizinhos (H6 e H6') do que o próton em δ 3,13 ppm. Um fator que influencia diretamente a constante de acoplamento é o ângulo diedro entre os prótons. Os ângulos diedros, na estrutura candidata **6h**, entre H5/H6, H5/H6', H5'/H6 e H5'/H6' são importantes para relacionarmos as constantes de acoplamento com os prótons H5 e H5'. Os ângulos diedros entre H5/H6 e H5'/H6' apresentam valores similares ($44,1^\circ$ e $41,8^\circ$), o que indica que eles devem possuir valores de J próximos de acordo com a equação de Karplus (THUREAU *et al.*, 2019). Entretanto, o ângulo diedro H5'/H6 é de $164,6^\circ$, o que leva a uma maior constante de acoplamento quando comparado ao ângulo diedro de $78,6^\circ$ entre H5/H6'. Então, segundo a equação de Karplus (THUREAU *et al.*, 2019), as constantes de acoplamento para H5' serão maiores do que aquelas para H5, sendo assim, o sinal δ 2,66 ppm foi assinalado a H5' e δ 3,13 ppm ao átomo H5. Os dois dupletos, integrados para um, em δ 4,76 e 4,67 ppm, foram assinalados a H9 e H9', respectivamente. Por fim, os sinais dos carbonos C5, C6, C8 e C9 foram assinalados aos sinais δ 54,1 ppm, 34,2 ppm, 77,5 ppm e 60,8 ppm, devido aos picos de correlação presentes no HSQC (**Figura 24**, página 70) com seus devidos prótons.

Passando para a análise da parte superior do macrocíclico, podemos notar pelo DEPT-135 (**Figura 25**, página 70), que três sinais de carbonos em δ 77,5 ppm, 175,9 ppm e 176,4 ppm não possuem hidrogênios. Observando as oito estruturas candidatas (**Figura 20**, página 62), concluimos que apenas três carbonos ainda não assinalados não possuem prótons ligados a si: C11, C14 e C15. Dentre eles, apenas C14 não é um carbono de carbonila, tendo ligado a si uma hidroxila. Como o deslocamento químico de carbonos carbonílicos é muito superior a carbonos ligados a hidroxilas, foi possível assinalar o sinal em δ 77,5 ppm ao carbono C14, condizente

com a região do espectro de RMN de ^{13}C para carbonos ligados a hidroxila (δ 40,0 - 80,0). Os três hidrogênios H19 são identificados como simpleto, integrado para três, em δ 1,39 ppm. Este sinal não apresenta contornos de correlação no COSY (**Figura 22**, página 67), demonstrando que esses prótons não possuem hidrogênios vizinhos. Pelo espectro de HSQC (**Figura 24**, página 70), é possível observar um pico de correlação entre H19 e o carbono C19 em δ 27,1 ppm. O sinal do carbono de C15 foi assinalado ao sinal em δ 175,9 ppm por conta de um pico de correlação com H19 no HMBC (**Figura 26**, página 71). Por fim, o sinal mais desblindado do espectro de RMN de ^{13}C foi atribuído ao carbono carbonílico em δ 176,4 ppm.

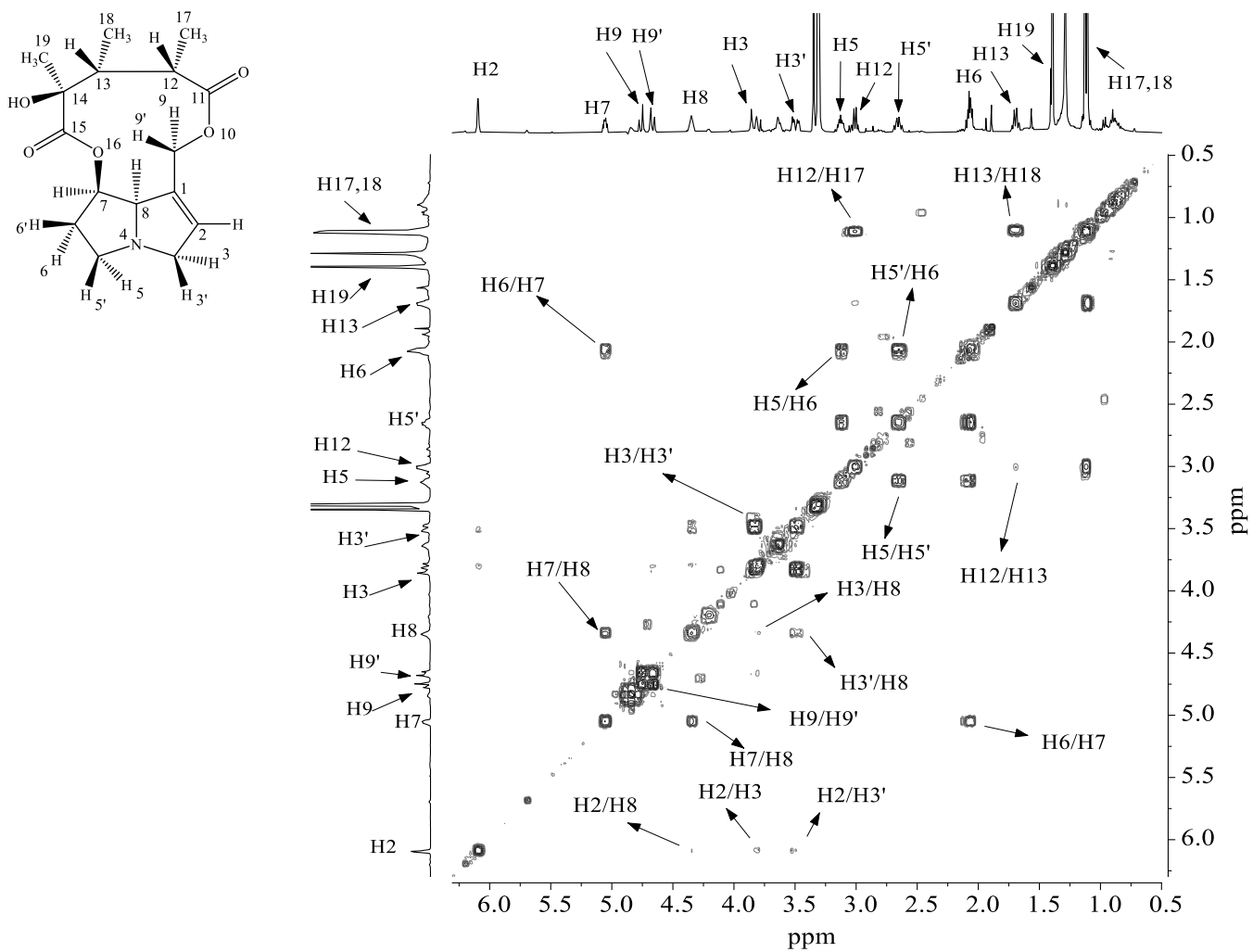
Os dupletos de quartetos (dq), integrados para um – H12 e H13 – foram atribuídos aos sinais em δ 3,01 ppm e 1,70 ppm, respectivamente. O átomo H12 foi atribuído ao duplete de quarteto mais desblindado por estar na posição α à carbonila em C11. O duplete de quarteto mais blindado foi assinalado ao próton H13, tanto por ele ser vizinho ao carbono da hidroxila quanto pelo seu pico de correção com C14 no HMBC (**Figura 26**, página 71). O duplete, integrado para três, do próton mais desblindado em δ 1,11 ppm, foi atribuído a H18, devido à sua constante de acoplamento ($J = 7,5$ Hz) possuir o mesmo valor de uma das duas constantes de acoplamento do duplete de quarteto de H13. De modo similar, H17 foi assinalado ao duplete, integrado para três, em δ 1,12 ppm, por possuir a mesma constante de acoplamento ($J = 7,2$ Hz) que o duplete de quarteto em H12. Por último, os sinais dos carbonos C12, C13, C17 e C18 foram assinalados aos sinais δ 38,5 ppm, 50,0 ppm, 18,5 ppm e 11,3 ppm por causa dos picos de correlação com seus devidos prótons presentes no HSQC (**Figura 24**, página 70).

Após assinalar todos os sinais, começando pelo RMN de ^1H (**Figura 21**, página 66) e COSY (**Figura 22**, página 67), foi possível estabelecer os sistemas de spin: **A** $\text{CH}_2(\text{C}5)\text{-CH}_2(\text{C}6)\text{-CH}(\text{C}7)\text{-CH}(\text{C}8)\text{-C}(\text{C}1)\text{-CH}(\text{C}2)\text{-CH}_2(\text{C}3)\text{-}[\text{CH}_2(\text{C}9)]$; **B** $\text{CH}_3(\text{C}17)\text{-CH}(\text{C}12)\text{-CH}(\text{C}13)\text{-CH}_3(\text{C}18)$; **C** $\text{CH}_3(\text{C}19)$. O próximo passo foi analisar o espectro de HMBC (**Figura 26**, página 71) para estabelecer como os carbonos hidrogenados e não hidrogenados estavam conectados entre si. As correlações de C1 para H9, C5 para H3 e C8 para H2 são evidências da conectividade do esqueleto pirrolizidínico (fração **A**). Os picos de correlação C14/H13, C14/H18, C14/H19 e C13/H19 no HMBC (**Figura 26**, página 71) indicam que os sistemas **B** e **C** estão interconectados através do carbono quaternário C14 (C-OH), definindo a sequência de ligação C11-C12-C13-C14-C15. A posição relativa da carbonila C11 foi definida pelas correlações com H9 e H12, bem como a carbonila C15, com as correlações com H13 e H19. Dessa forma, a estrutura do produto natural foi estabelecida como um alcaloide de pirrolizidina com um macrociclo de onze membros, tal como ilustra a **Figura 27** (página 72).

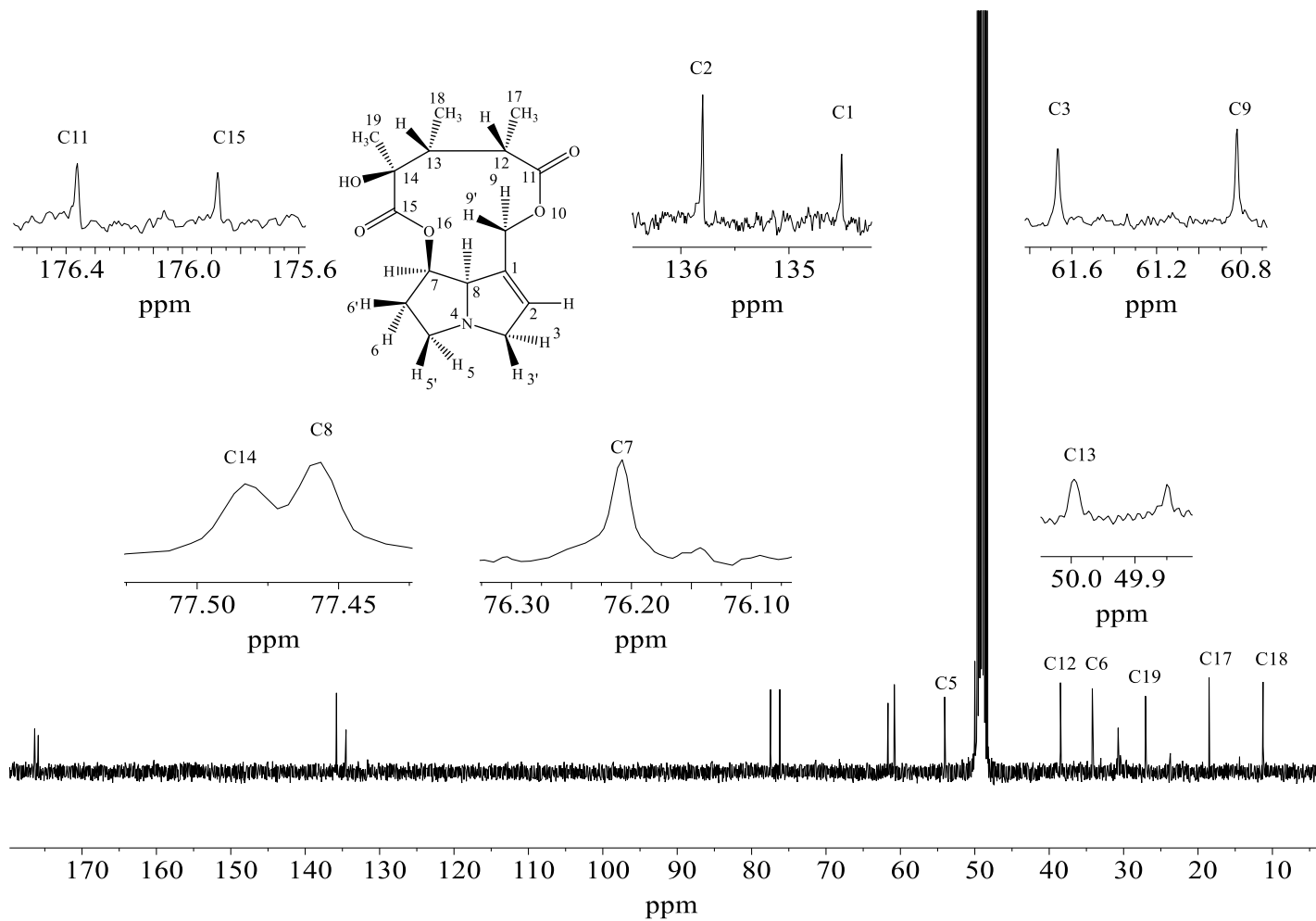
Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD , 25 °C) do composto **6h**.

Fonte: O autor.

Figura 22 - Correlações COSY para o composto **6h**.

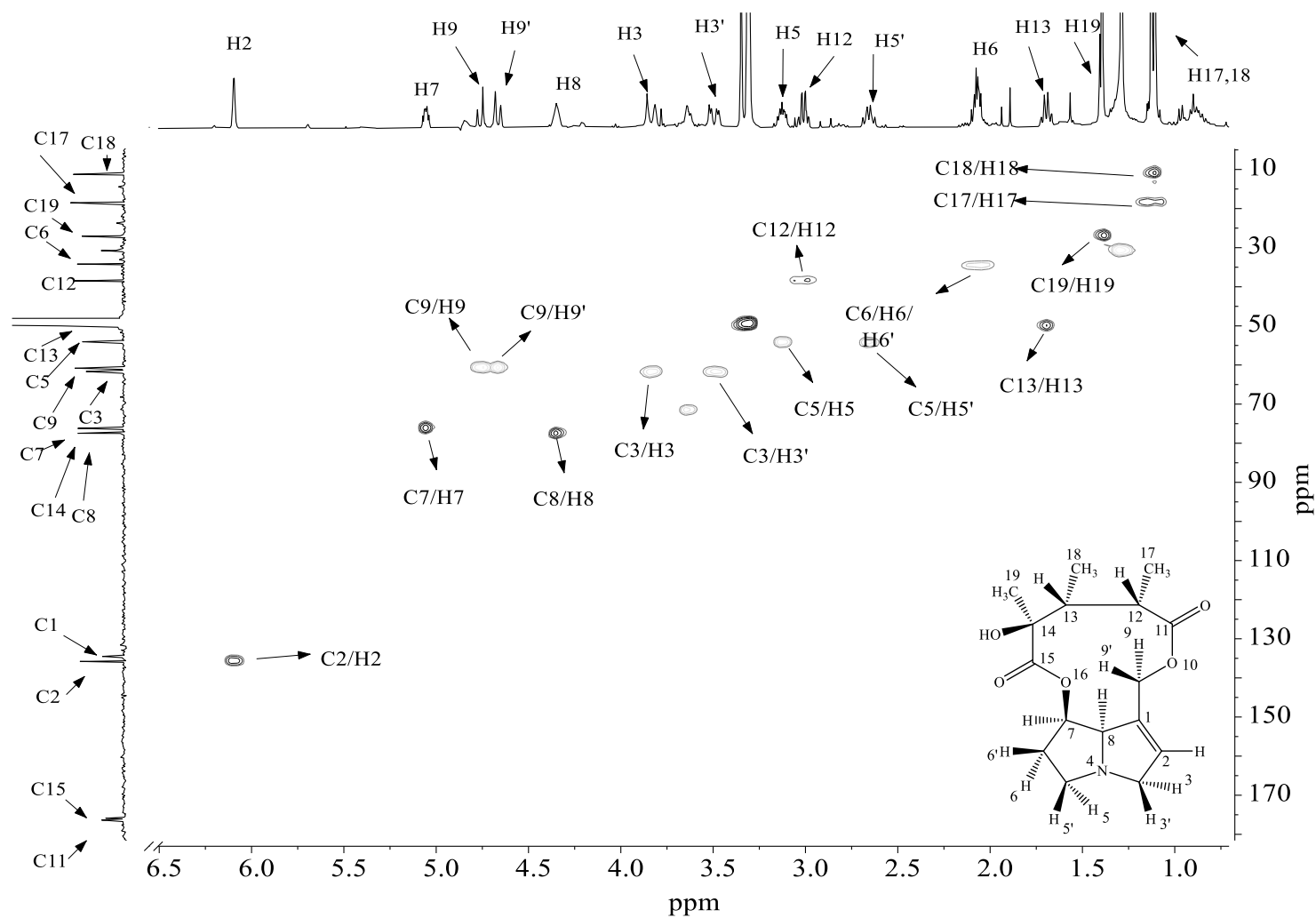


Fonte: O autor.

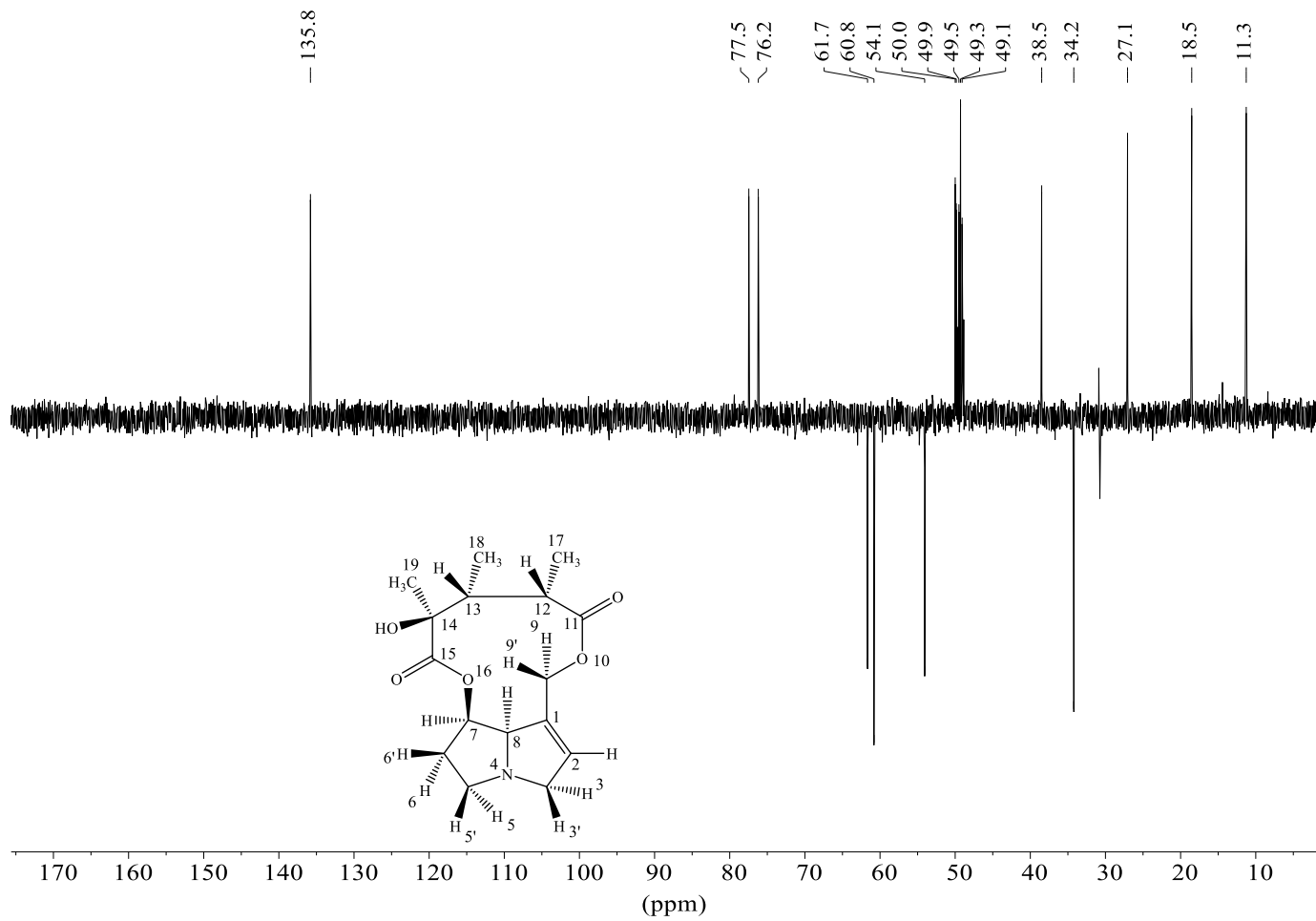
Figura 23 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , 25 °C) do composto **6h**.

Fonte: O autor.

Figura 24 - Correlações HSQC para o composto **6h**.

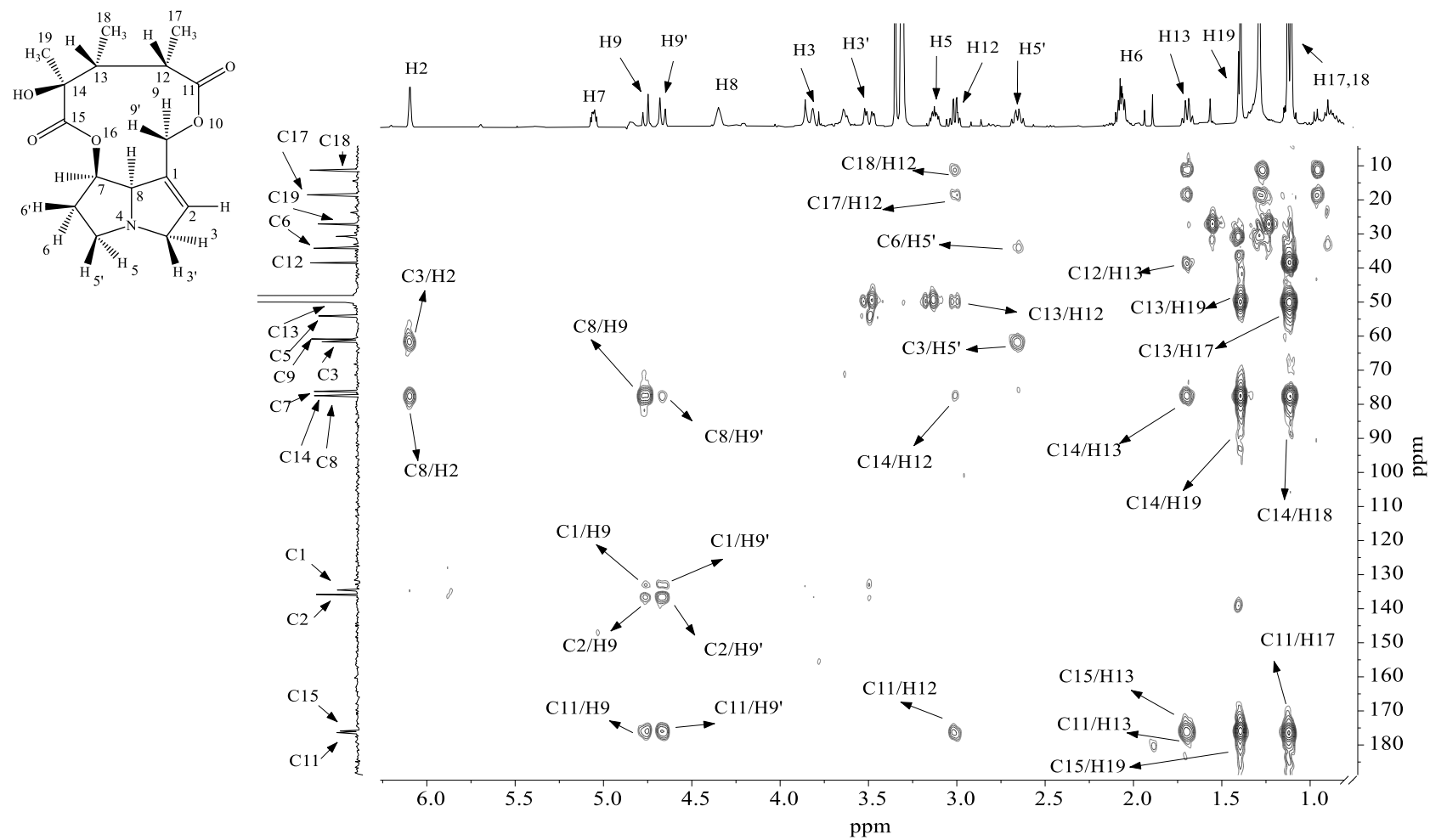


Fonte: O autor.

Figura 25 - Espectro DEPT-135 (100 MHz, CD₃OD, 25 °C) do composto **6h**.

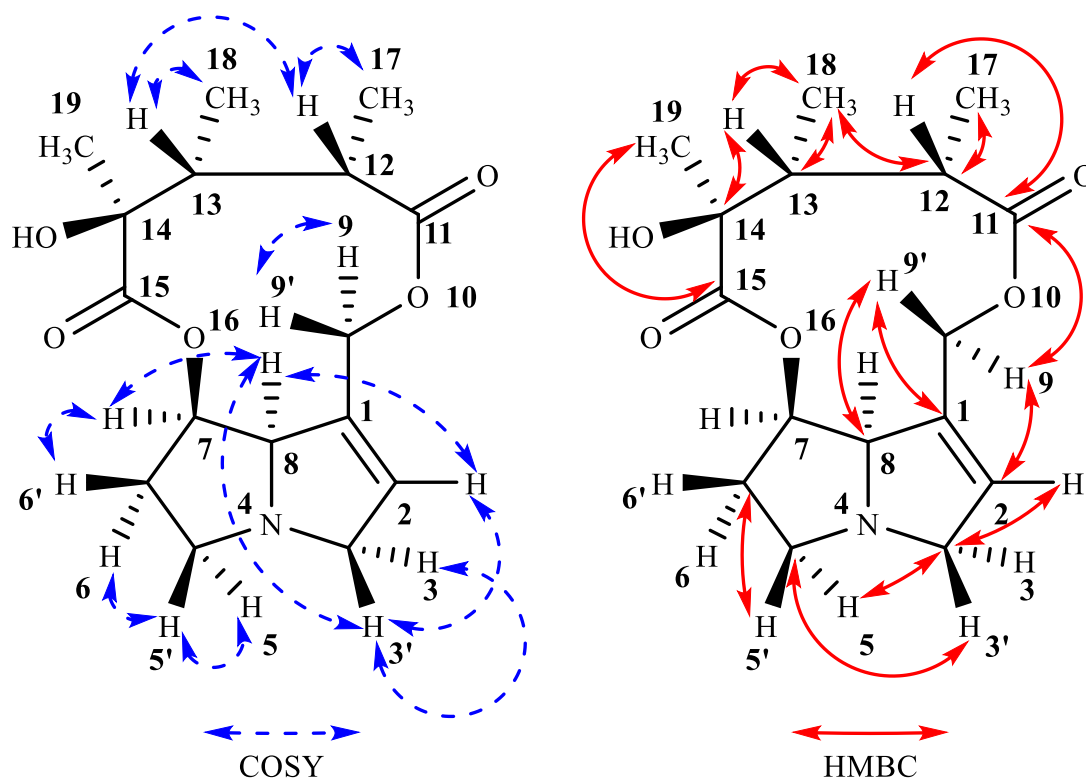
Fonte: O autor.

Figura 26 - Correlações HMBC para o composto 6h.



Fonte: O autor.

Figura 27 - Correlações chaves de COSY e HMBC para o composto **6h**.



Fonte: O autor.

A estereoquímica relativa da molécula inédita proveniente da *Crotalaria retusa* L. foi confirmada pelo uso de cálculos teóricos de deslocamento químico de RMN de ^1H e ^{13}C utilizando as estruturas candidatas, **6a-6h** (Figura 20, página 62). Os cálculos foram realizados no nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p) e os deslocamentos químicos calculados foram comparados por métodos estatísticos com os dados experimentais de RMN. Para avaliar a similaridade entre os dados teóricos e experimentais (Tabela 4, página 73), os métodos DP4 e CMAE foram empregados.

Tabela 4 - Dados de RMN para o composto **6h** em CD₃OD: Deslocamento químico experimental (δ_{exp}), multiplicidade (m), constantes de acoplamento (J), picos de correlação COSY e HMBC.

Átomo	δ_{Cexp} (ppm)	Átomo	δ_{Hexp} ppm (m, J Hz, nH)	COSY	HMBC
C1	134,5	-	-	-	H9, H9'
C2	135,8	H2	6,10 (dt, $J = 2,2$ Hz, 2,1 Hz, 1H)	H3, H3', H8	H9, H9'
C3	61,7	H3	3,83 (m, 1H)	H2, H3', H8,	H2, H5, H5'
		H3'	3,50 (m, 1H)	H2, H3, H8	-
C5	54,1	H5	3,13 (ddd, $J = 3,8$ Hz, 6,1 Hz, 9,4 Hz, 1H)	H5', H6/H6'	H3, H3'
		H5'	2,66 (ddd, $J = 6,8$ Hz, 9,4 Hz, 9,4 Hz, 1H)	H5, H6/H6'	-
C6	34,2	H6/H6'	2,07 (m, 2H)	H5, H5', H7	H5, H5'
C7	76,2	H7	5,06 (ddd, $J = 3,0$ Hz, 4,3 Hz, 5,9 Hz, 1H)	H6, H6', H8	-
C8	77,5	H8	4,35 (m, 1H)	H2, H3, H3', H7	H2, H9, H9'
C9	60,8	H9	4,76 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H)	H9'	H2
		H9'	4,67 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H)	H9	-
C11	176,4	-	-	-	H9, H9', H12, H13, H17
C12	38,5	H12	3,01 (dq, $J = 1,6$ Hz, 7,2 Hz, 1H)	H13, H17	H13, H17, H18
C13	50,0	H13	1,70 (dq, $J = 1,6$ Hz, 7,5 Hz, 1H)	H12, H18	H12, H17, H18, H19
C14	77,5	-	-	-	H12, H13, H18, H19
C15	175,9	-	-	-	H13, H19
C17	18,5	H17	1,12 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H)	H12	H12, H13
C18	11,3	H18	1,11 (d, $J = 7,5$ Hz, 3H)	H13	H12, H13
C19	27,1	H19	1,39 (s, 3H)	-	-

As análises DP4 e CMAE foram efetuadas após a correlação linear dos deslocamentos químicos calculados de ^1H e ^{13}C para as estruturas candidatas (**6a-6h**). A análise por regressão linear, seguida por correção dos valores de deslocamentos químicos calculados, foi realizada no programa Microsoft Excel. Os deslocamentos químicos dos carbonos carbonílicos (C11 e C15) não foram levados em conta durante a análise de regressão linear para a correção dos deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^{13}C .

A análise CMAE foi feita a partir do programa Microsoft Excel. Os deslocamentos químicos calculados de RMN para a estrutura **6h** apresentaram o melhor ajuste com os dados experimentais de RMN (0,08 para RMN de ^1H e 0,96 para RMN de ^{13}C). A **Tabela 5** (página 74) possui os resultados compilados para a análise estatística de CMAE.

Tabela 5 - Análise CMAE e DP4 para os dados de RMN de ^1H e ^{13}C para as estruturas candidatas **6a-6h** após assinalar os sinais.

Estruturas candidatas	CMAE		Probabilidade DP4 (%)		
	^1H	^{13}C	^{13}C e ^1H	^{13}C	^1H
6a	0,19	1,84	0	0,2	0
6b	0,19	1,80	0	0,0	0
6c	0,21	1,84	0	0,1	0
6d	0,19	2,13	0	0,0	0
6e	0,20	1,49	0	2,6	0
6f	0,15	1,51	0	1,5	0,0
6g	0,23	1,45	0	1,5	0
6h	0,08	0,96	100,0	94,2	100,0

Para a análise estatística DP4, os deslocamentos químicos experimentais e calculados de cada estrutura candidata foram organizados e transferidos para a ferramenta on-line no site <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>, a qual, automaticamente, executa a análise DP4. De acordo com os resultados do DP4 (**Tabela 5**, página 74), a estrutura candidata **6h** apresenta o melhor ajuste com dados experimentais de RMN. A estrutura candidata **6h** obteve 100% de probabilidade na análise DP4 ao serem considerados, de forma conjunta, os dados de RMN de próton e carbono. Quando as probabilidades para carbono e hidrogênio utilizando o DP4 foram calculadas separadamente, obteve-se os valores 94,2% e 100%, respectivamente.

Em suma, mediante a interpretação cuidadosa dos dados de RMN, alinhada a cálculos computacionais de DFT, foi possível identificar o produto natural isolado da *Crotalaria retusa* L. como o alcaloide pirrolizidínico representado pela estrutura cãndida **6h** (**Figura 20**, página 62).

3.5 Conclusão

Um alcaloide pirrolizidínico inédito foi isolado da planta *Crotalaria retusa* L. e sua estrutura foi identificada pela combinação da análise de espectros de RMN (^1H , ^{13}C e bidimensionais) em conjunto com cálculos computacionais de DFT. A estrutura do alcaloide pirrolizidínico isolada foi determinada como a molécula (3*S**,4*R**,5*S**,8a¹*R**,13a*R**)-3-hidroxi-3,4,5-trimetil-4,5,8,8a¹,10,12,13,13a-octahidro-2*H*-[1,6]dioxacicoundecino[2,3,4-*gh*]pirrolizina-2,6(3*H*)-diona (**6h**). O uso de métodos computacionais da mecânica quântica, experimentos de RMN e métodos de análise estatística (DP4 e CMAE) foram cruciais para a elucidação completa da estereoquímica relativa do produto natural.

Devido à baixa quantidade de amostra disponível, não foi possível conduzir outras análises, como infravermelho e espectro de massa de alta resolução, para ajudar na identificação do produto natural. Espera-se que, em uma nova etapa dessa pesquisa, seja possível obter uma maior quantidade de extrato da *Crotalaria retusa* L., a fim de realizar as análises espectroscópicas restantes, bem como outros testes biológicos para avaliar seu potencial como agroquímico ou fármaco.

4 CAPÍTULO III: Elucidação estrutural por RMN assistido por cálculos de DFT de um novo produto natural da *Conchocarpus mastigophorus* (Rutaceae)

4.1 Introdução

O desenvolvimento de novas substâncias para o tratamento de doenças humanas ou para a proteção das plantações são pontos-chaves de interesse para os químicos ao redor do mundo. Uma das melhores estratégias utilizadas nesse ramo consiste em investigar as moléculas obtidas da fauna e da flora contra os sítios ativos de proteínas responsáveis por doenças, sejam elas de humanos, de animais ou de plantas (LU *et al.*, 2019). Os produtos naturais ainda podem ser úteis como fonte de inspiração estrutural para novas moléculas sintéticas com elevada seletividade para combater a doença ou praga alvo, além de baixa toxicidade ao meio ambiente e aos seres vivos. A fauna e a flora brasileiras apresentam uma biodiversidade ímpar na natureza (COLLI-SILVA; PIRANI, 2019), com incontáveis substâncias que ainda não foram estudadas ou sequer identificadas, possuindo, um imensurável potencial para novos agroquímicos e fármacos. Um exemplo de planta com grande potencial para a pesquisa química é a *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki (**Figura 28**, página 77), pertencente à família Rutaceae, a qual é endêmica do Brasil. Nos últimos anos, pesquisas destacam a vasta constituição química que algumas plantas *Conchocarpus* possuem, por exemplo, a presença de metabólitos secundários como alcaloides (A. GARCIA CORTEZ *et al.*, 2009), cumarinas (CABRAL *et al.*, 2012), flavonoides (BELLETE *et al.*, 2012) e terpenos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016). Apesar dessa riqueza biológica, menos de um quarto das cinquenta e duas espécies conhecidas de *Conchocarpus* – incluindo a *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki – foram estudadas para um melhor entendimento dos seus potenciais químicos e biológicos (GROPPO *et al.*, 2019).

Figura 28 - Planta *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki.



Fonte: O autor.

Alcaloides acridonas são produtos naturais típicos da família Rutaceae e um dos mais comuns alcaloides encontrados do gênero *Conchocarpus* (MICHAEL, 2017). A literatura apresenta alguns exemplos de espécies de plantas do gênero *Conchocarpus* com alcaloides acridonas, como: *C. marginatus*; *C. inopinatus* (BELLETE *et al.*, 2012), *C. coeruleus*; *C. rubrus* (AMBROZIN *et al.*, 2005) e *C. paniculatus* (VIEIRA *et al.*, 1992). É importante enfatizar que, na literatura, algumas dessas plantas são conhecidas por outros nomes, dados antes de sua reclassificação, a saber, *Conchocarpus marginatus* era conhecida como *Angostura paniculate* (KALLUNKI; PIRANI, 1998), enquanto *Conchocarpus rubrus* e *Conchocarpus coeruleus* já pertenceram ao extinto gênero *Almeidea* (POLESELLI BRUNIERA; KALLUNKI; GROPPPO, 2015). Muitos estudos realizados nos últimos trinta anos têm evidenciado importantes atividades biológicas dos alcaloides acridonas, como antiviral (SEPULVEDA *et al.*, 2013), moluscicida (VIEIRA *et al.*, 1992), antiparasitário (*C. MATASYOH et al.*, 2011), citotóxico (TENG *et al.*, 2005), anti-inflamatório (NAIDOO *et al.*, 2005), antimicrobiano (CHANSRINIYOM *et al.*, 2009) e inibidor de enzimas.

O gênero *Conchocarpus* possui outros produtos naturais além dos alcaloides acridonas. Vários tipos de alcaloides, incluindo piranoquinolin-2-onas, foram isoladas das folhas e do caule da *Conchocarpus fontanesianus*, uma espécie nativa da Floresta Atlântica e popularmente conhecida como “pitaguará” (CABRAL *et al.*, 2016). Piranoquinolin-2-onas e piperidin-2-onas possuem em comum a presença de um anel δ -lactama em suas estruturas. Apesar da presença

das piranoquinolin-2-onas nas espécies *Conchocarpus* (AMBROZIN *et al.*, 2008), não há relatos na literatura sobre a presença da piperidin-2-onas nesse gênero.

Lactamas são um dos produtos naturais mais icônicos, pois o primeiro antibiótico descoberto pela humanidade foi a penicilina, uma β -lactama produzida pelo fungo *Penicillium Rubens* (GAYNES, 2017). Esses compostos heterocíclicos, com anéis de quatro a sete membros, são normalmente encontrados em fungos, além de existir relatos deles em plantas, bactérias e animais (CARUANO; MUCCIOLI; ROBIETTE, 2016). Esses compostos apresentam uma bioatividade com potencial de utilização como antibióticos (YIMER; HISHE; TUEM, 2019), anti-histamínico (ALAGAR YADAV *et al.*, 2015) e antiangiogênicos (SYED, 2017). A maior parte da literatura sobre as atividades biológicas das lactamas estão focadas nas β -lactamas e seu uso como antibióticos (penicilinas, cefalosporinas e monobactamas) (LISTRO *et al.*, 2020), entretanto, outras classes de lactamas também tem apresentado excelentes resultados na pesquisa, como a *Dolutegravir*, uma δ -lactama utilizada no tratamento do HIV (VENTER *et al.*, 2019). Químicos orgânicos sintéticos têm demonstrado um interesse em particular pelas lactamas, não apenas pelas rotas sintéticas para derivados de β -lactamas, mas também pela modificação estratégica de selecionadas lactamas e lactonas, com o objetivo de aprimorar sua solubilidade em meio aquoso, acarretando aumento da atividade biológica (WANG *et al.*, 2020).

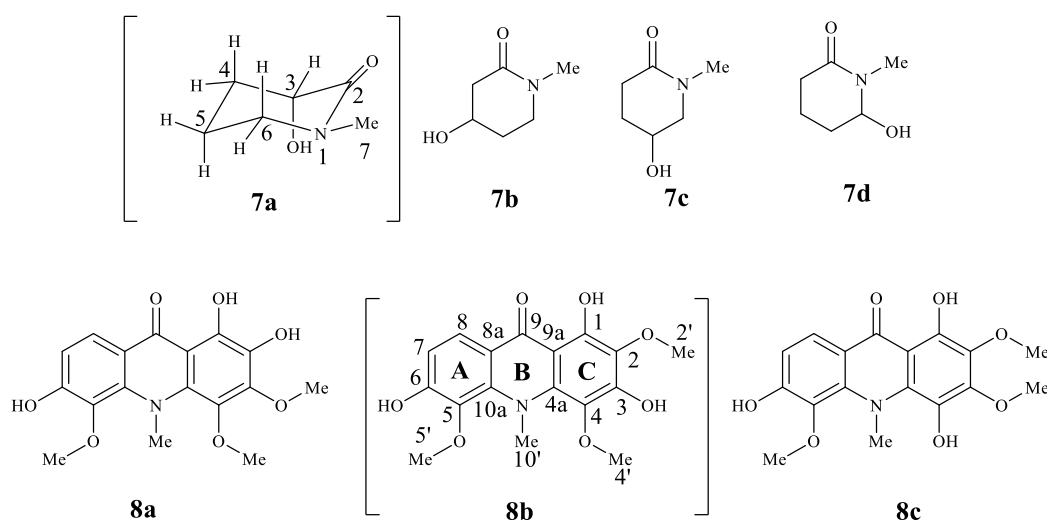
A elucidação estrutural de um novo produto natural é o primeiro passo para compreender os potenciais químicos e biológicos dessas moléculas. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma das melhores ferramentas na atualidade para realizar esta tarefa. A popularização de aparelhos de RMN com sistemas de imas de alta capacidade, chegando a alcançar valores superiores a 800 MHz, além do emprego de usos de softwares focados para a análise e tratamento de dados de espectros de RMN abriram caminho para a análise de moléculas cada vez mais complexas. Apesar de avanços consideráveis na espectroscopia de RMN nos últimos 30 anos, a técnica ainda apresenta algumas limitações. Para superar esses limites e aumentar ainda mais a sua aplicabilidade, a química computacional tem fornecido novas ferramentas para prever as propriedades espectroscópicas de compostos orgânicos. Tais ferramentas são indispensáveis durante o trabalho de identificação de novas moléculas (LAURO *et al.*, 2020).

Uma implementação típica nesse contexto visa a combinar os dados de RMN experimentais com os dados teóricos de RMN, oriundos de cálculos de mecânica quântica, para a elucidação estereoestrutural de novas moléculas orgânicas. Como cada estereoisômero possui um valor de deslocamento químico e multiplicidade característico em seus espectros de RMN

1D e 2D, os dados teóricos de RMN de um conjunto de estruturas candidatas podem ser comparados com os valores experimentais de RMN, a fim de encontrar a estrutura molecular de uma nova substância (TORRENT; ALVARENGA, 2021). Utilizando parâmetros quantitativos específicos – como o MAE ou R^2 – ou parâmetros estatísticos – como DP4 e CP3 – é possível indicar qual o conjunto de dados teóricos de RMN, referente a uma dada estrutura candidata, que melhor se adequa aos dados experimentais de RMN de um produto natural, levando, assim, à elucidação inequívoca da molécula (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

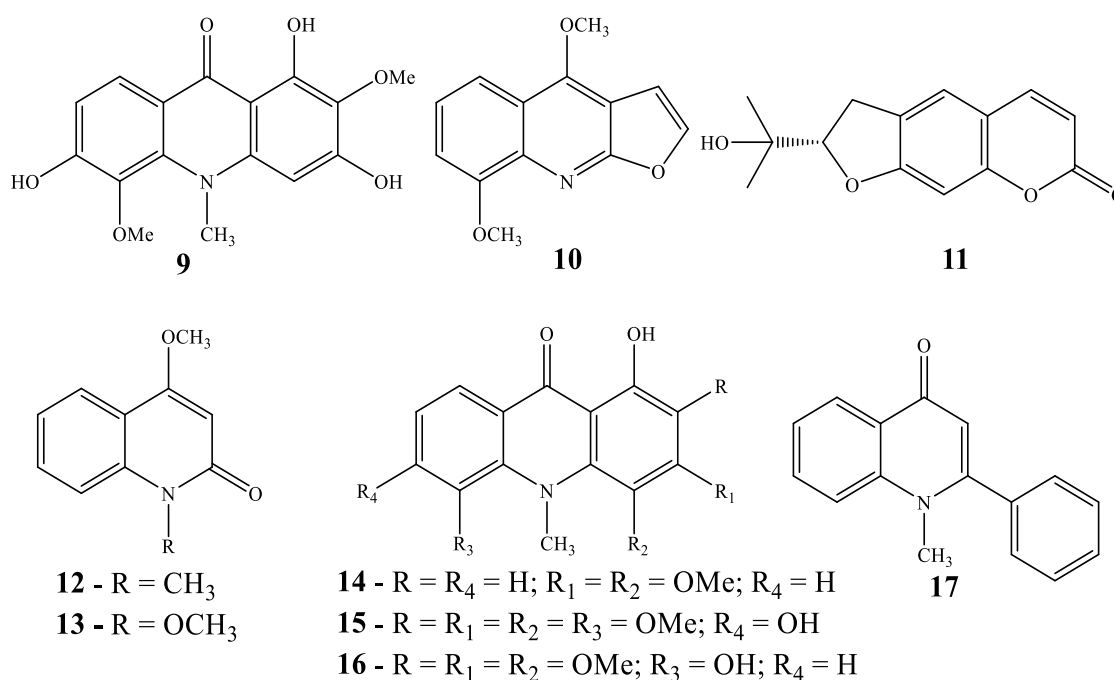
Esse trabalho tem por objetivo descrever de forma breve o isolamento de onze produtos naturais isolados do caule da *C. mastigophorus*. Dois desses compostos (**7a** e **8b**, **Figura 29**, página 79) tiveram a sua estrutura molecular elucidada pelo uso combinado de espectros de RMN e cálculos computacionais de DFT. Já os demais produtos naturais (**9-17**, **Figura 30**, página 80) foram identificados como substâncias já presentes na literatura. Os produtos naturais foram isolados e purificados pelos pesquisadores Anderson Ramos Santos e Washington Felix Oliveira. A elucidação estrutural dos compostos **7a** e **8b** foi realizada pelo autor dessa tese e será tratada de forma mais profunda nesse capítulo. O composto **7a** já havia sido relatado anteriormente na literatura (KAMAL *et al.*, 2003), porém sua elucidação completa não havia sido realizada e havia algumas críticas a atribuição dos seus sinais de RMN de ^1H . O composto **8b**, por sua vez, é uma molécula orgânica inédita.

Figura 29 - Estruturas candidatas **7a-7d** e **8a-8b** para os dois produtos naturais isolados na *Conchocarpus mastigophorus*. Entre colchetes são apresentadas as estruturas candidatas corretas (**7a** e **8b**).



Fonte: O autor.

Figura 30 - Estruturas para as moléculas conhecidas (9-17) isoladas na *Conchocarpus mastigophorus*.



Fonte: O autor.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Material vegetal

Conchocarpus mastigophorus foi coletada na fazenda “Alto da Caixa D’Água” (S13°71’804” W039°62’815”), localizada em Itamari, no estado da Bahia, sendo sua identificação feita pelo professor Dr. José Rubens Pirani. Uma amostra (#HUESB 9559) foi depositada no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (HUESB). Os autores desse trabalho obtiveram autorização de acesso ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (#A361C0C).

4.2.2 Extração e isolamento

Os caules secos ao ar da *C. mastigophorus* (2159 g) foram moídos e extraídos em três solventes, a saber, hexano (4 L), acetato de etila (4 L) e metanol (4 L). O filtrado foi evaporado e seco sob pressão reduzida em um evaporador rotativo, obtendo-se três extratos: 6,2 g em hexano; 6,7 g em acetato de etila; e 6,3 g em metanol. 1,2 g do extrato de metanol foi submetido à purificação por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando como eluente a mistura CHCl₃:MeOH (20:80), obtendo-se seis frações. A fração 6 (71 mg) foi purificada por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, utilizando como eluente metanol, obtendo-se 35

mg do composto **7a**. O extrato de acetato de etila foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando como eluente a mistura hexano:acetato de etila (100:0 até 0:100), seguido da mistura acetato de etila:metanol (100:0 até 0:100), obtendo-se vinte e três frações. A fração 19 (390 mg) foi purificada por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando o mesmo solvente do sistema, levando a três misturas: 27 mg de uma mistura dos compostos **8b** e **9** (84:16); 27 mg de uma mistura dos compostos **10** e **11**; e uma mistura de 6,5 mg dos compostos **12** e **13**. A fração 11 (249 mg) foi purificada por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando diclorometano como eluente, levando à obtenção de 22 mg do composto **14**. A fração 13 (249 mg) foi purificada pela sucessiva solubilização parcial em hexano, diclorometano e acetona, resultando em três subfrações (13.1, 13.2 e 13.3). Da subfração 13.2 obteve-se 16 mg do composto **15**. A subfração 9 (157 mg) foi purificada por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando o eluente da mistura hexano:diclorometano (30:70) levando à obtenção de 33 mg de uma mistura dos compostos **14** e **16**. A fração 22 (125 mg) foi purificada por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando como eluente uma mistura de diclorometano:acetato de etila:acetona (60:20:20), obtendo-se 18 mg do composto **17**.

4.2.3 Instrumentação

A análise de espectro de massas de alta resolução, por infusão direta, foi realizada em um espectrômetro de massas micrOTOF QII® (Bruker Daltonics, Alemanha), equipado com uma fonte de ionização microESI (eletrospray), operando em modo positivo. A amostra foi diluída em 100% de acetonitrila e acidificada com 0,1% de ácido fórmico (ambos de classe LCMS, SIGMA ALDRICH) e introduzida com uma bomba de infusão (Kd Scientific, EUA) a um fluxo de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. As colunas cromatográficas e placas de CCD (0,5 mm de espessura) foram preparadas usando sílica gel 60 (63–200 μm) Merck e GF254 Vetec, respectivamente. Vapores de iodo e luz Ultravioleta (254 e 365 nm) foram utilizados para revelar as placas de CCD. O espectro de massa por impacto eletrônico (70 eV) foi obtido utilizando o instrumento Shimadzu GCMS-QP5050A. Espectro de IV foi obtido em um espectrômetro PerkinElmer Spectrum Two™ ATR-FTIR, utilizando o método de filme fino sólido. A Rotação óptica foi obtida em um polarímetro Anton Paar MCP 300 (Anton Paar, Ashland, Virginia, EUA), à temperatura de 23 °C e 589 nm (linha D do espectro de sódio), IV e VCD foram obtidos com um espectrômetro Single-PEM ChiralIR-2X FT-VCD (BioTools, Inc., USA) em uma célula de BaF₂ com caminho óptico de 100 μm utilizando dimetilsulfóxido-*d*₆ como solvente (5 mg de amostra em 130 μL de solvente), com a resolução de 4 cm^{-1} e um tempo de aquisição de 20

horas. O retardo otimizado do modulador fotoelástico de ZnSe (PEM) foi fixado em 1400 cm^{-1} . Desvios instrumentais da linha de base foram eliminados dos espectros finais de VCD, subtraindo seus valores nos dados de VCD daqueles obtidos para o solvente sob condições idênticas.

Os espectros de RMN da lactama **7a** foram obtidos utilizando um espectrômetro Bruker Biospin AVANCE III HD 600 MHz. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm e as constantes de acoplamento em Hz. Os deslocamentos químicos foram referenciados segundo o resíduo de CHD_2OD ($\delta = 3,1\text{ ppm}$) para os espectros de ^1H e CD_3OD ($\delta = 49,0\text{ ppm}$) para os espectros de ^{13}C . Os espectros de RMN da acridona **8b** foram obtidos utilizando um espectrômetro Varian Mercury 300 MHz. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm e as constantes de acoplamento em Hz. Os deslocamentos químicos foram referenciados segundo o resíduo de $(\text{CD}_3)\text{CO}(\text{CHD}_2)$ ($\delta = 2,05\text{ ppm}$) ou CHCl_3 ($\delta = 7,26\text{ ppm}$) para o RMN de ^1H RMN e $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ($\delta = 29,8\text{ ppm}$) ou CDCl_3 ($\delta = 77,0\text{ ppm}$) para o RMN de ^{13}C RMN. Todos os espectros de RMN foram obtidos à temperatura controlada de $25\text{ }^\circ\text{C}$ durante a aquisição dos espectros.

4.2.4 Parte computacional

A busca conformacional foi realizada para cada uma das estruturas candidatas (**7a-7d** e **8a-8c**, **Figura 29**, página 79) se valendo do programa Maestro 2018-1 (versão 11.5.011) (MAESTRO; SCHRÖDINGER, 2019). Os confôrmeros foram submetidos à otimização de geometria e frequência no nível de teoria M06-2X/6-31+G(d,p). Os deslocamentos químicos foram obtidos pelos valores dos tensores de blindagem do RMN, os quais foram calculados para cada estrutura candidata utilizando o nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p) no programa Gaussian 16 (FRISCH *et al.*, 2016). Os tensores de blindagem de cada núcleo foram convertidos em deslocamento químicos pela subtração dos tensores de blindagem calculados para o TMS utilizando o mesmo nível de teoria ($^1\text{H} = 31,8757$; $^{13}\text{C} = 184,0352$). Essas operações foram repetidas para cada estrutura candidata **7a-7d** e **8a-8c**. A solvatação foi considerada nos cálculos pela utilização do modelo contínuo IEFPCM (TOMASI; MENNUCCI; CANCÈS, 1999) durante os processos de otimização e cálculos dos tensores de blindagem. A probabilidade da qualidade do ajuste foi determinada usando o método DP4, descrito por Goodman (SMITH *et al.*, 2010). A análise de DP4 foi realizada submetendo os dados de deslocamento químico experimentais e calculados na ferramenta de análise de DP4 disponível em <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>.

Os cálculos de IV e VCD foram realizados pela escolha arbitrária do enantiômero (3*S*)-**7a** no nível de teoria B3PW91/PCM(DMSO)/6-311G(d,p), sendo esse o mesmo nível de teoria utilizado para a otimização da geometria. Os espectros de IV e VCD foram criados utilizando as forças rotacionais e as forças de dipolo no programa Gaussian e convertidos em absorvidade molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Cada espectro foi plotado como uma soma das bandas lorentzianas com meia-largura e meia-altura de 6 cm^{-1} . Os números de onda calculados foram multiplicados pelo fator de escalonamento de 0,97. O espectro final foi gerado utilizando a média de Boltzmann (baseada na energia livre de Gibbs) dos confôrmeros de menor energia identificados para a molécula (3*S*)-**7a** e plotados no programa Origin.

4.3 Dados para o composto **7a**

Fórmula molecular: $C_6H_{11}NO_2$

Massa molar: 129,16 g/mol

IV (ATR, cm^{-1}) ν_{max} : 3350, 3051, 2842, 2678, 2605, 2213, 1602, 1469, 1396, 1320, 1182, 1106, 1024, 924, 845, 772, 574

EM m/z (%): 129 ($[M]^+$, 5), 85 (10), 84 (100), 82 (44), 80 (5), 70 (16), 69 (5), 68 (6), 67 (13), 57 (34), 56 (12), 55 (28), 54 (13), 53 (8)

$[\alpha]_D^{23}$: -0,021 (c 0.0483, metanol)

4.4 Dados para o composto **8b**

Fórmula molecular: $C_{17}H_{18}NO_7$

Massa molar: 347,32 g/mol

IV (ATR, cm^{-1}) ν_{max} : 3521, 3348, 2923, 1626, 1609, 1594, 1547, 1040

EM m/z (%): 347 ($[M]^+$, 74), 332 (100), 302 (14), 44 (25)

Massa Exata m/z (%): 348,10971 $[M+1]^+$

4.5 Resultados e discussão

Os substratos naturais oriundos de plantas, notórios pela sua vasta diversidade química, têm a flexibilidade para serem usados diretamente como agroquímicos e fármacos ou como uma fonte de inspiração para análogos sintéticos com maior atividade biológica, quando comparados aos substratos de partida (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009). Nesse sentido, a análise do extrato do caule da *Conchocarpus mastigophorus* resultou na purificação

e no isolamento de onze compostos, dois dos quais eram desconhecidos. Tais produtos naturais foram isolados, purificados e submetidos a análises espectroscópicas para o processo de elucidação de suas estruturas, sendo identificados como lactama **7a** e acridona **8b**, a qual é uma estrutura inédita. As estruturas candidatas **7a-7d** e **8a-8c** que se referem a essas moléculas, respectivamente, se encontram na **Figura 29** (página 79). Dito isso, a elucidação estrutural desses produtos naturais, utilizando espectros de RMN e cálculos de DFT, será apresentada em detalhes nesse capítulo.

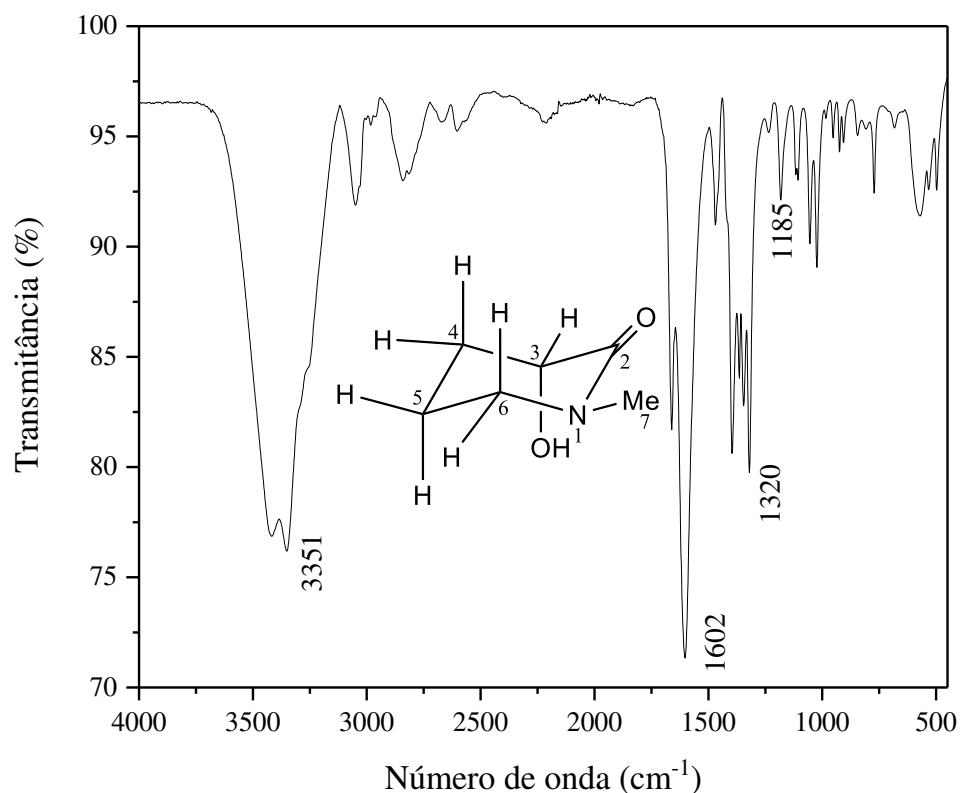
Os compostos **9** a **17** (**Figura 30**, página 80) já estão descritos na literatura, e suas estruturas foram confirmadas comparando os dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos experimentalmente com os dados na literatura. Os compostos identificados foram: citamina (**9**) (JU-ICHI *et al.*, 1988), gama-fagarina (**10**) (PAULINI; WAIBEL; SCHIMMER, 1989), marmesina (**11**) (ISIDORO *et al.*, 2012), 4-metoxi-1-metilquinolin-2(1*H*)-ona (**12**) (COPPOLA; KAHLE; SHAPIRO, 1981), haplotusina (**13**) (AMBROZIN *et al.*, 2008), citrusinina I (**14**) (WU; FURUKAWA, 1983), glifolina (**15**) (FURUKAWA; WU; KUOH, 1982), citibrasina (**16**) (WU; FURUKAWA, 1983) e 1-metil-2-fenilquinolin-4(1*H*)-ona (**17**) (BIAVATTI *et al.*, 2002). Pelo nosso conhecimento, apenas os compostos **10**, **11**, **13** e **17** foram reportados no gênero *Conchocarpus*.

4.5.1 Elucidação estrutural do composto **7a**

Os espectros de ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC, intensificação sem distorção por transferência de polarização com retenção de quaternários-135 (DEPTQ, do inglês *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer With Retention Of Quaternaries*), e 1D-NOESY foram obtidos para o primeiro produto natural desconhecido extraído da *Conchocarpus mastigophorus*. A análise dos dados desses experimentos foi utilizada para propor as estruturas candidatas dessa molécula. O espectro de IV para o composto **7a** (**Figura 31**, página 85) apresenta uma banda intensa e larga em 3351 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação O-H. Esse valor de número de onda indica que há um grupo hidroxila que pode fazer interações inter ou intramolecular. A banda em 1185 cm^{-1} é referente ao estiramento C-O, sendo mais um ponto a favor da presença da hidroxila. Uma banda intensa e fina é observada em 1602 cm^{-1} , a qual se refere ao estiramento de ligação dupla C=O, sendo esse valor de número de onda observado inferior ao mínimo da faixa de valor típica esperado para grupos carbonila, 1850 a 1610 cm^{-1} . Podemos inferir, portanto, que pelo baixo valor do número de onda observado para o grupo carbonila, esse deve pertencer a um grupo amida, porque as amidas apresentam um número de

onda menor no espectro de IV quando comparadas com suas contrapartes que contêm oxigênio (cetonas, aldeídos, ésteres etc.). Além disso, a presença do grupo hidroxila pode indicar que esse faz uma ligação de hidrogênio com o grupo carbonila, diminuindo ainda mais seu número de onda. Ressalta-se também que não se observam picos de estiramento de ligações N-H no espectro de infravermelho, apontando para uma amida alifática saturada ou uma lactama.

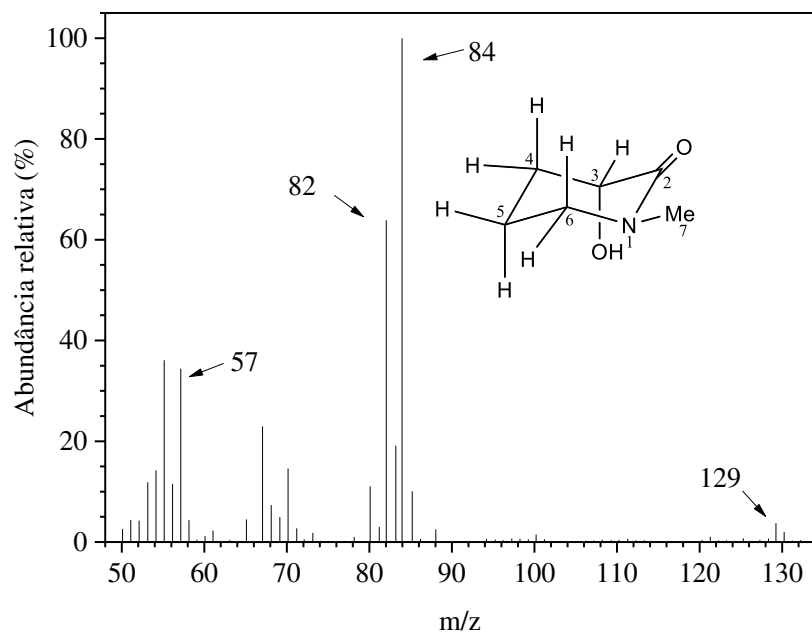
Figura 31 - Espectro de infravermelho do composto **7a**.



Fonte: O autor.

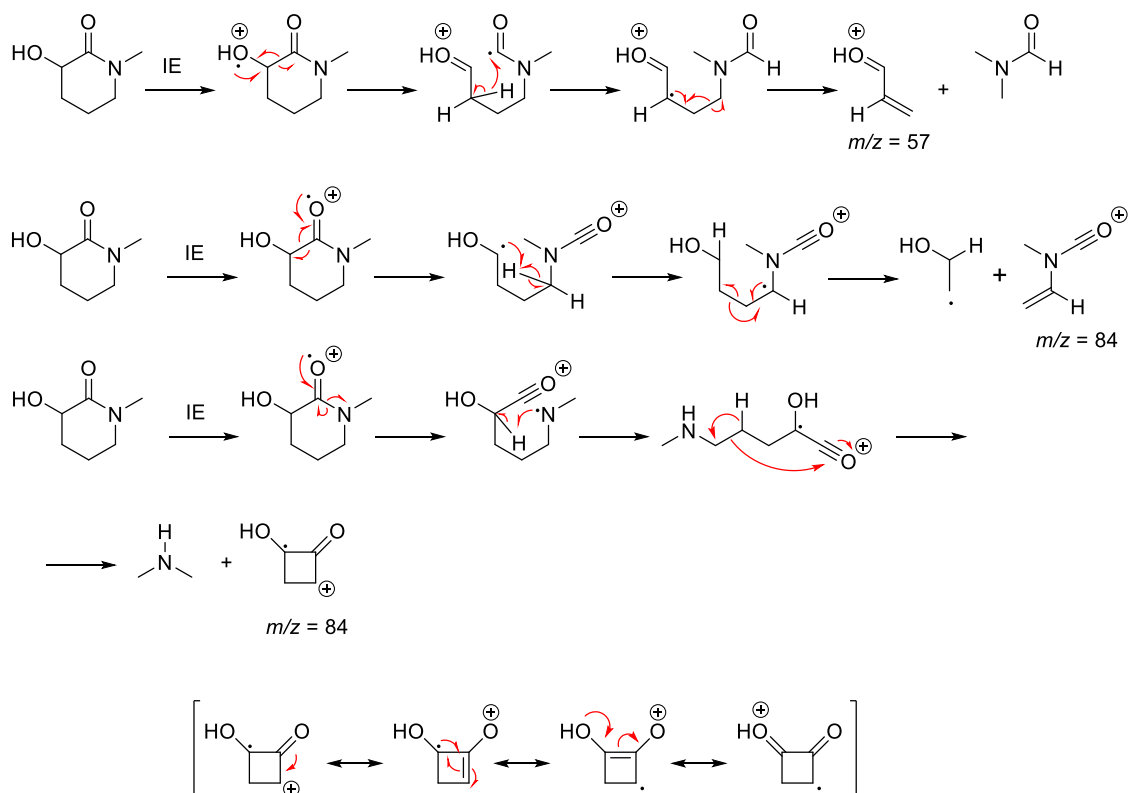
Em relação ao espectro de massas (**Figura 32**, página 86), podemos observar o pico do íon molecular em m/z 129, um valor ímpar, o que pode indicar a presença de um átomo de nitrogênio na fórmula molecular desse composto. Outrossim, o pico base em m/z 84 apresenta-se como o pico de maior intensidade, enquanto o pico em m/z 57 é característico de álcoois cíclicos de seis membros, o qual reforça a presença de uma hidroxila na molécula. A **Figura 33** (página 86) ilustra algumas propostas de fragmentação para o composto **7a**.

Figura 32 - Espectro de massas do composto **7a**.



Fonte: O autor.

Figura 33 - Proposta de fragmentação do composto **7a**.



Fonte: O autor.

Ao observamos os espectros de RMN, podemos extrair informações importantes, como: o sinal em $\delta = 173,2$ ppm, indicando a presença de um carbono sp^2 carbonílico de um grupo amida; o sinal em $\delta = 72,0$ ppm, possivelmente de um carbono sp^3 ligado a um átomo de oxigênio; e, finalmente, o sinal de um singlete em $\delta = 2,94$ ppm, região característica de prótons da ligação N-CH. Dessarte, a análise dos espectros de RMN, IR e massas, juntamente com a experiência em trabalhar com produtos naturais, nos levaram a propor quatro estruturas candidatas para a molécula, sendo elas **7a**, **7b**, **7c** e **7d** (**Figura 29**, página 79).

Os dados teóricos de deslocamento químico de RMN de ^{13}C e ^1H , para cada estrutura candidata, foram obtidos através de cálculos computacionais de DFT, ao nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p) utilizando o metanol como solvente. Em uma primeira análise, os deslocamentos químicos teóricos foram comparados com os valores de deslocamentos químicos não assinalados experimentais, a fim de averiguar se havia alguma similaridade entre os valores obtidos das estruturas candidatas e o composto analisado. Os valores de deslocamento químico, resultantes desse processo, foram organizados em tabelas e submetidos a análise de DP4 disponível no site <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>. Ademais, a qualidade do ajuste foi realizada comparando os valores de deslocamento químico de ^{13}C e ^1H experimentais com os respectivos valores de deslocamento químico de ^{13}C e ^1H teóricos para cada estrutura candidata (**7a-7d**). Consequentemente, a análise preliminar indicou que a estrutura candidata **7a** possuía 99,8% de probabilidade de ser a estrutura correta para o produto natural desconhecido, mesmo sem assinalar os deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H (**Tabela 6**, página 87).

Tabela 6 - Análise de DP4 dos dados de RMN de ^{13}C e ^1H para as estruturas candidatas **7a-7d** antes de assinalar os dados experimentais.

Estruturas candidatas	Probabilidade DP4 (%) para os dados de RMN		
	^{13}C e ^1H	^1H	^{13}C
7a	99,8	42,5	99,7
7b	0,0	27,6	0,1
7c	0,2	30,0	0,2
7d	0,0	0,0	0,0

Através da análise cuidadosa dos dados de RMN, a estrutura da lactama **7a** foi confirmada. Mediante esse procedimento, os sinais dos prótons na posição H7 foram facilmente assinalados ao singlete integrado para três em $\delta 2,94$ ppm no espectro de RMN de ^1H (**Figura 34**, página 91), uma vez que esse era o único singlete com tal multiplicidade presente no

espectro. O hidrogênio mais desblindado da molécula, H3, foi assinalado ao duplo duplete em δ 3,81 ppm, com constante de acoplamento de 9,3 e 6,9 Hz.

Os hidrogênios axiais de sistemas cíclicos similares ao cicloexano possuem duas características importantes quando comparados com os hidrogênios equatoriais. A primeira são seus valores de deslocamento químico menores, enquanto a segunda são seus maiores valores de constante de acoplamento vicinais. Levando essas características em consideração, foi possível assinalar os sinais em δ 3,13 ppm (ddd, $J = 11,4; 9,1, \text{ e } 7,5$ Hz) e δ 3,75 ppm (ddd, $J = 11,4; 7,6, \text{ e } 4,0$ Hz) aos prótons H6_{ax} e H6_{eq}, respectivamente. O par de prótons H6_{ax} e H6_{eq} apresenta picos de correlação no espectro de COSY com os multipletos em δ 1,93-2,04 ppm e δ 2,05-2,19 ppm (**Figura 35**, página 92), indicando que esses multipletos deveriam pertencer aos prótons H5_{ax} e H5_{eq}, ao passo que o multipletos em δ 1,93-2,04 ppm estava integrado para um, já o multipletos em δ 2,05-2,19 ppm estava integrado para dois, o que indicava a sobreposição de picos de hidrogênios distintos. Lançando mão, mais uma vez, do menor deslocamento químico de hidrogênios axiais em sistemas similares ao cicloexano, o hidrogênio mais blindado, H5_{ax}, foi assinalado ao multipletos em δ 1,93-2,04 ppm. A análise do multipletos em δ 2,05-2,19 ppm será feita mais adiante.

A partir desse ponto, também é possível elucidar com facilidade alguns átomos de carbono pela observação zelosa do RMN de ¹³C (**Figura 36**, página 93) e DEPTQ135 (**Figura 37**, página 94). Seis sinais de carbono, com deslocamentos químicos distintos, foram observados no experimento DEPTQ135. O carbono metílico C7 foi assinalado ao pico em δ 41,4 ppm no RMN de ¹³C. Além do valor de deslocamento químico esperado para um carbono metílico ligado a um átomo de nitrogênio, o carbono C7 apresenta o menor valor de deslocamento químico entre os picos positivos no DEPTQ135. O outro pico positivo presente do DEPTQ135, δ 72,0 ppm, foi atribuído ao carbono C3, um deslocamento químico esperado para carbonos de álcoois secundários. O pico em δ 173,2 ppm apresenta o maior deslocamento químico no espectro de RMN de ¹³C, sendo este pico atribuído ao carbono da carbonila C1. Por fim, o carbono metileno, ligado ao átomo de nitrogênio, C6, foi assinalado ao pico negativo em δ 57,2 ppm.

Foram observados picos de correlação entre C3/H3 e C7/H7 no espectro de HSQC (**Figura 38**, página 95), o que corrobora para as atribuições dos prótons de H3 e H7 realizadas a partir da interpretação do RMN de ¹H. A atribuição dos sinais para os átomos de hidrogênio H6_{ax} e H6_{eq} foi confirmada pelo pico de correlação de ambos os hidrogênios com o carbono C6 no espectro de HSQC. Com o espectro de HSQC, foi possível confirmar que o multipletos em δ 2,05-2,19 ppm conta com sinais de prótons pertencentes a átomos de carbono diferentes, uma

vez que ele possui picos de correção com os sinais em δ 30,1 ppm e δ 24,0 ppm (os únicos sinais de carbono ainda não atribuídos nesse ponto da análise). O sinal em δ 24,0 ppm possui um pico de correlação entre o multipletto em δ 2,05-2,19 ppm e o hidrogênio H5_{ax}, sendo, por fim, esse sinal atribuído ao carbono C5. Finalmente, ficou evidente que o último sinal ainda não atribuído para o espectro de RMN de ¹³C, δ 30,1 ppm, só poderia pertencer ao carbono C4, concluindo a atribuição de todos os átomos de carbono da lactama.

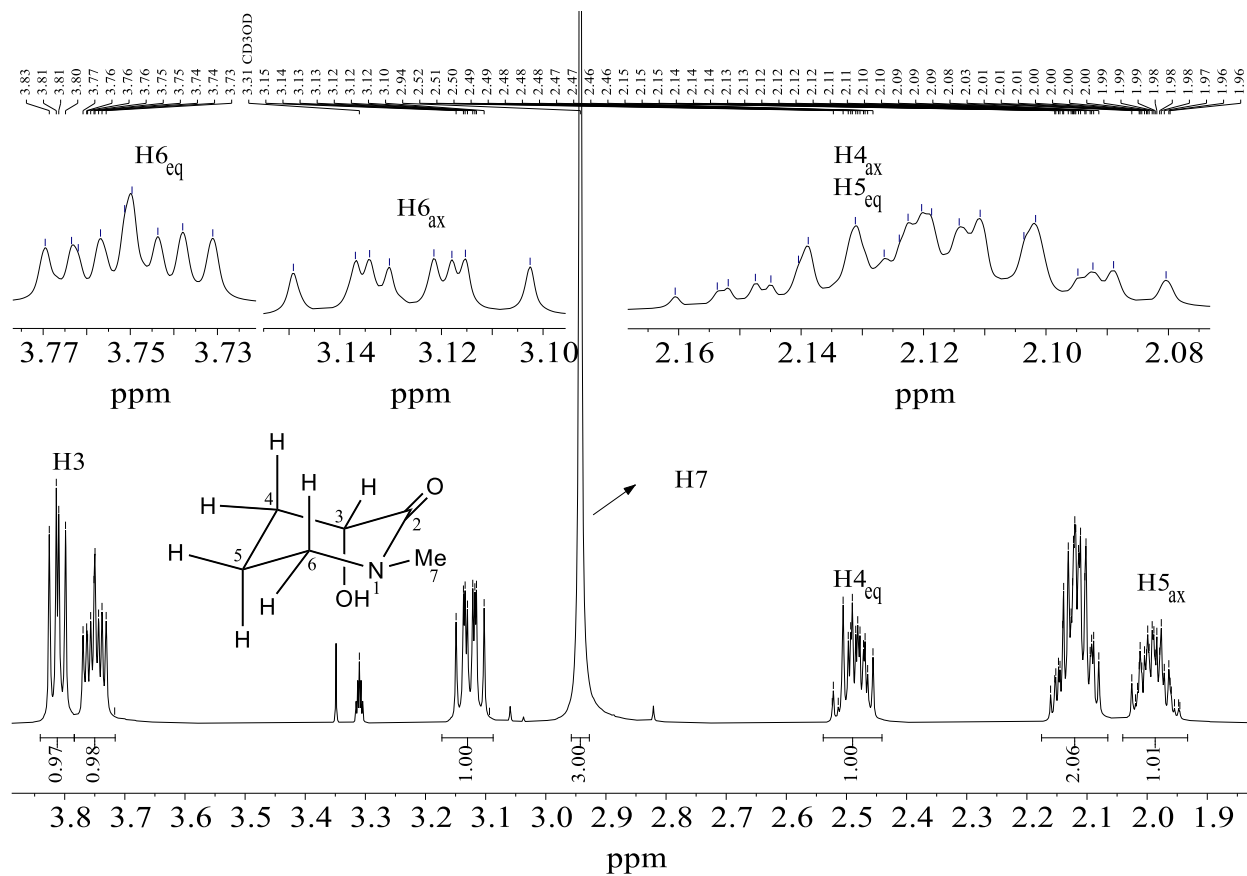
Nesse ponto da análise, é importante salientar que já é possível, pelo resultado do espectro de COSY, eliminar algumas estruturas candidatas. O próton H3 apresenta dois picos de correlação com os dois prótons ligados ao carbono C4 no espectro de COSY (**Figura 35**, página 92), desse modo, as estruturas candidatas **7b** e **7c** podem ser descartadas, haja vista que, nessas estruturas, o átomo hidrogênio ligado ao carbono C3 (ligado ao grupo hidroxila) apresentaria pelo menos 4 picos de correlação no espectro de COSY com seus prótons vizinhos.

No espectro de DEPTQ135, ambos os sinais para os carbonos C4 e C5 apresentam sinais negativos, o que é esperado para átomos de carbono ligados a um número par de hidrogênios. Também podemos confirmar os picos de C4 e C5, através da análise do espectro de HMBC (**Figura 39**, página 96). Já o átomo C4 apresenta picos de correlação com os prótons H3, H6_{ax}, H6_{eq} e os prótons H5, enquanto o carbono C5 demonstra picos de correlação com os hidrogênios H3, H6_{ax}, H6_{eq} e os prótons H4.

O multipletto em δ 2,05-2,19 ppm, integrado para dois, possui picos de correlação no HSQC tanto para C4 quanto para C5. Observa-se dois picos de correlação no HSQC para o carbono C4, sendo eles o multipletto em δ 2,44-2,54 ppm, integrado para um, e o multipletto em δ 2,05-2,19 ppm. Empregando-se mais uma vez o raciocínio utilizado na atribuição de H6_{ax}, H6_{eq} e H5_{ax}, o sinal em δ 2,44-2,54 ppm foi atribuído a H4_{eq}. Como consequência, os prótons H4_{ax} e H5_{eq} só podem estar presentes no multipletto em δ 2,05-2,19 ppm. Para conseguirmos observar os sinais sobrepostos nesse multipletto, foram realizados dois experimentos de espectroscopia de correlação total (TOCSY, do inglês *Total Correlation Spectroscopy*). O primeiro TOCSY (**Figura 40**, página 97) irradiou seletivamente o sinal em δ 2,10 ppm observando apenas este pico, um multipletto (δ 2,05-2,15 ppm) integrado para um. O segundo TOCSY (**Figura 41**, página 98) irradiou seletivamente o sinal em δ 2,17 ppm, observando apenas este pico, um multipletto (δ 2,09-2,19 ppm) integrado para um. Tendo ciência desses sinais, foi realizada uma série de experimentos NOESY-1D para identificar os prótons ainda não assinalados. Devido a limitações de orçamento e tempo, não foi possível realizar o NOESY bidimensional para o composto **7a**. O NOESY-1D (**Figura 42**, página 99) irradiado seletivamente para o pico do hidrogênio H5_{ax}, em δ 2,01 ppm, mostra claramente que esse

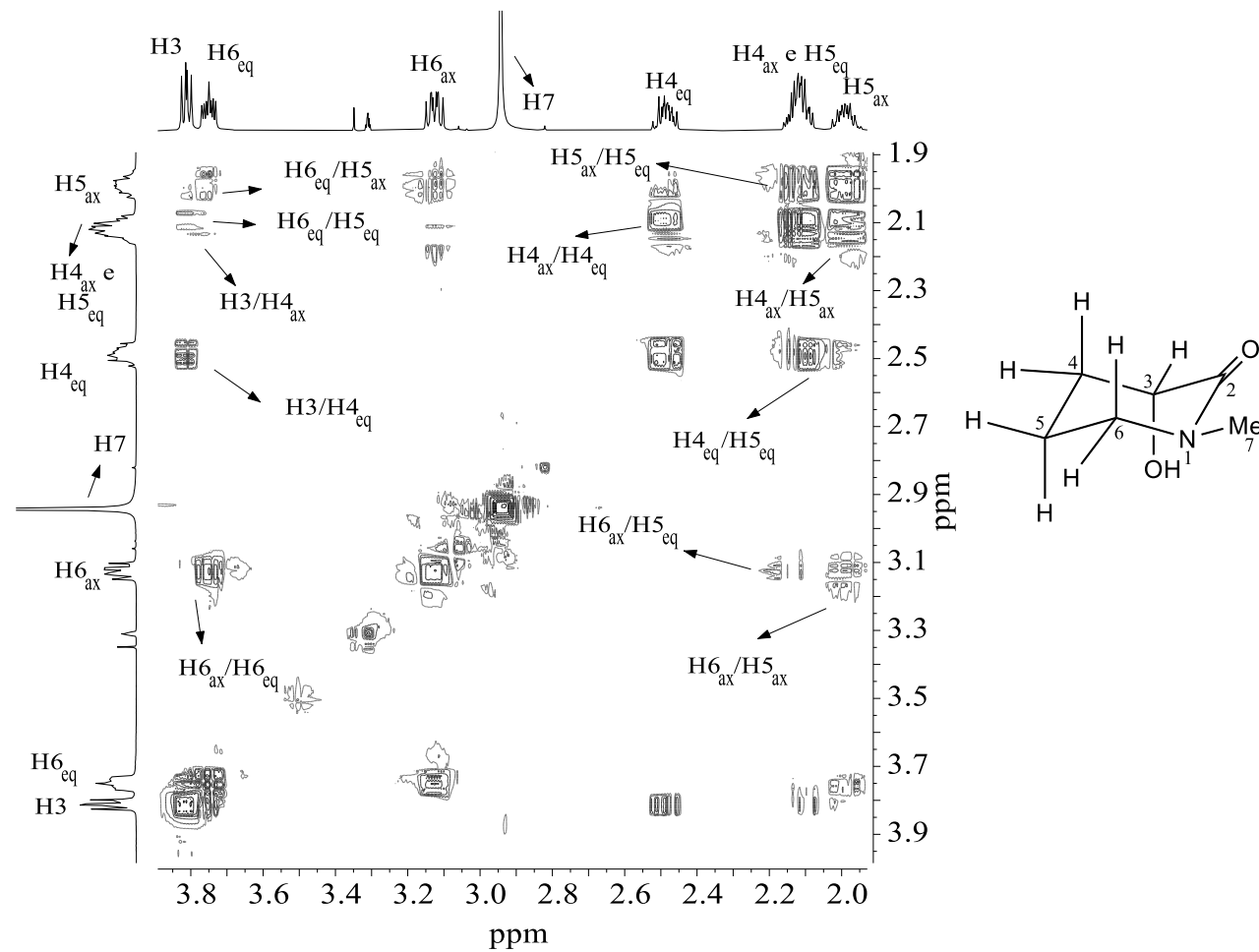
próton está correlacionado ao multipleteo δ 2,05-2,15 ppm, sendo atribuído ao próton H5_{eq}. Por último, o NOESY-1D (**Figura 43**, página 100), irradiado seletivamente para o pico do hidrogênio H4_{eq}, em δ 2,51 ppm, indica que esse próton está correlacionado ao multipleteo δ 2,09-2,19 ppm, sendo atribuído ao próton H4_{ax}, concluindo a atribuição de todos os prótons da lactama **7a**. Os demais espectros de NOESY-1D se encontram nas páginas 101 até 104.

A **Tabela 7** (página 105) apresenta todas as atribuições feitas para os átomos de carbono e hidrogênio da lactama **7a**. Além disso, algumas importantes correlações dos espectros de COSY e HMBC para a lactama **7a** são apresentados na **Figura 48** (página 106).

Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD , 25 °C) do composto **7a**.

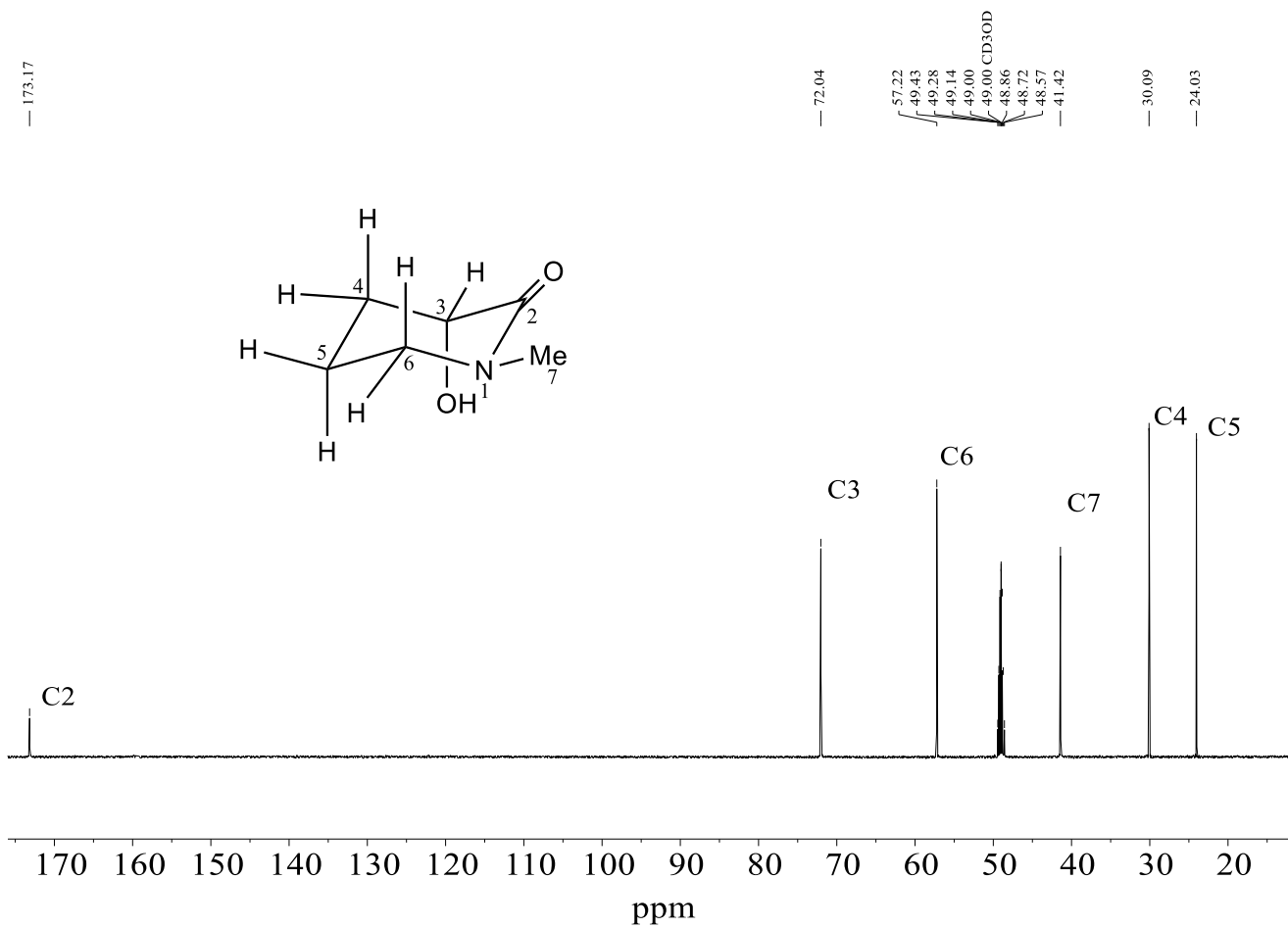
Fonte: O autor.

Figura 35 - Correlações COSY para o composto 7a.



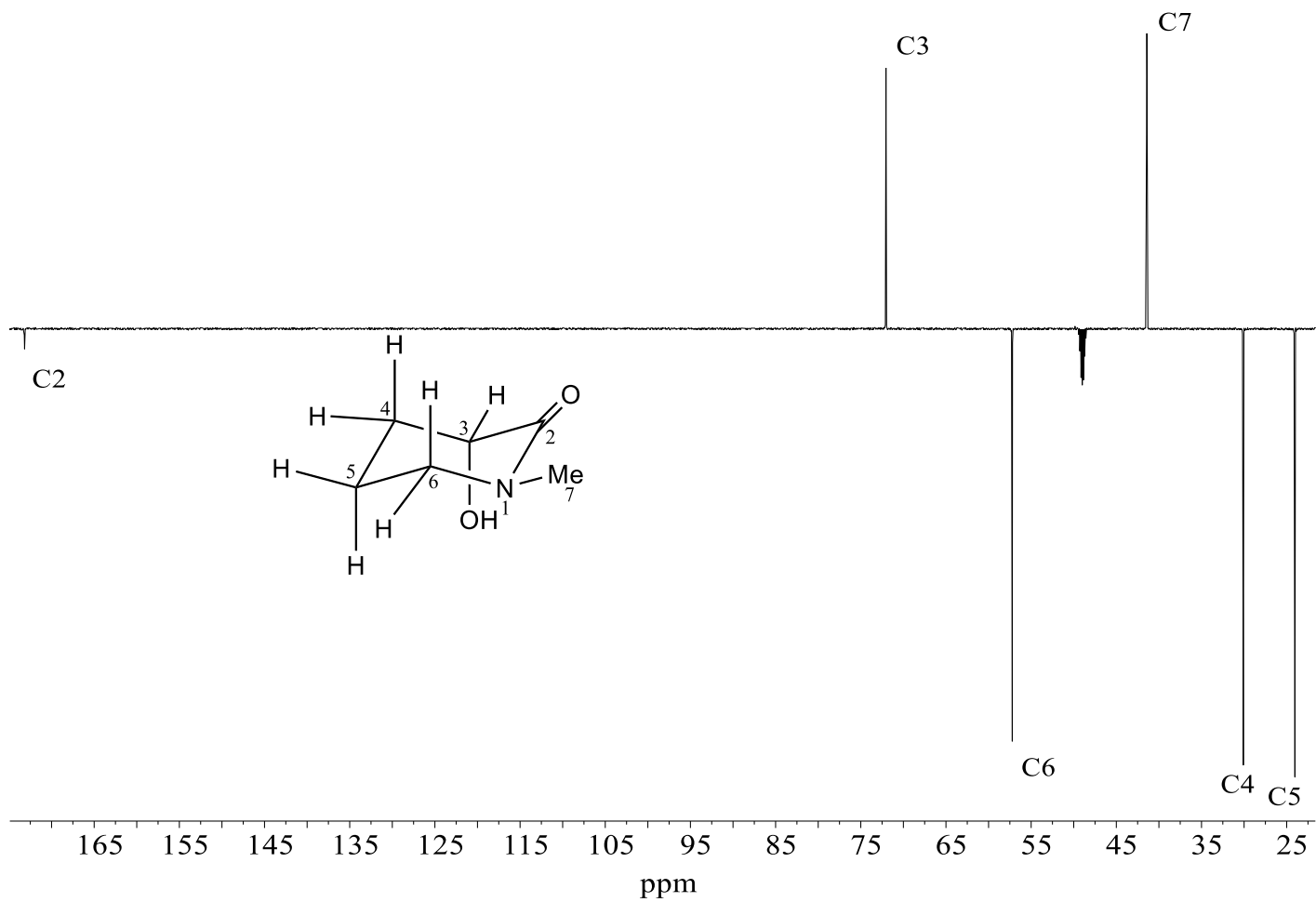
Fonte: O autor.

Figura 36 - RMN de ^{13}C RMN (150 MHz, CD_3OD , 25 °C) para o composto **7a**.



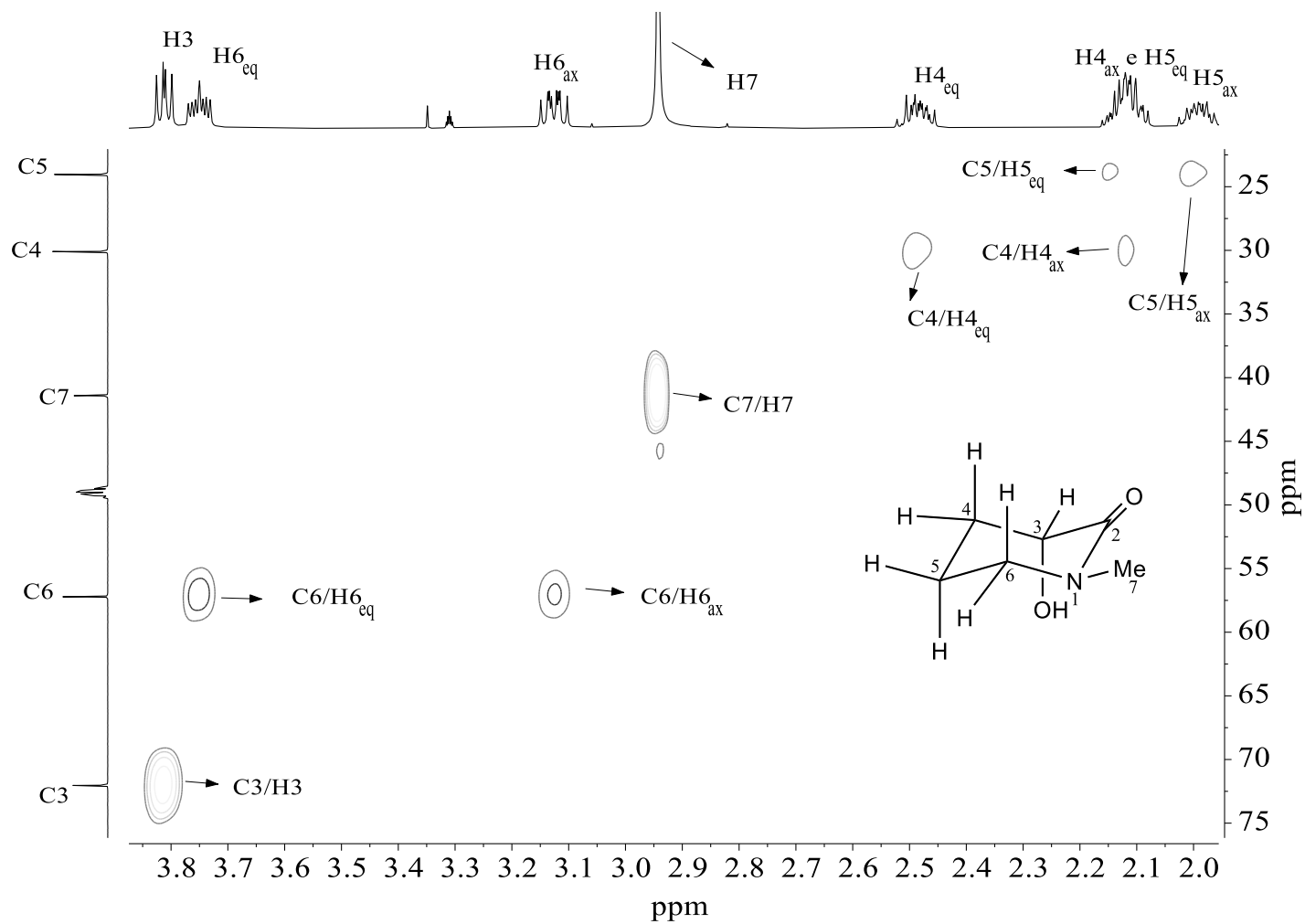
Fonte: O autor.

Figura 37 - Espectro de DEPTQ135 (150 MHz, CD₃OD, 25 °C) para o composto 7a.



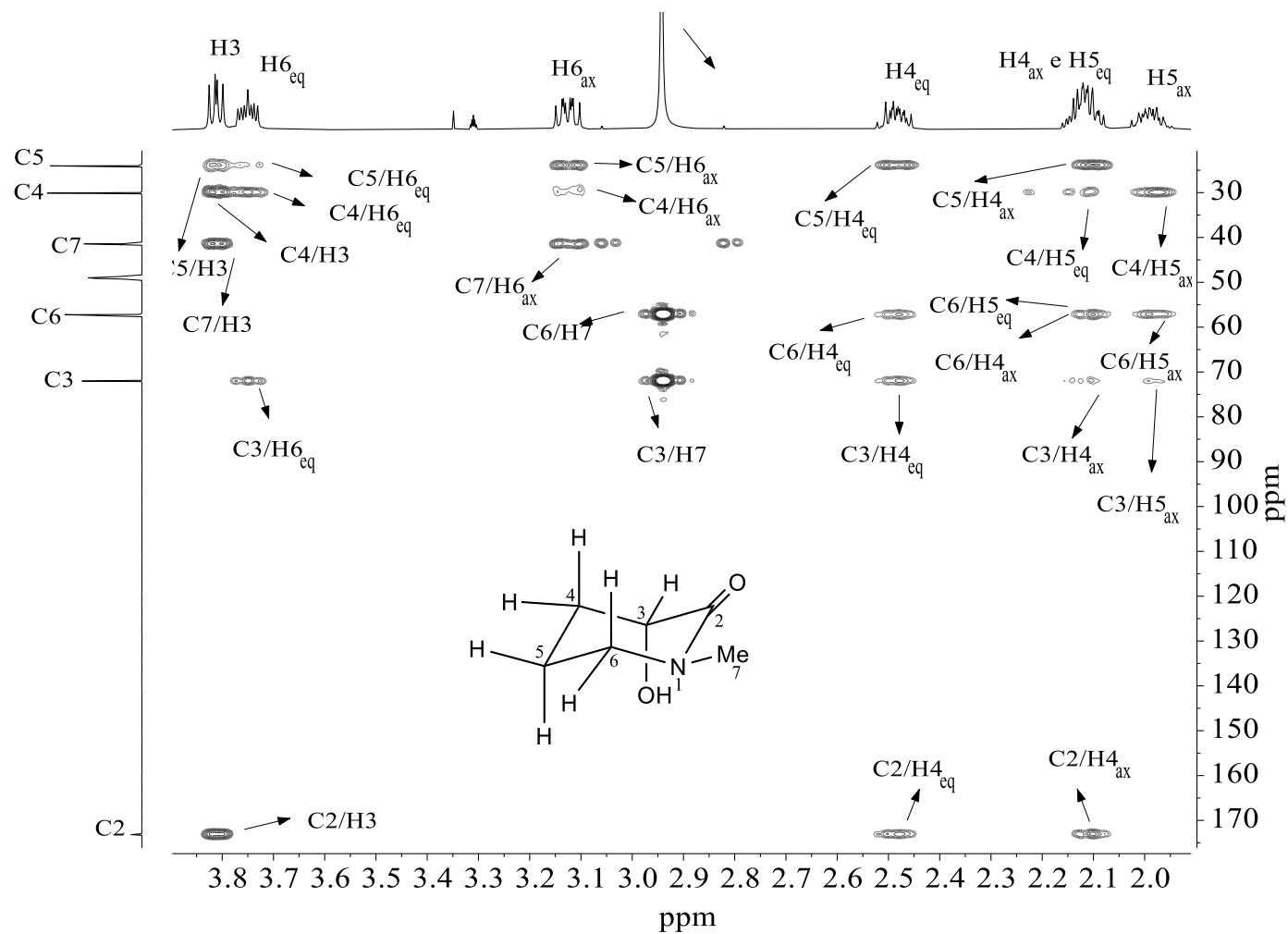
Fonte: O autor.

Figura 38 - Correlações de HSQC para o composto 7a.



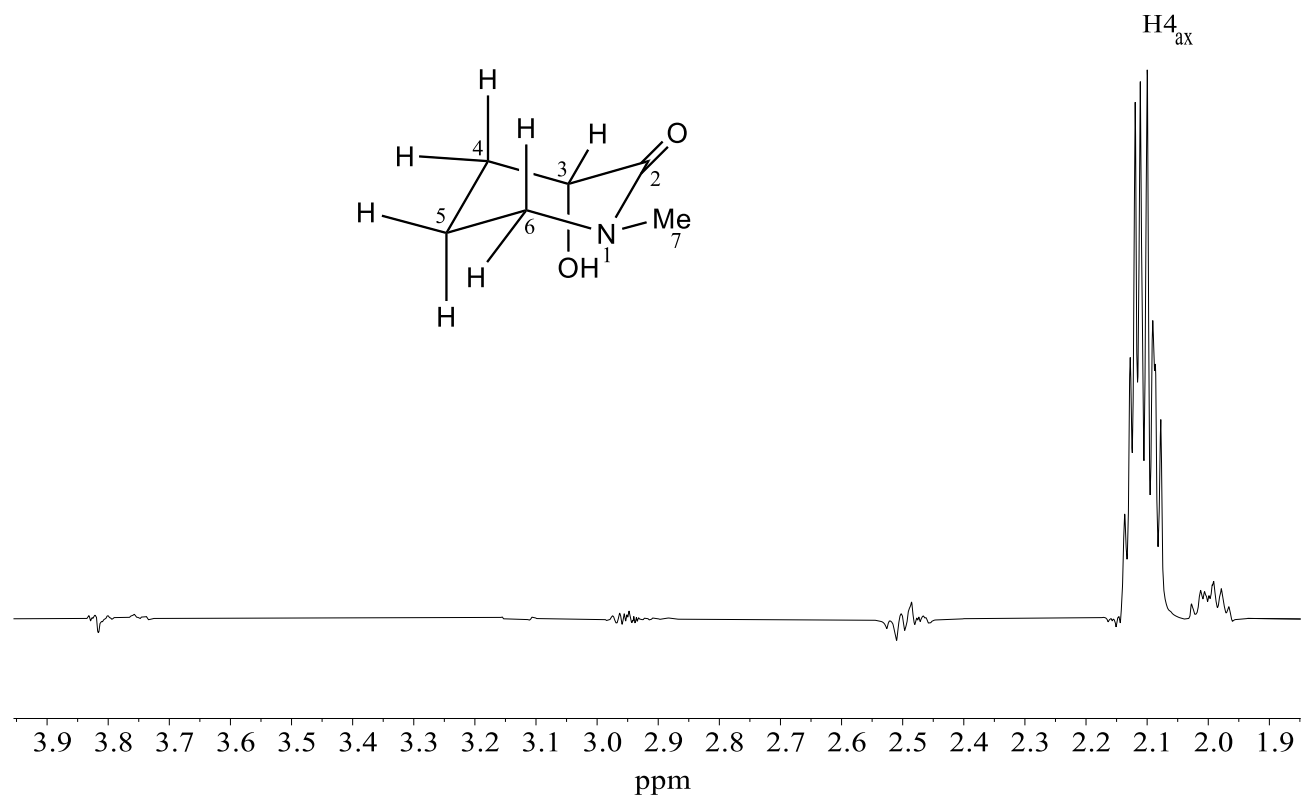
Fonte: O autor.

Figura 39 - Correlações de HMBC para o composto **7a**.



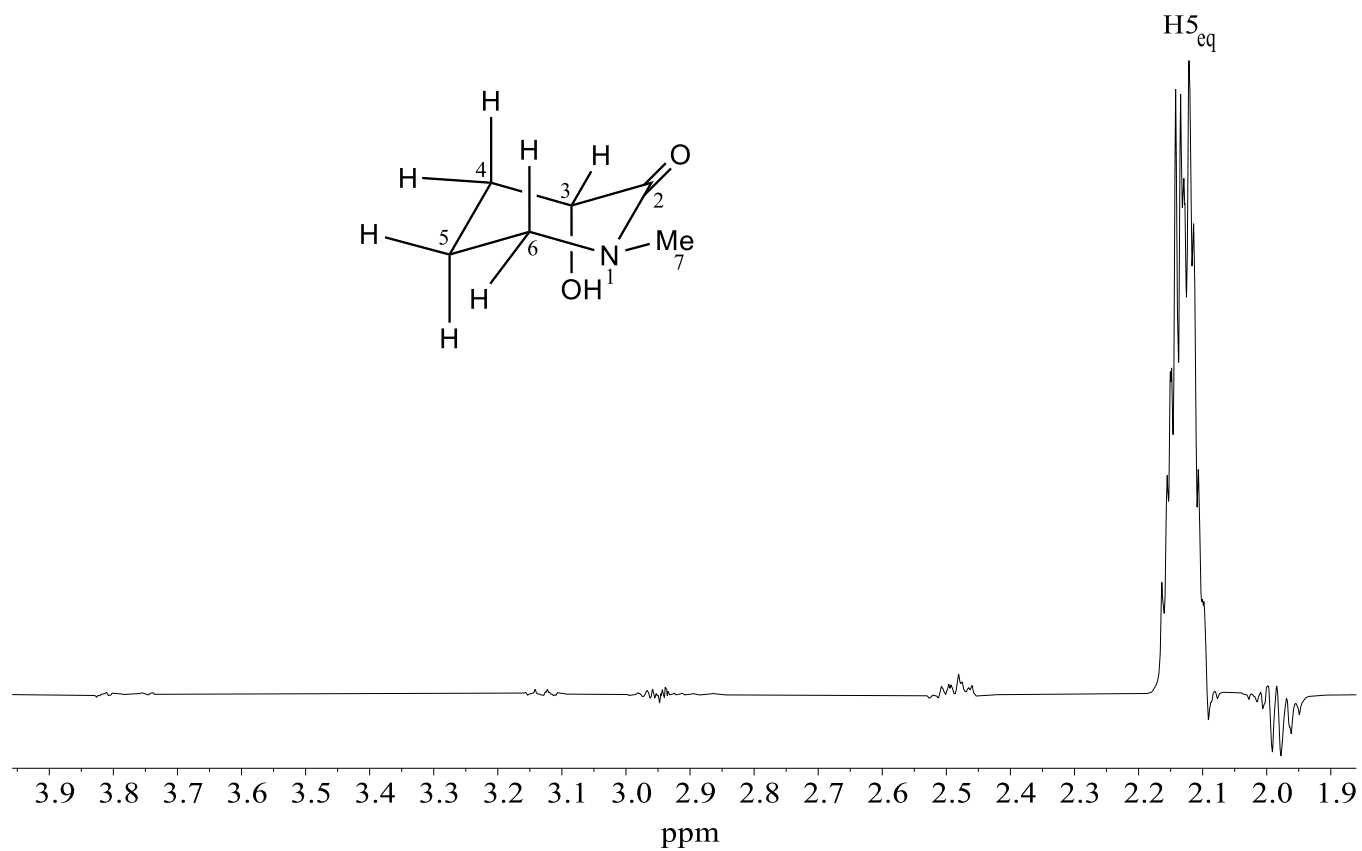
Fonte: O autor.

Figura 40 - TOCSY em δ 2,10 ppm para o composto **7a**.



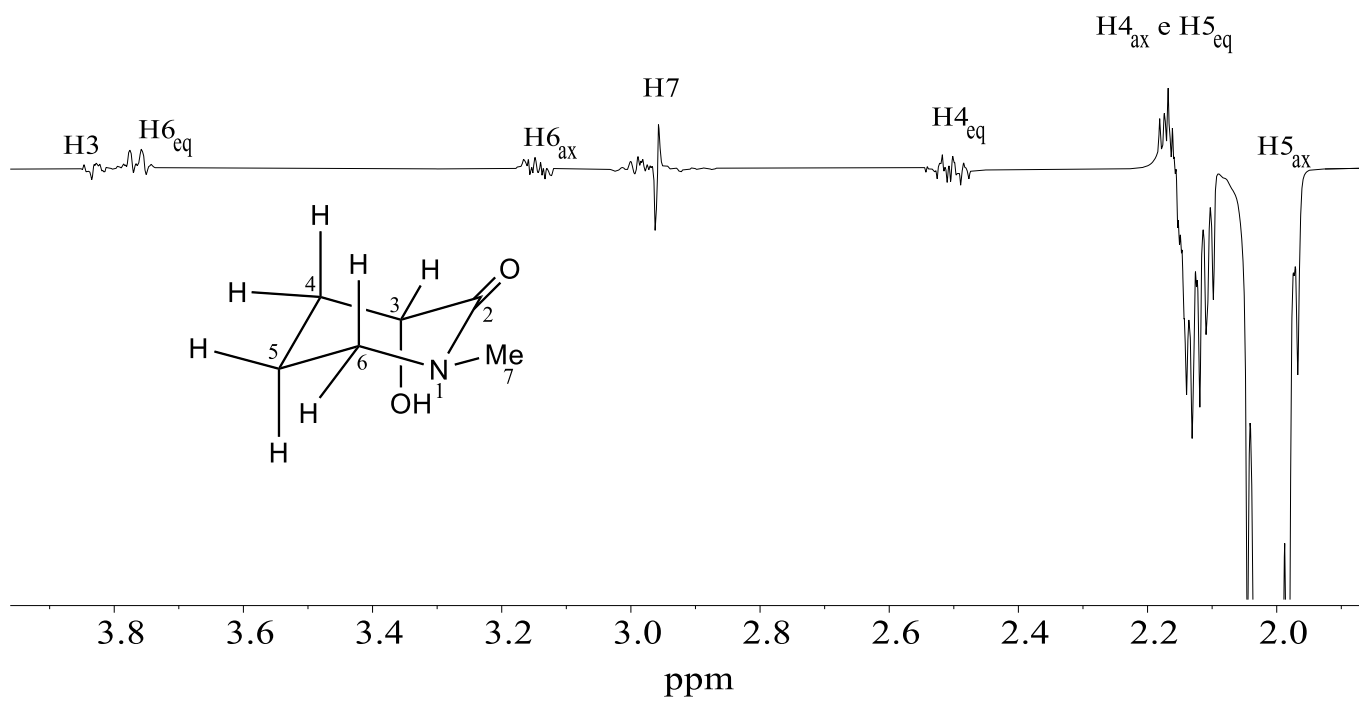
Fonte: O autor.

Figura 41 - TOCSY em δ 2,17 ppm para o composto **7a**.



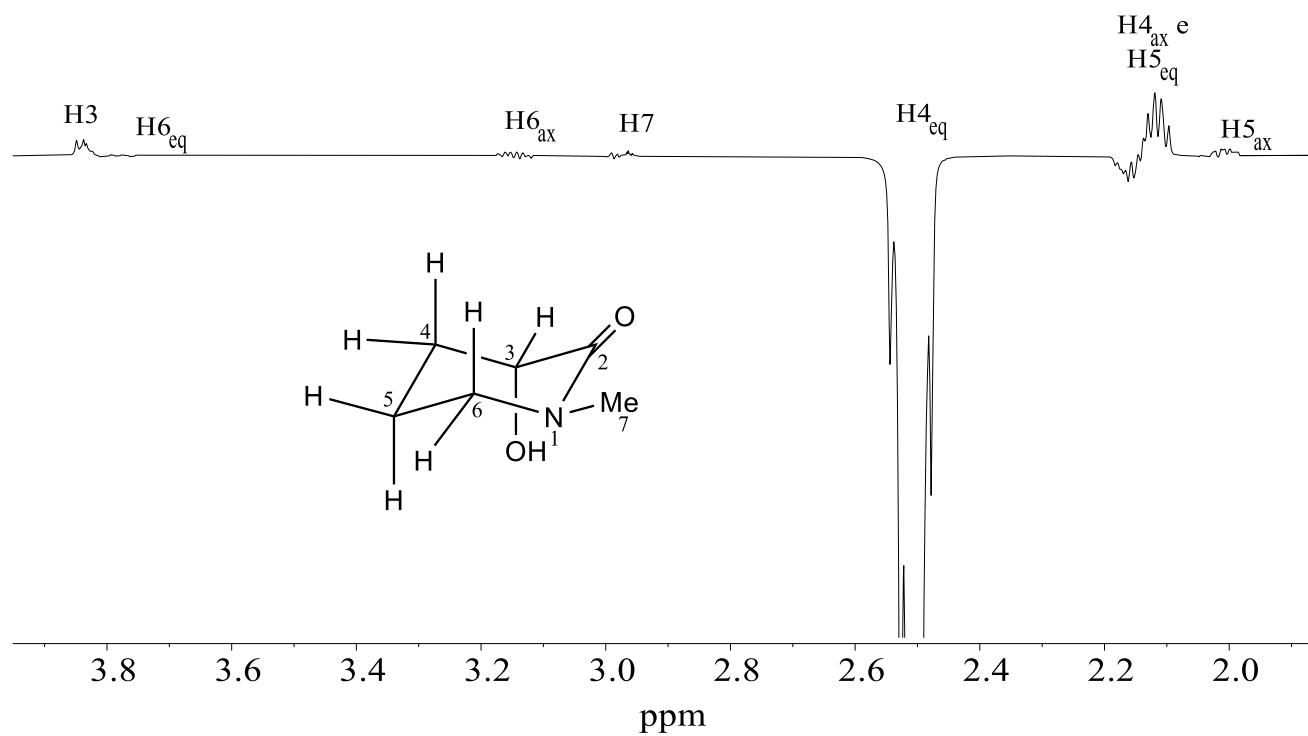
Fonte: O autor.

Figura 42 - Irradiação seletiva de NOESY-1D em δ 2,01 ppm para o composto **7a**.



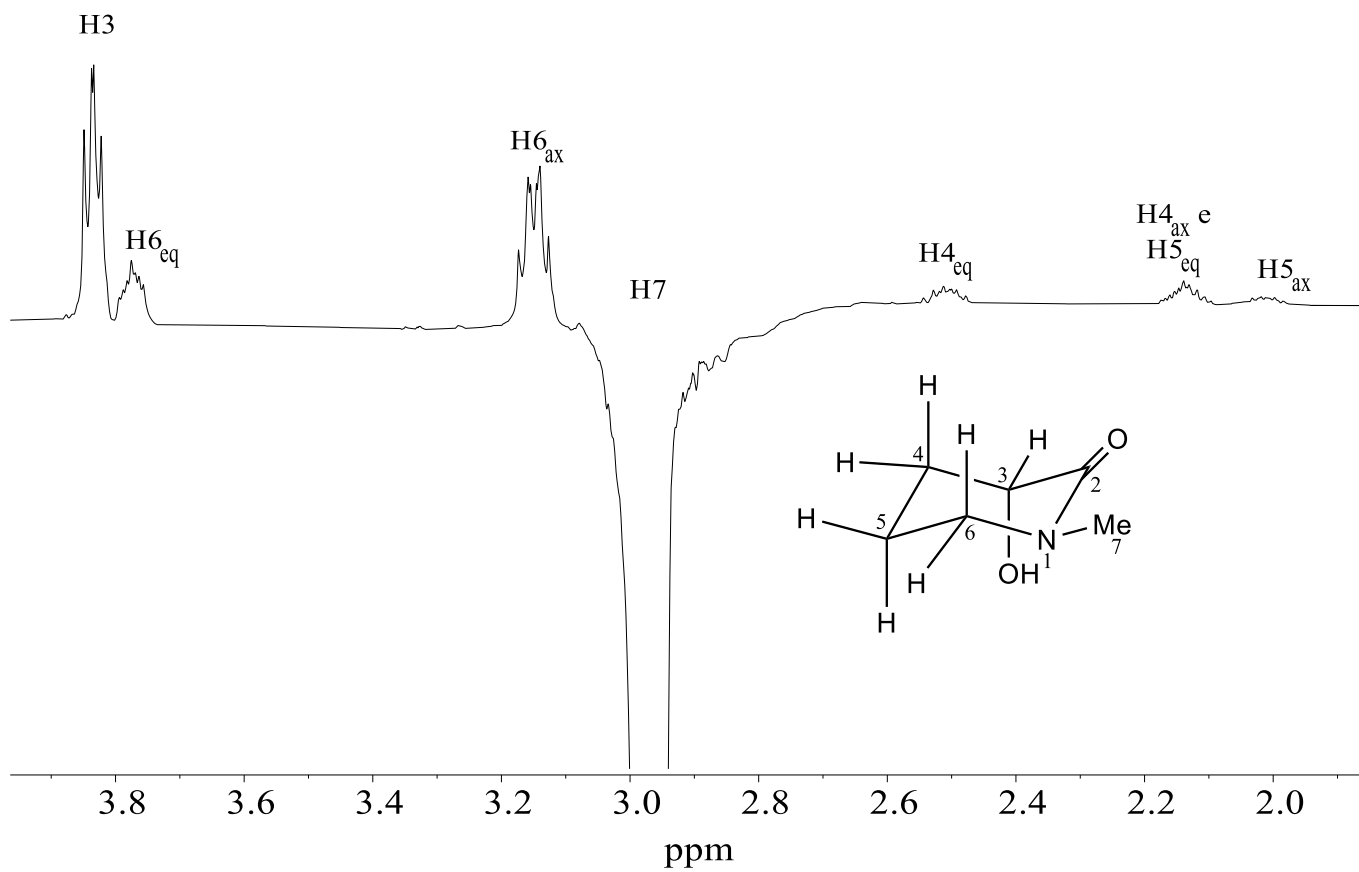
Fonte: O autor.

Figura 43 - Irradiação seletiva de NOESY-1D em δ 2,51 ppm para o composto **7a**.



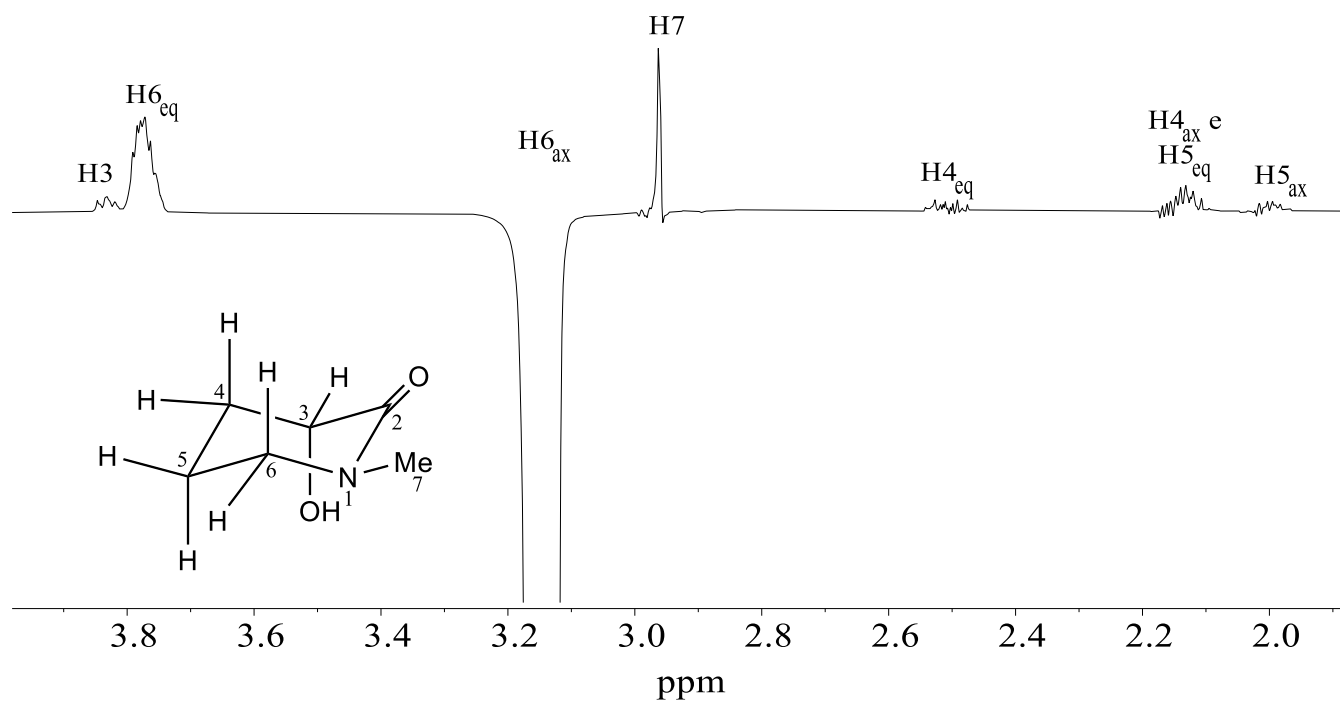
Fonte: O autor.

Figura 44 - Irradiação seletiva de NOESY-1D em δ 2,96 ppm para o composto **7a**.



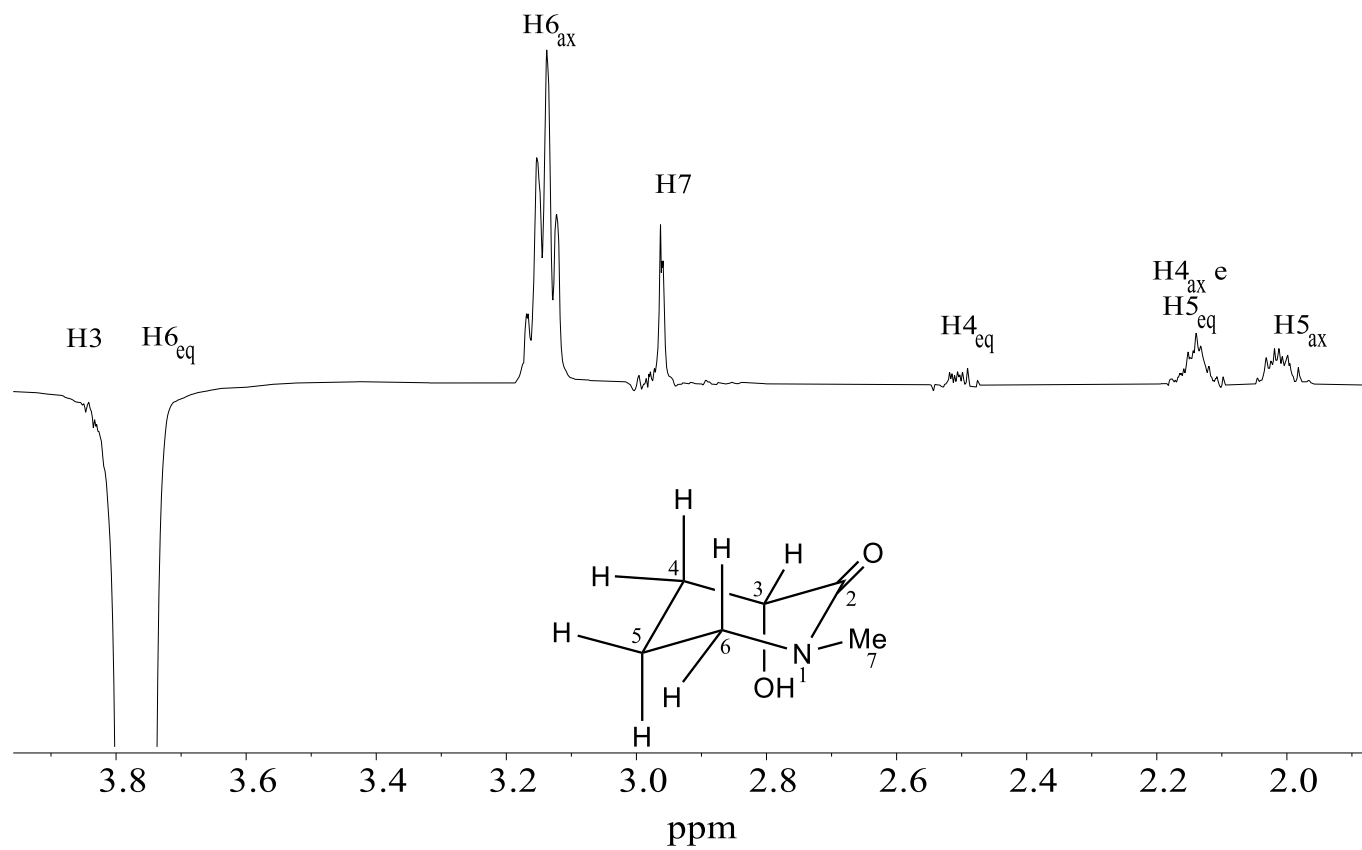
Fonte: O autor.

Figura 45 - Irradiação seletiva de NOESY-1D em δ 3,15 ppm para o composto **7a**.



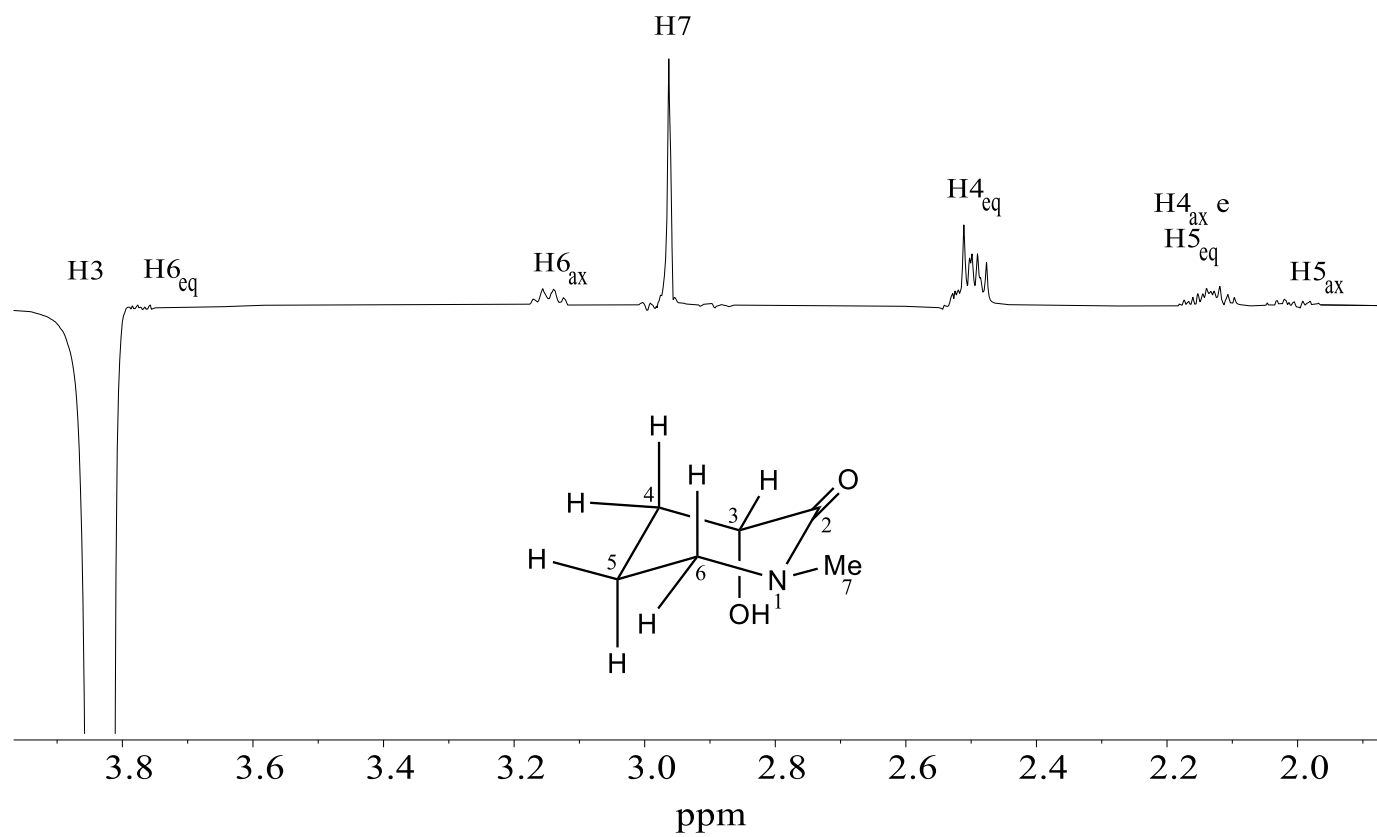
Fonte: O autor.

Figura 46 - Irradiação seletiva de NOESY-1D em δ 3,76 ppm para o composto **7a**.



Fonte: O autor.

Figura 47 - Irradiação seletiva de NOESY-1D em δ 3,85 ppm para o composto **7a**.



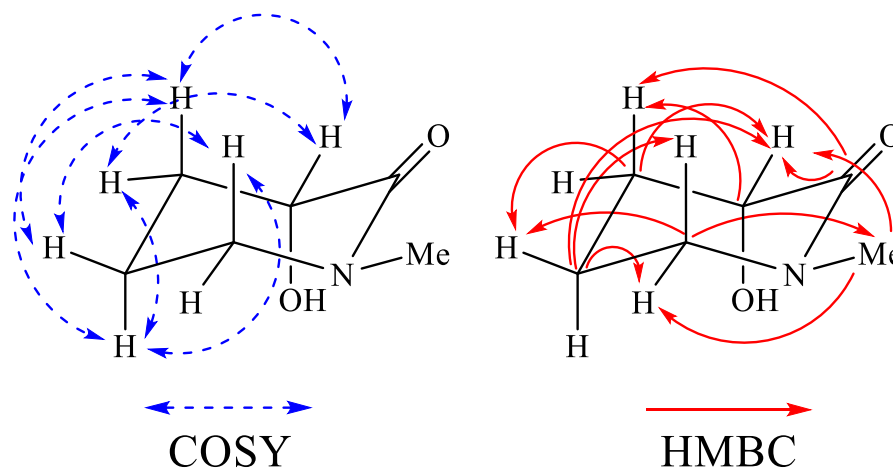
Fonte: O autor.

Tabela 7 - Dados de RMN para o composto **7a**: Deslocamento químico experimental (δ), multiplicidade (m), constantes de acoplamento (J), correlações COSY e HMBC.

Átomo	δ_C (ppm)	Átomo	δ_H (ppm) ^a	HMBC	COSY
C2	173,2	-	-	H3, H4ax, H4eq,	
C3	72,0	H3ax	3,81 (dd, 9,3, 6,9)	H4ax, H4eq, H5ax, H5eq, H6eq, H7	H4ax, H4eq
C4	30,1	H4ax	2,13 (m)	H3, H5ax, H5eq, H6ax, H6eq-	H3ax, H4eq, H5ax, H5eq
-	-	H4eq	2,48 (m)	-	H3ax, H4ax, H5ax, H5eq
C5	24,0	H5ax	1,99 (m)	H3, H4ax, H4eq, H6ax, H6eq	H4ax, H4eq, H5eq, H6ax, H6eq
-	-	H5eq	2,10 (m)	-	H4ax, H4eq, H5ax, H6ax, H6eq
C6	57,2	H6ax	3,13 (ddd, 7,5, 9,1, 11,4)	H4ax, H4eq, H5ax, H5eq, H7	H5ax, H5eq, H6eq
-	-	H6eq	3,75 (ddd, 4,0, 7,6, 11,5)	-	H5ax, H5eq, H6ax
C7	41,4	H7	2,94 (s)	H3, H6ax	

^aOs dados em parênteses ao lado dos deslocamentos químicos são a multiplicidade e as constantes de acoplamento (em Hz) para cada hidrogênio.

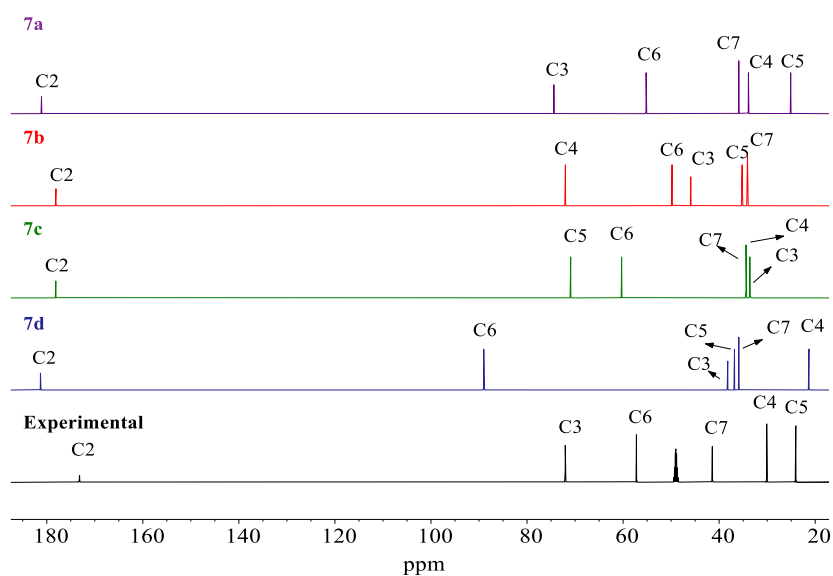
Figura 48 - Correlações chaves COSY e HMBC para o composto **7a**.



Fonte: O autor.

Após a finalização da análise dos espectros experimentais da lactama **7a**, foi realizada a análise estatística DP4, comparando os espectros de ^1H e ^{13}C teóricos com os espectros de RMN devidamente assinalados. O resultado dessa análise de DP4, depois de assinalar todos os sinais de RMN experimentais, apresentou uma probabilidade de 100% para a estrutura **7a** ser a correta para a lactama desconhecida. É importante pontuar que tanto o resultado da análise de DP4 para os sinais não assinalados (feitos no início deste tópico) quanto para os sinais assinalados apontaram para a mesma estrutura candidata **7a**. A **Figura 49** (página 106) ilustra de forma visual a similaridade entre os dados experimentais e teóricos de RMN de ^{13}C para o composto **7a**.

Figura 49 - Espectros calculados de RMN de ^{13}C para as estruturas candidatas **7a-7d** e o RMN de ^{13}C experimental para o composto **7a**.



Fonte: O autor.

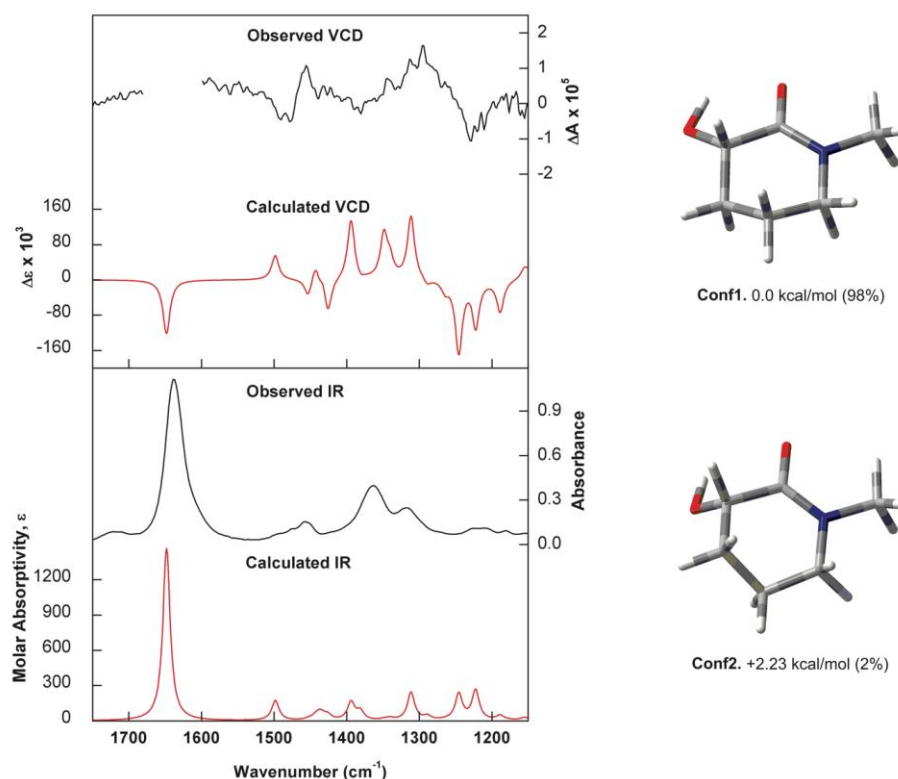
Concluiu-se, após a análise de todos os espectros experimentais de RMN, IV e massas, aliado aos resultados dos cálculos computacionais, que a lactama **7a** é 3-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona. Os resultados da análise de DP4 se encontram na **Tabela 8** (página 107).

Tabela 8 - Análise de DP4 dos dados de RMN de ^{13}C e ^1H para as estruturas candidatas **7a-7d** após assinalar os dados experimentais.

Estruturas Candidatas	Probabilidade DP4 (%) para os dados de RMN		
	^{13}C e ^1H	^1H	^{13}C
7a	100	100,0	100,0
7b	0,0	0,0	0,0
7c	0,0	0,0	0,0
7d	0,0	0,0	0,0

Não foi possível definir, apenas com os espectros de RMN, qual seria a estereoquímica absoluta para a lactama **7a**. Para resolver essa questão, a amostra foi submetida a uma análise em um polarímetro, o qual demonstrou que a amostra era levógira (-), desviando a luz polarizada para a esquerda. Em seguida, foi realizado um experimento de VCD (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016) – pelos pesquisadores João Marcos Batista Junior e Andrea Nastri de Luca Batista – o qual comparou os dados experimentais da amostra **7a** com os dados teóricos, utilizando o nível de teoria B3PW91/PCM(DMSO)/6-311G(d,p). A **Figura 50** (página 108) apresenta, em seu lado direito, a comparação dos espectros experimentais – em solvente $\text{DMSO-}d_6$ – e teóricos de IV e VCD para o composto **7a**. Ao lado direito da **Figura 50** (página 108), estão desenhadas as estruturas otimizadas, juntamente com as energias relativas e a população de Boltzmann (%) para os dois conformeros de menor energia. Dessa maneira, constata-se que o carbono quiral C3 possui a configuração *S* e a molécula referente à lactama **7a** foi identificada como 3*S*(-)-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona.

Figura 50 - Comparação dos espectros experimentais (linha preta) e teóricos (linha vermelha) de IV e VCD para o composto **7a**. O gap no espectro experimental de VCD corresponde a uma banda de alta absorção no IR.

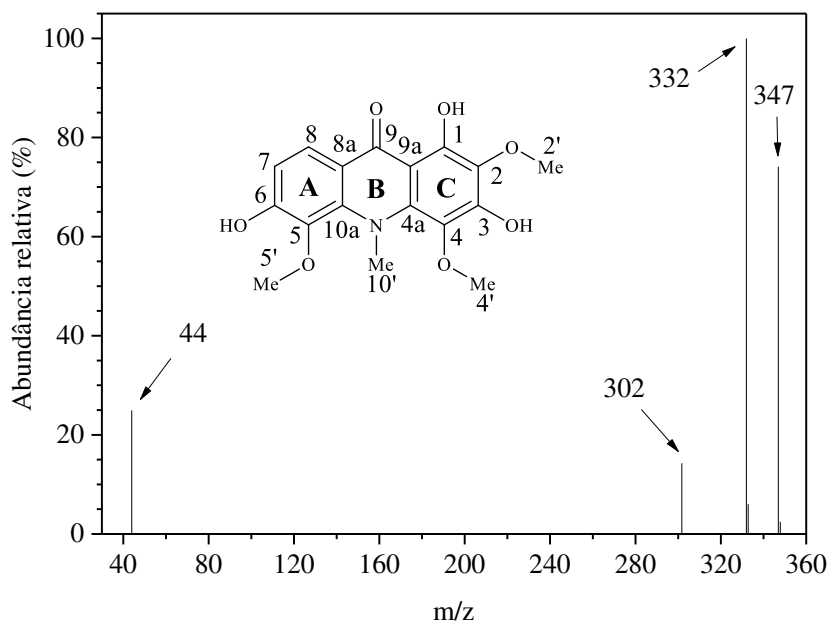


Fonte: O autor.

4.5.2 Elucidação estrutural do composto **8b**

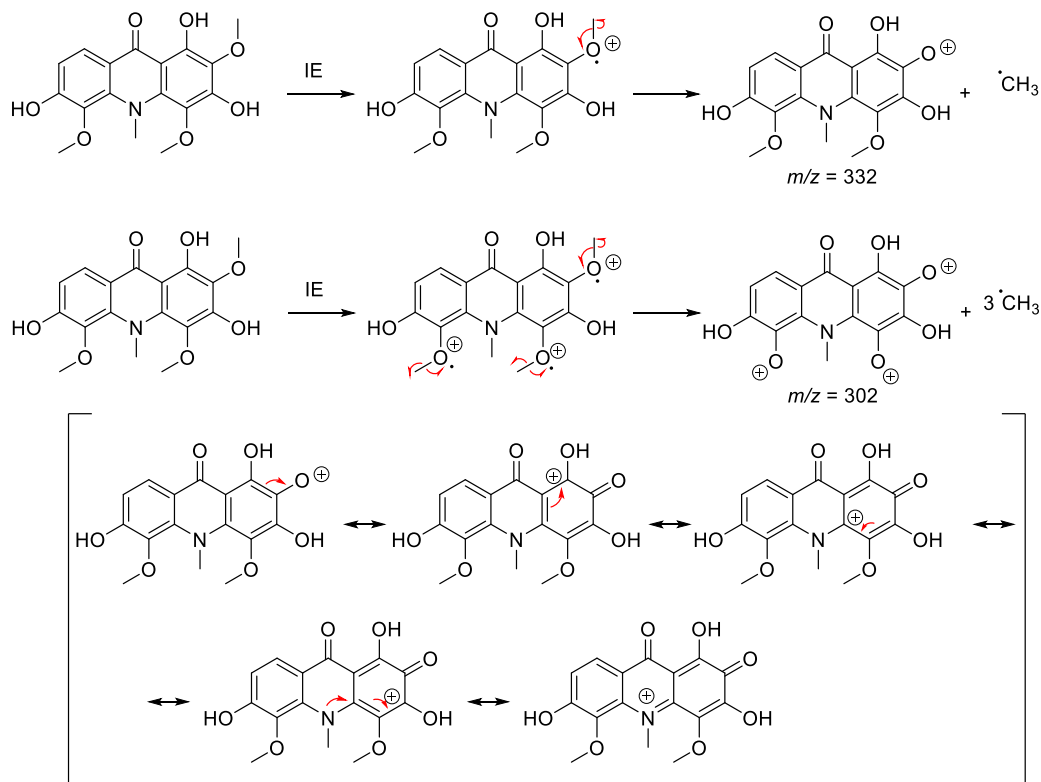
O esboço das estruturas candidatas para o composto **8b** foi concebido com base nas informações obtidas por diversas análises. Primeiramente, a massa exata para tal composto foi determinada como m/z 348,10971 $[M+1]^+$ (sendo o valor calculado 348,108327 para a fórmula molecular $C_{17}H_{18}NO_7$). O espectro de massas (**Figura 51**, página 109) apresenta o pico do íon molecular em m/z 347, o pico base em m/z 332 e outro pico em m/z 302. Assim como para a lactama **7a**, o valor ímpar do pico do íon molecular levanta a possibilidade de um átomo de nitrogênio na estrutura do produto natural **8b**. A presença dos picos m/z 332 e m/z 302 indica a perda de um e três grupos CH_3 , respectivamente. A **Figura 52** (página 109) apresenta algumas propostas de fragmentação para o composto **8b**.

Figura 51 - Espectro de massas do composto **8b**.



Fonte: O autor.

Figura 52 - Proposta de fragmentação do composto **8b**.

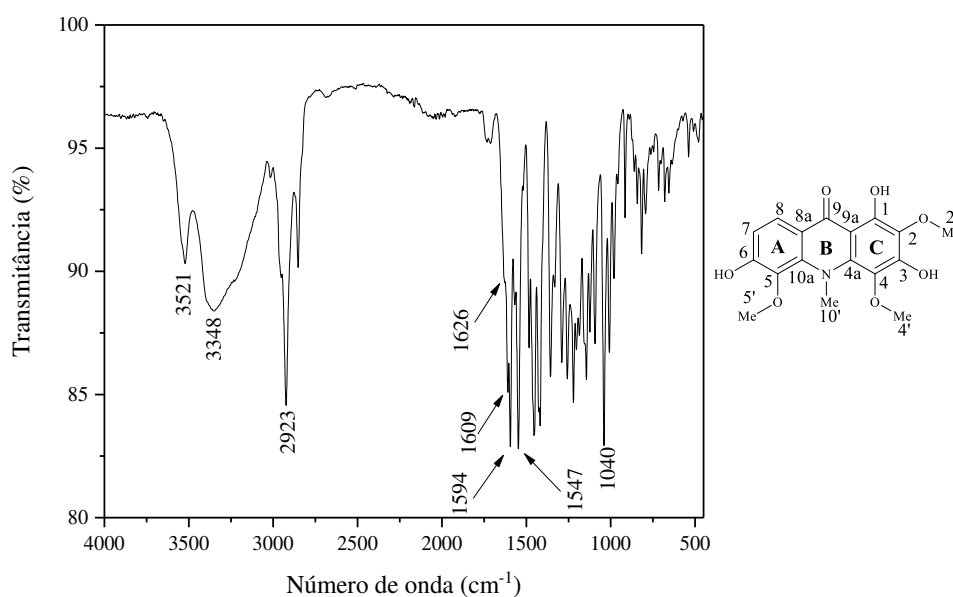


Fonte: O autor.

O espectro de RMN de ^1H e ^{13}C desse produto natural foi obtido tanto em acetona- d_6 quanto em CDCl_3 , na qual apenas os espectros em acetona- d_6 possuem todos os seus sinais

devidamente assinalados neste trabalho. Nesse viés, o espectro de RMN de ^1H em acetona- d_6 (**Figura 54**, página 114) apresentou três simpletos em $\delta = 14,38$; 9,11 e 8,90 ppm, porém, ao averiguarmos o espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (**Figura 55**, página 115), tais sinais estão ausentes. Segundo a literatura, os espectros de RMN de ^1H das acridonas em solventes deuterados polares, são conhecidos por apresentar sinais de prótons de hidroxila bem visíveis. Em contrapartida, os sinais desses hidrogênios quando empregado solventes deuterados pouco polares (como o CDCl_3) ficam muito fracos, ou até mesmo ausentes (WU; FURUKAWA, 1983). Uma particularidade do composto **8b** em seu espectro de RMN de ^1H em acetona- d_6 , é o sinal muito desblindado em $\delta = 14,38$ ppm. O elevado deslocamento químico desse próton está relacionado à forte ligação de hidrogênio entre a hidroxila (OH1) e sua carbonila vizinha (C9), fato observado em muitas outras acridonas conhecidas (CHEN *et al.*, 2021). O próton OH1 apresenta três picos de correlação no HMBC (**Figura 60**, página 120) com três carbonos em $\delta = 105,5$; 152,7 e 130,8 ppm (estes sinais serão atribuídos posteriormente aos carbonos C9, C1 e C2, respectivamente).

Já o espectro IV (**Figura 53**, página 111) para o composto **8b**, apresenta uma banda em 1626 cm^{-1} , um número de onde abaixo do esperado para cetonas, na faixa de $1720\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$. O sinal em $\delta = 14,38$ ppm e a baixa frequência de absorção da carbonila em 1626 cm^{-1} sugerem que o composto **8b** é um alcaloide acridona que possui um grupo hidroxila na posição 1. Essa evidência, juntamente com a análise preliminar dos espectros de RMN, massas, IV e o conhecimento do grupo de pesquisa em produtos naturais, levou-nos a considerar três estruturas candidatas para a acridona desconhecida: **8a**, **8b** e **8c** (**Figura 29**, página 79).

Figura 53 - Espectro de IV do composto **8b**.

Fonte: O autor.

Assim como procedido para a lactama **7a**, foi realizada uma pré-análise dos dados teóricos de RMN sem assinalar os sinais nos espectros de RMN experimentais da acridona **8b**. Os cálculos de deslocamento químico de RMN de ^1H e ^{13}C para as três estruturas candidatas **8a-8c**, com a solvatação em acetona, foram realizados no nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p) e então comparados com os dados de RMN experimentais não assinalados. Os deslocamentos químicos foram organizados e transferidos para o site <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>. A qualidade do ajuste foi feita comparando os deslocamentos químicos calculados de RMN para as estruturas candidatas (**8a-8c**) frente aos valores do RMN experimental. A estrutura candidata **8b** apresentou o melhor ajuste (100% de probabilidade com os espectros combinados de ^{13}C e ^1H) com os dados para o produto natural **8b**, mesmo sem a atribuição de nenhum sinal. A **Tabela 9** (página 111) apresenta os resultados desta análise de DP4.

Tabela 9 - Análise de DP4 dos dados de RMN de ^{13}C e ^1H para as estruturas candidatas **8a-8c** antes de assinalar os dados experimentais.

Estruturas candidatas	Probabilidade DP4 (%) para os dados de RMN		
	^{13}C e ^1H	^1H	^{13}C
8a	0,0	0,0	0,0
8b	100,0	99,8	98,2
8c	0,0	0,0	0,0

Posteriormente, foi realizada a interpretação dos espectros experimentais de RMN que foram obtidos em acetona- d_6 . O próton OH1 já havia sido atribuído ao sinal $\delta = 14,38$ ppm nas etapas de análise inicial. A carbonila C9 foi facilmente identificada pelo sinal em região típica de carbonila, $\delta = 182,6$ ppm, no espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 56**, página 116). O *N*-metil C10' foi atribuído ao sinal em $\delta = 46,3$ ppm, o que sugere, segundo a literatura, que ambas as posições *peri* relativas a essa parte *N*-metil da molécula (C4 e C5) estão substituídas (YANG *et al.*, 2013).

O espectro de HMBC (**Figura 60**, página 120) foi crucial para elucidar pontos importantes da estrutura do composto **8b**. Um único pico de correlação com o carbono C9 e um hidrogênio na região aromática do espectro de HMBC, sucedeu na atribuição do próton H8, um duplete em $\delta = 7,94$, com $J = 8,8$ Hz. Havia ainda um sinal de hidrogênio na região característica aromática no espectro de RMN de ^1H (**Figura 54**, página 114), o qual foi atribuído por eliminação ao outro único próton aromático da molécula, H7, um duplete em $\delta = 6,95$, acoplado com H8 ($J = 8,8$ Hz). Além disso, o espectro de NOESY (**Figura 58**, página 118) apresenta um pico de correlação entre H7 e H8, enfatizando a proximidade espacial entre esses prótons. Prontamente, os sinais em $\delta = 113,4$ e $123,2$ ppm foram assinalados aos carbonos C7 e C8, respectivamente, dado que apresentavam picos de correlação com os prótons H7 e H8 no espectro de HSQC (**Figura 59**, figura 119).

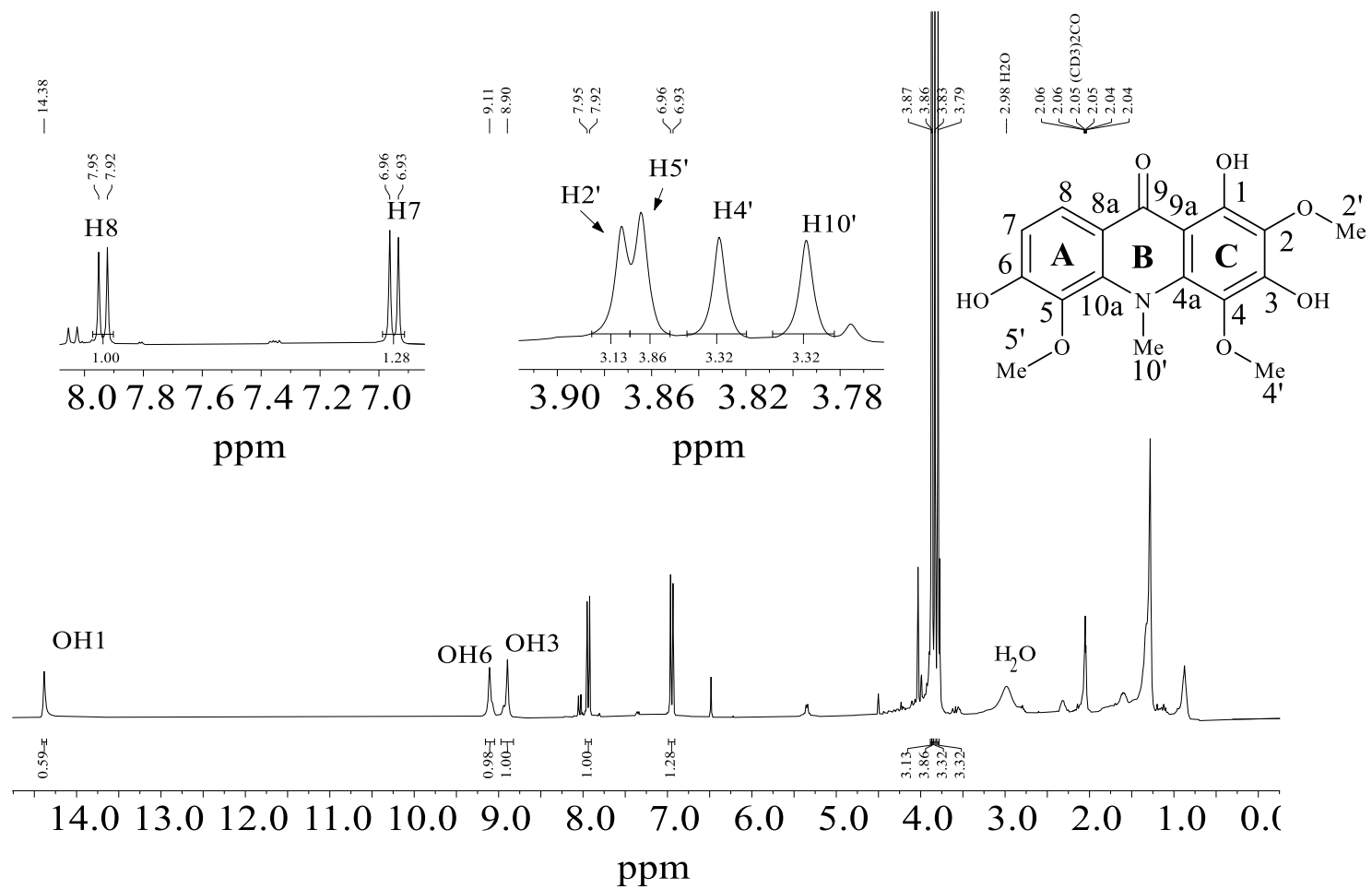
O hidrogênio H7 apresenta três picos de correlação no HMBC (**Figura 60**, página 120) com os sinais em $\delta = 118,0$; $137,2$ e $156,9$ ppm. Nesse panorama, o pico em $\delta = 118,0$ ppm foi assinalado ao carbono C8a, em virtude de C8a e C9a serem os carbonos não hidrogenados mais blindados nas acridonas, além de C8a estar mais próximo ao próton H7 do que C9a. Os carbonos não hidrogenados C4a e C10a são mais desblindados do que os carbonos C8a e C9a, porque C4a e C10a estão ligados a um átomo de nitrogênio eletronegativo, enquanto C8a e C9a estão ligados ao carbono sp^2 (C9) de uma carbonila. Já C6 foi assinalado ao sinal em $\delta = 156,9$ ppm, o qual também apresenta um pico de correlação com o próton H8. Finalmente, o sinal em $\delta = 137,2$ ppm, foi atribuído ao carbono C5. O singlete desblindado em $\delta = 9,11$ ppm foi assinalado ao OH6, devido aos picos de correlação que esse próton apresenta com os carbonos C5 e C7 no espectro de HMBC. A partir da identificação de OH1 e OH6, é simples atribuir OH3, um próton muito desblindado, ao simpleto em $\delta = 8,90$ ppm, no espectro de RMN de ^1H (**Figura 54**, página 114), posto que este é o último sinal mais desblindado de próton que ainda não foi assinalado nessa análise. O sinal em $\delta = 143,4$ ppm foi atribuído ao carbono C10a devido ao pico de

correlação com H8 no espectro de HMBC. Dessa forma, todos os carbonos sp^2 e hidrogênios do anel **A** foram identificados para a acridona **8b**.

O carbono C9a foi atribuído ao sinal em $\delta = 105,4$ ppm devido a um pico de correlação no HMBC com OH1. Enquanto os quatro singletos em $\delta = 3,79; 3,83; 3,86$ e $3,87$ ppm foram assinalados aos grupos *N*-metil e metóxi (CHEN *et al.*, 2021). A atribuição do grupo *N*-metil H10', um singlete em $\delta = 3,79$ ppm, se deu devido ao pico de correlação desse próton com o carbono C10a no espectro de HMBC. Obtendo-se o deslocamento químico de H10', foi elementar assinalar o sinal em $\delta = 46,3$ ppm para o carbono C10', devido ao pico de correlação entre tais átomos no espectro de HSQC. Somando-se a isso, o espectro de HMBC apresenta mais uma correlação de H10' com um sinal em $\delta = 139,0$ ppm, o qual foi atribuído ao átomo C4a. Nesse ponto da análise, todos os carbonos e hidrogênios do anel **B** foram identificados para a acridona **8b**.

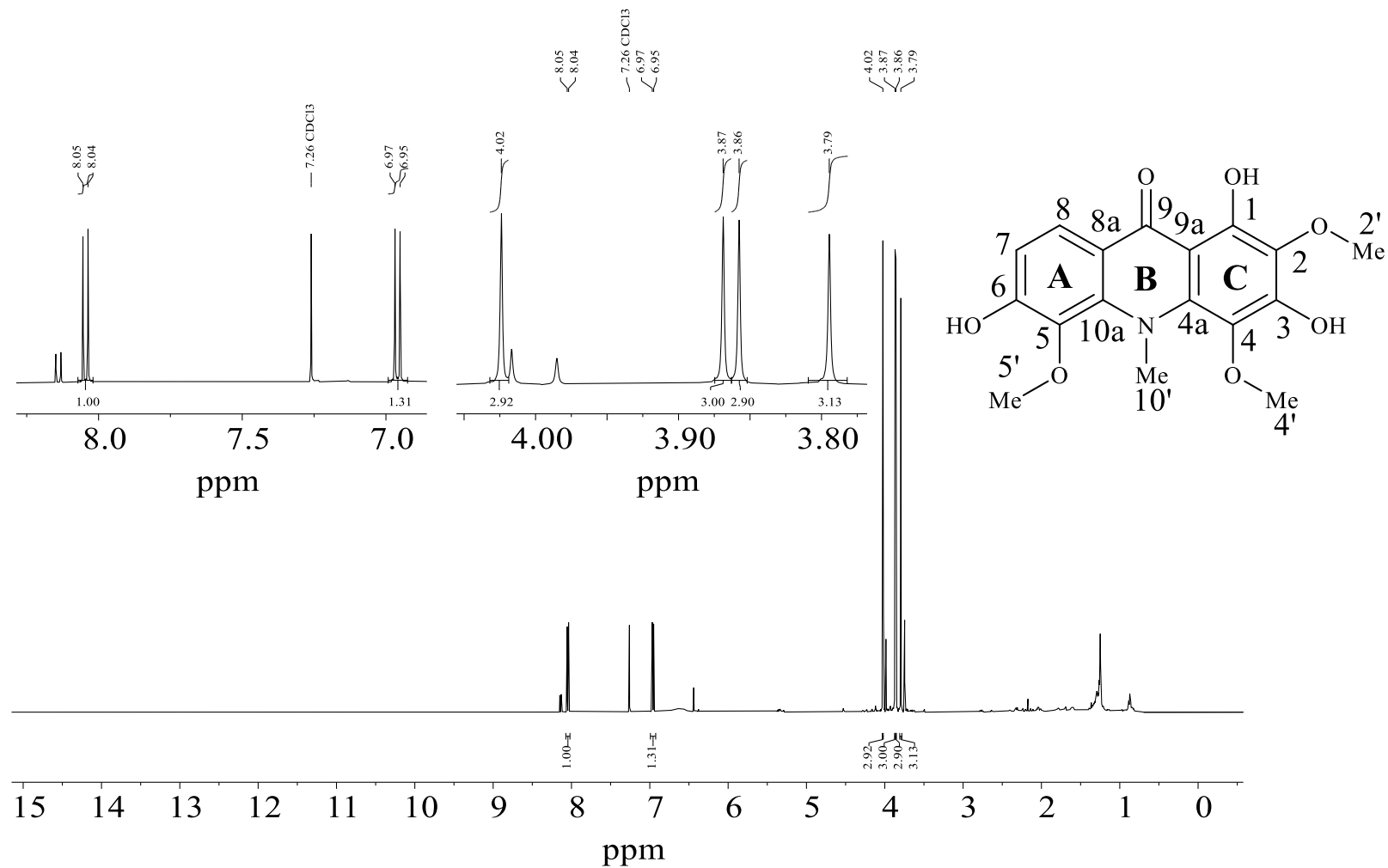
Por fim, os sinais em $\delta = 152,7$ e $152,4$ ppm foram assinalados aos carbonos aromáticos C1 e C3, respectivamente. Isso ocorre porque esses átomos (C1 e C3) são desblindados pelo grupo carbonil C9 (grupo retirador de elétrons), em contrapartida os carbonos C2 e C4 são blindados pela doação de densidade eletrônica do nitrogênio (grupo doador de elétrons) no anel **B**. Ademais, os picos de correlação entre o par C1 e OH1 e o par C3 e OH3 no espectro de HMBC foram determinantes para a atribuição de C1 e C3. Neste ponto da interpretação dos dados, sobraram apenas dois sinais referentes a carbonos aromáticos não identificados, em $\delta = 130,0$ e $130,8$ ppm. O sinal em $\delta = 130,8$ ppm apresenta um pico de correlação com o próton OH1 no espectro de HMBC, enquanto o outro sinal em $\delta = 130,0$ ppm não apresenta nenhuma correlação com tal próton. Essa informação indica que o sinal em $\delta = 130,8$ ppm é referente ao átomo C2, pois ele está apenas a três ligações de distância do próton OH1, enquanto C4 está a cinco ligações de distância, o que inviabilizaria o acoplamento entres átomos. Com isso, conclui-se que último sinal na região de carbono aromático, $\delta = 130,8$ ppm, pertence ao carbono C4. Dessarte, todos os carbonos sp^2 do anel **C** foram identificados, sendo possível afirmar, portanto, que, pelos dados dos espectros de RMN experimentais, a estrutura candidata correta é a **8b**, pois apenas ela apresenta os grupos hidroxilas nas posições 1 e 3 do anel **C**.

Figura 54 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, acetona- d_6 , 25 °C) do composto **8b**.



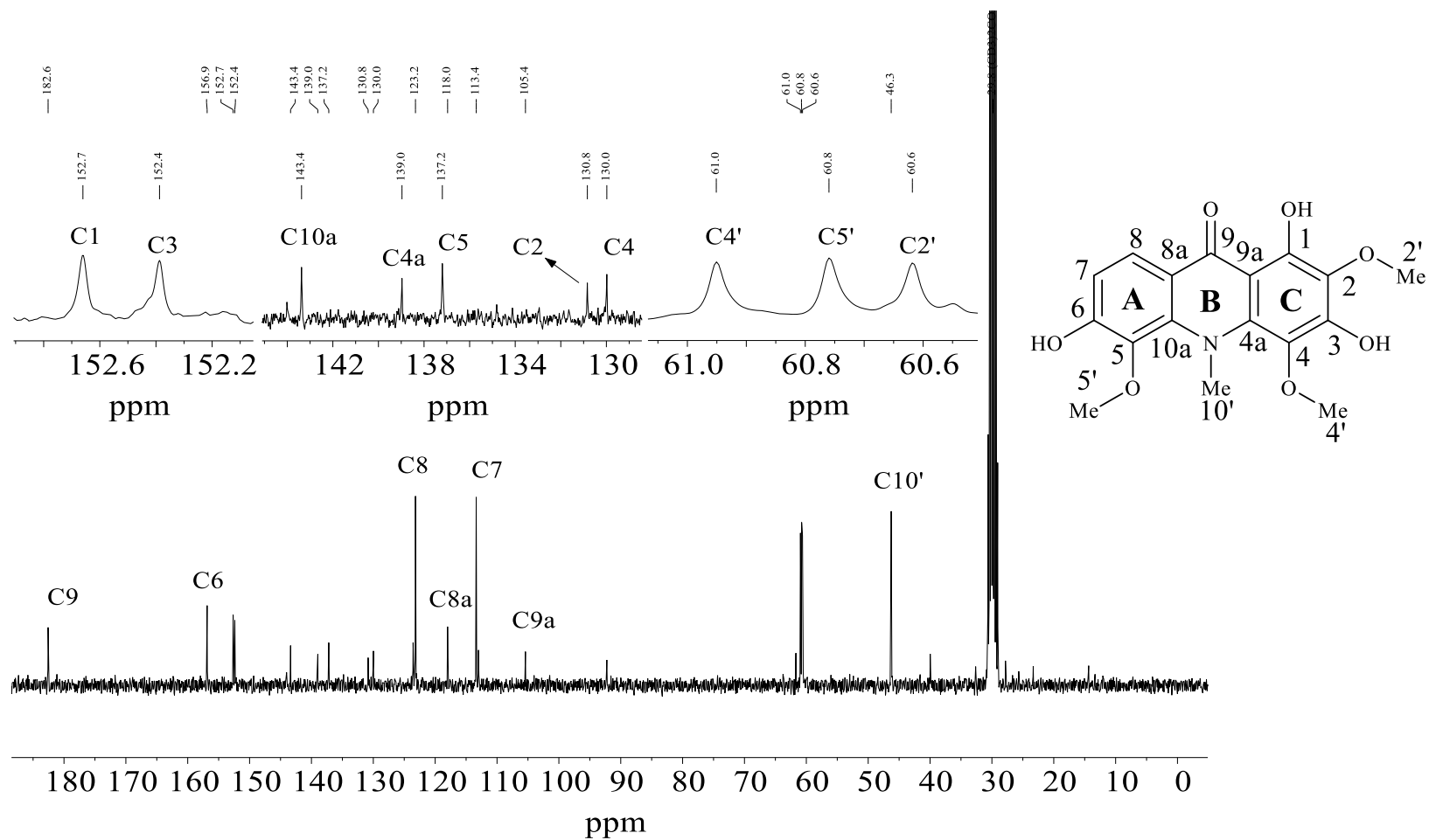
Fonte: O autor.

Figura 55 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C) do composto **8b**.

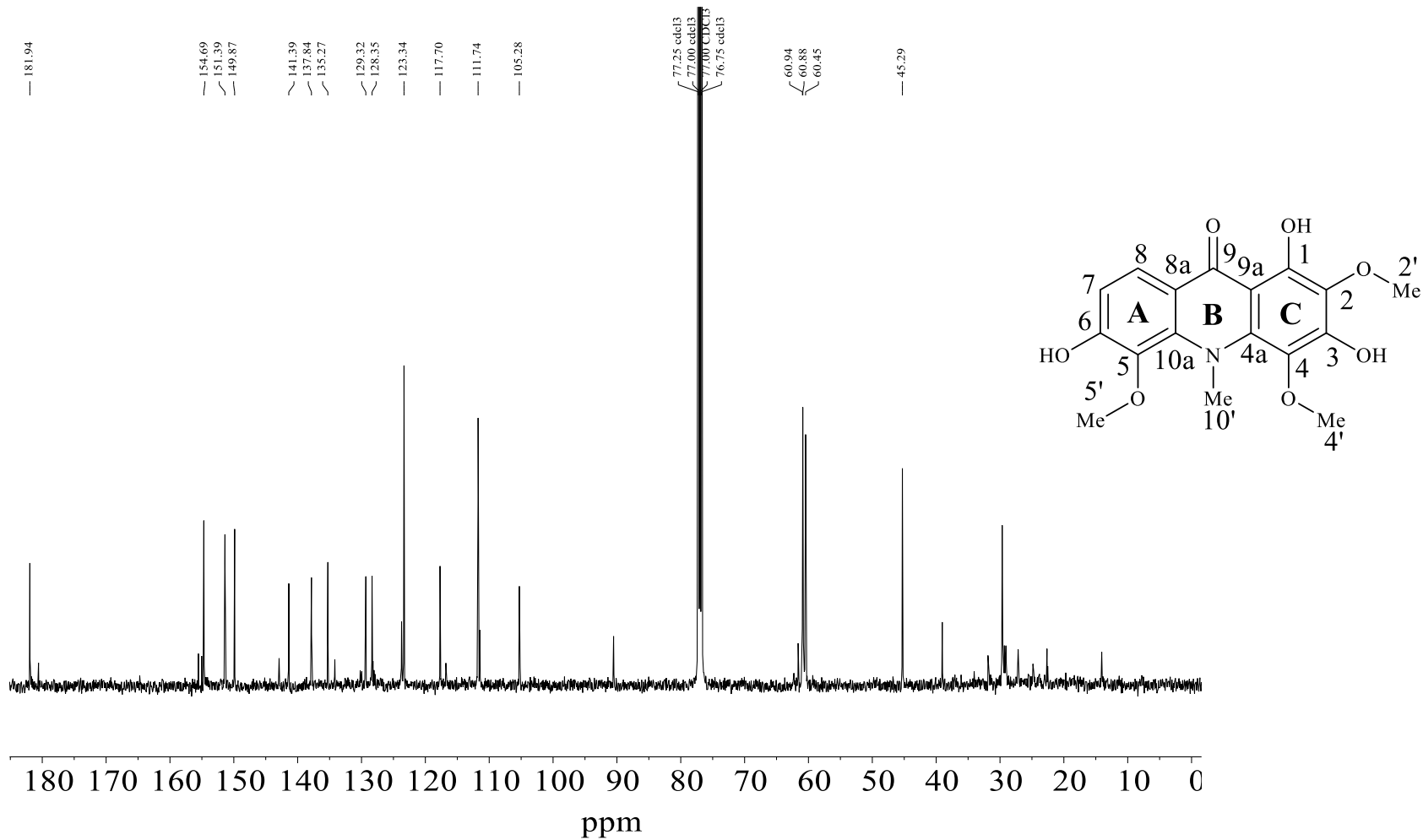


Fonte: O autor.

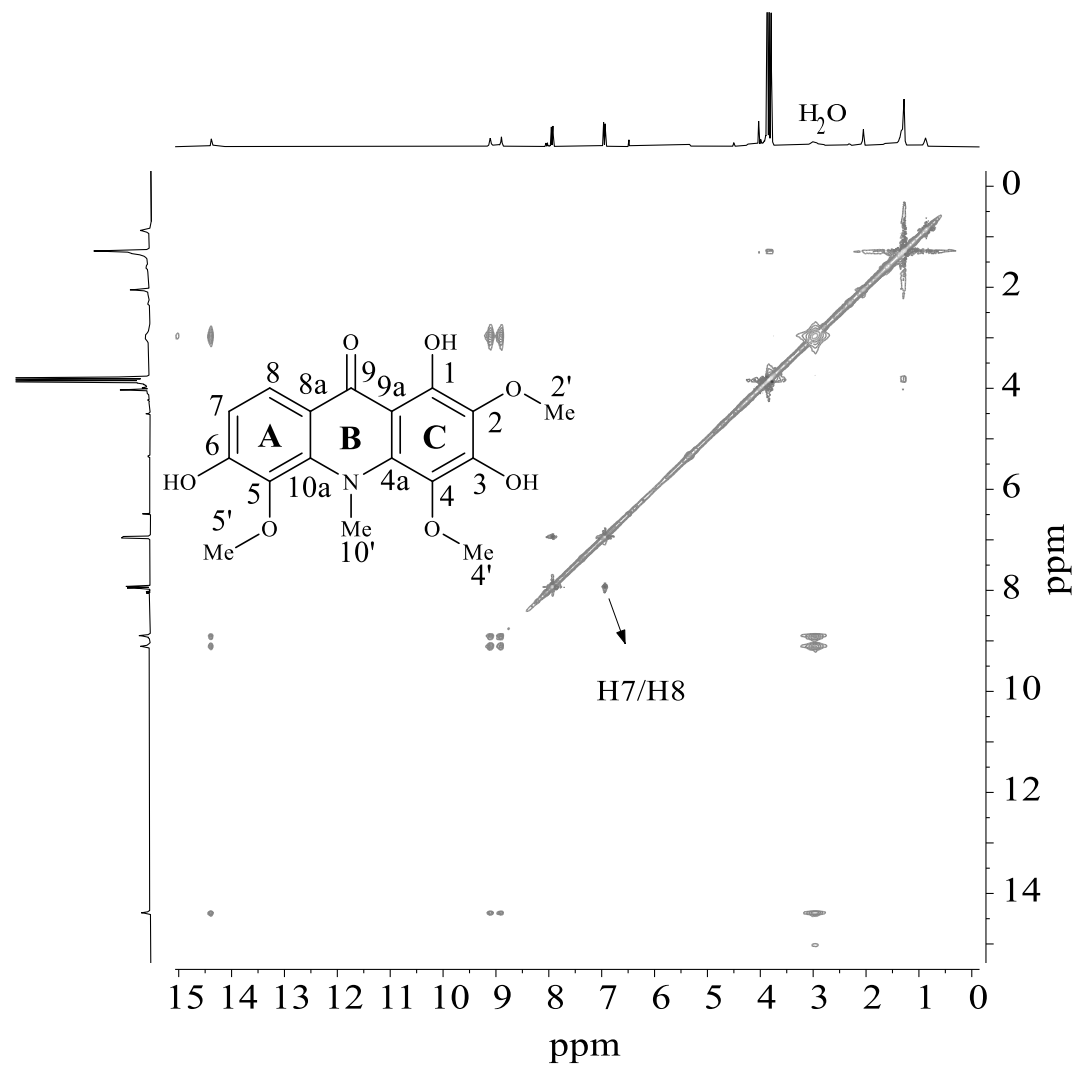
Figura 56 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona- d_6 , 25 °C) do composto **8b**.



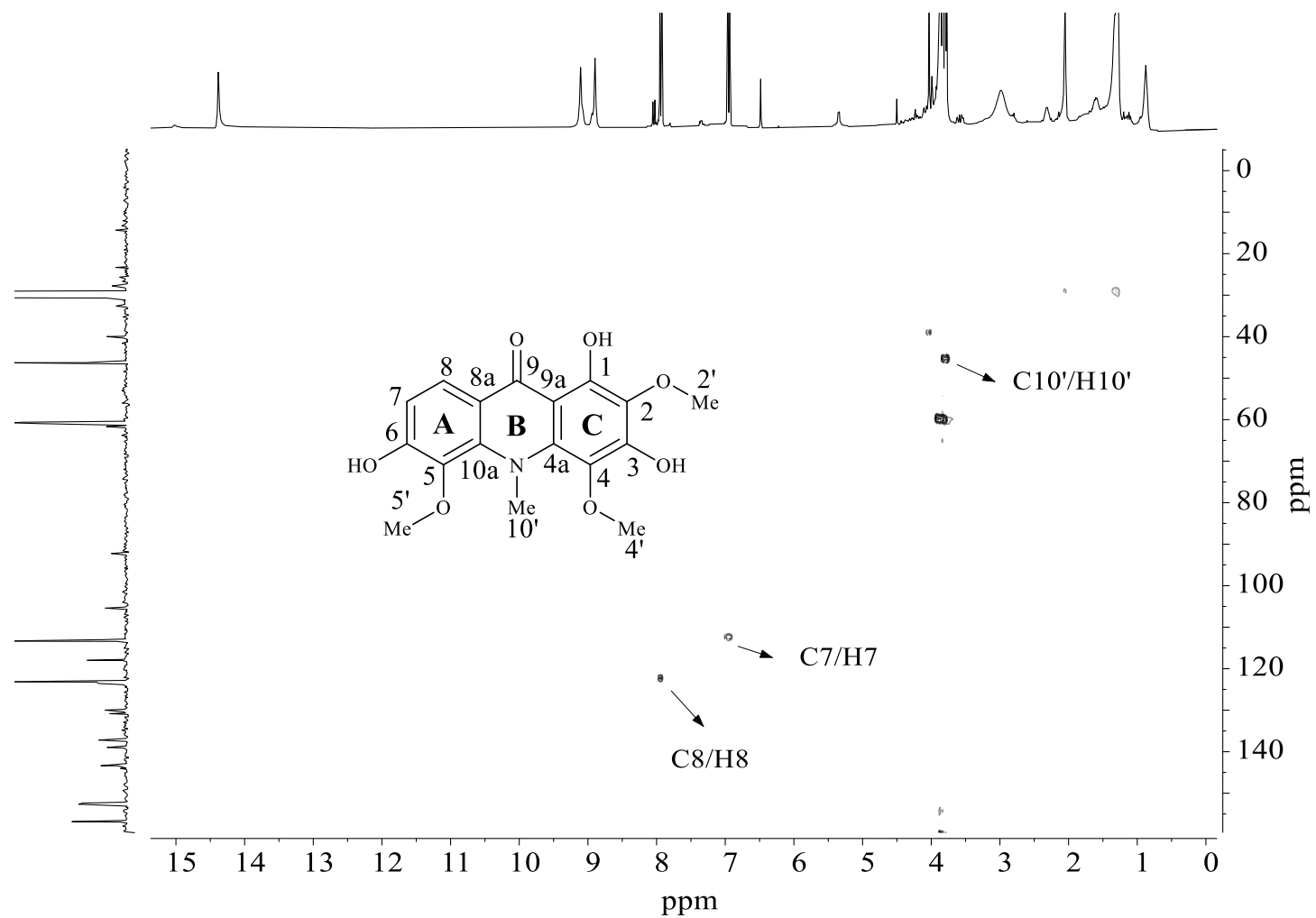
Fonte: O autor.

Figura 57 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C) do composto **8b**.

Fonte: O autor.

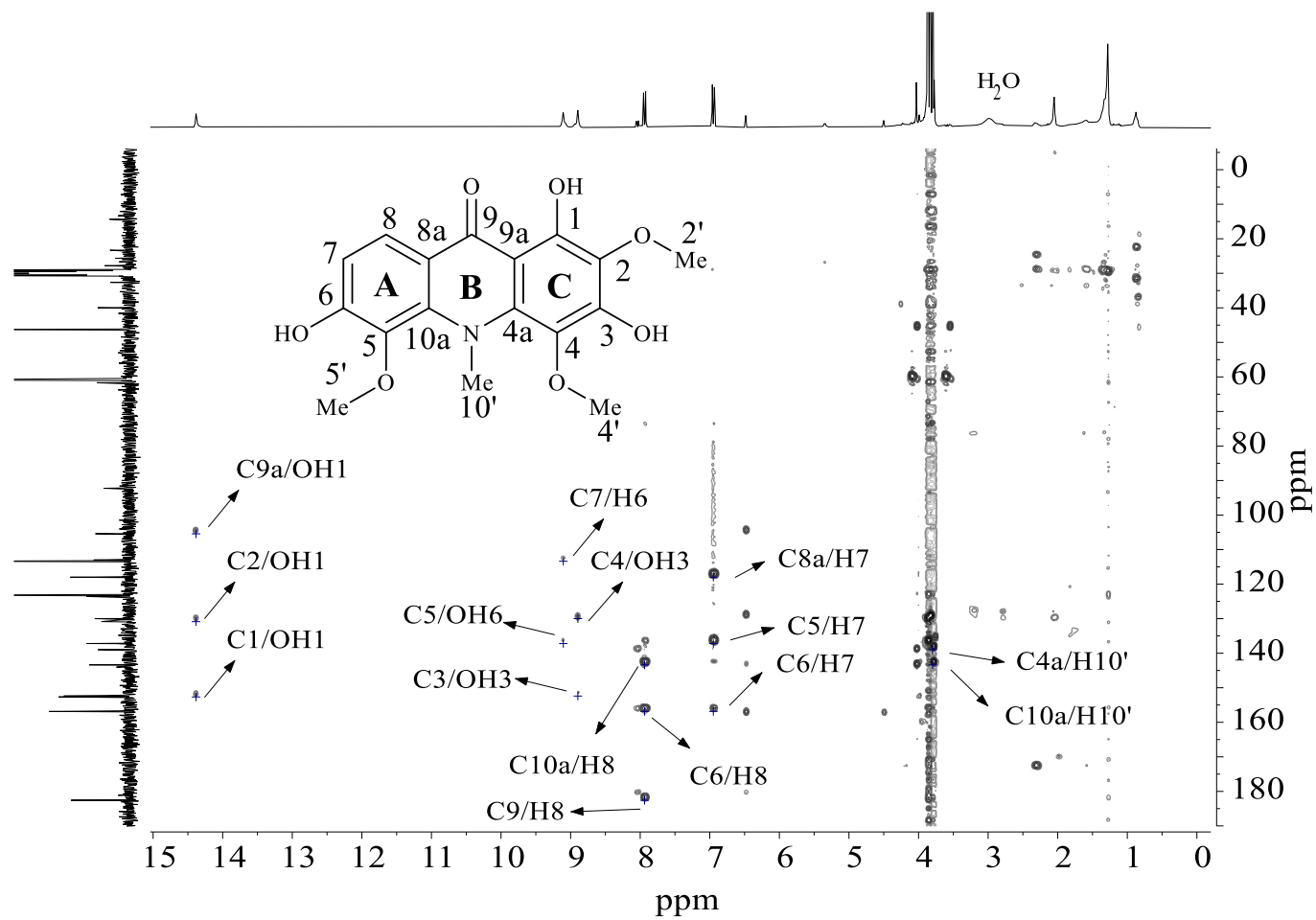
Figura 58 - Correlações de NOESY (acetona-*d*₆) para o composto **8b**.

Fonte: O autor.

Figura 59 - Correlações de HSQC (acetona-*d*₆) para o composto **8b**.

Fonte: O autor.

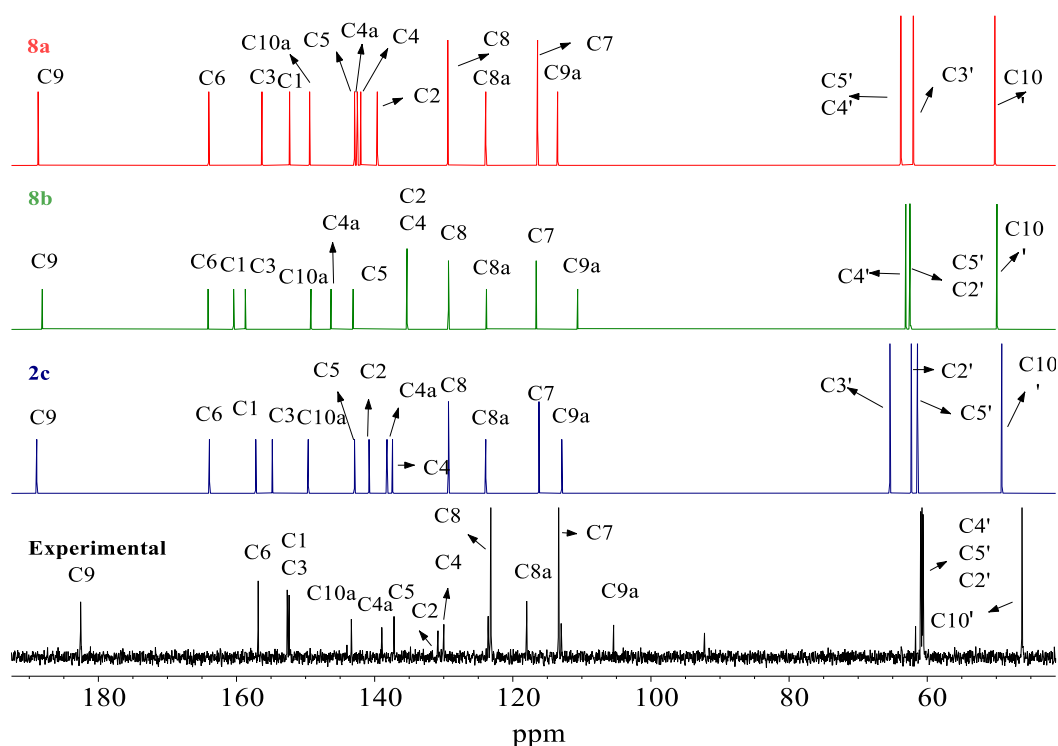
Figura 60 - Correlações de HMBC (acetona- d_6) para o composto **8b**.



Fonte: O autor.

Apesar de todas as técnicas empregadas, alguns sinais nos espectros de RMN para o composto **8b** ainda ficaram sem identificação. Os sinais em $\delta = 60,6$; $60,8$ e $61,0$ ppm, pertencem aos carbonos metílicos ($C2'$, $C4'$ e $C5'$), e os sinais em $\delta = 3,83$; $3,86$ e $3,87$ ppm aos prótons desses carbonos ($H2'$, $H4'$ e $H5'$). Apesar da possibilidade de alguns desses sinais serem identificados - como $H2'$ e $H4'$ devido à correlação que apresentam com $C2$ e $C4$ no HMBC - a proximidade e/ou sobreposição desses sinais entre si deixa esse trabalho muito árduo com os espectros experimentais que dispomos em mão. Para superar esse desafio, optamos por recorrer ao cálculo computacional. A **Figura 61** (página 121) ilustra o espectro experimental e os espectros teóricos para a amostra **8b** e suas estruturas candidatas.

Figura 61 - Espectro de RMN de ^{13}C calculado para as estruturas candidatas **8a-8c** e o espectro experimental para o composto **8b**.



Fonte: O autor.

A análise estatística DP4 realizada sem assinalar nenhum dos sinais do composto **8b** foi consistente com a interpretação dos sinais de RMN feitos a partir dos espectros experimentais, confirmando que a estrutura candidata correta é a **8b**. O DP4 assinalou os picos $\delta = 60,6$; $60,8$ e $61,0$ ppm para os carbonos $C2'$, $C5'$ e $C4'$, respectivamente. De igual modo, os sinais $\delta = 3,83$; $3,86$ e $3,87$ ppm foram atribuídos aos prótons $H4'$, $H5'$ e $H2'$, respectivamente. É interessante ressaltar que $C4$ e $C2$ apresentam picos de correlação no espectro de HMBC com os sinais $\delta = 3,87$ e $3,83$ ppm respectivamente, os quais foram atribuídos pelo DP4 aos hidrogênios metílicos $H2'$ e $H4'$. Desta forma, todos os hidrogênios e carbonos da acridona **8b**

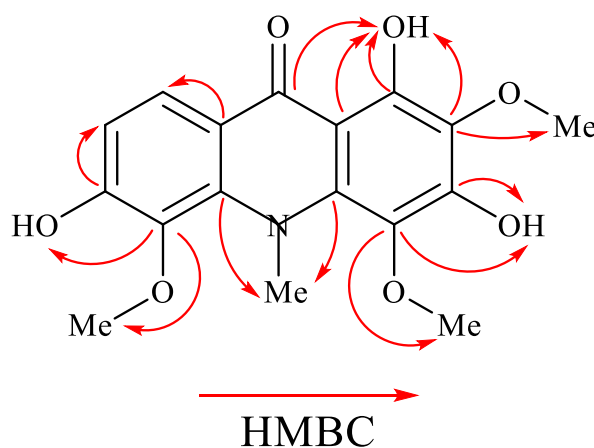
tiveram os seus sinais devidamente assinalados, como demonstra a **Tabela 10** (página 122). Algumas correlações chaves do espectro HMBC para a acridona **8b** são apresentados na **Figura 62** (página 122).

Tabela 10 - Dados de RMN para o composto **8b**: Deslocamento químico experimental (δ), multiplicidade (m), constantes de acoplamento (J), correlações HMBC.

Átomo	δ_{Cexp} (ppm)	Átomo	δ_{Hexp} (ppm) ^a	HMBC
C1	152.7	OH1	14.38 (s)	OH1
C2	130.8	-	-	OH1, H2'
C2'	60.6	H2'	3.87 (s)	-
C3	152.4	OH3	8.90 (s)	OH3
C4	130.0	-	-	OH3, H4'
C4'	61.0	H4'	3.83 (s)	-
C4a	139.0	-	-	H10'
C5	137.2	-	-	H5', H6, H7
C5'	60.8	H5'	3.86 (s)	-
C6	156.9	OH6	9.11 (s)	H7, H8
C7	113.4	H7	6.95 (d, 8.8 Hz)	OH6
C8	123.2	H8	7.94 (d, 8.8 Hz)	-
C8a	118.0	-	-	H7
C9	182.6	-	-	OH1
C9a	105.4	-	-	OH1
C10'	46.3	H10'	3.75 (s)	-
C10a	143.3	-	-	H8, H10'

^aOs dados em parênteses ao lado dos deslocamentos químicos são a multiplicidade e as constantes de acoplamento (em Hz) para cada hidrogênio.

Figura 62 - Correlações chaves HMBC para o composto **8b**.



Fonte: O autor.

Para concluir este estudo, foi realizada a análise estatística DP4 comparando os valores dos picos nos espectros de ^1H e ^{13}C teóricos com os valores obtidos nos espectros de RMN experimentais devidamente assinalados. O resultado da análise de DP4 (**Tabela 11**, página 123) indicou, mais uma vez, uma probabilidade de 100% para a estrutura candidata **8b** ser a correta para a acridona **8b**. Sendo assim, foi concluído que o produto natural **8b** é a molécula 1,3,6-triidroxi-2,4,5-trimetoxi-10-metilacridin-9(10*H*)-ona.

Tabela 11 - Análise de DP4 dos dados de RMN de ^{13}C e ^1H para as estruturas candidatas **8a-8c** após assinalar os dados experimentais.

Estruturas Candidatas	Probabilidade DP4 (%) para os dados de RMN		
	^{13}C e ^1H	^1H	^{13}C
8a	0,0	0,0	0,0
8b	100,0	100,0	100,0
8c	0,0	0,0	0,0

4.6 Conclusão

Onze compostos foram isolados do caule da *Conchrocarpus mastigophorus*. A estrutura de dois produtos naturais foi identificada pelo uso de métodos espectroscópicos auxiliados por cálculos teóricos computacionais. A estrutura do composto **7a** foi determinada como 3*S*-(-)-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona, enquanto a do composto **8b**, um produto natural inédito, foi atribuída como 1,3,6-triidroxi-2,4,5-trimetoxi-10-metilacridin-9(10*H*)-ona. O potencial de cálculos de mecânica quântica foi demonstrando nesse trabalho como uma importante ferramenta na elucidação estrutural de produtos naturais com espectros de RMN de alta complexidade.

5 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, foram elucidadas as estruturas de quatro moléculas utilizando dados experimentais de RMN, aliados ao cálculo computacional de DFT. Para avaliar a qualidade da análise, foram empregadas ferramentas estatísticas, como MAE, CMAE e DP4. A primeira molécula elucidada, a lactona pentacíclica *rac*-(3*aR*,4*S*,4*aS*,5*R*,8*S*,8*aR*,9*R*,9*aS*)-3*a*,9*a*-dicloro-3*a*,4,4*a*,5,8,8*a*,9,9*a*-octaidro-4,9:5,8-dimetanonafto[2,3-*c*]furan-1(3*H*)-ona (**3d**), enfatizou a importância de conhecermos o mecanismos das reações químicas, a fim de diminuir significativamente o número de estruturas candidatas, o que leva a uma análise mais precisa e com menor uso de recursos. A segunda molécula foi o primeiro dos três produtos naturais analisados, o alcaloide pirrolizidínico (3*S*^{*},4*R*^{*},5*S*^{*},8*a*^{1R}^{*},13*aR*^{*})-3-hidroxi-3,4,5-trimetil-4,5,8,8*a*¹,10,12,13,13*a*-octahidro-2*H*-[1,6]dioxacicoundecino[2,3,4-*gh*]pirrolizina-2,6(3*H*)-diona (**6h**). Este produto natural, extraído da *Crotalaria retusa* L., possuía uma pequena quantidade de amostra para realizar as análises, o que poderia ter inviabilizado sua elucidação naquele momento. Todavia, o uso de cálculos de DFT, nesse problema, demonstrou a importância da técnica na elucidação de produtos naturais.

A terceira e quarta molécula foram obtidas da planta *Conchocarpus mastigophorus* (Rutaceae). A lactama 3*S*-(-)-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona (**7a**), apesar de sua estrutura mais simples quando comparada às demais moléculas desse trabalho, demonstrou como os cálculos de DFT podem ser utilizados para aprimorar a elucidação de um produto natural que já havia sido registrado parcialmente na literatura. Além disso, o uso do experimento de VCD foi crucial para determinar sua estrutura inequívoca. Finalmente, a acridona 1,3,6-triidroxi-2,4,5-trimetoxi-10-metilacridin-9(10*H*)-ona (**8b**) teve sua estrutura completamente elucidada, e a parte final de sua elucidação (referente aos carbonos e prótons de algumas de suas metilas) foi muito facilitada pelo uso dos cálculos computacionais.

Esse trabalho traz exemplos de como a elucidação de moléculas orgânicas, de origem sintética ou natural, pode ser viabilizada pela combinação de esforços entre a química computacional e espectros experimentais de RMN e outras técnicas. Com a chegada de softwares mais otimizados e hardwares cada vez mais poderosos e acessíveis, o emprego dos cálculos computacionais de DFT no dia a dia dos laboratórios de pesquisa para elucidação de moléculas é uma realidade próxima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. GARCIA CORTEZ, D.; E. RANIERI CORTEZ, L.; B. FERNANDES, J.; C. VIEIRA, P.; G. FERREIRA, A.; FÁTIMA DAS G. F. DA SILVA, M. New Alkaloids from *Conchocarpus gaudichaudianus*. **HETEROCYCLES**, v. 78, n. 8, p. 2053, 2009.
- ABRAHAM, R. J.; CANTON, M.; GRIFFITHS, L. Proton chemical shifts in NMR: Part 17. Chemical shifts in alkenes and anisotropic and steric effects of the double bond. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 421–431, 2001.
- ALAGAR YADAV, S.; RAMALINGAM, S.; JABAMALAI RAJ, A.; SUBBAN, R. Antihistamine from *Tragia involucrata* L. leaves. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 12, n. 3, p. 2197, 2015.
- ALVARENGA, E. S.; TEIXEIRA, M. G.; LOPES, D. T.; DEMUNER, A. J. Computation and structural elucidation of compounds formed via epoxide alcoholysis. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 57, n. 4, p. S101–S107, 2019.
- AMBROZIN, A. R. P.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. das G. F. da; ELLENA, J. A.; ALBUQUERQUE, S. de. New pyrone and quinoline alkaloid from *Almeidea rubra* and their trypanocidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 3a, p. 434–439, 2005.
- AMBROZIN, A. R. P.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. das G. F. da; ALBUQUERQUE, S. de. Piranoflavonas inéditas e atividades tripanocidas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 740–743, 2008.
- ANTONIO, A. D. S.; WIEDEMANN, L. S. M.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Natural products' role against COVID-19. **RSC Advances**, v. 10, n. 39, p. 23379–23393, 2020.
- BABA, N. D.; UCHENDU, C.; NJOKU, C. O. I. Effect of *Crotalaria lachnosema* Stapf. (Fabaceae) extract on biomarkers of hepatic and renal function and oxidative stress in male Wistar rats. **Comparative Clinical Pathology**, v. 28, n. 5, p. 1259–1266, 2019.
- BACHRACH, S. M. **Computational Organic Chemistry**. Second ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014.
- BAGNO, A.; SAIELLI, G. Addressing the stereochemistry of complex organic molecules by density functional theory-NMR. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 5, n. 2, p. 228–240, 2015.
- BECKE, A. D. A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 2, p. 1372–1377, 1993 a.
- BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 7, p. 5648–5652, 1993 b.
- BELLETE, B. S.; SÁ, I. C. G. de; MAFEZOLI, J.; CERQUEIRA, C. do N.; SILVA, M. F. das G. F. d; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; PIRANI, J. R. Fitoquímica e quimiosistemática de *Conchocarpus marginatus* e *C. inopinatus* (Rutaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2132–2138, 2012.

BHANDARI NEUPANE, J.; NEUPANE, R. P.; LUO, Y.; YOSHIDA, W. Y.; SUN, R.; WILLIAMS, P. G. Characterization of Leptazolines A–D, Polar Oxazolines from the *Cyanobacterium Leptolyngbya* sp., Reveals a Glitch with the “Willoughby–Hoye” Scripts for Calculating NMR Chemical Shifts. **Organic Letters**, v. 21, n. 20, p. 8449–8453, 2019.

BIANCONI, V.; VIOLI, F.; FALLARINO, F.; PIGNATELLI, P.; SAHEBKAR, A.; PIRRO, M. Is Acetylsalicylic Acid a Safe and Potentially Useful Choice for Adult Patients with COVID-19? **Drugs**, v. 80, n. 14, p. 1383–1396, 2020.

BIAVATTI, M. W.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. das G. F. da; FERNANDES, J. B.; VICTOR, S. R.; PAGNOCCA, F. C.; ALBUQUERQUE, S.; CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Biological Activity of Quinoline Alkaloids from *Raulinoa echinata* and X-ray Structure of Flindersiamine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 1, p. 66–70, 2002.

BOPPRÉ, M.; THODEN, T. Plants producing pyrrolizidine alkaloids: sustainable tools for nematode management? **Nematology**, v. 12, n. 1, p. 1–24, 2010.

BRANDENBURG, J. G.; HOCHHEIM, M.; BREDOW, T.; GRIMME, S. Low-Cost Quantum Chemical Methods for Noncovalent Interactions. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 5, n. 24, p. 4275–4284, 2014.

BUSH, K. *et al.* Tackling antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 894–896, 2011.

C. MATASYOH, J.; M. TALONTSI, F.; M. NGOUMFO, R.; CHEPKORIR, R. Larvicidal Activity of Acridone Alkaloids from *Zanthoxylum leprieurii* against the Malaria Vector *Anopheles gambiae*. **The Natural Products Journal**, v. 1, n. 2, p. 121–124, 2011.

CABRAL, R. S. A.; ALLARD, P. M.; MARCOURT, L.; YOUNG, M. C. M.; QUEIROZ, E. F.; WOLFENDER, J. L. Targeted Isolation of Indolopyridoquinazoline Alkaloids from *Conchocarpus fontanesianus* Based on Molecular Networks. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 9, p. 2270–2278, 2016.

CABRAL, R. S.; SARTORI, M. C.; CORDEIRO, I.; QUEIROGA, C. L.; EBERLIN, M. N.; LAGO, J. H. G.; MORENO, P. R. H.; YOUNG, M. C. M. Anticholinesterase activity evaluation of alkaloids and coumarin from stems of *Conchocarpus fontanesianus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 2, p. 374–380, 2012.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. suppl 3, p. 1–7, 2019.

CARUANO, J.; MUCCIOLI, G. G.; ROBIETTE, R. Biologically active γ -lactams: synthesis and natural sources. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 14, n. 43, p. 10134–10156, 2016.

CARVALHO, K. S.; DANTAS, A. F. M.; MEDEIROS, R. M. T. Toxicity Spontaneous acute poisoning by *Crotalaria retusa* in sheep and biological control of this plant with sheep. **Toxicon**, v. 58, n. 6–7, p. 606–609, 2011.

CASTANEDA, S. M. B.; ALVARENGA, E. S.; DEMUNER, A. J.; GUIMARAES, L. M. Vibrational spectra and theoretical calculations of a natural pentacyclic triterpene alcohol

isolated from *Mucuna pruriens*. **Structural Chemistry**, v.31, n.2, p. 599-607, 2019.

CHANSRINIYOM, C.; RUANGRUNGSI, N.; LIPIPUN, V.; KUMAMOTO, T.; ISHIKAWA, T. Isolation of Acridone Alkaloids and *N*-[(4-Monoterpenyloxy)phenylethyl]-Substituted Sulfur-Containing Propanamide Derivatives from *Glycosmis parva* and Their Anti-herpes Simplex Virus Activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 11, p. 1246–1250, 2009.

CHARRIS-MOLINA, A.; CASTILLO, J.; MACÍAS, M.; PORTILLA, J. One-Step Synthesis of Fully Functionalized Pyrazolo[3,4-*b*]pyridines via Isobenzofuranone Ring Opening. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 82, n. 23, p. 12674–12681, 2017.

CHEN, H.; LAM, S.; YANG, M.; HUNG, H.; SHIEH, P.; CHEN, F.; KUO, P.; WU, T. Revision of structures of acridone alkaloids from natural sources. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 68, n. 4, p. 669–677, 2021.

COLLI-SILVA, M.; PIRANI, J. R. Biogeographic patterns of Galipeinae (Galipeae, Rutaceae) in Brazil: Species richness and endemism at different latitudes of the Atlantic Forest “hotspot”. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 251, n. December 2018, p. 77–87, 2019.

COPPOLA, G. M.; KAHLE, A. D.; SHAPIRO, M. J. ¹³C NMR investigation of some heteroring substituted 2- and 4-quinolone systems. **Organic Magnetic Resonance**, v. 17, n. 4, p. 242–245, 1981.

COSTA, F. L. P.; DE ALBUQUERQUE, A. C. F.; FIOROT, R. G.; LIÃO, L. M.; MARTORANO, L. H.; MOTA, G. V. S.; VALVERDE, A. L.; CARNEIRO, J. W. M.; DOS SANTOS JUNIOR, F. M. Structural characterisation of natural products by means of quantum chemical calculations of NMR parameters: New insights. **Organic Chemistry Frontiers**, v. 8, n. 9, p. 2019–2058, 2021.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 7, p. 3012–3043, 2009.

CRAMER, C. J. **Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models**. Second ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2002.

CUVELLIER, A.; VERHELLE, R.; BRANCART, J.; VANDERBORGHT, B.; VAN ASSCHE, G.; RAHIER, H. The influence of stereochemistry on the reactivity of the Diels–Alder cycloaddition and the implications for reversible network polymerization. **Polymer Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 473–485, 2019.

DA COSTA RESENDE, G.; ALVARENGA, E. S. Structural elucidation of dioxo-cage compounds from tetrahydroisobenzofuran-1(3*H*)-one: analysis of NMR data and GIAO chemical shifts calculations. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 968–974, 2016.

DE FIGUEIREDO, P. S.; LINDOSO SILVA, N. M. Somatic Polymorphism Variation in *Crotalaria retusa* L. Seeds. **American Journal of Plant Sciences**, v. 09, n. 01, p. 46–59, 2018.

DE OLIVEIRA, L. S. S.; DE ARAÚJO, M. F.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Two new labdane-type diterpenoids and others compounds from *Conchocarpus cyrtanthus* (Rutaceae).

Revista Virtual de Quimica, v. 8, n. 1, p. 87–96, 2016.

DITCHFIELD, R.; HEHRE, W. J.; POPLE, J. A. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 54, n. 2, p. 724–728, 1971.

ERMANIS, K.; PARKES, K. E. B.; AGBACK, T.; GOODMAN, J. M. Expanding DP4: Application to drug compounds and automation. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 3943–3949, 2016.

ERMANIS, K.; PARKES, K. E. B.; AGBACK, T.; GOODMAN, J. M. Doubling the power of DP4 for computational structure elucidation. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 15, n. 42, p. 8998–9007, 2017.

ERMANIS, K.; PARKES, K. E. B.; AGBACK, T.; GOODMAN, J. M. The optimal DFT approach in DP4 NMR structure analysis – pushing the limits of relative configuration elucidation. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 17, n. 24, p. 5886–5890, 2019.

FAROOQ, S.; NGAINI, Z. Natural and Synthetic Drugs as Potential Treatment for Coronavirus Disease 2019 (COVID-2019). **Chemistry Africa**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 2021.

FISCHER, H.; ZEILE, K. Synthese des Hämatoporphyrins, Protoporphyrins und Hämins. **Justus Liebig's Annalen der Chemie**, v. 468, n. 1, p. 98–116, 1929.

FLID, V. R.; DURAKOV, S. A.; MOROZOVA, T. A.; CHESHKOV, D. A.; KATSMAN, E. A. Codimerization of norbornene and 1,3-cyclopentadiene: quantum chemical and experimental research. **Russian Chemical Bulletin**, v. 67, n. 8, p. 1335–1339, 2018.

FREITAS, L. C. G. Prêmio Nobel de Química em 1998: Walter Kohn e John A. Pople. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 293–298, 1999.

FRINGUELLI, F.; TATICCHI, A. **The Diels-Alder Reaction: Selected Practical Methods**. 1st. ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2002.

FRISCH, M. J. *et al.* Gaussian 16 Revision C.01. Wallingford CT, 2016.

FU, P. P.; XIA, Q.; LIN, G.; CHOU, M. W. Pyrrolizidine Alkaloids—Genotoxicity, Metabolism Enzymes, Metabolic Activation, and Mechanisms. **Drug Metabolism Reviews**, v. 36, n. 1, p. 1–55, 2004.

FUNEL, J.-A.; ABELE, S. Industrial Applications of the Diels-Alder Reaction. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 14, p. 3822–3863, 2013.

FURUKAWA, H.; WU, T.-S.; KUOH, C.-S. Constituents of *Citrus depressa* (Rutaceae). Characterizations of Five New Acridone Alkaloids. **HETEROCYCLES**, v. 19, n. 2, p. 273, 1982.

GARCÍA-RODEJA, Y.; FERNÁNDEZ, I. Factors Controlling the Reactivity and Selectivity of the Diels–Alder Reactions Involving 1,2-Azaborines. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 81, n. 15, p. 6554–6562, 2016.

GAYNES, R. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical

Use. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 849–853, 2017.

GHOSH, K.; AMIN, S. A.; GAYEN, S.; JHA, T. Chemical-informatics approach to COVID-19 drug discovery: Exploration of important fragments and data mining based prediction of some hits from natural origins as main protease (Mpro) inhibitors. **Journal of Molecular Structure**, v. 1224, p. 129026, 2021.

GONSALVES, A. M. d'A. R.; SERRA, M. E. da S.; EUSÉBIO, M. E. da S. **Estereoquímica**. 1st. ed. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2011.

GRIMBLAT, N.; SAROTTI, A. M. Computational Chemistry to the Rescue: Modern Toolboxes for the Assignment of Complex Molecules by GIAO NMR Calculations. **Chemistry - A European Journal**, v. 22, n. 35, p. 12246–12261, 2016.

GRIMBLAT, N.; ZANARDI, M. M.; SAROTTI, A. M. Beyond DP4: an Improved Probability for the Stereochemical Assignment of Isomeric Compounds using Quantum Chemical Calculations of NMR Shifts. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 80, n. 24, p. 12526–12534, 2015.

GROPPO, M.; COSTA, I. G.; BRUNIERA, C. P.; FERREIRA, C.; AFONSO, L.; MAEOKA, H. M.; DUTRA, F. V.; GASPARINO, E. C.; FERREIRA, P. D. L. Rock star flowers: *Conchocarpus hendrixii* (Galipeinae, Rutaceae), a new species from Eastern Brazil with notes on its phylogenetic position in the genus. **Phytotaxa**, v. 422, n. 1, p. 75–92, 2019.

HE, X.; XIA, Q.; WU, Q.; TOLLESON, W. H.; LIN, G.; FU, P. P. Primary and secondary pyrrolic metabolites of pyrrolizidine alkaloids form DNA adducts in human A549 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 54, p. 286–294, 2019.

HEHRE, W. J.; DITCHFIELD, R.; POPLER, J. A. Self—Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian—Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 56, n. 5, p. 2257–2261, 1972.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. **Physical Review**, v. 136, n. 3B, p. B864–B871, 1964.

HOWARTH, A.; ERMANIS, K.; GOODMAN, J. M. DP4-AI automated NMR data analysis: straight from spectrometer to structure. **Chemical Science**, v. 11, n. 17, p. 4351–4359, 2020.

HOWARTH, A.; GOODMAN, J. M. The DP5 probability, quantification and visualisation of structural uncertainty in single molecules. **Chemical Science**, v. 13, n. 12, p. 3507–3518, 2022.

INOKUMA, Y.; YOSHIOKA, S.; ARIYOSHI, J.; ARAI, T.; HITORA, Y.; TAKADA, K.; MATSUNAGA, S.; RISSANEN, K.; FUJITA, M. X-ray analysis on the nanogram to microgram scale using porous complexes. **Nature**, v. 495, n. 7442, p. 461–466, 2013.

ISIDORO, M. M.; SILVA, M. F. das G. F. d; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; ARRUDA, A. C.; SILVA, S. da C. Fitoquímica e quimiossistemática de *Euxylophora paraensis* (Rutaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2119–2124, 2012.

JAIN, R.; BALLY, T.; RABLEN, P. R. Calculating Accurate Proton Chemical Shifts of Organic Molecules with Density Functional Methods and Modest Basis Sets. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 11, p. 4017–4023, 2009.

JANK, B.; RATH, J. The Risk of Pyrrolizidine Alkaloids in Human Food and Animal Feed. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 3, p. 191–193, 2017.

JU-ICHI, M.; KAGA, H.; MURAGUCHI, M.; INOUE, M.; KAJIURA, I.; OMURA, M.; FURUKAWA, H. New acridone alkaloid and coumarin from Citrus plants. **Heterocycles**, v. 27, n. 9, p. 2197–2200, 1988.

KALLUNKI, J. A.; PIRANI, J. R. Synopses of *Angostura Roem. & Schult.* and *Conchocarpus J. C. Mikan* (Rutaceae). **Kew Bulletin**, v. 53, n. 2, p. 257, 1998.

KAMAL, A.; RAMANA, K. V.; RAMANA, A. V.; BABU, A. H. Chemoenzymatic enantioselective synthesis of 3-hydroxy-2-pyrrolidinones and 3-hydroxy-2-piperidinones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, n. 17, p. 2587–2594, 2003.

KARMAKAR, R.; PAHARI, P.; MAL, D. Phthalides and Phthalans: Synthetic Methodologies and Their Applications in the Total Synthesis. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 12, p. 6213–6284, 2014.

KASZA, P.; TRYBULA, M. E.; BARADZIEJ, K.; KEPCZYNSKI, M.; SZAFRAŃSKI, P. W.; CEGŁA, M. T. Fluorescent triazolyl spirooxazolidines: Synthesis and NMR stereochemical studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1183, p. 157–167, 2019.

KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Physical Review**, v. 140, n. 4A, p. A1133–A1138, 1965.

KOPP, T.; SALZER, L.; ABDEL-TAWAB, M.; MIZAIKOFF, B. Efficient Extraction of Pyrrolizidine Alkaloids from Plants by Pressurised Liquid Extraction – A Preliminary Study. **Planta Medica**, 2019.

KRIVDIN, L. B. Computational protocols for calculating ^{13}C NMR chemical shifts. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 112–113, p. 103–156, 2019 a.

KRIVDIN, L. B. Computational ^1H NMR: Part 3. Biochemical studies. **Magnetic Resonance in Chemistry**, n. March, p. 1–16, 2019 b.

LA CLAIR, J. J. Total Syntheses of Hexacyclinol, 5-epi-Hexacyclinol, and Desoxohexacyclinol Unveil an Antimalarial Prodrug Motif. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 17, p. 2769–2773, 2006.

LAURO, G.; DAS, P.; RICCIO, R.; REDDY, D. S.; BIFULCO, G. DFT/NMR Approach for the Configuration Assignment of Groups of Stereoisomers by the Combination and Comparison of Experimental and Predicted Sets of Data. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 85, n. 5, p. 3297–3306, 2020.

LEE, D. Y. W.; LI, Q. Y.; LIU, J.; EFFERTH, T. Traditional Chinese herbal medicine at the forefront battle against COVID-19: Clinical experience and scientific basis. **Phytomedicine**, v. 80, p. 153337, 2021.

LEWARS, E. G. **Computational Chemistry**. 2nd. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011.

LIMA, W. G.; BRITO, J. C. M.; DA CRUZ NIZER, W. S. Bee products as a source of promising therapeutic and chemoprophylaxis strategies against COVID-19 (SARS-CoV-2).

Phytotherapy Research, v. 2019, n. December 2019, p. 743–750, 2020.

LISTRO, R.; ROSSINO, G.; DELLA VOLPE, S.; STABILE, R.; BOIOCCHI, M.; MALAVASI, L.; ROSSI, D.; COLLINA, S. Enantiomeric Resolution and Absolute Configuration of a Chiral δ -Lactam, Useful Intermediate for the Synthesis of Bioactive Compounds. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 24, 2020.

LU, A.; WANG, T.; HUI, H.; WEI, X.; CUI, W.; ZHOU, C.; LI, H.; WANG, Z.; GUO, J.; MA, D.; WANG, Q. Natural Products for Drug Discovery: Discovery of Gramines as Novel Agents against a Plant Virus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 8, p. 2148–2156, 2019.

LU, D.-Y.; LU, T.-R.; LU, Y.; SASTRY, N.; WU, H.-Y. Discover Natural Chemical Drugs in Modern Medicines. **Journal of Postgenomics Drug & Biomarker Development**, v. 6, n. 3, p. 1–6, 2016.

LUNDE, G. The 1927 and 1928 Nobel chemistry prize winners, Wieland and Windaus. **Journal of Chemical Education**, v. 7, n. 8, p. 1763–1777, 1930.

MACGREGOR, C. I.; HAN, B. Y.; GOODMAN, J. M.; PATERSON, I. Toward the stereochemical assignment and synthesis of hemicalide: DP4f GIAO-NMR analysis and synthesis of a reassigned C16–C28 subunit. **Chemical Communications**, v. 52, n. 25, p. 4632–4635, 2016.

MAESTRO; SCHRÖDINGER. **Schrödinger Release 2019**. New York: LLC, 2019.

MAIA, L. A.; DE LUCENA, R. B.; DA T. NOBRE, V. M.; DANTAS, A. F. M.; COLEGATE, S. M.; RIET-CORREA, F. Natural and experimental poisoning of goats with the pyrrolizidine alkaloid-producing plant *Crotalaria retusa* L. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 5, p. 592–595, 2013.

MÁNDI, A.; WU, J.; KURTÁN, T. TDDFT-ECD and DFT-NMR studies of thaigranatins A–E and granatumin L isolated from *Xylocarpus granatum*. **RSC Advances**, v. 10, n. 53, p. 32216–32224, 2020.

MARQUES, M. A. L.; BOTTI, S. O que é e para serve a teoria dos funcionais da densidade? **Gazeta da Física**, v. 29, n. 4, p. 10–15, 2006.

MAZZOLA, E. P.; LAMBERT, J. B.; RIDGE, C. D. The shielding effect of the double bond in 2-norbornene and α -pinene and β -pinene. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 31, n. 8, p. e3816, 2018.

MCALPINE, J. B. *et al.* The value of universally available raw NMR data for transparency, reproducibility, and integrity in natural product research. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 1, p. 35–107, 2019.

MICHAEL, J. P. Acridone Alkaloids. *In: Alkaloids: Chemistry and Biology*. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2017. v. 78p. 1–108.

MONDAL, A.; GANDHI, A.; FIMOIGNARI, C.; ATANASOV, A. G.; BISHAYEE, A. Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. **European Journal of Pharmacology**, v. 858, n. November 2018, p. 172472, 2019.

MONTINARI, M. R.; MINELLI, S.; DE CATERINA, R. The first 3500 years of aspirin history from its roots – A concise summary. **Vascular Pharmacology**, v. 113, n. October 2018, p. 1–8, 2019.

MORAES, F. C.; ALVARENGA, E. S.; DEMUNER, A. J.; VIANA, V. M. Assignment of the relative and absolute stereochemistry of two novel epoxides using NMR and DFT-GIAO calculations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1164, p. 109–115, 2018.

MURUGAVEL, S.; RAVIKUMAR, C.; JAABIL, G.; ALAGUSUNDARAM, P. Synthesis, crystal structure analysis, spectral investigations (NMR, FT-IR, UV), DFT calculations, ADMET studies, molecular docking and anticancer activity of 2-(1-benzyl-5-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-4-(2-chlorophenyl)-6-methoxypyridine – A novel poten. **Journal of Molecular Structure**, v. 1176, p. 729–742, 2019.

NAIDOO, D.; COOMBES, P. H.; MULHOLLAND, D. A.; CROUCH, N. R.; VAN DEN BERGH, A. J. J. N-Substituted acridone alkaloids from *Toddaliopsis bremekampii* (Rutaceae: Toddalioideae) of south-central Africa. **Phytochemistry**, v. 66, n. 14, p. 1724–1728, 2005.

NARKHEDE, R. R.; PISE, A. V.; CHEKE, R. S.; SHINDE, S. D. Recognition of Natural Products as Potential Inhibitors of COVID-19 Main Protease (Mpro): In-Silico Evidences. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 10, n. 5, p. 297–306, 2020.

NAVARRO-VÁZQUEZ, A.; GIL, R. R.; BLINOV, K. Computer-Assisted 3D Structure Elucidation (CASE-3D) of Natural Products Combining Isotropic and Anisotropic NMR Parameters. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 1, p. 203–210, 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NICOLAOU, K. C.; SNYDER, S. A. Chasing Molecules That Were Never There: Misassigned Natural Products and the Role of Chemical Synthesis in Modern Structure Elucidation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 7, p. 1012–1044, 2005.

NOBRE, V. M. da T.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA FILHO, J. M.; DANTAS, A. F. M.; TABOSA, I. M.; VASCONCELOS, J. S. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em Equídeos no semi-árido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 3, p. 132–143, 2004.

NOBRE, V. M. T.; DANTAS, A. F. M.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA FILHO, J. M.; TABOSA, I. M.; VASCONCELOS, J. S. Acute intoxication by *Crotalaria retusa* in sheep. **Toxicon**, v. 45, n. 3, p. 347–352, 2005.

NOORWALA, M.; MOHAMMAD, F. V.; AHMAD, V. U.; SENER, B.; ERGUN, F.; DELIORMAN, D. Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio lorenthii*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 5, p. 618–620, 2000.

OLIVEIRA, R. P.; DEMUNER, A. J.; ALVARENGA, E. S.; BARBOSA, L. C. A.; DE MELO SILVA, T. A novel alkaloid isolated from *Crotalaria paulina* and identified by NMR and DFT

calculations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1152, n. 15, p. 337–343, 2018.

OLIVEIRA, R. P.; DEMUNER, A. J.; ALVARENGA, E. S.; PARMA, M. C.; BARBOSA, L. C. A.; DE MOURA GUIMARÃES, L.; AGUIAR, A. R. Experimental and theoretical studies on the characterization of monocrotaline by infrared and Raman spectroscopies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1135, p. 228–233, 2017.

PAULINI, H.; WAIBEL, R.; SCHIMMER, O. Mutagenicity and structure-mutagenicity relationships of furoquinolines, naturally occurring alkaloids of the Rutaceae. **Mutation Research Letters**, v. 227, n. 3, p. 179–186, 1989.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4 ed ed. [S. l.]: Cengage Learning, 2010.

PINTO, B. N. S.; ALVARENGA, E. S.; SANTOS, A. R.; OLIVEIRA, W. F.; DE PAULA, V. F.; OLIVEIRA, M. N.; JUNIOR, J. M. B.; DE L. BATISTA, A. N. Structural Elucidation by NMR Analysis Assisted by DFT Calculations of a Novel Natural Product from *Conchocarpus Mastigophorus* (Rutaceae). **Asian Journal of Organic Chemistry**, v. 11, n. 6, 2022 a.

PINTO, B. N. S.; MOURA, G. A.; DEMUNER, A. J.; ALVARENGA, E. S. Structural elucidation of a novel pyrrolizidine alkaloid isolated from *Crotalaria retusa* L. **Journal of Molecular Structure**, v. 1254, p. 132394, 2022 b.

PINTO, B. N. S.; TEIXEIRA, M. G.; ALVARENGA, E. S. Synthesis and structural elucidation of a phthalide analog using NMR analysis and DFT calculations. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 559–565, 2020.

POLESELLI BRUNIERA, C.; KALLUNKI, J. A.; GROppo, M. *Almeidea* A. St.-Hil. Belongs to *Conchocarpus* J.C. Mikan (Galipeinae, Rutaceae): Evidence from Morphological and Molecular Data, with a First Analysis of Subtribe Galipeinae. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0125650, 2015.

PORCO, J. A.; SU, S.; LEI, X.; BARDHAN, S.; RYCHNOVSKY, S. D. Total synthesis and structure assignment of (+)-hexacyclinol. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 45, n. 35, p. 5790–5792, 2006.

QUEIROZ, G. R.; RIBEIRO, R. de C. L.; FLAIBAN, K. K. M. da C.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; LISBOA, J. A. N. Intoxicação espontânea por *Crotalaria incana* em bovinos no norte do estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 823–832, 2013.

RAO, K. N.; KANAKARAJU, M.; KUNWAR, A. C.; GHOSH, S. Total Synthesis of the Proposed Structure of Maltepolide C. **Organic Letters**, v. 18, n. 16, p. 4092–4095, 2016.

RESENDE, G. C.; ALVARENGA, E. S.; WILLOUGHBY, P. H. Isolation and stereochemical assignment of phthalides resulting from the Diels–Alder reaction between 5-isopropoxyfuran-2(5*H*)-one and cyclopentadiene. **Journal of Molecular Structure**, v. 1101, p. 212–218, 2015.

RODRIGUES, T.; REKER, D.; SCHNEIDER, P.; SCHNEIDER, G. Counting on natural products for drug design. **Nature Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 531–541, 2016.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, D.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; ATAIDE MARTINS, J. P.; FISCHER (NEE HELLER), L.; CSUK, R. Hederagenin amide derivatives as

potential antiproliferative agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 168, p. 436–446, 2019.

ROUAMBA, A.; OUÉDRAOGO, V.; KARAMA, I.; COMPAORÉ, M.; KIENDREBEOGO, M. Ethno-medicinal Use of *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae), a Pyrrolizidine Alkaloid Toxic Plant. **International Journal of Biochemistry Research & Review**, v. 23, n. 2, p. 1–6, 2018.

ROVIELLO, V.; ROVIELLO, G. N. Lower COVID-19 mortality in Italian forested areas suggests immunoprotection by Mediterranean plants. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 1, p. 699–710, 2021.

RYCHNOVSKY, S. D. Predicting NMR Spectra by Computational Methods: Structure Revision of Hexacyclinol. **Organic Letters**, v. 8, n. 13, p. 2895–2898, 2006.

RYCROFT, D. S.; STIRLING, I. R.; ROBINS, D. J. Assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra and conformational analysis of the pyrrolizidine alkaloid 13-*O*-acetyldicrotaline. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 30, n. 13, p. S42–S45, 1992.

SAIELLI, G.; BAGNO, A. Can two molecules have the same NMR spectrum? Hexacyclinol revisited. **Organic Letters**, v. 11, n. 6, p. 1409–1412, 2009.

SAROTTI, A. M. Successful combination of computationally inexpensive GIAO ^{13}C NMR calculations and artificial neural network pattern recognition: a new strategy for simple and rapid detection of structural misassignments. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 29, p. 4847, 2013.

SAROTTI, A. M. Structural revision of two unusual rhamnofolane diterpenes, curcusones I and J, by means of DFT calculations of NMR shifts and coupling constants. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 944–950, 2018.

SCHLEGEL, B.; HÄRTL, A.; DAHSE, H.-M.; GOLLMICK, F. a; GRÄFE, U.; DÖRFELT, H.; KAPPES, B. Hexacyclinol, a new antiproliferative metabolite of *Panus rudis* HKI 0254. **The Journal of antibiotics**, v. 55, n. 9, p. 814–817, 2002.

SEGHES, S.; PROTASOVA, L.; MULLENS, S.; THYBAUT, J. W.; STEVENS, C. V. Improving the efficiency of the Diels–Alder process by using flow chemistry and zeolite catalysis. **Green Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 237–248, 2017.

SEIXAS, P. T. L.; DEMUNER, A. J.; ALVARENGA, E. S.; BARBOSA, L. C. A.; MARQUES, A.; FARIAS, E. de S.; PIKANÇO, M. C. Bioactivity of essential oils from *Artemisia* against *Diaphania hyalinata* and its selectivity to beneficial insects. **Scientia Agricola**, v. 75, n. 6, p. 519–525, 2018.

SEPULVEDA, C. S.; FASCIO, M. L.; GARCIA, C. C.; D'ACCORSO, N. B.; DAMONTE, E. B. Acridones As Antiviral Agents: Synthesis, Chemical and Biological Properties. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 2402–2414, 2013.

SINAN, K. I.; SAFTIĆ, L.; PERŠURIĆ, Ž.; PAVELIĆ, S. K.; ETIENNE, O. K.; PICOT-ALLAIN, M. C. N.; MAHOMOODALLY, M. F.; ZENGİN, G. A comparative study of the chemical composition, biological and multivariate analysis of *Crotalaria retusa* L. stem barks, fruits, and flowers obtained via different extraction protocols. **South African Journal of Botany**, v. 128, p. 101–108, 2020.

SMITH, S. G.; CHANNON, J. A.; PATERSON, I.; GOODMAN, J. M. The stereochemical assignment of acyclic polyols: a computational study of the NMR data of a library of stereopentad sequences from polyketide natural products. **Tetrahedron**, v. 66, n. 33, p. 6437–6444, 2010.

SMITH, S. G.; GOODMAN, J. M. Assigning the Stereochemistry of Pairs of Diastereoisomers Using GIAO NMR Shift Calculation. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 4597–4607, 2009.

SMITH, S. G.; GOODMAN, J. M. Assigning Stereochemistry to Single Diastereoisomers by GIAO NMR Calculation: The DP4 Probability. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 37, p. 12946–12959, 2010.

SYED, Y. Y. Lenalidomide: A Review in Newly Diagnosed Multiple Myeloma as Maintenance Therapy After ASCT. **Drugs**, v. 77, n. 13, p. 1473–1480, 2017.

TAGLIALATELA-SCAFATI, O. New Hopes for Drugs against COVID-19 Come from the Sea. **Marine Drugs**, v. 19, n. 2, p. 104, 2021.

TEIXEIRA, M. G.; ALVARENGA, E. S. Characterization of novel isobenzofuranones by DFT calculations and 2D NMR analysis. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 623–631, 2016.

TENG, W. Y.; HUANG, Y. L.; SHEN, C. C.; HUANG, R. L.; CHUNG, R. S.; CHEN, C. C. Cytotoxic acridone alkaloids from the stem bark of *Citrus maxima*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 52, n. 6, p. 1253–1255, 2005.

THAWABTEH, A.; JUMA, S.; BADER, M.; KARAMAN, D.; SCRANO, L.; BUFO, S. A.; KARAMAN, R. The Biological Activity of Natural Alkaloids against Herbivores, Cancerous Cells and Pathogens. **Toxins**, v. 11, n. 11, p. 656, 2019.

THUREAU, P.; CARVIN, I.; ZIARELLI, F.; VIEL, S.; MOLLICA, G. A Karplus Equation for the Conformational Analysis of Organic Molecular Crystals. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, n. 45, p. 16047–16051, 2019.

TOMASI, J.; MENNUCCI, B.; CANCÈS, E. The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 464, n. 1–3, p. 211–226, 1999.

TOMEČEK, J.; BOUŘ, P. Density Functional Computations of Vibrational Circular Dichroism Spectra beyond the Born–Oppenheimer Approximation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 16, n. 4, p. 2627–2634, 2020.

TORRENT, K. B. A.; ALVARENGA, E. S. Synthesis and Identification of Epoxy Derivatives of 5-Methylhexahydroisindole-1,3-dione and Biological Evaluation. **Molecules**, v. 26, n. 7, p. 1923, 2021.

TRIGO, J. R.; BROWN, K. S.; WITTE, L.; HARTMANN, T.; ERNST, L.; BARATA, L. E. S. Pyrrolizidine alkaloids: different acquisition and use patterns in Apocynaceae and Solanaceae feeding ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 58, n. 1, p. 99–123, 1996.

VENTER, W. D. F. *et al.* Dolutegravir plus Two Different Prodrugs of Tenofovir to Treat HIV. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 9, p. 803–815, 2019.

VIEIRA, P. C.; KUBO, I.; KUJIME, H.; YAMAGIWA, Y.; KAMIKAWA, T. Molluscicidal Acridone Alkaloids from *Angostura paniculata*: Isolation, Structures, and Synthesis. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 8, p. 1112–1117, 1992.

WANG, S.; HAN, X.; YANG, Y.; ZHOU, C.; LUO, D.; HE, W.; ZHU, Q.; XU, Y. Discovery of deoxylimonin δ -lactam derivative with favorable anti-inflammation and antinociception efficacy from chemical modified limonin/deoxylimonin analogs. **Bioorganic Chemistry**, v. 100, n. April, p. 103886, 2020.

WANG, T.; BRUDVIG, G.; BATISTA, V. S. Characterization of Proton Coupled Electron Transfer in a Biomimetic Oxomanganese Complex: Evaluation of the DFT B3LYP Level of Theory. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 6, n. 3, p. 755–760, 2010.

WANNERE, C. S.; PAUL, A.; HERGES, R.; HOUK, K. N.; SCHAEFER, H. F.; VON RAGUÉ SCHLEYER, P. The existence of secondary orbital interactions. **Journal of Computational Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 344–361, 2007.

WILLIAMSON, G.; KERIMI, A. Testing of natural products in clinical trials targeting the SARS-CoV-2 (Covid-19) viral spike protein-angiotensin converting enzyme-2 (ACE2) interaction. **Biochemical Pharmacology**, v. 178, n. June, p. 114123, 2020.

WILLOUGHBY, P. H.; JANSMA, M. J.; HOYE, T. R. A guide to small-molecule structure assignment through computation of (1 H and 13 C) NMR chemical shifts. **Nature Protocols**, v. 9, n. 3, p. 643–660, 2014.

WOODWARD, R. B.; DOERING, W. E. The Total Synthesis of Quinine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 67, n. 5, p. 860–874, 1945.

WU, T.; FURUKAWA, H. Acridone alkaloids. VII. Constituents of *Citrus sinensis* Osbeck var. *brasiliensis* Tanaka. Isolation and characterization of three new acridone alkaloids, and a new coumarin. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 901–906, 1983.

XIN, D. *et al.* Development of a ^{13}C NMR Chemical Shift Prediction Procedure Using B3LYP/cc-pVDZ and Empirically Derived Systematic Error Correction Terms: A Computational Small Molecule Structure Elucidation Method. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 82, n. 10, p. 5135–5145, 2017.

YANG, M.; MA, J.; RUAN, J.; ZHANG, C.; YE, Y.; PI-CHENG FU, P.; LIN, G. Absorption difference between hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides – Mechanism and its potential toxic impact. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 249, n. October, p. 112421, 2020.

YANG, Y.-Y.; YANG, W.; ZUO, W.-J.; ZENG, Y.-B.; LIU, S.-B.; MEI, W.-L.; DAI, H.-F. Two new acridone alkaloids from the branch of *Atalantia buxifolia* and their biological activity. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 15, n. 8, p. 899–904, 2013.

YIMER, E. M.; HISHE, H. Z.; TUEM, K. B. Repurposing of the β -lactam antibiotic, ceftriaxone for neurological disorders: A review. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. March, p. 2260–2271, 2019.

ZANARDI, M. M.; SAROTTI, A. M. Sensitivity Analysis of DP4+ with the Probability Distribution Terms: Development of a Universal and Customizable Method. **The Journal of Organic Chemistry**, p. acs.joc.1c00987, 2021.

APÊNDICES

Tabela 12 - Dados de RMN experimental e calculado para as estruturas candidatas **3a-3d** para análise de MAE.

Posição	Experimental		Calculado δ_H				Calculado δ_C				$\Delta\delta_H$				$\Delta\delta_C$			
	δ_H	δ_C	3a	3b	3c	3d	3a	3b	3c	3d	3a	3b	3c	3d	3a	3b	3c	3d
1	-	171,8					172,9	174,5	174,0	173,1					1,1	2,7	2,2	1,3
3	4,85	73,7	4,80	4,41	4,33	4,80	75,8	82,0	79,8	72,7	0,05	0,44	0,52	0,05	2,1	8,3	6,1	1,0
3'	4,40	-	4,63	4,51	4,53	4,30					0,23	0,11	0,13	0,10				
3a	-	77,9					89,5	79,5	83,5	85,8					11,6	1,6	5,6	7,9
4	2,57	54,6	2,74	2,64	2,41	2,52	57,7	56,3	54,9	56,5	0,17	0,07	0,16	0,05	3,1	1,7	0,3	1,9
4a	2,24	40,6	2,26	2,10	2,78	2,40	49,7	47,7	43,5	42,8	0,02	0,14	0,54	0,16	9,1	7,1	2,9	2,2
5	2,98	46,9	2,83	2,78	2,87	2,89	43,5	43,4	48,5	49,0	0,15	0,20	0,11	0,09	3,4	3,5	1,6	2,1
6	6,05	135,8	6,31	6,34	6,12	6,14	141,6	141,7	137,2	137,3	0,26	0,29	0,07	0,09	5,8	5,9	1,4	1,5
7	6,05	136,5	6,31	6,35	6,13	6,13	141,6	141,8	137,1	137,8	0,26	0,30	0,08	0,08	5,1	5,3	0,6	1,3
8	2,98	47,4	2,68	2,83	2,89	2,86	42,6	42,7	48,6	49,5	0,30	0,15	0,09	0,12	4,8	4,7	1,2	2,1
8a	2,18	43,8	2,26	2,21	2,84	2,21	49,5	48,7	41,8	46,2	0,08	0,03	0,66	0,03	5,7	4,9	2,0	2,4
9	2,71	54,3	2,83	2,70	2,48	2,65	56,3	51,5	50,8	56,9	0,12	0,01	0,23	0,06	2,0	2,8	3,5	2,6
9a	-	76,0					83,3	78,0	81,1	82,5					7,3	2,0	5,1	6,5
10	1,83	33,9	2,81	1,79	1,00	1,86	49,2	39,8	28,3	33,3	0,98	0,04	0,83	0,03	15,3	5,9	5,6	0,6
10'	2,68	-	2,13	1,84	2,64	2,70					0,55	0,84	0,04	0,02				
11	1,22	53,6	1,38	2,70	1,44	1,35	42,1	46,3	53,3	53,6	0,16	1,48	0,22	0,13	11,5	7,3	0,3	0,0
11'	1,39	-	1,34	1,48	1,45	1,39					0,05	0,09	0,06	0,00				
MAE											0,24	0,30	0,27	0,07	6,3	4,5	2,7	2,4

Tabela 13 - Dados de RMN experimental e calculado para as estruturas candidatas **3e-3h** para análise de MAE

Position	Experimental		Calculado δ_H				Calculado δ_C				$\Delta\delta_H$				$\Delta\delta_C$			
	δ_H	δ_C	3e	3f	3g	3h	3e	3f	3g	3h	3e	3f	3g	3h	3e	3f	3g	3h
1	-	171,8					171,6	172,6	173,9	171,2					0,2	0,8	2,1	0,6
3	4,85	73,7	4,57	4,28	4,21	4,71	72,4	79,5	81,6	72,4	0,28	0,57	0,64	0,14	1,3	5,8	7,9	1,3
3'	4,4	-	4,22	4,50	4,39	4,38					0,18	0,10	0,01	0,02				
3a	-	77,9					85,3	82,9	77,0	88,9					7,4	5,0	0,9	11,0
4	2,57	54,6	2,49	2,34	2,54	2,74	57,1	55,3	56,8	59,5	0,08	0,23	0,03	0,17	2,5	0,7	2,2	4,9
4a	2,24	40,6	1,71	2,17	2,74	2,89	43,4	44,7	49,3	50,7	0,53	0,07	0,50	0,65	2,8	4,1	8,7	10,1
5	2,98	46,9	2,69	2,63	2,68	2,72	47,6	46,8	44,8	45,9	0,29	0,35	0,30	0,26	0,7	0,1	2,1	1,0
6	6,05	135,8	6,27	6,36	6,15	5,92	140,1	141,0	135,6	138,1	0,22	0,31	0,10	0,13	4,3	5,2	0,2	2,3
7	6,05	136,5	6,31	6,35	6,14	6,19	141,5	140,6	135,3	140,3	0,26	0,30	0,09	0,14	5,0	4,1	1,2	3,8
8	2,98	47,4	2,65	2,70	2,71	2,68	47,5	47,1	44,8	45,8	0,33	0,28	0,27	0,30	0,1	0,3	2,6	1,6
8a	2,18	43,8	1,66	2,25	2,87	2,86	46,8	42,6	50,4	51,9	0,52	0,07	0,69	0,68	3,0	1,2	6,6	8,1
9	2,71	54,3	2,65	2,52	2,72	2,82	56,9	51,2	52,1	58,1	0,06	0,19	0,01	0,11	2,6	3,1	2,2	3,8
9a	-	76					81,6	80,4	75,8	82,8					5,6	4,4	0,2	6,8
10	1,83	33,9	2,26	1,30	1,83	2,91	34,7	29,6	41,8	50,6	0,43	0,53	0,00	1,08	0,8	4,3	7,9	16,7
10'	2,68	-	2,41	2,28	1,91	2,18					0,27	0,40	0,77	0,50				
11	1,22	53,6	1,98	1,95	1,68	1,63	43,3	43,1	60,2	61,2	0,76	0,73	0,46	0,41	10,3	10,5	6,6	7,6
11'	1,39	-	1,15	1,18	1,95	1,96					0,24	0,21	0,56	0,57				
MAE											0,32	0,31	0,32	0,37	3,3	3,6	3,7	5,7

Tabela 14 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **3a**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	3,774636	0,289491	-0,614187
2	6	1,467172	-0,078129	-1,181709
3	6	2,425330	-0,745539	0,964147
4	6	1,479562	-1,269247	-0,164997
5	6	3,785380	-0,725553	0,259865
6	6	2,407234	0,971809	-0,513979
7	6	-0,020466	-1,686765	-0,081844
8	6	-1,041625	-0,716942	0,571459
9	6	-1,023231	0,496599	-0,418388
10	6	-0,037549	0,062278	-1,533743
11	6	-0,739468	1,702037	0,472460
12	8	-0,829095	1,345372	1,767457
13	6	-0,799899	-0,082806	1,953981
14	6	2,172706	0,774230	0,993761
15	6	-0,394310	-1,448423	-1,571376
16	17	-2,601789	0,903293	-1,190119
17	17	-2,620971	-1,600064	0,661083
18	8	-0,519620	2,829159	0,122144
19	1	4,533169	0,530996	-1,352256
20	1	1,920853	-0,368083	-2,135329
21	1	2,384130	-1,287954	1,911452
22	1	1,954335	-2,153816	-0,602257
23	1	4,553618	-1,482777	0,381634
24	1	2,338622	1,987607	-0,907145
25	1	-0,151050	-2,701994	0,298174
26	1	-0,211966	0,636032	-2,445557
27	1	-1,582963	-0,329353	2,668132
28	1	0,173255	-0,359395	2,366887
29	1	2,928275	1,294387	1,587354
30	1	1,204914	1,084999	1,357283
31	1	0,241077	-2,008712	-2,261013
32	1	-1,442472	-1,651307	-1,803246

Tabela 15 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **3b**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	3,651923	-1,034772	0,058095
2	6	1,342954	-1,064472	0,746458
3	6	2,490447	0,972301	0,029900
4	6	1,515739	0,448186	1,131664
5	6	3,797404	0,257672	0,380713
6	6	2,245000	-1,210936	-0,517083
7	6	0,060637	0,916743	1,406984
8	6	-0,911668	0,990064	0,211654
9	6	-1,075386	-0,524342	-0,187930
10	6	-0,189729	-1,274349	0,832186
11	6	-2,542503	-0,839128	0,157592
12	8	-3,174533	0,242397	0,621362
13	6	-2,336760	1,403774	0,670751
14	6	2,104818	0,152490	-1,214933
15	6	-0,467311	-0,382800	2,074179
16	17	-0,891953	-1,003964	-1,897204
17	17	-0,428764	2,169530	-1,051172
18	8	-3,075403	-1,911826	0,065306
19	1	4,342894	-1,846125	0,265978
20	1	1,742521	-1,719309	1,528302
21	1	2,543182	2,057207	-0,075313
22	1	2,014250	0,551598	2,101283
23	1	4,631117	0,713917	0,905858
24	1	2,072621	-2,106755	-1,116446
25	1	0,006876	1,826715	2,011644
26	1	-0,491032	-2,322362	0,906597
27	1	-2,331056	1,768397	1,701471
28	1	-2,776810	2,152821	0,013189
29	1	2,836385	0,272117	-2,018732
30	1	1,118795	0,357166	-1,605960
31	1	0,141021	-0,678179	2,931607
32	1	-1,512475	-0,348962	2,398173

Tabela 16 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **3c**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	3,236206	-1,368062	-0,421906
2	6	1,261729	-0,371604	0,823846
3	6	2,942035	0,922265	-0,397491
4	6	1,403625	0,888583	-0,087556
5	6	3,357754	-0,290865	-1,209165
6	6	2,737543	-0,894653	0,931076
7	6	0,349630	0,656906	-1,188427
8	6	-1,060003	0,827049	-0,558929
9	6	-1,186119	-0,451833	0,353188
10	6	0,158800	-1,193253	0,127509
11	6	-2,337577	-1,244442	-0,275288
12	8	-2,851048	-0,594826	-1,325693
13	6	-2,197750	0,655053	-1,593533
14	6	3,450452	0,478311	0,996093
15	6	0,333021	-0,876917	-1,374827
16	17	-1,619188	-0,196404	2,064649
17	17	-1,288532	2,402762	0,267623
18	8	-2,739763	-2,319026	0,082083
19	1	3,356995	-2,407753	-0,711674
20	1	0,949284	-0,109290	1,837511
21	1	3,287531	1,888618	-0,769745
22	1	1,180396	1,809697	0,454609
23	1	3,598062	-0,278311	-2,268265
24	1	2,895191	-1,579385	1,766456
25	1	0,470719	1,262313	-2,091784
26	1	0,093956	-2,247382	0,410741
27	1	-2,948098	1,441551	-1,516286
28	1	-1,804803	0,612327	-2,612825
29	1	4,538458	0,382994	1,034104
30	1	3,097249	1,116068	1,813672
31	1	-0,498870	-1,234118	-1,992308
32	1	1,245578	-1,273841	-1,801489

Tabela 17 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **3d**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	-3,279329	-0,276318	-1,290382
2	6	-1,272633	0,851148	-0,205919
3	6	-2,851040	-0,619722	0,951017
4	6	-1,320612	-0,275497	0,872653
5	6	-3,323104	-1,233051	-0,353852
6	6	-2,778565	0,993937	-0,628903
7	6	-0,292499	-1,310439	0,361728
8	6	1,134737	-0,735348	0,599913
9	6	1,184875	0,451209	-0,433320
10	6	-0,185022	0,350488	-1,180635
11	6	1,322057	1,692820	0,448231
12	8	1,289023	1,351723	1,745744
13	6	1,448970	-0,064058	1,945915
14	6	-3,408942	0,813038	0,774237
15	6	-0,339234	-1,182122	-1,177650
16	17	2,545705	0,442068	-1,588749
17	17	2,335544	-2,048186	0,339436
18	8	1,401148	2,833839	0,080212
19	1	-3,457080	-0,393360	-2,355261
20	1	-0,997475	1,822062	0,217813
21	1	-3,127574	-1,155552	1,860953
22	1	-1,046662	0,097091	1,864238
23	1	-3,542380	-2,286084	-0,502823
24	1	-2,991771	1,925645	-1,156048
25	1	-0,401430	-2,312263	0,784887
26	1	-0,152011	0,857320	-2,147518
27	1	0,773775	-0,370982	2,746121
28	1	2,482999	-0,242134	2,246031
29	1	-4,501055	0,836358	0,747878
30	1	-3,033128	1,524493	1,517643
31	1	0,507588	-1,681001	-1,657670
32	1	-1,254359	-1,538607	-1,633782

Tabela 18 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **3e**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	-3,620955	1,028530	0,128370
2	6	-3,641358	0,043637	1,036623
3	6	-2,789138	-1,098695	0,491369
4	6	-1,327360	-0,549068	0,618314
5	6	-1,306420	0,625601	-0,414549
6	6	-2,747195	0,561255	-1,033202
7	6	-0,142299	-1,437940	0,168509
8	6	1,179643	-0,726824	0,580863
9	6	1,194123	0,514005	-0,386017
10	6	-0,069255	0,299346	-1,280382
11	6	1,280625	-0,101047	1,980530
12	8	0,967031	1,292819	1,831340
13	6	1,088717	1,712178	0,559793
14	8	1,064598	2,871771	0,253245
15	6	-3,114164	-0,938376	-1,007067
16	6	-0,040870	-1,235943	-1,360287
17	1	-1,194549	1,609563	0,047770
18	1	-1,187813	-0,211248	1,648120
19	17	2,540578	-1,885219	0,390105
20	17	2,657097	0,723328	-1,384421
21	1	-4,030738	2,028141	0,230808
22	1	-4,075362	0,073934	2,030781
23	1	-2,862404	1,098617	-1,976383
24	1	0,002062	0,860688	-2,214106
25	1	-0,181153	-2,465713	0,537690
26	1	0,903822	-1,612184	-1,762756
27	1	-0,841416	-1,673202	-1,945231
28	1	-2,558911	-1,582746	-1,682062
29	1	-4,180626	-1,082108	-1,195303
30	1	-2,944881	-2,080591	0,942693
31	1	0,577508	-0,532373	2,694717
32	1	2,296393	-0,175302	2,372761

Tabela 19 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **3f**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	-3,600314	-0,373060	1,124201
2	6	-3,728287	0,771472	0,439367
3	6	-2,893557	0,639369	-0,832372
4	6	-1,426448	0,724461	-0,285464
5	6	-1,276827	-0,622634	0,498456
6	6	-2,682883	-1,288235	0,318010
7	6	-0,229064	0,704070	-1,258674
8	6	1,074550	0,902135	-0,437939
9	6	1,207481	-0,467852	0,327197
10	6	-0,033469	-1,268741	-0,148442
11	6	2,339645	0,949771	-1,328262
12	8	3,058188	-0,276400	-1,140528
13	6	2,484688	-1,093526	-0,246729
14	8	2,926326	-2,176929	0,019844
15	6	-3,121088	-0,864254	-1,099153
16	6	-0,052896	-0,786458	-1,615545
17	1	-1,355591	1,600850	0,359549
18	1	-1,098885	-0,476863	1,565315
19	17	1,420471	-0,398193	2,094577
20	17	1,055252	2,373467	0,585698
21	1	-4,220715	1,682232	0,764609
22	1	-3,122973	1,339241	-1,638475
23	1	-2,558276	-1,298421	-1,920753
24	1	-4,180239	-1,076688	-1,262540
25	1	-0,298724	1,408081	-2,093179
26	1	0,875806	-1,002794	-2,155023
27	1	-0,855237	-1,197824	-2,215619
28	1	3,004177	1,768488	-1,053026
29	1	2,077387	1,022459	-2,387302
30	1	0,087574	-2,341536	0,023014
31	1	-2,718525	-2,351303	0,564155
32	1	-3,968361	-0,588067	2,122169

Tabela 20 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **3g**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	-2,226418	-0,284498	1,476242
2	6	-2,387765	0,922784	0,926499
3	6	-2,699649	0,730016	-0,546948
4	6	-1,508584	0,123985	-1,364859
5	6	-1,317905	-1,285077	-0,707668
6	6	-2,429370	-1,322048	0,389666
7	6	-0,055172	0,610303	-1,613487
8	6	0,838595	0,935778	-0,399008
9	6	1,015139	-0,467331	0,284557
10	6	0,219808	-1,433506	-0,623682
11	6	2,279234	1,307518	-0,851323
12	8	3,143784	0,213473	-0,530180
13	6	2,508311	-0,792505	0,082497
14	8	3,057928	-1,813171	0,392259
15	6	-3,526782	-0,584088	-0,431418
16	6	0,561417	-0,768785	-1,991104
17	1	-1,905796	0,003515	-2,380033
18	17	0,264309	2,297905	0,604571
19	17	0,757002	-0,592383	2,039760
20	1	-2,294887	1,880846	1,419865
21	1	-1,969582	-0,506368	2,503851
22	1	-3,749082	-1,053954	-1,396485
23	1	-4,448605	-0,446142	0,138049
24	1	-3,185597	1,572873	-1,042122
25	1	-2,668931	-2,329661	0,734383
26	1	0,032555	-1,243001	-2,820272
27	1	-1,603697	-2,067156	-1,421633
28	1	1,626311	-0,748218	-2,242567
29	1	0,017644	1,392494	-2,374488
30	1	0,566120	-2,460706	-0,486602
31	1	2,654928	2,187001	-0,329891
32	1	2,327467	1,466898	-1,932091

Tabela 21 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **3h**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	2,283414	1,319699	0,336685
2	6	2,282147	0,459977	1,362074
3	6	2,578949	-0,924982	0,817880
4	6	1,439345	-1,467372	-0,111575
5	6	1,448012	-0,451794	-1,300277
6	6	2,593904	0,537694	-0,923027
7	6	-0,075787	-1,740256	0,121610
8	6	-0,991693	-0,610226	0,667941
9	6	-0,934097	0,449280	-0,482125
10	6	-0,057108	-0,220686	-1,577492
11	6	-0,656875	0,187406	1,939315
12	8	-0,457863	1,552350	1,546082
13	6	-0,498362	1,735458	0,217489
14	8	-0,288366	2,798072	-0,301355
15	6	-0,529464	-1,686980	-1,367486
16	17	-2,618982	-1,363446	0,940420
17	17	-2,518859	0,873896	-1,228830
18	6	3,565203	-0,515256	-0,314949
19	1	1,794230	-0,950884	-2,213132
20	1	1,806334	-2,441672	-0,455720
21	1	2,091398	0,700021	2,402484
22	1	2,941800	-1,654643	1,544165
23	1	3,815489	-1,333278	-0,999598
24	1	4,479117	-0,061338	0,075291
25	1	-1,603112	-1,829775	-1,506581
26	1	0,010721	-2,394369	-2,000800
27	1	-0,261092	-2,677054	0,650690
28	1	-1,479016	0,177734	2,653381
29	1	0,249215	-0,179072	2,420934
30	1	2,073929	2,381891	0,375188
31	1	2,965723	1,123729	-1,764982
32	1	-0,257123	0,225912	-2,552561

Tabela 22 - Coeficiente linear e angular resultante da regressão linear^a realizada com os deslocamentos químicos calculados de ¹H e ¹³C das estruturas candidatas **6a-6h**.

Estruturas candidatas	RMN de ¹ H		RMN de ¹³ C	
	Coeficiente linear	Coeficiente angular	Coeficiente linear	Coeficiente angular
6a	0,102	0,925	0,686	0,917
6b	0,135	0,910	-2,564	0,952
6c	0,034	0,946	0,045	0,928
6d	0,090	0,942	0,793	0,917
6e	0,287	0,884	0,006	0,933
6f	0,052	0,962	-0,943	0,944
6g	0,207	0,921	-3,408	0,966
6h	-0,013	0,960	-0,734	0,933

^aA regressão linear para os dados de carbono foi realizada sem considerar os deslocamentos químicos para os carbonos carbonílicos (C11 e C15).

Tabela 23 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **6a**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	2,7755	-1,9755	-0,2195
2	6	1,7974	-1,0430	-0,9286
3	6	2,4907	0,3189	-0,7792
4	7	3,3174	0,2219	0,4487
5	6	3,1908	-1,1370	0,9918
6	6	2,9578	1,3212	1,3578
7	6	1,9072	2,0985	0,6119
8	6	1,6289	1,5368	-0,5652
9	8	0,5720	-1,0498	-0,1619
10	6	0,6085	1,9891	-1,5643
11	6	-0,5404	-1,4879	-0,7434
12	8	-0,6255	-1,8490	-1,8988
13	6	-1,7103	-1,6115	0,2401
14	6	-2,1433	-0,2897	0,9210
15	6	-2,5844	0,8007	-0,1028
16	6	-1,4419	1,7474	-0,4007
17	8	-1,2510	2,8034	0,1626
18	8	-0,6304	1,2708	-1,3618
19	6	-3,7836	1,5861	0,4271
20	6	-1,1806	0,2432	1,9860
21	6	-1,3166	-2,6747	1,2763
22	8	-2,8437	-2,0551	-0,4807
23	1	3,1251	0,4516	-1,6704
24	1	2,3196	-2,9326	0,0457
25	1	3,6335	-2,1591	-0,8745
26	1	1,5738	-1,3067	-1,9623
27	1	2,4059	-1,1857	1,7653
28	1	4,1300	-1,4774	1,4372
29	1	2,5616	0,9353	2,3109
30	1	3,8268	1,9453	1,6030
31	1	1,4339	2,9937	1,0055
32	1	0,9070	1,7404	-2,5851
33	1	0,4171	3,0602	-1,4845
34	1	-3,0688	-0,5884	1,4329
35	1	-2,8572	0,2981	-1,0365
36	1	-4,6369	0,9138	0,5463
37	1	-3,5556	2,0386	1,3964
38	1	-4,0664	2,3891	-0,2584
39	1	-1,0654	-0,4726	2,8030
40	1	-0,1911	0,4581	1,5718
41	1	-1,5758	1,1710	2,4098
42	1	-2,1321	-2,7861	1,9967
43	1	-0,3987	-2,4081	1,8039
44	1	-1,1677	-3,6344	0,7723
45	1	-2,5466	-2,4962	-1,2953

Tabela 24 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **6b**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	1,9779	-2,0473	-1,2101
2	6	1,2472	-0,7075	-1,2244
3	6	2,3572	0,2716	-0,8237
4	7	3,3144	-0,5171	-0,0062
5	6	2,8684	-1,9153	0,0264
6	6	3,4914	0,1346	1,2990
7	6	2,6712	1,3901	1,1996
8	6	2,0168	1,4637	0,0397
9	8	0,2382	-0,6987	-0,1865
10	6	1,1117	2,5875	-0,3759
11	6	-0,9296	-1,2618	-0,4966
12	8	-1,1624	-1,8241	-1,5455
13	6	-1,9412	-1,1853	0,6486
14	6	-2,1729	0,2579	1,1760
15	6	-2,3660	1,3480	0,0745
16	6	-1,0847	1,6951	-0,6676
17	8	-0,8526	1,4183	-1,8265
18	8	-0,2288	2,3687	0,1117
19	6	-3,4773	1,0442	-0,9299
20	6	-1,1735	0,6873	2,2582
21	6	-1,4404	-2,1373	1,7468
22	8	-3,1881	-1,6533	0,1726
23	1	2,8294	0,6084	-1,7604
24	1	1,2945	-2,8983	-1,1718
25	1	2,5854	-2,1268	-2,1178
26	1	0,7662	-0,4558	-2,1702
27	1	2,2789	-2,1221	0,9353
28	1	3,7168	-2,6059	0,0094
29	1	3,1321	-0,5087	2,1188
30	1	4,5470	0,3546	1,5042
31	1	2,6304	2,1361	1,9897
32	1	1,0861	2,7130	-1,4609
33	1	1,4239	3,5202	0,0956
34	1	-3,1595	0,1847	1,6539
35	1	-2,6305	2,2558	0,6323
36	1	-3,6707	1,9242	-1,5495
37	1	-3,2045	0,2173	-1,5875
38	1	-4,3941	0,7712	-0,4032
39	1	-0,1380	0,6073	1,9198
40	1	-1,3524	1,7302	2,5329
41	1	-1,2988	0,0789	3,1567
42	1	-1,4034	-3,1546	1,3446
43	1	-0,4474	-1,8625	2,1085
44	1	-2,1485	-2,1228	2,5800
45	1	-3,0325	-2,2640	-0,5687

Tabela 25 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **6c**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	2,1230	-1,9448	-1,2045
2	6	1,3978	-0,6023	-1,1695
3	6	2,4873	0,3507	-0,6602
4	7	3,4375	-0,4945	0,1087
5	6	2,9712	-1,8855	0,0654
6	6	3,6214	0,0788	1,4499
7	6	2,7597	1,3104	1,4500
8	6	2,1088	1,4597	0,2953
9	8	0,3408	-0,6492	-0,1813
10	6	1,1955	2,6004	-0,0421
11	6	-0,8044	-1,2088	-0,5651
12	8	-0,9929	-1,7129	-1,6524
13	6	-1,8581	-1,1867	0,5423
14	6	-2,1338	0,2605	1,0335
15	6	-2,2943	1,3238	-0,0929
16	6	-0,9482	1,7415	-0,6627
17	8	-0,6045	1,6238	-1,8203
18	8	-0,1728	2,2818	0,2876
19	6	-3,2655	0,9626	-1,2155
20	6	-3,3660	0,2844	1,9429
21	6	-1,3189	-2,0684	1,6809
22	8	-3,0511	-1,7529	0,0411
23	1	2,9760	0,7760	-1,5511
24	1	1,4357	-2,7929	-1,2373
25	1	2,7614	-1,9767	-2,0936
26	1	0,9606	-0,2920	-2,1193
27	1	2,3481	-2,1255	0,9437
28	1	3,8110	-2,5861	0,0445
29	1	3,3076	-0,6305	2,2316
30	1	4,6732	0,3250	1,6452
31	1	2,7018	1,9941	2,2935
32	1	1,2557	2,8719	-1,0988
33	1	1,4311	3,4680	0,5756
34	1	-1,2611	0,5589	1,6255
35	1	-2,6626	2,2241	0,4183
36	1	-4,2250	0,6445	-0,8039
37	1	-3,4294	1,8304	-1,8595
38	1	-2,8745	0,1541	-1,8365
39	1	-4,2645	-0,0066	1,3939
40	1	-3,5104	1,2914	2,3441
41	1	-3,2549	-0,3966	2,7899
42	1	-0,4295	-1,6268	2,1370
43	1	-2,0935	-2,1951	2,4392
44	1	-1,0644	-3,0589	1,2907
45	1	-2,8641	-2,1714	-0,8172

Tabela 26 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **6d**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	2,6139	-1,9803	-0,6958
2	6	1,7246	-0,8015	-1,0802
3	6	2,5770	0,3888	-0,6269
4	7	3,3346	-0,0915	0,5514
5	6	3,1481	-1,5446	0,6756
6	6	2,9705	0,7232	1,7205
7	6	2,1057	1,8174	1,1546
8	6	1,8746	1,6311	-0,1454
9	8	0,5358	-0,8426	-0,2595
10	6	1,0259	2,4695	-1,0484
11	6	-0,5167	-1,4969	-0,7410
12	8	-0,5480	-2,0564	-1,8176
13	6	-1,6883	-1,5244	0,2480
14	6	-1,9601	-0,1064	0,7872
15	6	-2,2374	0,8671	-0,4171
16	6	-1,1746	1,9388	-0,3462
17	8	-1,1440	2,8147	0,4924
18	8	-0,2210	1,7750	-1,2798
19	6	-3,6306	1,4981	-0,4543
20	6	-3,0585	-0,1065	1,8512
21	6	-1,3080	-2,5209	1,3526
22	8	-2,8464	-1,9554	-0,4336
23	1	3,2540	0,6256	-1,4636
24	1	2,0686	-2,9273	-0,6696
25	1	3,4279	-2,0650	-1,4232
26	1	1,4317	-0,7634	-2,1309
27	1	2,4077	-1,7786	1,4566
28	1	4,0834	-2,0493	0,9351
29	1	2,4112	0,1314	2,4647
30	1	3,8574	1,1223	2,2288
31	1	1,7186	2,6401	1,7498
32	1	1,4730	2,5786	-2,0391
33	1	0,8258	3,4517	-0,6184
34	1	-1,0330	0,2103	1,2799
35	1	-2,0954	0,3170	-1,3529
36	1	-3,7419	2,1002	-1,3605
37	1	-3,7986	2,1484	0,4068
38	1	-4,3962	0,7195	-0,4675
39	1	-3,2570	0,9118	2,1934
40	1	-3,9891	-0,5351	1,4699
41	1	-2,7449	-0,6851	2,7232
42	1	-0,4884	-2,1357	1,9662
43	1	-2,1781	-2,7093	1,9841
44	1	-0,9989	-3,4728	0,9087
45	1	-2,5872	-2,5917	-1,1234

Tabela 27 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **6e**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	-2,3715	1,8820	-1,1789
2	6	-1,5020	0,6280	-1,1939
3	6	-2,4885	-0,4460	-0,7108
4	7	-3,4435	0,2614	0,1773
5	6	-3,1755	1,7049	0,1119
6	6	-3,4033	-0,3465	1,5161
7	6	-2,4710	-1,5160	1,3639
8	6	-1,9591	-1,5777	0,1354
9	8	-0,4569	0,7414	-0,2021
10	6	-1,0467	-2,6321	-0,4038
11	6	0,6133	1,4752	-0,5197
12	8	0,7296	2,0839	-1,5620
13	6	1,7250	1,3715	0,5365
14	6	2,7756	0,3347	0,0084
15	6	2,1657	-0,8331	-0,8091
16	6	1,0463	-1,5701	-0,1018
17	8	0,9664	-1,7528	1,0989
18	8	0,1427	-2,0360	-0,9691
19	6	3,2235	-1,8632	-1,2404
20	6	3,6981	-0,1252	1,1416
21	6	2,3558	2,7506	0,7041
22	8	1,1986	1,0195	1,7992
23	1	-2,9960	-0,8356	-1,6066
24	1	-1,7863	2,8024	-1,2069
25	1	-3,0304	1,8595	-2,0529
26	1	-1,0435	0,4039	-2,1592
27	1	-2,5748	2,0325	0,9747
28	1	-4,1024	2,2855	0,1068
29	1	-3,0235	0,3645	2,2669
30	1	-4,4001	-0,6611	1,8497
31	1	-2,2550	-2,2124	2,1681
32	1	-1,5014	-3,1577	-1,2461
33	1	-0,7679	-3,3473	0,3720
34	1	3,3823	0,8855	-0,7219
35	1	1,7277	-0,4175	-1,7234
36	1	4,0603	-1,3511	-1,7236
37	1	3,6077	-2,4213	-0,3829
38	1	2,7958	-2,5727	-1,9524
39	1	4,5768	-0,6297	0,7335
40	1	4,0503	0,7282	1,7252
41	1	3,1866	-0,8125	1,8183
42	1	3,2002	2,6903	1,3934
43	1	2,6994	3,1349	-0,2571
44	1	1,6190	3,4424	1,1208
45	1	0,9225	0,0891	1,7855

Tabela 28 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **6f**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	-2,4400	-1,8201	1,2233
2	6	-1,5575	-0,5778	1,1694
3	6	-2,5278	0,5123	0,6967
4	7	-3,6203	-0,1979	-0,0178
5	6	-3,3246	-1,6374	-0,0091
6	6	-3,7952	0,4051	-1,3489
7	6	-2,7364	1,4703	-1,4218
8	6	-2,0160	1,5275	-0,3004
9	8	-0,5558	-0,7320	0,1404
10	6	-0,9181	2,5088	-0,0219
11	6	0,5831	-1,3302	0,4905
12	8	0,7674	-1,8762	1,5555
13	6	1,6574	-1,2363	-0,6027
14	6	2,8473	-0,3882	-0,0498
15	6	2,5537	1,1360	-0,0639
16	6	1,1953	1,4957	0,5120
17	8	0,8823	1,3688	1,6767
18	8	0,3788	2,0016	-0,4263
19	6	3,5914	1,9339	0,7419
20	6	4,1227	-0,6579	-0,8536
21	6	2,0616	-2,6752	-0,9279
22	8	1,1470	-0,6861	-1,8039
23	1	-2,9119	1,0228	1,5924
24	1	-1,8593	-2,7445	1,2161
25	1	-3,0401	-1,7874	2,1381
26	1	-1,0479	-0,3349	2,1024
27	1	-2,7712	-1,9367	-0,9143
28	1	-4,2426	-2,2295	0,0386
29	1	-3,6699	-0,3458	-2,1424
30	1	-4,7978	0,8344	-1,4715
31	1	-2,6069	2,1198	-2,2823
32	1	-0,8739	2,7765	1,0358
33	1	-1,0533	3,4068	-0,6250
34	1	3,0034	-0,6997	0,9910
35	1	2,5621	1,4724	-1,1053
36	1	3,3313	2,9959	0,7565
37	1	3,6262	1,5747	1,7740
38	1	4,5854	1,8446	0,3030
39	1	4,4611	-1,6881	-0,7303
40	1	3,9473	-0,4746	-1,9192
41	1	4,9384	-0,0115	-0,5268
42	1	2,7187	-2,6822	-1,7988
43	1	2,5740	-3,1345	-0,0801
44	1	1,1693	-3,2611	-1,1638
45	1	0,5615	0,0610	-1,6051

Tabela 29 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **6g**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	2,1375	-2,0128	-1,2574
2	6	1,3660	-0,6967	-1,2197
3	6	2,4674	0,3058	-0,8429
4	7	3,4459	-0,4621	-0,0340
5	6	3,0649	-1,8814	-0,0466
6	6	3,5771	0,1622	1,2914
7	6	2,7146	1,3911	1,2096
8	6	2,0967	1,4776	0,0325
9	8	0,4077	-0,7179	-0,1387
10	6	1,2087	2,5846	-0,4361
11	6	-0,7399	-1,3683	-0,3475
12	8	-0,9968	-1,9778	-1,3643
13	6	-1,7413	-1,1714	0,8001
14	6	-2,7779	-0,0791	0,3433
15	6	-2,1680	1,0556	-0,5215
16	6	-0,9239	1,6877	0,0664
17	8	-0,7414	1,8992	1,2518
18	8	-0,0624	2,0591	-0,8823
19	6	-3,1560	2,2183	-0,7499
20	6	-3,9688	-0,6816	-0,4106
21	6	-2,3840	-2,5194	1,1148
22	8	-1,0902	-0,7900	1,9965
23	1	2,9188	0,6522	-1,7853
24	1	1,4850	-2,8863	-1,2159
25	1	2,7153	-2,0515	-2,1865
26	1	0,8425	-0,4495	-2,1454
27	1	2,5210	-2,1506	0,8724
28	1	3,9415	-2,5312	-0,1220
29	1	3,2262	-0,5131	2,0876
30	1	4,6204	0,4125	1,5214
31	1	2,6213	2,1072	2,0202
32	1	1,6159	3,0721	-1,3244
33	1	1,0469	3,3231	0,3508
34	1	-3,1392	0,3595	1,2830
35	1	-1,8885	0,6462	-1,5001
36	1	-3,9833	1,9103	-1,3893
37	1	-3,5587	2,5672	0,2058
38	1	-2,6535	3,0553	-1,2416
39	1	-4,7008	0,0889	-0,6563
40	1	-3,6399	-1,1545	-1,3424
41	1	-4,4839	-1,4295	0,1930
42	1	-1,6200	-3,1780	1,5360
43	1	-3,1723	-2,3820	1,8593
44	1	-2,7997	-2,9863	0,2223
45	1	-0,8093	0,1368	1,9371

Tabela 30 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **6h**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	2,486854	0,341509	-0,653821
2	7	3,437003	-0,503268	0,114719
3	6	3,60551	0,05845	1,462639
4	6	2,747549	1,29301	1,461314
5	6	2,105101	1,447617	0,302478
6	6	1,399754	-0,611729	-1,166201
7	6	2,134434	-1,948631	-1,218633
8	6	2,984164	-1,898326	0,051319
9	8	0,348996	-0,679319	-0,176015
10	6	-0,814778	-1,21197	-0,57463
11	6	-1,837094	-1,197298	0,571995
12	6	1,195579	2,589529	-0,040177
13	8	-0,176431	2,269282	0,273295
14	6	-0,945408	1,738253	-0,686815
15	8	-0,596005	1,627265	-1,842688
16	1	2,976164	0,769333	-1,543387
17	8	-1,014392	-1,640665	-1,687842
18	8	-1,25329	-1,885855	1,674339
19	6	-2,145243	0,267668	1,005758
20	6	-2,298258	1,323741	-0,127878
21	6	-3,052209	-2,024339	0,178945
22	6	-3,350954	0,315644	1,946567
23	6	-3,263182	0,973922	-1,258614
24	1	4,655509	0,29897	1,674152
25	1	3,278514	-0,655443	2,234977
26	1	2,684978	1,973089	2,307355
27	1	0,957886	-0,295091	-2,111572
28	1	2,7717	-1,967005	-2,109059
29	1	1,451778	-2,800173	-1,258988
30	1	2,36461	-2,156565	0,926544
31	1	3,830743	-2,590464	0,019701
32	1	1,423718	3,455268	0,582975
33	1	1,266795	2,864481	-1,09544
34	1	-0,450336	-1,412767	1,956918
35	1	-1,26432	0,577585	1,582073
36	1	-2,66697	2,224816	0,381882
37	1	-3,598144	-1,576295	-0,650965
38	1	-2,725461	-3,021921	-0,121836
39	1	-3,716754	-2,119473	1,038924
40	1	-3,403138	1,293358	2,433598
41	1	-3,262678	-0,448662	2,723313
42	1	-4,29254	0,154432	1,412576
43	1	-2,877914	0,159024	-1,875954
44	1	-3,406538	1,84081	-1,90799
45	1	-4,238563	0,687597	-0,85703

Tabela 31 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **7a**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	8	-0,2376	0,3290	-2,3816
2	6	-0,1755	0,3005	-1,1497
3	6	-0,1741	-1,0165	0,9461
4	6	1,1224	1,0959	0,8981
5	6	0,1954	0,231	1,7325
6	6	0,4263	1,4975	-0,3901
7	7	-0,7096	-0,7297	-0,3794
8	6	-1,3003	-1,8519	-1,0881
9	8	1,3571	2,2024	-1,2069
10	1	0,711	-1,6502	0,8116
11	1	-0,9215	-1,5897	1,5057
12	1	2,0514	0,5552	0,6755
13	1	1,4186	1,9907	1,458
14	1	0,683	-0,0506	2,672
15	1	-0,7096	0,795	1,989
16	1	-0,4026	2,1815	-0,1718
17	1	-1,8138	-1,5131	-1,9927
18	1	-2,0252	-2,351	-0,4388
19	1	-0,5074	-2,5514	-1,3695
20	1	1,0121	2,1253	-2,1197

Tabela 32 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **7b**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	8	1,7325	0,8785	-1,6723
2	6	0,7841	0,5170	-0,9732
3	6	-0,1795	-1,0974	0,6297
4	6	-1,1142	1,1965	0,6049
5	6	-1,4549	-0,2787	0,6988
6	6	-0,3325	1,4952	-0,6616
7	7	0,6169	-0,7971	-0,5514
8	6	1,6823	-1,7359	-0,8595
9	8	-0,3809	1,5871	1,765
10	1	0,4486	-0,9177	1,5103
11	1	-0,4382	-2,1622	0,6118
12	1	-2,0406	1,7821	0,6085
13	1	-1,9692	-0,4953	1,6419
14	1	-2,1245	-0,559	-0,1232
15	1	0,1137	2,4944	-0,5949
16	1	-1,0087	1,478	-1,5247
17	1	2,1174	-1,5237	-1,8405
18	1	1,2801	-2,7529	-0,8678
19	1	2,4629	-1,6496	-0,0976
20	1	-0,1952	2,5406	1,6959

Tabela 33 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **7c**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	8	-0,9748	-1,4742	-1,9815
2	6	-0,6663	-0,7023	-1,0728
3	6	0,9118	-0,0522	0,7354
4	6	-1,4722	0,6025	0,962
5	6	-0,0402	1,0644	1,17
6	6	-1,7007	0,2466	-0,4978
7	7	0,6359	-0,5843	-0,5961
8	8	0,1743	2,2588	0,4187
9	6	1,6384	-1,4742	-1,1557
10	1	1,9419	0,3219	0,7361
11	1	0,8443	-0,8918	1,4375
12	1	-2,1736	1,3947	1,2479
13	1	-1,6775	-0,2695	1,5946
14	1	0,13	1,3078	2,2241
15	1	-1,7008	1,1485	-1,121
16	1	-2,6867	-0,2218	-0,5975
17	1	1,1307	2,4296	0,3794
18	1	1,4328	-1,6854	-2,2091
19	1	1,6292	-2,4139	-0,5954
20	1	2,6235	-1,0053	-1,0788

Tabela 34 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **7d**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	8	-0,2616	0,5545	-2,4953
2	6	-0,1422	0,5062	-1,2709
3	6	-0,2075	-0,7958	0,8438
4	6	1,1329	1,2981	0,7901
5	6	0,1713	0,4594	1,6158
6	6	0,4765	1,6735	-0,5246
7	7	-0,6436	-0,5402	-0,5111
8	6	-1,3496	-1,6182	-1,1874
9	1	-1,0039	-1,3203	1,3828
10	1	2,0579	0,74	0,6019
11	1	1,4103	2,2041	1,3402
12	1	0,6471	0,1929	2,5663
13	1	-0,7273	1,0465	1,8409
14	1	-0,3211	2,4057	-0,3519
15	1	-1,7876	-1,2759	-2,1292
16	1	-2,1534	-1,9847	-0,5425
17	1	-0,6463	-2,4288	-1,3991
18	8	0,9113	-1,6577	0,764
19	1	1,2139	-1,6011	-0,1573
20	1	1,2229	2,1416	-1,1763

Tabela 35 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **8a**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	-4,1114	1,6802	-0,0413
2	6	-4,2133	0,2820	0,0585
3	6	-3,0760	-0,5165	0,1648
4	6	-1,7937	0,0689	0,2317
5	6	-1,6969	1,4709	0,0801
6	6	-2,8598	2,2519	-0,0522
7	7	-0,6704	-0,7197	0,4315
8	6	0,5943	-0,1763	0,1942
9	6	0,7611	1,2218	0,0475
10	6	-0,3911	2,1078	0,0543
11	6	1,7265	-1,0015	0,0983
12	6	2,9937	-0,4382	-0,0971
13	6	3,1669	0,9453	-0,2054
14	6	2,0487	1,7694	-0,1409
15	8	-0,2593	3,3513	-0,0080
16	8	2,2520	3,0944	-0,2835
17	8	-5,4367	-0,2802	0,0083
18	8	4,4147	1,4440	-0,4024
19	6	-0,7813	-1,8702	1,3545
20	8	-3,2738	-1,8782	0,1740
21	6	-2,8977	-2,5100	-1,0566
22	8	4,0608	-1,2698	-0,2536
23	6	4,9230	-1,3162	0,8884
24	8	1,6148	-2,3662	0,1624
25	6	1,5774	-2,9817	-1,1256
26	1	-5,0177	2,2699	-0,1353
27	1	-2,7389	3,3255	-0,1596
28	1	1,3537	3,5204	-0,1986
29	1	-5,3626	-1,2400	0,1667
30	1	4,3660	2,4154	-0,4661
31	1	0,1103	-1,8961	1,9788
32	1	-1,6594	-1,7240	1,9818
33	1	-0,8672	-2,8211	0,8253
34	1	-3,0798	-3,5765	-0,9241
35	1	-3,5052	-2,1239	-1,8819
36	1	-1,8378	-2,3343	-1,2695
37	1	5,7377	-1,9919	0,6292
38	1	5,3192	-0,3211	1,1090
39	1	4,3759	-1,7083	1,7521
40	1	1,4465	-4,0510	-0,9557
41	1	0,7343	-2,5919	-1,7088
42	1	2,5145	-2,8008	-1,6612

Tabela 36 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **8b**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	3,8386	-2,1092	-0,1541
2	6	4,1464	-0,7504	0,0214
3	6	3,1396	0,2004	0,1860
4	6	1,7859	-0,1934	0,2315
5	6	1,4826	-1,5538	0,0062
6	6	2,5154	-2,4891	-0,1804
7	7	0,7864	0,7394	0,4801
8	6	-0,5418	0,4028	0,2238
9	6	-0,9126	-0,9494	0,0095
10	6	0,0942	-1,9886	-0,0433
11	6	-1,5267	1,4004	0,1757
12	6	-2,8640	1,0396	-0,0202
13	6	-3,2468	-0,2988	-0,1832
14	6	-2,2757	-1,2917	-0,1964
15	8	-0,2117	-3,1973	-0,1742
16	8	-2,6519	-2,5605	-0,4061
17	8	5,4398	-0,3734	-0,0115
18	8	-3,7810	2,0209	-0,0810
19	6	1,0629	1,8162	1,4558
20	8	3,5384	1,5144	0,2776
21	6	3,2705	2,2698	-0,9107
22	8	-4,5755	-0,5540	-0,4095
23	6	-5,2202	-1,2631	0,6574
24	8	-1,2097	2,7322	0,2736
25	6	-1,0317	3,3492	-1,0021
26	1	4,6472	-2,8201	-0,2900
27	1	2,2366	-3,5256	-0,3434
28	1	-1,8170	-3,1082	-0,3551
29	1	5,5105	0,5739	0,2100
30	1	-4,6468	1,6321	-0,3094
31	1	0,1806	1,9470	2,0801
32	1	1,9044	1,5092	2,0750
33	1	1,2950	2,7671	0,9727
34	1	3,6000	3,2892	-0,7097
35	1	3,8267	1,8544	-1,7577
36	1	2,1991	2,2599	-1,1376
37	1	-6,2648	-1,3708	0,3656
38	1	-4,7630	-2,2466	0,7873
39	1	-5,1504	-0,6883	1,5869
40	1	-0,7516	4,3858	-0,8115
41	1	-0,2346	2,8446	-1,5611
42	1	-1,9628	3,3153	-1,5769

Tabela 37 - Coordenadas cartesianas para a estrutura candidata otimizada mais estável para o confômero de **8c**.

Átomo #	Número Atômico	Coordenadas cartesianas (x,y,z)		
1	6	4,1305	1,8168	0,0461
2	6	4,3500	0,4293	0,0745
3	6	3,2866	-0,4670	-0,0174
4	6	1,9694	0,0029	-0,1960
5	6	1,7501	1,3975	-0,1742
6	6	2,8376	2,2811	-0,0551
7	7	0,9268	-0,8929	-0,3770
8	6	-0,3874	-0,4432	-0,2355
9	6	-0,6831	0,9433	-0,2330
10	6	0,3939	1,9193	-0,2722
11	6	-1,4319	-1,3621	-0,0888
12	6	-2,7538	-0,9075	-0,0120
13	6	-3,0602	0,4591	-0,0419
14	6	-2,0244	1,3861	-0,1460
15	8	0,1651	3,1475	-0,3355
16	8	-2,3403	2,6929	-0,1307
17	8	5,6094	-0,0240	0,2339
18	8	-1,1604	-2,6915	0,0365
19	6	1,1721	-2,0861	-1,2161
20	8	3,5878	-1,8039	0,1020
21	6	3,1707	-2,3648	1,3545
22	8	-4,3591	0,8821	0,0532
23	6	-4,7226	1,2719	1,3800
24	8	-3,6795	-1,8848	0,1748
25	6	-4,9221	-1,8065	-0,5374
26	1	4,9795	2,4872	0,1325
27	1	2,6271	3,3462	-0,0493
28	1	-1,4828	3,1869	-0,2208
29	1	5,6167	-0,9971	0,1652
30	1	-2,0025	-3,1757	0,1117
31	1	0,3089	-2,2310	-1,8645
32	1	2,0546	-1,9016	-1,8274
33	1	1,3209	-2,9875	-0,6206
34	1	3,4631	-3,4146	1,3332
35	1	3,6713	-1,8524	2,1826
36	1	2,0851	-2,2807	1,4714
37	1	-5,7622	1,5975	1,3338
38	1	-4,6304	0,4206	2,0645
39	1	-4,0894	2,0966	1,7206
40	1	-5,2586	-2,8366	-0,6560
41	1	-5,6547	-1,2300	0,0281
42	1	-4,7702	-1,3454	-1,5164



Synthesis and structural elucidation of a phthalide analog using NMR analysis and DFT calculations

Bryan N.S. Pinto | Milena G. Teixeira | Elson S. Alvarenga

Department of Chemistry, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

CorrespondenceElson S. Alvarenga, Department of Chemistry, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, MG, Brazil.
Email: elson@ufv.br**Funding information**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

Abstract

Phthalides are secondary metabolites found in several fungi with a wide range of biological activities. A novel phthalide analog was synthesized by Diels–Alder reaction between cyclopentadiene and 3,4-dichlorofuran-2(5*H*)-one. Quantum mechanical calculations were used in conjunction with the spectroscopic methods to determine the structure of the title compound. The calculated NMR chemical shifts for eight candidate pairs of enantiomers were compared with the experimental NMR chemical shifts applying the DP4 probability and mean absolute errors methodology. DP4 analysis using ¹H and ¹³C NMR chemical shifts without assignment of the signals presented 100% probability for the correct candidate structure **3d**, proving the consistency of the method even without spectra interpretation. Results from theoretical calculation and NMR spectra interpretation were in agreement to the structure of *rac*-(3*aR*,4*S*,4*aS*,5*R*,8*S*,8*aR*,9*R*,9*aS*)-3*a*,9*a*-dichloro-3*a*,4,4*a*,5,8,8*a*,9,9*a*-octahydro-4,9:5,8-dimethanonaphtho[2,3-*c*]furan-1(3*H*)-one.

KEYWORDS¹H NMR, ¹³C NMR, Diels–Alder, DP4, MAE, Gaussian, phthalides, γ -lactone

1 | INTRODUCTION

In the last decades, the quality of life of mankind was significantly risen by the results of the scientific research. A good part of this is due to the discovery of new natural products, combined with synthesis and structure modification.^[1] The necessity for new chemical compounds, with less environmental impact, for the treatment of human diseases or protection of plantations is increasing every year.^[2] To overcome this challenge, natural products have been an excellent starting point for new drugs and agrochemicals. One group of natural products that our research group has been interested in are phthalides (or isobenzofuranones) and their derivatives. Phthalides can be found in nature as secondary metabolites of several species of fungi, and in the last years, much research has been done on their synthesis,^[3] physicochemical

properties, and bioactivities of phthalides and their derivatives.^[4]

Among the strategies to synthesize phthalides analogs, the Diels–Alder (DA) reaction is one of the most useful strategies that chemists have in their disposal.^[5] Phthalides and other complex molecules can be synthesized using DA reaction, once this reaction enables the formation of two new σ -bonds and up to four stereogenic centers in a single step,^[6] having control of the stereoisomerism of the final product.^[7]

After performing the synthesis of a product, the characterization and the structural elucidation must be performed. One of the most powerful tools with easy access that organic chemists have today to elucidate or confirm a molecular structure is NMR spectroscopy.^[8] Unfortunately, the elucidation of the molecule can become arduous in some cases, for example, overlapping signals in the

NMR spectrum (mainly in ^1H spectra) and molecules with complex structure. In the last decades, advances in computational chemistry have provided new tools for chemists to overcome these problems.^[9]

The evolution of quantum chemical methods and the increase in computational power in recent years have made computational chemistry able to help in the analyses of complex organic structures. Density functional theory (DFT) methods have become the most used for predicting NMR chemical shifts of organic molecules.^[10]

The geometry of a group of several candidate structures are optimized followed by chemical shift calculations for each atom (i.e., ^1H and ^{13}C). After this, the experimental NMR spectra of the compound are compared with the calculated NMR spectra. For evaluating the results, there is a diversity of methods, for example, mean absolute error (MAE), linear fit (R^2), corrected MAE, CP3, and DP4 probabilities. Among the mentioned methods, the DP4 parameter, developed by Goodman and Smith,^[11] has become one of the most frequently used method in the last years.^[12–14] The DP4 is used when there is one set of experimental data and two (or more) candidate structures. This method will point out the best fit between the set of experimental and calculated chemical shifts for the putative structures.^[10] This method is not only very useful for elucidating the structures of natural products,^[15] but also the structures of products from organic synthesis.^[16,17]

The purpose of this study is to report the synthesis of a pentacyclic lactone by a DA reaction, using cyclopentadiene 1,3-diene and 3,4-dichloro-2(5*H*)-furanone and structure elucidation of the product by combining NMR spectroscopy and DFT calculations.

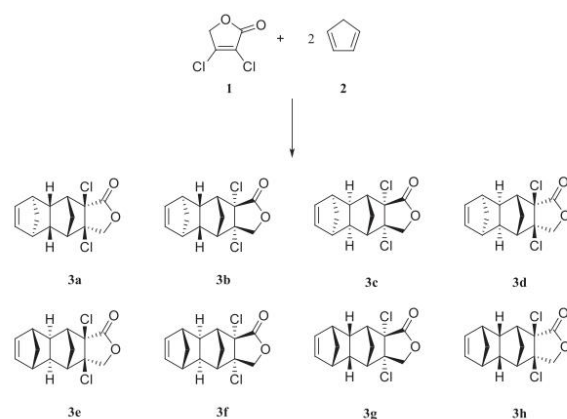
2 | RESULTS AND DISCUSSIONS

In the search for new substances with agrochemical activity, our research group aimed at the synthesis of analogues of phthalides.^[18] An elegant method for synthesizing such analogues is by the DA reaction. Cycloaddition of lactone **1** with cyclopentadiene **2**, under the appropriate reaction conditions, provided a pentacyclic lactone with eight chiral centers (Scheme 1). Considering the cyclic transition state of pericyclic reactions, only eight enantiomeric pairs (candidate structures **3a–3h**) could be formed.

The prochiral lactone dienophile **1** after reaction with cyclopentadiene **2** can provide a maximum of 16 stereoisomers. The way which the diene and dienophile approach each other defines the transition state of a pericyclic reaction determining the stereochemistry of the product. The rationale for the formation of the intermediates and the candidate structures are presented in the Supporting Information.

Full structural characterization of the pentacyclic lactone has been performed in this work with the aid of the spectrometric methods. The unequivocal definition of the relative stereochemistry has been done by NMR interpretations and theoretical calculations.

A preliminary approach was taken by comparing the experimental and calculated ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts using the DP4 statistical analyses without assignment of the signals. The approach was taken to show the validity of our method prior to the detailed analyses of the high field NMR spectra. DP4 analysis using both nuclei without assignment of the signals presented 100% probability for the candidate structure **3d** (Table S1). MAE and DP4 analyses were performed also after the



SCHEME 1 Diels–Alder reaction between lactone **1** and cyclopentadiene **2**: Candidate structures **3a–3h**

assignment of the signals, which is discussed after the interpretation of the NMR spectra.

The most deshielded signal in the ^1H NMR spectra (Figure S1), a non-first-order multiplet at δ 6.05 ppm, was assigned to the olefinic hydrogens H6 and H7. The doublet of doublet of doublets signals at δ 2.24 and 2.18 ppm were assigned to H4a and H8a. Proton H4a is coupled with H4, H5, and H8a; likewise, proton H8a is coupled with H4a, H8, and H9.

The assignment of the multiplet signal at δ 2.94–3.02 ppm to H8 and H5 was done due to the correlation observed in the COSY (correlated spectroscopy) with H6 and H7. No COSY cross peaks were observed between H4a and H4 and also for H8a and H9. The lack of correlations in the COSY for bridgehead protons could be due to close to 90° dihedral angle between these nuclei (Figure S4). Analyses of the ^{13}C NMR (Figure S2), heteronuclear correlation spectroscopy (HETCOR; Figure S5), and heteronuclear multiple bond correlation (HMBC; Figure S3) spectra resulted in the assignment of H9 and H4 as multiplet signals at δ 2.70–2.72 and 2.54–2.60 ppm, respectively. The protons H9 and H4 are three bonds apart from the chlorine atoms, which deshield them compared with H4a and H8a. The signal of H10' (δ 2.64–2.70 ppm) was identified by a cross peak with protons H6 and H7 observed in nuclear Overhauser enhancement spectroscopy (NOESY) spectrum. Proton H10 was assigned to the signal at 1.78–1.87 ppm (multiplet). The pair of doublets at δ 4.85 and 4.40 ppm was assigned to H3 and H3', respectively. These hydrogens are deshielded because they are located between two electron withdrawing atoms (O and Cl).

The methylene hydrogens, H11' and H11, were assigned to the pair of signals at δ 1.39 and 1.22 ppm, respectively.^[19–21] The signals of H11' and H11 are displayed as doublet of triplet with geminal coupling of 8.3 Hz and vicinal coupling with H5 and H8 of 1.7 Hz.

The most deshielded signal at δ 171.8 ppm was assigned to the carbonyl carbon, followed by the olefinic carbons C7 and C6 at δ 136.5 and 135.9 ppm. The signals at δ 77.9 and 76.0 ppm were assigned to the carbons connected to the chlorine atoms, C3a and C9a. The signals at δ 53.6 and 33.9 ppm presented correlations with H11/H11' and H10/H10', respectively in the HETCOR. This enabled us to assign the signal at 53.6 ppm to C11 and the signal at 33.9 ppm to C10. The difference in chemical shifts between C11 and C10 was described previously by our research group for a norbornene derivative.^[17,21]

The correlation with C1 (carbonyl) observed in the HMBC was essential to assign the signal of H9. The HMBC was also key to assign C4 to the signal at δ 54.6 ppm by the correlations observed with H3 and H3'.

The HETCOR spectrum was then used to assign the signal of H4 by the correlation presented with C4.

The relative configuration of H4a was defined by the cross-correlation with H3 observed in the NOESY (Figure 1). NOESY was also important to confirm the chemical shifts of H11 and H11' because of the correlation of H11 with H8a.

The candidate structure **3d** presented the best fit to the NMR spectral data and seems to be the correct structure as summarized in Table 1.

After the preliminary NMR analyses, we have carried out theoretical calculations for eight candidate structures to confirm the NMR analyses (Scheme 1). The predicted ^{13}C and ^1H NMR chemical shifts at B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p) level of theory for eight candidate (**3a–3h**) structures were compared side by side to the experimental NMR data. The MAE for the candidate structure **3d** was 0.07 and 2.4 for hydrogen and carbon respectively, whereas for **3a**, **3b**, **3c**, **3e**, **3f**, **3g**, and **3h**, the MAE values were larger, as shown in Table 2.

The chemical shifts calculated for candidate structures **3a–3h** at B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p) level of theory with chloroform solvation and the experimental chemical shifts were aligned and transferred to the web applet at <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>. The “goodness of fit” was performed by matching the experimental ^1H and ^{13}C chemical shifts with the respective calculated data of **3a–3h** concurrently. The previous NMR spectra interpretation provided the assignment of the signals, which assisted in the MAE and DP4 analyses.

The experimental ^1H and ^{13}C chemical shifts are much closer to the respective calculated data of the candidate structure **3d** than the other putative structures with 100% probability. The DP4 probability results are presented in Table 2.

The MAE and DP4 approaches matched the calculated ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts for structure **3d** to the experimental data. The results obtained by the theoretical approach is in agreement with the correct structure **3d** established by the NMR spectra analyses.

3 | CONCLUSION

The structure of a novel pentacyclic lactone was determined as being *rac*-(3*aR*,4*S*,4*aS*,5*R*,8*S*,8*aR*,9*R*,9*aS*)-3*a*,9*a*-dichloro-3*a*,4,4*a*,5,8,8*a*,9,9*a*-octahydro-4,9:5,8-dimethanonaphtho[2,3-*c*]furan-1(3*H*)-one (**3d**). The relative configuration of compound (**3d**) was determined by reaction mechanism analyses (Supporting Information) and NMR studies. Theoretical calculations were performed for the eight candidate diastereoisomers

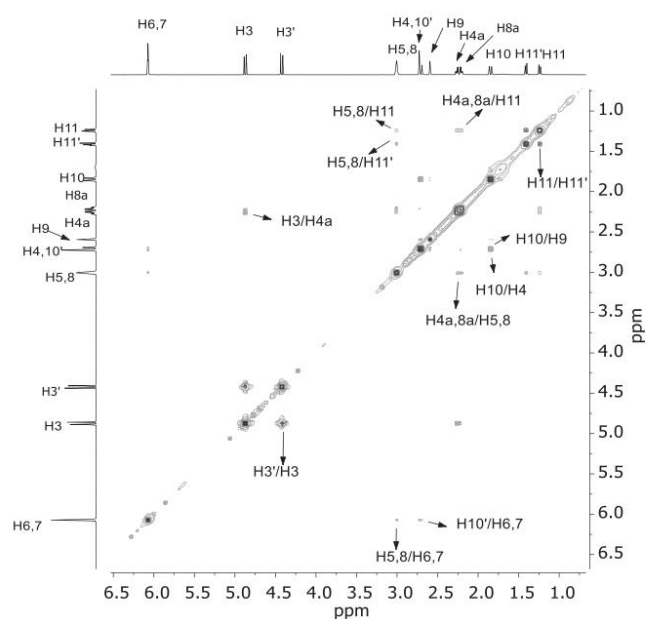


FIGURE 1 Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy

TABLE 1 NMR data of adduct **3d** in CDCl_3 : Experimental (δ_{exp}) chemical shifts, multiplicities (m), coupling constants (J), and COSY, NOESY, and HMBC correlations

Label	$\delta_{\text{C}_{\text{exp}}}$ (ppm)	Label	$\delta_{\text{H}_{\text{exp}}}$ (ppm) m, J (Hz)	COSY	NOESY
C-1	171.8	—	—	—	—
C-3	73.7	H-3	4.85 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H)	H3'	H3'
		H-3'	4.40 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H)	H3	H3, H4a
C-3a	77.9	—	—	—	—
C-4	54.6	H-4	2.57 (m, 1H)	H10'	H4a, H10, H10'
C-4a	40.6	H-4a	2.24 (ddd, $J = 8.2, 3.9, 1.1$ Hz, 1H)	H5, H8a	H5, H11
C-5	46.9	H-5	2.98 (m, 1H)	H4a, H6, H11, H11'	H4a, H6, H11, H11'
C-6	135.8	H-6	6.05 (m, 1H)	H5	H5, H7, H10'
C-7	136.5	H-7	6.05 (m, 1H)	H8	H6, H8, H10'
C-8	47.4	H-8	2.98 (m, 1H)	H7, H8a, H11, H11'	H7, H8a, H11, H11'
C-8a	43.8	H-8a	2.18 (ddd, $J = 8.5, 4.0, 1.1$ Hz, 1H)	H4a, H8	H4a, H8, H11
C-9	54.3	H-9	2.71 (m, 1H)	H10, H10'	H8a, H10, H10'
C-9a	76.0	—	—	—	—
C-10	33.9	H-10	1.83 (m, 1H)	H4, H9, H10'	H4, H9, H10'
		H-10'	2.68 (m, 1H)	H4, H10	H4, H9', H10
C-11	53.6	H-11	1.22 (dt, $J = 8.3, 1.7$ Hz, 1H)	H5, H8, H11'	H5, H4a, H8, H11'
		H-11'	1.39 (dt, $J = 8.3, 1.7$ Hz, 1H)	H5, H8, H11	H5, H8, H11

Abbreviations: COSY, correlated spectroscopy; HMBC, heteronuclear multiple bond correlation; NOESY, nuclear Overhauser enhancement spectroscopy.

TABLE 2 MAE and DP4 analyses of ^1H and ^{13}C NMR data for candidate structures **3a** to **3h** after assignment of the signals

Candidate structures	MAE ^a		DP4 probability (%) ^b		
	^1H	^{13}C	^{13}C and ^1H	^1H	^{13}C
3a	0.24	6.3	0	0.5	0
3b	0.29	4.5	0	0	0
3c	0.27	2.7	0	0	0.1
3d	0.07	2.4	100	99.5	99.9
3e	0.32	3.3	0	0	0
3f	0.31	3.5	0	0	0
3g	0.32	3.7	0	0	0
3h	0.37	5.7	0	0	0

Abbreviation: MAE, mean absolute error.

^aCalculations were carried out using B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p) with chloroform solvation.

(**3a–3h**), and MAE and DP4 analyses were employed to confirm the structure as being (**3d**).

GladiATR, using thin film solid method. Melting points are uncorrected and were obtained in MQAPF-301 melting point apparatus (Microquimica, Brazil).

4 | EXPERIMENTAL SECTION

4.1 | Synthesis

rac-(3*aR*,4*S*,4*aS*,5*R*,8*S*,8*aR*,9*R*,9*aS*)-3*a*,9*a*-dichloro-3*a*,4,4*a*,5,8,8*a*,9,9*a*-octahydro-4,9:5,8-dimethanonaphtho[2,3-*c*]furan-1(3*H*)-one (**3d**).

3,4-dichlorofuran-2(5*H*)-one (**1**) (0.50 g, 3.3 mmol) and cyclopentadiene (2.02 g, 30.7 mmol) were added to a sealed tube. The resulting reaction mixture was magnetically stirred and heated at 150°C for 44 hr. The excess of cyclopentadiene was evaporated, and the crude product was purified by column chromatography (eluent: hexane/ethyl acetate 15:1 v/v) to give 0.22 g of the title compound as a white solid (23% yield, mp 175.6–176.9) of **3d**.

IR (reflectance) 3052 (Csp²-H), 2973, 2881 (Csp³-H), 2042, 1784 (C=O), 1471, 1367, 1999, 1032, 839, 769, 582 (C-Cl).

MS (EI) *m/z* (%): 284 (M⁺, 0.1), C₁₄H₁₄Cl₂O₂, 218 (0.5), 152 (0.9), 115 (1.9) 66 (100).

4.2 | General

The reaction was monitored by thin layer chromatography plates coated with silica gel. The thin-layer chromatography plates were visualized in ultraviolet chamber^[22] at 254 nm. Column chromatography was performed over silica gel (70–230 mesh). The mass spectrum was recorded on a Shimadzu GCMS-QP5050A instrument using electron impact (70 eV). Infrared spectrum was acquired on a Varian 660-IR spectrometer, equipped with

4.3 | NMR spectral methods

Proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR), carbon 13 (^{13}C NMR), NOESY, and HMBC were obtained in a Bruker Biospin 400 MHz spectrometer. COSY and HETCOR were obtained in a Varian Mercury 300 MHz spectrometer. The NMR spectra were obtained at controlled temperature at 25°C. The chemical shifts were recorded in units δ in ppm and the scalar coupling constants (*J*) in Hz. The chemical shifts were referenced to residual CHCl₃ (δ = 7.26 ppm) in the ^1H NMR and CDCl₃ (δ = 77.0 ppm) in the ^{13}C NMR. The parameters of the NMR experiments are listed on Table S4.

4.4 | Computational

Conformational searches were performed with molecular mechanics in Maestro 2018-1 (Maestro version 11.5.011).^[23] The pentacyclic lactone is a rigid structure affording only one conformer for each of the candidate structures. Each of these candidate structures was then submitted to geometry optimization and frequency calculation using DFT at M06-2X/6-31+G(d,p) level of theory. Chemical shifts were obtained from the NMR shielding tensor values, which were computed for each candidate structure at B3LYP/6-311+G(2d,p) level in Gaussian 16.^[24] The shielding tensors of all nuclei were converted into referenced chemical shifts by subtracting the computed shielding tensors of tetramethylsilane calculated at the same level of theory (^1H = 31.8816; ^{13}C = 183.7262). These

operations were repeated for each candidate structure **3a–3h**. Solvation was addressed with integrated equation formalism polarized continuum model^[25] during optimizations/frequencies and shielding tensors calculations.

The experimental data set was compared with the calculated data, and MAE values were determined. The MAE is calculated by the summation of the absolute value of the difference between the experimental (δ_{exp}) and calculated (δ_{calc}) chemical shift of all N-nucleus, divided by the total number of N-nucleus. The calculated ¹H and ¹³C chemical shifts using B3LYP/6-311+G(2d,p)/M06-2X/6-31+G(d,p) level of theory are presented in the Supporting Information. The Cartesian coordinates for the optimized candidate structures **3a–3h** are also found in the Supporting Information.

A goodness-of-fit probability was determined using the DP4 method described by Goodman.^[26] DP4 analysis was accomplished by inputting computed and experimental chemical shifts into the DP4 analysis tool (located at: <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to FAPEMIG, CNPq, RQ-MG (Rede Mineira de Química), and CAPES for financial support. We are grateful to professor Jason Guy Taylor (UFOP) for obtaining some of the NMR spectra.

ORCID

Bryan N.S. Pinto  <https://orcid.org/0000-0002-7666-4802>

Milena G. Teixeira  <https://orcid.org/0000-0002-0848-4180>

Elson S. Alvarenga  <https://orcid.org/0000-0002-7333-0006>

REFERENCES

- [1] T. Rodrigues, D. Reker, P. Schneider, G. Schneider, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 531. <https://doi.org/10.1038/nchem.2479>
- [2] K. Bush, P. Courvalin, G. Dantas, J. Davies, B. Eisenstein, P. Huovinen, G. A. Jacoby, R. Kishony, B. N. Kreiswirth, E. Kutter, S. A. Lerner, S. Levy, K. Lewis, O. Lomovskaya, J. H. Miller, et al., *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 894. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2693>
- [3] R. Karmakar, P. Pahari, D. Mal, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6213. <https://doi.org/10.1021/cr400524q>
- [4] A. Charris-Molina, J. Castillo, M. Macías, J. Portilla, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 12674. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02471>
- [5] J.-A. Funel, S. Abele, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52*, 3822. <https://doi.org/10.1002/anie.201201636>
- [6] S. Seghers, L. Protasova, S. Mullens, J. W. Thybaut, C. V. Stevens, *Green Chem.* **2017**, *19*, 237. <https://doi.org/10.1039/C6GC02334G>
- [7] F. Fringuelli, A. Taticchi. *The Diels-Alder Reaction: Selected Practical Methods*. 1st ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd; **2002**. DOI: <https://doi.org/10.1002/0470845813>.
- [8] R. Jain, T. Bally, P. R. Rablen, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4017. <https://doi.org/10.1021/jo900482q>
- [9] D. Xin, C. A. Sader, O. Chaudhary, P.-J. Jones, K. Wagner, C. S. Tautermann, Z. Yang, C. A. Busacca, R. A. Saraceno, K. R. Fandrick, N. C. Gonnella, K. Horspool, G. Hansen, C. H. Senanayake, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 5135. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b00321>
- [10] A. Bagno, G. Saielli, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2015**, *5*, 228. <https://doi.org/10.1002/wcms.1214>
- [11] S. G. Smith, J. M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12946. <https://doi.org/10.1021/ja105035r>
- [12] A. M. Sarotti, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 944. <https://doi.org/10.1039/C7OB02916K>
- [13] C. I. MacGregor, B. Y. Han, J. M. Goodman, I. Paterson, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 4632. <https://doi.org/10.1039/C6CC01074A>
- [14] K. Ermanis, K. E. B. Parkes, T. Agback, J. M. Goodman, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 8998. <https://doi.org/10.1039/C7OB01379E>
- [15] R. P. Oliveira, A. J. Demuner, E. S. Alvarenga, L. C. A. Barbosa, T. de Melo Silva, *J. Mol. Struct.* **2018**, *1152*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.09.065>
- [16] F. C. Moraes, E. S. Alvarenga, A. J. Demuner, V. M. Viana, *J. Mol. Struct.* **2018**, *1164*, 109. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.03.050>
- [17] M. G. Teixeira, E. S. Alvarenga, *Magn. Reson. Chem.* **2016**, *54*, 623. <https://doi.org/10.1002/mrc.4411>
- [18] V. R. Flid, S. A. Durakov, T. A. Morozova, D. A. Cheshkov, E. A. Katsman, *Russ. Chem. Bull.* **2018**, *67*, 1335. <https://doi.org/10.1007/s11172-018-2222-4>
- [19] E. P. Mazzola, J. B. Lambert, C. D. Ridge, *J. Phys. Org. Chem.* **2018**, *31*, 3816. <https://doi.org/10.1002/poc.3816>
- [20] R. J. Abraham, M. Canton, L. Griffiths, *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 421. <https://doi.org/10.1002/mrc.862>
- [21] G. C. Resende, E. S. Alvarenga, P. H. Willoughby, *J. Mol. Struct.* **2015**, *1101*, 212. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.08.028>
- [22] E. S. Alvarenga, W. A. Saliba, B. G. Milagres, *Quim. Nova.* **2005**, *28*, 927. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000500034>
- [23] *Schrodinger Release 2019-1: Maestro, Schrodinger, LLC, New York*. <https://www.schrodinger.com/citations/>.
- [24] M. J. Frisch and G. W. Trucks and H. B. Schlegel and G. E. Scuseria and M. A. Robb and J. R. Cheeseman and G. Scalmani and V. Barone and G. A. Petersson and H. Nakatsuji and X. Li and M. Caricato and A. V. Marenich and J. Bloino and B. G. Janesko and R. Gomperts and B. Mennucci and H. P. Hratchian and J. V. Ortiz and A. F. Izmaylov and J. L. Sonnenberg and D. Williams-Young and F. Ding and F. Lipparini and F. Egidi and J. Goings and B. Peng and A. Petrone and T. Henderson and D. Ranasinghe and V. G. Zakrzewski and J. Gao and N. Rega and G. Zheng and W. Liang and M. Hada and M. Ehara and K. Toyota and R. Fukuda and J. Hasegawa and M. Ishida and T. Nakajima and Y. Honda and O. Kitao and H. Nakai and T. Vreven and K. Throssell and J. A. Montgomery, Jr. and J. E. Peralta and F. Ogliaro and M. J. Bearpark and J. J. Heyd and E. N. Brothers and K. N. Kudin and V. N. Staroverov and T. A. Keith and R. Kobayashi and J. Normand and K. Raghavachari and A. P. Rendell and J. C. Burant and S. S. Iyengar and J. Tomasi and M. Cossi and J. M. Millam and

- M. Klene and C. Adamo and R. Cammi and J. W. Ochterski and R. L. Martin and K. Morokuma and O. Farkas and J. B. Foresman, D. J. Fox *Gaussian 16, Revis. B.01*. <http://gaussian.com/citation/>.
- [25] J. Tomasi, B. Mennucci, E. Cancès, *J. Mol. Struct. THEOCHEM*. **1999**, *464*, 211. [https://doi.org/10.1016/S0166-1280\(98\)00553-3](https://doi.org/10.1016/S0166-1280(98)00553-3)
- [26] S. G. Smith, J. A. Channon, I. Paterson, J. M. Goodman, *Tetrahedron*. **2010**, *66*, 6437. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.06.022>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Pinto BNS, Teixeira MG, Alvarenga ES. Synthesis and structural elucidation of a phthalide analog using NMR analysis and DFT calculations. *Magn Reson Chem*. 2020;58:559–565. <https://doi.org/10.1002/mrc.4976>

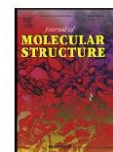
Artigo II

Journal of Molecular Structure 1254 (2022) 132394



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Structure

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molstrStructural elucidation of a novel pyrrolizidine alkaloid isolated from *Crotalaria retusa* L.

Bryan N.S. Pinto, Gabriella A. Moura, Antônio J. Demuner, Elson S. Alvarenga*

Department of Chemistry, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2021

Revised 8 December 2021

Accepted 9 January 2022

Available online 10 January 2022

Keywords:

DP4

CMAE

Macrocyclic

Theoretical calculation

Necine

Bislactone

ABSTRACT

A novel pyrrolizidine alkaloid was isolated and purified from the aerial parts of *Crotalaria retusa* L. Structural elucidation of the alkaloid was established by analyses of high field NMR spectra and quantum mechanical calculations. The ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts for eight candidate structures were calculated and compared with the experimental NMR data applying the corrected mean absolute error (CMAE) and the statistical probability methodology (DP4). The interpretation of the experimental NMR spectra and CMAE and DP4 analyses established that the novel pyrrolizidine alkaloid is (3*S*,4*R*,5*S*,8*a*¹*R*,13*a*¹*R*)-3-hydroxy-3,4,5-trimethyl-10,12,13,13a-tetrahydro-2*H*-[1,6]dioxacycloundecino [2,3,4-gh]pyrrolizine-2,6(3*H*)-dione.

© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pyrrolizidine alkaloids (PAs) belong to a group of secondary metabolites, found in many plants, known for their high toxicity to animals and humans, being characterized as cytotoxic, genotoxic and carcinogenic [1–3]. These PAs are present across a wide variety of angiosperms and more than 6000 plants have been identified with these metabolites, being one of them *Crotalaria retusa* L., also known as “rattlebox” or “snake rattle” [4]. This leguminous is found in tropical and subtropical regions, such as Brazil, and it has been used as the basis of folk medicine [5,6]. The potential use of these compounds in the treatment of diseases such as diabetes and cancer, or their application as nematicide, are driving forces to look for new natural PAs or new less cytotoxic synthetic derivative [7,8].

Monocrotaline and ethylcrotaline, toxic plant constituents, were isolated by our group from *Crotalaria paulina* L. and identified by spectrometric methods assisted by theoretical calculations [9,10]. The macrocyclic alkaloids have a tertiary amine called necine base, which are composed of two fused five-membered rings with bridgeheads containing carbon and nitrogen and a double bond at position C1–C2 (Fig. 1).

Nuclear magnetic resonance (NMR) has become the unrivalled technique for determining the structure of natural products, because it is the only one for which a complete interpretation of the

entire spectrum is normally expected. NMR is a non-destructive technique, and with modern instruments good spectra can be obtained with less than a milligram of sample [11,12]. A classic alternative is the total synthesis of the natural product to confirm if the initially proposed structure is correct, however, this approach demands time and resources.

The literature has many examples of natural products with incorrect structures, which were corrected after their total synthesis [13]. Theoretical computation associated with spectroscopic data is another approach used to overcome the challenge of establishing the stereochemistry of natural products [14–20].

A crucial part of research involving natural products is structural identification, carried out by spectrometric methods and, recently, this piece of work has been carried out with the aid of theoretical calculations. The analysis to indicate which calculated NMR spectrum best fits the experimental data, is performed by a wide variety of statistical methods, with DP4 and CP3 (statistical probability tools located at <http://www.jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr>) and MAE (mean absolute error) being frequently used. MAE is a measure of errors between calculated (d_{calc}) and experimental (d_{exp}) NMR chemical shifts, $\text{MAE (ppm)} = 1/n \sum |d_{\text{calc}} - d_{\text{exp}}|$, where n is the number of chemical shifts used in the comparison. CP3 and DP4 aims to assign which calculated NMR chemical shifts, within a set of candidate structures, best fits the experimental data. CP3 is used when experimental chemical shifts are available for more than one isomeric candidate structure. DP4 is used when experimental data are available for only one candidate structure [21–24].

* Corresponding author.

E-mail address: elson@ufv.br (E.S. Alvarenga).

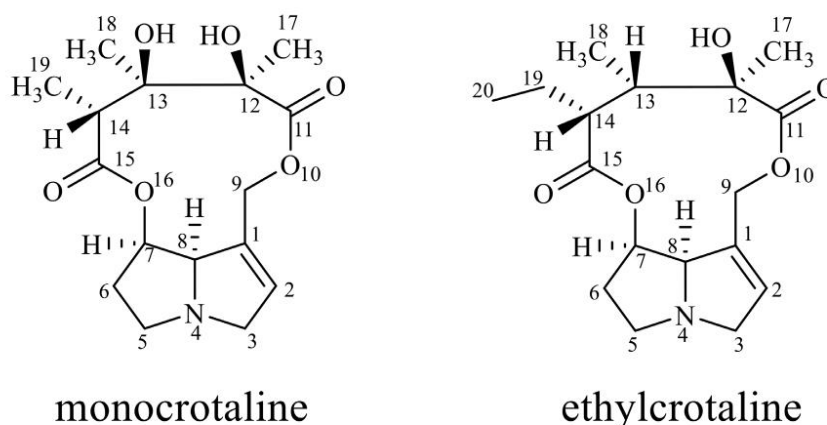


Fig. 1. Macrocyclic alkaloids isolated from *Crotalaria retusa* L.

The isolation of natural products and the synthesis of analogs accompanied by structural identification and bioassays to assess the potential agrochemical activity of such compounds have been the objectives of our research group [25,26]. The structures of novel compounds were established by the spectrometric methods assisted by NMR analyses and theoretical calculations [10,27]. Herein, we report the isolation and structural elucidation of a novel pyrrolizidine alkaloid extracted from *Crotalaria retusa* L. A combination of NMR interpretation and DFT calculations were used to propose the structure of the novel pyrrolizidine alkaloid.

2. Results and discussions

The demand for new drugs for treatment of complex diseases, such as cancer, increased in the XXI century. In this context, natural products have an important role, since many of them have fascinating bioactivity and can serve as inspiration for new synthetic molecules. PAs are known for their potent bioactivity (sometimes undesirable), stimulating interest in research on the possibilities of pharmacological applications [28,29]. PAs are present in about 3% of flowering plants, including *Crotalaria* genus [30], which we have been working on lately, isolating and identifying novel compounds [10].

The extract of *Crotalaria retusa* L. was purified by HPLC to afford an alkaloid, which was identified by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy associated with DFT calculation. Pyrrolizidine alkaloids have been isolated from various plant species, and their stereochemistries were determined [10,31–33]. The doublet of doublet of doublets (ddd) at $\delta = 5.06$ ppm was assigned to H7. Dihedral angles and corresponding vicinal coupling constants of H7 with H8, H6, and H6' are respectively: 28.6 ($J = 5.9$ Hz), 44.9 ($J = 4.3$ Hz), and 75.6 ($J = 3.0$ Hz). Due to similarity of chemical shifts of the nuclei on the pyrrolizidine skeleton of the present work with the compounds reported in the literature, we decided to alternate the stereochemistries on the superior part of the macrocycle (on carbons C12, C13, and C14). This approach is corroborated by the dihedral angles and vicinal coupling constants of H7, which agrees with Karplus equation prediction. This approach provided 8 candidate structures, allowing less costly theoretical calculations (Fig. 2). The isolated pyrrolizidine alkaloid possesses a necin skeleton attached to a pentanedioic acid to form an eleven-membered macrocycle. The hydrogens represented above the plane of the molecule

are labelled as Hx' (x is number of the carbon to which the hydrogen attaches).

In the ^1H NMR spectrum shown in supplementary material (SM, Fig. S1), the olefinic proton, H2, was observed as a doublet of triplets at δ 6.10 ppm, with a vicinal coupling of 2.2 Hz with H3, H3' and a long range coupling (J_4) of 2.1 Hz with H8. These couplings are also present in the COSY (SM, Fig. S4). The same coupling constant (J) value, observed for H2/H3 and H2/H3', is due to the close dihedral angle (φ) between these pairs of protons (58.5° and 60.8°).

Protons H3 and H3' were assigned by interpretation of the COSY contour map, as multiplets at δ 3.83 and 3.50 ppm. These shifts are consistent with the values reported in the literature for this family of natural products [31,34]. Furthermore, both H3 and H3' presented a cross peak in the HSQC (heteronuclear single quantum coherence spectroscopy, SM, Fig. S5) with the signal at δ 61.7 ppm (assigned to C3). Both protons presented COSY cross peaks with the multiplet at δ 4.35 ppm (H8), with a larger correlation spot for H3'/H8 (greater J value for this coupling).

Hydrogen H8 presented a strong correlation in the COSY contour map with the second most deshielded signal (H7). The signal at δ 5.06 ppm with doublet of doublet of doublets (ddd) multiplicity was assigned to H7, because C7 is bonded to oxygen of the carboxyl group.

The hydrogens H6 and H6' were the most shielded nuclei of the pyrrolizidine skeleton. H6 and H6' presented COSY cross peaks with H5 (δ 3.13 ppm, ddd) and H5' (δ 2.66 ppm, ddd).

The assignments of H5 and H5' to signals at δ 3.13 and 2.66 ppm, respectively, were carried out with the aid of the dihedral angles between H5/H6, H5/H6', H5'/H6 and H5'/H6' displayed in the candidate structure MC8. The dihedral angles of H5'/H6 and H5'/H6' are 164.6° and 41.8° , respectively. However, the dihedral angles of H5/H6 and H5/H6' are 44.1° and 78.6° , respectively. Therefore, according to Karplus equation, the coupling constants for H5' are greater than the corresponding coupling constants for H5. The two doublets at δ 4.76 and 4.67 ppm were assigned to H9 and H9', respectively.

The singlet and two doublets at δ 1.39 (s), 1.12 (d), and 1.11 (d) ppm were assigned to the methyl groups H19, H18, and H17, respectively. The doublet of quartets (dq) at δ 3.01 and 1.70 ppm were assigned to H12 and H13, respectively. The most deshielded signal was assigned to H12 because this nucleus is α to the carboxyl group.

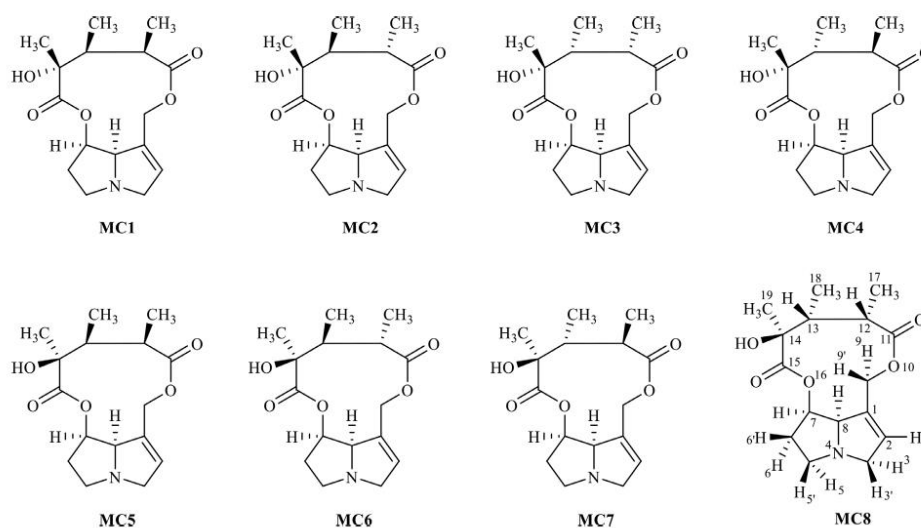


Fig. 2. Candidate structures MC1-MC8. The numbers in the MC8 structure are used to identify the atoms in the NMR spectra.

The ^1H NMR and COSY spectra gave us valuable information about the structure of the isolated pyrrolizidine alkaloid, and some important features were achieved using the ^{13}C NMR (SM, Fig. S2), HSQC and the heteronuclear multiple bond correlation (HMBC; SM, Fig. S6) spectra. The assignment of the olefinic carbon C2, with the aid of the DEPT (distortionless enhancement by polarisation transfer, SM, Fig. S3), was confirmed by the correlation observed in the HSQC of the signal at δ 135.8 ppm with H2. The most deshielded signal at δ 176.4 ppm in the ^{13}C NMR spectrum was assigned to carboxyl carbon C11, using correlations in the HMBC with protons H9, H9', H12, H13, and H17.

Carbons C3, C5, C6, C7 and C9 were assigned to signals at δ 61.7, δ 54.1, δ 34.2, δ 76.2 and δ 60.8 ppm, using the correlations with their respective protons observed in the HSQC spectrum.

After assigning all signals, starting with the ^1H NMR and COSY data, it was possible to establish the spin systems: **A** $\text{CH}_2(\text{C}5)-\text{CH}_2(\text{C}6)-\text{CH}(\text{C}7)-\text{CH}(\text{C}8)-\text{C}(\text{C}1)-\text{CH}(\text{C}2)-\text{CH}_2(\text{C}3)-[\text{CH}_2(\text{C}9)]$; **B** $\text{CH}_3(\text{C}17)-\text{CH}(\text{C}12)-\text{CH}(\text{C}13)-\text{CH}_3(\text{C}18)$; **C** $\text{CH}_3(\text{C}19)$. The next step was to analyse the HMBC spectrum and establish how hydrogenated and non-hydrogenated carbons are connected. The correlations from C1 to H9, C5 to H3 and C8 to H2 are evidence for connectivity of the pyrrolizidine skeleton (moiety A). The cross peaks C14/H13, C14/H18, C14/H19 and C13/H19 on the HMBC indicate that systems B and C are interconnected to the tertiary carbon C14 (C-OH), defining the bonding sequence C11-C12-C13-C14-C15.

The relative position of carbonyl C11 was defined by correlations with H9 and H12, and of carbonyl C15 by correlations with H13 and H19. Therefore, the skeleton of the natural product was established as an eleven-membered macrocyclic pyrrolizidine alkaloid, as shown in Fig. 3.

The structural elucidation of a novel molecule from a natural source can be arduous in some cases, due to the small amount of isolated sample and absence of a monocrystal for X-ray analysis. However, quantum mechanical calculations can be an important tool to assist in this task.

The relative stereochemistry of the natural molecule was confirmed by theoretical calculation of ^1H and ^{13}C NMR chemi-

cal shifts for candidate structures, MC1-MC8 (Fig. 2). The calculations were performed at B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p) level of theory and chemical shifts were compared with experimental data. The matching between calculated and experimental data was established by statistical DP4 method and corrected mean absolute error (CMAE) analysis. The previous NMR spectra interpretation, summarized in Table 1, provided the assignment of the signals, which were used in the CMAE and DP4 analyses.

CMAE and DP4 analyses were carried out after linear correction of the calculated ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts for all candidate structures (MC1-MC8). Linear regression analyses followed by correction of the calculated chemical shifts were performed in MS Excel. The ^{13}C NMR chemical shifts of the carbonyls (C11 and C15) were not taken in the linear regression analyses to provide the corrected ^{13}C NMR chemical shifts.

CMAE analyses were also carried out in MS Excel. The calculated NMR chemical shifts of candidate structure MC8 presented the best match with the experimental data (0.08 for ^1H NMR and 0.96 for ^{13}C NMR). The compilation of the results of the CMAE analyses is shown in Table 2.

The calculated and experimental chemical shifts of each candidate structure were aligned and transferred into the web applet at <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>, which automatically calculated the "goodness of fit". According to the DP4 probability results presented in Table 2, the candidate structure MC8 presented the best matching with the experimental data. A probability of 100.0% for MC8 was presented when considering carbon and proton NMR data in the DP4 analysis. Calculating the probabilities of the nuclei separately, the correspondences were 94.2% and 100.0% for carbon and proton, respectively.

Therefore, the interpretation of the NMR spectra, the results of the DP4 statistical method (Table 2) and the CMAE values were in agreement and the structure of the natural alkaloid was determined as MC8. We recently described the potential of Raman optical activity (ROA) technique by comparing the differences between the ROA spectra of glutinol and R-glutinol [27]. In the present work, we were unable to use this method to define the absolute

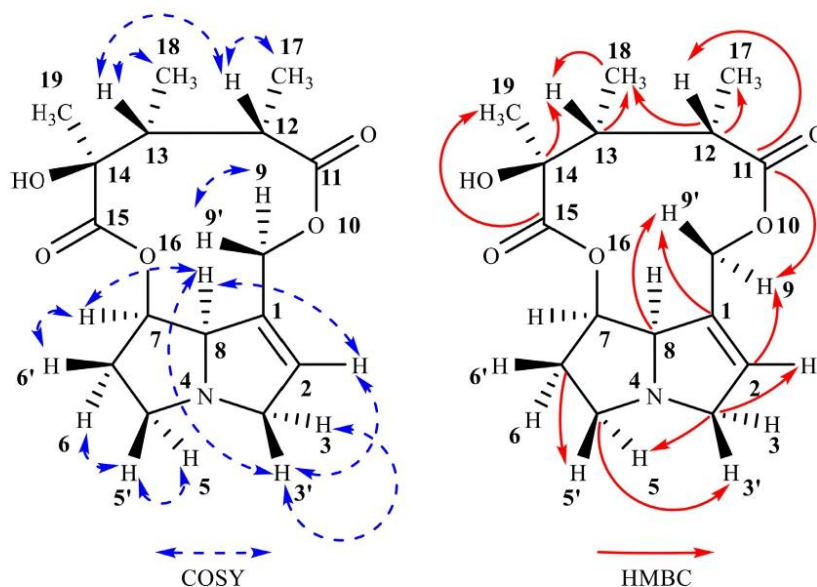


Fig. 3. Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations.

Table 1

NMR data of MC8 in CD_3OD : Experimental (δ_{exp}) chemical shifts, multiplicities (m), coupling constants (J), COSY and HMBC cross correlations.

Label	δ_{Cexp} (ppm)	Label	δ_{Hexp} ppm (m, J Hz, nH)	COSY	HMBC
C1	134.5	-	-	-	H9, H9'
C2	135.8	H2	6.10 (dt, $J = 2.2$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H)	H3, H3', H8	H9, H9'
C3	61.7	H3	3.83 (m, 1H)	H2, H3', H8,	H2, H5, H5'
		H3'	3.50 (m, 1H)	H2, H3, H8	-
C5	54.1	H5	3.13 (ddd, $J = 3.8$ Hz, 6.1 Hz, 9.4 Hz, 1H)	H5', H6/H6'	H3, H3'
		H5'	2.66 (ddd, $J = 6.8$ Hz, 9.4 Hz, 9.4 Hz, 1H)	H5, H6/H6'	-
C6	34.2	H6/H6'	2.07 (m, 2H)	H5, H5', H7	H5, H5'
C7	76.2	H7	5.06 (ddd, $J = 3.0$ Hz, 4.3 Hz, 5.9 Hz, 1H)	H6, H6', H8	-
C8	77.5	H8	4.35 (m, 1H)	H2, H3, H3', H7	H2, H9, H9'
C9	60.8	H9	4.76 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H)	H9'	H2
		H9'	4.67 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H)	H9	-
C11	176.4	-	-	-	H9, H9', H12, H13, H17
C12	38.5	H12	3.01 (dq, $J = 1.6$ Hz, 7.2 Hz, 1H)	H13, H17	H13, H17, H18
C13	50.0	H13	1.70 (dq, $J = 1.6$ Hz, 7.5 Hz, 1H)	H12, H18	H12, H17, H18, H19
C14	77.5	-	-	-	H12, H13, H18, H19
C15	175.9	-	-	-	H13, H19
C17	18.5	H17	1.12 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H)	H12	H12, H13
C18	11.3	H18	1.11 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H)	H13	H12, H13
C19	27.1	H19	1.39 (s, 3H)	-	-

configuration of the new alkaloid. Due to insufficient amount of sample, infrared and high resolution mass spectra were also not measured. As future work, we plan to cultivate *Crotalaria retusa* L., extract, isolate, and purify further quantities of alkaloids to perform biological assays.

It should be mentioned that new and known alkaloids will be found, but it is not certain that the compound of the present work will be isolated.

3. Materials and methods

3.1. Plant material

The *Crotalaria retusa* L. seeds were planted in a garden at the Universidade Federal de Viçosa, Viçosa city, Minas Gerais, Brazil, and their external aerial parts were harvested between September and November 2017. A voucher specimen was deposited at the

Table 2
CMAE and DP4 analyses of ^1H and ^{13}C NMR data for candidate structures MC1–MC8 after assignment of the signals.

Candidate structures	CMAE ^a		DP4 probability (%) ^b		
	^1H	^{13}C	^{13}C and ^1H	^{13}C	^1H
MC1	0.19	1.84	0	0.2	0
MC2	0.19	1.80	0	0.0	0
MC3	0.21	1.84	0	0.1	0
MC4	0.19	2.13	0	0.0	0
MC5	0.20	1.49	0	2.6	0
MC6	0.15	1.51	0	1.5	0.0
MC7	0.23	1.45	0	1.5	0
MC8	0.08	0.96	100.0	94.2	100.0

^a CMAE, corrected mean absolute error. The ^{13}C NMR chemical shifts of carbonyl carbons (C11 and C15) were not considered in the linear regression and in the CMAE analyses.

^b DP4 probabilities presented here were determined after linear correction of the chemical shifts. The ^{13}C NMR chemical shifts of carbonyl carbons (C11 and C15) were not considered in the linear regression and in the DP4 analyses. Calculations were carried out using B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p) level of theory with chloroform solvation.

herbarium of the Department of Botany, Universidade Federal de Viçosa under VIC 45,165.

3.2. General

High performance liquid chromatography (HPLC) analyses were performed on a SHIMADZU liquid chromatograph, consisting of two LC-20AT pumps, SPD-20 A UV/VIS detector, LC solution v.1.21 software (SHIMADZU) and ODS HYPERSIL (C18), 250.0 x 4.6 5 mm (SUPELCO). After the separation procedures, the samples were lyophilized using the Thermo Fisher SCIENTIFIC FR-Drying Digital Unit.

3.3. Isolation

The collected leaves of *Crotalaria retusa* L. (8 kg) were submitted to drying in an air forced circulation oven set at 50 °C for 24 h. Then, the dried leaves (1 kg) were milled on Willy type mill (TECNAL equipment, TE 650, Brazil). The powder was extracted with ethanol (1 L) at room temperature with occasional shaking for 24 h. After this period, the solvent was separated by filtration and the residue was extracted with a further 1 L of ethanol. This procedure was repeated three times to afford 3 L of ethanolic extract. The solvent was removed under reduced pressure at 40 °C to afford 98 g of crude extract. The residue was suspended in 200 mL of a mixture of 1 mol/L sulfuric acid and chloroform (1:1) and separated in a separating funnel. The acid layer was extracted with chloroform (2 x 50 mL) to separate the ionized alkaloid fraction from neutral amines. The acid layer was treated with zinc (5 g) dust for 5 h at pH 1.2, to reduce the amine N-oxides. Aqueous ammonium hydroxide (25%) was used to adjust pH to 12–14 and it was extracted with a mixture of ethanol and chloroform (4:1, 3 x 25 mL). The combined organic fractions was concentrated under reduced pressure and the residue was flashed in silica-gel column chromatography to afford 32.9 mg of PAs [10,35].

The PAs fraction (32.9 mg) obtained from silica-gel column chromatography, was subjected to isocratic mode HPLC analysis using as eluent a mixture of water:acetonitrile: ammonium hydroxide (65:35:0.5 v/v), pH 11 ± 0.5. The running time occurred in the range of 0.0–16.0 min. The volume manually injected was 20 μL. The flow was constant at a rate of 0.7 mL/min using C18 column, 250.00 x 3.0 5 μm. Chromatographic data were obtained, analysed, and stored at 210 nm. analysing the chromatogram, it was possible to visualize five different peaks with the corresponding retention

times: 2.238, 3.064, 6.451, 8.813 and 11.785 min. The fractions for each peak were combined and lyophilized. The peak at 11.785 min had the largest amount of mass amongst them, giving 5.3 mg of the title alkaloid [10].

3.4. NMR spectral methods

NMR spectra were obtained in a Bruker Avance DRX-400 400 MHz spectrometer. The temperature of the NMR instrument was controlled at 25 °C during the spectrum acquisition. The chemical shifts were recorded in units δ in ppm and the scalar coupling constants (*J*) in Hz. The chemical shifts were referenced to residual CHD₂OD (δ = 3.31 ppm) in ^1H NMR and CD₃OD (δ = 49.0 ppm) in the ^{13}C NMR.

3.5. Computational

The conformational searches were performed for eight candidate structures **MC1–MC8** (Fig. 1) using Maestro 2018–1 (Maestro version 11.5.011) [36]. The conformers were submitted to geometry optimisation and frequency calculation using DFT at M06-2X/6-31+G(d,p) level of theory. Chemical shifts were obtained from the NMR shielding tensor values, which were computed for each candidate structure at B3LYP/6-311+G(2d,p) level in Gaussian 16 [37]. The shielding tensor of all nuclei were converted into referenced chemical shifts by subtracting the computed shielding tensors of TMS calculated at the same level of theory ($^1\text{H} = 31.8757$; $^{13}\text{C} = 184.0352$). These operations were repeated for each candidate structure **MC1–MC8**. Solvation was addressed with integrated equation formalism polarized continuum model (iefpcm) [38] during optimisations/frequencies and shielding tensors calculations.

The experimental data set was compared with the calculated data to determine the CMAE values [39]. To obtain the CMAE values for each candidate structure, a linear regression is performed on a plot of the calculated (δ_{calc}) chemical shifts against experimental (δ_{exp}) chemical shifts, using the ^1H and ^{13}C NMR data. With the values of the intercept and slope, the δ_{scaled} for each candidate structure is obtained.

Finally, the CMAE is calculated by the summation of the absolute value of δ_{exp} and δ_{scaled} of all N-nucleus, divided by the total number of N-nucleus. The calculated ^1H and ^{13}C chemical shifts using B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p) level of theory are presented in the Supporting Material (SM).

A goodness-of-fit probability was determined using the DP4 method described by Goodman [40]. DP4 analysis was accomplished by inputting computed and experimental chemical shifts into the DP4 analysis tool (located at: <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>).

4. Conclusion

A novel pyrrolizidine alkaloid was isolated from *Crotalaria retusa* L. aerial parts and its structure was elucidated by NMR experiments and quantum mechanics calculations. The structure of the isolated pyrrolizidine alkaloid was determined as being (3*S*,4*R*,5*S*,8*a*¹*R*,13*a*¹*R*)–3-hydroxy-3,4,5-trimethyl-4,5,8,8*a*¹,10,12,13,13*a*-octahydro-2*H*-[1,6]dioxacycloundecino [2,3,4-*gh*]pyrrolizine-2,6(3*H*)-dione (**MC8**). The use of quantum mechanics calculations and NMR experiments, in combination with DP4 and CMAE analyses, were essential to elucidate the complete relative stereochemistry of the natural product.

Author contributions

GAM and AJD isolated and purified the alkaloid. BNSP and ESA carried out theoretical calculations and wrote the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

CRediT authorship contribution statement

Bryan N.S. Pinto: Methodology, Data curation, Writing – original draft. **Gabriella A. Moura:** Methodology. **Antônio J. Demuner:** Supervision, Visualization. **Elson S. Alvarenga:** Conceptualization, Writing – original draft.

Acknowledgements

We are grateful to FAPEMIG, CNPq, RQ-MG (Rede Mineira de Química), and CAPES for financial support.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.molstruc.2022.132394](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132394).

References

- X. He, Q. Xia, Q. Wu, W.H. Tolleson, G. Lin, P.P. Fu, Primary and secondary pyrrolic metabolites of pyrrolizidine alkaloids form DNA adducts in human A549 cells, *Toxicol. Vitro* 54 (2019) 286–294, [doi:10.1016/j.tiv.2018.10.009](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.10.009).
- T. Kopp, L. Salzer, M. Abdel-Tawab, B. Mizakoff, Efficient extraction of pyrrolizidine alkaloids from plants by pressurized liquid extraction—a preliminary study, *Planta Med.* (2019), [doi:10.1055/a-1023-7419](https://doi.org/10.1055/a-1023-7419).
- B. Jank, J. Rath, The risk of pyrrolizidine alkaloids in human food and animal feed, *Trends Plant Sci.* 22 (2017) 191–193, [doi:10.1016/j.tplants.2017.01.002](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.01.002).
- K.I. Sinan, L. Sajić, Ž. Peršurić, S.K. Pavelić, O.K. Etienne, M.C.N. Picot-Allain, M.F. Mahomoodally, G. Zengin, A comparative study of the chemical composition, biological and multivariate analysis of *Crotalaria retusa* L. stem barks, fruits, and flowers obtained via different extraction protocols, *S. Afr. J. Bot.* 128 (2020) 101–108, [doi:10.1016/j.sajb.2019.10.019](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.10.019).
- P.S. de Figueiredo, N.M. Lindoso Silva, Somatic polymorphism variation in *Crotalaria retusa* L. *Seeds Am. J. Plant Sci.* 09 (2018) 46–59, [doi:10.4236/ajps.2018.91005](https://doi.org/10.4236/ajps.2018.91005).
- A. Rouamba, V. Ouédraogo, I. Karama, M. Compaoré, M. Kiendrebeogo, Ethnomedicinal use of *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae), a pyrrolizidine alkaloid toxic plant, *Int. J. Biochem. Res. Rev.* 23 (2018) 1–6, [doi:10.9734/IJBCRR/2018/43635](https://doi.org/10.9734/IJBCRR/2018/43635).
- T. Thoden, M. Boppé, Plants producing pyrrolizidine alkaloids: sustainable tools for nematode management? *Nematology* 12 (2010) 1–24, [doi:10.1163/13855409x12549869072248](https://doi.org/10.1163/13855409x12549869072248).
- A. Mondal, A. Gandhi, C. Fimognari, A.G. Atanasov, A. Bishayee, Alkaloids for cancer prevention and therapy: current progress and future perspectives, *Eur. J. Pharmacol.* 858 (2019) 172472, [doi:10.1016/j.ejphar.2019.172472](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172472).
- R.P. Oliveira, A.J. Demuner, E.S. Alvarenga, M.C. Parma, L.C. de Almeida Barbosa, L. de Moura Guimarães, A.R. Aguiar, Experimental and theoretical studies on the characterization of monocrotaline by infrared and Raman spectroscopies, *J. Mol. Struct.* 1135 (2017) 228–233, [doi:10.1016/j.molstruc.2017.01.050](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.01.050).
- R.P. Oliveira, A.J. Demuner, E.S. Alvarenga, L.C.A. Barbosa, T. de Melo Silva, A novel alkaloid isolated from *Crotalaria paulina* and identified by NMR and DFT calculations, *J. Mol. Struct.* 1152 (2018) 337–343, [doi:10.1016/j.molstruc.2017.09.065](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.09.065).
- J.B. McAlpine, S. Chen, A. Kutateladze, J.B. MacMillan, G. Appendino, A. Barison, M.A. Beniddir, M.W. Biavatti, S. Bluml, A. Boufridi, M.S. Butler, R.J. Capon, Y.H. Choi, D. Coppage, P. Crews, M.T. Crimmins, M. Csete, P. Dewapriya, J.M. Egan, M.J. Garson, G. Genta-Jouve, W.H. Gerwick, H. Gross, M.K. Harper, P. Hermant, J.M. Hook, L. Hunter, D. Jeannerat, N. Ji, T.A. Johnson, D.G.I. Kingston, H. Koshino, H. Lee, G. Lewin, J. Li, R.G. Linington, M. Liu, K.L. McPhail, T.F. Molinski, B.S. Moore, J. Nam, R.P. Neupane, M. Niemitz, J. Nuzillard, N.H. Oberlies, F.M.M. Ocampos, G. Pan, R.J. Quinn, D.S. Reddy, J. Renault, J. Rivera-Chávez, W. Robien, C.M. Saunders, T.J. Schmidt, C. Seger, B. Shen, C. Steinbeck, H. Stuppner, S. Sturm, O. Tagliatalata-Scafati, D.J. Tantillo, R. Verpoorte, B. Wang, C.M. Williams, P.G. Williams, J. Wist, J. Yue, C. Zhang, Z. Xu, C. Simmler, D.C. Lankin, J. Bisson, G.F. Pauli, The value of universally available raw NMR data for transparency, reproducibility, and integrity in natural product research, *Nat. Prod. Rep.* 36 (2019) 35–107, [doi:10.1039/C7NP00064B](https://doi.org/10.1039/C7NP00064B).
- A. Navarro-Vázquez, R.R. Gil, K. Blinov, Computer-assisted 3D structure elucidation (CASE-3D) of natural products combining isotropic and anisotropic NMR parameters, *J. Nat. Prod.* 81 (2018) 203–210, [doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00926](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00926).
- K.N. Rao, M. Kanakaraju, A.C. Kunwar, S. Ghosh, Total synthesis of the proposed structure of maltepolidic C, *Org. Lett.* 18 (2016) 4092–4095, [doi:10.1021/acs.orglett.6b01981](https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b01981).
- F.C. Moraes, E.S. Alvarenga, A.J. Demuner, V.M. Viana, Assignment of the relative and absolute stereochemistry of two novel epoxides using NMR and DFT-GIAO calculations, *J. Mol. Struct.* 1164 (2018) 109–115, [doi:10.1016/j.molstruc.2018.03.050](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.03.050).
- M.G. Teixeira, E.S. Alvarenga, Characterization of novel isobenzofuranones by DFT calculations and 2D NMR analysis, *Magn. Reson. Chem.* 54 (2016) 623–631, [doi:10.1002/mrc.4411](https://doi.org/10.1002/mrc.4411).
- G.C. Resende, E.S. Alvarenga, P.H. Willoughby, Isolation and stereochemical assignment of phthalides resulting from the Diels-Alder reaction between 5-isopropoxyfuran-2(5H)-one and cyclopentadiene, *J. Mol. Struct.* 1101 (2015) 212–218, [doi:10.1016/j.molstruc.2015.08.028](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.08.028).
- B.N.S. Pinto, M.G. Teixeira, E.S. Alvarenga, Synthesis and structural elucidation of a phthalide analog using NMR analysis and DFT calculations, *Magn. Reson. Chem.* (2020) 1–7, [doi:10.1002/mrc.4976](https://doi.org/10.1002/mrc.4976).
- E.S. Alvarenga, M.G. Teixeira, D.T. Lopes, A.J. Demuner, Computation and structural elucidation of compounds formed via epoxide alcoholysis, *Magn. Reson. Chem.* 57 (2019) S101–S107, [doi:10.1002/mrc.4818](https://doi.org/10.1002/mrc.4818).
- G. da Costa Resende, E.S. Alvarenga, Structural elucidation of dioxo-cage compounds from tetrahydroisobenzofuran-1(3 H)-one: analysis of NMR data and GIAO chemical shifts calculations, *Magn. Reson. Chem.* 1 (2016) 4–10, [doi:10.1002/mrc.4483](https://doi.org/10.1002/mrc.4483).
- L.B. Krivdin, Computational ¹H NMR: part 3. Biochemical studies, *Magn. Reson. Chem.* 58 (2020) 15–30, [doi:10.1002/mrc.4895](https://doi.org/10.1002/mrc.4895).
- N. Grimblat, A.M. Sarotti, Computational chemistry to the rescue: modern toolboxes for the assignment of complex molecules by GIAO NMR calculations, *Chem. A Eur. J.* 22 (2016) 12246–12261, [doi:10.1002/chem.201601150](https://doi.org/10.1002/chem.201601150).
- S.G. Smith, J.M. Goodman, Assigning stereochemistry to single diastereoisomers by GIAO NMR calculation: the DP4 probability, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 12946–12959, [doi:10.1021/ja105035r](https://doi.org/10.1021/ja105035r).
- S.G. Smith, J.M. Goodman, Assigning the stereochemistry of pairs of diastereoisomers using GIAO NMR shift calculation, *J. Org. Chem.* 74 (2009) 4597–4607, [doi:10.1021/jo900408d](https://doi.org/10.1021/jo900408d).
- K. Ermanis, K.E.B. Parkes, T. Agback, J.M. Goodman, Doubling the power of DP4 for computational structure elucidation, *Org. Biomol. Chem.* 15 (2017) 8998–9007, [doi:10.1039/C7OB01379E](https://doi.org/10.1039/C7OB01379E).
- D. Rodríguez-Hernández, L.C.A. Barbosa, A.J. Demuner, J.P. Ataíde Martins, L. Fischer nee Heller, R. Csuk, Hederagenin amide derivatives as potential antiproliferative agents, *Eur. J. Med. Chem.* 168 (2019) 436–446, [doi:10.1016/j.ejmech.2019.02.057](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.057).
- P.T.L. Seixas, A.J. Demuner, E.S. Alvarenga, L.C.A. Barbosa, A. Marques, E. de S. Farias, M.C. Picanço, Bioactivity of essential oils from *Artemisia against Diaphania hyalinata* and its selectivity to beneficial insects, *Sci. Agric.* 75 (2018) 519–525, [doi:10.1590/1678-992x-2016-0461](https://doi.org/10.1590/1678-992x-2016-0461).
- S.M.B. Castaneda, E.S. Alvarenga, A.J. Demuner, L.M. Guimarães, Vibrational spectra and theoretical calculations of a natural pentacyclic triterpene alcohol isolated from *Mucuna pruriens*, *Struct. Chem.* (2019), [doi:10.1007/s11224-019-01431-9](https://doi.org/10.1007/s11224-019-01431-9).
- A. Thawabteh, S. Juma, M. Bader, D. Karaman, L. Scranò, S.A. Bufo, R. Karaman, The biological activity of natural alkaloids against herbivores, cancerous cells and pathogens, *Toxins (Basel)* 11 (2019) 656, [doi:10.3390/toxins11110656](https://doi.org/10.3390/toxins11110656).
- M. Yang, J. Ma, J. Ruan, C. Zhang, Y. Ye, P. Pi-Cheng Fu, G. Lin, Absorption difference between hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides—mechanism and its potential toxic impact, *J. Ethnopharmacol.* (2019) 112421, [doi:10.1016/j.jep.2019.112421](https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112421).
- N.D. Baba, C. Uchendu, C.O.I. Njoku, Effect of *Crotalaria lachnosema* Stapf (Fabaceae) extract on biomarkers of hepatic and renal function and oxidative stress in male Wistar rats, *Comp. Clin. Path.* 28 (2019) 1259–1266, [doi:10.1007/s00580-019-02906-1](https://doi.org/10.1007/s00580-019-02906-1).
- D.S. Rycroft, I.R. Stirling, D.J. Robins, Assignment of the 1H and 13C NMR spectra and conformational analysis of the pyrrolizidine alkaloid 13-O-acetylprocrotaline, *Magn. Reson. Chem.* 30 (1992) 542–545, [doi:10.1002/mrc.1260301310](https://doi.org/10.1002/mrc.1260301310).
- C.M. de Melo Sousa, R.B. Giordani, W.A.M. de Almeida, C. Griesinger, R.R. Gil, A. Navarro-Vázquez, F. Hallwass, Effect of the solvent on the conformation of monocrotaline as determined by isotropic and anisotropic NMR parameters, *Magn. Reson. Chem.* (2019) 1–8, [doi:10.1002/mrc.4968](https://doi.org/10.1002/mrc.4968).
- C. Ma, Y. Liu, L. Zhu, H. Ji, X. Song, H. Guo, T. Yi, Determination and regulation of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in food: a critical review of recent research, *Food Chem. Toxicol.* 119 (2018) 50–60, [doi:10.1016/j.fct.2018.05.037](https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.037).
- M. Noorwala, F.V. Mohammad, V.U. Ahmad, B. Sener, F. Ergun, D. Delioram, Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio lorenthii*, *Fitoterapia* 71 (2000) 618–620, [doi:10.1016/S0367-326X\(00\)00194-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00194-5).
- J.R. Trigo, K.S. Brown, L. Witte, T. Hartmann, L. Ernst, L.E.S. Barata, Pyrrolizidine alkaloids: different acquisition and use patterns in Apocynaceae and Solanaceae feeding ithomiine butterflies (Lepidoptera: nymphalidae), *Biol. J. Linn. Soc.* 58 (1996) 99–123, [doi:10.1111/j.1095-8312.1996.tb01663.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1996.tb01663.x).
- Maestro, in: Schrödinger, Schrödinger Release, 2019, p. 2019.
- M.J. Frisc, G.W. Trucks, B. Sclegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G.A. Petersson, Li X Nakatsuji, M. Caricato, A.V. Marenic, J. Bloino, B.G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, P. ratcian, J.V. Ortiz, A.F. Izmaylov, J.L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. enderson, D. Ranasinge, V.G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zeng, W. Liang, M. ada, M. Eara, K. Toyota, R. Fukuda, J. asegawa, NakajimaT IsidaM, KitaoO onday, VrevenT Nakai, K. Trossell, J.A. Montgomery Jr, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M.J. Bearpark, J.J. eyd, E.N. Broters, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, T.A. Keit, R. Kobayasi, J. Normand, K. Ragavacari, A.P. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J.M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J.W. Octerski, R.L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J.B. Foresman, D.J. Fox, in: Gaussian 16 Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford, 2016, p. CT2.

- [38] J. Tomasi, B. Mennucci, E. Cancès, The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level, *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 464 (1999) 211–226, doi:[10.1016/S0166-1280\(98\)00553-3](https://doi.org/10.1016/S0166-1280(98)00553-3).
- [39] A.M. Sarotti, Successful combination of computationally inexpensive GIAO 13C NMR calculations and artificial neural network pattern recognition: a new strategy for simple and rapid detection of structural misassignments, *Org. Biomol. Chem.* 11 (2013) 4847, doi:[10.1039/c3ob40843d](https://doi.org/10.1039/c3ob40843d).
- [40] S.G. Smith, J.A. Channon, I. Paterson, J.M. Goodman, The stereochemical assignment of acyclic polyols: a computational study of the NMR data of a library of stereopentad sequences from polyketide natural products, *Tetrahedron* 66 (2010) 6437–6444, doi:[10.1016/j.tet.2010.06.022](https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.06.022).

Structural Elucidation by NMR Analysis Assisted by DFT Calculations of a Novel Natural Product from *Conchocarpus Mastigophorus* (Rutaceae)

Bryan N. S. Pinto,^[a] Elson S. Alvarenga,^{*[a]} Anderson R. Santos,^[b] Washington F. Oliveira,^[b] Vanderlúcia F. de Paula,^[b] Márcio N. Oliveira,^[c] João M. B. Junior,^[d] and Andrea N. de L. Batista^[e]

Abstract: The stem of *Conchocarpus mastigophorus* was solvent-extracted and purified by silica-gel column chromatography to afford eleven natural products, including one new compound. The structures of all compounds were fully elucidated by spectrometric methods. NMR analyses assisted by theoretical calculations were used to determine the structure of a novel natural product. The structure of the novel compound **2** (acridone alkaloid) was established as 1,3,6-trihydroxy-2,4,5-trimethoxy-10-methylacridin-9(10H)-

one. The absolute configuration of compound **1** was assigned by means of vibrational circular dichroism (VCD) spectroscopy. The structure of compound **1** was defined as (3S)-(–)-3-hydroxy-1-methylpiperidin-2-one. Theoretical calculations were performed at the B3LYP/6-311+G(2d,p)/M06-2X/6-31+G(d,p) level of theory and DP4 statistical tool was employed to compare the calculated and experimental NMR chemical shifts.

Introduction

The development of novel substances for the treatment of human diseases or the protection of crops are key points of interest for chemists around the world. One of the best strategies in this topic is the study of molecules found in plants, insects, and animals against active sites of diseases or pests that one wants to strike.^[1] Natural products can also serve as models for new synthetic molecules with high selectivity and less toxicity for humans, crops, livestock, and the environment. The fauna and flora of Brazil present a huge biological and chemical diversity,^[2] with countless unexplored novel substances with real potential for applications as drugs or agrochemicals. An example of a plant with great research potential is *Conchocar-*

pus mastigophorus Kallunki, which belongs to the Rutaceae family and is endemic to Brazil.^[3] In recent years, researchers have highlighted the wide chemical constitution of some of the *Conchocarpus* plants, pointing out that the major secondary metabolites found are alkaloids,^[4] coumarins,^[5] flavonoids,^[6] and terpenes.^[7] However, more than forty of the fifty-two known species of *Conchocarpus*,^[8] including *C. mastigophorus* Kallunki, have never been studied for a better understanding of their chemical and biological potential.

Acridone alkaloids are natural products typical of the family Rutaceae and one of the most common alkaloids of the genus *Conchocarpus*.^[9] In the literature, there are some examples of plant species of the genus *Conchocarpus* with acridone alkaloids, namely: *C. marginatus*; *C. inopinatus*,^[6] *C. coeruleus*; *C. rubrus*^[10] and *C. paniculatus*.^[11] It is important to emphasize that some of those plants were known by other names before a reclassification; for example, *Conchocarpus marginatus* was previously known as *Angostura paniculate*,^[12] while *Conchocarpus rubrus* and *Conchocarpus coeruleus* belonged to the extinct genus *Almeidea*.^[13] An expressive number of studies in the last thirty years has assigned important biological activities to the acridone alkaloids, such as antiviral,^[14] molluscicide,^[11] antiparasitic,^[15] cytotoxic,^[16] anti-inflammatory,^[17] antimicrobial,^[18] and inhibitors of enzymes.^[19]

The genus *Conchocarpus* has other natural products in addition to acridonic alkaloids. In recent years, several types of alkaloids, including pyranoquinolin-2-ones, have been isolated from stem bark and leaves of *Conchocarpus fontanesianus*, a species native to the Brazilian Atlantic Rainforest and popularly known as “pitaguará”.^[20] Pyranoquinolin-2-ones and piperidin-2-ones, have in common a δ -lactam ring in their structures. Although pyranoquinolin-2-ones are present in species of *Conchocarpus*,^[21] there is no report on the occurrence of piperidin-2-ones in this genus. Lactams are one of the most iconic natural products because the

[a] B. N. S. Pinto, Prof. Dr. E. S. Alvarenga
Department of Chemistry
Universidade Federal de Viçosa
36570-900 Viçosa, Minas Gerais (Brazil)
E-mail: elson@ufv.br

[b] A. R. Santos, W. F. Oliveira, Prof. Dr. V. F. de Paula
Department of Science and Technology
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Jequié, Bahia (Brazil)

[c] M. N. Oliveira
Department of Biological Science
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Jequié, Bahia (Brazil)

[d] Prof. Dr. J. M. B. Junior
Institute of Science and Technology
Universidade Federal de São Paulo
São José dos Campos, São Paulo (Brazil)

[e] Dr. A. N. de L. Batista
Institute of Chemistry
Universidade Federal Fluminense
Niterói, Rio de Janeiro (Brazil)

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/ajoc.202200182>

first antibiotic discovered was penicillin, a β -lactam produced by the fungus *Penicillium rubens*.^[22]

Lactams are heterocyclic compounds, with four to seven membered rings, typically found in fungi, but also in plants, bacteria, and animals.^[23] These compounds present potent bioactivity, acting as antibiotics,^[24] antihistamine^[25] and antiangiogenic.^[26] The majority of the literature about the biological activities of lactams is focused on β -lactams and their use as antibiotics (penicillins, cephalosporins, and monobactams).^[27] Despite that, other lactams also have biological activities. One example includes *Dolutedegravir*, a δ -lactam used as a drug in the medicinal treatment of HIV.^[28] Synthetic organic chemists have particular interest in lactams, not only for the synthesis of β -lactams derivatives as scaffolds for novel molecules, but also for the strategic modification of selected lactones to lactams, aiming to improve the aqueous solubility of the former to increase their biological activity.^[29]

Structural elucidation of a new natural product is the first step towards understanding its potential chemical and biological properties. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is one of the best tools to accomplish this task. The popularization of NMR spectrometers with higher magnetic field strength and the improvement of software programs to analyze NMR data have facilitated the routine analysis and increased the capacity to analyze complex molecules. Although NMR spectroscopy has evolved over the years, there are limits to the technique. To overcome these limits and even improve accuracy, the tools available in computational chemistry to predict the spectroscopic properties of organic compounds have become an essential part of structural elucidation.^[30]

A typical implementation that combines experimental NMR data and theoretical quantum mechanics calculation is common in the stereo structural assignment of a new molecule.^[31]

As each stereoisomer has intrinsic ^1H and ^{13}C chemical shifts, the theoretical NMR data of a set of candidate structures can be compared with the experimental NMR values of the new molecule.^[32]

Using specific quantitative parameters such as, mean absolute error (MAE) and linear fit (R^2) or statistical parameters like DP4^[33] and CP3,^[34] it is possible to point out the NMR data of the candidate structure that best fit the experimental NMR data, thus elucidating the correct structure for the new natural product.^[35]

The present work describes the isolation of eleven natural products from the stem of *C. mastigophorus*. The structures of two natural products **1** and **2** were elucidated by analyses of the NMR spectra assisted by DFT calculations. The structures of all natural products were established by the spectrometric methods. The absolute configuration of **1** was proposed based on the comparison of vibrational circular dichroism (VCD) spectral data with DFT simulated spectra.

Results and Discussion

Plants are the most common sources of unique and fascinating substances, which have the flexibility to be used directly as an agrochemical or drug and can inspire the synthesis of analogous

molecules that can provide a greater biological activity when contrasted to the original natural product.^[36] Analyses of the extract from the stem of *C. mastigophorus* resulted in the isolation and purification of eleven compounds, two of which were unknown. These natural compounds were isolated, purified, and submitted to spectrometric analyses to elucidate their structures. Compounds **1** and **2** and their candidate structures are shown in Figure 1. Compound **2** is a novel natural product. The complete structure elucidation of these natural products, using NMR and DFT calculations are presented.

Compounds **3–11** are described in the literature (Figure 2), and their structures were confirmed by comparing the experimental ^1H and ^{13}C NMR data with those reported. The compounds identified were citramine (**3**),^[37] gamma-fagarine (**4**),^[38] marmesin (**5**),^[39] 4-methoxy-1-methylquinolin-2(1*H*)-one (**6**),^[40] haplotusine (**7**),^[21] citrusinine I (**8**),^[41] glyfoline (**9**),^[42] citbrasine (**10**)^[41] and 1-methyl-2-phenylquinolin-4(1*H*)-one (**11**).^[43] To the best of our knowledge, only compounds **4**, **5**, **7** and **11** were reported in the genus *Conchocarpus*.

Structure elucidation of compound 1

^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY, HMBC, HSQC, DEPTQ135, and 1D-NOESY were obtained for compound **1**. Analyses of NMR, IR (Figure S15) and EI mass spectra (Figure S16), enabled us to propose four candidate structures for compound **1**, namely, **1a**, **1b**, **1c**, and **1d** (Figure 1). DFT computation of the ^{13}C and ^1H

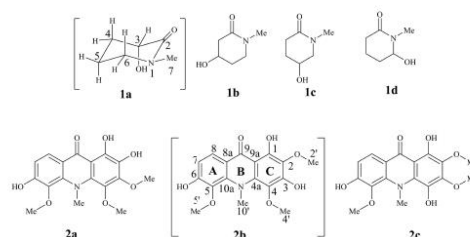


Figure 1. Candidate structures for compounds **1** and **2** isolated from *Conchocarpus mastigophorus*.

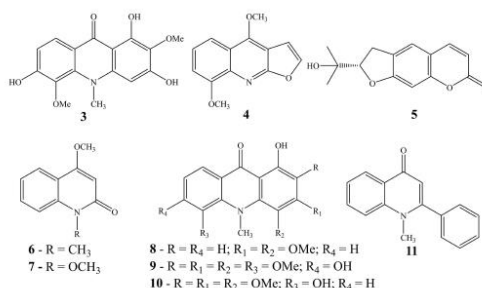


Figure 2. Structures for known compounds **3–11** isolated from *Conchocarpus mastigophorus*.

NMR chemical shifts with methanol solvation were performed for the four candidate structures (**1a–1d**) at the B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p) level of theory. The calculated ^{13}C and ^1H NMR chemical shifts were compared with the respective unassigned experimental data. The chemical shifts were aligned and transferred to the web applet at <http://www.jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/> which automatically performed statistical DP4 analyses. The “goodness of fit” was performed by matching the experimental ^{13}C and ^1H chemical shifts with the respective calculated ^{13}C and ^1H chemical shifts for **1a–1d**. Candidate structure **1a** matched the data for compound **1** with 99.8% probability considering the unassigned ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts (Table S15).

The structure of the lactam **1a** was confirmed by NMR analyses. The peak integrated for three hydrogens, a singlet at δ 2.94 ppm, was assigned to H7 (^1H NMR). The most deshielded hydrogen H3 was assigned to the doublet of doublets ($J=9.3$, and 6.9 Hz), at $\delta=3.81$ ppm. Axial hydrogens in cyclohexane-like systems have smaller chemical shifts and larger vicinal coupling constants than equatorial hydrogens. The signals at $\delta=3.13$ ppm (ddd, $J=11.4$, 9.1, and 7.5 Hz) and $\delta=3.75$ ppm (ddd, $J=11.4$, 7.6, and 4.0 Hz) were assigned to H6_{ax} and H6_{eq}, respectively (Figure S1). H6_{ax} and H6_{eq} presented cross-correlations with the multiplets at $\delta=1.93$ –2.04 ppm and $\delta=2.05$ –2.19 ppm in the correlation spectroscopy spectrum (COSY, Figure S5). The most shielded hydrogen H5_{ax} was assigned to the signal at $\delta=1.93$ –2.04 ppm.

Six signals for carbons with distinct chemical environments were observed in the DEPTQ135 (distortionless enhancement by polarization transfer with retention of quaternaries) experiment. The methyl carbon C7 was assigned to the signal at $\delta=41.4$ ppm. The signal at $\delta=72.0$ ppm was assigned to C3, an expected chemical shift for secondary alcohols. The peak with the highest chemical shift, $\delta=173.2$ ppm, was assigned to the carbonyl group. The methylene carbon bonded to the nitrogen of the lactam (C6) was assigned to the negative peak at $\delta=57.2$ ppm.

Cross correlations C3/H3 and C7/H7 were observed in the HSQC (heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) spectrum, which corroborates with the assignment of protons H3 and H7 made by ^1H NMR interpretation. The assignments of H6_{ax} and H6_{eq} were confirmed by the cross correlation with C6. The signals at $\delta=30.1$ and 24.0 ppm were assigned to C4 and C5, respectively, due to the cross correlations with H5_{ax}, H5_{eq} and H4_{ax} and H4_{eq} observed in the HSQC spectrum (Figure S4).

Hydrogen H3 presented correlations with H4_{ax} and H4_{eq} in the COSY spectrum, hence candidate structures **1b** and **1c** are discarded, because for these structures the hydrogen attached to C3 (bonded to the hydroxyl group) would present four COSY cross peaks (Figure S5).

The signal at $\delta=30.1$ ppm was assigned to C4 with the aid of the cross peak correlations with H3, H5 and H6 observed in the heteronuclear multiple bond correlation spectrum (HMBC). C5 presented correlations with H3, H4 and H6. The carbonyl presented correlations with H3 and H4 in the HMBC spectrum (Figure S21).

Calculated ^{13}C NMR spectra for candidate structures **1a–1d** and the experimental ^{13}C NMR spectrum of (3S)-(–)-3-hydroxy-1-methylpiperidin-2-one (**1a**) are shown in Figure 3.

The results of the DP4 analyses after assignment of the NMR signals presented 100% probability for **1a** as the correct structure for natural product **1** (Table S16). Therefore, after DP4 statistical analyses, infrared, mass spectrometry and NMR interpretation, the structure of the natural compound **1** was determined as (–)-3-hydroxy-1-methylpiperidin-2-one (**1a**). The assigned ^1H and ^{13}C NMR signals, COSY and HMBC correlations for lactam **1** are shown in Table 1. Some key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations for lactam **1** are shown in Figure 4 and Figure 5. The absolute stereochemistry of **1** was assigned as (3S) by comparison of the VCD^[44] experimental spectrum with

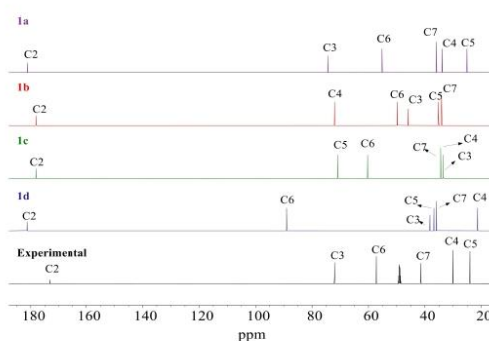


Figure 3. Calculated ^{13}C NMR spectra for candidate structures **1a–1d** and the experimental ^{13}C NMR spectrum of (3S)-(–)-3-hydroxy-1-methylpiperidin-2-one (**1a**).

Table 1. NMR data of compound 1 : Experimental (δ) chemical shifts, multiplicities (m), coupling constants (J), COSY, and HMBC cross correlations.					
Label	δ_c [ppm]	Label	δ_H [ppm] ^[a]	HMBC	COSY
C2	173.2	–	–	H3, H4 _{ax} , H4 _{eq}	H4 _{ax} , H4 _{eq}
C3	72.0	H3 _{ax}	3.81 (dd, 9.3, 6.9)	H4 _{ax} , H4 _{eq} , H5 _{ax} , H5 _{eq} , H6 _{eq} , H7	H4 _{ax} , H4 _{eq}
C4	30.1	H4 _{ax}	2.13 (m)	H3, H5 _{ax} , H5 _{eq} , H6 _{ax} , H6 _{eq}	H3 _{ax} , H4 _{eq} , H5 _{ax} , H5 _{eq}
–	–	H4 _{eq}	2.48 (m)	–	H3 _{ax} , H4 _{ax} , H5 _{ax} , H5 _{eq}
C5	24.0	H5 _{ax}	1.99 (m)	H3, H4 _{ax} , H4 _{eq} , H6 _{ax} , H6 _{eq}	H4 _{ax} , H4 _{eq} , H5 _{eq} , H6 _{ax} , H6 _{eq}
–	–	H5 _{eq}	2.10 (m)	–	H4 _{ax} , H4 _{eq} , H5 _{ax} , H6 _{ax} , H6 _{eq}
C6	57.2	H6 _{ax}	3.13 (ddd, 7.5, 9.1, 11.4)	H4 _{ax} , H4 _{eq} , H5 _{ax} , H5 _{eq} , H7	H5 _{ax} , H5 _{eq} , H6 _{eq}
–	–	H6 _{eq}	3.75 (ddd, 4.0, 7.6, 11.5)	–	H5 _{ax} , H5 _{eq} , H6 _{ax}
C7	41.4	H7	2.94 (s)	H3, H6 _{ax}	–

[a] Data in parentheses following the shift value are the multiplicity and J values (in Hz) for each hydrogen.

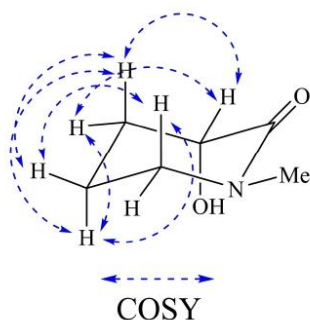


Figure 4. Key ^1H - ^1H COSY correlations of (3S)-(-)-3-hydroxy-1-methylpiperidin-2-one (**1a**).

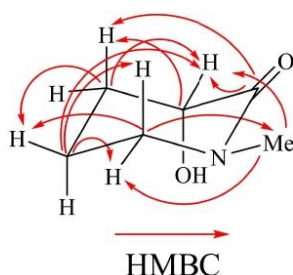


Figure 5. Key HMBC correlations of (3S)-(-)-3-hydroxy-1-methylpiperidin-2-one (**1a**).

simulated data for (S)-**1a** at the B3PW91/PCM(DMSO)/6-311G(d,p) level (Figure S26).

The synthetic pathway for 3-hydroxy-1-methylpiperidin-2-one (**1a**) from 3-acetoxy-1-methyl-2-piperidinone was first described in the literature in 2003. It was characterized by 200 MHz NMR, but the signals were listed as groups of multiplets with no specific assignments and missing hydrogens.¹⁴⁵

Structure elucidation of compound **2**

The exact mass of compound **2** was determined as being m/z 348.10971 $[\text{M}+1]^+$ (348.108327, calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{NO}_2$). ^1H NMR spectra of compound **2** were obtained in acetone- d_6 (Figure S17) and CDCl_3 (Figure S22). The ^1H NMR spectrum in acetone- d_6 showed three singlets at $\delta=14.38$, 9.11 and 8.90 ppm, but these signals are absent in the ^1H NMR spectrum in CDCl_3 . Hydrogen NMR spectra of acridones, in a deuterated polar solvent, are well known to present signals of hydroxyl protons, but those signals are weak or absent in deuterated less polar solvents.¹⁴⁶ A particular distinctive chemical shift is the signal at $\delta=14.38$ ppm. The deshielding of the hydrogen is due to strong intermolecular hydrogen bonding between the

hydroxyl (OH1) and the carbonyl, which is present in a wide range of acridones.¹⁴⁷ Hydrogen OH1 presents three cross peaks in HMBC (Figure S21) with carbons C9a at δ 105.5 ppm, C1 at δ 152.7 ppm and C2 at δ 130.8 ppm.

The infrared (IR) spectrum (Figure S24) presents a band at 1626 cm^{-1} , a lower wavenumber when compared with a regular ketone absorption at $1720\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$. The signal at $\delta=14.38$ ppm (^1H NMR) and the lower absorption frequency of the carbonyl at 1626 cm^{-1} suggests that compound **2** has a hydroxyl group at position 1 of an acridone alkaloid. This evidence and the preliminary results of the NMR, IR, and mass spectra led us to consider three possible candidate structures for the acridone alkaloid: **2a**, **2b** and **2c** (Figure 1).

The calculations of ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts for three candidate structures (**2a–2c**) with acetone solvation were performed at B3LYP/6-311 + G(2d,p)//M06-2X/6-31 + G(d,p) level of theory and compared with the unassigned experimental data. The chemical shifts were aligned and transferred to the web applet at <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/> which automatically performed the statistical DP4 analyses. The “goodness of fit” was performed by matching the experimental with the calculated NMR chemical shifts for **2a–2c**. Structure **2b** presented the best fit with the data of the natural product **2**, even without assignment of the signals.

NMR interpretation was carried out for the spectra obtained in acetone- d_6 . The carbonyl C9 was readily assigned to the signal at $\delta=182.6$ ppm in the ^{13}C NMR (Figure S18). The *N*-methyl C10' was assigned to the signal at $\delta=46.3$ ppm, which suggests that both *peri*-positions relative to this *N*-methyl moiety in the 9-acridone nucleus, C4 and C5, should be substituted.¹⁴⁸

The HMBC experiment was important to elucidate key aspects of the structure of compound **2**. A single correlation cross peak of C9 with a hydrogen in the aromatic region in the HMBC spectrum (Figure S21) resulted in the assignment of H8. H8 was assigned to the doublet ($J=8.8$ Hz) at δ 7.94 ppm in the ^1H NMR spectrum. The doublet at δ 6.95 ppm with coupling constant of 8.8 Hz was assigned to H7. H7 presented three correlations in the HMBC spectrum with signals at $\delta=118.0$, 137.2 and 156.9 ppm. The peak at $\delta=118.0$ ppm was assigned to C8a, because C8a and C9a are the most shielded non-hydrogenated carbons in acridones. C6 was assigned to the signal at $\delta=156.9$ ppm, which also presented correlation in the HMBC with H8. Finally, the signal at $\delta=137.2$ ppm was assigned to carbon C5. The singlet at $\delta=9.11$ ppm was assigned to OH6 (hydroxyl group) due to the cross peaks with carbons C5 and C7 in the HMBC spectrum. The signal at $\delta=143.4$ ppm was assigned to C10a due to the cross peak with H8 in the HMBC spectrum. Non-hydrogenated carbons C4a and C10a are more deshielded than C8a and C9a because C4a and C10a are bonded to the electronegative nitrogen atom, while C8a and C9a are bonded to sp^2 carbons.

The peaks at δ 113.4 and 123.2 ppm were assigned to C7 and C8 because of the correlations observed with H7 and H8 in the HSQC spectrum (Figure S20). Therefore, the sp^2 carbons and hydrogens from ring A of the acridone **2** were assigned.

The singlets at $\delta=3.79$, 3.83, 3.86 and 3.87 ppm were assigned to the *N*-methyl and methoxy groups.¹⁴⁷ The assign-

ment of the *N*-methyl (H10') group to the singlet signal was done with the aid of the correlations with C4a and C10a in the HMBC spectrum (Figure S21).

The signals at $\delta = 152.7$ and 152.4 ppm in the ^{13}C NMR were assigned to C1 and C3, respectively, because these atoms are deshielded by the electron withdrawing effect of the carbonyl compared to C2 and C4, which are shielded by the electron donating effect of the nitrogen.^[49] The HMBC spectrum presented correlations between C1/OH1 and C3/OH3, while C2 and C4 showed correlations with H2' and H4', respectively.

The calculated ^{13}C NMR spectra for candidate structures **2a–2c** and the experimental ^{13}C NMR spectrum of 1,3,6-trihydroxy-2,4,5-trimethoxy-10-methylacridin-9(10*H*)-one (**2b**) are presented in Figure 6.

Consistent with DP4 statistical analysis without assignment of the signals, the NMR interpretation confirmed candidate structure

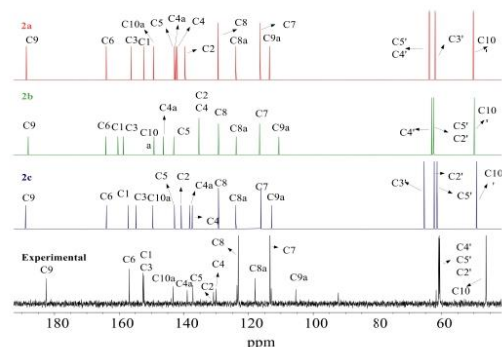


Figure 6. Calculated ^{13}C NMR spectra for candidate structures **2a–2c** and the experimental ^{13}C NMR spectrum of 1,3,6-trihydroxy-2,4,5-trimethoxy-10-methylacridin-9(10*H*)-one (**2b**).

Table 2. NMR data of natural product **2**: Experimental (δ_{exp}) chemical shifts, multiplicities (m), coupling constants (*J*) and HMBC cross correlations.

Label	δ_{exp} [ppm]	Label	δ_{exp} [ppm] ^[a]	HMBC
C1	152.7	OH1	14.38 (s)	OH1
C2	130.8	–	–	OH1, H2'
C2'	60.6	H2'	3.87 (s)	–
C3	152.4	OH3	8.90 (s)	OH3
C4	130.0	–	–	OH3, H4'
C4'	61.0	H4'	3.83 (s)	–
C4a	139.0	–	–	H10'
C5	137.2	–	–	H5', H6, H7
C5'	60.8	H5'	3.86 (s)	–
C6	156.9	OH6	9.11 (s)	H7, H8
C7	113.4	H7	6.95 (d, 8.8 Hz)	OH6
C8	123.2	H8	7.94 (d, 8.8 Hz)	–
C8a	118.0	–	–	H7
C9	182.6	–	–	OH1
C9a	105.4	–	–	OH1
C10'	46.3	H10'	3.75 (s)	–
C10a	143.3	–	–	H8, H10'

[a] Data in parentheses following the shift value are the multiplicity and *J* values (in Hz) for each hydrogen.

2b as the correct structure for compound **2**. DP4 matching assigned the peaks at $\delta = 60.6$, 61.0 , and 60.8 ppm to C2', C4', and C5', respectively. Likewise, the signals at $\delta = 3.87$, 3.83 , and 3.86 ppm were assigned to H2', H4', and H5', respectively.

The assigned ^1H and ^{13}C NMR signals and HMBC correlations for compound **2** are shown in Table 2. Some key HMBC correlations for compound **2** are shown in Figure 7.

Conclusion

Eleven compounds were isolated from the stem of *Conchocarpus mastigophorus*. The structures of the two natural products were established by the spectroscopic methods with the aid of theoretical calculations. The structure of compound **1** was determined as (3*S*)-(–)-3-hydroxy-1-methylpiperidin-2-one (**1a**). The structure of compound **2**, a novel natural product, was established as 1,3,6-trihydroxy-2,4,5-trimethoxy-10-methylacridin-9(10*H*)-one (**2b**). The potential of quantum mechanics calculations was explored as an important tool to elucidate the structure of natural products with complex NMR spectra.

Experimental Section

Plant material: *Conchocarpus mastigophorus* was collected at the farm “Alto da Caixa D’Água” (S13°71'804” W039°62'815”), Itamari, Bahia State (Brazil) and identified by Prof. Dr. José Rubens Pirani. A voucher (#HUESB 9559) is deposited in the Herbarium of Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (HUESB). Authors obtained authorization of access to Brazilian System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge - SISGEN (#A361C0C).

Extraction and isolation: The air-dried stem of *C. mastigophorus* (2195 g) was ground and extracted successively with hexane (4 L), ethyl acetate (4 L) and methanol (4 L). The filtrate was evaporated to dryness under reduced pressure in a rotatory evaporator, yielding 6.2 g hexane (HC), 6.7 g ethyl acetate (EAC) and 6.3 g methanol (MC) extracts. MC (1.2 g) was subjected to silica-gel column chromatography purification eluted with mixture of CHCl_3 :MeOH (20:80), to afford six fractions. Fraction 6 (71 mg) was purified by Sephadex® LH-20 column chromatography eluted with MeOH, to yield 35 mg of compound **1**. EAC (6.0 g) was subjected to

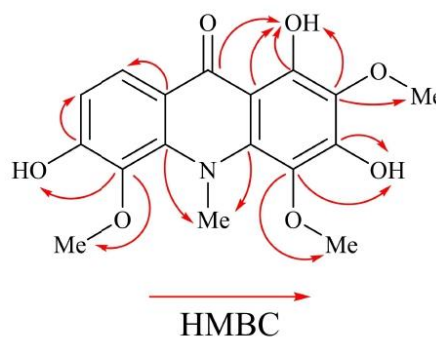


Figure 7. Key HMBC correlations of 1,3,6-trihydroxy-2,4,5-trimethoxy-10-methylacridin-9(10*H*)-one (**2b**).

silica-gel column chromatography purification eluted with mixtures of Hexane:AcOEt (100:0 to 0:100), followed by AcOEt:MeOH (100:0 to 0:100), to afford 23 fractions. Fraction 19 (390 mg) was purified by silica-gel column chromatography using the same solvent system, to yield 27 mg of a mixture of compounds **2** and **3** (~84:16), 26 mg of a mixture of compounds **4** and **5**, and 6.5 mg of a mixture of compounds **6** and **7**. Fraction 11 (249 mg) was purified by silica-gel column chromatography eluted with CH₂Cl₂, to yield compound **8** (22 mg). Fraction 13 (227 mg) was purified by successive partial solubilization in hexane, dichloromethane and acetone, resulting in three subfractions (13.1, 13.2 and 13.3). Subfraction 13.2 yielded compound **9** (16 mg). Fraction 9 (157 mg) was purified by silica-gel column chromatography eluted with mixture of hexane:CH₂Cl₂ (30:70) to yield 33 mg of a mixture of compounds **8** and **10**. Fraction 22 (125 mg) was purified by silica-gel column chromatography eluted with mixture of CH₂Cl₂:AcOEt:Acetone (60:20:20) to yield compound **11** (18 mg).

General: High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) analysis, by direct infusion, was performed on a mass spectrometer micrOTOF QII® (Bruker Daltonics, Germany), equipped with ionization source microESI (Electrospray), operating in positive mode. The sample was diluted in 100% acetonitrile and acidified with 0.1% formic acid (both LCMS grade, SIGMA ALDRICH), and introduced by an infusion pump (Kd Scientific, USA) at a flow rate of 3 µL/min. Column chromatography and thin layer chromatography (TLC) plates (0.5 mm in thickness) were prepared using silica gel 60 (63–200 µm) Merck and GF254 Vetec, respectively. Iodine fumes and UV light (254 and 365 nm) were employed to reveal TLC plates.

The mass spectra by electronic impact (70 eV) were recorded on a Shimadzu GCMS-QP5050A instrument. Infrared spectra were acquired in a PerkinElmer Spectrum Two™ ATR-FTIR spectrometer, using thin film solid method. Optical rotations were recorded on an Anton Paar MCP 300 polarimeter (Anton Paar, Ashland, Virginia, USA), at 23 °C and at 589 nm (Sodium D line). IR and VCD spectra were recorded with a Single-PEM ChiralIR-2X FT-VCD spectrometer (BioTools, Inc., USA) in a BaF₂ cell with 100 µm path length using DMSO-*d*₆ as solvent (5 mg of sample in 130 µL of solvent), with a resolution of 4 cm⁻¹ and a collection time of 20 h. The optimum retardation of the ZnSe photoelastic modulator (PEM) was set at 1400 cm⁻¹. Minor instrumental baseline offsets were eliminated from the final VCD spectra by subtracting their VCD data from that obtained for the solvent under identical conditions.

NMR spectral methods: NMR spectra of lactam **1** were obtained in a Bruker Biospin AVANCE III HD 600 MHz spectrometer. The chemical shifts were recorded in units δ in ppm and the scalar coupling constants (*J*) in Hz. The chemical shifts were referenced to residual CHD₂OD (δ = 3.31 ppm) in the ¹H NMR and CD₃OD (δ = 49.0 ppm) in the ¹³C NMR.

NMR spectra of the acridone **2** were obtained in a Varian Mercury 300 MHz spectrometer. The chemical shifts were referenced to residual (CD₃)CO(CHD₂) (δ = 2.05 ppm) or CHCl₃ (δ = 7.26 ppm) in the ¹H NMR and (CD₃)₂CO (δ = 29.8 ppm) or CDCl₃ (δ = 77.0 ppm) in the ¹³C NMR.

NMR spectra were obtained with temperature controlled at 25 °C during spectrum acquisition. The chemical shifts were recorded in units δ in ppm and the scalar coupling constants (*J*) in Hz.

Computational: The conformational searches were performed for each candidate structure (**1a–1d** and **2a–2c**) by using Maestro 2018-1 (Maestro version 11.5.011).^[50] The conformers were submitted to geometry optimization and frequency calculation at M06-2X/6-31+G(d,p) level of theory. Chemical shifts were obtained from the NMR shielding tensor values, which were computed for each candidate structure at B3LYP/6-311+G(2d,p) level in the software Gaussian 16.^[51]

The shielding tensor of all nuclei were converted into referenced chemical shifts by subtracting the computed shielding tensors of TMS calculated at the same level of theory (¹H = 31.8757; ¹³C = 184.0352). These operations were repeated for each candidate structure **1a–1d** and **2a–2c**. Solvation was addressed with integrated equation formalism polarized continuum model (IEFPCM)^[52] during optimizations/frequencies and shielding tensors calculations. A goodness-of-fit probability was determined using the DP4 method described by Goodman.^[53] DP4 analysis was accomplished by inputting computed and experimental chemical shifts into the DP4 Analysis tool (located at: <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>). IR and VCD calculations were performed for the arbitrarily chosen (3S)-**1a** at the B3PW91/PCM(DMSO)/6-311G(d,p) level, the same level of theory used for geometry optimization steps. IR and VCD spectra were created using dipole and rotational strengths from Gaussian and converted into molar absorptivities (M⁻¹cm⁻¹). Each spectrum was plotted as a sum of Lorentzian bands with half-widths at half-maximum of 6 cm⁻¹. The calculated wavenumbers were multiplied with a scaling factor of 0.97. The final spectra were generated using the Boltzmann average (based on Gibbs free energies) of the lowest-energy conformers identified for (3S)-**1a** and plotted using Origin 8 software.

Spectrometric data

(3S)-(-)-**3-hydroxy-1-methylpiperidin-2-one (1a)**: IR (thin film, cm⁻¹): 3350, 3051, 2842, 2678, 2605, 2213, 1602, 1469, 1396, 1320, 1182, 1106, 1024, 924, 845, 772, 574. EI 70 eV, *m/z* (%): 129 ([M]⁺, 5, C₉H₁₁NO₂), 85 (10), 84 (100), 82 (44), 80 (5), 70 (16), 69 (5), 68 (6), 67 (13), 57 (34), 56 (12), 55 (28), 54 (13), 53 (8). [α]_D²³ -0.021 (c 0.0483, methanol).

1,3,6-trihydroxy-2,4,5-trimethoxy-10-methylacridin-9(10H)-one (2b): IR (thin film, cm⁻¹): 3521, 3348, 2923, 1626, 1609, 1594, 1547, 1040. EI 70 eV, *m/z* (%): 347 ([M]⁺, 74, C₁₇H₁₈NO₇), 332 (100), 302 (14), 44 (25).

Acknowledgements

We are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2019/22319-5), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Rede Mineira de Química (RQ-MG), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Financial code 001) and Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias (SisNANO)/Ministério da Ciência, Tecnologia e Informação (MCTI) for financial support. Also, to the Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) of the Universidade Federal de Viçosa (UFV) for providing the facilities for the conduction of the experiments and data analysis. This research was also supported by resources supplied by the Centre for Scientific Computing (NCC/GridUNESP) of São Paulo State University (UNESP).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available in the supplementary material of this article.

Keywords: acridone alkaloid · DFT · DP4 · piperidone · theoretical calculation

- [1] A. Lu, T. Wang, H. Hui, X. Wei, W. Cui, C. Zhou, H. Li, Z. Wang, J. Guo, D. Ma, Q. Wang, *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 2148–2156.
- [2] M. Colli-Silva, J. R. Pirani, *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* **2019**, *251*, 77–87.
- [3] J. R. Pirani, "Conchocarpus," can be found under <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB471>, **2015**.
- [4] D. A. Garcia Cortez, L. E. Ranieri Cortez, J. B. Fernandes, P. C. Vieira, A. G. Ferreira, M. Fátima das G. F. da Silva, *Heterocycles* **2009**, *78*, 2053.
- [5] R. S. Cabral, M. C. Sartori, I. Cordeiro, C. L. Queiroga, M. N. Eberlin, J. H. G. Lago, P. R. H. Moreno, M. C. M. Young, *Braz. J. Pharmacogn.* **2012**, *22*, 374–380.
- [6] B. S. Bellele, I. C. G. de Sá, J. Mafezoli, C. do N. Cerqueira, M. F. das G. F. da Silva, J. B. Fernandes, P. C. Vieira, J. Zukerman-Schpector, J. R. Pirani, *Quim. Nova* **2012**, *35*, 2132–2138.
- [7] L. S. S. De Oliveira, M. F. De Araújo, R. Braz-Filho, I. J. C. Vieira, *Rev. Virtual Quim.* **2016**, *8*, 87–96.
- [8] M. Groppo, I. V. G. Costa, C. P. Bruniera, C. Ferreira, L. Afonso, H. M. Maeoka, F. V. Dutra, E. C. Gasparino, P. D. L. Ferreira, *Phytotaxa* **2019**, *422*, 75–92.
- [9] J. P. Michael, in *Alkaloids Chem. Biol.*, Elsevier Ltd, **2017**, pp. 1–108.
- [10] A. R. P. Ambrozini, J. Mafezoli, P. C. Vieira, J. B. Fernandes, M. F. das G. F. da Silva, J. A. Ellena, S. de Albuquerque, *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 434–439.
- [11] P. C. Vieira, I. Kubo, H. Kujime, Y. Yamagiwa, T. Kamikawa, *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1112–1117.
- [12] J. A. Kallunki, J. R. Pirani, *Kew Bull.* **1998**, *53*, 257.
- [13] C. Poleselli Bruniera, J. A. Kallunki, M. Groppo, *PLoS One* **2015**, *10*, e0125650.
- [14] C. S. Sepulveda, M. L. Fascio, C. C. Garcia, N. B. D'Accorso, E. B. Damonte, *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 2402–2414.
- [15] J. C. Matasyoh, F. M. Talontsi, R. M. Ngoumfo, R. Chepkorir, *Nat. Prod. J.* **2011**, *1*, 121–124.
- [16] W. Y. Teng, Y. L. Huang, C. C. Shen, R. L. Huang, R. S. Chung, C. C. Chen, *J. Chin. Chem. Soc.* **2005**, *52*, 1253–1255.
- [17] D. Naidoo, P. H. Coombes, D. A. Mulholland, N. R. Crouch, A. J. J. Van Den Bergh, *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1724–1728.
- [18] C. Chansriyom, N. Ruangrungrui, V. Lipipun, T. Kumamoto, T. Ishikawa, *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 1246–1250.
- [19] R. P. Severino, R. V. C. Guido, E. F. Marques, D. Brömme, M. F. D. G. F. Da Silva, J. B. Fernandes, A. D. Andricopulo, P. C. Vieira, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1477–1481.
- [20] R. S. A. Cabral, P. M. Allard, L. Marcourt, M. C. M. Young, E. F. Queiroz, J. L. Wolfender, *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 2270–2278.
- [21] A. R. P. Ambrozini, P. C. Vieira, J. B. Fernandes, M. F. das G. F. da Silva, S. de Albuquerque, *Quim. Nova* **2008**, *31*, 740–743.
- [22] R. Gaynes, *Emerging Infect. Dis.* **2017**, *23*, 849–853.
- [23] J. Caruano, G. G. Muccioli, R. Robiette, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 10134–10156.
- [24] E. M. Yimer, H. Z. Hishe, K. B. Tuem, *Front. Neurol. Neurosci.* **2019**, *13*, 2260–2271.
- [25] S. Alagar Yadav, S. Ramalingam, A. Jabamalai Raj, R. Subban, *J. Complement. Integr. Med.* **2015**, *12*, 2197.
- [26] Y. Y. Syed, *Drugs* **2017**, *77*, 1473–1480.
- [27] R. Listro, G. Rossino, S. Della Volpe, R. Stabile, M. Boiocchi, L. Malavasi, D. Rossi, S. Collina, *Molecules* **2020**, *25*.
- [28] W. D. F. Venter, M. Moorhouse, S. Sokhela, L. Fairlie, N. Mashabane, M. Masenya, C. Serenata, G. Akpomemie, A. Qavi, N. Chandiwana, S. Norris, M. Chersich, P. Clayden, E. Abrams, N. Arulappan, A. Vos, K. McCann, B. Simmons, A. Hill, *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 803–815.
- [29] S. Wang, X. Han, Y. Yang, C. Zhou, D. Luo, W. He, Q. Zhu, Y. Xu, *Bioorg. Chem.* **2020**, *100*, 103886.
- [30] G. Lauro, P. Das, R. Riccio, D. S. Reddy, G. Bifulco, *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 3297–3306.
- [31] B. N. S. Pinto, M. G. Teixeira, E. S. Alvarenga, *Magn. Reson. Chem.* **2020**, *58*, 559–565.
- [32] L. M. O. S. Martins, J. O. Santos, T. Hoye, E. S. Alvarenga, *Magn. Reson. Chem.* **2021**, mrc.5195.
- [33] K. B. A. Torrent, E. S. Alvarenga, *Molecules* **2021**, *26*, 1923.
- [34] V. M. T. Carneiro, A. R. Aguiar, E. S. Alvarenga, *J. Mol. Struct.* **2020**, *1212*, 128157.
- [35] R. P. Oliveira, A. J. Demuner, E. S. Alvarenga, L. C. A. Barbosa, T. de Melo Silva, *J. Mol. Struct.* **2018**, *1152*, 337–343.
- [36] G. M. Cragg, P. G. Grothaus, D. J. Newman, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3012–3043.
- [37] M. Ju-ichi, H. Kaga, M. Muraguchi, M. Inoue, I. Kajiura, M. Omura, H. Furukawa, *Heterocycles* **1988**, *27*, 2197–2200.
- [38] H. Paulini, R. Waibel, O. Schimmer, *Mutat. Res. Lett.* **1989**, *227*, 179–186.
- [39] M. M. Isidoro, M. F. das G. F. da Silva, J. B. Fernandes, P. C. Vieira, A. C. Arruda, S. da C. Silva, *Quim. Nova* **2012**, *35*, 2119–2124.
- [40] G. M. Coppola, A. D. Kahle, M. J. Shapiro, *Org. Magn. Reson.* **1981**, *17*, 242–245.
- [41] T. Wu, H. Furukawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 901–906.
- [42] H. Furukawa, T.-S. Wu, C.-S. Kuoh, *Heterocycles* **1982**, *19*, 273.
- [43] M. W. Biavatti, P. C. Vieira, M. F. das G. F. da Silva, J. B. Fernandes, S. R. Victor, F. C. Pagnocca, S. Albuquerque, I. Caracelli, J. Zukerman-Schpector, *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13*, 66–70.
- [44] A. N. L. Batista, F. M. dos Santos, A. L. Valverde, J. M. Batista, *Rev. Bras. Farmacogn.* **2021**, *31*, 612–624.
- [45] A. Kamal, K. V. Ramana, A. V. Ramana, A. H. Babu, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2587–2594.
- [46] T. Wu, C. Kuoh, H. Furukawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 895–900.
- [47] H. Chen, S. Lam, M. Yang, H. Hung, P. Shieh, F. Chen, P. Kuo, T. Wu, *J. Chin. Chem. Soc.* **2021**, *68*, 669–677.
- [48] Y.-Y. Yang, W. Yang, W.-J. Zuo, Y.-B. Zeng, S.-B. Liu, W.-L. Mei, H.-F. Dai, *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2013**, *15*, 899–904.
- [49] M. Aarjane, S. Slassi, A. Ghaleb, A. Amine, *J. Mol. Struct.* **2021**, *1231*, 129921.
- [50] Maestro, Schrödinger, *Schrödinger Release 2019*, LLC, New York, NY, **2019**.
- [51] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, D. J. Fox, *Gaussian 16, Revision C.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2016**.
- [52] J. Tomasi, B. Mennucci, E. Cancès, *J. Mol. Struct.* **1999**, *464*, 211–226.
- [53] S. G. Smith, J. A. Channon, I. Paterson, J. M. Goodman, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6437–6444.

Manuscript received: April 5, 2022
 Revised manuscript received: May 4, 2022
 Accepted manuscript online: May 5, 2022
 Version of record online: May 20, 2022