

ATRIBUIÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DO ALCALÓIDE CICLOPEPTÍDICO DISCARINA-B POR TÉCNICAS DE RMN DE 1D E 2D

 Emília Carolina Machado, Nilo Zanatta e Ademir Farias Morel*
 Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Maria - RS

Recebido em 16/3/92; cópia revisada em 5/5/93

^1H - and ^{13}C -Chemical shifts assignment of the cyclopeptide alkaloid discarine-B was done based on 2D-NMR experiments such as ^1H x ^1H -COSY and ^1H x ^{13}C -COSY. This work intends to be a guide for future identification of other kinds of structurally similar cyclopeptide alkaloids.

Keywords: cyclopeptide alkaloids; discarine-B; ^1H - and ^{13}C -chemical shifts assignment.

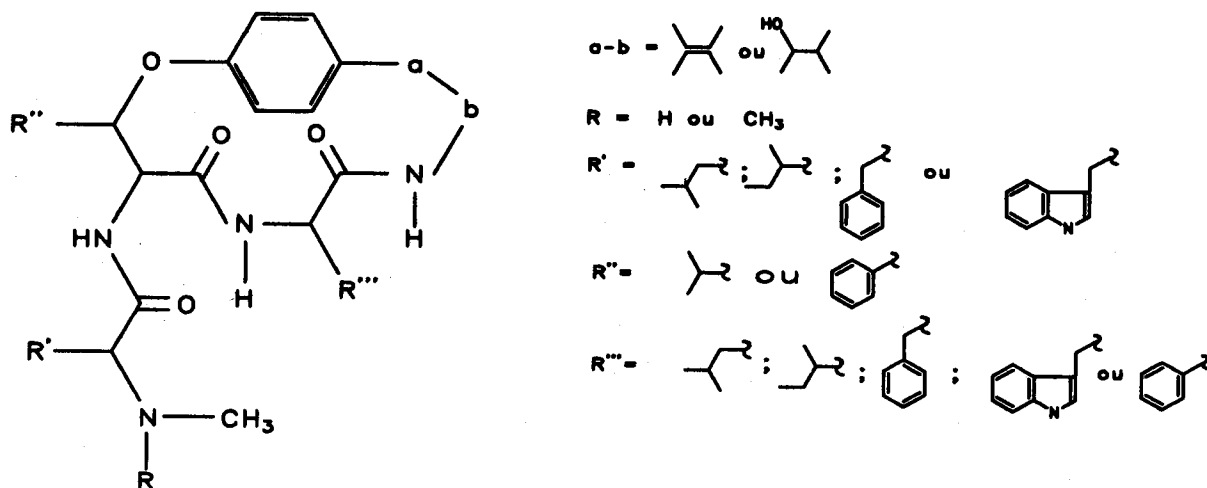
INTRODUÇÃO

Alcalóides ciclopeptídicos são bases poliamídicas encontradas em diversas famílias de plantas, principalmente em espécies pertencentes à família Rhamnaceae¹. Essas moléculas são constituídas por um macrociclo de 13, 14 ou 15 membros, nos quais fazem parte, geralmente, dois aminoácidos e um grupo estirilamina (Esquema 1).

Esses compostos despertaram considerável interesse pelas

diferentes ações farmacológicas associadas com muitos deles, incluindo atividades hipotensivas², anti-diarréicas e anti-disentéricas³, anti-fúngicas e anti-bióticas¹. Tais resultados têm incentivado o crescente número de investigações acerca desses compostos, como isolamento, determinações estruturais e síntese^{1,4,5}.

As plantas das quais esses alcalóides têm sido isolados são bastante utilizadas na medicina popular, em várias partes do mundo, há séculos⁶⁻⁹.



Esquema 1. Estrutura geral para alcalóides ciclopeptídicos de 14 membros.

Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C , encontrados na literatura, sobre esses compostos são limitados e as poucas tentativas de atribuições de sinais basearam-se, principalmente, em compostos modelos sintetizados¹⁰⁻¹³.

Neste trabalho, realizou-se um estudo mais atualizado de espectroscopia de RMN utilizando-se técnicas de 1-D e 2-D, com a finalidade de se obter atribuições corretas dos sinais dos núcleos de ^1H e ^{13}C de um alcalóide ciclopeptídico denominado discarina-B. Os resultados aqui mostrados poderão ser utilizados para auxiliar na atribuição de sinais e na determinação de outros compostos dessa classe.

RESULTADOS E DISCUSSÃO
RMN de ^1H

A Figura 1 mostra o espectro de RMN de ^1H (80 MHz) de discarina-B, cuja estrutura está representada no Esquema 2, com a respectiva numeração de seus átomos de carbono e indicação de unidades estruturais (I-VI) caracterizadas pelos deslocamentos químicos e sistemas de interação spin-spin.

Nesta figura, a região espectral compreendida entre 0,50 e 2,50 ppm apresenta os sinais dos prótons metílicos e de al-

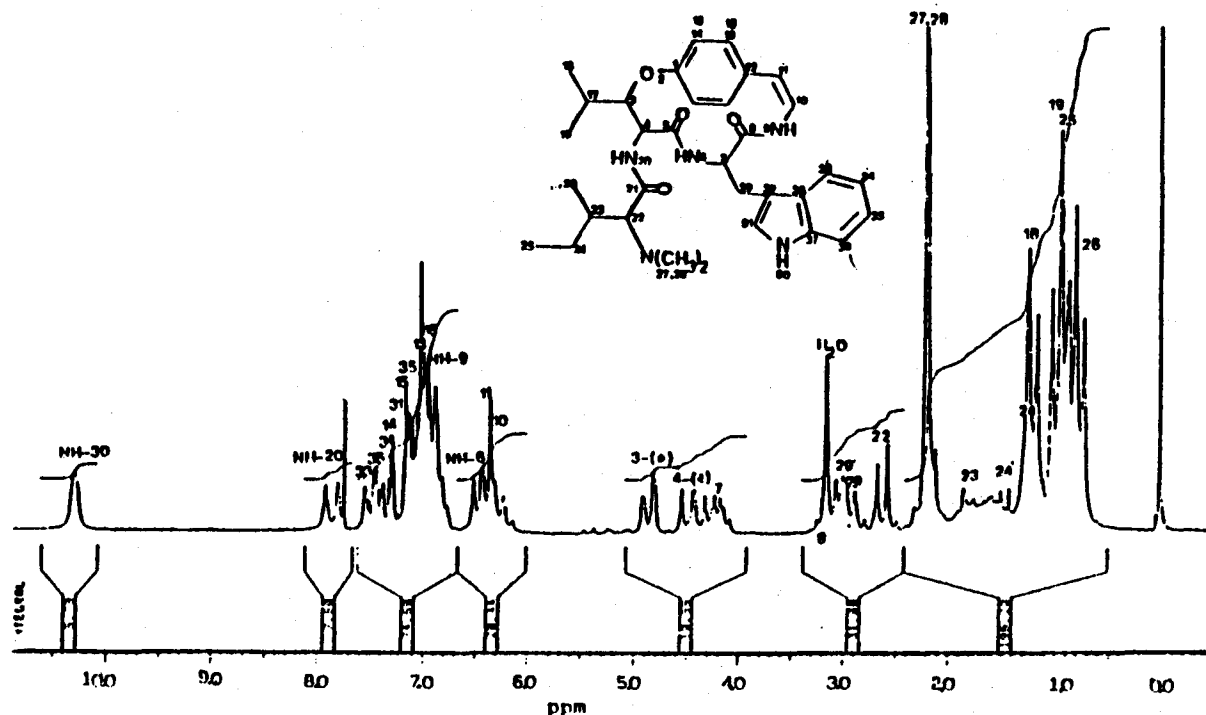


Figura 1. Espectro de RMN-¹H, de discarina-B em CDCl₃ + 10% DMSO-d₆, a 80 MHz.

guns dos prótons metilênicos e metínicos dos aminoácidos que compõem a molécula.

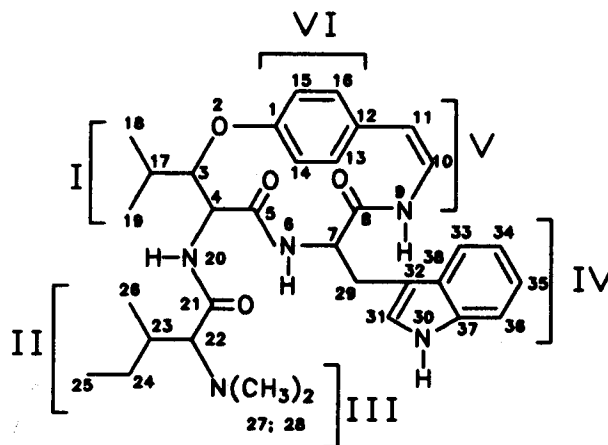
Os prótons metínicos α -carbonílicos (H-4, H-7 e H-22) correspondem aos sinais localizados entre $\delta = 2,50$ e $5,50$ ppm. Nesta região inclui-se também, o sinal referente ao próton β -carbonílico (H-3) da unidade β -hidroxi-leucina e, ainda, os prótons diastereotópicos H-29 e 29' β -carbonílicos da unidade triptofano, que correspondem aos sinais em $\delta = 2,90$ e $3,15$ ppm, respectivamente.

Os deslocamentos químicos compreendidos entre $\delta = 6,50$ a $10,60$ ppm apresentam os sinais correspondentes aos prótons NH-6, NH-9 e NH-20 das funções amídicas e ao próton indólico NH-30 do triptofano. Nessa região, observam-se também os sinais que correspondem aos prótons olefínicos do grupo enamina e aos prótons aromáticos das unidades estilamina e triptofano.

Pelo fato de não se ter observado acoplamentos entre os prótons amídicos de uma unidade de aminoácidos, com os prótons α -carbonílicos da unidade subsequente ($^4J_{H4-H6}$, $^4J_{H7-H9}$ e $^4J_{H22-H20}$), a estrutura de discarina-B pode ser considerada como possuindo seis unidades estruturais envolvendo diferentes sistemas de spins (I-VI). Um sistema de spins para cada aminoácido (I, II e IV), dois para o grupo estilamina (V-VI) e o último formado pelo grupo N-N-dimetila (III) (ver Esquema 2).

As atribuições de sinais, registrados no espectro unidimensional de RMN-¹H, de discarina-B, foram realizadas com contribuições de espectroscopia bidimensional de correlação homonuclear (¹H x ¹H-COSY), que revelou a interação spin-spin entre vários núcleos de prótons, permitindo atribuições inequívocas (Tabela 1).

Para a atribuição dos prótons de cada sistema de spins é necessário encontrar um sinal de atribuição inequívoca, para servir como ponto de partida para a atribuição dos demais prótons do mesmo sistema de spins. De longe, o caso mais difícil é a atribuição dos três aminoácidos. Para encontrar o sinal de partida para a atribuição dos aminoácidos utilizaram-se as diferentes velocidades de troca dos prótons amídicos. Haslinger¹⁴ constatou que, pela adição de D₂O, o NH-20 troca



Esquema 2. Estrutura e sistema de spins (I-IV) de discarina-B.

numa velocidade muito superior à dos outros dois prótons amídicos. O NH-20 ($\delta = 7,90$ ppm) foi, então, o sinal de partida para encontrar os demais deslocamentos químicos dos prótons do hidroxi-aminoácido (sistema de spins I), conforme demonstrado na Figura 2 pelos sinais transversais de NH-20 e H-4 ($4,50$ ppm), H-4 e H-3 ($4,90$ ppm), H-3 e H-17 ($2,20$ ppm, superposto com o sinal do NMe₂) e do H-17 e 3H-18 ($1,20$ ppm) e 3H-19 ($1,03$ ppm).

O sinal de partida para a atribuição dos deslocamentos químicos dos prótons do aminoácido triptofano representa o hidrogênio indólico observado a $10,50$ ppm. Esse próton apresenta quatro sinais transversais (em relação à diagonal): dois mais intenso, com o sinal a $7,15$ ppm, atribuído ao H-31 (3J), e os dois restantes, com o sinal a $7,40$ ppm, que foi atribuído ao H-36 (4J). Os sinais dos prótons metilênicos β -carbonílicos H-29 e H-29' ($2,90$ e $3,15$ ppm) foram atribuídos pelo acoplamento de longa distância ($^4J_{HH}$) com H-31. Estes prótons metilênicos

Tabela 1. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (ppm com relação ao TMS) e constantes de acoplamento (J_{HH}) de discarina-B.^a

Posição	Identificação	δH [ppm] $J(\text{Hz})$	δC [ppm]	δ
1	- <u>C</u> (Ar)		156,0	156,1
3	- <u>CH</u> -O	4,90 (dd) $J_{3,17} = 1,5; J_{3,4} = 8,0$	81,4	82,4
4	-NH- <u>CH</u> -CO-	4,52 (dd) $J_{4,3} = 8,0; J_{4,20} = 9,5$	54,2	55,5
5	-CO		171,0	171,2
6	-OC- <u>NH</u> -CH-	6,50 (d) $J_{6,7} = 6,5$		
7	-NH- <u>CH</u> -CO-	4,20 (m)	53,0	54,1
8	-CO-		167,6	167,7
9	-CO- <u>NH</u> -CH-	6,85 (d) $J_{9,10} = 6,5$		
10	-NH- <u>CH</u> =CH-Ar	6,25 (dd) $J_{10,9} = 7,0; J_{10,11} = 7,9$	124,7	125,4
11	-NH-CH= <u>CH</u> -Ar	6,40 (d) $J_{11,10} = 7,9$	122,9	124,0
12	- <u>C</u> (Ar)		130,0	131,3
13 ^b	- <u>CH</u> (Ar)	6,88 (m)	129,7	129,8
14 ^b	- <u>CH</u> (Ar)	7,40 (m)	120,2	119,6
15 ^b	- <u>CH</u> (Ar)	7,14 (m)	119,1	121,0
16 ^b	- <u>CH</u> (Ar)	6,92 (m)	128,4	131,3
17	- <u>CH</u> -	2,20 (m)	27,3	27,5
18	- <u>CH</u> ₃ -CH-	1,21 (d) $J_{18,17} = 6,5$	13,9	14,4
19	- <u>CH</u> ₃ -CH-	1,03 (d) $J_{19,17} = 6,5$	21,3	20,1
20	-CH- <u>NH</u> -CO-	7,85 (d) $J_{20,4} = 9,5$		
21	-CO-		171,3	172,1
22	-(CH ₃) ₂ N- <u>CH</u> -CO-	2,62 (d) $J_{22,23} = 7,6$	71,5	73,9
23	-CH ₃ - <u>CH</u> -CH ₂ -	1,85 (m)	32,8	34,6
24;24'	-CH ₃ - <u>CH</u> ₂ -CH-	1,21;1,52 (m)	26,51	27,3
25	- <u>CH</u> ₃ -CH ₂ -	0,90 (t) $J_{25,24} = 6,5$	10,0	12,2
26	- <u>CH</u> ₃ -CH-	0,75 (d) $J_{26,23} = 6,5$	13,8	14,8
27;28	-N(CH ₃) ₂	2,20 (s)	40,7	42,7
29;29'	- <u>CH</u> ₂ (Indol)	2,90;3,15 (m)	24,8	27,3
30	- <u>NH</u> (Indol)	10,25 (s)		
31	- <u>CH</u> (Indol)	7,15 (s)	120,2	122,1
32	- <u>C</u> (Indol)		107,6	109,2
33	- <u>CH</u> (Indol)	7,53 (d)	117,5	118,5
34 ^c	- <u>CH</u> (Indol)	7,28 (m)	122,9	119,6
35 ^c	- <u>CH</u> (Indol)	7,44 (m)	117,5	122,1
36	- <u>CH</u> (Indol)	7,46 (m)	110,2	110,0
37	- <u>C</u> (Indol)		135,0	136,4
37	- <u>C</u> (Indol)		126,1	127,0

^a Valores confirmados por experimentos ^1H x ^1H -COSY, ^1H x ^{13}C -COSY e DEPT com $\theta = 135^\circ$ e 90° .

^b As ressonâncias de ^1H e ^{13}C , devido a sobreposição de sinais, não foram atribuídos com certeza.

^c Os valores de ^{13}C podem estar trocados.

^d Valores obtidos da Ref. 10.

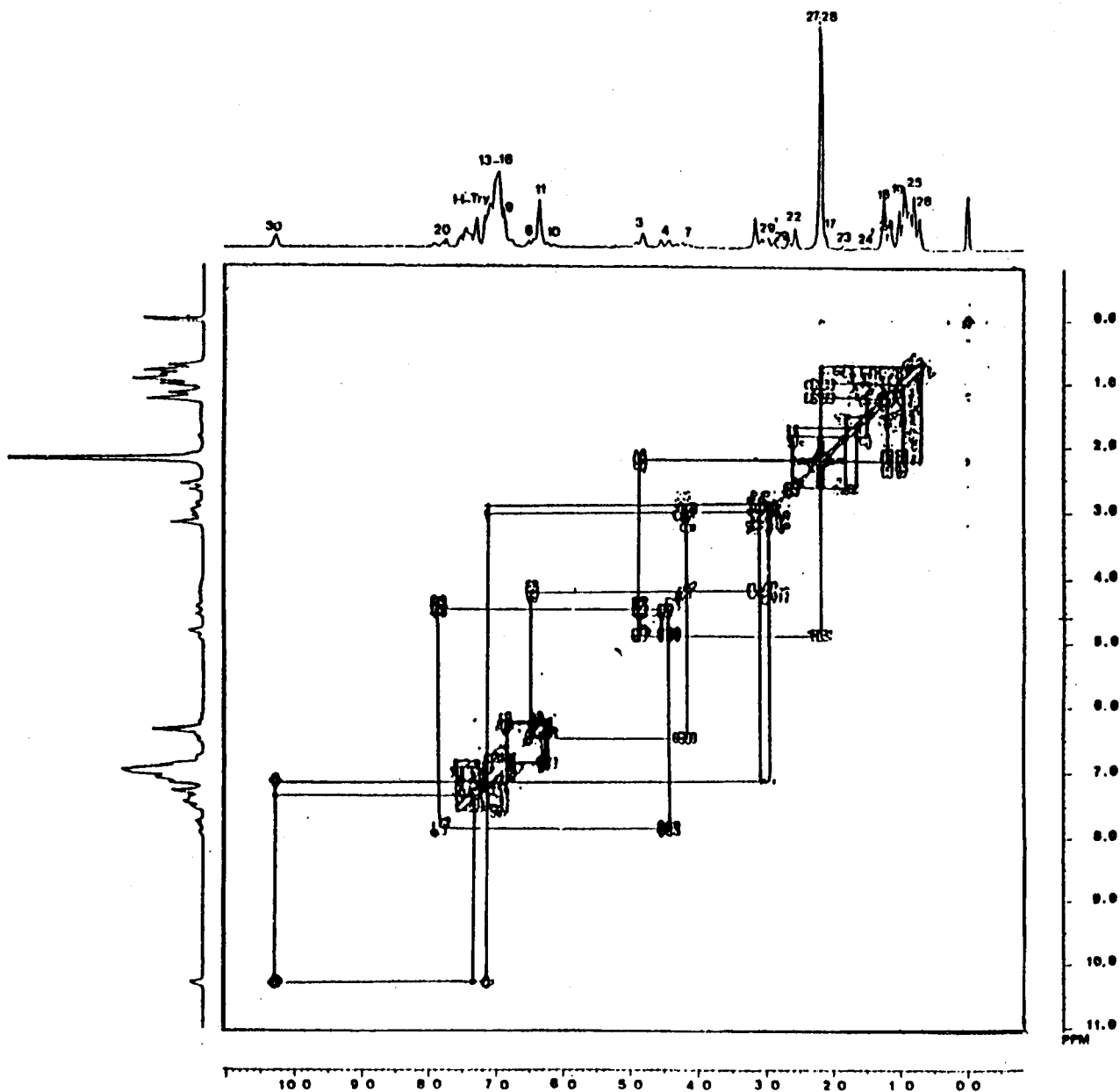


Figura 2. Espectro de RMN-2D, correlação ^1H - ^1H (*cosy*-45°), de discarina-B, em CDCl_3 + 10% $\text{DMSO}-d_6$, a 80 MHz.

H-29 e H-29' apresentam sinais transversais com o H-7 (4,20 ppm) e este com o sinal a 6,50 ppm atribuído ao NH-6.

Para a atribuição dos sinais da unidade N,N-dimetilisoleucina (sistema de spins II), os sinais dos prótons metilênicos γ -carbonílicos, H-24 e H-24', foram utilizados como ponto de partida para a identificação dos deslocamentos químicos dos demais prótons dessa unidade. Esses prótons foram atribuídos através do espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (Fig. 2). Eles absorvem em 1,20 e 1,40 ppm e apresentam sinais transversais que caracterizam interações entre si, e cada um deles com a metila 25 (0,90 ppm) e com H-23 (1,85 ppm) e este, por sua vez, com a metila 26 (0,750 ppm) e com H-22 (2,60 ppm). Os sinais dos prótons da unidade estirilamina (sistema de spin V) foram atribuídos pelos seus deslocamentos químicos e pela observação dos sinais transversais do H-10 (6,20 ppm) com o H-11 (6,40 ppm) e o NH-9 (6,80 ppm) mostrados na Figura 2.

No anel aromático da unidade estirilamina (sistema de spin VI), embora *p*-substituído, o H-13 não é quimicamente equivalente ao H-16, assim como H-14 não é equivalente ao H-15. Suas atribuições são grandemente dificultadas pela pequena dispersão de seus deslocamentos químicos e pela intensa sobreposição destes sinais com os prótons aromáticos do triptofano.

E, por último, o sinal do N,N-dimetil (sistema de spin III) é atribuído pela sua intensidade e deslocamento químico característico (2,20 ppm).

RMN de ^{13}C

Para atribuição dos sinais de ^{13}C do espectro apresentado na Figura 3a, foram utilizados experimentos de RMN ^{13}C DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com $\theta = 90^\circ$ (somente sinais de CH, Figura 3c) e $\theta = 135^\circ$

(CH₃ e CH em fase oposta do CH₂, Figura 3b: CH₃ e CH como sinais positivos e CH₂ como sinais negativos), e espectroscopia bidimensional de correlação heteronuclear ¹H x ¹³C-COSY-¹J_{CH} (Figura 4). Os deslocamentos químicos de ¹³C se encontram na Tabela 1.

O primeiro passo na atribuição de sinais dos espectros obtidos pela técnica DEPT, permitiu a análise das multiplicidades CH_n. Assim, o experimento DEPT com $\theta = 135^\circ$ (Fig. 3b), apresentou os sinais referentes a carbonos metínicos (CH) e metílicos (CH₃) registrados na fase positiva e dois sinais na fase negativa, que identificam os dois carbonos metilênicos (CH₂) presentes na estrutura de discarina-B. A distinção entre os sinais de carbonos primários (CH) e de terciários (CH₃),

foi realizada pela comparação com espectro do experimento DEPT com $\theta = 90^\circ$, que forneceu apenas os sinais de carbonos metínicos (CH) (Fig. 3c). Considerando que, no espectro DEPT com $\theta = 135^\circ$ não aparecem os sinais referentes aos carbonos não protonados (não são modulados) essa técnica possibilitou também a identificação dos sinais dos carbonos quaternários. Verificou-se assim, que por comparação com o espectro da Figura 3a, os cinco sinais do espectro de carbono-13 estão ausentes no DEPT com $\theta = 135^\circ$.

Embora os espectros DEPT sejam eficientes na identificação do número de prótons ligados a cada carbono da molécula, esse espectro não permite discernir os sinais decorrentes de carbonos com mesmo número de prótons. Assim, para uma

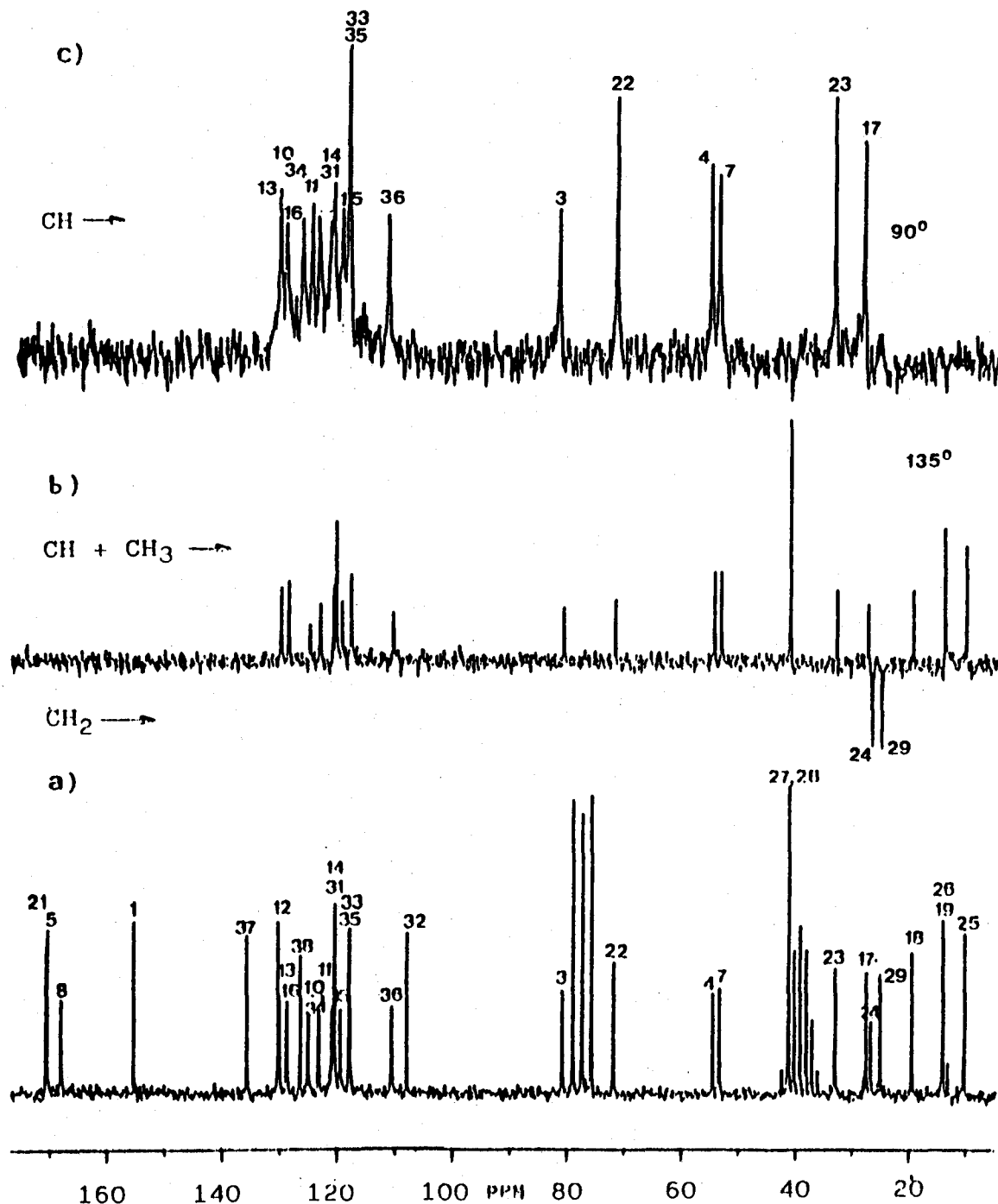


Figura 3. a) Espectro de RMN-¹³C de discarina-B (20 MHz) em CDCl₃ + 10% DMSO-d₆; b) Experimento DEPT-135°; c) Experimento DEPT-90°.

atribuição inequívoca dos sinais dos carbonos protonados, utilizou-se um experimento $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY (Figura 4). Nesse espectro, o eixo F2 (abscissa) representa o espectro de ^{13}C obtido através da projeção ao longo da matriz bidimensional e nesse espectro somente os carbonos protonados aparecem. O eixo F1 (ordenada) representa o espectro de prótons reconstruído através da projeção ao longo da matriz bidimensional.

Como o experimento foi registrado com desacoplamento nas duas dimensões, tanto o eixo F2 (^{13}C) como o eixo F1 (^1H) apresentam sinais de ^{13}C e ^1H totalmente desacoplados. Para facilitar a interpretação, plotou-se na Figura 4 o espectro 1D de RMN ^1H no eixo F1 (ordenada). No campo delimitado por esses dois eixos, aparecem sinais, em forma de estacas, cujas projeções sobre ambos os eixos unem carbonos e prótons que estão diretamente ligados. Os sinais alongados que aparecem neste espectro são devidos à baixa resolução no eixo F1, determinada por um número maior de experimentos menor que o ideal. O uso de um número maior de experimentos melhoraria a resolução do espectro com o conseqüente encurtamento dos contornos. No entanto, o longo tempo de acumulação ne-

cessário para atingir uma melhor resolução, devido a diluição da amostra e limitação do equipamento (baixo campo magnético), inviabilizaria o experimento. Contudo, mesmo havendo um alongamento excessivo dos contornos, no eixo F1, a resolução é suficiente para permitir a atribuição segura dos sinais. A inversão das ressonâncias entre os carbonos C-17 e C-24, observadas nos espectros da Figura 4 em relação ao espectro DEPT (Fig. 2b), deve-se provavelmente a parcial evaporação do CDCl_3 , devido ao longo tempo de acumulação exigido pelo experimento de 2D, e conseqüente aumento da concentração da amostra e enriquecimento do DMSO-d_6 na solução. Acreditamos, por isso, que esta inversão de sinais seja apenas efeito de solvente e não de mudança conformacional. Os deslocamentos químicos dos dois átomos de carbonos quaternários, do sistema aromático da unidade estilamina, foram atribuídos aos sinais a $\delta = 130,0$ ppm (C-12) e $\delta = 156,0$ ppm (C-1), com base nas posições de ressonância em anéis aromáticos *p*-substituídos desse tipo.

O sistema aromático da unidade triptofânica apresenta três átomos de carbonos quaternários, os quais foram primeiramente identificados no espectro totalmente desacoplado (BB). Es-

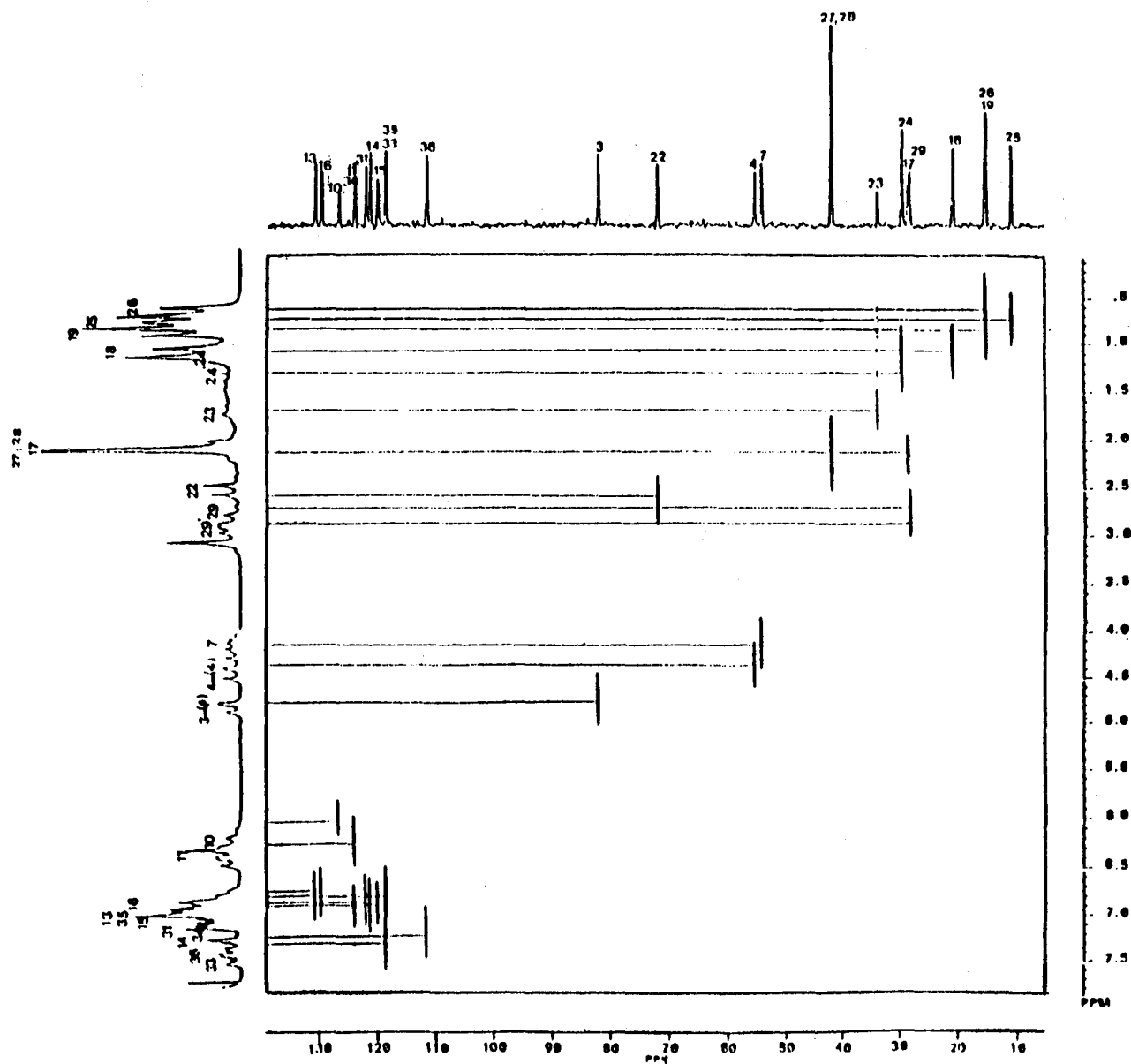


Figura 4. Espectro de RMN-2D, Correlação ^1H - ^{13}C de Discarina-B à 80 MHz/20 MHz em CDCl_3 + DMSO-d_6 .

ses sinais foram atribuídos, utilizando-se como modelo, os deslocamentos químicos do alcalóide gramina¹⁵, que apresenta o sistema indólico na sua estrutura.

Os sinais correspondentes aos carbonos das funções carbonílica apresentaram posições de ressonância a $\delta = 171,3$ ppm (C-21); 171,0 ppm (C-5) e 167,6 ppm (C-8) em concordância com os dados apresentados por E. Wenkert e col.¹⁰

EXPERIMENTAL

Isolamento e separação de discarina-B: 8 kg da casca da raiz de *Discaria americana* Gill & Hook (Quina do campo) foram secados a temperatura ambiente e moídos a fino grão, colocados em porções de 600 g em um extrator tipo Soxhlet e extraídos exaustivamente com metanol a quente. O solvente foi evaporado a vácuo, resultando em 1200 g de um resíduo viscoso escuro, que foi suspenso em água e acidificado a pH 2 com HCl 2 N. A fase ácida foi extraída com éter etílico (5 x 1 L) e a fase aquosa resultante basificada a pH 9 com solução de amoníaco, extraída com éter etílico (5 x 1 L) e após seca em sulfato de sódio, o solvente foi evaporado, obtendo-se 8,2 g (0,102%) de um sólido amarelo composto por uma mistura de alcalóides. Esta mistura foi cromatografada em coluna, utilizando-se sílica-H como suporte sólido e clorofórmio-metanol, a várias concentrações, como sistema eluente. A fração na qual foi identificada o alcalóide discarina-B foi recristalizada várias vezes em clorofórmio-éter etílico resultando em 85 mg do alcalóide puro, com ponto de fusão 247-249 °C.

Todos os espectros de RMN foram registrados em um espectrômetro Bruker AC 80A que opera a 80.13 MHz para prótons e 20.15 MHz para carbono-13, em tubos de 5 mm.

Os espectros de ¹H foram registrados com amostras de 0,148 M em CDCl₃ com gotas de DMSO-d₆ e 0,02% TMS foi utilizado como referência interna, 128 FIDs foram acumulados com 16 K de memória (resolução de 0,6 Hz/ponto), e espectros de 90° (4,5 μs), sem tempo espera entre pulsos.

Os espectros de carbono-13 desacoplados foram registrados em amostras 0,148 M em CDCl₃ com gotas de DMSO-d₆ e 0,02% de TMS foi adicionado como referência interna. Os parâmetros de aquisição foram os seguintes: pulsos de 30° (1,6 μs) 16K de memória, resolução de 0,3 Hz/ponto, tempo de espera entre pulsos de 1s e um total de 23.280 varreduras foram acumulados.

Os experimentos DEPT foi registrada usando-se os seguintes parâmetros: o tempo de espera D1 = 1s, D2 = 0,5.¹J_{CH} = 3,3 ms. O pulso de 90° (¹H) foi de 16,8 μs e 135° (¹H) de 25,2 μs. Todos os demais parâmetros de aquisição foram os mesmos do espectro de ¹³C.

A correlação homonuclear (¹H x ¹H-COSY) foi registrada com tempo de espera entre pulsos D1 = 1s, o pulso de 90° foi de 4,5 μs, 256 experimentos definem a resolução do domínio de tempo t₁ e 1024 pontos foram usados para definir o domí-

nio de tempo t₂. O pulso final de 45° foi usado para diminuir a intensidade dos sinais da diagonal.

A correlação heteronuclear (¹H x ¹³C-COSY) foi registrada usando-se desacoplamento em ambas as dimensões. Foi utilizado um tempo de reciclo, D1 = 1s, Δ = 0,5/¹J_{CH} = 3,5 ms e Δ₂ = 0,25/¹J_{CH} = 1,75 ms. A fase do pulso de 90° (¹H) foi de 16,8 μs e pulso de 90° (¹³C) foi de 4,8 μs. A região espectral no domínio de tempo t₂ (¹³C) foi de 6.024 Hz e o domínio de tempo t₁ (¹H) foi de 1.388 Hz; 4.096 pontos foi usado no domínio de tempo t₂ e 128 experimentos definem a resolução no domínio de tempo t₁ com um total de 1.200 transientes acumulados por experimento.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo auxílio financeiro e bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

1. Tschesche, R.; Kaussman, E.V.; "The Alkaloids", Vol. 15, Manske (ed). Academic Press, New York, N.Y., (1975), p. 165.
2. Tschesche, R.; Frohberg, E.; Fehlhaber, H. W.; *Ber.*, (1970), **103**, 2501.
3. Bertho, A.; Liang, W. S.; *Arch. Pharm.* (Weinheim), (1973), **271**, 273.
4. Schimidt, U.; Lieberknecht, A.; Bökens, H.; Griesser, H. J.; *J. Org. Chem.*, (1983), **48**, 2680.
5. Schimidt, U.; Lieberknecht, A.; Bökens, H.; Griesser, H. J.; *Liebigs. Ann. Chem.*, (1983), **48**, 1459.
6. Warnhoff, E. W.; *Fortsch. Chem. Org. Naturst.*, (1970), **28**, 162.
7. Marchand, J.; Rocchioli, F.; Pais, M.; Jarreau, F. X.; *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1972), 4699.
8. Warnhoff, E. W.; Ma, J. C. N.; Warnhoff, P. R.; *J. Am. Chem. Soc.*, (1965), **87**, 4198.
9. Tschesche, R.; Reutel, C.; *Tetrahedron Lett.*, (1968), 3817.
10. Pais, M.; Jarreau, F. X.; Sierra, M. G.; Mascaretti, O. A.; Ruveda, E. A.; Chang, C. J.; Hagaman, E. W.; Wenkert, E.; *Phytochemistry*, (1979), **18**, 1869.
11. Lagarias, J. C.; Yokoyama, W. M.; Bordnes, J.; Shik, W. C.; Klein, M. P.; Rapoport, H.; *J. Am. Chem. Soc.*, (1983), **105**, 1031.
12. Goff, D.; Lagarias, J. C.; Shik, W. C.; Klein, M. P.; Rapoport, H.; *J. Am. Chem. Soc.*, (1980), **45**, 4873.
13. Morel, A. F.; Bravo, R. V. F.; Reis, F. D. A. M.; Ruveda, E. A.; *Phytochemistry*, (1979), **18**, 473.
14. Haslinger, E.; *Tetrahedron*, (1978), **34**, 685.
15. Wenkert, E.; Bindra, J. S.; Cochrau, D. W.; Schell, F. M.; *Acc. Chem. Res.*, (1974), **7**, 46.