



Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Química  
Departamento de Química Orgânica

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

# ESTUDOS ESTRUTURAIS DE AGONISTAS DA ACETILCOLINA PELA ESPECTROSCOPIA DE RMN E CÁLCULOS TEÓRICOS

Julio Cesar Araujo da Silva

ALUNO

PROF. DR. ROBERTO RITTNER

ORIENTADOR

Campinas – SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNICAMP

Si38e	<p>Silva, Julio Cesar Araujo da. Estudos estruturais de agonistas da acetilcolina pela espectroscopia de RMN e cálculos teóricos / Julio Cesar Araujo da Silva. -- Campinas, SP: [s.n], 2008.</p> <p>Orientador: Roberto Rittner Neto.</p> <p>Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. Análise conformacional. 2. RMN. 3. Cálculos teóricos. 4. Agonistas da acetilcolina. I. Rittner Neto, Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	--

**Título em inglês:** Structural studies of acetylcholine agonists by NMR spectroscopy and theoretical calculations

**Palavras-chaves em inglês:** Conformational analysis, NMR, Theoretical Calculations, Acetylcholine agonists

**Área de concentração:** Química Orgânica

**Titulação:** Mestre em Química na área de Química Orgânica

**Banca examinadora:** Prof. Dr. Roberto Rittner Neto (orientador), Prof. Dr. Luis Carlos Dias (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Sergio Antonio Fernandes (UFV)

**Data de defesa:** 13/02/2008

“Sabemos bem que para quem se contenta em olhar a ciência de passagem a severidade que ela exige da parte de seus servidores, este impiedoso rigor que reclama no pormenor e no conjunto, esta rapidez que exige no inquérito, no juízo e no veredicto, têm alguma coisa de vertiginoso, de terrificante. O que assusta, particularmente, o nosso homem é que lhe peçam aí para dar o seu máximo e realizar o impossível, sem jamais receberem louvor nem distinção; mas somente esperar ouvir censuras ou severas reprimendas; pois o bem fazer é aqui a regra, errar deve ser apenas a exceção; e aqui, como em toda a parte, a regra guarda silêncio. (...) receia que o melhor da sua arte não possa ser útil a ninguém e lhe não dê a ele próprio nenhuma alegria, que metade da sua vida se lhe escoe entre os dedos no meio de mal-entendidos, que se lhe seja incessantemente necessário viver em uma preocupação, em um segredo, em uma retenção que lhe devorem inutilmente as forças! Quando, em vez disso, no luminoso e severo elemento da disciplina científica as possui a todas: então pode voar! Por que iria ele voltar a descer para a vasa destas águas turvas onde será condenado a nadar, a patinhar e perder a cor das suas asas? Não! É para nós muito difícil viver nestes méis insalubres: será culpa nossa se somos feitos para o ar, o ar puro, nós, rivais do raio de luz, e se o nosso sonho mais caro é andar como ele sobre partículas de éter, mas não fugindo ao sol, pelo contrário, subindo para ele! Não o podendo, façamos a única coisa que as nossas forças nos permitem: levemos a luz à terra, sejamos “a luz da terra”! Aqueles que não souberem aquecer-se e iluminar-se na nossa chama, que nos temam! Que importa que eles nos temam!”

(Friedrich Nietzsche em A Gaia Ciência)

À Cecília.

Sempre perto, ainda que distante...

Aos meus pais.

Por me guiarem na direção do conhecimento...

Aos seres de espírito livre...

Sou grato.

## Agradecimentos

- Aos colegas de laboratório. Os que já estavam quando eu cheguei e aos que chegaram quando eu já estava.
- Em especial gostaria de agradecer ao Paulinho pelas noites “tirando” dezenas de espectros; ao Lucas pela extrema paciência com minha ignorância computacional; à Jana e ao Chico pelas bem vindas correções no meu texto e pelos empréstimos de máquinas; e ao amigo de longa data Bitos (Fábio Valiante), como eu enxergaria as conformações espaciais sem suas “pacientes” explicações?
- Aos “caras da química”, de todos os anos e sexos.
- A Soninha e Sônia pelos espectros RMN.
- À Bel e a toda equipe da CPG-IQ.
- Ao IQ e à Unicamp por me acolherem em uma instituição de tamanha excelência acadêmica.
- À Capes e à Fapesp pelo financiamento da pesquisa.
- Ao professor Cláudio Tormena pelo compartilhamento de parte de seus extensos conhecimentos.
- Ao professor Roberto Rittner pela orientação, acolhimento em seu grupo de trabalho e paciência ao longo destes anos.

Julio Cesar Araujo da Silva

✉ juliocesar@iqm.unicamp.br

## Formação Acadêmica

Mestrado em Química Orgânica Unicamp – 2008

Bacharelado em Química Unicamp – 2005

Licenciatura Plena em Química Unicamp – 2000

## Formação Profissional

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)  
Professor Estagiário (regime PED) Campinas/SP  
2008

Colégio Guimarães Rosa  
Professor Ensino Médio Bragança Pta./SP  
2007-2008

Colégio Guimarães Rosa  
Professor Ensino Médio Itu/SP  
2006-2008

Colégio Integral  
Professor de Curso Pré-Vestibular Paulínia/SP  
2006 - 2006

Colégio Santanna  
Professor Ensino Médio / Fundamental Vinhedo/SP  
2003-2006

Colégio Anglo  
Professor Ensino Médio / Curso pré-vestibular Poços de Caldas/MG  
2002 - 2003

Colégio COC  
Professor Ensino Médio / Curso pré-vestibular Poços de Caldas/MG  
2002 - 2003

Colégio Litteratus  
Professor Ensino Médio Itatiba/SP  
2002

Colégio Atibaia  
Professor Ensino Médio / Curso pré-vestibular Atibaia/SP  
2001

Cursinho do Sindicato  
Professor Curso pré-vestibular Campinas/SP  
1999 – 2001

## RESUMO:

### ESTUDOS ESTRUTURAIS DE AGONISTAS DA ACETILCOLINA PELA ESPECTROSCOPIA DE RMN E CÁLCULOS TEÓRICOS.

Neste trabalho é apresentado o estudo conformacional dos agonistas muscarínicos da acetilcolina (ACh<sup>+</sup>): carbacol, metacolina e pilocarpina. O estudo baseou-se na análise das constantes de acoplamento  $^3J_{HH}$  e nos dados obtidos pelos cálculos teóricos *ab initio*. O comportamento conformacional destes compostos é descrito principalmente por apenas dois dos seus ângulos diedros. Os resultados dos cálculos teóricos realizados com o nível teórico B3LYP/6-311+G(d,p), bem como os dados experimentais, apontaram a conformação *gauche* como a predominante para todos os compostos estudados para o diedro responsável pela atividade farmacológica dos agonistas independente do solvente utilizado. Atribui-se a estabilização da forma *gauche* à interação eletrostática entre o átomo de nitrogênio positivamente carregado e o átomo de oxigênio da porção éster (OCH<sub>2</sub>). Os cálculos teóricos mostraram que os confôrmeros mais estáveis possuem uma distância N<sup>+</sup>/O menor. Em adição, estudos de NBO mostraram a importância das interações hiperconjugativas  $\sigma_{C5H5} \rightarrow \sigma^*_{C6N7}$  e  $\sigma_{C5H5} \rightarrow \sigma^*_{O4C5}$  na maior estabilização dos confôrmeros *gauche*. Os confôrmeros mais estáveis para cada composto são: acetilcolina, TG<sup>-</sup>; carbacol, AG<sup>+</sup>; metacolina, TG<sup>+</sup>; pilocarpina, TG<sup>+</sup>C.

## ABSTRACT:

### STUDIES OF MOLECULAR STRUCTURE OF ACETYLCHOLINE AGONISTS BY NMR SPECTROSCOPY AND THEORETICAL CALCULATIONS.

This work describes the conformational analysis of muscarine agonists of acetylcholine (ACh<sup>+</sup>): carbachol, metacholine and pilocarpine. It was performed from the analysis of <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> coupling constants and from *ab initio* theoretical calculations. Their conformational behavior is discussed taking into account the most important dihedral angles. Both the results from theoretical calculations at B3LYP/6-311+G(d,p) as the experimental data indicated that the *gauche* conformer is predominant, considering the dihedral angle which is responsible by their pharmacological activity regardless the solvent employed. The stabilization of the *gauche* conformer was ascribed to the electrostatic interaction between the positively charged nitrogen atom and the (OCH<sub>2</sub>) oxygen atom of the ester fragment. This was confirmed by the N<sup>+</sup>/O smaller distance for the most stable conformers. In addition, NBO data showed the relevant role of  $\sigma_{C5H5} \rightarrow \sigma^*_{C6N7}$  and  $\sigma_{C5H5} \rightarrow \sigma^*_{O4C5}$  hyperconjugative interactions of the *gauche* conformers. The most stable conformers for the above compounds are: : acetylcholine, TG<sup>-</sup>; carbachol, AG<sup>+</sup>; methacholine, TG<sup>+</sup>; pilocarpine, TG<sup>+</sup>C.

# ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE FIGURAS.....	xxi
LISTA DAS FIGURAS EM ANEXO.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. Acetilcolina e os receptores muscarínicos.....	3
1.2. Receptores Muscarínicos e agonistas da acetilcolina.....	4
1.3. Estudo conformacional.....	5
1.3.1. RMN e Estudo Conformacional.....	9
1.3.1.1. A constante de acoplamento indireta spin-spin.....	10
1.3.1.2. Acoplamento spin-spin $^3J(H,H)$ .....	12
1.3.1.3. Dependência angular das constantes de acoplamento spin-spin $^3J(H,H)$ .....	14
1.3.1.4. Influência das interações hiperconjugativas nas constantes de acoplamento spin-spin $^3J(H,H)$ .....	16
1.3.1.5. Influência do efeito de solvente nas constantes de acoplamento spin-spin $^3J(H,H)$ .....	17
1.3.2. Química computacional.....	18
1.3.2.1. Modelo e Método Teórico Utilizado.....	22
1.3.2.2. Conjunto de Bases.....	22
1.3.2.3. Natural Bond Orbital (NBO).....	23
2. OBJETIVOS.....	27
3. EXPERIMENTAL.....	31
3.1. RMN.....	31
3.2. Cálculos Teóricos.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Análise dos Espectros de RMN de $^1H$ .....	35
4.1.1. Acetilcolina.....	35
4.1.2. Carbacol.....	39

4.1.3. Metacolina.....	41
4.1.4. Pilocarpina.....	44
4.2. Análise de efeito de solvente.....	50
4.2.1. Acetilcolina.....	52
4.2.2. Carbacol.....	52
4.2.3. Metacolina.....	54
4.2.4. Pilocarpina.....	55
4.3. Estudo Teórico Computacional.....	56
4.3.1. Superfície de Energia Potencial: determinação dos mínimos.....	56
4.3.2. Otimização de geometria e cálculo de frequência.....	59
4.3.2.1. Acetilcolina.....	61
4.3.2.2. Carbacol e Metacolina.....	62
4.3.2.3. Pilocarpina.....	66
4.3.3. Cálculo de NBO.....	68
4.3.3.1. Carbacol.....	68
4.3.3.2. Metacolina.....	73
4.3.3.3. Pilocarpina.....	78
5. CONCLUSÃO.....	85
6. REFERÊNCIAS.....	87
ANEXOS .....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ da acetilcolina em $\text{D}_2\text{O}$	38
Tabela 2. Constantes de acoplamento para a acetilcolina em $\text{D}_2\text{O}$	38
Tabela 3. Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ do carbacol em $\text{D}_2\text{O}$	40
Tabela 4. Constantes de acoplamento para o carbacol em $\text{D}_2\text{O}$	40
Tabela 5. Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ da metacolina em $\text{D}_2\text{O}$	43
Tabela 6. Constantes de acoplamento para a metacolina em $\text{D}_2\text{O}$	43
Tabela 7. Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ da pilocarpina em $\text{D}_2\text{O}$	47
Tabela 8. Constantes de acoplamento para a pilocarpina em $\text{D}_2\text{O}$	48
Tabela 9. Momento de dipolo, constante dielétrica e viscosidade dos solventes utilizados	50
Tabela 10. Momento de dipolo do confôrmero mais estável de cada composto	51
Tabela 11. Constantes de acoplamento para a acetilcolina em diferentes solventes	52
Tabela 12. Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ do carbacol em diferentes solventes	53
Tabela 13. Constantes de acoplamento para o carbacol em diferentes solventes	53
Tabela 14. Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ da metacolina em diferentes solventes	54
Tabela 15. Constantes de acoplamento para a metacolina em diferentes solventes	54
Tabela 16. Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ da pilocarpina em diferentes solventes	55
Tabela 17. Constantes de acoplamento para a pilocarpina em diferentes solventes	55
Tabela 18. Ângulos diedros e energias relativas calculados dos confôrmeros mais estáveis da $\text{ACh}^+$ em solução	61
Tabela 19. Ângulos diedros e energias relativas calculados dos confôrmeros mais estáveis do carbacol	62
Tabela 20. Ângulos diedros e energias relativas calculados dos confôrmeros mais estáveis da metacolina	64
Tabela 21. Ângulos diedros e energias relativas calculados dos confôrmeros mais estáveis da pilocarpina	66
Tabela 22. Algumas importantes interações de orbitais calculadas para os principais confôrmeros do carbacol: ângulo $\text{C}_2\text{-O}_4\text{-C}_5\text{-C}_6$	69

Tabela 23. Algumas importantes interações de orbitais calculadas para os principais confôrmeros do carbacol: ângulo O <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> -N <sub>7</sub>	70
Tabela 24. Distâncias interatômicas N <sup>+</sup> /O calculadas para os confôrmeros mais estáveis do carbacol	72
Tabela 25. Algumas importantes interações de orbitais calculadas para os principais confôrmeros da metacolina: ângulo C <sub>2</sub> -O <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub>	73
Tabela 26. Algumas importantes interações de orbitais calculadas para os principais confôrmeros da metacolina: ângulo O <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>7</sub> -N <sub>8</sub>	75
Tabela 27. Distância interatômica N <sup>+</sup> /O calculadas para os confôrmeros mais estáveis da metacolina	76
Tabela 28. Algumas importantes interações de orbitais calculadas para os principais confôrmeros da pilocarpina: ângulo C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>8</sub>	78
Tabela 29. Algumas importantes interações de orbitais calculadas para os principais confôrmeros da pilocarpina: ângulo C <sub>7</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>10</sub>	79
Tabela 30. Algumas importantes interações de orbitais calculadas para os principais confôrmeros da pilocarpina: ângulo C <sub>8</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>11</sub>	80
Tabela 31. Distância interatômica N <sup>+</sup> /O calculadas para os confôrmeros mais estáveis da pilocarpina	81

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estruturas (a) acetilcolina, (b) carbacol, (c) metacolina e (d) pilocarpina.	5
<b>Figura 2.</b> Numeração dos átomos para definir os principais ângulos diedros dos agonistas. (A) X=NH <sub>2</sub> : carbacol; X=CH <sub>3</sub> : metacolina. (B) pilocarpina. Os demais átomos foram omitidos para efeito de clareza.	7
<b>Figura 3.</b> Especificação dos ângulos de torção de Klyne-Prelog.	8
<b>Figura 4.</b> Relação geral de Karplus: dependência de J em função do ângulo diedro.	15
<b>Figura 5.</b> Espectro experimental de RMN de <sup>1</sup> H a 500MHz para a ACh <sup>+</sup> em D <sub>2</sub> O.	36
<b>Figura 6.</b> Parâmetros N e L determinados a partir do sinal do espectro de RMN de hidrogênio.	36
<b>Figura 7.</b> Espectro experimental de RMN de <sup>1</sup> H a 500MHz para o carbacol em D <sub>2</sub> O.	39
<b>Figura 8.</b> Espectro experimental de RMN de <sup>1</sup> H a 500MHz para a metacolina em D <sub>2</sub> O. Os hidrogênios 6 (3,7 ppm) e 6' (3,52 ppm) são distinguíveis.	43
<b>Figura 9.</b> Espectro experimental de RMN de <sup>1</sup> H a 500MHz para a pilocarpina em D <sub>2</sub> O.	47
<b>Figura 10.</b> Acetilcolina: (A) superfície de energia potencial; (B) mapa de contorno indicando as estruturas de mínimos locais.	57
<b>Figura 11.</b> Carbacol: (A) superfície de energia potencial; (B) mapa de contorno indicando as estruturas de mínimos locais.	57
<b>Figura 12.</b> Metacolina: (A) superfície de energia potencial; (B) mapa de contorno indicando as estruturas de mínimos locais.	58
<b>Figura 13.</b> Pilocarpina: (A) superfície de energia potencial; (B) mapa de contorno indicando as estruturas de mínimos locais.	58
<b>Figura 14.</b> Estruturas dos confôrmeros de menor energia do carbacol.	63
<b>Figura 15.</b> Estruturas dos confôrmeros de menor energia da metacolina.	65
<b>Figura 16.</b> Estruturas dos confôrmeros de menor energia da pilocarpina.	67

## LISTA DE FIGURAS EM ANEXO

<b>Figura 1.1:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da acetilcolina com integração dos sinais.	91
<b>Figura 1.2:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do carbacol com integração dos sinais.	92
<b>Figura 1.3:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da metacolina com integração dos sinais.	93
<b>Figura 1.4:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da pilocarpina com integração dos sinais.	94
<b>Figura 2.1:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do carbacol em acetonitrila deuterada.	97
<b>Figura 2.2:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do carbacol em clorofórmio deuterado.	98
<b>Figura 2.3:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do carbacol em DMSO deuterado.	99
<b>Figura 2.4:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do carbacol em metanol deuterado.	100
<b>Figura 2.5:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do carbacol em solução tampão aquosa deuterada.	101
<b>Figura 2.6:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da metacolina em acetona deuterada.	102
<b>Figura 2.7:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da metacolina em acetonitrila deuterada	103
<b>Figura 2.8:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da metacolina em clorofórmio deuterado	104
<b>Figura 2.9:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da metacolina em diclorometano deuterado.	105
<b>Figura 2.10:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da metacolina em DMSO deuterado.	106
<b>Figura 2.11:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da metacolina em metanol deuterado.	107
<b>Figura 2.12:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da metacolina em tampão aquoso deuterado.	108
<b>Figura 2.13:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da pilocarpina em acetona deuterada.	109
<b>Figura 2.14:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da pilocarpina em acetonitrila deuterada.	110
<b>Figura 2.15:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da pilocarpina em clorofórmio deuterado.	111
<b>Figura 2.16:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da pilocarpina em diclorometano deuterado.	112
<b>Figura 2.17:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da pilocarpina em DMSO deuterado.	113
<b>Figura 2.18:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da pilocarpina em metanol deuterado.	114
<b>Figura 2.19:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da pilocarpina em tampão aquoso deuterado.	115
<b>Figura 3.1:</b> Mapa de contorno de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) da metacolina em $\text{D}_2\text{O}$ deuterado.	119

<b>Figura 3.2:</b> Mapa de contorno de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) da metacolina em $\text{D}_2\text{O}$ deuterado.	120
<b>Figura 3.3:</b> Mapa de contorno de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) da pilocarpina em $\text{D}_2\text{O}$ deuterado.	121
<b>Figura 3.4:</b> Mapa de contorno de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) da pilocarpina em $\text{D}_2\text{O}$ deuterado.	122

## Capítulo 1

### INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

Certamente a determinação da estrutura de um dado neurotransmissor isolado das interações que ocorrem durante seu encontro com as moléculas do neurorreceptor não é suficiente para descrever o mecanismo de ligação neurotransmissor-neurorreceptor e, portanto, sua atividade biológica. Contudo, o estudo de sua conformação espacial e de seu comportamento em diferentes solventes justifica-se na medida em que permite mapear separadamente importantes interações que também estão presentes em um sistema biológico, como, por exemplo, as eletrostáticas e hiperconjugativas. Estudar separadamente os neurotransmissores também permite mapear tendências que poderão ser consideradas quando do estudo das interações neurotransmissor-neurorreceptor, já que em um sistema biológico as interações que ocorrem não são de natureza diferente das de um sistema isolado, as diferentes interações se somam ao longo do processo, mas certamente as tendências se mantêm. A necessidade deste estudo leva a uma das questões mais fundamentais em química: aprofundar cada vez mais o entendimento da estrutura molecular através da sua geometria e de propriedades físico-químicas.

### 1.1. Acetilcolina e os receptores muscarínicos

Acetilcolina (**1a**),  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ , ( $\text{ACh}^+$ ), é um importante neurotransmissor endógeno que atua tanto no sistema nervoso central como no periférico. Ela foi inicialmente descoberta como a substância liberada pelo estímulo dos nervos vagos que alteram as contrações musculares do coração.<sup>1</sup> A análise conformacional da acetilcolina já foi tema de muitos trabalhos experimentais<sup>1-11</sup> e teóricos<sup>12-20</sup> com o propósito de obter informações detalhadas dos seus mecanismos de interação com os receptores colinérgicos.<sup>2</sup>

Para descrever o mecanismo de ligação e, portanto, sua atividade biológica, é importante entender as conformações da  $\text{ACh}^+$  e suas possíveis mudanças em diferentes solventes. Em geral, mudanças significativas são observadas quando

as propriedades moleculares são investigadas no vácuo ou em solução, usando métodos experimentais ou computacionais de investigação.<sup>1</sup>

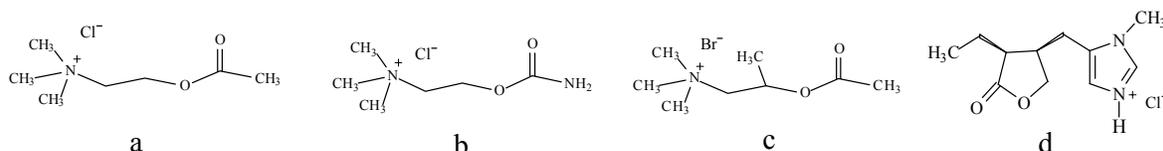
O neurotransmissor acetilcolina liga-se a dois tipos de receptores colinérgicos: a família ionotrópica de receptores nicotínicos e a família metabotrópica de receptores muscarínicos. Receptores nicotínicos são canais iônicos moduladores de potenciais da membrana celular, enquanto receptores muscarínicos pertencem a uma imensa família de receptores acoplados à proteína-G ligada à membrana celular (GPCRs).<sup>3</sup>

Devido a seus sítios amplos e distribuição periférica, receptores muscarínicos mostraram-se promissores alvos no tratamento de diversas doenças como glaucoma, bradicardia, secreção gástrica ácida, asma e como antiespasmódicos para distúrbios gastrointestinais.<sup>3</sup>

## 1.2. Receptores Muscarínicos e agonistas da acetilcolina

Agonistas são substâncias que mimetizam a ação de neurotransmissores que existem naturalmente. Agonistas muscarínicos, como a muscarina e a pilocarpina, e antagonistas, como a atropina, são conhecidos há mais de um século, mas pouco se avançou na descoberta de compostos seletivos para este subtipo de receptores dificultando a determinação de suas funções específicas.<sup>3</sup>

A Figura 1 mostra a estrutura da acetilcolina (**1a**) e dos agonistas foco deste trabalho. O carbacol (**1b**) e a metacolina (**1c**) são usados no chamado *teste de provocação* em pacientes de asma brônquica. O alcalóide pilocarpina (**1d**) derivado da planta sul-americana da espécie *Pilocarpus* é usado para aliviar a pressão intra-ocular em pacientes com glaucoma.<sup>17</sup> O carbacol também é usado em pacientes com glaucoma, é similar a pilocarpina, mas é um pouco mais eficiente na redução da pressão intra-ocular.



**Figura 1.** Estruturas (a) acetilcolina, (b) carbacol, (c) metacolina e (d) pilocarpina.

Têm-se explorado o potencial uso de agonistas seletivos no controle da dor e no tratamento da esquizofrenia. Como os receptores muscarínicos associados a estes tratamentos ainda não estão bem compreendidos, o desenvolvimento de potentes e eficazes agonistas destes receptores seria de grande auxílio na elucidação e constatação do potencial terapêutico de agonistas muscarínicos.<sup>3</sup>

Os agentes muscarínicos utilizados no tratamento da esquizofrenia têm utilidade terapêutica significativa quando se trata os sintomas positivos e negativos com o benefício adicional de que melhoram a função cognitiva. Um ligante muscarínico também pode ser útil no tratamento de psicose e demência associadas com doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer, doença de Lewybody e doença de Parkinson.<sup>3</sup> A complexidade do sistema nervoso colinérgico e a sobreposição da distribuição dos cinco subtipos de receptores muscarínicos dentro do encéfalo apontam um edificante desafio para o desenvolvimento de terapias baseadas em receptores muscarínicos no tratamento de psicoses e outras indicações.<sup>3</sup>

Além disso, evidências farmacológicas sugerem que receptores muscarínicos e possivelmente nicotínicos desempenham um importante papel no aprendizado e na memória.<sup>3</sup>

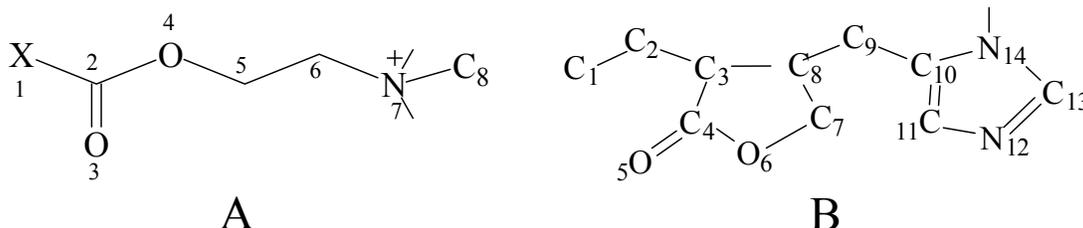
### 1.3. Estudo conformacional

Conformações são discretos arranjos moleculares que diferem no arranjo espacial como resultado das rotações em torno das ligações simples. Normalmente, confôrmeros estão em equilíbrio térmico e não podem ser separados.<sup>21</sup>

Os princípios nos quais a análise do equilíbrio conformacional está baseada foram desenvolvidos dentro de uma estrutura da mecânica clássica. Uma molécula assume uma forma com uma mínima energia possível a partir das rotações em torno das ligações simples e dos ajustes dos ângulos de ligação e comprimentos de ligação. Como ângulos e comprimentos de ligação variam relativamente pouco de molécula para molécula, a forma molecular é primeiramente determinada pelos processos rotacionais. Portanto, a energia total de uma molécula está diretamente relacionada a sua forma. Vários componentes da energia total podem ser identificados e, até certo ponto, atribuídos a características estruturais específicas. Entre os fatores que contribuem para a energia total e possuem uma conexão reconhecida com a estrutura molecular estão repulsões dos pares não-ligantes, tensão do anel em sistemas cíclicos, tensão torsional advinda do emparelhamento de ligações e a desestabilização resultante da distorção de comprimentos de ligação ou de ângulos de ligação dos valores ideais. Por outro lado, há interações estabilizantes que possuem restrições geométricas. Muitas destas podem ser classificadas como *efeitos estereoeletrônicos*. O termo *efeito estereoeletrônico* é usado para incluir relações entre estrutura, conformação, energia e reatividade que podem ser investigadas pelas interações de orbitais que dependem da geometria; isto é, uma relação geométrica particular é necessária para maximizar a interação estabilizante. Além do que, há outras interações, tais como formação de ligação de hidrogênio e interações de dipolo-dipolo para as quais a força da interação depende fortemente da geometria da molécula.<sup>21</sup>

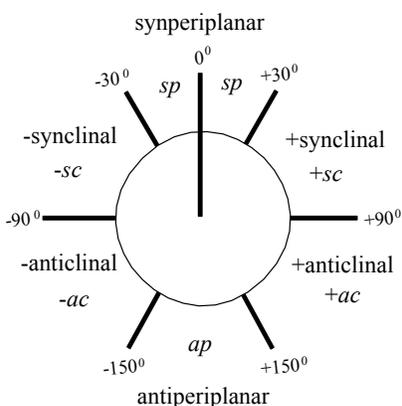
Por analogia com a acetilcolina, as diferentes conformações do carbacol e da metacolina derivam da rotação dos quatro ângulos torsionais internos  $X_1-C_2-O_4-C_5$ ;  $C_2-O_4-C_5-C_6$ ;  $O_4-C_5-C_6-N_7$  e  $C_5-C_6-N_7-C_8$ , onde  $X=NH_2$  para o carbacol e  $X=CH_3$  para a metacolina (Figura 2A). Como os ângulos  $X_1-C_2-O_4-C_5$  e  $C_5-C_6-N_7-C_8$  variam em uma faixa estreita e independente das condições, devido à simetria do triplo rotor e à rigidez do grupo éster, respectivamente, isso permite manter estes dois diedros constantes e focar o estudo nos outros dois ângulos diedros  $C_2-O_4-C_5-C_6$  e  $O_4-C_5-C_6-N_7$  que descrevem a maioria do comportamento

conformacional destes compostos.<sup>2, 4, 6, 8, 14, 20, 22</sup>. Já no caso da pilocarpina a sua conformação é em grande parte definida pelos três ângulos torsionais  $C_1-C_2-C_3-C_8$ ,  $C_7-C_8-C_9-C_{10}$  e  $C_8-C_9-C_{10}-C_{11}$  (Figura 2B) e pela flexibilidade do anel da lactona<sup>23</sup> que será investigada através dos diedros  $C_2-C_3-C_8-C_9$  e  $C_4-O_6-C_7-C_8$ .



**Figura 2.** Numeração dos átomos para definir os principais ângulos diedros dos agonistas. (A)  $X=NH_2$ : carbacol;  $X=CH_3$ : metacolina. (B) pilocarpina. Os demais átomos foram omitidos para efeito de clareza.

Em uma cadeia de átomos A-B-C-D o ângulo diedro ou ângulo torsional entre o plano contendo os átomos A, B, C e o outro contendo B, C, D é o ângulo entre os dois planos que se intersectam em um terceiro plano normal a intersecção destes dois planos. Em uma projeção de Newman o ângulo torsional é o ângulo (que possui um valor absoluto entre  $0^\circ$  e  $180^\circ$ ) entre as ligações de dois grupos específicos, um próximo ao observador e o outro a uma certa distância. O ângulo torsional entre dois grupos A e D é então considerado positivo se a ligação A-B é rotacionada no sentido horário até o valor de  $180^\circ$ ; um valor negativo é considerado quando a rotação se dá em sentido oposto, anti-horário. A Figura 3 mostra os arranjos estereoquímicos correspondentes a cada faixa de ângulos torsionais e suas respectivas nomeações.<sup>24</sup>



**Figura 3.** Especificação dos ângulos de torção de Klyne-Prelog.

A conformação synperiplanar é também conhecida como conformação *syn*- ou *cis*-; antiperiplanar como *anti* ou *trans* e a synclinal como *gauche*. Para uso em macromoléculas os símbolos T, C, G<sup>+</sup>, G<sup>-</sup>, A<sup>+</sup> e A<sup>-</sup> são recomendados (*ap*, *sp*, *+sc*, *-sc*, *+ac* e *-ac*, respectivamente).<sup>24</sup>

Neste trabalho seguir-se-á a seguinte seqüência ao se referir aos confôrmeros: diedro C<sub>2</sub>-O<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>/diedro O<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>-N<sub>7</sub> para acetilcolina, carbacol e metacolina e diedro C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>/diedro C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>/diedro C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>11</sub> para a pilocarpina. Por exemplo, G<sup>+</sup>T, significa *gauche* para um diedro e *trans* para o seguinte.

Para o butano e para a maioria das outras moléculas do tipo YCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>Y e YCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, o confôrmero *anti* é mais estável, mas exceções são conhecidas. Um grupo de exceção consiste de moléculas contendo pequenos átomos eletronegativos, especialmente flúor e oxigênio. Desta forma, 2-fluoroetanol, 1,2-difluoroetano e tricloroacetato de 2-fluoroetila existem predominantemente na forma *gauche* e compostos como 2-cloroetanol e 2-bromoetanol também preferem a forma *gauche*. Foi proposto que a preferência pela conformação *gauche* nestas moléculas é um exemplo de um fenômeno mais geral chamado de *efeito gauche*, que consiste na tendência em adotar a estrutura que possui o maior número de interações *gauche* entre pares de elétrons adjacentes ou entre ligações polares. Com base neste efeito acredita-se que a conformação *gauche* do 2-fluoroetanol é o resultado de ligações de hidrogênio intramoleculares, mas esta explicação não é suficiente para moléculas como tricloroacetato de 2-fluoroetila e também tem sido

excluída para o 2-fluoroetanol. Além disso, o solvente pode exercer um poderoso efeito sobre a conformação de moléculas deste tipo. Por exemplo, o composto 2,3-dinitro-2,3-dimetilbutano existe inteiramente na conformação *gauche* no estado sólido, mas em benzeno a razão *gauche/anti* é de 79:21; enquanto que em CCl<sub>4</sub> a forma *anti* é mais favorecida (42:58). Em muitos casos há diferenças na conformação destas moléculas quando em vácuo e quando em solução (quando X=Y=OMe) devido à interações com o solvente.<sup>21</sup>

Estes efeitos serão considerados na discussão dos resultados obtidos para as moléculas estudadas neste trabalho, uma vez que se trata de etanos di e trissubstituídos. Outros efeitos estão presentes nestas estruturas e podem ser mais determinantes na estabilização de suas conformações como será mostrado ao longo deste trabalho.

### 1.3.1. RMN e Estudo Conformacional

Os ângulos de torção que definem a conformação molecular tomam em geral vários valores que levam a geometrias estáveis, correspondentes a mínimos de energia potencial separados por barreiras rotacionais mais ou menos elevadas. Deste modo, devido à liberdade de rotação interna dada pelas ligações simples presentes nas moléculas, existirá em solução um grande número de conformações com populações apreciáveis.<sup>26</sup>

As relações entre os parâmetros experimentais de RMN e a estrutura molecular são bem definidas para cada conformação instantânea. Porém, os parâmetros de RMN experimentais são médias no tempo tomadas num grande número de moléculas que sofrem interconversões entre todas as conformações populadas.<sup>26</sup>

Mais importante para o químico é o fato dos núcleos da mesma espécie apresentarem, em geral, sinais distintos, de acordo com as características da nuvem eletrônica que os rodeia. É esta a principal justificativa para a utilização em RMN dos núcleos magnéticos de uma molécula como sondas magnéticas naturais reveladoras da estrutura molecular.<sup>26</sup>

### 1.3.1.1. A constante de acoplamento indireta spin-spin

Além da estrutura fina (deslocamento químico), existe uma *estrutura hiperfina* nos espectros atribuída a interações entre os spins nucleares de uma mesma molécula, o chamado *acoplamento de spins nucleares*. Em virtude das rápidas rotações moleculares em líquidos e gases, o efeito magnético correspondente à interação direta dipolo-dipolo, através do espaço, entre os momentos magnéticos nucleares tem, normalmente, um valor médio nulo. Porém através de mecanismos indiretos em que intervêm os elétrons das ligações o valor médio do campo magnético em cada núcleo depende da orientação dos spins dos núcleos vizinhos. Este acoplamento indireto de spins nucleares conduz, normalmente, a um desdobramento do sinal de RMN de cada núcleo (ou grupo de núcleos equivalentes), pois a condição de ressonância para esse núcleo será atingida para um valor de frequência que varia juntamente com os estados de spin dos outros núcleos na molécula.<sup>26</sup>

Enquanto a separação dos sinais devido a cada grupo é proporcional à intensidade do campo magnético aplicado, a interação de dois spins nucleares em uma molécula – momentos angulares  $I_N$  e  $I_{N'}$  – é independente do campo magnético externo e corresponde a uma energia proporcional à constante de acoplamento  $J_{NN'}$ .<sup>26</sup>

$$\Delta E_{NN'} = \sum J_{NN'} I_N I_{N'} \quad (1)$$

onde  $\Delta E$  é a energia de interação entre os dois núcleos com spins  $I_N$  e  $I_{N'}$ ;  $J_{NN'}$  é a constante de acoplamento nuclear indireta spin-spin e a somatória é sobre todos os pares de núcleos magnéticos.

No caso geral, o sinal de RMN de um dado núcleo, acoplado a outro de spin  $I$  (i.e. com  $2I + 1$  estados de spin) e quimicamente não equivalente ao primeiro, é um multipletto de  $2I + 1$  componentes de igual intensidade; a separação entre dois picos consecutivos é a constante de acoplamento  $J$ . Deve-se notar que estas considerações sobre a natureza dos multipletos determinados por acoplamento de

spins nucleares só são válidas em espectros de 1ª ordem, isto é, quando os deslocamentos químicos,  $|v_i - v_j|$ , entre os diversos grupos  $i, j$  de átomos quimicamente equivalentes entre si forem bastante superiores às respectivas constantes de acoplamento  $J_{ij}$ . Em sistemas de 1ª ordem, os grupos de núcleos são não só quimicamente equivalentes como magneticamente equivalentes. É convenção, nestes casos, designarem-se os grupos  $i, j$  de núcleos magnéticos (com  $I = \frac{1}{2}$ ) por letras que ocupem lugares afastados no alfabeto, por exemplo AX para um sistema de dois núcleos ou AMX para um de três, e assim por diante. Também, enquanto os espectros de 1ª ordem (e os espectros AB) são insensíveis aos sinais das constantes de acoplamento  $J_{ij}$ , já o mesmo não sucede, em geral, com espectros de 2ª ordem. Estes dependem dos sinais relativos dos vários  $J_{ij}$ . Assim, ocorrem valores positivos e negativos para as constantes de acoplamento. Como a análise dos espectros de 2ª ordem apenas conduz a sinais relativos de  $JJ$  os sinais são normalmente estabelecidos por comparação com um pequeno número de casos em que o sinal absoluto tenha sido obtido experimentalmente, ou seja, estabelecido inequivocamente por cálculos teóricos.<sup>26</sup>

Para núcleos de  $I = \frac{1}{2}$ , um acoplamento positivo entre dois hidrogênios significa uma preferência pelo alinhamento antiparalelo dos momentos magnéticos dos respectivos spins nucleares em relação a um alinhamento paralelo com o campo.<sup>26</sup>

O valor da constante de acoplamento entre dois núcleos está intimamente relacionado com a natureza das ligações as quais ambos os átomos estão envolvidos. Também a posição relativa das ligações é um importante fator decisivo da grandeza da constante de acoplamento. Em regra, as constantes de acoplamento diminuem à medida que a distância entre os núcleos considerados aumenta, porém isso nem sempre acontece.

### 1.3.1.2. Acoplamento spin-spin $^3J(H,H)$

As relações entre os parâmetros espectrais e os conceitos básicos que descrevem a estrutura molecular estão mais firmemente estabelecidas para os casos de acoplamentos entre núcleos vicinais  $^3J_{NN'}$ , isto é, separados por três ligações; as teorias quantitativas encontram nestes casos os seus principais testes e a possibilidade de melhor contribuírem para o esclarecimento da estrutura das moléculas a partir das constantes de acoplamento de spins nucleares. Especialmente, com as constantes de acoplamento  $^3J(H,H)$ .<sup>26</sup>

Os valores de  $^3J(H,H)$  variam caracteristicamente entre cerca de 1 a 20 Hz. A contribuição dominante para  $^3J(H,H)$  vem do mecanismo de *contacto de Fermi* através do sistema de elétrons  $\sigma$ ; a contribuição relativa  $\pi$  em compostos insaturados é muito menor neste caso.<sup>26</sup>

As constantes  $^3J(H,H)$  são sensíveis a três categorias de características estruturais:

- a) A natureza dos átomos no fragmento H-X-Y-H;
- b) A geometria desse fragmento molecular;
- c) A natureza dos outros átomos ou grupos de átomos ligados a X e Y.

O fator geométrico desdobra-se em três componentes:

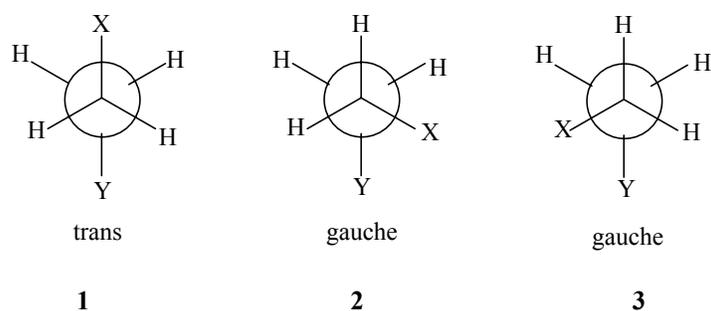
- 1- comprimento da ligação X-Y.
- 2- ângulos das ligações.
- 3- ângulo diedro entre os planos  $H_1XY$  e  $XYH_2$  em  $H_1XYH_2$ .

O efeito do ângulo diedro é talvez o mais marcante e certamente o que se tem revelado mais interessante em estudos da estrutura geométrica de moléculas.<sup>26</sup>

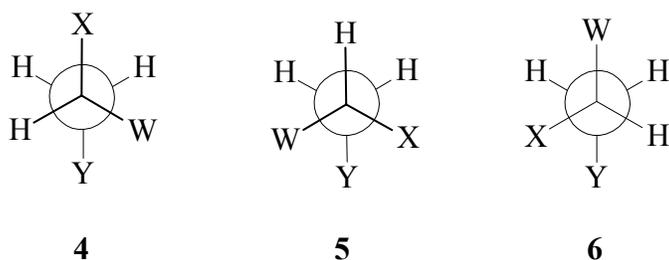
Por exemplo, em derivados acíclicos do etano, normalmente se observa apenas valores médios de  $^3J(H,H)$  como conseqüência da rápida rotação interna em torno da ligação C-C, por isso, os hidrogênios de um grupo metila são quimicamente equivalentes: em média temporal, o ambiente químico de cada

núcleo H é o mesmo. Também o acoplamento com um hidrogênio de um grupo CH ou CH<sub>2</sub> vizinho é, em média, idêntico para cada um dos três núcleos de CH<sub>3</sub>, já que as várias conformações comparáveis têm a mesma energia, sendo por isso igualmente povoadas. Já o mesmo não acontece, por exemplo, para dois grupos CH<sub>2</sub> em etanos dissustituídos, genericamente XCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Y.

Existem três conformações estrelas possíveis para moléculas do tipo XCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Y, uma *trans* (**1**) e duas formas *gauche* equivalentes (**2** e **3**). Há no conformêro **1** um J *trans* e um J *gauche*, no conformêro **2**, um J *trans* e três J *gauche*.



Nas moléculas do tipo XWCHCH<sub>2</sub>Y também existem três conformações estrelas possíveis (**4**, **5** e **6**), mas as duas formas *gauche* (**5** e **6**) não são mais equivalentes.

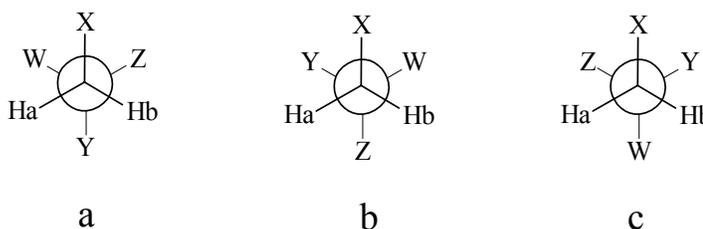


Núcleos quimicamente equivalentes são também equivalentes no que diz respeito ao deslocamento químico, mas não necessariamente equivalentes no que toca as constantes de acoplamento com núcleos de um outro grupo, ou seja, eles não são obrigatoriamente magneticamente equivalentes.

Muitas moléculas de interesse farmacológico são etanos 1,2-dissustituídos, por exemplo, acetilcolina, histamina e serotonina. Dois dos

compostos estudados neste trabalho (acetilcolina – 1a e carbacol – 1b) são etanos 1,2-dissubstituídos do tipo  $XCH_2CH_2Y$  e seus espectros de RMN se encaixam no sistema de quatro hidrogênios descritos como  $AA'XX'$ .<sup>27</sup> Os outros dois compostos estudados (metacolina – 1c e pilocarpina – 1d) são etanos 1,2,2-trissubstituídos do tipo  $XWCHCH_2Y$ . Este sistema de três hidrogênios é descrito como  $AMX$ .

Em derivados do etano do tipo  $XCH_2CYWZ$  com os confôrmeros estrelas



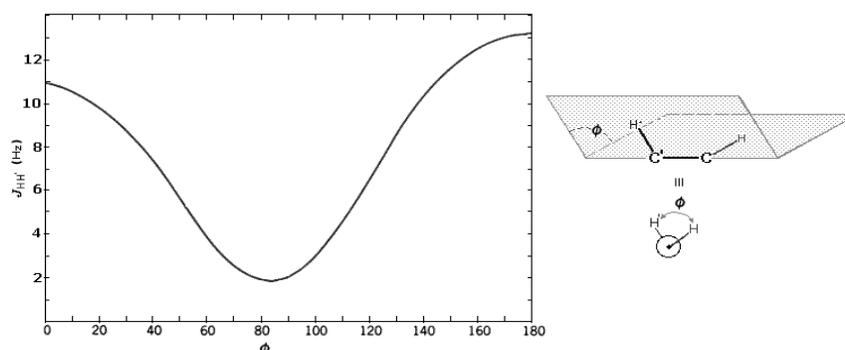
os núcleos Ha e Hb não são quimicamente equivalentes caso  $Y \neq W \neq Z$ . Neste caso dizemos que os núcleos Ha e Hb são diastereotópicos, como é o caso dos hidrogênios metilênicos da metacolina e da pilocarpina. Se  $W=Z$  as formas (b) e (c) tornam-se enantioméricas, ao mesmo tempo em que Ha e Hb são equivalentes no confôrmero (a); nestas condições, o espectro de RMN não distingue Ha de Hb em solventes não quirais. Neste último caso se diz que os núcleos Ha e Hb são enantiotópicos, como é o caso da acetilcolina e do carbacol.

### 1.3.1.3. Dependência angular das constantes de acoplamento spin-spin $^3J(H,H)$

O uso da dependência angular de acoplamentos  $^3J(X,Y)$  como evidência estereoquímica para o estudo conformacional aumentou rapidamente seguindo o pioneiro trabalho de Karplus<sup>28,29</sup> de 1953 com acoplamentos  $^3J(H,H)$ . Desde então, muitos trabalhos apareceram complementando e modificando a relação de Karplus (Equação 3 e Figura 4) para incluir outros tipos de acoplamentos e outros efeitos, como eletronegatividade dos substituintes, ângulos de ligação, interações de transferência de cargas, dentre outros efeitos.<sup>30</sup>

$${}^3J(\text{H,H}) = A_1 \cos^2 \phi + B_1 \cos \phi + C_1 \quad (2)$$

onde  $\phi$  é o ângulo diedro H-X-Y-H e  $A_1$ ,  $B_1$  e  $C_1$  são parâmetros empíricos.



**Figura 4.** Relação geral de Karplus: dependência de J em função do ângulo diedro

Fatores que afetam a dependência angular de acoplamentos  ${}^3J(\text{X,Y})$  são em geral melhor conhecidos para acoplamentos  ${}^3J(\text{H,H})$ . É interessante notar que muitos desses fatores parecem afetar outros tipos de acoplamentos de modo similar ao que afeta acoplamentos  ${}^3J(\text{H,H})$ , pelo menos para acoplamentos dominados pela contribuição do *contato de Fermi*.

A relação de Karplus sofreu várias outras correções à medida que novos fatores de influência foram sendo descobertos e/ou suas medidas foram se tornando possíveis. O *review* de Contreras e Peralta<sup>30</sup> apresenta uma boa discussão sobre os principais fatores de influência sobre a relação de Karplus e as modificações implementadas. Dentre as várias modificações feitas na equação de Karplus, a melhor forma conhecida para um sistema genérico qualquer, é aquela proposta por Haasnoot e col.<sup>31</sup>, conhecida como *equação de Karplus generalizada* (3).

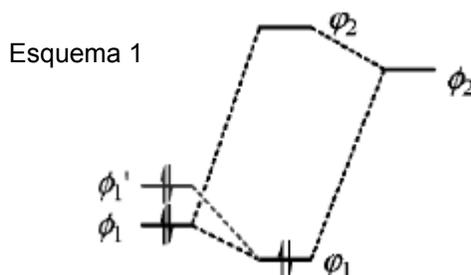
$${}^3J(\text{H,H})(\text{Hz}) = P_1 \cos^2 \phi + P_2 \cos \phi + P_3 + \sum \Delta \chi_i [P_4 + P_5 \cos^2(\xi_i \phi + P_6 |\Delta \chi_i|)] \quad (3)$$

onde  $\Delta\chi_i$  é a diferença de eletronegatividade entre o substituinte e o átomo de H para os átomos que pertencem ao caminho do acoplamento;  $\xi_i$  é +1 ou -1 dependendo da orientação dos substituintes em relação ao átomo H ligado ao mesmo átomo de carbono;  $\phi$  é o ângulo diedro entre os planos  $H_1-C_1-C_2$  e  $C_1-C_2-H_2$ .

Verificou-se que interações entre substituintes afetam os acoplamentos  ${}^3J(H,H)$  de uma forma significativa. Altona e col.<sup>32</sup> determinaram a eletronegatividade empírica de grupos levando em consideração efeitos de solvente nos substituintes que possuem um ou dois pares isolados de elétrons em contrapartida aos valores originais que eram baseados na escala de eletronegatividade de Pauling.

#### 1.3.1.4. Influência das interações hiperconjugativas nas constantes de acoplamento spin-spin ${}^3J(H,H)$ .

Na teoria de orbital molecular, OM, a estabilização hiperconjugativa vem da interação entre um orbital localizado ocupado (por exemplo, um orbital ligante  $\sigma_{CH}$  no etano) e um orbital localizado vazio (por exemplo,  $\sigma_{CH}^*$ ), e subseqüentemente, a energia de hiperconjugação é definida como a diferença de energia entre o orbital ocupado  $\phi_1$  e o orbital delocalizado ocupado  $\varphi_1$  como ilustrado no esquema 1. Entretanto, nos cálculos teóricos de OM, apenas orbitais delocalizados  $\{\varphi\}$  podem ser obtidos de modo autoconsistente. Devem-se adotar aproximações para derivar os orbitais localizados  $\{\phi\}$ . Se este último não for ideal, suas energias orbitais sobem a níveis maiores (por exemplo,  $\phi'_1$  no esquema 1) e uma grave conseqüência é a de superestimar a energia de hiperconjugação.<sup>33</sup>



Interações hiperconjugativas são fatores importantes que afetam os valores de  ${}^3J(\text{H,H})$  em função do ângulo diedro. As interações que levam ao aumento do efeito Barfield são racionalizadas em termos de delocalizações  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  que dependem tanto da capacidade doadora da ligação  $\sigma$  como da capacidade acceptora da antiligante  $\sigma^*$ .<sup>25</sup>

### 1.3.1.5. Influência do efeito de solvente nas constantes de acoplamento spin-spin ${}^3J(\text{H,H})$ .

Em geral, os parâmetros de RMN deslocamentos químicos e acoplamentos médios spin-spin são dependentes do tipo de solvente utilizado. Esta dependência surge de sutis mudanças eletrônicas que ocorrem na molécula do soluto como resultado de interações intermoleculares soluto-solvente.<sup>35</sup> Na verdade, reconhece-se um efeito indireto da natureza do meio sobre constantes de acoplamento determinadas experimentalmente no caso de moléculas não rígidas e que é o de afetar a distribuição das várias conformações; desse modo, as constantes de acoplamento, como medidas que são para as várias conformações, são sensíveis ao meio.<sup>26</sup>

Mas além desse, há um efeito direto decorrente de perturbações na distribuição eletrônica (e, conseqüentemente, nos comprimentos e ângulos de ligações) induzidas pelo meio. A formação de ligação de hidrogênio e a solvatação constituem dois exemplos. O campo de reação do solvente no caso de solutos polares igualmente afeta os parâmetros  $J$ , de uma forma relacionável com a constante dielétrica do meio.<sup>26</sup>

Geralmente, existem diversas interações que surgem diretamente das ligações químicas e outras de natureza não ligantes que podem influenciar os parâmetros de RMN.

As interações do tipo não ligantes surgem **(a)** a partir dos efeitos de susceptibilidade magnética do meio contínuo formado por moléculas distantes da molécula considerada, **(b)** da contribuição das forças de van der Waals, ao efeito do campo elétrico correspondente à polarização do solvente causada por um

soluto polar, ou com grupos polares, **(c)** da resultante da anisotropia magnética das moléculas vizinhas; e **(d)**  $\sigma_{\text{ass}}$  é a contribuição adicional correspondente a associações específicas entre soluto e solvente.<sup>35</sup>

Diversas interações de ligações específicas soluto-solvente também podem ocorrer. Exemplos são as associações moleculares, ligação de hidrogênio, deslocamentos induzidos por solventes aromáticos, interações iônicas, mudança intramolecular e efeitos de equivalência magnética.<sup>35</sup>

Experimentalmente, a estimativa da importância relativa de várias das contribuições de natureza não ligante para os efeitos de solvente observados normalmente não é fácil. Do ponto de vista da química quântica a separação das várias contribuições não é muito significativa, pois expressões matemáticas precisas não estão disponíveis para a maioria das interações de natureza não ligante consideradas.<sup>35</sup>

No caso de moléculas que podem assumir mais de uma conformação, deve-se considerar como principal efeito nos acoplamentos o que surge na mudança das populações relativas entre os conformeros por causa de interações intermoleculares soluto-solvente.<sup>35</sup>

### 1.3.2. Química computacional

Todo químico usa modelos. Modelos plásticos que ajudam a entender e visualizar as estruturas das moléculas são um exemplo de um tipo de modelo pictórico utilizado. Modelos em química podem ser físicos, pictóricos, teóricos ou até mesmo a própria química sendo um modelo para certos aspectos da física do universo. O que todos têm em comum, entretanto, é que eles usam um conjunto de objetos e regras pré-definidos na tentativa de se aproximarem dos processos químicos e das entidades químicas reais.

De um jeito semelhante, a química computacional simula numericamente estruturas e reações químicas baseando-se completa ou parcialmente nas leis fundamentais da física. Isso permite aos químicos estudar fenômenos químicos através de cálculos computacionais ao invés de examinar reações e compostos

experimentalmente. Alguns métodos podem ser usados para modelar não apenas moléculas estáveis, mas também intermediários instáveis ou mesmo estados de transição. Neste sentido, eles podem fornecer informações sobre moléculas e reações que seriam impossíveis de se obter através de observações experimentais.<sup>36</sup>

Atualmente, existem diversos programas com este propósito. Mas nem todos os modelos representam um quadro final e completo dos compostos em estudo.

Mesmo levando em conta suas limitações, a utilização da química computacional tem se tornado cada vez mais difundida entre químicos de todas as áreas. Fatores, como redução de custos com o avanço dos computadores, melhora no nível de confiança dos modelos propostos, possibilidade de trabalhar com hipóteses ainda não disponíveis experimentalmente, grande coerência entre dados obtidos experimentalmente e resultados de cálculos e desenvolvimento da química teórica e de programas computacionais de fácil utilização, são atrativos dessa ferramenta.<sup>37</sup>

Existem duas grandes áreas dentro da química computacional dedicadas ao estudo de estruturas moleculares e reatividade: Mecânica Molecular e Teoria da Estrutura Eletrônica. Por qualquer uma das abordagens é possível realizar alguns tipos de cálculos como: (i) cálculo da energia de estruturas moleculares e propriedades relacionadas com a energia; (ii) realizar otimização de geometria; (iii) calcular frequências vibracionais; (iv) calcular a geometria de um estado de transição; (v) calcular o caminho de menor energia para uma reação química.<sup>36</sup>

Simulações utilizando Mecânica Molecular usam as leis da física clássica para prever estruturas e propriedades moleculares. Existem vários diferentes métodos de mecânica molecular. Cada uma é caracterizada por seu *campo de força* particular. Um campo de força possui os seguintes componentes:<sup>36</sup>

- um conjunto de equações definindo como a energia potencial de uma molécula varia com as localizações de seus átomos.

- uma série de *tipos atômicos* definindo as características de um elemento dentro de um contexto químico específico. Tipos atômicos descrevem diferentes

características e comportamentos para um elemento em seu ambiente químico. O tipo atômico depende da hibridação, carga e dos tipos dos outros átomos aos quais aqueles ligados.

- um ou mais conjuntos de parâmetros que ajustam as equações e os tipos atômicos aos dados experimentais. Os conjuntos de parâmetros definem constantes de força, que são valores usados nas equações para relacionar características atômicas aos componentes de energia e dados estruturais como comprimento de ligação e ângulos.

Cálculos de mecânica molecular não tratam explicitamente os elétrons em um sistema molecular. Ao invés disso, eles fazem cálculos baseados nas interações com o núcleo. Efeitos eletrônicos estão implicitamente incluídos nos campos de força através de parametrizações.<sup>36</sup>

Essa aproximação faz com que os cálculos de mecânica molecular tenham um custo computacional bastante barato e permite que eles sejam usados em grandes sistemas contendo milhares de átomos. Entretanto, ela também impõe várias limitações. Entre as mais importantes: cada campo de força consegue bons resultados apenas para uma limitada classe de moléculas para a qual ele está parametrizado; desprezar os efeitos eletrônicos significa que o método de mecânica molecular não consegue tratar problemas químicos onde efeitos eletrônicos predominam.<sup>36</sup>

As simulações que utilizam a Teoria de Estrutura Eletrônica usam as leis da física quântica como base para seus cálculos. A mecânica quântica estabelece que a energia e outras propriedades moleculares relacionadas podem ser obtidas resolvendo-se a equação de Schrödinger (4):<sup>36</sup>

$$H\Psi = E\Psi \quad (4)$$

Exceto para sistemas pequenos, a solução exata da equação de Schrödinger não é computacionalmente possível. Métodos de estrutura eletrônica são caracterizados pelas várias aproximações matemáticas para sua solução. Existem duas grandes classes dentro do método de estrutura eletrônica: métodos

semi-empíricos e métodos *ab initio*.<sup>36</sup>

Métodos semi-empíricos e *ab initio* diferem na relação entre custos computacionais e exatidão do resultado. Cálculos semi-empíricos são relativamente baratos e dão descrições qualitativas razoáveis dos sistemas moleculares e previsões quantitativas normalmente exatas de energias e estruturas dos sistemas em que existe bom conjunto de parâmetros. Eles usam parâmetros derivados de dados experimentais.<sup>36</sup>

Em contrapartida, métodos *ab initio* não usam parâmetros experimentais em seus cálculos; eles são baseados somente nas leis da mecânica quântica e nos valores de um pequeno número de constantes físicas: velocidade da luz, as massas e as cargas dos elétrons e do núcleo e na constante de Planck. Métodos *ab initio* dão previsões quantitativas de alta qualidade para uma ampla faixa de sistemas. Eles não estão limitados a qualquer classe específica de sistemas. Antigamente programas *ab initio* eram limitados pelo tamanho dos sistemas que eles podiam manusear. Entretanto, as máquinas computacionais disponíveis no mercado atualmente estão cada vez mais conseguindo romper esta limitação.<sup>35</sup>

Uma terceira classe de métodos de estrutura eletrônica vem sendo amplamente utilizada: teoria do funcional de densidade (DFT). Alguns autores defendem que métodos DFT são métodos *ab initio*, mas a discussão acerca desta controvérsia foge ao objetivo deste trabalho.<sup>36</sup>

Os métodos DFT são similares aos métodos *ab initio*. Eles requerem praticamente os mesmos recursos computacionais da teoria Hartree-Fock, o método *ab initio* computacionalmente mais barato.<sup>36</sup>

Métodos DFT são atrativos porque incluem os efeitos de correlação eletrônica – elétrons em uma molécula reagem aos movimentos dos outros elétrons – em seus modelos. Por isso, métodos DFT podem trazer os benefícios de alguns dos métodos *ab initio* computacionalmente mais caros com o custo de um Hartree-Fock.<sup>36</sup>

### 1.3.2.1. Modelo e Método Teórico Utilizado

O método B3LYP, que usa funcionais de correlação desenvolvidas por Becke, Lee e Young, é baseado na teoria do funcional de densidade (DFT). Apresenta sobre os métodos tradicionais semi-empíricos e *ab initio* padrões ganho em velocidade computacional e espaço em memória. Além disso, em contraste com métodos semi-empíricos, o hamiltoniano na DFT é bem definido e suas características não são obscurecidas por aproximações no procedimento computacional. Assim, esse método tem sido utilizado no estudo de grandes sistemas moleculares, descrevendo realisticamente sistemas orgânicos, inorgânicos, metálicos e semicondutores. Por estas e outras razões, a teoria do funcional de densidade tem sido cada vez mais empregada para sistemas moleculares encontrados em pesquisas farmacêuticas, agroquímicas e biotecnológicas, que estão fora do alcance de métodos de natureza *ab initio* padrões.<sup>36</sup>

### 1.3.2.2. Conjunto de Bases

Um conjunto de bases é uma representação matemática dos orbitais moleculares dentro de um sistema. O conjunto de bases pode ser interpretado como uma restrição de cada um dos elétrons a uma região particular do espaço. Na mecânica quântica sem aproximações, elétrons possuem uma probabilidade finita de existir em qualquer lugar do espaço; este limite corresponde à expansão infinita do conjunto de bases. Bases maiores impõem menores restrições aos elétrons e fazem aproximações mais exatas dos orbitais moleculares. Obviamente, elas requerem maior custo computacional.<sup>36</sup>

Os métodos *ab initio* e DFT mais comuns são métodos baseados na LCAO (Linear Combination of Atomic Orbitals). Isto é, os orbitais atômicos são escritos como combinações lineares de conjunto de bases de orbitais atômicos. Em princípio estes conjuntos de bases deveriam ser construídas a partir dos orbitais tipo Slater, mas pacotes computacionais mais modernos, entretanto, passaram a

usar conjuntos de bases nos quais os orbitais tipo Slater foram substituídos pelas funções gaussianas que são computacionalmente mais fáceis de ser manuseadas.<sup>36</sup>

Dependendo de cada sistema, uma série de ajustes pode ser feito nos conjuntos de base com o objetivo de melhor descrever os processos eletrônicos envolvidos. Cada um destes ajustes leva em conta fatores como mudança no ambiente molecular, mudanças na forma dos orbitais e melhor descrição de cargas, por exemplo.<sup>36</sup>

### 1.3.2.3. Natural Bond Orbital (NBO)

A análise por *Natural Bond Orbital* (NBO) originou-se como uma técnica para o estudo dos efeitos de hibridação e de covalência em funções de onda poliatômicas, baseadas nos blocos locais de autovetores de uma matriz de densidade de uma partícula. NBOs foram considerados como um “conjunto de base dos químicos” que se aproximaria muito de uma imagem das ligações localizadas e dos pares isolados como uma unidade básica da estrutura molecular. O NBO para uma ligação  $\sigma$  localizada entre átomos A e B é formada diretamente dos orbitais híbridos naturais (híbridos ortonormais - NHOs) que por sua vez são compostos por um conjunto de orbitais atômicos de camada de valência (NAOs) otimizados a partir das funções de ondas escolhidas. Funções de onda *ab initio* transformadas para a forma NBO estão em acordo com os conceitos de estrutura de Lewis e com a imagem básica de Pauling-Slater-Coulson de hibridação e polarização. Os NBOs preenchidos  $\sigma_{AB}$  das “estruturas naturais de Lewis” são, portanto, bem adaptadas para descrever efeitos covalentes nas moléculas.<sup>38</sup>

Entretanto, a transformação para NBO também leva a orbitais que estão desocupados na estrutura formal de Lewis e que, portanto, podem ser usados para descrever efeitos não-covalentes. O mais importante destes são os antiligantes  $\sigma_{AB}^*$  que surgem do mesmo conjunto de híbridos atômicos da camada de valência que se juntam para formar as funções ligantes  $\sigma_{AB}$ . Os antiligantes

representam camadas de valência potencialmente não usadas, continuação de parte das valências atômicas que são oficialmente insaturadas pela formação de ligação covalente. Pequenas ocupâncias destes antiligantes correspondem, na teoria Hartree-Fock, a mudança irreduzível da imagem idealizada de Lewis e, portanto, as pequenas correções não-covalentes na imagem das ligações covalentes localizadas.<sup>38</sup>

A energia associada aos antiligantes pode ser numericamente mensurada subtraindo estes orbitais do conjunto de bases e recalculando a energia total para determinar o abaixamento da energia variacional associada.

Os símbolos “ $\sigma$ ” e “ $\sigma^*$ ” são usados em uma forma geral para se referir aos orbitais preenchidos e vazios, respectivamente, das estruturas formais de Lewis, assim como “n” é usado para pares isolados.<sup>38</sup>

Na decomposição do NBO, as contribuições não covalentes são tipicamente menores do que 1% da contribuição covalente, refletindo o domínio do componente tipo Lewis da ligação.<sup>38</sup>

Descrições quantitativas das interações hiperconjugativas podem ser obtidas empregando-se o método NBO. Interações do tipo  $n \rightarrow \sigma^*$ ,  $\sigma \rightarrow \pi^*$ ,  $\pi \rightarrow \sigma^*$ , e  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  podem afetar significativamente as constantes de acoplamento spin-spin. Portanto, o entendimento de como elas são afetadas podem ser usadas no estudo das interações hiperconjugativas e vice-versa.<sup>38</sup>

O primeiro tipo de interação hiperconjugativa é parte do *efeito anomérico* e é conhecida como “interação hiperconjugativa negativa”, geralmente ela é notavelmente mais forte do que os outros três tipos a seguir. O segundo e o terceiro tipos são reconhecidos como os principais mecanismos de transmissão para o *contato de Fermi* de acoplamentos a longa distância em compostos do tipo benzílicos. O quarto tipo é atualmente conhecido como o responsável pelo termo de *contato de Fermi* de constantes de acoplamento spin-spin a longa distância em compostos saturados tensionados.<sup>25</sup>

## Capítulo 2

### OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo determinar as conformações preferenciais dos agonistas da acetilcolina: **carbacol** [cloreto de carbamilcolina], **metacolina** [brometo de acetil-beta-metilcolina] e **pilocarpina** [cloridrato de (+)-pilocarpina] (Figura 1) através da análise de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de cálculos teóricos *ab initio*. Ainda, a partir da análise do efeito de diferentes solventes nas constantes de acoplamento vicinais hidrogênio-hidrogênio,  $^3J_{\text{HH}}$ , estudar os efeitos de estabilização dos confôrmeros mais estáveis. Cálculos de NBO (*Natural Bond Orbital*) foram realizados com o objetivo de fornecer ferramentas teóricas capazes de explicar tais estabilizações.

## Capítulo 3

### EXPERIMENTAL

### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1. RMN

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em um equipamento Varian INOVA 500MHz em  $\text{D}_2\text{O}$ , acetona- $\text{d}_6$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  e  $\text{D}_2\text{O}$  em pH fisiológico todos a 298 K. Um conjunto de espectros foi determinado a partir de aproximadamente 20 mg dos respectivos sais em cerca de 0,7mL de óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ) puro e em pH fisiológico (pH=7,4). Outro conjunto de espectros foi obtido pela dissolução máxima de cada um dos respectivos sais nos solventes deuterados de estudo. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm em relação ao TMS como padrão interno. As condições do pulso foram as descritas abaixo:

Condições de aquisição:

-RMN de  $^1\text{H}$  para acetilcolina, carbacol e metacolina: tempo de aquisição 3,277 s, número de transientes 16, tempo de relaxação 0,010 s; para HSQC, tempo de aquisição 0,158 s, número de transientes 96, tempo de relaxação 1,300 s;

-RMN de  $^1\text{H}$  para pilocarpina: tempo de aquisição 3,277 s, número de transientes 16, tempo de relaxação 0,010 s;

-HSQC para metacolina: tempo de aquisição 3,043 s, número de transientes 32, tempo de relaxação 1,500 s;

-HSQC para pilocarpina: tempo de aquisição 0,209 s, número de transientes 64, tempo de relaxação 0,010 s;

-COSY para metacolina: tempo de aquisição 0,158 s, número de transientes 4, tempo de relaxação 1,000 s;

-COSY para pilocarpina: tempo de aquisição 0,208 s, número de transientes 128, tempo de relaxação 1,000 s.

### 3.2. Cálculos Teóricos

Os estudos teóricos foram feitos usando-se o pacote Gaussian 2003. Para construir a superfície de energia potencial (PES) utilizou-se o método Hartree-Fock com o conjunto de bases 6-31G. Os PES's foram feitos variando-se os ângulos diedros  $C_2-O_4-C_5-C_6$  e  $O_4-C_5-C_6-N_7$  (para acetilcolina, carbacol e metacolina) e  $C_7-C_8-C_9-C_{10}$  e  $C_8-C_9-C_{10}-C_{11}$  (para a pilocarpina).

As otimizações de energia e os cálculos de frequência foram realizados usando-se o método B3LYP com o conjunto de bases 6-311+g(d,p) utilizando-se a água como solvente.

Os cálculos NBO (*Natural Bond Orbital*) foram realizados com o programa NBO 3.1 implementado no programa Gaussian 03 com o mesmo método e conjunto de bases utilizados na otimização das moléculas.

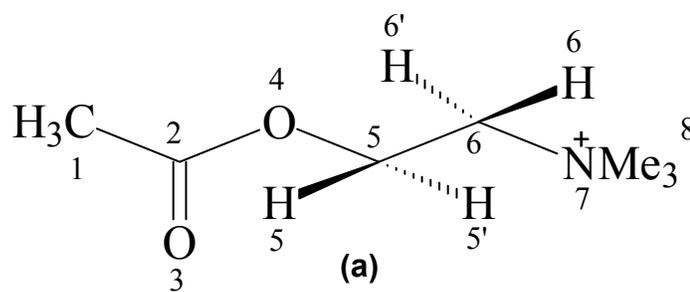
## Capítulo 4

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

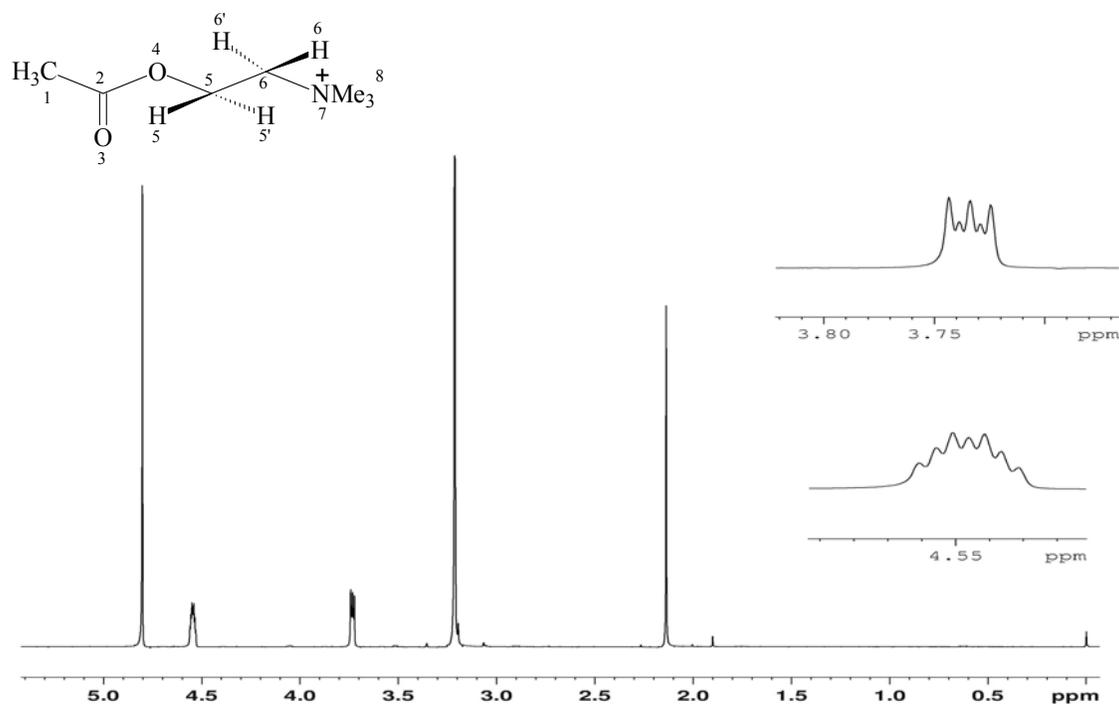
### 4.1. Análise dos Espectros de RMN de $^1\text{H}$

#### 4.1.1. ACETILCOLINA



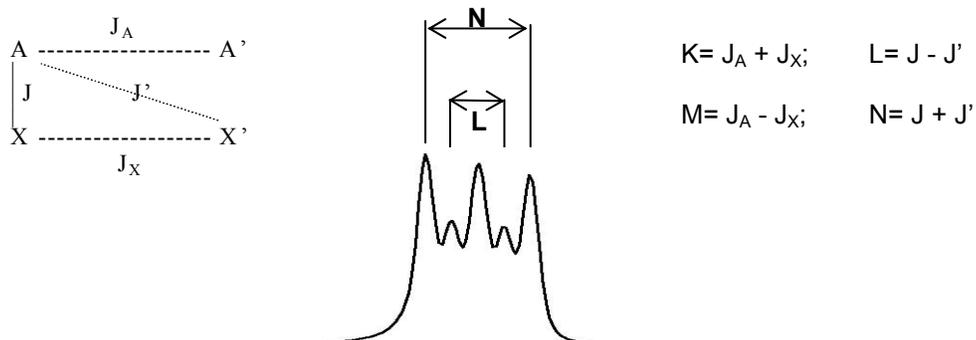
A acetilcolina ( $\text{ACh}^+$ ) (a) foi usada como uma molécula de controle, um padrão de validação para os resultados deste trabalho devido aos inúmeros estudos tanto teóricos<sup>1-11</sup> como experimentais<sup>12-19</sup> já bem estabelecidos. Outro fator é a óbvia semelhança estrutural entre a acetilcolina e os agonistas estudados que produz espectros de RMN essencialmente semelhantes em complexidade espectroscópica.

Os principais sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da  $\text{ACh}^+$  (Figura 5) são aqueles referentes aos hidrogênios metilênicos. O multipletto devido aos hidrogênios do  $\text{OCH}_2$  (4,55 ppm) é mais largo do que o multipletto do  $\text{N}^+\text{CH}_2$  (3,74 ppm) por causa de um acoplamento adicional de cerca de 2Hz entre os hidrogênios do  $\text{OCH}_2$  e o átomo de nitrogênio positivamente carregado (spin nuclear 1).<sup>27</sup> Tal comportamento deve-se ao acoplamento quadrupolar destes hidrogênios com o núcleo de nitrogênio ( $^{14}\text{N}$ ). Núcleos com números quânticos spin ( $I$ ) maior do que  $\frac{1}{2}$ , como é o caso do nitrogênio-14, possuem um *momento quadrupolar elétrico* em adição a seu momento dipolar magnético. Para moléculas contendo núcleos quadrupolares, a separação das linhas pode estar ausente tanto no espectro dos próprios núcleos quadrupolares como no espectro de núcleos cujos spins estão acoplados devido ao mecanismo de relaxação quadrupolar rápida.<sup>39, 40</sup>



**Figura 5.** Espectro experimental de RMN de  $^1\text{H}$  a 500 MHz para a  $\text{ACh}^+$  em  $\text{D}_2\text{O}$ .

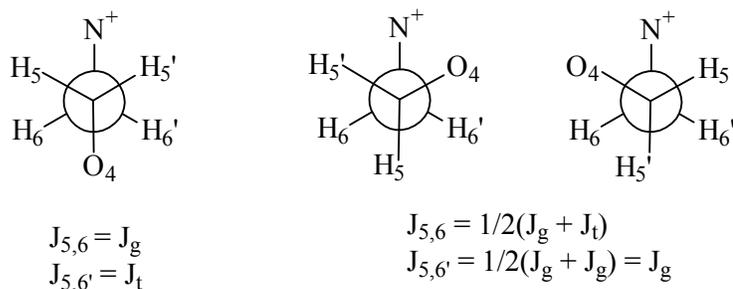
O espectro obtido para a  $\text{ACh}^+$  é complexo e não pode ser analisado por um tratamento de primeira ordem. Quatro constantes de acoplamento estão envolvidas. Estas constantes não podem ser obtidas diretamente do espectro, mas podem ser calculadas a partir dos parâmetros N e L (Figura 6):<sup>41</sup>



**Figura 6.** Parâmetros N e L determinados a partir do sinal do espectro de RMN de hidrogênio.

Os valores de deslocamento químico para todos os hidrogênios da  $ACh^+$  estão na Tabela 1 e os das constantes de acoplamento na Tabela 2. Os espectros com a integração dos sinais de todos os compostos estudados estão no Anexo I.

Os parâmetros  $N$  e  $L$  foram determinados a partir do sinal dos hidrogênios metilênicos  $H_6$  e  $H_6'$  (3,74 ppm) do espectro da  $ACh^+$  (Figura 5) resultando  $N= 9,5$  Hz e  $L= 4,9$  Hz. Assim,  $J= 7,2$  Hz e  $J'= 2,3$  Hz. Estes valores são agora comparados com os valores antecipados se os confôrmeros (i) *trans* e (ii) *gauche* são favorecidos.



No caso do arranjo *trans* a constante de menor valor (2,3 Hz) poderia corresponder a  $J_g$ , mas o maior valor (7,2 Hz) é muito baixo para um  $J_t$  mesmo levando-se em conta os efeitos dos substituintes. Por outro lado, o valor 2,3 Hz é consistente com um  $J_g$ , enquanto 7,2 Hz é um valor coerente para  $1/2(J_g + J_t)$ . Assim sendo,  $J_t$  tem um valor de 12,3 Hz, um valor normal para este tipo de acoplamento.<sup>41</sup>

Estes resultados mostram que para o ângulo diedro  $O_4-C_5-C_6-N_7$  a principal conformação é a *gauche*. O que está de acordo com os resultados de vários estudos experimentais de RMN de  $^1H$ <sup>1-11</sup>

**Tabela 1.** Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  da acetilcolina em  $\text{D}_2\text{O}$

Núcleo	$\delta$ (ppm)	
	experimental	literatura <sup>a</sup>
H1	2,14	2,14
H5/5'	4,54	4,53
H6/6'	3,74	3,76
H8	3,22	3,24

<sup>a</sup> Ref. 11 a 300 MHz

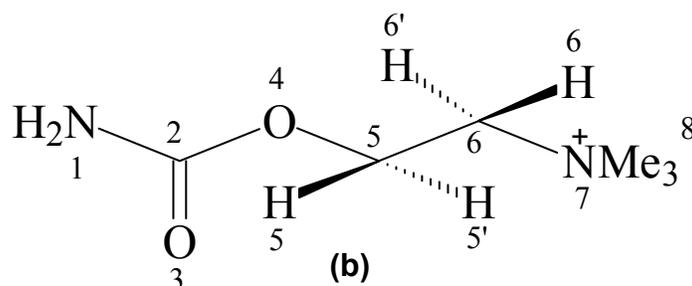
**Tabela 2.** Constantes de acoplamento para a acetilcolina em  $\text{D}_2\text{O}$

J	J/Hz	J <sup>a</sup> /Hz
$^3\text{J}(5,6)$	7,2	7,2
$^3\text{J}(5,6')$	2,3	2,3

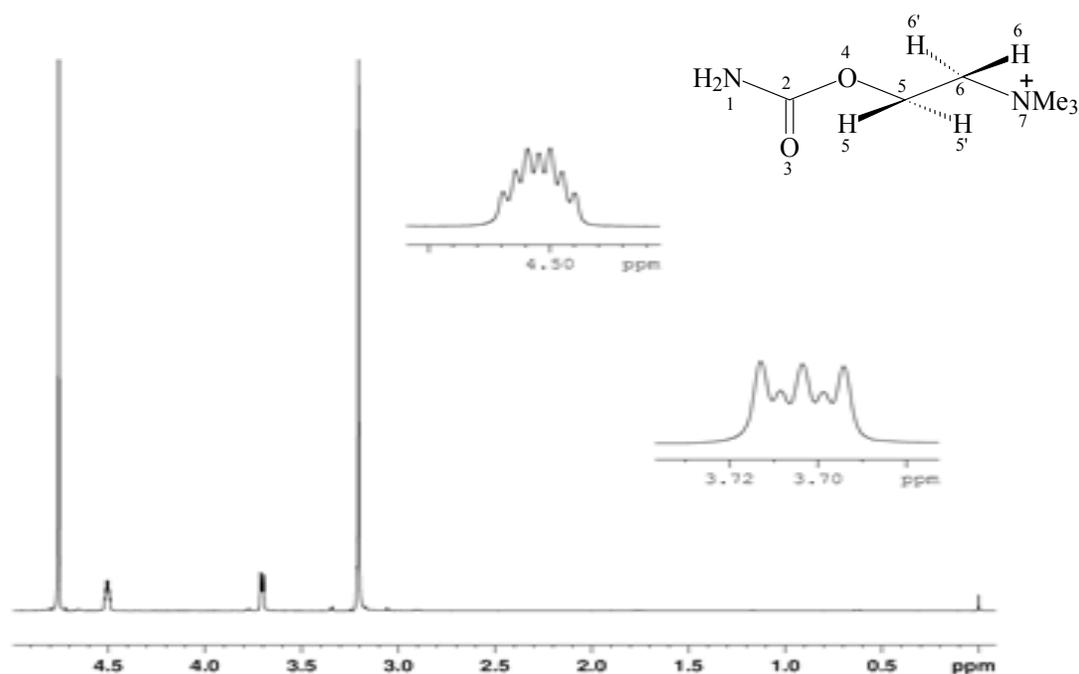
<sup>a</sup> Ref. 11 a 300 MHz

É importante salientar que a análise das constantes de acoplamento  $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$  dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das moléculas do tipo  $\text{XCH}_2\text{CH}_2\text{Y}$  permite inferir a conformação apenas em relação ao diedro  $\text{O}_4\text{-C}_5\text{-C}_6\text{-N}_7$ , mas nada em relação ao diedro  $\text{C}_2\text{-O}_4\text{-C}_5\text{-C}_6$ , outro importante ângulo no estudo conformacional deste tipo de molécula e que será estudado a partir dos resultados dos cálculos computacionais.

## 4.1.2. Carbacol



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do carbacol (b) (Figura 7) apresenta um comportamento muito semelhante ao da acetilcolina (Figura 5), inclusive com relação à forma dos sinais e aos deslocamentos químicos. Os valores das constantes de acoplamento (Tabela 4) foram determinados aplicando-se o mesmo procedimento usado para a determinação dos valores de  $J$  no estudo do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da acetilcolina<sup>18</sup>. Sendo  $J=7,2$  Hz e  $J'=2,3$  Hz os valores referentes aos acoplamentos vicinais entre os hidrogênios do diedro  $\text{O}_4\text{-C}_5\text{-C}_6\text{-N}_7$ . Assim como feito para a acetilcolina, estes valores são comparados com os valores antecipados se os confôrmeros *trans* e *gauche* são favorecidos.



**Figura 7.** Espectro experimental de RMN de  $^1\text{H}$  a 500 MHz para o carbacol em  $\text{D}_2\text{O}$ .

No caso do arranjo *trans* a constante de menor valor (2,3 Hz) poderia corresponder a  $J_g$ , mas o maior valor (7,2 Hz) é muito baixo para um  $J_t$  mesmo levando-se em conta os efeitos dos substituintes. Por outro lado, o valor 2,3 Hz é consistente com um  $J_g$ , enquanto 7,2 Hz é um valor coerente para  $\frac{1}{2}(J_g + J_t)$ . Assim sendo,  $J_t$  tem um valor de 12,1 Hz, um valor normal para este tipo de acoplamento.<sup>41</sup>

Também para o carbacol, os valores de  $J$  ( $J_{5,6} = 7,2$  Hz e  $J_{5,6'} = 2,3$  Hz) apontam para a conformação *gauche* como sendo a preferencial.

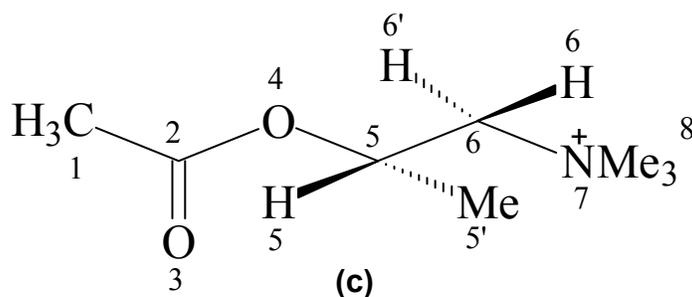
**Tabela 3.** Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  do carbacol em  $\text{D}_2\text{O}$  em 500 MHz.

Núcleo	$\delta$ (ppm)
	experimental
H5/5'	4,50
H6/6'	3,70
H8	3,22

**Tabela 4.** Constantes de acoplamento para o carbacol em  $\text{D}_2\text{O}$  em 500 MHz.

J	J/Hz
$^3J(5,6)$	7,2
$^3J(5,6')$	2,3

## 4.1.3. Metacolina



Embora a metacolina (c) seja uma molécula relativamente simples, a interpretação de seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  não é um exercício trivial, pois, assim como acontece com o espectro da acetilcolina a presença do grupo éster e principalmente da amina quaternária governam o comportamento dos sinais. Contudo uma característica distingue os dois espectros: os dois hidrogênios ligados a **C6** não são distinguíveis no espectro da acetilcolina (Figura 5), enquanto os hidrogênios correspondentes na metacolina o são (Figura 8). Essa diferença permite a determinação das constantes de acoplamento de interesse diretamente do espectro sem a necessidade do tratamento feito para a acetilcolina e para o carbacol, embora o aspecto alargado dos multipletos dos hidrogênios metilênicos se mantenha nos espectros dos três compostos.

O espectro de hidrogênio da metacolina (Figura 8) caracteriza-se como um sistema AMX formado pelos dois hidrogênios metilênicos (A, M) e pelo hidrogênio metínico (X), numerados neste trabalho como **6**, **6'** e **5**, respectivamente. Como o sinal referente ao hidrogênio metínico apresenta-se bastante alargado utilizou-se os sinais dos hidrogênios metilênicos para a determinação das constantes de acoplamento.<sup>27</sup>

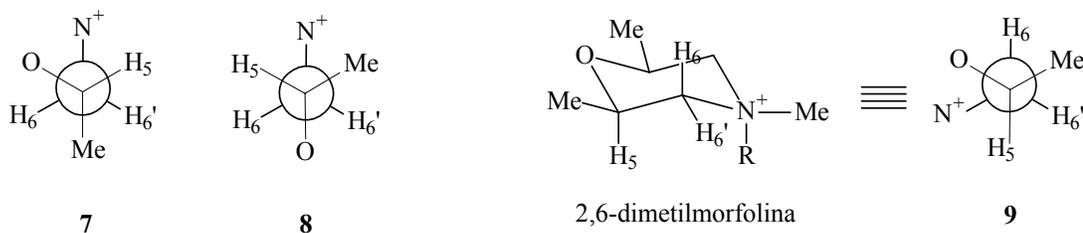
Cada sinal metilênico envolve um acoplamento geminal ( $J_{6,6'}$ ) e um vicinal ( $J_{5,6}$  ou  $J_{5,6'}$ ); assim o sinal de H6 e H6' é composto de um duplete de duplete. Para ajudar na atribuição dos sinais, procedeu-se a análise dos espectros de HSQC e COSY da metacolina (Anexo III). Os sinais atribuídos e os respectivos deslocamentos químicos estão na Tabela 5. A Tabela 6 mostra as principais constantes de acoplamento da metacolina, obtidas experimentalmente a partir do

espectro da Figura 8.<sup>27</sup>

Pela ordem de grandeza dos valores de  $J = 9,5$  Hz e  $J' = 2,3$  Hz os rotamêros preferenciais da metacolina apresentam constantes de acoplamento vicinal *trans* e *gauche*, o que leva aos confôrmeros **7** e **8**.

O fato de haver uma significativa diferença entre os deslocamentos químicos de H<sub>6</sub> e H<sub>6'</sub> indica que a metacolina apresenta uma conformação preferencial, mas não é trivial determinar qual seria esta conformação porque os ambientes dos dois hidrogênios diferem em ambos confôrmeros.

Para o diedro O<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>-N<sub>7</sub>, a molécula de 2,6-dimetilmorfolina (**9**) serve como um modelo rígido para o confôrmero *gauche* (confôrmero **7**). Dados retirados do espectro da 2,6-dimetilmorfolina obtidos da literatura<sup>27</sup> mostram valores de J's vicinais hidrogênio-hidrogênio:  $J = 11,2$  Hz e  $J' = 2,1$  Hz similares aos da metacolina. Os valores de deslocamento químico da metila metínica para ambas as moléculas também são próximos (Me;  $\delta_{\text{metacolina}} = 1,32$  ppm e  $\delta_{\text{morfolina}} = 1,23$  ppm)<sup>27</sup>. A análise deste modelo rígido aponta o confôrmero **7** como sendo o preferencial para a metacolina, ou seja, o confôrmero preferencial apresenta o ângulo diedro O<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>-N<sub>7</sub> *gauche* como igualmente observado para a acetilcolina e para o carbacol.



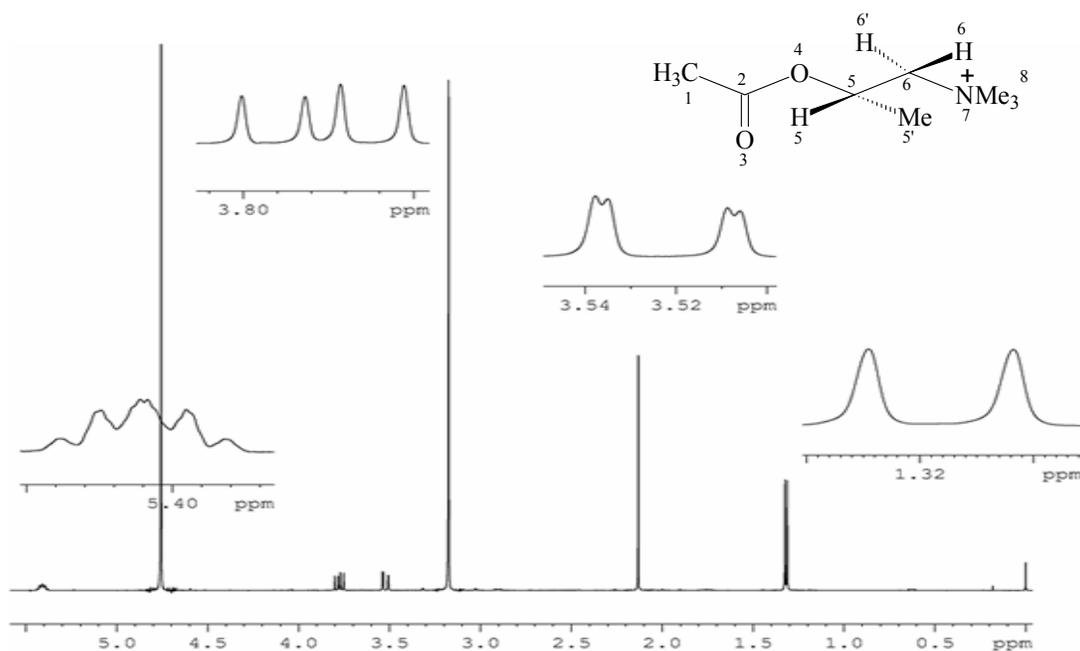
A pequena, mas significativa, diferença observada entre os valores de  $J_{5,6}$  e  $J_{5,6'}$  do modelo da morfolina e daqueles da metacolina é melhor explicada se considerarmos que o ângulo diedro O<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>-N<sub>7</sub> na metacolina se afasta do valor de 60° observado na morfolina. Com base na relação de Karplus (Figura 4, p. 14) o afastamento do valor do ângulo diedro de 60° leva à diminuição da constante de acoplamento.<sup>22</sup> De posse dos valores deste diedro obtidos nos cálculos teóricos esta hipótese será melhor discutida.

**Tabela 5.** Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  da metacolina em  $\text{D}_2\text{O}$ 

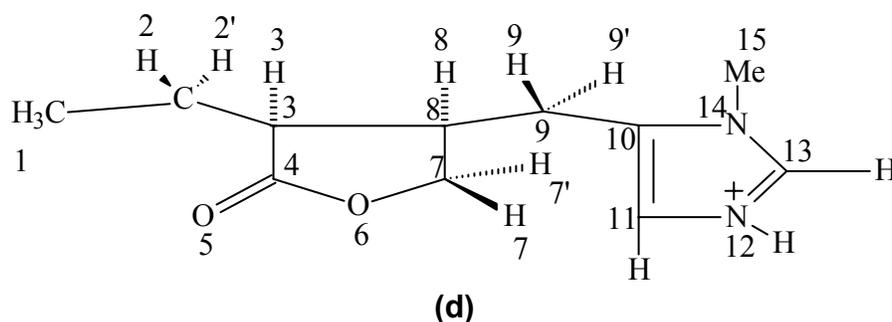
Núcleo	$\delta$ (ppm)	
	experimental	literatura <sup>a</sup>
H1	2,14	2,10
H5	5,42	5,46
H5'	1,32	1,30
H6	3,78	3,77
H6'	3,53	3,53
H8	3,16	3,18

<sup>a</sup> Ref. 22 a 300 MHz.**Tabela 6.** Constantes de acoplamento para a metacolina em  $\text{D}_2\text{O}$ 

J	J/Hz	J <sup>a</sup> /Hz
$^3\text{J}(5,5')$	6,3	---
$^3\text{J}(5,6)$	9,5	9,4
$^3\text{J}(5,6')$	1,3	1,3
$^2\text{J}(6,6')$	14,4	---

<sup>a</sup> Ref. 22 a 300 MHz**Figura 8.** Espectro experimental de RMN de  $^1\text{H}$  a 500 MHz para a metacolina em  $\text{D}_2\text{O}$ . Os hidrogênios 6 (3,7 ppm) e 6' (3,52 ppm) são distinguíveis.

#### 4.1.4. Pilocarpina

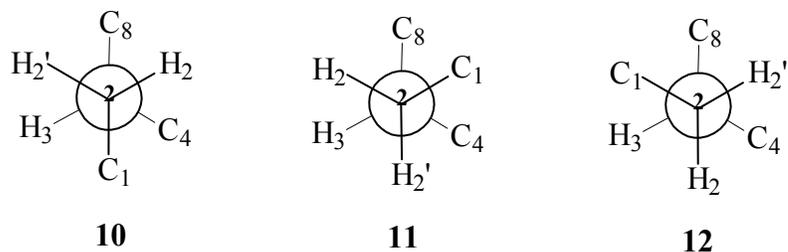


A análise dos valores de  $^3J_{\text{HH}}$  do espectro de hidrogênio da pilocarpina (**d**) permite estudar diretamente o comportamento de quatro diferentes diedros:  $\text{C}_1\text{-C}_2\text{-C}_3\text{-C}_8$ ,  $\text{C}_7\text{-C}_8\text{-C}_9\text{-C}_{10}$ ,  $\text{C}_2\text{-C}_3\text{-C}_8\text{-C}_9$  e  $\text{C}_4\text{-O}_6\text{-C}_7\text{-C}_8$ , sendo estes dois últimos ligados à flexibilidade do anel da lactona. Contudo, o aspecto mais relevante do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da pilocarpina (Figura 9) diz respeito aos sinais dos hidrogênios 3 e 9 que aparecem sobrepostos em 2,90 ppm aproximadamente. Não apenas pelos sinais característicos de segunda ordem, mas, também, porque sob estes sinais está parte da informação sobre um dos principais ângulos que respondem pela conformação da pilocarpina. Partindo da mesma análise feita para os demais agonistas com relação à ordem de grandeza das constantes de acoplamento é possível inferir a conformação da pilocarpina envolvendo os ângulos torsionais  $\text{C}_1\text{-C}_2\text{-C}_3\text{-C}_8$ ,  $\text{C}_7\text{-C}_8\text{-C}_9\text{-C}_{10}$  e  $\text{C}_2\text{-C}_3\text{-C}_8\text{-C}_9$ . O comportamento dos diedros  $\text{C}_8\text{-C}_9\text{-C}_{10}\text{-C}_{11}$  e  $\text{C}_4\text{-O}_6\text{-C}_7\text{-C}_8$  será discutido com base nos resultados dos cálculos teóricos. A atribuição de todos os sinais está listada na Tabela 7 e foi feita a partir da análise dos espectros HSQC e COSY da pilocarpina (Anexo III). As constantes de acoplamento encontram-se listadas na Tabela 8 e foram obtidas a partir do espectro da Figura 9.

Em um procedimento semelhante ao feito para determinar o confômero preferencial para a acetilcolina, os valores das constantes de acoplamento da pilocarpina são comparados com os valores antecipados se os confômeros *trans* e *gauche* são favorecidos.

Inicialmente vamos analisar o diedro  $\text{C}_1\text{-C}_2\text{-C}_3\text{-C}_8$ , cujos valores de  $J$

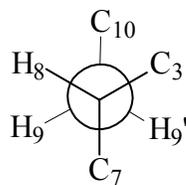
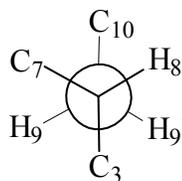
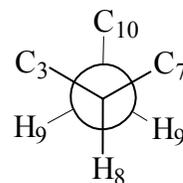
vicinais hidrogênio-hidrogênio são  $J = 7,4$  Hz e  $J' = 7,0$  Hz. As estruturas **10**, **11** e **12** são os principais confôrmeros possíveis.



Pelas ordens de grandeza, os valores de  $J_{2,3} = 7,0$  Hz e  $J_{2',3} = 7,4$  Hz são em grande parte influenciados por acoplamentos *trans* no equilíbrio conformacional (confôrmeros **10** e **12**). Se, por exemplo, o confôrmero **11** fosse o preferencial, os valores das constantes de acoplamento deveriam estar mais próximos de 4,0 Hz mesmo levando-se em consideração os desvios da relação de Karplus (p. 14), uma vez que os ângulos diedros entre cada um dos pares de hidrogênios H2/H3 e H2'/H3 são cerca de  $60^\circ$ . Por isso, os valores médios de 7,0 Hz levam a eliminar o confôrmero **11** como um confôrmero preferencial.

O valor de  $J$  para os hidrogênios 2' e 3 apontam uma ligeira preferência para o rotâmero **12**, mas a pequena diferença entre os valores das constantes de acoplamento não permite afirmar qual rotâmero está de fato em maior quantidade no equilíbrio apenas com base nestes dados. Na verdade, pode-se esperar que ambos os confôrmeros estejam aproximadamente igualmente populados devido à livre rotação da ligação C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>. A análise dos outros ângulos diedros e dos valores obtidos pelos cálculos computacionais poderá dar outras informações no sentido de esclarecer uma possível preferência conformacional para este diedro.

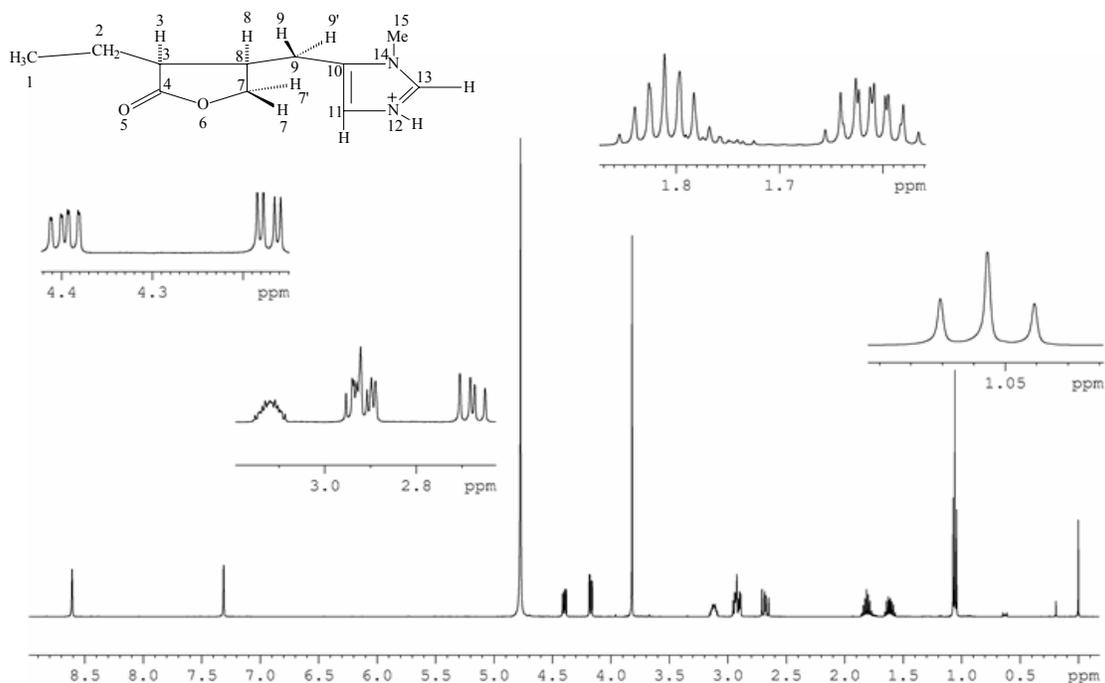
Seguindo o mesmo procedimento para análise do diedro C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>, cujos valores de  $J$  vicinal hidrogênio-hidrogênio são  $J = 4,6$  Hz e  $J' = 11,3$  Hz. As estruturas **13**, **14** e **15** são os principais confôrmeros possíveis (lembrando que C<sub>10</sub> pertence ao volumoso grupo imidazol e C<sub>3</sub> ao anel da lactona).

**13****14****15**

Para este diedro, o confômero **15** não é uma estrutura possível porque ele apresenta apenas acoplamentos *gauche* entre os hidrogênios, o que não é corroborado pelos valores experimentais de J.

Os valores de  $^3J(8,9) = 11,3$  Hz e  $^3J(8,9') = 4,6$  Hz (Tabela 8) apontam para um arranjo preferencial *trans* entre H8 e H9, enquanto os hidrogênios H8 e H9' devem apresentar um arranjo *gauche* na maior parte do tempo no equilíbrio conformacional, sendo, portanto, o rotâmero **14** o preferencial. Além do que, nesta conformação ambos os anéis estão em um arranjo espacial bastante favorável, o que é mais um fator de estabilização para esta geometria.

Em um trabalho anterior realizado por Maat et al.<sup>42</sup> sobre o estudo conformacional da pilocarpina a partir do espectro de RMN de hidrogênio a 200 MHz, o autor comete um equívoco ao atribuir os valores de deslocamento dos hidrogênios aqui numerados como H9 e H9', invertendo-os (na Tabela 7 a numeração dos hidrogênios já aparece corrigida em relação ao artigo original). Tal equívoco leva o autor a eleger a estrutura **13** como a mais estável, embora toda a sua discussão seja em cima da estrutura **14** como sendo a mais estável, isto é, ele apresenta uma estrutura que não é compatível com a sua numeração atribuída aos hidrogênios. Contudo, sem dúvida, levando-se em conta a ordem de grandeza dos  $^3J_{HH}$  apresentados no trabalho<sup>42</sup> a estrutura compatível com sua discussão é a mesma da apresentada neste estudo.



**Figura 9.** Espectro experimental de RMN de  $^1\text{H}$  a 500 MHz para a pilocarpina em  $\text{D}_2\text{O}$ .

**Tabela 7.** Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  da pilocarpina em  $\text{D}_2\text{O}$

Núcleo	$\delta$ (ppm)	
	experimental	literatura <sup>a</sup>
H1	1,05	1,07
H2	1,80	1,79
H2'	1,60	1,66
H3	2,93	2,97
H7	4,16	4,15
H7'	4,39	4,33
H8	3,12	3,15
H9	2,67	2,69
H9'	2,90	2,94
H11	7,25	7,35
H13	8,62	8,66
H15	3,81	3,84

a. Ref. 42 a 200 MHz

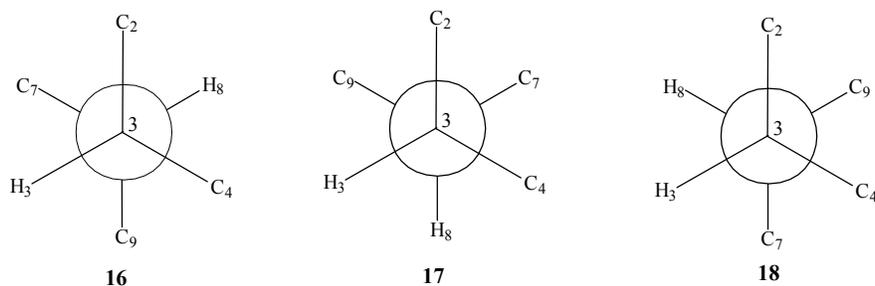
**Tabela 8.** Constantes de acoplamento para a pilocarpina em D<sub>2</sub>O

<b>J</b>	<b>J/Hz</b>	<b>J<sup>a</sup>/Hz</b>
<sup>3</sup> J(1,2)	7,4	7,4
<sup>3</sup> J(1,2')	7,4	7,4
<sup>2</sup> J(2,2')	-14,6	-14
<sup>3</sup> J(2,3)	7,0	6,7
<sup>3</sup> J(2',3)	7,4	7,5
<sup>3</sup> J(3,8)	8,8	8,7
<sup>2</sup> J(7,7')	-9,5	-9,5
<sup>3</sup> J(7,8)	3,4	3,3
<sup>3</sup> J(7',8)	5,9	5,8
<sup>4</sup> J(7',9')	0,7	1,0
<sup>3</sup> J(8,9)	11,3	11,3
<sup>3</sup> J(8,9')	4,6	4,5
<sup>2</sup> J(9,9')	-16,2	-16,2

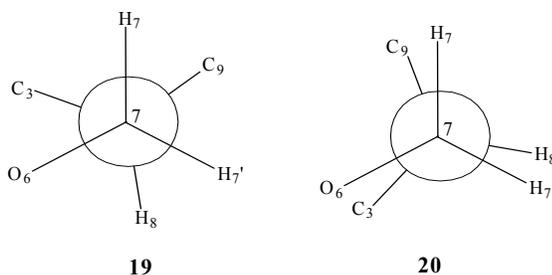
a Ref. 42 a 200 MHz

A influência da conformação do anel da lactona sobre a estabilização das estruturas de mínimo da pilocarpina foi estudada com base nos valores das constantes de acoplamento <sup>3</sup>J<sub>H<sub>3</sub>H<sub>8</sub> (diedro C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>), <sup>3</sup>J<sub>H<sub>7</sub>H<sub>8</sub> e <sup>3</sup>J<sub>H<sub>7</sub>'H<sub>8</sub> (diedro C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>7</sub>-O<sub>6</sub>).</sub></sub></sub>

Não sendo a estrutura **16** uma conformação possível para o diedro C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub> devido a rigidez do anel, têm-se as estruturas **17** e **18** como os principais confôrmeros possíveis.



O valor de  ${}^3J_{H_3H_8} = 8,8$  Hz aponta para uma conformação *synclinal*. Podendo este diedro assumir qualquer valor próximo aos das estruturas **17** e **18**. A análise os valores de  ${}^3J_{H_7H_8}$  e  ${}^3J_{H_7'H_8}$  ajudará na escolha do confômero mais favorecido. As estruturas **19** e **20** correspondem aos possíveis confômeros com relação aos hidrogênios H7/H8 e H7'/H8 quando o diedro C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub> varia entre **17** e **18**.



Pela Tabela 8, observa-se que os valores  ${}^3J_{H_7H_8} = 3,4$  Hz e  ${}^3J_{H_7'H_8} = 5,9$  Hz não são compatíveis com uma relação *trans* H7/H8 nem com uma relação *gauche* desta magnitude entre H7'/H8, ou seja, o confômero **19** não é o confômero preferencial neste caso. O confômero **20** está de acordo com os valores de acoplamento encontrados; o que nos leva indiretamente ao confômero **18** para o diedro C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>. Esta conformação mostra uma conformação envelope para o anel de lactona com o átomo de oxigênio do mesmo lado dos átomos de carbono C2 e C9 de um plano imaginário passando pelo anel. Esta conformação do anel será analisada pelos cálculos teóricos com relação ao diedro C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>7</sub>-O<sub>6</sub>.

## 4.2. Análise de efeito de solvente

Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em diferentes solventes para cada um dos agonistas foram obtidos e as respectivas constantes de acoplamento determinadas. Os solventes utilizados, seus momentos de dipolo, constantes dielétricas e viscosidades estão apresentados na Tabela 9. A escolha dos solventes levou em consideração a maior faixa de variação de polaridade possível, mas a solubilidade dos agonistas mostrou-se um fator limitante para esta escolha. A obtenção dos sinais de hidrogênios em alguns solventes mostrou-se bastante difícil a ponto de ser necessária uma grande acumulação de pontos que nem sempre resultaram em sinais de intensidades satisfatórias, como pode ser observado nos espectros do Anexo II. Também por conta da baixa solubilidade, o estudo do efeito de solvente a baixas temperaturas mostrou-se inviável para estes compostos.

**Tabela 9.** Momento de dipolo, constante dielétrica e viscosidade dos solventes utilizados

Solvente	Momento dipolar (D)	Constante dielétrica	Viscosidade (cP)
Acetona	2,88	20,7	0,31
Acetonitrila	3,92	37,5	0,37
Água	1,85	78,5	0,89
Clorofórmio	1,01	4,8	0,54
Diclorometano	1,60	9,1	0,45
DMSO	4,30	46,7	1,99
Metanol	1,70	32,7	0,54

As Tabelas 11 a 17 mostram os valores de deslocamento químico e das constantes de acoplamento dos hidrogênios para a acetilcolina, a molécula escolhida como padrão, e de cada um dos agonistas estudados em diferentes solventes.

Os valores não mostram alterações significativas que indiquem uma

mudança nas conformações presentes quando da variação dos solventes. Para todos os agonistas estudados a conformação *gauche* se mantém como sendo a mais estável independente do solvente utilizado, ou seja, há ausência de efeito de solvente sobre o equilíbrio conformacional destes tipos de moléculas.

O comportamento dos agonistas de não alterarem sua conformação principal quando da mudança do meio de solvatação leva naturalmente a busca de um fator capaz de explicar a estabilidade da estrutura *gauche*. O *efeito gauche*, que consiste na tendência em adotar a estrutura que possui o maior número de interações *gauche* entre pares de elétrons adjacentes ou entre ligações polares, certamente está presente nestas estruturas, bem como os efeitos hiperconjugativos a ele associados. Porém, um outro fator é de extrema importância na estabilização destes confôrmeros: a interação eletrostática entre o átomo de nitrogênio positivamente carregado e o átomo de oxigênio polarizado da porção éster. Para estudar a importância dos efeitos conjugativos e o papel da interação eletrostática N<sup>+</sup>/O foram realizados alguns estudos teóricos. Os resultados deste estudo e as discussões pertinentes a eles serão mostrados no item 4.3.2.

**Tabela 10.** Momento de dipolo do confôrmero mais estável de cada composto

Confôrmero	Momento dipolar (D)
Acetilcolina	10,57
Carbacol	8,79
Metacolina	10,21
Pilocarpina	20,20

### 4.2.1. Acetilcolina

Para a acetilcolina os dados das constantes de acoplamento apresentados na Tabela 11 foram retirados da dissertação de mestrado de Segal, E. M.<sup>43</sup> que na ocasião desenvolveu parte de seu trabalho no Laboratório de Físico-Química Orgânica (LFQO-IQ), nosso grupo de estudos. Optou-se por não repetir a obtenção dos espectros para a acetilcolina em outros solventes, dentre outros motivos, pelos desnecessários gastos e uso de tempo de equipamento.

**Tabela 11.** Constantes de acoplamento para a acetilcolina em diferentes solventes<sup>a</sup>

Solvente	<sup>3</sup> J <sub>5,6</sub> <sup>b</sup>	<sup>3</sup> J <sub>5,6'</sub>
Acetona	7,2	2,6
Acetonitrila	7,2	2,7
Água	7,2	2,3
Clorofórmio	7,2	2,3
DMSO	7,3	2,6
Metanol	7,1	2,5

<sup>a</sup>Ref. 43 <sup>b</sup> valores de J em Hz

### 4.2.2. Carbacol

Os dados dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H para o carbacol em diferentes solventes estão resumidos nas Tabelas 12 e 13. O composto se mostrou praticamente insolúvel em acetona impossibilitando a aquisição do espectro de RMN de <sup>1</sup>H. Em DMSO, o formato extremamente alargado dos sinais não permite a obtenção das constantes de acoplamento como pode ser visto no respectivo espectro no Anexo II.

**Tabela 12.** Deslocamentos químicos para o  $^1\text{H}$  do carbacol em diferentes solventes<sup>a</sup>

Solvente	Núcleo			
	H1	H5/5'	H6/6'	H8
Acetonitrila	5,50	4,38	3,54	3,16
Água	--- <sup>b</sup>	4,50	3,71	3,22
Clorofórmio	4,76	4,50	3,70	3,20
DMSO	6,80	4,34	3,62	3,18
Metanol	---	4,49	3,70	3,24
pH fisiológico	---	4,50	3,71	3,42

<sup>a</sup> valores de J em Hz. <sup>b</sup> valores não determinados

**Tabela 13.** Constantes de acoplamento para o carbacol em diferentes solventes

Solvente	$^3J_{5,6}$	$^3J_{5,6'}$
Acetonitrila	7,0	2,4
Água	7,2	2,3
Clorofórmio	7,0	2,2
DMSO	--- <sup>b</sup>	---
Metanol	7,0	2,4
pH fisiológico	7,0	2,2

<sup>a</sup> valores de J em Hz. <sup>b</sup> valores não determinados

### 4.2.3. Metacolina

Os dados dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para a metacolina em diferentes solventes estão resumidos nas Tabelas 14 e 15. Não foi possível obter os principais valores de J em acetonitrila por conta do aspecto dos sinais como mostrado no Anexo II.

**Tabela 14.** Deslocamentos químicos para o  $^1\text{H}$  da metacolina em diferentes solventes<sup>a</sup>

Solvente	Núcleo					
	H1	H5	H5'	H6	H6'	H8
Acetona	2,14	5,48	1,34	3,94	4,34	3,50
Acetonitrila	2,04	5,32	1,28	3,80	3,66	3,24
Água	2,14	5,41	1,32	3,78	3,52	3,16
Clorofórmio	2,12	5,46	1,40	3,79	4,38	3,54
Diclorometano	2,14	5,44	1,38	3,74	4,30	3,46
DMSO	2,06	5,25	1,23	3,70	3,62	3,14
Metanol	2,12	5,42	1,32	3,76	3,62	3,24
pH fisiológico	2,14	5,42	1,32	3,78	3,53	3,16

<sup>a</sup> valores de J em Hz.

**Tabela 15.** Constantes de acoplamento para a metacolina em diferentes solventes<sup>a</sup>

Solvente	$^3J_{5,5'}$	$^3J_{5,6}$	$^3J_{5,6'}$	$^2J_{6,6'}$
Acetona	6,4	9,6	1,4	-14,2
Acetonitrila	6,4	--- <sup>b</sup>	---	---
Água	6,3	9,5	1,3	-14,4
Clorofórmio	6,4	9,6	1,2	-14,1
Diclorometano	6,4	9,6	1,4	-14,2
DMSO	6,4	9,0	---	-14,1
Metanol	6,4	9,2	1,5	-14,4
pH fisiológico	6,4	9,3	1,2	-14,6

<sup>a</sup> valores de J em Hz. <sup>b</sup> valores não determinados

## 4.2.4. Pilocarpina

Os dados dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para a pilocarpina em diferentes solventes estão resumidos nas Tabelas 16 e 17.

**Tabela 16.** Deslocamentos químicos para o  $^1\text{H}$  da pilocarpina em diferentes solventes<sup>a</sup>

Solvente	Núcleo											
	H1	H2	H2'	H3	H7	H7'	H8	H9	H9'	H11	H13	H15
Acetona	1,11	1,80	1,64	3,57	4,34	4,12	3,18	3,00	2,72	7,40	8,72	4,00
Acetonitrila	1,06	1,77	1,56	---	4,22	4,00	2,98	---	2,54	7,24	8,50	3,78
Água	1,05	1,80	1,60	2,93	4,39	4,16	3,12	2,90	2,67	7,25	8,62	3,81
Clorofórmio	1,12	1,82	1,62	2,82	4,33	4,10	3,08	2,91	2,65	7,40	8,85	3,82
Diclorometano	1,11	1,87	1,43	--- <sup>b</sup>	4,25	4,01	2,96	---	2,52	7,20	8,74	3,80
DMSO	1,01	1,68	1,52	2,80	4,26	3,98	2,96	2,78	2,54	7,60	9,16	3,80
Metanol	1,12	1,82	1,62	2,82	4,33	4,10	3,08	2,91	2,65	7,40	8,85	3,82
Ph fisiológico	1,06	1,81	1,60	2,92	4,39	4,18	3,16	2,90	2,66	7,24	8,50	3,80

<sup>a</sup> valores de em ppm. <sup>b</sup> valores não determinados

**Tabela 17.** Constantes de acoplamento para a pilocarpina em diferentes solventes<sup>a</sup>

Solvente	$^3J_{1,2}$	$^2J_{2,2'}$	$^3J_{2,3}$	$^3J_{2',3}$	$^3J_{3,8}$	$^2J_{7,7'}$	$^3J_{7,8}$	$^3J_{7',8}$	$^4J_{7',9'}$	$^3J_{8,9}$	$^3J_{8,9'}$	$^2J_{9,9'}$
Acetona	7,3	-14,4	7,3	7,4	--- <sup>b</sup>	-9,3	2,9	5,9	1,0	11,6	4,1	-16,1
Acetonitrila	7,5	-14,6	7,1	7,4	8,4	-9,5	2,9	5,8	0,9	11,7	4,1	-16,0
Água	7,5	-14,6	7,0	7,4	8,8	-9,5	3,4	5,9	0,7	11,3	4,6	-16,2
Diclorometano	7,4	-14,3	7,1	7,5	8,5	-9,6	2,0	5,3	---	11,8	3,4	-15,9
DMSO	7,5	-14,8	7,2	7,4	---	-9,1	3,3	5,9	---	11,4	---	-16,2
Metanol	7,4	-14,9	7,1	7,5	8,3	-9,4	3,2	5,8	---	11,5	4,3	-16,1
Ph fisiológico	7,5	-14,6	7,0	7,4	8,8	-9,5	3,4	5,9	0,7	11,6	4,6	-16,2

<sup>a</sup> valores de J em Hz. <sup>b</sup> valores não determinados

### 4.3. Estudo Teórico Computacional

Como a energia de uma molécula depende de sua geometria, pequenas mudanças na estrutura podem acarretar grandes mudanças na energia total da molécula. Por isso, conhecer a geometria de equilíbrio conformacional é muito importante para estudos computacionais. Do ponto de vista da teoria do orbital molecular, a energia de uma molécula é a soma da energia dos orbitais ocupados<sup>36</sup>. A interpretação física é dada em termos de sobreposição efetiva dos orbitais.

O estudo computacional foi dividido em três etapas:

- 1- construção de uma superfície de energia potencial;
- 2- otimização de geometria e cálculo de frequência de infravermelho;
- 3- cálculo de interações do tipo NBO.

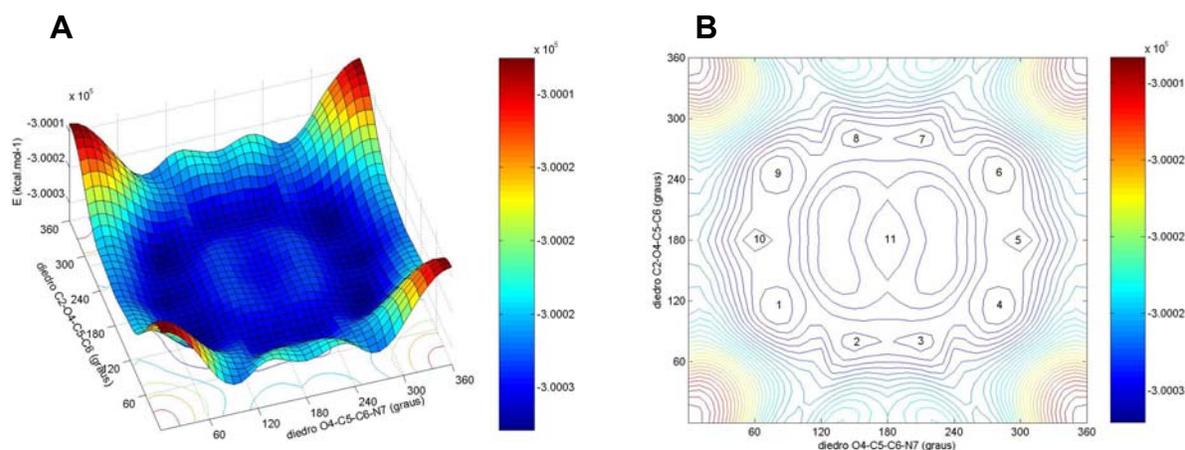
#### 4.3.1. Superfície de Energia Potencial: determinação dos mínimos.

O modo como a energia de um sistema molecular varia devido às pequenas mudanças em sua estrutura pode ser evidenciada pela sua *superfície de energia potencial* (PES – Potential Energy Surface). Uma superfície de energia potencial é uma relação matemática que relaciona a estrutura molecular e a energia resultante. Para sistemas grandes, a superfície terá tantas dimensões quanto forem os graus de liberdade internos das moléculas. As estruturas de menor energia encontradas nos gráficos de PES são as chamadas *estruturas de mínimos*.<sup>36</sup>

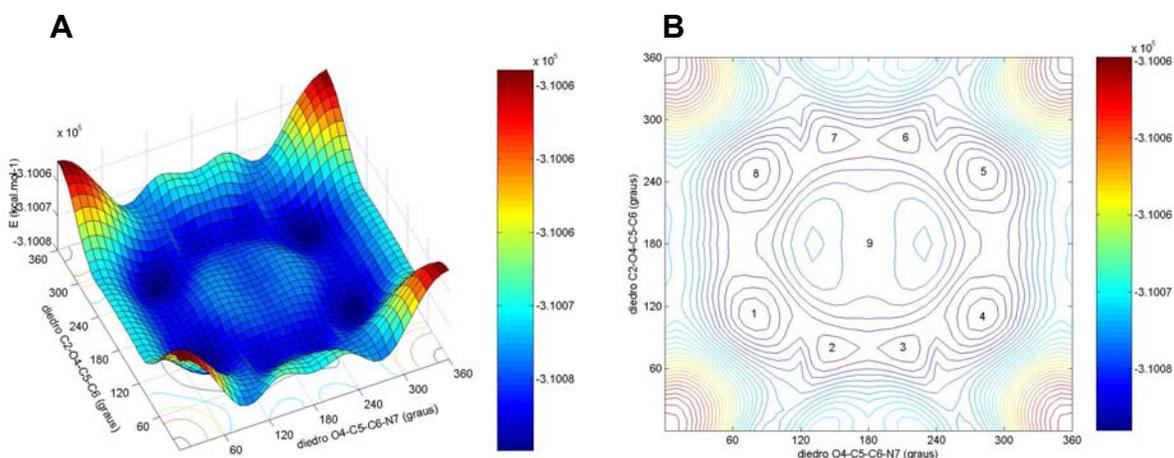
Construiu-se para cada uma das moléculas em estudo uma superfície de energia potencial (Figuras 10A, 11A, 12A e 13A). Por uma questão de custo computacional, utilizou-se o método Hartree-Fock com o conjunto de bases 6-31g. Para o tipo de molécula estudada, consideraram-se apenas dois graus de liberdade internos às moléculas e a energia foi colocada acima do plano formado por eles. Em cada estrutura molecular, um dos ângulos diedros era mantido fixo, enquanto o outro sofria incrementos de 10°. Desta forma obteve-se 1369 pontos

para cada agonista. Cada ponto corresponde a valores específicos das duas variáveis e, portanto, representa uma estrutura molecular particular.

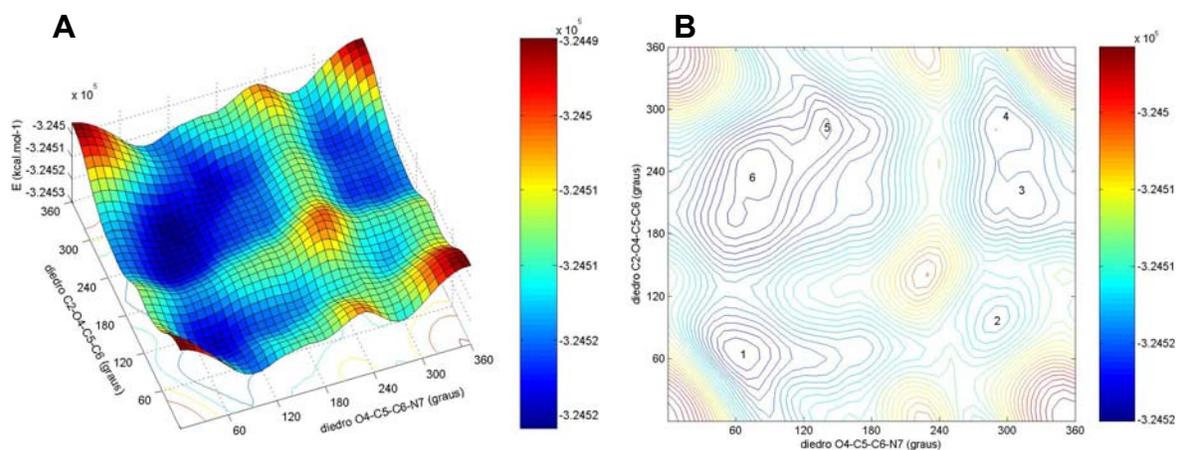
Como já discutido no item 1.3, para o carbacol e metacolina o estudo está focado nos diedros  $C_2-O_4-C_5-C_6$  e  $O_4-C_5-C_6-N_7$  que descrevem a maioria do comportamento conformacional destes compostos; e para a pilocarpina a sua conformação é em grande parte definida pelos três ângulos torsionais  $C_1-C_2-C_3-C_8$ ,  $C_7-C_8-C_9-C_{10}$  e  $C_8-C_9-C_{10}-C_{11}$ , com foco para os dois últimos.



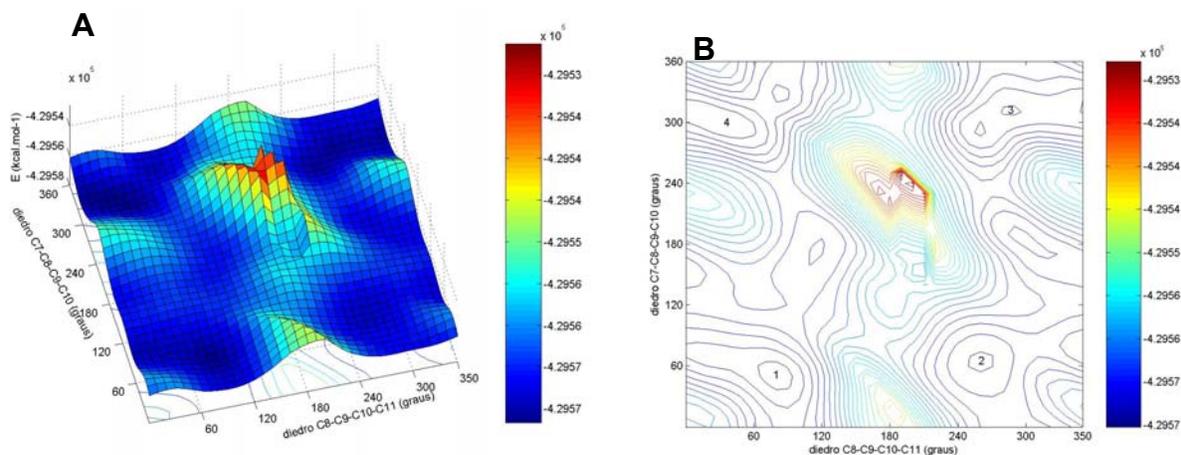
**Figura 10.** Acetilcolina: (A) superfície de energia potencial; (B) mapa de contorno indicando as estruturas de mínimos locais.



**Figura 11.** Carbacol: (A) superfície de energia potencial; (B) mapa de contorno indicando as estruturas de mínimos locais.



**Figura 12.** Metacolina: (A) superfície de energia potencial; (B) mapa de contorno indicando as estruturas de mínimos locais.



**Figura 13.** Pilocarpina: (A) superfície de energia potencial; (B) mapa de contorno indicando as estruturas de mínimos locais.

Analisando-se as superfícies de energia potencial para cada uma das moléculas em estudo observam-se poços de energia potencial, os mínimos de energia. Saber se estas estruturas são mínimos reais ou apenas “pontos de sela” requer a re-otimização de cada uma destas estruturas. Os mapas de contorno (Figuras 10B, 11B, 12B e 13B) permitem uma visão mais clara das estruturas eleitas como as de menor energia para cada um dos agonistas.

### 4.3.2. Otimização de geometria e cálculo de freqüência.

As estruturas de mínimo obtidas nas PES's foram, então, re-otimizadas utilizando-se o método B3LYP e o conjunto de bases 6-311+g(d,p).

As otimizações de geometria, também chamadas de minimizações, geralmente tentam localizar na superfície de energia potencial as estruturas de mínimos. Embora as otimizações de geometria possam também localizar estruturas de transição, o interesse aqui se limita às estruturas de mínimo. Uma forma de garantir que a estrutura encontrada seja mesmo um mínimo e não um “ponto de sela” (um ponto que é um máximo em uma direção e um mínimo na outra) consiste em caracterizar os pontos estacionários através de cálculos de freqüência harmônica. Uma estrutura é de fato um mínimo quando o cálculo de freqüência não encontra nenhuma freqüência imaginária ou, dizendo de outro modo, nenhum valor negativo é encontrado para as freqüências harmônicas.<sup>36</sup>

O ponto de mínimo de menor energia é denominado de mínimo global e, em princípio, é o mais provável de ser observado experimentalmente. Contudo equilíbrios conformacionais podem ocorrer. O comportamento conformacional pode ser examinado calculando-se as quantidades termodinâmicas conhecidas, energia livre de Gibbs (G), entalpia (H) e entropia (S).

$$\text{À T constante:} \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

Na verdade, espera-se que a entropia não mude significativamente no caso de um sistema de confôrmeros em equilíbrio e, por isso, assume-se que  $\Delta G = \Delta H$ . Para comparações entre confôrmeros, esta pode ser uma hipótese válida.

Sendo a constante de equilíbrio para dois confôrmeros  $A \rightleftharpoons B$  dada por:

$$K_{eq} = \exp(-\Delta G^{\circ}/RT) \quad (6)$$

A variação de energia livre padrão de Gibbs,  $\Delta G^{\circ}$ , é dada pela expressão para a energia livre padrão de Gibbs total,  $\Delta G^{\text{tot}}$ , definida abaixo:

$$\Delta G^{\text{tot}} = \Delta E^{\text{ab initio}} \quad (7)$$

Dáí decorre que, pela distribuição de Boltzman, para duas espécies em equilíbrio, apenas as estruturas que apresentam uma diferença de energia ( $\Delta E$ ) menor do que  $2,0 \text{ kcal mol}^{-1}$  podem ser consideradas como tendo uma população significativa no equilíbrio conformacional.

Com essas considerações em mente, foi feita a re-otimização de geometria das estruturas de mínimo encontradas na superfície de energia potencial de cada uma das moléculas em estudo juntamente com os cálculos de frequências harmônicas no sentido de encontrar os confôrmeros mais estáveis.

### 4.3.2.1. Acetilcolina

São vários os confôrmeros possíveis para a acetilcolina dentro de uma faixa de energia relativamente estreita (Tabela 18). Dependendo do método e da base utilizadas, pequenas diferenças quanto às energias relativas e o confôrmero preferencial são encontradas.

**Tabela 18.** Ângulos diedros e energias relativas calculados dos confôrmeros mais estáveis da ACh<sup>+</sup> em solução

Confôrmero	C <sub>2</sub> -O <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub>	O <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> -N <sub>7</sub> <sup>a</sup>	ΔE <sup>b</sup>
TG <sup>-</sup>	-168,6	-74,5	0,00
A <sup>+</sup> G <sup>+</sup>	90,7	73,2	0,77
TT	-178,9	177,4	1,36
A <sup>-</sup> A <sup>-</sup>	-90,2	-117,6	1,99
G <sup>-</sup> T	-89,8	-178	2,00
G <sup>+</sup> T	88,4	168,7	2,04

<sup>a</sup> ângulos em graus. <sup>b</sup> energia em kcal mol<sup>-1</sup>.

Vários trabalhos da literatura<sup>11-20</sup> apontam para um mesmo conjunto de confôrmeros como sendo aqueles de menor energia conformacional, tendo a conformação *gauche* como a mais estável para o diedro O<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>-N<sub>7</sub>. Para o objetivo deste trabalho, os resultados experimentais e teóricos obtidos para a acetilcolina são extremamente satisfatórios. Primeiro, porque eles concordam entre si no que se refere ao confôrmero mais estável; segundo, porque, assim como ocorreu no estudo por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H, eles estão em acordo com os trabalhos que utilizam métodos computacionais similares<sup>11-20</sup>.

Desta forma, acredita-se que a mesma estratégia de estudo possa ser utilizada para os agonistas em estudo por se tratarem de moléculas semelhantes quanto ao comportamento estrutural, devido a suas funções biológicas.

### 4.3.2.2. Carbacol e Metacolina.

Também para estes dois agonistas os confôrmeros possíveis variam dentro de uma faixa de energia relativamente estreita (Tabela 19 e 20).

No caso do carbacol, a conformação preferencial é a  $A^+G^+$  (Figura 14). Em relação ao diedro  $O_4-C_5-C_6-N_7$ , deve-se observar que os três confôrmeros mais estáveis são *gauche*. A conformação *gauche* em relação ao diedro  $O_4-C_5-C_6-N_7$ , obtida pelos cálculos teóricos está de acordo com os dados de RMN de  $^1H$  (item 4.1.2). Se lembrarmos que, independentemente do solvente, os resultados de RMN de  $^1H$  também mostraram a conformação *gauche* como a mais estável para este diedro (Tabela 13), conclui-se ser de fato esta a geometria preferencial para o carbacol.

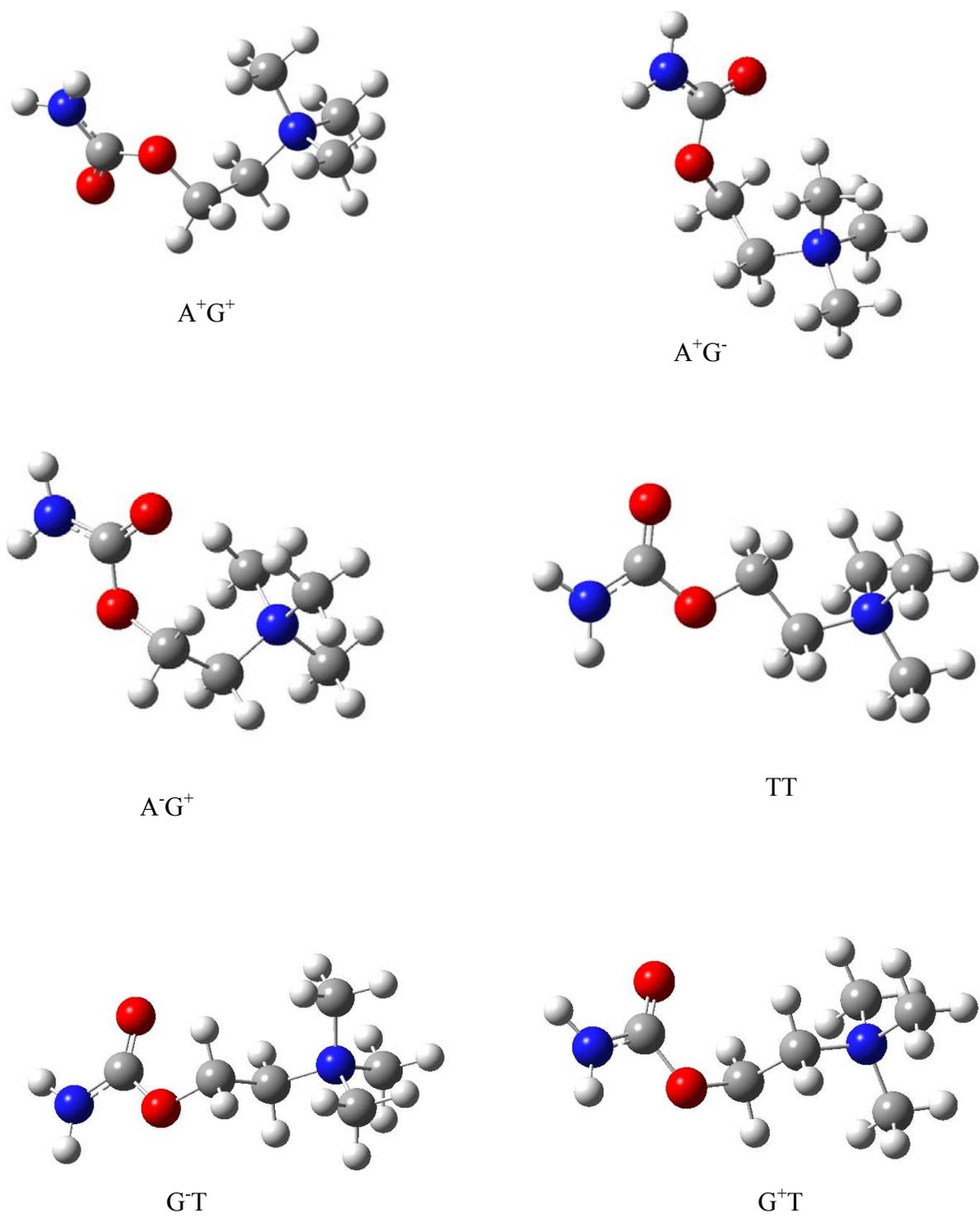
Como a espectroscopia de RMN de  $^1H$  não permitiu inferir nenhuma informação sobre o diedro  $C_2-O_4-C_5-C_6$ , temos como única fonte de informação os cálculos teóricos e estes apontam para uma conformação *anticlinal* ( $A^+G^+$ ) como a mais estável (Tabela 19 e Figura 14).

**Tabela 19.** Ângulos diedros e energias relativas calculados dos confôrmeros mais estáveis para o carbacol

Confôrmero	$C_2-O_4-C_5-C_6$	$O_4-C_5-C_6-N_7^a$	$\Delta E^b$
$A^+G^+$	91,4	71,8	0,00
$A^+G^-$	129,4	-84,2	0,85
$A^-G^+$	-118,3	70,3	1,00
TT	179,8	179,4	1,15
$G^-T$	-86,9	-170,9	1,28
$G^+T$	88,2	175,7	1,40

<sup>a</sup> ângulos em graus. <sup>b</sup> energia relativa em kcal mol<sup>-1</sup>.

Cálculos de NBO foram efetuados na tentativa de avaliar as principais interações de orbitais responsáveis pela estabilização de cada uma das estruturas e serão mostrados no próximo capítulo.



**Figura 14.** Estruturas dos confômeros de menor energia do carbacol.

A Tabela 20 mostra as energias relativas e os valores dos principais diedros calculados para os confôrmeros de menor energia da metacolina e cujas estruturas são mostradas na Figura 15. A diferença de 2,4 kcal mol<sup>-1</sup> entre o confôrmero mais estável, TG<sup>+</sup>, e o segundo, G<sup>-</sup>A, indica uma preferência conformacional quase que exclusiva pelo primeiro (Tabela 20).

**Tabela 20.** Ângulos diedros e energias relativas calculados dos confôrmeros mais estáveis da metacolina

Confôrmero	C <sub>2</sub> -O <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>7</sub>	O <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>7</sub> -N <sub>8</sub> <sup>a</sup>	ΔE <sup>b</sup>
TG <sup>+</sup>	-159,3	80,9	0,00
G <sup>-</sup> A <sup>+</sup>	-87,1	142,9	2,40
A <sup>-</sup> G <sup>-</sup>	-130	-30	2,80
G <sup>-</sup> G <sup>-</sup>	-60	-30	2,80

<sup>a</sup> ângulos em graus. <sup>b</sup> energia em kcal mol<sup>-1</sup>.

Repetindo a tendência observada para o carbacol, também para a metacolina a conformação *gauche* se mostrou a mais estável para o diedro O<sub>4</sub>C<sub>5</sub>C<sub>6</sub>N<sub>7</sub>, em concordância com os dados de espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H (item 4.1.3). O que leva a concluir ser de fato esta a geometria mais estável para este diedro. A conformação *trans* mostrou-se a mais estável para o diedro C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>C<sub>5</sub>C<sub>6</sub>.

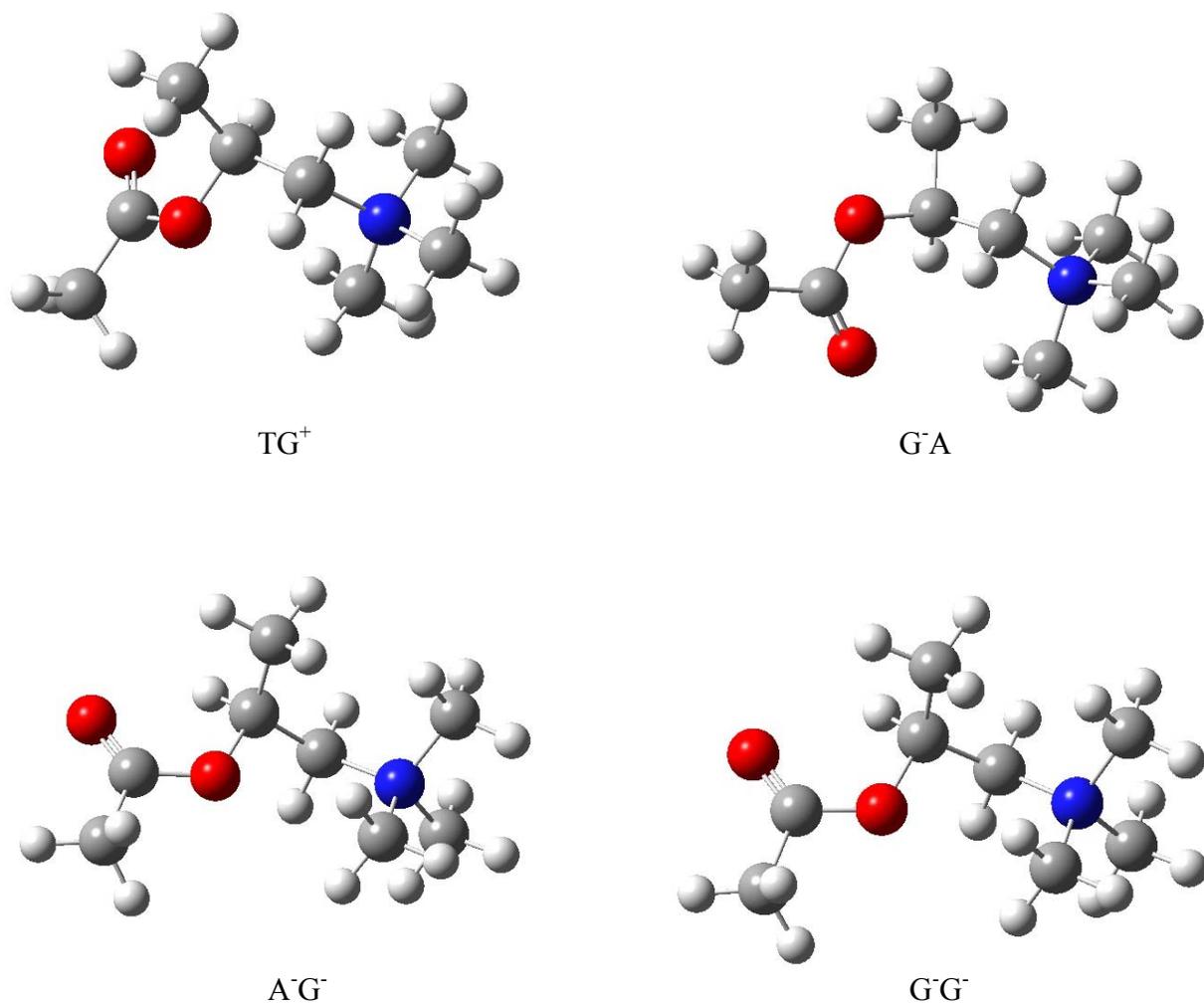


Figura 15. Estruturas dos confômeros de menor energia da metacolina.

### 4.3.2.3. Pilocarpina

De uma forma geral os cálculos para a pilocarpina apresentaram o confômero TG<sup>+</sup>C como o de menor energia. Deve-se lembrar que a conformação da pilocarpina é definida pelos três ângulos torsionais C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub> e C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>11</sub> (Figura 2B) e pela flexibilidade do anel da lactona.<sup>23</sup> investigada através dos diedros C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub> e C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>7</sub>-O<sub>6</sub>. A Tabela 21 mostra os confômeros mais estáveis encontrados para a pilocarpina com seus respectivos diedros e suas energias relativas obtidos pelos cálculos teóricos. Como dito anteriormente, confômeros com energia relativa superior a 2,5 kcal mol<sup>-1</sup> praticamente não estão presentes no equilíbrio conformacional, entretanto optou-se por apresentar o confômero G<sup>+</sup>G<sup>-</sup>G<sup>+</sup> justamente como um contra-argumento concreto para as discussões, uma vez que a pilocarpina é um etano com substituintes que diferem quanto à estrutura dos agonistas anteriormente discutidos neste trabalho.

**Tabela 21.** Ângulos diedros e energias relativas calculados dos confômeros mais estáveis da pilocarpina

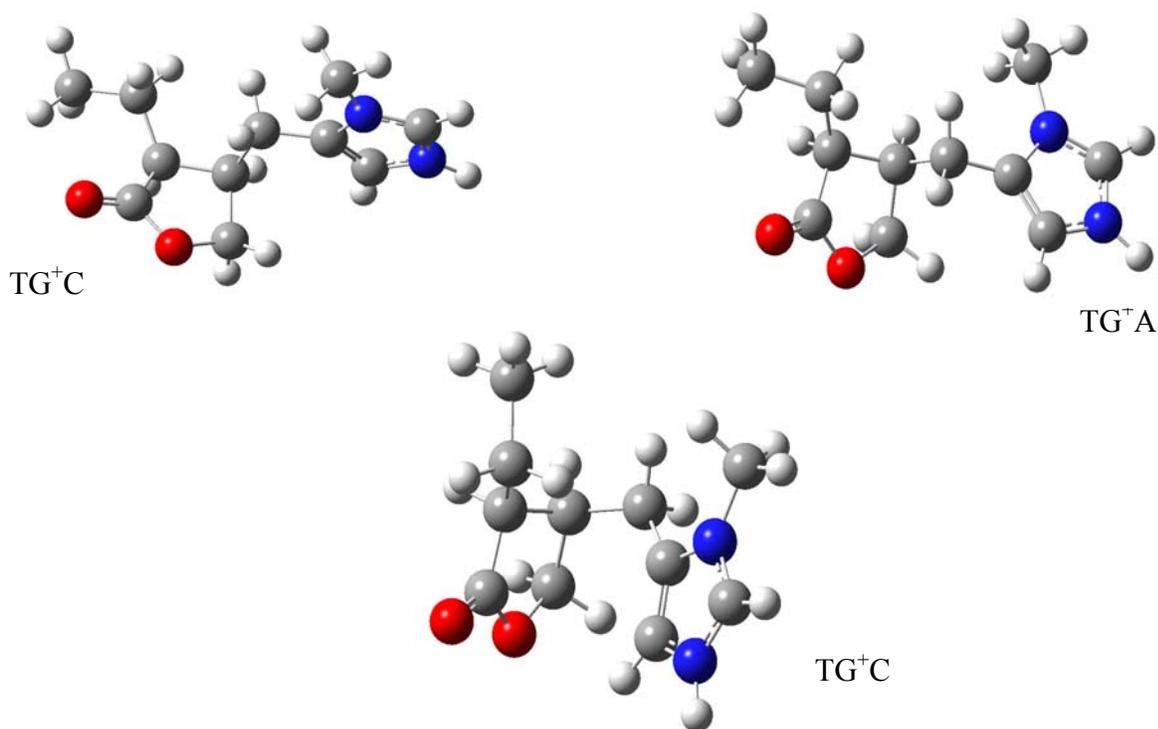
Confômero	C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>8</sub> <sup>a</sup>	C <sub>7</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>10</sub>	C <sub>8</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>11</sub>	C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>9</sub>	C <sub>3</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>7</sub> -O <sub>6</sub>	ΔE <sup>b</sup>
TG <sup>+</sup> C	163,0	71,2	15,6	40,6	-33,0	0,00
TG <sup>+</sup> A <sup>-</sup>	163,9	63,7	-103,7	41,1	-33,8	0,17
G <sup>+</sup> G <sup>-</sup> G <sup>+</sup>	69,7	-67,2	38,3	31,4	-28,9	3,24

<sup>a</sup> ângulos em graus. <sup>b</sup> energia em kcal mol<sup>-1</sup>.

Com relação ao diedro C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, enquanto que os dados de RMN apontam para uma distribuição quase equânime entre os confômeros *trans* e *gauche* (respectivamente, **10** e **12** do item 4.1.4, p. 40), os resultados teóricos apontam grande preferência apenas pelo confômero *trans* (Tabela 21), aquele em que os hidrogênios 2 e 3 também encontram-se na posição relativa *trans* (TG<sup>+</sup>C, Figura 16). De qualquer modo, os dados teóricos e experimentais estão bem coerentes com relação à estabilidade da geometria *trans* para o diedro C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>.

A conformação *gauche* é a mais estável para o diedro C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub> em ambas estruturas de menor energia. Os dados obtidos por cálculos teóricos mais uma vez apontam na mesma direção dos dados experimentais de RMN.

Para o diedro C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>11</sub>, os cálculos mostraram uma variação entre uma geometria *synperiplanar* e uma *anticlinal*. A diferença de energia entre os dois confôrmeros mais estáveis TG<sup>+</sup>C e TG<sup>+</sup>A<sup>-</sup> é relativamente pequena, podendo existir, portanto, uma quantidade apreciável do confôrmero TG<sup>+</sup>A<sup>-</sup> em relação ao mais estável TG<sup>+</sup>C. Contudo, observa-se que a única diferença significativa entre estes dois confôrmeros encontra-se no diedro C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>11</sub>. O fator responsável pela maior estabilidade da forma TG<sup>+</sup>C será melhor investigado na próxima seção.



**Figura 16.** Estruturas dos confôrmeros de menor energia da pilocarpina.

Com relação aos diedros envolvendo a conformação do anel da lactona, os cálculos teóricos também se mostraram em concordância com os dados experimentais, mostrando uma conformação *synclinal* para o diedro C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub> e também mostrando a posição relativa do heteroátomo de oxigênio do anel do mesmo lado dos átomos carbono C<sub>2</sub> e C<sub>9</sub> em relação ao plano do anel.

### 4.3.3. Cálculos de NBO

Como já dito anteriormente, o cálculo de NBO (Natural Bond Orbital) fornece descrições quantitativas das interações hiperconjugativas. Dentro do esquema NBO, os mecanismos hiperconjugativos de transferência de elétrons são entendidos como interações que envolvem transferências parciais de elétrons de um orbital (ligante) duplamente ocupado para um orbital (antiligante) contíguo vazio.<sup>34</sup>

No presente estudo, o maior interesse é sobre as interações do tipo par de elétrons não ligante doando para o orbital sigma antiligante ( $n \rightarrow \sigma^*$ ) e sigma ligante doando para o orbital sigma antiligante ( $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ) e se estas estão a influenciar na estabilização das estruturas de menor energia relativa.

#### 4.3.3.1. Carbacol

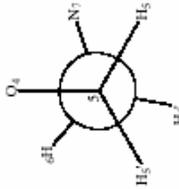
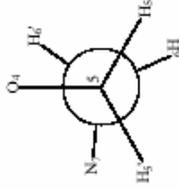
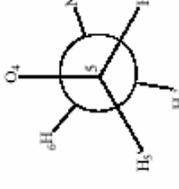
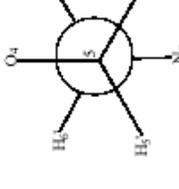
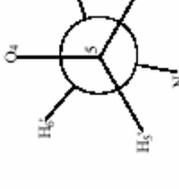
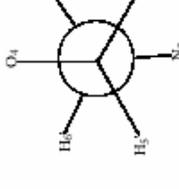
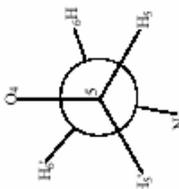
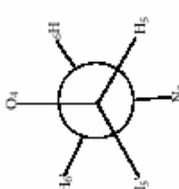
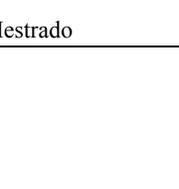
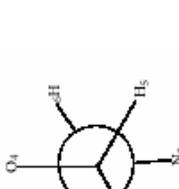
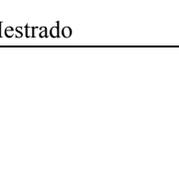
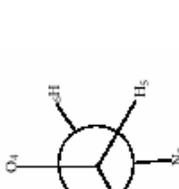
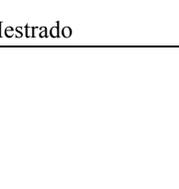
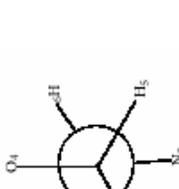
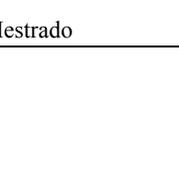
A Tabela 22 mostra os valores de NBO das principais interações para os confôrmeros mais estáveis em relação ao ângulo diedro C<sub>2</sub>-O<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> e a Tabela 23, em relação ao ângulo diedro O<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>-N<sub>7</sub>.

Tabela 22. Algumas importantes interações de orbitais calculadas para os principais conformêros do carbacol: ângulo C<sub>2</sub>-O<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>

Interação	E <sup>a</sup>					
	A*G <sup>+</sup>	A*G <sup>-</sup>	A*G <sup>+</sup>	TT	GT	G <sup>+</sup> T
	---	0,62	---	---	---	---
$\sigma_{C2O4} \rightarrow \sigma^*_{C5O6}$	---	0,62	---	0,95	---	---
$\sigma_{C5H5} \rightarrow \sigma^*_{C2O4}$	2,20	1,13	---	---	---	2,34
$\sigma_{C5H5} \rightarrow \sigma^*_{C2O4}$	---	---	1,54	---	2,37	---
$\Pi_{1(O4)} \rightarrow \sigma^*_{C5H5}$	1,72	0,78	2,74	0,51	1,79	2,03
$\Pi_{1(O4)} \rightarrow \sigma^*_{C5H5'}$	1,96	2,89	1,32	0,52	2,04	1,84
$\Pi_{1(O4)} \rightarrow \sigma^*_{C5O6}$	---	---	---	1,02	---	---
$\Pi_{2(O4)} \rightarrow \sigma^*_{C5H5}$	1,66	4,52	---	5,18	2,06	1,13
$\Pi_{2(O4)} \rightarrow \sigma^*_{C5H5'}$	1,49	---	3,38	5,14	1,06	1,94
$\Pi_{2(O4)} \rightarrow \sigma^*_{C5O6}$	6,25	3,49	4,67	---	5,78	5,73
$\sigma_{C5O6} \rightarrow \sigma^*_{C2O4}$	0,55	1,15	0,91	1,90	---	---

<sup>a</sup> Energia em kcal mol<sup>-1</sup>

**Tabela 23.** Algumas importantes interações de orbitais calculadas para os principais conformêros do carbaol: ângulo O<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>-N<sub>7</sub>

Interação	E <sup>a</sup>					
	A*G <sup>+</sup>	A*G'	A*G <sup>+</sup>	TT	GT	GT
	---	0,93	---	---	---	---
$\sigma_{O_4C_5} \rightarrow \sigma_{C_8H_6}$	---	0,93	---	---	---	---
	0,90	---	0,87	---	---	---
$\sigma_{O_4C_5} \rightarrow \sigma_{C_8H_6}$	0,90	---	0,87	---	---	---
	---	---	---	3,01	2,40	2,48
$\sigma_{O_4C_5} \rightarrow \sigma_{C_8N_7}$	---	---	---	3,01	2,40	2,48
	2,44	0,69	2,45	---	---	---
$\sigma_{C_5H_5} \rightarrow \sigma_{C_8H_6}$	2,44	0,69	2,45	---	---	---
	---	---	---	2,45	2,31	2,37
$\sigma_{C_5H_5} \rightarrow \sigma_{C_8H_6}$	---	---	---	2,45	2,31	2,37
	0,72	5,86	0,68	---	---	---
$\sigma_{C_5H_5} \rightarrow \sigma_{C_8N_7}$	0,72	5,86	0,68	---	---	---
	---	---	---	2,46	2,34	2,31
$\sigma_{C_5H_5} \rightarrow \sigma_{C_8H_6}$	---	---	---	2,46	2,34	2,31
	0,54	2,22	0,59	---	---	---
$\sigma_{C_5H_5} \rightarrow \sigma_{C_8H_6}$	0,54	2,22	0,59	---	---	---
	6,17	0,96	6,54	---	---	---
$\sigma_{C_5H_5} \rightarrow \sigma_{C_8N_7}$	6,17	0,96	6,54	---	---	---
	0,90	3,60	1,03	0,80	---	0,85
$\sigma_{C_8H_6} \rightarrow \sigma_{O_4C_5}$	0,90	3,60	1,03	0,80	---	0,85
	2,34	0,71	2,32	---	---	---
$\sigma_{C_8H_6} \rightarrow \sigma_{C_5H_5}$	2,34	0,71	2,32	---	---	---
	---	---	---	2,24	2,21	2,21
$\sigma_{C_8H_6} \rightarrow \sigma_{C_5H_5}$	---	---	---	2,24	2,21	2,21
	4,32	1,44	4,33	0,76	1,03	0,61
$\sigma_{C_8H_6} \rightarrow \sigma_{O_4C_5}$	4,32	1,44	4,33	0,76	1,03	0,61
	---	---	---	2,25	2,15	2,19
$\sigma_{C_8H_6} \rightarrow \sigma_{C_5H_5}$	---	---	---	2,25	2,15	2,19
	0,51	2,19	0,63	---	---	---
$\sigma_{C_8H_6} \rightarrow \sigma_{C_5H_5}$	0,51	2,19	0,63	---	---	---
	---	---	---	0,75	0,84	0,84
$\sigma_{C_8N_7} \rightarrow \sigma_{O_4C_5}$	---	---	---	0,75	0,84	0,84

<sup>a</sup> Energia em kcal mol<sup>-1</sup>

Conforme os dados da Tabela 22, as principais interações responsáveis pela estabilização do diedro C<sub>2</sub>-O<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> são  $\sigma_{C_5H_5} \rightarrow \sigma^*_{C_2O_4}$  e  $n_2(O_4) \rightarrow \sigma^*_{C_5C_6}$ . A energia de estabilização para o confômero mais estável A<sup>+</sup>G<sup>+</sup> valem 2,20 kcal mol<sup>-1</sup> e 6,25 kcal mol<sup>-1</sup>, respectivamente. Quando comparados aos valores destas mesmas interações no confômero A<sup>+</sup>G<sup>-</sup>, o segundo mais estável, 1,13 kcal mol<sup>-1</sup> e 3,49 kcal mol<sup>-1</sup> fica evidente a maior estabilização do confômero A<sup>+</sup>G<sup>+</sup>.

Os orbitais n<sub>1</sub>(O<sub>4</sub>) e n<sub>2</sub>(O<sub>4</sub>) referem-se aos pares de elétrons isolados do átomo de oxigênio. Um par no orbital híbrido sp, n<sub>1</sub>(O<sub>4</sub>), e o outro no orbital de caráter p puro, n<sub>2</sub>(O<sub>4</sub>). O primeiro, n<sub>1</sub>(O<sub>4</sub>), possui alto caráter **s**, enquanto o segundo, n<sub>2</sub>(O<sub>4</sub>), altíssimo caráter **p** o que confere a este último uma estabilização por doação bastante efetiva.

A Tabela 23 fornece informações sobre as interações hiperconjugativas referentes ao diedro O<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>-N<sub>7</sub>. Comparando-se os valores de NBO entre dois grupos de confômeros, o que possui o diedro em *gauche* e o que possui o diedro em *trans*, observa-se que as interações  $\sigma_{C_5H_x} \rightarrow \sigma^*_{C_6N_7}$  e  $\sigma_{C_5H_x} \rightarrow \sigma^*_{O_4C_5}$  respondem pela maior estabilização dos confômeros *gauche* (H<sub>x</sub>= H<sub>5</sub> ou H<sub>6</sub>). O orbital  $\sigma^*_{O-C}$  é bom acceptor de elétrons devido à presença do átomo de oxigênio, mais eletronegativo do que o átomo de carbono, o que faz a energia do orbital antiligante diminuir em relação a um orbital  $\sigma^*_{C-C}$ , por exemplo. Já o orbital  $\sigma^*_{C-N}$  tem sua capacidade acceptora aumentada pela presença do átomo de nitrogênio positivamente carregado, o que também diminui a energia relativa do orbital.

Analisando-se os valores de NBO para os dois confômeros de menor energia, A<sup>+</sup>G<sup>+</sup> e A<sup>+</sup>G<sup>-</sup>, observa-se que as interações  $\sigma_{C_5H_x} \rightarrow \sigma^*_{C_6N_7}$  e  $\sigma_{C_5H_x} \rightarrow \sigma^*_{O_4C_5}$  são maiores para o confômero A<sup>+</sup>G<sup>+</sup>, uma diferença de 0,3 kcal mol<sup>-1</sup> e 0,72 kcal mol<sup>-1</sup>, respectivamente. As interações do tipo  $\sigma_{C_5H_{5x}} \rightarrow \sigma^*_{C_6H_{6x}}$  e  $\sigma_{C_6H_{6x}} \rightarrow \sigma^*_{C_5H_{5x}}$  também possuem valores ligeiramente maiores para A<sup>+</sup>G<sup>+</sup> corroborando para a maior estabilização deste (H<sub>5x</sub>= H<sub>5</sub> ou H<sub>5'</sub>).

Contudo, quando se analisam os valores de NBO para os confômeros A<sup>+</sup>G<sup>+</sup> e A<sup>-</sup>G<sup>+</sup>, observa-se que as interações  $\sigma_{C_5H_x} \rightarrow \sigma^*_{C_6N_7}$  e  $\sigma_{C_5H_x} \rightarrow \sigma^*_{O_4C_5}$  são praticamente equivalentes para ambos. Inclusive, o confômero A<sup>-</sup>G<sup>+</sup>, o terceiro de menor energia, possui um valor 0,63 kcal mol<sup>-1</sup> maior para a interação

$\sigma_{C5Hx} \rightarrow \sigma^*_{C6N7}$  do que o confômero mais estável  $A^+G^+$ . Os valores das interações do tipo  $\sigma_{C5H5x} \rightarrow \sigma^*_{C6H6x}$  e  $\sigma_{C6H6x} \rightarrow \sigma^*_{C5H5x}$  são praticamente iguais para estes dois confômeros. Portanto, neste caso, a análise das interações hiperconjugativas fornece bons argumentos para justificar a maior estabilidade das formas *gauche* sobre as formas *trans*, mas não justifica de forma satisfatória a diferença de estabilidade entre as formas *gauche*.

Assim sendo, com base numa proposta feita por Schulman e col.<sup>44</sup> de que a distância entre o átomo de nitrogênio quaternário, positivamente carregado, e o oxigênio da porção éster (OCH<sub>2</sub>) poderia ser mais importante do que o ângulo diedro OCCN para a atividade farmacológica, decidiu-se analisar os valores da distância entre esses átomos (Tabela 24) no intuito de verificar se esta interação é, de fato, importante na estabilização da forma *gauche*.

**Tabela 24.** Distâncias interatômicas N<sup>+</sup>/O calculadas para os confômeros mais estáveis do carbacol

Confômero	E <sup>a</sup>	N <sub>7</sub> <sup>+</sup> ---O <sub>4</sub> <sup>b</sup>	N <sub>7</sub> <sup>+</sup> ---O <sub>6</sub>
A <sup>+</sup> G <sup>+</sup>	0,00	3,20	4,62
A <sup>+</sup> G <sup>-</sup>	0,85	3,27	4,10
A <sup>-</sup> G <sup>+</sup>	1,00	3,26	3,81
TT	1,15	3,73	5,20
G <sup>-</sup> T	1,28	3,78	4,48
G <sup>+</sup> T	1,40	3,79	4,44

<sup>a</sup> energia em kcal mol<sup>-1</sup>; <sup>b</sup> distância em angstroms.

O confômero A<sup>+</sup>G<sup>+</sup> apresenta uma distância N<sup>+</sup>/O menor do que os confômeros A<sup>+</sup>G<sup>-</sup> e A<sup>-</sup>G<sup>+</sup>. A questão a ser analisada é se esta pequena diferença (0,07 Å) pode responder por uma diferença de energia de 1,0 kcal mol<sup>-1</sup> entre os confômeros considerados. Muito provavelmente, a união das interações estabilizantes e a distância da interação eletrostática N<sup>+</sup>/O são os fatores mais importantes na estabilização dos confômeros e esta interação eletrostática não só justifica a preferência conformacional do agonista pela forma *gauche* (diedro O<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>-N<sub>7</sub>) como também fornece uma explicação bastante coerente para a ausência do efeito de solvente sobre as diferentes conformações.

## 4.3.3.2. Metacolina

As principais interações responsáveis pela estabilização do diedro C<sub>2</sub>-O<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> são mostradas na Tabela 25.

**Tabela 25.** Algumas importantes interações de orbitais calculadas para os principais confômeros da metacolina: ângulo C<sub>2</sub>-O<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>

Interação	E <sup>a</sup>			
	TG <sup>+</sup>	G <sup>-</sup> A <sup>+</sup>	A <sup>-</sup> G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup> G <sup>-</sup>
$\sigma_{C_2O_4} \rightarrow \sigma_{C_5C_5}'^*$	---	0,71	---	0,84
$\sigma_{C_2O_4} \rightarrow \sigma_{C_5C_6}^*$	0,87	---	0,69	---
$\sigma_{C_5H_5} \rightarrow \sigma_{C_2O_4}^*$	---	---	---	---
$n_{1(O_4)} \rightarrow \sigma_{C_5C_5}'^*$	---	0,74	---	1,09
$n_{1(O_4)} \rightarrow \sigma_{C_5H_5}^*$	1,90	1,88	2,68	---
$n_{1(O_4)} \rightarrow \sigma_{C_5C_6}^*$	0,79	---	---	1,74
$n_{2(O_4)} \rightarrow \sigma_{C_5C_5}'^*$	4,90	0,80	---	---
$n_{2(O_4)} \rightarrow \sigma_{C_5H_5}^*$	2,37	1,97	---	5,00
$n_{2(O_4)} \rightarrow \sigma_{C_5C_6}^*$	0,71	5,45	3,60	4,01
$\sigma_{C_5C_5}' \rightarrow \sigma_{C_2O_4}^*$	---	1,86	0,97	2,51
$\sigma_{C_5C_6} \rightarrow \sigma_{C_2O_4}^*$	1,74	---	1,32	---

<sup>a</sup> Energia em kcal mol<sup>-1</sup>

Há uma importante interação entre o orbital da ligação  $\sigma_{C_5-C_6}$  e o antiligante da ligação  $\sigma^*_{C_2-O_4}$  ( $\sigma_{C_5C_6} \rightarrow \sigma^*_{C_2O_4}$ ) de 1,74 kcal mol<sup>-1</sup> no confômero mais estável TG<sup>+</sup> bem como uma interação de natureza equivalente  $\sigma_{C_5C_5}' \rightarrow \sigma^*_{C_2O_4}$  de 1,86 kcal mol<sup>-1</sup> no confômero G<sup>-</sup>A<sup>+</sup>. Porém, ambas possuem valores praticamente iguais e, portanto, não respondem pela preferência de um confômero frente a outro.

Outras duas importantes interações dizem respeito aos pares isolados de elétrons do átomo de oxigênio. Os valores de  $n_{1(O4)} \rightarrow \sigma^*_{C5H5}$  1,90, 1,88 e 2,68 kcal mol<sup>-1</sup> para os três primeiros confôrmeros mostram uma pequena vantagem na estabilização da estrutura A<sup>-</sup>G<sup>-</sup>, a terceira mais estável. Mas as interações que decidem a favor dos dois confôrmeros de menor energia TG<sup>+</sup> e G<sup>-</sup>A<sup>+</sup> são, certamente as interações  $n_{2(O4)} \rightarrow \sigma^*_{C5C5'}$ ,  $n_{2(O4)} \rightarrow \sigma^*_{C5C6}$  e  $n_{2(O4)} \rightarrow \sigma^*_{C5H5}$  que possuem valores maiores do que os valores para o confôrmero A<sup>-</sup>G<sup>-</sup>. Entretanto, estes valores não são suficientes para justificar a preferência conformacional quase exclusiva da metacolina pelo confôrmero TG<sup>+</sup>.

A Tabela 26 mostra as principais interações estabilizantes para o diedro O<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>-N<sub>7</sub>.

**Tabela 26.** Algumas importantes interações de orbitais calculadas para os principais confôrmeros da metacolina: ângulo O<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>-N<sub>7</sub>

Interação	<b>E<sup>a</sup></b>			
	TG <sup>+</sup>	GA <sup>+</sup>	A <sup>-</sup> G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup> G <sup>-</sup>
$\sigma_{O_4C_5} \rightarrow \sigma^*_{C_6H_6}$	---	---	0,88	0,89
$\sigma_{O_4C_5} \rightarrow \sigma^*_{C_6H_6'}$	1,20	---	---	---
$\sigma_{O_4C_5} \rightarrow \sigma^*_{C_6N_7}$	---	1,58	---	---
$\sigma_{C_5C_5'} \rightarrow \sigma^*_{C_5H_5}$	---	---	0,52	---
$\sigma_{C_5C_5'} \rightarrow \sigma^*_{C_5C_6}$	---	0,73	---	---
$\sigma_{C_5C_5'} \rightarrow \sigma^*_{C_6H_6}$	---	1,01	---	---
$\sigma_{C_5C_5'} \rightarrow \sigma^*_{C_6H_6'}$	---	---	1,54	1,52
$\sigma_{C_5C_5'} \rightarrow \sigma^*_{C_6N_7}$	4,08	---	---	---
$\sigma_{C_5H_5} \rightarrow \sigma^*_{C_6H_6}$	2,30	---	---	---
$\sigma_{C_5H_5} \rightarrow \sigma^*_{C_6H_6'}$	---	1,66	0,77	0,65
$\sigma_{C_5H_5} \rightarrow \sigma^*_{C_6N_7}$	0,90	1,09	4,84	4,69
$\sigma_{C_6H_6} \rightarrow \sigma^*_{O_4C_5}$	1,36	2,11	3,67	3,50
$\sigma_{C_6H_6} \rightarrow \sigma^*_{C_5C_5'}$	---	1,67	---	---
$\sigma_{C_6H_6} \rightarrow \sigma^*_{C_5H_5}$	2,51	---	---	---
$\sigma_{C_6H_6'} \rightarrow \sigma^*_{O_4C_5}$	3,53	---	---	---
$\sigma_{C_6H_6'} \rightarrow \sigma^*_{C_5C_5'}$	---	---	2,21	2,14
$\sigma_{C_6H_6'} \rightarrow \sigma^*_{C_5H_5}$	---	1,79	0,68	0,82
$\sigma_{C_6N_7} \rightarrow \sigma^*_{O_4C_5}$	---	0,65	---	---
$\sigma_{C_6N_7} \rightarrow \sigma^*_{C_5C_5'}$	0,73	---	---	---

<sup>a</sup> Energia em kcal mol<sup>-1</sup>

Analisando-se os valores de NBO, vê-se que a interação  $\sigma_{C_6H_6} \rightarrow \sigma^*_{O_4C_5}$  é maior para  $TG^+$  (3,53 kcal mol<sup>-1</sup>) do que a interação correspondente  $\sigma_{C_6H_6} \rightarrow \sigma^*_{O_4C_5}$  de  $G^-A^+$  (2,11 kcal mol<sup>-1</sup>), devido à geometria dos orbitais que interagem. Em  $\sigma_{C_6H_6} \rightarrow \sigma^*_{O_4C_5}$  os orbitais estão próximos da geometria antiperiplanar, já em  $\sigma_{C_6H_6} \rightarrow \sigma^*_{O_4C_5}$  a geometria está em synperiplanar o que leva a uma sobreposição menos efetiva dos lóbulos dos orbitais ligantes e antiligantes. Uma outra importante interação estabilizante que é maior para o confômero  $TG^+$  é  $\sigma_{C_5C_5} \rightarrow \sigma^*_{C_6N_7}$ , quando comparada com a interação correspondente  $\sigma_{C_5H_5} \rightarrow \sigma^*_{C_6N_7}$  pelos mesmos motivos de sobreposição dos orbitais já discutidos. Para somar-se a estas ainda podem-se citar as interações  $\sigma_{C_5H_5} \rightarrow \sigma^*_{C_6H_6}$  e  $\sigma_{C_5H_6} \rightarrow \sigma^*_{C_5H_5}$  que também são maiores para o confômero  $TG^+$ , justificando, portanto, a maior estabilidade deste frente ao confômero  $G^-A^+$ , mesmo considerando-se as retrodoações.

Contudo, a estabilização não é tão bem justificada se compararmos os valores das interações  $\sigma_{C_5C_5} \rightarrow \sigma^*_{C_6N_7}$  e  $\sigma_{C_6H_6} \rightarrow \sigma^*_{O_4C_5}$  do confômero  $TG^+$  com as interações correspondentes,  $\sigma_{C_5H_5} \rightarrow \sigma^*_{C_6N_7}$  e  $\sigma_{C_6H_6} \rightarrow \sigma^*_{O_4C_5}$ , dos confômeros  $A^-G^-$  e  $G^-G^-$ , o terceiro e quarto mais estáveis, respectivamente. Vê-se que  $TG^+$  possui os menores valores.

Assim como foi feito para o carbacol, decidiu-se estudar se a distância interatômica  $N^+/O$  também desempenha um papel importante na estabilização da metacolina (Tabela 27)

**Tabela 27.** Distâncias interatômicas  $N^+/O$  calculadas para os confômeros mais estáveis da metacolina

Confômero	E <sup>a</sup>	$N_7^+ \cdots O_4$ <sup>b</sup>	$N_7^+ \cdots O_6$
$TG^+$	0,0	3,19	4,73
$G^-A^+$	2,4	3,72	3,87
$A^-G^-$	2,8	3,17	5,21
$G^-G^-$	2,8	3,17	5,21

<sup>a</sup> energia em kcal mol<sup>-1</sup>; <sup>b</sup> distância em angstroms.

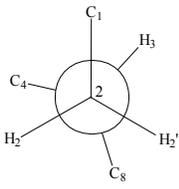
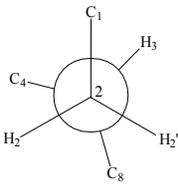
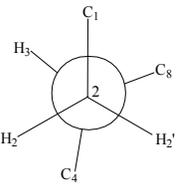
A distância  $N^+/O$  para o primeiro confômero é, de fato, menor do que para o

segundo, sendo, portanto, mais um fator de estabilização do conformero TG<sup>+</sup>. Porém, no caso da metacolina, o terceiro e quarto conformeros também possuem uma distância N<sup>+</sup>/O semelhante ao mais estável. Neste caso, acreditamos que as interações hiperconjugativas  $\sigma_{C6H6} \rightarrow \sigma^*_{C5H5}$  e  $\sigma_{C5H5} \rightarrow \sigma^*_{C6H6}$  mostram-se importantes na estabilização do conformero de menor energia. Ou seja, a distância interatômica sozinha é um importante fator de estabilização da conformação *gauche* para os agonistas muscarínicos da acetilcolina, mas a natureza das interações hiperconjugativas podem decidir entre uma ou outra estrutura específica dentro das geometrias *gauche* possíveis.

## 4.3.3.3. Pilocarpina

As principais interações responsáveis pela estabilização do diedro C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> são mostradas na Tabela 28.

**Tabela 28.** Algumas importantes interações de orbitais calculadas para os principais confôrmeros da pilocarpina: ângulo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>

Interação	E <sup>a</sup>		
	TG <sup>+</sup> C	TG <sup>+</sup> A <sup>-</sup>	G <sup>+</sup> G <sup>-</sup> G <sup>+</sup>
			
$\sigma_{C_1C_2} \rightarrow \sigma_{C_3C_4}^*$	---	---	2,08
$\sigma_{C_1C_2} \rightarrow \sigma_{C_3C_8}^*$	2,64	2,63	---
$\sigma_{C_2H_2} \rightarrow \sigma_{C_3C_8}^*$	---	---	4,46
$\sigma_{C_2H_2} \rightarrow \sigma_{C_3H_3}^*$	2,99	3,02	---
$\sigma_{C_2H_2'} \rightarrow \sigma_{C_3C_4}^*$	3,45	3,46	---
$\sigma_{C_2H_2'} \rightarrow \sigma_{C_3H_3}^*$	---	---	2,93
$\sigma_{C_3C_4} \rightarrow \sigma_{C_1C_2}^*$	---	---	1,97
$\sigma_{C_3C_4} \rightarrow \sigma_{C_2H_2'}^*$	1,28	1,32	---
$\sigma_{C_3C_8} \rightarrow \sigma_{C_1C_2}^*$	1,31	1,32	---
$\sigma_{C_3C_8} \rightarrow \sigma_{C_2H_2}^*$	---	---	0,97
$\sigma_{C_3H_3} \rightarrow \sigma_{C_2H_2}^*$	2,61	2,60	---
$\sigma_{C_3H_3} \rightarrow \sigma_{C_2H_2'}^*$	---	---	2,99

<sup>a</sup> Energia em kcal mol<sup>-1</sup>

A análise dos valores de NBO para o diedro C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> não ajudam na elucidação da preferência conformacional da pilocarpina. Primeiro porque os valores dos ângulos diedros dos dois confôrmeros mais estáveis são muito próximos, 163° para TG<sup>+</sup>C e 163,9° para TG<sup>+</sup>A<sup>-</sup> (Tabela 21) o que leva à valores de interações praticamente iguais; segundo, porque não há nenhuma estabilização significativa nos confôrmeros *trans* que não tenha uma equivalente

em natureza e em magnitude no confômero *gauche*. Assim sendo, pode-se esperar uma contribuição de interações estabilizantes referentes aos outros dois diedros. As principais interações responsáveis pela estabilização do diedro C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub> são mostradas na Tabela 29.

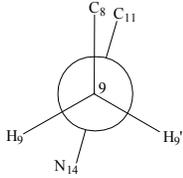
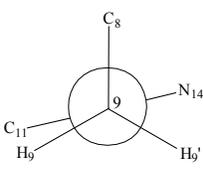
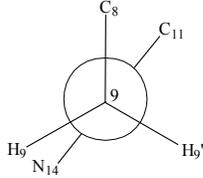
**Tabela 29.** Algumas importantes interações de orbitais calculadas para os principais confômeros da pilocarpina: ângulo C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>

Interação	E <sup>a</sup>		
	TG <sup>+</sup> C	TG <sup>+</sup> A <sup>-</sup>	G <sup>+</sup> G <sup>-</sup> G <sup>+</sup>
$\sigma_{C3C8} \rightarrow \sigma_{C9C10}^*$	1,90	2,07	---
$\sigma_{C3C8} \rightarrow \sigma_{C9H9'}^*$	---	---	1,21
$\sigma_{C7C8} \rightarrow \sigma_{C9H9}^*$	---	---	1,46
$\sigma_{C7C8} \rightarrow \sigma_{C9H9'}^*$	1,78	1,67	---
$\sigma_{C8H8} \rightarrow \sigma_{C9C10}^*$	---	---	4,45
$\sigma_{C8H8} \rightarrow \sigma_{C9H9}^*$	2,79	2,53	---
$\sigma_{C9C10} \rightarrow \sigma_{C3C8}^*$	1,43	1,46	---
$\sigma_{C9C10} \rightarrow \sigma_{C3H8}^*$	---	---	0,75
$\sigma_{C9H9} \rightarrow \sigma_{C7C8}^*$	---	---	3,45
$\sigma_{C9H9} \rightarrow \sigma_{C8H8}^*$	2,81	2,91	0,51
$\sigma_{C9H9'} \rightarrow \sigma_{C3C8}^*$	---	---	3,75
$\sigma_{C9H9'} \rightarrow \sigma_{C7C8}^*$	3,03	3,00	---

<sup>a</sup> Energia em kcal mol<sup>-1</sup>

Também para o diedro C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub> os valores de NBO não ajudam a explicar a maior estabilização do confômero TG<sup>+</sup>C. A geometria *gauche* é a mais estável para este diedro para os três confômeros, mas nada que possa ser justificado com base apenas nos valores das interações hiperconjugativas. Dentre os três diedros estudados o que apresentou maior variação de um confômero para outro foi o diedro C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>11</sub> cujos valores das principais interações hiperconjugativas são mostrados na Tabela 30.

**Tabela 30.** Algumas importantes interações de orbitais calculadas para os principais confôrmeros da pilocarpina: ângulo C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>11</sub>

Interação	E <sup>a</sup>		
	TG <sup>+</sup> C	TG <sup>+</sup> A	G <sup>+</sup> G <sup>+</sup> G <sup>+</sup>
			
$\sigma_{C8C9} \rightarrow \sigma^*_{C10C11}$	---	1,27	---
$\sigma_{C8C9} \rightarrow \pi^*_{C10C11}$	---	2,79	0,63
$\sigma_{C8C9} \rightarrow \sigma^*_{C10N14}$	4,66	---	3,12
$\sigma_{C9H9} \rightarrow \sigma^*_{C10C11}$	3,62	---	4,90
$\sigma_{C9H9} \rightarrow \pi^*_{C10C11}$	2,87	0,51	0,68
$\sigma_{C9H9} \rightarrow \sigma^*_{C10N14}$	---	7,47	1,01
$\sigma_{C9H9'} \rightarrow \sigma^*_{C10C11}$	1,67	3,26	0,58
$\sigma_{C9H9'} \rightarrow \pi^*_{C10C11}$	6,13	3,20	6,52
$\sigma_{C10C11} \rightarrow \sigma^*_{C9H9}$	1,73	---	0,54
$\sigma_{C10C11} \rightarrow \sigma^*_{C9H9'}$	2,80	---	---
$\pi_{C10C11} \rightarrow \sigma^*_{C8C9}$	---	3,01	---
$\pi_{C10C11} \rightarrow \sigma^*_{C9H9}$	1,73	---	0,57
$\pi_{C10C11} \rightarrow \sigma^*_{C9H9'}$	2,80	1,75	3,01
$\sigma_{C10N14} \rightarrow \sigma^*_{C8C9}$	0,68	---	0,63

<sup>a</sup> Energia em kcal mol<sup>-1</sup>

O diedro C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>11</sub> apresenta algumas das interações estabilizantes mais significativas quando comparadas àquelas existentes nos outros dois diedros. E, por isso, pode ser o fator preponderante na preferência conformacional da pilocarpina. A presença do sistema  $\pi$  entre os átomos C<sub>10</sub>-C<sub>11</sub> associada com a geometria perfeita para uma sobreposição efetiva dos orbitais confere a este diedro interações de alto caráter estabilizante. As interações responsáveis pela maior estabilidade do confôrmero TG<sup>+</sup>C são  $\sigma_{C8C9} \rightarrow \sigma^*_{C10N14}$  (4,66 kcal mol<sup>-1</sup>),  $\sigma_{C9H9} \rightarrow \pi^*_{C10C11}$  (2,87 kcal mol<sup>-1</sup>),  $\sigma_{C9H9'} \rightarrow \pi^*_{C10C11}$  (6,13 kcal mol<sup>-1</sup>), que, mesmo levando-se em conta os valores das retrodoações (respectivamente 0,68, 1,73 e 2,80 kcal mol<sup>-1</sup>) ainda são maiores neste confôrmero do que os valores das

interações correspondentes nos outros confôrmeros.

Como para os outros agonistas foi feito o estudo da interação eletrostática  $N^+/O$  na estabilidade, o mesmo foi feito para a pilocarpina. Os dados da distância interatômica estão na Tabela 31.

**Tabela 31.** Distâncias interatômicas  $N^+/O$  calculadas para os confôrmeros mais estáveis da pilocarpina

Confôrmero	$E^a$	$N_{12}^+ \cdots O_6^b$	$N_{14}^+ \cdots O_6$
$TG^+C$	0,00	5,87	5,14
$TG^+A^-$	0,17	5,63	5,19
$G^+G^-G^+$	3,24	4,80	4,39

<sup>a</sup> energia em  $\text{kcal mol}^{-1}$ ; <sup>b</sup> distância em angstroms.

Como o anel de imidazol pode apresentar ressonância, a carga positiva que inicialmente está sobre o átomo de  $N_{12}$  pode se deslocar para o  $N_{14}$ , que inclusive é melhor estabilizada pelo efeito indutivo da metila ligada a ele. Desse modo a distância interatômica a ser considerada é entre o átomo  $O_6$  e o  $N_{14}^+$ . Mas observa-se que este fator não desempenha papel importante como nos outros agonistas para a estabilização dos confôrmeros. Além do mais, a ordem de grandeza da distância na pilocarpina é significativamente maior do que no carbacol e na metacolina. Por outro lado, a interação eletrostática também presente na pilocarpina é um fator de estabilização da forma gauche de um modo geral; tanto que também para esta molécula não se observou efeito de variação de solvente nos valores das constantes de acoplamento médias. Dois pontos devem ser observados com relação a uma possível explicação para a atividade agonista da pilocarpina: primeiro, conforme mostra o valor do diedro  $C_8-C_9-C_{10}-C_{11}$ , os átomos de oxigênio e de nitrogênio estão do mesmo lado da molécula (Figura 16), o que, provavelmente, facilita a acoplagem ao sítio receptor; segundo, devido à liberdade rotacional das ligações importantes para descrição conformacional da pilocarpina, provavelmente a molécula sofre alguns ajustes estruturais quando da aproximação do sítio ativo. Embora, vários estudos sugiram que haja uma relação direta entre a distância  $N^+/O$  e a atividade biológica<sup>2,9,22,45</sup>, seria necessário realizar, por exemplo, estudos de *docking* para confirmar estas hipóteses.

## Capítulo 5

### CONCLUSÃO

## 5. CONCLUSÃO

O estudo se mostrou bastante coerente quanto à determinação das conformações dos agonistas da acetilcolina escolhidos. Os dados teóricos mostraram-se satisfatórios quando comparados aos dados experimentais obtidos pela espectroscopia de RMN. O que nos leva a concluir que este nível teórico é confiável para descrever sistemas de etanos dissubstituídos sejam simples, como o carbacol e a metacolina, ou mais complexos como a pilocarpina.

Os confôrmeros mais estáveis obtidos em solução aquosa foram:  $A^+G^+$  para o carbacol,  $TG^+$  para a metacolina e  $TG^+C$  para a pilocarpina. Estes se referem aos principais ângulos que respondem pelo comportamento conformacional destes agonistas.

A análise das constantes de acoplamento em diferentes solventes mostrou a importância da interação entre o átomo de nitrogênio positivamente carregado e o átomo de oxigênio polarizado da porção éster ( $OCH_2$ ). Mesmo variando-se a polaridade do solvente dentro de uma gama relativamente extensa (de 4,8 a 78,5) os valores de  $^3J_{HH}$  médios não sofreram alterações significativas.

Os cálculos teóricos foram importantes na determinação dos valores dos diedros que não puderam ser obtidos por RMN de  $^1H$  por causa da inexistência de acoplamentos vicinais H-H em algumas partes das moléculas. Também foram importantes na confirmação da importância do papel da interação eletrostática  $N^+/O$  ao mostrar que os confôrmeros mais estáveis eram aqueles que possuíam menor distância entre estes átomos.

As interações de orbitais obtidas através dos cálculos de NBO mostraram a importância das hiperconjugações na estabilização das estruturas de menor energia conformacional. Principalmente as interações do tipo  $\sigma_{C-C} \rightarrow \sigma^*_{C-N^+}$  e  $\sigma_{C-C} \rightarrow \sigma^*_{C-O}$  no carbacol e metacolina e do tipo  $\sigma_{C-C} \rightarrow \pi^*_{C-C}$  e  $\sigma_{C-H} \rightarrow \pi^*_{C-C}$  na pilocarpina.

Na verdade, acredita-se que a junção dos fatores efeito hiperconjugativo e interação eletrostática sejam os responsáveis pela estabilização de uma geometria frente às demais, juntamente com fatores estéreo, principalmente na pilocarpina.

Embora o objetivo deste trabalho não fosse estudar a interação neurotransmissor-neurorreceptor, acredita-se que algumas tendências possam ser tiradas do comportamento dos agonistas estudados:

- A forte estabilização da forma *gauche*, por exemplo, no carbacol e na metacolina provavelmente se mantêm em um meio biológico;

- A posição relativa dos átomos de oxigênio da porção éster (OCH<sub>2</sub>) e o átomo de nitrogênio positivo deve ser de fundamental importância para a existência de atividade biológica.

O estudo destas hipóteses pode ser fruto da continuidade desta linha de estudo, por hora, pode-se mapear apenas tendências.

## 6. REFERÊNCIAS

- 1- Gordon, M. S.; Song, J.; Deakyne, C. A.; Zheng, W. *J. Phys. Chem A* **2004**, 108, 11419.
- 2- Frydenvang, K.; Jensen, B. *Acta Cryst.* **1996**, B52, 184.
- 3- Felder, C. C.; Bymaster, F. P.; Ward, J.; DeLapp, N. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4333.
- 4- Canepa, F.G.; Pauling, P.; Sorum, H. *Nature (London)* **1966**, 210, 907.
- 5- Chothia, C.; Pauling, P. *Nature (London)* **1968**, 219, 1156.
- 6- Cushley, R. J.; Mautner, H. G., *Tetrahedron* **1970**, 26, 2151.
- 7- Partington, P.; Feeney, S.; Burgen, A. S. V. *Mol. Pharmacol.* **1972**, 8, 269.
- 8- Culvenor, C. C. J.; Ham, N. S. *Chem. Commun.* **1966**, 15, 537.
- 9- Beers, W. H.; Reich, E. *Nature* **1970**, 228, 917.
- 10- Lambert, J. B.; Schilf, C. *Magn. Reson. Chem.* **1991**, 29, 184.
- 11- Harmon, K. M.; Bulgarella, J. A. *J. Mol. Struct.* **1995**, 351, 181.
- 12- Margheritis, C.; Corongiu, G. *J. Comput. Chem.* **1988**, 9, 1.
- 13- Segal, M. D.; Payne, M. C.; Boyes, R. N. *Mol. Phys.* **1998**, 93, 365.
- 14- Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. *Theo. Chem. Accounts*, **2001**, 107, 8.
- 15- Vistoli, G.; Pedretti, A.; Villa, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 7472.
- 16- Vistoli, G.; Pedretti, A.; Villa, L.; Testa, B. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1759.
- 17- Schulman, J. M.; Sabio, M. L.; Disch, R. L. *J. Med. Chem.* **1983**, 26, 817.
- 18- Deakyne, C. A.; Mautner, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1546.
- 19- Muñoz-Caro, C.; Niño, A.; Mora, M.; Reyes, S.; Melendez, F. J.; Castro, M. E. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2005**, 726, 115.
- 20- Kim, Y. J.; Kim, S. C.; Kang, Y. K. *J. Mol. Struct.* **1992**, 269, 231.
- 21- Smith, M. B.; March, J. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, John Wiley & Sons, **2001**.
- 22- Furukawa, H.; Hamada, T.; Hayashi, M. K. *Mol. Pharm.* **2002**, 62, 778.
- 23- Schulman, J. M.; Peck, R. C.; Disch, R. L. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 1455.
- 24- <http://www.iupac.org/goldbook/T06406.pdf>, acessado em 04/01/2007.
- 25- Contreras, R. H.; Esteban, A. L.; Díez, E.; Della, E. W.; Lochert, I. J.; Santos, F. P.; Tormena, C. F. *J. Phys. Chem.* **2006**, 110, 4266.
- 26- Gil, V. M. S. and Geraldés, C. F. G. C. *Ressonância Magnética Nuclear*, Fundação Calouste Gulbenkian: Coimbra, 1987; p.237.
- 27- Casy, F. A., *PMR Spectroscopy in Medical and Biological Chemistry*, Academic Press, London, **1971**. p. 215.
- 28- Karplus, M. *J. Chem. Phys.* **1959**, 30, 11.
- 29- Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2870.
- 30- Contreras, R. H.; Peralta, J. E. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spec.* **2000**, 37, 321.
- 31- Haasnoot, C. A. G.; Leeuw, F. A. A. M.; Altona, C.; *Tetrahedron* **1980**, 36, 2783.
- 32- Altona, C.; Francke, R.; De Haan, R.; Ippel, J. H.; Daalmans, G. J.; Hoekzema, A. J. A. W. *Magn. Reson. Chem.* **1994**, 32, 670.
- 33- Song, L.; Lin, Y.; Wu, W.; Zhang, Q.; Mo, Y. *J. Phys. Chem. A* **2005**, 109, 2310.

- 34- Provasi, P. F.; Gómez, C. A.; Aucar, G. A. *J. Phys. Chem. A* **2004**, 108, 6231.
- 35- Ando, I.; Webb, G. A. *Org. Magn. Reson.* **1981**, 15, 111.
- 36- Foresman, J. B.; Frish, A.; *Exploring Chemistry with Eletronic Structure Methods*, Gaussian Inc.; USA (1993).
- 37- Custodio, R.; Morgon, N. H. *Quim. Nova* **1995**, 18, 44.
- 38- Reed, A. E.; Curtiss, L. A.; Weinhold, F. *Chem. Rev.* **1988**, 88, 899.
- 39- Witanowski, M.; Webb, G. A. *Nitrogen NMR*; Plenum Press: London, 1973; p. 8-9, 93- 99, 143.
- 40- Breitmaier, E.; Voelter, W. *<sup>13</sup>C NMR spectroscopy of Organic Compounds: high-resolution and applications inorganic chemistry and biochemistry*; VCH:Weinheim,1987 p. 238.
- 41- Abraham, R. J.; Fisher, J. Lótus, P. *Introduction to NMR Spectroscopy*; John Wiley & Sons, **1993**.
- 42- Maat, L.; Peters, J. A.; Aboul-Enein, H. Y. *Org. Magn. Reson.* **1984**, 22, 454.
- 43- Segal, E. M.; Tormena, C.; Oliveira, P. R.; Rittner, R.; Tinoco, L. W.; Figueroa-Villar, J. D.; Höehr, N. F. *J. Mol. Struct.* **2006**, 797, 44.
- 44- Schulman, J. M.; Sabio, M. L.; Disch, R. L. *J. Med. Chem.* **1983**, 26, 817.
- 45- Dolmella, A.; Bandoli, G.; Cavallin, M. *J. Mol. Struct.* **2000**, 526, 287.

Anexo I:

Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\text{D}_2\text{O}$  com a integração dos sinais.

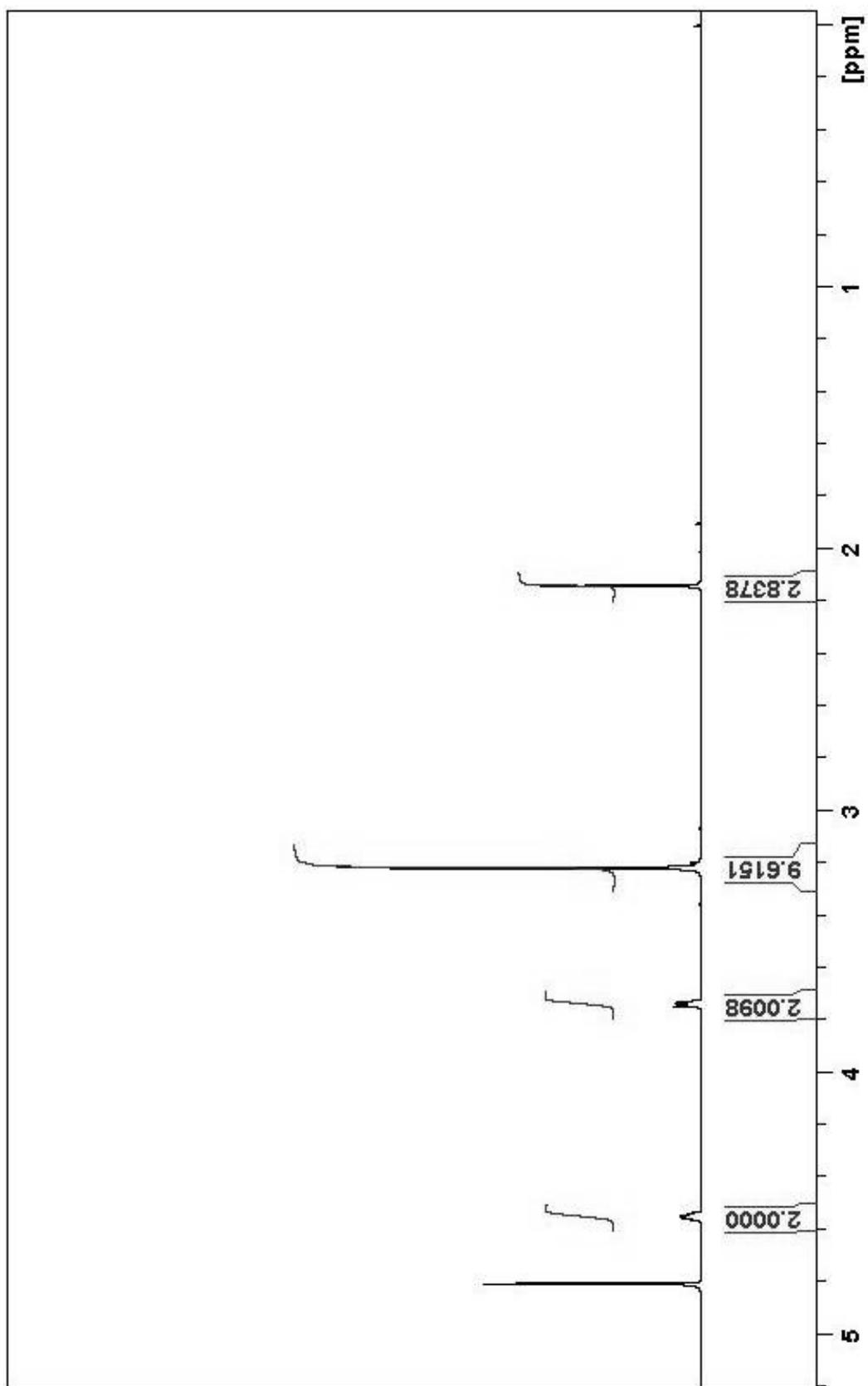


Figura 1.1: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da acetilcolina com integração dos sinais.

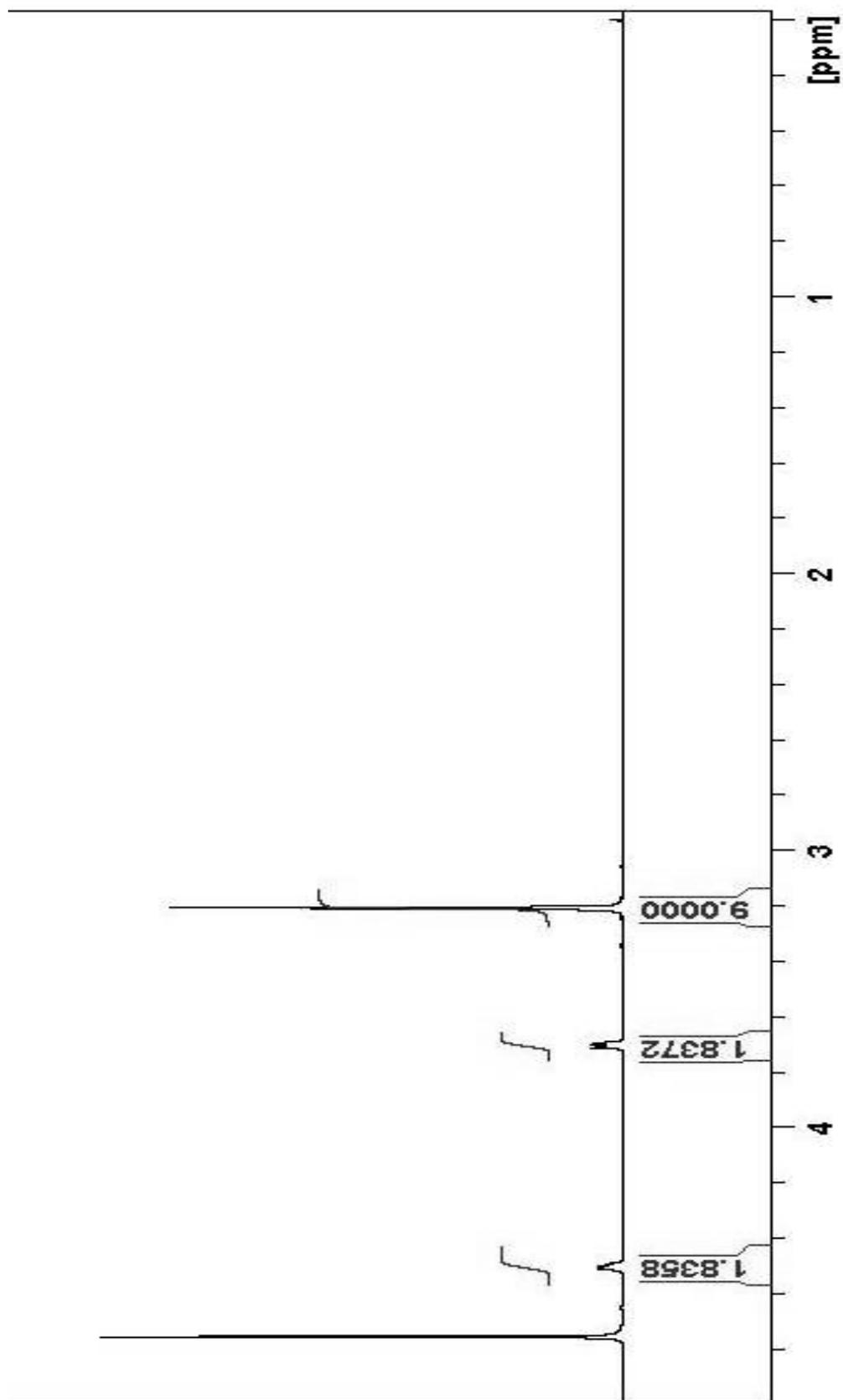


Figura 1.2: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do carbacol com integração dos sinais.

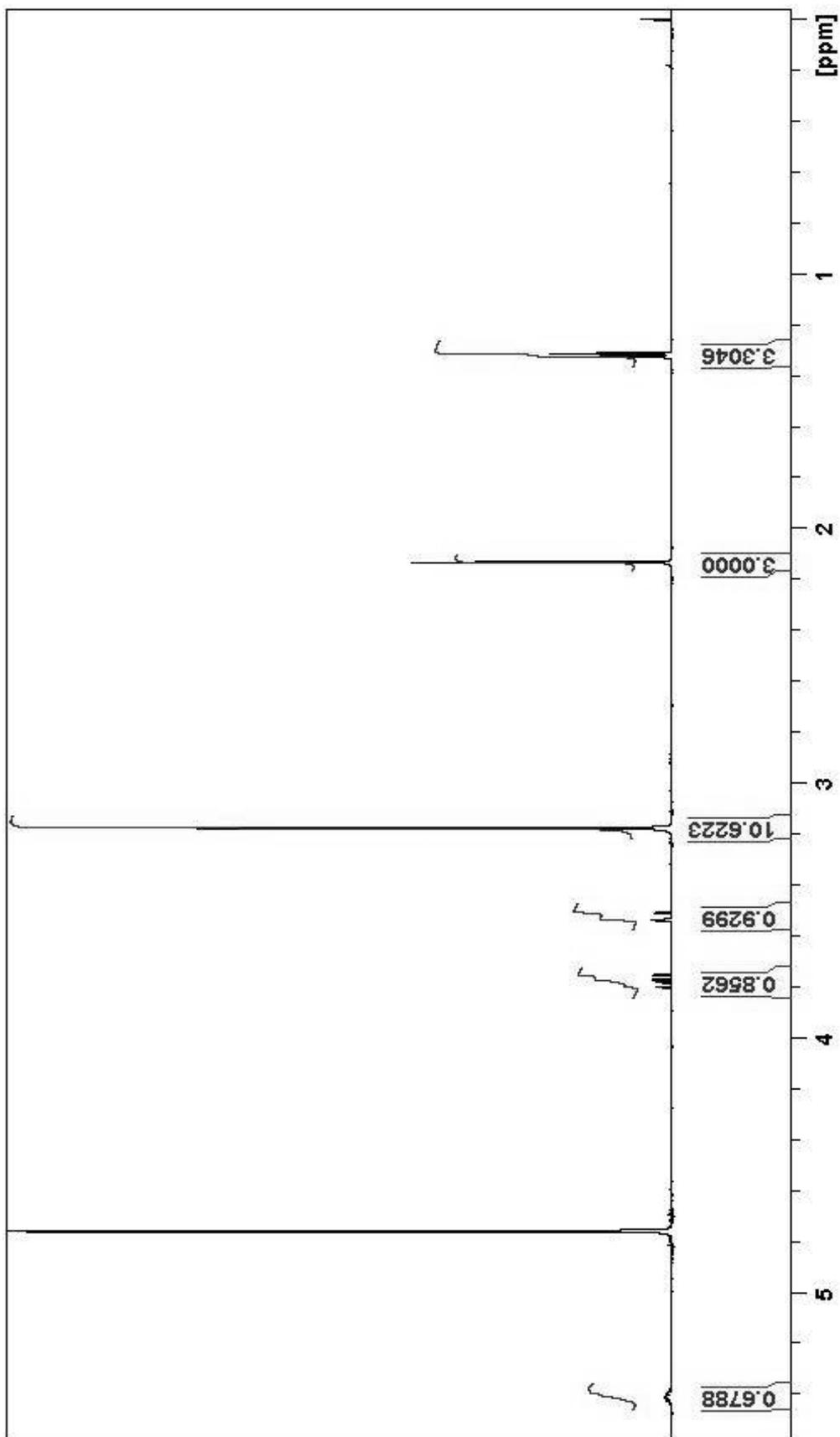


Figura 1.3: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da metacolina com integração dos sinais.

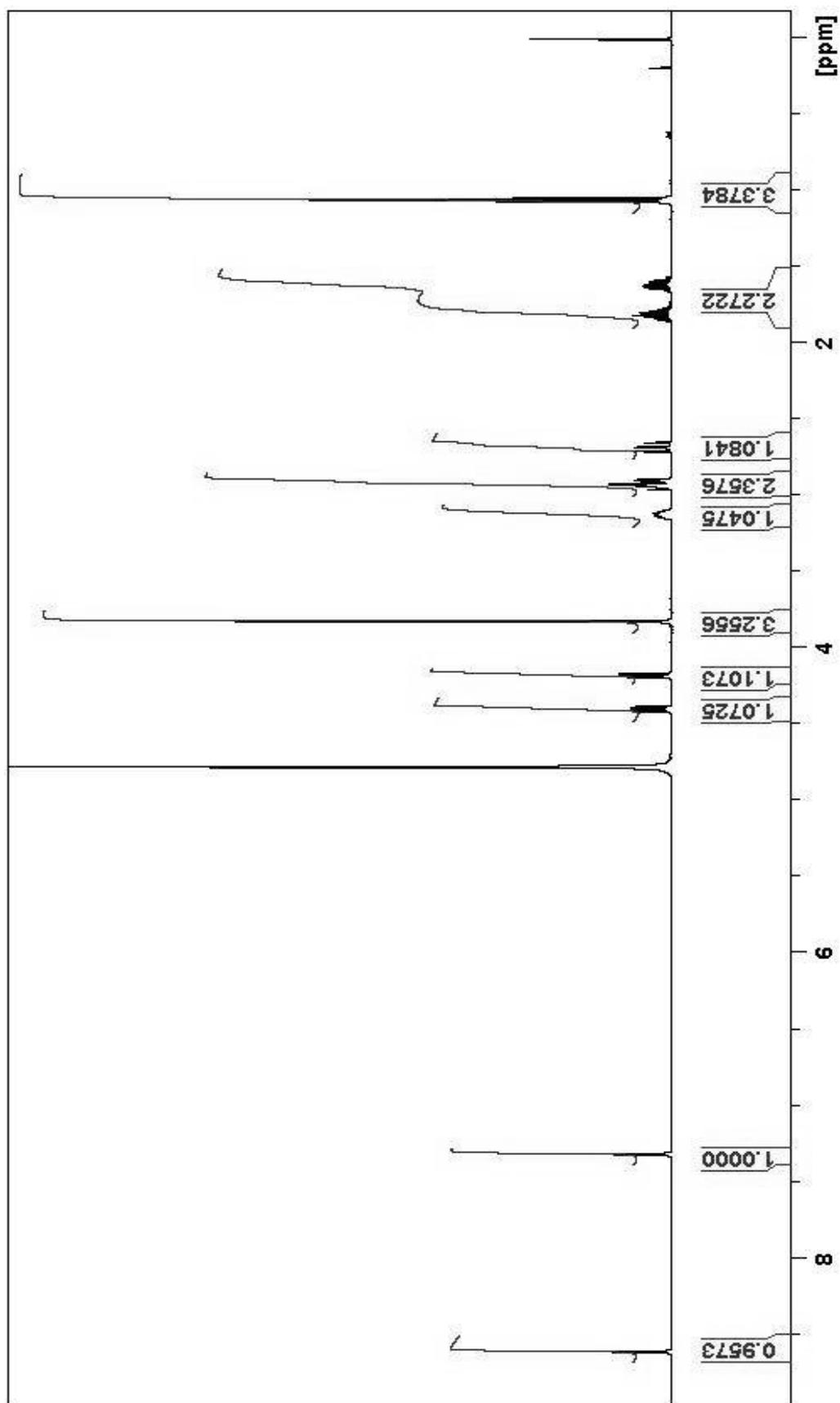


Figura 1.4: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da pilocarpina com integração dos sinais.

Anexo II:

Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos agonistas em diferentes solventes.

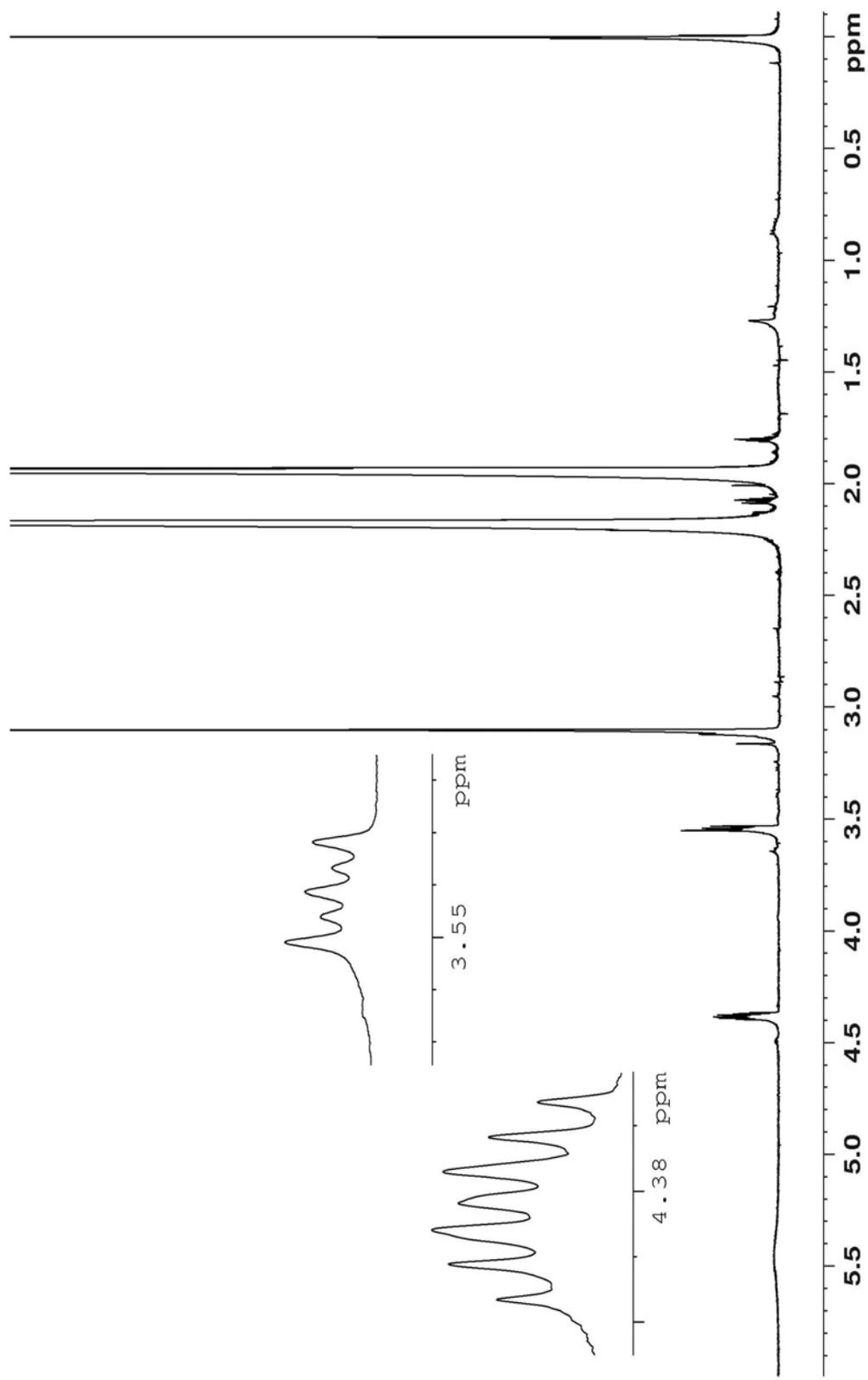


Figura 2.1: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do carbacol em acetonitrila deuterada.

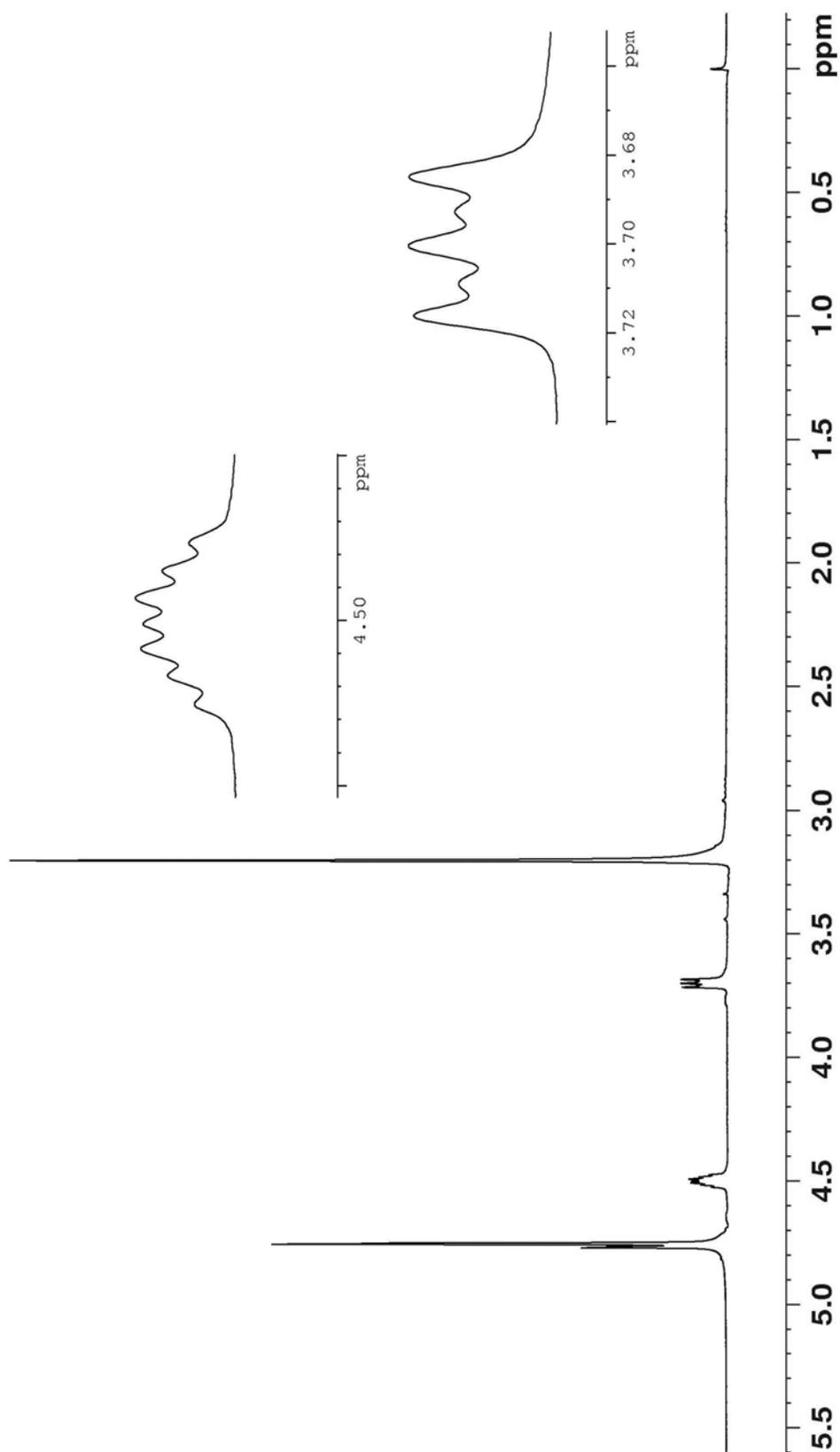


Figura 2.2: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do carbacol em clorofórmio deuterado.

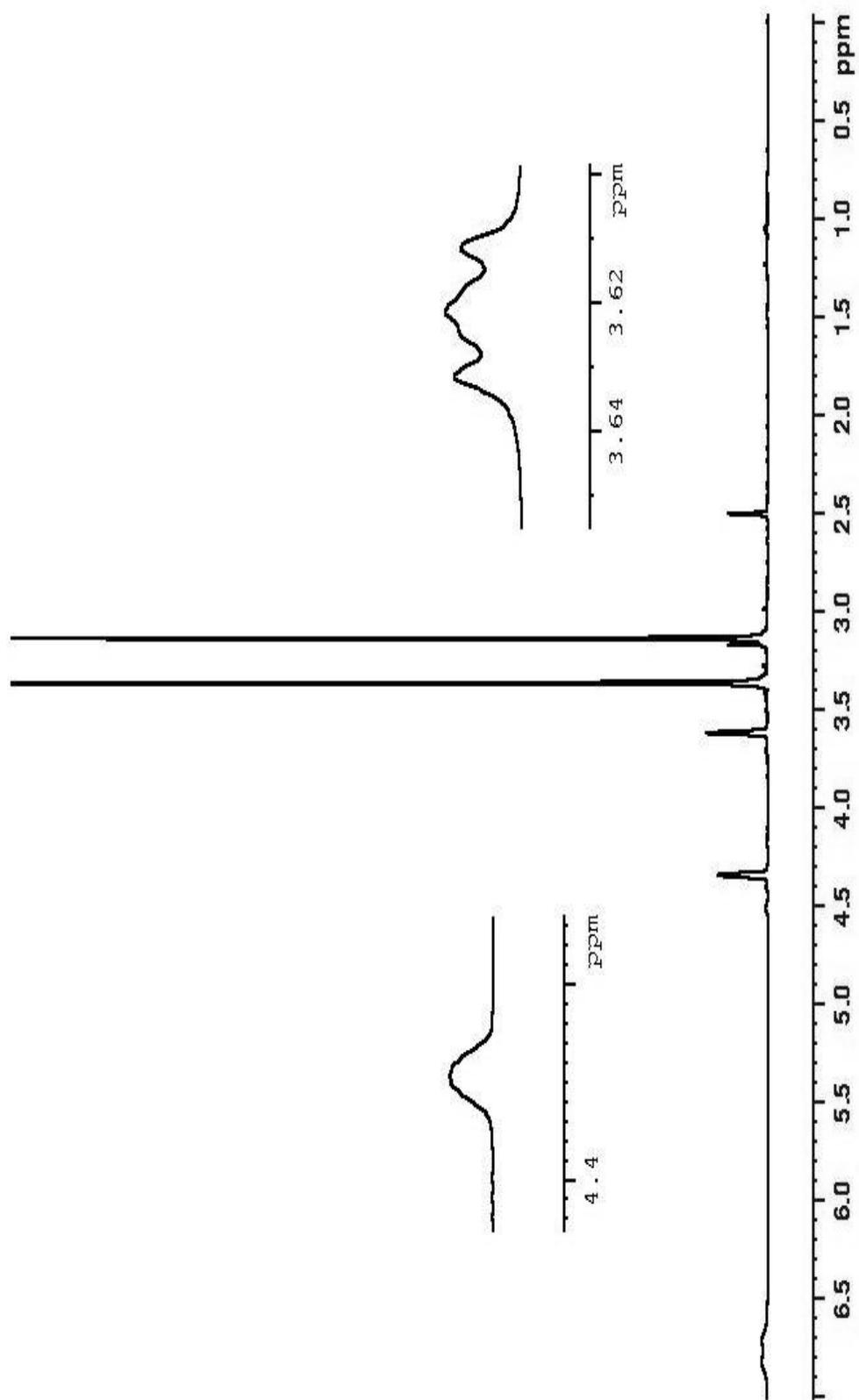
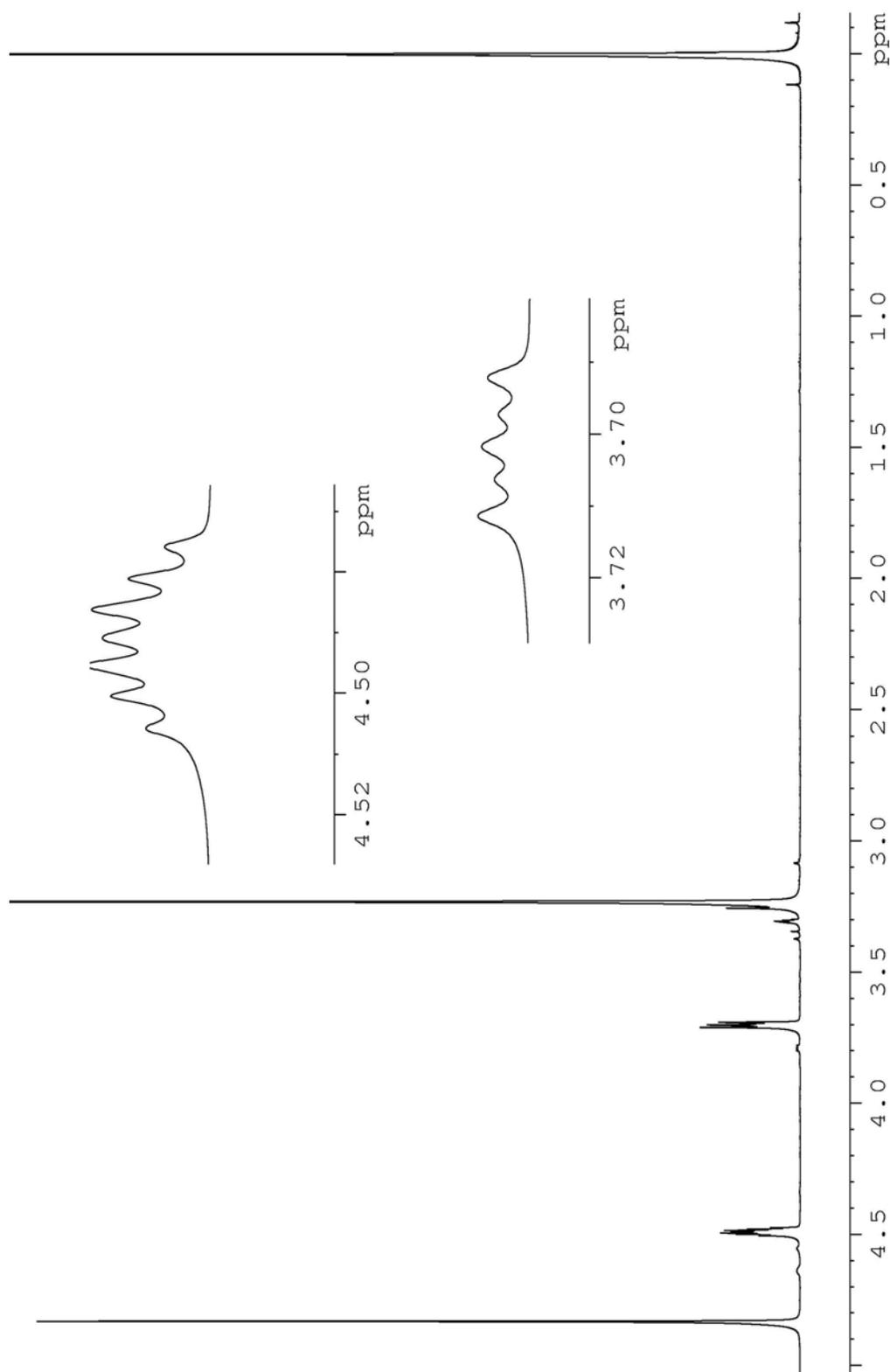
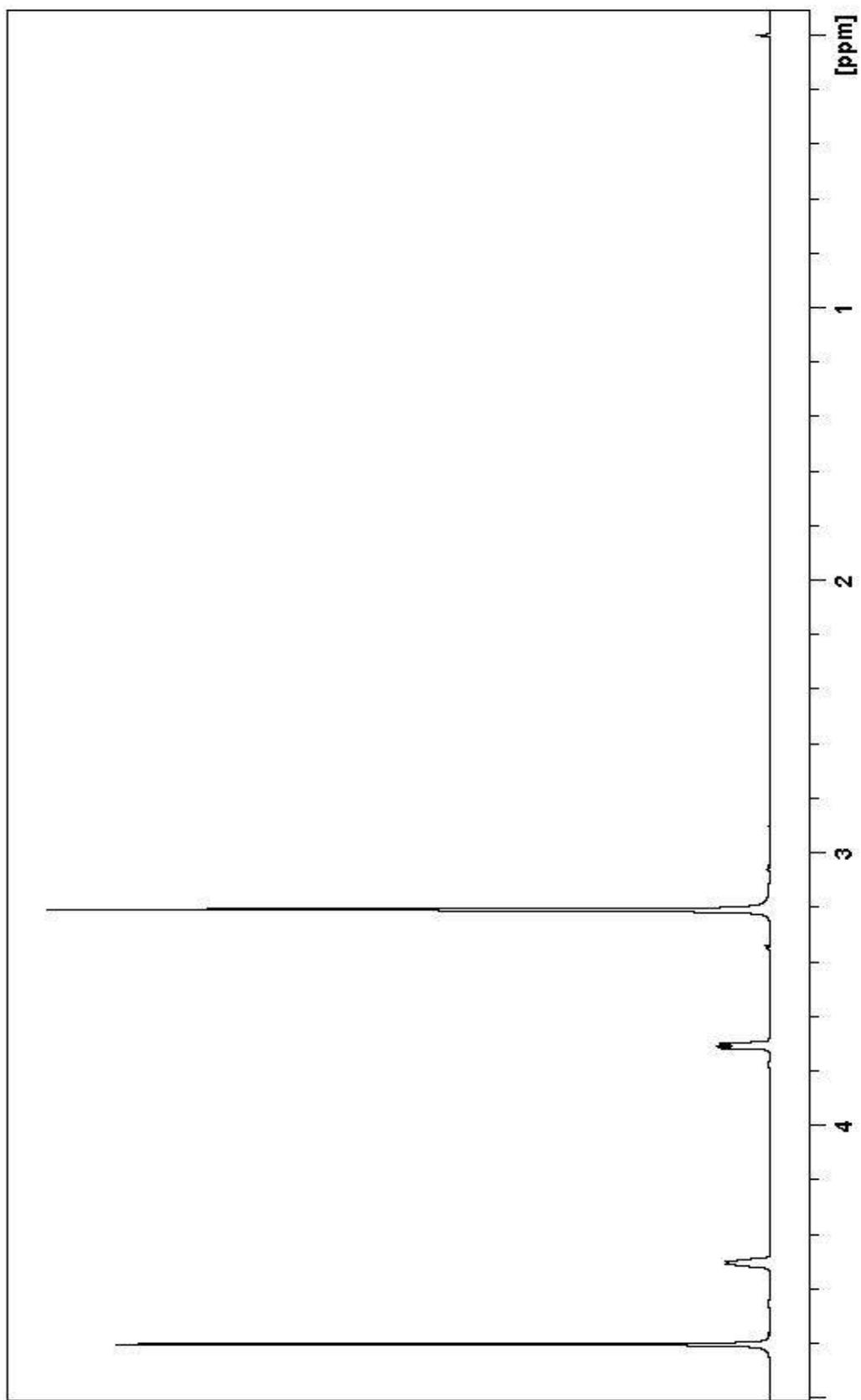


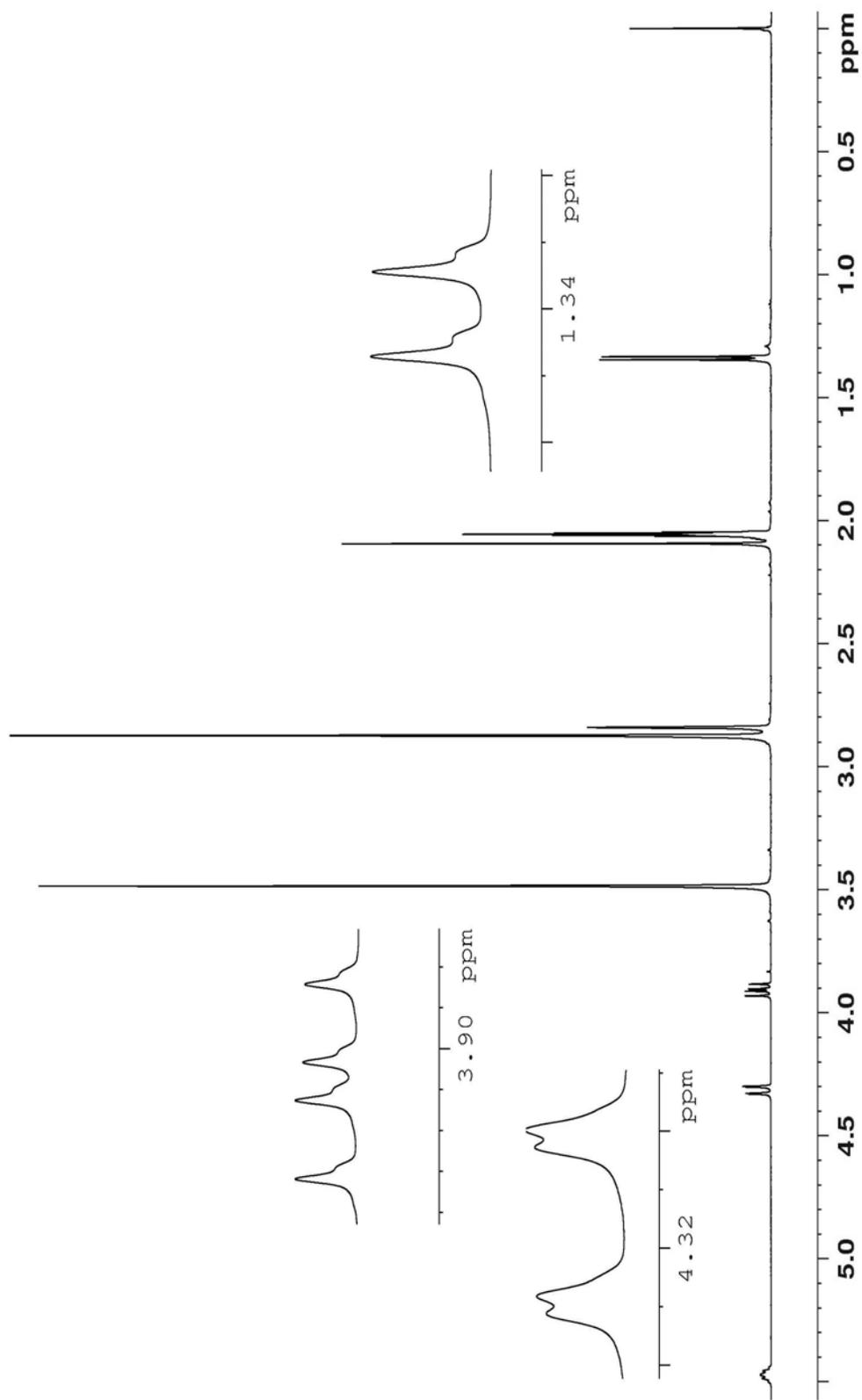
Figura 2.3: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do carbacol em DMSO deuterado.



**Figura 2.4:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do carbacol em metanol deuterado.



**Figura 2.5:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do carbacol em solução tampão aquosa deuterada.



**Figura 2.6:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da metacolina em acetona deuterada.

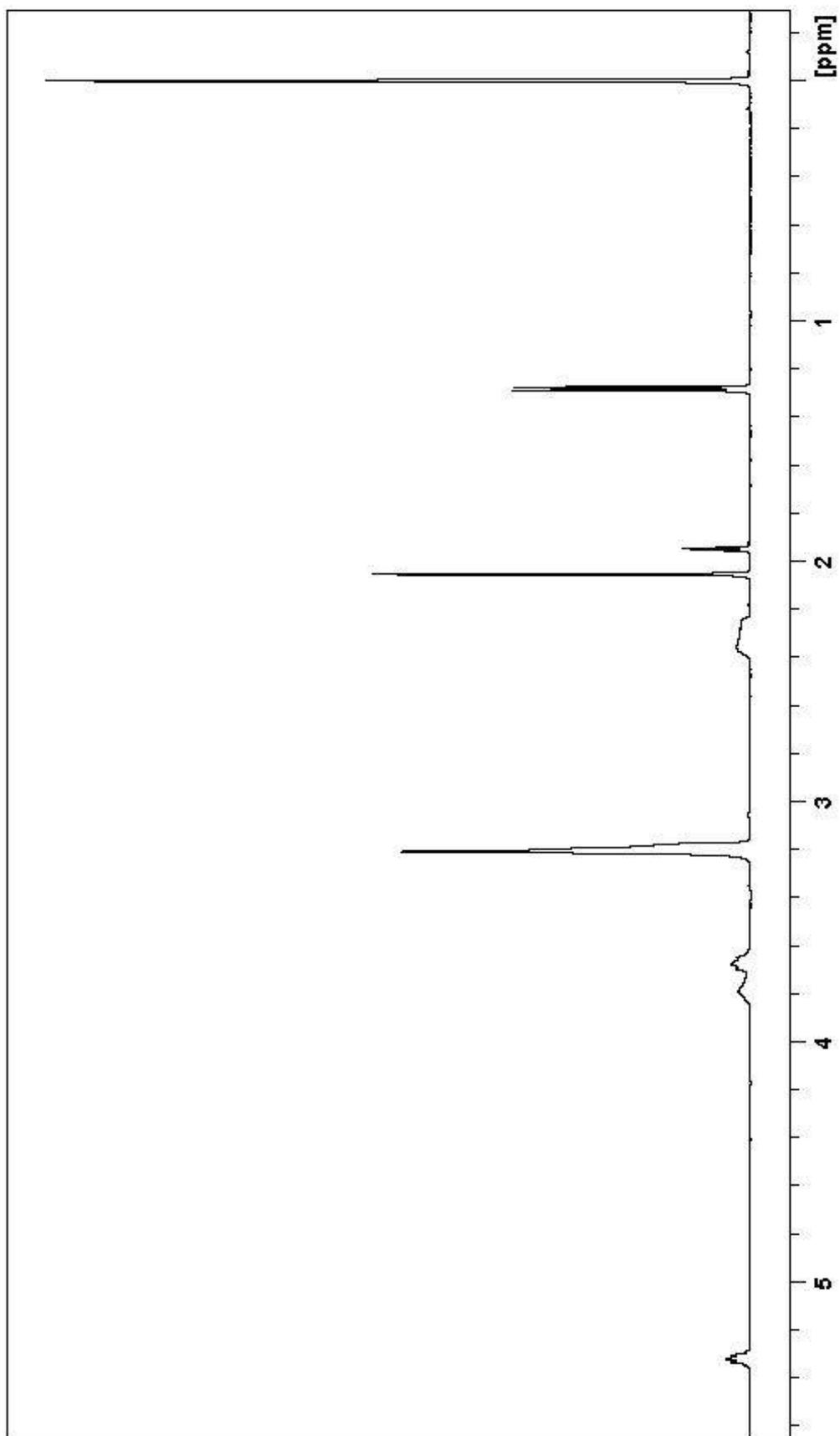
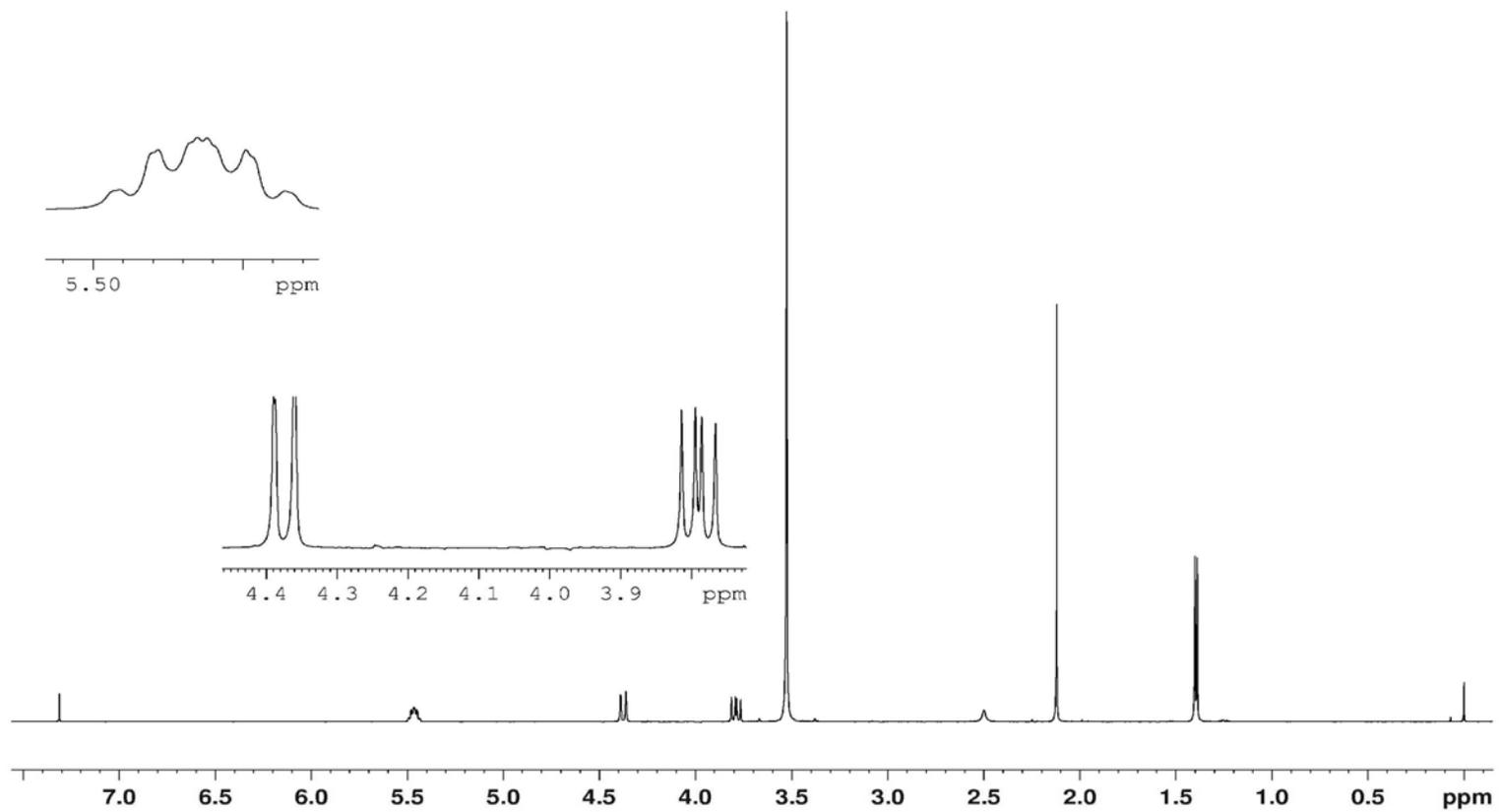
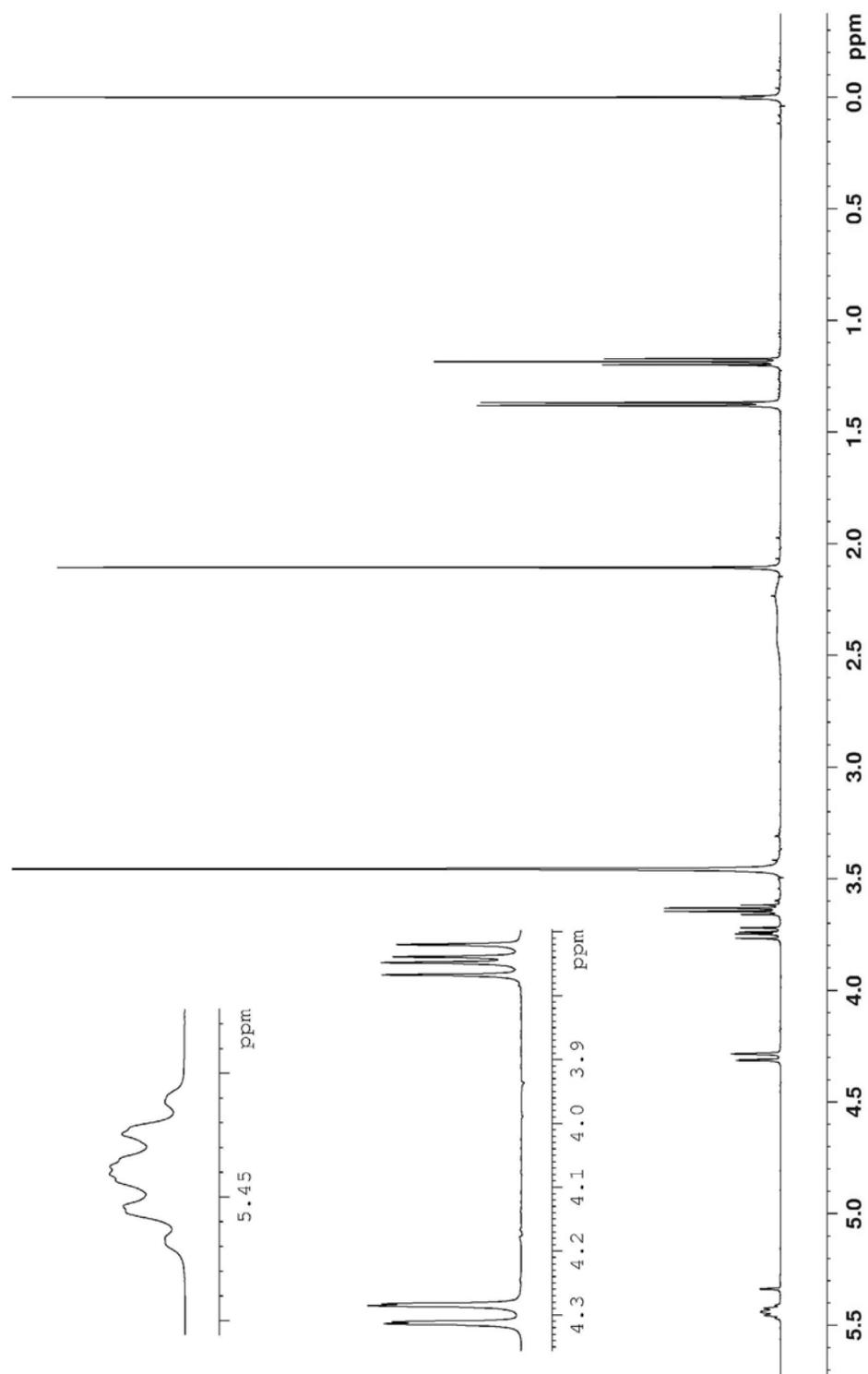


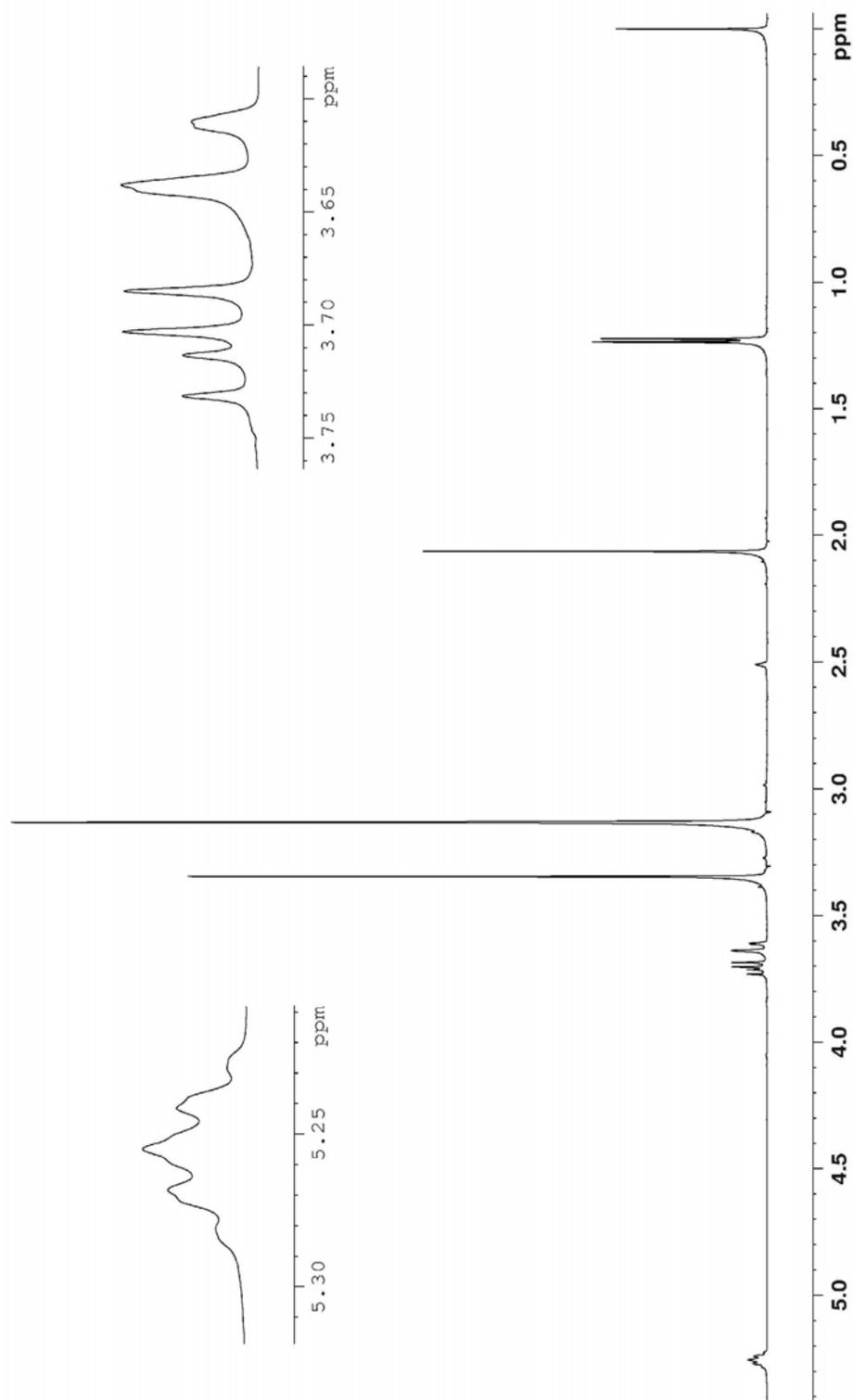
Figura 2.7: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da metacolina em acetoneitrila deuterada.



**Figura 2.8:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da metacolina em clorofórmio deuterado.



**Figura 2.9:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da metacolina em diclorometano deuterado.



**Figura 2.10:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da metacolin em DMSO deuterado.

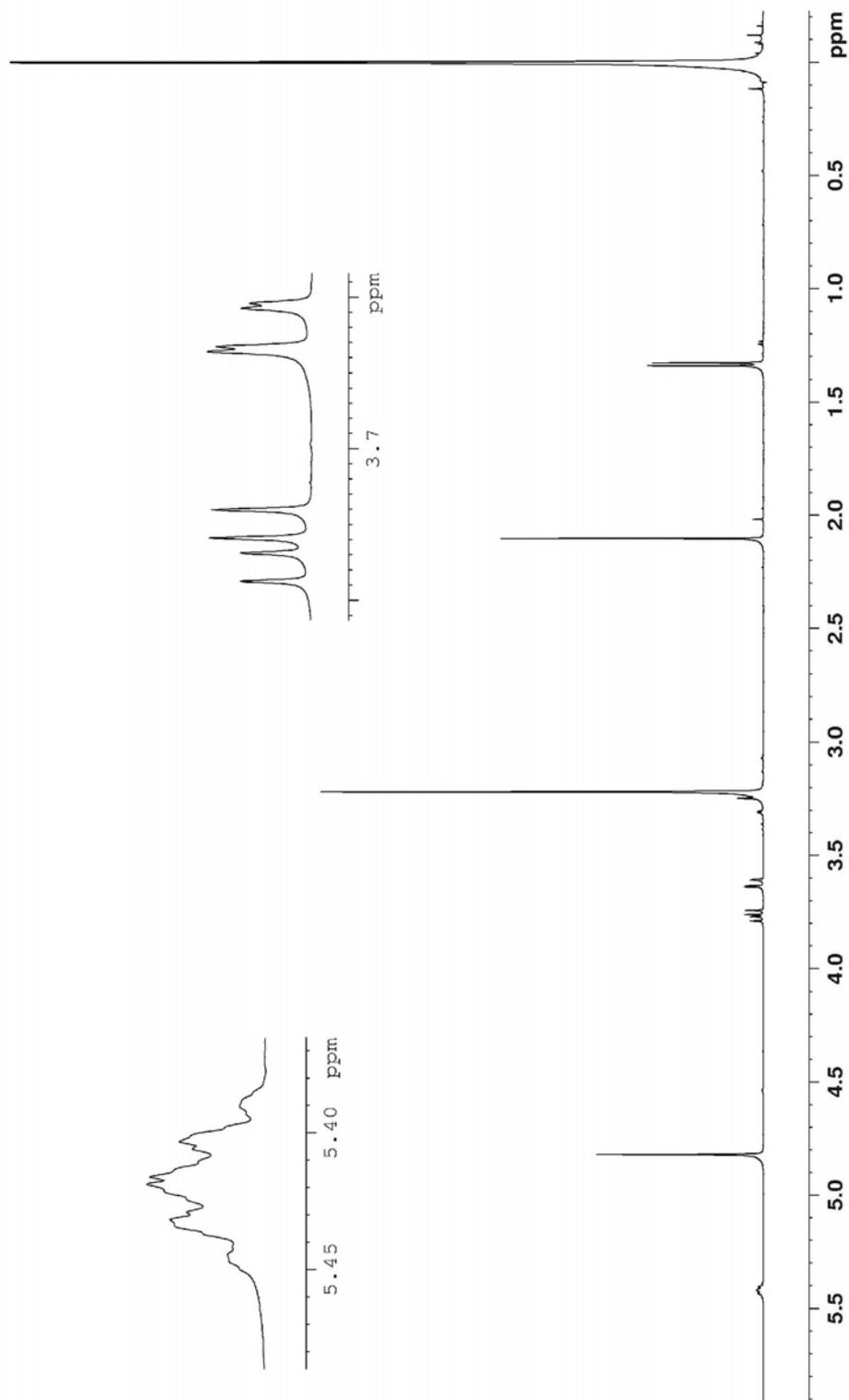
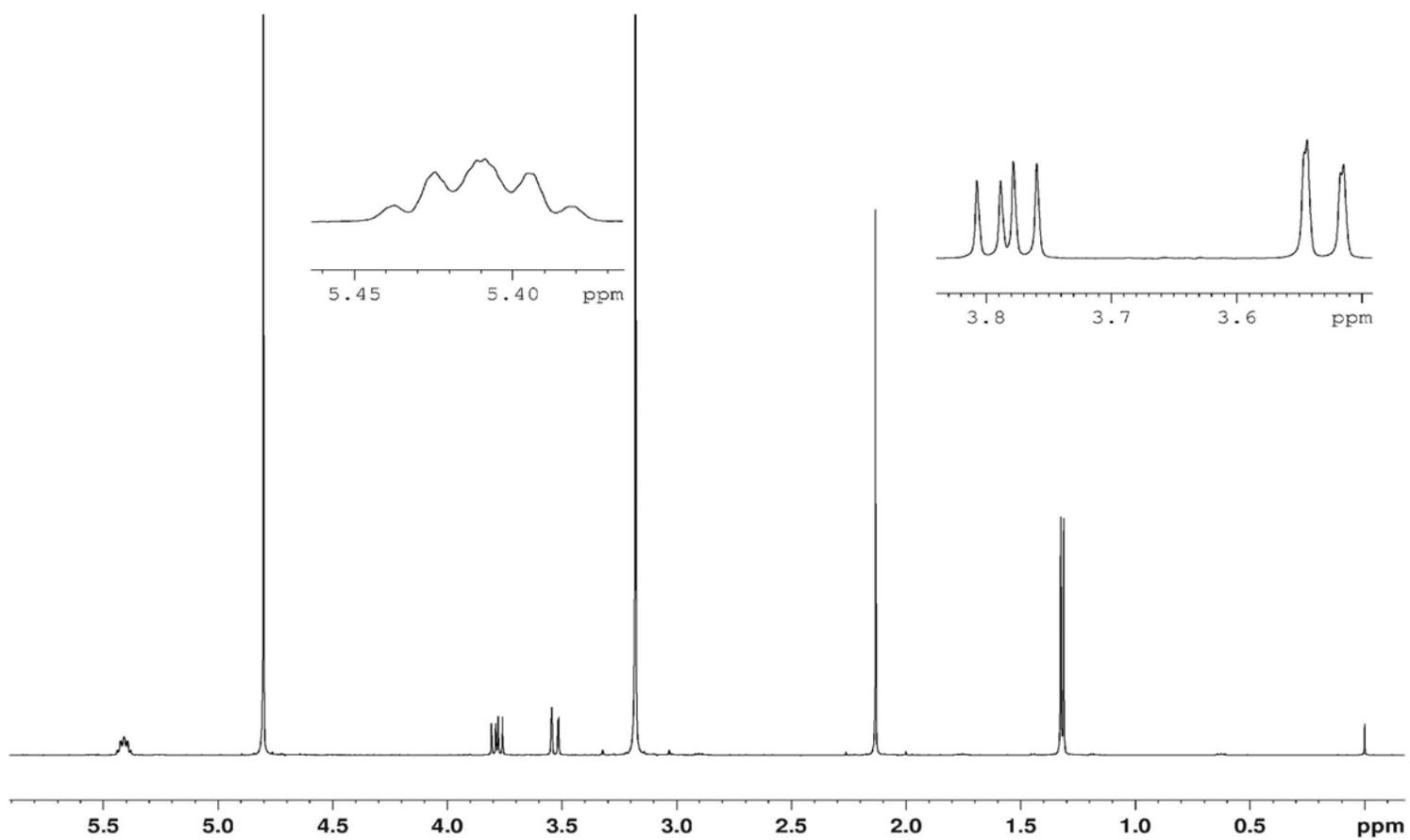


Figura 2.11: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da metacolina em metanol deuterado.



**Figura 2.12:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da metacolina em tampão aquoso deuterado.

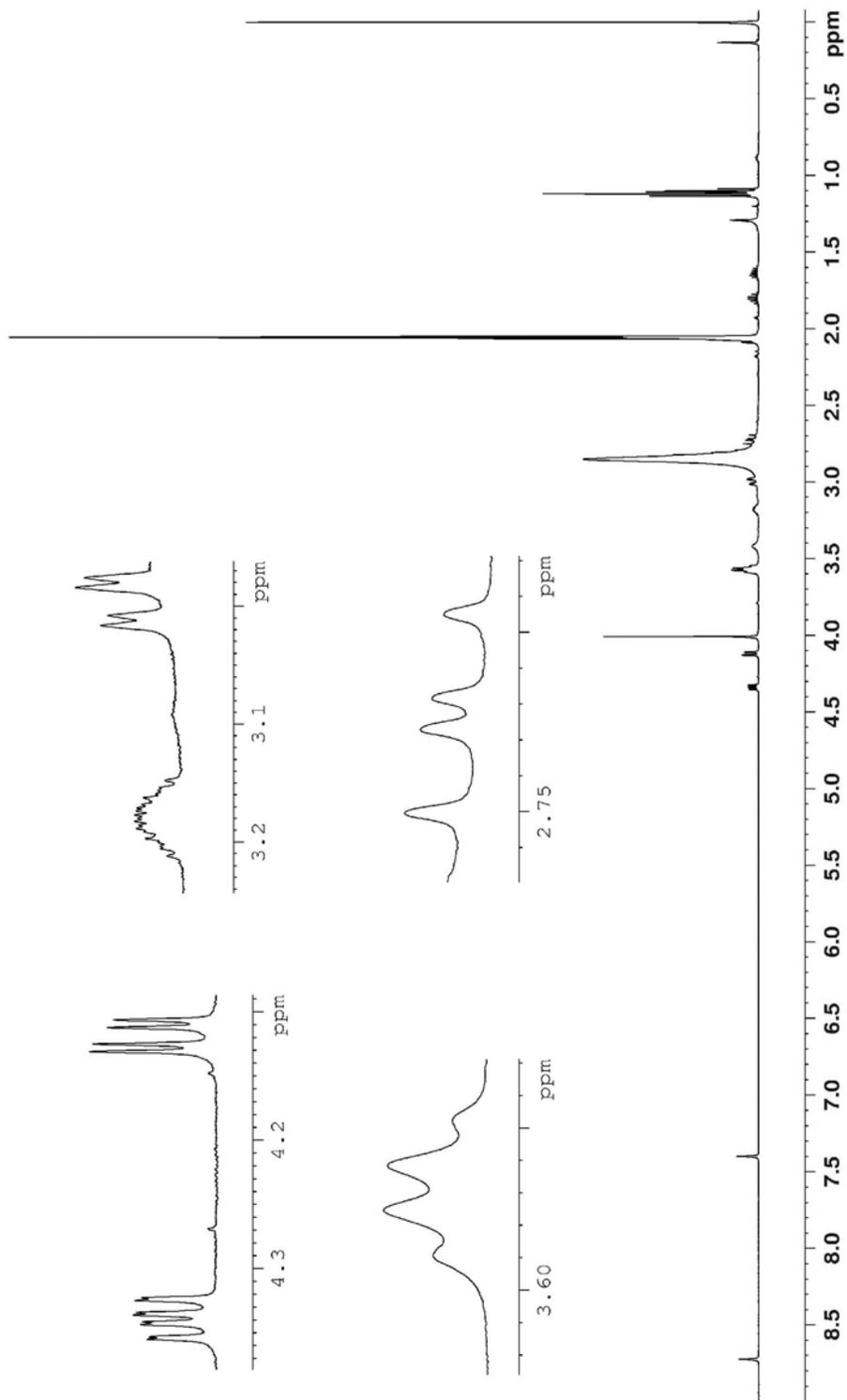
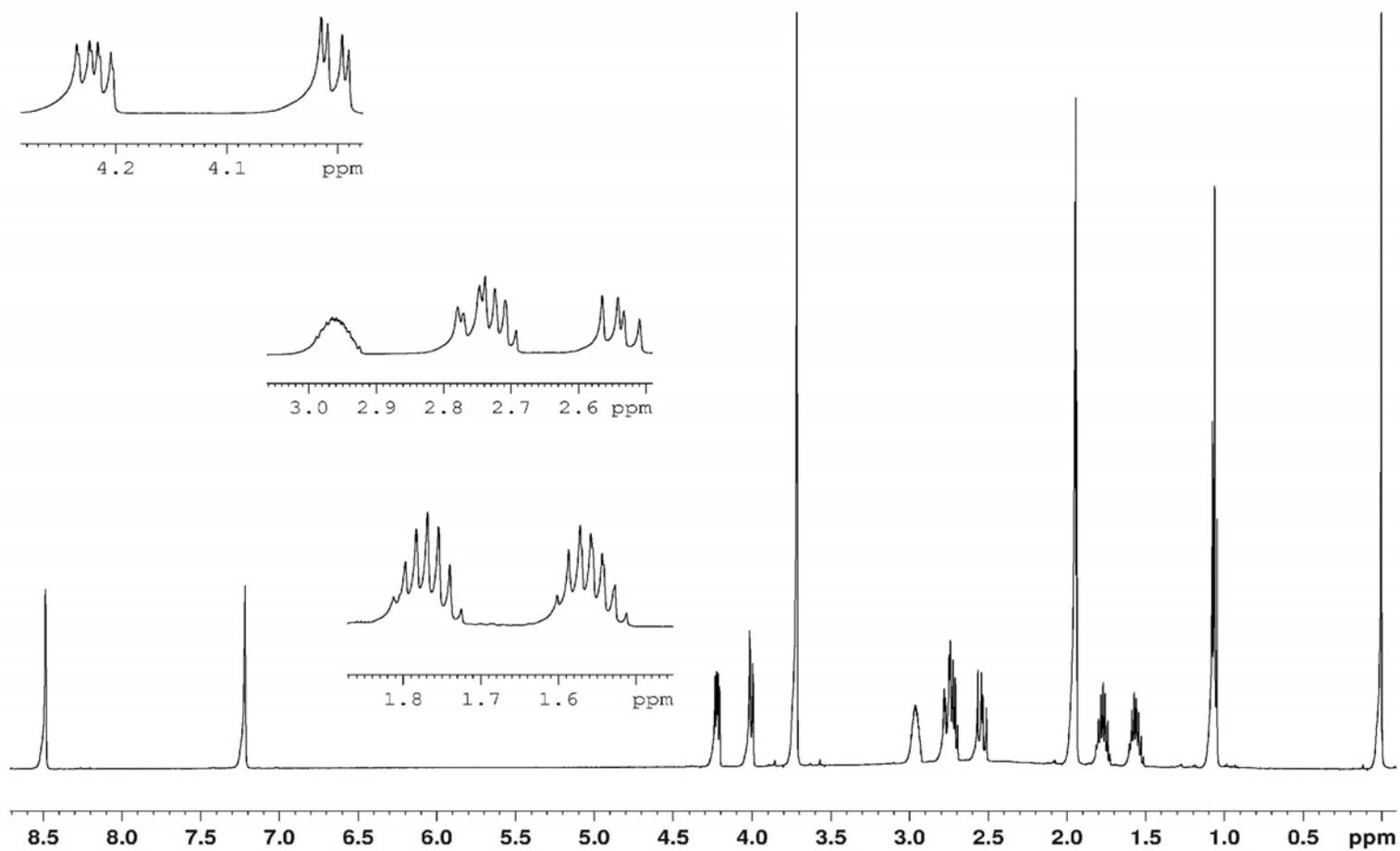


Figura 2.13: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da pilocarpina em acetona deuterada.



**Figura 2.14:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da pilocarpina em acetonitrila deuterada.

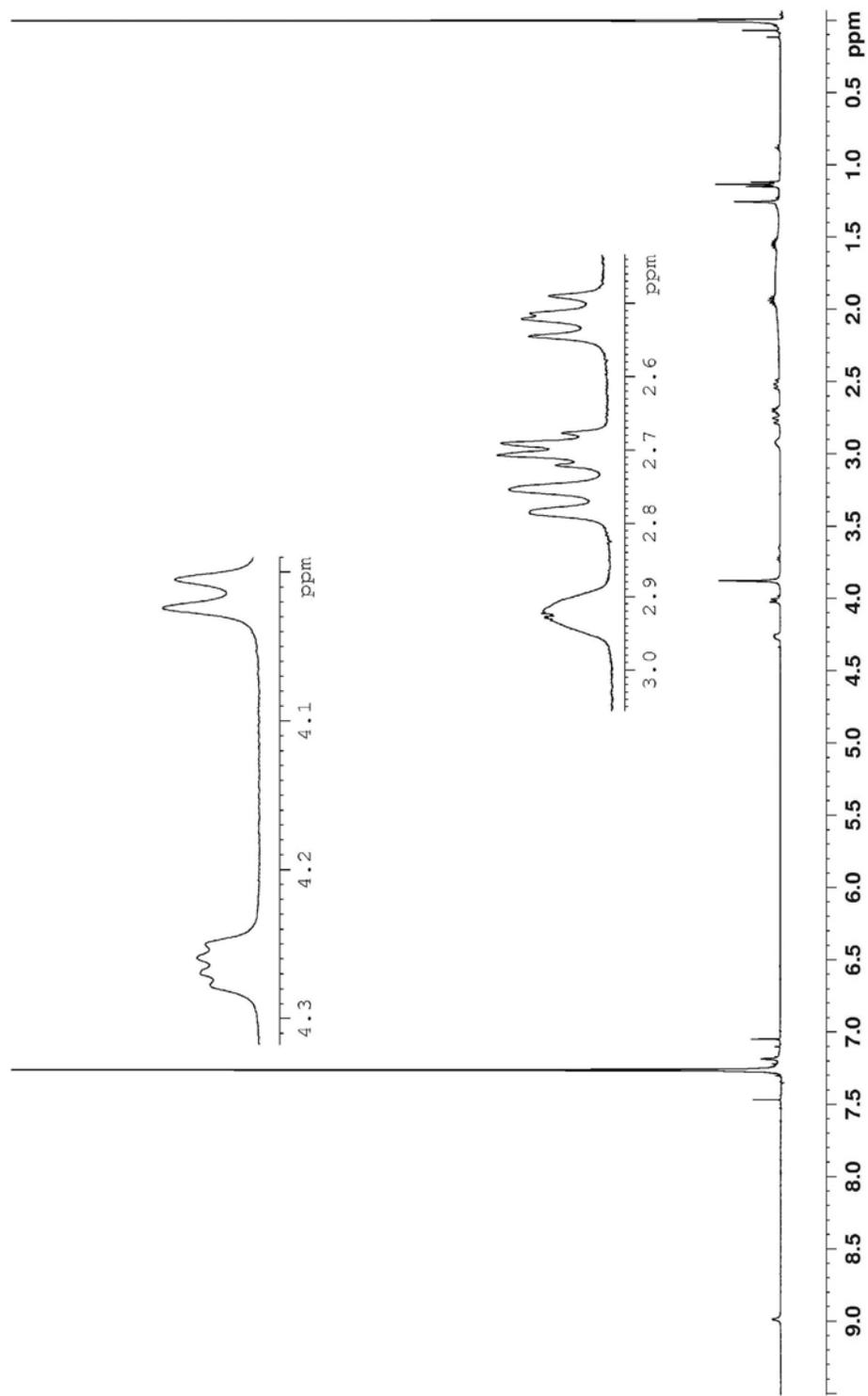
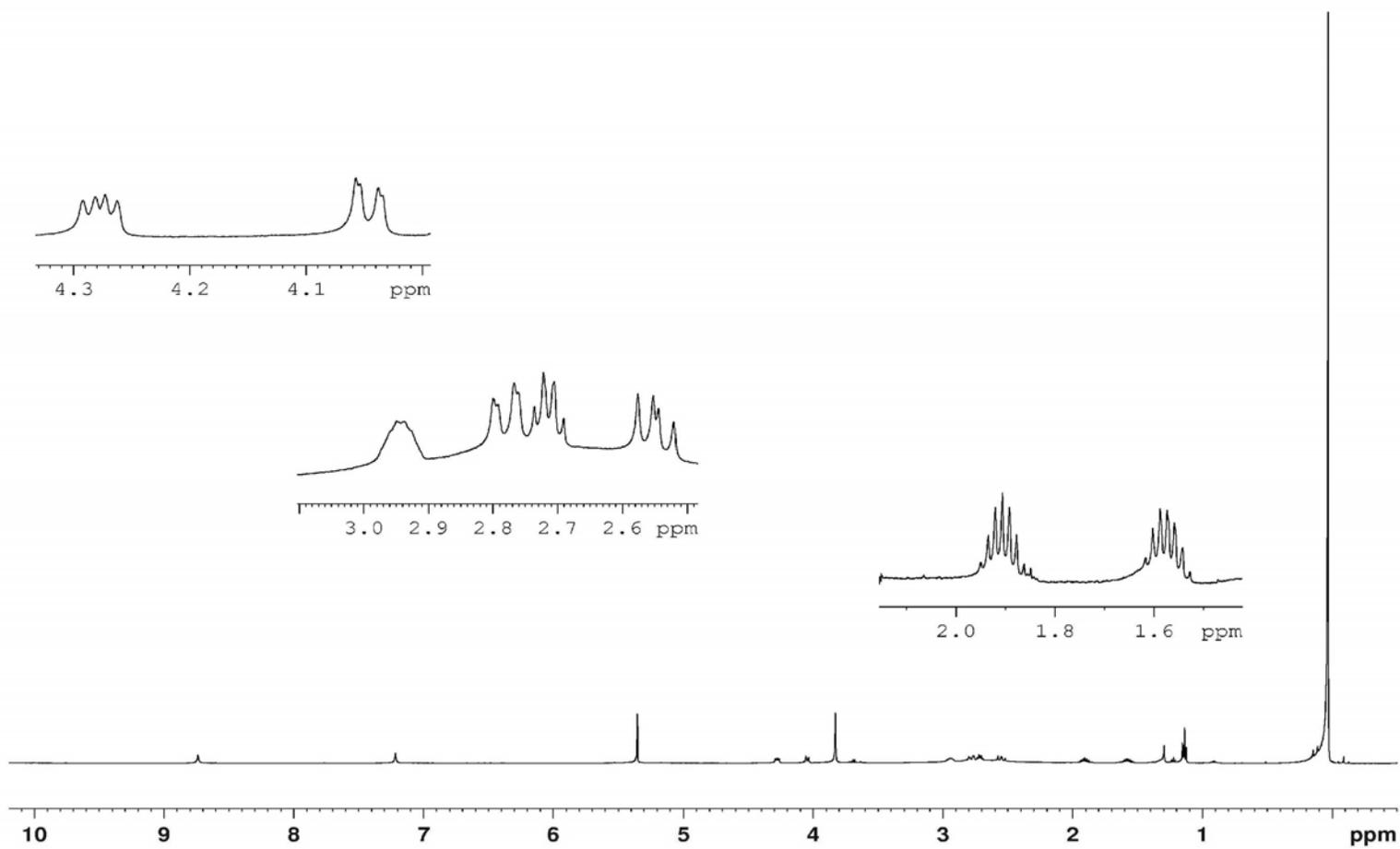


Figura 2.15: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da pilocarpina em clorofórmio deuterado.



**Figura 2.16:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da pilocarpina em diclorometano deuterado.

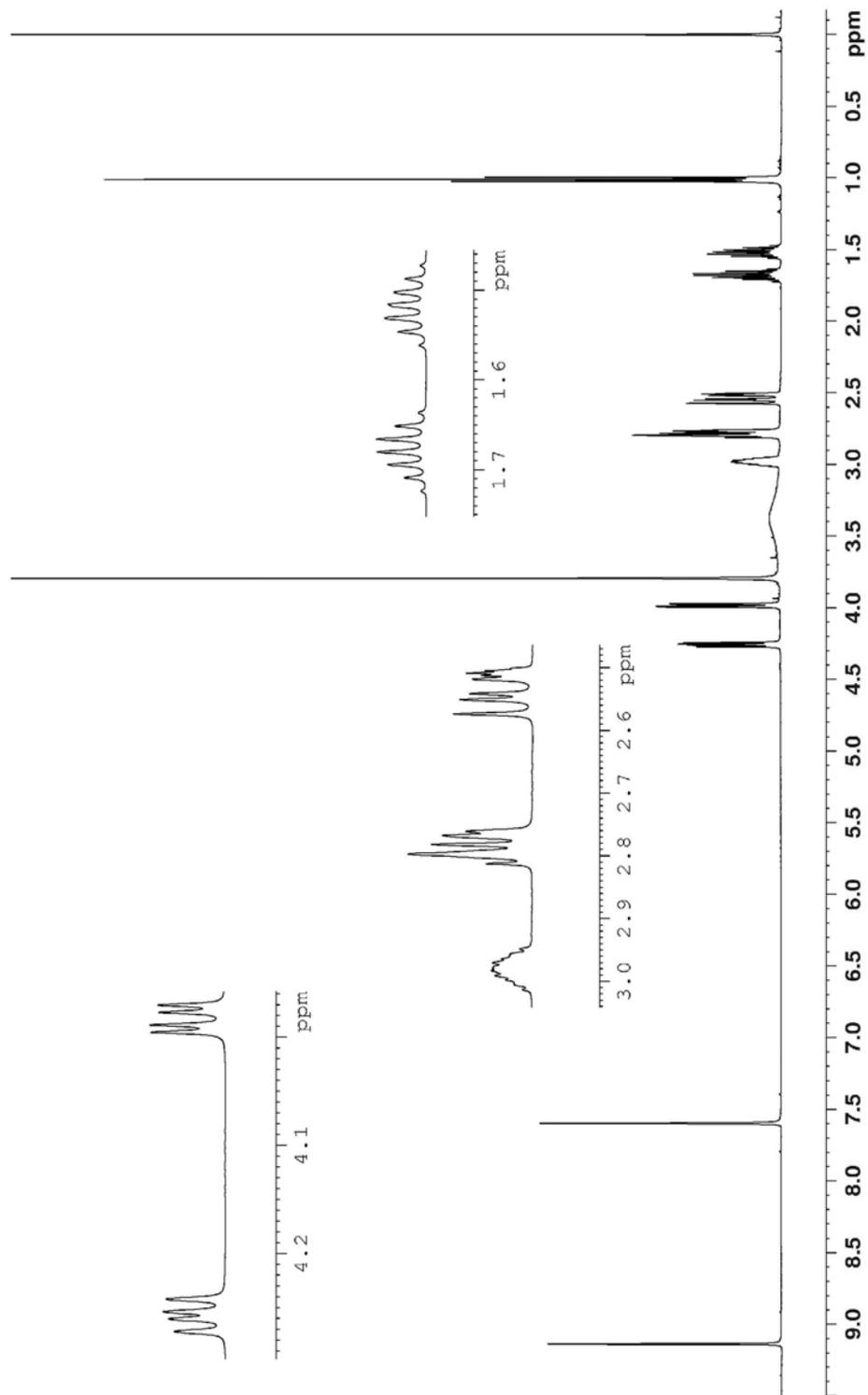
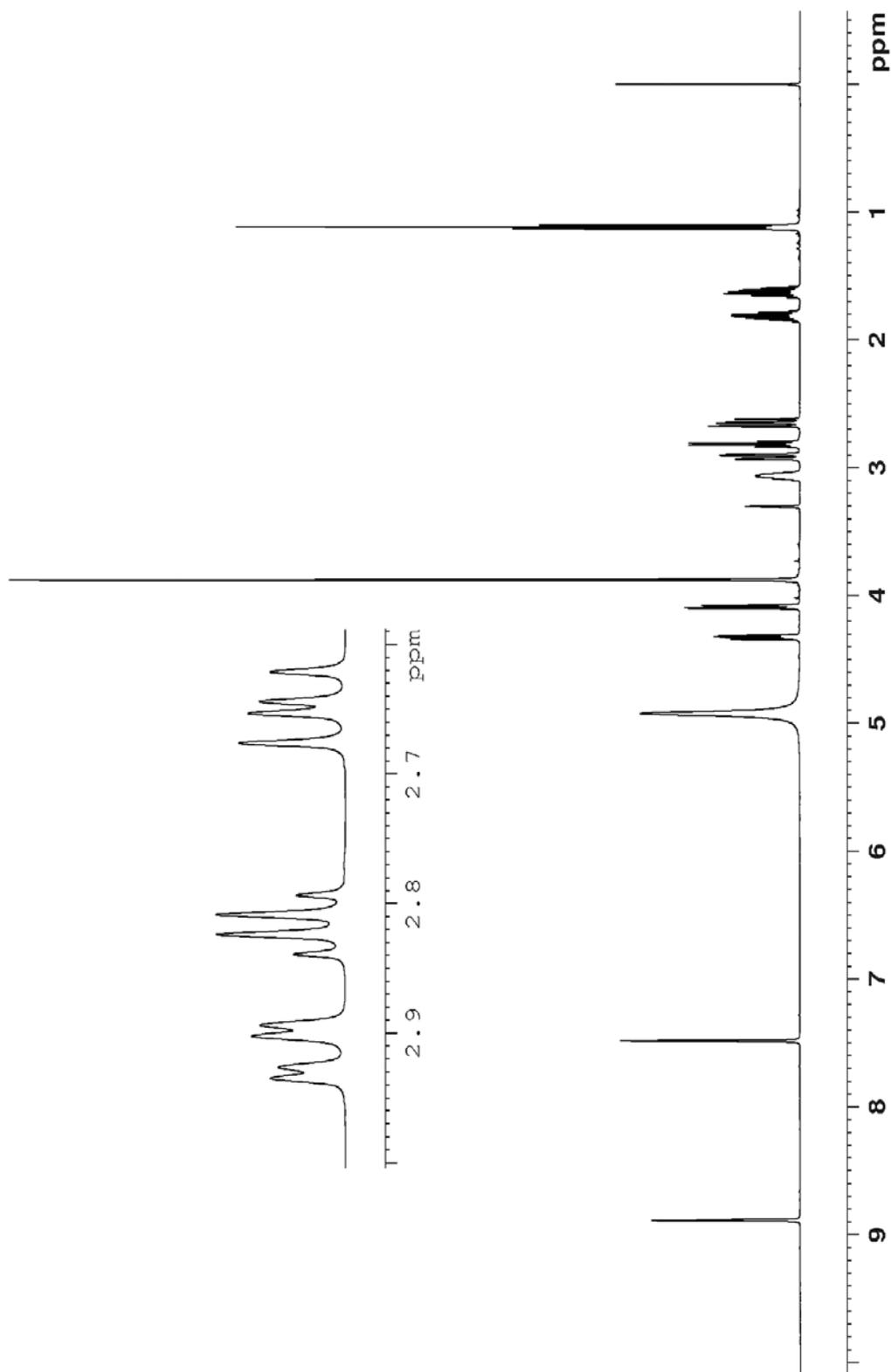


Figura 2.17: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da pilocarpina em DMSO deuterado.



**Figura 2.18:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da pilocarpina em metanol deuterado

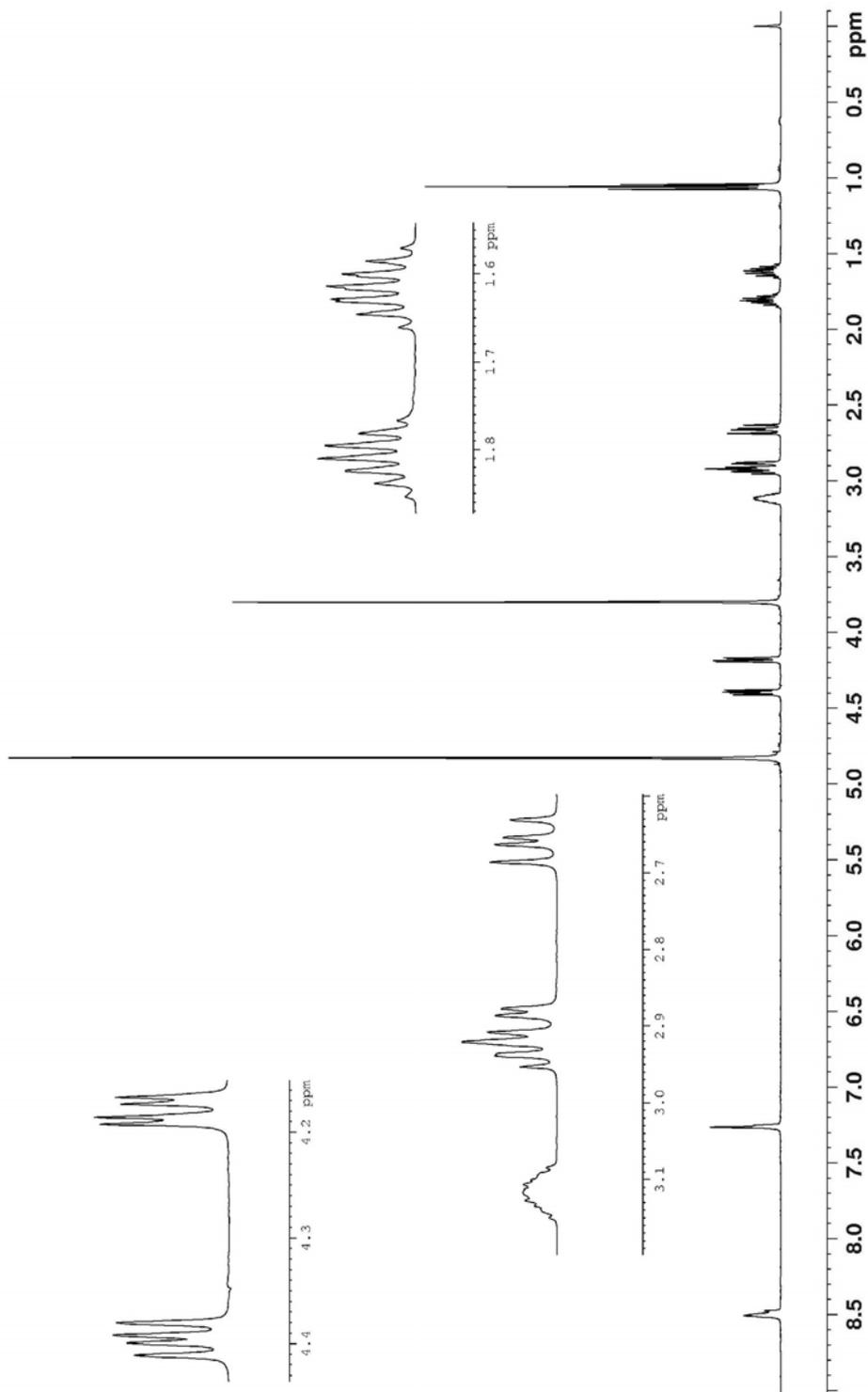
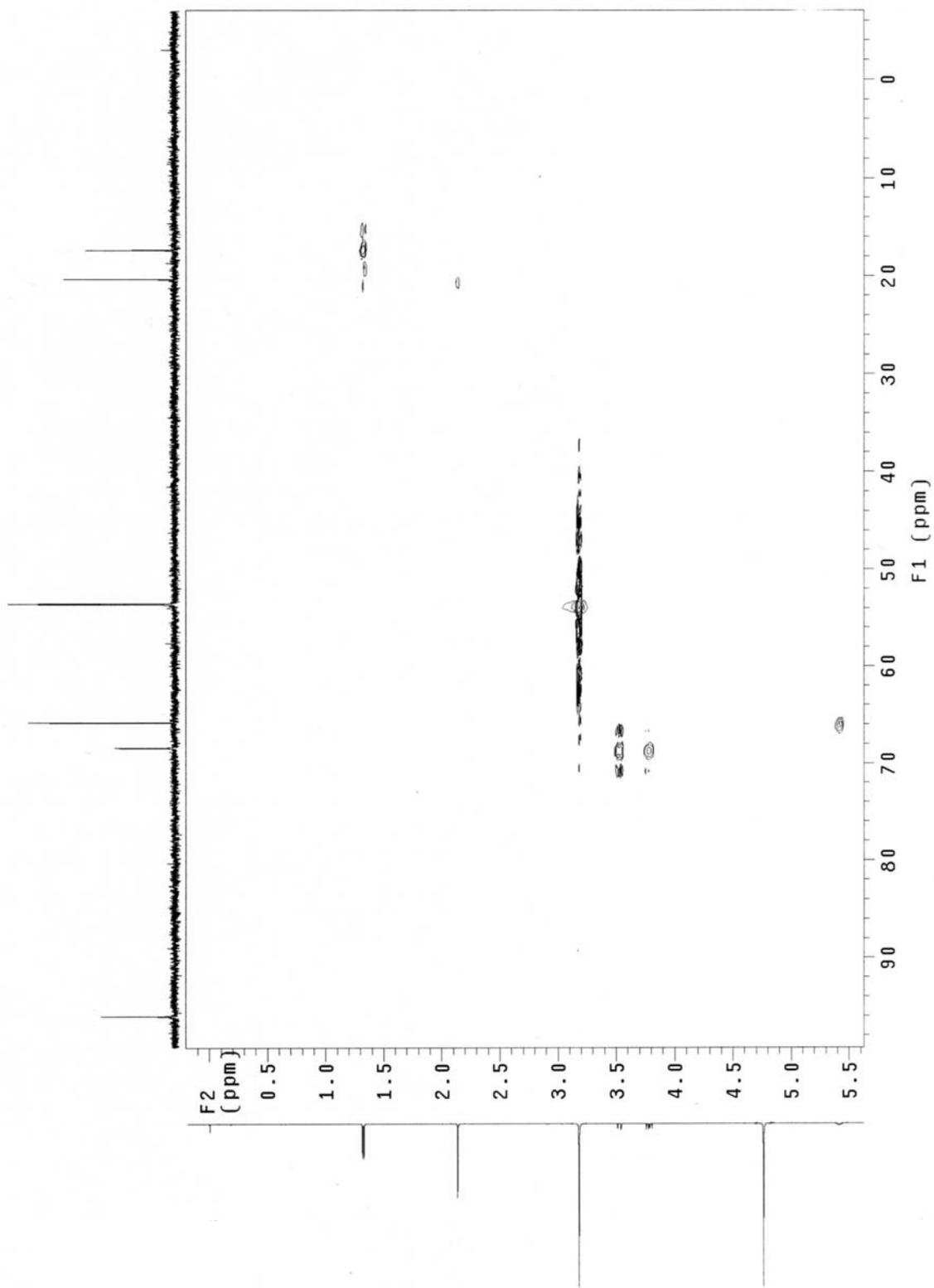


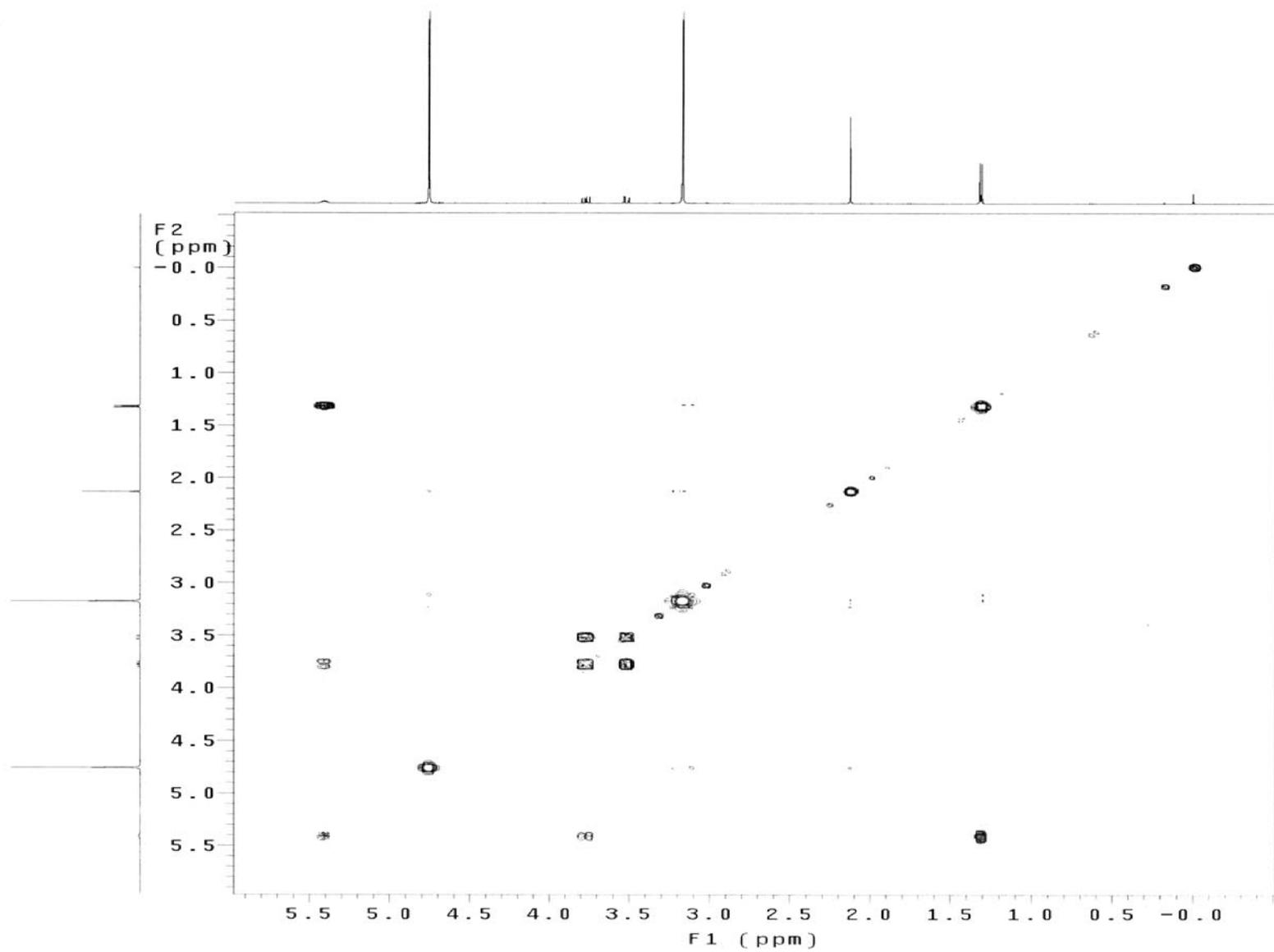
Figura 2.19: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da pilocarpina em tampão aquoso deuterado.

Anexo III:

Mapas de Contorno HSQC e COSY em D<sub>2</sub>O.



**Figura 3.1:** Mapa de contorno de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HSQC) da metacolina em  $\text{D}_2\text{O}$  deuterado.



**Figura 3.2:** Mapa de contorno de correlação homonuclear  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (COSY) da metacolina em  $\text{D}_2\text{O}$  deuterado.

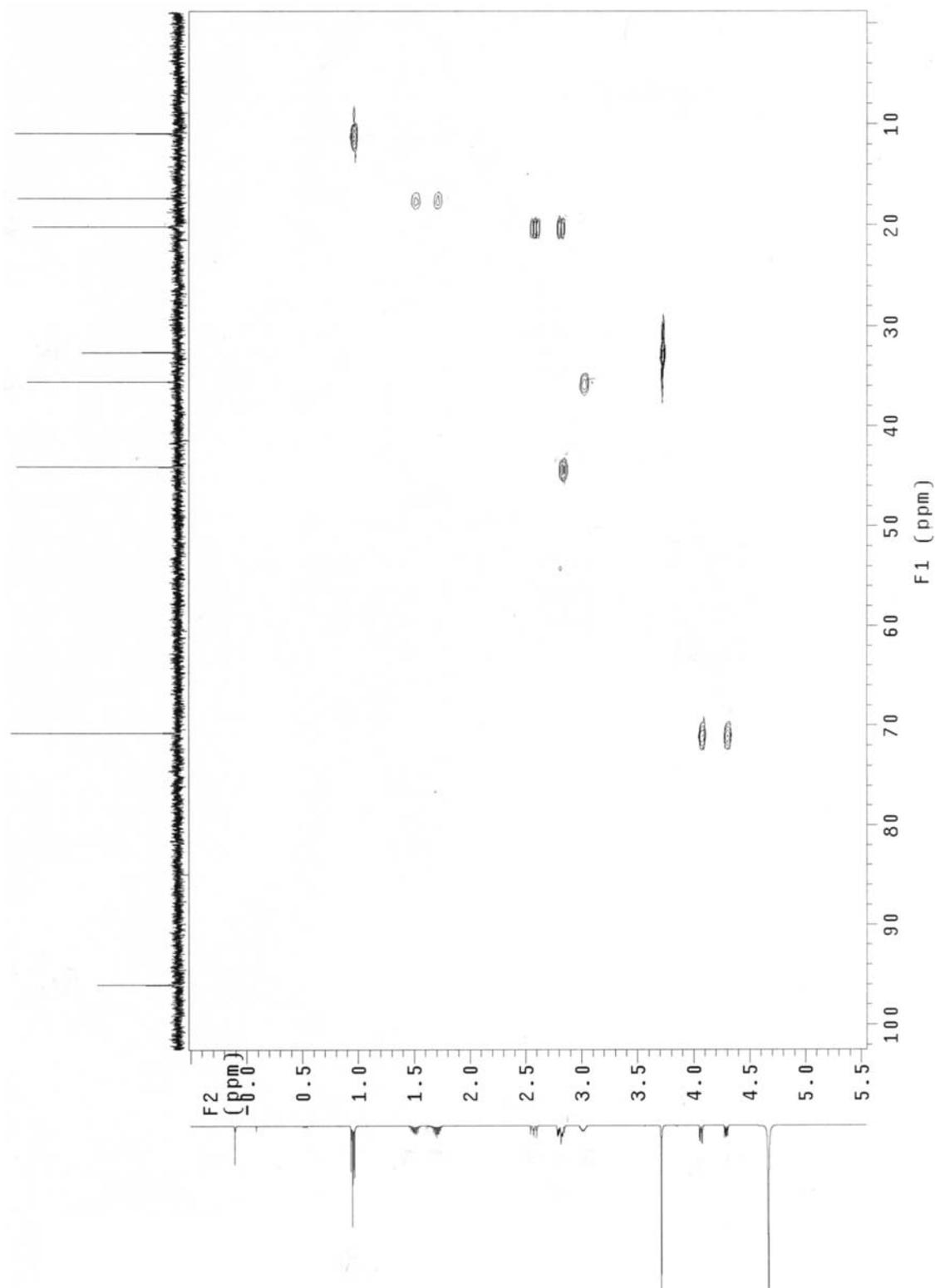
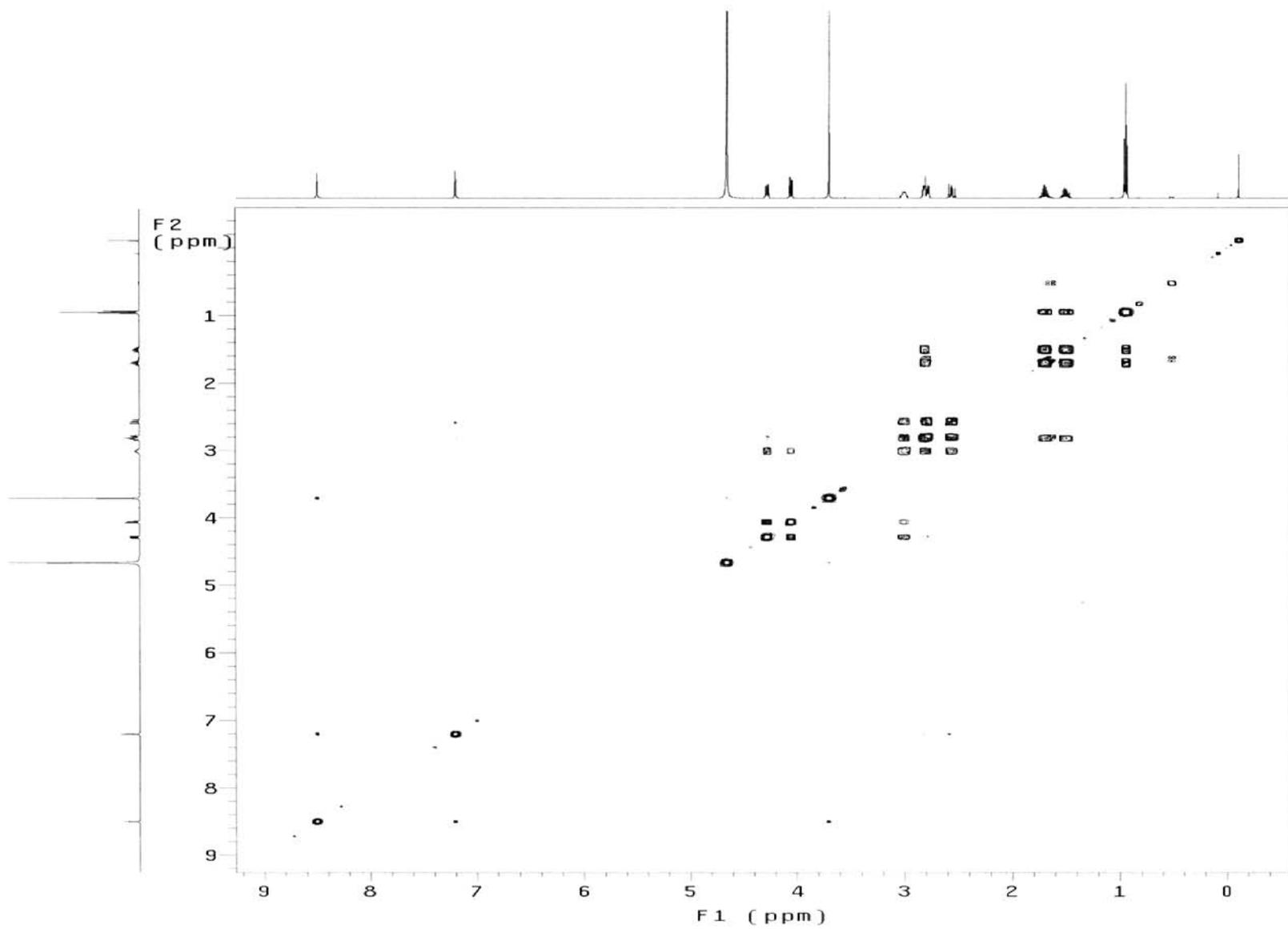


Figura 3.3: Mapa de contorno de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HSQC) da pilocarpina em  $\text{D}_2\text{O}$ . deuterado



**Figura 3.4:** Mapa de contorno de correlação homonuclear <sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H (COSY) da pilocarpina em D<sub>2</sub>O. deuterado