

ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C NO ESTUDO DE ROTAS BIOSINTÉTICAS DE PRODUTOS NATURAIS

Fernando César de Macedo Júnior*

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas - SP, Brasil

Recebido em 2/9/05; aceito em 19/1/06; publicado na web em 30/8/06

^{13}C NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY IN THE STUDIES OF BIOSYNTHETIC ROUTES OF NATURAL PRODUCTS. During the last five decades, as a result of an interaction between natural product chemistry, synthetic organic chemistry, molecular biology and spectroscopy, scientists reached an extraordinary level of comprehension about the natural processes by which living organisms build up complex molecules. In this context, ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy, allied with isotopic labeling, played a determinant role. Nowadays, the widespread use of modern NMR techniques allows an even more detailed picture of the biochemical steps by accurate manipulation of the atomic nuclei. This article focuses on the development of such techniques and their impact on biosynthetic studies.

Keywords: ^{13}C NMR; isotopic labeling; biosynthetic routes.

INTRODUÇÃO

Os organismos vivos produzem miríades de compostos orgânicos cuja grande maioria parece não participar diretamente do seu crescimento e desenvolvimento. No entanto, a apreciação crescente dos diversos efeitos biológicos produzidos por estas substâncias, tradicionalmente denominadas metabólitos secundários, tem incitado uma reavaliação dos seus possíveis papéis, especialmente no contexto de interações ecológicas.

Além disso, o reconhecimento das propriedades biológicas de ampla variedade de produtos naturais, termo empregado como sinônimo de metabólitos secundários, tem alimentado uma busca intensa por novos fármacos, antibióticos, inseticidas e herbicidas.

Por estes motivos, a química de produtos naturais foi alvo de intensas investigações durante as últimas décadas, resultando no desenvolvimento de teorias biosintéticas e em maior compreensão dos mecanismos de ação das enzimas. Estas descobertas tiveram um grande impacto sobre a imaginação dos químicos orgânicos, e a mimetização de processos bioorgânicos em laboratório levou a importantes avanços nos métodos sintéticos.

Muitos destes desenvolvimentos não teriam sido possíveis sem a ação de brilhantes pesquisas sobre as rotas biosintéticas de metabólitos secundários, onde a marcação isotópica tem desempenhado um papel fundamental.

As primeiras aplicações destes experimentos consistiam na incorporação de substratos enriquecidos em elementos radioativos, os radioisótopos. O produto natural marcado era destruído através de seqüências de degradações complexas e seus fragmentos eram monitorados quanto à emissão de radiação.

Neste contexto, o uso de isótopos estáveis, aliado à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), consistindo em um método rápido e não destrutivo, surgiu como uma ferramenta poderosa para elucidação de mecanismos bioquímicos.

Durante as primeiras aplicações da RMN a problemas biosintéticos¹, no final dos anos 60, o destino de precursores enri-

quecidos em ^{13}C era monitorado a partir dos aumentos nas intensidades dos sinais de ^{13}C -H satélites no espectro de RMN de ^1H . Este método², entretanto, não fornece informações de carbonos não ligados diretamente a hidrogênios e, assim, foi rapidamente superado pela espectroscopia de RMN de ^{13}C .

A partir dos anos 70, o estudo de rotas biosintéticas recebeu um grande impulso com os avanços no campo da espectroscopia de RMN provenientes da introdução de técnicas pulsadas associadas à transformada de Fourier. Estes desenvolvimentos facilitaram imensamente a obtenção de espectros de ^{13}C de produtos naturais, até então, dificultada pela sua baixa sensibilidade.

Hoje em dia, como um resultado de meio século de desenvolvimentos, muito mais respostas podem ser obtidas mediante a manipulação precisa de núcleos atômicos.

CONSIDERAÇÕES SOBRE RMN DE ^{13}C

Infelizmente, sob o ponto de vista da determinação estrutural, a distribuição isotópica do carbono na natureza é de apenas 1,1% em ^{13}C (número quântico de spin, $I = 1/2$) conferindo à RMN deste núcleo uma falta de sensibilidade intrínseca. A grande maioria dos átomos de carbono (98,9%) é constituída pelo isótopo magneticamente inerte, o ^{12}C ($I = 0$). Outra conseqüência deste fato, não raramente esquecida, é que uma amostra, mesmo de um composto orgânico simples, é constituída por uma mistura complexa de isotopômeros. Ver, por ex. a distribuição isotopomérica de carbono no etanol mostrada na Tabela 1.

Como pode ser verificado, a maior parte de uma amostra de etanol (97,81%), constituída pelo isotopômero 1, não é detectada pela RMN. Os isotopômeros 2 e 3, apresentando um núcleo de ^{13}C

Tabela 1. Distribuição isotopomérica de carbono no etanol

nº	Isotopômero	Distribuição Natural
1	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	$98,9\% \times 98,9\% = 97,81\%$
2	$^{13}\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	$1,1\% \times 98,9\% = 1,08\%$
3	$\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{CH}_2\text{-OH}$	$98,9\% \times 1,1\% = 1,08\%$
4	$^{13}\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{CH}_2\text{-OH}$	$1,1\% \times 1,1\% = 0,01\%$

*e-mail: fmacedo@ufba.br

Endereço atual: IQ - UFBA, 40170-290 Salvador - BA

em diferentes posições, são responsáveis pelos sinais do etanol em experimentos convencionais de RMN de ^{13}C . Os espectros de RMN de ^{13}C são complexos e apresentam muitas linhas devido aos acoplamentos escalares com os núcleos de hidrogênio ($^nJ_{\text{CH}}$, onde n é o número de ligações entre os núcleos acoplados). As baixas intensidades dos sinais de ^{13}C são, portanto, ainda mais reduzidas devido aos seus desdobramentos em multipletos.

O desenvolvimento de técnicas de dupla ressonância possibilitou a supressão do acoplamento J_{CH} fornecendo espectro de ^{13}C apresentando apenas singletos. A versão mais comum deste experimento consiste na irradiação dos núcleos de hidrogênio durante todo experimento de RMN de ^{13}C e é conhecido por desacoplamento heteronuclear em banda larga.

Sob estas condições as intensidades dos sinais de ^{13}C são ainda mais aumentadas devido ao efeito NOE ("Nuclear Overhauser Enhancement"). Como este aumento é proporcional ao número de hidrogênios ligados diretamente, os diferentes carbonos da molécula sofrerão diferentes variações de intensidade em virtude do NOE. Outra contribuição importante para esta distorção surge dos diferentes tempos de relaxação apresentados pelos diferentes carbonos na molécula, levando à perda de intensidade durante o experimento devido à saturação. Estas são as principais fontes de distorções que impedem a integração de espectros de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$, ou seja, correlacionar a intensidade de um sinal com o seu número de carbonos.

Finalmente, os sinais satélites resultantes do acoplamento escalar ^{13}C - ^{13}C ($^1J_{\text{CC}}$), esperado para o isotópomo 4, normalmente não são distinguidos do ruído nestes experimentos devido a sua pequena percentagem. Os valores dos acoplamentos escalares $^1J_{\text{CC}}$ aumentam proporcionalmente ao caráter s dos átomos na ligação e geralmente encontram-se entre 35 e 220 Hz. O acoplamento $^1J_{\text{CC}}$ depende ainda do substituinte X no fragmento ^{13}C - ^{13}C -X. A introdução de uma ligação a mais entre os pares de ^{13}C de um sistema de spins diminui bastante os valores do acoplamento escalar. Assim, os valores de $^2J_{\text{CC}}$ são, em média, 10 vezes mais baixos que os acoplamentos a uma ligação. Em geral, as magnitudes dos acoplamentos são suficientemente diferentes, permitindo distinguir os pares de carbonos que se encontram acoplados.

Além do desdobramento dos sinais, os núcleos ^{13}C acoplados apresentam-se ligeiramente blindados (de 0 a 0,03 ppm) devido ao efeito isotópico sobre os seus deslocamentos químicos (Figura 1).

A baixa abundância natural do ^{13}C oferece a oportunidade de enriquecimentos, possibilitando os estudos biossintéticos através da marcação isotópica. No caso do ^{13}C , um enriquecimento de cerca de apenas 1% significa duplicar a intensidade do sinal correspondente.

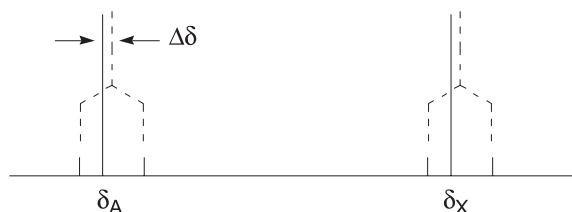


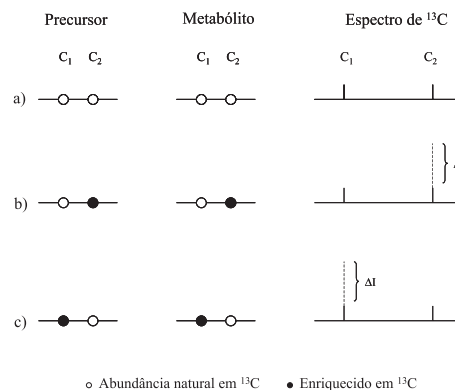
Figura 1. Efeito isotópico do ^{13}C sobre o deslocamento químico em RMN de ^{13}C

MARCAÇÃO COM ^{13}C

Marcação simples

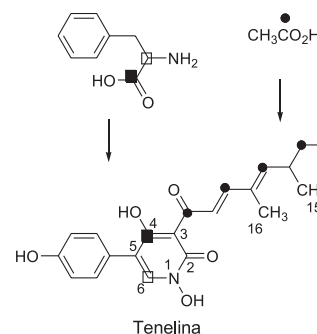
Um dos métodos de marcação com ^{13}C mais empregados consiste na utilização de precursores enriquecidos em apenas uma po-

sição, caracterizando a marcação simples. Assim, o mapeamento da incorporação destes precursores em metabólitos é determinado pela comparação do espectro de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ do metabólito marcado com o espectro do composto não marcado. O Esquema 1 mostra os resultados da incorporação de precursores enriquecidos simplesmente em ^{13}C em metabólitos.



Esquema 1. Efeito da incorporação de acetato marcado simplesmente sobre o espectro de RMN de ^{13}C

A simplicidade e elegância deste método podem ser ilustradas pelo estudo sobre a tenelina (Esquema 2), um metabólito isolado do fungo *Beauveria bassiana*³. A incorporação de precursores simplesmente marcados mostrou que o esqueleto inteiro (exceto pelos dois grupos metila, C-15 e C-16, originados da metionina) foi formado pela condensação entre uma cadeia policetílica de dez carbonos e a fenilalanina. As marcações das posições C-4 e C-6 do metabólito pela [1- ^{13}C] fenilalanina e [2- ^{13}C] fenilalanina, respectivamente, indicam que o carbono carboxílico é transferido de C-2 para C-3 do aminoácido durante a biossíntese.

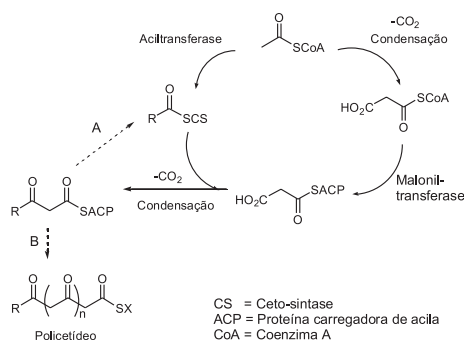


Esquema 2. Proposta de biossíntese da tenelina

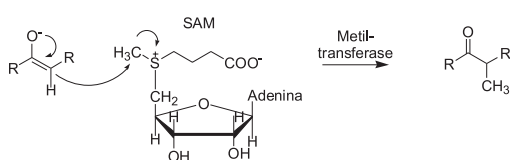
A conclusão a respeito do envolvimento da cadeia policetílica baseia-se no mecanismo de incorporações sucessivas de unidades C-C intactas na construção destas cadeias. Neste processo, uma cadeia policetílica R-COEnz é estendida mediante sucessivas condensações descarboxilativas com o grupo malonil de 3 carbonos, resultando em um aumento de dois carbonos a cada repetição do ciclo⁴ (Rota A; Esquema 3). Assim, a incorporação de acetato simplesmente marcado em um policetídio resulta em um padrão apresentando posições marcadas e não marcadas alternadas.

A utilização de metionina marcada resultou no enriquecimento das metilas 15 e 16 possibilitando assim, a determinação de sua origem. Inicialmente, a reação da metionina com ATP catalisada pela metionina-adenosil-transferase transfere a metila marcada para a S-adenosilmetionina (SAM), um importante agente metilante biológico. A C-metilação da cadeia policetílica pela SAM, por sua vez, é

catalisada por uma trans-metilase específica. A reação sempre se processa via ataque eletrofílico da metila reativa do fon sulfônio a um metileno enolizável conforme mostrado no Esquema 4.

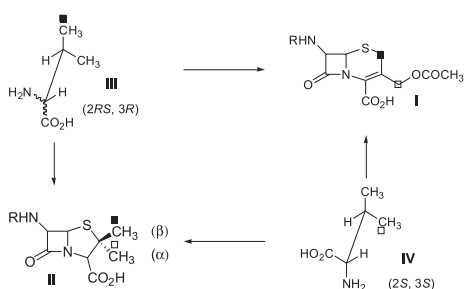


Esquema 3. Etapas enzimáticas de alongamento de uma cadeia policetílica



Esquema 4. Metilação biológica de uma cadeia policetílica

Em uma outra aplicação da marcação simples, a estereoespecificidade da inserção do grupo isopropila da valina durante a biossíntese da cefalosporina (I; Esquema 5) e penicilina (II) foi estabelecida pela incorporação dos precursores quirais marcados: (2*RS*, 3*R*)-valina [4-¹³C] (III) e (2*S*, 3*S*)-valina [4-¹³C] (IV). Estes estudos⁵ permitiram concluir que os grupos isopropilas são incorporados com retenção de configuração.



Esquema 5. Incorporação de valina marcada na cefalosporina (I) e penicilina (II)

Apesar da existência de várias outras aplicações bem sucedidas, a obtenção dos valores de enriquecimentos isotópicos a partir da diferença entre as intensidades dos sinais no espectro de ¹³C

{¹H} do metabólito enriquecido e não enriquecido apresenta sérias limitações. Pequenas flutuações instrumentais inevitáveis nos experimentos sucessivos de RMN de ¹³C causam variações nas intensidades dos sinais, criando dificuldades óbvias quando estes erros são das mesmas ordens que as diferenças de intensidades. Portanto, os enriquecimentos devem estar aproximadamente 0,5-1,0% em ¹³C acima da abundância natural para serem detectados pelo método da diferença⁴.

Experimento de RMN de ¹³C com desacoplamento descontínuo inverso (“Inverse Gated Decoupling”) utilizando-se altos intervalos de tempo entre as acumulações é capaz de contornar este problema.

Nesta técnica, o desacoplador é ligado apenas durante a aquisição do sinal minimizando, assim, as variações das intensidades dos sinais de ¹³C devido a efeitos NOE. Além disso, os altos tempos entre as repetições das seqüências, estimados a partir dos tempos de relaxação (T₁) dos carbonos da molécula, impedem a saturação dos sinais. Assim, as áreas dos sinais nos espectros (obtidas por integração direta) podem ser relacionadas quantitativamente com o teor de ¹³C.

Este método foi utilizado nos estudos biossintéticos do terreinol⁶, um novo produto natural de *Aspergillus terreus* (Figura 2). Sua origem policetílica foi determinada através de experimentos de incorporação de D-glicose [1-¹³C], uma vez que a utilização do acetato de sódio inibiu a produção do metabólito de interesse inviabilizando os estudos de marcação isotópica com este precursor. A Figura 2 mostra o espectro obtido através do experimento com desacoplamento descontínuo inverso que revelou as posições enriquecidas a partir das integrais (Tabela 2).

A origem biossintética deste metabólito foi interpretada à luz dos mecanismos metabólicos e das teorias biogenéticas. De acor-

Tabela 2. Dados de RMN de ¹³C do terreinol marcado com D-glicose [1-¹³C]

Carbono	δ _c	Integral (marcado)	Integral (não marcado)
1	59,7	1,2	1,1
2	123,1	2,3	1,1
3	152,3	1,3	1,2
4	120,8	2,3	1,4
5	156,7	1,2	1,2
6	104,7	2,3	1,3
7	128,0	0,9	1,0
8	190,7	2,6	1,4
9	106,6	1,1	1,4
10	33,8	2,4	1,2
11	26,0	1,1	1,2
12	71,2	2,3	1,3
13	9,3	1,5	1,3

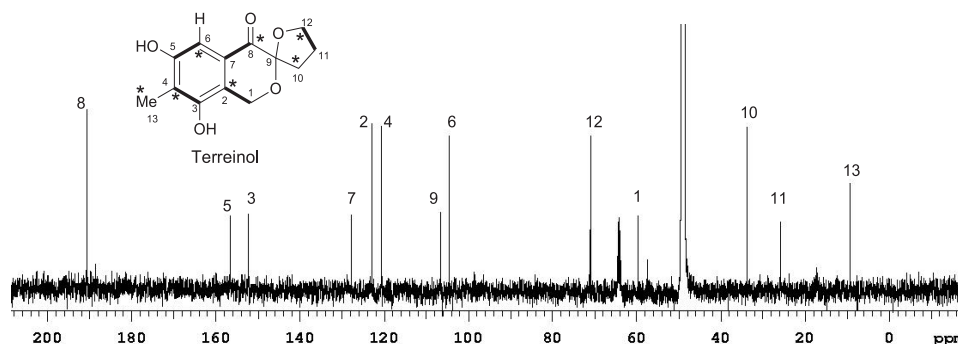
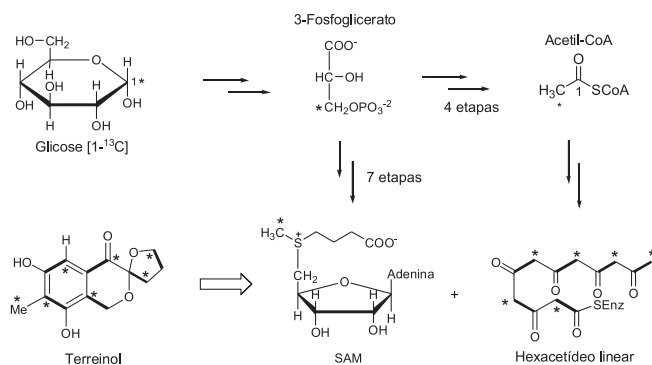


Figura 2. Espectro de RMN de ¹³C (¹H) com desacoplamento descontínuo inverso do terreinol marcado (CD₃OD; 125 MHz)

do com a sequência de etapas da via glicolítica, a clivagem oxidativa da glicose [$1-^{13}\text{C}$] resultará em duas moléculas de piruvato, sendo que apenas uma delas conserva uma posição enriquecida em ^{13}C . A posterior condensação descarboxilativa entre o piruvato e a HSCoA formará a acetil-SCoA, em que a posição enriquecida está localizada no carbono 2 do grupo acetila, ou seja, na metila (Esquema 6). Portanto, a utilização de glicose simplesmente marcada nas posições 1 ou 2 equivale, em termos de um padrão de incorporação policetídico, ao acetato simplesmente marcado.

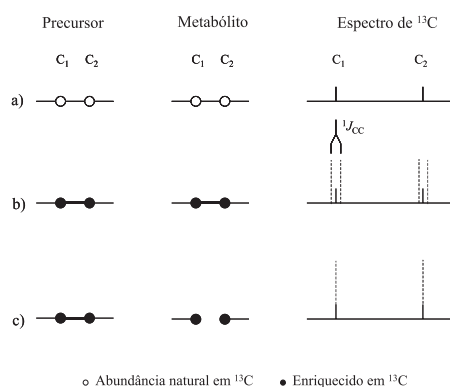


Esquema 6. Proposta de origem biossintética do terreinol

A marcação de posições contíguas 13 e 4 ajusta-se facilmente a um modelo biossintético em que a metila aromática é inserida em uma cadeia policetídica via metilação mediada pela S-adenosilmetionina (SAM). A rota do carbono 1 da glicose marcada até a metila da SAM inicia-se a partir do desvio de um dos intermediários da via glicolítica, o 3-fosfoglicerato, em direção à síntese da serina, precursor clássico da metionina. O maior número de etapas envolvidas na formação da SAM, a partir do 3-fosfoglicerato em relação ao da rota deste último até acetil-SCoA, explica o valor mais baixo de enriquecimento da metila em relação à média das demais posições enriquecidas.

Marcação dupla

Como foi visto anteriormente, um composto com abundância natural em ^{13}C apresenta baixa probabilidade de dois átomos de ^{13}C estarem adjacentes (0,01%) e assim, a observação dos sinais satélites resultantes do acoplamento escalar $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ no espectro de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ é normalmente suprimida (Esquema 7a).



Esquema 7. Efeito da incorporação de acetato marcado duplamente sobre o espectro de RMN de ^{13}C

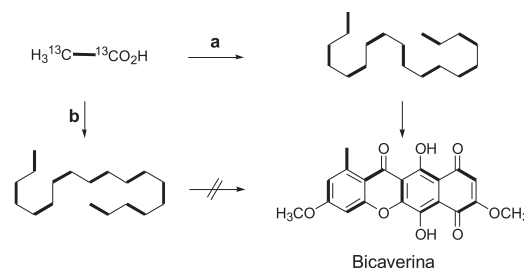
A introdução de precursores contendo unidades de $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ aumenta as intensidades destes satélites e permite sua observação no

espectro do metabólito enriquecido, caso a ligação em questão permaneça intacta ao longo da rota biossintética⁷ (Esquema 7b). Se, entretanto, a ligação é quebrada, os carbonos originados do precursor marcado fornecerão singletos aumentados⁴ (Esquema 7c).

Portanto, a técnica de marcação dupla com ^{13}C apresenta maior sensibilidade, uma vez que pequenos satélites de $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ acoplados podem ser detectados com mais precisão que os correspondentes enriquecimentos a partir de precursores simplesmente marcados. Em geral as magnitudes dos acoplamentos são suficientemente diferentes permitindo distinguir os pares de carbonos que se encontram acoplados.

Deve ser enfatizado que o precursor marcado normalmente encontra-se altamente diluído na população de acetato não marcado endógena, não se observando, portanto, acoplamentos J_{CC} entre pares de carbonos contíguos provenientes de diferentes unidades de acetato marcadas. Os seguintes exemplos ilustram a aplicação desta técnica poderosa na dedução de processos biossintéticos.

Em um estudo⁸ para determinar a incorporação de acetato na estrutura da bicaverina (Esquema 8), a utilização deste precursor duplamente enriquecido foi crucial uma vez que os baixos valores de enriquecimentos (<0,5%) inviabilizam o estudo com substâncias marcadas em uma posição. O enriquecimento medido a partir das intensidades dos sinais satélites para cada posição foi de 0,4% e mostra o alcance deste procedimento em fornecer bons dados quantitativos em altas diluições. Todos os sinais no espectro de ^{13}C da bicaverina marcada (com exceção para os grupos metoxilas que foram marcados a partir da metionina) foram acompanhados de enriquecimentos dos satélites. Portanto, o sistema de anéis benzoxantona é montado inteiramente por nove unidades intactas de acetato. O arranjo das unidades de acetato na bicaverina marcada é consonante com a participação de uma cadeia policetídica de 18 carbonos com o padrão a. O padrão b, ou o envolvimento de um intermediário simétrico tipo naftoquinona, é excluído.



Esquema 8. Proposta de biossíntese da bicaverina

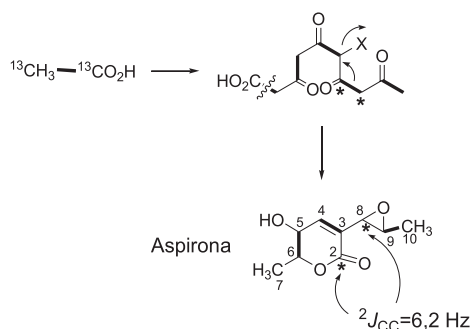
Estudos de marcação da aspirona, um metabólito de *Aspergillus melleus*, forneceram o padrão de incorporação, mostrado no Esquema 9, que sugeriu sua biossíntese via uma clivagem do anel ou por rearranjo. A rota através do rearranjo mostrado foi amparada pela observação de um acoplamento $^2J_{\text{CC}}$ de 6,2 Hz entre C-2 e C-8 no espectro de RMN de ^{13}C da aspirona enriquecida com acetato [$1,2-^{13}\text{C}$].

Esta foi a primeira observação de um acoplamento deste tipo em estudos biossintéticos. Trabalhos mais recentes que levaram ao completo delineamento da biossíntese da aspirona serão discutidos adiante.

Muitas vezes o espectro de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ de um metabólito duplamente marcado apresenta padrões complexos, devido à sobreposição de sinais e ao ruído da linha de base. Nestes casos, a observação dos satélites ^{13}C torna-se obscura e impossibilita o delineamento da biossíntese em estudo.

O experimento de RMN de ^{13}C envolvendo a sequência de

pulsos INADEQUATE 2D⁹ tem sido extensivamente empregado¹⁰ para identificação de conectividades C-C contornando, assim, estas dificuldades.



Esquema 9. Proposta de biossíntese da aspirina

Neste experimento, o sinal intenso devido aos núcleos de ¹³C isolados é eliminado através da alteração simultânea da fase do último pulso de 90° e do detector, de modo a acompanhar apenas a pequena magnetização correspondente ao sistema AX acoplado formado pelos pares de carbonos adjacentes ¹³C-¹³C. Este esquema resulta em dois padrões de livre decaimento da indução (FID), cuja soma promove a eliminação do sinal indesejado.

O INADEQUATE 2D quando aplicado a moléculas com abundância natural em ¹³C normalmente exige centenas de mg de amostra¹¹ e o espectro obtido apresenta correlações C-C contínuas, permitindo desenhar a estrutura de toda a cadeia carbônica. No entanto, quando moléculas duplamente marcadas são empregadas, obtêm-se espectros rapidamente com a utilização de poucos mg de material. O espectro obtido, neste caso, apresenta apenas correlações isoladas, correspondentes aos pares marcados ¹³C-¹³C de unidades incorporadas intactas. A Figura 3 mostra o espectro de INADEQUATE 2D da terreína marcada¹² através de experimentos de incorporação de acetato [1,2-¹³C] por culturas de *Aspergillus terreus*.

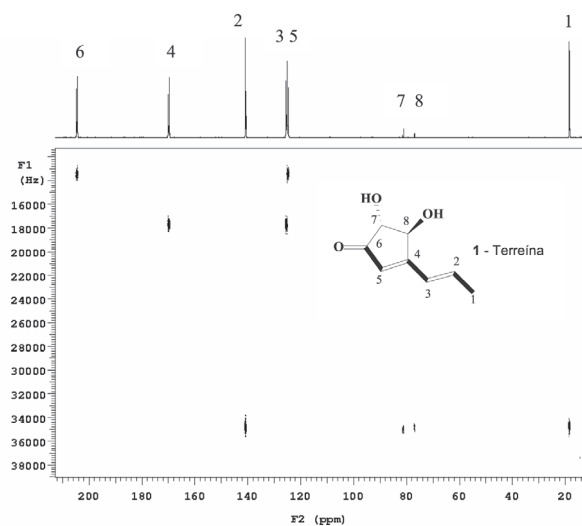
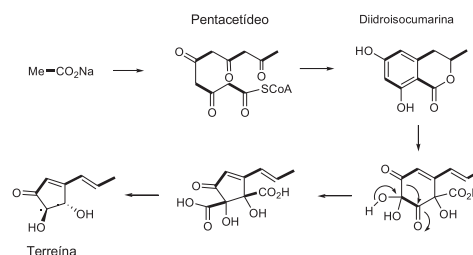


Figura 3. Espectro de INADEQUATE 2D da terreína marcada (CD₃OD; 125 MHz)

Resultados de incorporação similares permitiram uma proposta biossintética para a terreína, envolvendo uma etapa de contração

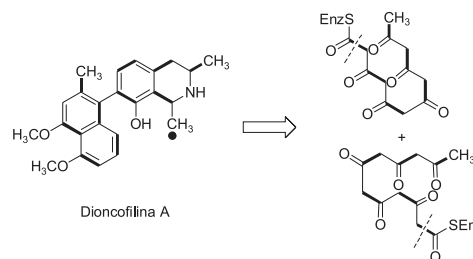
de anel de um intermediário cíclico originado a partir de um pentacetídeo, como apresentado no Esquema 10.



Esquema 10. Proposta de biossíntese da terreína

O INADEQUATE 2D foi crucial para a elucidação da biossíntese da dioncofilina A, um alcalóide de *Triphyophyllum peltatum*. Nestes estudos¹³, foi estabelecida uma rota acetato-polimalonato para o esqueleto carbônico e consistiu na primeira observação deste caminho biossintético para alcalóides em plantas superiores.

A análise do espectro de INADEQUATE 2D da dioncofilina marcada com acetato [1,2-¹³C] indicou que todo o esqueleto carbônico deriva do acetato e que ambas as metades da molécula apresentam um padrão policetídeo idêntico (Esquema 11). Desta forma, a partir de seis unidades de acetato para cada metade, através de intermediários β-policarbonilados idênticos, tanto a parte naftalênica como a isoquinolínica do metabólito são formadas por ciclização. No caso da isoquinolínica, a ciclização ocorre com incorporação do átomo de nitrogênio. Finalmente, os dois fragmentos resultantes são unidos originando a dioncofilina A.



Esquema 11. Proposta de biossíntese da dioncofilina A

Marcação mista

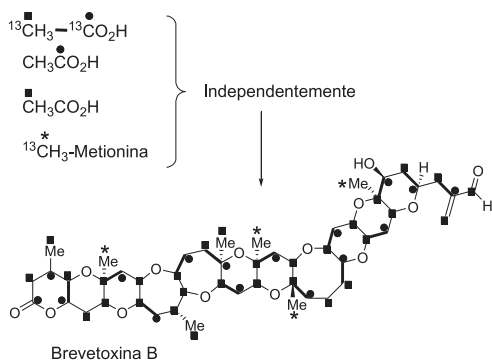
A incorporação de uma mistura de precursores simplesmente marcados pode resultar na marcação de um metabólito de forma que o acoplamento escalar ¹³C-¹³C seja observado. Esta informação é útil no delineamento de processos de condensação e ciclização e sua obtenção é intensamente facilitada através de um estudo preliminar com precursores duplamente marcados.

A técnica de precursores mistos foi elegantemente empregada no estudo de atribuição dos sinais no espectro de ¹³C e demonstrou a origem biossintética da brevetoxina B, uma potente neurotoxina produzida pelo dinoflagelado *Gymnodinium breve*¹⁴ (Esquema 12).

A brevetoxina B biossintetizada a partir de acetato [1,2-¹³C] foi empregada para experimentos de RMN 2D (INADEQUATE) que levou ao esclarecimento das conectividades de 14 unidades de acetato utilizando-se apenas 1,5 mg de amostra. Experimentos adicionais envolvendo a utilização de acetato [1-¹³C], [2-¹³C] e metionina [metila-¹³C] forneceram o padrão de incorporação completo.

Dos 50 átomos de carbono da brevetoxina B, 16 apresentaram

enriquecimento a partir de acetato [$1\text{-}^{13}\text{C}$]; 30 de acetato [$2\text{-}^{13}\text{C}$] e quatro a partir de metionina [metila- ^{13}C].



Esquema 12. Incorporação de precursores marcados na brevetoxina

Mais recentemente, estas técnicas de marcação foram empregadas na elucidação das rotas de vários outros metabólitos policetídeos complexos de dinoflagelados¹⁵.

MARCAÇÃO COM ^2H E ^{18}O

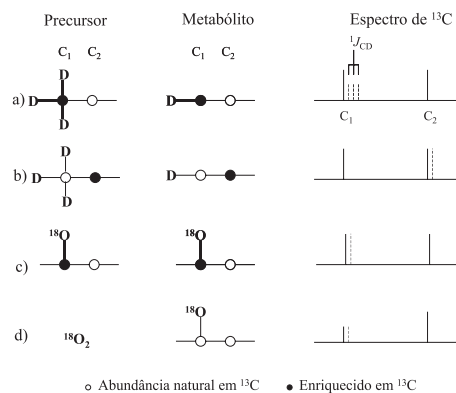
No final dos anos 80, iniciou-se uma nova revolução em estudos biossintéticos na medida em que os pesquisadores desenvolveram métodos de identificar, purificar e manipular geneticamente enzimas individuais. Paralelamente, na área da espectroscopia de RMN, outro grande avanço ocorreu com o desenvolvimento de gradientes de campo e a implementação de estudos¹⁶ envolvendo precursores marcados com ^2H e ^{18}O .

A RMN de ^2H tem sido empregada em muitas investigações biossintéticas, apesar de apresentar muitas desvantagens inerentes. Por constituir um núcleo com momento magnético quadrupolar, o ^2H ($I = 1$) apresenta linhas espectrais largas e isto, combinado com sua baixa constante magnetogírfica ($0,15\gamma_{\text{H}}^1$) e a estreita faixa de valores de deslocamentos químicos, freqüentemente resulta em espectros pouco resolvidos. Entretanto, em conseqüência da baixa abundância natural do ^2H (0,012%), são toleradas diluições muito acima daquelas permitidas em estudos com ^{13}C . Isto torna a marcação com ^2H particularmente útil para se estudar a incorporação de intermediários avançados em uma rota biossintética.

A falta de resolução inerente da RMN de ^2H pode ser superada pela análise dos efeitos isotópicos provocados nos deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^{13}C . A utilização do ^{13}C como um núcleo "delator" tanto de hidrogênio como de oxigênio representa um dos maiores avanços em estudos biossintéticos. Este método consiste na observação da mudança no deslocamento químico do ^{13}C provocada pela substituição de um hidrogênio α ou β por deutério. Similarmente, a presença de ^{18}O α a um átomo de ^{13}C pode ser detectada pelo deslocamento induzido no espectro de RMN de ^{13}C .

O efeito de um átomo de deutério diretamente ligado a um núcleo de ^{13}C sobre o espectro de RMN de ^{13}C consiste no surgimento de multipletos mais blindados em relação ao sinal normal (Esquema 13a). A presença de cada deutério desloca a freqüência do sinal em 0,3 a 0,6 ppm e o acoplamento $^1J_{\text{CD}}$ produz o multipletos característico⁴.

Sinais deslocados originados de carbonos sem hidrogênios diretamente ligados apresentam razões sinal/ruído reduzidas, devido à pouca relaxação e ausência de NOE. Esta é uma desvantagem do método, que é ampliada ainda mais pela distribuição da intensidade entre os picos do multipletos. O desacoplamento de deutério pode auxiliar nesta questão através da remoção do acoplamento $^2\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$.



Esquema 13. Efeito da incorporação de ^2H e ^{18}O no deslocamento químico do ^{13}C

Muitas das desvantagens associadas à ligação direta do deutério são evitadas com o posicionamento deste átomo a duas ligações do núcleo de ^{13}C relacionado (Esquema 13b). Uma vez que as constantes de acoplamentos geminais carbono-deutério são muito pequenas, os sinais deslocados apresentam-se efetivamente como singletos, mesmo sem a aplicação de desacoplamento de deutério. Isto resulta em um aumento da razão sinal/ruído quando comparado ao experimento de deslocamento α correspondente⁴.

Como mencionado anteriormente, a incorporação biossintética de ^{18}O também pode ser detectada pela observação do deslocamento isotópico induzido no espectro de RMN de ^{13}C . O ^{18}O pode ser convenientemente introduzido através de um precursor duplamente marcado (Esquema 13c) ou pelo crescimento sob atmosfera de $^{18}\text{O}_2$ (Esquema 13d). Os deslocamentos resultantes são da mesma magnitude dos deslocamentos isotópicos promovidos por $\beta\text{-}^2\text{H}$, ou seja, aproximadamente 0,05 ppm e somente se tornam observáveis em espectrômetros de altos campos⁴.

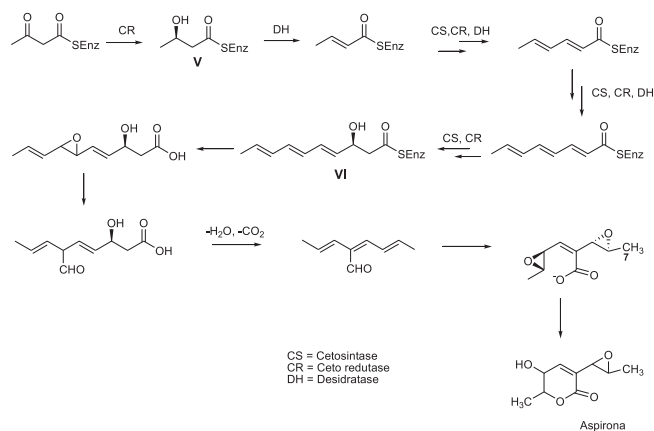
O desenvolvimento de experimentos de marcação com ^{18}O e ^2H conduziram a uma reavaliação da formação da aspirona. Estudos envolvendo a incorporação de acetato [$1\text{-}^{13}\text{C}$, ^{18}O] e $^{18}\text{O}_2$ gasoso revelaram, surpreendentemente, que nenhum dos oxigênios derivou do acetato, sendo três provenientes da atmosfera e um do meio de cultura¹⁷. Estes resultados foram subsequentemente verificados em um dos poucos relatos¹⁸ de aplicações de marcação com ^{17}O e RMN de ^{17}O em estudos biossintéticos. O núcleo de ^{17}O (spin 5/2) é pouco sensível e fornece linhas largas, devido à relaxação quadrupolar⁴.

A incorporação de acetato [$2\text{-}^{13}\text{C}$, $^2\text{H}_3$] na aspirona mostrou a retenção de dois hidrogênios derivados do acetato em C-7, sugerindo que este carbono poderia ter participado de uma ligação olefínica em algum ponto ao longo da rota biossintética. Para acomodar estes resultados, foi proposto um caminho envolvendo rearranjo mediado por epóxido e reações de fechamento de anel.

Posteriormente, foi realizada uma série de experimentos¹⁹ de incorporações com os supostos intermediários da construção da cadeia, marcados tanto com ^2H como com ^{13}C , que foram sintetizados na forma de seus tioésteres *N*-acetilcisteamina (NAC).

Estes experimentos resultaram no completo delineamento da rota de montagem catalisada pela policetídeo sintase e se mantêm como o mais completo e bem sucedido estudo deste tipo. A incorporação de intermediários β -hidroxioésteres, ou seja, o tioéster NAC correspondente a V, estabeleceu que o processo de cetorredução ocorre com a mesma estereoquímica absoluta que a biossíntese de ácidos graxos. Deste fato surgiu a proposta de que a policetídeo sintase envolvida na biossíntese da aspirona poderia ser derivada da ácido graxo sintase que, presumivelmente, teria perdido sua capacidade de efetuar reduções de enoila. Foi mostrado

que as desidratações ocorrem por uma eliminação *syn*. O produto final hexacetídeo VI do processo de montagem policetídic seria então convertido na aspirona pela seqüência mostrada no Esquema 14, que inclui um rearranjo de epóxido⁴.



Esquema 14. Biossíntese da aspirona

Muito do atual estágio de entendimento da formação de metabólitos policetídicos se deve a estudos usando tioésteres *N*-acetilcisteamina de intermediários avançados, marcados em conjugação à análise detalhada de espectroscopia de RMN de metabólitos enriquecidos. Os tioésteres *N*-acetilcisteamina são empregados porque mimetizam estruturalmente a terminação tiol do grupo fosfopanteteína encontrado na coenzima A⁴.

Esta abordagem foi aplicada a vários problemas biossintéticos, dentre os quais se destacam os estudos envolvendo as avermectinas, uma família de produtos naturais²⁰ produzida por *Streptomyces avermitilis* constituída por oito estruturas pentacíclicas (Figura 4) contendo um anel macrolídico de 16 membros.

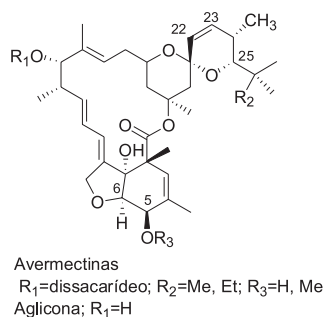


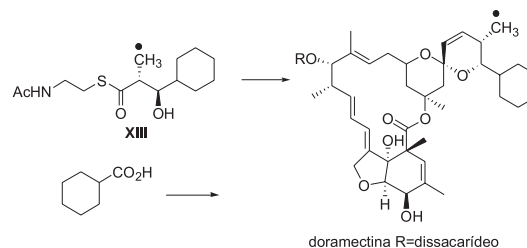
Figura 4. Estrutura das avermectinas

Estes oito compostos diferem estruturalmente devido à variação de unidade iniciadora da policetídic sintase em C-25, ao padrão de O-metilação em C-5 e ao padrão de hidratação-desidratação em C-22/C-23. As avermectinas naturais e sintéticas exibem uma potente atividade antiparasitária.

Estudos de marcação²¹ mostraram que a aglicona da avermectina deriva de sete unidades de acetato e cinco de propionato. As unidades iniciadoras da policetídic sintase, isobutirato e 2-metilbutirato, derivam do catabolismo da L-valina e da L-isoleucina, respectivamente. Todos os átomos de oxigênio, excluindo-se aqueles ligados a C-6 e C-25, são derivados dos seus precursores carboxilados.

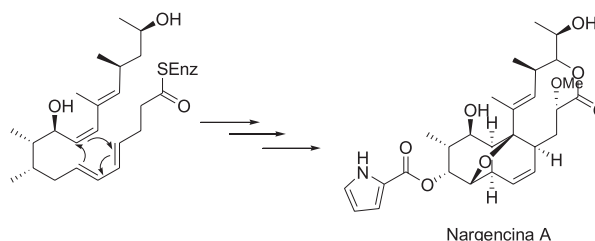
Através da utilização de um mutante²² da *Streptomyces avermitilis*, que apresenta carência da atividade de descarboxilase

responsável pela produção dos ácidos iniciadores da policetídic sintase (PCS), foram obtidas várias outras avermectinas. A administração dos ácidos iniciadores naturais a este mutante restabeleceu a produção das avermectinas naturais, enquanto que a administração de 40 ácidos iniciadores não naturais levou a muitos novos análogos das avermectinas modificados na posição C-25. A doramectina, um antiparasitário extremamente efetivo comercializado como Dectomax, foi isolada após administração do ácido cicloexilmetanóico (Esquema 15). O tioéster NAC XIII do intermediário biossintético dicetídico também foi incorporado²³ na doramectina através da linhagem mutante. Este consiste em um dos primeiros exemplos da incorporação de um análogo de um precursor natural ligado à PCS⁴.



Esquema 15. Incorporação de tioésteres NAC de intermediários na doramectina

Certas estruturas cíclicas presentes em alguns policetídicos ocorrem via reação de Diels-Alder intramolecular e consistem em uma das primeiras evidências da existência de enzimas do tipo diels-alderase. Este processo foi proposto para vários metabólitos dentre os quais a nargencina A é um dos mais profundamente estudados (Esquema 16).



Esquema 16. Etapa de cicloadição na biossíntese da nargencina A

Estudos envolvendo administração de tioésteres NAC marcados com ¹³C a culturas de *Nocardia argentinensis* demonstraram incorporações regioespecíficas na nargencina, que são consistentes com uma ciclização intramolecular Diels-Alder de um intermediário nonacetídico linear²⁴. Recentemente, foi caracterizada a estrutura cristalina da primeira diels-alderase natural²⁵.

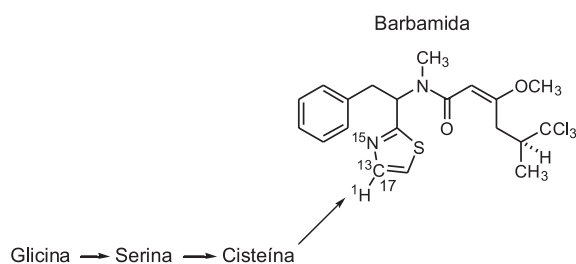
RMN DE OUTROS NÚCLEOS

Embora este artigo se concentre nos desenvolvimentos da RMN envolvendo a detecção de ¹³C, estudos biossintéticos baseados na observação de outros núcleos, tais como ¹⁵N, ¹⁹F, ²H, ³H, têm fornecido informações importantes sobre mecanismos e estereoseletividades das reações enzimáticas²⁶. Algumas destas aplicações, envolvendo inovações espectroscopicamente importantes, foram incluídas e serão exemplificadas a seguir.

O núcleo de ¹⁵N apresenta spin 1/2, abundância natural de 0,36% e baixa constante magnetográfica (0,10γ_H¹). Embora a observação direta do ¹⁵N por espectroscopia de RMN seja possível, a maioria

dos estudos biossintéticos tem detectado a incorporação de ^{15}N através do seu acoplamento ao ^{13}C via RMN de ^{13}C unidimensional (1D). Entretanto, muitas vezes os fracos sinais satélites resultantes do acoplamento heteronuclear ^{15}N - ^{13}C permanecem escondidos no ruído da linha de base.

Recentemente, foi desenvolvido um novo método²⁷ para observação do acoplamento entre unidades ^{13}C - ^{15}N , baseado em uma modificação do experimento de HMBC. Esta abordagem foi aplicada na elucidação da origem do anel tiazol da barbamida²⁸, um metabólito isolado de uma cianobactéria marinha (Esquema 17).



Esquema 17. Incorporação de $[2-^{13}\text{C}-^{15}\text{N}]$ glicina na barbamida

Os autores esperavam detectar a incorporação da $[2-^{13}\text{C}-^{15}\text{N}]$ glicina, precursor metabólico da cisteína no anel tiazólico do produto natural. Neste caso, foi observado que os hidrogênios ligados ao ^{13}C se desdobraram em um duplete de cerca de 180 Hz, devido ao acoplamento $^1J_{\text{CH}}$ (Figura 5). No espectro de H,N-HMBC este duplete apresentou uma correlação com o deslocamento químico do nitrogênio, confirmando a incorporação da glicina duplamente marcada.

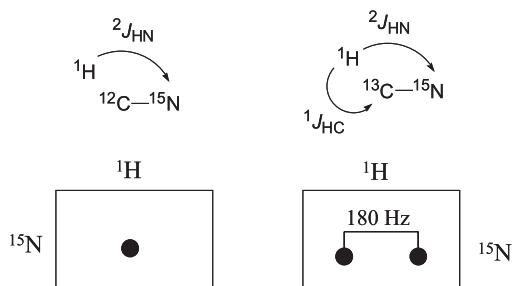
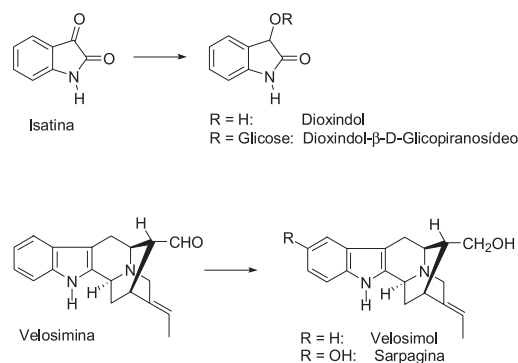


Figura 5. Representação esquemática dos padrões de acoplamentos esperados para o experimento H,N-HMBC

Novas perspectivas de investigações biossintéticas têm sido criadas como resultado de avanços instrumentais, como o aumento dos valores de campos magnéticos gerados nos espectrômetros. Recentemente, tais progressos permitiram o monitoramento da transformação de compostos indólicos *in vivo*, sem a necessidade de marcação isotópica através de uma elegante combinação de experimentos de ^1H de 1D e H,C-HSQC a 800 MHz²⁹. Neste estudo, os autores utilizaram a RMN de ^1H na sua versão unidimensional para acompanhar reações rápidas, como a redução da isatina e da velosimina (Esquema 18), por culturas de células de *Rauwolfia serpentina*, uma planta medicinal indiana. A sensibilidade do método permitiu a obtenção de espectros unidimensionais suficientemente resolvidos a cada 2 min. Esta transformação rápida foi seguida por um processo muito mais lento, consistindo na glicosilação do dioxindol e da hidroxilação do velosimol. Estas reações lentas foram monitoradas por experimentos de H,C-HSQC e demonstraram a seqüência das etapas finais envolvidas na síntese de alcalóide da classe sarpagina nesta planta.



Esquema 18. Transformações em células de *R. serpentina* monitoradas *in vivo* por RMN de ^1H

CONCLUSÕES

Dentre as técnicas de determinação de rotas biossintéticas de produtos naturais, a RMN de ^{13}C aliada à marcação isotópica apresenta um papel de destaque. Paralelamente ao aumento da complexidade das estruturas dos compostos isolados, novos avanços instrumentais e seqüências de pulsos foram incorporados em uma evolução sinérgica entre a RMN de ^{13}C e nossa compreensão sobre os princípios biossintéticos e os mecanismos de ação das enzimas.

Novas perspectivas de investigações biossintéticas têm sido criadas como resultado de avanços instrumentais, como o aumento dos valores de campos magnéticos dos espectrômetros, e desenvolvimentos de sondas ainda mais sensíveis, permitindo, por ex., o monitoramento de transformações de metabólitos secundários *in vivo* sem a necessidade de marcação isotópica.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece profundamente à Profa. A. J. Marsaioli (IQ – UNICAMP) pelas discussões valiosas e pelo seu entusiasmo contagiante pela ciência natural.

REFERÊNCIAS

- Desaty, D.; McInnes, A. G.; Vining, L. C.; Smith, D. G.; *Can. J. Biochem.* **1968**, *46*, 1293; Tanabe, M.; Detre, G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 4515.
- Tanabe, M.; Seto, H.; Johnson, L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 2157; McInnes, A. G.; Smith, D. G.; Vining, L. C.; *Chem. Commun.* **1971**, 325.
- McInnes, A. G.; Smith, D. G.; Wat, C. K.; Vining, L. C.; Wright, J. L. C.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1974**, 281; McInnes, A. G.; Smith, D. G.; Walter, J. A.; Vining, L. C.; Wright, J. L. C.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1974**, 282.
- Simpson, T. J.; *Top. Curr. Chem.* **1998**, *195*, 1.
- Binder, M.; Tamm, C.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1973**, *12*, 370.
- Macedo Jr, F. C.; Porto, A. L. M.; Marsaioli, A. J.; *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 53; Macedo Jr, F. C.; Marsaioli, A. J.; *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 251.
- McInnes, A. G.; Vining, L. C.; Smith, D. G.; Walter, J. A.; Wright, J. L. C.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1974**, 282.
- McInnes, A. G.; Vining, L. C.; Smith, D. G.; Walter, J. A.; Wright, J. L. C.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1975**, 66.
- Bax, A.; Freeman, R.; Frenkiel, T. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2102.
- Wang, C. Z.; Maier, U. H.; Eisenreich, W.; Adam, P.; Obersteiner, I.; Keil, M.; Bacher, A.; Zenk, M. H.; *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1459; Carter, G. T.; Fantini, A. A.; James, J. C.; Borders, D. B.; White, R. J.; *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 255.
- Buddrus, J.; Bauer, H.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1987**, *26*, 625.
- Macedo Jr, F. C.; Marsaioli, A. J.; *Resumos da 7ª Jornada Brasileira de Ressonância Magnética*, Maringá, Brasil, 2002; Hill, R.; Carter, R. C.; Stauton, J.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1980**, 2570.
- Bringmann, G.; Wohlfarth, M.; Rischer, H.; Grüne, M.; Schlauer, J.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 1464.

14. Lee, M. S.; Repeta, D. J.; Nakanishi, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7855.
15. Houdai, T.; Matsuoka, S.; Murata, M.; Satake, M.; Ota, S.; Oshima, Y.; Rhodes, L. L.; *Tetrahedron* **2001**, *57*, 5551.
16. Simpson, T. J.; *Chem. Soc. Rev.* **1987**, *16*, 123.
17. Ahmed, A. S.; Simpson, T. J.; Staunton, J.; Sutkowski, A. C.; Trimble, L. A.; Vederas, J. C.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 1685.
18. Staunton, J.; Sutkowski, A. C.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1106; Laue, E. D.; Pollard, K. O. B.; Skilling, J.; Staunton, J.; Sutkowski, A. C.; *J. Magn. Reson.* **1987**, 493.
19. Staunton, J.; Sutkowski, A. C.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1108; Staunton, J.; Sutkowski, A. C.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1110; Jacobs, A.; Staunton, J.; Sutkowski, A. C.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1113; Jacobs, A.; Hill, A.; Staunton, J.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 859; Hill, A.; Staunton, J.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 861; Jacobs, A.; Staunton, J.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 863.
20. Burg, R. W.; Miller, B. M.; Baker, E. E.; Birnbaum, J.; Currie, S. A.; Hartman, R.; Kong, Y. L.; Monaghan, R. L.; Olson, G.; Putter, I.; Tunac, J. B.; Wallick, H.; Stapley, E. O.; Oiwa, R.; Omura, S.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *15*, 361.
22. Cane, D. E.; Liang, T. C.; Kaplan, L.; Nallin, M. K.; Schulman, M. D.; Hensens, O. D.; Douglas, A. W.; Schonberg, G.A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4110.
22. Dutton, C. J.; Gibson, S. P.; Goudie, A. C.; Holdom, K. S.; Pacey, M. S.; Ruddock, J. C.; Bullock, J. D.; Richards, M. K.; *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 357; Hafner, E. W.; Holley, B. W.; Wernau, W. C.; *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 349.
23. Dutton, C. J.; Hooper, A. M.; Leadlay, P. F.; Staunton, J.; *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 327.
24. Cane, D. E.; Tan, W.; Ott, W. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 527; Cane, D. E.; Luo, G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6633.
25. Pohnert, G.; *Chem. Biochem.* **2003**, *4*, 713.
26. Less, S.L.; Handa, S.; Leadlay, P. F.; Dutton, C. J.; Staunton, J.; *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3511; Simpson, T. J.; Stevenson, G. I.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 1822; Eguchi, T.; Dekishima, Y.; Hamano, Y.; Dairi, T.; Seto, H.; Kakinuma, K.; *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5433.
27. Williamson, R. T.; Sitachitta, N.; Gerwick, W. H.; *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5175.
28. Orjala, J.; Gerwick, W. H.; *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 427.
29. Hinse, C.; Sheludko, Y. V.; Provenzani, A.; Stockigt, J. H. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5118.