

## Aplicações recentes do método DP4+ na elucidação estereoquímica de alcaloides naturais complexos

Recent applications of the DP4+ method in the stereochemical elucidation of complex natural alkaloids

Aplicaciones recientes del método DP4+ en la elucidación estereoquímica de alcaloides naturales complejos

Recebido: 10/04/2025 | Revisado: 16/04/2025 | Aceitado: 16/04/2025 | Publicado: 19/04/2025

**Isac George Rosset**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2989-7854>

Universidade Federal do Paraná, Brasil

E-mail: [rosset@ufpr.br](mailto:rosset@ufpr.br)

### Resumo

A determinação estereoquímica de compostos naturais é essencial para a compreensão de suas propriedades biológicas e farmacológicas. O objetivo do presente estudo é apresentar uma revisão narrativa na qual são apresentados e discutidos estudos recentes (2021 a 2024) que utilizaram o método DP4+ para atribuir configurações estereoquímicas de alcaloides naturais. O método DP4+ se mostrou altamente eficaz na distinção entre isômeros com múltiplos centros quirais, mesmo em estruturas complexas. Além disso, os compostos revisados demonstraram uma ampla gama de atividades biológicas, reforçando a importância do rigor estereoquímico em estudos de produtos naturais. O DP4+ consolida-se como uma ferramenta indispensável na química de produtos naturais, especialmente quando se busca integrar rigor estrutural com potencial farmacológico. Espera-se que sua aplicação continue a crescer nos próximos anos, especialmente com os avanços em métodos de simulação e análise estatística.

**Palavras-chave:** Alcaloides; RMN; DP4+; DFT.

### Abstract

Stereochemical determination of natural compounds is essential for understanding their biological and pharmacological properties. The aim of this study is to present a narrative review in which recent studies (2021 to 2024) that used the DP4+ method to assign stereochemical configurations of natural alkaloids are presented and discussed. The DP4+ method proved to be highly effective in distinguishing between isomers with multiple chiral centers, even in complex structures. Furthermore, the reviewed compounds demonstrated a wide range of biological activities, reinforcing the importance of stereochemical rigor in natural product studies. DP4+ has established itself as an indispensable tool in natural product chemistry, especially when seeking to integrate structural rigor with pharmacological potential. Its application is expected to continue to grow in the coming years, especially with advances in simulation methods and statistical analysis.

**Keywords:** Alkaloids; NMR; DP4+; DFT.

### Resumen

La determinación estereoquímica de compuestos naturales es esencial para comprender sus propiedades biológicas y farmacológicas. El objetivo de este estudio es presentar una revisión narrativa en la que se presentan y discuten estudios recientes (2021 a 2024) que utilizaron el método DP4+ para asignar configuraciones estereoquímicas de alcaloides naturales. Se ha demostrado que el método DP4+ es muy eficaz para distinguir entre isómeros con múltiples centros quirales, incluso en estructuras complejas. Además, los compuestos revisados demostraron una amplia gama de actividades biológicas, lo que refuerza la importancia del rigor estereoquímico en los estudios de productos naturales. DP4+ se está consolidando como una herramienta indispensable en la química de productos naturales, especialmente cuando se busca integrar el rigor estructural con el potencial farmacológico. Se espera que su aplicación continúe creciendo en los próximos años, especialmente con los avances en los métodos de simulación y análisis estadístico.

**Palabras clave:** Alcaloides; RMN; DP4+; DFT.

## 1. Introdução

A determinação estrutural de compostos orgânicos é uma etapa fundamental na compreensão de suas propriedades físico-químicas, biológicas e farmacológicas. A identificação precisa da configuração tridimensional das moléculas é essencial,

sobretudo quando pequenas variações estereoquímicas resultam em diferenças significativas de atividade biológica, toxicidade e interações moleculares (Claridge, 2016). Nesse contexto, os avanços em métodos computacionais, em especial os cálculos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), transformaram-se em aliados indispensáveis na elucidação estrutural.

A espectroscopia de RMN sempre foi uma das ferramentas mais utilizadas para análise estrutural de moléculas orgânicas. No entanto, interpretações baseadas apenas em dados experimentais podem ser desafiadoras, especialmente em compostos com múltiplos centros quirais, sistemas cíclicos complexos ou conformações flexíveis (Albuquerque et al., 2016). Para suprir essas limitações, cálculos teóricos dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , baseados em métodos de química quântica, como a Teoria do Funcional da Densidade (DFT), têm sido amplamente empregados (Pierens, 2014; Safi & Wazzan, 2022). Esses cálculos fornecem previsões quantitativas que, quando comparadas com os dados experimentais, permitem inferências confiáveis sobre a estrutura da molécula.

O uso combinado de RMN experimental e RMN computacional tem evoluído para incluir ferramentas estatísticas que auxiliam na escolha entre diferentes estereoisômeros. O método DP4, proposto em uma publicação em 2010, revolucionou essa abordagem ao introduzir um modelo bayesiano que compara os deslocamentos químicos experimentais e calculados para um conjunto de estereoisômeros, estimando a probabilidade de cada estrutura ser a correta (Smith & Goodman, 2010). Apesar de seu sucesso, o método original apresentava limitações, como o uso exclusivo de dados não escalados e sensibilidade à escolha do nível de teoria utilizado nos cálculos.

Para resolver essas questões, um grupo de pesquisa argentino e colaboradores desenvolveram o método DP4+, uma versão aprimorada que emprega dados escalados e não escalados, e utiliza melhores práticas em cálculos DFT (Grimblat et al., 2015). O DP4+ mostrou desempenho superior, especialmente em sistemas com muitos centros estereogênicos e com deslocamentos químicos próximos. Estudos comparativos entre DP4 e DP4+ demonstraram ganhos significativos em precisão e confiabilidade (Ketzler, Li, Kaupp, Sun, & Schattenberg, 2024; Marcarino, Cicetti, Zanardi, & Sarotti, 2022). Além do DP4+, outros métodos têm sido explorados, como o *J*-DP4, que inclui constantes de acoplamento de spin (*J-couplings*) na análise, e abordagens baseadas em aprendizado de máquina (ML), como *Random Forests* e redes neurais aplicadas à predição de deslocamentos químicos (Martínez-Treviño et al., 2020). Embora promissores, esses métodos exigem grandes conjuntos de dados de treinamento e nem sempre são generalizáveis para moléculas altamente complexas, como os alcaloides naturais.

Alcaloides são compostos nitrogenados naturais, biossintetizados por plantas, bactérias, fungos e animais. São amplamente conhecidos por suas propriedades farmacológicas, incluindo atividades analgésica, antitumoral, antiparasitária, antimicrobiana e neuroativa (Dewick, 2009; Ziegler & Facchini, 2008). Estruturalmente, os alcaloides podem ser extremamente complexos, com múltiplos anéis fusionados, centros quirais e substituintes variados. Essa diversidade estrutural impõe barreiras à elucidação por métodos espectroscópicos tradicionais.

A determinação estereoquímica de alcaloides por RMN pode ser dificultada pela sobreposição de sinais, multiplicidade conformacional e baixa quantidade de amostra. Assim, os métodos computacionais surgem como alternativa poderosa. Cálculos DFT de RMN, associados a estatísticas como DP4+, têm sido empregados com sucesso para resolver a estereoquímica de alcaloides novos, como relatado em diversos estudos recentes (Nugroho & Morita, 2019).

No período entre 2021 e 2024, a literatura científica apresentou um número crescente de artigos que utilizaram o DP4+ na determinação estereoquímica de alcaloides inéditos. Dentre eles, destacam-se compostos isolados de espécies vegetais como *Crotalaria paulina*, *Lycium barbarum*, *Tabernaemontana bufalina*, *Fritillaria ussuriensis*, *Sophora alopecuroides* e de organismos marinhos como *Agelas nakamurai*. Em todos esses casos, o método DP4+ foi decisivo para confirmar a configuração relativa e/ou absoluta das moléculas estudadas, muitas vezes em associação com dados de NOESY, ECD ou cristalografia de raios X (Baia et al., 2023; H. Chen et al., 2021; S.-Q. Chen et al., 2022; Fu et al., 2023; Lu et al., 2024).

É importante ressaltar que a confiabilidade dos resultados obtidos pelo DP4+ depende da qualidade da geometria otimizada da molécula, do nível de teoria empregado (geralmente B3LYP/6-31G\* ou superiores) e da inclusão de múltiplas conformações na média ponderada dos deslocamentos químicos. Em moléculas altamente flexíveis, a amostragem conformacional é crucial, sendo comum o uso de técnicas como busca sistemática por Monte Carlo ou simulações de dinâmica molecular para obter um conjunto representativo de estruturas (Iron, 2017).

No caso específico de alcaloides, o DP4+ mostrou particular robustez em distinguir entre isômeros com diferenças estereoquímicas sutis, como a orientação axial ou equatorial de grupos hidroxila em núcleos policíclicos, ou a configuração de ligações espiro e pontes glicosídicas. Em compostos como os menisperdaurinas (Wei et al., 2022) e os yanhusamidas (Wang et al., 2023), a análise DP4+ foi decisiva para validar a proposta estrutural baseada em RMN e MS, permitindo a publicação das estruturas com alto grau de confiança.

Assim, o uso de métodos computacionais aplicados à RMN, especialmente o DP4+, tornou-se uma ferramenta de rotina na caracterização de alcaloides e outros produtos naturais complexos. Sua integração com dados experimentais representa uma abordagem moderna, confiável e cada vez mais acessível, permitindo avanços significativos na química de produtos naturais e na descoberta de novos fármacos. Dessa forma, o presente artigo tem como objetivo revisar e analisar criticamente as aplicações do método DP4+ na determinação estereoquímica de alcaloides naturais publicadas entre 2021 e 2024, destacando os parâmetros computacionais utilizados, as técnicas espectroscópicas complementares empregadas e os níveis de confiança alcançados na atribuição estrutural.

## 2. Metodologia

### 2.1 Estratégia de Busca e Fontes de Dados

Realizou-se uma pesquisa bibliográfica de natureza qualitativa (Pereira et al., 2018) e, de característica não sistemática (Snyder, 2019) do tipo específico, revisão narrativa da literatura (Canuto & Oliveira, 2020; Casarin et al., 2020; Rother, 2007). A abordagem metodológica seguiu princípios de revisões sistemáticas qualitativas, inspirando-se nas recomendações da metodologia PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) adaptada para revisões narrativas e focadas em estudos de caso (Liberati et al., 2009).

A busca por artigos foi realizada manualmente por meio da seleção criteriosa de trabalhos completos obtidos em bases indexadas (ScienceDirect, PubMed, ACS Publications, Wiley Online Library e SpringerLink) e arquivos suplementares obtidos com permissão e, utilizou-se como palavras de busca ou descritores: Alkaloids, NMR, DP4+, DFT. A inclusão dos artigos foi feita com base na disponibilidade de acesso completo aos dados experimentais e computacionais necessários para análise.

Para garantir relevância e atualidade, foram incluídos apenas artigos publicados entre janeiro de 2021 e dezembro de 2024, que empregaram o método DP4+ para a atribuição estereoquímica de alcaloides naturais isolados de plantas, fungos ou organismos marinhos. O DP4+ deveria ter sido aplicado como ferramenta principal ou complementar na elucidação estrutural por RMN.

### 2.2 Critérios de Inclusão

Os artigos foram incluídos na revisão caso preenchessem os seguintes critérios:

- Aplicação explícita do método DP4+ na determinação estereoquímica de alcaloides naturais;
- Disponibilidade de dados de RMN experimental ( $^1\text{H}$  e/ou  $^{13}\text{C}$ );
- Apresentação de dados teóricos de deslocamentos químicos obtidos por DFT ou métodos equivalentes;
- Inclusão de comparação entre dados experimentais e teóricos com cálculo estatístico de probabilidade (DP4+ ou variantes);
- Publicações revisadas por pares (peer-reviewed).

### 2.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídos

- Artigos com aplicação apenas do método DP4 original ou sem distinção clara entre DP4 e DP4+;
- Estudos baseados exclusivamente em dados de ECD, X-ray, ou NOESY, sem uso de RMN teórica;
- Trabalhos sobre compostos não classificados como alcaloides;
- Revisões, resumos de conferência e artigos sem dados experimentais completos.

### 2.4 Seleção das Moléculas para Análise

Para os artigos que possuíam mais de uma molécula, apenas uma foi selecionada para análise detalhada. Essa escolha foi baseada nos seguintes critérios:

- Relevância química ou farmacológica destacada pelos autores;
- Complexidade estrutural que justificasse o uso do método DP4+;
- Representatividade dentro do conjunto de compostos isolados no artigo;
- Presença de dados computacionais completos para essa molécula.

Essa estratégia buscou garantir a profundidade analítica de cada caso, evitando repetições e mantendo o foco na aplicação do método DP4+.

### 2.5 Etapas de Extração e Análise de Dados

Para cada molécula selecionada, foram extraídas as seguintes informações:

- Nome sistemático ou trivial;
- Origem biológica (espécie e parte do organismo);
- Estrutura geral e principais grupos funcionais;
- Atividades biológicas descritas (*in vitro* ou *in vivo*);
- Dados de RMN utilizados na elucidação;
- Nível de teoria e base de cálculo empregados nos cálculos DFT;
- Resultados estatísticos do método DP4+ (probabilidade atribuída, CMAE, etc.);
- Métodos complementares utilizados (ECD, X-ray, VCD, NOESY, etc.);
- Conclusão dos autores quanto à confiabilidade da estrutura proposta.

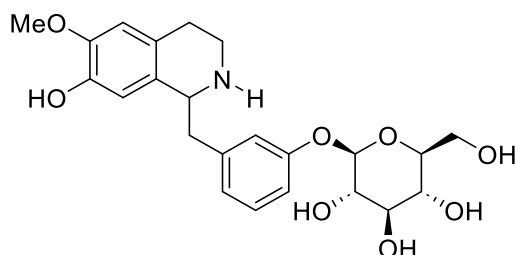
Todas as análises foram feitas diretamente a partir da leitura crítica dos textos dos artigos originais, sem reprocessamento dos dados computacionais. As estruturas das moléculas serão posteriormente desenhadas pelo autor desta revisão, com base nas fórmulas apresentadas nos artigos.

## 3. Resultados e Discussão

### Menisperdaurina A

Menisperdaurina A (Figura 1) é um alcaloide do tipo benzilisoquinolínico glicosilado, isolado dos rizomas de *Menispermum dauricum* DC., uma planta medicinal tradicional amplamente utilizada na China para o tratamento de febre, infecções e inflamações. Foram isolados 33 alcaloides isoquinolínicos, dos quais Menisperdaurina A se destacou por apresentar uma estrutura inédita e atividade biológica relevante, como potente atividade antagonista ao receptor de dopamina D1, com IC<sub>50</sub> de 1,0 µM. O processo de isolamento foi realizado por extração etanólica dos rizomas secos, seguido por técnicas cromatográficas, incluindo CC, MPLC e HPLC (Wei et al., 2022).

**Figura 1** - Fórmula estrutural da Menisperdaurina A.



Fonte: Autoria própria.

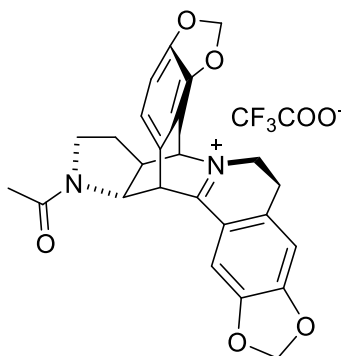
A identificação preliminar foi feita com base na fórmula molecular  $C_{27}H_{33}NO_{11}$ , determinada por espectrometria de massas de alta resolução (HRESIMS). A elucidação estrutural envolveu análises detalhadas de espectros de RMN 1D e 2D ( $^1H$ ,  $^{13}C$ , COSY, HSQC, HMBC), que permitiram definir a conectividade dos átomos e a presença de uma unidade de glicose ligada ao núcleo aromático. As correlações NOESY sugeriram uma configuração relativa, mas não foram suficientes para definir a estereoquímica absoluta dos centros quirais.

Para superar essa limitação, os autores utilizaram cálculos de deslocamentos químicos via DFT e aplicaram o método estatístico DP4+, comparando os valores teóricos de  $^{13}C$  com os experimentais. Foram avaliados quatro possíveis estereoisômeros, e o isômero atribuído a Menisperdaurina A apresentou uma probabilidade DP4+ de 99,89%, validando a configuração estereoquímica com alta precisão. Esse resultado, aliado a dados complementares de ECD, confirmou de forma robusta a estrutura do composto.

#### (+)-Yanhusamida A

(+)-Yanhusamida A (Figura 2) é um alcaloide heterodimérico inédito isolado da planta *Corydalis yanhusuo* (Papaveraceae), uma espécie amplamente utilizada na medicina tradicional chinesa para o tratamento da dor e distúrbios inflamatórios. Os autores relataram a descoberta de três pares de enantiômeros de novos alcaloides, dentre os quais (+)-Yanhusamida A demonstrou potente atividade anti-inflamatória e efeito antinociceptivo em modelos animais. O composto foi obtido a partir da extração etanólica dos tubérculos secos, seguida por fracionamentos cromatográficos, incluindo sílica gel, ODS, Sephadex LH-20 e HPLC (Wang et al., 2023).

**Figura 2** - Fórmula estrutural da (+)-Yanhusamida A.



Fonte: Autoria própria.

A identificação da molécula foi realizada por espectrometria de massas (HR-ESIMS) e análise extensiva de RMN 1D e 2D ( $^1H$ ,  $^{13}C$ , COSY, HSQC, HMBC e NOESY). A estrutura revelou-se como um heterodímero formado por uma unidade de

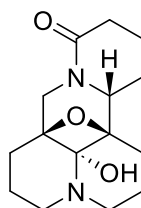
benzilisoquinolina e uma unidade de pirrol, ligadas por uma rara ponte C–C gerando um sistema policíclico 3,8-diazatriciclo[5.2.2.0<sup>2,6</sup>]undecano. A complexidade estrutural e a presença de múltiplos centros estereogênicos exigiram abordagem computacional para a determinação estereoquímica.

Foram realizados cálculos de RMN teórica por DFT para diferentes estereoisômeros, e a comparação com os dados experimentais foi feita utilizando o método DP4+. O isômero correspondente a (+)-Yanhusamida A apresentou uma probabilidade DP4+ de 99,88%, validando a configuração relativa com alta confiança. A estrutura absoluta foi posteriormente confirmada por cristalografia de raios X e análise de espectros ECD.

### Sophaloseedlina I

Sophaloseedlina I (Figura 3) é um alcaloide do tipo matrina isolado das sementes da planta *Sophora alopecuroides* L. (Fabaceae), tradicionalmente utilizada na medicina chinesa para o tratamento de inflamações, infecções intestinais e doenças hepáticas. No estudo, os autores isolaram nove novos alcaloides do tipo matrina, entre eles Sophaloseedlina I, a partir da extração metanólica das sementes secas, seguida por etapas de fracionamento com solventes e purificação cromatográfica utilizando colunas de sílica gel, ODS, Sephadex LH-20 e HPLC. Biologicamente, Sophaloseedline I demonstrou atividade anti-inflamatória moderada, inibindo a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW264.7 ativados por LPS (IC<sub>50</sub> = 15,6 µM), sem apresentar citotoxicidade significativa. Essas propriedades reforçam seu potencial como agente anti-inflamatório seguro derivado de produtos naturais. (Luo et al., 2024).

**Figura 3** - Fórmula estrutural da Sophaloseedlina I.



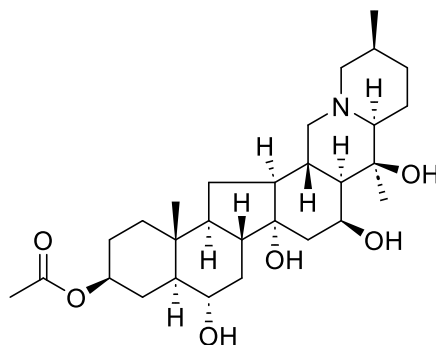
Fonte: Autoria própria.

A identificação inicial da molécula foi baseada em sua fórmula molecular (C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), determinada por espectrometria de massas de alta resolução (HR-ESIMS). A elucidação estrutural foi feita com suporte de espectroscopia de RMN 1D e 2D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC, HMBC e NOESY), que permitiu definir o esqueleto tetracíclico típico de matrinas e a presença de grupos hidroxila e metileno nas posições laterais. Devido à presença de múltiplos centros estereogênicos e a complexidade do sistema bis-quinolizidínico, os autores utilizaram cálculos teóricos de deslocamentos químicos por DFT (nível B3LYP/6-31G\*) e aplicaram o método DP4+ para comparar os dados experimentais com os teóricos. Quatro possíveis estereoisômeros foram avaliados, e o isômero identificado como Sophaloseedline I obteve probabilidade DP4+ superior a 97%, confirmando sua configuração relativa com alto grau de confiança.

### Pingbeimina D

Pingbeimina D (Figura 4) é um alcaloide esteroidal isolado dos bulbos de *Fritillaria ussuriensis* (Liliaceae), planta tradicionalmente empregada na medicina chinesa para tratar doenças respiratórias como bronquite, tosse crônica e infecções pulmonares. Foram isolados e caracterizados nove alcaloides esteroidais inéditos, entre os quais Pingbeimina D que demonstrou significativa atividade anti-inflamatória, inibindo a produção de NO em macrófagos RAW264.7 ativados por LPS, com IC<sub>50</sub> de 3,21 µM, e sem citotoxicidade significativa (Lu et al., 2024).

**Figura 4** - Fórmula estrutural da Pingbeimina D.



Fonte: Autoria própria.

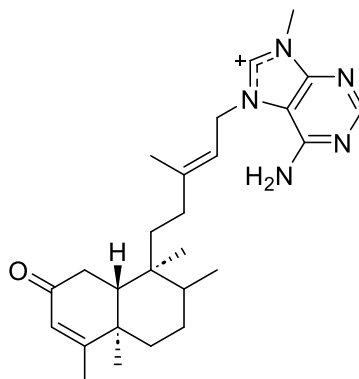
O processo de isolamento envolveu extração com etanol a partir dos bulbos secos, seguida de fracionamento com solventes de polaridades crescentes e purificação cromatográfica com sílica gel, Sephadex LH-20, colunas ODS e HPLC. A fórmula molecular de Pingbeimina D foi determinada como C<sub>27</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>4</sub> por espectrometria de massas de alta resolução (HR-ESI-MS). A estrutura foi elucidada por meio de análises de RMN 1D e 2D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC, HMBC e NOESY), que revelaram um esqueleto esteroidal tetracíclico do tipo cevanina com múltiplos centros estereogênicos e um grupo hidroxila em posição axial.

Devido à complexidade estereoquímica e à presença de diversas possíveis configurações relativas, os autores recorreram a cálculos de deslocamentos químicos por DFT e aplicaram o método DP4+ para determinar com precisão a estereoquímica relativa. Quatro possíveis diastereoisômeros foram comparados, e o isômero correspondente a Pingbeimina D apresentou probabilidade DP4+ superior a 99,5%, confirmando a atribuição estereoquímica com alta confiança.

### Nakamusina A

Nakamusina A (Figura 5) é um alcaloide híbrido do tipo 9-metiladenina-diterpenoide, isolado da esponja marinha *Agelas nakamurai* (Demospongiae), coletada na costa de Taiwan. No estudo, os autores relataram a descoberta de três novos alcaloides dessa classe - Nakamusinas A, B e C - marcados por uma arquitetura estrutural rara e uma fusão entre um núcleo purínico (derivado da adenina) e um esqueleto diterpenoide altamente funcionalizado. Embora a Nakamusina A não tenha demonstrado citotoxicidade significativa nas linhagens testadas, seu valor reside na inovação estrutural e no potencial como modelo para desenvolvimento de conjugados bioativos baseados em nucleosídeos (Fu et al., 2023).

**Figura 5** - Fórmula estrutural da Nakamusina A.



Fonte: Autoria própria.

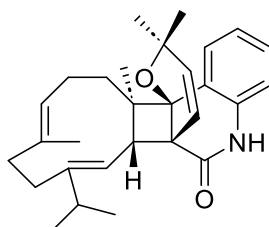
A extração foi realizada com etanol, seguida por fracionamento utilizando partição líquido-líquido, colunas de sílica gel, ODS, Sephadex LH-20 e HPLC. A fórmula molecular de Nakamusina A foi estabelecida como  $C_{26}H_{36}N_6O_6$  por espectrometria de massas de alta resolução (HR-ESI-MS). A elucidação estrutural contou com uma abordagem combinada de espectroscopia de RMN 1D e 2D ( $^1H$ ,  $^{13}C$ , COSY, HSQC, HMBC e NOESY), revelando um núcleo adenínico N-glicosilado em C-9 ligado a uma cadeia diterpenoide contendo grupos hidroxila, ésteres e duplas ligações conjugadas.

Devido à presença de múltiplos centros estereogênicos no fragmento diterpenoide, foi necessário empregar cálculos de deslocamentos químicos por DFT (nível B3LYP/6-31+G(d,p)) para diferentes estereoisômeros. A aplicação do método estatístico DP4+ foi fundamental para confirmar a configuração relativa: o isômero atribuído apresentou probabilidade superior a 98,7%, validando a proposta estereoquímica com segurança.

### Hypernumqulin A

(±)-Hypernumqulin A (Figura 6) é um alcaloide sesquiterpenoide quinolínic isolado da planta *Hypericum monogynum* L. (Hypericaceae), conhecida na medicina tradicional chinesa por suas propriedades anti-inflamatórias, hepatoprotetoras e cicatrizantes. No estudo, foram isoladas oito novas moléculas quirais racêmicas, incluindo o composto (±)-Hypernumqulin A, que apresenta uma estrutura altamente inusitada e complexa, formada por uma rara reação de ciclização intramolecular do tipo [2+2] entre um fragmento sesquiterpenoide tipo germacrano e uma unidade quinolínic. Biologicamente, (–)-Hypernumqulin A mostrou atividade citotóxica potente contra células MCF-7 ( $IC_{50} = 2,82 \mu M$ ) e capacidade de induzir apoptose, regulando a expressão de Bax e Bcl-2. A originalidade estrutural e o potencial farmacológico conferem grande valor a esse composto para estudos posteriores (Dong et al., 2024).

**Figura 6** - Fórmula estrutural da Hypernumqulin A.



Fonte: Autoria própria.

A extração foi realizada com etanol, seguida de partição com solventes orgânicos e purificação cromatográfica com sílica gel, ODS, Sephadex LH-20 e HPLC. A fórmula molecular foi determinada como  $C_{24}H_{29}NO_2$  por espectrometria de massas de alta resolução (HR-ESI-MS). A estrutura completa foi elucidada com base em dados de RMN 1D e 2D ( $^1H$ ,  $^{13}C$ , COSY, HSQC, HMBC e NOESY), que revelaram um esqueleto pentacíclico do tipo 6/6/6/4/10 com alta densidade estereoquímica.

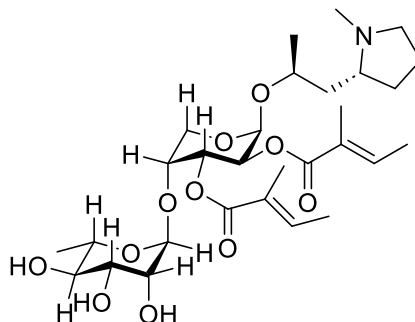
A separação dos enantiômeros foi realizada por HPLC em fase quiral, permitindo a obtenção de (+)- e (–)-Hypernumqulin A. A estereoquímica de um dos enantiômeros foi confirmada por cristalografia de raios X. Para os centros não definidos por difração, os autores utilizaram cálculos de deslocamentos químicos por DFT e aplicaram o método DP4+ para determinar a configuração relativa. O isômero identificado apresentou probabilidade  $DP4+ > 99,5\%$ , reforçando a validade da estrutura atribuída.

### Schizanthosida E1

Schizanthosida E1 (Figura 7) é um alcaloide derivado de pirrolizidina glicosilado, isolado da planta *Schizanthus tricolor* (Solanaceae), endêmica do Chile e tradicionalmente empregada na medicina popular por suas propriedades anti-inflamatórias e

antimicrobianas. Foram isolados sete novos alcaloides, dentre os quais Schizanthosida E1 se destacou por sua estrutura incomum e significativa atividade biológica antiparasitária. Do ponto de vista farmacológico, Schizanthosida E1 demonstrou atividade antiplasmodial moderada ( $IC_{50} = 4,9 \mu M$ ) contra *Plasmodium falciparum*, com baixa citotoxicidade, sugerindo potencial como protótipo para novos agentes antiparasitários (Cretton et al., 2021).

**Figura 7** - Fórmula estrutural da Schizanthosida E1.



Fonte: Autoria própria.

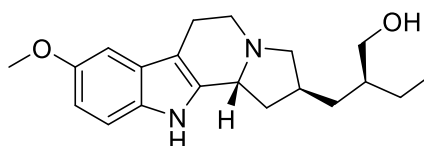
O material vegetal (parte aérea da planta) foi extraído com metanol e as frações alcaloídicas foram submetidas a sucessivas etapas de purificação utilizando cromatografia em coluna de sílica gel, ODS e Sephadex LH-20, além de HPLC. A fórmula molecular de Schizanthosida E1 foi estabelecida como  $C_{15}H_{25}NO_6$  por espectrometria de massas de alta resolução (HRESIMS). A estrutura foi elucidada com base em dados de RMN 1D e 2D ( $^1H$ ,  $^{13}C$ , COSY, HSQC, HMBC e NOESY), que revelaram um núcleo pirrolizidínico do tipo retronecina com uma unidade de glicose ligada na posição C-9, além de grupos ésteres e hidroxila.

A complexidade estereoquímica do núcleo bicíclico e a ligação glicosídica exigiram a aplicação de métodos computacionais para definir a configuração relativa dos centros quirais. Os autores realizaram cálculos DFT dos deslocamentos químicos e aplicaram o método DP4+, que indicou com 99,8% de probabilidade a estereoquímica correta, confirmando a estrutura proposta com alta confiança.

### Taberbufamina A

Taberbufamina A (Figura 8) é um alcaloide do tipo iboga isolado da planta *Tabernaemontana bufalina* (Apocynaceae), uma espécie tradicionalmente utilizada na medicina popular asiática por suas propriedades anti-inflamatórias, antipiréticas e analgésicas. Os autores relataram o isolamento de cinco novos alcaloides iboga, incluindo Taberbufamina A, notável por seu esqueleto indolizidino[8,7-b]indol inédito e alto grau de complexidade estereoquímica. Biologicamente, a Taberbufamina A exibiu atividade citotóxica seletiva contra células de câncer hepático HepG2 ( $IC_{50} = 3,7 \mu M$ ), com baixa toxicidade em células normais, destacando-se como um candidato promissor para desenvolvimento de antitumorais naturais baseados em alcaloides iboga (S.-Q. Chen et al., 2022).

**Figura 8** - Fórmula estrutural da Taberbufamina A.



Fonte: Autoria própria.

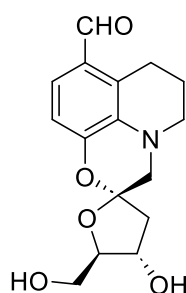
O processo de extração foi realizado com metanol, seguido por partição com solventes orgânicos e fracionamentos cromatográficos usando colunas de sílica gel, ODS e Sephadex LH-20, além de purificação por HPLC. A fórmula molecular foi estabelecida como  $C_{22}H_{26}N_2O_3$  por espectrometria de massas de alta resolução (HR-ESI-MS). A estrutura planar foi elucidada com base em análises de RMN 1D e 2D ( $^1H$ ,  $^{13}C$ , COSY, HSQC, HMBC e NOESY), que revelaram a presença de um sistema de anéis fusionados 6/7/6/6 altamente funcionalizado, típico de alcaloides iboga modificados.

Para determinar a configuração relativa dos centros estereogênicos, especialmente nas junções de anel, foram realizados cálculos teóricos de deslocamentos químicos via DFT (nível B3LYP/6-31G\*), seguidos da aplicação do método estatístico DP4+. Quatro possíveis estereoisômeros foram comparados, e o isômero correspondente a Taberbufamina A apresentou probabilidade DP4+ superior a 98,5%, confirmando a configuração com alto grau de confiança.

### Lycibarbarina A

Lycibarbarina A (Figura 9) é um alcaloide tetra-hidroquinolínico inédito isolado dos frutos de *Lycium barbarum* L. (Solanaceae), popularmente conhecido como “goji berry”, utilizado na medicina tradicional chinesa por seus efeitos neuroprotetores, antioxidantes e imunomoduladores. Recentemente foram isolados três novos alcaloides espiro-heterocíclicos, denominados Lycibarbarinas A–C, entre os quais a Lycibarbarina A se destacou por sua complexidade estrutural, pois sua estrutura inovadora representa um modelo promissor para investigação de compostos neuroativos naturais e para o desenvolvimento de novos alcaloides com atividade no sistema nervoso central (Chen et al., 2021).

**Figura 9** - Fórmula estrutural da Lycibarbarina A.



Fonte: Autoria própria.

A extração foi realizada com etanol, seguida de partição com clorofórmio e n-butanol, e posterior purificação cromatográfica com sílica gel, ODS e HPLC. A fórmula molecular foi determinada como  $C_{15}H_{21}NO_4$  por espectrometria de massas de alta resolução (HR-ESI-MS). A estrutura planar da molécula foi elucidada com base em dados de RMN 1D e 2D ( $^1H$ ,  $^{13}C$ , COSY, HSQC, HMBC e NOESY), que revelaram um sistema espiro incomum entre um anel tetra-hidroquinolina e uma unidade diidrofuranona.

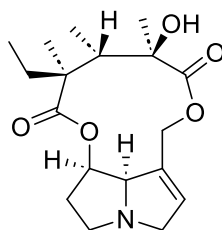
Devido à presença de três centros estereogênicos, a determinação da configuração relativa foi desafiadora. Os autores realizaram cálculos DFT de deslocamentos químicos (nível B3LYP/6-31G\*) para os possíveis estereoisômeros e aplicaram o método DP4+. O isômero atribuído à Lycibarbarina A apresentou probabilidade DP4+ de 99,2%, confirmando a estereoquímica com alto grau de confiança. A validação adicional foi obtida por comparação de espectros ECD experimentais e simulados, reforçando a atribuição da configuração absoluta.

### Ethylmethylecrotalina

Ethylmethylecrotalina (Figura 10) é um alcaloide pirrolizidínico macrolactônico isolado da planta *Crotalaria paulina* (Fabaceae), conhecida por produzir compostos biologicamente ativos, incluindo pirrolizidinas com potencial citotóxico. No

estudo, os autores investigaram a composição alcaloidal da espécie e relataram o isolamento de seis alcaloides, sendo Ethylmethylecrotalina o mais inédito e estruturalmente interessante devido à sua rara modificação no grupo éster da cadeia lateral. A Ethylmethylecrotalina demonstrou atividade citotóxica seletiva contra células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) com  $IC_{50}$  inferior a 10  $\mu$ M, destacando-se como um candidato promissor para estudos antitumorais envolvendo pirrolizidinas naturais (Baia et al., 2023).

**Figura 10** - Fórmula estrutural da Ethylmethylecrotalina.



Fonte: Autoria própria.

O material vegetal foi coletado no cerrado brasileiro, seco e pulverizado, sendo submetido a extração com metanol. As frações alcaloídicas foram obtidas por partição ácido-base e purificadas por cromatografia em coluna com sílica gel e HPLC. A fórmula molecular de Ethylmethylecrotalina foi determinada como  $C_{19}H_{29}NO_5$  por espectrometria de massas de alta resolução (HRESIMS). A estrutura foi elucidada por RMN 1D e 2D ( $^1H$ ,  $^{13}C$ , COSY, HSQC, HMBC e NOESY), revelando o esqueleto típico de retronecina com um anel macrolactona de 12 membros, contendo uma cadeia lateral etilmetil-substituída em C-9.

A complexidade na configuração relativa dos centros quirais, especialmente na região do macrolactona, motivou a aplicação de cálculos de deslocamentos químicos via DFT (nível B3LYP/6-31G\*) e o uso do método DP4+. Foram avaliados quatro possíveis diastereoisômeros, sendo o isômero CS3 o que apresentou probabilidade DP4+ de 99,9%, validando a proposta estrutural com alta confiança.

### 3.1 Comparação dos Resultados

Todos os estudos utilizaram cálculos de deslocamentos químicos baseados na DFT, predominantemente no nível B3LYP/6-31G\*, com algumas variações como a inclusão de funções de polarização (B3LYP/6-31+G(d,p)) para compostos mais complexos, como Menisperdaurina A e Nakamusina A. As probabilidades obtidas pelo DP4+ variaram de 97% a 99,9%, refletindo alta confiança na atribuição estereoquímica realizada (Tabela 1). Essa consistência estatística confirma a robustez do método na diferenciação de estereoisômeros, mesmo em alcaloides com estruturas complexas contendo múltiplos centros quirais e grande flexibilidade conformacional.

**Tabela 1** - Parâmetros Computacionais e Técnicas Complementares na Determinação Estereoquímica de Alcaloides Complexos por DP4+ entre 2021 a 2024.

| Molécula             | Nível de Teoria   | Prob. DP4+ | Técnicas Adicionais                   |
|----------------------|-------------------|------------|---------------------------------------|
| Menisperdaurine A    | B3LYP/6-31+G(d,p) | 99,89%     | RMN 2D, NOESY, ECD                    |
| (+)-Yanhusamida A    | B3LYP/6-31G*      | 99,88%     | NOESY, ECD, Cristalografia de raios X |
| Sophaloseedlina I    | B3LYP/6-31G*      | 97%        | NOESY                                 |
| Pingbeimina D        | B3LYP/6-31G*      | 99,5%      | NOESY, RMN 2D                         |
| Nakamusina A         | B3LYP/6-31+G(d,p) | 98,7%      | ECD, NOESY                            |
| (±)-Hypernumqulin A  | B3LYP/6-31G*      | 99,5%      | Cristalografia de raios X, ECD        |
| Schizanthosida E1    | B3LYP/6-31G*      | 99,8%      | NOESY, RMN 2D                         |
| Taberbufamina A      | B3LYP/6-31G*      | 98,5%      | NOESY, RMN 2D                         |
| Lycibarbarina A      | B3LYP/6-31G*      | 99,2%      | NOESY, ECD                            |
| Ethylmethylcrotalina | B3LYP/6-31G*      | 99,9%      | NOESY, RMN 2D                         |

Fonte: Autoria própria.

Além do DP4+, todos os estudos incorporaram técnicas espectroscópicas complementares, como RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC), NOESY e, em alguns casos, dicroísmo circular eletrônico (ECD) ou cristalografia de raios X. Esses dados demonstram que o DP4+ tem se consolidado como ferramenta confiável e cada vez mais integrada aos protocolos de elucidação estrutural de produtos naturais. Sua combinação com outras abordagens experimentais assegura uma determinação estereoquímica precisa, essencial para o avanço da química de alcaloides e do desenvolvimento de novos fármacos derivados desses compostos.

#### 4. Conclusão

O presente artigo de revisão destacou o papel central do método DP4+ na determinação estereoquímica de alcaloides naturais com estrutura complexa entre os anos de 2021 e 2024. A análise das moléculas de origem vegetal e marinha revelou que, mesmo diante de estruturas altamente complexas, com múltiplos centros estereogênicos e sistemas cíclicos incomuns, o DP4+ demonstrou excelente desempenho na diferenciação de isômeros e na confirmação de estruturas.

A confiabilidade estatística do método, quando associada a cálculos de RMN teórica por DFT, permitiu a validação de configurações estereoisoméricas com altas probabilidades (acima de 95% em todos os casos analisados). Essa capacidade é especialmente valiosa quando outras técnicas, como difração de raios X ou ECD, não estão disponíveis ou são inconclusivas. Além disso, os compostos estudados apresentaram uma ampla variedade de atividades biológicas, incluindo efeitos citotóxicos, anti-inflamatórios, antiparasitários e neuromoduladores. Isso reforça o papel dos alcaloides como fontes promissoras de novos fármacos e a importância de métodos precisos para sua caracterização. Portanto, o DP4+ consolida-se como uma ferramenta indispensável na química de produtos naturais, especialmente quando se busca integrar rigor estrutural com potencial farmacológico. Espera-se que sua aplicação continue a crescer nos próximos anos, especialmente com os avanços em métodos de simulação e análise estatística.

#### Agradecimentos

O autor agradece a Universidade Federal do Paraná pelo apoio prestado e a Receita Federal do Brasil em Mundo Novo - MS pela doação de itens de informática para a montagem dos computadores usados nas pesquisas.

## Referências

- Albuquerque, A. C. F., Ribeiro, D. J., & de Amorim, M. B. (2016). Structural determination of complex natural products by quantum mechanical calculations of <sup>13</sup>C NMR chemical shifts: Development of a parameterized protocol for terpenes. *Journal of Molecular Modeling*, 22(8), 183. <https://doi.org/10.1007/s00894-016-3045-6>
- Baia, V. C., Oliveira, R. P., Alvarenga, E. S., Pinto, B. N. S., & Demuner, A. J. (2023). Exploring pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria paulina*: Isolation and identification of a promising compound. *Journal of Molecular Structure*, 1292, 136171. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.136171>
- Canuto, L. T., & Oliveira, A. A. S. de. (2020). Métodos de revisão bibliográfica nos estudos científicos. *Psicologia em Revista*, 26(1), Artigo 1. <https://doi.org/10.5752/P.1678-9563.2020v26n1p82-100>
- Casarin, S. T., Porto, A. R., Gabatz, R. I. B., Bonow, C. A., Ribeiro, J. P., & Mota, M. S. (2020). Tipos de revisão de literatura: Considerações das editoras do *Journal of Nursing and Health* / Types of literature review: considerations of the editors of the *Journal of Nursing and Health*. *Journal of Nursing and Health*, 10(5), Artigo 5. <https://doi.org/10.15210/jonah.v10i5.19924>
- Chen, H., Kong, J.-B., Zhang, L., Wang, H.-H., Cao, Y.-G., Zeng, M.-N., Li, M., Sun, Y.-J., Du, K., Xue, G.-M., Wu, Y., Zheng, X.-K., & Feng, W.-S. (2021). Lycibarbarines A–C, Three Tetrahydroquinoline Alkaloids Possessing a Spiro-Heterocycle Moiety from the Fruits of *Lycium barbarum*. *Organic Letters*, 23(3), 858–862. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c04092>
- Chen, S.-Q., Jia, J., Hu, J.-Y., Wu, J., Sun, W.-T., Zheng, M., Wang, X., Zhu, K.-K., Jiang, C.-S., Yang, S.-P., Zhang, J., Wang, S.-B., & Cai, Y.-S. (2022). Iboga-type alkaloids with Indolizidino[8,7-b]Indole scaffold and bisindole alkaloids from *Tabernaemontana bufalina* Lour. *Phytochemistry*, 196, 113089. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113089>
- Claridge, N. F. M. the D. P. L. T. D. W. (2016). *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry* (3rd ed. edição). Elsevier Science.
- Cretton, S., Genta-Jouve, G., Kaiser, M., Mäser, P., Muñoz, O., Bürgi, T., Cuendet, M., & Christen, P. (2021). Hygroline derivatives from *Schizanthus tricolor* and their anti-trypanosomatid and antiplasmodial activities. *Phytochemistry*, 192, 112957. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112957>
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach* (3rd edition). Wiley.
- Dong, Z., Pu, Q., Qiu, Y., Zhang, R., Chen, Q., Liu, Q., Khalid, A., Meng, F., Wang, G., Liao, Z., & Chen, M. (2024). (±)-Hypernumquins A–H: Eight pairs of unexpected [2+2] cycloaddition sesquiterpenoid alkaloid with 6/6/6/4/10 ring system from *Hypericum monogynum* L. *Bioorganic Chemistry*, 150, 107564. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107564>
- Fu, C.-W., Chiang, L., Chao, C.-H., Huang, Y.-L., Chiou, S.-F., Wang, L.-C., Chang, H.-W., Chen, S.-L., Wang, H.-C., Yu, M.-C., Huang, H.-C., & Sheu, J.-H. (2023). Nakamusines A–C, new 9-methyladeninium diterpenoid alkaloids from a Formosan marine sponge *Agelas nakamurai*. *Tetrahedron*, 149, 133745. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2023.133745>
- Grimblat, N., Zanardi, M. M., & Sarotti, A. M. (2015). Beyond DP4: An Improved Probability for the Stereochemical Assignment of Isomeric Compounds using Quantum Chemical Calculations of NMR Shifts. *The Journal of Organic Chemistry*, 80(24), 12526–12534. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02396>
- Iron, M. A. (2017). Evaluation of the Factors Impacting the Accuracy of <sup>13</sup>C NMR Chemical Shift Predictions using Density Functional Theory—The Advantage of Long-Range Corrected Functionals. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 13(11), 5798–5819. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00772>
- Ketzel, A. F., Li, X., Kaupp, M., Sun, H., & Schattenberg, C. J. (2025). Benchmark of Density Functional Theory in the Prediction of <sup>13</sup>C Chemical Shielding Anisotropies for Anisotropic Nuclear Magnetic Resonance-Based Structural Elucidation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 21(2), 871–885. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.4c01407>
- Liberati, A., Altman, D. G., Tetzlaff, J., Mulrow, C., Gøtzsche, P. C., Ioannidis, J. P. A., Clarke, M., Devereaux, P. J., Kleijnen, J., & Moher, D. (2009). The PRISMA Statement for Reporting Systematic Reviews and Meta-Analyses of Studies That Evaluate Health Care Interventions: Explanation and Elaboration. *PLoS Medicine*, 6(7), e1000100. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000100>
- Lu, D., Jiang, P., Wang, Y., Li, Y., Naseem, A., Mohammed Algradi, A., Pan, J., Guan, W., Wu, J., Kuang, H., Yang, B., & Liu, Y. (2024). Undescribed steroidal alkaloids from the bulbs of *Fritillaria ussuriensis* Maxim and their anti-inflammatory activities. *Phytochemistry*, 225, 114172. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2024.114172>
- Luo, D., Zou, J.-W., Wang, J.-H., Tian, H., Xie, H.-Y., Zhu, T.-X., Zhu, H.-H., Deng, L.-M., Fan, C.-L., Wang, H., Wang, G.-C., & Zhang, Y.-B. (2024). Undescribed matrine-type alkaloids from *Sophora alopecuroides* with anti-inflammatory activity. *Phytochemistry*, 218, 113954. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2023.113954>
- Marcarino, M. O., Cicetti, S., Zanardi, M. M., & Sarotti, A. M. (2022). A critical review on the use of DP4+ in the structural elucidation of natural products: The good, the bad and the ugly. A practical guide. *Natural Product Reports*, 39(1), 58–76. <https://doi.org/10.1039/D1NP00030F>
- Martínez-Treviño, S. H., Uc-Cetina, V., Fernández-Herrera, M. A., & Merino, G. (2020). Prediction of Natural Product Classes Using Machine Learning and <sup>13</sup>C NMR Spectroscopic Data. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(7), 3376–3386. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00293>
- Nugroho, A. E., & Morita, H. (2019). Computationally-assisted discovery and structure elucidation of natural products. *Journal of Natural Medicines*, 73(4), 687–695. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01321-8>
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica. Brasil. <http://repositorio.ufsm.br/handle/1/15824>
- Pierens, G. K. (2014). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR scaling factors for the calculation of chemical shifts in commonly used solvents using density functional theory. *Journal of Computational Chemistry*, 35(18), 1388–1394. <https://doi.org/10.1002/jcc.23638>

- Rother, E. T. (2007). Revisão sistemática X revisão narrativa. *Acta Paulista de Enfermagem*, 20, v–vi. <https://doi.org/10.1590/S0103-21002007000200001>
- Safi, Z. S., & Wazzan, N. (2022). DFT calculations of <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR chemical shifts of 3-methyl-1-phenyl-4-(phenyldiazenyl)-1H-pyrazol-5-amine in solution. *Scientific Reports*, 12(1), 17798. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22900-y>
- Smith, S. G., & Goodman, J. M. (2010). Assigning stereochemistry to single diastereoisomers by GIAO NMR calculation: The DP4 probability. *Journal of the American Chemical Society*, 132(37), 12946–12959. <https://doi.org/10.1021/ja105035r>
- Snyder, H. (2019). Literature review as a research methodology: An overview and guidelines. *Journal of Business Research*, 104, 333–339. <https://doi.org/10.1016/j.jbusres.2019.07.039>
- Wang, L., Xia, G., Xia, H., Wei, X., Wang, Y., & Lin, S. (2023). (+)(-)-Yanhusamides A–C, three pairs of unprecedented benzyloisoquinoline-pyrrole heterodimeric alkaloid enantiomers from *Corydalis yanhusuo*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 13(2), 754–764. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.10.025>
- Wei, H.-L., Zhao, Y.-P., Wang, J.-X., Han, Y., Li, H., Zhou, H., Hou, T., Wang, C.-J., Yao, Y.-M., Zhang, X.-L., Liu, Y.-F., & Liang, X.-M. (2022). Menisperdaurines A–W, structurally diverse isoquinoline alkaloids from *Menispermum dauricum* and their dopamine D1 receptor activities. *Bioorganic Chemistry*, 127, 106027. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106027>
- Ziegler, J., & Facchini, P. J. (2008). Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 735–769. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092730>