

RMN mono y bi dimensional como herramientas para determinar la estructura del monosacárido en un glicósido diterpénico

Cóbar O.

Departamento de Química Orgánica, Laboratorio de Investigación en Productos Naturales
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala
ocobar@usac.edu.gt

La Resonancia Magnética Nuclear es actualmente la técnica de rutina para determinar la estructura de moléculas orgánicas. Esta determinación no solo incluye la conectividad de los átomos en la molécula, sino también la configuración relativa de los centros quirales que esta posea (Jacobsen, N. 2007).

Los glicósidos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en la naturaleza, reportándose su existencia tanto en el mundo terrestre como marino (Cutler, S.; Cutler, H. 2002; Blunt, J. *et al.* 2009). Se les asigna una gran variedad de actividades biológicas, que van desde antimicrobianos, cardiotónicos, antitumorales, hasta anti-inflamatorios, siendo esta última la más reportada recientemente (Cutler, S.; Cutler, H. 2002).

Los extractos polares son ricos en glicósidos que poseen entre 2 y 6 unidades (en algunos casos más) de monosacáridos. Aglicones monoglicosidados, generalmente acetilados en una o más posiciones del monosacárido, se encuentran en las fracciones hexánicas o clorofórmicas de los extractos (Jones, W.; Kinghorn, D. 2006).

Existen trabajos recientes que permiten deducir sin ambigüedad la información estructural clave sobre la posición de las distintas unidades de carbohidratos sobre un aglicón, vía el análisis de desplazamientos químicos, patrones de acoplamiento y multiplicidad de las señales (Bagno, A. *et al.* 2007).

Rutinariamente, el desplazamiento químico de los protones, proporciona información sobre su ambiente químico, estereoquímica relativa del centro quiral en donde se encuentra, e incluso, la constitución y conformación de la molécula (Bose-Basu, B. *et al.* 2007).

Combinando toda esta información y analizándola detenidamente como una identidad espectral, es posible conocer la posición de las cadenas glicosidadas en el aglicón y la secuencia de monosacáridos en las mismas.

Lo anterior se realiza con ayuda de la información que proporciona el RMN¹³C y de los datos bidimensionales, principalmente COSY, NOESY, HMQC y HMBC (Jiménez, C. 2008).

Normalmente, la identidad de los monosacáridos individuales, se deduce a través del análisis del hidrolizado respectivo (HCl al 1N a 48-50 °C durante tres horas para 0.5 mg del glicósido) por GC-MS quiral, utilizando patrones puros de monosacáridos para comparar (Leavitt, A.; Sherman, W. 1982).

En este trabajo se pretende ilustrar de una manera simple, cómo elucidar la estructura de un diterpeno monoglicosidado natural, aislado del gorgonio caribeño *Eunicea sp.*, que posee propiedades citotóxicas (10⁻⁴-10⁻⁵ M contra varias líneas celulares cancerosas) y anti-inflamatorias a niveles comparables a indometacina (Cóbar, O. *et al.* 1997).

El glicósido muestra una fórmula molecular de C₃₀H₄₈O₈, obtenido a partir del espectro de HRFABMS, que indica la existencia de siete grados de insaturación.

El espectro infrarrojo muestra absorciones atribuibles a grupos hidroxilo (3438 cm⁻¹) y éster carbonilo (1748 cm⁻¹). El espectro de RMN-¹H (300 MHz en CDCl₃) muestra a campo alto, la presencia de seis grupos metilos como singletes a δ 1.22, δ 1.55, δ 1.56, δ 1.63, δ 2.05 y δ 2.11 (los dos últimos asignables a metilos localizados en grupos éster acetato), cuatro grupos metileno (todos multipletes a δ 1.27, δ 1.65, δ 1.86 y δ 2.20) y un metino multiplete a δ 1.45. A campo bajo se observan diez señales claramente resueltas: dos metilenos a δ 4.10 (dd, *J* = 2.4, 12.0 Hz) y δ 4.19 (dd, *J* = 6.1, 12.0 Hz) y ocho metinos a δ 3.41 (t, *J* = 8.46 Hz), δ 3.59 (ddd, *J* = 2.5, 6.1, 9.1 Hz), δ 3.68 (t, *J* = 9.16 Hz), δ 4.45 (d, *J* = 4.5 Hz), δ 4.87 (t, *J* = 9.8 Hz), δ 4.93 (t, *J* = 6.6 Hz), δ 5.00 (t, *J* = 6.7 Hz) y δ 5.07 (t, *J* = 6.7 Hz).

Las demás señales están solapadas en la región comprendida entre δ 2.0 y δ 2.2 (Figura 1).

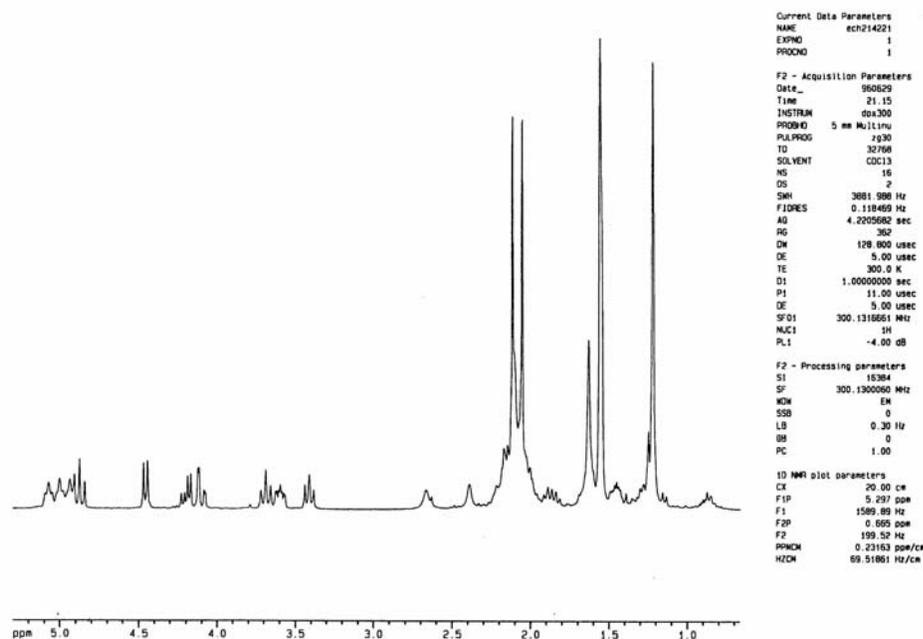


Figura 1. Espectro de RMN-¹H del glicósido-diterpénico

El espectro de RMN-¹³C (75 MHz en CDCl₃) muestra siete metilos que resuenan a δ 15.3, δ 15.5, δ 15.6, δ 20.7 y δ 20.9 (los dos últimos atribuibles a metilos sobre éster acetato), δ 24.0 y δ 24.5, ocho metilenos a δ 24.0, δ 24.7, δ 28.2, δ 28.3, δ 37.8, δ 38.8, δ 39.4, y δ 62.8, nueve metinos a δ 47.7, δ 70.9, δ 71.6, δ 74.5, δ 74.7, δ 96.7, δ 125.1, δ 125.7 y δ 125.8 y seis carbonos cuaternarios a δ 81.6, δ 133.1, δ 133.5, δ 134.1, δ 170.6 y δ 170.7 (los dos últimos atribuibles a grupos carbonilo de éster acetato) (Figura 2).

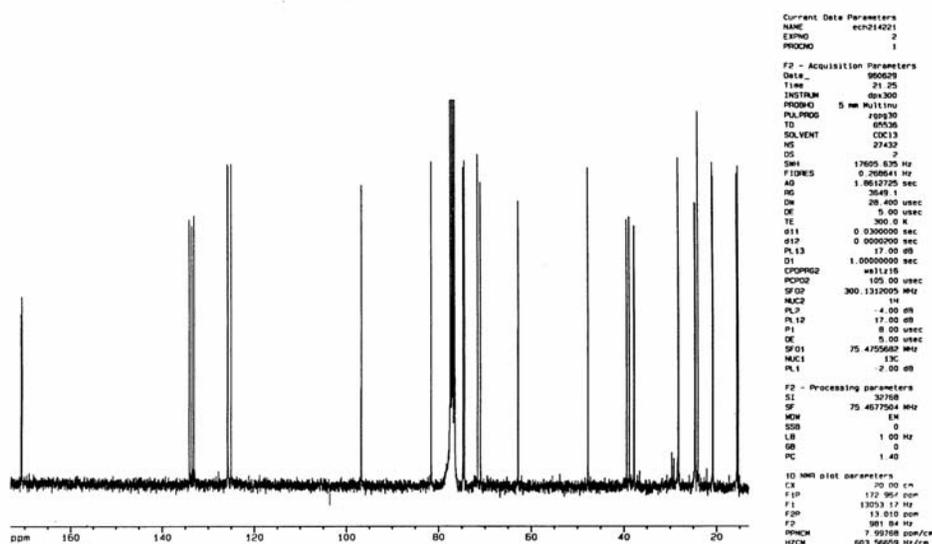


Figura 2. Espectro de RMN-¹³C del glicósido-diterpénico

La existencia de un esqueleto diterpénico se deduce por la presencia de cinco grupos metilo no adscritos a éster acetato, siete metilenos no-oxygenados, cuatro carbonos cuaternarios no atribuibles a grupos carbonilo, tres metinos vinílicos y un metilo que absorbe a campo alto.

La resonancia en el espectro de RMN- ^{13}C a δ 96.7 (d) que puede asignarse a un carbono anomérico y cinco señales en la región comprendida entre δ 62-75, sugieren la existencia de una hexosa en la molécula.

La presencia de un grupo acetal y numerosos carbonos oxygenados, analizados en conjunto con la fórmula molecular, son fuertes indicativos de la presencia de un fragmento de 10 átomos de carbono adicionales al diterpénico, lo que sugiere que estructuralmente la molécula contiene una hexosa diacetilada unida a un aglicón diterpénico.

La elucidación vía RMN de la estructura y conformación de la hexosa, se inicia con el análisis de las correlaciones que muestran los protones oxygenados en el espectro del ^1H - ^1H COSY (ver **Figura 3**).

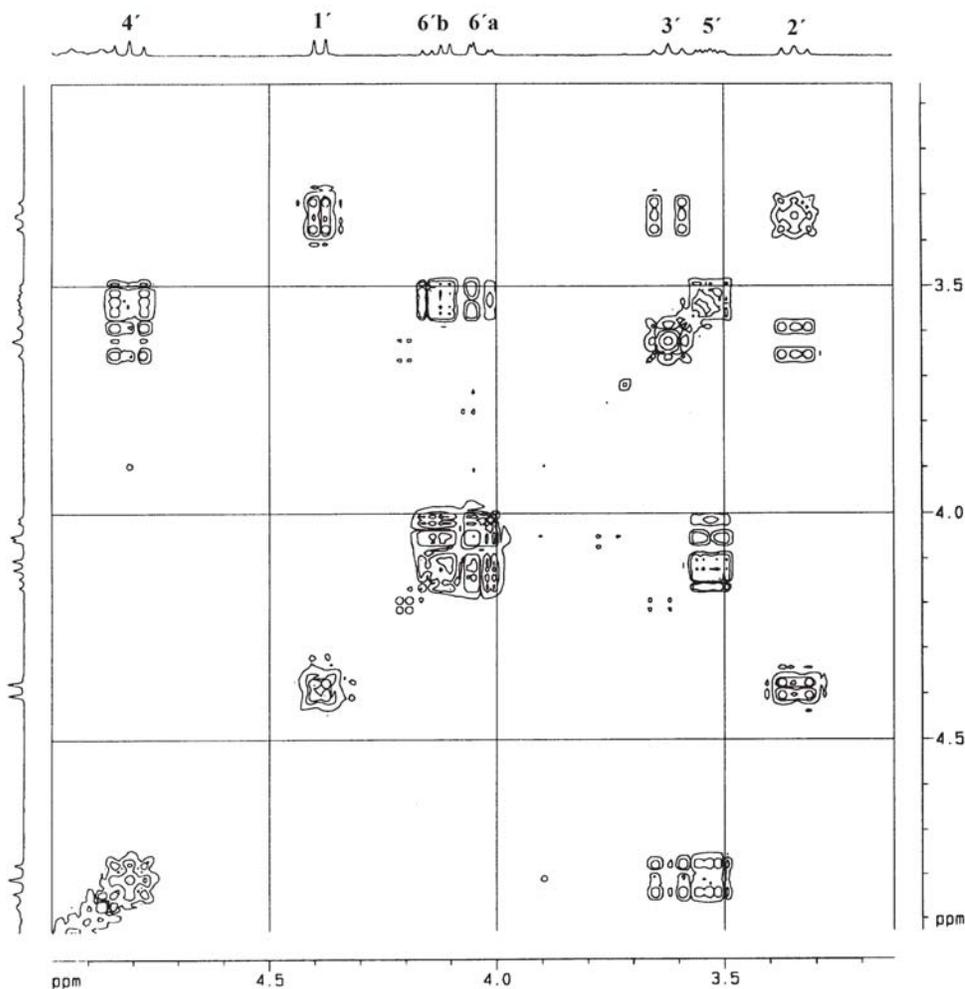


Figura 3. Espectro ^1H - ^1H COSY (300 MHz en CDCl_3) del glicósido-diterpénico

Designando como “pivote” o “señal punto de partida” al protón anomérico, (δ 4.45, d, $J = 7.65$ Hz, H-1'), se observa que correlaciona con el triplete ubicado a δ 3.41 ($J = 8.7$ Hz, H-2') quien a su vez lo hace con la señal a δ 3.68 (t, 9.16, H-3').

La secuencia de correlaciones sucesivas continúa con el protón H-3' por su correlación con el que resuena a δ 4.87, (t, 9.67, H-4') y este a su vez con el multiplete a δ 3.59 (ddd, 2.51, 6.14, 9.18, H-5') y este con ambos protones H-6' (δ 4.10, dd, 2.46, 11.99/ δ 4.19, dd, 6.14, 12.00). Finalmente, se observa la correlación entre ambos protones H-6' para terminar la secuencia.

Lo anterior nos permite asignar, sin ambigüedades, los protones asociados a la hexosa de la molécula.

Con los protones glicosídicos debidamente identificados, se procede a asignar los carbonos respectivos mediante el análisis del espectro de ^1H - ^{13}C HETCOR (CSCM) (ver **Figura 4**).

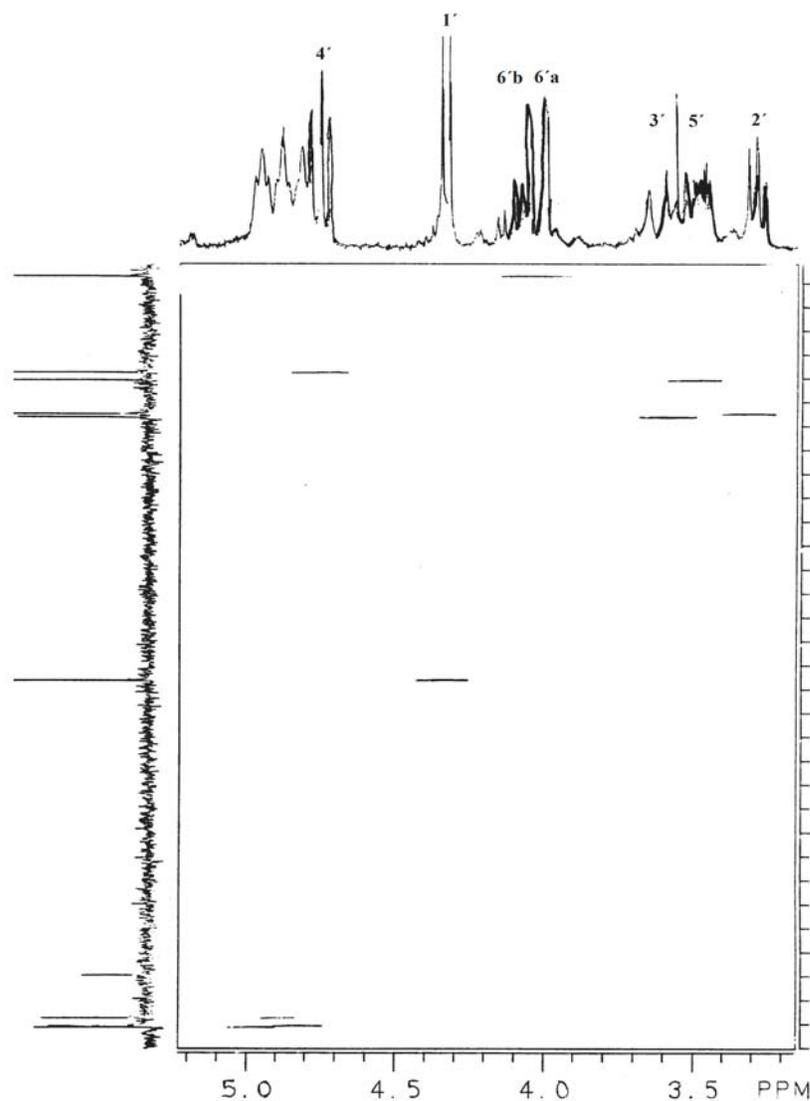


Figura 4. Espectro de ^1H - ^{13}C -HETCOR (CSCM a 300 MHz en CDCl_3) del glicosido-diterpénico

La conformación beta del enlace glicosídico entre la hexosa y la porción diterpénica de la molécula, se puede inferir por el desplazamiento químico y constante de acoplamiento del protón anomérico (δ 4.45, d, $J = 7.65$ Hz),

que claramente indica su posición axial. Un desplazamiento químico superior a 4.8 ppm y una constante de acoplamiento $^3J_{H-H}$ menor de 4 Hz indica que la posición del protón anomérico es ecuatorial. El espectro de PS-NOESY, específicamente en el área correspondiente a los protones del azúcar (ver **Figura 5**), muestra correlaciones fuertes entre los protones H-1' y H-3', H-1' y H-5', H-3' y H-5', H-2' y H-4', que conjuntamente con la magnitud de las constantes de acoplamiento de dichos protones ($^3J_{H-H}$ entre 6.5 y 9.1 Hz), son evidencia inequívoca de la relación 1,3-diaxial que existe entre ellos.

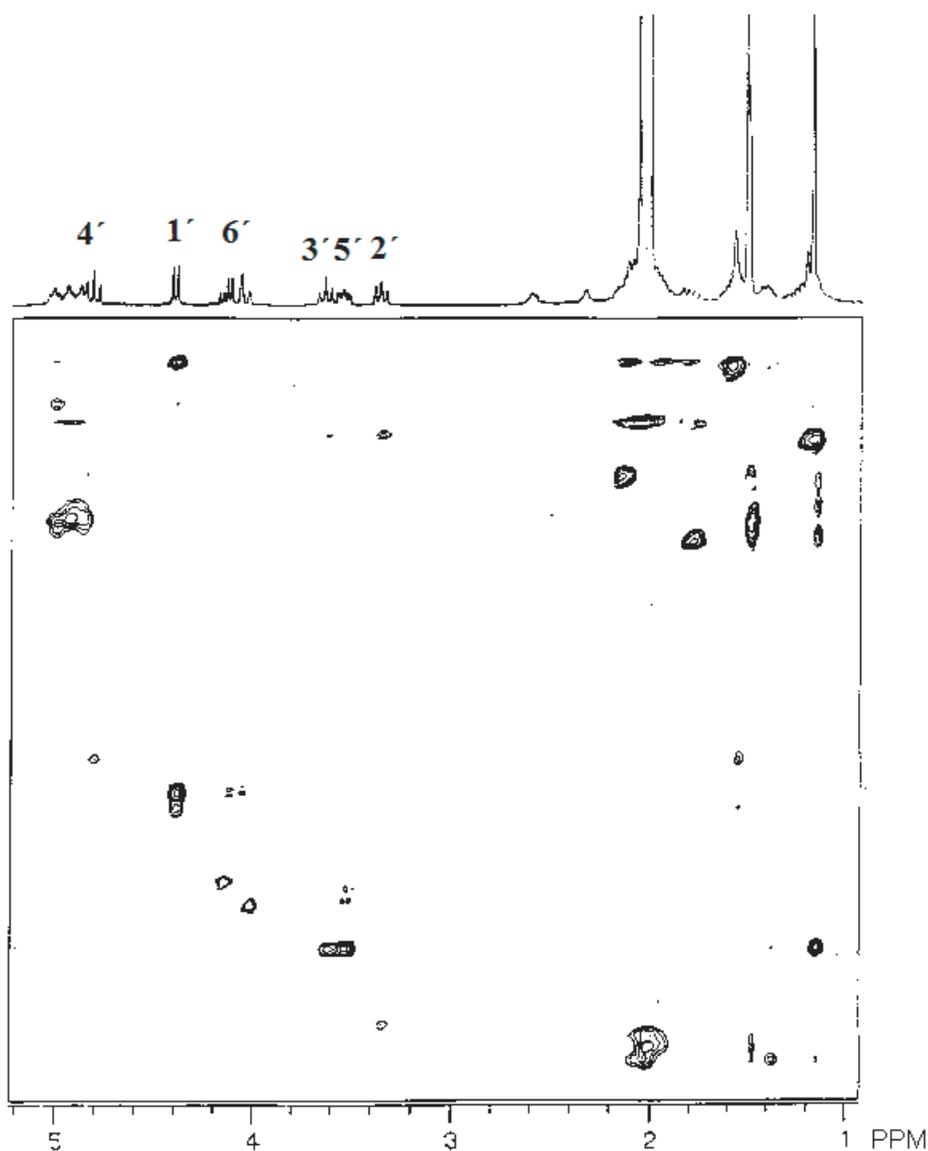


Figura 5. Espectro de PS-NOESY (300 MHz en CDCl₃) del glicósido-diterpénico

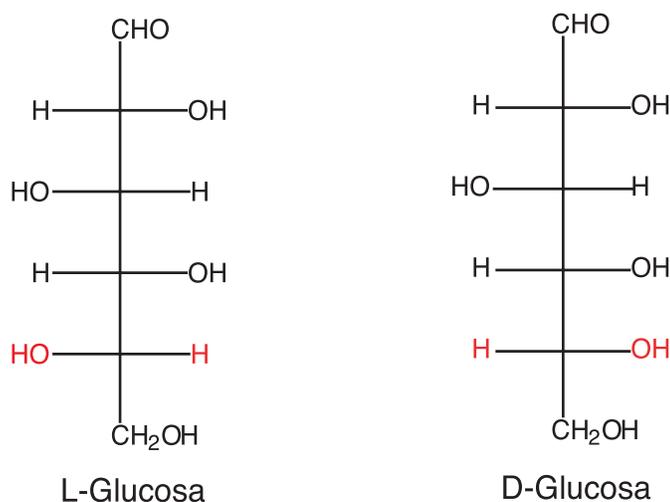
Organizando la información espectral y las inferencias efectuadas hasta ahora, es posible asignar la presencia de una glucosa en forma de piranosa y con una conformación beta en su enlace glicosídico.

Queda ahora por determinar la posición de los dos grupos éster acetato que posee la molécula. El desplazamiento a campo bajo de los protones H-4' (δ 4.87) y H-6' (δ 4.10 y δ 4.19), que normalmente se encuentran en la zona de 3.5-3.0 ppm respectivamente en CDCl₃, y las correlaciones encontradas entre los protones H-4' y H-6' con las señales de RMN-¹³C a δ 170.6 y δ 170.7, adscritas a los grupos éster-carbonilo en el espectro de HMBC, localizan respectivamente ambos grupos sobre los carbonos C-4' y C-6' del residuo glicosídico.

Hay que puntualizar que la aplicación rutinaria de RMN es un método no-quiral, por lo que no puede distinguir entre las series "D" o "L" de un monosacárido.

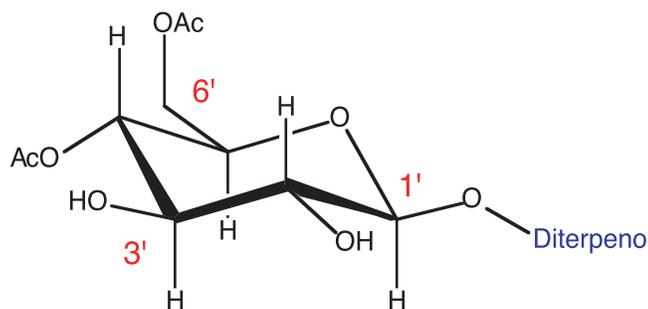
Por convención, las hexosas de la serie "D" son aquellas que poseen el grupo hidroxilo sobre el carbono quiral de mas alta numeración a la derecha en el sistema de proyección de Fischer (quedando ubicado el grupo CH₂OH en posición ecuatorial en la conformación de silla).

Los que lo poseen a la izquierda, se asignan a la serie "L".



La utilización de reactivos desplazantes de Lantánido puede discriminar entre ellos. Teóricamente es posible hacerlo debido al diastereotopismo causado por la inducción asimétrica, que en la práctica, requiere comparación con datos de la literatura de moléculas con conocida configuración absoluta en su azúcar (Eliel E.; Wilen, S. 1994).

Basado en el análisis elucidativo efectuado, es confiable entonces asignar la porción glicosídica del glicósido-diterpénico como **β -D-4,6-diacetilglucopiranososa**.



La identidad de esta hexosa fue confirmada por análisis del hidrolizado en una columna quiral por GC-MS (Cóbar, O. *et. al.* 1997).

REFERENCIAS

1. Bagno, A.; Rastrelli, F.; Saielli, G. **Prediction of the ^1H and ^{13}C NMR Spectra of $\alpha\text{-D-Glucose}$ in Water by DFT Methods and MD Simulations.** *Journal of Organic Chemistry*, **2007**, *72*, 7373-7381.
2. Blunt, J.; Copp, B.; Hu, W-P.; Munro, M.; Northcote, P.; Prinsep, M. **Marine natural products.** *Natural Product Reports*, **2009**, *26*, 170-244.
3. Bose-Basu, B.; Klepach, T.; Bondo, G.; Bondo, P.; Zhang, W.; Carmichael, I.; Serianni, A. **^{13}C - ^{13}C NMR Spin-Spin Coupling Constants in Saccharides: Structural Correlations Involving All Carbons in Aldohexopyranosyl Rings.** *Journal of Organic Chemistry*, **2007**, *72*, 7511-7522.
4. Cobar, O.M.; Rodríguez, A.D.; Padilla, O.L.; Sánchez, J. **The Calyculaglycosides; Dilophol-Type Diterpene Glycosides Exhibiting Antiinflammatory Activity from the Caribbean Gorgonian Octocoral *Eunicea* sp.** *Journal of Organic Chemistry*, **1997**, *62*, 7183-7188.
5. Cutler, S.; Cutler, H. **Biologically active natural products: pharmaceuticals.** CRC Press, New York, **2000**, 268 pp.
6. Eliel, E.L.; Wilen, S.H. **Stereochemistry of Organic Compounds.** Ch. 11th John Wiley and Sons Inc. New York, USA. **1994**, 750 pp.
7. Jacobsen, N. **NMR spectroscopy explained: simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology.** Wiley-Interscience, Hoboken, N.J., **2007**, 668 pp.
8. Jiménez, C. **Estrategias en la Determinación Estructural de Glicósidos y Poliglicósidos por RMN.** *Manual de Determinación Estructural de Compuestos Naturales.* CYTED-Convenio Andrés Bello, Colombia, **2008**, 495-525 pp.
9. Jones, W.; Kinghorn, D. **Extraction of Plant Secondary Metabolites.** *Natural Product Isolation*, in *Methods in Biotechnology*, 2nd. Ed. Ch. 13th, Humana Press, USA, **2006**, 323-352 pp.
10. Leavitt, A.; Sherman, W. **Direct gas-chromatographic resolution of DL-*myo*-inositol 1-phosphate and other sugar enantiomers as simple derivatives on a chiral capillary column.** *Carbohydrate Research*, **1982**, *103*, 203-212.