



ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA CITOQUININA N-BENZIL 9 (2 TETRAHIDROPIRANYL) ADENINE UTILIZANDO EL MÉTODO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Angélica Huertas¹, Fabiola Espejo², Carlos Rojas¹

¹ Departamento. de Física. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
Carrera 7ª # 40-82, Bogotá

² Fundación Instituto Colombiano de Inmunología
carojas@javeriana.edu.co

RESUMEN

Para comprender la función biológica de las moléculas que conforman los seres vivos es necesario conocer la estructura tridimensional de ellas, pues está comprobado que la función depende más de la distribución espacial que de los mismos componentes. El objetivo del presente trabajo es determinar la estructura de una fitohormona. Uno de los métodos que existen para determinar estas estructuras es la resonancia magnética nuclear pulsada el cual se escogió para este trabajo. Este método se diferencia de la resonancia de onda continua en el hecho de que el campo magnético variable es aplicado en forma de pulsos y su amplitud no puede ser considerada como una perturbación al sistema. La determinación de la estructura exigió la toma de los espectros unidimensionales de H1, C13 y los Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT); este último es una secuencia de pulsos que permite diferenciar entre carbonos unidos a tres, a dos y a un hidrógeno. Con la ayuda del espectro C13 también se pueden distinguir los carbonos que no están enlazados con ningún hidrógeno. Además de éstos, fueron necesarios los siguientes espectros bidimensionales: 1) Heteronuclear Multiple Quantum Correlation (HMQC) el cual correlaciona hidrógenos con carbonos que se encuentren enlazados; 2) Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) que correlaciona carbonos con hidrógenos que se encuentren a dos o tres enlaces; 3) Correlation Spectroscopy (COSY) el cual muestra la correlación entre hidrógenos que se encuentren a dos o tres enlaces; y 4) Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY) el cual correlaciona hidrógenos que distan entre sí menos de 5 Å. A partir de la información obtenida del análisis de estos espectros se dedujo el modelo de la fitohormona que se presenta como resultado del trabajo.

Palabras clave: espectros de resonancia magnética nuclear, estructura tridimensional, hormona vegetal, modelo.

ABSTRACT

In order to understand the biological function of the molecules that form living beings, it is necessary to know their three-dimensional structure, because this verifies that the function depends more on the space distribution than on its components. The objective of the present work is to determine the fitohormona structure. One of the methods that exists to determine these structures is the magnetic resonance nuclear pulsation which was chosen for this work. This method differs from the resonance of continuous wave in the fact that the variable magnetic field is applied in form of pulses and its amplitude cannot be considered like a perturbation to the system. The determination of the structure requires the taking the unidimensionales spectra of H1, C13 and the Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT); the last one is a sequence of pulses that allows to differentiate between carbons with three, two and one hydrogen. With the aid of the C13 spectrum it is also possible distinguish the carbons that are not connected with any

hydrogen. In addition to these, the following bidimensional spectra were necessary: 1) Heteronuclear Multiple Quantum Correlation (HMQC) which correlates hydrogens with carbons that are connected; 2) Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) that correlates carbons with hydrogen's that have two or three links; 3) Correlation Spectroscopy (COSY) which shows the correlation between hydrogen's that have two or three links; and 4) Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY) which correlates hydrogen's that are distant from each other less than 5 Å. From the data obtained from the analysis of these spectra the model of fitohormona, which resulted from the work, was deduced.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la estructura tridimensional de las moléculas orgánicas de interés biológico es muy importante para comprender su funcionamiento, pues hoy en día está muy bien establecido que la función de una molécula depende tanto de su estructura tridimensional como de su composición química. La única forma de determinar la estructura tridimensional es utilizando métodos físicos, entre los cuales los mejor desarrollados son: la difracción de rayos x sobre un monocristal y la resonancia magnética nuclear. En este trabajo se utilizó el método de resonancia magnética nuclear (RMN) con el fin de determinar la estructura de la hormona propuesta. La molécula n Benzil estudiada en este trabajo pertenece al grupo de las auxinas. Las auxinas juegan un papel fundamental en el crecimiento de las plantas y en la respuesta a estímulos externos como: el fototropismo, el gravitropismo, la diferenciación vascular y la ramificación lateral de raíces y retoños. Con el fin de contribuir a determinar los detalles moleculares del funcionamiento de esta hormona en la planta se emprendió la determinación de su estructura utilizando el método de resonancia magnética nuclear.

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RNM) utiliza la interacción entre los momentos magnéticos nucleares de algunos átomos (tales como H^1 , P^{31} , C^{13} , N^{15}) con un campo magnético estático y un campo magnético variable en el tiempo, para "localizar" los núcleos de estos átomos y con la ayuda del conocimiento de la

estructura primaria de la molécula determinar su estructura tridimensional.

El campo estático que actúa sobre los núcleos produce efecto Zeeman, es decir, causa el desdoblamiento de los niveles magnéticos de energía. Este desdoblamiento dependerá de la carga y la masa del núcleo, contenidas en su constante giromagnética y del campo que afecta al núcleo. El campo que afecta al núcleo llamado campo local, está formado por el campo externo aplicado a la muestra y los campos magnéticos internos de la muestra (el campo generado por: las corrientes diamagnéticas electrónicas, los núcleos paramagnéticos cercanos y los momentos magnéticos electrónicos entre otros) y por consiguiente, el espectro RMN da información del ambiente magnético de los núcleos observados.

Hay dos formas de tomar estos espectros una de ellas es RMN de onda continua en la cual la amplitud del campo magnético alterno es tan pequeña comparada con la amplitud del campo estático que se puede considerar como una perturbación al sistema de espines. El espectro es tomado barriendo las amplitudes del campo magnético estático mediante procesos cuasiestáticos o cambiando las frecuencias del campo magnético alterno de la misma forma. La otra es RMN pulsada o espectroscopia de Fourier (usada en este trabajo). Este método consiste en aplicar un campo variable H_1 mediante pulsos cortos e intensos cambiando de esta manera, la dirección del vector de magnetización del sistema un ángulo θ el cual está dado por

$\theta = \gamma H_1 t_w$ donde γ es la constante giromagnética de los núcleos afectados, H_1 la amplitud del campo magnético de radiofrecuencias aplicado y t_w el tiempo durante el cual el campo es aplicado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los espectros para este trabajo fueron tomados en un espectrómetro Spectrospin and Bruker Superconducting Magnet 600 MHz con un campo de 14 T y en un espectrómetro Spectrospin and Bruker Superconducting Magnet 500 MHz de 11.5 T de la Fundación Instituto Colombiano de Inmunología. Para ello, se disolvieron 10 mg de muestra en 10 ml de cloroformo deuterado. Sobre esta solución se tomaron los espectros unidimensionales ^1H ^{13}C y los DEPT 45, 90 y 135. Y luego los espectros bidimensionales HMQC, HMBC, COSY y NOESY, los cuales utilizan la técnica de espectroscopia bidimensional de Fourier con la que se pueden desenredar los complicados espectros que se obtienen de las moléculas muy grandes y conocer la estructura exacta de pequeñas moléculas, además permiten visualizar los posibles cambios estructurales de las moléculas cuando hay una reacción química.

El esquema básico de la espectroscopia bidimensional está dado en la figura 1.

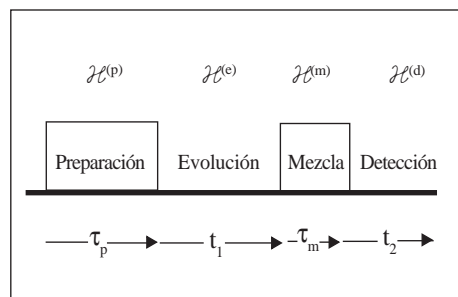


FIGURA 1. Esquema básico de la espectroscopia bidimensional.

En donde en el primer período (tiempo perturbación) el sistema de espines se saca del equilibrio mediante una secuencia de pulsos; durante el segundo período (tiempo de evolución) se deja evolucionar los sistemas de espín de la muestra bajo sus propias interacciones (en la mayoría de los casos) por un tiempo variable durante el experimento. El tercer período (tiempo de mezcla) es el tiempo en el cual se perturba al sistema con diferentes campos para lograr resaltar ciertas interacciones entre los diferentes sistemas de espín de la muestra. Y el último período (tiempo de detección) es el tiempo durante el cual se detecta la señal emitida por la muestra, este tiempo también es variable durante el experimento. La señal recogida entonces depende del tiempo de evolución y el tiempo de detección. Mediante una transformación de Fourier de la señal detectada se obtiene el espectro en el espacio de las frecuencias como el NOESY de la muestra Nbenzil mostrado en la figura 2.

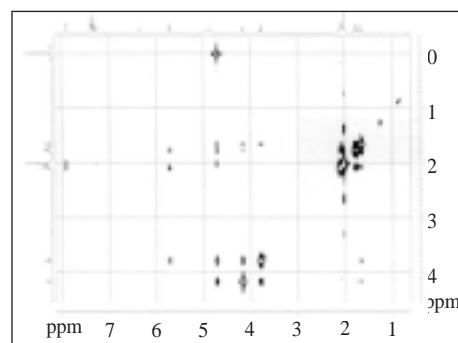


FIGURA 2. Espectro bidimensional NOESY de la hormona N^{H} -Benzil-9- (2-tetrahydropyrany) Adenine.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del espectro unidimensional H^1 mostrado en la figura 3 se extrajo información básica como el corrimiento químico de los picos (δ), el tipo de pico (es decir doble, triplete, ..., multiplete) y la relación de intensidades de los picos.

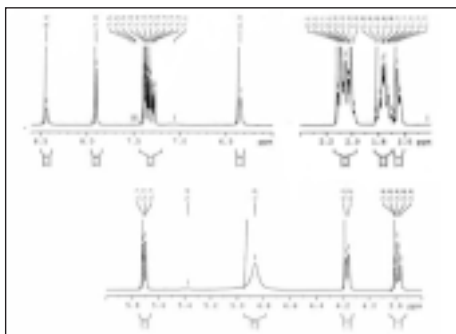


FIGURA 3. Espectro unidimensional de hidrógeno (H^1) de la hormona N-Benzil-9-(2-tetrahydropyrany) Adenine. Muestra de intensidades y muestra de corrimientos químicos.

De los espectros C^{13} y DEPT 45 mostrados en la figura 4 y en la figura 5 se dedujo cuáles carbonos eran cuaternarios (los que no están unidos a ningún hidrógeno) ya que la diferencia entre las señales del espectro DEPT 45 y el espectro C^{13} son las señales de los carbonos cuaternarios. Para el caso de la muestra en estudio no se encontró ninguna diferencia entre estos espectros lo que nos sugería la no presencia de carbonos cuaternarios, sin embargo, esto no concordaba con la secuencia primaria de la molécula; para solucionar este problema se tomó otro espectro aumentando el tiempo en que se recoge normalmente la señal, en el cual se encontraron dos señales más, mostradas en la figura 6. Sin embargo quedaron faltando 2 señales de carbonos cuaternarios sugeridos por la estructura primaria, que no aparecieron y que exigían un tiempo de decaimiento demasiado largo, se concluyó que eran los carbonos unidos a nitrógenos que sugería la secuencia primaria de la molécula.

En el espectro de C^{13} se observan tres señales cuyos corrimientos químicos son 78.0, 77.7 y 77.4 ppm, los cuales corresponden al solvente (cloroformo deuterado) y una señal con corrimiento químico de 0.7 la cual es la referencia TMS (tetramethylsilane); por su origen éstas no entran en el análisis

del espectro. Exceptuando estas señales hay 10 líneas de resonancia; si le sumamos las otras cuatro de las líneas de carbonos cuaternarios aún faltarían tres líneas para completar el número de carbonos que proporciona la fórmula ($C_{17}H_{19}N_5O$), lo cual indica que hay carbonos equivalentes.

El DEPT 90 que muestra los carbonos terciarios (carbonos unidos a un hidrógeno), presenta 6 líneas de resonancia. La parte Benzil de la molécula contiene un benceno, debido a su simetría, se deduce que hay dos pares de carbonos equivalentes, indicando que en la molécula hay 8 carbonos primarios, que presentan sólo 6 líneas de resonancia en este DEPT.

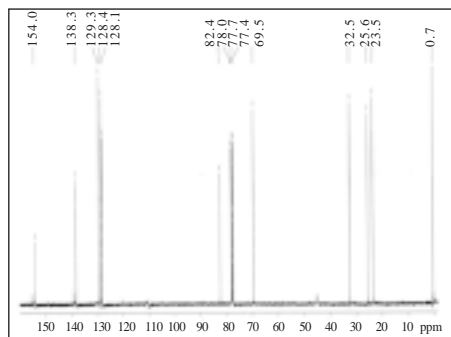


FIGURA 4. Espectro unidimensional de carbono (C^{13}) de la hormona N-Benzil-9-(2-tetrahydropyrany) Adenine. Muestra de corrimientos químicos.

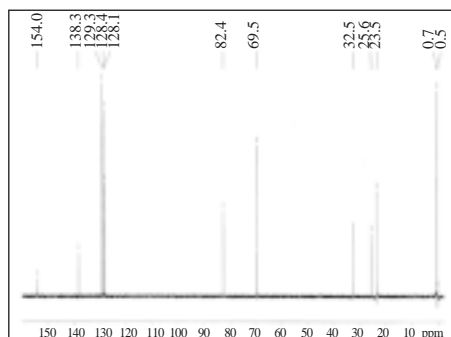


FIGURA 5. Espectro unidimensional DEPT 45 de la hormona N-Benzil-9-(2-tetrahydropyrany) Adenine. Muestra de corrimientos químicos.

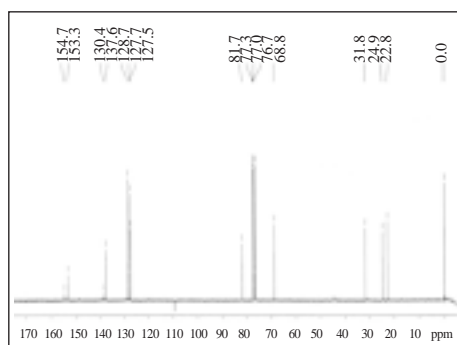


FIGURA 6. Espectro unidimensional de carbono (C^{13}) de la hormona N-Benzil-9- (2-tetrahydropyrany) Adenine. Muestra de corrimientos químicos y nuevas señales.

El DEPT 135 muestra carbonos primarios (carbonos unidos a tres hidrógenos), secundarios y terciarios de igual forma que lo hace el DEPT 45, con la diferencia de que los carbonos secundarios aparecen con “intensidad negativa” (desfasados); hay 4 líneas de resonancia que muestran carbonos secundarios (véase figura 7) y restando las señales de intensidad positiva del DEPT 135 de las señales del DEPT 90 se observa que no hay ningún carbono primario. Por lo tanto hay un par de carbonos secundarios equivalentes. Para identificar que carbono le corresponde a cada corrimiento químico se usaron los datos de RMN para moléculas similares. Para observar si las asignaciones han sido correctas, se tomó el espectro HMQC (véase figura 8) el cual muestra la correlación entre átomos de carbono y átomos de hidrógeno. Este espectro ilustra qué hidrógenos deben tener corrimientos químicos determinados, lo cual fue confirmado con el espectro unidimensional, el HMBC, el COSY y el NOESY.

Para la hormona n – Benzil – 9 (2-tetrahydropyrany) Adenine se detectó una

señal que no corresponde a una señal que pueda ser producida por la muestra o por el solvente, se concluyó que había una impureza en la solución cuyo corrimiento químico fue 4,81 ppm.

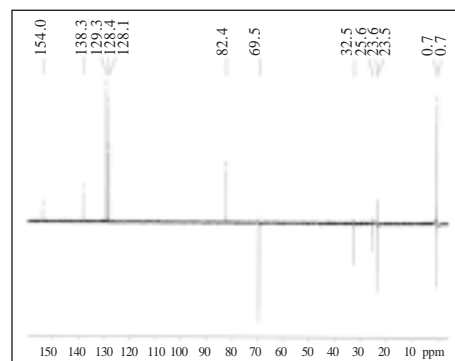


FIGURA 7. Espectro unidimensional DEPT 135 de la hormona N-Benzil-9- (2-tetrahydropyrany) Adenine. Muestra de corrimientos químicos.

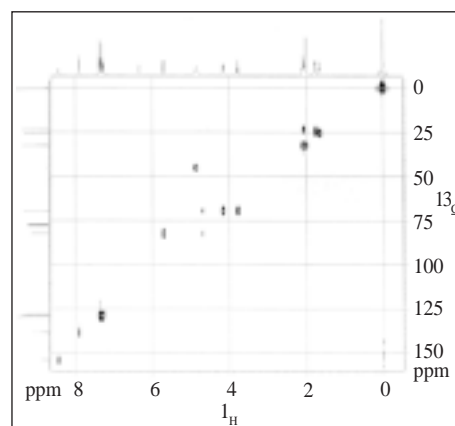


FIGURA 8. Espectro bidimensional HMQC de la hormona N-Benzil-9- (2-tetrahydropyrany) Adenine.

Finalmente después de un análisis cuidadoso de todos los espectros se llegó a la estructura mostrada en la figura 9 de la hormona.

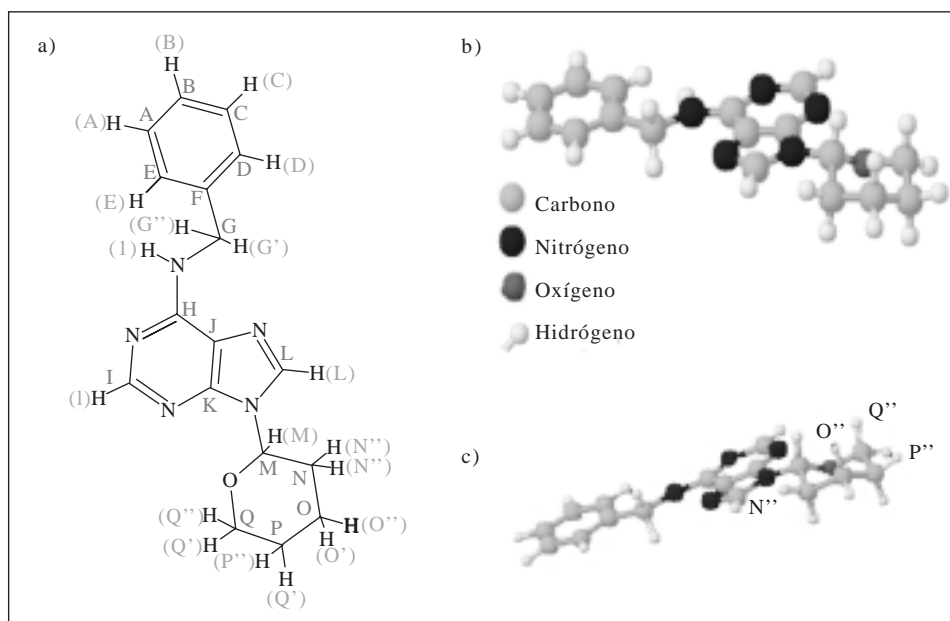


FIGURA 9. a) Fórmula estructural de la fitohormona. b) Vista superior del modelo tridimensional de la fitohormona. c) Vista lateral del modelo tridimensional de la fitohormona.

Tabla 1.

Carbono n°	Tipo de carbono	¹³ C δ(ppm)	¹ Hδ (PPM)	HMQC
1	Terciario	128,1	7,33	
2	Terciario	129,3	7,38	
3	Terciario	128,4	7,27	
4	Terciario	129,3	7,38	
5	Terciario	128,1	7,33	
6	Cuaternario	139,3		
7	Secundario	25,6	2,10	2,00
8	Terciario	155,5		
9	Terciario	154,0	8,42	
10	Cuaternario	140,9		
11	Terciario	138,3	7,90	
12	Cuaternario	120,0		
13	Terciario	82,4	5,70	
14	Secundario	69,5	3,75	4,16
15	Secundario	32,5	2,10	1,75
16	Secundario	23,5	1,75	1,65
17	Secundario	32,5	2,10	2,10

CONCLUSIONES

En la determinación de las estructuras de las pequeñas moléculas es necesario tomar los espectros DEPT, HMQC, HMBC, COSY y NOESY para asignar correctamente las señales presentadas en los espectros unidimensionales; éstos se llevan a cabo gracias a la espectroscopia de pulsos. Esta técnica permite discriminar las interacciones entre los sistemas de espines que contengan la molécula, lo que finalmente es aprovechado para determinar el ambiente magnético de los sistemas de espín y con ello la estructura tridimensional de las moléculas. Los espectros HMQC y HMBC dan la correlación de los carbonos identificados por medio del DEPT con los hidrógenos de la molécula. Al hacer la correlación con estos espectros, en el caso de la hormona N- Benzil -9 - (2-Tetrahydropyranyl) Adenine se comprobó



la presencia de una impureza en la solución utilizada para tomar los espectros. Los últimos detalles tales como la identificación de hidrógenos unidos a carbonos secundarios se realizaron por medio del espectro NOESY.

AGRADECIMIENTOS

A la Pontificia Universidad Javeriana por haber patrocinado el proyecto que originó este trabajo.

A la fundación Instituto Colombiano de Inmunología por facilitar los equipos para la toma de los diferentes espectros en especial a Katherine Jaramillo y Maria Elena Torres por su desinteresada colaboración.

LITERATURA CITADA

LAWRENCE HOBBIÉ, CANDECE TEMPTÉ and MARK ESTELLE. 1994. *Plant molecular biology*, 26, 1499.

ERNST R.R., BODENHAUSEN G. and WOKAUN A. 1988. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Oxford Science Publications.

HORE P.J. 1995. *Nuclear Magnetic Resonance*, Oxford University Press.

SLICHTER C.P. 1990. *Principles of Magnetic Resonance*, Springer-Verlag.

ABRAGAM A. 1955. *Principles of nuclear magnetism*. Oxford University Press.

CARRINGTON ALAN and D. MCLACHLAN ANDREW. 1967. *Introduction to Magnetic Resonance with Applications to Chemistry and Chemical Physics*. A Harper International Edition.

BLOCH F. 1946. *Phys. Rev.*, 70-7, 460.

IGOR VLAGIMIROVICH ALEKSANDROV. 1966. *The theory of nuclear Magnetic Resonance*. Academic Press New York and London.

HAUSSER K.H. and KALBITZER H.R. 1989. *NMR in Medicine and Biology*, Springer-Verlag.

OVERHAUSER A. 1953. *Phys. Rev.*, 89-4, 689.

CARR H.Y. 1958. *Phys. Rev.*, 112-5, 1693.

ABRAGAM A. 1955. *Phys. Rev.*, 98-6, 1729.

SANDERS J.K. and HUNTER B. 1989. *Modern NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford New York Toronto.

Recibido: 10-07-2003

Aceptado: 18-03-2004