

# AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE DOS DERIVADOS DEL $\alpha$ -ONOCERIN

*Atma-Sol Bustos, Patricia Mollinedo, Jose A. Bravo, Jose L. Vila*

Instituto de Investigaciones en Productos Naturales IIPN, Universidad Mayor de San Andrés, Campus Universitario, Edificio FCPN 2º piso, Calle 27 y Calle Andrés Bello, Cota-Cota La Paz Bolivia

**Keywords:** *Lycopodium clavatum*,  $\alpha$ -onocerin, triterpene, 1D, 2DNMR

## ABSTRACT

From the *Lycopodium clavatum* species, an unusual triterpenoid:  $\alpha$ -onocerin (**1**) was isolated. Also the semi-synthetic derivatives **2** and **3** were prepared out from compound **1**. Their structures were determined by 1D and 2DNMR spectroscopy.

Corresponding author: [joselu62@hotmail.com](mailto:joselu62@hotmail.com)

## RESUMEN

El aislamiento de  $\alpha$ -onocerin (**1**) de la especie vegetal *Lycopodium clavatum*, un triterpenoide infrecuente, y la obtención de los derivados **2** y **3** por acetilación y oxidación respectivamente, son reportados en el presente artículo. La elucidación estructural de los compuestos fue realizada por técnicas espectroscópicas de RMN 1D y 2D.

## INTRODUCCION

La  $\alpha$ -onocerin corresponde al grupo de los triterpenoides de estructura simétrica tetracíclica, es una estructura química inusual, sintetizada y publicada por G. Stork<sup>1</sup>, Naftali Danieli,<sup>2</sup> Church R.F.,<sup>3</sup> posteriormente utilizando una nueva ruta para la síntesis del  $\alpha$ -onocerin, realizado por N. Dakieli,<sup>4</sup> todos estos trabajos realizados en la síntesis de la  $\alpha$ -onocerin, fueron llevados a cabo en varios pasos, es así que el año 2002 se muestra un último trabajo de síntesis de este compuesto, el cual fue llevado a cabo en cuatro pasos por Yuan Mi.<sup>5</sup> Este producto natural se ha identificado y aislado de muchas especies de los géneros *Lycopodium* y *Ononis*. La especie *Lycopodium clavatum* es usada en la medicina tradicional por el uso de amnesia, contusiones, esquizofrenia e hinchazones,<sup>6,7</sup> actividad anticolinesterasa,<sup>8,9</sup> actividad antioxidante,<sup>10,11</sup> antibacteriano, antifúngico, y actividad antiviral de la *L. clavatum*.<sup>12</sup> Así mismo se reporta en la literatura que la concentración presente del  $\alpha$ -onocerin en las especies vegetales es muy baja. El interés del estudio de este producto natural es debido a la actividad biológica que presenta el  $\alpha$ -onocerin. En el laboratorio del Instituto de Investigaciones en Productos Naturales se ha optimizado el rendimiento de extracción del  $\alpha$ -onocerin, llegando a obtener 1,6 %. Este trabajo presenta el aislamiento del  $\alpha$ -onocerin de la especie vegetal *Lycopodium clavatum*, colectada a 3 800 m.s.n.m. posteriormente su purificación y derivatización del compuesto aislado, todo esto acompañado de la espectroscopía de RMN 1 y 2D para la elucidación estructural.

## RESULTADOS, DISCUSION

De la especie *Lycopodium clavatum* colectado en la localidad de Unduavi que esta ubicada a 3800 m.s.n.m. en el Departamento de La Paz. Luego del pretratamiento de la especie vegetal colectada, esta fue extraída exhaustivamente con etanol 95 °GL. El extracto etanólico fue cristalizado en metanol, obteniéndose un compuesto blanco **1** que corresponde a la formula molecular, C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>. En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, se muestra dos singuletes a  $\delta$  4.6 y  $\delta$  4.8 ppm que corresponden al grupo metilen (=CH<sub>2</sub>), el cual es confirmado en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C, donde se observa el  $\delta$  a 106 ppm, que corresponde al grupo metilen (=CH<sub>2</sub>), este metilen sp<sup>2</sup> esta enlazado al carbono cuaternario sp<sup>2</sup> que esta a  $\delta$  148.1, por lo que se tiene (>C=CH<sub>2</sub>). En los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C se observa la presencia de tres grupos metil, a  $\delta$  0,64 s,  $\delta$  0,76 s y  $\delta$  0,99 s, un protón metino axial, para un grupo oxhidrilo a  $\delta$ <sub>H</sub> 3,26 (1H, dd);  $\delta$ <sub>C</sub> 79.4 (C-3). Del espectro DEPT revela que el compuesto **1**, tres metilos, cinco metilenos sp<sup>3</sup>, un metilen sp<sup>2</sup>,

dos metinos  $sp^3$ , un hidroximetino  $sp^3$ , dos carbonos cuaternarios  $sp^3$  y un carbono cuaternario  $sp^2$ . La estructura parcial de la estructura química **1**, fue deducida de los análisis de los espectros 2D de RMN, que son; HMQC, HMBC y COSY  $^1H$ - $^1H$ , en estos espectros se observan las correlaciones H-26 para C-9, C-8 y C-7, el H-25 para C-1, C-5, C-10 y C-9, el H-24 para C-23, C-4, C-3 y C-5, tal como se observa en la figura 1a. En el espectro COSY  $^1H$ - $^1H$  se muestra la correlación de los protones H-1 con H-2, H-2 con H-3, H-5 con H6, H-6 con H-7 y H-9 con H-11, esto se observa en la Fig. 1b. La estereoquímica relativa del compuesto **1**, fe elucidada por la correlación NOESY como se muestra en la figura 1c. Una particularidad de esta estructura molecular **1**, se muestra en el espectro de RMN- $^{13}C$  donde solamente se observan 15 señales que corresponden a 15 carbonos, la cual fue deducida por RMN 2D, mostrando una estructura parcial, sin embargo la estructura molecular corresponde a un triterpeno de treinta átomos de carbono. Esto sucede debido que la molécula tiene dos partes similares tanto en la estereoquímica, desplazamiento químico, acoplamientos, y que estos están unidos a través de los metilenos de carbono 11 y 12 (Fig.2)

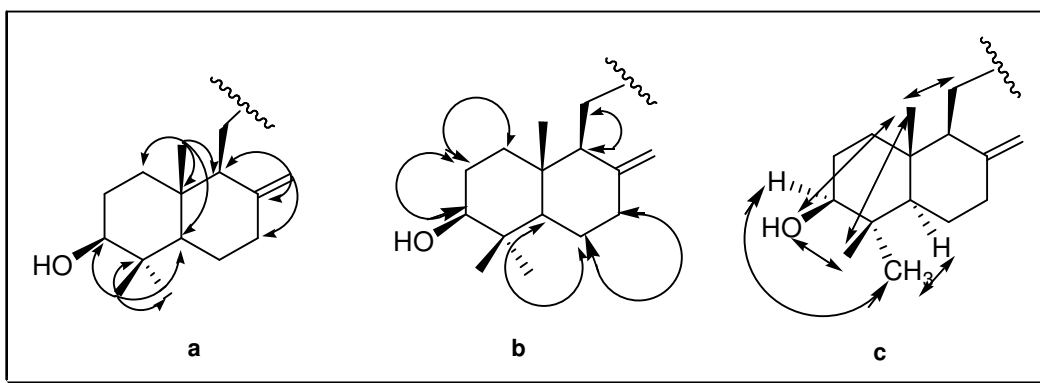


Fig 1. a) Correlacion HMBC, b) COSY  $^1H$ - $^1H$ , c) NOESY

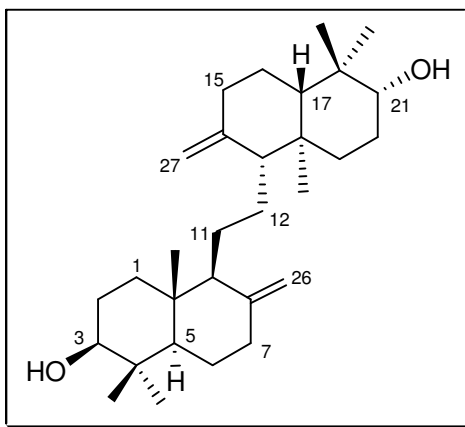


Fig 2.  $\alpha$ -Onocerin

El compuesto **1** fue derivatizado realizando una acetilación, el  $\alpha$ -onocerin se hizo reaccionar con anhídrido acético en presencia de piridina, llegando a obtener el compuesto **2**. El compuesto **2** fue sometido al análisis espectroscópico de RMN- $^1H$ , RMN- $^{13}C$ , a diferencia del compuesto **1**, el compuesto **2** tiene los mismos desplazamientos químicos tal como se observa en la tabla **1**, excepto dos señales que aparecen en el espectro de RMN- $^{13}C$  del compuesto **2**, cuyos desplazamientos químicos están a  $\delta$  171.0 ppm que corresponde a un grupo C=O, otra señal que se puede observar es a  $\delta$  21.7 que corresponde a un grupo  $CH_3$ . En el espectro de RMN- $^1H$  se observa el desplazamiento químico del protón metino axial, para un grupo oxhidrilo a  $\delta_H$  3,26 (1H, *dd*);  $\delta_C$  79,4 (C-3) del compuesto 1, que se desplaza a  $\delta_H$  4,56 (1H, *dd*);  $\delta_C$  80,3 (C-3). En el mismo espectro de RMN- $^1H$  del compuesto 2 se observa una nueva señal a  $\delta$  2,05 s ppm, que corresponde a un grupo metilo.

El compuesto 2 muestra el mismo comportamiento espectroscópico que el compuesto 1, de presentar 15 señales en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C. Por otro lado, para el compuesto 2 se realizó el análisis de RMN 2D, que corresponde al HMQC, HMBC, COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H y NOESY, de este análisis espectroscópico se propone la estructura que se presenta en la figura 3a. Otro derivado que se realizó del compuesto 1, fue la oxidación con dicromato de potasio en medio ácido, llegando a obtener el compuesto 3. este compuesto obtenido a diferencia de los otros no presenta la señal en el RMN-<sup>1</sup>H que corresponde protón metino axial, para un grupo oxhidrilo a  $\delta_H$  3,26 (1H, *dd*), en l espectro de RMN-<sup>13</sup>C a diferencia del compuesto 1, muestra una señal a *d* 216,9 ppm, que corresponde a un grupo carbonilo ce tónico (C-3), y la señal  $\delta_C$  79,4 (C-3) del compuesto 1, en este espectro ya no se presenta, las otras señales no varían significativamente su desplazamiento químico excepto los que corresponden al C-2, C-4, C-22 y C-20. Del análisis de los espectros de HMQC, HMBC, COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H y NOESY, se propone la estructura molecular 3, como se observa en la figura 3b.

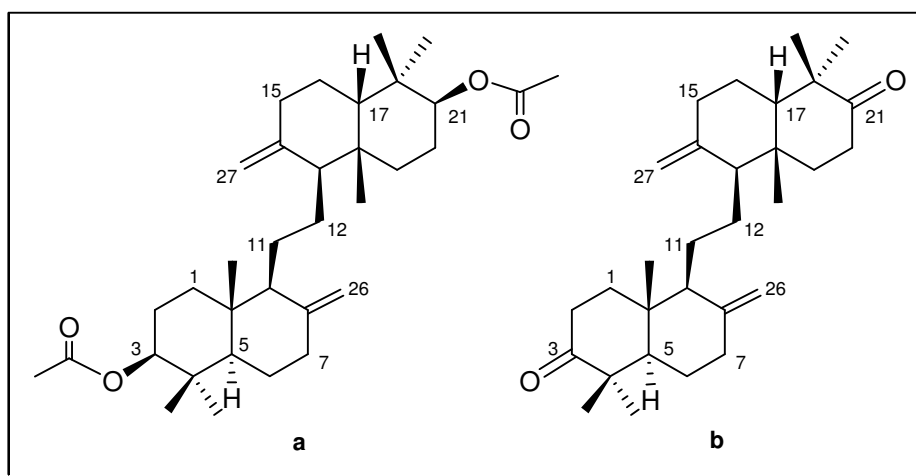


Fig 3. a) Compuesto 2 (onocerin acetilado), b) compuesto 3 (onocerin oxidado)

Tabla 1. Desplazamientos químicos de RMN-<sup>13</sup>C(ppm), de los compuestos 1, 2 y 3

(C)	1	2	3	(C)	1	2	3
1	36,3	36,7	37,9	16	23,3	23,8	25,1
2	27,3	24,3	37,5	17	53,8	54,8	55,2
3	79,4	80,3	216,9	18	38,5	39,1	39,2
4	38,3	38,1	47,8	19	36,3	36,7	37,9
5	53,8	54,8	55,2	20	27,3	24,3	37,5
6	23,3	23,8	25,1	21	79,4	80,3	216,9
7	37,3	38,0	37,9	22	38,3	38,1	47,8
8	148,1	148,2	147,5	23	28,7	28,2	26,0
9	56,4	57,1	56,5	24	15,0	16,5	21,6
10	38,5	39,1	39,2	25	13,8	14,6	14,1
11	21,9	22,3	22,7	26	105,5	106,8	107,6
12	21,9	22,3	22,7	27	105,5	106,8	107,6
13	56,4	57,1	56,5	28	13,8	14,6	14,1
14	148,1	148,2	147,5	29	15,0	16,5	21,6
15	37,3	38,0	37,9	30	28,7	28,2	26,0
				31 $\underline{C=O}$	-	171,0	-
				31 $\underline{COCH_3}$	-	21,7	-

## SECCION EXPERIMENTAL

### Extracción y purificación del $\alpha$ -onocerin

La especie vegetal *Lycopodium clavatum* fué colectada en la localidad de Unduavi a 3 800 m.s.n.m. (Departamento de La Paz). El vegetal fue secado (2000 g), molido, posteriormente se procedió con la extracción sólido-líquido con etanol 96 °GL, por el lapso de 48 h. El extracto etanólico fué sometido a una cristalización fraccionada utilizando solventes de (MeOH/EtOH), obteniendo dos productos el  $\alpha$ -onocerin y sacarosa, cristalizando en primera instancia el  $\alpha$ -onocerin y luego la sacarosa. La purificación del  $\alpha$ -onocerin se realizó por sucesivas cristalizaciones llegando a obtener 3.2 g de producto.

### Acetilación del $\alpha$ -onocerin

200 mg de  $\alpha$ -onocerin, fueron disueltos en 1.5 ml de anhídrido acético, posteriormente se adicionó tres gotas de piridina, dejando la reacción por 24 h, con agitación y temperatura ambiente. Luego de la reacción se procedió con la purificación del producto y sometido al análisis espectroscópico de RMN 1 y 2D, llegando a obtener el producto **2** (diacetato de onocerin).

### Oxidación del $\alpha$ -onocerin

200 mg de  $\alpha$ -onocerin, fueron oxidados con dicromato de potasio en medio ácido, la reacción se llevó a cabo por el lapso de 2 horas, a temperatura de 60 °C, luego de la reacción se procedió con la purificación del derivado, obteniéndose un único producto que fue sometido al análisis espectroscópico, que luego del análisis espectroscópico de RMN 1 y 2D, obteniendo el producto **3**.

### Espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C de los derivados del $\alpha$ -onocerin (RMN 250 Mz)

Las figuras 4 y 5 muestran los espectros de RMN-<sup>1</sup>H del  $\alpha$ -onocerin acetilado y del  $\alpha$ -onocerin oxidado respectivamente. Las figuras 6 y 7 muestran los espectros de RMN-<sup>13</sup>C de la  $\alpha$ -onocerin y del onocerin oxiado respectivamente.

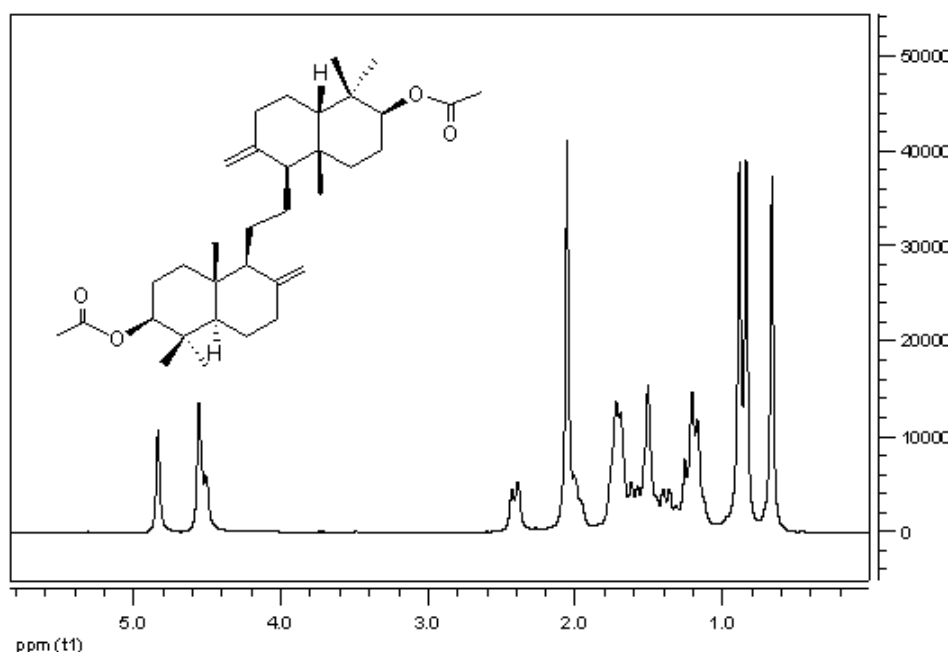


Fig 4. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H  $\alpha$ -onocerin acetilado, 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ from TMS

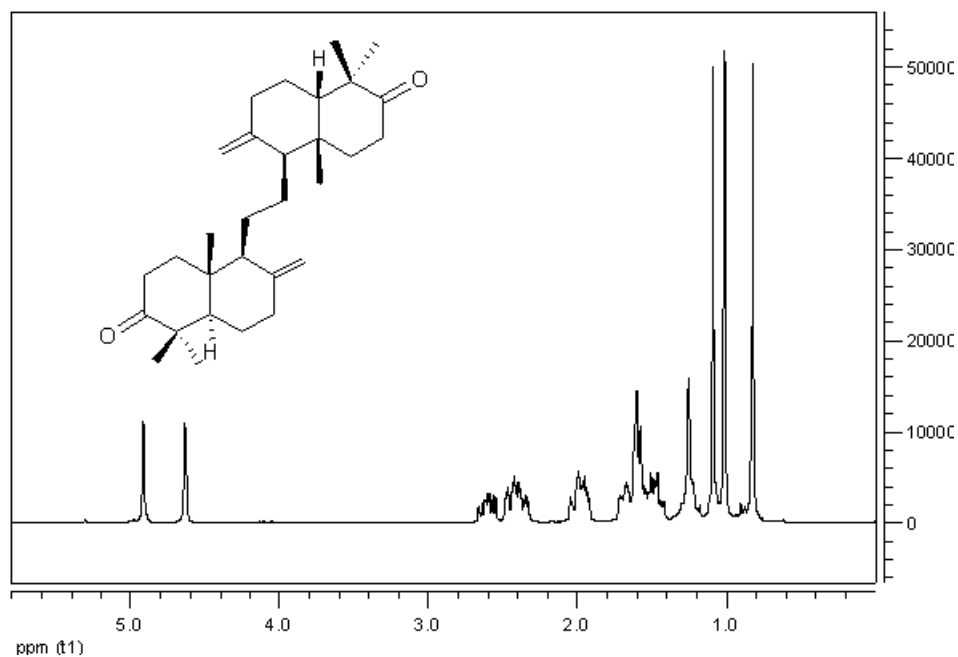


Fig 5. Espectro de RMN- $^1\text{H}$   $\alpha$ -onocerin oxidado, 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  from TMS

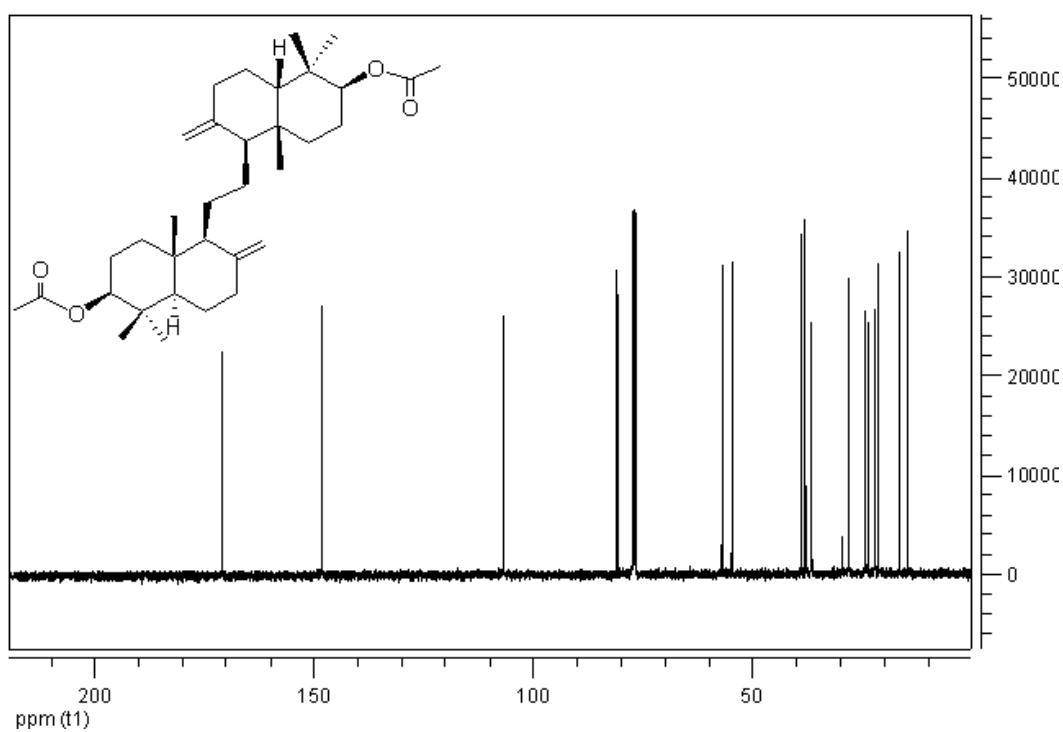


Fig 6. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$   $\alpha$ -onocerin acetilado, 75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  from  $\text{CDCl}_3$  at  $\delta$  77.0

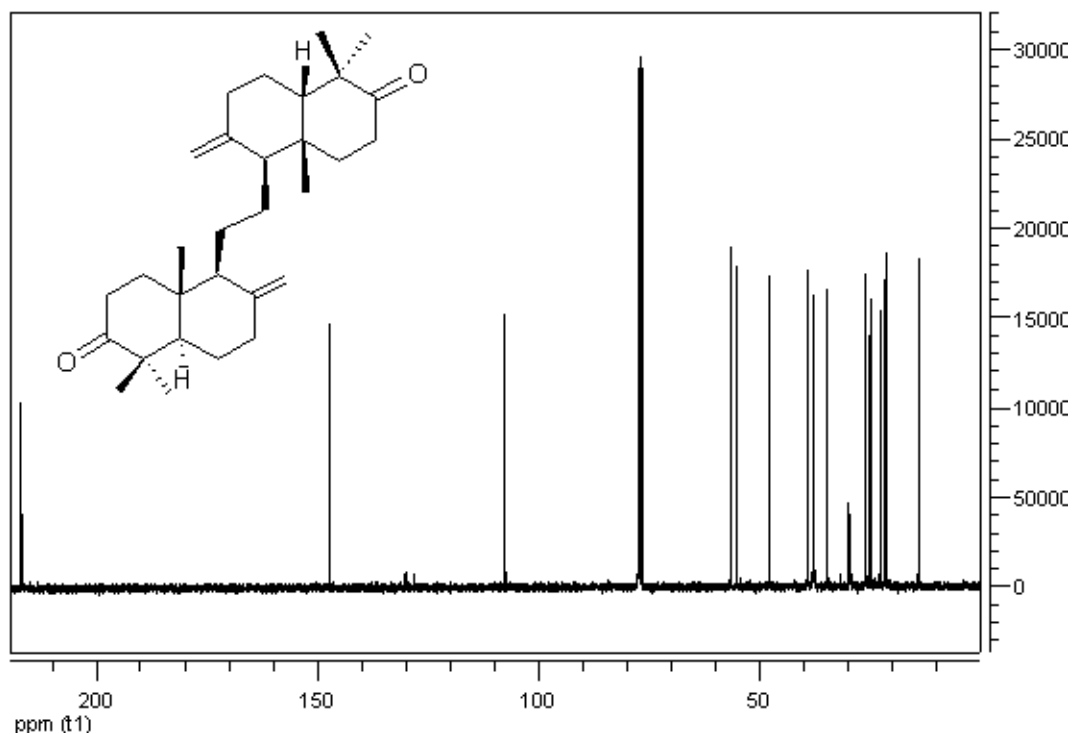


Fig 7. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$   $\alpha$ -onocerin oxidado, 75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ from  $\text{CDCl}_3$  at  $\delta$ 77.0

## RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen por el financiamiento a los recursos IDH y al Dr. Yonny Flores por la obtención de los espectros de RMN.

## REFERENCIAS

- <sup>1</sup> G. Stork, J. E. Davies y A. Meis, *J. Amer. Chem. Soc.* 81, 5516 (1959); G. Stork, A. Mcis-Isnand J. E. Davies. *Ibid.*, 3419 (1963).
- <sup>2</sup> Naftali Danieli, Yehuda Mazur, Franz Sondhelmer *Tetrahedron Letters* No. 9, pp. 310-312, 1961.
- <sup>3</sup> R. F. Church, R. E. Ireland, J. A. Marshall, *Tetrahedron Letters* No. 1, pp. 34-38, 1961.
- <sup>4</sup> N. Dakieli, Y. Mazur, F. Sondheimer *Tetrahedron* 1967, vol 23, 509 - 514.
- <sup>5</sup> Yuan Mi, Ju'rg V. Schreiber, E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 11290-11291
- <sup>6</sup> Bai DL (1993) Traditional Chinese medicines and new drug development. *Pure Appl Chem* 65:1103-1112
- <sup>7</sup> Zhu DY, Bai DL, Tang CX (1996) Recent studies on traditional Chinese medicinal plants. *Drug Dev Res*, 39:147-157
- <sup>8</sup> Liu JS, Zhu YL, Yu CM, Zhou YZ, Han YY, Wu FW, Qi BF (1986) The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. *Can J Chem* 64:837-839
- <sup>9</sup> Zhang HY, Tang XC (2000) Huperzine B, a novel acetylcholinesterase inhibitor, attenuates hydrogen peroxide induced injury in PC12 cells. *Neurosci Lett* 292:41-44
- <sup>10</sup> Xiao XQ, Wang R, Han YF, Tang XC (2000) Protective effects of huperzine A on b-amyloid25-35 induced oxidative injury in rat pheochromocytoma cells. *Neurosci Lett* 286:155-158
- <sup>11</sup> Xiao XQ, Yang JW, Tang XC (1999) Huperzine A protects rat pheochromocytoma cells against hydro-gen peroxide-induced injury. *Neurosci Lett* 275:73-76
- <sup>12</sup> Ilkay Orhan, Berrin Ozcelik, Sinem Aslan, Murat Kartal, Taner Karaoglu, Bilge Sener, Salih Terzioglu, M. Iqbal Choudhary *Phytochem Rev* (2007) 6:189-196