



# UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de  
*Rauvolfia tetraphylla* y análisis de su reactividad química”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Presenta: Q.F.B. Gregorio Eduardo Pérez Ramírez

Director: D.C. Hugo Alejandro García Gutiérrez



Morelia, Michoacán, agosto de 2021.

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA MEDICINAL DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA DIRECCIÓN DEL D.C. HUGO ALEJANDRO GARCÍA GUTIÉRREZ. PROYECTO REALIZADO GRACIAS AL APOYO OTORGADO POR CIC-UMSNH Y CONACYT CIENCIA BÁSICA (A1-S-47325).

*“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”.*

*Marie Curie.*

## **AGRADECIMIENTOS**

En cierto modo existe un poder superior que influye sobre la naturaleza y sobre el ser humano. Agradezco a Dios por la vida prestada y la oportunidad de vivir sendas experiencias durante estos últimos años.

Agradecer a mi familia, sobre todo a mis padres Eva y Adrián por el apoyo y amor que me han dado a cada paso que doy en la vida, ellos son un gran motivo para seguir adelante día con día, haga lo que tenga que hacer, más que un logro para mí lo es también para ellos. A mi hermano, gracias por compartir parte de mi vida contigo, estoy orgulloso de ti.

A la doctora Lidia Beiza Granados por su atención y sus enseñanzas, sin usted no hubiese sido posible este proyecto. Al doctor Hugo A. García Gutiérrez por la oportunidad de formar parte de este grupo de trabajo en el cual me sentí como en una segunda familia, agradezco mucho su atención, confianza y paciencia durante esta trayectoria, es y siempre será un placer haber sido su estudiante.

Agradezco a mis revisores D.C. Judit Aviña Verduzco, D.C. Alejandra Ochoa Zarzosa, D.C. Pedro Navarro Santos y D.C. Carlos M. Cerda-García-Rojas, por su tiempo y atención dedicados a este trabajo, así como las enseñanzas adquiridas de su parte.

A todos mis compañeros del laboratorio, A Luis Ja: gracias por el apoyo y los tips que tanto me ayudaron a progresar en mi vida y proyecto. A Fidel: gracias por tu amistad y también muchos tips que me fueron de gran ayuda. Al Wero y a Fran, fue un placer haber compartido anécdotas y risas junto a la jefa Marili, les deseo lo mejor el resto de nuestras vidas. Al David, gracias por esas carnes asadas y la fidedigna camaradería que me mostraste estos años. A Vero y Martín, fue un enorme gusto el haber compartido el laboratorio y charlas con ustedes, así como a Heidy, llegarás muy lejos, un placer haber coincidido contigo. Las palabras no bastan para comunicar el profundo agradecimiento que tengo de haberlos conocido a todos y cada uno, aunque no me despidió, tengo la certeza de que seguiré viéndolos durante mucho tiempo más.

Y a amigos del pueblo: Rodrigo, Berna, Dante, Isaac, Eddie, Adrián, Alo, Germin, etc. Este logró también es para ustedes, gracias por estar siempre conmigo en las malas, las buenas y la mejores. Los quiero como si fueran hermanos.

Por último, agradecer a CONACYT por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo.

## PRESENTACIONES

Parte de este trabajo se presentó en el siguiente evento académico:

**Gregorio E. Pérez Ramírez**, Lidia Beiza-Granados, Judit A. Aviña-Verduzco, Pedro Navarro-Santos, Alejandra Ochoa-Zarzosa, Hugo A. García-Gutiérrez. Análisis fitoquímico de los extractos orgánicos de hojas de *Rauvolfia tetraphylla*. Presentado en el 3er Foro del Posgrado en Ciencias Químicas del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Celebrado del 1 al 5 de julio en Morelia, Michoacán, México.

## ÍNDICE GENERAL

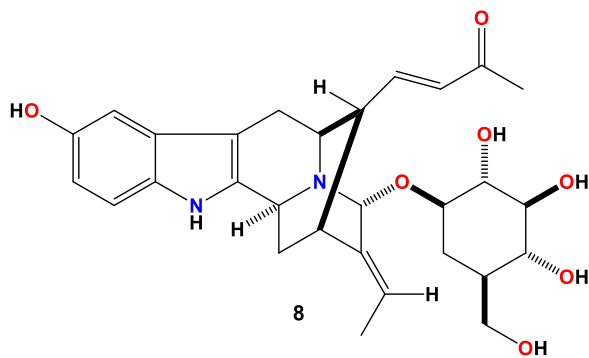
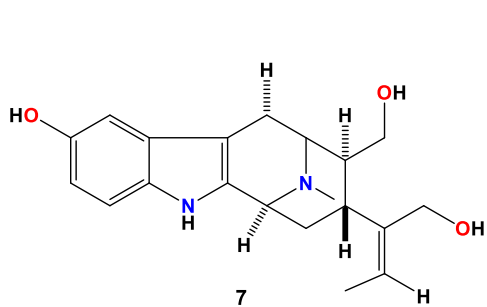
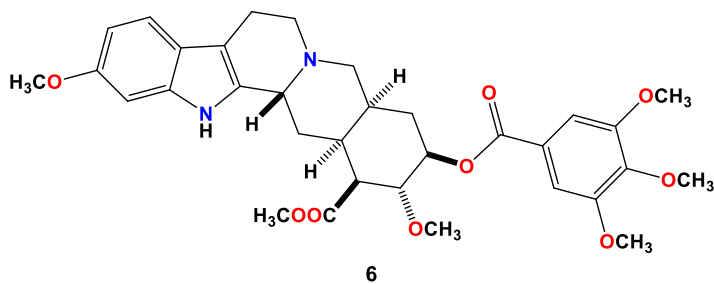
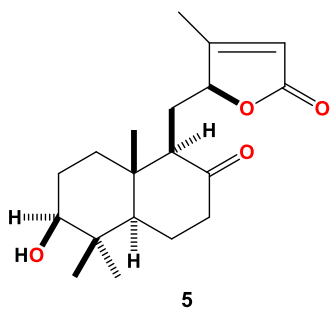
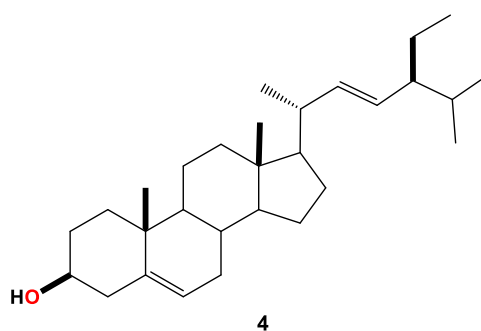
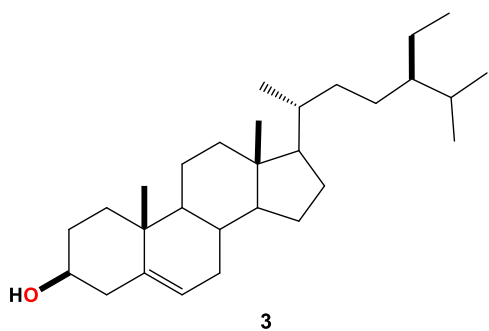
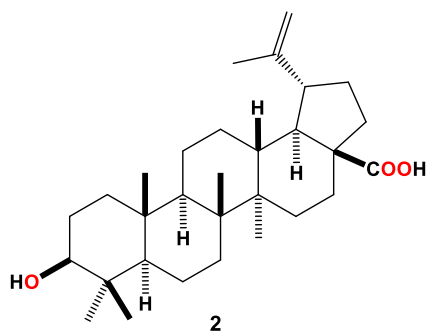
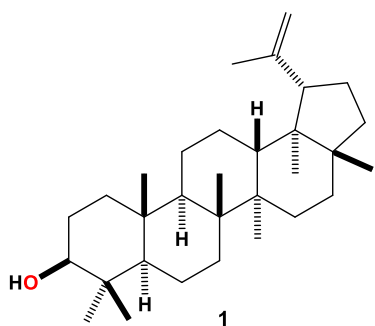
I.	INDICE DE ESTRUCTURAS	viii
II.	ÍNDICE DE FIGURAS	x
III.	SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	xii
IV.	RESUMEN	xiii
V.	ABSTRACT	xiv
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Producto Natural	2
1.2.	Terpenos	5
1.2.1	Triterpenos	6
1.3.	Alcaloides	8
2.	ANTECEDENTES	9
2.1.	Familia Apocynaceae	9
2.2.	Género <i>Rauvolfia</i>	10
2.2.1	<i>Rauvolfia tetraphylla</i>	11
2.3.	Actividad biológica del lupeol	16
2.4.	Actividad biológica del ácido betulínico	17
3.	JUSTIFICACIÓN	18
4.	OBJETIVOS	18
4.1.	General	18
4.2.	Específicos	18

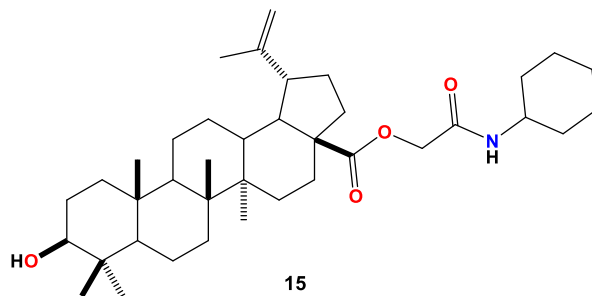
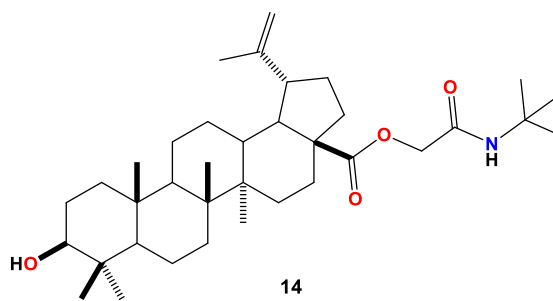
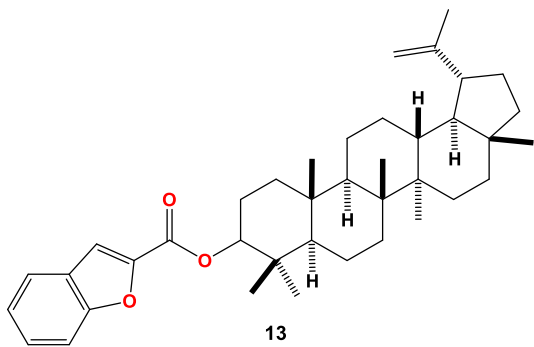
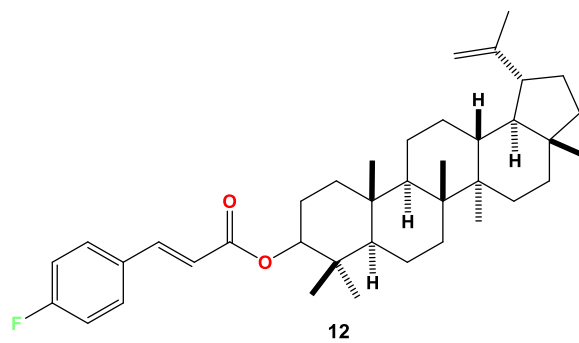
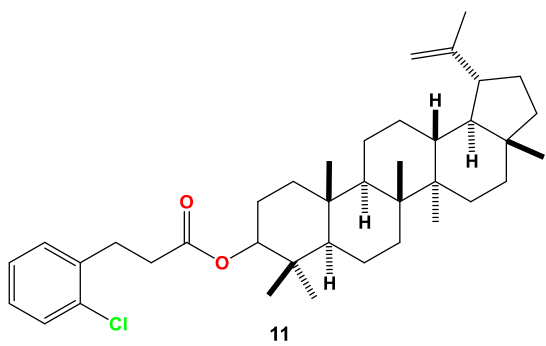
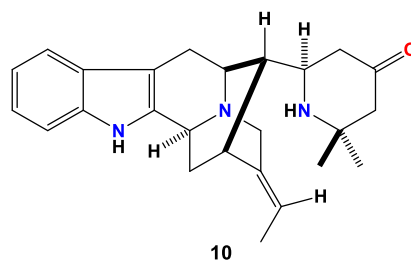
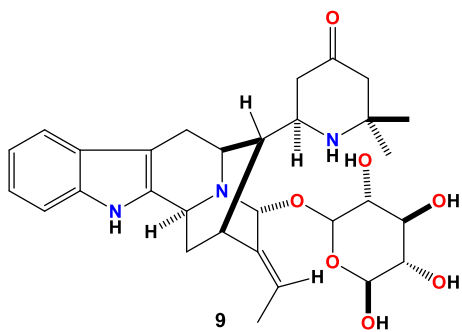
5.	ESQUEMA METODOLÓGICO	19
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
6.1.	Obtención de los extractos	20
6.2.	Análisis de los extractos hexánicos de <i>R. tetraphylla</i>	22
6.3.	Análisis de los extractos diclorometánicos de <i>R. tetraphylla</i>	24
6.4.	Análisis de los extractos de AcOEt y MeOH de <i>R. tetraphylla</i>	25
6.5.	Obtención del lupeol (1)	27
6.6.	Obtención del ácido betulínico (2)	30
6.7.	Obtención del $\beta$ -sitosterol y estigmasterol (3 y 4)	33
6.8.	Preparación de ésteres de lupeol	35
6.8.1.	Preparación del $3\beta$ -(2-clorocinamoiloxi)-lup-20(29)-eno (11)	35
6.8.2.	Preparación del $3\beta$ -(4-fluorocinamoiloxi)-lup-20(29)-eno (12)	38
6.8.3.	Preparación del $3\beta$ -(benzofuran-2-carbonil)-lup-20(29)-eno (13)	41
6.9.	Preparación de derivados del ácido betulínico	44
6.9.1.	Preparación del $3\beta$ -hidroxilup-20(29)-enoato de 2-( <i>tert</i> -butilamino)-2-oxoetilo (14)	44
6.9.2.	Preparación del $3\beta$ -hidroxilup-20(29)-enoato de 2-(ciclohexilamino)-2-oxoetilo (15)	48
7.	CONCLUSIÓN	51
8.	PARTE EXPERIMENTAL	52
8.1.	Material vegetal	52
8.2.	Generalidades	53

8.3.	Metodología para la obtención del lupeol ( <b>1</b> ), ácido betulínico ( <b>2</b> ) y $\beta$ -sitosterol–estigmasterol ( <b>3-4</b> ).	53
8.4.	Preparación de ésteres de lupeol	54
8.5.	Preparación de aductos de Passerini	54
8.6.	Datos físicos y espectroscópicos	56
8.6.1.	Lupeol ( <b>1</b> )	56
8.6.2.	Ácido betulínico ( <b>2</b> )	57
8.6.3.	Estigmasterol ( <b>3</b> ) y $\beta$ -sitosterol ( <b>4</b> )	58
8.6.4.	$3\beta$ -(2-clorocinamoiloxi)-lup-20(29)-eno ( <b>11</b> )	59
8.6.5.	$3\beta$ -(2-fluorocinamoiloxi)-lup-20(29)-eno ( <b>12</b> )	60
8.6.6.	$3\beta$ -(benzofuran-2-carbonil)-lup-20(29)-eno ( <b>13</b> )	61
8.6.7.	$3\beta$ -hidroxilup-20(29)-enoato de 2-( <i>tert</i> -butilamino)-2-oxoetilo ( <b>14</b> )	62
8.6.8.	$3\beta$ -hidroxilup-20(29)-enoato de 2-(ciclohexilamino)-2-oxoetilo ( <b>15</b> )	63
9.	BIBLIOGRAFÍA	65



# I. INDICE DE ESTRUCTURAS





## II. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estructura química del taxol.	3
<b>Figura 2.</b>	Esquema de las principales rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios.	4
<b>Figura 3.</b>	Esquema de la biosíntesis de terpenos.	5
<b>Figura 4.</b>	Ejemplos de terpenos.	6
<b>Figura 5.</b>	Clasificación y ejemplos de triterpenos.	7
<b>Figura 6.</b>	Clasificación y ejemplos de algunos alcaloides.	8
<b>Figura 7.</b>	Distribución geográfica del género <i>Rauvolfia</i> en el planeta.	10
<b>Figura 8.</b>	Fotografía de la parte aérea de <i>R. tetraphylla</i> .	12
<b>Figura 9.</b>	Estructura del 3 $\beta$ -hidroxilabda-8(17),13(14)-dien-12(15)-olido.	13
<b>Figura 10.</b>	Estructura química de la reserpina ( <b>6</b> ).	14
<b>Figura 11.</b>	Estructuras químicas de la rauvotetrafilina A ( <b>7</b> ) y C ( <b>8</b> ).	14
<b>Figura 12.</b>	Estructuras químicas de las rauvotetrafilinas F( <b>9</b> ) y G ( <b>10</b> ).	15
<b>Figura 13.</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) del extracto hexánico de hojas de <i>R. tetraphylla</i> en CDCl <sub>3</sub> .	22
<b>Figura 14.</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) del extracto hexánico de tallos de <i>R. tetraphylla</i> en CDCl <sub>3</sub>	23
<b>Figura 15.</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) del extracto hexánico de frutos de <i>R. tetraphylla</i> en CDCl <sub>3</sub> .	23
<b>Figura 16.</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) del extracto diclorometánico de hojas de <i>R. tetraphylla</i> en CDCl <sub>3</sub> .	24
<b>Figura 17.</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) del extracto diclorometánico de frutos de <i>R. tetraphylla</i> en CDCl <sub>3</sub> .	25
<b>Figura 18.</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) del extracto de acetato de etilo de hojas de <i>R. tetraphylla</i> en CDCl <sub>3</sub> .	26
<b>Figura 19.</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) del extracto metanólico de hojas de <i>R. tetraphylla</i> en CD <sub>3</sub> OD.	26
<b>Figura 20.</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz) del lupeol en CDCl <sub>3</sub> .	28
<b>Figura 21.</b>	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz) del lupeol en CDCl <sub>3</sub> .	29

<b>Figura 22</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) del ácido betulínico en DMSO- $d_6$ .	31
<b>Figura 23.</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz) del ácido betulínico en DMSO- $d_6$ .	32
<b>Figura 24.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) de la mezcla $\beta$ -sitosterol–estigmasterol en $\text{CDCl}_3$ .	34
<b>Figura 25.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) del $3\beta$ -(2-clorocinamoiloxi)-lup-20(29)-eno en $\text{CDCl}_3$ ( <b>11</b> ).	36
<b>Figura 26.</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz) del $3\beta$ -(2-clorocinamoiloxi)-lup 20(29)-eno en $\text{CDCl}_3$ ( <b>11</b> ).	37
<b>Figura 27.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) del $3\beta$ -(4-fluorocinamoiloxi)-lup-20(29)-eno $\text{CDCl}_3$ ( <b>12</b> ).	39
<b>Figura 28.</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz) del $3\beta$ -(4-fluorocinamoiloxi)-lup-20(29)-eno $\text{CDCl}_3$ ( <b>12</b> ).	40
<b>Figura 29.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) del $3\beta$ -(benzofuran-2-carbonil)-lup-20(29)-eno en $\text{CDCl}_3$ ( <b>13</b> ).	42
<b>Figura 30.</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz) del $3\beta$ -(benzofuran-2-carbonil)-lup-20(29)-eno en $\text{CDCl}_3$ ( <b>13</b> ).	43
<b>Figura 31.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) del $3\beta$ -hidroxilup-20(29)-enoato de 2-( <i>tert</i> -butilamino)-2-oxoetilo en $\text{CDCl}_3$ ( <b>14</b> ).	46
<b>Figura 32.</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz) del $3\beta$ -hidroxilup-20(29)-enoato de 2-( <i>tert</i> -butilamino)-2-oxoetilo en $\text{CDCl}_3$ ( <b>14</b> ).	47
<b>Figura 33.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) del $3\beta$ -hidroxilup-20(29)-enoato de 2-(ciclohexilamino)-2-oxoetilo en $\text{CDCl}_3$ ( <b>15</b> ).	49
<b>Figura 34.</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (400 MHz) del $3\beta$ -hidroxilup-20(29)-enoato de 2-(ciclohexilamino)-2-oxoetilo en $\text{CDCl}_3$ ( <b>15</b> ).	50
<b>Figura 35.</b>	Identificación taxónomica de <i>R. tetraphylla</i> .	52

### III. SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.

°C	Grados Celsius
b.v.	baño de vapor
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
DCM	Diclorometano
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
g	Gramo
h	Hora
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMC	Reacciones multicomponentes
RMN	Resonancia magnética nuclear
t.a.	Temperatura ambiente.

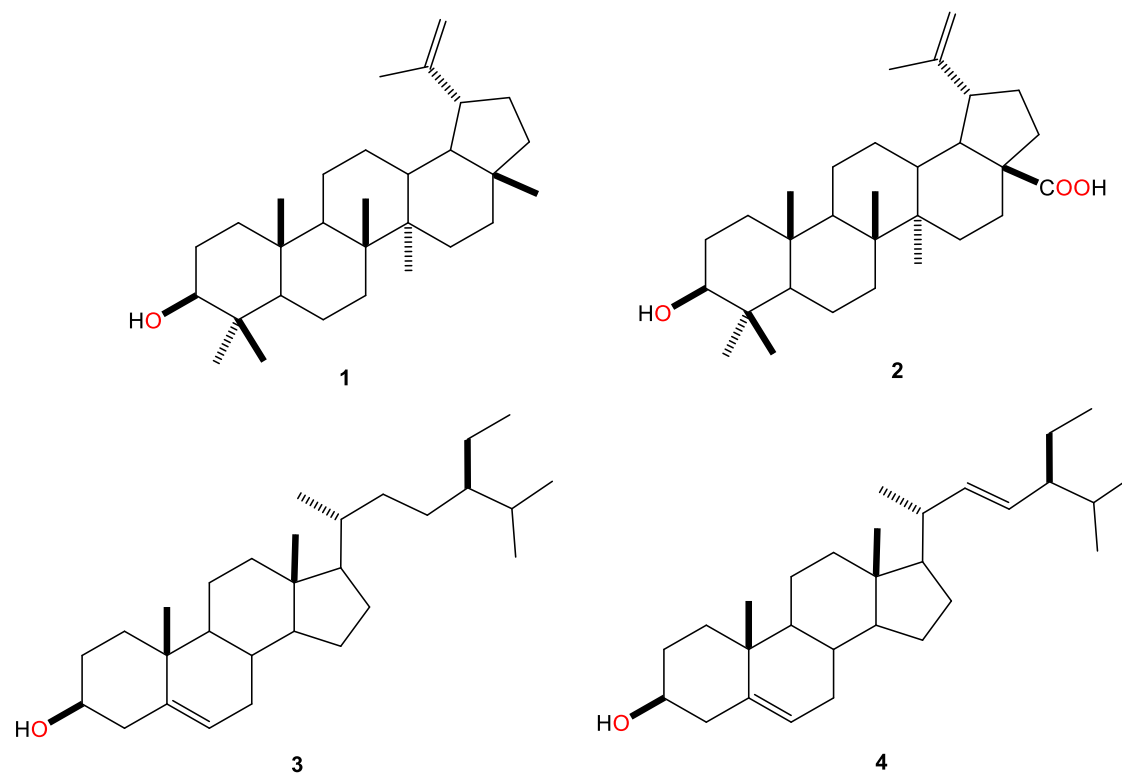
## IV. RESUMEN

De las hojas, tallos y frutos de *Rauvolfia tetraphylla* se prepararon los extractos hexánicos de los cuales se obtuvieron el lupeol (**1**), ácido betulínico (**2**),  $\beta$ -sitosterol (**3**) y estigmasterol (**4**), siendo **1** el componente mayoritario mientras que **3** y **4** se encontraron en forma de mezcla.

Además, se obtuvieron los extractos de diclorometano, acetato de etilo y metanol encontrado **3** y **4** como componentes principales.

Utilizando **1** como materia prima se prepararon los ésteres **11-13**.

Finalmente empleando **4** como componente ácido de la reacción multicomponentes de Passerini se obtuvieron los derivados semisintéticos **14** y **15** utilizando como reactivos el *t*-butilisonitrilo y el ciclohexilisonitrilo, empleando el formaldehído para ambos casos. Las estructuras 11-13 fueron asignadas mediante análisis espectroscópicos, particularmente mediante espectroscopia de RMN 1D y 2D.



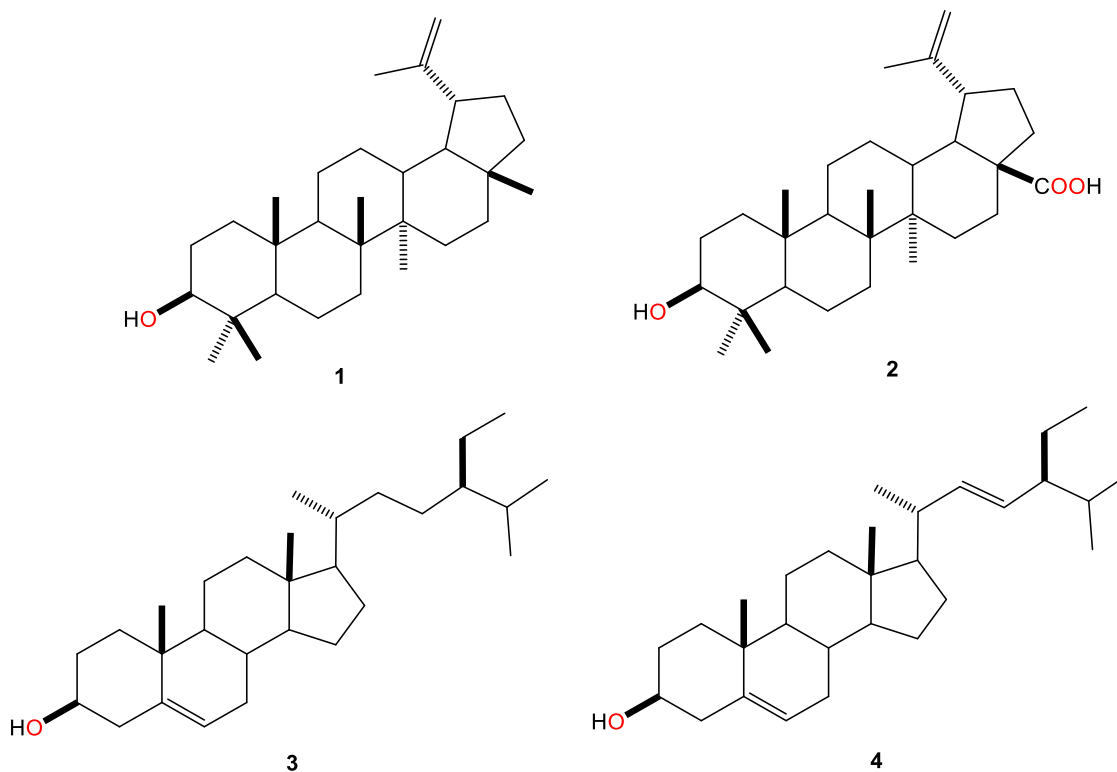
**Palabras clave:** Apocynaceae, *Rauvolfia tetraphylla*, producto natural, triterpeno, esterificación, RMC.

## V. ABSTRACT

Hexane extracts of the leaves, stems and fruits of *Rauvolfia tetraphylla*, afforded four known triterpenes: lupeol (**1**), betulinic acid (**2**)  $\beta$ -sitosterol (**3**) and stigmasterol (**4**). Triterpene **1** as main compound while **3** and **4** were found in 1:1 mixture.

Furthermore, the dichloromethane, ethyl acetate and methanol extracts provided **3** and **4** as main compounds.

Esters **11-13** were obtained using **1** as starting material. In addition, compound **2** was used as acid component of Passerini Multicomponent Reaction to give two semisynthetic derivatives (**14** and **15**) employing formaldehyde and *t*-isocyanide or cyclohexylisocyanide as reactants in one pot reaction. The structures and stereochemistry of **11-15** were established by spectroscopic analyses, particularly by 1D and 2D NMR spectra.



**Keywords:** Apocynaceae, *Rauvolfia tetraphylla*, natural product, triterpene, esterification, MCR.

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos ancestrales, el ser humano ha buscado una fuente de sanación para sus enfermedades en la naturaleza. Los comienzos de esta búsqueda comenzaron siendo por medio del instinto como en el caso de algunos animales, con lo cual, la falta de conocimiento sobre sus padecimientos, así como de las propiedades farmacológicas de las plantas fueron evolucionando con base en la experiencia convirtiéndose con el tiempo en un valioso cimiento para la terapéutica y medicina moderna.<sup>1,2</sup>

La evidencia escrita más antigua que se conoce se encontró en losas de arcilla sumerias de Nagpur hace aproximadamente 5000 años, en la cual se encuentran doce recetas para la preparación de remedios con más de 250 plantas.<sup>3</sup>

El libro chino sobre hierbas y raíces “Pén Ts’ao”, escrito por el emperador Shen Nung aproximadamente en el año 2500 a.C., se encuentran 350 remedios basados en partes secas de plantas medicinales, muchas de las cuales siguen siendo usadas hoy en día tales como *Rhei rhizoma* (raíces), *Theae folium* (infusiones) de ginseng, canela, y sustancias como el alcanfor entre otras.<sup>4,5</sup>

La sabiduría de la medicina tradicional ha estimulado el estudio de las propiedades curativas de las plantas como una importante fuente para la obtención de medicinas para la cura de enfermedades emergentes y aquellas que se han vuelto resistentes a tratamientos convencionales.<sup>6</sup>

A partir del siglo XX comenzó a investigarse la causa de los efectos terapéuticos de las plantas, surgiendo la idea de las interacciones de sustancias con macromoléculas biológicas presentes en los organismos vivos, esto condujo a la conclusión de que compuestos químicos individuales en los extractos de remedios usados tradicionalmente eran los responsables de los efectos farmacológicos en los seres humanos, revolucionando la exploración y elucidación de dichas moléculas biológicamente activas y el impulso de la industria farmacéutica a partir de productos naturales.<sup>2,6</sup>



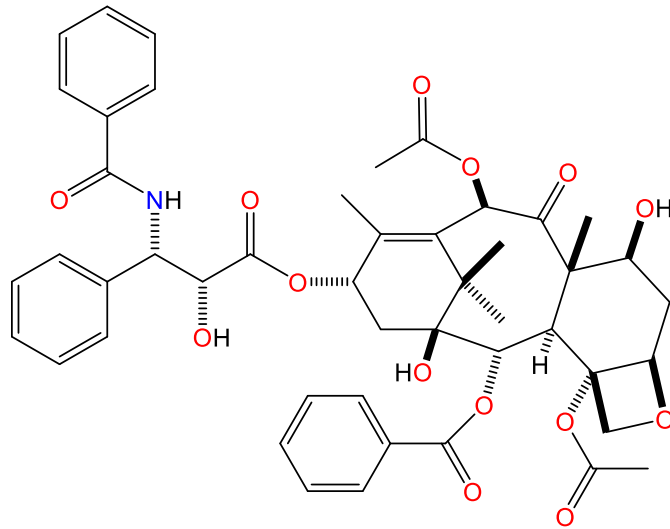
## 1.1 Producto natural

Se considera un producto natural a los compuestos de origen orgánico e inorgánico que puede encontrarse en la naturaleza. Aquellos producidos por sistemas biológicos como plantas, bacterias, hongos y algunos animales poseen un interés particular debido a sus importantes beneficios para el ser humano como fuente nutricional y otros por sus propiedades curativas entre las más importantes.

Las plantas constituyen la fuente más rica de productos naturales, estas elaboran en su metabolismo una serie de sustancias que van a tener un diferente interés en función de su utilidad, aunque ningún compuesto sintetizado por los vegetales será indiferente para su estudio científico.<sup>7</sup>

Dichos compuestos se pueden dividir en tres amplias categorías: primeramente, se encuentran aquellos que desempeñan un papel central en el metabolismo y reproducción celular conocidos como metabolitos primarios en los que se incluyen ácidos nucleicos, aminoácidos y glúcidos. En segundo lugar, se hallan materiales poliméricos de alto peso molecular que proporcionan estructura celular y soporte como ligninas, celulosa y proteínas. Finalmente se encuentran los metabolitos secundarios los cuales cumplen funciones no esenciales en los organismos, sirven como defensa, y son característicos en un rango limitado de especies tanto vegetales como animales, además de ser de gran interés debido a su variado efecto biológico en organismos diferentes a los que los producen.<sup>8</sup>

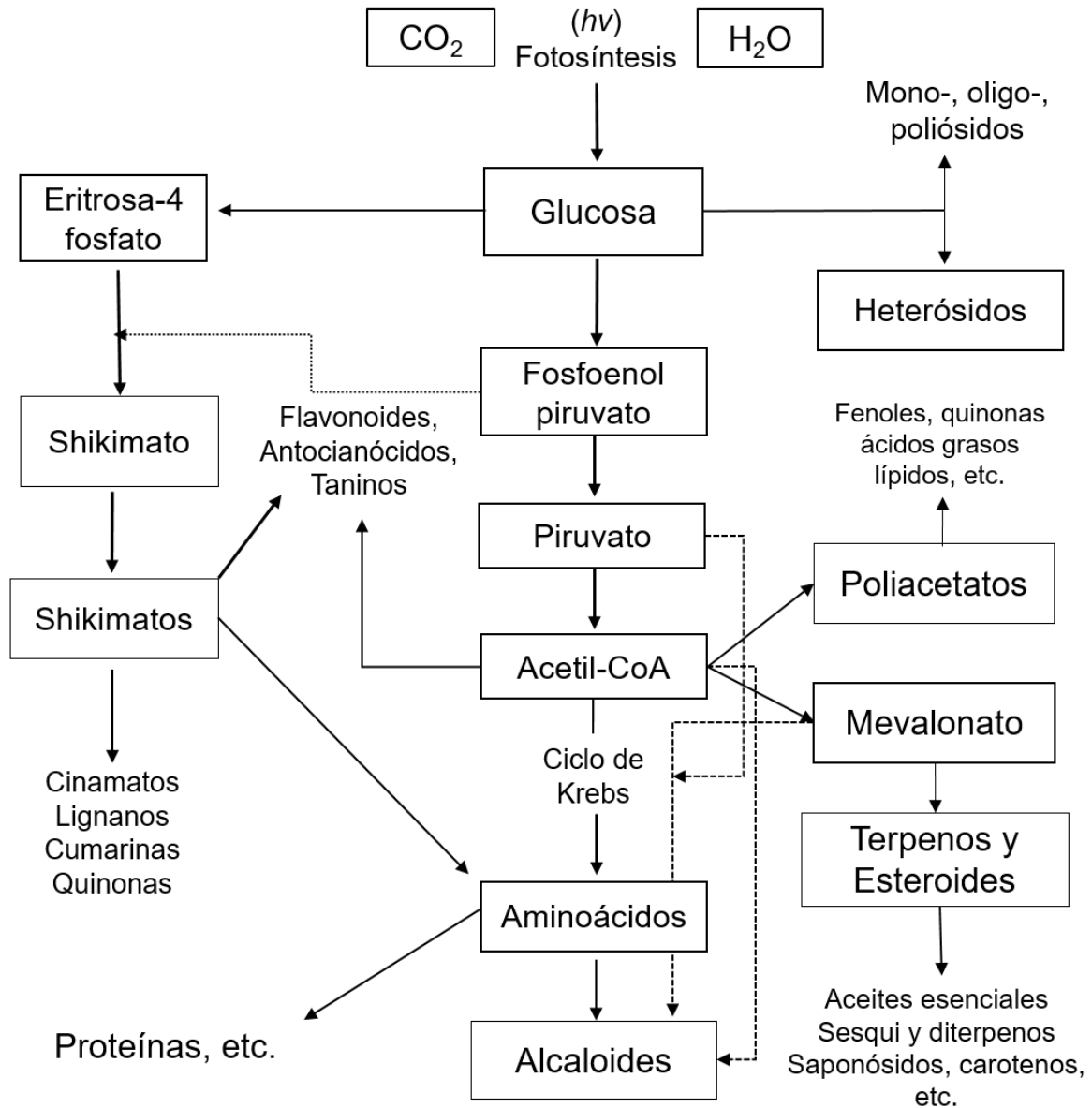
Los metabolitos secundarios, presentan una estructura química perfectamente definida, algunos son fáciles de identificar, mientras que otros, al formar parte de mezclas complejas resultan difíciles de determinar cuáles son los responsables de la actividad biológica específica, entre ellos actúan como mecanismo de defensa para las plantas contra insectos y animales herbívoros y también como atrayentes y feromonas para polinización.<sup>7</sup> Se considera que más del 40% de las medicinas actuales han sido desarrollados a partir de estos productos naturales. Un ejemplo es el taxol usado para el tratamiento de algunos tipos de cáncer (figura 1).<sup>8</sup>



**Figura 1.** Estructura química del Taxol.

Los metabolitos secundarios son muy variados estructuralmente, estos dependen de las rutas biosintéticas que son características de cada familia del reino vegetal (figura 2) y se agrupan en tres categorías principales:

- Terpenos y esteroides,
- Compuestos fenólicos,
- Alcaloides.<sup>9</sup>

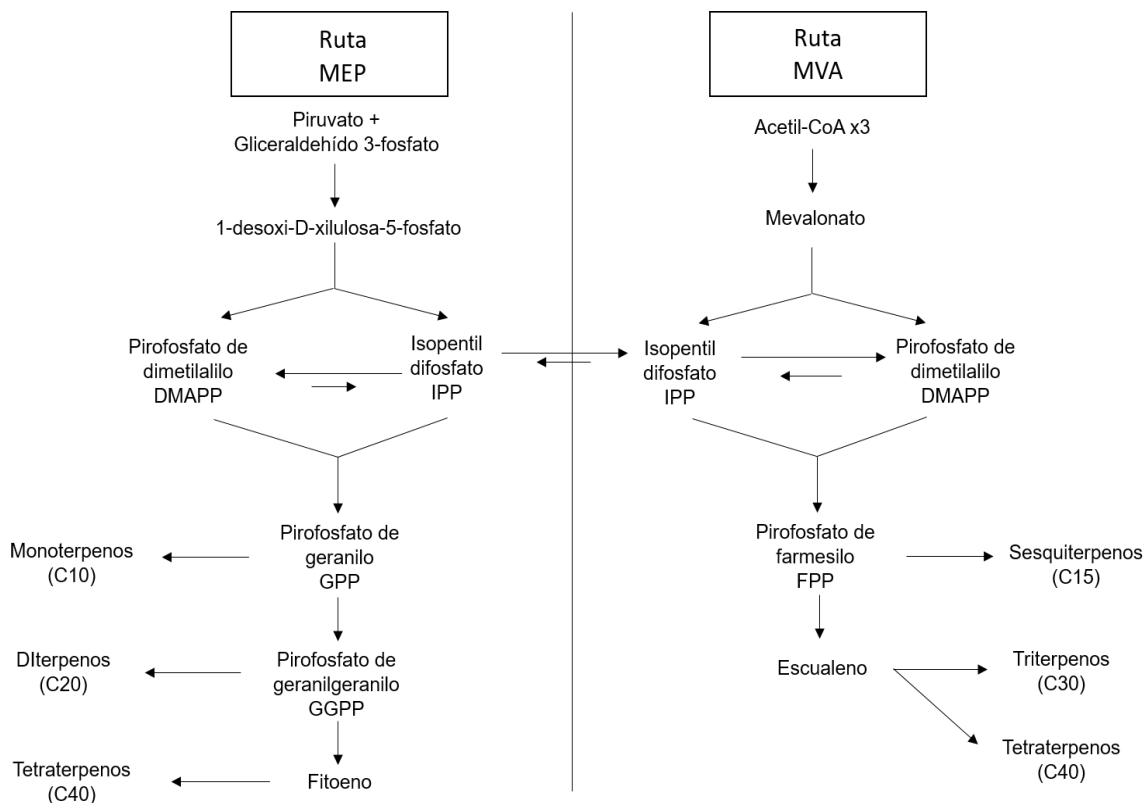


**Figura 2.** Esquema de las principales rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios.

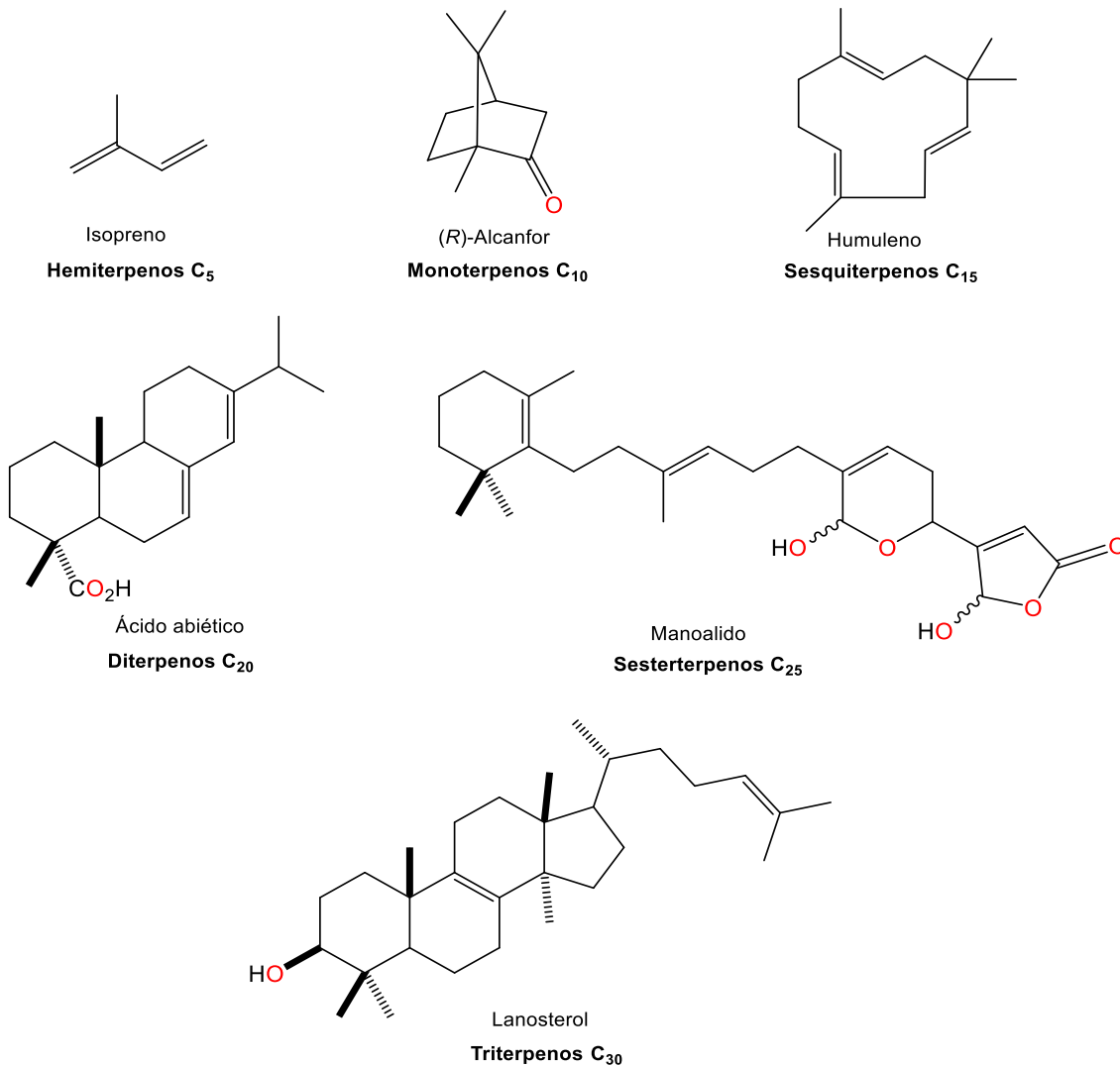
## 1.2. Terpenos

Se trata del grupo más numeroso y diverso estructuralmente dentro de los metabolitos secundarios, se consideran más de 40,000 moléculas que derivan de la condensación de unidades variables de isopreno, a su vez son sintetizadas por dos rutas metabólicas: la vía del mevalonato (MVA) y la del metileritrol fosfato (MEP) (figura 3). Aunque la mayoría de los terpenos conocidos pertenecen al reino vegetal, también se pueden encontrar en algunas especies de animales, algunos ejemplos son las feromonas y hormonas juveniles sesquiterpénicas, diterpenos de organismos marinos (Celentéreos, Espongiarios).<sup>7</sup>

Los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C<sub>5</sub>) que forman. Sus esqueletos se ejemplifican en la figura 4. Muchos de los terpenos poseen estructuras cíclicas, la mayoría de ciclaciones que ocurren en sistemas vivos son vía catálisis ácida.<sup>8</sup>



**Figura 3.** Esquema de la biosíntesis de terpenos.



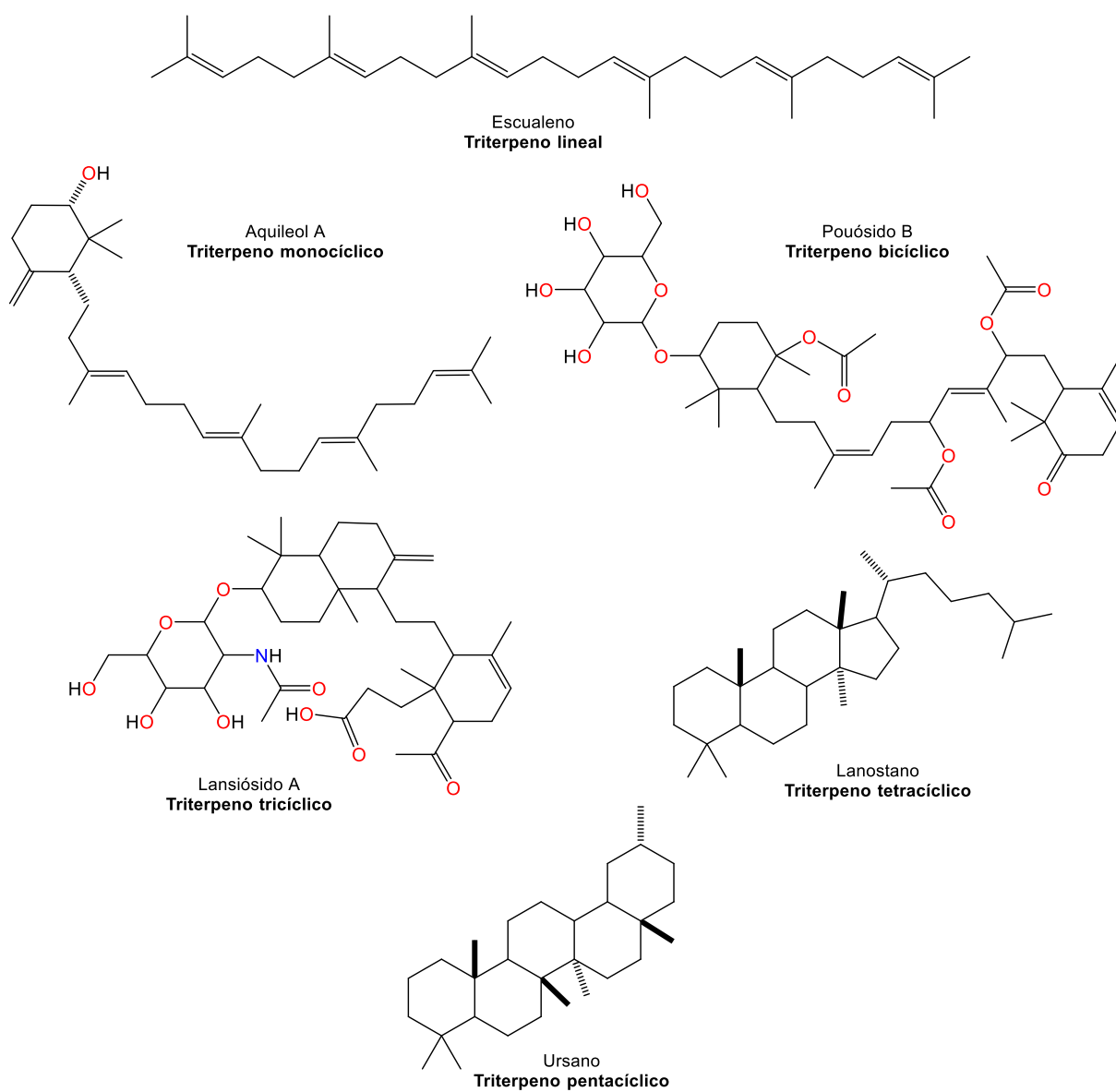
**Figura 4.** Ejemplos de terpenos.

### 1.2.1. Triterpenos

Son sustancias ubicuas ampliamente distribuidas en el reino vegetal y comparten bastante analogía con los esteroides ya que provienen de la misma ruta biosintética. Se trata de compuestos de treinta átomos de carbono producidos a partir de la ciclación del escualeno por la vía del mevalonato. Además, poseen rasgos estructurales y funcionales semejantes a los de los terpenos más elementales, poseen un esqueleto policíclico formado a partir de la condensación de isopreno activo con un bajo grado de insaturación, aunque también se han encontrado anillos con

características aromáticas en casos excepcionales como los friedelanos de algunas especies vegetales documentadas.<sup>7,9</sup>

Los triterpenos se clasifican en lineales y cíclicos; estos últimos se subclasifican con base en el número de anillos que conforman su esqueleto base como se ejemplifican en la figura 5.<sup>10</sup>



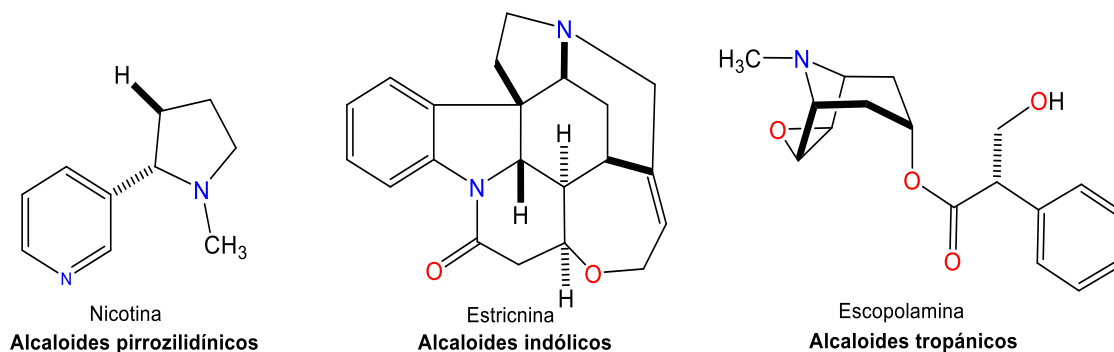
**Figura 5.** Clasificación y ejemplos de triterpenos.

### 1.3. Alcaloides

Se trata de un amplio grupo de metabolitos secundarios encontrados en la naturaleza sobre todo en el reino vegetal, aunque también en algunas especies animales. El número descrito, su diversidad estructural y el abanico de propiedades farmacológicas que poseen hacen de los alcaloides uno de los grupos más importantes dentro de las sustancias de origen vegetal con interés terapéutico.<sup>9</sup>

El término alcaloide fue introducido a principios del siglo XIX por W. Meisner para designar a aquellas sustancias naturales que reaccionan como bases al igual que los álcalis. Si bien no existe una manera clara y concisa de definirlos, se puede afirmar que sí existen características generales, dentro de ellas están el ser un grupo heterogéneo de principios activos de origen natural encontrados en vegetales principalmente, y algunos animales, de estructuras generalmente complejas formadas por carbono, hidrógeno y nitrógeno, el cual, en la mayoría de los casos asociados a un anillo heterocíclico, además de la presencia de oxígeno en casi todas las estructuras. Son de carácter básico, su biosíntesis generalmente es a partir de aminoácidos, y muy frecuentemente provistos de una gran actividad farmacológica y toxicológica.<sup>7,9</sup>

Generalmente se sintetizan a partir de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, triptófano, tirosina, arginina y ornitina. Según su esqueleto se pueden clasificar como indólicos, trópanicos, pirrolizidínicos, quinolizidínicos, quinolénicos, isoquinolénicos, piperidínicos, etc. (figura 6).<sup>7</sup>



**Figura 6.** Clasificación y ejemplos de algunos alcaloides.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Familia Apocynaceae

La familia Apocynaceae s.l. consiste en aproximadamente 424 géneros con cerca de 35 000 especies. La distribución es global pero la mayoría de las especies se encuentran principalmente en climas tropicales o subtropicales, raramente en climas templados. Las variedades representativas de esta familia son lianas, hierbas, arbustos, arboles pequeños a grandes o plantas reófitas. Algunas tienen apariencia de ser comestibles mientras que otras no. Sus flores son comúnmente llamativas, bisexuales y actinomorfas o bastante parecidas. Miembros de la familia producen látex, iridoides (precursores de alcaloides indolterpénicos), cardioglucósidos, y varios alcaloides (notablemente indol y grupos esteroides), en ocasiones cianogénicos y raramente saponíferos. Ciertos géneros son de importancia económica, por ejemplo, como fuente natural de caucho (*Mascarenhasia* A. DC.), látex (*Landolphia* P. Beauv.), fármacos tales como cardioglucósidos (*Acokanthera* G. Don), ouabaína y cimarina (*Strophantus* DC.), y los alcaloides reserpina y rescinnamina (*Rauvolfia* L.).

En la opinión de algunos investigadores, una familia Apocynaceae s.l. unificada (incluyendo Asclepiadaceae) refleja mejor la filogenia del grupo. Se propuso una clasificación unificada basada en la naturaleza morfológica complementada con resultados moleculares. Su clasificación consiste de 424 géneros distribuidos entre cinco subfamilias: Rauvolfioideae, Apocynoideae, Periplocoidae, Secamonoideae y Asclepiadoideae.<sup>11</sup>



## 2.2. Género *Rauvolfia*

El género *Rauvolfia* consiste de aproximadamente mil especies; son plantas arbustivas o árboles pequeños de hojas perennes pertenecientes a la familia *Apocynaceae*.<sup>12</sup>

Se encuentra principalmente distribuido en América, África, Asia y Oceanía tanto en el hemisferio norte, así como en el sur, predominando en las regiones de clima tropical y subtropical (figura 7).

Las especies de *Rauvolfia* son de gran importancia debido a su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades como demencia, picadura de escorpión, purgante, edema, antihelmíntico, dolores reumáticos, antitusivo, antidiarreico y otras enfermedades intestinales.<sup>13</sup>



**Figura 7.** Distribución geográfica del género *Rauvolfia* en el planeta.

Es un importante género de la familia *Apocynaceae*, tiene una posición única como fuente de alcaloides terapéuticamente importantes, este hecho fue señalado por primera vez por Greshoff en 1890.<sup>13</sup> El descubrimiento del género data del siglo XVI y desde entonces más de 130 especies de *Rauvolfia* han sido descritas las cuales

se encuentran en la mayoría de regiones tropicales y subtropicales tanto del hemisferio norte como del sur. En 1703 Charles Plumier nombró al género *Rauvolfia* en honor a Rauwolf Leonhard (1535-1596), un botánico alemán por su investigación de la planta como un fármaco potencial.

Entre las especies de *Rauvolfia*, *R. serpentina* Benth, *R. tetraphylla* Linn, y *R. vomitoria* Afzuelia, tienen una importancia comercial, y actualmente son utilizadas como la mejor fuente de alcaloides antihipertensivos terapéuticamente activos. Las raíces secas de este género han sido utilizadas por siglos para el tratamiento del insomnio y la ansiedad, trastornos psicóticos, demencia, epilepsia y varios padecimientos más.<sup>13</sup>

### **2.2.1. *Rauvolfia tetraphylla***

La especie *Rauvolfia tetraphylla* L. y con frecuencia otras del género son utilizadas ampliamente en los sistemas de medicina tradicional “Ayurvédicos” y “Unani”, así como en diversas preparaciones tradicionales de la mayoría de países asiáticos.<sup>12</sup>

Así mismo, se han empleado en medicina tradicional para tratar casos de demencia, picaduras de escorpión, como purgantes, para edemas, como antihelmínticos, para dolores reumáticos, trastornos psicóticos y enfermedades intestinales, entre otros.

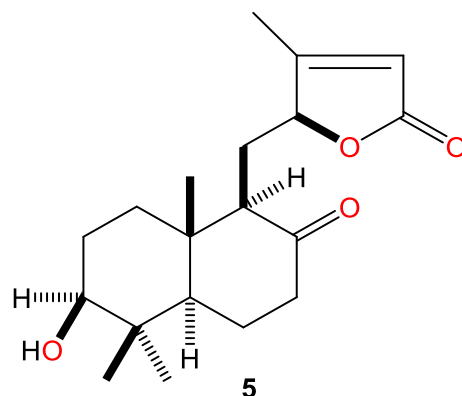
Entre las especies relacionadas, la más importante en términos de aplicaciones farmacéuticas es *Rauvolfia tetraphylla*. Stoll la nombró de esa manera debido a la presencia de cuatro hojas en cada nodo (figura 8), el cual es un rasgo característico de esta especie.<sup>13</sup> *R. tetraphylla* es considerada una rica fuente de distintos tipos de alcaloides importantes tales como la reserpina, deserpidina, reserpilina, raujemidina, isoreserpilina, ajmalina, ajmalicina, yohimbinas, serpentina, tetrafilina, sarpagina y vellosimina. Se ha reportado el uso de extractos de las raíces en el tratamiento de hipertensión, cólera, disentería, fiebre, malaria, como antiinflamatorio y diversos desordenes del sistema nervioso central.<sup>13</sup>



**Figura 8.** Fotografía de la parte aérea de *R. tetraphylla*.

De los estudios sobre la especie *Rauvolfia* más remotos (1988) se describe la detección de un nuevo alcaloide de dos especies de *Rauvolfia*; *R. tetraphylla* L. y *R. cubana* en concreto. Del estudio de las especies vegetales anteriores se aisló un alcaloide tipo sarpagina denominada *N*( $\alpha$ )-demetilaccedina.<sup>14</sup>

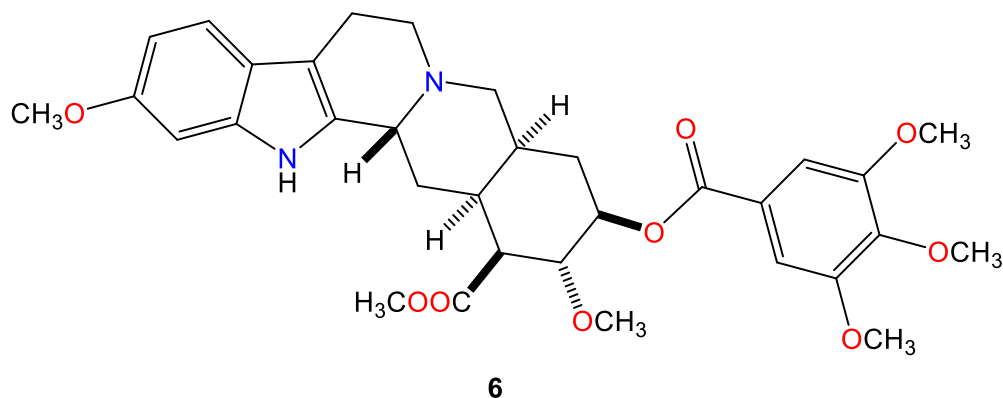
De las hojas, tallos y raíces se han aislado varios metabolitos como azúcares reductores, carbohidratos, alcaloides, aminoácidos, esteroides, taninos, flavonoides, fenoles, saponinas, grasas, gomas y mucilagos. Otros estudios de tallos y ramas de *Rauvolfia tetraphylla* han demostrado la presencia de un labdano diterpénico caracterizado como 3 $\beta$ -hidroxilabda-8(17),13(14)-dien-12(15)-olido (**5**) que se representa en la figura 9.<sup>15</sup>



**Figura 9.** Estructura del 3β-hidroxilabda-8(17),13(14)-dien-12(15)-olido.

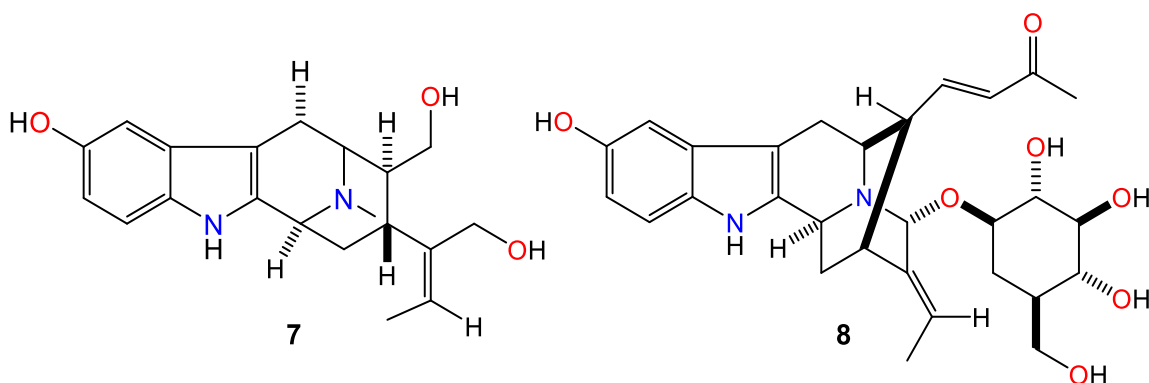
Dicho diterpeno tipo labdano se ha caracterizado en grupos de estudio de la India a partir de las ramas y tallos secados al aire de *R. tetraphylla* reportándolo como un constituyente terpenoide novedoso. En el procedimiento descrito las partes de la planta anteriormente mencionadas se extrajeron en éter de petróleo en equipo Soxhlet a una temperatura entre 60 y 80 °C por cerca de 70 horas.<sup>15</sup>

Un grupo relevante de productos naturales extraídos e identificados son los alcaloides monoterpénicos del indol (MIAs), compuestos terapéuticamente importantes obtenidos de las raíces de especies de *Rauwolfia*. Algunos ejemplos son la yohimbina que ha demostrado ser un agente afrodisíaco, hipotensivo, depresor del sistema cardiovascular e hipnótico y la reserpina (**6**, figura 10), con propiedades antihipertensivas y tranquilizantes. Ambos son fármacos oficialmente incluidas en la Lista Modelo de Medicamentos Esenciales de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Además de estos medicamentos, también se han descrito aproximadamente treinta alcaloides más incluyendo ajmalicina, reserpitina, sarpagina, deserpidina, serpentina, papaverina, raunatina, rauwolcina, reserpilina, resepinina, serpinina, por mencionar solo algunos.<sup>16</sup>



**Figura 10.** Estructura química de la reserpina (**6**).

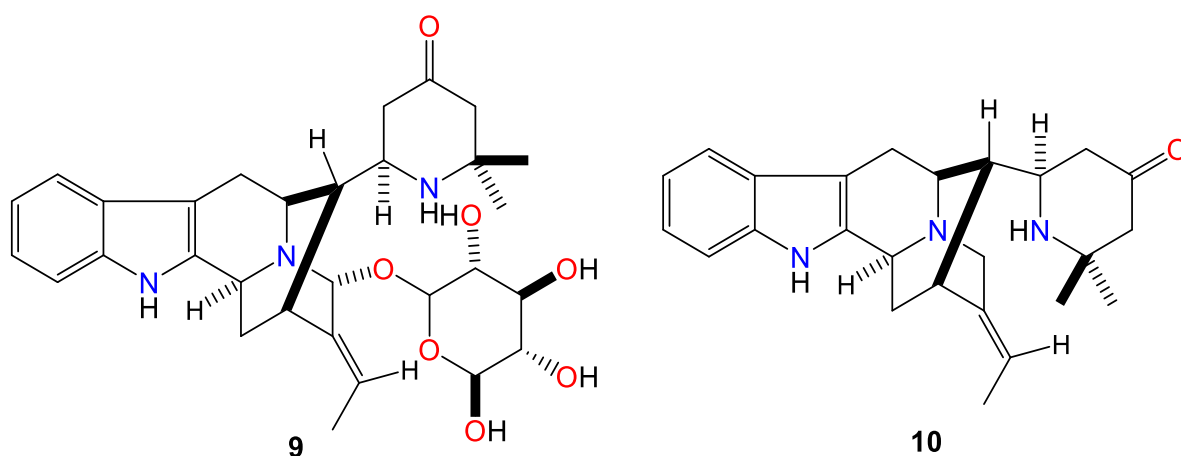
Se ha llevado a cabo un estudio de las partes aéreas de la especie ubicada en China, recolectada en la provincia de Yunnan, brindando una atención particular en los constituyentes monoterpénicos del indol, y como resultado se han aislado cinco nuevos alcaloides catalogados como rauvotetrafillinas A-E, así como ocho análogos conocidos; alstonina, nortetrafilicina, peraksina, sarpagina, 3-hidroxisarpagina, dihidroperaksina, 10-hidroxi dihidroperaksina y raucrafficina.<sup>17</sup> En la figura 11 se muestran estructuras químicas de la rauvotetrafilina A y C.



**Figura 11.** Estructuras químicas de la rauvotetrafilina A (**7**) y C (**8**).

Además de los alcaloides anteriormente descritos, el mismo grupo de investigación ha reportado el aislamiento de cinco alcaloides monoterpénicos de indol más, ampliando así la biblioteca de moléculas de productos naturales. Los anteriores

alcaloides fueron obtenidos de los extractos etanólicos de las partes aéreas de *R. tetraphylla*, estudios posteriores de los componentes restantes han llevado al aislamiento de cinco alcaloides más que poseen una fracción inusual 2,2-dimetil-4-oxopiperidin-6-ilo designadas como raivotetrafilinas F-H, 17-*epi*-raivotetrafilina F y la 21-*epi*-raivotetrafilina H.<sup>18</sup>



**Figura 12.** Estructuras químicas de las raivotetrafilinas F(9) y G (10).

También se han llevado estudios de actividad antibacterial de extractos etanólicos contra especies bacterianas de *Escherichia coli*, *Streptococcus lactis*, *Enterobacter aerogenes*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus vulgaris*. Dichos extractos mostraron mayor actividad contra *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Alcaligenes faecalis*.

Los extractos etanólicos de las hojas de *R. tetraphylla* presentaron actividad antifúngica contra especies de *Fusarium oxysporum*, *Alternaria helianthii*, *Curvularia lunata*, *Aspergillus niger* y *Penicillium* spp, encontrándose que el extracto crudo mostró mayor actividad en comparación con otros extractos para este tipo de hongos.

Otros estudios también han demostrado la actividad antioxidante de los extractos de hexano, cloroformo, acetona y metanol de hojas y frutos de *R. tetraphylla*. Todos los extractos presentaron una buena acción antioxidante en el radical DPPH (2,2-

difenil-1-picrilhidrazilo) en un ensayo de barrido comparado con el ácido ascórbico a diferentes concentraciones.<sup>12</sup>

### **2.3 Actividad biológica del lupeol**

El lupeol (**1**) es un triterpeno pentacíclico. Su fórmula química es C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O, tiene un punto de fusión de 216-217 °C y un peso molecular de 426.717 g/mol.<sup>19</sup>

El lupeol tiene importancia económica y se encuentra en una amplia variedad de plantas, frutas y plantas medicinales como *Glycyrrhiza glabra* (Regaliz), *Cucumis sativus* (Pepino), *Lewisia redivia* (Raíz amarga), *Tamarindus indica* (Tamarindo). Dicho compuesto ha tenido creciente interés debido a varios beneficios para la salud humana (antitumoral, antidiabético y antiinflamatorio).<sup>20,21</sup>

Recientes investigaciones han revelado otras importantes actividades farmacológicas del lupeol. Varios estudios realizados *in vitro* y en estudios preclínicos en animales sugieren que, además de los efectos mencionados anteriormente, tiene potencial como antimicrobiano, antiprotozoario, cardioprotectivo, cicatrizante, para el tratamiento de artritis, nefroprotector y hepatoprotector.<sup>21</sup>

Varios estudios han demostrado que la actividad antiinflamatoria del lupeol a través de la modulación de las rutas p-38 inhiben la neuroinflamación en el cerebelo e inducen neuroprotección.<sup>22</sup> Además, dentro del mecanismo antiinflamatorio también se observa la inhibición del complejo enzimático IκBα inducida por lipopolisacáridos (LPS) en colitis empleando la línea celular epitelial de colon humano COLO 205 y en la línea celular de macrófago murino RAW 264.7, observándose una supresión de las citocinas proinflamatorias y de la actividad en la unión de ADN del factor NF-κB en las células epiteliales del intestino y macrófagos.<sup>23</sup>

Dentro de los efectos anticancerígenos del lupeol encontramos su potencial actividad contra diferentes tipos de cáncer como el de próstata, cáncer de mama, hígado y algunos tipos de leucemias.

Para evaluar la efectividad del lupeol contra el cáncer de mama se empleó una concentración IC<sub>50</sub> de 80 μM en células MCF-7. Tal estudio demostró una acción

eficaz contra el crecimiento celular y un significativo cambio en su viabilidad celular sin provocar toxicidad en células sanas.<sup>24</sup>

También se ha probado el efecto antitumoral del lupeol (0-140 mM) en las líneas de cáncer de colon HCT116 y SW620 (metastásica), este triterpeno también ha mostrado la supresión en la migración mediante la inhibición de la vía del citoesqueleto RohA-ROCK1, disminuyendo su viabilidad y proporcionando una actividad antimetastásica en pacientes con cáncer colorectal (CRC).<sup>25</sup>

#### **2.4 Actividad biológica del ácido betulínico**

El ácido betulínico (**2**, C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>) es un fitoconstituyente presente en frutas, verduras y plantas medicinales. Se trata de un triterpeno pentacíclico tipo lupano que ha mostrado una extensa variedad de efectos farmacológicos y bioquímicos, incluyendo actividad antiinflamatoria y anticancerígena, además se ha demostrado que promueve la función vascular mediante la reducción de formación de triglicéridos en estudios preclínicos con ratones.<sup>26,27</sup>

Diversos estudios han demostrado, además, una actividad en contra del VIH, propiedades antibacterianas, antimaláricas, antihelmínticas y antioxidantes.<sup>28</sup>



### 3. JUSTIFICACIÓN

El género *Rauvolfia* ha sido ampliamente utilizado en la medicina tradicional en diferentes partes del mundo, sin embargo, en el estado de Michoacán ha sido poco estudiado desde el punto de vista químico y de la especie *Rauvolfia tetraphylla* se encuentran pocos estudios químicos descritos. Por lo anterior, resulta relevante llevar a cabo el estudio fitoquímico para contribuir al conocimiento quimiotaxonómico del género y la especie, la cual podría emplearse eventualmente para posibles aplicaciones terapéuticas.

### 4. OBJETIVOS

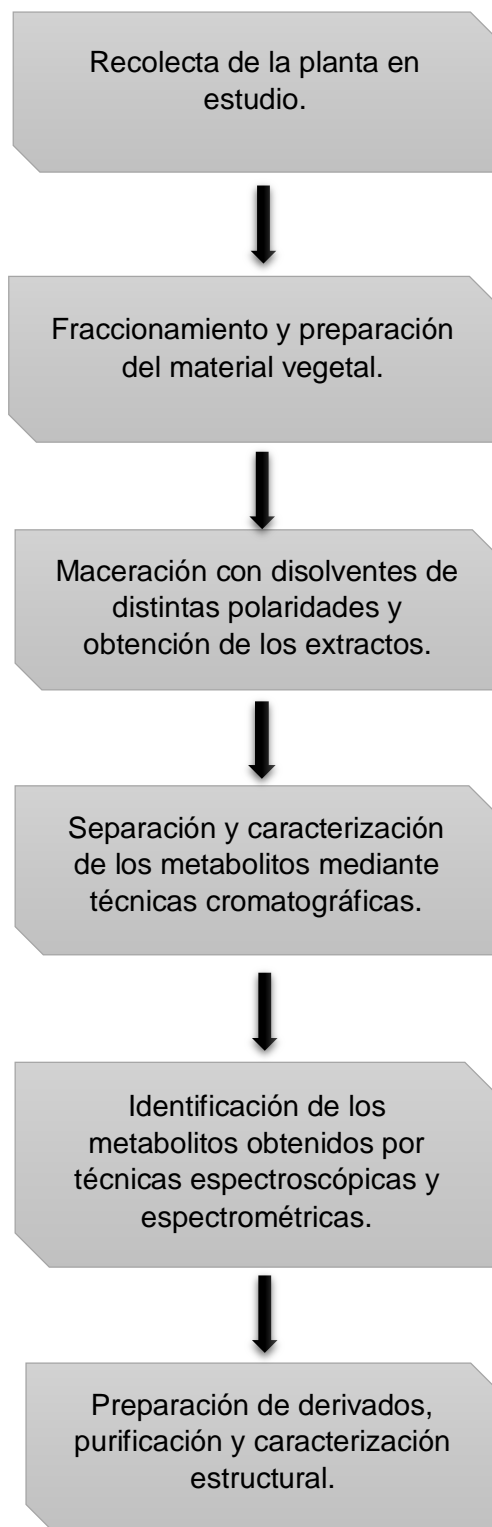
#### 4.1. Objetivo general

Aislar e identificar metabolitos secundarios de *Rauvolfia tetraphylla* y analizar la reactividad química dependiendo de los grupos funcionales que presenten los metabolitos aislados.

#### 4.2. Objetivos específicos

- Obtener por separado los extractos de las distintas partes aéreas y de la raíz de *R. tetraphylla* en orden ascendente de polaridad.
- Determinar las condiciones de aislamiento de metabolitos secundarios por medio de técnicas cromatográficas convencionales.
- Identificar y en caso de ser necesario caracterizar los metabolitos secundarios de *R. tetraphylla* obtenidos mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Conceptualizar y determinar la preparación de derivados de los metabolitos secundarios aislados con base en a la reactividad de los grupos funcionales presentes.

## 5. ESQUEMA METODOLÓGICO



## 6.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Obtención de los extractos

El material vegetal fue separado para someterse a maceración por cuatro días a temperatura ambiente con los disolventes orgánicos hexano, cloruro de metileno (DCM), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH), por triplicado cada parte de la planta.

Se procesó un total de 1668 g de hoja, 364 g de tallos y 105 g de fruto de *R. tetraphylla*. En la tabla 1 se resumen los rendimientos de los extractos obtenidos a partir de los macerados de hojas con disolventes en orden de polaridad ascendente.

**Tabla 1.** Rendimientos de los extractos de hojas obtenidos de *R. tetraphylla*.

<b>Extracto de hojas (1668 g)</b>	<b>Hexánico</b>	<b>Cloruro de metileno</b>	<b>Acetato de etilo</b>	<b>Metanol</b>
1 <sup>er</sup> macerado	13.00 g	12.50 g	15.19 g	37.80 g
2 <sup>do</sup> macerado	4.40 g	4.23 g	7.17 g	15.96 g
3 <sup>er</sup> macerado	2.17 g	2.06 g	4.80 g	12.60 g
<b>Total</b>	<b>19.57 g</b>	<b>18.79 g</b>	<b>27.16 g</b>	<b>66.34 g</b>
Rendimiento (%)	<u>1.17%</u>	<u>1.12%</u>	<u>1.63%</u>	<u>3.98%</u>

En cuanto a los extractos obtenidos a partir de los tallos, se obtuvieron mediante dos macerados y tres refluos los cuales se resumen en la tabla 2.

**Tabla 2.** Rendimientos de los extractos de tallos obtenidos de *R. tetraphylla*.

<b>Extracto de tallos (364 g)</b>	<b>Hexánico</b>	<b>Cloruro de metileno</b>	<b>Acetato de etilo</b>
1er macerado	3.87 g	–	–
2do macerado	2.97 g	–	–
1er reflujo	1.48 g	1.28 g	1.30 g
2do reflujo	1.02 g	0.70 g	0.90 g
3er reflujo	0.49 g	0.32 g	0.72 g
<b>Total</b>	<b>9.83 g</b>	<b>2.30 g</b>	<b>2.92 g</b>
Rendimiento (%)	<u>2.70%</u>	<u>0.63%</u>	<u>0.80%</u>

\*No se obtuvieron los extractos metanólicos.

Los extractos adquiridos a partir de frutos se obtuvieron mediante maceración y se resumen en la tabla 3.

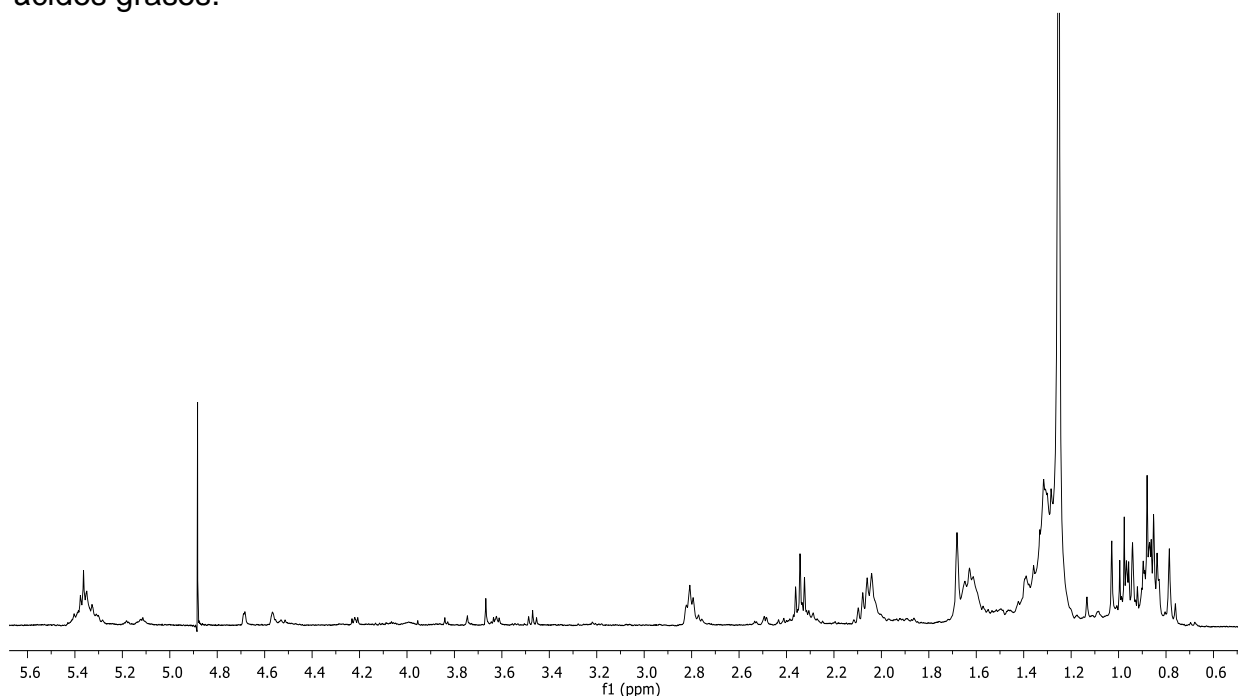
**Tabla 3.** Rendimientos de los extractos de frutos obtenidos de *R. tetraphylla*.

<b>Extracto de frutos (105 g)</b>	<b>Hexánico</b>	<b>Cloruro de metileno</b>	<b>Acetato de etilo</b>	<b>Metanol</b>
1er macerado	0.98 g	1.42 g	2.12 g	0.79 g
2do macerado	0.53 g	0.30 g	1.99 g	0.46 g
3er macerado	0.17 g	0.13 g	1.44 g	0.41 g
<b>Total</b>	<b>1.68 g</b>	<b>1.85 g</b>	<b>5.55 g</b>	<b>1.66 g</b>
Rendimiento (%)	<u>1.60%</u>	<u>1.76%</u>	<u>5.30%</u>	<u>1.58%</u>

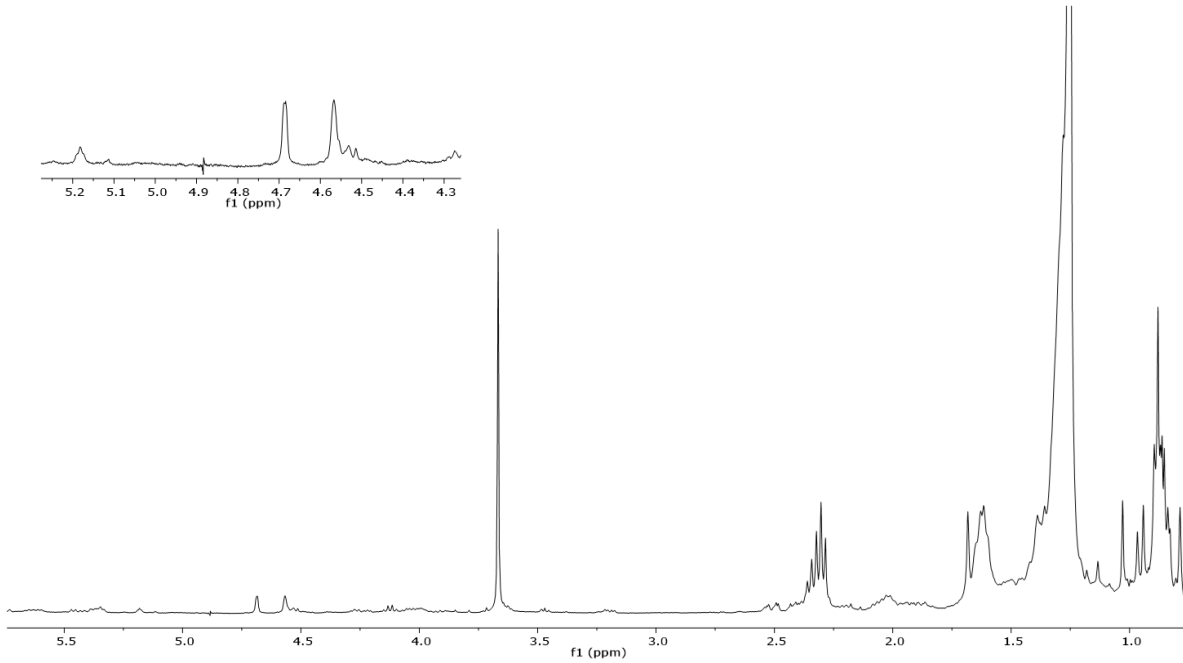
## 6.2. Análisis de los extractos hexánicos de *R. tetraphylla*.

Se tomaron alícuotas de los extractos hexánicos de hojas, tallos y frutos de *R. tetraphylla* para su análisis mediante RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) en  $\text{CDCl}_3$ . Los espectros resultantes se muestran en las figuras 13-15.

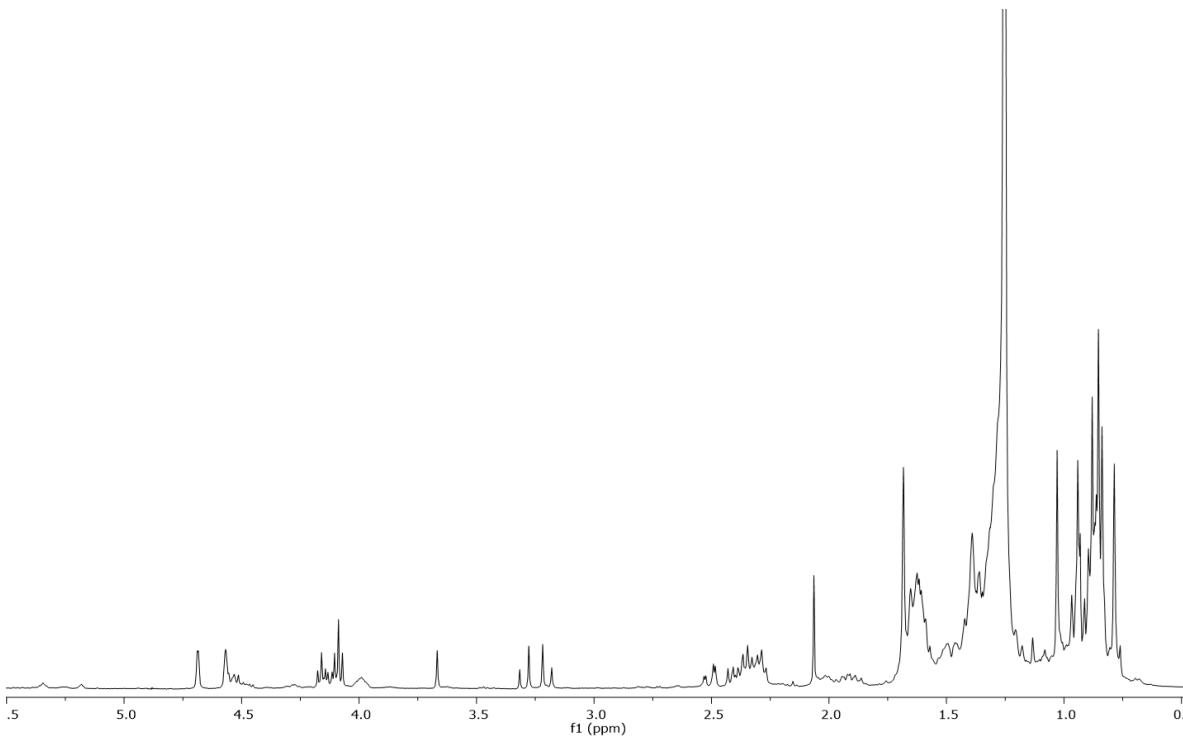
De manera general, los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  correspondientes muestran señales en la región de aromáticos. En la región de protones vinílicos se aprecian una serie de señales que nos indica que en los constituyentes presentes en el crudo poseen insaturaciones. Entre 4.6 y 4.7 ppm se encuentran señales características de triterpenos tipo lupano mientras que alrededor de 3.00 ppm aparece una señal correspondiente a protones base de oxígeno y aproximadamente en 2.25 ppm protones alfa a un grupo carbonilo. A campo alto se observan varias señales simples que corresponden a metilos características de estructuras triterpénicas y señales de ácidos grasos.



**Figura 13.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del extracto hexánico de hojas de *R. tetraphylla* en  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 14.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del extracto hexánico de tallos de *R. tetraphylla* en CDCl<sub>3</sub>.

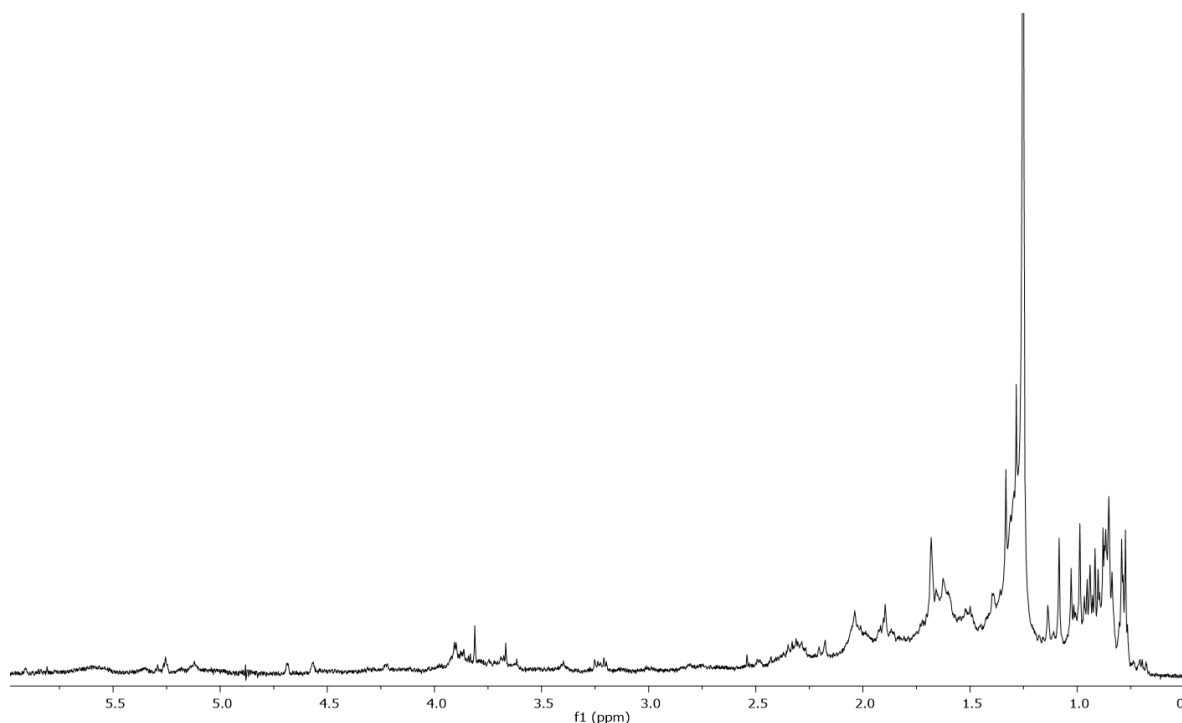


**Figura 15.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del extracto hexánico de frutos de *R. tetraphylla* en CDCl<sub>3</sub>.

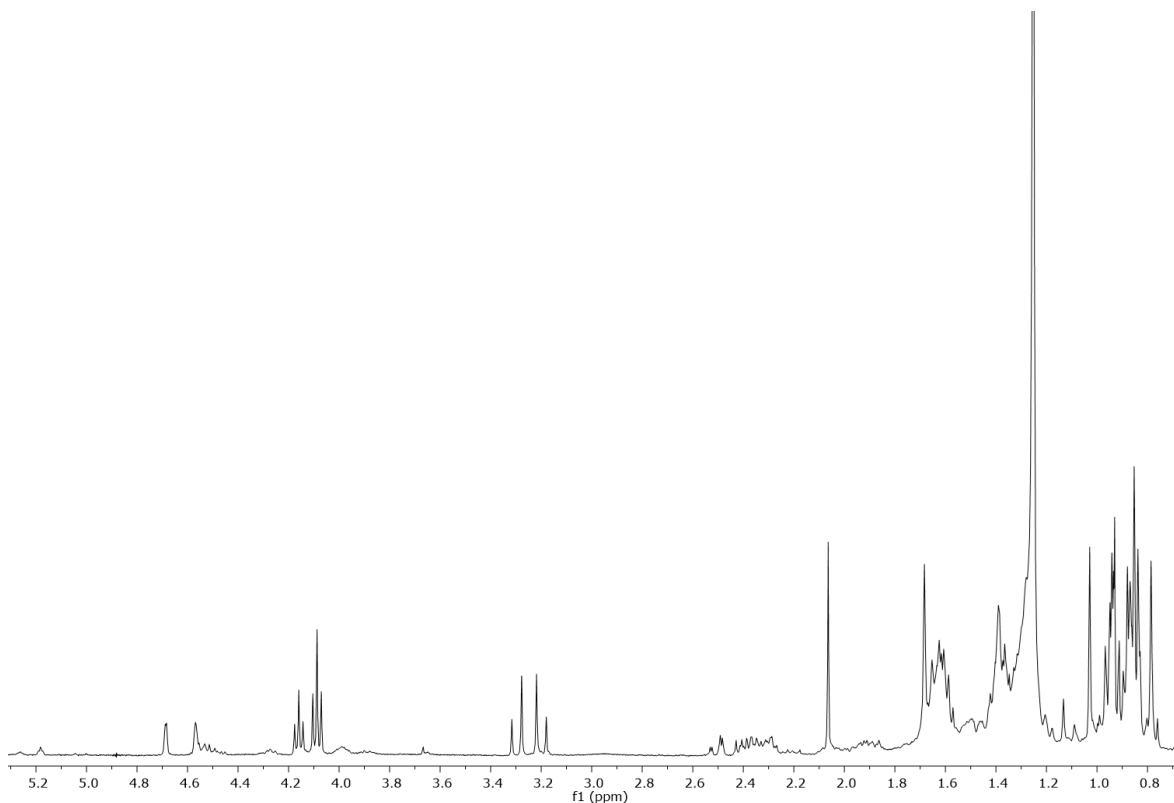
### 6.3. Análisis de los extractos diclorometánicos de *R. tetraphylla*.

Se tomaron alícuotas de los extractos de DCM de hojas y frutos de *R. tetraphylla* para su análisis mediante RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) en  $\text{CDCl}_3$ . Los espectros resultantes se muestran en las figuras 16 y 17.

En los espectros de hojas y frutos se pueden observar las señales entre 4.55 y 4.70 ppm características de hidrógenos de metilenos exocíclicos de triterpenos tipo lupano, así como el conjunto de señales a campo alto propios de los mismos. También se observan señales de hidrógenos base de heteroátomo y algunas señales de alifáticos.



**Figura 16.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del extracto diclorometánico de hojas de *R. tetraphylla*  $\text{CDCl}_3$ .



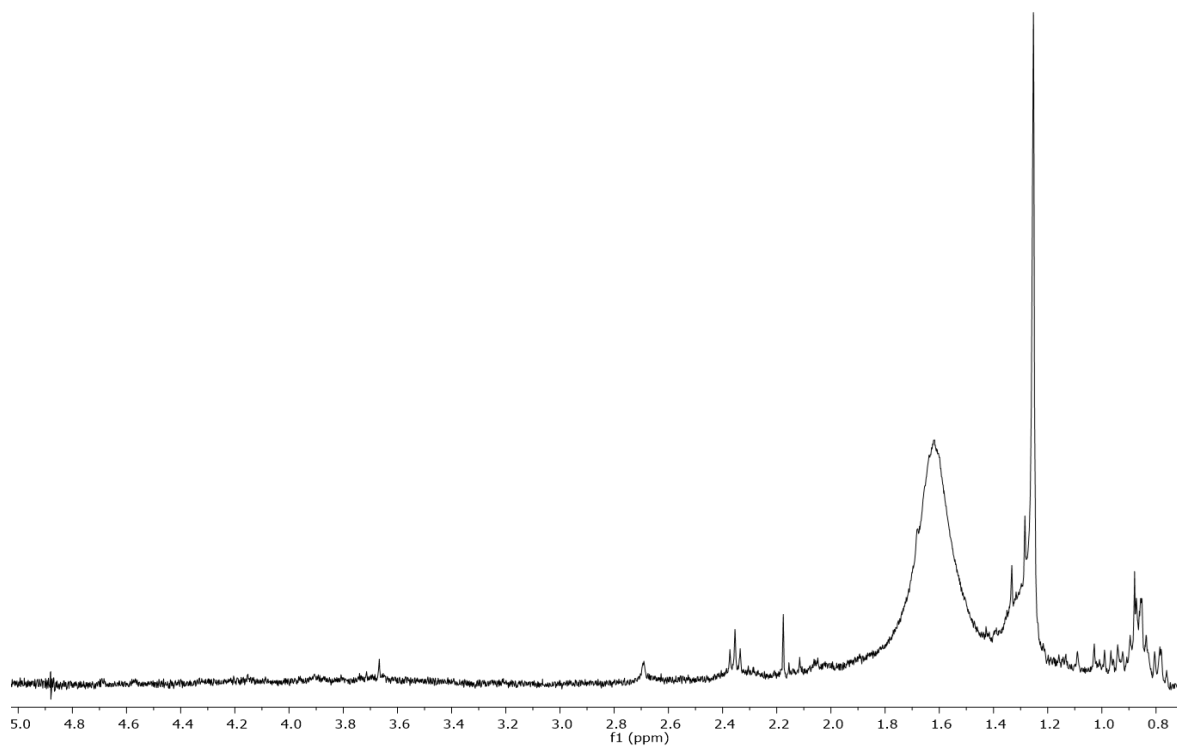
**Figura 17.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del extracto diclorometánico de frutos de *R. tetraphylla*  $\text{CDCl}_3$ .

#### **6.4. Análisis de los extractos de AcOEt y de MeOH de *R. tetraphylla*.**

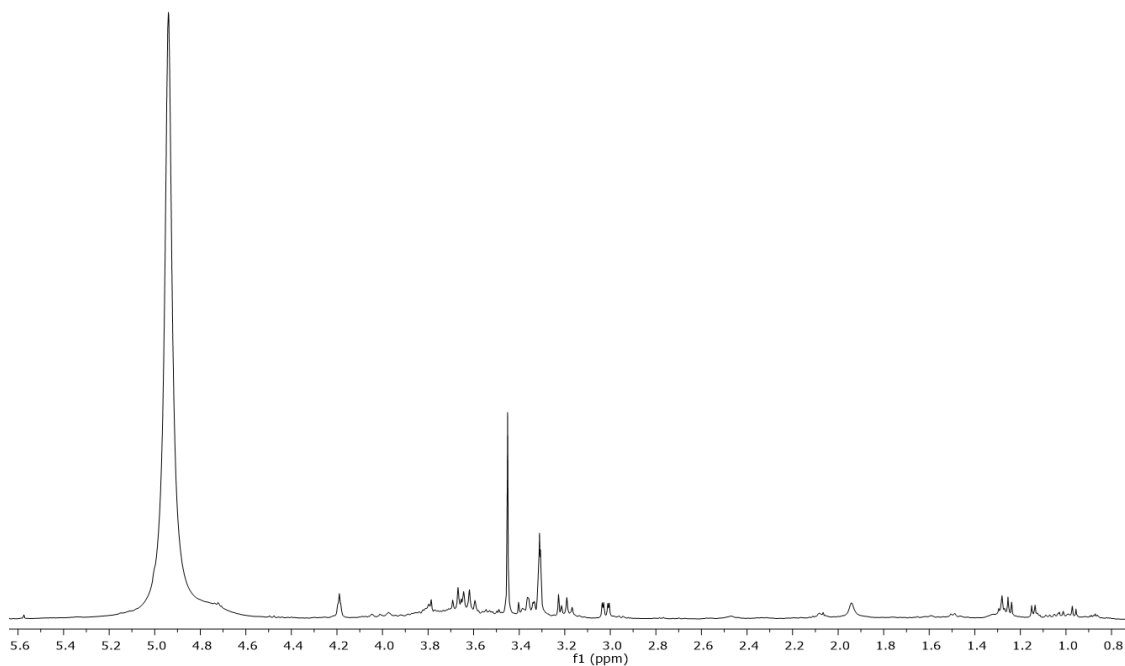
Por último, se tomaron alícuotas de los extractos de acetato de etilo y metanol de las hojas de *R. tetraphylla* para su análisis mediante RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) en  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Los espectros resultantes se muestran en las figuras 18 y 19.

En ambos espectros se observan señales en las regiones de hidrógenos base de heteroátomos, así como de vinílicos y aromáticos característicos de azúcares y también pueden observarse señales de humedad remanente principalmente.





**Figura 18.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del extracto de acetato de etilo de hojas de *R. tetraphylla* en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



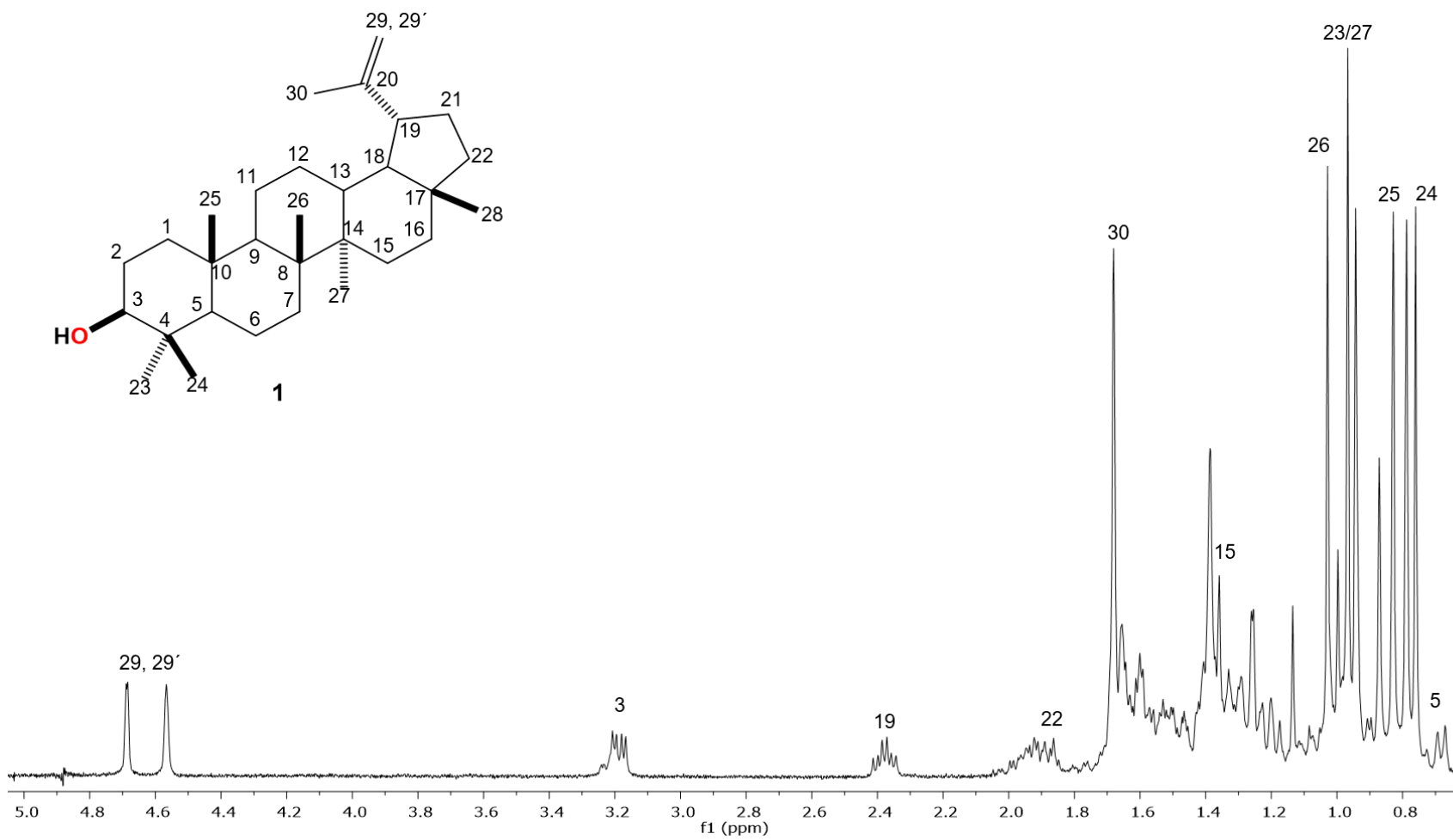
**Figura 19.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del extracto metanólico de hojas de *R. tetraphylla* en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

## 6.5. Obtención del lupeol (1)

El lupeol (**1**) se aisló del extracto hexánico de hojas y frutos de *R. tetraphylla*, entre las polaridades 49:1 y 19:1 de la mezcla hexano-acetato de etilo, como un sólido blanco con p.f. 179-182 °C, soluble en cloruro de metileno y parcialmente soluble en acetona y metanol. El análisis se realizó mediante cromatografía en capa fina y espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H (figura 20), dichos datos fueron comparados con referencias bibliográficas.<sup>29</sup>

Dicho compuesto se obtuvo mediante purificación en columna cromatográfica utilizando gel de sílice de malla 230-400 como fase estacionaria y mezcla de los disolventes hexano-acetato de etilo como fase móvil.

En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **1** se observó en los desplazamientos de 4.70 y 4.59 ppm dos señales simples que corresponden a los hidrógenos del doble enlace H-29 y H-29'. En 2.5 ppm se mostró una señal doble de dobles ( $J = 10.9, 5.4$  Hz) para el hidrógeno base de hidroxilo H-3. En 2.40 ppm una señal múltiple para H-19. En 1.70 ppm se observó una señal simple que integró para tres hidrógenos correspondiente al Me-30. Entre 0.80 y 1.05 ppm se observan señales para metilo y metilenos.



**Figura 20.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del lupeol (**1**) en CDCl<sub>3</sub>.

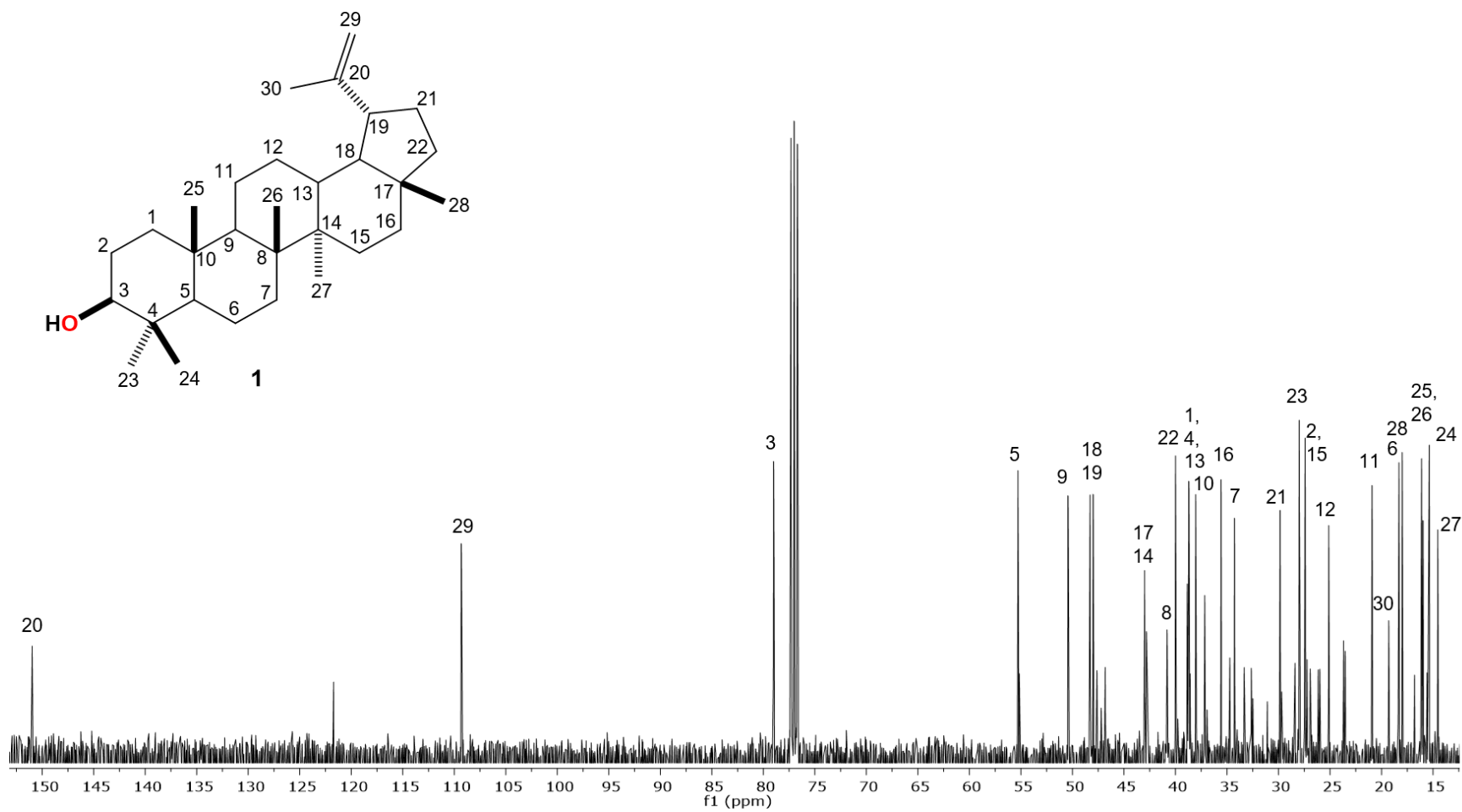


Figura 21. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) del lupeol (1) en  $\text{CDCl}_3$ .

## 6.6. Obtención del ácido betulínico (2)

El ácido betulínico (**2**) se aisló del extracto hexánico de las hojas de *R. tetraphylla*, entre las polaridades 85:15 y 8:2 de la mezcla hexano-acetato de etilo, como un sólido blanco con p.f. 280-283 °C, soluble en cloruro de metileno y parcialmente soluble en acetona y metanol. El análisis se realizó mediante cromatografía en capa fina y espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H (figura 21). Dichos datos fueron comparados con referencias bibliográficas.<sup>29,30</sup>

En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **2** se observó en los desplazamientos de 4.70 y 4.60 ppm dos señales simples que corresponden a los hidrógenos del doble enlace H-29 y H-29'. En 3.19 ppm se mostró una señal doble de dobles ( $J = 10.9, 5.4$  Hz) algo difusas, para el hidrógeno base de hidroxilo H-3. En 3.00 ppm una señal múltiple para H-19. En 1.68 ppm se vio una señal simple que integró para tres hidrógenos correspondiente al Me-30. Igualmente, entre 0.50 y 1.00 ppm se pueden observar las señales de hidrógenos correspondientes a metilos y metilenos.

En el espectro de <sup>13</sup>C se puede observar la señal de carbono de ácido carboxílico C-28 en 177.2 ppm, en 150.3 ppm se encuentra la señal del carbono vínilico disustituído C-20, mientras que en 109.6 ppm se encuentra la señal del metileno C-29. En 76.7 se encuentra el carbono base de hidroxilo y a campo bajo las señales de metilos características de un sistema triterpénico tipo lupano.

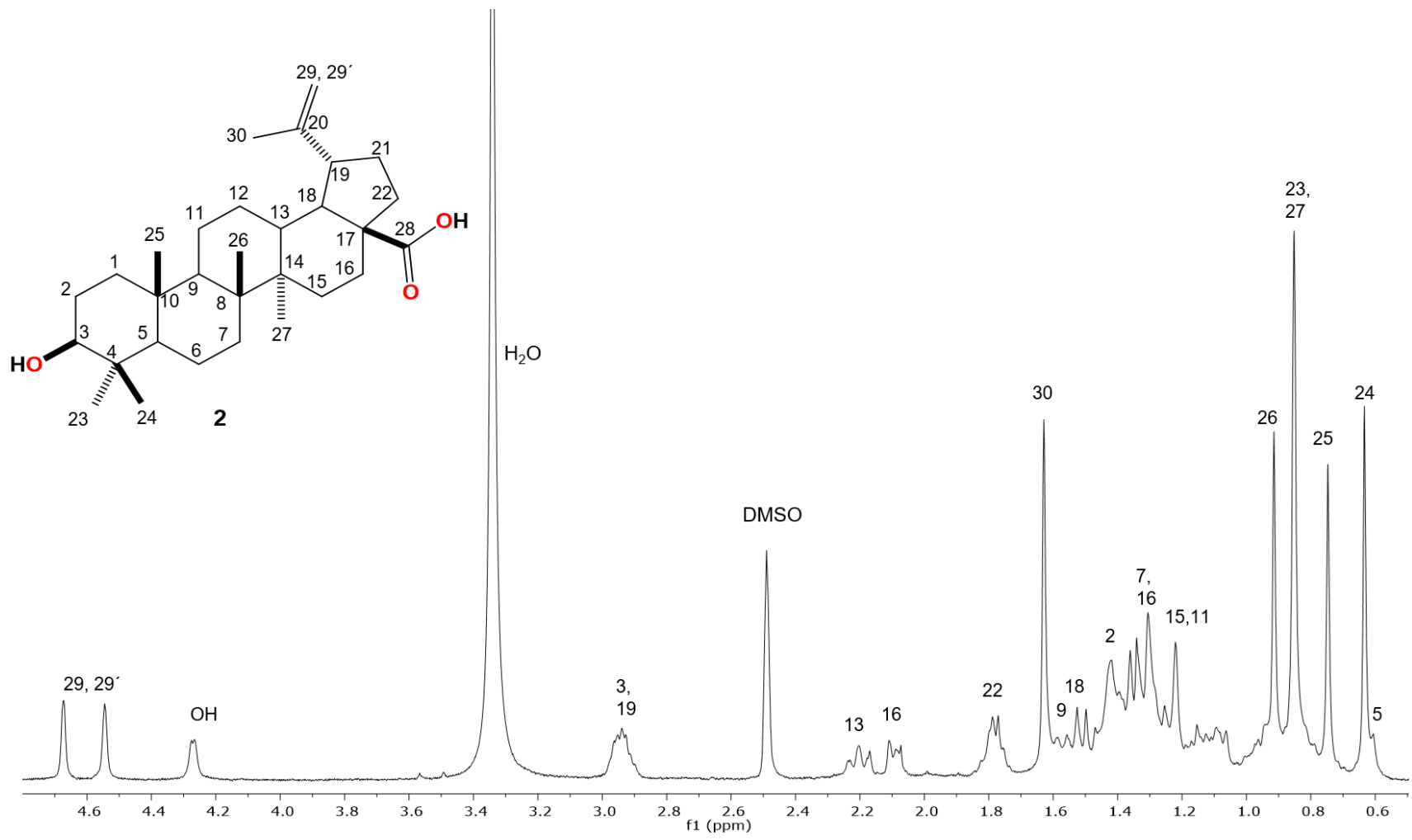
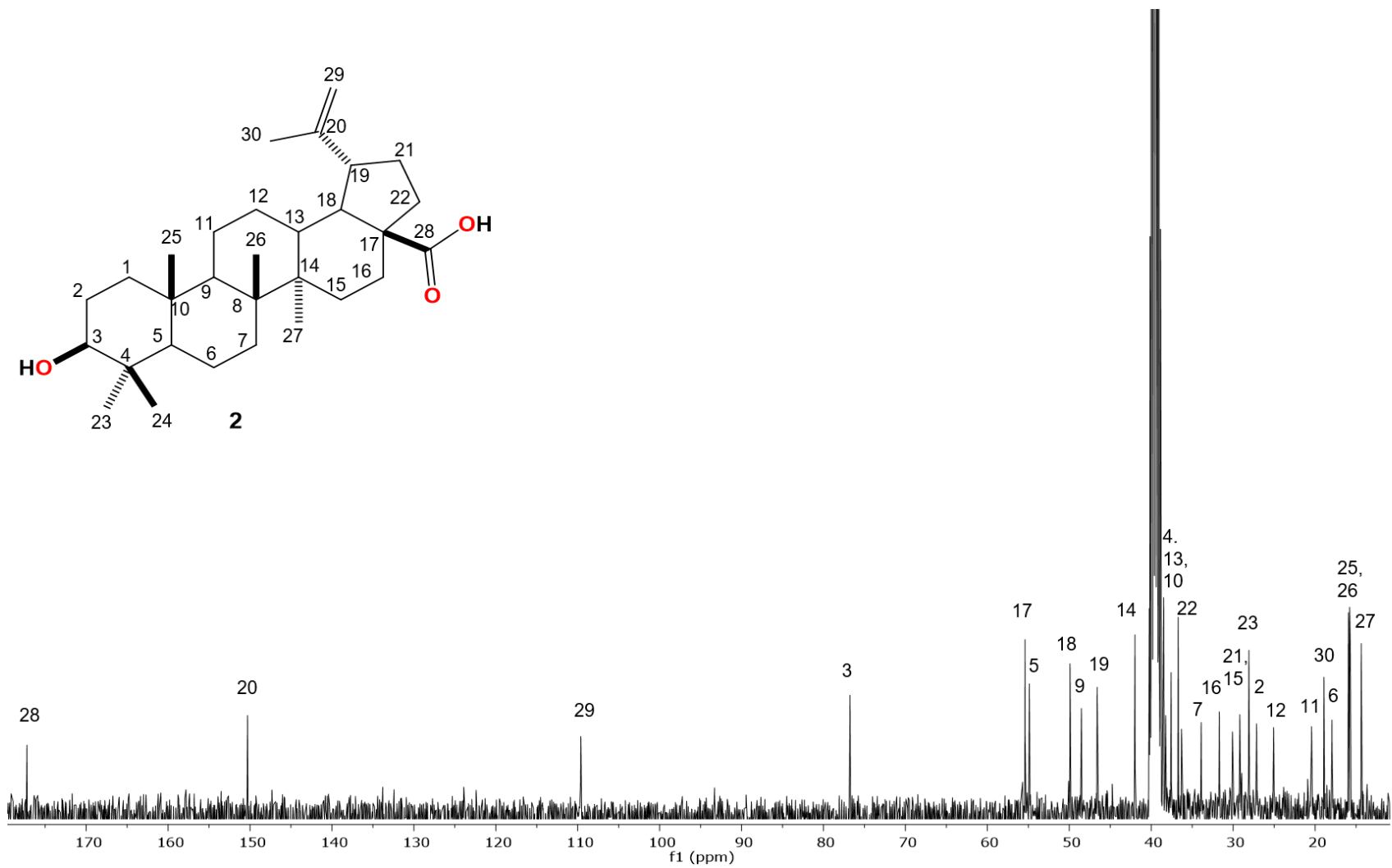


Figura 22. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del ácido betulínico (2) en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

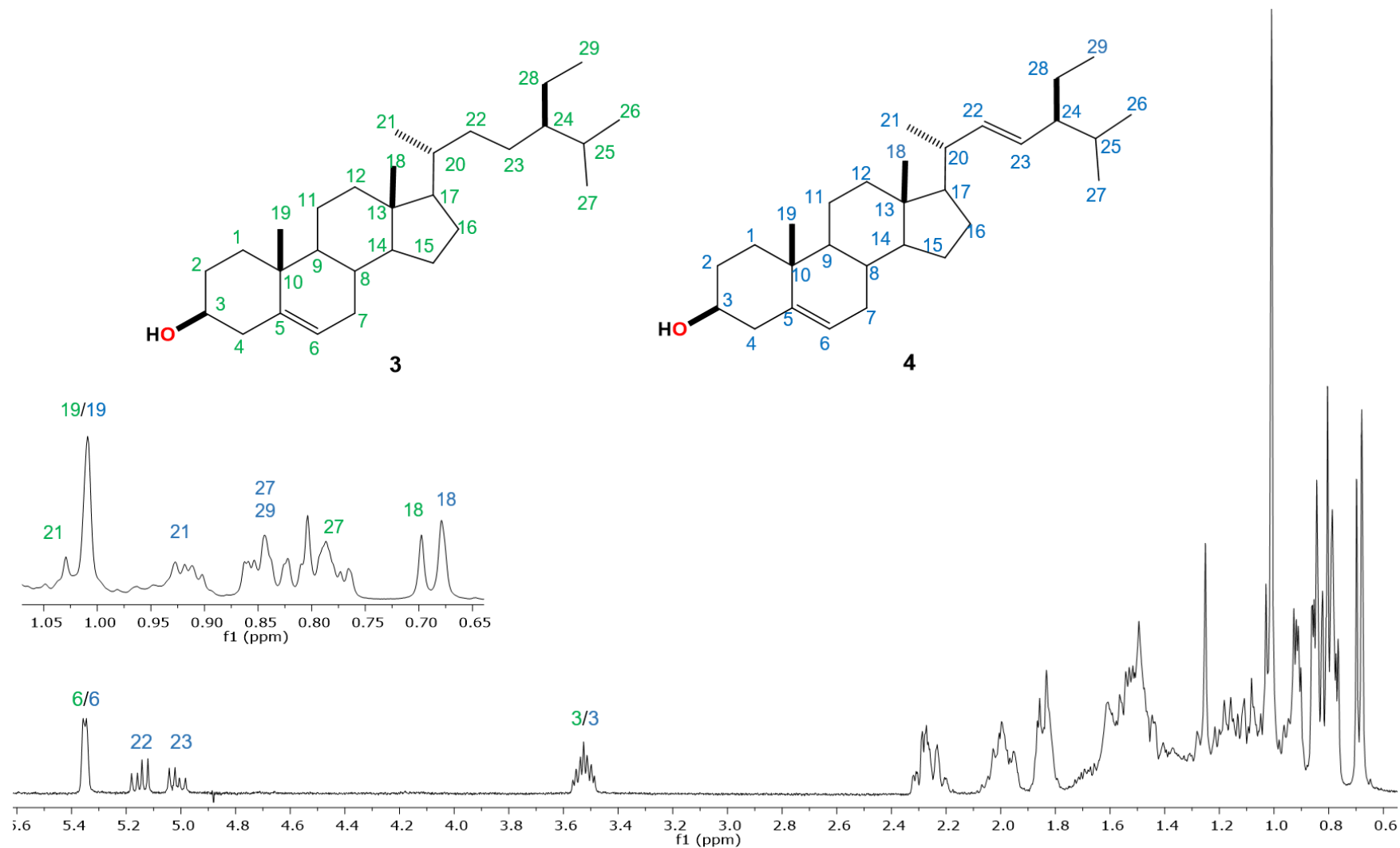


**Figura 23.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) del ácido betulínico (2) en  $\text{DMSO-}d_6$ .

### 6.7. Obtención del $\beta$ -sitosterol y estigmasterol (3 y 4)

De los extractos de DCM y AcOEt de las hojas de *R. tetraphylla* se lograron identificar los compuestos  $\beta$ -sitosterol (**3**) y estigmasterol (**4**) como únicos metabolitos secundarios de importancia. Dichos compuestos se obtuvieron en la polaridad 49:1 de la mezcla hexano/acetato de etilo como finos cristales en forma de agujas. Las estructuras mencionadas fueron elucidadas mediante RMN de  $^1\text{H}$  utilizando  $\text{CDCl}_3$  como disolvente (figura 13). Los datos espectroscópicos obtenidos nos muestran una señal en 5.35 ppm que corresponden al hidrógeno vinílico del anillo B, mientras que entre 5.20 y 5.00 ppm se observan un par de señales dobles de dobles de los hidrógenos vinílicos característicos de la insaturación entre los carbonos 22 y 23 del estigmasterol, y en 3.53 ppm se aprecia la señal triple múltiple de hidrógeno base de alcohol. Se llegó a la conclusión de que la mezcla se encuentra en una proporción de 1:1.34 estigmasterol- $\beta$ -sitosterol con base a la integral de los hidrógenos en el espectro obtenido.



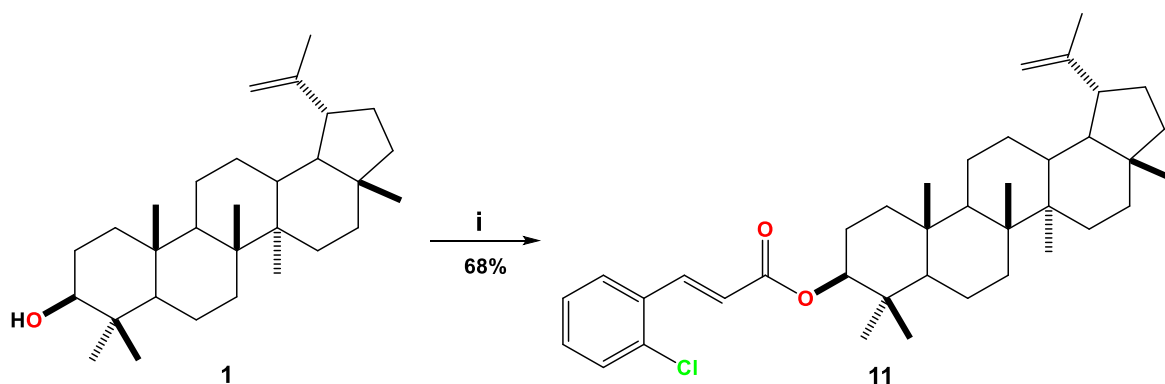


**Figura 24.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de la mezcla  $\beta$ -sitosterol–estigmasterol (**3** y **4**) en  $\text{CDCl}_3$ .

## 6.8. Preparación de ésteres de lupeol

### 6.8.1. Preparación del 3 $\beta$ -(2-clorocinamoiloxi)-lup-20(29)-eno (**11**)

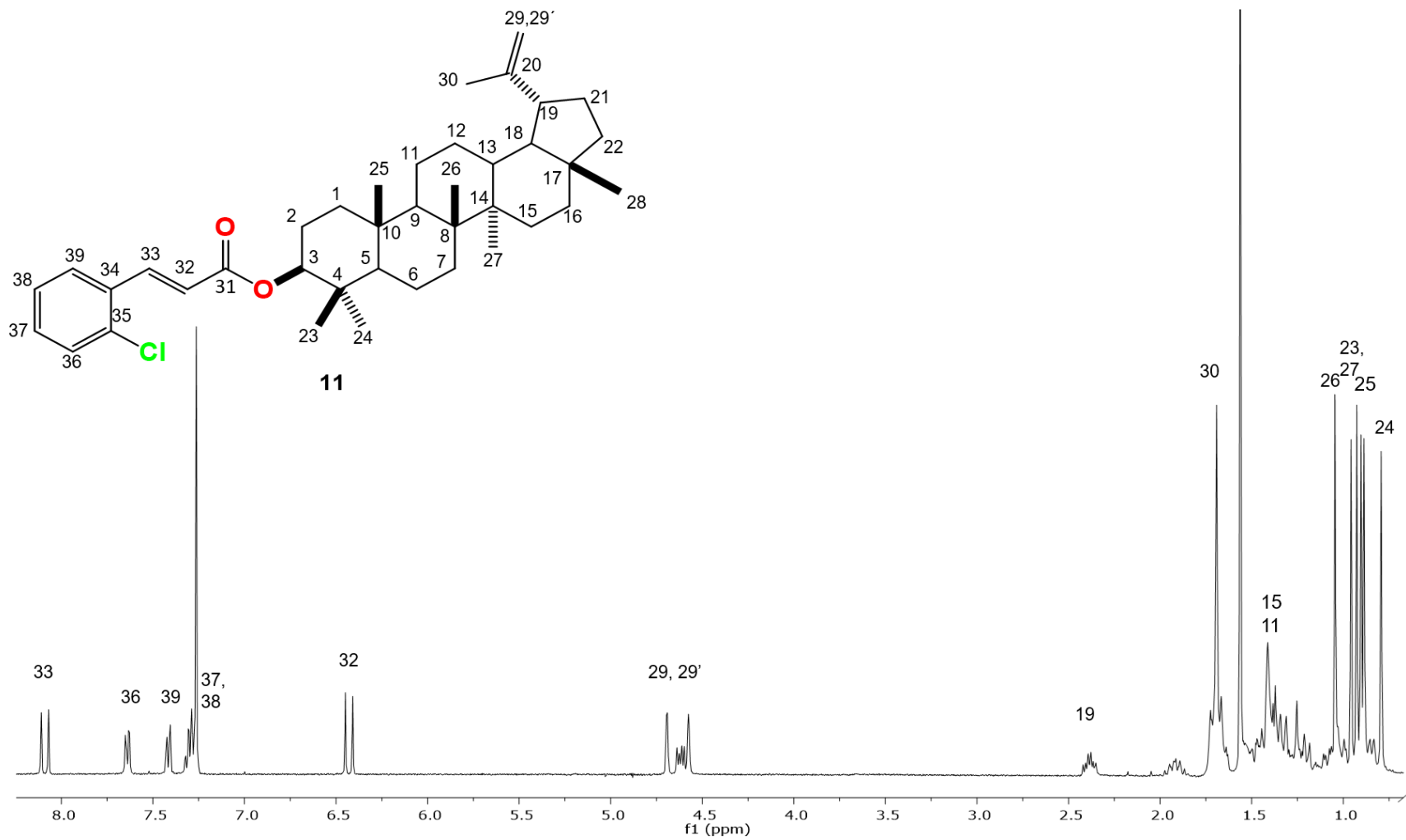
A partir de **1** se preparó el derivado **11** utilizando cloruro de 2-clorocinamoílo. Se obtuvo el producto como un sólido blanco amorfo y se analizó mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .



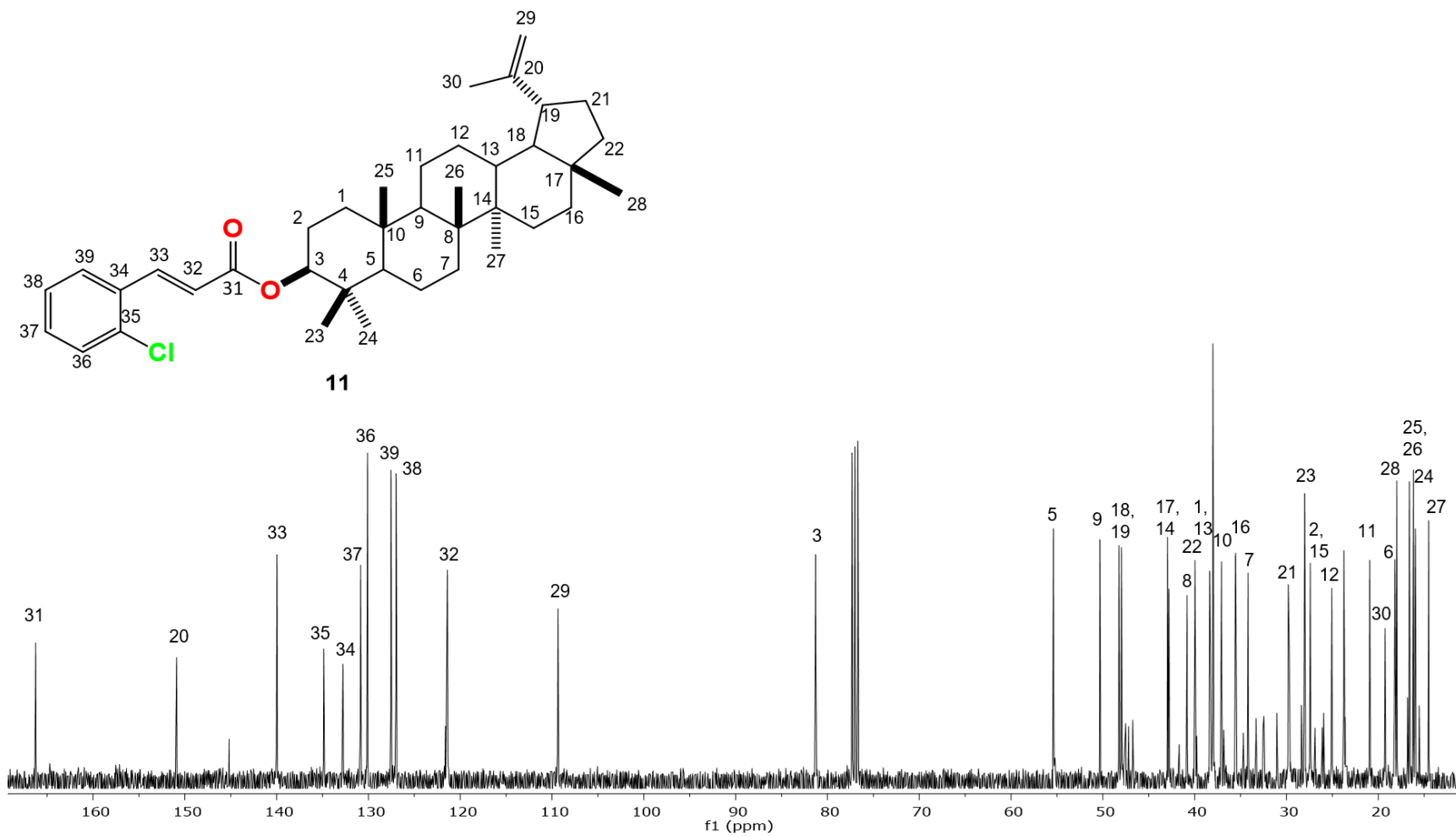
**Esquema 1.** Reactivos y condiciones. **i)** piridina, cloruro de 2-clorocinamoílo, b.v., 8 h.

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **11** (Figura 25) se observan las señales correspondientes a dicho derivado en 8.09 y 6.43 ppm se identificaron dos señales dobles ( $J = 16.0$  Hz) para los hidrógenos vinílicos H-33 y H-32. En 7.64 y 7.41 se observan dos señales triples de dobles que corresponden a los hidrógenos aromáticos H-36 y H-39, respectivamente. Entre 7.32 y 7.26 ppm se observan dos conjuntos de señales múltiples que corresponden a los hidrógenos H-37 y H-38. Se observan de manera normal las demás señales correspondientes a la materia prima.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **11** (Figura 26) se pueden observar señales entre 120 y 167 ppm correspondientes a la fracción de cinamato del derivado. En 166.2 ppm se encuentra la señal correspondiente al carbono de carbonilo C-31. En 139.9 y 121.4 ppm se observan las señales de los carbonos vinílicos H-33 y H-32 respectivamente. Se identificaron en 134.8, 132.7, 130.8, 130.1, 127.5, 126.9 señales para los carbonos aromáticos C-35, C-34, C-37, C-36, C-39 y C-38, respectivamente.



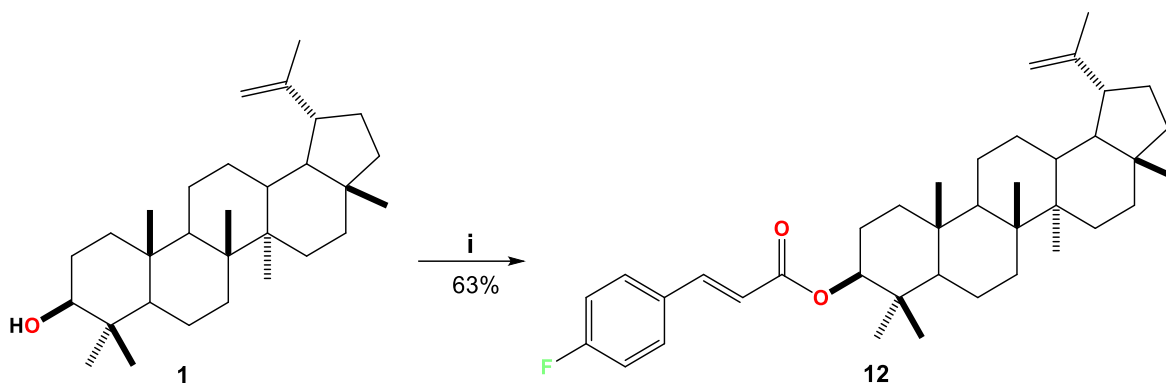
**Figura 25.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del 3β-(2-clorocinamoiloxi)-lup-20(29)-eno (**11**) en CDCl<sub>3</sub>.



**Figura 26.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz) del 3 $\beta$ -(2-clorocinamoiloxi)-lup-20(29)-eno (**11**) en CDCl<sub>3</sub>.

### 6.8.2. Preparación del 3β-(4-fluorocinamoiloxi)-lup-20(29)-eno (**12**)

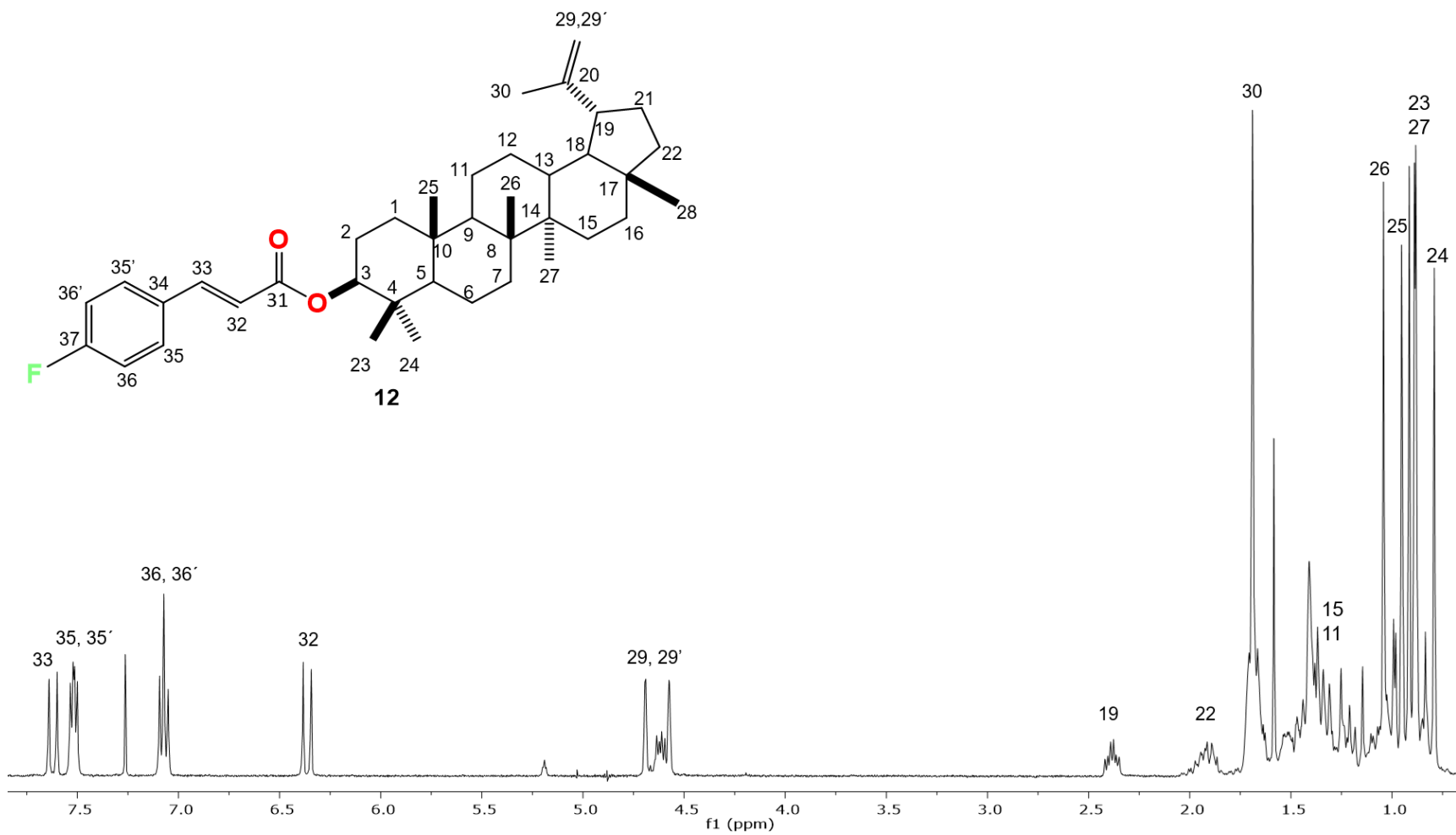
A partir de **1** se preparó el derivado **12** empleando cloruro de 4-fluorocinamoílo. Se obtuvo el producto como un sólido blanco amorfo y se analizó mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .



**Esquema 2.** Reactivos y condiciones. **i)** piridina, cloruro de 4-fluorocinamoílo, b.v., 8 h.

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **12** (figura 27) se observan en 7.62 y 6.37 ppm las dos señales dobles ( $J = 16.0$  Hz) para los hidrógenos vinílicos H-33 y H-32. Entre 7.54 y 7.49 ppm se observa un conjunto de señales múltiples que corresponden a los hidrógenos equivalentes H-35 y H-35'. Entre 7.07 ppm se observan dos señales triples traslapadas que corresponden a los hidrógenos H-36 y H-36'. El resto de señales permanecen conforme a la materia prima.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **12** (figura 28) se pueden observar señales entre 120 y 167 ppm correspondientes a la fracción de cinamato de nuestro derivado. En 166.6 ppm se encuentra la señal correspondiente al carbono de carbonilo C-31, mientras que entre 165.0 y 162.5 ppm se observa una señal doble para el C-37 debido al acoplamiento con el flúor. En 143.9 y 118.6 ppm se observan las señales de los carbonos vinílicos H-33 y H-32 respectivamente. En 130.7 ppm se observa la señal para C-34, en 129.9 y 129.8 se encuentran las señales para C-35 y C-35' y en 116.0 y 115.8 ppm las correspondientes a C-36 y C-36'. El resto de las señales se mantuvieron respecto a la materia de entrada.



**Figura 27.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del 3 $\beta$ -(4-fluorocinamoiloxi)-lup-20(29)-eno (**12**) en CDCl<sub>3</sub>.

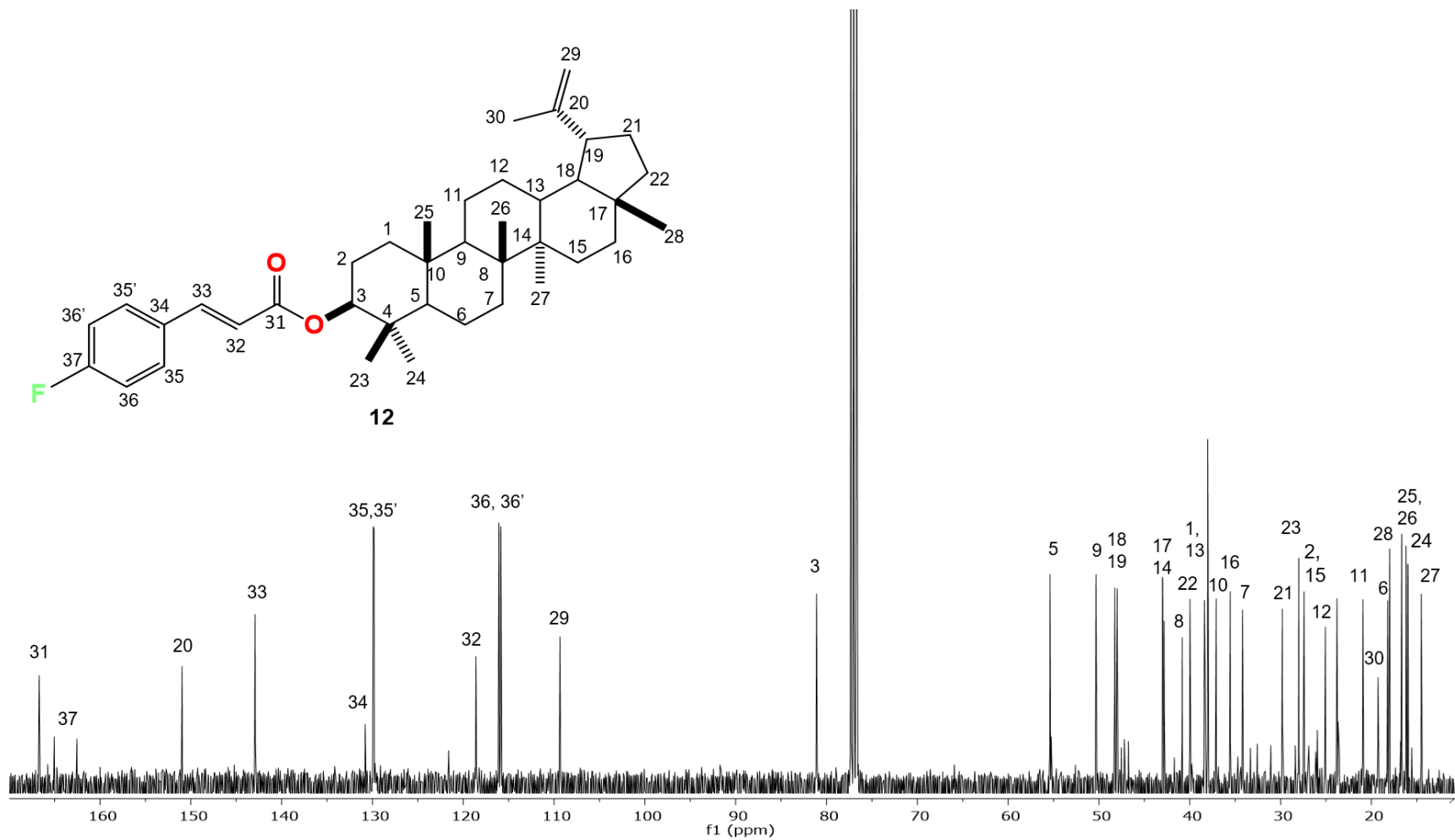
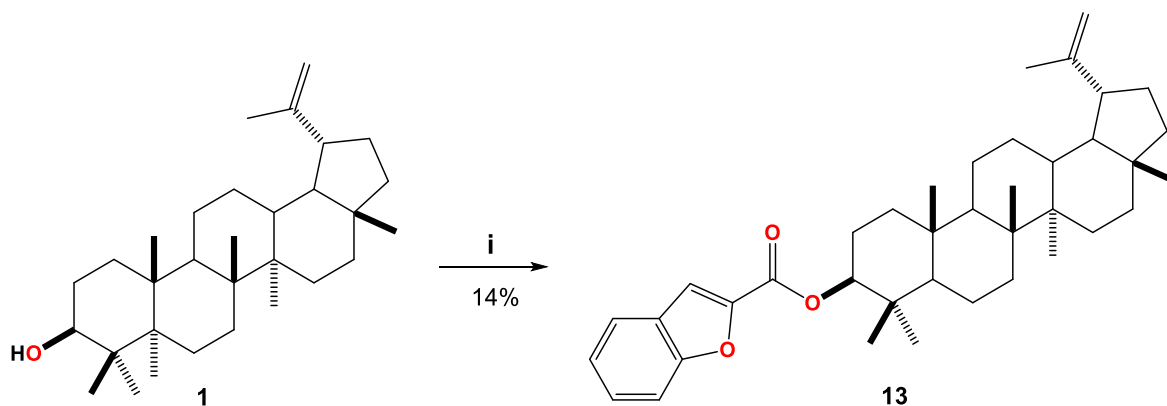


Figura 28. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz) del 3β-(4-fluorocinamoiloxi)-lup-20(29)-eno (12) en CDCl<sub>3</sub>.

### 6.8.3. Preparación del 3 $\beta$ -(benzofuran-2-carbonil)-lup-20(29)-eno (**13**)

A partir **1** se preparó el derivado **13** empleando la metodología descrita en la sección 8.4, utilizando cloruro de benzofuran-2-carbonilo. Se obtuvo el producto como un sólido blanco amorfo y se analizó mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

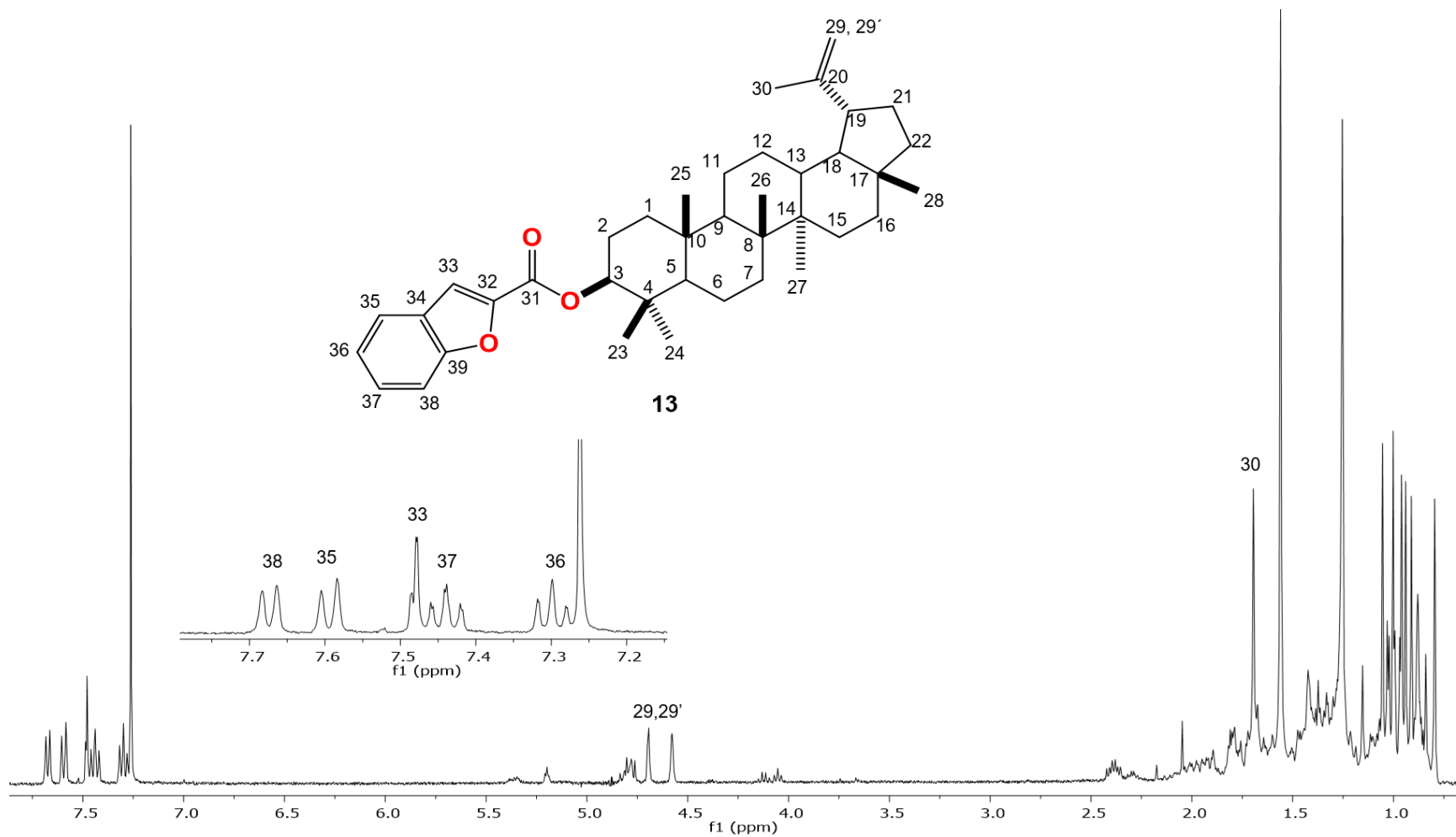


**Esquema 3.** Reactivos y condiciones. **i)** piridina, cloruro de benzofuran-2-carbonilo, b.v., 8 h.

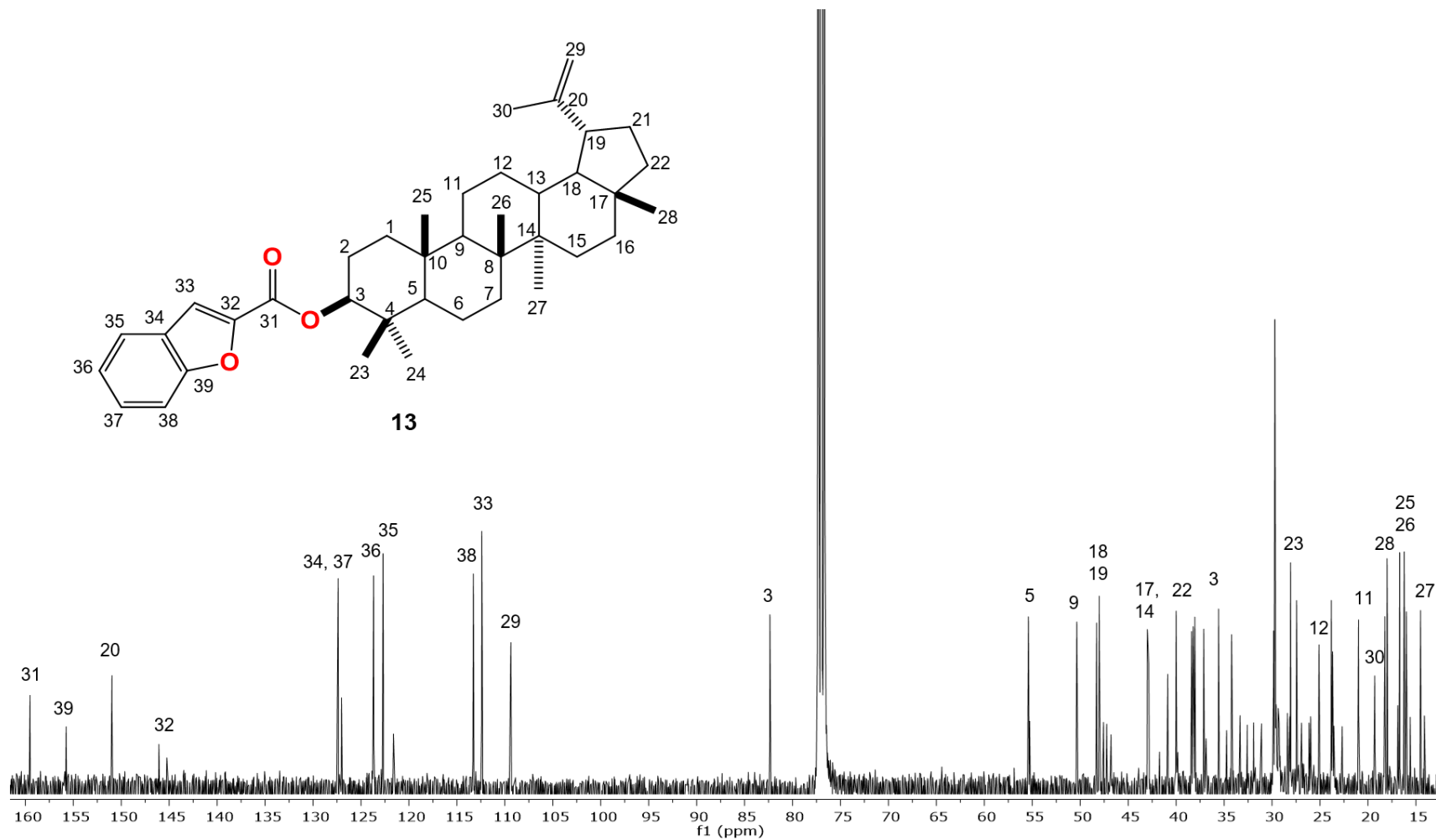
En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **13** (Figura 29) entre 7.70 y 7.30 ppm se observan las señales de los hidrógenos aromáticos de la fracción de benzofurano. En 7.67 y 7.59 ppm dos señales dobles que corresponden al H-38 y H-35, respectivamente. En 7.48 y 7.44 ppm se aprecia una señal dd y ddd para los hidrógenos H-33 y H-37. Finalmente se identificó una señal múltiple en 7.30 ppm para el hidrógeno H-37 de manera normal las demás señales correspondientes a la materia prima.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **13** (Figura 30) se observan señales entre 160.0 y 122.0 ppm correspondientes a la nueva funcionalización de nuestra molécula. En 159.5 ppm se encuentra la señal correspondiente al carbono de carbonilo C-31, en 155.7 ppm se encuentra la señal correspondiente a C-39 y la señal característica de C-20 en 150.9 ppm. Los C-32, C-34, C-37, C-36, C-35, C-38 y C-33 se identificaron mediante las señales identificadas en 156.0, 127.3, 127.0, 123.6, 122.6, 113.2 y 112.4 ppm respectivamente.





**Figura 29.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del 3β-(benzofuran-2-carbonil)-lup-20(29)-eno (**13**) en CDCl<sub>3</sub>.



**Figura 30.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) del 3 $\beta$ -(benzofuran-2-carbonil)-lup-20(29)-eno (**13**) en  $\text{CDCl}_3$ .

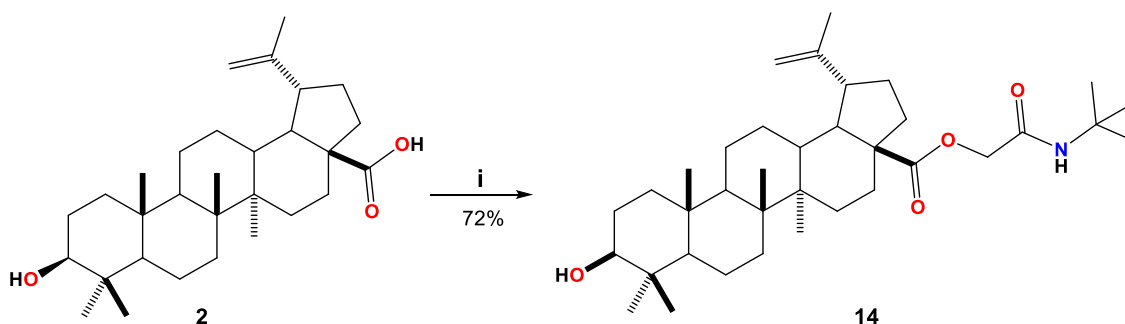
## 6.9. Preparación de derivados del ácido betulínico.

A partir de las funciones químicas que presenta el ácido betulínico se buscaron metodologías que permitieran la preparación de derivados con posibles aplicaciones biológicas. En el grupo de trabajo se han preparado ésteres y amidas mediante el acoplamiento con CDI y DCC, las cuales no han sido favorables para este compuesto, debido al impedimento estérico del carboxilo C-28 de **2**.

Mediante la reacción de Passerini, otra metodología utilizada en el grupo de trabajo, se logró preparar estructuras que contengan ambos grupos, éster y amida, empleando reactivos poco voluminosos que no se ven afectados por tal impedimento estérico.

### 6.9.1. Preparación del 3 $\beta$ -hidroxilup-20(29)-enoato de 2-(*tert*-butilamino)-2-oxoetilo (**14**)

Partiendo de **2** como materia prima se preparó el aducto **14** empleando la reacción de Passerini, utilizando formaldehído y *t*-butilisonitrilo. Se obtuvo un sólido blanco con p.f. de 188-191 °C, el cual se caracterizó mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

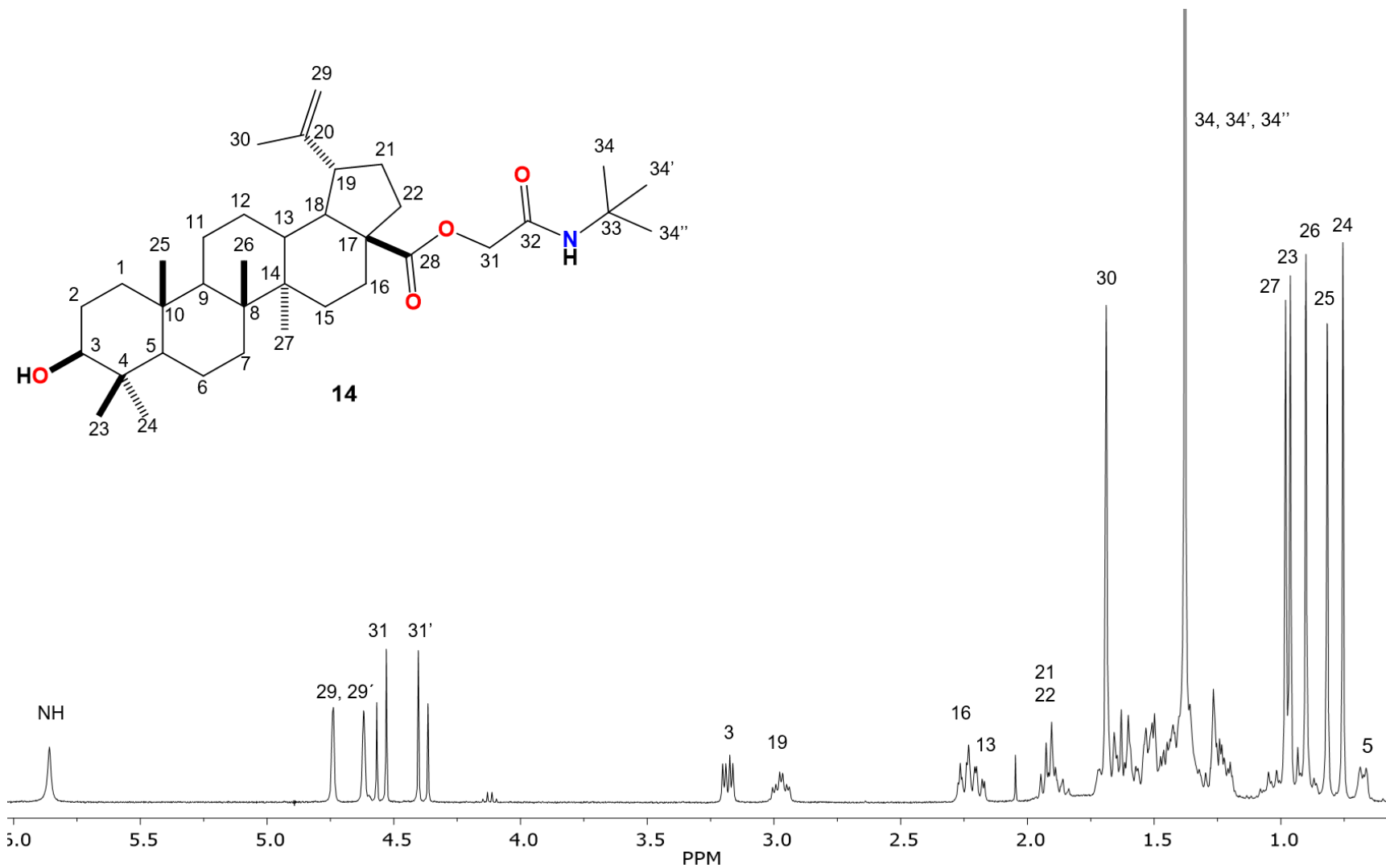


**Esquema 4.** Reactivos y condiciones. **i)** THF, formaldehído, *t*-isonitrilo, t.a.

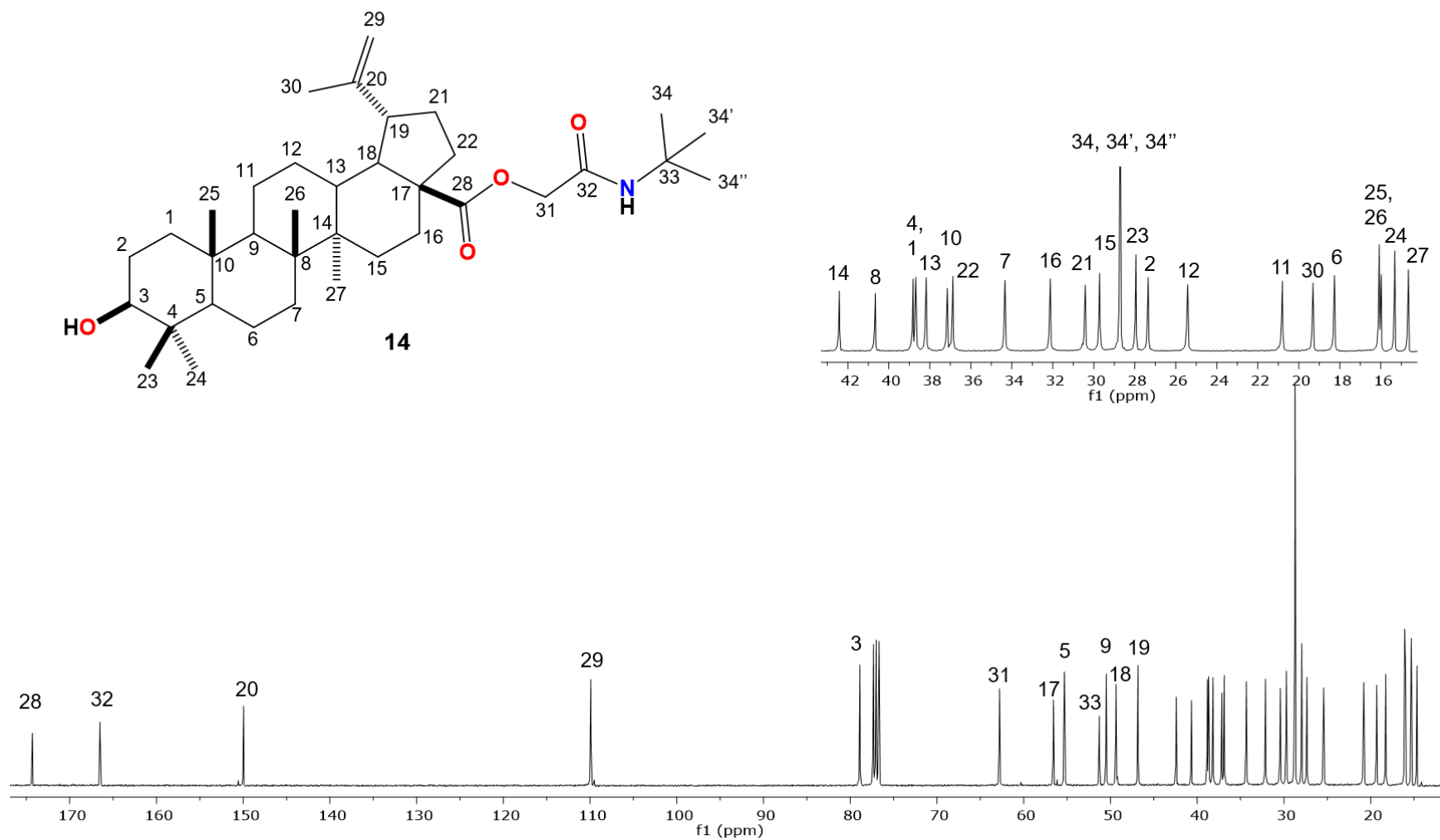
En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **14** (figura 31) se observan las señales para las fracciones incorporadas. Se identificó en 5.85 ppm una señal simple correspondiente al hidrogeno de la amida N-H. En 4.74 y 4.61 ppm se observan dos señales dobles ( $J = 2.2$  Hz) para los hidrógenos vinílicos 29 y 29'. En 4.55 y 4.38 ppm se observan dos señales dobles ( $J = 15.2$  Hz) para los hidrógenos 31 y 31'. En

1.38 ppm se observa una señal simple intensa que integra para 9 hidrógenos y corresponden para los carbonos 34, 34' y 34''. El resto de las señales permanece conforme a la materia prima de origen.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **14** (figura 32) se observaron 34 señales de carbono para dicho derivado. En 174.3 y 166.5 ppm se observan las señales de los carbonilos de éster y de amida, C-28 y C-32 respectivamente. En 28.7 ppm se observa una señal intensa que integra para 3 carbonos 34, 34' y 34''. El resto de las señales permanece conforme al ácido betulínico.



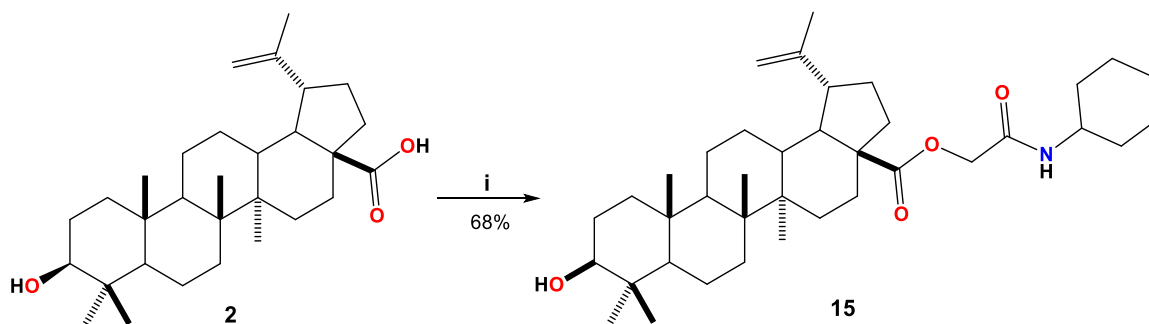
**Figura 31.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del 3β-hidroxilup-20(29)-enoato de 2-(*tert*-butilamino)-2-oxoetilo (**14**) en CDCl<sub>3</sub>.



**Figura 32.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz) del 3β-hidroxilup-20(29)-enoato de 2-(*tert*-butilamino)-2-oxoetilo (**14**) en CDCl<sub>3</sub>.

### 6.9.2. Preparación del 3 $\beta$ -hidroxilup-20(29)-enoato de 2-(ciclohexilamino)-2-oxoetilo (**15**)

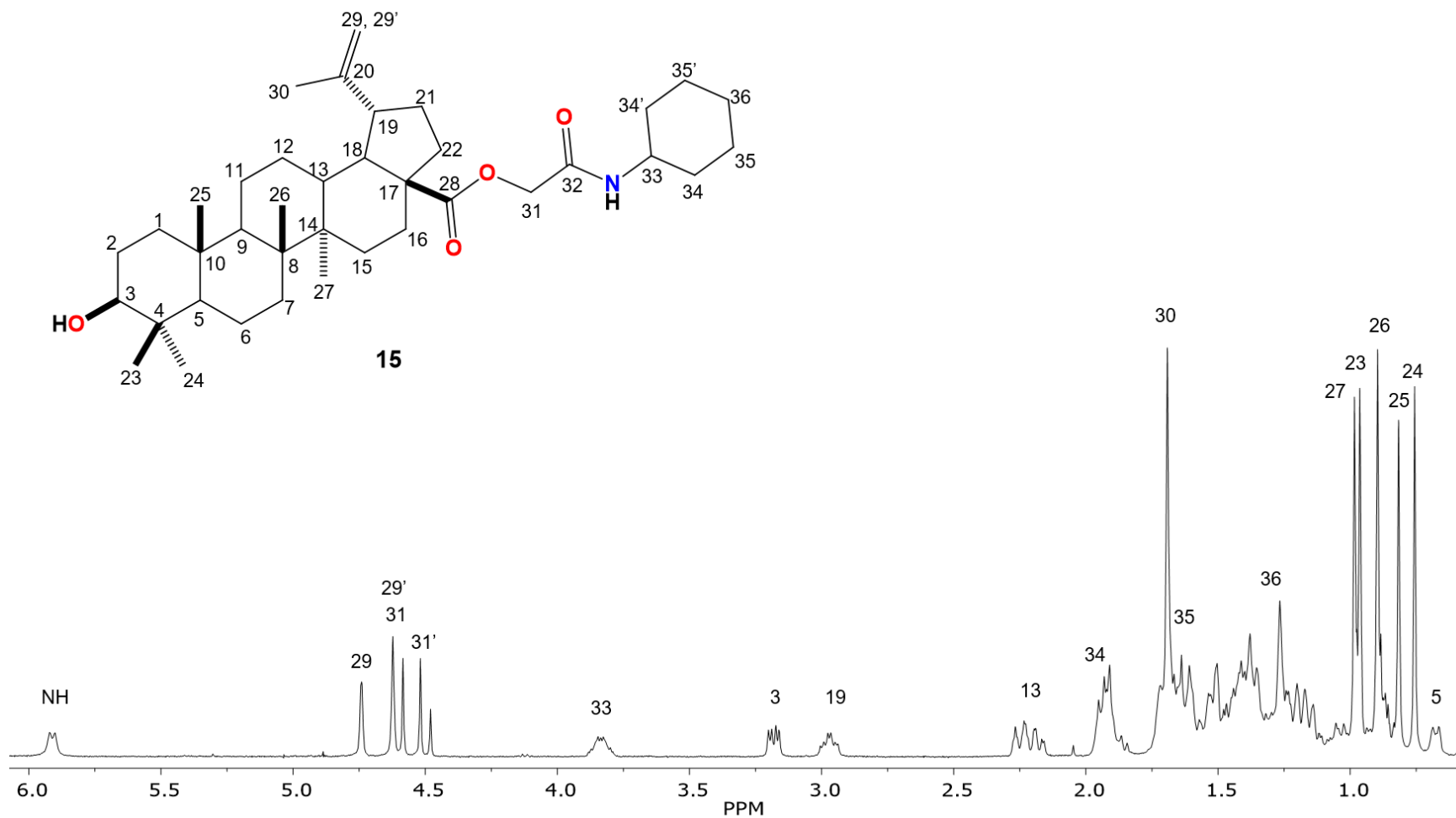
Partiendo de **2** como materia prima se preparó el derivado **15** vía reacción de Passerini, utilizando como reactivos formaldehído y ciclohexilisonitrilo obteniendo una miel que se caracterizó mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .



**Esquema 5.** Reactivos y condiciones. **i)** THF, formaldehído, ciclohexilisonitrilo, t.a.

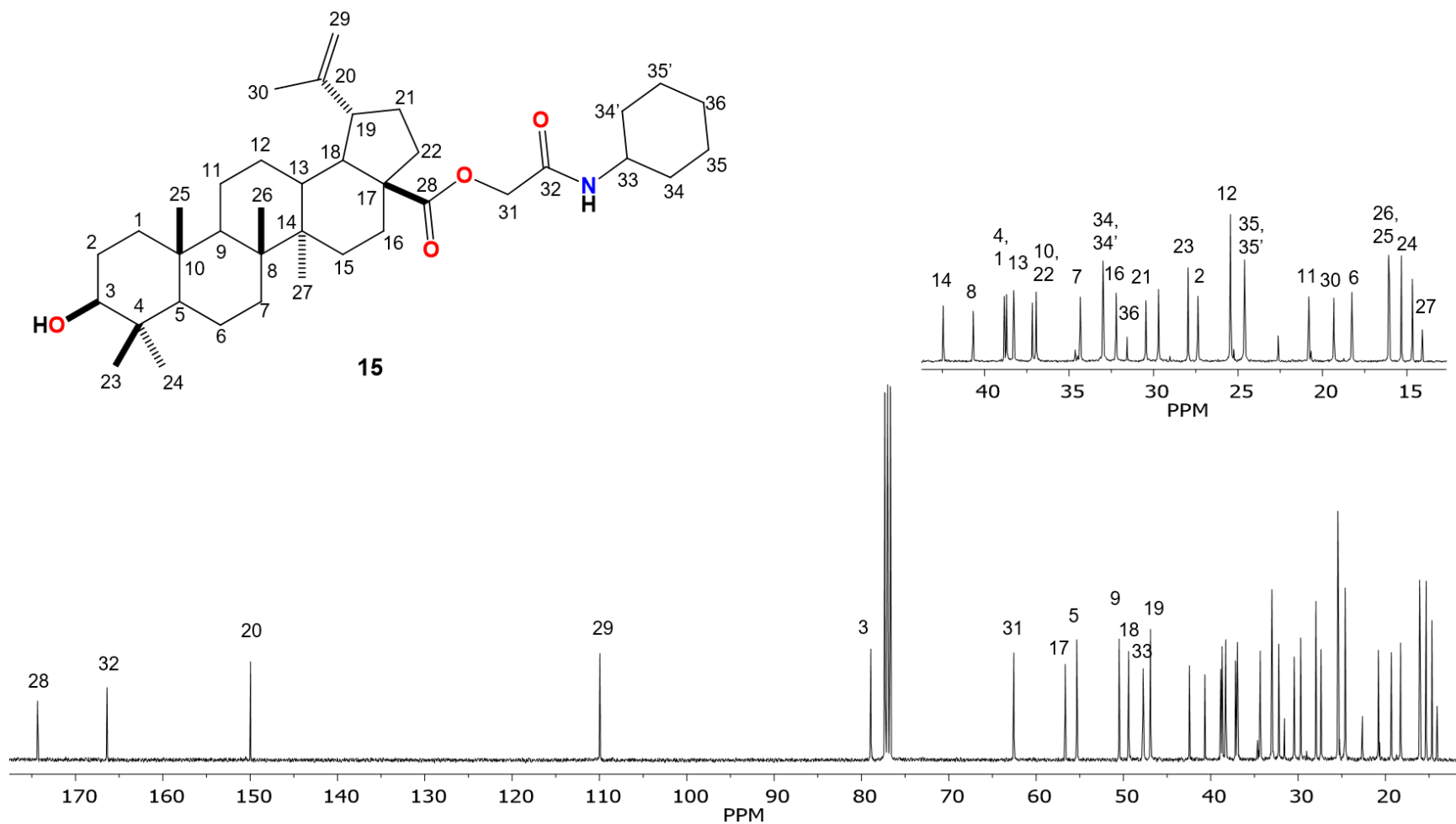
En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **15** (figura 32) se observan las señales del triterpeno y las fracciones adicionadas mediante la RMC. En 5.92 ppm se observa una señal simple correspondiente al hidrógeno de la amida N-H, en 4.74 y 4.62 ppm ( $J = 15.4$  Hz) se observan las señales de los hidrógenos vinílicos 29 y 29', este último traslapado con la señal doble en 4.58 ppm ( $J = 15.4$  Hz) del hidrógeno H-31, y en 4.50 ppm la señal de H-31. Se puede observar en 3.84 ppm una señal múltiple correspondiente al hidrógeno H-33. En 1.69 ppm se observa una señal simple intensa que integra para 6 hidrógenos de los metilos H-35 y H-30. A campo alto se observan las señales simples de los metilos del sistema triterpénico de la materia prima de origen y las demás señales características de la misma.

Se observó en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (figura 33) en 174.3 y 166.3 ppm los carbonos de carbonilo de éster y de amida de C-28 y C-32 respectivamente. En 78.9 ppm se encuentra la señal de C-3 y en 62.5 ppm la señal de carbono puente de éster C-35. A campo bajo se identificaron las señales de la fracción de ciclohexilo C-33, C-34 (C-34'), C-36, y C-35 (C-35') en 47.7, 32.9, 31.5 y 24.6 ppm respectivamente.



**Figura 33.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del 3 $\beta$ -hidroxilup-20(29)-enoato de 2-(ciclohexilamino)-2-oxoetilo (**15**) en  $\text{CDCl}_3$ .





**Figura 34.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) del 3β-hidroxilup-20(29)-enoato de 2-(ciclohexilamino)-2-oxoetilo (**15**) en  $\text{CDCl}_3$ .

## 7. CONCLUSIONES

A partir de los extractos hexánicos de hojas y frutos de *Rauvolfia tetraphylla* se logró aislar e identificar el lupeol (**1**) como metabolito principal. Mediante la hidrólisis básica del extracto hexánico de hojas se obtuvo **1** en una mayor proporción, permitiendo también la obtención del ácido betulínico (**2**). Adicionalmente se aislaron el estigmasterol (**3**) y  $\beta$ -sitosterol (**4**) en forma de mezcla en la mayoría de los extractos de la planta.

Dada la importante función biológica de ésteres y amidas, y la presencia de dichos grupos funcionales en algunos de los fármacos comerciales, se optó por preparar este tipo de derivados a partir de los metabolitos secundarios **1** y **2** los cuales pueden presentar potencial farmacológico.

Empleando **1** como materia prima se prepararon los ésteres **11-13** empleando cloruros de ácido, obteniéndose rendimientos de moderados a buenos. A partir de lo anterior se puede observar que la preparación de ésteres a partir de alcoholes triterpénicos mediante esta metodología constituye una herramienta eficaz para la preparación de derivados con posible aplicación biológica.

Utilizando **2** como componente ácido de la reacción de Passerini se obtuvieron los aductos **14** y **15** en combinación con diferentes isonitrilos, los cuales presentan a su vez tanto un grupo éster como amida resultando interesante su posible empleo en pruebas biológicas. Además se obtuvieron rendimientos aceptables en una reacción de un solo paso, demostrándose su alta reactividad química para este tipo de RMC.

## 8. PARTE EXPERIMENTAL

### 8.1. Material vegetal

El material vegetal de *Rauvolfia tetraphylla* fue recolectado en el municipio de Apatzingán, Michoacán.

La identificación taxonómica de la planta fue realizada en la Facultad de Biología de la UMSNH (figura 35).

La planta se separó en sus distintas partes (tallos, hojas y frutos) y se secó a la sombra. Los tallos se cortaron en pequeños canutos para las maceraciones y reflujos.



Figura 35. Identificación taxonómica de *R. tetraphylla*.

## 8.2 Generalidades

Para la separación de los compuestos presentes en los extractos obtenidos se realizaron empleando gel de sílice de un tamaño de malla de 70-230 y 230 a 400 mesh como fase estacionaria de acuerdo a las necesidades para separación y purificación. Se empleó como fase móvil mezcla de disolventes orgánicos, principalmente hexano y acetato de etilo en orden ascendente de polaridad de acuerdo a las características de los metabolitos y derivados en su caso. El proceso de elucidación y purificación se monitoreo mediante el uso de cromatografía en capa fina, tanto mediante la observación bajo luz UV y su posterior revelación con sulfato cérico amoniacal principalmente.

Los extractos crudos y los metabolitos obtenidos posteriormente fueron analizados mediante Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  a 400 MHz, utilizando como disolventes cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\text{DMSO}-d_6$  y metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, empleando un espectrómetro Varian Mercury Plus 400.

## 8.3. Metodología para la obtención del lupeol (1), ácido betulínico (2) y $\beta$ -sitosterol-estigmasterol (3-4).

El material vegetal fue sometido a extracción mediante macerados y en su caso reflujos por triplicado, utilizando disolventes en orden ascendente de polaridad (hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol). Los extractos obtenidos fueron concentrados en rotavapor a presión reducida.

Los extractos fueron impregnados en gel de sílice de malla 70-230 para la obtención de fracciones gruesas, las cuales se recromatografiaron posteriormente empleando gel de sílice de malla 230-400 empleando como fase móvil mezclas de hexano y acetato de etilo en orden ascendente de polaridad.

Para la obtención del lupeol (1) se empleó 1 gramo de extracto hexánico de hojas sometido a hidrólisis básica con KOH en MeOH. Se purificó en columna cromatográfica abierta empleando gel de sílice de malla 230-400. Entre las polaridades 19:1 y 93:7 de la mezcla hexano/acetato de etilo se obtuvo un sólido

blanco amorfo el cual fue identificado mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y presentando un punto de fusión de 212-215 °C.

Para la obtención del ácido betulínico (**2**) se empleó 1 gramo de extracto hexánico de hojas sometido a hidrólisis básica con KOH en MeOH. Se purificó en columna cromatográfica abierta empleando gel de sílice de malla 230-400. En la polaridad 8:2 de la mezcla hexano/acetato de etilo se obtuvo un sólido blanco insoluble en diclorometano y parcialmente soluble en acetona el cual fue identificado mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , presentando un punto de fusión de 280-283 °C.

La mezcla  $\beta$ -sitosterol/estigmasterol se obtuvo en los extractos diclorometánicos y de acetato de etilo de hojas entre las polaridades 9:1 y 85:15 de la mezcla hexano/acetato de etilo. Dicha mezcla se encontró en forma de agujas transparentes con un punto de fusión de y se comprobó su estructura mediante RMN de  $^1\text{H}$  y referencias del equipo de trabajo.

#### **8.4. Preparación de ésteres de lupeol.**

La preparación de ésteres de lupeol se realizó empleando cloruro de 2-clorocinamoilo, cloruro de 4-fluorocinamoilo y cloruro de benzofuran-2-carbonilo. La materia prima a reaccionar se disolvió en 1 a 2 ml de piridina y se adicionaron 3 equivalentes del cloruro de ácido. La mezcla de reacción fue colocada en b.v. durante 8 horas y se verificó mediante CCF una vez transcurrido el tiempo.

El crudo de reacción se extrajo con acetato de etilo y se realizaron lavados con HCl al 10% y agua destilada hasta pH neutro. El remanente de agua en la fase orgánica fue retirado con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente en rotavapor bajo presión reducida. Se impregnó con gel de sílice de malla 230-400 para su posterior purificación en columna abierta.

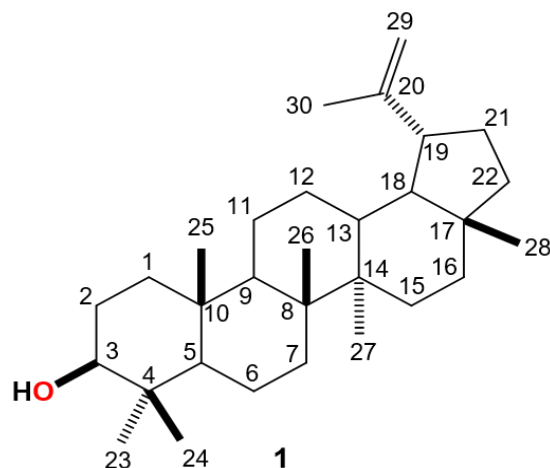
#### **8.5. Preparación de aductos de Passerini.**

A partir de una solución de formaldehído al 35%, se preparó otra solución del mismo en THF a una concentración de 0.5 M, el cual se adicionó a un tubo de ensaye con 1 equivalente de ácido betulínico (**2**) y se dejó en agitación por 5 minutos. Después se agregó un equivalente del respectivo isonitrilo, y se dejó reaccionando por 24

horas a temperatura ambiente. Al término del tiempo de reacción se impregnó el crudo de reacción en gel de sílice de malla 230-400, se dejó secar y se sometió a purificación en columna abierta mediante mezcla de disolventes en orden de polaridad ascendente.

## 8.6. Datos físicos y espectroscópicos

### 8.6.1. Lupeol (1)

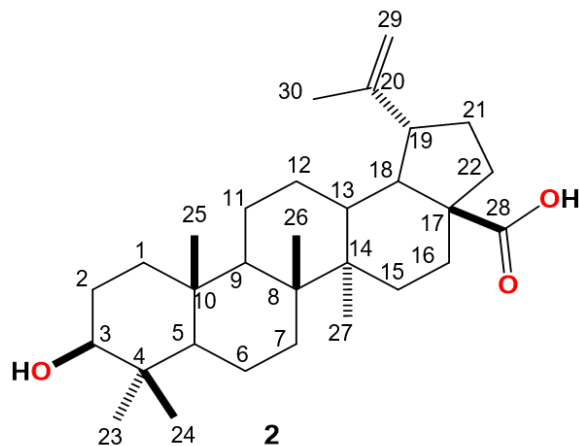


Sólido blanco con p.f. 179-182 °C.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.68 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-29), 4.56 (1H, dd,  $J = 2.3$ , 1.3 Hz, H-29'), 3.19 (1H, dd,  $J = 11.2$ , 5.2 Hz, H-3), 2.38 (1H, td,  $J = 11.0$ , 5.8 Hz, H-19), 1.93 (1H, m, H-21), 1.86 (1H, m, H-15), 1.68 (3H, s, H-30), 1.65 (1H, m, H-1), 1.63 (1H, m, H-12), 1.60 (1H, m, H-13), 1.57 (1H, m, H-2), 1.53 (1H, m, H-2'), 1.51 (1H, m, H-6), 1.46 (1H, m, H-16), 1.41 (1H, m, H-11), 1.38 (1H, m, H-7), 1.38 (1H, m, H-6'), 1.36 (1H, m, H-22), 1.36 (1H, m, H-16'), 1.33 (1H, m, H-18), 1.29 (1H, m, H-21'), 1.27 (1H, m, H-9), 1.19 (1H, m, H-22'), 1.06 (1H, m, H-12'), 1.03 (3H, s, H-26), 1.02 (1H, m, H-15'), 0.97 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, s, H-27), 0.87 (1H, m, H-1'), 0.83 (3H, s, H-25), 0.78 (3H, s, H-28), 0.76 (3H, s, H-24), 0.69 (1H, m, H-5).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  150.9 (C-20), 109.3 (C-29), 79.0 (C-3), 55.2 (C-5), 50.4 (C-9), 48.2 (C-18), 47.9 (C-19), 42.8 (C-17), 42.8 (C-14), 40.8 (C-8), 40.0 (C-22), 38.8 (C-4), 38.7 (C-1), 38.0 (C-13), 37.1 (C-10), 35.5 (C-16), 34.2 (C-7), 29.8 (C-21), 28.0 (C-23), 27.9 (C-15), 27.4 (C-2), 25.1 (C-12), 20.9 (C-11), 19.2 (C-30), 18.3 (C-6), 18.0 (C-28), 16.1 (C-25), 15.9 (C-26), 15.3 (C-24), 14.5 (C-27).

### 8.6.2. Ácido betulínico (2)



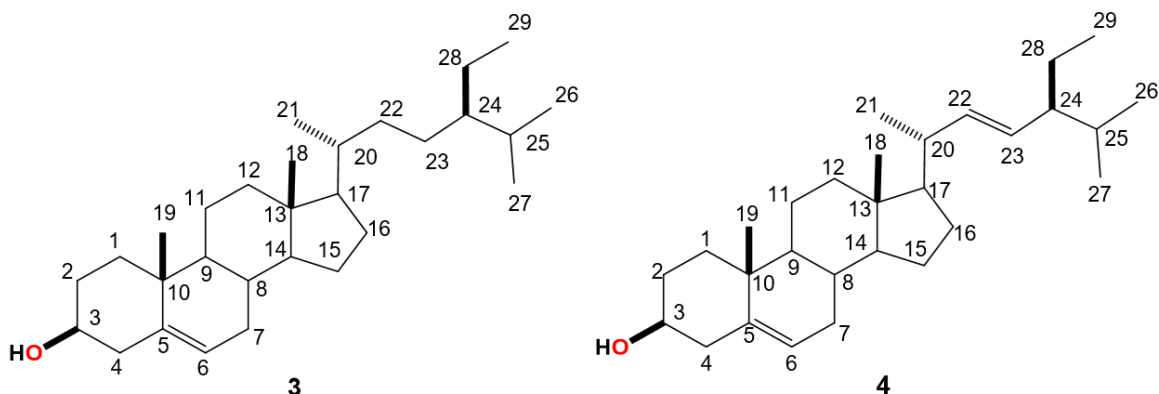
Sólido blanco con p.f. 280-283 °C.

RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.67 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-29), 4.54 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-29'), 4.27 (1H, d, *J* = 4.8 Hz -OH), 2.98 (1H, m, H-3), 2.93 (1H, m, H-19), 2.20 (1H, m, H-13), 2.09 (1H, m, H-16), 1.79 (1H, m, H-22), 1.77 (1H, m, H-21), 1.63 (3H, s, H-30), 1.58 (1H, m, H-9), 1.57 (1H, m, H-1), 1.52 (1H, m, H-1'), 1.51 (1H, m, H-18), 1.49 (1H, m, H-6), 1.45 (1H, m, H-7), 1.44 (1H, m, H-22'), 1.42 (2H, m, H-2), 1.36 (1H, m, H-21'), 1.36 (1H, m, 16'), 1.31 (1H, m, H-7'), 1.31 (1H, m, H-6'), 1.25 (1H, m, H-15), 1.23 (2H, s, H-11), 1.15 (1H, m, H-15'), 0.94 (1H, m, H-12'), 0.91 (3H, s, H-26), 0.85 (3H, s, H-27), 0.85 (3H, s, H-23), 0.74 (3H, s, H-25), 0.63 (3H, s, H-24), 0.60 (1H, m, H-5).

RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 177.2 (C-28), 150.3 (C-20), 109.6 (C-29), 76.7 (C-3), 55.4 (C-17), 54.8 (C-5), 49.9 (C-18), 48.5 (C-9), 46.6 (C-19), 41.9 (C-14), 40.2 (C-8), 38.8 (C-4), 38.6 (C-1), 38.4 (C-13), 37.5 (C-10), 36.7 (C-22), 33.9 (C-7), 31.7 (C-16), 30.0 (C-21), 29.1 (C-15), 28.0 (C-23), 27.1 (C-2), 25.0 (C-12), 20.4 (C-11), 18.9 (C-30), 17.9 (C-6), 15.9 (C-25), 15.7 (C-26), 15.7 (C-24), 14.3 (C-27).



### 8.6.3. Estigmasterol (**3**) y $\beta$ -sitosterol (**4**)

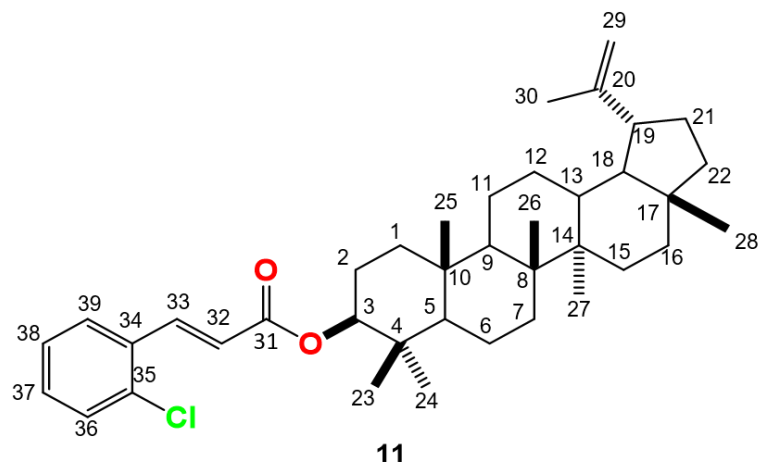


Cristales incoloros en forma de aguja.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) **Estigmasterol (3)**  $\delta$  5.36 (1H, d,  $J = 5.6$  Hz, H-6), 5.15 (1H, dd,  $J = 15.2, 8.8$  Hz, H-21), 5.05 (1H, dd,  $J = 15.2, 8.8$  Hz, H-20), 3.53 (1H, m, H-3), 1.02 (3H, s, H-19), 1.00 (3H, s, H-28), 0.85 (3H, d,  $J = 2.8$  Hz H-26), 0.80 (3H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-27), 0.70 (3H, s, H-29).  **$\beta$ -sitosterol (4)**  $\delta$  5.36 (1H, d,  $J = 5.6$  Hz, H-6), 3.53 (1H, m, H-3), 1.00 (3H, s, H-28), 0.92 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-19), 0.84 (3H, d,  $J = 2.8$  Hz H-27), 0.82 (3H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-26), 0.68 (3H, s, H-29).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) **Estigmasterol (3)**  $\delta$  140.7 (C-5), 138.3 (C-20), 129.2 (C-21), 121.7 (C-6), 71.8 (C-3), 56.7 (C-14), 55.9 (C-17), 50.1 (C-9), 45.8 (C-22), 42.2 (C-4), 42.2 (C-13), 40.5 (C-18), 39.7 (C-12), 37.2 (C-1), 36.5 (C-10), 33.8 (C-2), 31.8 (C-7), 31.8 (C-8), 29.6 (C-25), 29.1 (C-16), 25.9 (C-23), 24.3 (C-15), 21.1 (C-11), 20.0 (C-26), 19.8 (C-27), 19.2 (C-19), 18.9 (C-28), 11.9 (C-24), 11.8 (C-29).  **$\beta$ -sitosterol (4)**  $\delta$  140.7 (C-5), 121.7 (C-6), 71.8 (C-3), 56.7 (C-14), 55.9 (C-17), 50.1 (C-9), 45.8 (C-22), 42.2 (C-4), 42.2 (C-13), 39.7 (C-12), 37.2 (C-1), 36.5 (C-10), 36.3 (C-18), 34.2 (C-20), 33.8 (C-2), 31.8 (C-7), 31.8 (C-8), 29.6 (C-25), 29.1 (C-16), 24.3 (C-15), 26.3 (C-21), 23.3 (C-23), 21.1 (C-11), 20.0 (C-26), 19.8 (C-27), 19.2 (C-19), 18.9 (C-28), 11.9 (C-24), 11.8 (C-29).

#### 8.6.4. 3 $\beta$ -(2-clorocinamoiloxi)-lup-20(29)-eno (**11**)



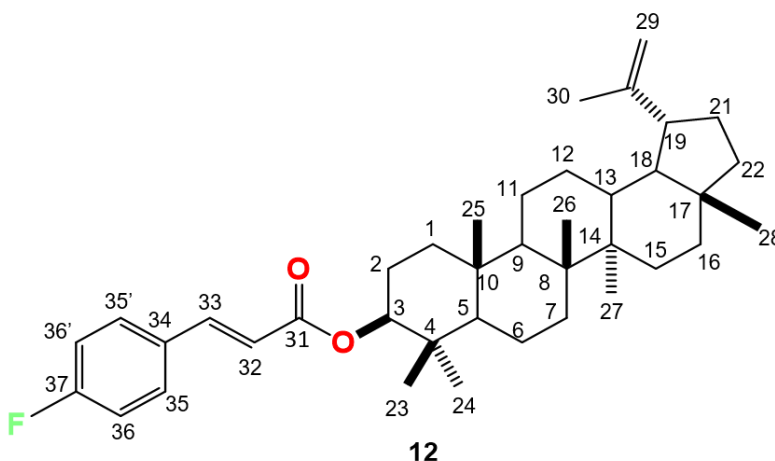
Sólido blanco con p.f. 170-173 °C.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.09 (1H, dd,  $J = 16.0, 2.2$  Hz, H-33), 7.64 (1H, dt,  $J = 7.3, 1.9$  Hz, H-36), 7.41 (1H, dt,  $J = 7.4, 1.4$  Hz H-39), 7.32 - 7.26 (1H, m, H-37) 7.32 – 7.26 (1H, m, H-38), 6.43 (1H, dd,  $J = 16.0, 2.5$  Hz, H-32), 4.68 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-29), 4.56 (1H, dd,  $J = 2.3, 1.3$  Hz, H-29'), 3.19 (1H, dd,  $J = 11.2, 5.2$  Hz, H-3), 2.38 (1H, td,  $J = 11.0, 5.8$  Hz, H-19), 1.93 (1H, m, H-21), 1.86 (1H, m, H-15), 1.68 (3H, s, H-30), 1.65 (1H, m, H-1), 1.63 (1H, m, H-12), 1.60 (1H, m, H-13), 1.57 (1H, m, H-2), 1.53 (1H, m, H-2'), 1.51 (1H, m, H-6), 1.46 (1H, m, H-16), 1.41 (1H, m, H-11), 1.38 (1H, m, H-7), 1.38 (1H, m, H-6'), 1.36 (1H, m, H-22), 1.36 (1H, m, H-16'), 1.33 (1H, m, H-18), 1.29 (1H, m, H-21'), 1.27 (1H, m, H-9), 1.19 (1H, m, H-22'), 1.06 (1H, m, H-12'), 1.03 (3H, s, H-26), 1.02 (1H, m, H-15'), 0.97 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, s, H-27), 0.87 (1H, m, H-1'), 0.83 (3H, s, H-25), 0.78 (3H, s, H-28), 0.76 (3H, s, H-24), 0.69 (1H, m, H-5).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.2 (C-31), 150.9 (C-20), 139.9 (C-33), 134.8 (C-35), 132.7 (C-34), 130.8 (C-37), 130.1 (C-36), 127.5 (C-39), 126.9 (C-38), 121.4 (C-32), 109.3 (C-29), 79.0 (C-3), 55.2 (C-5), 50.4 (C-9), 48.2 (C-18), 47.9 (C-19), 42.8 (C-17), 42.8 (C-14), 40.8 (C-8), 40.0 (C-22), 38.8 (C-4), 38.7 (C-1), 38.0 (C-13), 37.1 (C-10), 35.5 (C-16), 34.2 (C-7), 29.8 (C-21), 28.0 (C-23), 27.9 (C-15), 27.4 (C-

2), 25.1 (C-12), 20.9 (C-11), 19.2 (C-30), 18.3 (C-6), 18.0 (C-28), 16.1 (C-25), 15.9 (C-26), 15.3 (C-24), 14.5 (C-27).

### 8.6.5. 3 $\beta$ -(4-fluorocinamoiloxi)-lup-20(29)-eno (12)



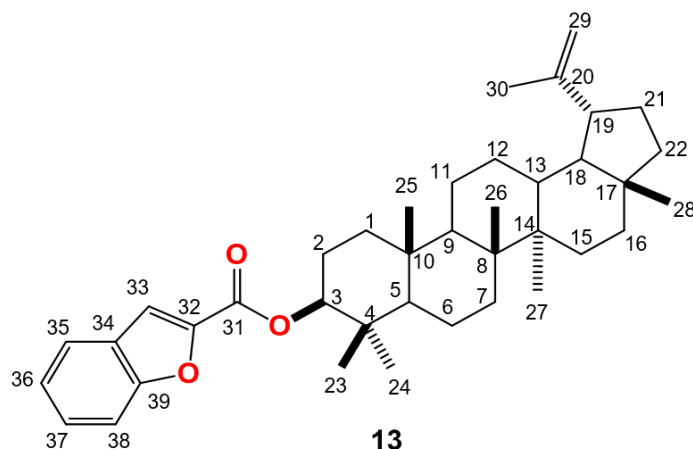
Sólido blanco con p.f. 206-208 °C.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.62 (1H, dd,  $J = 16.1, 2.7$  Hz, H-33), 7.54 – 7.49 (1H, m, H-35), 7.54 – 7.49 (1H, m, H-35'), 7.07 (1H, t,  $J = 8.6$  Hz, H-36) (1H, t,  $J = 8.6$  Hz, H-36'), 6.37 (1H, dd,  $J = 16.0, 2.5$  Hz, H-32), 4.68 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-29), 4.56 (1H, dd,  $J = 2.3, 1.3$  Hz, H-29'), 3.19 (1H, dd,  $J = 11.2, 5.2$  Hz, H-3), 2.38 (1H, td,  $J = 11.0, 5.8$  Hz, H-19), 1.93 (1H, m, H-21), 1.86 (1H, m, H-15), 1.68 (3H, s, H-30), 1.65 (1H, m, H-1), 1.63 (1H, m, H-12), 1.60 (1H, m, H-13), 1.57 (1H, m, H-2), 1.53 (1H, m, H-2'), 1.51 (1H, m, H-6), 1.46 (1H, m, H-16), 1.41 (1H, m, H-11), 1.38 (1H, m, H-7), 1.38 (1H, m, H-6'), 1.36 (1H, m, H-22), 1.36 (1H, m, H-16'), 1.33 (1H, m, H-18), 1.29 (1H, m, H-21'), 1.27 (1H, m, H-9), 1.19 (1H, m, H-22'), 1.06 (1H, m, H-12'), 1.03 (3H, s, H-26), 1.02 (1H, m, H-15'), 0.97 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, s, H-27), 0.87 (1H, m, H-1'), 0.83 (3H, s, H-25), 0.78 (3H, s, H-28), 0.76 (3H, s, H-24), 0.69 (1H, m, H-5).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.6 (C-31), 163.7 (C-37), 150.9 (C-20), 142.9 (C-33), 130.7 (C-34), 129.9 (C-35), 129.8 (C-35'), 118.6 (C-32), 116.0 (C-36), 115.8

(C-36'), 109.3 (C-29) 81.1 (C-3), 55.2 (C-5), 50.4 (C-9), 48.2 (C-18), 47.9 (C-19), 42.8 (C-17), 42.8 (C-14), 40.8 (C-8), 40.0 (C-22), 38.6 (C-4), 38.3 (C-1), 38.0 (C-13), 37.1 (C-10), 35.5 (C-16), 34.2 (C-7), 29.8 (C-21), 28.0 (C-23), 27.9 (C-15), 27.4 (C-2), 25.1 (C-12), 20.9 (C-11), 19.2 (C-30), 18.3 (C-6), 18.0 (C-28), 16.1 (C-25), 15.9 (C-26), 15.3 (C-24), 14.5 (C-27).

### 8.6.6. 3 $\beta$ -(benzofuran-2-carbonil)-lup-20(29)-eno (**13**)

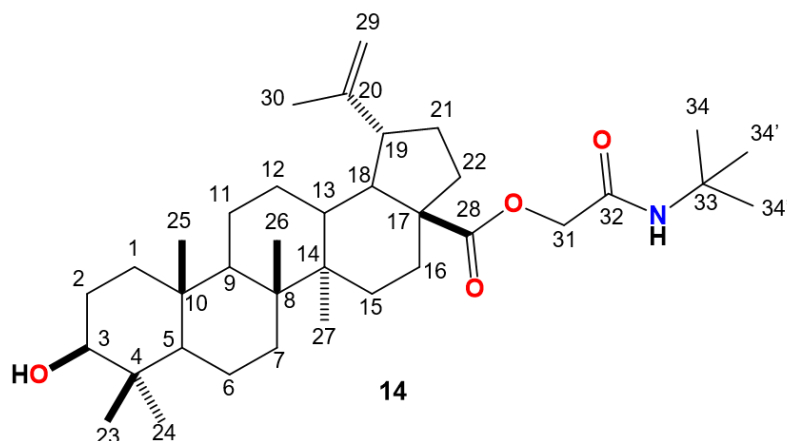


Sólido blanco con p.f. 190-193 °C.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.67 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz, H-38), 7.59 (1H, m, H-35), 7.48 (1H, dd,  $J = 2.9, 0.9$  Hz, H-33), 7.44 (1H, ddd,  $J = 8.5, 7.2, 1.3$ , H-37), 7.30 (1H, m, H-36), 4.68 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-29), 4.56 (1H, dd,  $J = 2.3, 1.3$  Hz, H-29'), 3.19 (1H, dd,  $J = 11.2, 5.2$  Hz, H-3), 2.38 (1H, td,  $J = 11.0, 5.8$  Hz, H-19), 1.93 (1H, m, H-21), 1.86 (1H, m, H-15), 1.68 (3H, s, H-30), 1.65 (1H, m, H-1), 1.63 (1H, m, H-12), 1.60 (1H, m, H-13), 1.57 (1H, m, H-2), 1.53 (1H, m, H-2'), 1.51 (1H, m, H-6), 1.46 (1H, m, H-16), 1.41 (1H, m, H-11), 1.38 (1H, m, H-7), 1.38 (1H, m, H-6'), 1.36 (1H, m, H-22), 1.36 (1H, m, H-16'), 1.33 (1H, m, H-18), 1.29 (1H, m, H-21'), 1.27 (1H, m, H-9), 1.19 (1H, m, H-22'), 1.06 (1H, m, H-12'), 1.03 (3H, s, H-26), 1.02 (1H, m, H-15'), 0.97 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, s, H-27), 0.87 (1H, m, H-1'), 0.83 (3H, s, H-25), 0.78 (3H, s, H-28), 0.76 (3H, s, H-24), 0.69 (1H, m, H-5).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  159.5 (C-31), 155.7 (C-39), 150.9 (C-20), 156.0 (C-32), 127.3 (C-34), 127.0 (C-37), 123.6 (C-36), 122.6 (C-35), 113.2 (C-38), 112.4 (C-33), 109.3 (C-29), (C-3), 55.2 (C-5), 50.4 (C-9), 48.2 (C-18), 47.9 (C-19), 42.8 (C-17), 42.8 (C-14), 40.8 (C-8), 40.0 (C-22), 38.6 (C-4), 38.3 (C-1), 38.0 (C-13), 37.1 (C-10), 35.5 (C-16), 34.2 (C-7), 29.8 (C-21), 28.0 (C-23), 27.9 (C-15), 27.4 (C-2), 25.1 (C-12), 20.9 (C-11), 19.2 (C-30), 18.3 (C-6), 18.0 (C-28), 16.1 (C-25), 15.9 (C-26), 15.3 (C-24), 14.5 (C-27).

### 8.6.7. 3 $\beta$ -hidroxilup-20(29)-enoato de 2-(*tert*-butilamino)-2-oxoetilo (14)



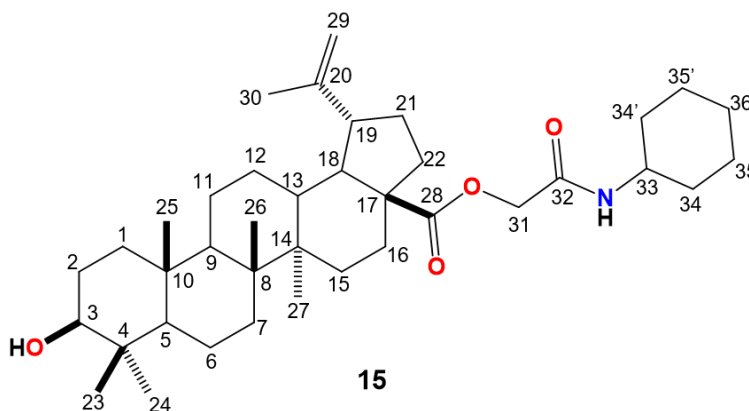
Sólido blanco con p.f. 188-191 °C.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.85 (1H, s, N-H), 4.74 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-29), 4.61 (1H, dd,  $J = 2.1, 1.3$  Hz H-29'), 4.55 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz, H-31), 4.38 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz, H-31'), 3.18 (1H, dd,  $J = 11.2, 4.9$  Hz, H-3), 2.97 (1H, td,  $J = 10.8, 4.6$  Hz, H-19), 2.26 (1H, m, H-16), 2.22 (1H, m, H-13), 1.91 (1H, m, H-22), 1.91 1H, m, H-1), 1.89 (1H, m, H-21), 1.69 (3H, s, H-30), 1.69 (1H, m, H-12), 1.59 (1H, m, H-18), 1.59 (1H, m, H-2), 1.55 (1H, m, H-6) 1.50 (1H, m, H-22'), 1.50 (1H, m, H-21'), 1.50 (1H, m, H-16'), 1.50 (1H, m, H-1'), 1.43 (1H, m, H-11), 1.38 (9H, s, H-34), 1.36 (1H, m, H-7), 1.36 (1H, m, H-6'), 1.26 (1H, m, H-11'), 1.26 (1H, m, H-9), 1.03 (1H, m, H-

12'), 0.99 (3H, s, H-27), 0.96 (3H, s, H-23), 0.90 (3H, s, H-26), 0.82 (3H, s, H-25), 0.76 (3H, s, H-24).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.3 (C-28), 166.5 (C-32), 149.9 (C-20), 109.9 (C-29), 78.8 (C-3), 62.7 (C-31), 56.5 (C-17), 55.3 (C-5), 51.2 (C-33), 50.4 (C-9), 49.3 (C-18), 46.8 (C-19), 42.4 (C-14), 40.6 (C-8), 38.8 (C-4), 38.6 (C-1), 38.1 (C-13), 37.1 (C-10), 36.8 (C-22), 34.3 (C-7), 32.1 (C-16), 30.4 (C-21), 29.7 (C-15), 28.7 (C-34), 27.9 (C-23), 27.4 (C-2), 25.4 (C-12), 20.8 (C-11), 19.3 (C-30), 18.2 (C-6), 16.0 (C-25), 15.9 (C-26), 15.3 (C-24), 14.6 (C-27).

### 8.6.8. 3 $\beta$ -hidroxilup-20(29)-enoato de 2-(ciclohexilamino)-2-oxoetilo (15)



Miel de color amarillo.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.92 (1H, d, 7.5 Hz, N-H), 4.74 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz H-29), 4.62 (1H, s, H-29'), 4.58 (1H, d,  $J = 15.4$  Hz, H-31), 4.50 (1H, d,  $J = 15.4$  Hz H-31'), 3.84 (1H, m, H-33), 3.18 (1H, dd,  $J = 11.3, 4.9$  Hz, H-3), 2.97 (1H, td,  $J = 11.1, 4.6$  Hz, H-19), 2.20 (1H, m, H-16), 2.20 (1H, m, H-13), 1.93 (1H, m, H-34), 1.93 (1H, m, H-22), 1.93 (1H, m, H-21), 1.72 (1H, m, H-12), 1.69 (3H, s, H-30), 1.69 (2H, m, H-35), 1.64 (1H, m, H-18), 1.64 (1H, m, H-1), 1.62 (1H, m, H-12') 1.62 (1H, m, H-2), 1.53 (1H, m, H-6) 1.53 (1H, m, H-22'), 1.53 (1H, m, H-16'), 1.43 (1H, m, H-21'), 0.90 (1H, m, H-1'), 1.43 (1H, m, H-11), 1.38 (1H, m, H-35') 1.35 (1H, m, H-7), 1.35 (1H, m, H-6'), 1.28 (1H, m, H-9), 1.26 (1H, m, H-11'), 1.15 (1H, m, H-34') 0.98 (3H, s, H-27), 0.96 (3H, s, H-23), 0.90 (3H, s, H-26), 0.82 (3H, s, H-25), 0.76 (3H, s, H-24).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.3 (C-28), 166.3 (C-32) 149.9 (C-20), 109.9 (C-29), 78.9 (C-3), 62.5 (C-31), 56.6 (C-17), 55.3 (C-5), 50.4 (C-9), 49.3 (C-18), 47.7 (C-33), 46.9 (C-19), 42.4 (C-14), 40.6 (C-8), 38.8 (C-38.7), 38.2 (C-13), 37.1 (C-10), 36.9 (C-22), 34.3 (C-7), 32.9 (C-34), 32.2 (C-16), 31.5 (C-36), 30.4 (C-21), 29.7 (C-15), 27.9 (C-23), 27.3 (C-2), 25.4 (C-12), 24.6 (C-35), 20.8 (C-11), 19.3 (C-30), 18.2 (C-6), 16.0 (C-26), 16.0 (C-25), 15.3 (C-24), 14.6 (C-27).

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Petrovska, B. B. Historical Review of Medicinal Plants Usage. *Pharmacogn. Rev.* **2012**, 6 (11), 1–6.
- (2) Lahlou, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacol. Pharm.* **2013**, 4, 17–31.
- (3) Kelly, K. *History of Medicine*; Facts On File: New York, **2009**.
- (4) Bottcher, H. *Miracle Drugs*; Zora: Zagreb, **1965**.
- (5) Wiart, C. *Ethnopharmacology of Medicinal Plants*; Humana Press: New Jersey, **2006**.
- (6) Dahanukar, S. A.; Kulkarni, R. A.; and Rege, N. N. Pharmacology of Medicinal Plants and Natural Products. *Indian J. Pharmacol.* **2000**, 37, 213–227.
- (7) Villar del Fresno, Á. M. *Farmacognosia General. Síntesis*: Madrid **1999**.
- (8) Hanson, J. R. *Natural Products: The Secondary Metabolites*; Real Society Of Chemistry: Cambridge, **2003**.
- (9) Bruneton, J. *Farmacognosia*, 2a ed.; Acribia, **2001**.
- (10) Garg, A.; Sharma, R.; Dey, P.; Kundu, A.; Kim, H. S.; Bhakta, T.; Kumar, A. Analysis of Triterpenes and Triterpenoids. *Recent Advances in Natural Products*, Elsevier, **2020**; pp 393–426.
- (11) Vinkier, E.; Smets, E. Morphological and Ultrastructural Diversity of Orbicules in Relation to Evolutionary Tendencies in Apocynaceae s . L . *Ann. Bot.* **2002**, 90, 650.
- (12) Jakaria, M. D.; Tareq, S. Q.; Ibrahim, M.; Bokhtearuddin, S. *Rauvolfia tetraphylla* L. (Apocynaceae): A Pharmacognostical, Phytochemical and Pharmacological Review. *J. Chem. Pharm. Res.* **2016**, 8 (12), 114–119.
- (13) Rohela, G. K.; Bylla, P.; Korra, R.; Reuben, C. Phytochemical Screening and



- Antimicrobial Activity of Leaf, Stem, Root and Their Callus Extracts in *Rauwolfia tetraphylla*. *Int. J. Agric. Biol.* **2016**, *18* (3), 521–522.
- (14) Martinez, J. A.; Velez, H.; Santana, T. An Alkaloid from Two *Rauwolfia* Spp. *Phytochemistry* **1989**, *28* (3), 961–962.
- (15) Brahmachari, G.; Mandal, L. C.; Gorai, D.; Mondal, A.; Sarkar, S. A New Labdane Diterpene from *Rauwolfia tetraphylla* Linn . (Apocynaceae). *J. Chem. Res.* **2011**, *62*, 678–680.
- (16) Kumar, S.; Singh, A.; Bajpai, V.; Kumar, B. Identification, Characterization and Distribution of Monoterpene Indole Alkaloids in *Rauwolfia* Species by Orbitrap Velos Pro Mass Spectrometer. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *118*, 183–194.
- (17) Gao, Y.; Zhou, D.; Kong, L.; Hai, P.; Li, Y.; Wang, F. Rauvotetraphyllines A–E, New Indole Alkaloids from *Rauwolfia tetraphylla*. *Nat. Prod. Bioprospect.* **2012**, *2*, 65–69.
- (18) Gao, Y.; Ping, D. Z.; Li, Y.; Wang, F. Hybrid Monoterpenoid Indole Alkaloids Obtained as Artifacts from *Rauwolfia tetraphylla*. *Nat. Products Bioprospect.* **2015**, *5* (5), 247–253.
- (19) Saleem, M. Lupeol , a Novel Anti-Inflammatory and Anti-Cancer Dietary Triterpene. *Cancer Lett.* **2009**, *285* (2), 109–115.
- (20) Qiao, W.; Zhou, Z.; Liang, Q.; Mosongo, I.; Li, C. Improving Lupeol Production in Yeast by Recruiting Pathway Genes from Different Organisms. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (2992), 1–8.
- (21) Siddique, H. R.; Saleem, M. Beneficial Health Effects of Lupeol Triterpene: A Review of Preclinical Studies. *Life Sci.* **2010**, *88* (2011), 285–293.
- (22) Oliveira-junior, M. S.; Pereira, E. P.; Cristina, V.; Amorim, M. De; Tainã, L.; Reis, C.; Pereira, R.; Diogenes, V.; Costa, S. L. International Immunopharmacology Lupeol Inhibits LPS-Induced Neuroinflammation in Cerebellar Cultures and Induces Neuroprotection Associated to the Modulation of Astrocyte Response and Expression of Neurotrophic and in FI

Ammatory Factors. *Int. Immunopharmacol.* **2019**, *70*, 302–312.

- (23) Lee, C.; Won, J.; Yeon, J.; Wook, S.; Pil, J.; Sung, J. Lupeol Inhibits LPS-Induced NF-Kappa B Signaling in Intestinal Epithelial Cells and Macrophages, and Attenuates Acute and Chronic Murine Colitis. *Life Sci.* **2016**, *146*, 100–108.
- (24) Pitchai, D.; Roy, A.; Ignatius, C. *In Vitro* Evaluation of Anticancer Potentials of Lupeol Isolated from *Elephantopus scaber* L. on MCF-7 Cell Line. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research.* **2014**, *5* (4), 179–185.
- (25) Jiang, Y.; Hong, D.; Lou, Z.; Tu, X.; Jin, L. Lupeol Inhibits Migration and Invasion of Colorectal Cancer Cells by Suppressing RhoA-ROCK1 Signaling Pathway. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2020**, 2–12.
- (26) Saeed, M. E. M.; Mahmoud, N.; Sugimoto, Y.; Efferth, T. Betulinic Acid Exerts Cytotoxic Activity Against Multidrug-Resistant Tumor Cells via Targeting Autocrine Motility Factor Receptor (AMFR). *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 481.
- (27) De Melo, C. L.; Queiroz, M. G.; Arruda Filho, A. C.; Al, E. Betulinic Acid, a Natural Pentacyclic Triterpenoid , Prevents Abdominal Fat Accumulation in Mice Fed a High-Fat Diet. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (19), 8776–8781.
- (28) Yogeewari, P.; Sriram, D. Betulinic Acid and Its Derivatives: A Review on Their Biological Properties. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12* (6), 657–666.
- (29) César, J.; Pérez, B.; Best, C. R.; Llanes, F. Triterpenos Pentacíclicos En Propóleo. *Rev. la Soc. Química del Perú* **2009**, *75* (4), 439–452.
- (30) Noviany, H.; Osman, H. Structure Elucidation of Betulinic Acid from *Sesbania grandiflora* Root *J. Phys. Conf. Ser.* **2021**, 1751.