



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



Facultad de Químico Farmacobiología

**“Estudio Químico Preliminar de *Trixis michuacana* var.
longifolia (D. Don) C.E. Anderson”**

TESIS

**Que para obtener el título de:
Químico Farmacobiólogo**

Presenta:

Luis Daniel Herrera Sanabria

Asesores:

D. Q. Mario Armando Gómez Hurtado

M.C. Ana Karen Villagómez Guzmán

Morelia, Michoacán Mayo de 2019

*Me dijo la abuela: "Recuerda, hijo, que las plantas llevan aquí desde
que la Madre Tierra es Madre. Y nosotros somos sus hijos. Nosotros
llegamos después... Ellas contienen la memoria sagrada de nuestras
raíces."*

Adaluz Márquez

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado y de la M.C. Ana Karen Villagómez Guzmán, con apoyo económico de la CIC-UMSNH.

ÍNDICE

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
P'IMUTANSKUA KARAKATA	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Uso de las plantas medicinales en el México prehispánico	4
2.2. Las plantas medicinales desde el punto de vista etnobotánico, químico, farmacológico y biológico	8
2.3. Panorama actual de la medicina tradicional y diversidad de las plantas medicinales en México	11
2.4. Diversidad cultural y vegetal de plantas medicinales en Michoacán	13
2.5. Medicina tradicional de la cultura <i>p'urhépecha</i>	14
2.6. Uso etnofarmacológico de <i>Trixis michuacana</i> var. <i>longifolia</i> entre los <i>p'urhépecha</i>	19
2.6.1. Clasificación botánica	21
2.6.2. Descripción botánica	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVOS	24
4.1. Objetivo general	24



4.2. Objetivos específicos	24
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	25
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	27
6.1. Colecta e identificación de la especie vegetal	27
6.2. Obtención de extractos.....	27
6.3. Análisis químico del extracto hexánico de hojas de <i>Trixis michuacana</i> var. <i>longifolia</i>	28
6.4. Comparación de extractos de la decocción de las partes aéreas de <i>Trixis michuacana</i> var. <i>longifolia</i>	71
7. CONCLUSIONES	77
8. PARTE EXPERIMENTAL	79
8.1. Material vegetal.....	79
8.2. Obtención de extractos.....	79
8.3. Métodos instrumentales	79
8.4. Estudio Químico preliminar de <i>Trixis michuacana</i> var. <i>longifolia</i>	80
8.5. Comparación de extractos de la decocción de las partes aéreas de <i>Trixis michuacana</i> var. <i>longifolia</i>	85
9. BIBLIOGRAFÍA.....	86



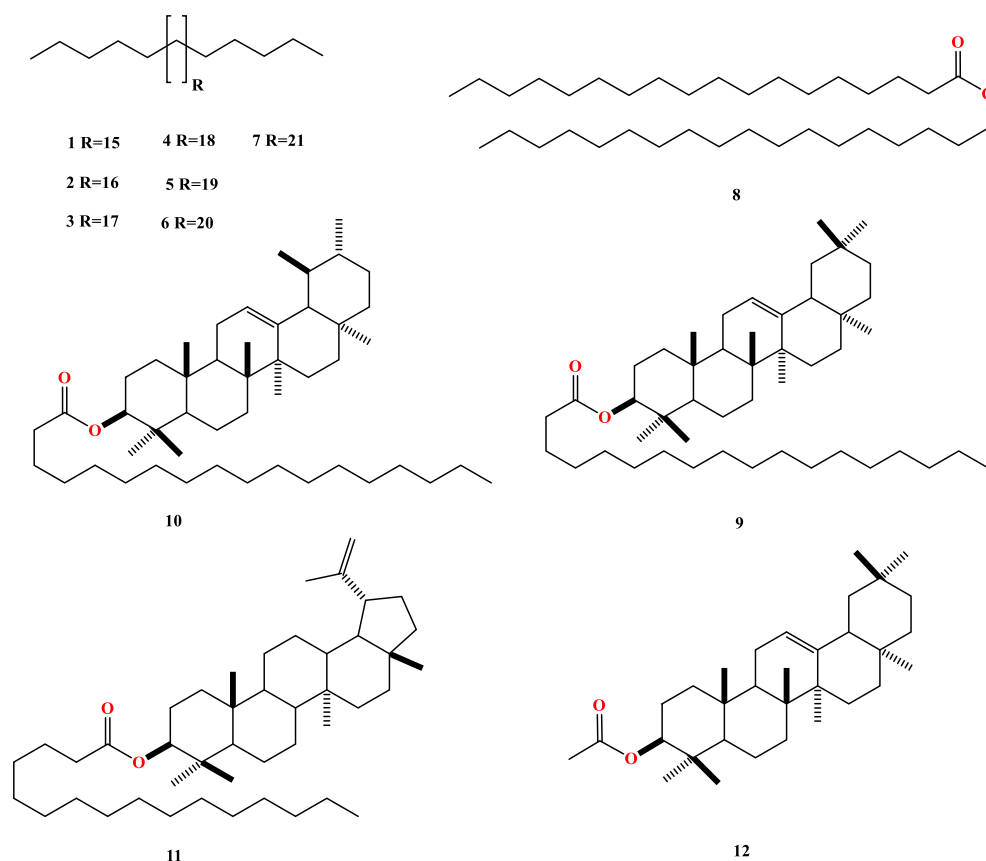
SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

δ	Desplazamiento químico en ppm
μm	Micrómetros
%	Porcentaje
a.C.	Antes de Cristo
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
AcOEt	Acetato de Etilo
cm	Centímetros
da	Señal doble ancha
dd	Señal doble de dobles
dt	Señal doble de triples
EBUM	Herbario de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
EM	Espectrometría de masas
eV	Electronvolts
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
g	Gramos
Hex	Hexanos
Hz	Hertz
Int. Rel.	Intensidad Relativa
J	Constante de acoplamiento
Km^2	Kilómetros cuadrados
L	Litros
m	Metros
MHz	Megahertz
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
m/z	Ion molecular
OMICOP	Organización de Médicos Indígenas de la Cañada de los Once Pueblos
OMIP	Organización de Médicos Indígenas P'urhépechas
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
In	Pulgadas
RE	Retículo Endoplasmático
RMN de ^1H	Resonancia magnética nuclear de Hidrógeno
RMN de ^{13}C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
Rt	Tiempo de retención
s	Señal simple
sa	Señal simple ancha
t	Señal triple
TMS	Tetrametilsilano
VLCFAs	Ácidos grasos de cadenas muy largas



RESUMEN

La medicina tradicional *p'urhépecha* constituye un legado que se ha mantenido a través del paso del tiempo. La búsqueda de compuestos con aplicaciones biológicas y farmacológicas, así como la contribución al rescate de las prácticas medicinales del pueblo *p'urhépecha* encaminó al estudio químico preliminar de la especie vegetal de *Trixis michuacana* var. *longifolia* (*tepári*), el cual es utilizado para tratar infertilidad, padecimientos y malestares relacionados con el ciclo y naturaleza reproductiva de las mujeres. El presente trabajo describe el estudio químico preliminar del extracto hexánico de hojas donde se aislaron e identificaron mezcla de pentacosano (**1**), hexacosano (**2**), heptacosano (**3**), octacosano (**4**), nonacosano (**5**), triacontano (**6**) y hentriacontano (**7**), al ácido octadecanoico octadecil éster (**8**), al estearato de β -amirina (**9**), mezcla de estearato de α - y β -amirina (**10, 9**), palmitato de lupeilo (**11**) y al acetato de β -amirina (**12**). Los compuestos aislados fueron identificados por métodos físicos, químicos, espectroscópicos y espectrométricos.



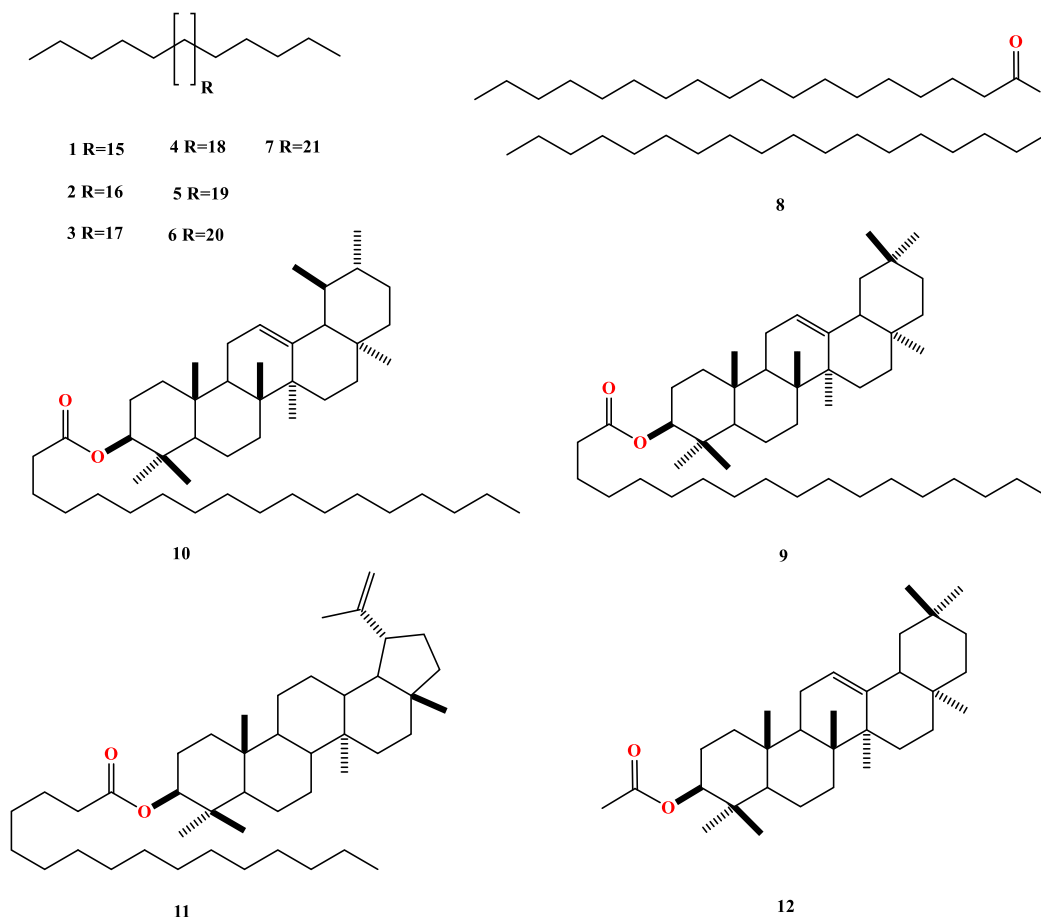
De forma complementaria se realizó la comparación de los espectros de RMN de ^1H de la decocción de las partes aéreas de esta especie vegetal *versus* los espectros obtenidos por el método de maceración a diferentes polaridades; hexanos, cloruro de metileno y acetato de etilo, encontrando que hay correspondencia en algunos patrones de señales.

Palabras clave: Medicina tradicional *p'urhépecha*, *Trixis michuacana* var. *longifolia*, *tepári*, infertilidad, decocción.



ABSTRACT

Traditional *p'urhépecha* medicine constitutes a legacy that has been maintained through the passage of time. Scientific research for compounds with biological and pharmacological applications, as well as the contribution to the rescue of the medicinal practices of the *p'urhépecha* people led to the preliminary chemical study of the plant species of *Trixis michuacana* var. *Longifolia* (tepári), which is used to treat infertility, ailments and discomforts related to the cycle and reproductive nature of women. The present work describes the preliminary chemical study of the hexanes extract of leaves, where a mixture of pentacosane (**1**), hexacosane (**2**), heptacosane (**3**), octacosane (**4**), nonacosane (**5**), triacontane (**6**) and hentriacontane (**7**), the acid. octadecanoic octadecyl ester (**8**), β -amyrin stearate (**9**), mixture of α - and β -amyrin stearate (**10,9**), lupeil palmitate (**11**) and β -amyrin acetate (**12**) were isolated and identified. The isolated compounds were identified by its physical, chemical, spectroscopic and spectrometric data.



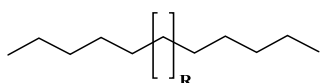
In addition, comparison of the ^1H NMR spectra of a decoction sample of the aerial parts of this plant species versus the spectra obtained by the maceration method was done with different polarities: hexanes, methylene chloride and ethyl acetate, finding that there is an adequate correspondence in their signal patterns.

Key words: Traditional medicine *p'urhépecha*, *Trixis michuacana* var. *Longifolia*, *tepári*, infertility, decoction.

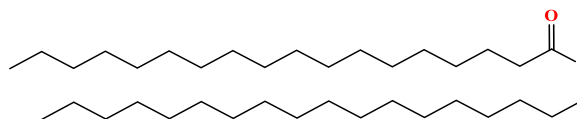


P'imutanskua karakata

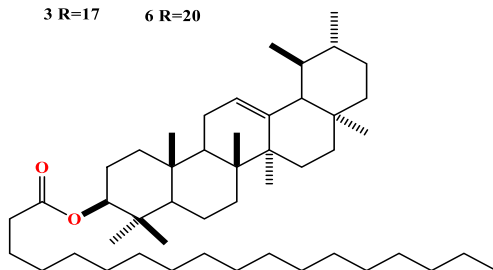
Sipiata p'urhépecha jandeti shipita enga pauani menku ishĩ k'uiripu juremguarini jaraka untani. Ima jiringanskua mamar ambe'pa jatsikuni biológicu ka farmatológicu ambé, ishĩ eski na jirinhaska mamar ambé pa juchachi no tsitani shipita púrhépecha, ishĩ xanharatarati indé jorenguarikua químicaru iamu anhatapu shipitaricha comishik indé *Trixis michuacana* var. *longifolia* (tepári), enga marutanka pa imecha enga no uka kondpini, naina p'ameiakua ambé indé naja ióni jauaka kutsĩ pa kondpini. Arí anchikuarikua uandantsashini iamu jorenguarikua indé anhatapu shipitariecha enga chkuriecha p'itarukunga enga xenhantsaka jiuetakata pentacosano (1), hexacosano (2), heptacosano (3), octacosano (4), nonacosano (5), triacontano (6) y hentriacontano (7), ácido octadecanoico octadecil éster (8), al estearato de β -amirina (9), jiuetakata de estearato de α y β -amirina (10, 9), palmitato de lupeilo (11) y al acetato de β -amirina (12). Jiuetakata enga jarshpaaka iamu xenhantsati mama jashĩ niatanhapari físicos, químicos, espectroscópicos y espectrométricos.



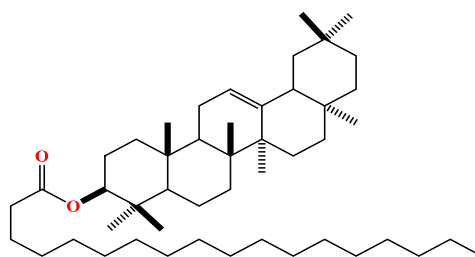
1 R=15 4 R=18 7 R=21
2 R=16 5 R=19
3 R=17 6 R=20



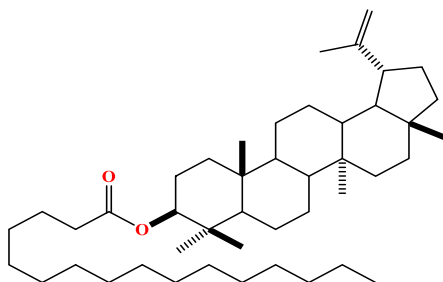
8



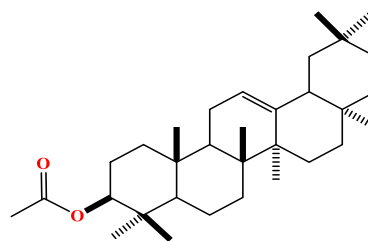
10



9



11



12



Mama jashĩ ambé maku unhantsapari untatishĩ terukutanstskua ma RMN ka ^1H iamu imechangu enga chkuripu p'itarukukatacha ka imecha enga p'inhaka ni ueradini engatsi arika maceración mama jashĩ polaridades hexanos, cloruro de metileno y acetato de etilo, xentsapari mama jashĩ ambé enga indé anapuecha maku jaranhaka.

Uandakua clave: Shĩpiata p'urhépecha, *Trixis michuacana* var. *longifolia*, tepári, no uka kondpini, chkuripu p'itarukukaya



1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido el acompañante más antiguo del ser humano, debido a su uso como alimento, medicina, ornato, veneno, entre otros. Desde la prehistoria es bien conocido que las plantas pueden poseer una de estas características, esto permitió al ser humano establecer cuáles de ellas eran benéficas o perjudiciales para el organismo. Lo que condujo a establecer los sistemas de medicina tradicional en la mayoría de las antiguas civilizaciones y que a pesar del tiempo aún se mantienen vivas las prácticas ancestrales por las poblaciones indígenas del mundo.

La medicina tradicional hace referencia al conocimiento y uso terapéutico adquirido a lo largo del tiempo para el reconocimiento de las plantas medicinales cuyos componentes activos son utilizados en el tratamiento de enfermedades, así como la manera de preparación o las dosis que debe utilizarse (Ocegueda *et al.*, 2005). Esta tradición ha sido un proceso dinámico a través de la historia y representa la mezcla de culturas con adiciones, supresiones y modificaciones. En muchas regiones de México la principal fuente de flora medicinal que se usaba, y aún se usa, reside en los recursos vegetales de la región, lo cual explica el amplio y profundo conocimiento tradicional que se tiene sobre las propiedades curativas de las plantas (Zepeda & White, 2008).

Existen muchas razones por las cuales los científicos y las industrias farmacéuticas han prestado atención al estudio y conservación de la biodiversidad de las regiones indígenas de nuestro país, entre la que destaca la importancia de las plantas medicinales como nuevas fuentes en el desarrollo de nuevos fármacos, cada especie tiene un valor etnofarmacológico distinto, que se encuentra explícito en el conocimiento colectivo de las comunidades originarias basado en el juicio empírico, resultado de innumerables observaciones y experimentos, adquiridos generacionalmente desde tiempos prehispánicos.

Las estrategias para elegir qué plantas investigar en la búsqueda para nuevos productos médicos incluyen la selección aleatoria de plantas sobre la base de la afinidad taxonómica, o la persecución de las pistas sobre los conocimientos etnobotánicos (Magaña *et al.*, 2010). Debido al conocimiento que aún tienen las comunidades



p'urhépecha, sobre las diversas especies medicinales es importante rescatar la información, con la finalidad de plasmarla en escritos, contribuyendo a sentar las bases para extender su uso de manera racional (Bello, 2006).

Según Cruz, 2017, en cuanto a la eficacia terapéutica de las plantas medicinales existen diferentes parámetros que contribuyen a demostrar la eficacia de un preparado medicinal a partir de especies vegetales, pero no en todos tienen la misma relevancia; entre estos parámetros se encuentran:

- El uso tradicional de una determinada especie vegetal, para un fin terapéutico determinado, avala en principio su eficacia y seguridad demostrada durante años; sin embargo, no constituye una prueba inequívoca de su eficacia.
- El conocimiento de sus principios activos por los estudios y resultados de los ensayos farmacológicos, así como los conocimientos acumulados a partir de la experiencia clínica; estudios epidemiológicos, estudios de casos, ensayos clínicos, etcétera; son los que definitivamente sustentarán la demostración de la eficacia en los seres humanos.

En la elección de la forma más adecuada para la administración de una planta medicinal hay que tener en cuenta el objetivo terapéutico, las características de los pacientes, la duración del tratamiento y la vía de administración. Si se necesita una acción sistémica del principio activo, la vía de elección es la oral (Castillo & Martínez, 2016).

El género *Trixis* fue descrito en 1756 por Patrick Browne en “*The civil and Natural History of Jamaica*”, pertenece a la familia Asteraceae; se halla ampliamente distribuido desde el sur de los Estados Unidos de América, México (con la mayor diversidad) y América central (Katinas, 1996). Algunos estudios etnobotánicos de este taxón han proporcionado información del uso tradicional de algunas especies, pero químicamente muy pocas cuentan con un estudio fitoquímico.

El propósito del estudio químico preliminar de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, usada en la medicina *p'urhépecha*, pretende aislar e identificar sus metabolitos secundarios mayoritarios, teniendo en cuenta el valor etnofarmacológico que ésta posee, para así relacionarlos con la actividad biológica descrita.



La forma farmacéutica de administración de *Trixis michuacana* var. *longifolia* en la medicina tradicional *p'urhépecha* es la decocción, la cual emplea las partes aéreas de la planta (tallo, hojas y flores) junto con chocolate y piloncillo.

En este trabajo se describen los resultados obtenidos del estudio químico preliminar de la especie *Trixis michuacana* var. *longifolia*, conocida con el nombre *Tepári* (adj. estar gordo o grueso) en la región *p'urhépecha* del estado de Michoacán. A la fecha no cuenta con un estudio químico por lo cual los datos obtenidos sentarán la base para futuras investigaciones, para así lograr determinar la eficacia de esta especie en el tratamiento de la infertilidad y naturaleza reproductiva de las mujeres.

Adicionalmente al estudio químico preliminar de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, se presenta la comparación de los espectros de RMN de ^1H obtenidos de la bipartición de la decocción de sus partes aéreas *versus* los espectros de RMN de ^1H de las partes aéreas obtenidos por maceración. Logrando así determinar la naturaleza química y abundancia de los metabolitos secundarios presentes en la decocción y permitir establecer que se pueden extraer el mismo tipo de metabolitos presentes en la extracción por maceración en hexanos, cloruro de metileno y acetato de etilo.



2. ANTECEDENTES

2.1. Uso de las plantas medicinales en el México prehispánico

El ser humano desde su origen tuvo que aprender a cazar, vestirse y curarse para buscar su bienestar, se volvieron observadores cuidadosos de la naturaleza. Se vieron en la necesidad de estudiar la conducta de los animales, cuando un animal estaba enfermo éste consumía una determinada especie vegetal, lo cual llamó la atención de los cazadores. Probablemente uno de nuestros antepasados al sentirse enfermo imitó esa conducta del animal y sanó en el mejor de los casos, por medio del ensayo y error (además de su condición de nómada recolector) fue seleccionando vegetales o animales que tenían la propiedad de sanar o mitigar el dolor, pero también de sustancias tóxicas que le podían producir alucinaciones o incluso la muerte. Estos fenómenos aparentemente inexplicables fueron asociados con las nacientes creencias mágico-religiosas que ya debían estar más o menos desarrolladas para aquellos tiempos (Pérez, 1997; Cortez *et al.*, 2004).

Con el paso de los años, al ser sedentarios esos y otros conocimientos, se consolidaron y el desarrollo de un lenguaje estructurado permitió su difusión con mucho mayor eficacia; en tanto que la jerarquización de labores en las sociedades primitivas permitió que algunos integrantes del grupo comenzaran a especializarse en el manejo y utilización de plantas, animales y minerales con fines curativos (Pérez, 1997; Pavía *et al.*, 1998; Cortez *et al.*, 2004).

La civilización humana en el territorio mexicano data aproximadamente del año 35,000 a.C., la historia de Mesoamérica se inicia hacia el año 2,500 a.C., es a partir de este momento cuando se inician los asentamientos de las regiones en pequeñas aldeas. Para los pueblos prehispánicos, la naturaleza representaba el elemento sustancial de su supervivencia; la vida provenía de la madre tierra, el sol, la luna, los astros y las estrellas, el agua, el maíz, la flora y la fauna simbolizaban el origen de su existencia (Callado, 2010).



Un suceso notable de la herbolaria mexicana es el desarrollo de los jardines temáticos del mundo prehispánico de América, donde se fomentaba la admiración, el cuidado y el aprovechamiento de la flora silvestre mexicana que datan del siglo XV. Fueron Nezahualcóyotl y Moctezuma Ilhuicamina, emperadores aztecas, quienes tuvieron la visión de desarrollar las primeras colecciones vivas de plantas organizadas por su utilidad, como hortalizas, árboles frutales, plantas ornamentales, plantas aromáticas y plantas medicinales. Los más representativos fueron los jardines de Chapultepec y de Texcoco, construidos por órdenes de Nezahualcóyotl; y también las huertas de Iztapalapa y Oaxtepec, desarrolladas por mandato de Moctezuma (Arizaga *et al.*, 2018).

A su llegada al territorio mexicano los españoles se encontraron con una gran riqueza de medicina practicada por los principales grupos indígenas, estos poseían un amplio conocimiento sobre la flora silvestre, así como también de la anatomía del cuerpo humano. Los conquistadores quedaron admirados de las prácticas y habilidades que estos poseían sobre la curación de las enfermedades (Cosme, 2008). Los principales datos escritos que se poseen hoy en día sobre la medicina y la herbolaria de las principales culturas mesoamericanas fueron documentados en códices que se realizaron posteriormente a la llegada de los conquistadores.

En 1522 el Virrey Don Antonio de Mendoza, encomendó a Martín de la Cruz médico indígena y alumno del Real Colegio de la Santa Cruz Tlatelolco, documentar las plantas medicinales prehispánicas de México. El resultado fue el primer herbario “*Libellus de medicinalibus indorum herbis*” que registra la medicina mesoamericana escrito en náhuatl, a través de dibujos prehispánicos a color de 185 plantas, además de comentarios clínicos y fórmulas sobre su uso. Años más tarde fue traducido al latín por Juan Badiano quien era originario de Xochimilco y profesor del Colegio de la Santa Cruz Tlatelolco (Rios *et al.*, 2012). Actualmente es conocido como “Librito sobre las hierbas medicinales de los indios o Códice de la Cruz-Badiano”, se trata de la fuente bibliográfica más antigua donde se pueden encontrar plantas autóctonas del México antiguo.



Otro notable escrito realizado por Fray Bernardino de Sahagún, con respecto a la cultura azteca, fue su trabajo conocido como *Códice Florentino*, escrito en náhuatl, y su versión en español como “Historia General de las cosas de la Nueva España” (Cortez et al., 2004). Donde recopiló datos acerca de los indígenas, de quienes recababa información en náhuatl. La obra se concluyó en 1569, con doce tomos escritos en náhuatl, en el tomo décimo se dedica exclusivamente a las enfermedades y su tratamiento, donde se documentan cerca de 300 plantas silvestres mexicanas que eran usadas con fines medicinales.

El primer relato científico sobre las plantas americanas se le atribuye al médico sevillano Nicolás Monardes quien en 1569 escribió el primer tratado de las plantas medicinales de la Nueva España. Lo interesante de esta obra es que su autor nunca viajó a la Nueva España; él describió las plantas que le llegaron a sus manos y que trataba de cultivar en un jardín botánico. En esta obra se describen por primera vez la pimienta gorda, la caña fístula, la raíz de Michoacán, el tabaco, el sasafrás, la piña, la guayaba, la coca y la escorzonera (Gómez, 1997).

Es bien sabido, que en 1570 había llegado a la Nueva España el doctor Francisco Hernández, enviado por Felipe II, con el encargo de examinar y describir los géneros y las formas de plantas, animales y minerales de la Nueva España, e investigara sus virtudes y usos para beneficio de la humanidad (Ríos et al., 2012). Durante varios años recorrió el territorio recopilando el mayor número posible de especímenes y recabando información sobre ellos de los grupos indígenas. El resultado de su investigación se editó en varios tomos que tituló “*Historia Natural de la Nueva España*” (Arizaga et al. 2018). En este documento se registró un aproximado de 3,000 plantas, la mayoría con su nombre autóctono, su descripción morfológica, usos e información del lugar donde habitaban, la mayoría de estas fueron enviadas a España, esto contribuyó al desarrollo de nuevas medicinas, enriqueciendo la farmacología universal.

La conquista ocasionó una profunda transformación sociocultural y un intercambio de especies animales y vegetales entre América y Europa, de tal forma que la herbolaria medicinal mexicana incorporó desde entonces no sólo plantas nativas, sino también



europeas. Algunos estudios señalan que a lo largo de toda la etapa colonial se incorporaron de Europa más del 50% de las plantas medicinales usadas actualmente (Zepeda y White, 2008). Este hecho no modificó los conocimientos tradicionales, sino que fueron ampliados por las nuevas especies introducidas dando un nuevo uso, así como su respectivo nombre indígena.

Por los motivos anteriormente señalados, es evidente que en el México actual coexisten la medicina “científica” y la “tradicional mexicana”, y ambos modelos médicos tienen un gran interés en las plantas medicinales. Sin embargo, debido a las exigencias contemporáneas, ha tenido que renovarse, fusionando los conocimientos de los pueblos prehispánicos con las prácticas de la conquista, las mestizas y las urbanas, e incorporando elementos de otras culturas médicas (Berenzon *et al.*, 2002). La terapéutica medicinal prehispánica se ha mantenido vigente hasta nuestros días gracias a los pueblos indígenas quienes aún conservan el conocimiento antiguo de nuestro país.



2.2. Las plantas medicinales desde el punto de vista etnobotánico, químico, farmacológico y biológico

Las plantas medicinales han asumido un papel fundamental en el mejoramiento de la salud humana, un número significativo de los medicamentos actuales se producen directa o indirectamente de las plantas medicinales. En los últimos años se ha estudiado a las especies medicinales empleadas en la medicina tradicional desde el punto de vista etnobotánico, químico, farmacológico, biológico y toxicológico.

El conocimiento tradicional de los pueblos indígenas sobre la relación que existe entre sus habitantes, hábitat y naturaleza, les ha permitido desarrollar sistemas de medicina tradicional a través de muchas generaciones, sin embargo, carecen de un carácter científico. En nuestro país son todavía éstos quienes poseen de una manera más arraigada las prácticas tradicionales sobre el uso de sus recursos vegetales y son frecuentemente menospreciadas.

Por esta razón surge la etnobotánica, la cual se define como el campo científico que estudia las interrelaciones que se establecen entre el hombre y las plantas, a través del tiempo y en diferentes ambientes. Los elementos de las interrelaciones hombre-planta, motivo de estudio de la etnobotánica, están determinadas principalmente por dos factores: el medio ambiente (biodiversidad) y la cultura. Al estudiar dichos factores a través del paso del tiempo, se puede apreciar, que éstos cambian cuantitativa y cualitativamente, el medio ambiente por modificaciones en sus componentes, además por la acción del hombre y la cultura por la acumulación y, a veces, por la pérdida del conocimiento tradicional. La etnobotánica es un campo interdisciplinario que comprende el estudio e interpretación del conocimiento, significación cultural, manejo y usos tradicionales de los elementos de la flora de las distintas regiones del país (Barrera, 2008).

El uso de las plantas medicinales por los pueblos indígenas es sumamente importante porque representan el resultado de un conocimiento empírico, a veces probado a través de generaciones, lo cual permite a la etnobotánica ser un campo de



difusión de los conocimientos tradicionales con un carácter científico teniendo una aceptación mayor en la sociedad actual.

Las plantas, al igual que otros organismos poseen un metabolismo, éste a su vez se divide en: metabolismo primario; responsable de ofrecer los nutrientes necesarios para el crecimiento, desarrollo y preservación de éstas (carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos); y metabolismo secundario, el cual sintetiza compuestos de bajo peso molecular a manera de respuesta de defensa química contra el daño de cierto tipo de depredadores, para la atracción de insectos polinizadores o como respuesta al clima abiótico. Los principales metabolitos secundarios de acuerdo con su naturaleza química son agrupados en tres diferentes grupos: compuestos fenólicos, terpenoides/terpenos y alcaloides (Waizel *et al.*, 2005).

La Fitoquímica es la ciencia dedicada al estudio de los componentes químicos (terpenoides, alcaloides y fenólicos) mediante distintos métodos fisicoquímicos. El interés químico de las plantas medicinales radica en la determinación de la presencia de metabolitos secundarios en las distintas partes de la planta (raíz, tallo, hoja, flores y semillas), ya que se encuentran en distintas concentraciones.

En los últimos años se ha incrementado notablemente el uso de las plantas medicinales para tratar problemas de salud básicos. En México se estima que nueve de cada diez habitantes han empleado de alguna manera la medicina tradicional. Las plantas medicinales pueden comportarse como verdaderos medicamentos ya que contienen mezclas complejas de ácidos grasos, esteroides, alcaloides, flavonoides, terpenoides, glicósidos, taninos, saponinas, entre otros que pueden tener una actividad farmacológica en nuestro organismo (Swabha, 2018).

Uno de los métodos para la selección de especies vegetales potenciales para el desarrollo de nuevas investigaciones científicas, está definido por una actividad farmacológica, lo que hace que las especies empleadas en la medicina tradicional sean fuentes potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos. Existe una hipótesis acerca de que cualquier planta que posea una actividad clínica tiene que poseer un principio activo; sin embargo, el efecto farmacológico deseado puede no ser causado por un sólo



componente sino por la combinación de dos o más, que resulta en un sinergismo farmacodinámico (Mohamed *et al.*, 2012; Prieto *et al.*, 2004). Las plantas medicinales están compuestas de principios activos que, una vez ingeridos, se absorben, metabolizan, distribuyen y excretan siguiendo las mismas vías que los fármacos (Baulies *et al.*, 2009).

El interés biológico se ve reflejado en sus componentes químicos (terpenoides, polifenoles y alcaloides) que inducen efectos bioactivos en organismos vivos. Los principales usos de éstos en el área biológica son como agentes terapéuticos directos, poseen una amplia gama de aplicaciones clínicas, bioquímicas y farmacológicas. Uno de los problemas que se enfrentan en el área biológica es la alta tasa de fracaso para reproducir la actividad biológica de extractos de plantas individuales, por lo cual se requiere un análisis químico que asegure la consistencia de estos en una determinada especie vegetal (Mohamed *et al.*, 2012).

En México existen alrededor de 4,000 especies de plantas con flores (aproximadamente 15% de la flora total) que tienen atributos medicinales, es decir, una de cada siete posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo sólo en 5% de estas especies (Ocegueda *et al.*, 2005).

Lo anterior abre un gran panorama para realizar investigaciones conjuntas con los pueblos indígenas del país en lo que respecta a estudios etnobotánicos y de estos deriven los estudios químicos, farmacológicos y biológicos de la diversa flora medicinal de cada una de sus regiones, con el único objetivo de conservar y proteger el conocimiento tradicional, contribuyendo además al desarrollo sustentable y uso racional de sus recursos vegetales.



2.3. Panorama actual de la medicina tradicional y diversidad de las plantas medicinales en México

Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de las plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza rutinariamente la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Akerele, 1993; Sheldon *et al.*, 1997; Katewa *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2004; Bermúdez *et al.*, 2005).

En el caso de México se estima que más del 90% de la población utiliza la medicina tradicional o herbolaria para el tratamiento de diversas enfermedades (Berenzon *et al.*, 2009; Gum *et al.*, 2009). Existe una extensa variedad de tratamientos fitoterapéuticos que forman parte de la medicina tradicional mexicana, soportada por aproximadamente 4,500 especies de plantas medicinales, lo cual lo posiciona en el segundo lugar a nivel mundial en cuanto al número de especies registradas (Barragán, 2006; García de Alba *et al.*, 2011).

El territorio mexicano es una región que posee una gran riqueza cultural debido al gran número de grupos étnicos que lo habitan y al alto grado de desarrollo civilizatorio alcanzado en la antigüedad. La riqueza biológica de México, su diversidad cultural, así como su larga historia de poblamiento, se ha traducido en el desarrollo de una vasta tradición etnobotánica, la cual incluye el conocimiento, el uso y el manejo de una gran cantidad de especies vegetales entre las comunidades locales y su entorno vegetal (Caballero *et al.*, 1998).

Existen cerca de 50 grupos étnicos en las diferentes regiones del país por lo que el uso de las plantas es innegable, esta sabiduría de origen tradicional continúa proporcionando salud y bienestar a la población indígena de nuestro país (Hurtado *et al.*, 2006). La apreciación de estos conocimientos y saberes tradicionales de las plantas medicinales, dan una identidad cultural específica a cada uno de estos grupos indígenas.



La extraordinaria riqueza florística, que consta de 26,500 especies, de las cuales aproximadamente 9,500 son endémicas, ubica a México en el cuarto lugar mundial y ha permitido que la medicina tradicional floreciera desde la época prehispánica (Huerta, 1997). Las plantas medicinales en México se utilizan para tratar diversos padecimientos como: afecciones de la piel, alopecia, caspa, herpes bucal, sarna, anemia, varices, presión arterial, cálculos biliares, cólicos, diabetes, epilepsia, insomnio, trastornos del aparato reproductor, tos, dolor de garganta, pecho y pulmón, así como cálculos renales, traumatismos de golpes, heridas, torceduras, gangrena, fiebre y hernias (Muñeton, 2009; Torres *et al.*, 2013).

Las plantas curativas son el recurso terapéutico por excelencia de la medicina tradicional mexicana, que en gran parte es aún rescatable y puede constituir un importante elemento para implementar nuevos planes de salud, que combinen el conocimiento popular con el científico (Canales *et al.*, 2006). Estos recursos terapéuticos lejos de ser desplazados por el desarrollo de nuevos medicamentos ocupan un lugar importante en la atención primaria de la salud en México.

La Secretaría de Salud en 2001 crea la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM). Actualmente se cuenta con la segunda edición vigente desde 2013, este documento tiene como propósito establecer los lineamientos oficiales relacionados con el control de calidad, destinados a asegurar la idoneidad de las plantas utilizadas, haciendo especial énfasis en su identidad (nombre científico) y optimización. Además, trata de establecer los métodos de análisis que deberán cumplir las plantas y los derivados de ellas utilizados en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios, contribuyendo al mejoramiento de la calidad de los productos y a su uso adecuado, así como difundir y promover el potencial terapéutico de la flora de México (Ocegueda *et al.*, 2005). Sin embargo, las especies medicinales incluidas en la FHEUM son muy pocas en comparación del total de la flora medicinal de nuestro país.



2.4. Diversidad cultural y vegetal de plantas medicinales en Michoacán

El Estado de Michoacán posee una gran riqueza cultural, derivada principalmente de tres etnias. De acuerdo con el Censo Poblacional y Vivienda de 2010, en el estado hay 136,662 habitantes indígenas. Los nahuas representan el 9.17% de la población y se concentran principalmente en la región costera de Aquila. Los mazahuas están representados por el 5.43% de la población y habitan al Oriente de Michoacán. Los *p'urhépecha* son la etnia más representativa de la entidad con un 88.14% de la población, y se concentra en 21 municipios del Centro-Norte del estado (INEGI, 2010; Arizaga *et al.*, 2018).

El Estado de Michoacán figura en el sexto lugar en diversidad vegetal en el país, producto de la gran variedad de climas, suelos y topografía que posee (Arizaga *et al.*, 2018). Esta entidad tiene una gran biodiversidad que se ve contrastada en sus diversas regiones donde crecen un gran número de especies medicinales que son aprovechadas por las diferentes comunidades indígenas del estado.

En Michoacán existen aproximadamente 5,379 especies de plantas de las cuales cerca del 20% son usadas con fines terapéuticos en la medicina tradicional *p'urhépecha* (Alarcón, 2009). La región *p'urhépecha* es un rico reservorio de biodiversidad que incluye plantas leñosas y herbáceas las más importantes pertenecen a los géneros *Quercus* L., *Gnaphalium* L., *Senecio* L., *Eupatorium* L., *Bidens* L., *Stevia* Cav., *Pinus* L., *Cirsium* Mill., *Adiantum* L. y *Dalea* L. (García *et al.*, 2018).



2.5. Medicina tradicional de la cultura *p'urhépecha*

Actualmente la superficie que abarca las comunidades *p'urhépecha* es de 6,000 Km² en el actual Estado de Michoacán de Ocampo, situado geográficamente en el Centro-Occidente de la República Mexicana (INEGI, 2010). A su vez la Región *p'urhépecha* está conformada por cuatro regiones (Figura 2.5.1), se identifican como:

- Región Lacustre (*Japondarhu* o *Inchamikuarhu* “lugar del lago”).
- Región Ciénega de Zacapu (*Tsirontarhu* o *Tsirondarhu* “la Ciénega”).
- Región de la Cañada de los Once Pueblos (*Eraxamani* o *Ichangueni* “Cañada de los Once Pueblos”).
- Región de la Meseta o sierra (*Juatarhu* o *P'ukuminturhu* “Meseta Boscosa”).

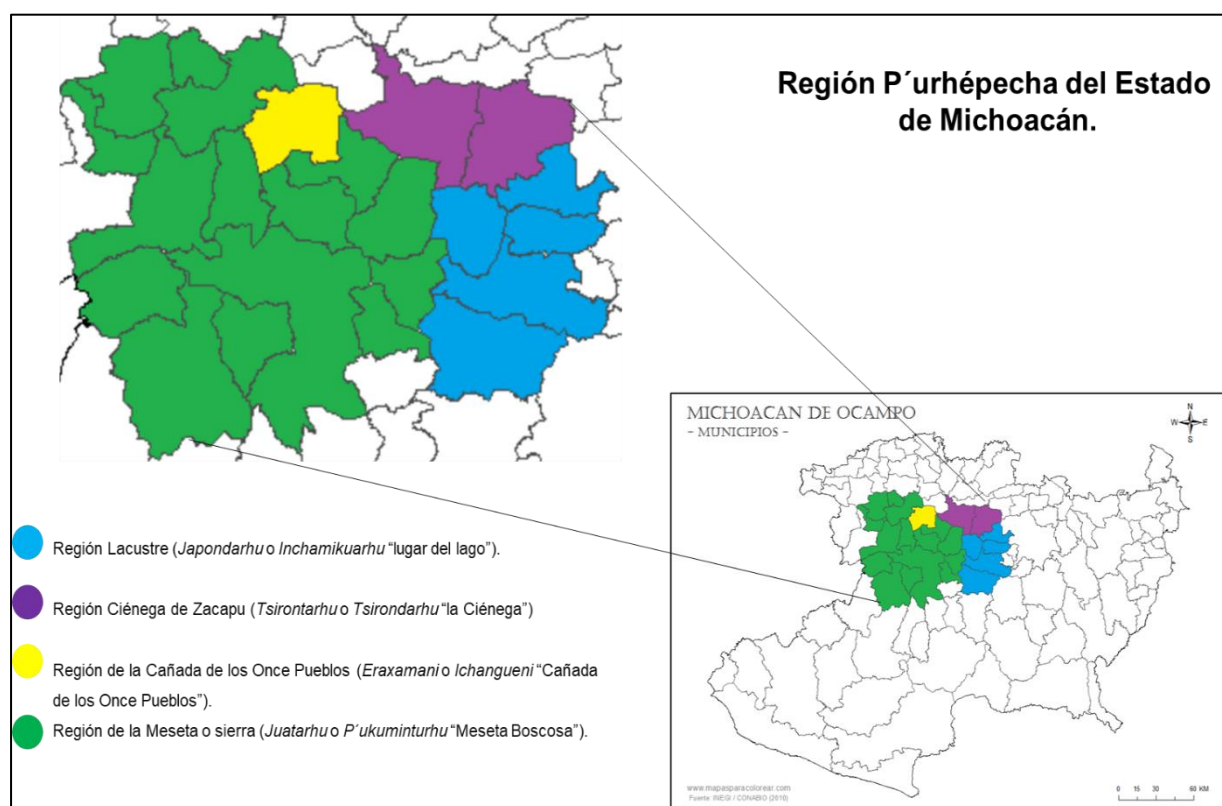


Figura 2.5.1. Región *p'urhépecha* del Estado de Michoacán (Fuente: INEGI. Marco Geoestadístico Municipal 2010, versión 5.0.)

El entorno ecológico constituye no sólo el soporte material en que se reproducen y se distinguen los pueblos indígenas, sino que es también un referente de identidad y un



espacio de conocimiento (Bonfil & Pont, 1999; Vázquez *et al.*, 2011). Algo que caracteriza a estas comunidades es la presencia de un *ekuario* o solar, espacio establecido dentro de la misma casa de las familias *p'urhépecha*, donde, por lo general se cultivan especies con el fin alimenticio, medicinal, forraje, ornamental, entre otros.

La medicina tradicional *p'urhépecha* se practica a lo largo de las cuatro regiones, ya que se tiene un vasto vínculo con la naturaleza, y principalmente las plantas medicinales (*anhatapu sipiati*) les han proporcionado a las comunidades *p'urhépecha* ser grandes conocedores de la flora medicinal, así como de los beneficios de ésta en la prevención y cuidado de la salud de su población.

El pueblo *p'urhépecha*, así como los demás pueblos mesoamericanos en su gran diversidad cultural, idealizaban su estado de salud en un sistema de cosmovisión muy relacionado con las fuerzas de la naturaleza. Para ellos el cuerpo humano (*curipita huacarekua*) era como un microcosmos en el cual se reflejaba el universo y las creaciones cíclicas. La creencia de un universo tripartita conformado por el cielo (*ahuándarhu*), la tierra (*echerendo*) y el inframundo (*K'umajchukuarhu*), todas ellas constituían fuerzas anímicas que fortalecían o dañaban el cuerpo humano (Alarcón, 2009; Callado, 2009).

La salud y la enfermedad son conceptos que siempre han existido a lo largo de la historia, pero con distintas interpretaciones y significados. Por su parte los *p'urhépecha* explican la enfermedad y la salud como una dualidad (frío/caliente; *ts'irapiti / jorhrepiti*; luz/oscuridad; *Charharusi/ pápk'andkua*) (Luna, 2006). La cualidad caliente (*jorhrepiti*) se relaciona con el espacio celeste, con el sol, luz, claridad y con la energía masculina. La cualidad fría (*ts'irapiti*) se asocia con el inframundo, con la luna, lo acuático, lo subterráneo, la oscuridad y con la energía femenina (Alvarez *et al.*, 2017). Por lo tanto, el desequilibrio entre estas fuerzas vitales provoca la enfermedad (*p'amenchekua*).

Las enfermedades frías (*p'amenchekua ts'irapiti*), por regla general se producen por la intrusión de la calidad fría, que puede llegar al organismo por medio de una corriente de aire en el momento que el hombre se encuentra débil o por la ingestión de alimentos fríos. Estas enfermedades se manifiestan como fenómenos de incapacidad, que



aminoran o anulan las funciones sensoriales y motoras. No son exteriormente notables y se hacen patentes por el dolor o por la inmovilidad (López, 1993).

Las enfermedades de naturaleza caliente (*p'amenchekua jorhrepiti*), en cambio, se generan en el interior mismo del cuerpo o provienen de la exposición prolongada a los rayos solares. Se manifiestan cuando el calor interno sale a la superficie en forma de erupciones de la piel, asperezas e irritaciones, y pueden provocar fiebre, aunque ésta no es señal inequívoca de que el mal sea caliente (López, 1993).

De acuerdo con lo anterior, las prácticas medicinales entre los *p'urhépecha* se centran en recuperar el equilibrio perdido y las plantas medicinales son uno de los principales recursos empleados por los médicos *p'urhépecha*. Las prácticas terapéuticas son numerosas y distintas, cuya repetibilidad y duración es en función de su éxito con el paciente: cada terapeuta tiene a su disposición un conjunto de técnicas que pone en acción, una vez determinada la causa etiológica de la enfermedad.

Dentro de las comunidades *p'urhépecha*, existen los curanderos (*tsinajpiri* o *shurhíjki esheri*), parteras (*pikurpiri*), sobadores (*parhijpiri*), brujos (*sikuame*), hueseros (*kutururantani uní*), hierberas (*mamar jas huitzakua jamantspini*). Cada uno de estos desempeña una función específica, atendiendo las afecciones más comunes de sus habitantes. Estos emplean las plantas (a veces junto con animales) en remedios herbolarios y sus formas de administración más comunes son: infusión, cocimientos o decocción (*jamakata*), maceración en alcohol (*alcoholejatziman*), cataplasmas, pomadas (*jáhikua*), tinturas (*atakua karakatakua*) y emplastos.

El conocimiento tradicional *p'urhépecha* encuentra su máxima expresión en el uso de un amplio número de especies medicinales con diferentes fines terapéuticos, empleadas por los habitantes de las distintas comunidades, es transmitido de manera oral a través de generaciones, para mantener y conservar sus recursos naturales preservando así la gran variedad de especies vegetales que habitan la región *p'urhépecha*. Las principales plantas medicinales (*anatapu sipiati*) usadas con fines terapéuticos por las comunidades *p'urhépecha* se muestran en la Tabla 2.5.1.



Tabla 2.5.1. Plantas medicinales usadas por los *p'urhépecha* (Dimas et al., 2018).

Nombre en <i>p'urhépecha</i>	Nombre común	Nombre científico
<i>Kutsumu tsitsiki</i>	Aceitilla	<i>Bidens odorata</i>
<i>K'amempa urapiti</i>	Altamisa	<i>Tenacetum parthenium</i>
<i>Putsuti</i>	Anís de campo	<i>Tagetes filifolia</i>
<i>Jurhiaata tsitsiki</i>	Árnica	<i>Heterotheca inuloides</i>
<i>Aparhika juátarhu anapu</i>	Cardo Santo	<i>Cirsium mexicanum</i>
<i>Ch'erapeni</i>	Cenicilla	<i>Helianthemum glomeratum</i>
<i>Xate</i>	Chicalote	<i>Argemone ochroleuca</i>
<i>Kauintserani</i>	Cinco llagas	<i>Tagetes lunulata</i>
<i>Kutukua</i>	Cola de caballo	<i>Equisetum hyemale</i>
<i>Kónkerani</i>	Conguera	<i>Phytolaca icosandra</i>
<i>Xurhata tsitsiki</i>	Diente de león	<i>Taraxacum officinale</i>
<i>K'uitsiki sipiaata</i>	Epazote de zorrillo	<i>Chenopodium graveolens</i>
<i>Charhapiti chemekua tsitsiki</i>	Espinosilla	<i>Loeselia mexicana</i>
<i>Tsauankeni</i>	Estafiate	<i>Artemisa ludoviciana</i>
<i>Iauakua tsitsiki</i>	Flor de hielo	<i>Gentiana spathacea</i>
<i>Kontempa tsitsiki</i>	Flor de sauco	<i>Sambucus mexicana</i>
<i>Trómpeta</i>	Floripondio	<i>Brugmansia candida</i>
<i>Kóntpekua tsitsiki</i>	Garañona	<i>Castilleja tenuiflora</i>
<i>Sununkurhakua</i>	Gordolobo	<i>Genaphalium attenuatum</i>
<i>Tsarhakata tsitsiki</i>	Hierba del burro	<i>Stevia serrata</i>
<i>Uarhikua tsitsiki</i>	Hierba del cáncer	<i>Cuphea aequipetala</i>
<i>Parakata tsitsiki</i>	Hierba del golpe	<i>Oenothera rosea</i>
<i>Merenharhi</i>	Hierba del sapo	<i>Eryngium heterophyllum</i>
<i>Tskípini</i>	Huinare	<i>Sida rhombifolia</i>
<i>T'ókstini</i>	Jara de pescadillo	<i>Barkleyanthus salicifolicus</i>
<i>Kuíni t'irekua</i>	Lentejilla	<i>Lepidium virginicum</i>
<i>Jurhiaata eranchi</i>	Malva de campo	<i>Malva sylvestris</i>
<i>K'amempa</i>	Manrubio	<i>Marrubium vulgare</i>
<i>Miritsekua</i>	Mirto	<i>Salvia microphylla</i>
<i>Charatsikua</i>	Muicle	<i>Justicia spincigera</i>
<i>Nuriteni</i>	Nurite	<i>Satureja macrostema</i>
<i>Aparhikua</i>	Ortiga	<i>Urtica dioica</i>
<i>Chencheni atakua</i>	Salvia del campo	<i>Lepechinia caulescens</i>
<i>Kuiniki k'umanchekua</i>	Tabardillo	<i>Piqueria trinervia</i>
<i>Karhasi</i>	Tejocote	<i>Crataegus mexicana</i>
<i>Tsirimu tsitsiki</i>	Tila	<i>Tilia mexicana</i>



<i>K'uáki éskua</i>	Toloache	<i>Datura stramonium</i>
<i>P'untsumeti tsitsiki Urapiti o Uarhoti</i>	Toronjil blanco o morado	<i>Agastache mexicana</i>
<i>K'áptsarhukua</i>	Tronadora	<i>Tecoma stans</i>
<i>Uauarhu</i>	Valeriana	<i>Valeriana procera</i>

Es importante destacar la participación de los médicos tradicionales *p'urhépecha*, quienes son los encargados de curar y sanar los diversos padecimientos y/o malestares de la población. Actualmente existe dos agrupaciones de médicos *p'urhépecha*. La Organización de Médicos indígenas de la Cañada de los Once Pueblos *Itsitsipikua Uítsakuecheri* (OMICOP), fundada en 1990 y cuya sede se encuentra en *Cherán K'eri*; cuenta con más de 40 terapeutas provenientes de la Cañada de los Once pueblos y parte de la Meseta *P'urhépecha*. El grupo de Médicos *P'urhépecha Tsinajpiriicha* (OMIP), creada en 1989 y con sede actual en Pátzcuaro, agremia a más de 50 médicos tradicionales de los municipios de Cherán *K'eri*, Uruapan, Pátzcuaro, Tzintzuntzan, Tingambato y Erongarícuaro (Amézcua *et al.*, 2015). Estas organizaciones de médicos tradicionales *p'urhépecha* tienen el propósito de dar a conocer y preservar las prácticas de la medicina tradicional, así como el uso y manejo de la gran biodiversidad de plantas que habitan las comunidades que integran la cultura *p'urhépecha* del Estado de Michoacán.



2.6. Uso etnofarmacológico de *Trixis michuacana* var. *longifolia* entre los *p'urhépecha*

En la comunidad indígena de Nuevo Zirosto, fundada en 1952, ubicada en la Meseta *p'urhépecha*, en lo que hoy corresponde a la municipalidad de Uruapan, dado que las plantas medicinales forman parte de la vida cotidiana de sus habitantes, el uso de éstas como medicina ha permanecido vigente; hay personas que aún conservan las prácticas de sanación de distintas enfermedades empleando la flora medicinal de la comunidad.

La comprensión de estas prácticas de la medicina tradicional *p'urhépecha* radica en las personas mayores de la comunidad, como es el caso de *nandi* Ilda Gonzales Buenaventura originaria de la comunidad indígena de La Palma, Municipio de Los Reyes, quien tiene años de radicar en esta comunidad; ella adquirió su conocimiento sobre las plantas medicinales cuando realizaba ciertas labores en el campo a lo largo de sus años de vida. Las principales enfermedades que ella atendía eran: enfermedades relacionadas con el aparato digestivo (dolor estomacal, diarrea, empacho, etc.), enfermedades relacionadas con el estrés, enfermedades para tratar la frialdad del vientre, la infertilidad, padecimientos y malestares relacionados con el ciclo y naturaleza reproductiva de las mujeres.

Para entender la infertilidad en las mujeres, se debe comprender que dentro de la medicina *p'urhépecha* hay enfermedades provocadas por el desequilibrio frío y caliente (*ts'irapiti* / *jorhrepiti*). La esterilidad femenina se le atribuye a la frialdad, su origen puede deberse a la entrada de aire y descuidos durante la menstruación, parto o puerperio, por ingerir alimentos de calidad fría, o bien por recibir un enfriamiento en el vientre. Los tratamientos dentro de la medicina tradicional *p'urhépecha* se basan en extraer el frío o contrarrestar sus efectos por medio de fricciones, frotaciones, masajes y administración de infusiones de plantas medicinales.

La salud depende de mantener el balance entre “lo caliente” y “lo frío”. En este contexto, “caliente y frío” se refieren a las cualidades inherentes de las plantas, los



animales y el medio ambiente y no a la temperatura real de los mismos (Alvarez *et al.*, 2017).

Así, las plantas que crecen en las tierras bajas, calientes en pleno sol, y en tierra seca y roja, que pierden las hojas en época seca del año, que tienen apariencia pálida o rojiza, que tienen las hojas y la corteza duras, ásperas, espinosas y/o resinosas, y que tienen un olor o sabor muy fuerte, repugnante, amargo, picante, irritante o mentolado por lo general son calientes. Por su parte, las plantas frías, por el contrario, suelen crecer en tierras altas, frías, en lugares húmedos, en la sombra o en cercanía al agua, y en tierra negra; son siempre verdes, de un color verde vivaz, muchas veces son suculentas o jugosas, al tocar son suaves y lisas, y por lo general tienen aromas y sabores ligeros y agradables, siendo un poco dulces o agrias (Geck *et al.*, 2018).

El uso etnofarmacológico reportado por *nandi* Ilda, dentro de la medicina tradicional *p'urhépecha*, recomendaba el uso de la especie vegetal conocida como *Tepári* (*Trixis michuacana* var. *longifolia*) ya que posee la propiedad de ser una planta medicinal con cualidad caliente, por lo tanto, para combatir la frialdad en las mujeres ésta se debe de administrar en forma de decocción caliente de las partes aéreas (tallos, hojas y flores) junto con una pequeña cantidad de chocolate y piloncillo (poseen cualidades calientes), esta forma de preparar el remedio está vinculada también con el concepto de caliente-frío. La posología es tomar una taza de este preparado durante la noche por dieciocho días (nueve días antes y nueve días después del periodo menstrual; suspendiendo los días de menstruación).



2.6.1. Clasificación botánica

El género *Trixis* cuenta con las siguientes categorías taxonómicas (Tabla 2.6.1):

Tabla 2.6.1. Categorías taxonómicas para el género *Trixis*.

<i>Trixis michuacana</i> var. <i>longifolia</i> (D. Don) C.E. Anderson.	
Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoiophyta</i>
Clase:	<i>Equisetopsida</i>
Subclase:	<i>Magnoliidae</i>
Superorden:	<i>Ateranae</i>
Orden:	<i>Asteranae</i>
Familia:	<i>Asteraceae</i>
Género	<i>Trixis</i>

2.6.2. Descripción botánica

Arbusto hasta de 1.5 m de alto; tallos individuales poco ramificados, seríceos a lanosos o estrigosos y también con pubescencia glandular más corta, glabros con la edad; hojas sobre peciolo de 0 a 5 mm de largo, lineares a ovadas o elípticas, de 2.5 a 10 cm de largo, de 0.5 a 4 cm de ancho, agudas y apiculadas o acuminadas en el ápice, enteras a denticuladas en el margen, atenuadas a obtusas en la base, estrigosas a seríceas y cortamente glandular-pubescentes en el haz, seríceas a lanosas o pilosas en el envés, penninervadas; cabezuelas agrupadas en tirso o corimbos, sus ejes densamente glanduloso-pubescente, pedúnculos hasta de 2 cm de largo; involucro campanulado, sus brácteas exteriores 4 ó 5 (7), 8 a 25 (32) mm de largo y de 3 a 10 (12) mm de ancho, por lo común más largas y anchas que las anteriores, que generalmente son 8 y miden 11 a 22 mm de largo y 1.7 a 3.3 mm de ancho; flores por cabezuela 12 a 23, corolas con el labio exterior de 4.5 a 10 cm de largo; aquenio de 7 a 11 mm de largo, diminutivamente pubescente, vilano de ± 140 cerdas de color café claro, de 9.5 a 14 mm de largo (Figura 2.6.1) (Rzedowski *et al.*, 2001).





Figura 2.6.1. *Trixis michuacana* var. *longifolia* (D. Don) C.E. Anderson.



3. JUSTIFICACIÓN

Las comunidades que integran la cultura *p'urhépecha* viven vinculadas a la naturaleza y por lo tanto emplean las especies vegetales medicinales que existen en su entorno para satisfacer sus necesidades básicas de salud. En el caso particular de la especie vegetal *Trixis michuacana* var. *Longifolia* es empleada en la medicina tradicional *p'urhépecha* para tratar la frialdad del vientre, la infertilidad, padecimientos y malestares relacionados con el ciclo y naturaleza reproductiva de las mujeres. El conocimiento tradicional que se tiene sobre ella ha venido transmitiéndose a través de generaciones, aunque no hay ningún registro escrito. El estudio de la medicina tradicional *p'urhépecha* puede realizarse bajo diferentes enfoques, disciplinas y objetivos; por lo que es transcendental realizar un estudio químico preliminar que lleve a identificar los metabolitos secundarios mayoritarios responsables de la acción farmacológica reportada y contribuir así a la quimiotaxonomía de esta especie y validar su uso en la medicina tradicional *p'urhépecha*.



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Realizar el estudio químico preliminar del extracto hexánico de las hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia* para aislar y caracterizar sus componentes mayoritarios.

4.2. Objetivos específicos

- Colectar la especie vegetal.
- Obtener los extractos hexánicos de las hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.
- Aislar y caracterizar los metabolitos mayoritarios presentes en el extracto hexánico de hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, mediante estudios físicos y espectroscópicos.
- Preparar la decocción de las partes aéreas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.
- Obtener los extractos hexánico, cloruro de metileno y acetato de etilo de la decocción.
- Correlacionar los espectros de RMN de ^1H obtenidos de la decocción contra los espectros de RMN de ^1H resultado de la maceración de las hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.



5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para el estudio de los componentes mayoritarios del extracto hexánico de las hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, se efectuó de la siguiente manera:

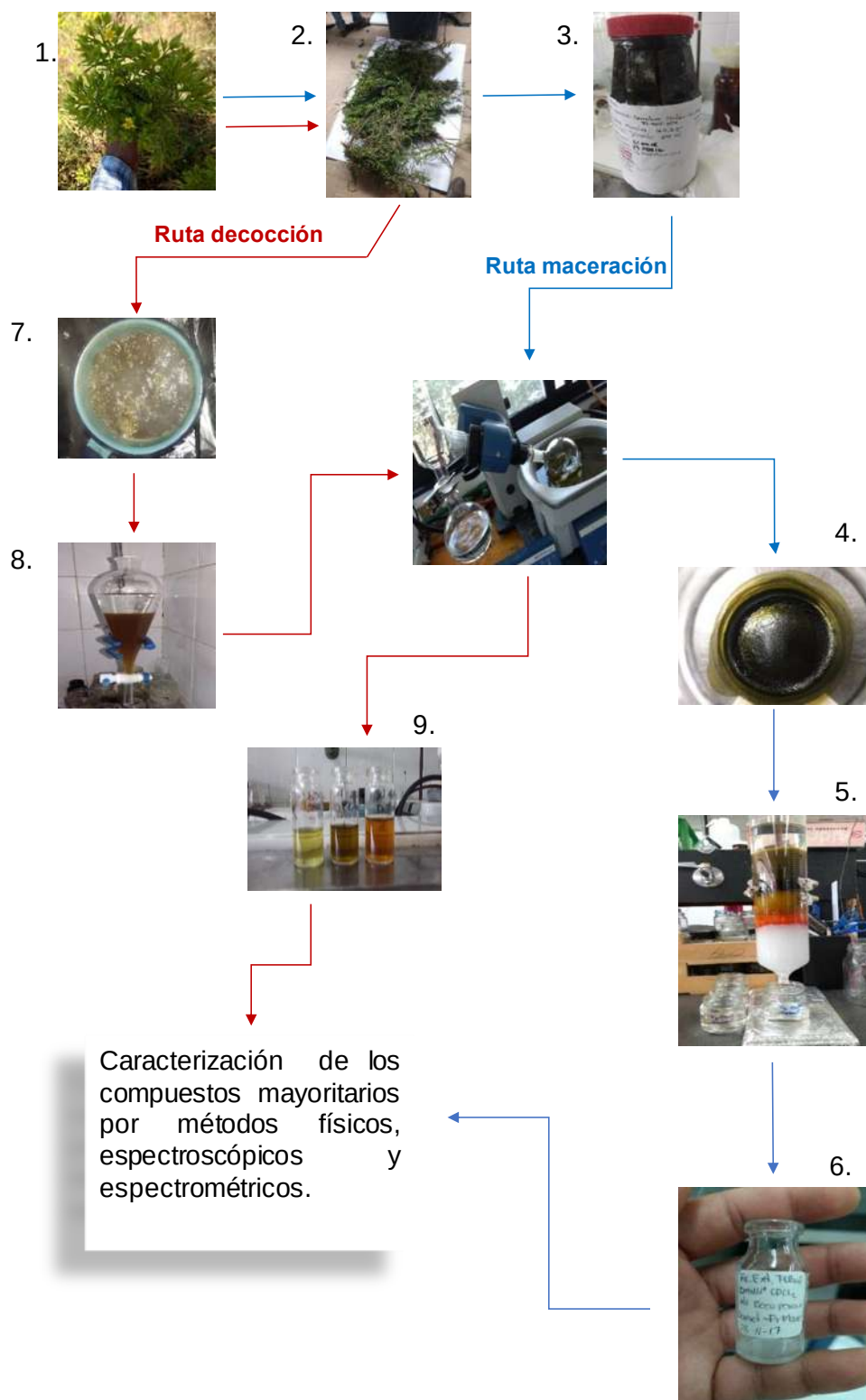
1. Colecta de la especie vegetal.
2. Secado de la planta a la sombra.
3. Separación y molienda de la planta en sus distintas partes (hojas, tallo, flores y raíz).
4. Obtención de los extractos mediante maceración a temperatura ambiente durante tres días.
5. Aislamiento y purificación mediante cromatografía en columna.
6. Elucidación estructural mediante espectrometría de masa y RMN ^1H y ^{13}C .

Para la preparación de la decocción de *Trixis michuacana* var. *longifolia* se realizó lo siguiente:

7. Preparación de la decocción de las partes aéreas de la planta a partir del lote 191016.
8. Obtención de los extractos hexánico, cloruro de metileno y acetato de etilo.
9. Correlación los espectros de RMN de ^1H de las extracciones obtenidas de la decocción contra los espectros de RMN de ^1H resultado de la maceración e hexanos, cloruro de metileno y AcOEt de las hojas de especie vegetal en estudio.



Esquema 5.1. Metodología experimental para el desarrollo del proyecto.



6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. Colecta e identificación de la especie vegetal

La especie vegetal de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, fue colectada en la carretera Peribán-Los Reyes en los límites de la comunidad de San Francisco, Peribán; se realizaron dos colectas con fecha 19 de octubre y otra el 03 de diciembre del 2016, colectando únicamente las partes aéreas de la planta.

Un ejemplar botánico fue llevado al Herbario de la Facultad de Biología (EBUM) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo donde establecieron la determinación y clasificación taxonómica para *Trixis michuacana* var. *longifolia* (D. Don) C.E. Anderson.

6.2. Obtención de extractos

Para la obtención de los extractos, inicialmente el material vegetal se dejó secar por 15 días a la sombra a temperatura ambiente, separándola en sus distintas partes (hoja, tallo y flor). Las Hojas (400 g) del lote I y (220 g) del lote II una vez secos y triturados en molino, fueron sometidas a maceración por separado con hexanos a temperatura ambiente por tres días, empleando 2 L y 550 mL, respectivamente; los extractos obtenidos fueron filtrados y concentrados a presión reducida, realizando este proceso por triplicado. Los pesos y porcentajes de rendimiento se describen en la Tabla 6.2.1.

Tabla.6.2.1. Extractos obtenidos en hexanos de las hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

Lote I (g)		Rendimiento (%)	Lote II (g)		Rendimiento (%)
1a	15.53	3.88	1a	5.48	2.49
2a	9.77	2.44	2a	3.42	1.56
3a	4.48	1.11	3a	1.76	0.80
Total:	29.77	7.44	Total:	10.66	4.85



6.3. Análisis químico del extracto hexánico de hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*

La separación en columna cromatográfica del extracto hexánico de hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*; para la obtención de 20 fracciones enriquecidas (Figura 6.3.1).

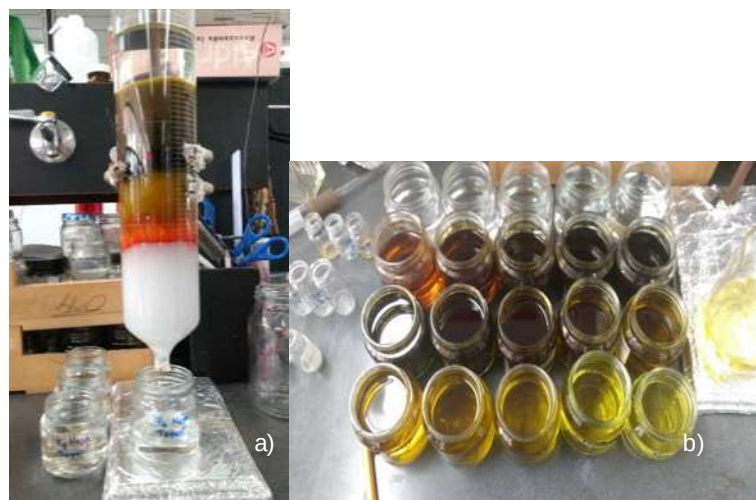


Figura 6.3.1. a) Columna empleada en el fraccionamiento del extracto hexánico de hojas de *T. michuacana* var. *longifolia* y b) Fracciones enriquecidas obtenidas en Hex-AcOEt en polaridad ascendente del extracto hexánico.

El análisis del extracto hexánico de hojas inició por RMN de ^1H (Figura 6.3.2), para determinar naturaleza química y abundancia de sus componentes, en el cual se observó a frecuencias bajas señales de protones vinílicos entre δ 6.5- 5.0; entre δ 4.8- 2.5 aparecen protones base éster, así como señales a frecuencias altas correspondientes a protones alifáticos entre δ 2.30-0.7, lo cual sugiere la presencia de compuestos hidrocarbonados, entre ellos, aquellos de tipo n-alcanos saturados y tipo éster, además compuestos de naturaleza terpenoide.



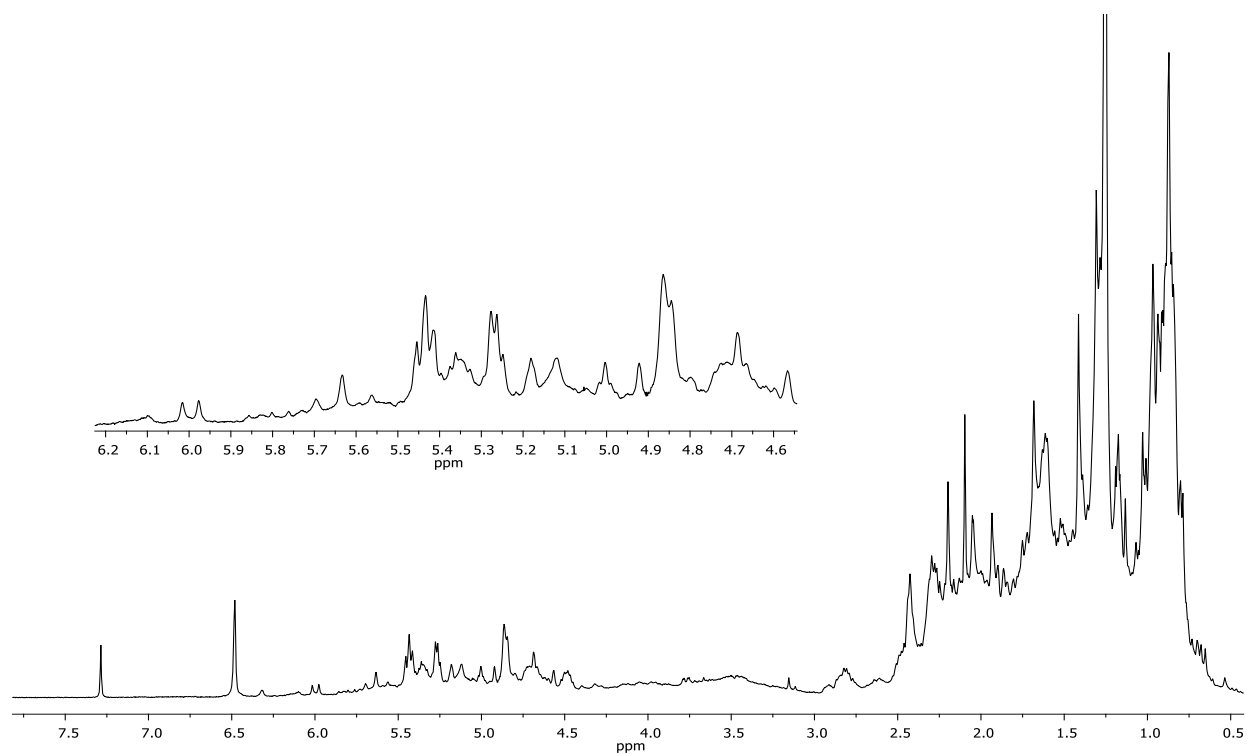


Figura 6.3.2. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto hexánico de hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.



De la fracción 3 (4:1Hex-AcOEt) del extracto hexánico crudo de hoja se obtuvo un sólido al cual tras varios lavados con hexanos, se consiguió como resultado 43 mg de un sólido blanco ceroso, el espectro de RMN de ^1H mostró una señal simple ancha en δ 1.25, correspondiente a los protones metilénicos de una cadena hidrocarbonada; una señal triple en δ 0.88 ($J= 6.3$ Hz) pertenecientes a los protones de los metilos (α y Ω), lo que sugiere la presencia de compuestos de tipo hidrocarburos saturados (Figura 6.3.3).

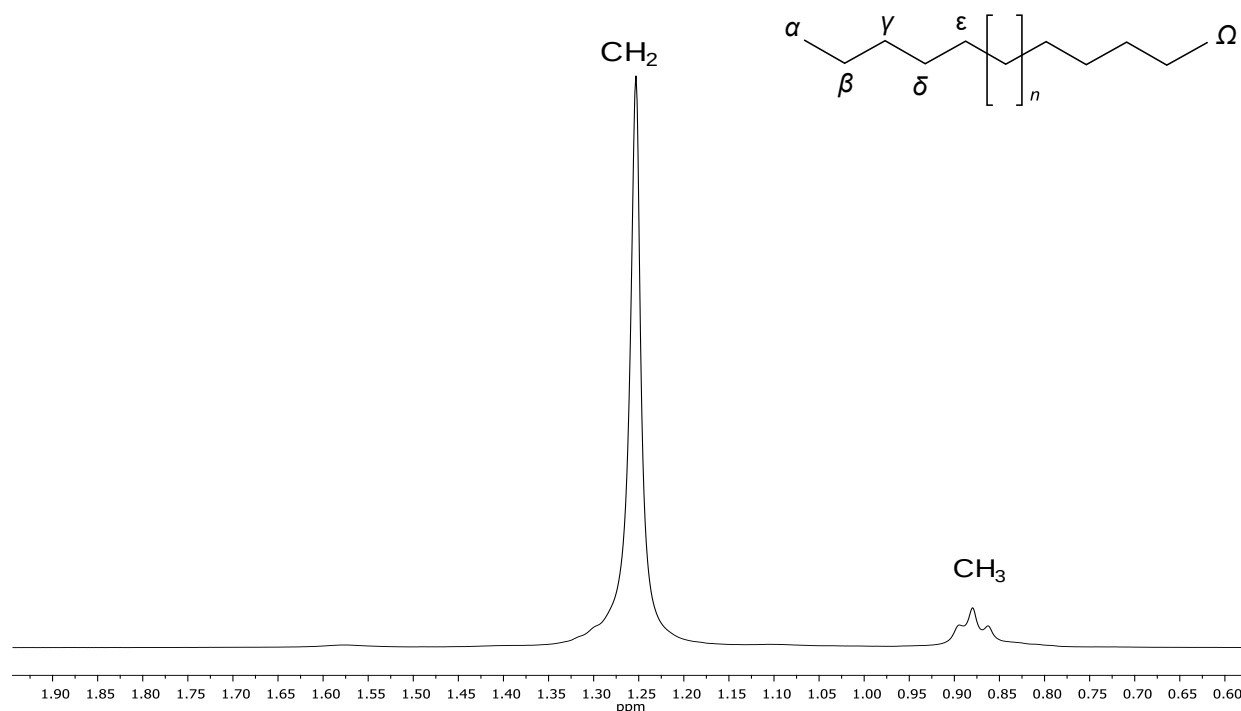


Figura 6.3.3. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de compuestos hidrocarburos saturados.

En su espectro de RMN de ^{13}C se apreció en δ 31.9 la señal correspondiente a los carbonos CH_2 (γ); también en δ 29.7 la señal de los $(\text{CH}_2)_n$; se observó la señal en δ 29.4 la señal para los CH_2 (δ); en δ 22.7 la señal característica de los CH_2 (β); además en δ 14.2 se distinguió la señal perteneciente a los metilos (α), estas 5 señales confirman la presencia de compuestos hidrocarbonados saturados (Figura 6.3.4).



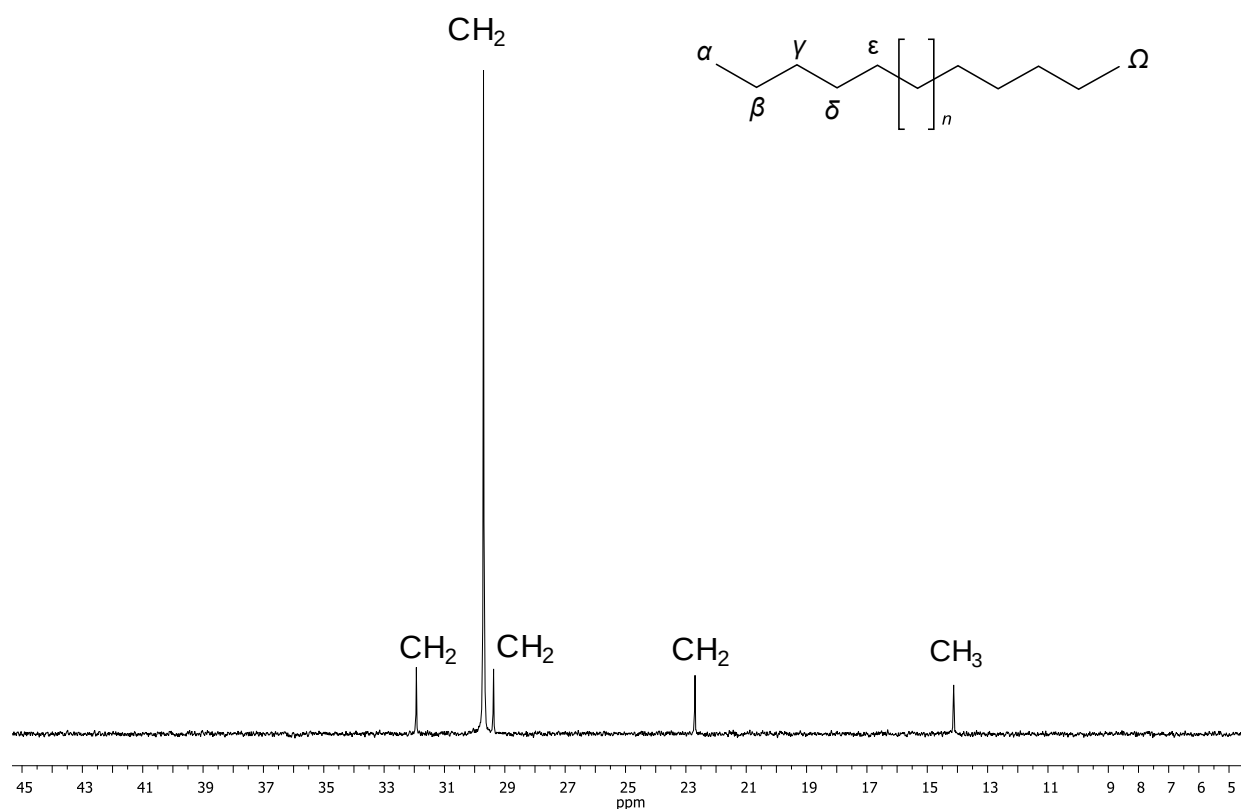


Figura 6.3.4. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 de compuestos del tipo hidrocarburos saturados.

Como parte de la caracterización del sólido blanco ceroso se analizó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (EM) para conocer la elongación de la cadena, dado que RMN de ^1H y ^{13}C sugiere la presencia de un compuesto de tipo hidrocarburo saturado. Teniendo como resultado el cromatograma de gases con los tiempos de retención (Rt) se puede observar 6 picos más abundantes en 19.84 min, 20.51 min, 21.36 min, 22.31 min, 23.65 min, 25.12 min y 27.34 min, respectivamente (Figura 6.3.5).



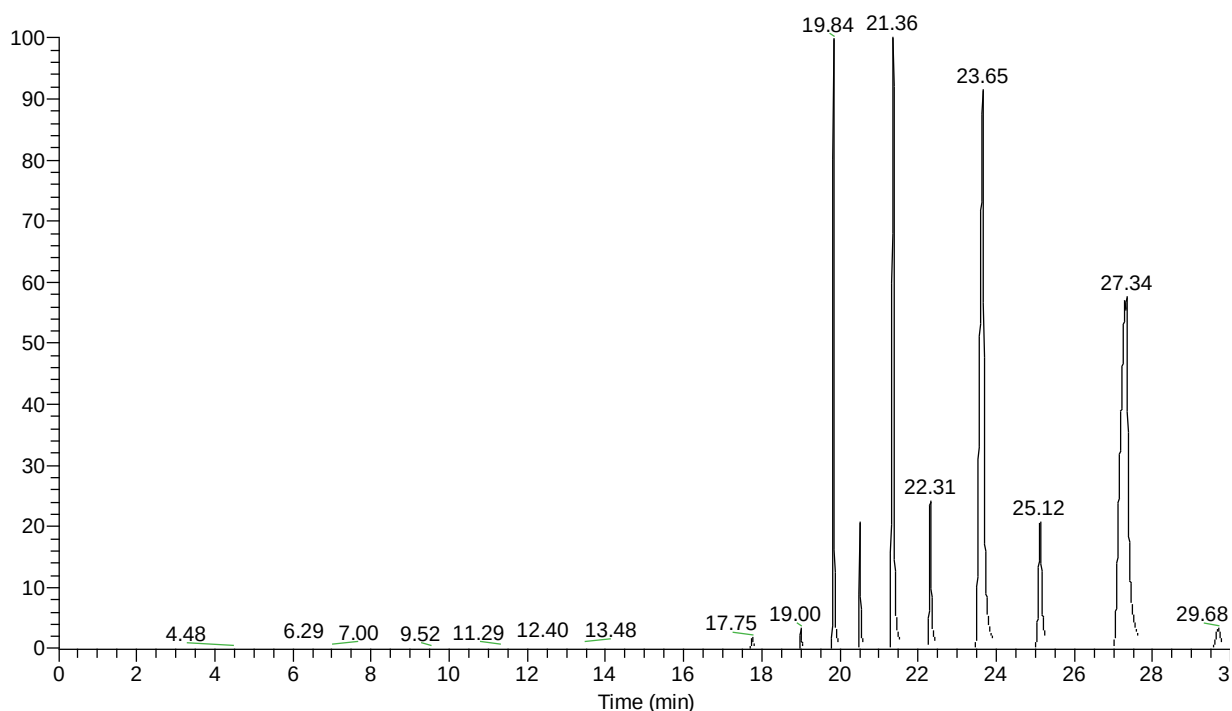


Figura 6.3.5. Cromatograma de gases del sólido blanco ceroso.

En Rt 19.84 min del espectro de masas se detectó el ion molecular 352.4 m/z para el compuesto $C_{25}H_{52}$ y como picos de fragmentación más importantes m/z (Int. Rel.): 295.3 (1.0) $[C_{21}H_{43}]^+$, 267.3 (1.3) $[C_{19}H_{39}]^+$, 239.3 (1.8) para $[C_{17}H_{33}]^+$, 211.2 (2.8) perteneciente a $[C_{15}H_{31}]^+$, 155.2 (7.9) $[C_{11}H_{23}]^+$, 183.2 (4.6) $[C_{13}H_{27}]^+$, 127.1 (15.0) para $[C_9H_{19}]^+$, 113.1 (19.7) perteneciente al $[C_8H_{17}]^+$, 99.1 (30.0) $[C_7H_{15}]^+$, 85.1 (70.8) $[C_6H_{13}]^+$, 71.1 (85.3) $[C_5H_{11}]^+$ y el pico base a 57.1 (100) correspondiente al catión $[C_4H_9]^+$, (Figura 6.3.6).

Para calcular el número de átomos de carbono se asumió que un alcano tiene la fórmula C_nH_{2n+2} , para el Rt 19.84 min con 352.4 m/z , se restaron los dos hidrógenos de los metilos $C_nH_{2n} = 350$. Como el grupo metileno corresponde a 14.02 uma, la igualdad queda $14n = 350$ y, por lo tanto, $n = (350/14) = 25$. Cuando el resultado es un valor entero, el hidrocarburo es saturado y en este caso corresponde al pentacosano (**1**) (Tapasco *et al.*, 2016).



F-3 #4658 RT: 19.84 AV: 1 NL: 6.65E8
T: {0,0} + c EI Full ms [45.00-450.00]

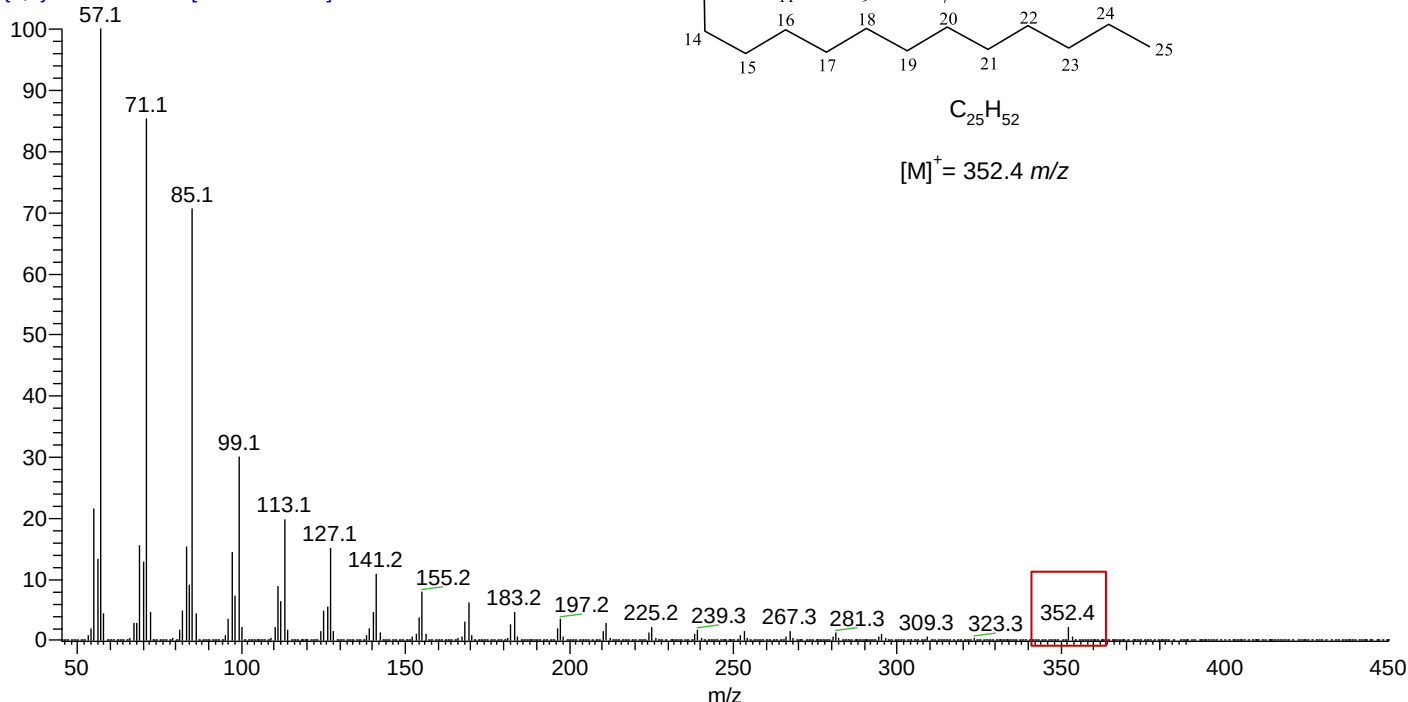


Figura 6.3.6. Espectro de masa del pentacosano (1).

Estos datos fueron comparados en la biblioteca de espectros de masa NIST Search 2.0, en el cual indica que existe alrededor de un 13.3% de similitud entre el espectro obtenido en Rt 19.84 min y el espectro asignado al pentacosano ($C_{25}H_{52}$) con un ion molecular de 352 m/z . La Figura 6.3.7, presenta el espectro de masa correspondiente experimental al pentacosano (1) y su comparación en la librería NIST MS Search 2.0.

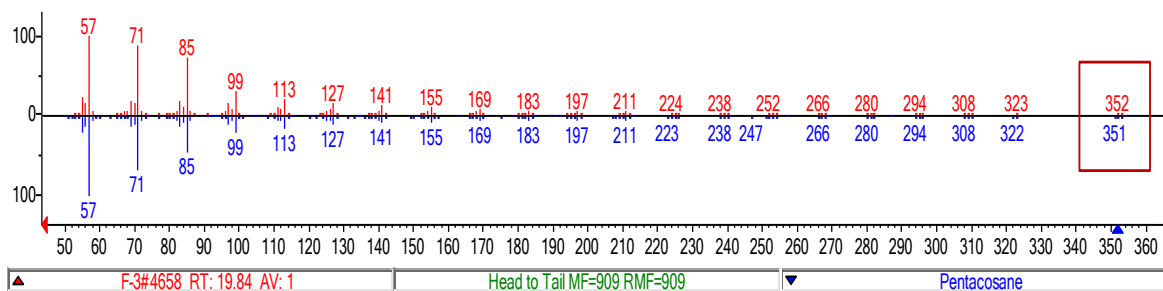


Figura 6.3.7. Comparación del espectro experimental correspondiente al pentacosano (1) (trazo superior) y su comparación en la librería NIST MS Search 2.0 (trazo inferior).



Los hidrocarburos saturados presentan como característica principal, fragmentaciones que corresponden a las pérdidas de CH_2 secuenciales, es decir, cada vez 14.02 uma, también la presencia de picos de una serie de iones de hidrocarburos a 29, 43, 57, 71, 85, 99, 113 m/z , sucesivamente, y una serie de iones $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}^+$ a 27, 41, 55, 69, 83, 97, 111 m/z , etcétera; de una abundancia moderada (Salama *et al.*, 1989). Este tipo de fragmentación se presenta cuando todos los enlaces carbono-carbono de ion molecular de un alcano tienen igual fuerza (Figura 6.3.8).

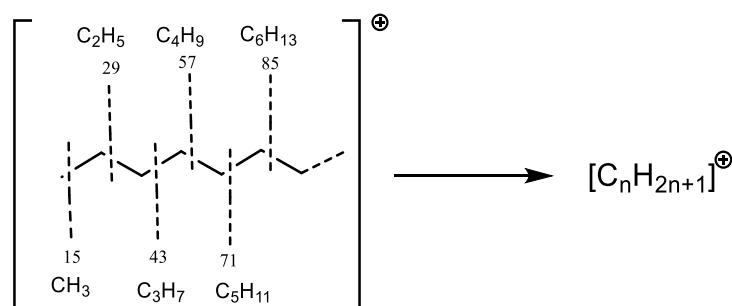


Figura 6.3.8. Patrones de fragmentación de hidrocarburos saturados.

Para los R_t 20.51 min, 21.36 min, 22.31 min, 23.65 min, 25.12 min y 27.34 min, se identificaron los m/z correspondiente al hexacosano (**2**), heptacosano (**3**), octacosano (**4**), nonacosano (**5**), triacontano (**6**) y hentriacontano (**7**), respectivamente. Los iones moleculares y patrones de fragmentación característicos siguen una distribución Gaussiana centrada en el 57 m/z , se describen en la Tabla 6.3.2.



Tabla 6.3.2. Datos de fragmentación de la serie homóloga de *n*-alcanos identificados del sólido blanco ceroso.

Rt (min)	20.51	21.36	22.31	23.65	25.11	27.39	
Fórmula	C ₂₆ H ₅₄ (2)	C ₂₇ H ₅₆ (3)	C ₂₈ H ₅₈ (4)	C ₂₉ H ₆₀ (5)	C ₃₀ H ₆₂ (6)	C ₃₁ H ₆₄ (7)	Catión
m/z (Int. Rel.)	366.4 (0.9)	380.4 (2.3)	394.4 (1.3)	408.4 (2.0)	422.4 (1.0)	436.4 (2.0)	
	267.3 (1.0)	281.5* (1.3)	267.3 (1.4)	267.3 (1.8)	267.3 (1.7)	267.3 (2.1)	[C ₁₉ H ₃₉] ⁺
	253.3 (1.2)	253.3 (1.8)	253.3 (1.8)	239.2* (2.4)	253.3 (1.8)	253.3 (2.3)	[C ₁₈ H ₃₇] ⁺
	225.2 (1.6)	239.2 (2.2)	225.2 (2.8)	225.2 (2.9)	225.2 (3.2)	225.2 (3.3)	[C ₁₆ H ₃₃] ⁺
	211.2 (2.2)	211.2 (3.3)	211.2 (3.4)	211.2 (3.9)	211.2 (4.0)	211.2 (4.3)	[C ₁₅ H ₃₁] ⁺
	183.2 (4.0)	197.2* (4.2)	183.2 (5.8)	183.2 (6.1)	183.2 (6.3)	183.2 (7.1)	[C ₁₃ H ₂₇] ⁺
	169.1 (5.6)	169.1 (7.0)	169.1 (7.0)	155.2* (9.6)	169.1 (8.0)	169.2 (9.2)	[C ₁₂ H ₂₅] ⁺
	141.1 (9.1)	155.2 (9.3)	141.1 (11.8)	141.1 (12.9)	141.1 (12.5)	141.1 (14.5)	[C ₁₀ H ₂₁] ⁺
	127.1 (12.0)	127.1 (16.0)	127.1 (15.0)	127.1 (16.3)	127.1 (16.1)	127.1 (18.2)	[C ₉ H ₁₉] ⁺
	113.1 (17.1)	113.1 (19.7)	113.1 (19.7)	113.1 (22.3)	113.1 (22.0)	113.1 (24.0)	[C ₈ H ₁₇] ⁺
	99.1 (22.4)	99.1 (28.5)	99.1 (28.5)	99.1 (30.2)	99.1 (31.4)	99.1 (33.1)	[C ₇ H ₁₅] ⁺
	85.1 (61.8)	85.1 (60.7)	85.1 (60.7)	85.1 (64.9)	85.1 (68.1)	85.1 (64.7)	[C ₆ H ₁₃] ⁺
	71.1 (81.5)	71.1 (82.4)	71.1 (87.7)	71.1 (84.6)	71.1 (85.6)	71.1 (75.8)	[C ₅ H ₁₁] ⁺
	57.1 (100)	57.1 (100)	57.1 (100)	57.1 (100)	57.1 (100)	57.1 (100)	[C ₄ H ₉] ⁺

NOTA: *281.5 [C₂₁H₄₁]⁺, 239.2 [C₁₇H₃₅]⁺, 197.2 [C₁₄H₂₉]⁺ y 155.2 [C₁₁H₂₃]⁺.



En el espectro de masa de Rt 20.51 min se identificó su ion molecular en 366.4 m/z correspondiente para el n -alcano $C_{26}H_{54}$, además se observó el pico base de este compuesto en 57.1 m/z perteneciente al catión $[C_4H_9]^+$. Las señales restantes siguen el mismo patrón de fragmentación de un hidrocarburo saturado (Figura 6.3.9). Al realizar el cálculo aritmético correspondiente a este Rt $n= 26$, tratándose del hexacosano (**2**).

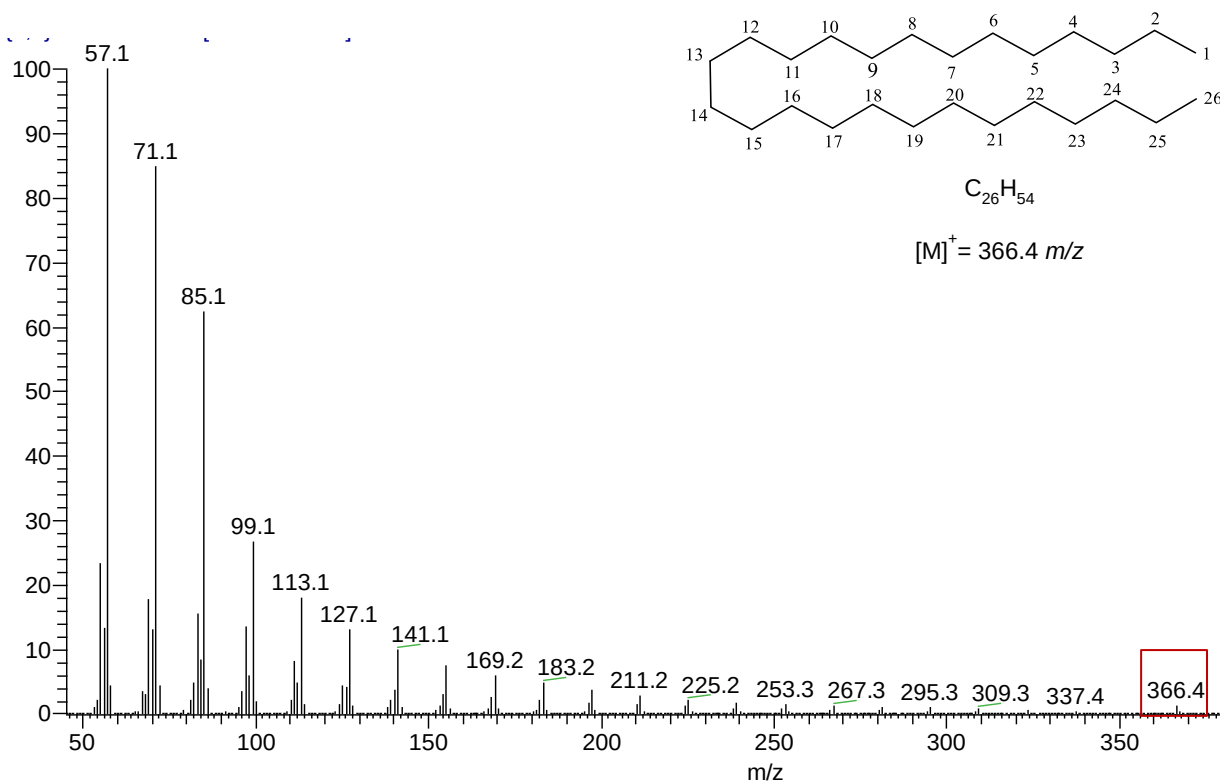


Figura 6.3.9. Espectro de masa del hexacosano (**2**).

Los datos obtenidos fueron comparados en la librería NIST Search 2.0, donde indica que existe un 15.6 % de similitud entre el espectro obtenido en Rt 20.51 min y el espectro asignado al hexacosano (**2**) con 366 m/z y fórmula molecular $C_{26}H_{54}$. La Figura 6.3.10, presenta el espectro de masa experimental correspondiente al hexacosano (**2**) y su comparación en la librería NIST MS Search 2.0.



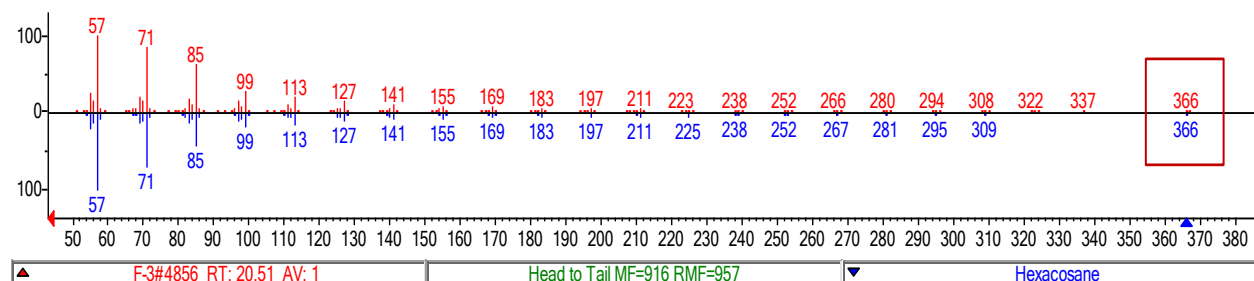


Figura 6.3.10. Comparación del espectro experimental correspondiente al hexacosano (2) (trazo superior) y su comparación en la librería NIST MS Search 2.0 (trazo inferior).

De la misma forma en el espectro de masa correspondiente al Rt 21.36 min se logró ubicar el ion molecular 380.4 m/z , que corresponde para el heptacosano (3) de fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{54}$, así como su pico base en 57.1 m/z . Las señales siguen mostrando el mismo patrón de fragmentación descrito anteriormente (Figura 6.3.11).

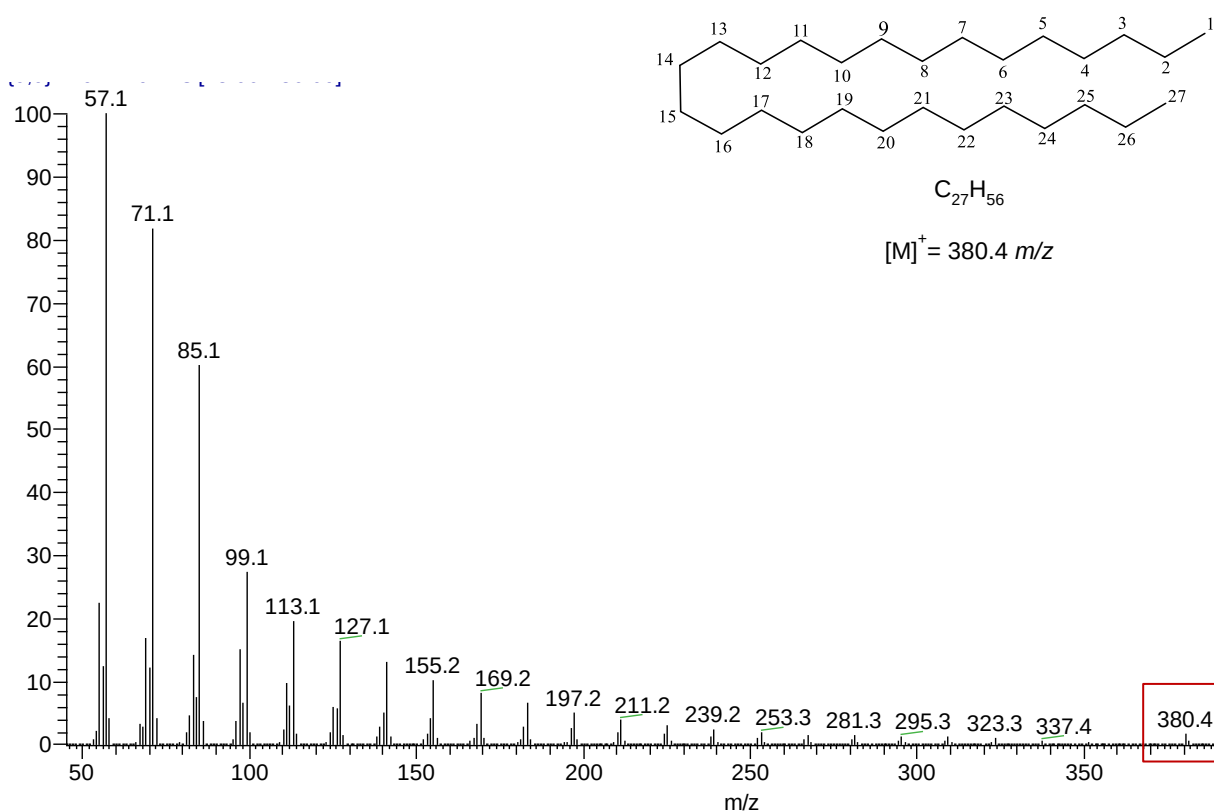


Figura 6.3.11. Espectro de masas del heptacosano (3).



Los datos obtenidos fueron comparados en la base de datos NIST Search 2.0, indicando una similitud del 6.0% respecto al espectro obtenido en Rt 21.36 min y el espectro asignado al heptacosano ($C_{27}H_{54}$) proporcionando un ion molecular en 380 m/z (Figura 6.3.12).

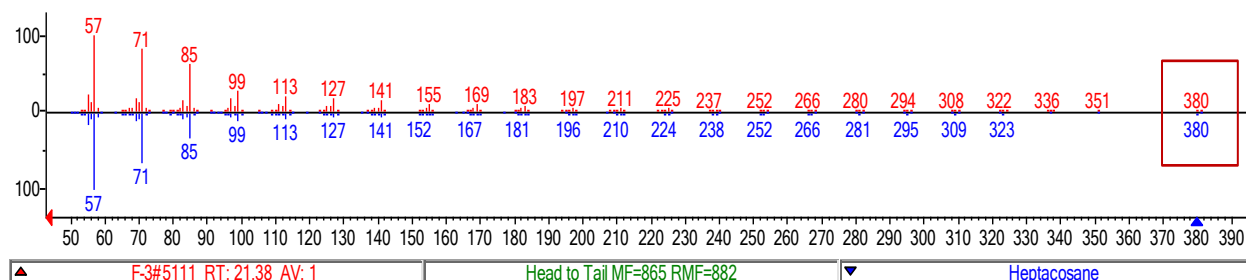


Figura 6.3.12. Comparación del espectro experimental correspondiente al heptacosano (3) (trazo superior) y su comparación en la librería NIST MS Search 2.0 (trazo inferior).

En el espectro de masa del Rt 22.31 se apreció un ion molecular 394.4 m/z y el pico base a 57.1 m/z , en concordancia para el octacosano (4) con fórmula molecular $C_{28}H_{58}$. Las señales más importantes siguen una distribución Gaussiana centrada en su pico padre, característica de hidrocarburo saturado (Figura 6.3.13).

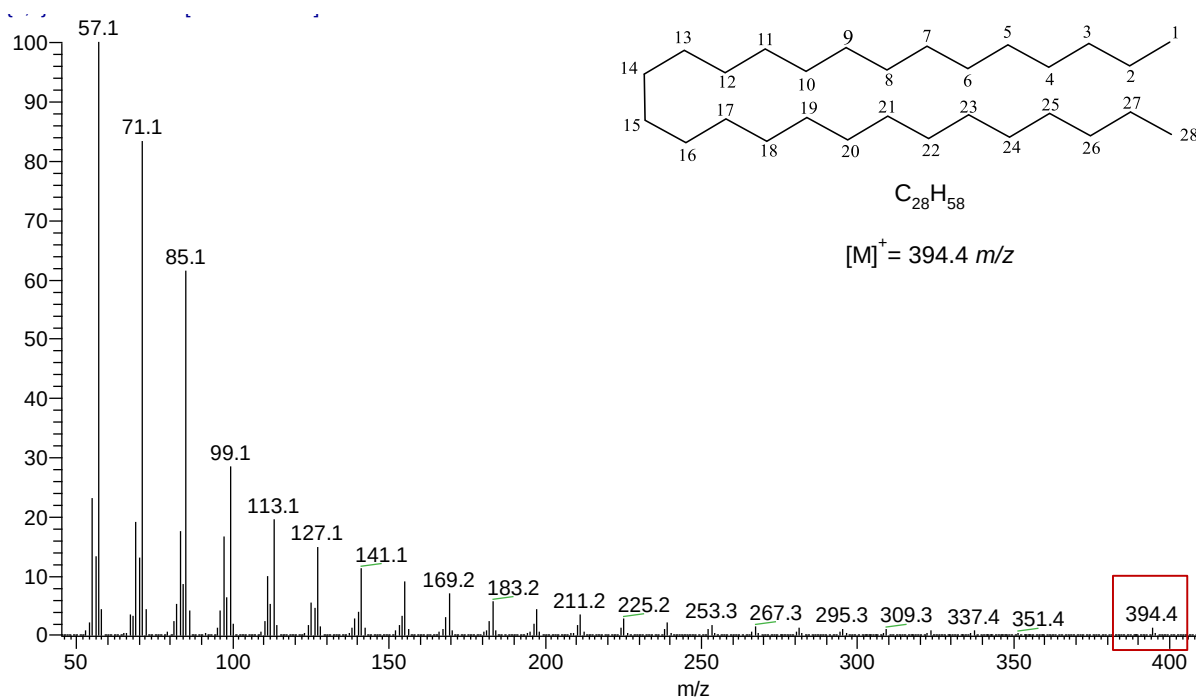


Figura 6.3.13. Espectro de masas del octacosano (4).



Los datos de fragmentación fueron comparados en la biblioteca NIST Search 2.0, donde muestra una similitud del 30.0% respecto a la comparación del espectro experimental obtenido en Rt 22.31 y el asignado para el octacosano $C_{28}H_{58}$ facilitando un ion molecular 394 m/z (Figura 6.3.14).

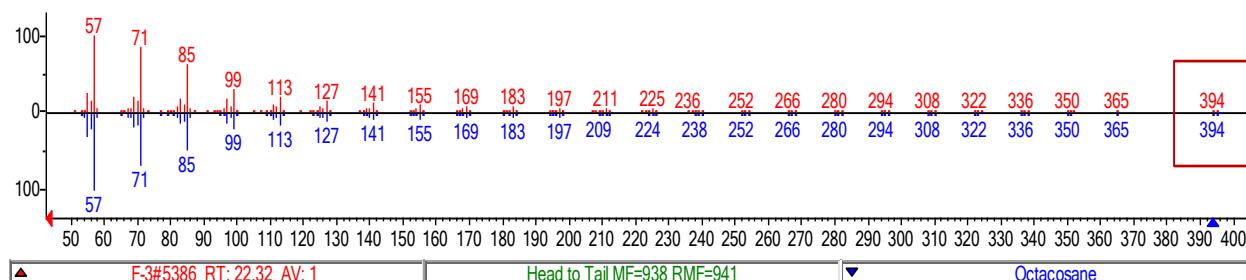


Figura 6.3.14. Comparación del espectro experimental correspondiente al octacosano (4) (trazo superior) y su comparación en la librería NIST MS Search 2.0 (trazo inferior).

El patrón de señales observado en el espectro de masa correspondiente a Rt 23.65 min sigue la misma fragmentación representativa de un hidrocarburo saturado, identificando el ion molecular en 408.4 m/z y el pico base en 57.1 m/z , perteneciente al nonacosano (5) de fórmula molecular $C_{29}H_{60}$ (Figura 6.3.15).

Los datos de fragmentación fueron comparados en la base de datos NIST Search 2.0, donde arrojó una similitud del 9.9% de la comparación del espectro obtenido en Rt 23.65 con el espectro asignado al nonacosano $C_{29}H_{60}$ con ion molecular 408 m/z (Figura 6.3.16).



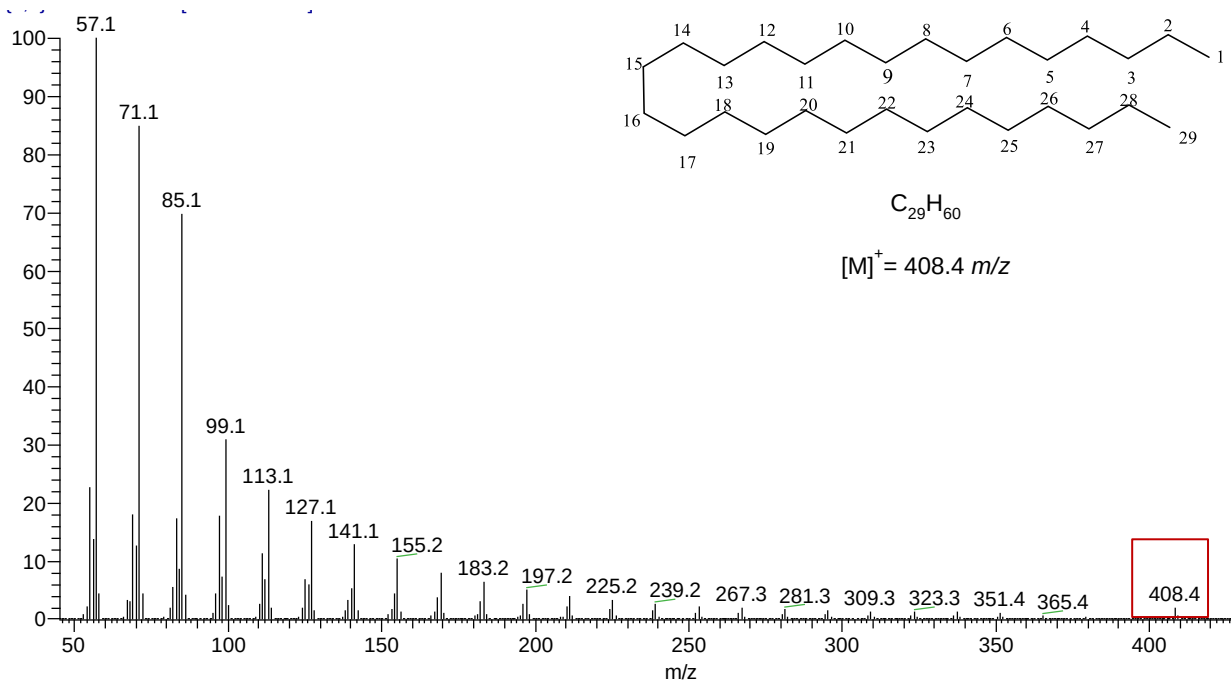


Figura 6.3.15. Espectro de masas del nonacosano (5).

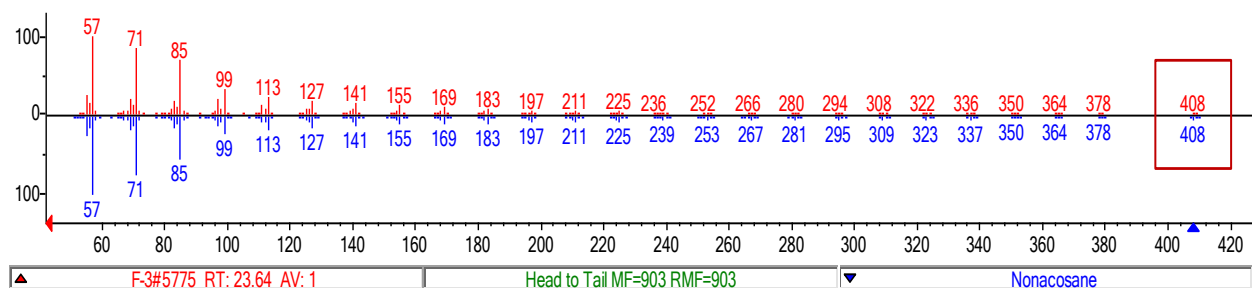


Figura 6.3.16. Comparación del espectro experimental correspondiente al nonacosano (5) (trazo superior) y su comparación en la librería NIST MS Search 2.0 (trazo inferior).

Para el R_t 25.11 min, en su espectro de masa se logró identificar el ion molecular en $422.4 m/z$, así como su pico base en $57.1 m/z$ estos datos pertenecen al triacontano (6) con fórmula molecular $C_{30}H_{62}$. El patrón de fragmentación corresponde al de un alcano saturado, ya que se observa pérdidas cada 14.02 una correspondientes a las unidades metilénicas (Figura 6.3.17).



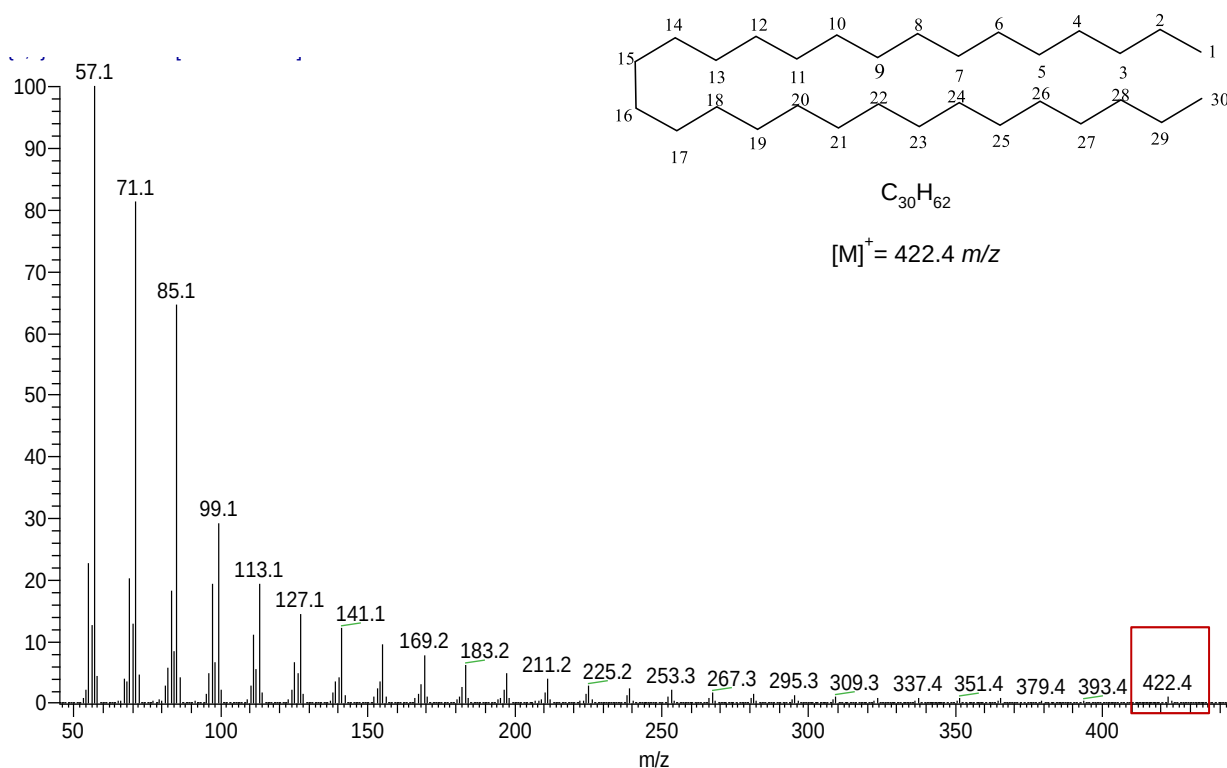


Figura 6.3.17. Espectro de masas del triacontano (6) en Rt 25.11 min.

Al realizar la comparación en la base de datos NIST Search 2.0, mostró una similitud del 7.8% para el espectro experimental obtenido en Rt 25.11 min y el espectro correspondiente al triacontano $C_{30}H_{62}$ de ion molecular 422 m/z (Figura 6.3.18).

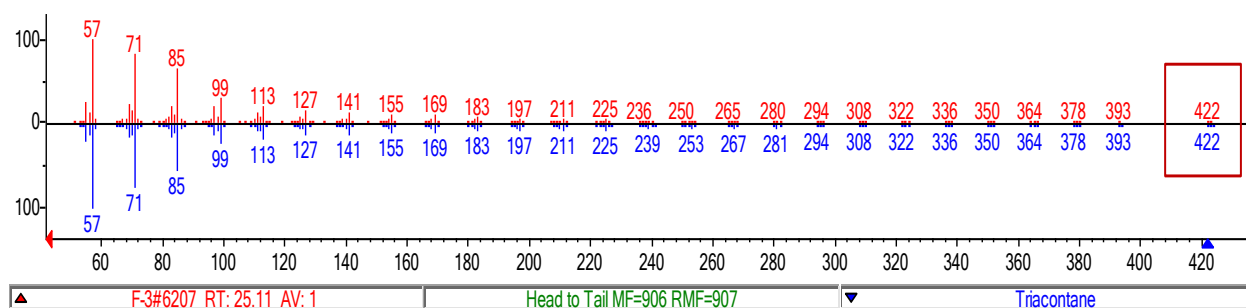


Figura 6.3.18. Comparación del espectro experimental correspondiente al triacontano (6) (trazo superior) y su comparación en la librería NIST MS Search 2.0 (trazo inferior).

Por último, en el espectro masa obtenido en Rt 27.34 min se identificó el ion molecular en 436.4 m/z y su pico base en 57.0 m/z característico de un hidrocarburo



saturado, el patrón de fragmentación observado corresponde al hentriacontano (**7**) con fórmula molecular $C_{31}H_{64}$ (Figura 6.3.19).

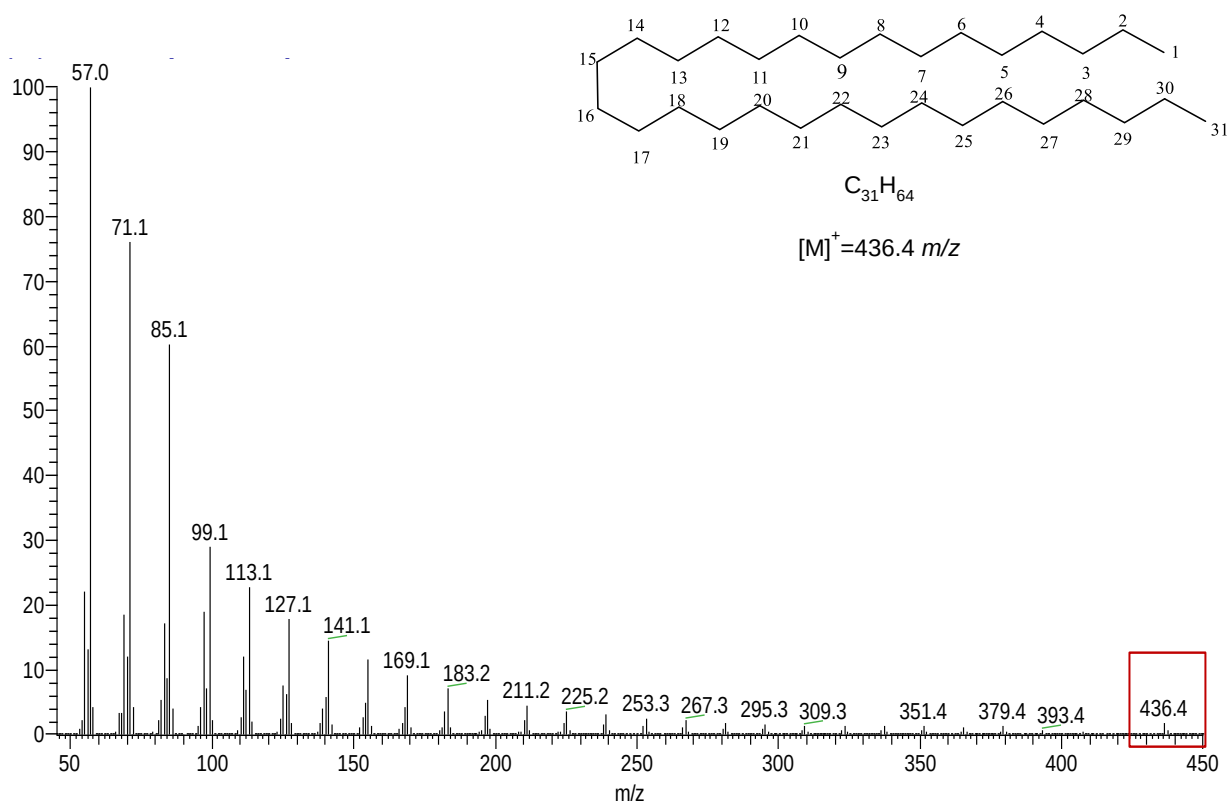


Figura 6.3.19. Espectro de masas del hentriacontano (**7**).

En su comparación en la biblioteca NIST Search 2.0 de los datos obtenidos en el Rt 27.34 min, se observó una similitud del 9.1% respecto al espectro definido para el hentriacontano $C_{31}H_{64}$ con 436 m/z (Figura 6.3.20).

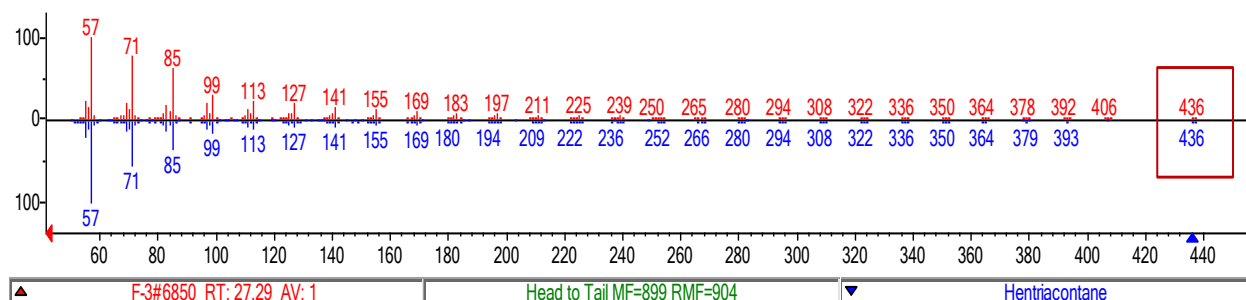


Figura 6.3.20. Comparación del espectro experimental correspondiente al triacontano (**7**) (trazo superior) y su comparación en la librería NIST MS Search 2.0 (trazo inferior).



Los R_t no son información suficiente para asegurar la identificación de los componentes de una mezcla homóloga compleja. Existe un método cualitativo para relacionar el R_t de un compuesto desconocido con otro de n -carbonos (el cual eluye antes y después de él), se conoce como índice de Kovats, el cual utiliza patrones de referencia que son sometidos a las mismas condiciones cromatográficas en las que fue procesada la muestra. En este caso no se disponen de patrones de referencia para los n -alcanos saturados presentes en el extracto hexánico de hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, por lo cual únicamente fueron identificados por su ion molecular m/z y haciendo su comparación en la biblioteca NIST Search 2.0, 2011. Además, todos ellos presentan una forma característica de fragmentación que se asemeja a una curva Gaussiana centrada en el fragmento con 57 m/z correspondiente al catión $[C_4H_9]^+$ (Tapasco *et al.*, 2016).

La fracción 4 (4:1 Hex-AcOEt) del extracto hexánico de hojas se obtuvo un sólido, el cual fue sometido a continuos lavados con Hex-Acetona (1:1) en frío, obteniéndose como resultado 38 mg del sólido de color blanco ceroso, el cual fue analizado por RMN de 1H donde se distingue en δ 1.25 una señal simple ancha que corresponde a los protones metilénicos; además de una señal triple en δ 0.88 con una constante de acoplamiento de 6.0 Hz pertenecientes a los protones de los metilos de la molécula, estas señales son características de hidrocarburos saturados (Figura 6.3.21).



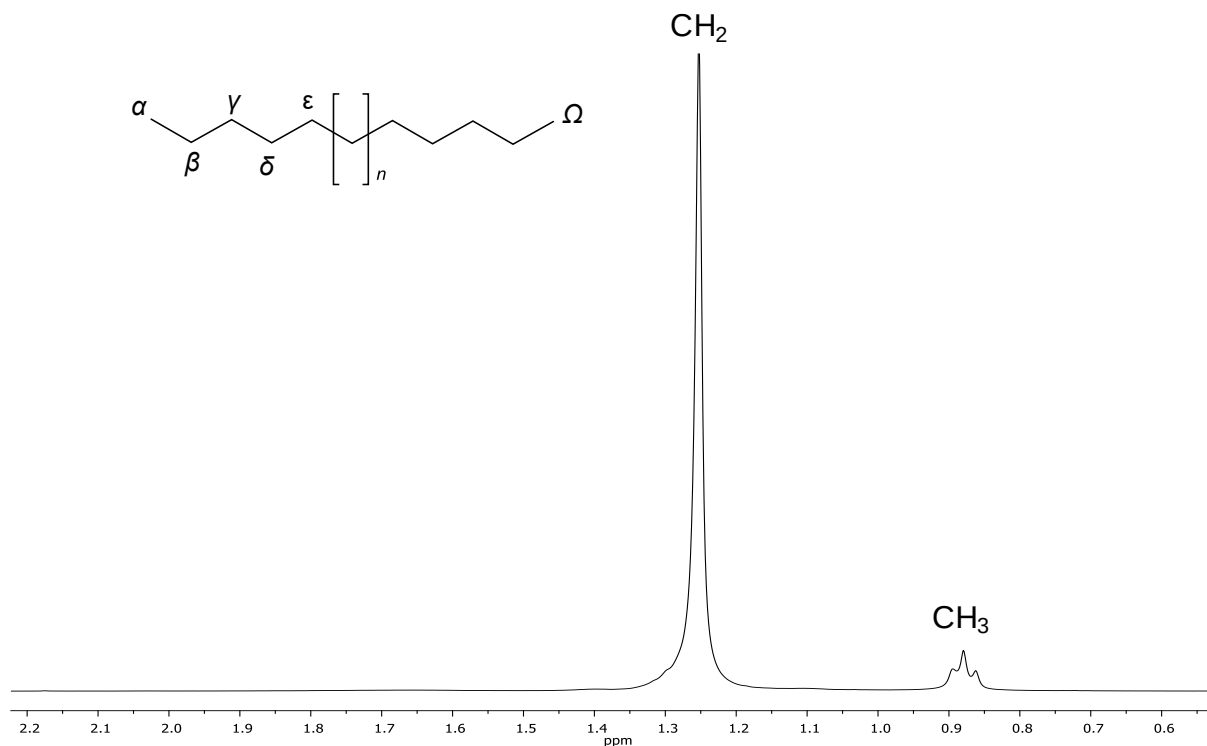


Figura 6.3.21. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de la mezcla de compuestos del tipo hidrocarburo saturado.

En su espectro de RMN de ^{13}C como describió anteriormente, mostró un conjunto de 5 señales características de un compuesto de tipo hidrocarburo saturado (Figura 6.3.22).



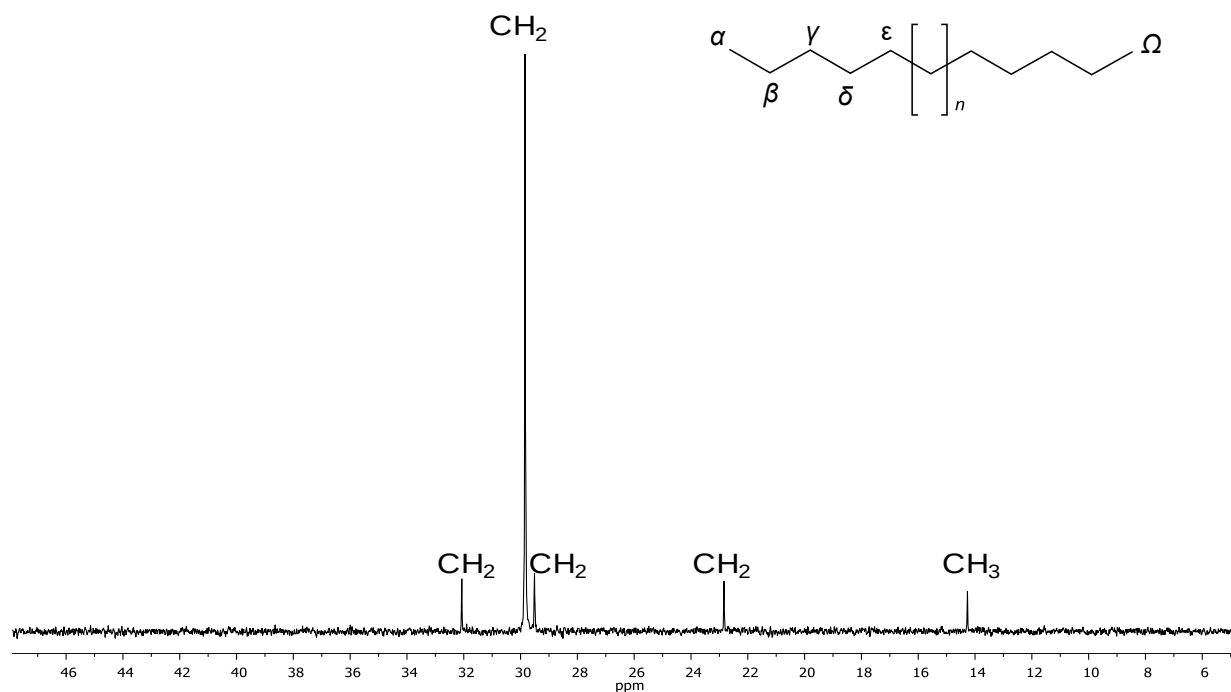


Figura 6.3.22. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 de la mezcla de compuestos de tipo hidrocarburo saturado.

Para caracterizar el sólido blanco ceroso se realizó por cromatografía de gases acoplada a EM, en el cromatograma se observan tres picos los cuales presentan un R_t de 0.55 min, 0.65 min y 1.00 min, respectivamente (Figura 6.3.23).



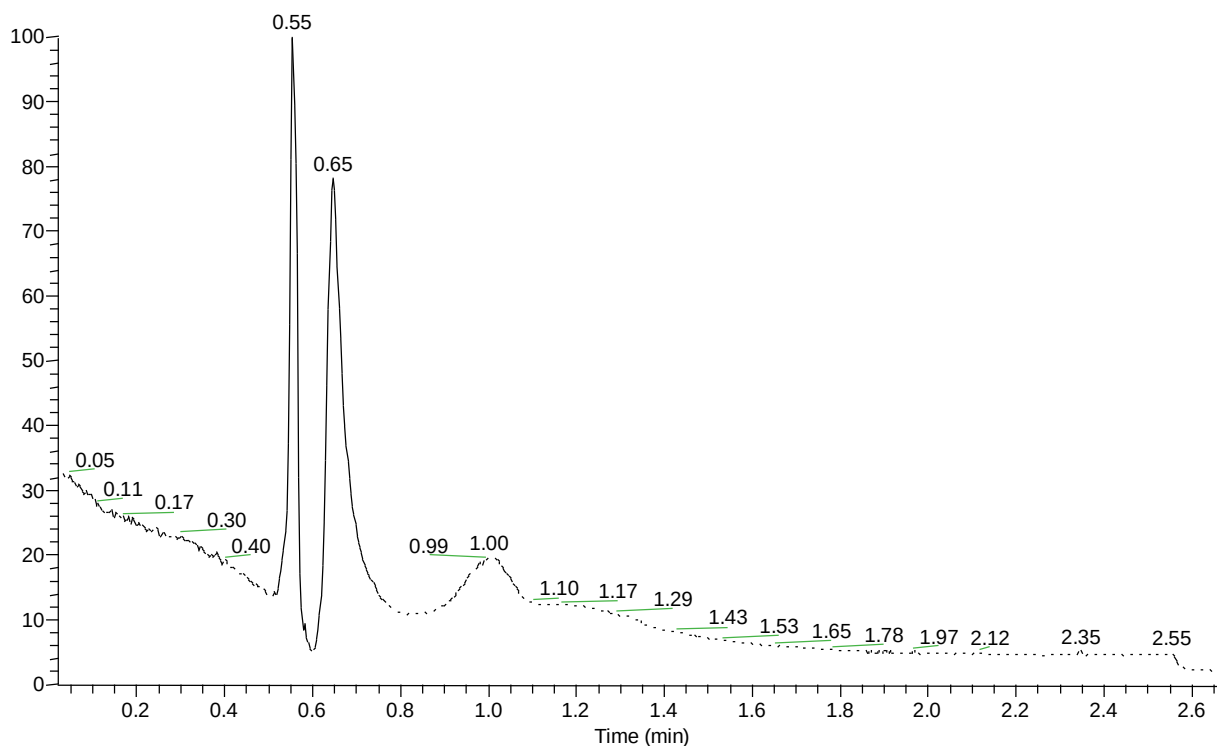


Figura 6.3.23. Cromatograma del sólido blanco ceroso.

El Rt 0.65 min se observó un patrón de fragmentación típico de un hidrocarburo saturado detectando el ion molecular en $366.4\ m/z$ y su pico base en $57.1\ m/z$, además el patrón de señales de fragmentación más características sigue una distribución Gaussiana (ver Tabla 6.3.2) concuerda para el hexacosano (**2**) descrito anteriormente (ver Figuras 6.3.9 y 6.3.10).

Para el Rt 1.0 min se observó una fragmentación cada $14.02\ u$ correspondiente a la pérdida consecutiva de unidades metilénicas, este tipo de patrón es característico de hidrocarburos saturados. Se identificó su ion molecular en $380.4\ m/z$ y su pico base en $57.1\ m/z$ correspondiente a $[C_{4}H_9]^+$, las señales más representativas se describen en la Tabla 6.3.2, estos datos coinciden para el heptacosano (**3**) detallado anteriormente (ver Figuras 6.3.11 y 6.3.12).



Se sometió a columna cromatográfica la fracción 6 (7:3 Hex-AcOEt) del extracto hexánico, obteniendo 53 fracciones. De las fracciones 16-53 (9:1 Hex-AcOEt) tras sucesivos lavados con una mezcla 1:1 Hex-Acetona fría se obtuvieron 493 mg de un sólido de color blanco.

El espectro de RMN de ^1H mostró en δ 4.05 una señal doble de triples ($J= 6.4$ Hz) característica de protones base de éster; en δ 2.28 una señal doble de triples ($J= 7.6$ Hz) mostrando acoplamiento vecinal y fue asignada a los protones alifáticos de la posición α al carbonilo de éster; se observó una señal simple en δ 1.25, correspondiente a los protones metilénicos de las cadenas alifáticas y en δ 0.87 ($J= 6.0$ Hz) se localizó una señal triple que integra para los protones de los metilos, este patrón de señales sugiere la presencia de un alcanoato de ácido graso (Figura 6.3.24).

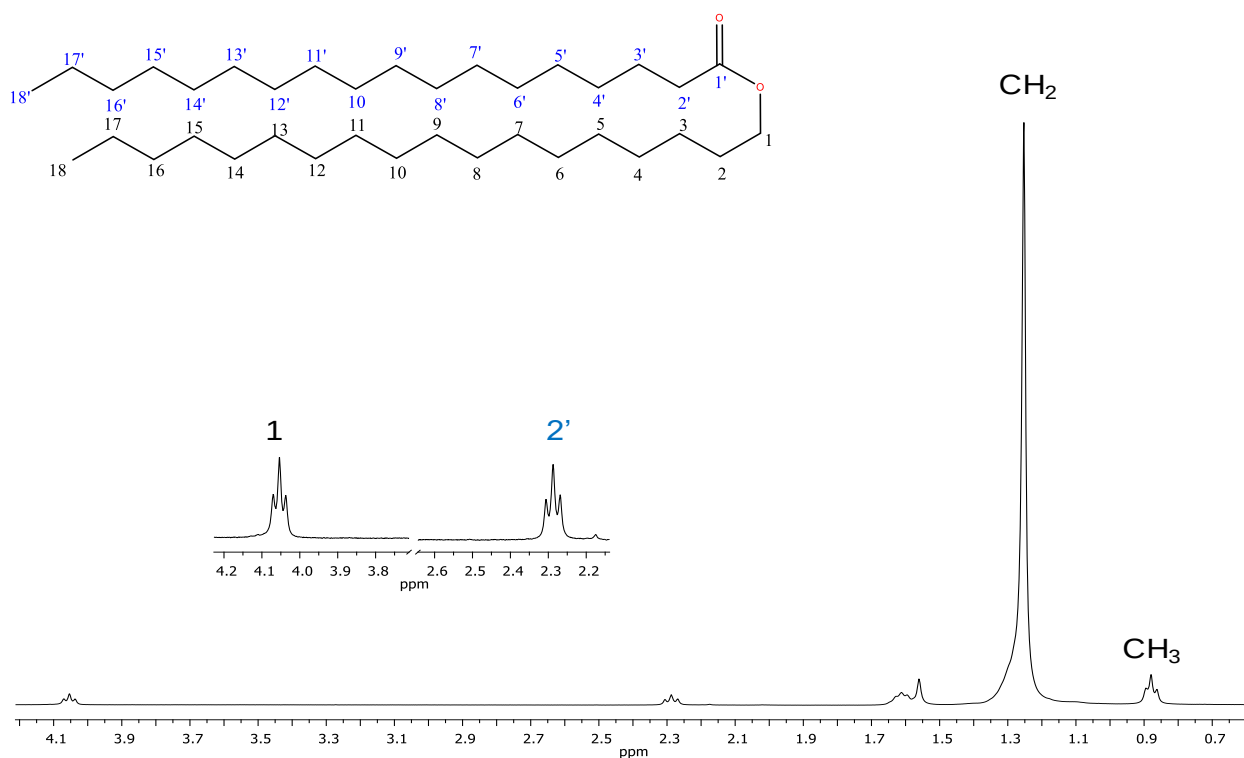


Figura 6.3.24. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del ácido octadecanoico octadecil éster (8).

En su espectro de RMN de ^{13}C se observó la presencia de una señal típica de carbonilo de éster en δ 173.8 asignada a C1'; desplazada a campo bajo, en δ 64.1 se



apreció la señal correspondiente del carbono base de éster C-1, un conjunto de señales entre δ 34.5-12.0 fueron observadas y asignadas a las cadenas alifáticas típicas de hidrocarburos saturados, este patrón de señales que sugiere una estructura de tipo alcanato de ácido graso (Figura 6.3.25).

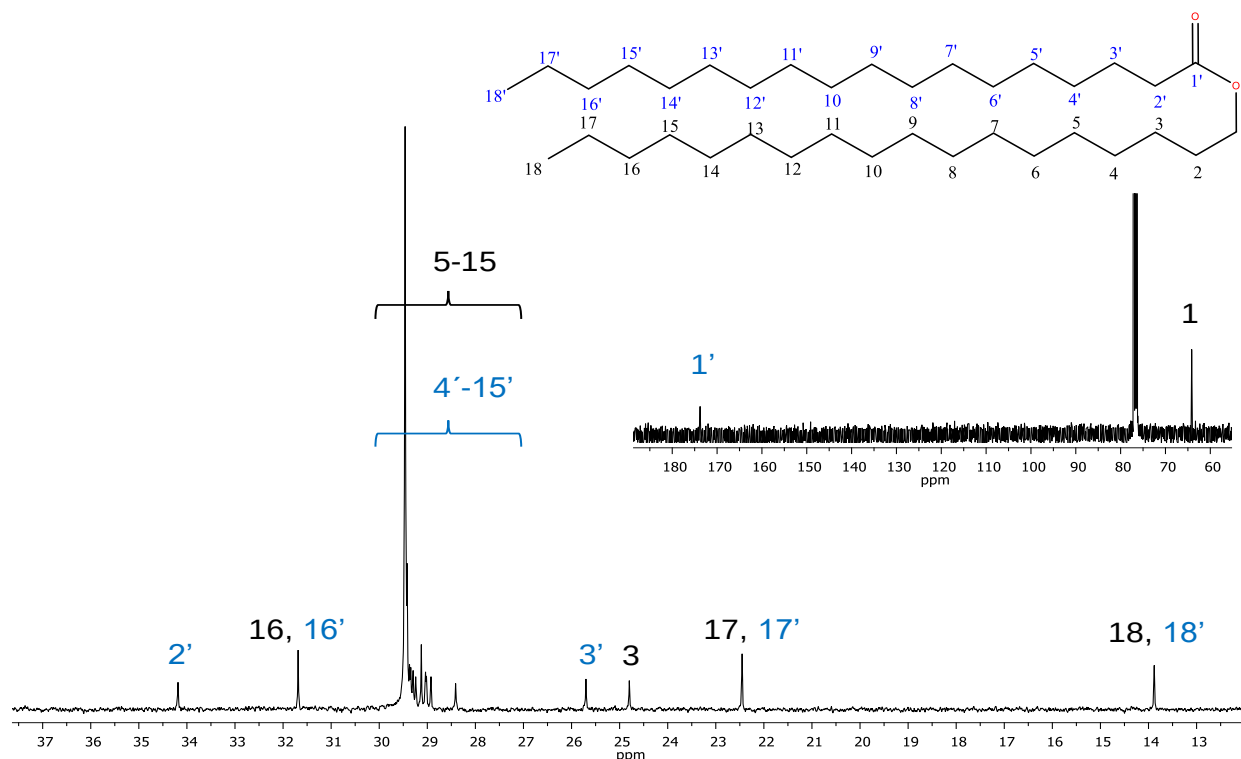


Figura 6.3.25. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del ácido octadecanoico octadecil éster (8).

Como parte de la caracterización de este compuesto se analizó por cromatografía de gases acoplada a EM, en su cromatograma se obtuvo un pico donde mayoritario en Rt 0.70 min (Figura 6.3.26).



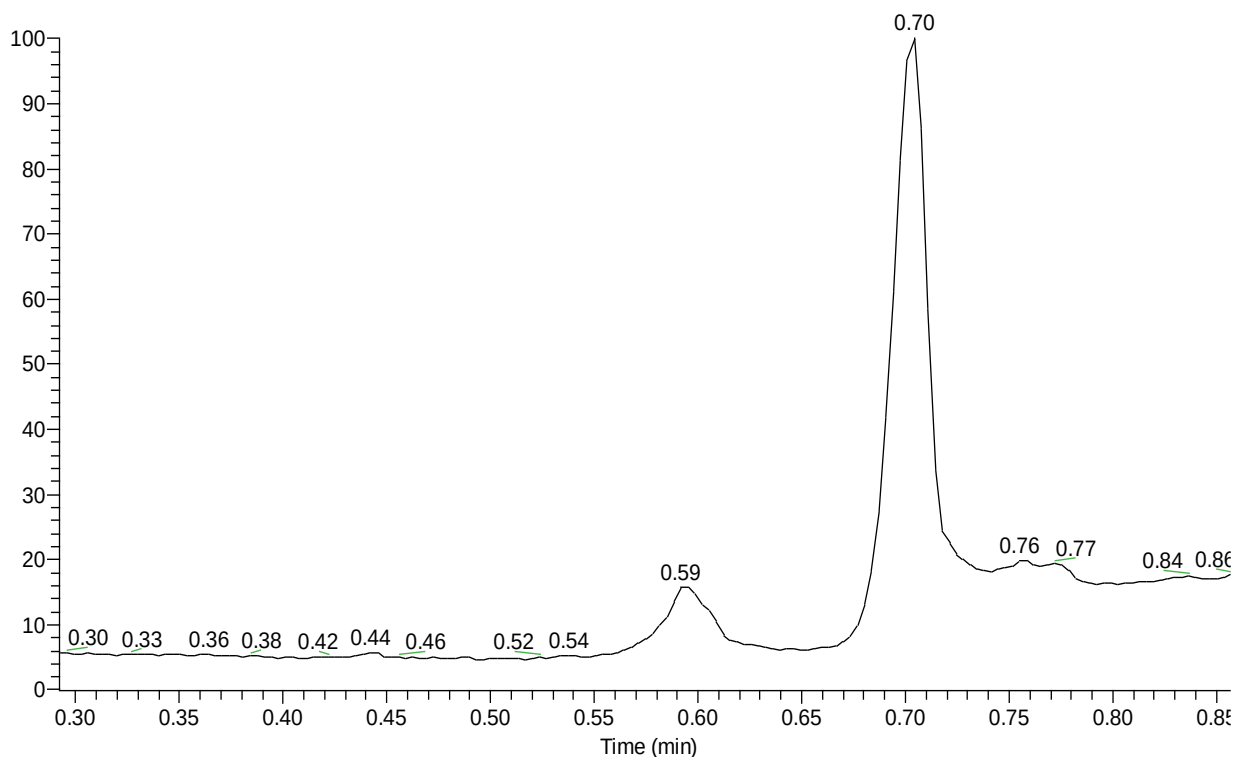


Figura 6.3.26. Cromatograma del sólido blanco ceroso obtenido de la fracción 6.

El espectro de masas a Rt 0.70 min se identificó un ion molecular 536.12 m/z correspondiente a la fórmula molecular $C_{36}H_{72}O_2$ para el ácido octadecanoico octadecil éster (**8**). El pico base de este compuesto corresponde a la señal en 57.1 m/z $[C_4H_9]^+$ característico de la fragmentación de las cadenas alifáticas del éster. Además, se observa un patrón de fragmentación correspondiente a compuestos del tipo éster, donde las señales más importantes son: m/z (Int. Rel.) 285.3 (2.5) corresponde al $[C_{18}H_{36}O_2]^+$, 257.2 (14.6) la pérdida de la cadena alifática $[C_{18}H_{38}]^+$, 125.2 (12.2) $[C_9H_{17}]^+$, 111.1 (23.8) $[C_8H_{15}]^+$, 97.1 (46.7) $[C_7H_{13}]^+$, 85.10 (36.7) $[C_6H_{13}]^+$, 71.1 (58.2) $[C_5H_{11}]^+$ (Figura 6.3.26).



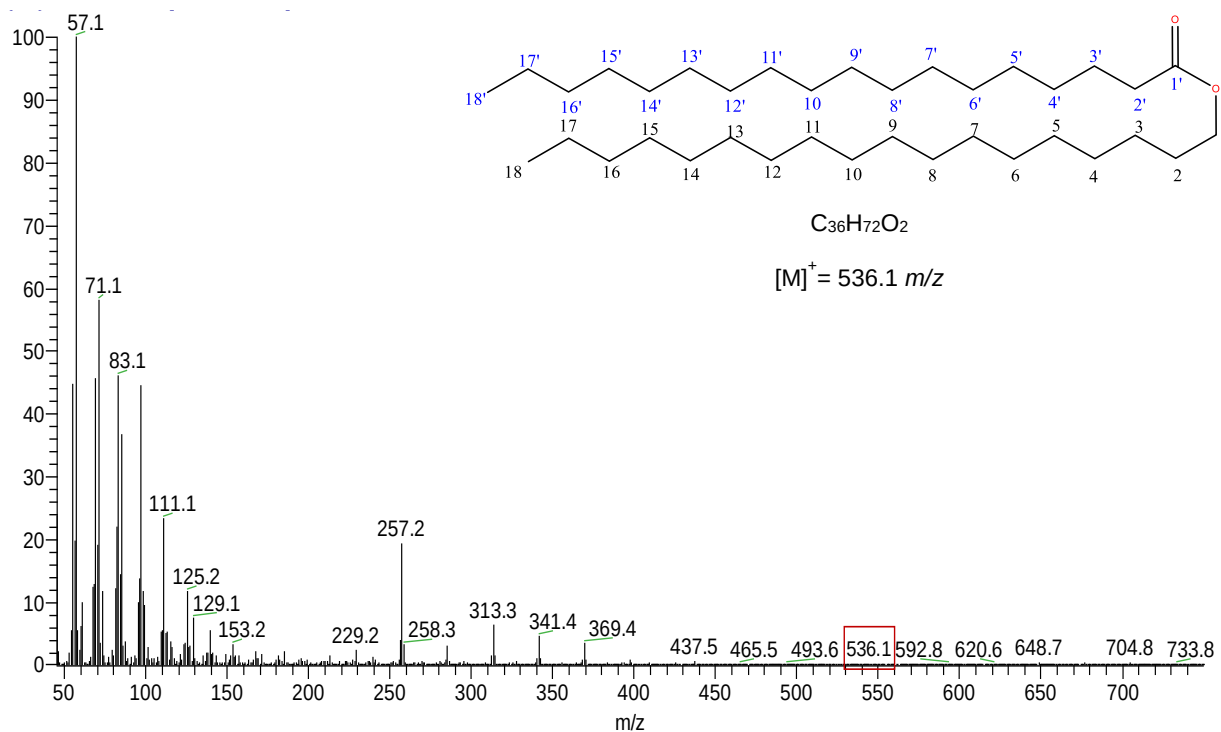


Figura 6.3.26. Espectro de masa correspondiente al ácido octadecanoico octadecil éster (**8**).

Los datos obtenidos fueron comparados con el software NIST MS Search 2.0, arrojando una similitud del 7.4% con el espectro experimental obtenido a Rt 0.70 min y el espectro proporcionado para el ácido octadecanoico octadecil éster ($C_{36}H_{72}O_2$) con un ion molecular 536.5 m/z . La figura 6.3.27, muestra la comparación del espectro a Rt correspondiente para el ácido octadecanoico octadecil éster (**8**). (rojo) y su comparación en la librería NIST MS Search 2.0.



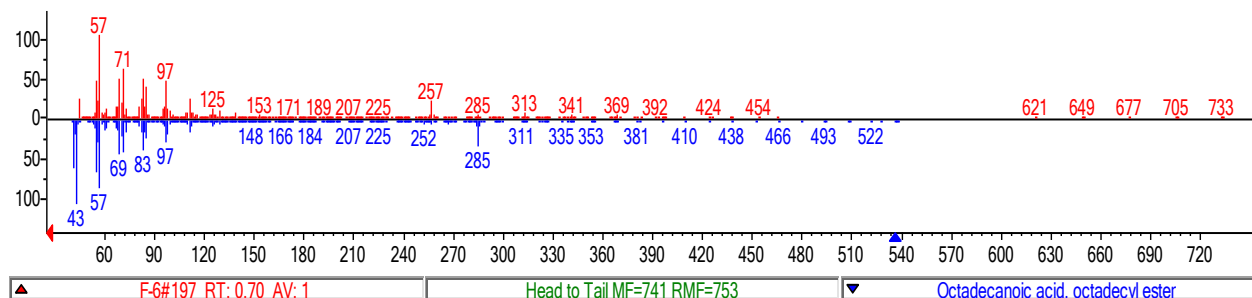


Figura 6.3.27. Comparación del espectro obtenido en Rt 0.70 min (trazo superior) versus compuesto librería NIST MS Search 2.0 (trazo inferior) correspondiente para ácido octadecanoico octadecil éster (8).

La composición química encontrada en *Trixis michuacana* var. *longifolia* está asociada a que todas las partes de la planta (excepto las raíces) están cubiertas por una cutícula, que es la interfase entre las plantas y su medio ambiente, protege a la planta de varios factores ambientales como la sequía y daño por las radiaciones ultravioleta y actúa como una defensa contra patógenos como insectos, bacterias y hongos (Pérez & Sepúlveda, 2011). La ultraestructura de la cutícula (entre 0.5 y 15 μm) varía ampliamente entre especies de plantas, tipos de órgano y su estado de desarrollo, y está irreversiblemente asociada al crecimiento activo de los tejidos vegetales (Tafolla et al., 2013).

Desde el punto de vista morfológico, estudios a través de un corte transversal observado desde el exterior de plantas con estas características, donde se aprecia que la cutícula cubre la pared celular de las células epidérmicas demuestran la presencia de una cubierta superior de ceras epicuticulares, seguida por otra capa inferior formada por cutina y ceras mezcladas con sustancias de la pared celular, pectinas, celulosa y otros carbohidratos, los cuales constituyen la capa cuticular, como lo ilustra la Figura 6.3.28 (Tafolla et al., 2013).

En contraste, las ceras cuticulares, constituyen de 20 a 60% de la masa de la cutícula, que pueden ser extraídas por solventes orgánicos. La cera cuticular es una mezcla compleja de compuestos alifáticos de cadenas lineales que varían en cuanto a su tamaño (C_{20} y C_{40}); sin embargo, también se han identificado ésteres con cadenas que van desde C_{37} a C_{70} . Los principales componentes químicos de las ceras son n-alcanos,



ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas y ácidos grasos, además también puede incluir metabolitos secundarios y polisacáridos (celulosa y pectina) y polipéptidos (Samuels *et al.*, 2008; Tafolla *et al.*, 2013).

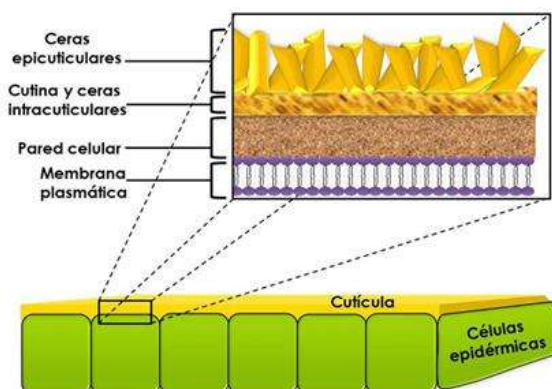


Figura 6.3.28. Ubicación de la cutícula con respecto a las células epidérmicas, y sección transversal de la misma, muestra la posición de los principales polímeros que la conforman, (Fuente Tafolla *et al.*, 2013).

La formación de las ceras cuticulares se lleva a cabo en los cloroplastos, comenzando con la síntesis de ácidos grasos C_{16} y C_{18} (Figura 6.3.29). Una vez sintetizados los ácidos grasos son transportados de los cloroplastos al retículo endoplasmático (RE) para la formación de ácidos grasos de cadenas muy largas (VLCFAs) de C_{24} a C_{34} (Samuels *et al.*, 2008; Tafolla *et al.*, 2013).

Para la formación de alcoholes primarios se da por la vía de reducción del acil-CoA, por tanto, es la responsable de la formación de componentes con predominante número par de carbonos. En las diversas especies de plantas y órganos, los más importantes son los alcoholes primarios de C_{26} a C_{28} y en algunos sistemas C_{30} a C_{32} , se encuentran de manera libre o esterificados. Los alcoholes son generados por reducción de precursores de VLCFAs y se producen mediante aldehídos intermediarios (Tafolla *et al.*, 2013).

La biosíntesis de ésteres componentes de las ceras cuticulares, utiliza como sustrato una amplia gama de ácidos grasos saturados e insaturados en forma de acil-CoA, que varían entre C_{14} a C_{24} o alcoholes C_{18} insaturados. El tamaño de las cadenas varía entre



C₃₇ a C₇₀, poseen además una correlación en cuanto al tamaño de las cadenas alifáticas en ambos tipos de compuestos (Samuels *et al.*, 2008; Tafolla *et al.*, 2013).

Una segunda fase de la ruta biosintética de las ceras es responsable de la formación de compuestos con número predominantemente impar de carbonos. La biosíntesis se centra en una reacción central para la formación de alcanos (el paso que hace la transición de cadenas de carbono de números pares a impares) implica la pérdida de un átomo de carbono de los precursores de acilo, en lugar de la adición de un carbono (Tafolla *et al.*, 2013). Se han propuesto varias hipótesis, que difieren principalmente en la pérdida de un carbono, pero sólo una se ha probado hasta cierto punto: la etapa de escisión de Carbono-Carbono es la descarboxilación por un intermediario de aldehído y, por lo tanto, la formación de alcanos de número impar (Bognar *et al.*, 1984; Samuels *et al.*, 2008).

Los *n*-alcanos más abundantes en la mayoría de las plantas superiores son los de número impar de carbonos en el rango de C₂₁ a C₃₅ y tanto la concentración como la proporción relativa están determinadas genéticamente, por lo que pueden diferir marcadamente entre distintas especies y dentro de una misma especie, aunque también se observan diferencias entre las partes morfológicas de una misma planta y variaciones relacionadas con la edad, el desarrollo y las condiciones ambientales (Bakker *et al.*, 2006). Por esta razón estos metabolitos, tienen una gran relevancia en *Trixis michuacana* var. *longifolia*, ya que se pueden desempeñar como marcadores genéticos contribuyendo así a la quimiotaxonomía de la especie.



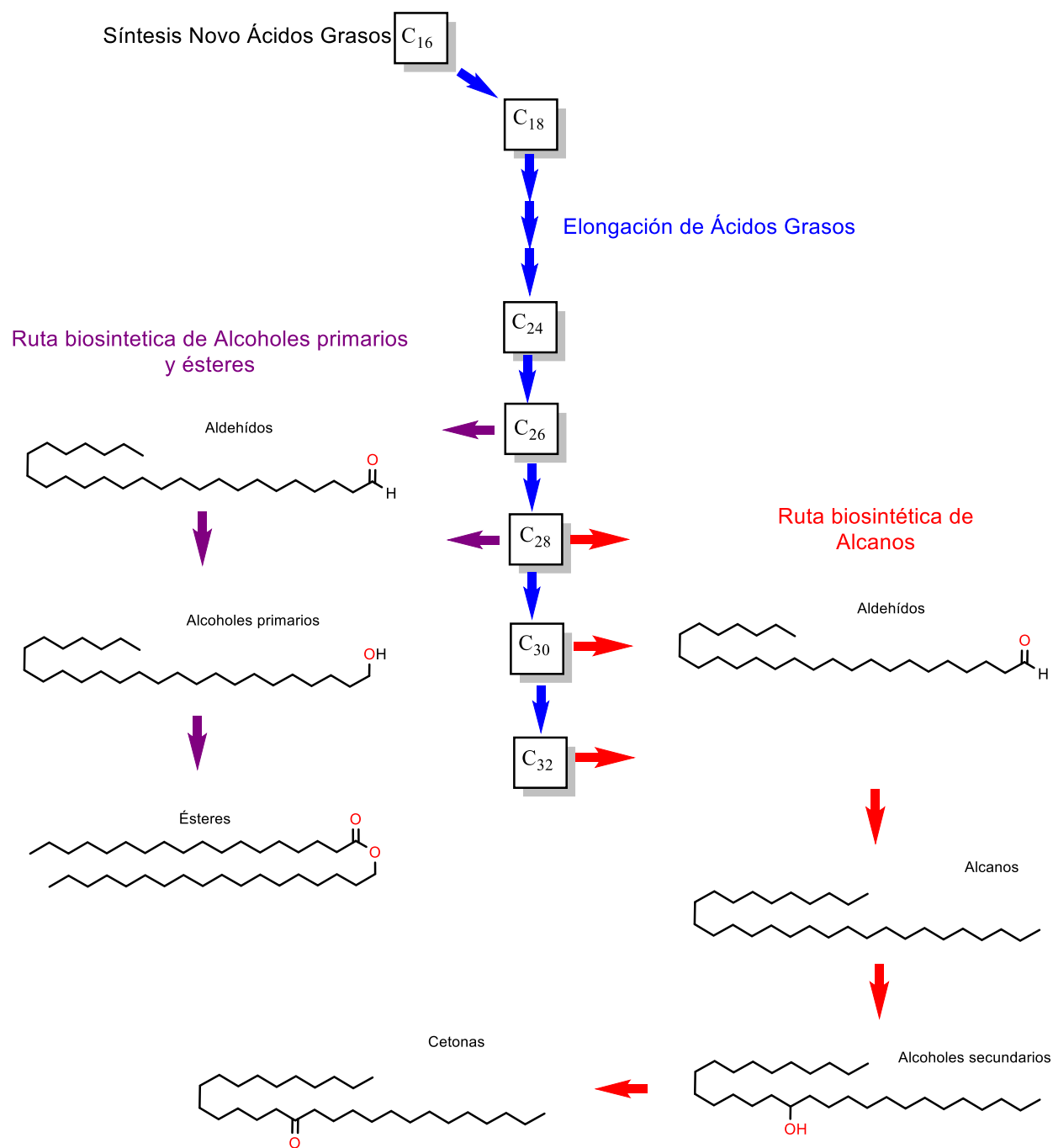


Figura 6.3.29. Biosíntesis de las ceras cuticulares (Modificado: Samuels *et al.*, 2008; Tafolla *et al.*, 2013).



Las fracciones 7 y 8 (3:2 Hex-AcOEt) del extracto hexánico de hoja, se unieron y fueron sometidas a cromatografía de columna empleando mezclas de Hex-AcOEt en orden ascendente para la obtención de 10 fracciones enriquecidas.

La fracción 4 (4:1 Hex-AcOEt) (Figura. 6.3.29) presentó un precipitado, al cual se le realizaron sucesivos lavados con acetona, llevándonos a la obtención de 688 mg de un sólido blanco ceroso.



Figura 6.3.29. Fracción 4 antes de realizar los lavados con acetona, donde podemos observar un precipitado en el fondo del vial.

En su espectro de RMN de ^1H en el cual se observaron señales en la región vinílica en δ 5.18 una señal triple ($J= 3.6$ Hz) que corresponde al protón vinílico de la posición H-12; en δ 4.50 una señal doble de dobles ($J= 8.4, 6.4$ Hz) que se asignó para el protón base de éster H-3; de igual manera se identificó en δ 2.29 una señal triple con acoplamiento vecinal ($J= 7.6$ Hz) para el protones alifáticos de la posición α al carbonilo de éster; se identificó adicionalmente, una señal simple intensa en δ 1.25 asignada a los protones alifáticos 4'-15' de la cadena de ácido graso; en δ 1.13 a δ 0.83 se observaron 8 señales correspondientes a los metilos de la molécula, estas señales pertenecen a un compuesto triterpénico funcionalizado (Figura 6.3.30).



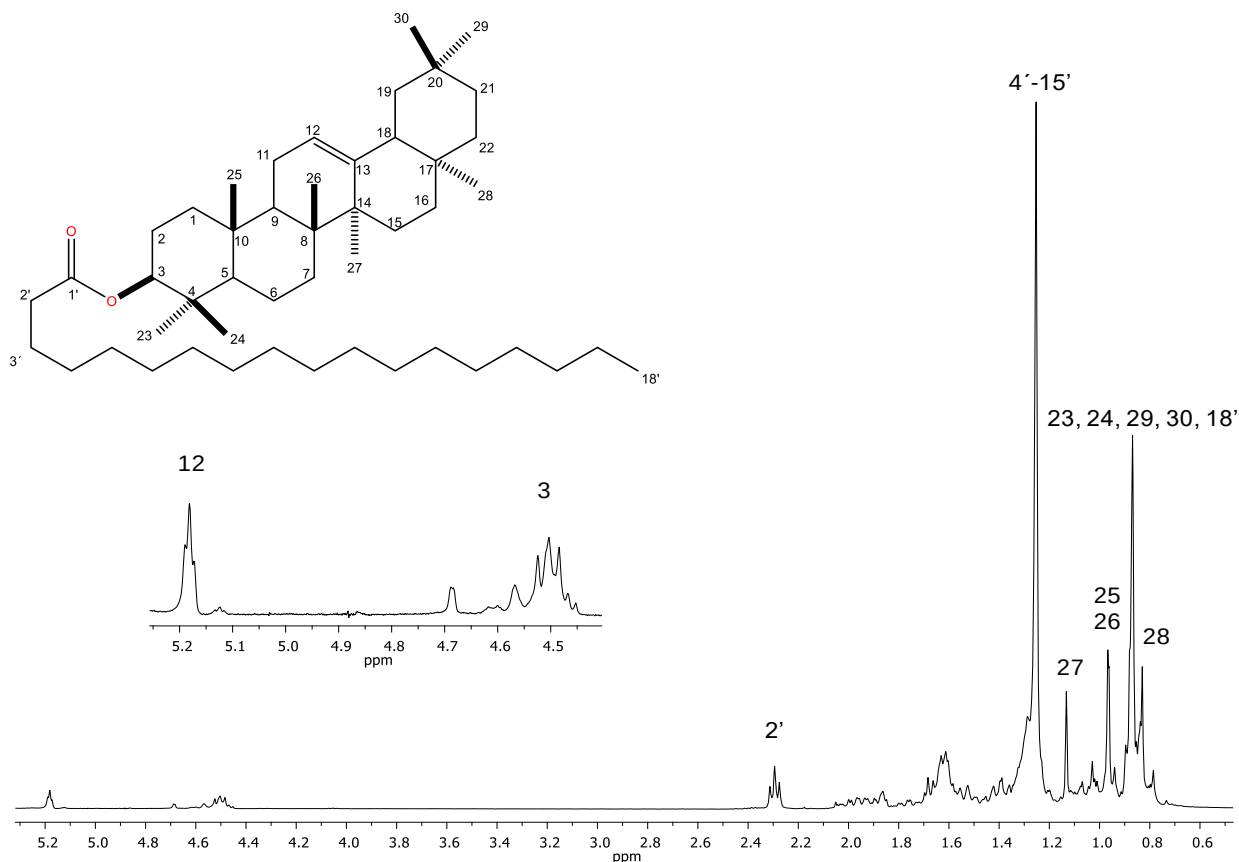


Figura 6.3.30. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del estearato de β -amirina (9).

En su espectro de RMN de ^{13}C se diferenci3 en δ 173.72 la se3al característica de carbonilo de éster C-1'; en δ 145.2 y δ 121.6 las se3ales correspondientes para los carbonos sp^2 C-13 y C-12, respectivamente; por otra parte, en δ 80.6 se observ3 la se3al del carbono base de éster C-3; un grupo de 6 se3ales entre δ 30.0 y δ 29.0 fueron asignadas a una cadena alifática típica de ácidos grasos saturados; las se3ales correspondientes al resto del esqueleto pentacíclico se ubic3 en δ 28.5 a δ 14.0; este patr3n de se3ales son características del esqueleto de oleanano que se encuentra esterificado (Figura 6.3.31).

Los datos obtenidos fueron comparados con la literatura coincidiendo para el triterpeno esterificado de β -amirina (9) (Tabla 6.3.3).



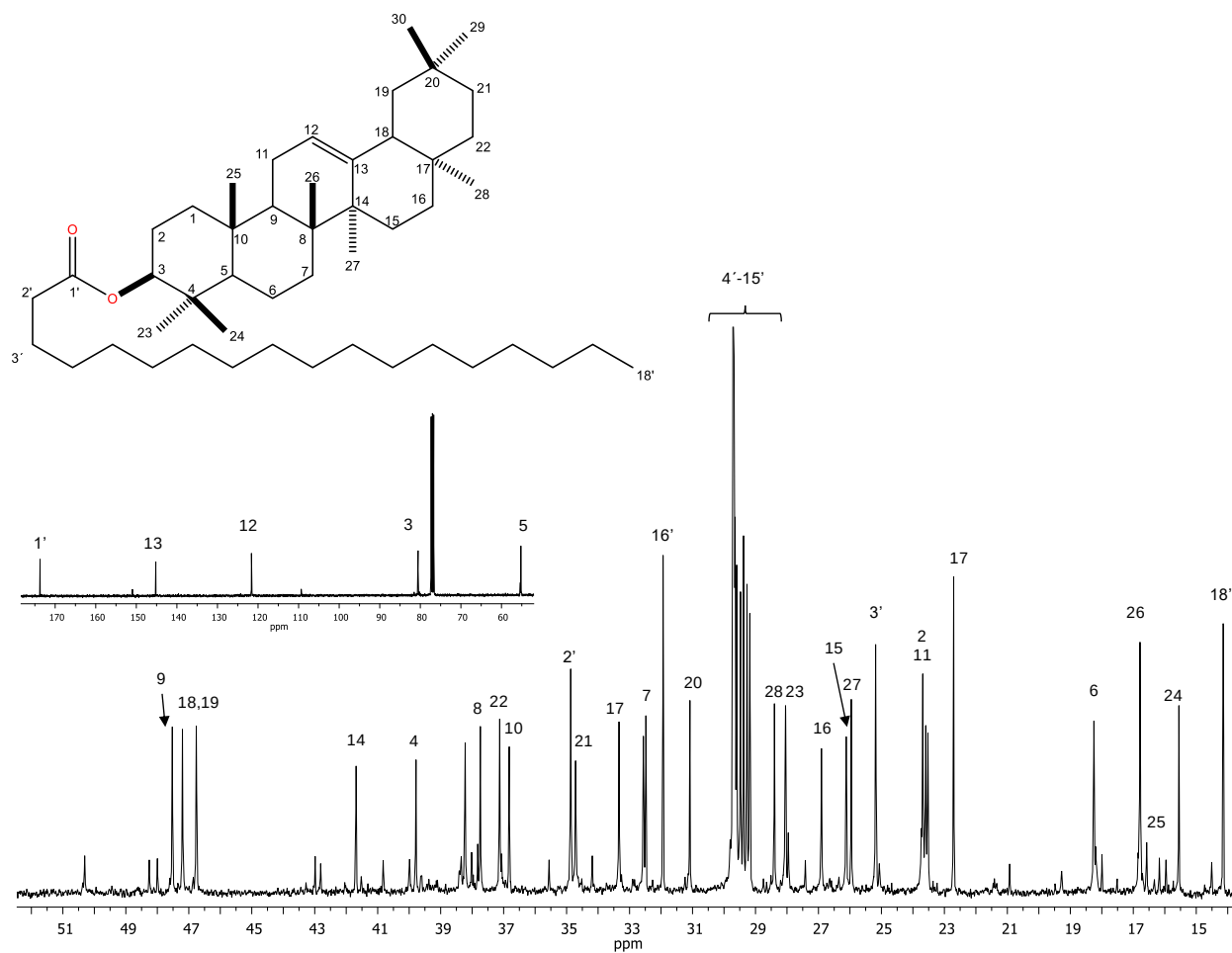


Figura 6.3.31. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del estearato de β -amirina (9).



Tabla 6.3.3. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C del éster de β -amirina (**9**) con la literatura (Shan *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2006).

Estearato de β -amirina (9)					
β -amirina (Shan <i>et al.</i> , 2014)			Cadena de ácido graso (Miranda <i>et al.</i> , 2006)		
Carbonos	Experimental (δ en ppm)	Referencia (δ en ppm)	Carbonos	Experimental (δ en ppm)	Referencia (δ en ppm)
1	38.3	38.3	1'	173.7	173.54
2	23.5	23.5	2'	34.8	34.87
3	80.6	81.0	3'	25.2	25.21
4	39.9	39.8	4'	29.2	29.21
5	55.3	55.2	5'	29.3	29.28
6	18.3	18.3	6'	29.4	29.37
7	32.6	32.6	7'	29.6	29.61
8	37.7	37.7	8'	29.7	29.68
9	47.5	47.6	9'	29.7	29.70
10	36.8	36.8	10'	29.7	29.72
11	23.7	23.6	11'	29.7	29.72
12	121.6	121.6	12'	29.7	29.72
13	145.2	145.2	13'	29.7	29.72
14	41.6	41.7	14'	29.6	29.56
15	26.1	26.1	15'	29.5	29.49
16	26.9	26.9	16'	31.9	31.95
17	32.6	32.5	17'	22.7	22.70
18	47.2	47.2	18'	14.1	14.09
19	46.7	46.7			
20	31.0	31.1			
21	34.8	34.7			
22	37.1	37.1			
23	28.0	28.0			
24	15.5	15.6			
25	16.6	16.7			
26	16.8	16.8			
27	25.9	26.0			
28	28.4	28.4			
29	23.5	23.4			
30	23.6	23.7			



Como parte de la caracterización del triterpeno esterificado se examinó por cromatografía de gases acoplado a EM (Figura 6.3.32) observándose un solo pico mayoritario en Rt 0.70 min.

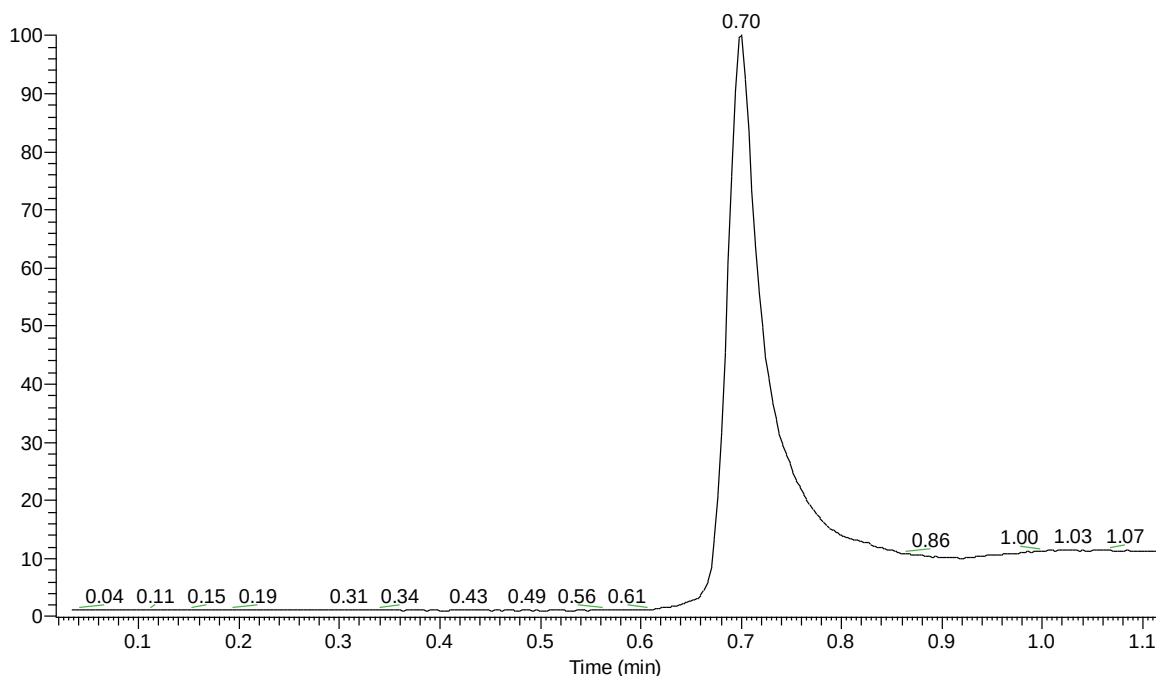


Figura 6.3.32. Cromatograma de gases del estearato de β -amirina (**9**).

En su espectro de masa permitió confirmar la presencia de un ion molecular 692.6 m/z , en concordancia con la fórmula molecular $C_{48}H_{84}O_2$ correspondiente al estearato de β -amirina. La asignación de los fragmentos más importantes son: 678.6 m/z la pérdida de un grupo metilo a partir del ion molecular $[M-CH_3]^+$, el pico base del espectro se observó a 145.1 m/z el cual se forma de la fragmentación del grupo estearato, la pérdida terpénica seguido de la pérdida de agua a 408.4 m/z (9.93) (M-Estearato- H_2O), en 257.3 m/z se aprecia la señal correspondiente al grupo estearato; así como los fragmentos m/z (Int. Rel.) 218.2 (90.1), 201.1 (21.0), 203.2 (48.4) y 189.2 (46.0), que constituyen los denominados picos diagnósticos para el esqueleto del tipo oleanano (Figura 6.3.33).



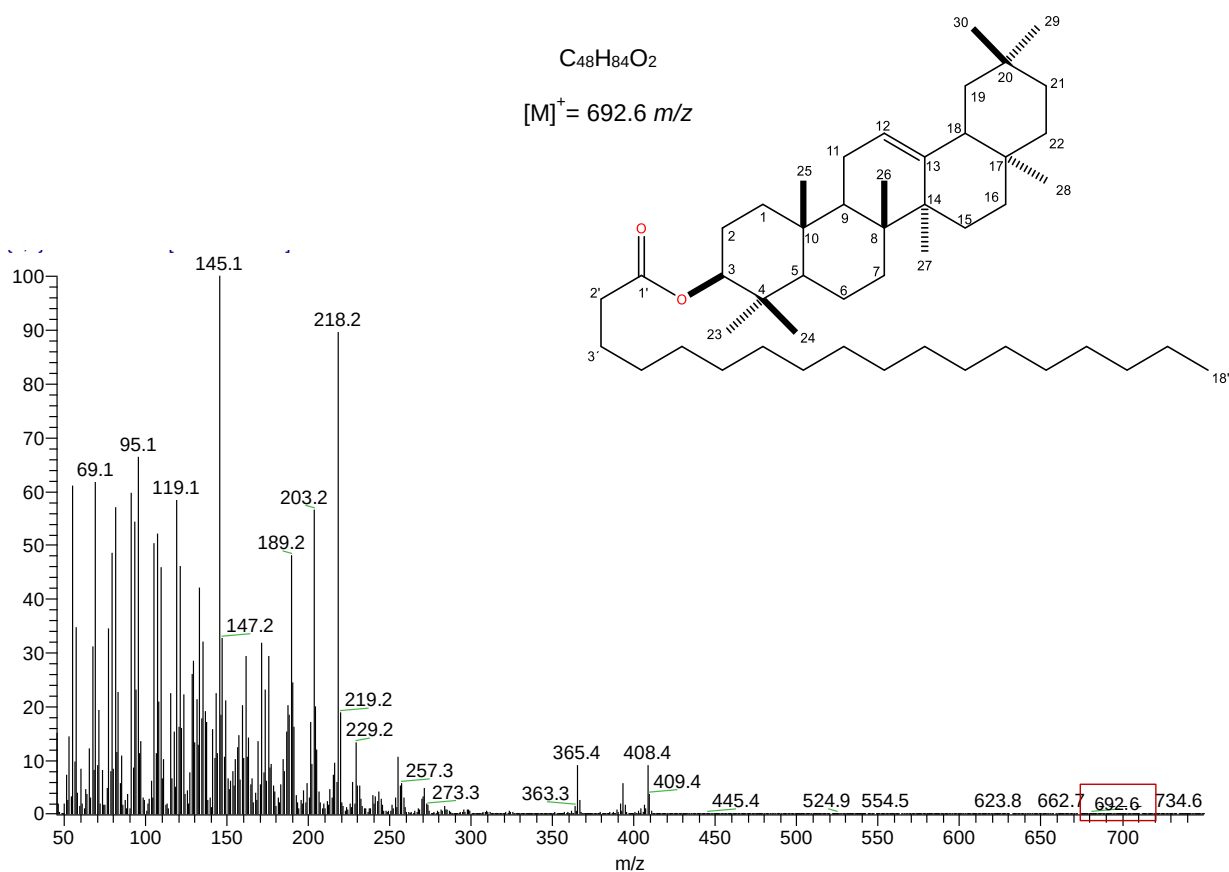


Figura. 6.3.33. Espectro de masas en Rt 0.70 min correspondiente al estearato de β -amirina (**9**).

El fragmento 218 m/z (67.9) es el más importante porque corresponde a un reordenamiento Retro-Diels-Alder (RDA), en el anillo C que posee el doble enlace, que favorece la ruptura RDA en el espectro de masas (Figura 6.3.34) y del cual se originan los iones 203 m/z , por la pérdida de un grupo metilo y 189 m/z debido a la pérdida del fragmento $[C_2H_5]^+$ por la ruptura del enlace que une a los anillos D y E (Bracho *et al.*, 2009).



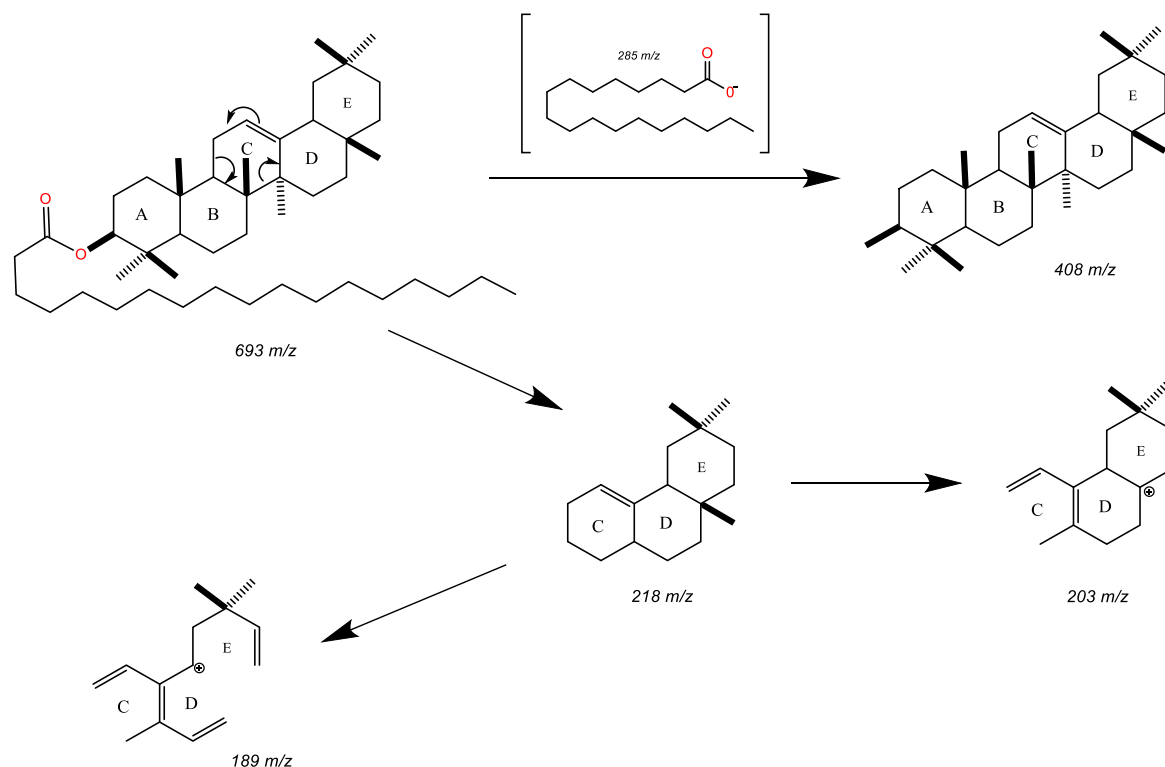


Figura 6.3.34. Patrón de fragmentación del estearato de β -amirina (9).

De los lavados de la fracción 4 se obtuvo una miel de color naranja, la cual fue sometida a columna cromatográfica para la obtención de 100 fracciones.

De las fracciones 26-29 (9:1 Hex-CH₂Cl₂) se obtuvieron 41 mg un sólido de color blanco, el cual en su espectro de RMN de ¹H mostró en δ 5.18 (J = 3.6 Hz) y δ 5.12 (J = 3.2 Hz), dos señales triples, perteneciente a los protones vinílicos de H-12 y H-12 respectivamente; en δ 4.50 se ubicó una señal doble de dobles (J = 8.4, 6.4 Hz) perteneciente a un protón base de éster H-3 y H-3; en 2.29 una señal triple con acoplamiento vecinal (J = 7.2 Hz) para los protones alifáticos de la posición α al carbonilo de éster H-2'; a campo alto se localiza en δ 1.25 la señal simple intensa típica de un ácido graso saturado asignados a los protones H-4'- 15'; en δ 1.13 se aprecia la señal simple de los protones del grupo metilo H-27 y H-27; entre δ 0.86 y 0.82 se observan las señales de los protones terciarios de los metilos de la H-28 y H-29 (Figura 6.3.35).



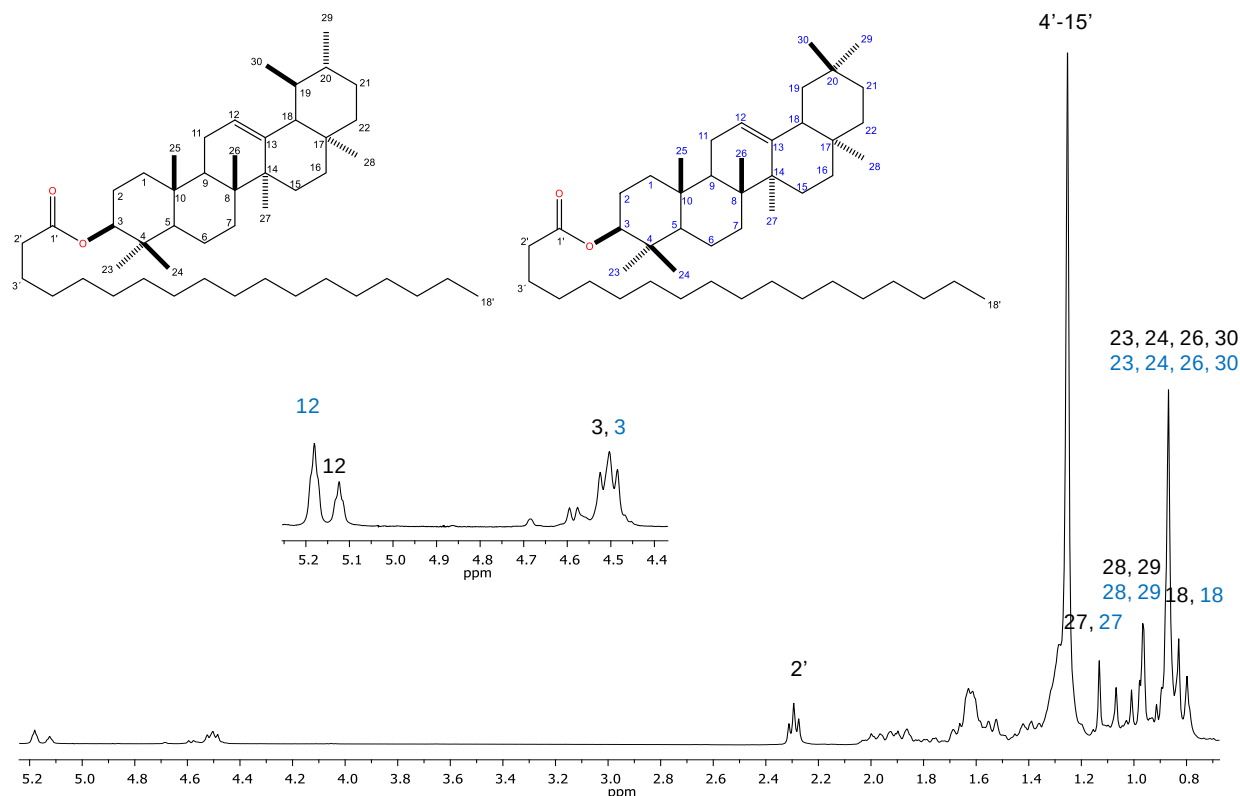


Figura 6.3.35. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de la mezcla de estearato de α - y β -amirina (**10**, **9**).

En su espectro de RMN de ^{13}C se ubicó en δ 173.7 una señal típica para carbonilo de éster C-1'; en δ 145.2 y δ 121.6 las señales de los carbonos vinílicos de la posición C-**13** y C-**12**, respectivamente; así mismo se aprecian en las señales de los carbonos sp^2 en δ 139.6 asignada a C-13 y δ 124.3 para C-12; para el carbono base de éster se sitúa en δ 80.6; un grupo de siete señales se ubicaron entre δ 32.0 y δ 29.0 características de una cadena alifática de ácidos grasos saturados; el resto de las señales correspondientes a los esqueletos triterpénicos se ubican en δ 59.1 a δ 14.1. Las señales son correspondientes a una mezcla de compuestos triterpénicos del tipo oleanano y ursano esterificados (Figura 6.3.36 a y b; Tablas 6.3.3 y 6.3.4).

Los datos obtenidos fueron comparados con lo descrito en la bibliografía y se concluyó que se trataba de una mezcla (2:1) constituida por estearato de β -amirina (**9**) (ver Tabla 6.3.3) y estearato de α -amirina (**10**).



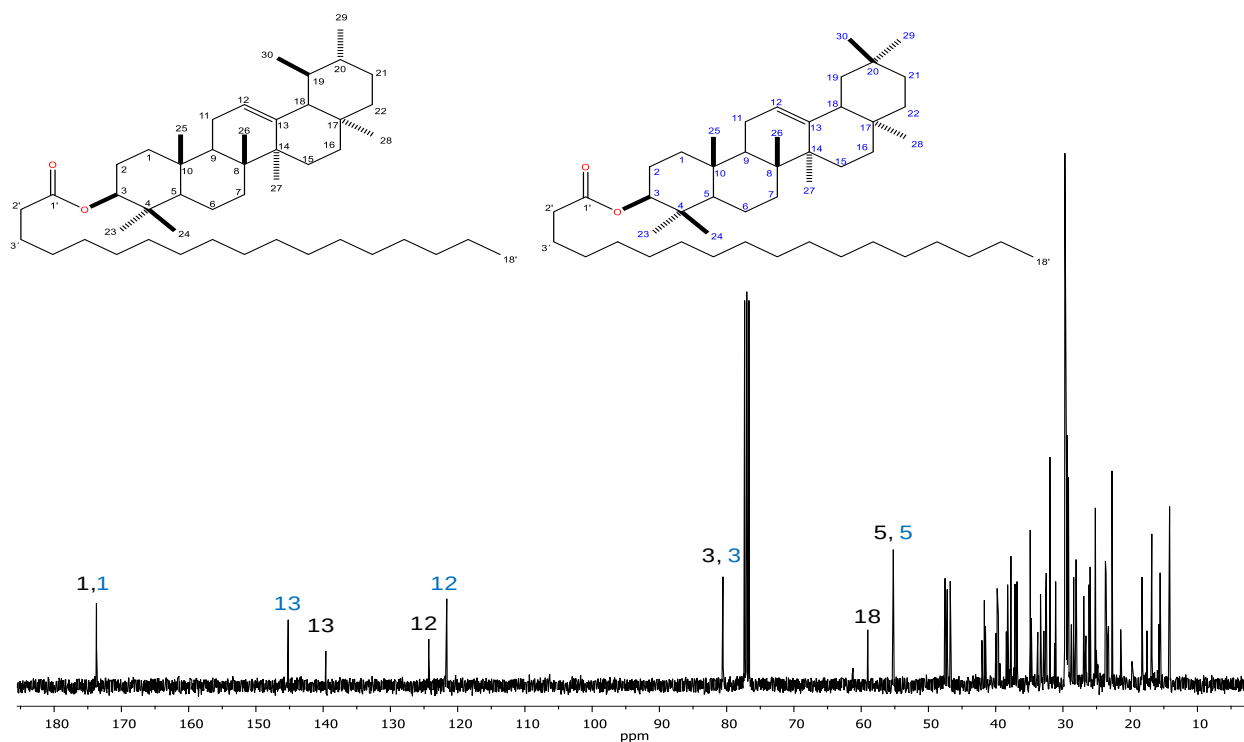


Figura 6.3.36 a. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 de la mezcla de estearato de α - y β -amirina (10, 9).

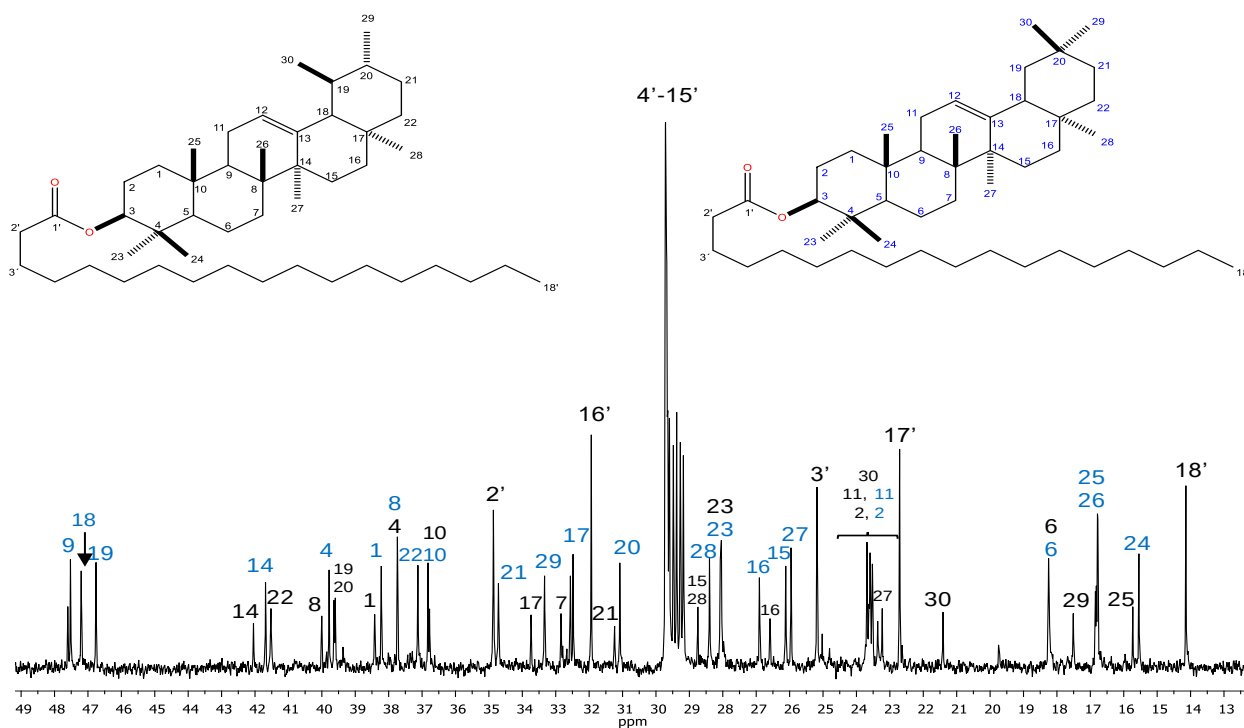


Figura 6.3.36 b. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del estearato de α - y β -amirina (10, 9).



Tabla 6.3.4. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C del estearato de α -amirina (**10**) con la literatura (Miranda *et al.*, 2006).

Estearato de α -amirina (10)					
α -amirina			Cadena de ácido graso		
Carbonos	Experimental (δ en ppm)	Referencia (δ en ppm)	Carbonos	Experimental (δ en ppm)	Referencia (δ en ppm)
1	38.4	38.5	1'	173.7	173.68
2	23.7	23.6	2'	34.7	34.71
3	80.5	80.6	3'	25.2	25.20
4	37.7	37.7	4'	29.2	29.20
5	55.2	55.3	5'	29.3	29.28
6	18.3	18.2	6'	29.4	29.38
7	32.8	32.9	7'	29.6	29.60
8	40.0	40.0	8'	29.7	29.68
9	47.6	47.6	9'	29.7	29.69
10	36.8	36.8	10'	29.7	29.71
11	23.3	23.4	11'	29.7	29.72
12	124.3	124.3	12'	29.7	29.72
13	139.6	139.6	13'	29.7	29.72
14	42.0	42.1	14'	29.7	29.66
15	28.7	28.7	15'	29.4	29.49
16	26.6	26.6	16'	31.9	31.95
17	33.7	33.7	17'	22.7	22.70
18	59.0	59.1	18'	14.1	14.12
19	39.6	39.6			
20	39.7	39.7			
21	31.2	31.2			
22	41.5	41.5			
23	28.0	28.1			
24	16.8	16.8			
25	15.7	15.7			
26	16.8	16.9			
27	23.2	23.2			
28	28.7	28.7			
29	17.5	17.5			
30	21.4	21.4			



En las fracciones de 76-84 (9:1 Hex-CH₂Cl₂) se consiguió un sólido blanco ceroso al cual, tras varios lavados con hexanos, se obtuvieron 35 mg. En su espectro de RMN de ¹H se observó en δ 4.66 una señal doble ancha (J = 2.4 Hz) que se asignó al protón vinílico H-29a; en δ 4.53 mostró una señal doble de dobles (J = 2.4 y 1.6 Hz) asignada a H-29b, este acoplamiento evidenció una correlación alílica con los protones del metilo terciario H-30; en δ 4.44 se encontró una señal doble de triples (J = 12.0 y 6.0 Hz) correspondiente al protón base de éster H-3; en δ 2.35 se distinguió una señal doble de triples (J = 10.4 y 5.0 Hz) asignada al protón en posición alílica H-19; se identificó en δ 2.25 una señal triple la cual mostró acoplamiento vecinal (J =7.4 Hz) y fue asignada al metileno alifático H-2' en posición alfa a carbonilo de éster, en δ 1.65 se observó la señal simple ancha del metilo vinílico CH-30; la señal simple en δ 1.25 corresponde a los protones metilénicos de la cadena de ácido graso saturado; en δ 1.00 a δ 0.75 se observaron las señales simples de los protones de los metilos de la molécula (Figura 6.3.37).

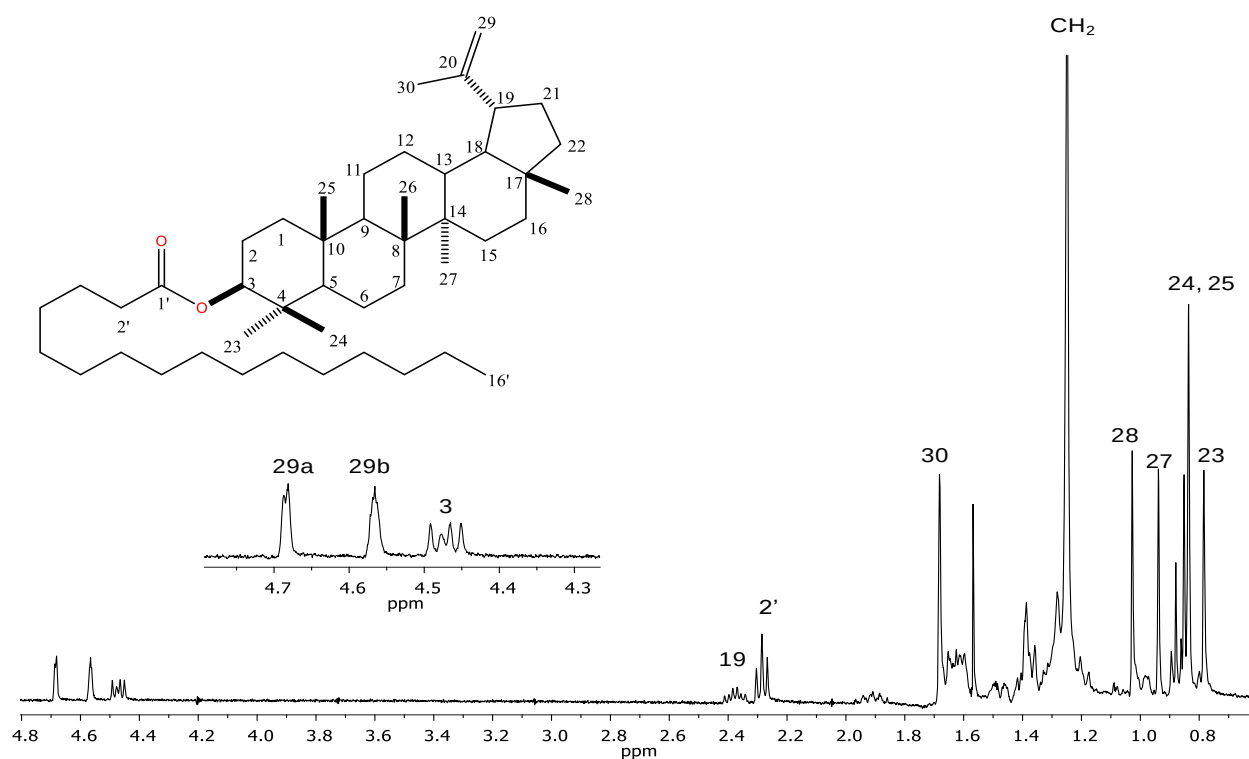


Figura 6.3.37. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del palmitato de lupeilo (11).



En su espectro de RMN de ^{13}C se observó la presencia de una señal típica de carbonilo de éster en δ 173.8; en δ 150.8 se localizó la señal correspondiente al carbono vinílico cuaternario C-20, además, en δ 109.6 la señal que integra para el metileno vinílico C-29, este conjunto de señales son características del esqueleto pentacíclico denominado lupano; en δ 80.5 se apreció la señal del carbono base de éster C-3; en δ 29.0 y δ 30.0 se identificó un grupo de siete señales asignadas a una cadena alifática típica de ácidos grasos saturados; de δ 28.5 a δ 14.0 se aprecian el resto de las señales correspondientes al esqueleto. El patrón de señales confirmó que se trataba de un esqueleto triterpénico esterificado (Figura 6.3.38).

Estos datos fueron comparados con los descritos, coincidiendo para el triterpeno denominado palmitato de lupeilo (**11**), (Tabla 6.3.5).

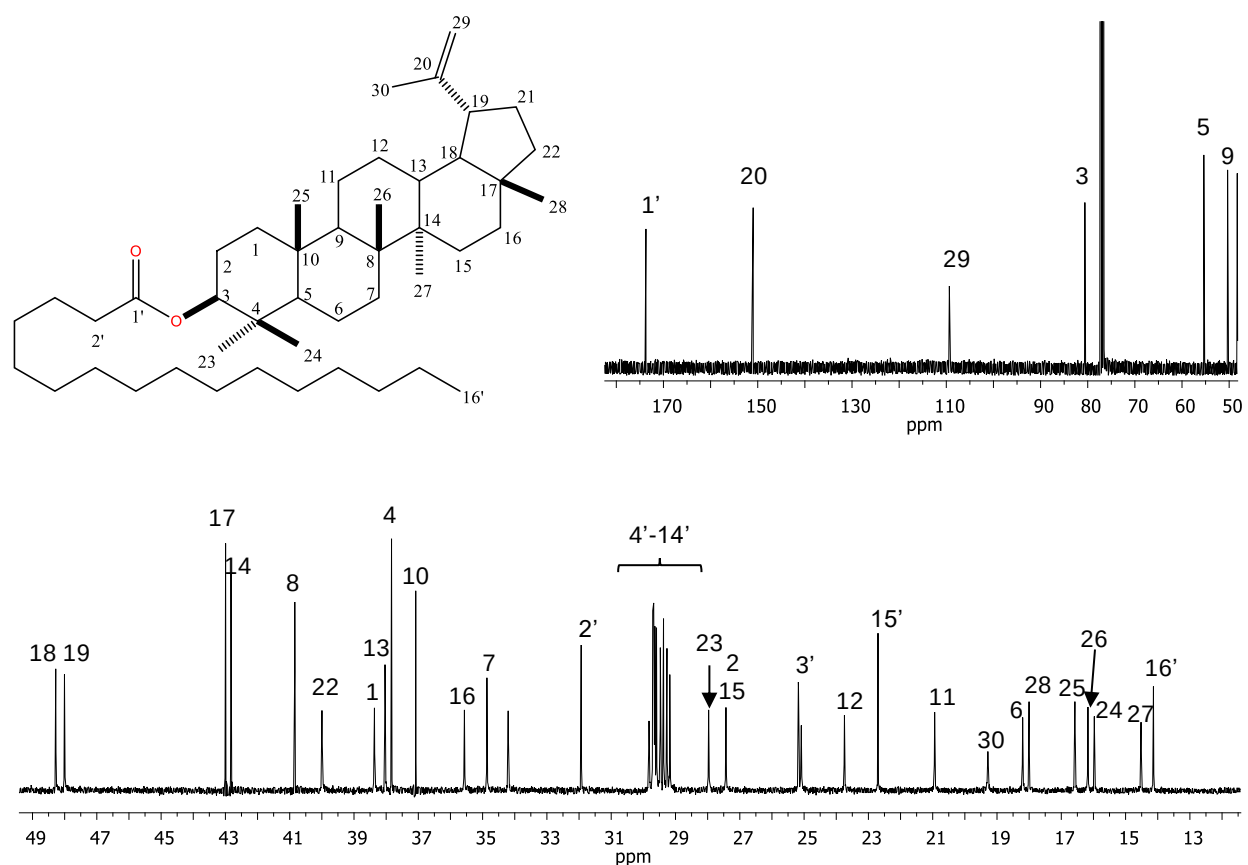


Figura 6.3.38. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del palmitato de lupeilo (**11**).



Tabla 6.3.5. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C del palmitato de lupeilo (**11**) con la literatura (Kezetas *et al.*, 2017.)

Palmitato de lupeilo (11)		
Carbonos	Experimental (δ en ppm)	Referencia (δ en ppm)
1	38.3	38.4
2	27.4	27.4
3	80.6	80.6
4	37.8	37.8
5	55.3	55.4
6	18.2	18.2
7	34.8	34.7
8	40.8	40.9
9	50.3	50.4
10	37.1	37.1
11	20.9	21.0
12	25.1	25.1
13	38.0	38.1
14	42.8	42.8
15	27.4	27.4
16	35.5	35.5
17	42.9	43.0
18	48.2	48.3
19	48.0	48.0
20	150.9	151.0
21	29.8	29.8
22	40.0	40.0
23	28.0	28.0
24	15.9	16.0
25	16.5	16.6
26	16.1	16.2
27	14.5	14.5
28	18.0	18.0
29	109.3	109.3
30	19.3	19.3
1'	173.7	173.7
2'	31.9	31.9
4'-14'	29.1-29.7	29.2-29.8
15'	22.7	22.7
16'	14.1	14.1



De la fracción 6 (7:3 Hex-CH₂Cl₂) se sometió a columna cromatográfica, para la obtención de 100 fracciones. De las fracciones 15-18 (1:1 Hex-CH₂Cl₂) se obtuvo un sólido de color amarillo el cual fue sometido a continuos lavados con acetona fría obteniéndose 26 mg de cristales incoloros.

En su espectro de RMN de ¹H se observó una señal triple en δ 5.18 (J = 3.6 Hz) perteneciente al protón vinílico H-12; así mismo, en δ 4.50 se identificó una señal doble de dobles (J = 8.0 Hz) correspondiente para el protón base de acetato H-3; de la misma manera, se encontró en δ 2.05 una señal simple característica para los protones de acetato; en la región de los protones alifáticos mostró las señales simples de los protones de metilos en δ 1.13 a δ 0.83 se observaron las señales de los metilos de molécula (Figura 6.3.39).

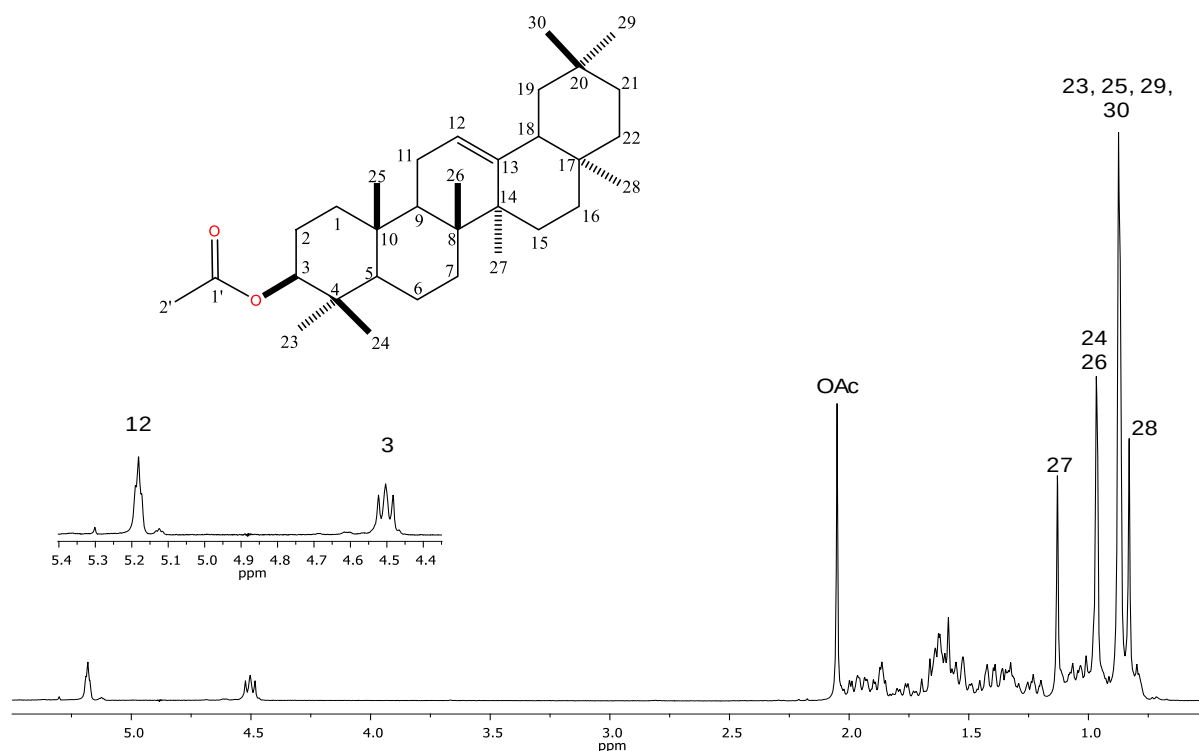


Figura 6.3.39. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del acetato de β -amirina (12).



En su espectro de RMN de ^{13}C se observó una señal en δ 170.9 típica de carbonilo de acetato para el C-1'; en δ 145.2 y δ 121.5 se observaron las señales pertenecientes a los carbonos vinílicos C-13 y C-12, respectivamente; el C-3 base de acetato se apreció en δ 80.8 y el resto de las señales de la estructura triterpénica se identificaron entre δ 55.0 a δ 13.0, estas señales corresponden a un compuesto triterpénico acetilado (Figura 6.3.40 y Tabla 6.3.6).

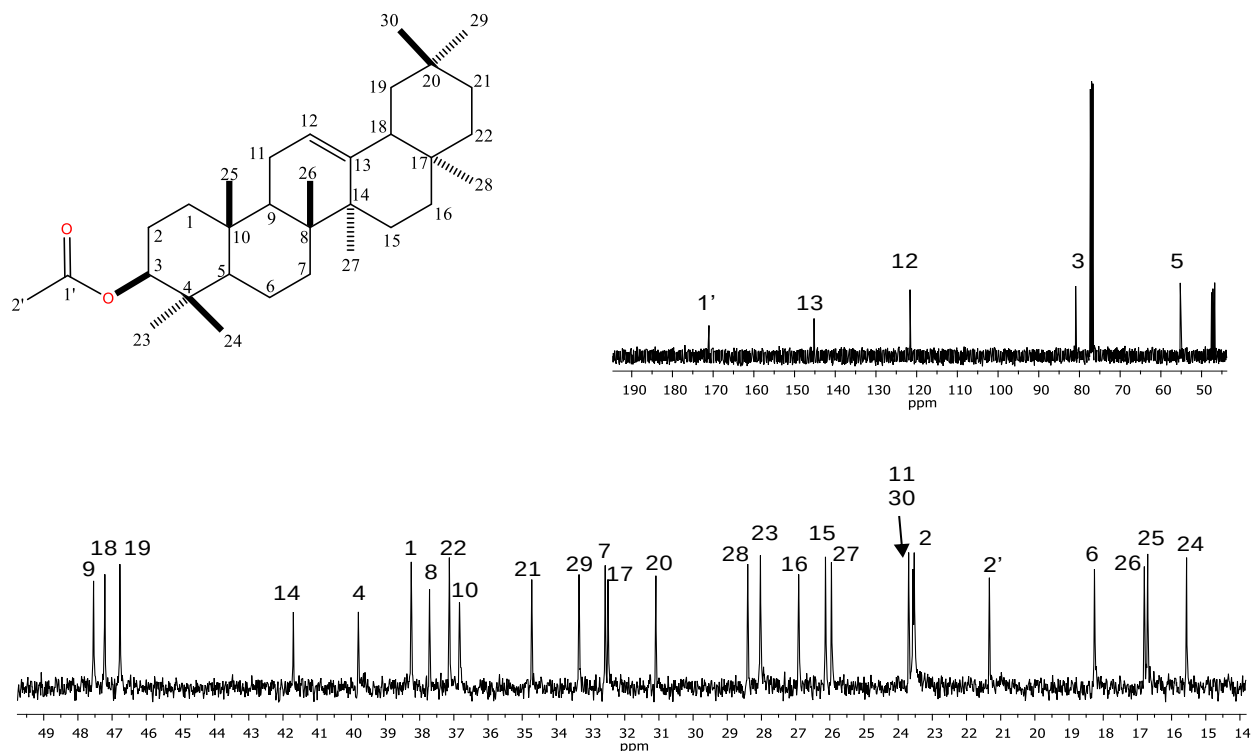


Figura 6.3.40. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del acetato de β -amirina (12).

Los datos obtenidos fueron comparados con la literatura coincidiendo para el acetato de β -amirina (12). En trabajos realizados por Watcho *et al.*, en el 2012 señala que el acetato de β -amirina (12) y su isómero el acetato de α -amirina tienen la propiedad de mejorar la función eréctil en ratas macho. Sin embargo, señalan que el acetato de α -amirina ocasiona infertilidad en ratas hembra. Gislei *et al.*, 2009 en su trabajo demostró que esta misma mezcla de triterpenos posee actividad neurofarmacológica, ansiolítica, anticonvulsiva y sedativa.



Tabla 6.3.6. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C del acetato de β -amirina (**12**) con la literatura (Shan *et al.*, 2014).

Acetato de β -amirina (12)		
Carbonos	Experimental (δ en ppm)	Referencia (δ en ppm)
1	38.2	38.3
2	23.5	23.5
3	80.9	81.0
4	39.8	39.8
5	55.2	55.2
6	18.2	18.2
7	32.6	32.6
8	37.7	37.7
9	47.5	47.6
10	36.8	36.8
11	23.5	23.6
12	121.6	121.6
13	145.2	145.2
14	41.7	41.7
15	26.1	26.1
16	26.9	26.9
17	32.5	32.5
18	47.2	47.2
19	46.7	46.8
20	31.1	31.1
21	34.7	34.7
22	37.1	37.1
23	28.0	28.0
24	15.5	15.6
25	16.7	16.7
26	16.8	16.8
27	26.0	26.0
28	28.4	28.4
29	33.3	33.4
30	23.7	23.7
1'	171.0	171.1
2'	21.3	21.4



6.4. Comparación de extractos de la decocción de las partes aéreas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*

Los remedios herbolarios son formas líquidas preparados a base de plantas medicinales o sus partes individuales o combinadas, y sus derivados, presentado en forma farmacéutica, al cual se le atribuye por conocimiento tradicional que garantiza el alivio parcial o total para algunos de los síntomas de una enfermedad. La principal forma de administrar una planta medicinal es a partir de una infusión, decocción, decocto, entre otras. El procesamiento de las plantas medicinales utilizando medios físicos como el calentamiento puede alterar la actividad farmacológica de los constituyentes orgánicos, que también pueden verse afectados en su concentración dependiendo de factores ambientales, características del suelo, humedad, clima, altitud y de la parte vegetal utilizada (Tres, 2006).

La forma de administración de *Trixis michuacana* var. *longifolia* es por la vía oral, dentro de la medicina tradicional *p'urhépecha* la forma de vehiculizar sus principios activos es por medio de la decocción de las partes aéreas de la planta, lo cual permite validar de una manera más racional el efecto terapéutico reportado, preparando la decocción de las partes aéreas de ésta, tomando en cuenta las diferentes variables como la temperatura, tiempo de ebullición, cantidad de planta y partes utilizadas, así como la posología.

El método de elección para la preparación de la decocción se realizó integrando los diferentes métodos descritos que se encuentran explícitos en la Tabla 6.5.1, realizando ciertos ajustes para lograr un mayor rendimiento de compuestos en la preparación. La decocción se aplica a plantas cuyos principios activos no pueden ser extraídos fácilmente, en este tipo de dosificación se puede añadir un endulzante, la posología es 2-3 tazas por día lo cual asemeja a la forma de preparación del *Tepári*, en este caso no se le adicionará piloncillo ni chocolate; ya que se correlacionará los patrones de señales obtenidas en los espectros de RMN de ^1H de las partes aéreas de la planta.



Tabla 6.4.1. Métodos descritos para la preparación de remedios herbolarios.

Formas Farmacéuticas	
Infusión	Decocción
Consiste en verter agua potable hirviendo sobre la droga vegetal, dejando así de 5-15 min. Se utiliza en drogas de consistencia delicada (flores, hojas delgadas, etc.) (Secretaría de Salud, 2013).	Consiste en mantener las drogas vegetales en contacto con agua potable en ebullición por un periodo de 15 a 30 min (Secretaría de Salud, 2013).
Son preparaciones líquidas obtenidas por extracción de los principios activos vertiendo agua hirviendo o muy caliente sobre la droga seca y pulverizada, dejando reposar 10 min. Las drogas utilizadas son partes tiernas de la planta, normalmente hojas y flores, y la cantidad de droga dependerá de la parte de la planta que se utiliza para su elaboración (Castillo & Martinez, 2016).	Son preparaciones farmacéuticas obtenidas por la extracción de los principios activos obtenida por contacto prolongado con agua hirviendo o muy caliente, manteniendo la fuente de calor después de haber añadido la planta. El cocimiento suele ser útil cuando se utilizan las partes duras de la planta (corteza, tallo o raíz). Para su preparación se vierte agua fría sobre la droga seca y pulverizada (5-30 g/L de agua), se calienta hasta ebullición y se mantiene el tiempo necesario, se deja reposar tapado durante 10 min y se filtra (Castillo & Martinez, 2016).
Es una de las formas líquidas ideal para obtener de forma casera los principios activos de las partes delicadas de las plantas. Se realiza vertiendo agua hirviendo sobre una proporción de planta adecuada. Dejar reposar tapada entre 5 y 10 min para finalmente colar y tomarla. Se utilizan 20 a 30 g de planta se por litro de agua, resultado una proporción estándar al 2-3 % (Cruz, 2007).	Es una forma farmacéutica líquida de las partes duras de las plantas. La proporción adecuada de planta se pone cuando el agua comienza a hervir, manteniendo la cocción durante 3 a 15 min con posterior reposo, siempre tapada, durante 5 a 10 min. Se utilizan de 30 a 50 g de planta seca por litro de agua (3-5%) (Cruz, 2007).



El material vegetal (*T. michuacana* var. *longifolia*) previamente secado a la sombra y molido (tallos, hojas, flores), se pesaron 20 g de droga vegetal los cuales fueron sometidos a maceración en agua fría (1:1) por 10 min, se colocaron 400 mL de agua purificada a una fuente de calor hasta alcanzar la temperatura de ebullición, se vertió el macerado dejándola hervir a fuego lento 15 min, se retiró del fuego y se dejó macerar por 30 min. Para realizar la bipartición a diferente polaridad, se tomaron 100 mL de la decocción y 100 mL de solvente indicado (hexanos, CH₂Cl₂ y AcOEt) haciendo esto por triplicado (Figura 6.4.1, Tabla 6.4.1).



Figura 6.4.1. a) Preparación de la decocción de las partes aéreas de *T. michuacana* var. *longifolia*, b) Bipartición de la decocción a diferente polaridad, c) Concentración de la fase orgánica recuperada en rotavapor a presión reducida y d) Obtención del extracto hexánico, cloruro de metileno y acetato de etilo.

Tabla 6.4.1. Extracciones de la decocción de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

Solvente	Método de extracción	Peso extracto (mg)
Hexanos	Decocción/Bipartición	74
CH ₂ Cl ₂	Decocción/Bipartición	113
AcOEt	Decocción/Bipartición	206

En el espectro de RMN de ¹H del extracto hexánico de la decocción de las partes aéreas de *Trixis michuacana* var. *longifolia* (trazo azul) versus extracto hexánico de hojas por maceración (trazo negro), al realizar la comparativa de sus espectros se observan señales que van desde δ 6.55-0.03; las señales con mayor similitud entre ambos espectros son una señal múltiple en δ 5.43; señal múltiple en δ 2.70; en δ 2.20 señal



simple; δ 1.25 señal simple ancha (Figura 6.4.2). La correlación que existe entre ambos espectros indica que se extraen compuestos de la misma naturaleza química en los dos métodos.

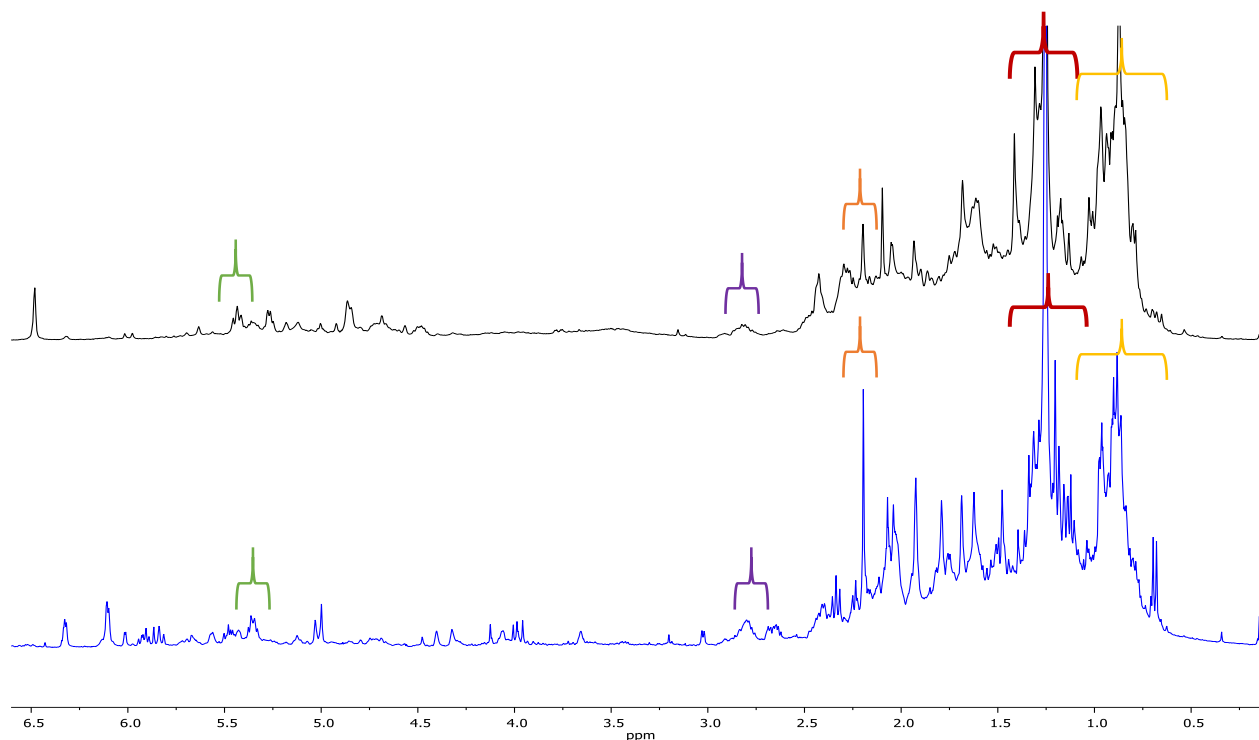


Figura 6.4.2. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto hexánico de hojas *Trixis michuacana* var. *longifolia* (trazo superior) y extracto hexánico de la decocción de las partes aéreas (trazo inferior).

En su espectro de RMN de ^1H del extracto CH_2Cl_2 de la decocción de las partes aéreas (trazo en azul) versus extracto CH_2Cl_2 de las hojas por maceración (trazo en negro), al realizar la comparativa de sus espectros, se obtuvieron señales en el rango de δ 6.6-0.6, donde no se observaron señales de similitud siendo indicativo que la naturaleza de los compuestos pudo variar por la acción del calor en el momento de realizar la extracción, sólo se aprecia una señal simple ancha en δ 1.25 indicativo de protones de cadenas alifáticas (Figura 6.4.3).



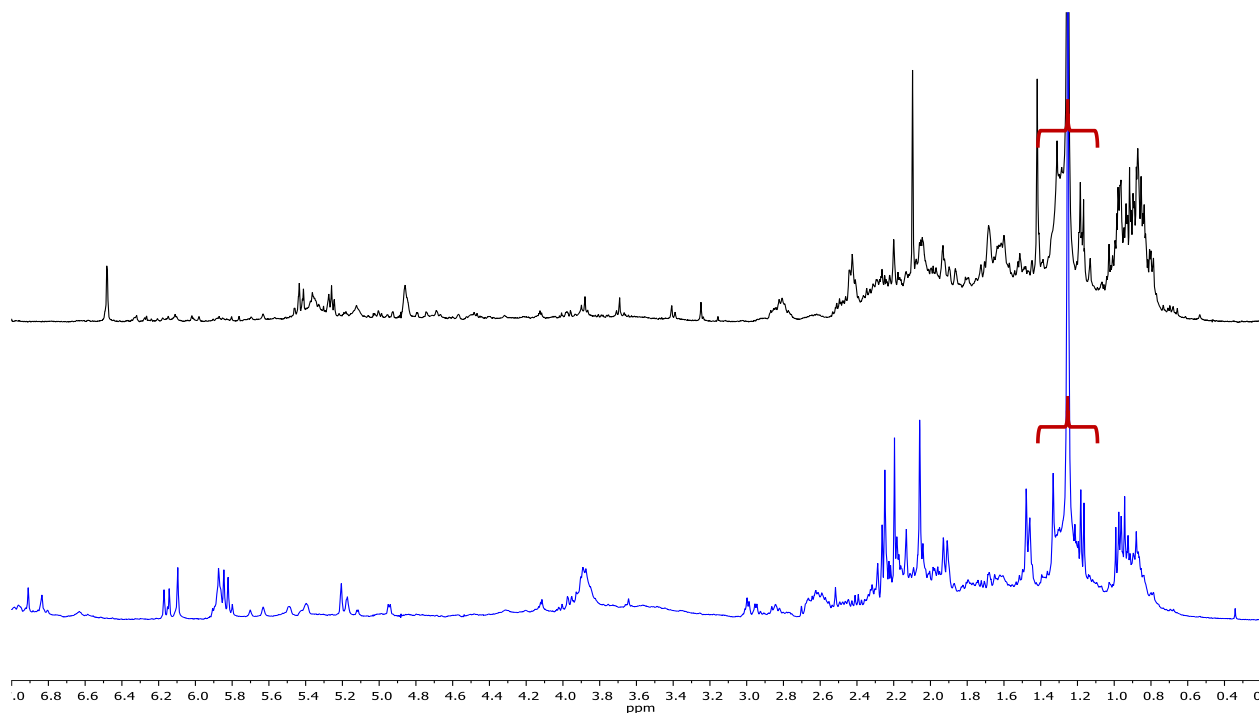


Figura 6.4.3. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto cloruro de metileno de hojas *Trixis michuacana* var. *longifolia* (trazo superior) y extracto cloruro de metileno de la decocción de las partes aéreas (trazo inferior).

En la comparativa de sus espectros de RMN de ^1H del extracto de AcOEt de la decocción de las partes aéreas (trazo azul) versus extracto de AcOEt por maceración (trazo negro), se observó una mayor correlación en sus patrones de señales entre δ 5.4-0.4, donde destaca una señal múltiple en δ 5.36; en δ 2.35 se observó un conjunto de 3 señales simples; en δ 1.70 destaca una señal simple ancha; en δ 1.63 se apreció una señal simple; además en δ 1.25 una señal simple ancha (6.4.4). La similitud entre sus espectros ha permitido establecer que en ambos extractos se extraen compuestos de la misma naturaleza química.



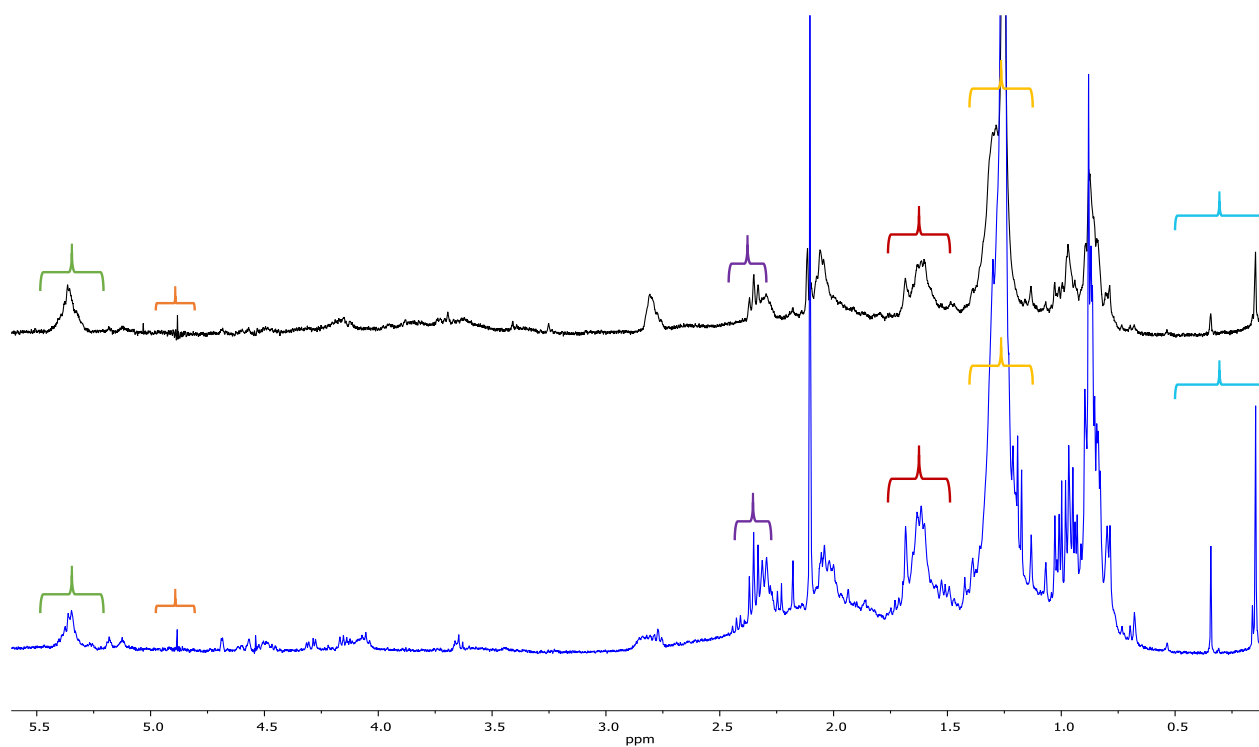


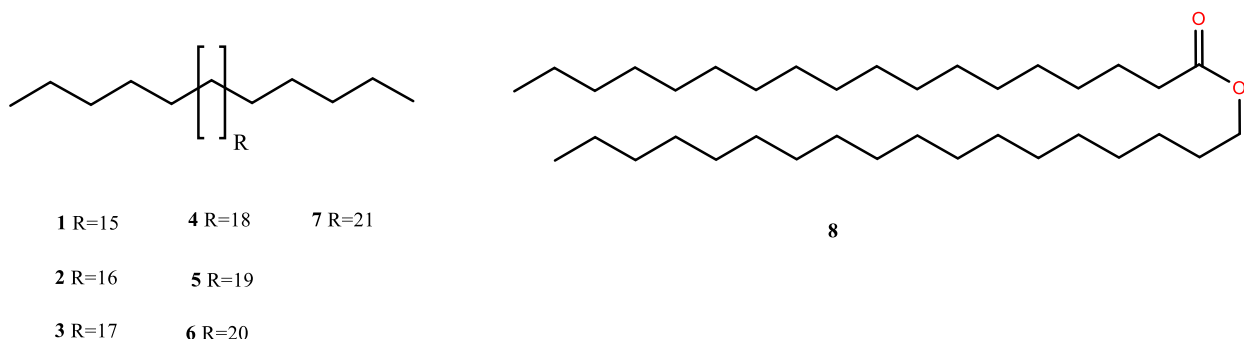
Figura 6.4.4. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto de AcOEt de hojas *Trixis michuacana* var. *longifolia* (trazo superior) y extracto de AcOEt de la decocción de las partes aéreas (trazo inferior).



7. CONCLUSIONES

Esta investigación constituye el primer estudio químico para *Trixis michuacana* var. *longifolia*, se aislaron e identificaron los metabolitos secundarios mayoritarios del extracto hexánico de hojas.

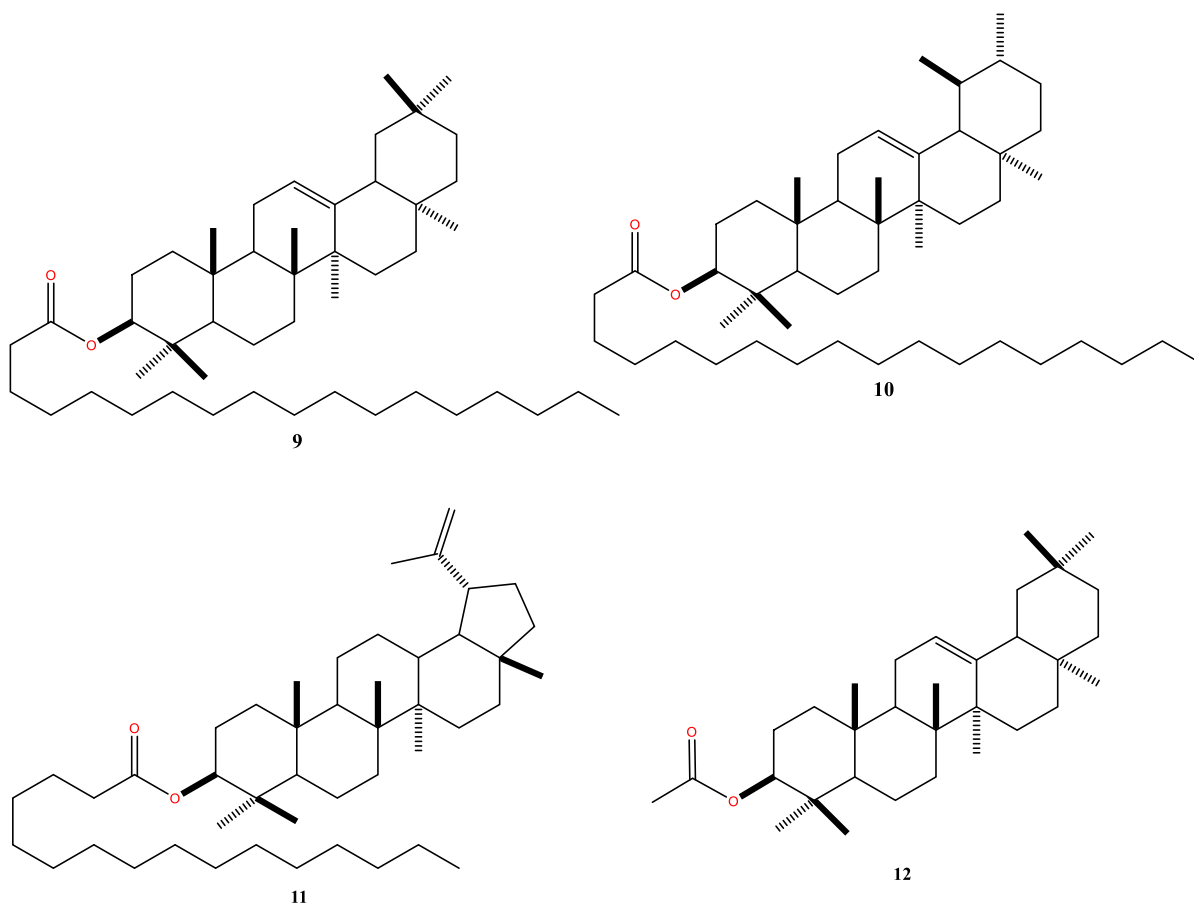
Se identificaron siete hidrocarburos saturados lineales en mezcla de pentacosano (**1**), hexacosano (**2**), heptacosano (**3**), octacosano (**4**), nonacosano (**5**), triacontano (**6**), hentriacontano (**7**) y un compuesto de tipo éster denominado ácido octadecanoico octadecil éster (**8**); se analizaron por RMN de ^1H y de ^{13}C y por cromatografía de gases a acoplada EM; sus identidades se verificaron por comparación de sus espectros de masas en la biblioteca NIST Search 2.0.



La naturaleza de estos compuestos radica en la formación de las ceras cuticulares de la planta; los cuales desempeñan un papel fundamental que permitirá establecer su quimiotaxonomía. Este tipo de compuestos no han sido reportados dentro de los estudios realizados a las especies de este género.

Así mismo, se aislaron los terpenoides funcionalizados, estearato de β -amirina (**9**), una mezcla de estearatos de α y β -amirina (**10, 9**), palmitato de lupeilo (**11**) y acetato de β -amirina (**12**). Los compuestos fueron caracterizados por RMN de ^1H y ^{13}C y los datos obtenidos fueron comparados con la literatura.





Adicionalmente, se preparó la decocción de las partes aéreas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, se realizaron extracciones por bipartición con hexanos, cloruro de metileno y AcOEt. Los extractos obtenidos se analizaron por RMN de ^1H y fueron comparados con los espectros de RMN de ^1H de los extractos de las hojas obtenidos por maceración en los mismos solventes. Durante la comparación de los extractos de hexanos y AcOEt se aprecia una mayor correlación, lo que establece que se extraen metabolitos secundarios de la misma naturaleza química en ambos procesos de extracción. Respecto a los extractos CH_2Cl_2 no se apreció correlación significativa.



8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. Material vegetal

La especie vegetal *Trixis michuacana* var. *longifolia* (D. Don) C. E. Anderson, se colectó en octubre y diciembre de 2016 en la carretera Peribán-Los Reyes a longitud: -102° 39.861' y una latitud: 19° 55.638', se encuentra a una altura media de 1620 metros sobre el nivel del mar.

Un ejemplar botánico fue llevado al EBUM donde establecieron la determinación y clasificación taxonómica del Tepári, donde fue revisado coincidiendo para *Trixis michuacana* var. *longifolia* (D. Don) C.E. Anderson, donde forma parte de la Colección de Plantas Vasculares del EBUM con número de folio 3640.

8.2. Obtención de extractos

La planta se secó a la asombra a temperatura ambiente, lotes I y II de hojas fueron sometidos a maceración en hexanos a temperatura ambiente durante tres días. Transcurrido este tiempo, se filtró y evaporó el disolvente en rotavapor a presión reducida. Este proceso se realizó tres veces para extraer la mayor cantidad posible de compuestos no polares de la especie vegetal. Los extractos obtenidos presentaron una coloración verde-amarillenta (ver Tabla 6.3.1).

8.3. Métodos instrumentales

Los espectros de RMN de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz, se midieron en un aparato Varian Mercury Plus-400. En todas las determinaciones se utilizó como disolvente dueterocloroformo (CDCl_3) y como referencia interna tetrametil silano (TMS). Los espectros se procesaron en el software MestReNova.

Los espectros de masa se llevaron a cabo en un Cromatógrafo de gases Thermo Scientific Trace 1310, acoplado a un espectrómetro de masas ISQ LT. Los espectros fueron procesados en el software Thermo Xcalibur y comparados con la base de datos NIST Mass Spectral Search Program for NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 2011.

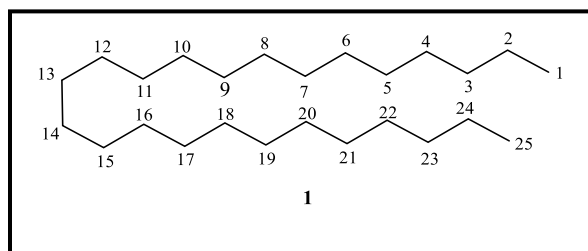


8.4. Estudio Químico preliminar de *Trixis michuacana* var. *longifolia*

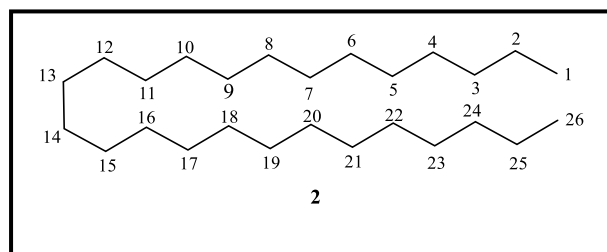
La separación en columna cromatográfica de 7 cm de diámetro y 34 cm empleando gel de sílice malla de 230-400 como fase estacionaria y mezclas de Hex-AcOEt en polaridad ascendente como eluente, fraccionando el extracto crudo de hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia* (38 g); para la obtención de 20 fracciones enriquecidas de 100 mL.

De la fracción 3 del extracto hexánico de hoja (4:1 Hex-AcOEt), tras varios lavados con hexanos se obtuvieron 43 mg de un sólido blanco ceroso que corresponde a una mezcla de compuestos del tipo hidrocarburos saturados, de la cual se lograron identificar por medio de espectrometría de masas los siguientes compuestos:

Datos generales de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.25 (n H, sa), 0.88 (6H, t, $J=6.3$, H-1 y H-25). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 31.9 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.3 (CH_2), 22.7 (CH_2), 14.1 (CH_3). De los hidrocarburos saturados pentacosano (**1**), hexacosano (**2**), heptacosano (**3**), octacosano (**4**), nonacosano (**5**), triacontano (**6**) y hentriacontano (**7**).

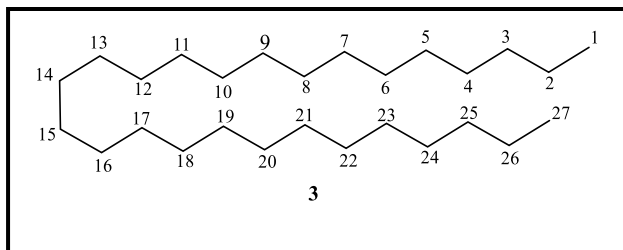


Pentacosano (1): Identificado en Rt 19.84 min. EM (70 eV): $[\text{M}]^+$ 352.36 (2.20), 295.29 (1.06) $[\text{C}_{21}\text{H}_{43}]^+$, 267.26 (1.35) $[\text{C}_{19}\text{H}_{39}]^+$, 239.25 (1.76) $[\text{C}_{17}\text{H}_{33}]^+$, 211.22 (2.75) $[\text{C}_{15}\text{H}_{31}]^+$, 183.20 (4.66) $[\text{C}_{13}\text{H}_{27}]^+$, 155.15 (7.99) $[\text{C}_{11}\text{H}_{23}]^+$, 127.13 (15.04) para $[\text{C}_9\text{H}_{19}]^+$, 113.12 (19.66) $[\text{C}_8\text{H}_{17}]^+$, 99.11 (30.01) $[\text{C}_7\text{H}_{15}]^+$, 85.10 (70.75) $[\text{C}_6\text{H}_{13}]^+$, 71.08 (85.31) $[\text{C}_5\text{H}_{11}]^+$, 57.07 (100) $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$.

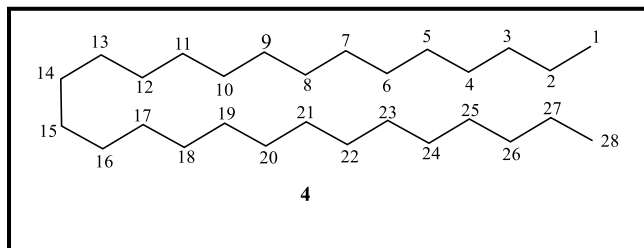


Hexacosano (2): Identificado en Rt 19.84 min. EM (70 eV): ver tabla 6.3.2.

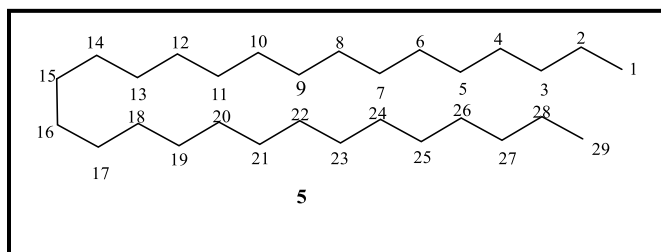




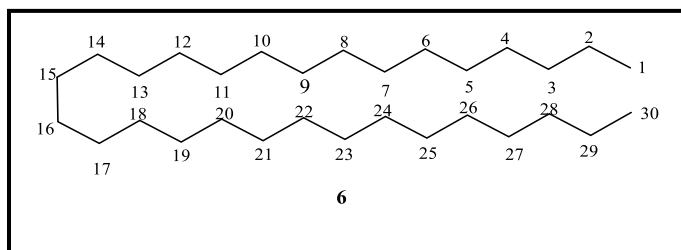
Heptacosano (3): Identificado en Rt 19.84 min. EM (70 eV): ver tabla 6.3.2.



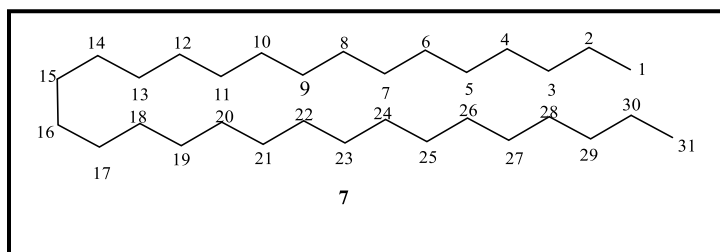
Octacosano (4): Identificado en Rt 19.84 min. EM (70 eV): ver tabla 6.3.2.



Nonacosano (5): Identificado en Rt 19.84 min. EM (70 eV): ver tabla 6.3.2.



Triacontano (6): Identificado en Rt 19.84 min. EM (70 eV): ver tabla 6.3.2.



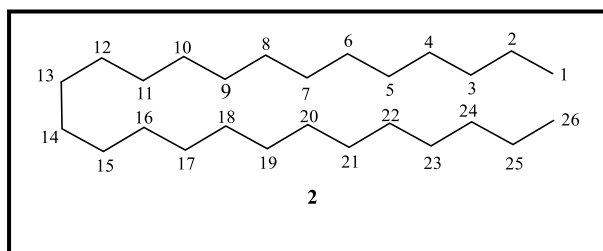
Hentriacontano (7): Identificado en Rt 19.84 min. EM (70 eV): ver Tabla 6.3.2.

De la fracción 4 del extracto hexánico de hoja (4:1 Hex-AcOEt) se obtuvieron 38 mg de un sólido blanco ceroso, tras varios lavados con mezcla de 1:1 Hex-Acetona fría se



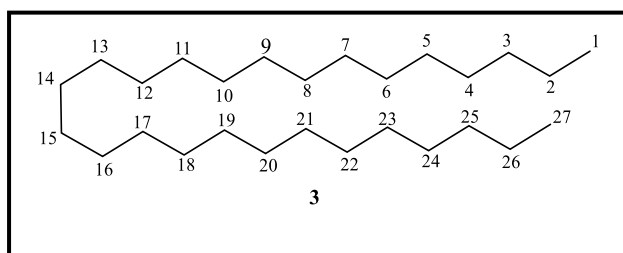
obtuvieron como resultado mg de un sólido blanco ceroso, el cual fue identificado por cromatografía de gases acoplada a EM.

Datos generales de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.25 (48H, sa), 0.88 (6H, t, $J=6.0$). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 31.9 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.3 (CH_2), 22.7 (CH_2), 14.1 (CH_3). Para los alcanos saturados hexacosano (**2**) y heptacosano (**3**).



Hexacosano (2): identificado en Rt 0.60 min. EM (70 eV): m/z (Int. Rel.) $[\text{M}]^+$ 367.2 ($\text{C}_{26}\text{H}_{54}$), 141.2 (4.5) $[\text{C}_{10}\text{H}_{21}]^+$, 127.2 (6.3) $[\text{C}_9\text{H}_{19}]^+$, 113.1 (9.1) $[\text{C}_8\text{H}_{17}]^+$, 70.1 (11.6) $[\text{C}_5\text{H}_{10}]^+$, 85.1 (47.2) $[\text{C}_6\text{H}_{13}]^+$, 83.1 (15.2)

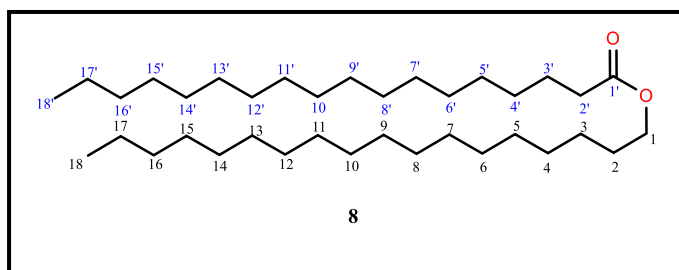
$[\text{C}_6\text{H}_{13}]^+$, 71.1 (70.6) $[\text{C}_5\text{H}_{11}]^+$, 69.1 (16.7) $[\text{C}_5\text{H}_9]^+$, 57.1 (100) $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$.



Heptacosano (3): identificado en Rt 1.0 min. EM (70 eV): m/z (Int. Rel.) 380.4 $[\text{C}_{27}\text{H}_{56}]^+$, 127.1 (5.8) $[\text{C}_9\text{H}_{19}]^+$, 113.1 (8.8) $[\text{C}_8\text{H}_{17}]^+$, 99.1 (19.5) $[\text{C}_7\text{H}_{15}]^+$, 85.1 (48.2) $[\text{C}_6\text{H}_{13}]^+$, 71.1 (67.1) $[\text{C}_5\text{H}_{11}]^+$, 57.08 (100)

$[\text{C}_4\text{H}_9]^+$.

Se sometieron a fraccionamiento 1.78 g de la fracción 6 (7:3 Hex-AcOEt) del extracto hexánico, empleando una columna de 2.5 cm de diámetro, como fase estacionaria gel de sílice malla de 230-400 (6 pulg) y una mezcla de Hex-AcOEt (9:1) como eluente, obteniendo 53 fracciones de 9 mL. De las fracciones 16-53 tras varios lavados con 1:1 Hex: Acetona fría, lo que condujo a la separación de 493 mg de un sólido ceroso de color blanco:



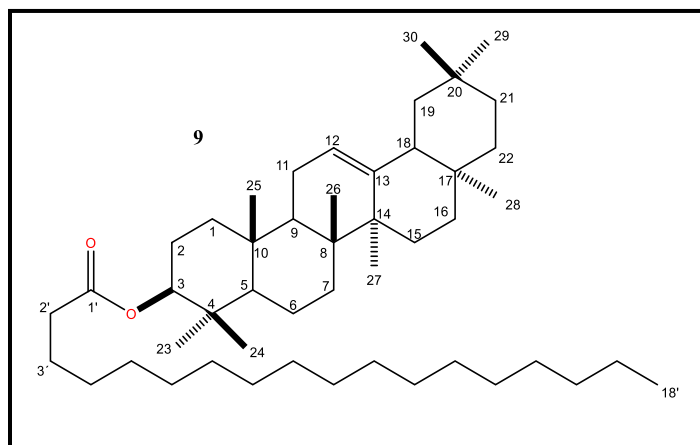
Ácido octadecanoico, octadecil éster (6): RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.05 (2H, dt, $J=6.4$ Hz, H-1), 2.28 (2H, dt, $J=7.6$ Hz, H-2') , 1.25 (62H, sa, H-2 a H-17, H-3' a H-17'),

0.87 (6H, t, $J=6.0$ Hz, H-18, H-18'). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 173.8 (C, C-1'), 65.2



(CH₂,C-1), 34.1 (CH₂,C-2'), 31.6 (CH₂, C-16, C-16'), 29.4 (CH₂,C-5 a C-14, C-6' a C-14'), 29.2 (CH₂, C-4, C-15, C-5', C-15') 28.9 (CH₂, C-4', C-2), 25.7 (CH, C-3), 24.8 (CH, C-3'), 22.4 (CH, C-17, C-17'), 13.8 (CH, C-18, C-18'). EM (70 eV): *m/z* (Int. Rel.) 536.12 [C₃₆H₇₂O₂]⁺, 285.30 (2.5) [C₁₈H₃₆O₂]⁺, 257.2 (14.6) [C₁₈H₃₈ + 3H]⁺, 125.2 (12.2) [C₉H₁₇]⁺, 111.1 (23.8) [C₈H₁₅]⁺, 97.1 (46.7) [C₇H₁₃]⁺, 85.1 (36.7) [C₆H₁₃]⁺, 71.1 (58.2) [C₅H₁₁]⁺, 57.1 (100.0) [C₄H₉]⁺.

Las fracciones 7 y 8 (3:2 Hex-AcOEt) del extracto hexánico de hoja, se unieron obteniendo un peso de 15.16 g, se sometieron a cromatografía de columna de 4.5 cm de diámetro usando como fase estacionaria gel de sílice malla 230-400 (6 pulg) empleando mezclas de Hex-AcOEt en orden ascendente para la obtención de 10 subfracciones enriquecidas (100 mL).

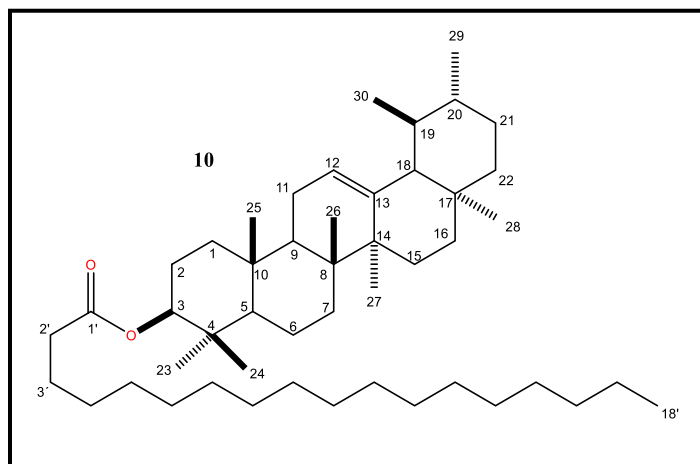


Estearato de β -amirina (9): En la fracción 4 (4:1 Hex-AcOEt) se observó un precipitado al cual se le realizaron varios lavados con acetona, como resultado se obtuvieron 688 mg de un sólido blanco ceroso. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.18 (1H, t, *J*= 3.6 Hz, H-12), 4.50 (1H, dd, *J*= 8.4, 6.4 Hz, H-3), 2.29 (2H, t, *J*= 7.6 Hz, H-2'), 1.25 (22H, sa, H-4' a H-13') 1.13 (3H, s, H-27), 0.97 (3H, s, H-26), 0.96 (3H, s, H-25), 0.88 (18H, s, H-23, H-24, H-29, H-30, H-18'), 0.83 (3H, s, H-28). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) ver Tabla 6.3.3. EM (70 eV): *m/z* (Int. Rel.) 693 (1) [M]⁺, 678 (0.9) [M-CH₃]⁺, 408 (9.9) [C₁₈H₃₀O₂], 218 (67.9) [C₁₆H₂₆]⁺, 203 (48.4) [C₁₆H₂₆-CH₃]⁺, 189 (46.0) [C₁₆H₂₆-C₂H₅]⁺.

Los lavados de la fracción 4 se obtuvieron en forma de miel 0.72 g, fue sometida a columna cromatográfica de 1.5 cm de diámetro usando como fase estacionaria gel de sílice malla 230-400 como fase estacionaria y mezcla de Hex-CH₂Cl₂ (9:1) como fase móvil obteniendo un total de 100 fracciones de 2 mL.



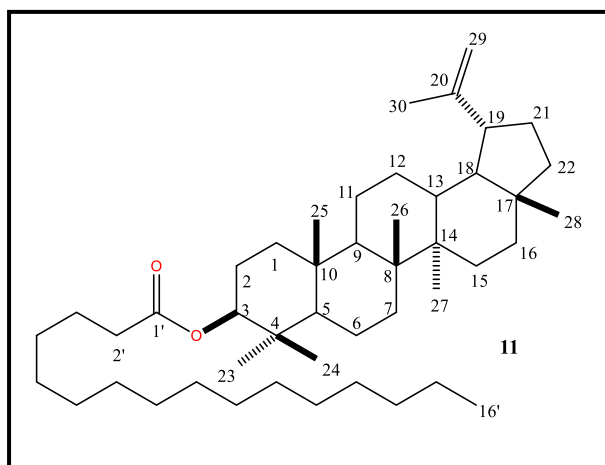
En las fracciones 26-29 (9:1 Hex-CH₂Cl₂) se obtuvieron 41 mg de un sólido de color blanco correspondiente a una mezcla de estearato de α - y β -amirina (**10**, **9**).



Estearato de α -amirina (10**):**

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.12 (1H, t, J = 3.2, H-12), 4.50 (1H, dd, J = 8.4, 6.4 Hz), 2.29 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-2'), 1.25 (22H, sa, H-4' a H-13') 1.13 (3H, s, H-27), 0.97 (3H, s, H-26), 0.96 (3H, s, H-25), 0.88 (18H, s, H-23, H-24, H-29, H-30, H-18'), 0.83 (3H, s, H-28). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃):

ver Tabla 6.3.4.



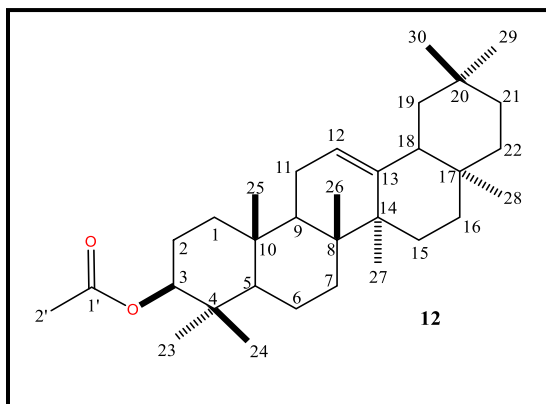
Palmitato de lupeilo (11**):**

En las fracciones 76-84 (9:1 Hex-CH₂Cl₂) se obtuvieron 35 mg de un sólido blanco ceroso. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 4.66 (1H, da, J = 2.4 Hz, H-29a), 4.53 (1H, dd, J = 2.4, 1.6 Hz, H-29b), 4.44 (1H, dt, J = 12.0, 6.0 Hz, H-3), 2.35 (1H, dt, J = 10.4, 5.0 Hz, H-19), 2.25 (2H, t, J = 7.4 Hz, H-2'), 1.65 (3H, sa, H-30), 1.25 (30H, s, H-3'-16'), 1.00

(3H, s, H-28), 0.91 (3H, s, H-27), 0.82 (6H, s, H-24, H-25), 0.75 (3H, s, H-23). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): ver Tabla 6.3.5.

La fracción 6 obtenida a 7:3 Hex-CH₂Cl₂ del fraccionamiento de las fracciones 7 y 8, se colocaron 1.70 g a columna cromatográfica de 1.5 cm de diámetro empleando gel de sílice malla 230-400 como fase estacionaria (6 pulgadas) y mezcla de Hex-CH₂Cl₂ (1:1) como eluente, se colectaron 100 fracciones de 2 mL.





Acetato de β-amirina (12): las fracciones 15-18 (1:1 Hex-CH₂Cl₂) se obtuvo un sólido de color amarillo el cual fue sometido a lavados con acetona fría obteniéndose 23 mg de cristales incoloros. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.18 (1H, t, J= 3.6 Hz, H-12), 4.50 (1H, t, J=8.0 Hz, H-3), 2.05 (3H, s, H-2'), 1.13 (3H, s, H-27), 0.97

(6H, s, H-24, H-26), 0.88 (12H, s, H-23, H-25, H-29, H-30), 0.83 (3H, s, H-28). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): ver Tabla 6.3.6.

8.5. Comparación de extractos de la decocción de las partes aéreas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*

Se pesaron 20 g de planta seca (hojas, tallos y flores) se colocaron a maceración en agua fría (1:1) a temperatura ambiente por 10 min, posteriormente en un recipiente adecuado se colocaron 400 mL de agua purificada (proporción del 4%), se sometieron a una fuente de calor hasta alcanzar la temperatura de ebullición, se vertió el macerado dejándola hervir a fuego lento por 15 min, posteriormente se retiró del fuego y se dejó macerar por 30 min. Para realizar la bipartición se tomaron 100 mL de la decocción y 100 mL hexanos, CH₂Cl₂ y AcOEt haciendo esto por triplicado para cada uno de los solventes, se recuperó la fase orgánica en rotavapor a presión reducida (ver Tabla 6.4.2).



9. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad D.R., Shahnawaz M., Hassan Q. P. (2017). General overview of medicinal plants: A review. *The Journal of Phytopharmacology*. 6 (6): 349-351.
- Akerele O. (1993). Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. Foro Mundial de la salud. 14: 390-395.
- Alarcón C.P. (2009). Etnoecología de los Indígenas P'urhépechas: Una guía para el análisis de la apropiación de la naturaleza. Centro de investigaciones en Ecosistemas. Morelia, Michoacán. Pp.
- Alberti M.P. (2006). Los aportes de las mujeres rurales al conocimiento de las plantas medicinales en México: análisis de género. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*. 3 (2): 139-153.
- Alvarez Q.V., Caso B.L., Aliphath F.M., Galmiche T.A. (2017). Plantas medicinales con propiedades frías y calientes en la cultura Zoque de Ayapa, Tabasco, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 16 (4): 428-454.
- Amézcua L.J., Sánchez D.G., (2015). P'urhépechas: Pueblos Indígenas de México en el siglo XXI. De la Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas (CDI). 3: 20-103.
- Arizaga S., Huerta A., Martínez C.J., Cervantes M. (2018). Monografía de las plantas medicinales de Michoacán. Hierbas y bejucos nativos. Universidad Nacional Autónoma de México: Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia; Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad. 1ª Ed. México pp 9-16.
- Bakker L.M., Alvarado I.P. (2006). Alcanos lineales de la cera cuticular de hojas de *Populus alba*, *Populus deltoides* (Salicaceae), *Robinia pseudoacacia* (Fabaceae), *Ulmus pumila* (Elmaceae) y *Fraxinus americana* (Oleaceae) en Tandil, Buenos Aires, Argentina. *Darwiniana*. 44 (1): 58-63.
- Barragán S.A., (2006). La práctica de la autoatención por fitoterapia en un grupo de familias mexicanas. *Archivos en medica Familiar*. 8:155-162.



- Barrera A. (2008). La etnobotánica: tres puntos de vista y una perspectiva. Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. *Programa Nacional de Etnobotánica*. Estado de México, México. pp: 1-16.
- Baulies R.M.G., Martín L.A., Roig G.I. (2009). ¿Qué pasa con las plantas medicinales? *Atención Primaria*. 41 (10): 584.
- Bello G.M.A, Hernández M.S., Lara C.M.B. Salgado G.R. (2015). Plantas útiles de la comunidad Indígena San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. *Polibotánica*. 39: 175-275.
- Berenzon G.S., Alanís N.S., Saavedra S.N. (2009). El uso de las terapias alternativas y complementarias en la población mexicana con trastornos depresivos y ansiedad: resultados de una encuesta en la Ciudad de México. *Salud Mental*. 32: 107-115.
- Berenzon S., Saavedra N. (2002). Presencia de la herbolaria en el tratamiento de los problemas emocionales: Entrevistas a los curanderos urbanos. *Salud mental*. 25 (1): 55-66.
- Bermúdez A., Oliveira M.M., Velázquez D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*. 30 (8): 453-459.
- Bognar B.J., Paliyath G., Rogers L., Kolattukudy P.E. (1984). Biosynthesis of alkanes by particulate and solubilized enzyme preparations from pea leaves (*Pisum sativum*). *Arch. Biochem, Biophys*. 235: 8-17.
- Bonfil P., Marcó del Pont R. (1999). Las mujeres Indígenas al final del Milenio. FNUAP-CONMUJER. México, D.F. pp: 320 .
- Bracho P.J.C., Rodríguez B.C., Llanes F. (2009). Triterpenos pentacíclicos en propóleo. *Rev Soc Quím Perú*. 75 (4): 439-452.
- Caballero J., Casas A., Cortés L., Mapes C. (1998). Patrones en el conocimiento, usos y manejo de las plantas en pueblos indígenas de México. *Estudios Atacameños*. 16: 181-195.
- Callado S.J.R. (2010). Historia antigua de México como fuente de aproximación a la enfermería transcultural. *Desarrollo Científico Enfermería*. 18 (1): 38-43.



- Canales M. M., Hernández D.T., Caballero N. J., Romo de Vivar R. A., Durán D. A., Lira S. R. (2006). Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana*. 75: 21-43.
- Castillo G. E., Martínez S. I. (2016). Formas de administración de plantas medicinales. En Manual de fitoterapia. 2ª ed. Ed. Elsevier, Barcelona, España: 159-185.
- Cortez G.V., Macedo C.J.P., Hernández A.M., Arteaga A.G., Espinosa G., Rodríguez L.J.F. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Rev Biomed*. 15: 123-136.
- Cosme P.I. (2008). El uso de las plantas medicinales. *Revista Intercultural de Universidad Veracruzana Intercultural*. 1: 23-26.
- Cruz-S.J. (2007). La calidad, la eficacia y la seguridad en la utilización de las plantas medicinales. En Más de 100 plantas medicinales. Medicina Popular Canaria. Monografías. Ed. La obra social de la caja de canarias. 1ª edición. pp: 34-38.
- Delgado G., Romo de Vivar A. (2008). Sobre el curso Temas selectos de Química de Productos Naturales impartido el 30 de junio, 1 y 2 de julio del 2008 en el Instituto de Química de la UNAM. *Bol. Soc. Quím. Méx.* 2 (2): 71-74.
- Dimas H.B., Dimas H.N. (2018). *Sipiaata Tsinajpekua: plantas y prácticas medicinales de los p'urhépecha*. Grupo Tsinajpiriicha. Michoacán, México. pp: 1-159.
- García de Alba G.J.E., Ramírez H.B.C., Robles A.G., Zañudo H.J., Salcedo R.A. L., García de Alba V.J.E. (2011). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*. 39: 29-44.
- García E.R., Calix P.E., Ochoa Z.A., García P.M.E. (2018). Ethnomedical plants used for the treatment of dermatological affections on the Purépecha Plateau, Michoacán, México. *Acta Botanica mexicana* 125. DOI:10.21829/abm125.2018.1339.
- Geck S. M., Reyes G. J., Ledesma D. F., Leonti Marco. (2018). Medicina tradicional y Herbolaria Zoque. 1ª Ed. Taller editorial de la Cosecha. Chiapas, México. Pág.: 7-12.



- Gislei F.A., Lyvia M.V., Antonio P.F., Bandeira P.N., Lemos T.L.G., Glaude S.B.V. (2009). Evidence for Excitatory and Inhibitory Amino Acids Participation in the Neuropharmacological activity of Alpha- and Beta-Amyrin Acetate. *The open Pharmacology Journal*. 3: 9-16.
- Godínez R.R., Aceves P.P. (2012). La regulación del medicamento industrial en México (1926-1937). *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 43 (1): 49-57.
- Godínez R.R., Aceves P.P. (2014). El surgimiento de la industria farmacéutica en México (1917-1940). *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 45 (2): 55-68.
- Gómez P.A. (1997): Las raíces de la etnobotánica mexicana. *Acta Biologica Panamensis*. 1: 87-100. Publicado originalmente en: Guevara S., Moreno-Casasola P., Rzedowski J. (1993), Logros y Perspectivas del Conocimiento de los Recursos Vegetales de México en vísperas del Siglo XXI. *Instituto de Ecología A. C. y Sociedad Botánica de México*. 26-37. Versión corregida y autorizada por el autor para *Acta Biologica Panamensis*.
- Gum A.M., King K.B., Kohn R. (2009). Prevalence of mood, anxiety, and substance-abuse disorders of older Americans in the National Comorbidity Survey Replication. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*. 17: 769-781.
- Gutiérrez R.A., Estévez B.A. (2009). Relevancia de los productos en el descubrimiento de nuevos fármacos en siglo XXI. *Rev. R. Acad. Cienc. Exac. Fís. Nat.* 103 (2): 409-419.
- Huerta C. (1997). La Herbolaria: mito o realidad. CONABIO. *Biodiversitas*. 12: 1-7.
- Hurtado R.N., Rodríguez J.C., Aguilar C.A. (2006). Estudio cualitativo y cuantitativo de la flora del municipio de Copándaro de Galeana, Michoacán, México. *Polibotánica*. (22): 21-50.
- INEGI. (2010). Censo poblacional y vivienda Michoacán México, en Línea consultado 08 de octubre del 2018.
- Katewa S., Chaudhary B., Jain A. (2004). Folk herbal medicines from tribal area of Rajasthan, India. *Journal Ethnopharmacol.* 92:41-46.
- Katinas L. (1996). Revisión de las especies sudamericanas del género *Trixis* (Asteraceae, Mutisieae). *Darwiniana*. 34 (1): 27-108.



- Kezetas B.J.J., Dawé A., Mbiantcha M., Tchouya F.G.R., Ali I., Tchuenta-T.M.A., Mehreen L., Ndjakou L.B., Shaiq A.M., Ngouela S.A. (2017). Characterization of bioactive compounds from *Ficus vallis-choudae* Deile (*Moraceae*). *Trends Phytochem. Res.* 1 (4): 235-242.
- López A.A. (1993). Textos de medicina náhuatl. Publicado en línea 3 de mayo del 2017. Disponible en: http://www.historicas.unam.mx/publicaciones/publicadigital/libros/textos/medicina_nahuatl.html.
- Luna P.A.M. (2006). Salud y enfermedad entre los tarascos del siglo XVI. *Boletín Mexicano de Historia y Filosofía de la Medicina.* 9 (1): 5-8.
- Magaña A.M.A., Gama C.M.L., Mariaca M.R. (2010). El uso de las plantas medicinales en las comunidades Maya-Chontales de Nacajuca, Tabasco, México. *Polibotánica.* 29: 213-262.
- Miranda R.S.S., Silva G.D.F., Duarte L.P., Fortes I.C. P., Vieira F.S.A. (2006). Structural determination of 3 β -stearyloxy-urs-12-ene from *Maytenus salicifolia* by 1D and 2D NMR and quantitative ¹³C NMR spectroscopy. *Mag. Reson. Chem.* 44: 127-131.
- Mohamed I., Shuid A., Borhanddin., Fozi N. (2012). The application of Phytomedicine in Modern Drug Development. *The Journal of Herbal and Plant Medicine.* 1 (2): 1-9.
- Muñeton P. (2008). Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. *Revista Digital Universitaria.* 79: 132-141.
- Ocegueda S., Moreno E., Koleff P. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas*, 62: 12-15
- Pavía R.N., Ceballos Q.J.M., Medina E.C., Ordoñez D.A. Rios R.H. (1998). Magia, religión y medicina. *Rev Biomed.* 9:192-198
- Pérez G.M., Sepúlveda S.J.D. (2011). Micromorfología de ceras epicuticulares en hojas maduras de *Sabal yapa* Ex Becc. (*Arecaceae*). *Polibotánica.* 32: 153-161.
- Pérez T.R. (1997). La medicina de los pueblos primitivos. En: Pérez-Tamayo R., editor. De la magia primitiva a la medicina moderna. México: SEP, Fondo de Cultura Económica, CONACYT. pp.17-29.



- Petit J.D., Carvallo R.T., González L.A., Sotelo M.R., Báez S.R.(2009). Composición química de las ceras cuticulares del fruto de *Mangifera indica* L. *Revista iberoamericana de tecnología postcosecha*. 10 (1): 14-25.
- Plascencia G. M. (2009). La Industria Farmacéutica en México. *Bol. Soc. Quím. Méx.* 3 (1): 30-31.
- Prieto G.S., Garrido G.G., González-L. J.S., Molina T.J. (2004). Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. 15 (1): 19-36.
- Ríos C.T., Quijano L., Reyes C.R. (2012). Algunas reflexiones actuales sobre la herbolaria prehispánica desde el punto de vista químico. *Rev. Latinoamer. Quím.* 40 (2): 41- 64.
- Romero C.O., Reyes M.A., Herrera A.X., Lozoya L.J.T. (2004). Aceptación de los fitofármacos por médicos y pacientes en clínicas de atención primaria. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)*. 42 (2): 125-130.
- Rzedowski J., Calderón R.G. (2001). Flora Fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A.C., Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán, México. pp.1406.
- Salama M.A., Polo E.A., León P.A., Medina S. C., Rivera A. (1989). Hidrocarburos y un diterpeno con actividad antimicrobiana y antiinflamatoria de *Baccharis decusata*. *Revista Colombiana de ciencias Químico-Farmacéuticas*. 17: 63-67.
- Samuels L., Kunts L., Jetter R. (2008). Saeling Plant Surface Cuticular Wax Formation by Epidermal Cells. *The Annual Review of Plant Biology*. 59: 638-707.
- Secretaria de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2013). Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. Segunda Edición. Secretaria de Salud, México, D.F. pp: 323.
- Shan Y.L., Chuan T.T., Siow P.T., Awang K., Hashim M.N., Nafiah A.M., Ahmad K. (2014). Cytotoxic, antibacterial and antioxidant activity of triterpenoids from *Kopsia singapurensis* Ridl. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 6 (5): 815-822.
- Sheldon J., Balick M., Laird S. (1997). *Medical plants ¿can utilization and conservation coexist?* New york Botanical Garden: Nueva York, EEUU. pp:104.



- Swabha T. (2018). Bioactive Compounds in Medicinal Plants: A Condensed Review. *Sej Pharmacognosy and Natural Medicine*. (1) 1: 1-35.
- Tafolla A.J.C., Gonzáles L.A., Tiznado H.M.E., Zacarías G.L., Báez S.R. (2013). Composición, Fisiología y Biosíntesis de la cutícula en plantas. *Rev. Fitotec. Mex.* 36 (1): 3-12.
- Tapasco J., Isaza J.H., Torres H.G. (2016). Cromatografía de gases y espectrometría de masas del extracto en hexano de *Miconia acuminifera* Triana (Melastomataceae). *J. Sci. Technol. Appl.* (1) 87-89.
- Torres N.M., López L.L., De la Cruz G. G., Silva B.S. (2013). Solanaceas mexicanas: Una fuente de nuevos agentes farmacológicos. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 5 (10): 27-32.
- Tres J.C. (2006). Interacción entre fármacos y plantas medicinales. *An. Sist. Navar.* 29 (2): 233-252.
- Vázquez M.B., Martínez C.B., Aliphath F.M.M., Aguilar C.A. (2011). Uso y conocimiento de las plantas medicinales por hombres y mujeres de dos localidades indígenas en Coyomeapan, Puebla, México. *Interciencia*, 36 (7): 493-499.
- Waizel B.J., Waizel H. S. (2005). Algunas plantas utilizadas popularmente en el tratamiento de enfermedades respiratorias. Parte I. *AN ORL Mex.* 50(4): 76-87.
- Watcho P., Zelefack F., Ngouela S., Benoit T. (2012). Enhancement of erectile function of sexually naïve rats by β -Sitosterol and α - β -amyrin acetate isolated from the hexane extract of *Mondia whitei*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. S: 1266-1269.
- Zepeda G.C., White O.L. (2008). Herbolaria y pintura mural: plantas medicinales en los murales del convento del divino salvador de Malinalco, estado de México. *Polibotánica*. 25: 173-199.

