



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA



“PREPARACIÓN DE DERIVADOS A PARTIR DE FITOSTEROLES

AISLADOS DE *Trixis michuacana* var. *longifolia*”

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGA

PRESENTA:

P.Q.F.B. ANDREA GUADALUPE CÁRDENAS GONZÁLEZ

DIRECTORES:

D.Q. MARIO ARMANDO GÓMEZ HURTADO

M.C. LUIS DANIEL HERRERA SANABRIA

Morelia, Michoacán, diciembre de 2022

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales y Química de Coordinación y Organometálicos 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 el M.C. Luis Daniel Herrera Sanabria, con el apoyo de la CIC-UMSNH.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente le agradezco a Dios por darme la vida, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad, por ser el motor principal en mi vida y darme a mis padres, que desde muy pequeña me enseñaron el significado del trabajo duro y a quienes agradezco por darme todo su apoyo tanto económico como emocional, por cuidarme y aconsejarme siempre que lo necesité.

Sé que el amor puede distraer, pero en mi caso me sirvió de impulso para seguir adelante, por ello le agradezco a mi pareja porque a pesar de todos mis fallos siempre creyó en mí y me hizo confiar en mí misma.

A mi universidad, la casa que me formó a nivel intelectual y humanístico. Así mismo estoy en deuda con todos los docentes que me cultivaron el gusto por aprender, quienes día a día luchan para educar a ciudadanos íntegros y humanos en cada cátedra. Al IIQB de la UMSNH por permitirme realizar la investigación que dio como resultado este trabajo.

Les agradezco a los D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado (mi director) y D.Q. Gabriela Rodríguez García quienes fueron mis tutores desde que comencé a cursar en la facultad, por haberme invitado a conocer el laboratorio y que gracias a ello pude integrarme a su equipo de trabajo. Sin ustedes este sueño no habría sido posible.

A mi Co-director el M.C. Luis Daniel Herrera Sanabria por haberme enseñado la parte práctica del laboratorio, por haberme brindado su amistad. Gracias por toda la paciencia que tuviste para enseñarme y por no dejar que me rindiera.

A los sinodales: la D.Q. Gabriela Rodríguez García, la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres, el Q.F.B. Ricardo Vega Tavera, el M.C. Sinuhe Galván Gómez y la M.C. Rosa

María Trujillo Aguirre, por tomarse el tiempo de revisar mi trabajo, así como brindarme sus consejos y correcciones.

Finalmente quiero agradecer a todos los involucrados, por apoyarme cuando más las necesité, por ayudarme en momentos difíciles y por el amor brindado cada día.

*“Investigación es lo que hago
cuando no sé lo que estoy haciendo”.*

Wernher von Braun

ÍNDICE

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	I
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
1- INTRODUCCIÓN	1
2- ANTECEDENTES	3
2.1 Género <i>Trixis</i>	3
2.2 <i>Trixis michuacana</i> var. <i>longifolia</i>	4
2.3 Estudios en <i>Trixis michuacana</i> var. <i>longifolia</i>	5
2.4 Fitoesteroles.....	6
2.5 Hidrogenación	7
2.6 Oxidación de alcoholes	8
2.7 Bases de Schiff	10
3- OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo general.	12
3.2 Objetivos específicos.	12
4- JUSTIFICACIÓN	13
5- METODOLOGÍA.....	14
6- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	15
6.1. Colecta de la especie vegetal	15
6.2. Obtención de extractos	15
6.3. Obtención y purificación de estigmasterol (9) y sitosterol (11).	17
6.4 Preparación de sitostanol (14 y 14b) a partir de estigmasterol (9) y sitosterol (11)...	21
6.5 Preparación de sitostanona (15) a partir del sitostanol (14 y 14b)	26
6.6 Preparación de la tiosemicarbazona de sitostano (16).....	30

7- CONCLUSIONES.....	35
8- PARTE EXPERIMENTAL.....	36
8.1 Material vegetal.....	36
8.2 Obtención de extractos	36
8.3 Métodos instrumentales.....	36
8.4 Obtención y purificación de sitosterol (11) y estigmasterol (9).	37
8.5 Preparación de sitostanol (14 y 14 b) a partir de sitosterol (11) y estigmasterol (9). ...	38
8.6 Preparación de sitostanona (15) a partir del sitostanol (14 y 14b)	38
8.7 Preparación de la tiosemicarbazona de sitostano (16).....	39
9- Bibliografía	40

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

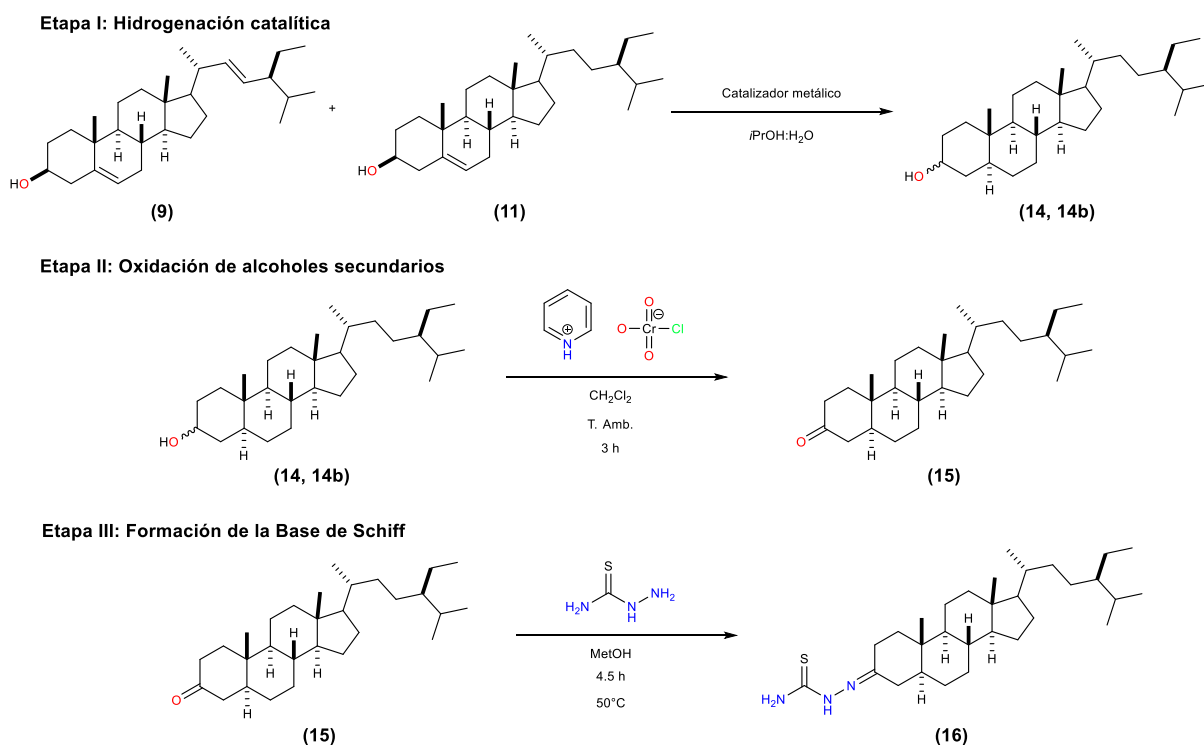
δ	Desplazamiento químico en ppm
°C	Grados Celsius
CC	Cromatografía en columna
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
cm	Centímetros
d	Señal doble
dd	Señal doble de dobles
<i>E</i>	<i>Entgegen</i>
Eq	Equivalentes químicos
g	Gramos
h	Horas
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LDL	Lipoproteína de baja densidad
m	Señal múltiple
min	Minutos
mL	Mililitros
mg	Miligramos
MHz	Mega Hertz
msnm	Metros sobre el nivel del mar
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
PCC	Clorocromato de piridinio

PDC	Dicromato de piridinio
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN de ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN de ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
s	Señal simple
sa	Señal simple ancha
t	Señal triple
TMS	Tetrametilsilano
V	Voltios
Z	Zusammen

RESUMEN

El estudio químico realizado a los extractos hexánicos de los tallos de *Trixis michuacana* var. *longifolia* permitió el aislamiento, purificación e identificación de sus dos principales metabolitos secundarios mayoritarios: estigmasterol (**9**) y sitosterol (**11**).

Estos metabolitos se encuentran ampliamente distribuidos en la mayoría de las especies vegetales, por tal motivo resultó interesante explorar su reactividad química mediante una serie de reacciones (Esquema 1): el primer paso fue una reacción de hidrogenación de **9** y **11**, obteniendo los isómeros 5 α -sitosta-3 α -ol (**14**) y 5 α -sitosta-3 β -ol (**14b**), los cuales fueron oxidados en presencia de PCC (clorocromato de piridinio) para obtener la 5 α -sitostanona (**15**), y finalmente una reacción para la obtención de la tiosemicarbazona de sitostano (**16**), siendo ésta un compuesto novedoso con posibles actividades biológicas.



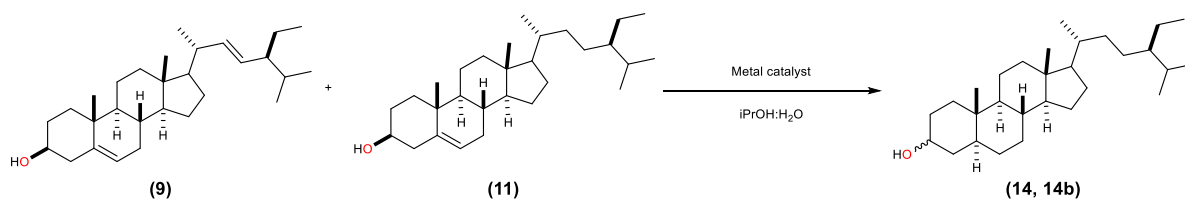
Palabras clave: Fitosteroles, reactividad química, hidrogenación, oxidación, base de Schiff.

ABSTRACT

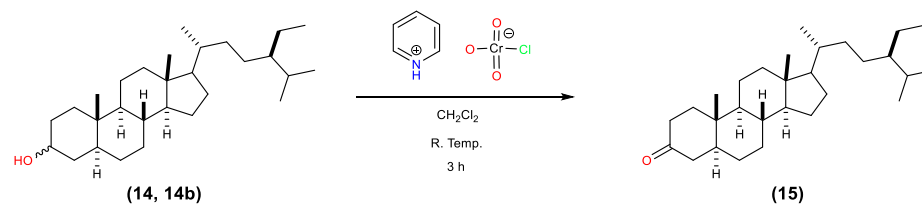
The chemical study of the hexanic extracts of the *Trixis michuacana* var. *longifolia* stems allowed the isolation, purification, and identification of two of the main secondary metabolites: stigmasterol (**9**) and sitosterol (**11**).

These metabolites are widely distributed in other plant species, therefore it was interesting the chemical reactivity of phytosterols, that was explored through a series of chemical reactions: the first step was a hydrogenation reaction of **9** and **11**, the isomers 5 α -sitosta-3 α -ol (**14**) and 5 α -sitosta-3 β -ol (**14b**) were obtained, which were oxidized in the presence of PCC (pyridinium chlorochromate) to obtain 5 α -sitostanone (**15**), and finally a reaction to obtain sitostan thiosemicarbazone (**16**), this being a newfangled compound with possible biological activities.

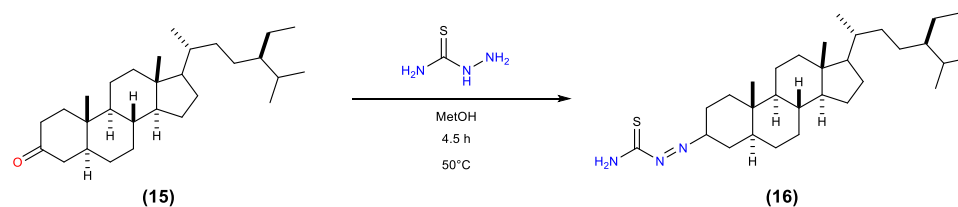
Stage I: Catalytic hydrogenation



Stage II: Oxidation of secondary alcohols



Stage III: Schiff Base Formation



Keywords: Phytosterols, chemical reactivity, hydrogenation, oxidation, Schiff base.

1- INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales como alternativa medicinal para diversos padecimientos ha sido una práctica tradicional que no ha caído en desuso. Se estima que 80% de la población mundial depende de remedios herbolarios tradicionales y que al menos 35, 000 especies vegetales presentan potencial para uso medicinal (García de Alba, *et al.*, 2012).

Dentro de estas especies medicinales destaca el género *Trixis*, el cual ha sido poco explorado químicamente. Los resultados de las investigaciones químicas de algunas de sus especies han demostrado la presencia de compuestos de interés químico y biológico, teniendo algunas aplicaciones biológicas significativas. En el caso particular de la especie medicinal *Trixis michuacana* var. *longifolia*, es usada dentro de la medicina tradicional *p'urhépecha* para el tratamiento de la infertilidad ocasionada por la “frialidad del vientre”, actualmente cuenta con un estudio químico preliminar de su extracto hexánico de sus hojas (Herrera, 2019), donde se identificaron sus componentes mayoritarios, incluyendo la mezcla de estigmasterol (**9**) y sitosterol (**11**), los cuales están presentes en los tallos de casi todas las plantas y son precursores de hormonas, ácidos biliares y vitamina D. Se han encontrado más de 200 tipos de esteroides vegetales, y muchos de ellos han sido útiles para llevar a cabo la exploración de múltiples reacciones químicas (Fieser y Fieser, 1959)

Entre las reacciones químicas de interés en la síntesis orgánica se encuentra la hidrogenación, que es una reacción en la que se requiere la presencia de un catalizador, como Pt, Pd o Ni y una fuente de hidrógeno. Los enlaces C=C son mucho más reactivos hacia la hidrogenación catalítica que la mayor parte de los otros grupos funcionales, por lo que se considera una reacción bastante selectiva, (McMurry, 2012). Por otro lado, la oxidación del grupo hidroxilo (-OH) es una reacción orgánica muy común, las condiciones de oxidación que presentan un mayor rendimiento son aquellas donde se emplean especies de cromo hexavalente (principalmente PCC y PDC) como el oxidante en medios anhidros (Carey, 2014).

La diversidad de sustratos carbonílicos y los grupos sustituyentes de las aminas primarias permiten obtener bases de Schiff, con diferentes funciones, donde el enlace C=N, es esencial para la actividad biológica (Sirajuddin, *et. al.*, 2013). Las bases de Schiff o iminas son compuestos orgánicos derivados de la reacción de aminas primarias con aldehídos o cetonas. En la última década, las investigaciones sobre bases de Schiff han resultado útiles para sintetizar nuevos compuestos de buena estabilidad y versatilidad estructural. Las iminas se coordinan fácilmente hacia centros metálicos y los compuestos que forman tienen aplicaciones en la industria, en química analítica, y algunos presentan actividad bactericida, fungicida, antiviral, agroquímica, anticorrosiva y catalítica (Tulcán-Mejía, *et. al.*, 2021).

En el presente trabajo se describe la obtención, identificación y caracterización de estigmasterol (**9**) y sitosterol (**11**), presentes en el extracto hexánico de los tallos de la especie medicinal *Trixis michuacana* var. *longifolia*, así como una serie de reacciones químicas realizadas para explorar su reactividad química que incluyó reacciones de hidrogenación, oxidación y la formación de bases de Schiff, con el fin de obtener derivados con potenciales aplicaciones biológicas. Los compuestos obtenidos se identificaron mediante sus datos físicos y espectroscópicos.

2- ANTECEDENTES

2.1 Género *Trixis*

Este género forma parte de la familia Asteraceae, considerada la familia de Angiospermas más basta y diversa, abarcando más de 1,600 géneros y 23,000 especies, distribuidas ampliamente en el mundo (Villaseñor, 2018). El género *Trixis* se compone de plantas arbustivas o herbáceas perennes; hojas alternadas, involucro cilíndrico a campanulado o hemisférico; flores todas hermafroditas, sus carolas amarillas o anaranjadas, tendiendo al blanco con la edad (Rzedowski *et al.*, 2005). Se encuentra distribuido en la región neotropical, desde el sur de Estados Unidos de América hasta el centro de Argentina (Figura 2.1.1), comprendiendo 37 especies, de las cuales 16 se consideran endémicas de México, entre ellas *Trixis michuacana* var. *longifolia*, la especie de nuestro interés (Katinas, 1996).



Figura 2.1.1. Distribución del género *Trixis* (modificado de Katinas, 1996).

2.2 *Trixis michuacana* var. *longifolia*

Es una especie endémica de México, se encuentra distribuida en el centro-occidente del Estado de Michoacán y estados colindantes. Es una planta con tallos estrigosos o esparcidamente seríceos y cortamente glanduloso-pubescentes; hojas por lo común lineares a lanceoladas, esparcidamente estrigosas y glanduloso-pubescentes en el haz, esparcidamente pilosas en el envés (Figura 2.2.1). Se caracteriza por las hojas generalmente más anchas y la pubescencia serícea a lanosa. La especie se desarrolla durante junio a abril, florece de noviembre a abril (Rzedowski *et al.*, 2005).



Figura 2.2.1. *Trixis michuacana* var. *longifolia* (D. Don) C.E. Anderson.

2.3 Estudios en *Trixis michuacana* var. *longifolia*

Se ha demostrado que el extracto metanólico de las flores secas de *Trixis michuacana* var. *longifolia* posee una potente actividad inhibidora de la enzima tirosinasa, siendo la quercetina (**1**) el metabolito mayoritario, además de identificarse al metil *p*-cumarato (**2**) (Figura 2.3.1) (Kubo *et al.*, 2004).

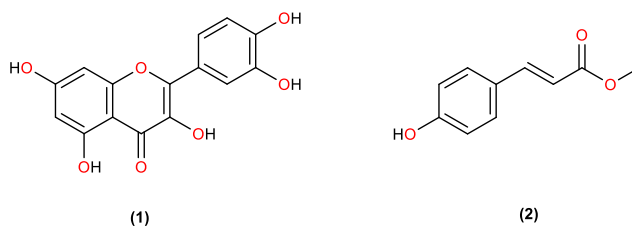


Figura 2.3.1. Metabolitos identificados en flores de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

Estudios realizados al extracto hexánico de sus hojas reportan el aislamiento y purificación de diversos compuestos como el octadecanoato de octadecilo (**3**), los estearatos de α y β -amirina (**4**, **5**), el acetato de β -amirina (**6**) y el palmitato de lupeol (**7**), destacando como metabolitos mayoritarios en el extracto hexánico **3** y **4** (Figura 2.3.2) (Herrera, 2019).

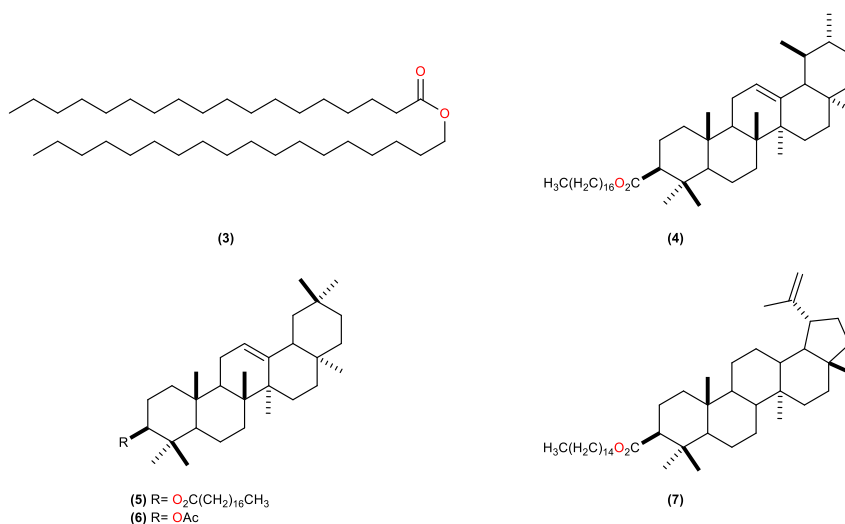


Figura 2.3.2. Metabolitos identificados en hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

2.4 Fitoesteroles

Los esteroides son compuestos que forman parte de la estructura de las membranas celulares y son precursores de hormonas, ácidos biliares y vitamina D. Los fitoesteroides son esteroides vegetales presentes en todos los órganos de las plantas de casi todo el reino vegetal (Romero-Palacio y Vásquez-Trespacios, 2012).

Los fitoesteroides son compuestos con 29 átomos de carbono que derivan del esqueleto del ciclopentano perhidrofenantreno; de estructura similar al colesterol (**8**), el cual posee una cadena lateral hidrocarbonada formada por ocho carbonos saturados. En cambio, los fitoesteroides suelen presentar específicamente en el C-24 sustituyentes de tipo metilo o etilo y una cadena hidrocarbonada lateral de nueve o diez carbonos y pueden presentar doble enlace en los carbonos 22 y 23, como es el caso del estigmasterol (**9**) (Muñoz, 2011).

En la naturaleza, se han encontrado más de 200 tipos de esteroides vegetales en diversas especies de plantas, los más abundantes son el estigmasterol (**9**), campesterol (**10**) y sitosterol (**11**) (Figura 2.4.1) (López, 2005).

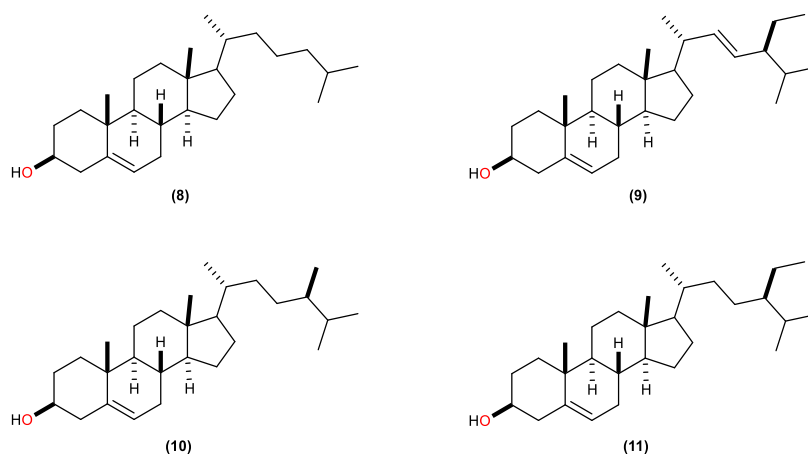


Figura 2.4.1. Estructura química del colesterol y de los principales fitoesteroides.

Estudios realizados en hígado de rata, han demostrado, que los fitoesteroles con doble enlace en C-22, actúan como inhibidores competitivos de la esterol reductasa en los microsomas, siendo los fitoesteroles saturados inactivos (Muñoz, 2011). Además, ejercen un marcado efecto hipocolesterémico, ya que con 2 g/día de fitoesteroles se produce una reducción en el colesterol LDL (Low-Density Lipoprotein o lipoproteína de baja densidad) en un 15%, si se combina su consumo con una dieta sana que contenga pocas grasas saturadas (Romero-Palacio y Vásquez-Trespacios, 2012). De igual manera se ha observado el efecto útil que los fitoesteroles ejercen en el control de la hiperplasia prostática benigna, adicionalmente se les atribuyen propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas (López, 2005).

Muchas de las reacciones empleadas en síntesis orgánica han sido desarrolladas con ayuda de esteroides y fitoesteroles, destacando con esto su importancia en las ciencias químicas.

2.5 Hidrogenación

La hidrogenación de un alqueno es formalmente una reducción, con H₂ adicionándose a través del enlace doble para formar un alcano. El proceso por lo general requiere un catalizador que contenga Pt, Pd o Ni y, para la mayoría de los alquenos, la hidrogenación ocurre a temperatura ambiente, utilizando hidrógeno gaseoso a presión atmosférica. Los alquenos son mucho más reactivos hacia la hidrogenación catalítica que la mayor parte de los grupos funcionales insaturados, y por tanto, la reacción es bastante selectiva. Otros grupos funcionales como los aldehídos, las cetonas, los ésteres y los nitrilos sobreviven sin cambios en condiciones normales de hidrogenación de alquenos, aunque la reacción con estos grupos ocurre bajo condiciones más vigorosas (McMurry, 2012).

La hidrogenación de fitoesteroles se ha investigado previamente empleando Pd/C microporoso (Wärnå, *et al.*, 2006), Pd soportado sobre fibra de polímero (Helminen, Paatero & Hotanen, 2006) y Pd soportado en otros materiales (Mäki-Arvela, *et al.*, 2009). Teniendo en común la necesidad de llevar a cabo la reacción a temperaturas altas (60-120 °C) con una presión de hidrógeno constante durante 1 a 2 h.

2.6 Oxidación de alcoholes

Los alcoholes son compuestos orgánicos que se distinguen por la presencia de grupos hidroxilo (-OH). Son de los compuestos más comunes y útiles en la naturaleza, la industria y el hogar. La palabra alcohol es uno de los términos químicos más antiguos, el cual se deriva del árabe *al-kuhl*, que en un principio significaba “el polvo”, y más adelante “la esencia”, ya que el alcohol etílico, destilado del vino se consideraba “la esencia” del vino (Wade, 2011).

Los alcoholes tienen en su estructura dos importantes grupos: el grupo hidroxilo (-OH) que tiene la característica de ser hidrófilo, y el grupo hidrofóbico que es la cadena del hidrocarburo. El grupo hidroxilo es muy polar, lo que le permite a la molécula establecer puentes de hidrógeno con otras moléculas. La solubilidad del alcohol en el agua disminuye a medida que aumenta el grupo hidrofóbico (Autino *et. al.*, 2013). Los alcoholes se pueden clasificar como primarios (**A**), secundarios (**B**), terciarios (**C**) y fenoles (**D**), de acuerdo con el número de grupos orgánicos unidos al carbono enlazado al hidroxilo (Figura 2.6.1).

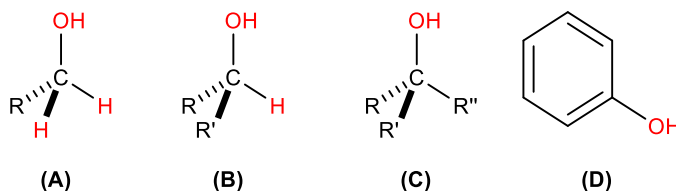


Figura 2.6.1. Clasificación de los alcoholes.

La oxidación de los alcoholes es una reacción orgánica muy común, pues son los compuestos orgánicos más versátiles, debido a que gran parte de otros compuestos orgánicos se pueden sintetizar a partir de un alcohol. Un alcohol primario (**A**) posee dos hidrógenos enlazados al carbono que tiene el grupo (-OH), por lo que puede perder uno de ellos y ser oxidado a aldehído (**E**) y, a continuación, a ácido carboxílico (**F**). Un alcohol secundario (**B**) puede perder su único hidrógeno y ser oxidado a cetona (**G**) (Figura

2.6.2), pero un alcohol terciario no puede ser oxidado con facilidad porque el carbono que tiene el grupo (-OH) no tiene enlaces con ningún átomo de hidrógeno, por lo cual la oxidación requiere de la ruptura de un enlace carbono-carbono, sin embargo, en medio ácido la reacción ocurre, pero con ruptura del esqueleto (Autino *et al*, 2013).

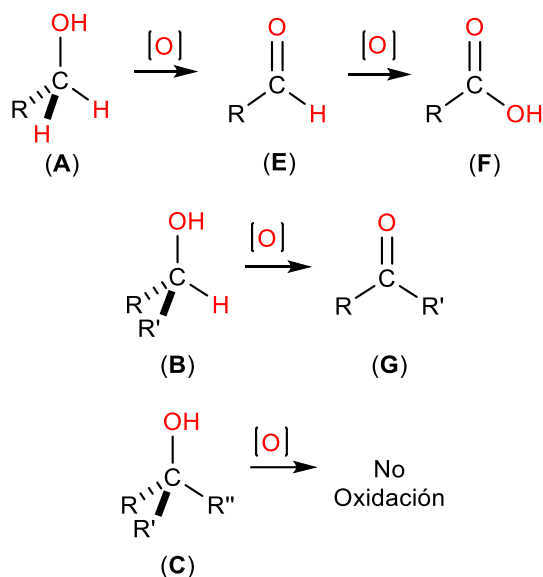


Figura 2.6.2. Reacciones de oxidación de los alcoholes primarios y secundarios (Modificado de McMurry, 2012).

Las condiciones de oxidación que permiten el aislamiento fácil de los productos oxidados con un buen rendimiento son aquellas donde se emplean varias especies Cr(VI) como el oxidante en medios anhidros. Dos de estos reactivos son el clorocromato de piridinio (PCC) (**12**), y dicromato de piridinio (PDC) o reactivo de Collins (**13**) (Figura 2.6.3) (Carey, 2014).

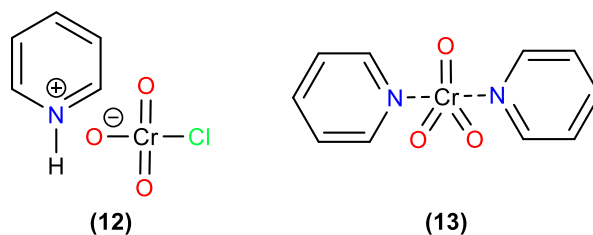
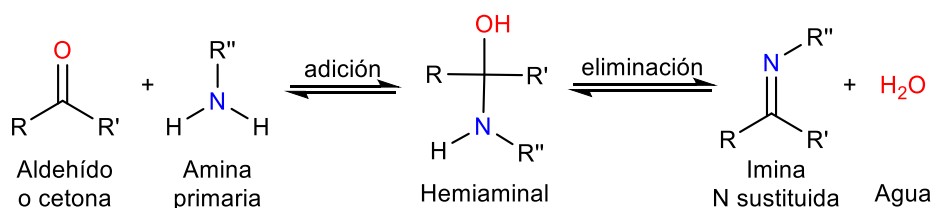


Figura 2.6.3. Agentes oxidantes con especie Cromo(V).

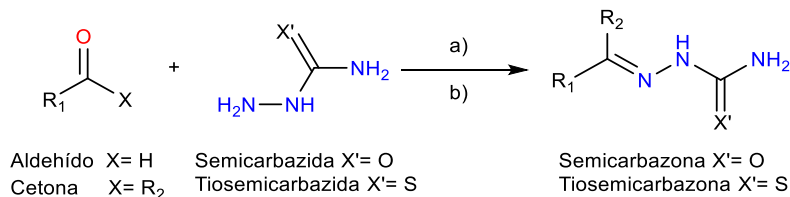
2.7 Bases de Schiff

Estructuralmente, una base de Schiff (llamadas así por Hugo Schiff) es un análogo de nitrógeno de un aldehído o cetona en la que el grupo carbonilo (C=O) ha sido sustituido por una imina (Esquema 2.7.1). Son compuestos orgánicos, utilizados como pigmentos y colorantes, catalizadores, productos intermedios de síntesis inorgánica, y estabilizadores de polímeros; se han utilizado por exhibir una importante gama de actividades biológicas, incluida la antifúngica, antibacteriana, antipalúdicas, propiedades antiproliferativas, antiinflamatorias, antivirales y antipiréticas (Perentena, *et. al.*, 2015).



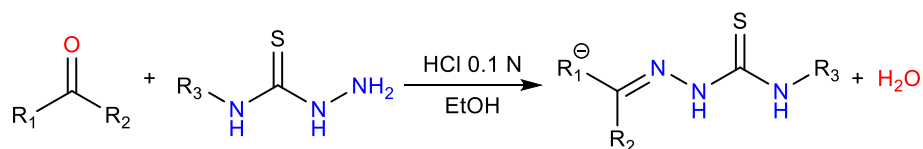
Esquema 2.7.1. Reacción general para la obtención de Bases de Schiff.

Las semicarbazonas y tiosemicarbazonas son compuestos derivados de la semicarbazida y tiosemicarbazida, respectivamente; presentan una amplia gama de bioactividades, y sus aplicaciones químicas y farmacológicas han sido ampliamente investigadas (Pavan, *et. al.*, 2010). Las rutas para obtener semicarbazonas y tiosemicarbazonas (Esquema 2.7.2) son similares: para la obtención de tiosemicarbazonas a partir de compuestos carbonílicos se efectúa utilizando en el medio metanol y ácido acético al 1%, mientras para la obtención de semicarbazonas existe la posibilidad de utilizar acetato de sodio, agua y etanol (de Oliveira, *et. al.*, 2008).



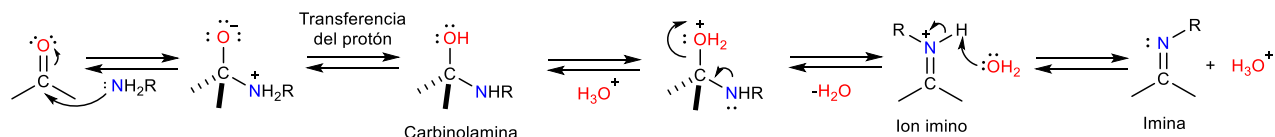
Esquema 2.7.2. Condiciones de reacción para la obtención de semicarbazonas a) NaOAc, H₂O, EtOH y tiosemicarbazonas b) MeOH, 1% HOAc.

Otro método muy utilizado para la obtención de semicarbazonas es el expuesto por Fatondji y colaboradores en 2012, para su obtención se implementa el uso de etanol como medio de reacción y una cantidad mínima de HCl 0.1 N (Esquema 2.7.3).



Esquema 2.7.3. Condiciones empleadas por Fatondji *et al.*, 2012 para obtención de tiosemicarbazonas.

En ambos casos, el medio ácido propicia que el ataque nucleofílico, conduciendo a un intermediario tetraédrico dipolar, en el cual se transfiere un protón del nitrógeno al oxígeno, produciendo una carbinolamina neutra. El catalizador ácido protona al oxígeno del hidroxilo, de tal forma que los electrones del par no enlazado del nitrógeno expulsan agua, dando un ion imino, donde finalmente la pérdida del H⁺ del nitrógeno da la imina neutra como producto (Esquema 2.7.4) (Pavan, *et al.*, 2010).



Esquema 2.7.4. Mecanismo de reacción para la obtención de una imina a partir de una cetona (McMurry, 2012).

3- OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Preparar derivados a partir de los fitosteroles: estigmasterol (**9**) y sitosterol (**11**), aislados del extracto hexánico de los tallos de *Trixis michuacana* var. *longifolia* mediante una secuencia estratégica de reacciones químicas, con la finalidad de obtener compuestos con potenciales aplicaciones biológicas.

3.2 Objetivos específicos

- Colectar la especie vegetal.
- Obtener extractos hexánicos de los tallos la planta.
- Aislar y purificar mediante técnicas cromatográficas la mezcla de estigmasterol (**9**) y sitosterol (**11**).
- Obtener el derivado hidrogenado (**14**) a partir de la mezcla de estigmasterol (**9**) y sitosterol (**11**).
- Obtener su respectiva cetona (**15**).
- Preparar la base de Schiff (**16**).
- Caracterizar los productos de reacción por métodos físicos, espectroscópicos y espectrométricos.

4- JUSTIFICACIÓN

El estudio químico de la especie vegetal *Trixis michuacana* var. *longifolia* usada dentro de la medicina tradicional *p'urhépecha* ha permitido el aislamiento, purificación y caracterización de metabolitos secundarios, permitiendo explorar su reactividad química frente a diferentes condiciones de reacción.

Los terpenos son el grupo de metabolitos secundarios con mayor abundancia en el reino vegetal, siendo uno de los grupos más importantes los fitosteroles compuestos que poseen una amplia diversidad estructural, por tal motivo, actualmente han atraído la atención en la química sintética; debido a que son biológicamente activos y por presentar una alta complejidad estructural, lo que permitirá obtener nuevos derivados con propiedades biológicas interesantes.

5- METODOLOGÍA

La metodología en el presente trabajo se llevada a cabo se resume en el diagrama 5.1.

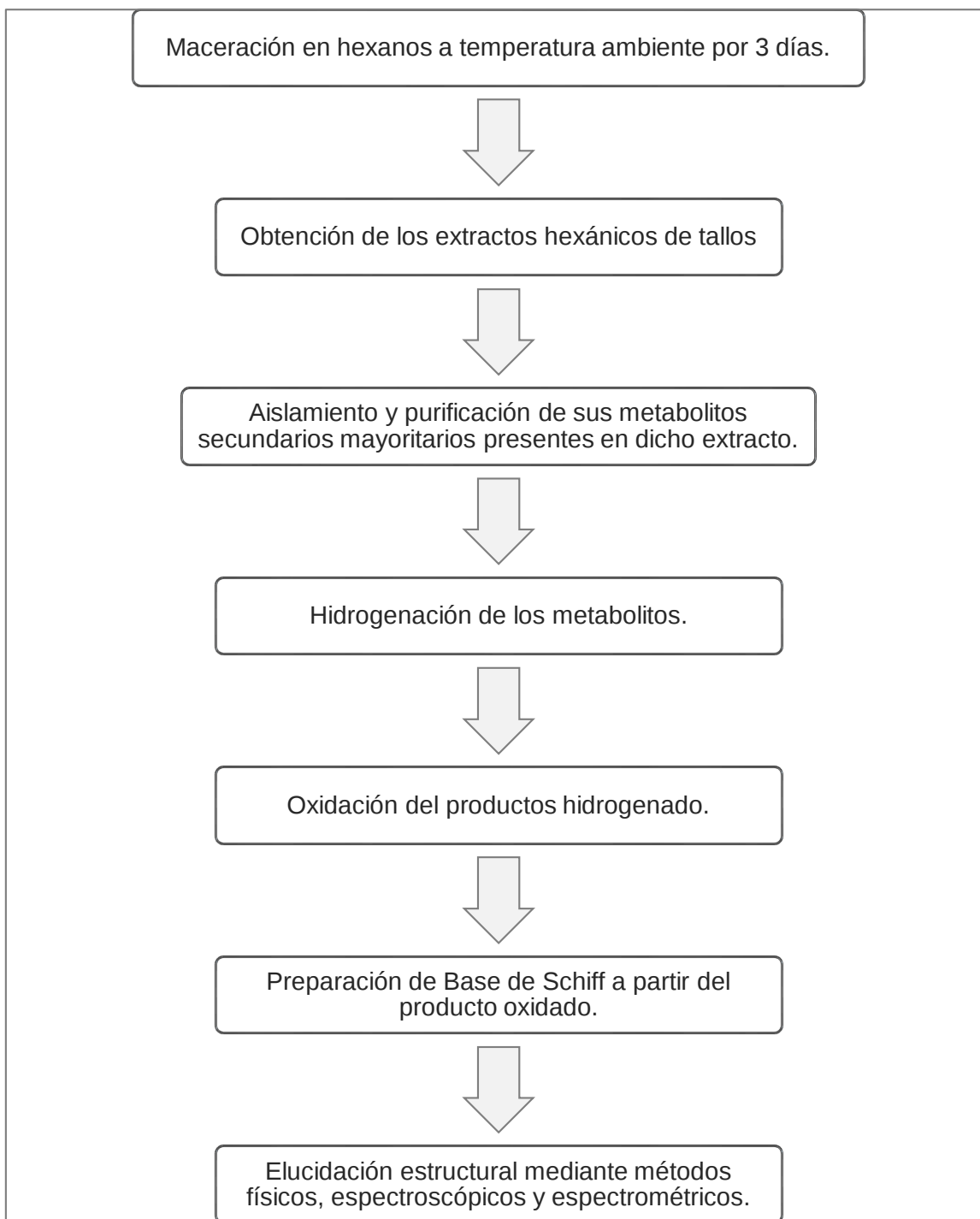


Diagrama 5.1. Metodología experimental para el desarrollo del proyecto.

6- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. Colecta de la especie vegetal

La especie vegetal *Trixis michuacana* var. *longifolia* fue colectada en la carretera Peribán-Los Reyes, en los límites de la comunidad de San Francisco, Peribán en noviembre de 2018.

6.2. Obtención de extractos

Para la obtención de los extractos, el material vegetal se dejó secar por 15 días a la sombra a temperatura ambiente, posteriormente se separó en sus distintas partes y fue triturada. Los tallos (4.4 kg) se sometieron a maceración en hexanos por 3 días a temperatura ambiente, filtrando y concentrando a presión reducida, realizando este proceso por triplicado.

Los extractos obtenidos fueron analizados por RMN de ^1H (Figura 6.2.1) para conocer la abundancia y naturaleza química de sus componentes: observando señales en δ 5.65-4.50 que características de protones vinílicos, así como en δ 4.00-3.20 señales que indican la presencia de protones base de heteroátomos. También se observan en δ 2.44-0.60 con mayor intensidad señales características de protones alifáticos, indicativas de metilos de compuestos terpénicos.

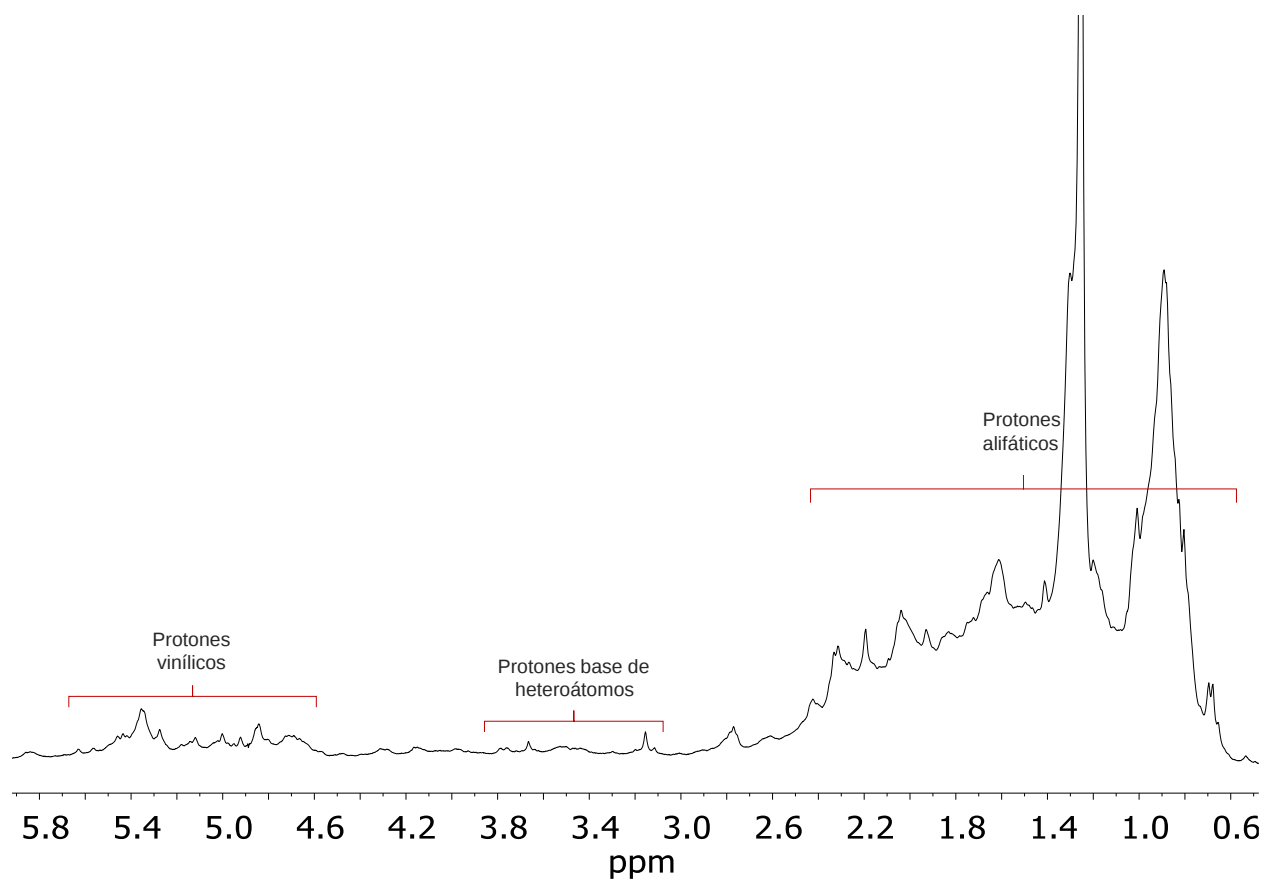


Figura 6.2.1. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del extracto hexánico de tallos de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

6.3. Obtención y purificación de estigmasterol (9) y sitosterol (11).

El extracto crudo (21.67 g) se separó por CC para la obtención de 18 fracciones enriquecidas de 100 mL empleando como fase móvil mezclas de hexanos:AcOEt en polaridad ascendente. De las fracciones 5 y 6 (obtenidas con polaridades 3:2 y 1:1, respectivamente) de manera consecutiva se separaron empleando hexanos:AcOEt (9:1), lo que llevó a la obtención de 170 mg de un sólido blanco cristalino con p.f. 136-138 °C. En su análisis por espectroscopia de infrarrojo (IR) (Figura 6.3.1) se observan bandas de estiramiento en 3435.45 cm^{-1} característica del grupo funcional -OH y entre $1600\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ aproximadamente la banda de adsorción correspondiente a los carbonos con hibridación sp^2 .

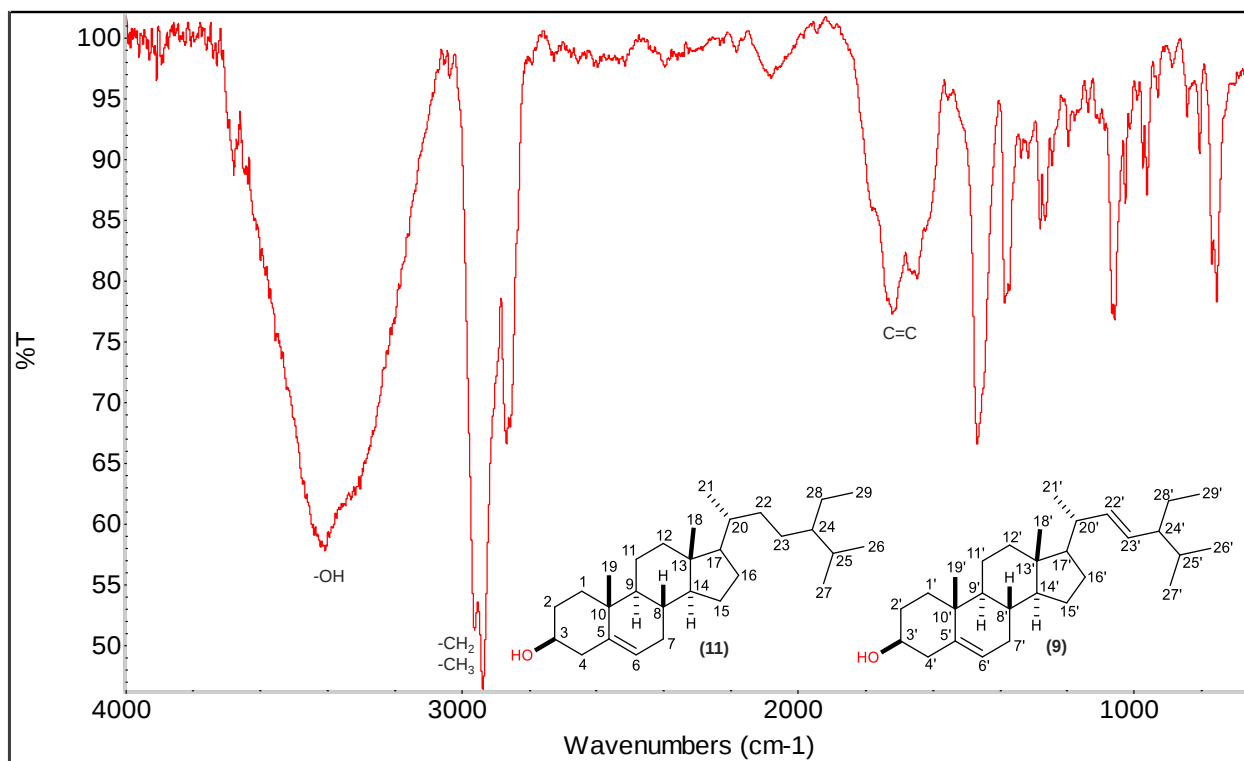


Figura 6.3.1. Espectro IR del estigmasterol (9) y sitosterol (11).

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 6.3.2), se observa una señal doble ancha en δ 5.35 ($J= 5.2$ Hz) que corresponde a los protones vinílicos H-6 y H-6', en δ 5.14 y 5.01 ($J= 15.1$ y 8.5 MHz) se encuentran dos señales dobles de dobles distintivas de los protones vinílicos H-22' y H-23', respectivamente, además en δ 3.53 se aprecia una señal múltiple asignada al protón base de hidroxilo H-3 y H-3'. Finalmente, entre δ 1.01 y 0.68 se ubican las señales correspondientes a los hidrógenos de los metilos. Al realizar el análisis de sus integrales se determinó que se trataba de una mezcla de estigmasterol (**9**) y sitosterol (**11**) en una proporción 2:1, respectivamente.

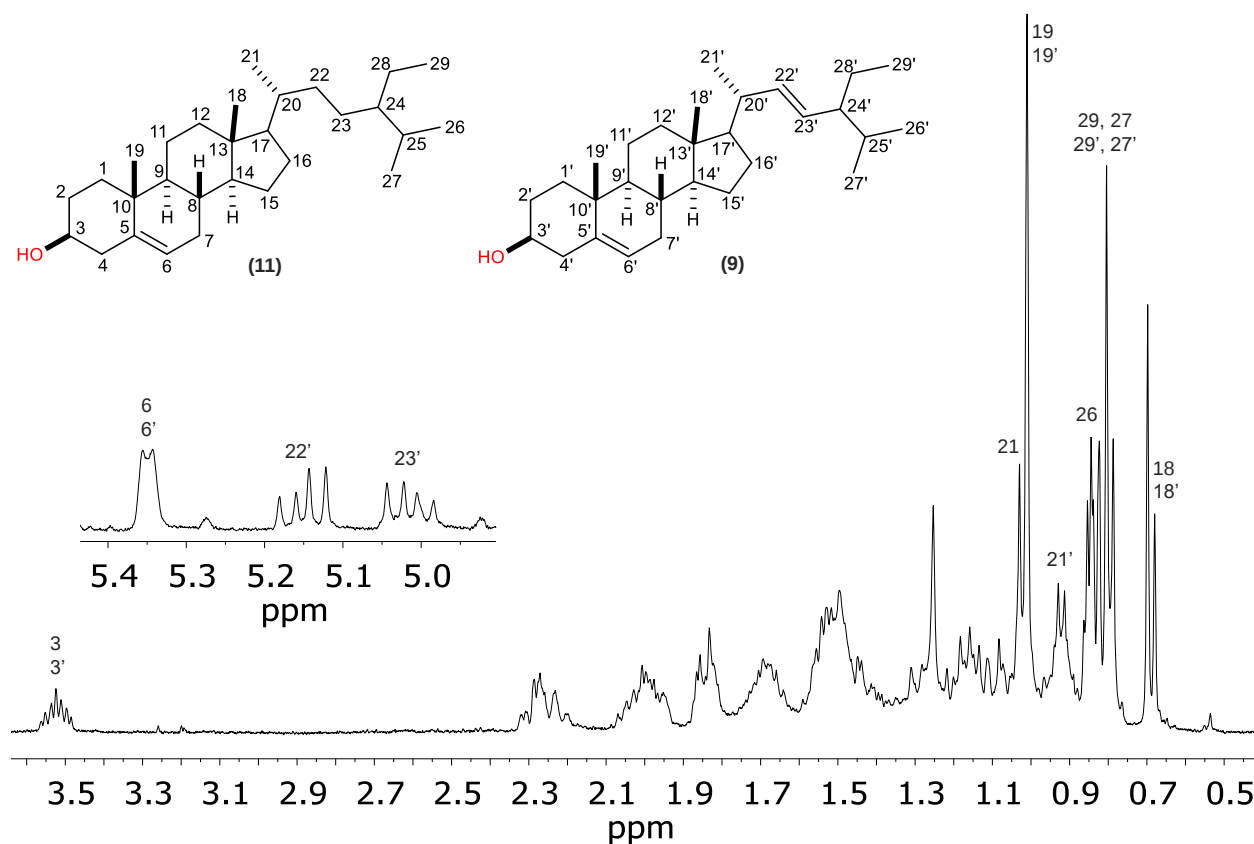


Figura 6.3.2. Espectro RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de estigmasterol (**9**) y sitosterol (**11**).

En cuanto al espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.3.3), se observaron 2 juegos de señales, de las cuales, destacan las señales en δ 140.7 que corresponden a los carbonos vinílicos C-5 y C-5' y δ 121.6 para C-6 y C-6'. Las señales en δ 138.3 y 129.2 se asignan a C-22' y C-23', respectivamente, correspondientes al doble enlace de la cadena lateral del estigmasterol (**9**), mientras que para el sitosterol (**11**) C-22 y C-23 se asignan a las señales en δ 36.1 y δ 28.2. Por último, en δ 71.7 y 71.8 se ubican las señales de C-3 y C-3' bases de hidroxilo.

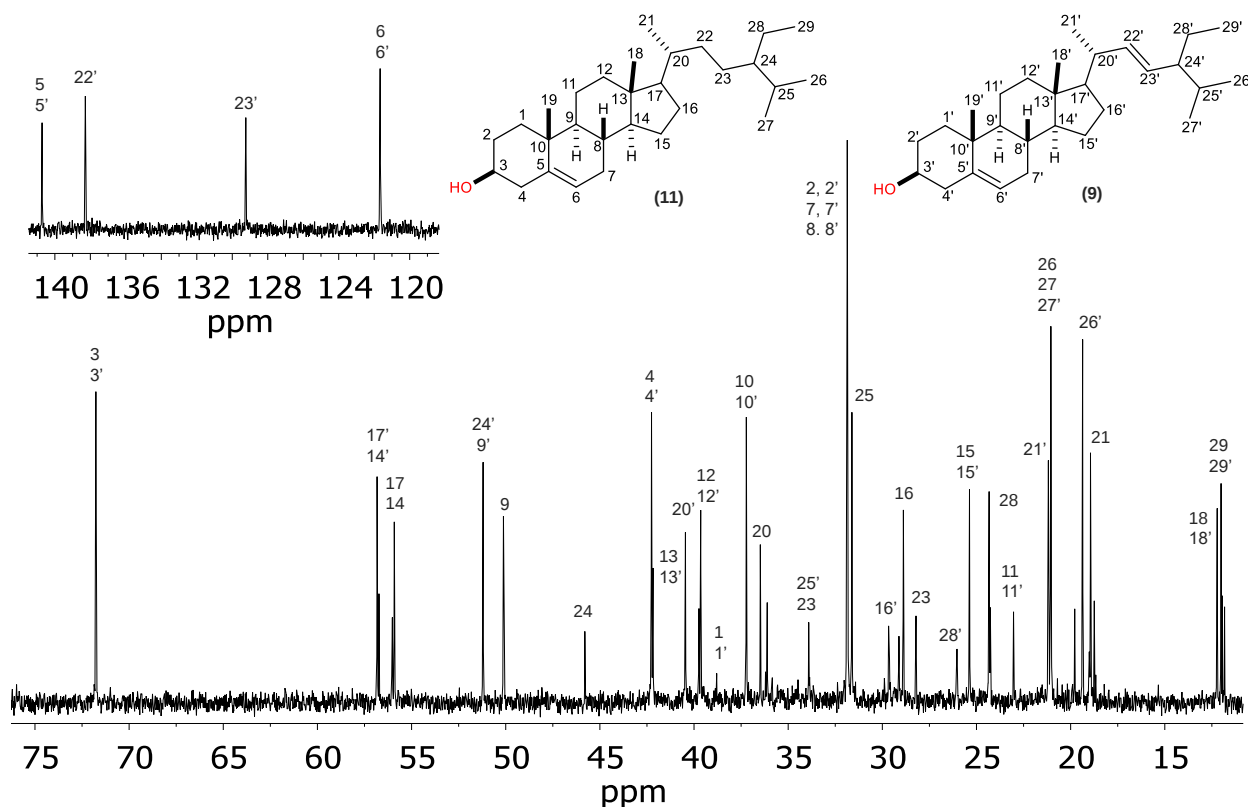


Figura 6.3.3. Espectro RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 de estigmasterol (**9**) y β -sitosterol (**11**).

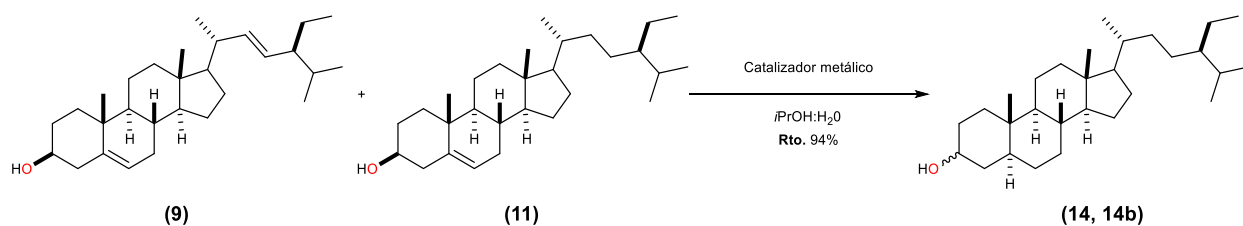
Los datos de espectroscopía de RMN de ^{13}C fueron iguales a los reportados (Tabla 6.3.1). Estos fitoesteroides se describen por primera vez en la especie *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

Tabla 6.3.1. Comparación de desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C de estigmasterol (**9**) y sitosterol (**11**) (Kipkemei, 2017; Ododo, 2016).

Estigmasterol (9)			3 β - sitosterol (11)		
Carbono	$\delta\text{c}_{\text{EXP}}$	$\delta\text{c}_{\text{REF}}$	Carbono	$\delta\text{c}_{\text{EXP}}$	$\delta\text{c}_{\text{REF}}$
1	37.2	37.2	1'	37.2	37.2
2	31.6	31.6	2'	31.6	31.6
3	71.7	71.7	3'	71.7	71.8
4	42.2	42.2	4'	42.2	42.3
5	140.7	140.7	5'	140.7	140.7
6	121.6	121.6	6'	121.6	121.7
7	31.8	31.8	7'	31.8	31.9
8	31.8	31.8	8'	31.8	31.9
9	50.1	50.1	9'	50.1	50.1
10	36.5	36.4	10'	36.5	36.5
11	21.0	21.1	11'	21.0	21.1
12	39.7	39.6	12'	39.7	39.8
13	40.4	40.4	13'	42.2	42.3
14	56.9	56.8	14'	56.9	56.8
15	24.2	24.2	15'	24.2	24.3
16	28.9	28.8	16'	28.2	28.3
17	56.0	56.0	17'	56.0	56.0
18	12.2	12.1	18'	11.9	11.9
19	19.3	19.3	19'	19.3	19.4
20	39.7	39.7	20'	36.1	36.1
21	21.0	20.9	21'	18.7	18.8
22	138.3	138.2	22'	33.9	33.9
23	129.2	129.2	23'	26.0	26.1
24	51.2	51.2	24'	45.8	45.8
25	33.9	33.9	25'	29.1	29.2
26	18.9	18.9	26'	19.8	19.8
27	21.0	21.0	27'	19.0	19.1
28	25.3	25.3	28'	23.0	23.1
29	11.8	11.8	29'	12.0	12.0

6.4 Preparación de sitostanol (14 y 14b) a partir de estigmasterol (9) y sitosterol (11)

Aunque actualmente los procesos de hidrogenación son ampliamente usados en diversos sectores industriales, la gran mayoría de métodos requieren condiciones de alto peligro, por lo cual se optó por una hidrogenación catalítica, cuyo método fue desarrollado recientemente por nuestro equipo de trabajo (Herrera, 2021) (Esquema 6.4.1).



Esquema 6.4.1. Hidrogenación de estigmasterol (9) y sitosterol (11).

Como producto de estas condiciones se obtuvieron 94 mg de un sólido blanco con p.f. 136-138 °C, el cual fue analizado por IR (Figura 6.4.1) observando bandas de 3350 a 3100 cm^{-1} del grupo hidroxilo (-OH), de 3000 a 2800 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de los enlaces CH_2 y CH_3 del esqueleto triterpénico, así como una banda en 1100 cm^{-1} del enlace C-O.

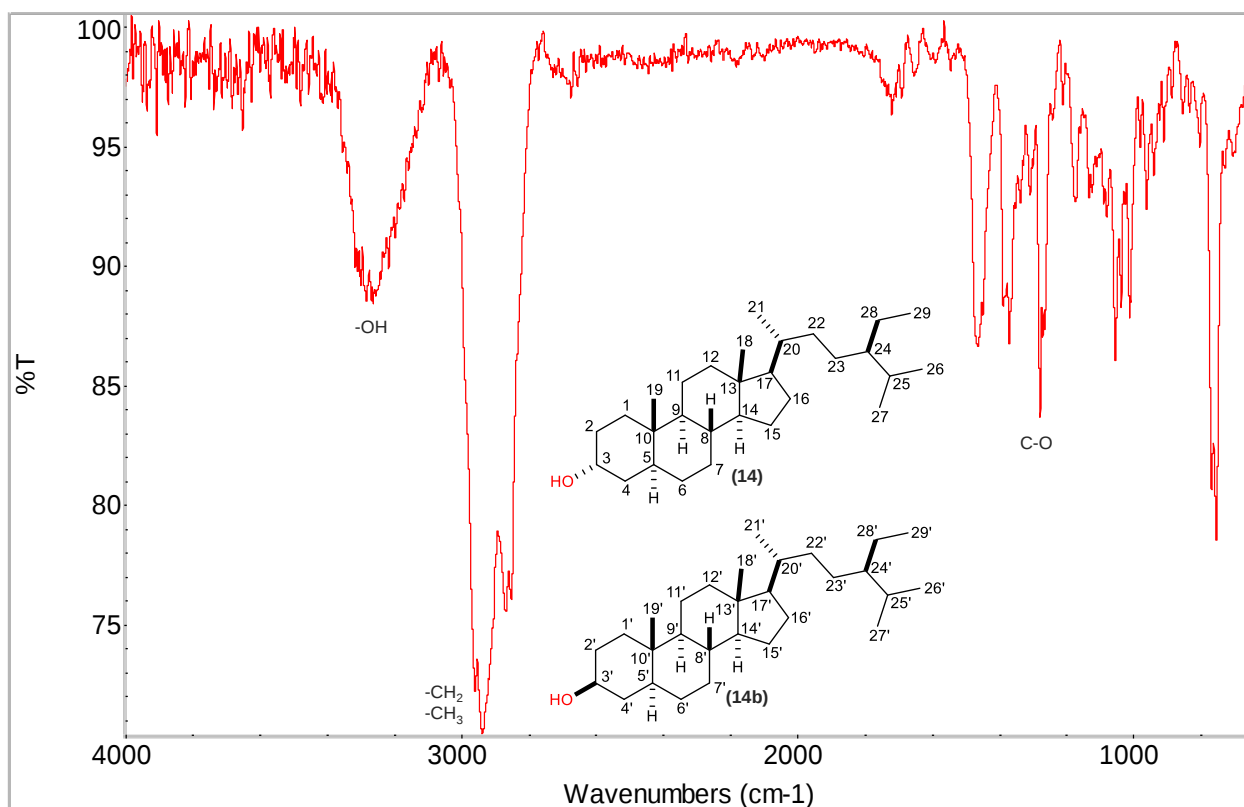


Figura 6.4.1. Espectro IR de 5 α -sitosta-3 α -ol (**14**) y 5 α -sitosta-3 β -ol (**14b**).

En su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.4.2) se aprecian señales en la región alifática, adicionalmente se observan en δ 4.03 una señal simple ancha que corresponde al H-3 β y en δ 3.59 un multiplete para H-3 α , indicando la hidrogenación de la mezcla esteroideal **9** y **11**, así como la isomerización del producto hidrogenado en la posición C-3, este fenómeno es poco común en núcleos esteroidales; sin embargo, se sabe que en presencia de un catalizador metálico puede propiciarlo (Pàmies, 2001). Para determinar la proporción de estos isómeros se integraron ambas señales, obteniendo una proporción 32:68 de 5 α -sitosta-3 α -ol (**14**) y 5 α -sitosta-3 β -ol (**14b**).

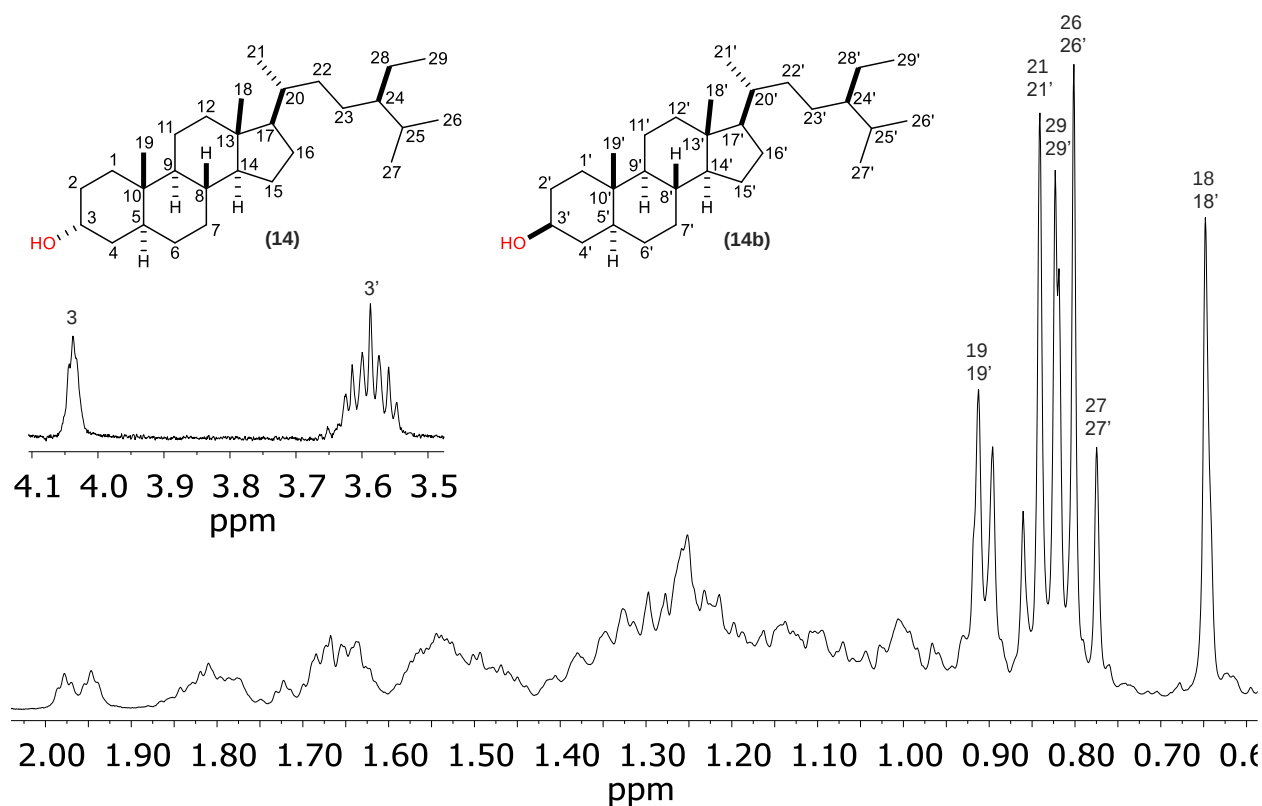


Figura 6.4.2. Espectro RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de 5α -sitosta- 3α -ol (**14**) y 5α -sitosta- 3β -ol (**14b**).

En cuanto al espectro RMN de ^{13}C (Figura 6.4.3) se identifican 2 juegos de señales, corroborando lo observado anteriormente en RMN de ^1H . Se aprecia en δ 39.1 y 28.7 las señales de C-5 y C-6, respectivamente; además se observan en δ 33.9 y 26.0 las señales de C-22' y C-23' del estigmasterol (**9**), así como las señales en δ 73.8 y 66.4 son características de los C-3 y C-3' bases al hidroxilo. El resto de las señales se ubican entre δ 54.5-11.0 (Tabla 6.4.1.).

Los datos de RMN de ^{13}C obtenidos experimentalmente concuerdan con los reportados para 5α -sitosta- 3α -ol (**14**), debido a que no hay evidencia de los desplazamientos para el isómero 5α -sitosta- 3β -ol (**14b**) (Tabla 6.4.1).

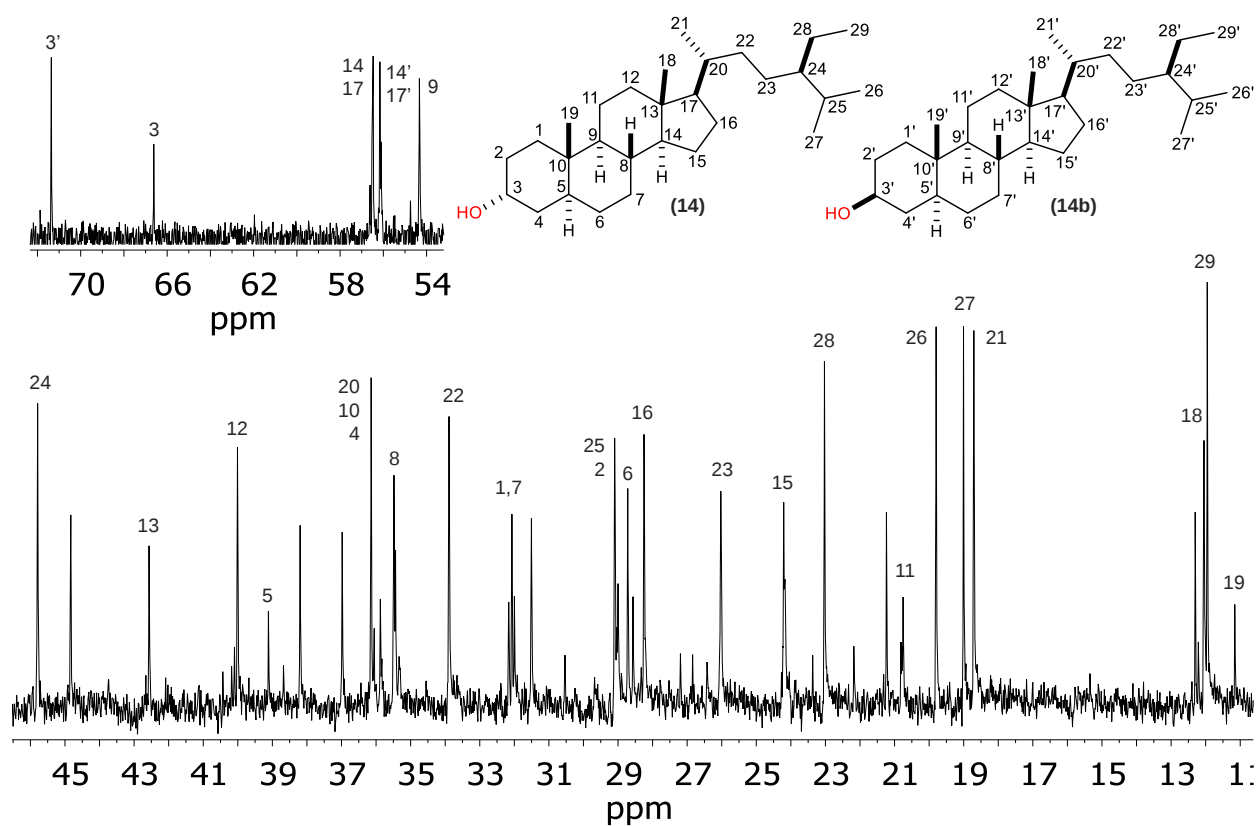


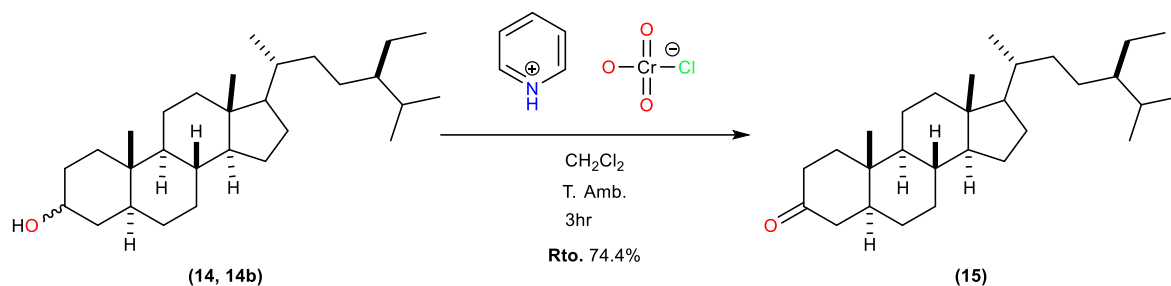
Figura 6.4.3. Espectro RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 de 5α -sitosta-3 α -ol (**14**) y 5α -sitosta-3 β -ol (**14b**).

Tabla 6.4.1. Desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C del 5 α -sitosta-3 α -ol (**14**) con la literatura (Luo, 2009).

Carbono	$\delta\text{C}_{\text{REF}}$	$\delta\text{C}_{\text{EXP}}$
1	32.2	32.2
2	29.0	29.0
3	66.6	66.6
4	35.9	35.9
5	39.1	39.1
6	28.6	28.7
7	32.0	32.1
8	35.5	35.5
9	54.3	54.3
10	36.0	36.0
11	20.7	20.8
12	40.0	40.0
13	42.6	42.6
14	56.5	56.5
15	24.2	24.2
16	28.2	28.2
17	56.6	56.5
18	12.1	12.3
19	11.2	11.2
20	36.1	36.1
21	18.7	18.7
22	33.9	33.9
23	26.0	26.0
24	45.8	45.8
25	29.1	29.1
26	19.8	19.8
27	19.0	19.0
28	23.0	23.0
29	12.0	12.0

6.5 Preparación de sitostanona (15) a partir del sitostanol (14 y 14b)

Ya que el 5 α -sitostanol (**14** y **14b**) es una mezcla isomérica del alcohol de la posición 3, se optó por oxidarlo empleando como agente oxidante PCC en CH₂Cl₂, con el fin de obtener su respectiva cetona (**15**) y de esta manera generar un solo producto de reacción (Esquema 6.5.1).



Esquema 6.5.1. Oxidación de 5 α -sitosta-3 α -ol (**14**) y 5 α -sitosta-3 β -ol (**14b**).

Se obtuvo como producto de esta reacción un sólido blanco cristalino en forma de pequeñas agujas de p.f. 126-128 °C, el cual fue analizado por espectroscopía de IR, en cuyo espectro (Figura 6.5.1), se observa una banda de adsorción en 1719.53 cm⁻¹ correspondiente al grupo carbonilo de la cetona, sugiriendo la oxidación de los grupos hidroxilo de la posición C-3.

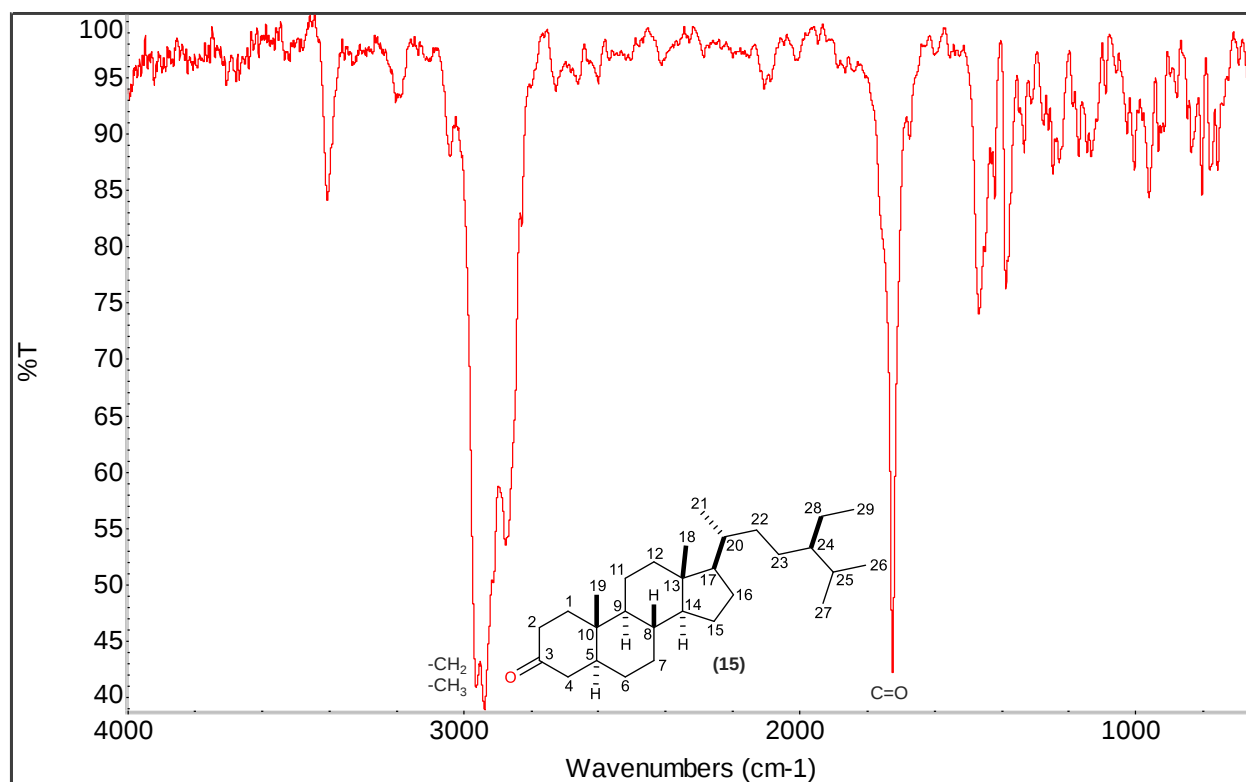


Figura 6.5.1. Espectro IR de 5 α -sitostan-3-ona (**15**).

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 6.5.2) se observan entre δ 2.41 y 0.50 únicamente las señales correspondientes a los protones alifáticos del esqueleto esteroide, mientras en el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.5.3) destaca en δ 212.3 el desplazamiento de la señal del C-3 hacia frecuencias altas correspondiente ahora a carbonilo de cetona (Tabla 6.5.1). Cabe resaltar que los juegos de señales observados en el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.4.3) de los dos isómeros anteriores (**14**, **14b**) se resuelven a uno al momento de oxidarlos. Los datos experimentales fueron comparados con Luo, 2009 coincidiendo para la 5 α -sitostanona (**15**).

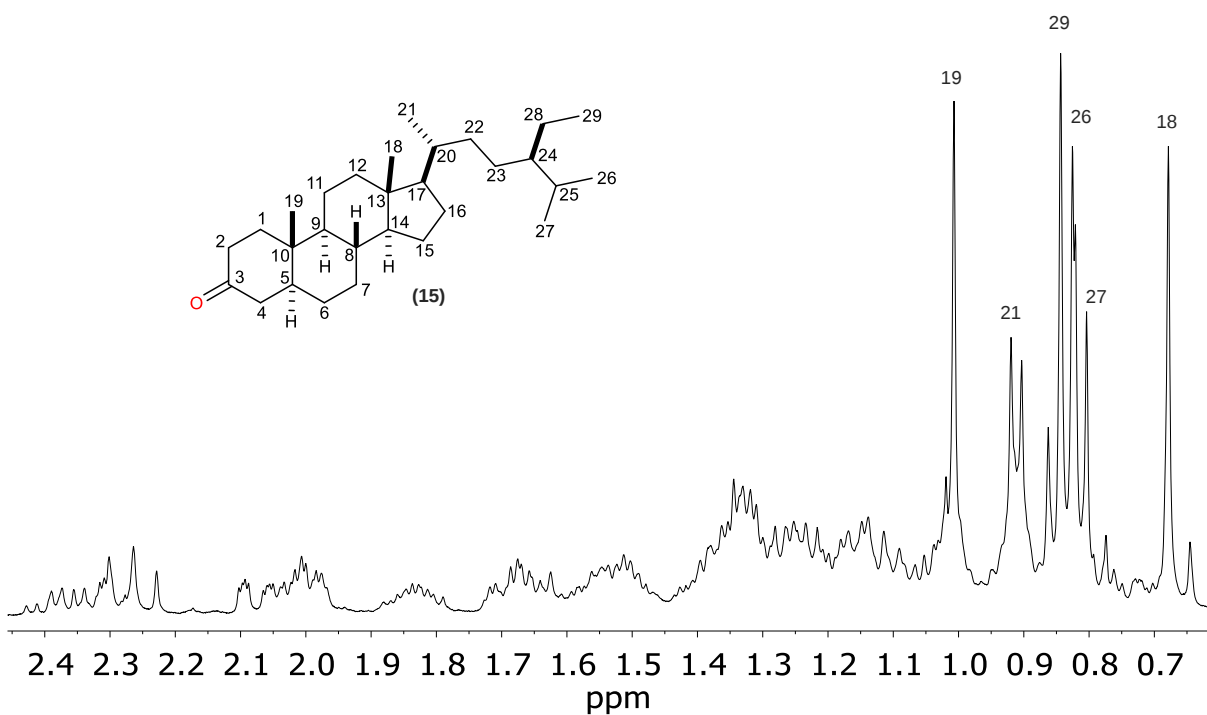


Figura 6.5.2. Espectro RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de la 5 α -sitostan-3-ona (15).

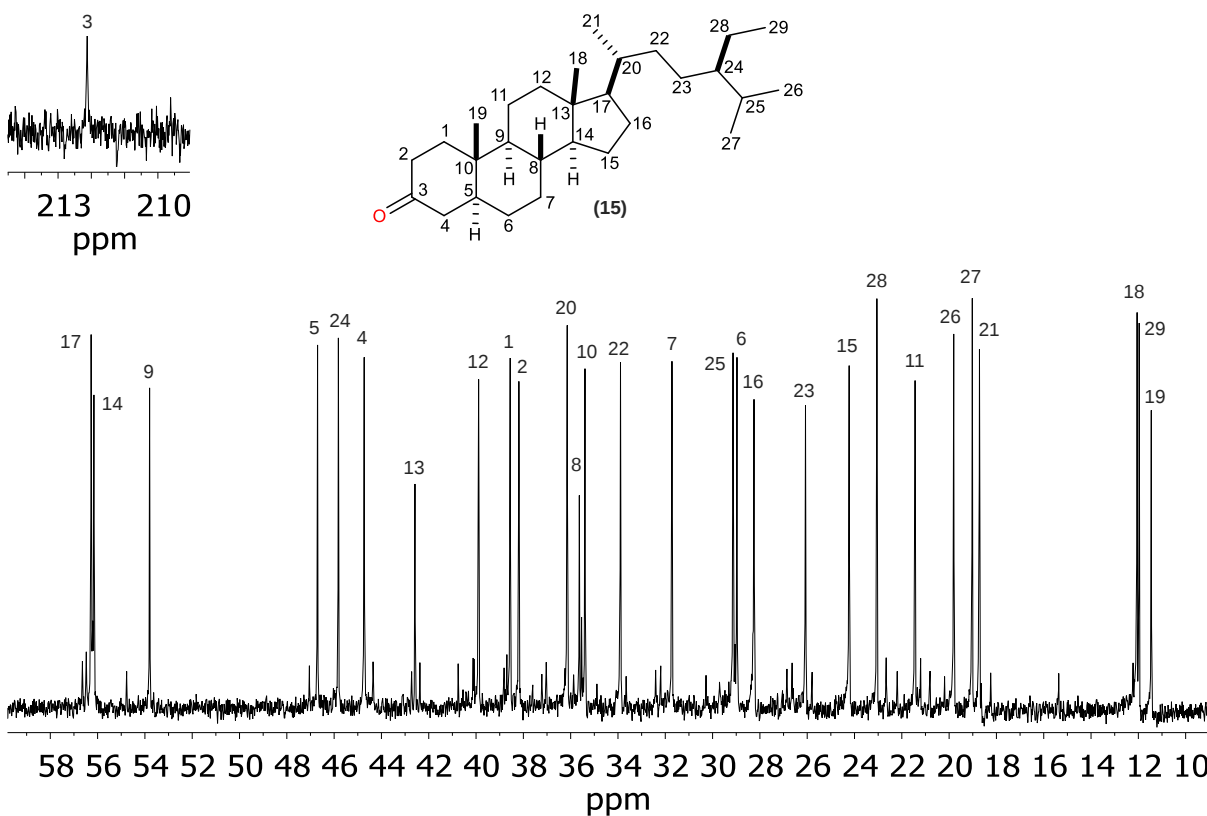


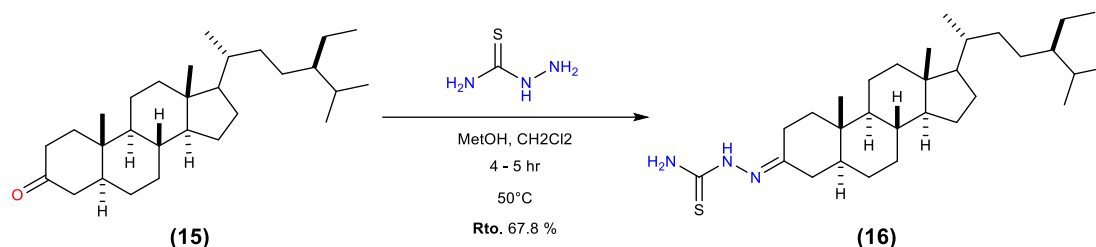
Figura 6.5.3. Espectro RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 de la 5 α -sitostan-3-ona (15).

Tabla 6.5.1. Desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C de la 5α -sitostan-3-ona (**15**) con la literatura (Luo, 2009)

Carbono	$\delta\text{c}_{\text{REF}}$	$\delta\text{c}_{\text{EXP}}$
1	38.5	38.6
2	38.2	38.2
3	212.3	212.1
4	44.7	44.7
5	46.7	46.7
6	29.0	29.1
7	31.7	31.7
8	35.4	35.4
9	53.8	53.8
10	35.6	35.6
11	21.4	21.4
12	39.9	39.9
13	42.6	42.6
14	56.1	56.2
15	24.2	24.2
16	28.2	28.2
17	56.3	56.3
18	12.0	12.1
19	11.4	11.5
20	36.1	36.1
21	18.7	18.7
22	33.9	33.9
23	26.0	26.1
24	45.8	45.8
25	29.1	29.1
26	19.8	19.8
27	19.0	19.0
28	23.0	23.1
29	11.9	11.9

6.6 Preparación de la tiosemicarbazona de sitostano (16)

Se preparó la tiosemicarbazona de sitostano (**16**) haciendo reaccionar la 5 α -sitostanona (**15**) con tiosemicarbazida, conforme al Esquema 6.6.1.



Esquema 6.6.1. Preparación de la tiosemicarbazona de la sitostano (**16**).

Se obtuvieron 36.9 mg de un sólido amorfo amarillento de p.f. 195-197 °C, el cual fue analizado por espectroscopía de IR, en su espectro (Figura 6.6.1) se observan en 1743.23 cm^{-1} el modo vibracional correspondiente al enlace imínico ($\text{C}=\text{N}$), una banda de estiramiento en 2055.11 cm^{-1} asignada al enlace tiocarbonilo ($\text{C}=\text{S}$); la banda de tensión en 3229.16 cm^{-1} de la amina secundaria ($\text{N}-\text{H}$), y en 3409.37 cm^{-1} la banda correspondiente al grupo amino ($-\text{NH}_2$).

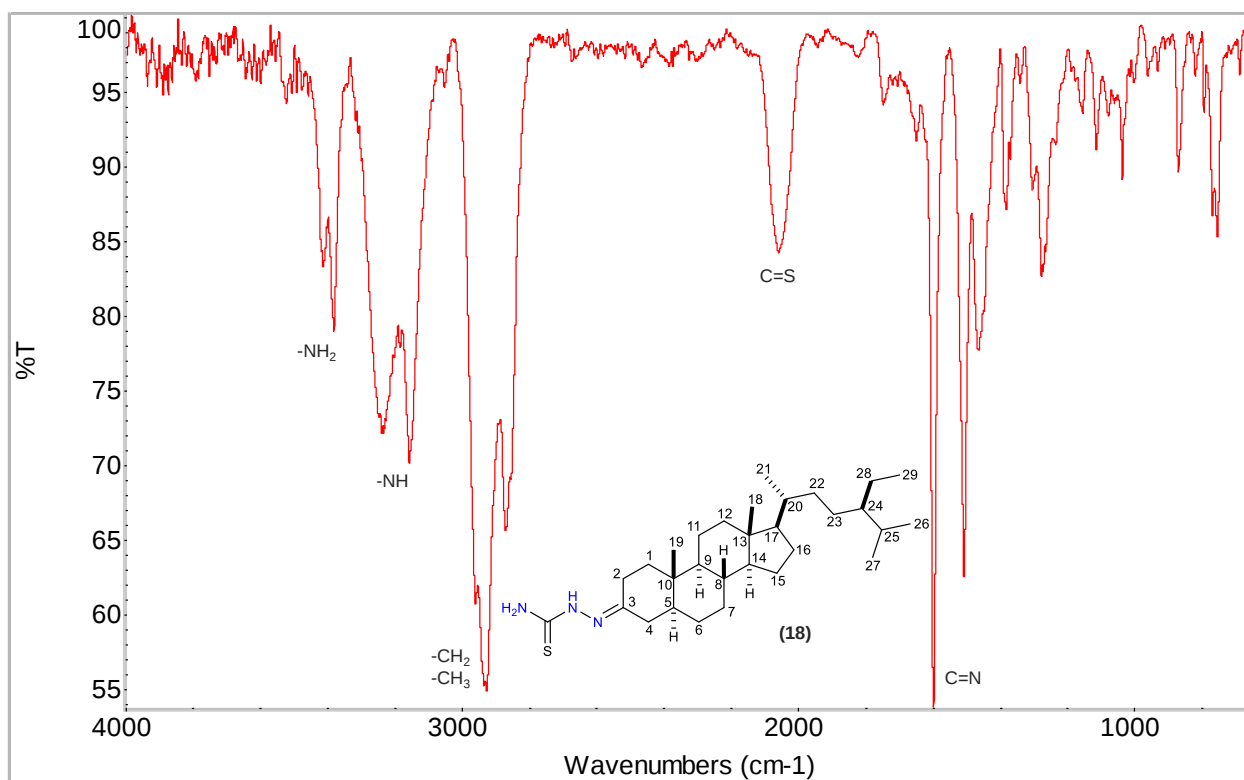


Figura 6.6.1. Espectro IR de la tiosemicarbazona de sitostano (**16**).

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 6.6.2) se observa el patrón de señales típico del esqueleto de sitostano, adicionalmente se observan en δ 8.74 la señal simple ancha correspondiente al protón del NH y dos señales simples anchas en δ 7.23 y 6.36 para los protones del NH_2 correspondientes a la tiosemicarbazona.

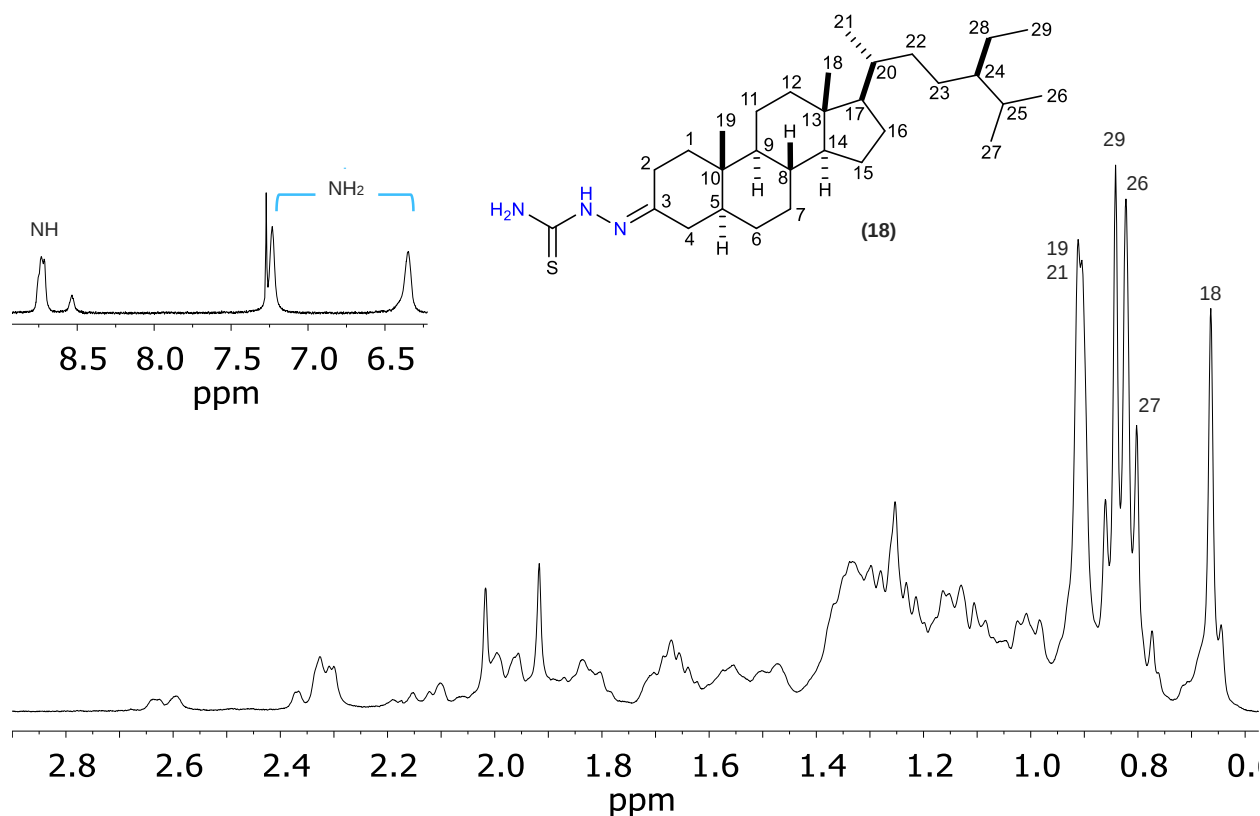


Figura 6.6.2. Espectro RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de la tiosemicarbazona de sitostano (**16**).

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.6.3) se tiene el mismo juego de señales que la 5α -sitostan-3-ona (**15**), adicionalmente se aprecian dos señales en δ 178.7 asignada al carbono imínico C-3, y en δ 156.7 correspondiente al tiocarbonilo ($\text{C}=\text{S}$).

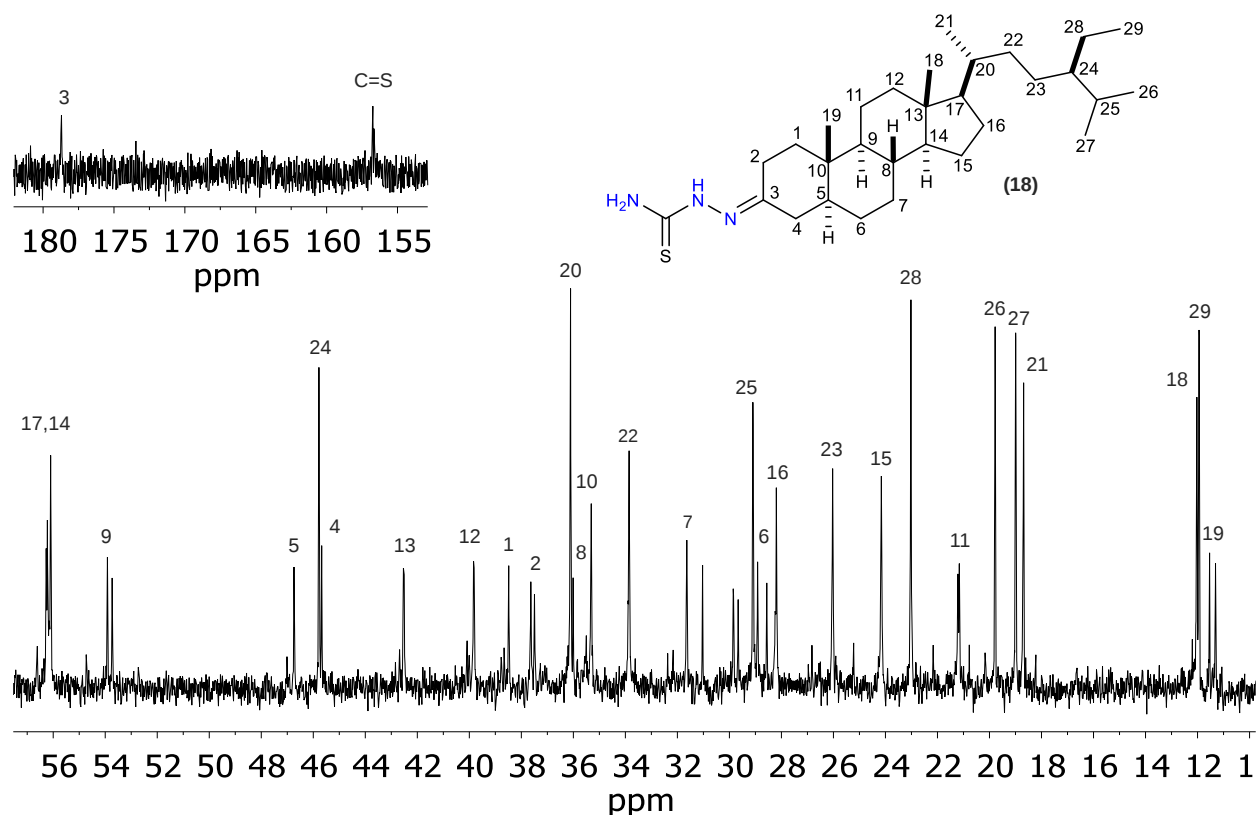


Figura 6.6.3. Espectro RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 de la tiosemicarbazona de sitostano (**16**).

En la preparación de las bases de Schiff existe la posibilidad de obtener los productos *E* y *Z*, donde el producto *E* es el más estable termodinámicamente, por lo cual se sugiere que el producto de reacción mayoritario corresponde al isómero *E* de la tiosemicarbazona de sitostano (**16**), resultando un compuesto nuevo. Los valores obtenidos en RMN de ^{13}C fueron comparados con los obtenidos para la sitostanona (**15**) observando que los valores para el esqueleto del sitostano no variaron significativamente a excepción de C-3, ahora carbono imínico ($\text{C}=\text{N}$), además de la aparición del carbono del tiocarbonilo ($\text{C}=\text{S}$) de la tiosemicarbazona (Tabla 6.6.1).

Tabla 6.6.1. Desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C de la tiosemicarbazona de sitostano (**15**) (δc en ppm).

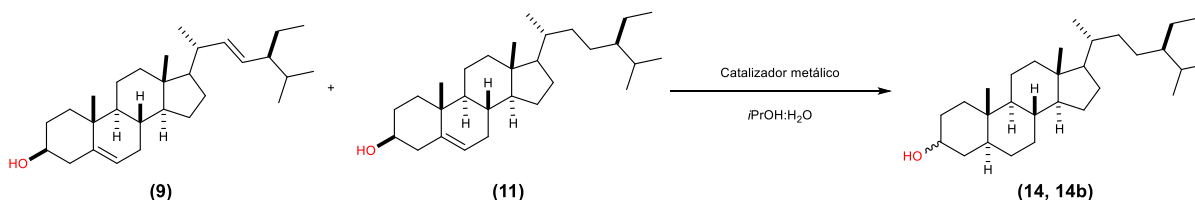
Carbono	$\delta\text{c}_{\text{EXP (15)}}$	$\delta\text{c}_{\text{EXP (16)}}$
1	38.6	38.5
2	38.2	37.7
3	212.1	178.4
4	44.7	45.7
5	46.7	46.7
6	29.1	29.0
7	31.7	31.7
8	35.4	35.4
9	53.8	53.9
10	35.6	35.6
11	21.4	21.4
12	39.9	39.9
13	42.6	42.6
14	56.2	56.1
15	24.2	24.2
16	28.2	28.3
17	56.3	56.3
18	12.1	12.0
19	11.5	11.5
20	36.1	36.2
21	18.7	18.7
22	33.9	33.9
23	26.1	26.0
24	45.8	45.8
25	29.1	29.1
26	19.8	19.8
27	19.0	19.0
28	23.1	23.0
29	11.9	11.9
C=S	-	156.8

7- CONCLUSIONES

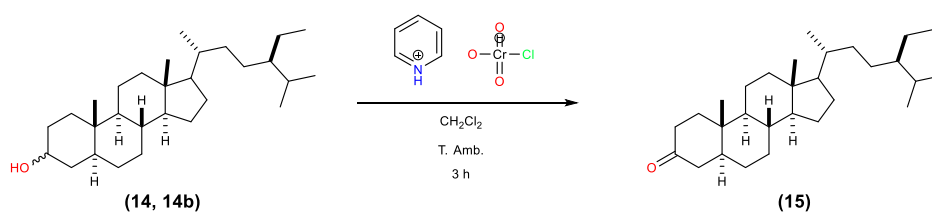
Se logró el aislamiento y purificación de una mezcla 2:1 del sitosterol (**11**) y estigmasterol (**9**) del extracto hexánico de tallos de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, siendo estos los metabolitos mayoritarios. Al estar éstos presentes en todo el reino vegetal se optó por evaluar su reactividad química frente a una serie de reacciones lo que condujo a la obtención de una nueva base de Schiff, con un rendimiento global de 47.4%.

La ruta de semisíntesis para la obtención de la tiosemicarbazona de sitostano (**16**) consta de tres etapas que involucran la hidrogenación logrando obtener como producto hidrogenado una mezcla 32:68 de 5α -sitosta- 3α -ol (**14**) y 5α -sitosta- 3β -ol (**14b**), los cuales fueron se pudieron oxidar a 5α -sitostan-3-ona (**15**) utilizando PCC y finalmente la formación de **16**, un producto nuevo con posibles aplicaciones biológicas.

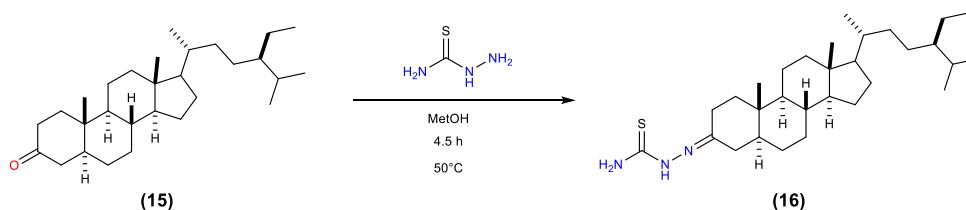
Etapas I: Hidrogenación catalítica



Etapas II: Oxidación de alcoholes secundarios



Etapas III: Formación de la Base de Schiff



8- PARTE EXPERIMENTAL

8.1 Material vegetal

La especie vegetal *Trixis michuacana* var. *longifolia* (D. Don) C.E. Anderson, se colectó en 2018, en la carretera Peribán-Los Reyes a la longitud: 102° 39.861' y una latitud 19° 55.638', la cual se encuentra a una altura media de 1620 m sobre el nivel del mar.

Un ejemplar botánico fue llevado al Herbario de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana donde fue revisado por las profesoras Rosa Isabel Fuentes Chávez y Norma Patricia Reyes Martínez, coincidiendo para *Trixis michuacana* var. *Longifolia* (D. Don) C.E. Anderson (No. Folio 3640).

8.2 Obtención de extractos

La planta se secó a la sombra a temperatura ambiente, los tallos (4.4 kg) se llevaron a macerar en 5 L de hexanos a temperatura ambiente durante 3 días. Transcurrido el tiempo, se filtró y se evaporó el solvente en rotavapor con presión reducida. Se repitió el proceso en 3 ocasiones con la finalidad de extraer la mayor cantidad de compuestos apolares de la especie vegetal. Lo que permitió obtener obteniendo 21.67 g de extracto crudo total teniendo un rendimiento del 1.41 %.

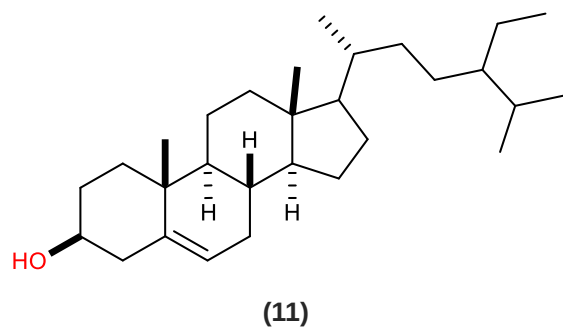
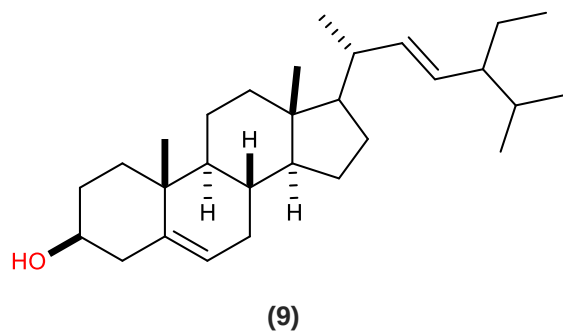
8.3 Métodos instrumentales

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fischer-Scientific y no están corregidos.

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 cloroformo deuterado (CDCl_3) y como referencia interna tetrametil silano (TMS). Los espectros se procesaron en el software MestReNova.

Los espectros de IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Nicolet iS10 empleando la técnica de ATR. Los datos se expresan cm^{-1} para los máximos principales de absorción. Los espectros fueron procesados en el software OMNIC. Los espectros de masa fueron obtenidos 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.

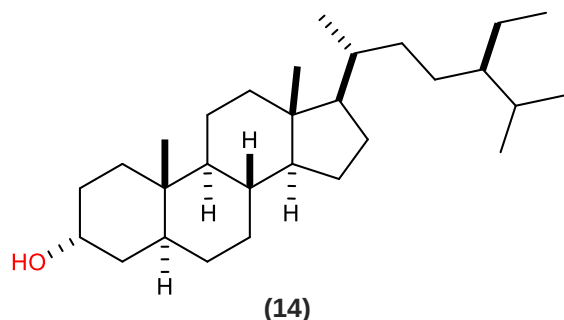
8.4 Obtención y purificación de sitosterol (**11**) y estigmasterol (**9**).



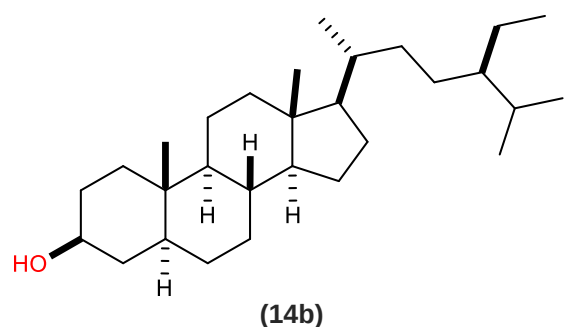
Los extractos hexánicos (21.67 g) se separaron en una columna de 4 cm de diámetro, empleando 15.5 cm de gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de hexanos:AcOEt en polaridad ascendente como eluyente. Se obtuvieron 18 fracciones enriquecidas de 100 mL cada una. Las fracciones 5 y 6 (5.4 g) se cromatografiaron en una columna de 2 cm de diámetro, empleando 15.5 cm de gel de sílice como fase estacionaria y usando mezclas de hexanos:AcOEt (9:1), para la obtención de 101 fracciones de las cuales de la fracción 23 a la 38 llevó a la

obtención de 170 mg de cristales blancos, p.f.: 116 °C, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 5.35 (2H, d, J = 5.08 Hz, H-6 y H-6'), δ 5.14 (1H, dd, J = 15.1 y 8.5 Hz, H-22'), δ 5.01 (1H, dd, J = 15.1 y 8.5 Hz, H-23'), δ 3.52 (2H, m, H-3 y H-3'), δ 1.01 (3H, s, H-19 y H-19'), δ 0.92 (6H, t, J = 6.48 Hz, H-21 y H-21'), δ 0.84 (6H, t, J = 7.48 Hz, H-29 y H-29'), δ 0.82 (6H, d, J = 7.52 Hz, H-26 y H-26'), δ 0.80 (6H, d, J = 6.92 Hz, H-27 y H-27'), δ 0.68 (6H, s, H-18 y H-18'). RMN de ^{13}C : Ver Tabla 6.3.1. EM: $[\text{M}]^+$ de 412.69 m/z (calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$) y $[\text{M}]^+$ de 414.69 m/z (calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$), (**9**) y (**11**), respectivamente. IR: $\tilde{\nu}_{\text{OH}}$ = 3435.45 cm^{-1} , $\tilde{\nu}_{\text{C=C}}$ = 1716.65 cm^{-1} .

8.5 Preparación de sitostanol (14 y 14 b) a partir de sitosterol (11) y estigmasterol (9).



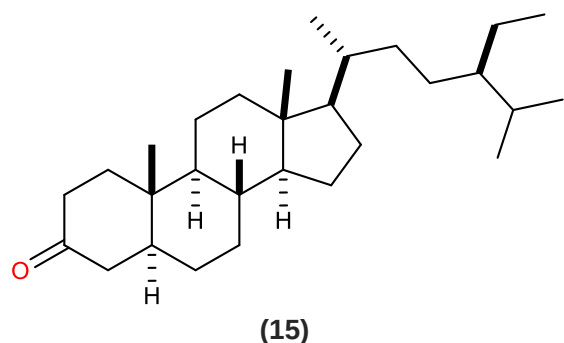
Se pesaron 25 mg de catalizador metálico y se disolvieron 100 mg de la mezcla **9** y **11** con *i*PrOH:H₂O, dejando en reflujo durante 10 h. Se dejó atemperar y se añadieron 15 mL de hexanos, dejando en agitación 15 min.; se extrajo la fase orgánica, repitiendo el proceso por 3 ocasiones.



Se obtuvieron 94.1 mg de un sólido blanco (Rto 94%), p.f: 136-138 °C. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 4.03 (1H, s, H-3 α), δ 3.59 (1H, m, H-3 β), δ 0.91 (6H, d, *J*= 6.5 Hz, H-19 y H-19'), δ 0.86 (6H, s, H-21 y H-21'), δ 0.84 (6H, t, *J*= 7.2 Hz, H-29), δ 0.82 (6H, d, *J*= 7.2 Hz, H-26 y H-26'). δ 0.80 (6H, s, H-27 y H-27'), δ 0.65

(6H, s, H-18 y H-18'). RMN de ¹³C: Ver Tabla 6.4.1. EM: [M]⁺ de 416.45 *m/z* (calculado para C₂₉H₅₂O). IR: $\tilde{\nu}_{OH}$ = 3279.71 cm⁻¹, $\tilde{\nu}_{C-O}$ = 1100 cm⁻¹.

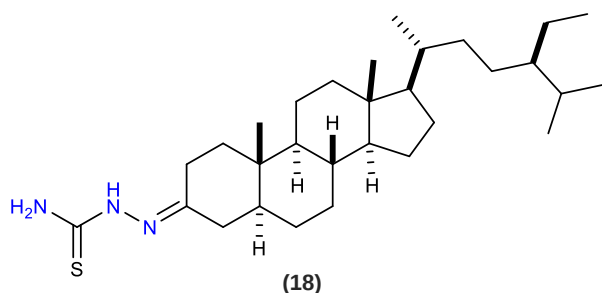
8.6 Preparación de sitostanona (15) a partir del sitostanol (14 y 14b)



Se disolvieron 100 mg de sitostanol (**14** y **14b**) en 2 mL CH₂Cl₂ en agitación moderada. Se añadieron 130 mg (1.5 Eq) de clorocromato de piridinio (PCC), dejando en agitación durante 3 h. El producto se filtró en 15.5 cm de gel de sílice y se concentró en rotavapor con calentamiento suave, hasta conseguir un peso constante.

Se obtuvieron 74.4 mg de un sólido blanco cristalino (74.4% Rto.), p.f.: 126-128 °C, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 1.01 (3H, s, H-19), δ 0.92 (3H, d, J = 6.52 Hz, H-21), δ 0.84 (3H, t, J = 7.64 Hz, H-29), δ 0.83 (3H, d, J = 7.24 Hz, H-26), δ 0.81 (3H, d, J = 6.92 Hz, H-27), δ 0.68 (3H, s, H-18). RMN de ^{13}C : Ver Tabla 6.5.1. EM: $[\text{M}]^+$ de 414.37 m/z (calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{51}\text{O}-1\text{H}$). IR: $\tilde{\nu}_{\text{C=O}}$ = 1719.53 cm^{-1} .

8.7 Preparación de la tiosemicarbazona de sitostano (16)



Se disolvieron 16.8 mg de tiosemicarbazida en 6 mL de MeOH; se añadieron 51 mg (1.5 Eq) de la sitostanona (15). Se llevó a reflujo con una agitación moderada, dejando reaccionar durante 4.5 h.

Se obtuvieron 34.6 mg de un sólido amorfo amarillento (Rto 67.8%), p.f.: 196-198 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 8.74 (1H, s, NH), δ 7.23 (1H, s, NH_2), δ 6.36 (1H, s, NH_2), δ 0.91 (3H, s, H-19), δ 0.90 (3H, s, H-21), δ 0.86 (3H, t, J = 7.6 Hz, H-29), δ 0.84 (3H, d, J = 7.6 Hz, H-26), δ 0.82 (3H, d, J = 7.6 Hz, H-27), δ 0.66 (3H, s, H-18). RMN de ^{13}C : Ver Tabla 6.6.1. IR: $\tilde{\nu}_{\text{C=S}}$ = 2055.11 cm^{-1} , $\tilde{\nu}_{\text{NH}}$ = 3229.16 cm^{-1} , $\tilde{\nu}_{\text{NH}_2}$ = 3409.37 cm^{-1} , $\tilde{\nu}_{\text{C=N}}$ = 1743.23 cm^{-1} .

9- Bibliografía

- Autino, J. (2013). Introducción a la Química Orgánica (1 ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial de la Universidad de la Plata.
- Carey, F., & Giuliano, R. (2014). Química orgánica (9 ed.). Mexico: McGraw-Hill Education.
- de Oliveira, R. B.; de Souza-Fagundes, E. M.; Soares, R. P., Andrade, A. A.; Krettli, A. U.; & Zani, C. Z. (2008). Synthesis and antimalarial activity of semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 43(9), 1983-1988.
- Fatondji, H. R.; Kpoviessi, S.; Gbaguidi, F.; Bero, J.; Hannaert, V.; Quetin-Leclercq, J.; Poupaert, J.; Moudachirou, M.; & Accrombessi, G. C. (2012). Structure–activity relationship study of thiosemicarbazones on an African trypanosome: *Trypanosoma brucei brucei*. *Medicinal Chemistry Research*, 22(5), 2151-2162.
- Fieser, L. F., & Fieser, M. (1959). Steroids. Edinburgh: Reinhold Publishing Corporation.
- García de Alba García, J. E.; Ramírez Hernández, B. C.; Robles Arellano, G.; Zañudo Hernández, J.; Salcedo Rocha, A. L.; & García de Alba Verduzco, J. E. (2012). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*, (39), 29-44.
- Helminen, J.; Paatero, E.; & Hotanen, U. (2006). Hydrogenation of plant sterols over a polymer fiber-supported Pd catalyst. *Organic Process Research & Development*, 10(1), 51-63.
- Herrera, L. D. (2019). Estudio Químico Preliminar de *Trixis michuacana* var. *longifolia* (D. Don) C.E. Anderson. Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich.

- Herrera, L.D. (2021). Estudio Químico de *Trixis michuacana* var. *longifolia* (D. Don) C.E. Anderson. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich.
- Katinas, L. (1996). Revisión de las especies sudamericanas del genero *Trixis* (Asteraceae, Mutisieae). *Darwiniana*, 34(1-4), 37-40.
- Kipkemei, A. (2017). Isolation of stigmasterol, α -amyrin acetate and lupeol acetate from *Tabernaemontana Stapfiana Britten*. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 8(11), 1331-1335.
- Kubo, I.; Nihei, K. I.; & Tsujimoto, K. (2004). Methyl *p*-coumarate, a melanin formation inhibitor in B16 mouse melanoma cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(20), 5349-5354.
- López Luengo, T. (2005). Fitoesteroles y fitoestanoles. Su papel en la prevención cardiovascular. *OFFARM*, 24(4), 90-94.
- Luo, J. R.; Ma, Q. Y.; Zhao, Y. X.; Yi, T. M.; Li, C. S.; & Zhou, J. (2009). Palaeophytochemical components from the miocene-fossil wood of *Pinus griffithii*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 56(3), 600–605.
- Mäki-Arvela, P.; Martin, G.; Simakova, I.; Tokarev, A.; Wärnå, J.; Hemming, J.; Holmbom, B.; Salmi, T.; & Murzin, D. Y. (2009). Kinetics, catalyst deactivation and modeling in the hydrogenation of β -sitosterol to β -sitostanol over microporous and mesoporous carbon supported Pd catalysts. *Chemical Engineering Journal*, 154(1-3), 41-51.
- McMurry, J. (2012). Química orgánica (8 ed.). México: Cengage Learning.
- Muñoz-Jáuregui, A.; Alvarado-Ortiz, U. C.; & Encina-Zelada, C. (2011). Fitoesteroles y fitoestanoles: Propiedades saludables. *Horizonte Médico*, 11(2), 93-100.

- Ododo, M. M.; Choudhury, M. K.; & Dekebo, A. H. (2016). Structure elucidation of β -sitosterol with antibacterial activity from the root bark of *Malva parviflora*. *Springer Plus*, 5(1), 1210.
- Pàmies, Oscar & Bäckvall, Jan-E. (2001). Studies on the mechanism of metal-catalyzed hydrogen transfer from alcohols to ketones. *Chemistry: A European Journal*, 7(24), 5052-5058.
- Pavan, F. R.; Maia, P.; Leite, Sergio R. A.; Deflon, V. M.; Batista, A. A.; Sato, D. N.; Franzblau, S. G.; & Leite, C. (2010). Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti – *Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(5), 1898-1905.
- Perentena, L.; Gonzalez, C.; Celis, B.; Valbuena, A.; & Colina, M. (2015). Síntesis de bases de Schiff derivadas del quitosano por reacción con p–dimetilaminobenzaldehído y 4–hidroxi –3– metoxibenzaldehído. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 16(1), 1,27.
- Romero-Palacio, J., & Vásquez-Trespacios, E. (2012). Fitoestanoles: eficaces para la disminución de lípidos plasmáticos. *Revista CES Salud Pública*, 3(2), 165-173.
- Rzedowski, J., & Rzedowski, G. C. (2005). Flora fanerogámica del Valle de México (2 ed.). Pátzcuaro, Michoacán, México: Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Sirajuddin, M.; Uddin, N.; Ali, S.; & Tahir, M. N. (2013). Potential bioactive Schiff base compounds: synthesis, characterization, X-ray structures, biological screenings and interaction with Salmon sperm DNA. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 116, 11-121.
- Tulcán-Mejía, E. M.; Galindo, J. F.; & Pérez Figueredo, C. R. (2021). Síntesis de una base de Schiff a partir de dopamina y cinamaldehído. *Ciencia en desarrollo*, 12(2), 119-128.

- Villaseñor, J. L. (2018). Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en México. *Botanical Sciences*, 96(2), 332-358.
- Wade, L. (2011). Química Orgánica (7 ed., Vol. 1). México: Pearson Educación.
- Wärnå, J.; Geant, M. F.; Salmi, T.; Hamunen, A.; Orte, J.; Hartonen, R.; & Murzin, D. Y. (2006). Modeling and scale-up of sitosterol hydrogenation process: from laboratory slurry reactor to plant scale. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(21), 7067-7076.