



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS
Maestría en Ciencias Químicas**

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

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Presenta:

Q.F.B. Luis Daniel Herrera Sanabria

Directores:

D.Q. Gabriela Rodríguez García

D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado

Morelia, Michoacán, diciembre 2021



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales y Química de Coordinación del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección de la D.Q. Gabriela Rodríguez García y el D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado, con la beca de maestría 749207 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros.

Pero... ¡Qué importa!

*Hay que perseverar y, sobre todo, tener
confianza en uno mismo.”*

Marie Curie.

Los resultados de esta investigación, así como colaboraciones dentro de nuestro grupo de trabajo permitieron la participación en los siguientes congresos, coloquios y foros:

1. Determinación del quimiotipo del aceite esencial de *Trixis michuacana* var. *longifolia*. **Luis Daniel Herrera Sanabria**, Irving Raúl Vázquez Cacho, Andrea Guadalupe Cárdenas González, Rosa E. Norma del Río, Mario Armando Gómez Hurtado, Gabriela Rodríguez García, presentado en el marco de las actividades académicas del 16° Congreso Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación y el 10° Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán, celebrado el 20 a 22 de octubre de 2021 en Morelia, Michoacán, México.
2. Obtención de dicetonas α,β -insaturadas a partir de núcleos esteroidales. Jorge Enrique Ortíz Servín, **Luis Daniel Herrera Sanabria**, Rosa E. Norma del Río Torres, Mario Armando Gómez Hurtado, Gabriela Rodríguez García, presentado en el marco de las actividades académicas del 16° Congreso Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación y el 10° Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán, celebrado el 20 a 22 de octubre de 2021 en Morelia, Michoacán, México.
3. Obtención de prednisona a partir de una forma farmacéutica comercial. Brenda Lizeth Baez Contreras, **Luis Daniel Herrera Sanabria**, Rosa E. Norma del Río Torres, Gabriela Rodríguez García, Mario Armando Gómez Hurtado, presentado en el marco de las actividades académicas del 16° Congreso Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación y el 10° Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán, celebrado el 20 a 22 de octubre de 2021 en Morelia, Michoacán, México.
4. Obtención de ácido oleanólico de *Salvia plurispicata*. Irving Raúl Vázquez Cacho, Goretti Patzimba García Farías, Eva E. Soto Guzmán, **Luis Daniel Herrera Sanabria**, Gabriela Rodríguez García, Yliana López Castro, Brenda Y. Bedolla García, Mario Armando Gómez Hurtado, Rosa E. Norma del Río, presentado en el marco las actividades académicas del 16° Congreso Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación y el 10° Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán, celebrado el 20 a 22 de octubre de 2021 en Morelia, Michoacán, México.
5. Obtención de tiosemicarbazona de estigmastano a partir de esteroides aislados de *Trixis michuacana* var. *longifolia*. **Luis Daniel Herrera Sanabria**, Andrea Guadalupe

Cárdenas González, Jorge Enrique Ortíz Servín, Brenda Lizeth Baez Contreras, Rosa E. Norma del Río, Mario Armando Gómez Hurtado, Gabriela Rodríguez García, presentado en el V Foro del Posgrado en Ciencias Químicas y 45 aniversario del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, celebrado del 26 al 30 de julio de 2021 en Morelia, Michoacán, México.

6. Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios mayoritarios de *Trixis michuacana* var. *longifolia*. **Luis Daniel Herrera Sanabria**, Ángel Perea Frausto, Ana Karen Villagómez Guzmán, Rosa E. Norma del Río, Mario Armando Gómez Hurtado, Gabriela Rodríguez García, presentado en el IV Foro del Posgrado en Ciencias Químicas del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, celebrado del 18 al 22 de enero de 2021 en Morelia, Michoacán, México.
7. Estudio de los componentes del aceite esencial de especies del género *Trixis*. **Luis Daniel Herrera Sanabria**, Andrea Guadalupe Cárdenas González, Lizbeth Ahtziri Vargas contreras, Rosa E. Norma del Río Torres, Mario Armando Gómez Hurtado, Gabriela Rodríguez García, presentado en las actividades del XV Coloquio Internacional Multidisciplinario 2020 de la Unidad Profesional del Balsas-UMSNH, celebrado del 23 al 26 de noviembre de 2020 en Huetamo de Núñez, Michoacán, México.
8. Identificación de fitosteroles de *Trixis michuacana* var. *longifolia*. **Luis Daniel Herrera Sanabria**, Lizbeth Ahtziri Vargas Contreras, Rosa E. Norma del Río Torres, Mario Armando Gómez Hurtado, Gabriela Rodríguez García, presentado en el marco de las actividades académicas del 15° Congreso Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación y el 9° Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán, celebrado el 30 de octubre de 2020 en Morelia, Michoacán, México.
9. Medicina tradicional *p'urhépecha* enfocada a la química de productos naturales. **Luis Daniel Herrera Sanabria**, Gabriela Rodríguez García, Rosa E. Norma del Río Torres, Mario Armando Gómez Hurtado, presentado en las actividades del XV Coloquio Internacional Multidisciplinario 2020 de la Unidad Profesional del Balsas-UMSNH, celebrado del 2 al 5 de diciembre de 2019 en Huetamo de Núñez, Michoacán, México.
10. Análisis químico preliminar de *Trixis* sp., y su uso etnofarmacológico. **Luis Daniel Herrera Sanabria**, Ana Karen Villagómez Guzmán, Rosa E. Norma del Río Torres, Mario Armando Gómez Hurtado, Gabriela Rodríguez García, presentado en el marco de

las actividades académicas del 14° Congreso Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación y el 8° Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán, celebrado el 30 de octubre de 2019 en Morelia, Michoacán, México.

ÍNDICE

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	I
RESUMEN	III
ABSTRACT	V
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. ANTECEDENTES	9
2.1. Familia Asteraceae	9
2.2. Género <i>Trixis</i>	9
2.2.1. Descripción y clasificación botánica.....	10
2.2.2. Estudios químicos de especies del género <i>Trixis</i>	11
2.3. <i>Trixis michuacana</i> var. <i>longifolia</i> (D. Don) C. E. Anderson.....	16
2.3.1. Descripción botánica.....	16
2.3.2. Usos etnobotánicos.....	17
2.3.3. Estudios químicos	18
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. OBJETIVOS.....	20
4.1. Objetivo general	20
4.2. Objetivos específicos.....	20
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	21
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23

6.1.	Colecta e identificación de la especie vegetal.....	23
6.2.	Estudio químico de <i>Trixis michuacana</i> var. <i>longifolia</i>	23
6.2.1.	Análisis químico del aceite esencial (AEs) de hojas y flores	23
6.2.2.	Obtención de extractos vegetales	30
6.2.3.	Análisis químico de los extractos hexánicos de tallos.....	30
6.2.4.	Análisis químico del extracto de diclorometano de hojas.....	36
6.2.5.	Análisis químico del extracto de diclorometano de tallos.....	44
6.3.	EXPLORACIÓN DE LA REACTIVIDAD QUÍMICA DE LOS METABOLITOS MAYORITARIOS DE <i>TRIXIS MICHUACANA</i> VAR. <i>LONGIFOLIA</i>.	
	48	
6.3.1.	Hidrogenación de la mezcla de sitosterol (23) y estigmasterol (24)	48
6.3.2.	Preparación de la 5 α -sitostan-3-ona (72) a partir de 5 α -sitostan-3-ol (70, 70a)	53
6.3.3.	Obtención de la tiosemicarbazona de estigmastano (76) a partir de la 5 α -sitostan-3-ona (72)	58
7.	CONCLUSIONES	64
8.	PARTE EXPERIMENTAL	67
8.1.	Procedimientos generales	67
8.2.	Material vegetal	67
8.3.	Análisis químico de <i>Trixis michuacana</i> var. <i>longifolia</i>	68
8.3.1.	Análisis químico del AEs de hojas y flores de <i>Trixis michuacana</i> var. <i>longifolia</i>	68
8.3.2.	Obtención de extractos	68
8.3.3.	Estudio químico de los extractos hexánicos de hojas y tallos <i>Trixis michuacana</i> var. <i>longifolia</i>	68
8.3.4.	Estudio químico del extracto de CH ₂ Cl ₂ de hojas de <i>Trixis michuacana</i> var. <i>longifolia</i> ..	69
8.3.5.	Estudio químico extracto de CH ₂ Cl ₂ de tallo de <i>Trixis michuacana</i> var. <i>longifolia</i>	70
8.4.	Estudio de la reactividad química de los metabolitos mayoritarios de <i>Trixis michuacana</i> var. <i>longifolia</i>	71

8.4.1.	Hidrogenación de la mezcla de sitosterol (23) y estigmasterol (24)	71
8.4.2.	Preparación de la 5 α -sitostan-3-ona (72) a partir de 5 α -sitostan-3-ol (70, 70a)	71
8.4.3.	Obtención de la tiosemicarbazona de estigmastano (76) a partir de la 5 α -sitostan-3-ona (72)	72
9.	BIBLIOGRAFÍA	73
10.	ANEXOS	80

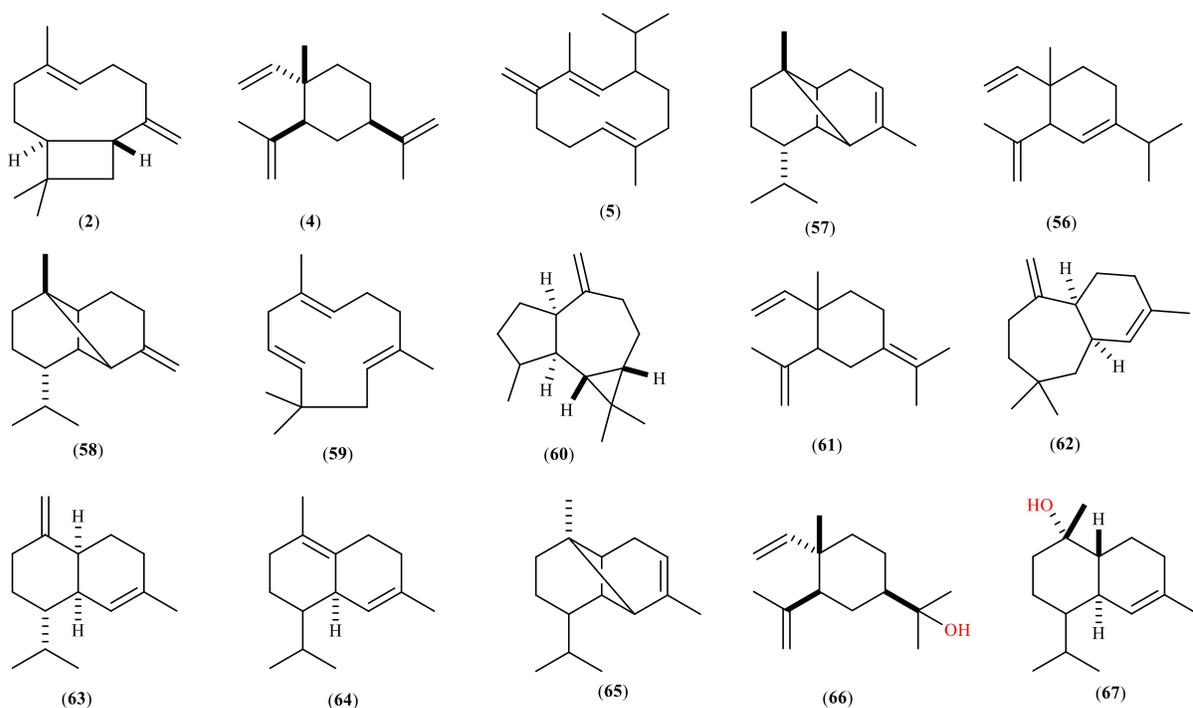
Símbolos, abreviaturas y acrónimos

δ	Desplazamiento químico
°C	Grados Celsius
μm	Micrómetros
μL	Microlitros
AEs	Aceites esenciales
CCF	Cromatografía en capa fina
cm	Centímetro
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa
d	Señal doble
dd	Señal doble de dobles
<i>E</i>	<i>Entgegen</i>
EBUM	Herbario de la facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
EI-MS	Espectrometría de masa por impacto electrónico
Eq	Equivalente químico
eV	Electronvoltio
FPP	Farnesil difosfato
g	Gramos
h	Horas
HETCOR	Heteronuclear Correlation (por sus siglas en ingles)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (por sus siglas en ingles)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy (por sus siglas en ingles)
Hz	Hertz
<i>IK</i>	Índice de retención lineal o índice de Kováts
in	Pulgadas
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramo

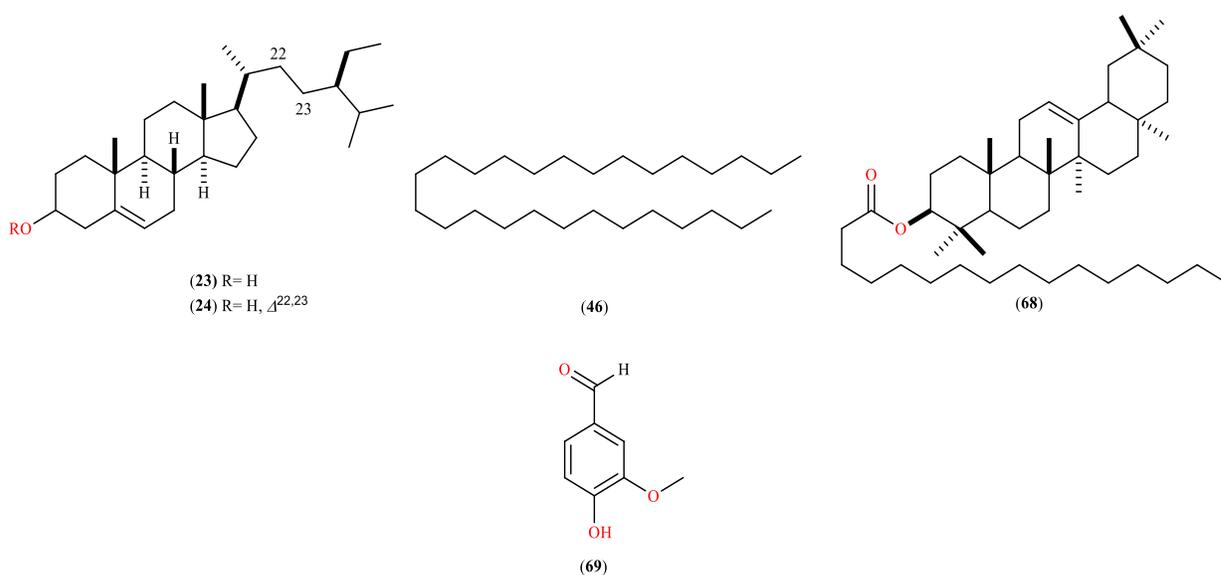
L	Litro
msnm	Metros sobre el nivel del mar
mm	Milímetro
m	Señal múltiple
mg	Miligramo
MHz	MegaHertz
min	Minutos
mL	Mililitro
<i>m/z</i>	Relación masa carga
[M] ⁺	Ion molecular
NIST MS	National Institute of Standards and Technology Mass Spectral Database
NPP	Nerolidil difosfato
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (por sus siglas en ingles)
PCC	Clorocromato de piridinio
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN de ¹ H	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.a.	Temperatura ambiente
t	Señal triple
ta	Señal triple ancha
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
W-M	Reordenamiento Wagner-Meerwein
Z	<i>Zusammen</i>

Resumen

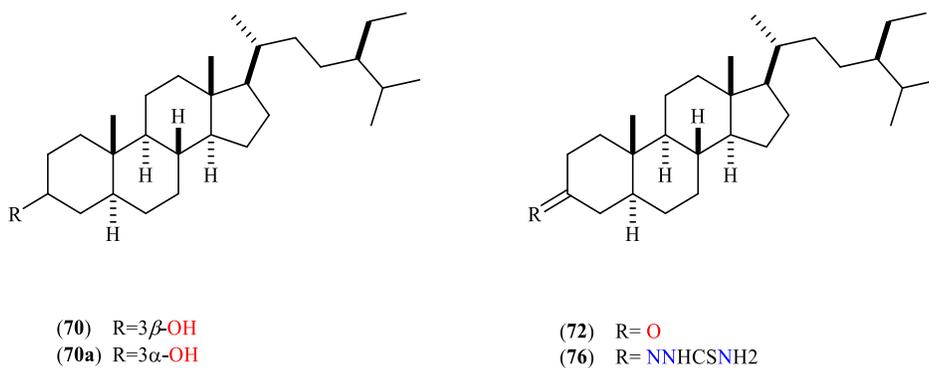
Del estudio químico del aceite esencial (AEs) de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, se logró determinar su naturaleza y composición química; además; permitió establecer los quimiotipos, de los cuales, posee tres: germacreno, muuroleno y cariofileno, siendo principalmente sesquiterpenos. Este análisis representa el primer reporte de los principales componentes del AEs de la especie, lo cual es un aporte relevante a la química del género *Trixis*.



El estudio químico de los extractos apolares y polaridad intermedia de las partes áreas de la especie *Trixis michuacana* var. *longifolia*, permitió el aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios: sitosterol (23), estigmasterol (24), heptacosano (46), palmitato de β -amirina (68) y 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (69); siendo 23 y 24 los metabolitos mayoritarios en el extracto hexánico de tallos. Por su parte 46 y 68, son los componentes mayoritarios del extracto de diclorometano de hojas y el compuesto 69 del extracto de diclorometano de tallos.



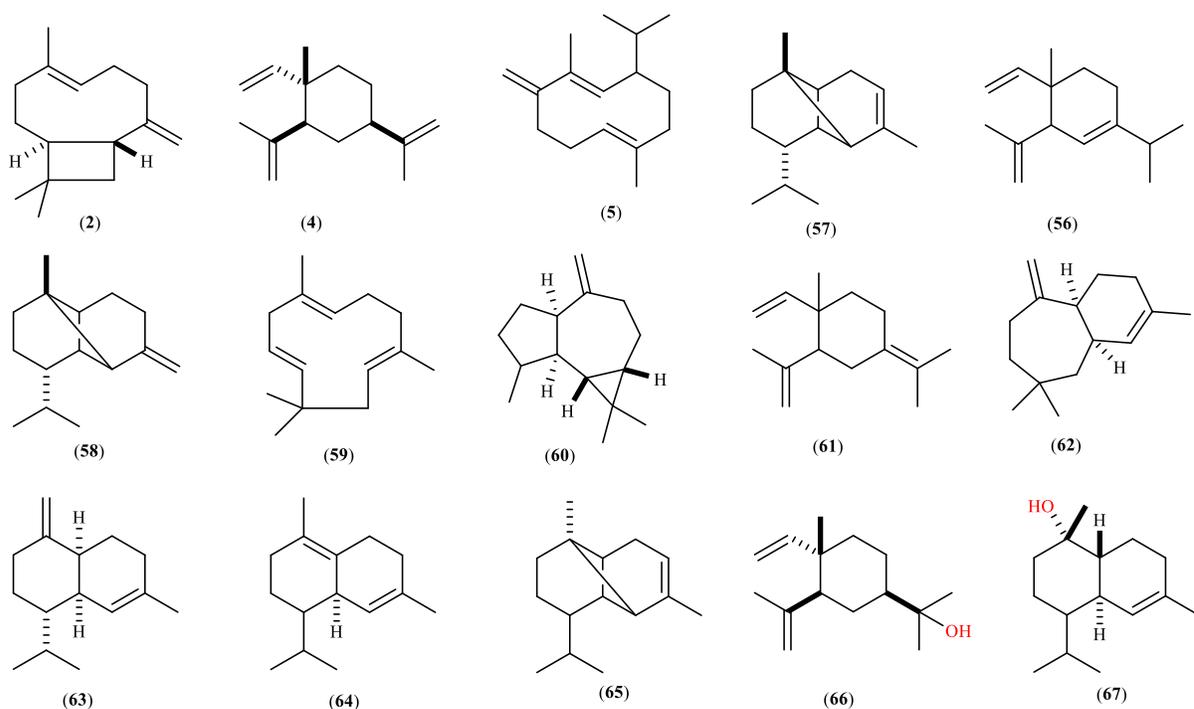
Adicionalmente, se exploró la reactividad química de los fitosteroles **23** y **24** en una serie de reacciones químicas que llevó a la obtención de los isómeros del 5α -sitostan-3-ol (**70,70a**), a la 5α -sitostan-3-ona (**72**) y finalmente a la tiosemicarbazona de estigmastano (**76**), siendo esta última una estructura novedosa.



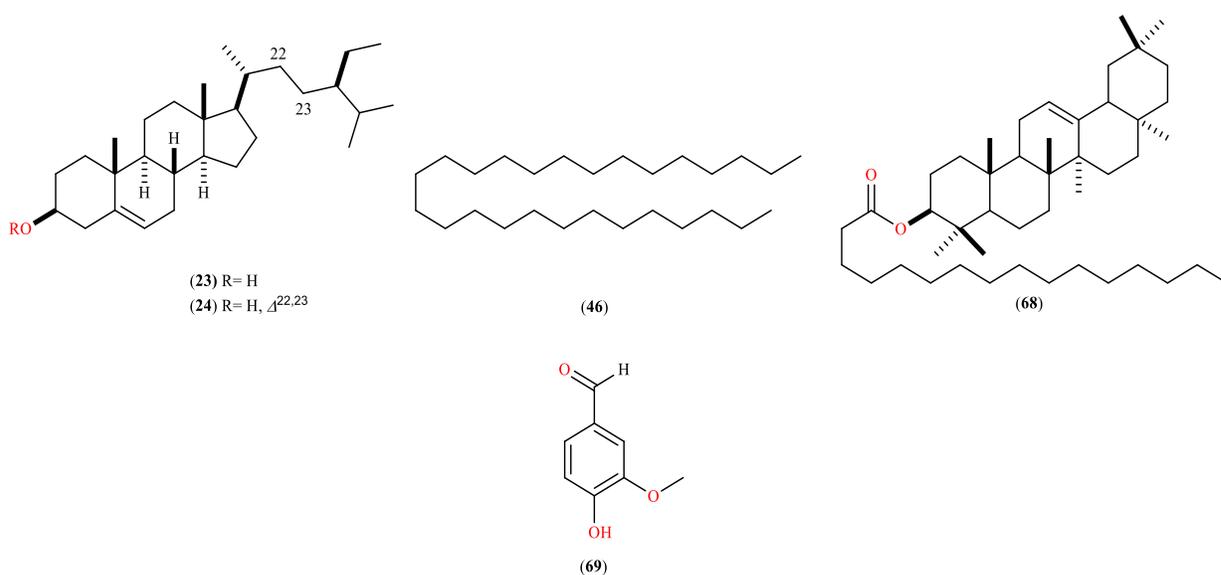
Palabras clave: *Trixis michuacana* var. *longifolia*, aceites esenciales (AEs), estudio químico, fitosteroles, terpenos.

Abstract

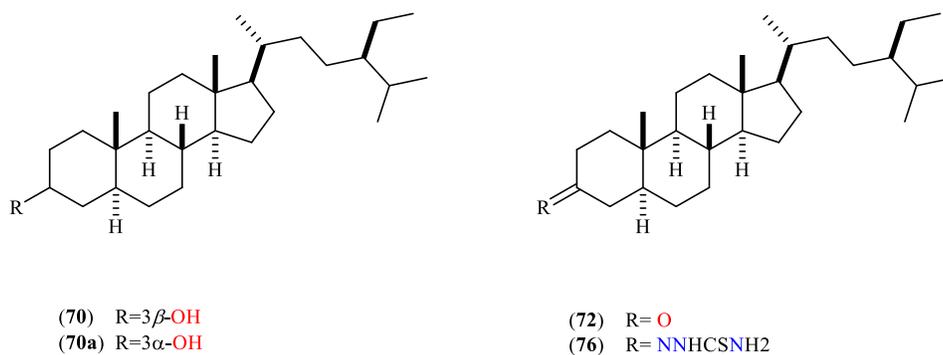
From the chemical study of essential oil (EO) of *Trixis michuacana* var. *longifolia*, its nature and chemical composition were determined; what's more; allowed to establish the chemotypes, of which it has three: germacrene, muurolene and caryophyllene, being mainly sesquiterpenes. This analysis represents the first report of the main components of the EO of the species, which is a relevant contribution to the chemistry of the genus *Trixis*.



The chemical study of the apolar extracts and intermediate polarity of the aerial parts of the species *Trixis michuacana* var. *longifolia*, allowed the isolation and characterization of the secondary metabolites: sitosterol (**23**), stigmasterol (**24**), heptacosane (**46**), β -amyryn palmitate (**68**) and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (**69**); being **23** and **24** the major metabolites in the hexane extract of stems. On the other hand, **46** and **68** are the main components of the dichloromethane extract of leaves and compound **69** of the dichloromethane extract of stems.



Additionally, the chemical reactivity of phytosterols **23** and **24** was explored in a series of chemical reactions that led to obtaining the isomers of 5α -sitostan-3-ol (**70,70a**), 5α -sitostan-3-one (**72**) and finally to stigmasterane thiosemicarbazone (**76**), the latter being a novel structure.



Keywords: *Trixis michuacana* var. *longifolia*, essential oils (EO), chemical study, phytosterols, terpenes.

1. Introducción

Actualmente, existe un interés creciente por estudiar a las plantas medicinales empleadas en las prácticas médicas de los principales grupos étnicos de nuestro país, 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 a través del tiempo. Las estrategias para elegir qué plantas investigar en la búsqueda para nuevos productos con propiedades químicas y/o biológicas 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).

La etnomedicina refiere al estudio de las prácticas médicas tradicionales, se enfoca a la interpretación cultural de la salud, enfermedad, malestares y a los procesos de sanación y cuidado de la salud. Aborda las creencias y prácticas en relación con la salud, valores culturales y sociales, por lo que es un análisis multidisciplinario (Chávez *et al.*, 2017). El estudio de las plantas medicinales utilizadas en las prácticas médicas de los pueblos indígenas de nuestro país es uno de los recursos más importantes de la química de productos naturales y de la industria farmacéutica; generando una nueva relación entre la etnomedicina y la ciencia del descubrimiento de nuevos fármacos.

El análisis fitoquímico tiene como objeto determinar los metabolitos secundarios presentes en las plantas incluyendo especies medicinales, aplicando para ello métodos de extracción, separación, purificación y determinación estructural. Los metabolitos secundarios son los de mayor relevancia para las investigaciones en química de productos naturales, puesto que son la fuente de los compuestos biológicamente activos que satisfacen las necesidades a nuevas opciones terapéuticas (Yadav y Argarwala, 2011).

Como estrategia en la presente investigación de química de productos naturales, se buscó combinar información etnofarmacológica de la flora medicinal con estudios fitoquímicos que permitan validar su uso, lo cual permitiría difundir los conocimientos y prácticas medicinales tradicionales con un carácter científico, así como sentar las bases científicas para su uso de manera racional.

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 de la especie vegetal *Trixis michuacana* var. *longifolia* (D. Don) C.E. Anderson, la cual es usada en forma de decocción de las partes aéreas para tratar la infertilidad ocasionada por la “frialdad del vientre” de acuerdo con las prescripciones de personas que han adquirido estos conocimientos de manera oral y a través de generaciones, como ha ocurrido con Ilda Gonzales Buenaventura, originaria de la comunidad indígena de La Palma, Municipio de Los Reyes, Michoacán, México.

Las investigaciones químicas llevadas a cabo a especies del género *Trixis* han descrito compuestos de importante interés químico y biológico. *Trixis michuacana* var. *longifolia*, cuenta con un estudio químico preliminar del extracto hexánico de hojas donde se encontraron compuestos de importante interés químico (Herrera, 2019), por lo cual resultó interesante ampliar el conocimiento de fitoquímico de esta especie y del género.

En el presente trabajo se describe el estudio químico de los extractos apolares y de polaridad intermedia de hojas y tallos de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, con el propósito de aislar y caracterizar sus componentes mayoritarios. Así mismo, se realizó el análisis químico del aceite esencial (AEs) de las hojas y flores de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, logrando identificar a sus componentes mayoritarios, siendo el primer reporte de la naturaleza química de los componentes volátiles del género *Trixis*.

Derivado del estudio químico de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, se describen una serie de reacciones químicas a partir de los metabolitos mayoritarios del extracto hexánico de tallos, permitiendo explorar la reactividad química en reacciones de hidrogenación, oxidación y formación de bases de Schiff, con la finalidad de obtener derivados con una potencial respuesta bioactiva y otras aplicaciones químicas.

2. Antecedentes

2.1.Familia Asteraceae

La familia Asteraceae agrupa entre 23,000-30,000 especies y 1,500 géneros, y está ampliamente distribuida por el mundo. Las asteráceas se encuentran organizadas en tres subfamilias y 17 tribus, basándose en análisis cladísticos de datos morfológicos; se distinguen por su estructura reproductiva, el capítulo donde las flores se disponen en forma de sécil sobre un receptáculo ensanchado (Katinas *et al.*, 2007; Ubierno *et al.*, 2009).

En México se albergan poco más del 10% de la familia Asteraceae, con alrededor de 3,057 especies nativas, representando el 63% de la riqueza florística de nuestro país. El territorio nacional es importante centro de diversificación y endemismo para la familia de compuestas con 417 géneros y 3,113 especies; además siguen describiéndose nuevas especies de asteráceas (Vargas *et al.*, 2013; Redonda, 2018; Cilia *et al.*, 2021).

2.2.Género *Trixis*

La tribu Mutisieae incluye cerca de 55 géneros, se compone alrededor de 500 especies a nivel mundial, principalmente en Sudamérica, aunque algunos taxones también se encuentran en Norteamérica, Centroamérica y Asia; dentro de esta tribu donde se encuentra al taxón *Trixis* (Villareal y Estrada, 2014).

El género *Trixis* P. Browne (Asteraceae) comprende 60 especies descritas y de estas, solo 34 especies aceptadas, se distribuye principalmente dentro de la región Neotropical, desde el sur de los Estados Unidos de América hasta regiones centrales de la Argentina y está conformado por especies arbustivas o herbáceas perennes (Figura 2.2.1). De este género solo 16 especies son endémicas de México (Anderson,1972; Xavier y Machado, 2010).

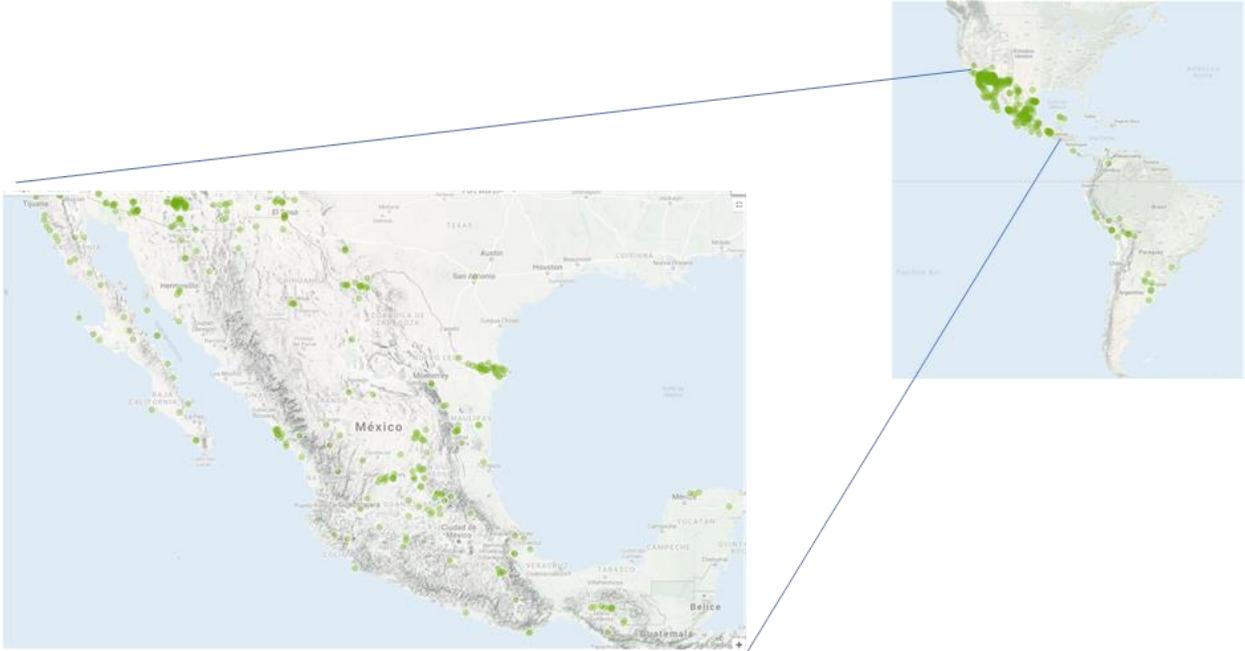


Figura 2.2.1. Distribución geográfica de especies del género *Trixis*.

2.2.1. Descripción y clasificación botánica

El género *Trixis* se compone principalmente de especies arbustivas y herbáceas perennes; hojas alternadas, a menudo enteras, varias veces más largas que anchas; cabezuelas por lo general corimbosas o paniculadas, involucre cilíndrico a campanulado o hemisférico, sus brácteas interiores de largo subigual, las exteriores (o accesorias) en número de 3 a 5, más cortas o a veces más largas y anchas que las anteriores; receptáculo plano, desnudo, pero pubescente; flores todas hermafroditas, las exteriores a menudo más grandes que las interiores, sus corolas amarillas o anaranjadas (blancas con la edad), bilabiadas, el labio exterior tridentado, el interior profundamente bipartido; anteras con las bases caudadas; ramas de estilo lineares, aplanadas y peniciladas en el ápice, aquenios fusiformes, con 5 costillas, vilano de numerosas cerdas (Rzedowski, 2001). El género *Trixis* cuenta con las categorías taxonómicas enlistadas en la Tabla 2.2.1.1.

Tabla 2.2.1.1. Categorías taxonómicas para el género *Trixis*.

Taxonomía del Género <i>Trixis</i>	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Equisetopsida
Subclase:	Magnoliidae
Superorden:	Ateranae
Orden:	Asteranae
Familia:	Asteraceae
Género:	<i>Trixis</i>

2.2.2. Estudios químicos de especies del género *Trixis*

El estudio del género *Trixis* comenzó a finales del siglo pasado, se han estudiado químicamente algunas especies de este género: *T. antimenorrhoea*, *T. inula*, *T. vauthieri*, *T. grisebachii*, *T. praestans*, *T. paradoxa*, *T. angustifolia*, *T. pallida* y *T. wrightii*, los resultados de estas investigaciones han demostrado la presencia de metabolitos de importante interés químico y biológico.

El grupo más diverso de metabolitos secundarios encontrado en la mayoría de las especies del género son los terpenos, siendo los sesquiterpenos y triterpenos los metabolitos mayoritarios. A la fecha se han reportado al γ -curcumeno (**1**), β -cariofileno (**2**), voleneol (**3**), aislados del extracto etanólico de las partes aéreas de *T. antimenorrhoea* y del extracto de éter de petróleo de raíz y partes aéreas de *T. inula* se identificaron al β -elemeno (**4**) y germacreno D (**5**) (Figura 2.2.2.1) (Bohlmann *et al.*, 1979; Maldonado *et al.*, 2014).

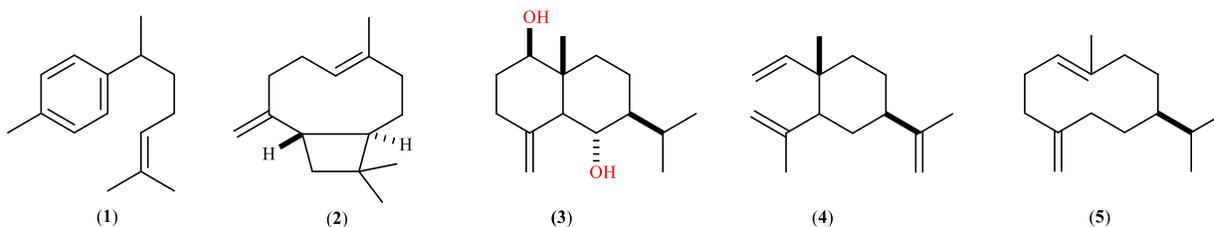


Figura 2.2.2.1. Sesquiterpenos aislados de *T. inula* y *T. antimenorrhoea*.

Del análisis del extracto éter de petróleo de las raíces de *T. vauthieri* se identificaron las lactonas **6** y **7**, el aldehído de cumarina (**8**), al 15-acetoxi-13-metoxirotendeno (**9**), así como su derivado de aldehído (**10**); los derivados del germacreno **11** y **12** y sus epóxidos tetraesterificados (**13-15**), estos últimos se han descrito también en las flores de *T. grisebachii* (Bohlmann *et al.*, 1981; De Riscala *et al.*, 1989) (Figura 2.2.2.2).

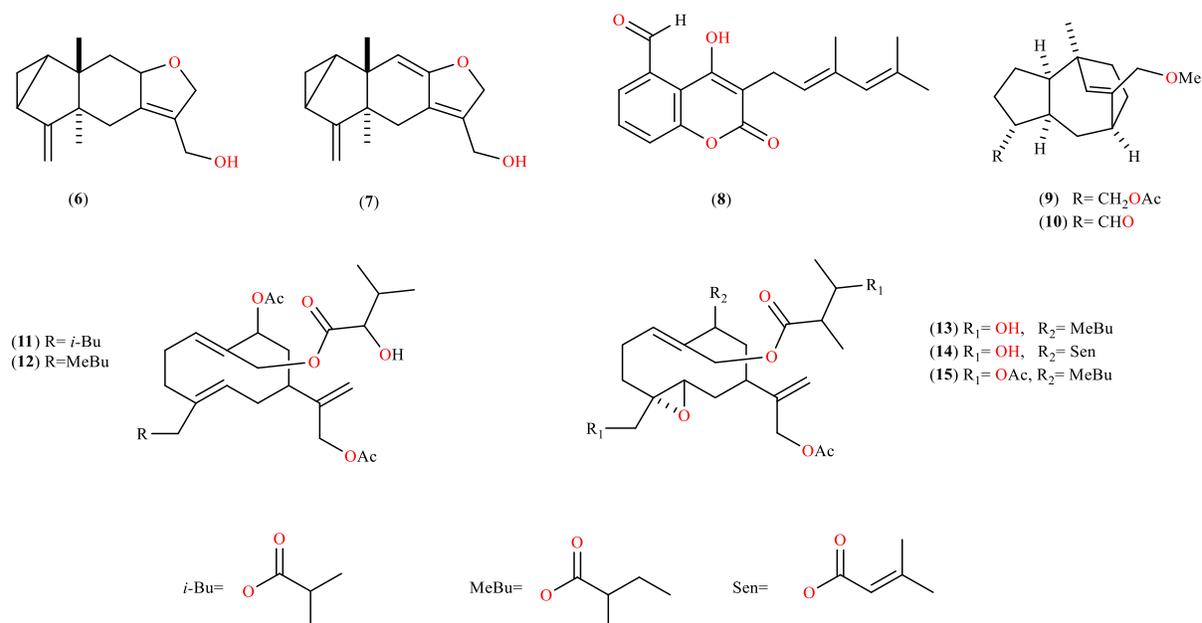


Figura 2.2.2.2. Metabolitos secundarios aislados de *T. vauthieri* y *T. grisebachii*.

De las flores de *T. grisebachii* se reportaron al acetato de lupeol (**16**), β -amirina (**17**), α -amirina (**18**) y germanicol (**19**); mientras que de las hojas y flores de *T. praestans* se obtuvieron a **17**, **19** y lupeol (**20**). De las partes aéreas de *T. antimenorrhoea* se aislaron a **16**, **17** y lupenona (**21**); de *T. paradoxa* aislaron a **16**, **18** y **20**. Otros metabolitos del tipo terpenoide con una presencia significativa en el género son los fitoesteroles, ya que se han aislado de las flores y hojas de *T. praestans* al isofucosterol (**22**), sitosterol (**23**) y estigmasterol (**24**). De las flores de *T. grisebachii* identificaron a **23** y **24**, 3-O-Acetildammarenediol II (**25**) y dipterocarpol (**26**) (Figura 2.2.2.3) (De Riscala *et al.*, 1989; Bermejo, 2000, Granato *et al.*, 2013; Maldonado *et al.*, 2014).

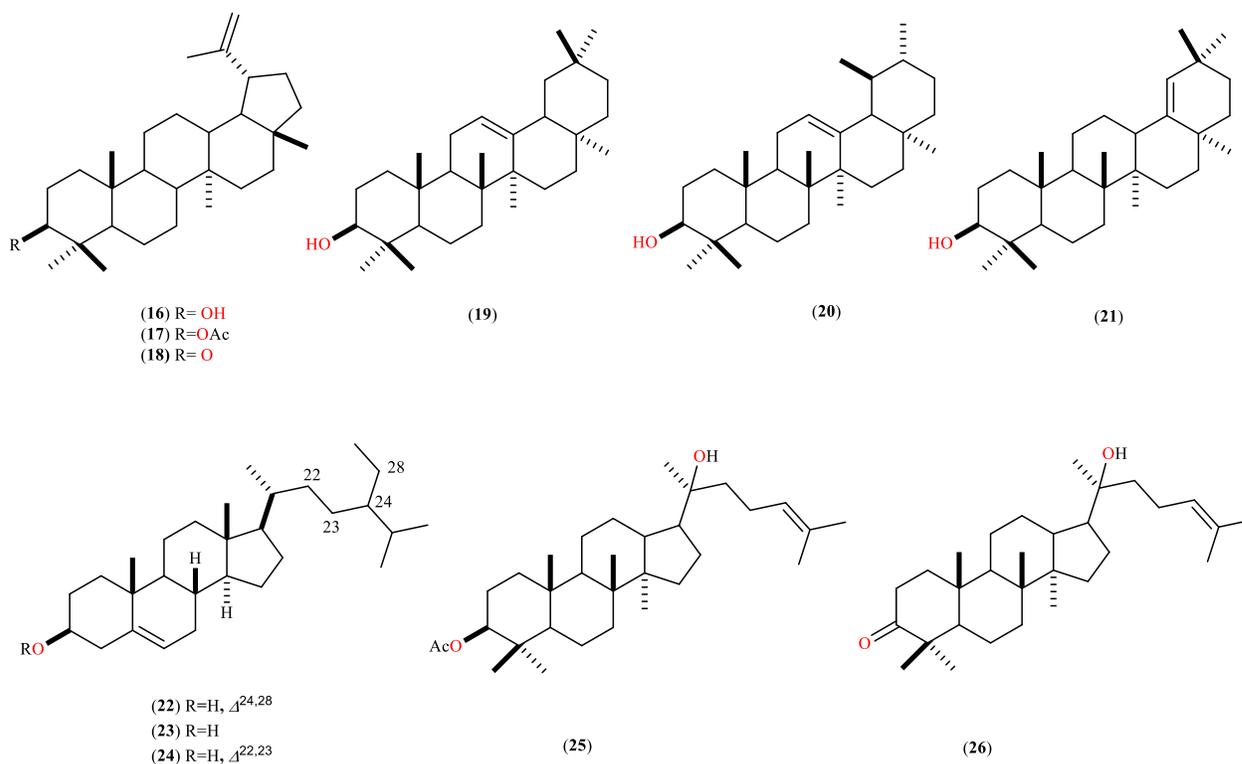


Figura 2.2.2.3. Triterpenos aislados en especies del género *Trixis*.

Los terpenoides de mayor relevancia de las especies del género *Trixis*, son los denominados trixanolidos, aislados por primera vez por Bohlmann y colaboradores en 1979 de las especies: *T. wright* y *T. inula*. Este tipo de compuestos contienen un esqueleto de tipo isocedreno (27), se pueden encontrar principalmente en su forma esterificada en las posiciones C-3, C-9 y C-14. Del extracto AcOEt de las partes aéreas de *T. pallida*, aislaron los trixanolidos 28 y 29, cuya estereoquímica fue establecida mediante el método de Mösher (Katowicz *et al.*, 2001). Del extracto etanólico de las partes aéreas de *T. vauthieri* identificaron una mezcla inseparable de los trixingólidos 30 y 31, siendo potenciales candidatos a fármacos tripanocidas (Sales *et al.*, 2019). De las partes aéreas de *T. grisebachii* se describieron a los trixanolidos 32 y 33 (De Riscala *et al.*, 1989). Del estudio del extracto etanólico de las partes aéreas de *T. antimenorrhoea* reportaron al trixanolido 34 (Granato *et al.*, 2013; Maldonado *et al.*, 2014) (Figura 2.2.2.4).

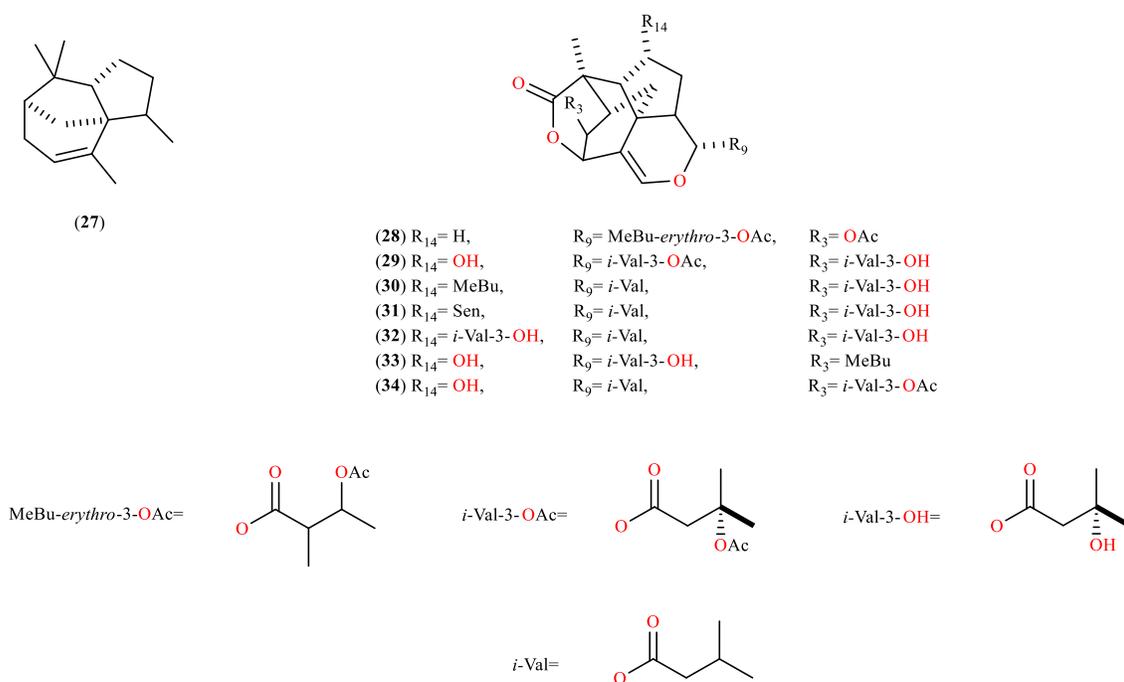
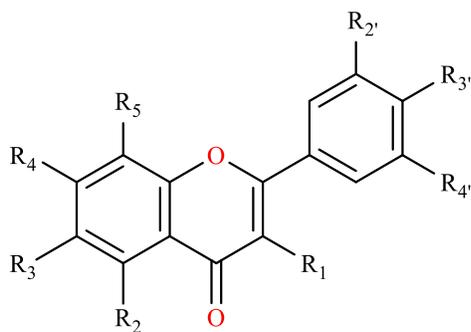


Figura 2.2.2.4. Trixanolidos aislados de especies del género *Trixis*.

Otro de los grupos de productos naturales aislados de este género son los flavonoides, principalmente descritos en los extractos polares de las partes aéreas. Del extracto etanólico de *T. paradoxo* Cass reportaron al xantomicro (35) (Bermejo, 2000). Del extracto hexánico y de acetato de etilo de *T. angustifolia*, aislaron las flavonas 35, pebrellina (36), cirsimaritina (37) (Sánchez *et al.*, 2017). Del estudio del extracto etanólico de *T. antimenorrhoea* se describe el aislamiento de la nevadesina (38), sudaquitina (39) (Maldonado *et al.*, 2014). Del estudio de los extractos polares de *T. vauthieri*, reportaron a las sakuranetina (40) y padmatina (41) (Figura 2.2.2.5) (Bohlmann *et al.*, 1989; Ribeiro *et al.*, 1999; Ribeiro y Pilo, 1997).



- | | | | | | | | | |
|------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| (35) | R ₁ = H, | R ₂ = OH, | R ₃ = OMe, | R ₄ = OMe, | R ₅ = OMe, | R ₂ '= H, | R ₃ '= OH, | R ₄ '= H |
| (36) | R ₁ = H, | R ₂ = OH, | R ₃ = OH, | R ₄ = OMe, | R ₅ = OMe, | R ₂ '= H, | R ₃ '= OMe, | R ₄ '= OMe |
| (37) | R ₁ = H, | R ₂ = OH, | R ₃ = OMe, | R ₄ = OMe, | R ₅ = H, | R ₂ '= H, | R ₃ '= OH, | R ₄ '= H |
| (38) | R ₁ = OH, | R ₂ = OH, | R ₃ = OMe, | R ₄ = OH, | R ₅ = OH, | R ₂ '= H, | R ₃ '= OMe, | R ₄ '= H |
| (39) | R ₁ = H, | R ₂ = OH, | R ₃ = OMe, | R ₄ = OH, | R ₅ = OH, | R ₂ '= OH, | R ₃ '= OH, | R ₄ '= H |
| (40) | R ₁ = H, | R ₂ = H, | R ₃ = H, | R ₄ = OMe, | R ₅ = H, | R ₂ '= H, | R ₃ '= OH, | R ₄ '= H |
| (41) | R ₁ = OH, | R ₂ = H, | R ₃ = H, | R ₄ = OMe, | R ₅ = H, | R ₂ '= H, | R ₃ '= OH, | R ₄ '= OH |

Figura 2.2.2.5. Flavonoides aislados de especies del género *Trixis*.

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

La especie *Trixis michuacana* var. *longifolia* (Asteraceae) es endémica de México, se encuentra distribuida en el centro-occidente del Estado de Michoacán y estados colindantes. Crece en matorrales xerófilos, bosques de encino, pastizales y áreas adyacentes. Es una planta arbustiva perenne, florece de noviembre a enero, es una planta por lo general común y sin problemas de extinción (Rzedowski, 2001).

2.3.1. 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 peciolos 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 tirsos o corimbos, sus ejes densamente glanduloso-pubescente, pedúnculos hasta de 2 cm de largo; involucreo 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 \pm 140 cerdas de color café claro, de 9.5 a 14 mm de largo (Figura 2.3.1.1) (Rzedowski *et al.*, 2001).



Figura 2.3.1.1. *Trixis michuacana* var. *longifolia* (D. Don) C.E. Anderson.

2.3.2. Usos etnobotánicos

Las plantas medicinales han sido aprovechadas a través de los años por los pueblos originarios de nuestro país. *Trixis michuacana* var. *longifolia* es conocida como *Tepári* dentro de la medicina *p'urhépecha*; sus partes aéreas son usadas en forma de decocción junto con una pequeña cantidad de chocolate y piloncillo para tratar la “frialdad del vientre” que puede ocasionar infertilidad, así como otros malestares relacionados con la naturaleza reproductiva de las mujeres (Herrera, 2019). En la medicina tradicional es comúnmente llamada árnica de cerro, árnica falsa, se le atribuyen la buena digestión, cicatrización de heridas, llagas y úlceras (Gamboa, 1999).

2.3.3. Estudios químicos

El estudio químico del extracto metanólico de flores de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, aislaron a la quercetina (**42**) como su metabolito mayoritario; además identificaron al *p*-cumarato de metilo (**43**) (Lim *et al.*, 1999). Adicionalmente, cuenta con un estudio químico preliminar del extracto hexánico de hojas por nuestro grupo de trabajo, donde se describe la separación, purificación e identificación de una serie homóloga de *n*-alcanos C₂₅-C₃₁ (**44** - **50**), al octadecanoato de octadecilo (**51**) esta la primera vez que se describen este tipo de metabolitos para el género *Trixis*; a los estearatos de α y β -amirina (**52**, **53**), al acetato de β -amirina (**54**) y al palmitato de lupeilo (**55**) (Figura 2.3.3.1). Donde los metabolitos secundarios mayoritarios en el extracto hexánico **51** y **52** (Herrera, 2019).

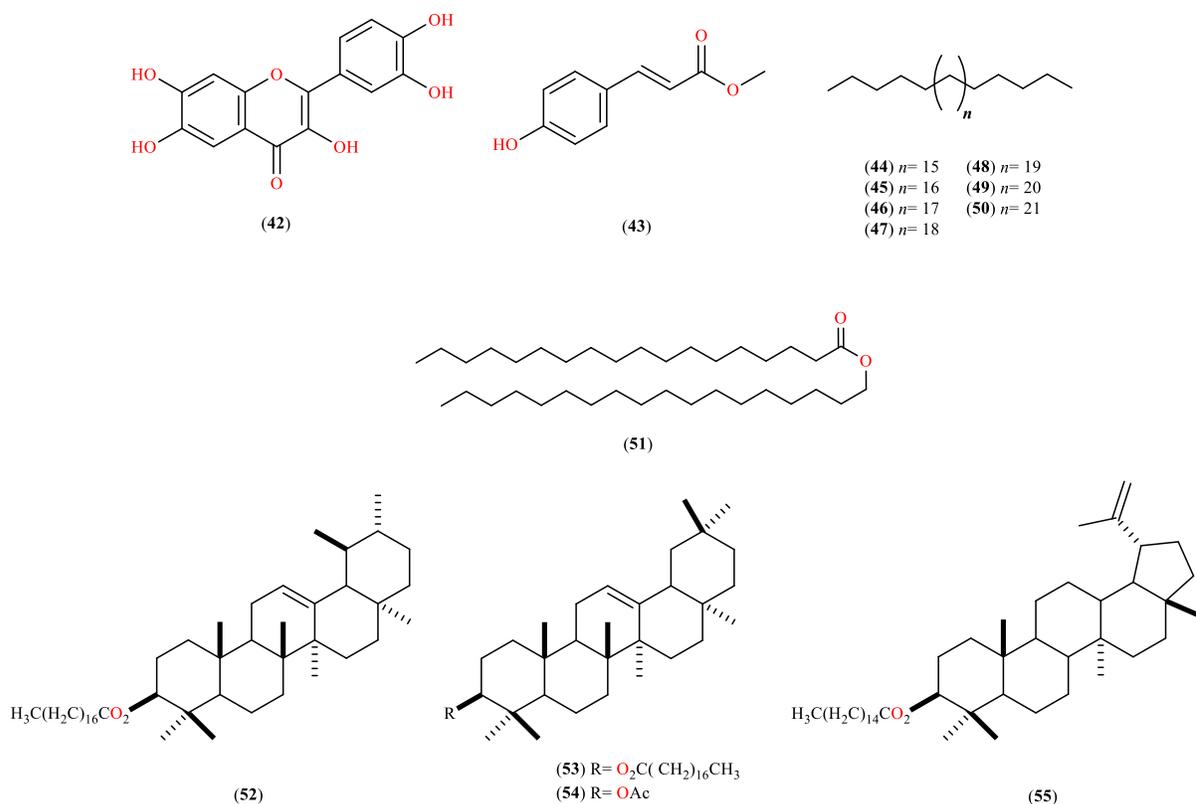


Figura 2.3.3.1. Metabolitos secundarios aislados de hojas y flores de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

3. Justificación

El género *Trixis* ha sido explorado químicamente desde 1979, que comprenden el estudio de nueve especies de las 60 conocidas. Los resultados de las investigaciones químicas de algunas especies demostraron la presencia de compuestos de importante interés químico y biológico, algunos de ellos poseen actividades como tripanocidas, antiinflamatorias, anti-ulcerogénica, antimicrobiana e hipoglucémicas.

Trixis michuacana var. *longifolia* es una especie endémica de México, empleada en la medicina *p'urhépecha* para tratar la infertilidad de las mujeres ocasionada por la “frialdad del vientre”. Esta especie no cuenta con estudio biológico y solo con estudios químicos preliminares de hojas y flores, por lo cual resulta pertinente ampliar el estudio químico lo que permitirá contribuir a la quimiotaxonomía de esta especie y del género. Adicionalmente permitirá explorar la reactividad química de algunos de sus metabolitos secundarios mayoritarios con potenciales aplicaciones químicas y/o bilógicas. .

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Llevar a cabo el estudio químico de las partes aéreas de *Trixis michuacana* var. *longifolia* para el aislamiento, identificación y caracterización de sus metabolitos mayoritarios; así como explorar la reactividad química de los metabolitos, para la obtención de derivados de interés químico y biológico

4.2. Objetivos específicos

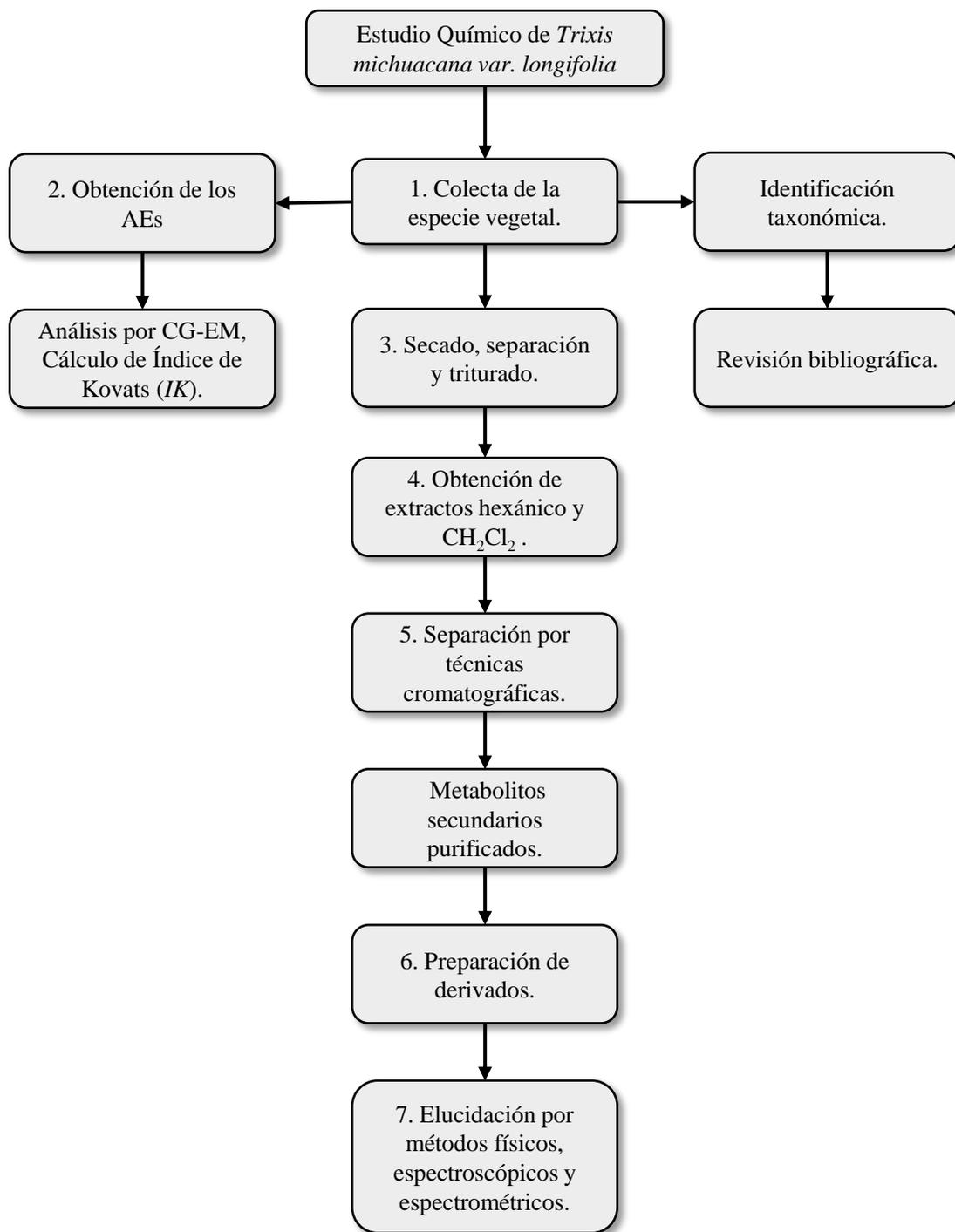
- Colectar la especie vegetal.
- Determinar la composición química de los Aceites Esenciales (AEs).
- Obtener los extractos a diferente polaridad de las partes aéreas de la planta.
- Aislar y purificar mediante técnicas cromatográficas los metabolitos mayoritarios presentes en dichos extractos.
- Evaluar la reactividad química de los metabolitos mayoritarios.
- Caracterizar los compuestos por métodos espectroscópicos y espectrométricos.

5. Metodología Experimental

Para el estudio químico de *Trixis michuacana* var. *longifolia* se desarrolló de la siguiente manera:

1. Colecta de la especie vegetal.
2. Obtención de los AEs de las hojas y flores frescas.
3. Secado de la planta a la sombra, separación y triturado de las hojas y tallos.
4. Obtención de los extractos por maceración a temperatura ambiente empleando disolventes de polaridad ascendente.
5. Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios mayoritarios mediante técnicas cromatográficas: cromatografía en columna y cromatografía en capa fina (CCF).
6. Preparación de derivados a partir de los componentes mayoritarios.
7. Elucidación estructural mediante punto de fusión, espectroscopia de 1D (^1H y ^{13}C) y 2D (HETCOR o HSQC, NOESY, HMBC), infrarrojo, espectrometría de masa.

La metodología experimental se resume en el Esquema 5.1.



Esquema 5.1. Metodología experimental llevada a cabo para el estudio químico de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

6. Resultados y discusión

6.1. Colecta e identificación de la especie vegetal

La especie vegetal *Trixis michuacana* var. *longifolia* (D. Don) C. E. Anderson, fue colectada en la carretera Peribán-Los Reyes, Michoacán, México (19°55'63.9'' N, - 103°39'86.1'' O) a 1640 msnm; en el mes de noviembre; se trabajó con lotes del 2016 y 2017.

Un ejemplar botánico fue preparado y llevado al Herbario de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (EBUM), donde establecieron la determinación y clasificación taxonómica como: *Trixis michuacana* var. *longifolia* (D. Don) C.E. Anderson por las profesoras Rosa Isabel Fuentes Chávez y Norma Patricia Reyes Martínez del Herbario de la Facultad de Biología de Universidad Michoacana (EBUM).

6.2. Estudio químico de *Trixis michuacana* var. *longifolia*

El estudio químico de esta especie consistió en primera instancia en el análisis de la composición y naturaleza química de los componentes volátiles; posteriormente, se continuó con el estudio de los componentes no volátiles, los cuales se obtuvieron de los extractos vegetales obtenidos a diferente polaridad.

6.2.1. Análisis químico del aceite esencial (AEs) de hojas y flores

Los AEs son mezclas compuestas de entre 20-60 compuestos, de composición variable y abundancia (en ocasiones desde trazas hasta altas concentraciones), principalmente compuestos por metabolitos del tipo terpeno y grupos fenólicos. La evaluación de la composición de los AEs de una especie vegetal es crucial en la determinación de aquellos compuestos con actividades biológicas (Marrero *et al.*, 2017). El género *Trixis* no cuenta con estudios previos de la composición química de sus AEs, por lo cual se llevó a cabo la obtención de los componentes volátiles de las hojas y flores de la especie vegetal *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

Del arrastre de vapor de las partes aéreas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, se consiguió un rendimiento de 0.03 % de aceite de color ámbar (45.5 mg); el cual fue analizado por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa (CG-EM). El cromatograma de gases mostró picos con tiempos de retención (Rt) que van desde 3.64-38.56 min. La zona más abundante del cromatograma corresponde a los Rt de 9.01-12.10 min, donde se distinguen 15 Rt de mayor abundancia (Figura 6.2.1.1).

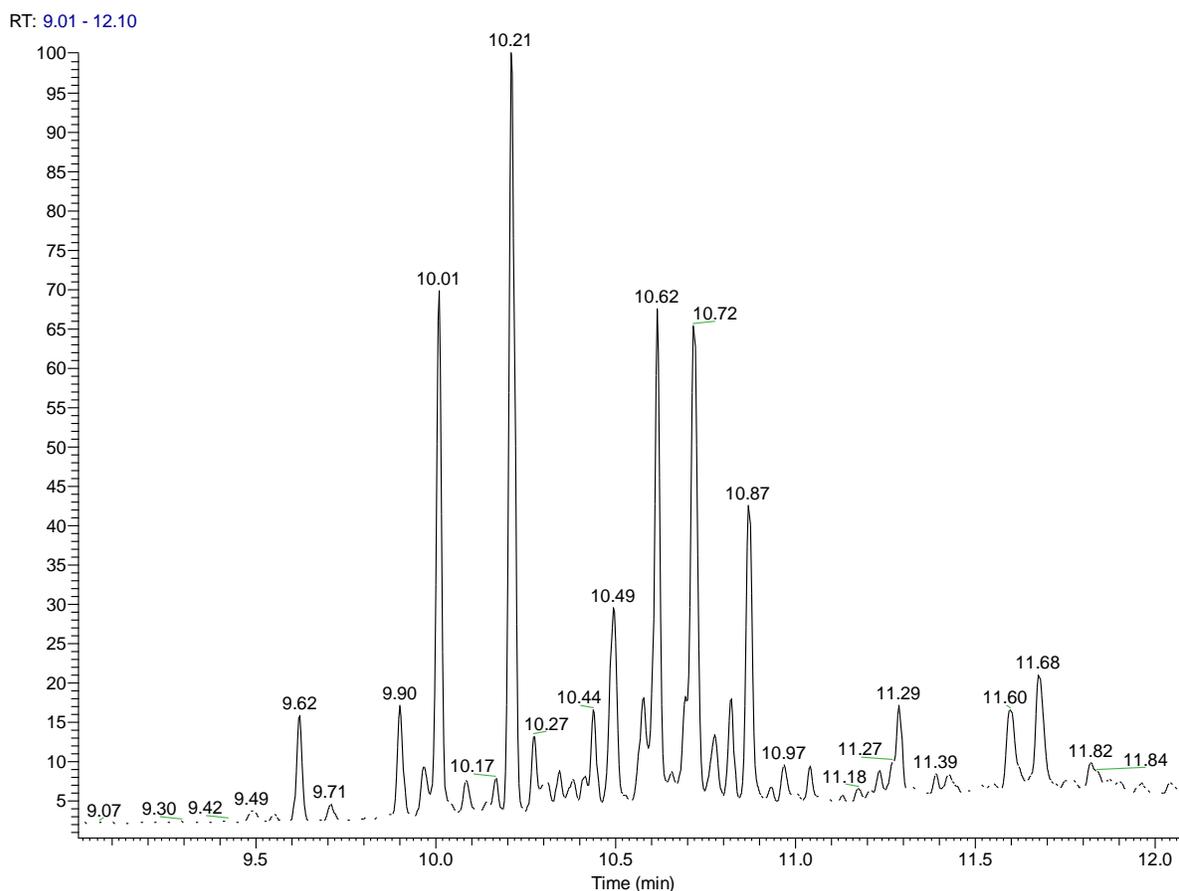


Figura 6.2.1.1. Cromatograma de gases del AEs de las hojas y flores de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

La comparación con las bases de datos es un recurso importante en la identificación de los constituyentes de un AEs; sin embargo, estas no son eficientes debido la variabilidad de los procesos en los que son procesados y analizados. El índice de retención lineal o índice de Kováts (*IK*) es una cantidad adimensional que se caracteriza por la velocidad de elución del analito (*Rt*), respecto a los *n*-alcanos más cercanos que eluyen inmediatamente antes y después del analito. En química analítica es un parámetro importante debido a su utilidad para reducir el número de posibilidades generadas en la identificación de compuestos de una mezcla compleja, arrojados por las bibliotecas de datos (Babushok *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2021).

Cada *Rt* fue comparado con la base de datos del National Institute of Standards and Technology Mass Spectral Database (NIST 2.0 2011) lo que llevó a la identificación de los 16 principales componentes del AEs, siendo sesquiterpenos los compuestos predominantes (Figura 6.2.1.2); por lo tanto, se requiere calcular el *IK*, el cual permite correlacionar el *Rt* de los analitos, respecto a los *Rt* de un patrón de referencia, en este caso se hizo la comparación con una serie homóloga de *n*-alcanos (C₆-C₂₀). Los *IK* se calcularon con base en la siguiente expresión:

$$IK = 100 \left[n + (N - n) \frac{\log Rt (analito) - \log Rt(n)}{\log Rt(N) - \log Rt(n)} \right]$$

Donde:

n: Número de átomos de carbono del alcano más pequeño.

N: Número de átomos de carbono del alcano más grande.

Rt (*n*): Tiempo de retención de alcano más pequeño.

Rt (*N*): Tiempo de retención del alcano más grande.

Rt (*analito*): Tiempo de retención del analito.

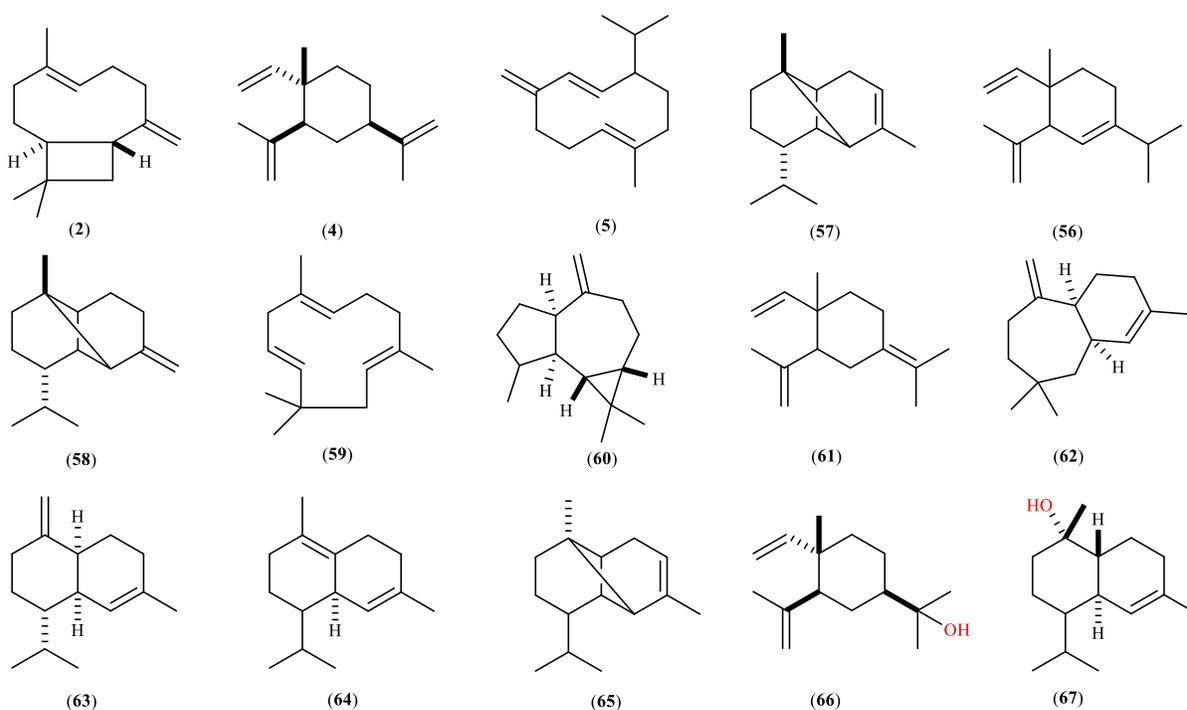


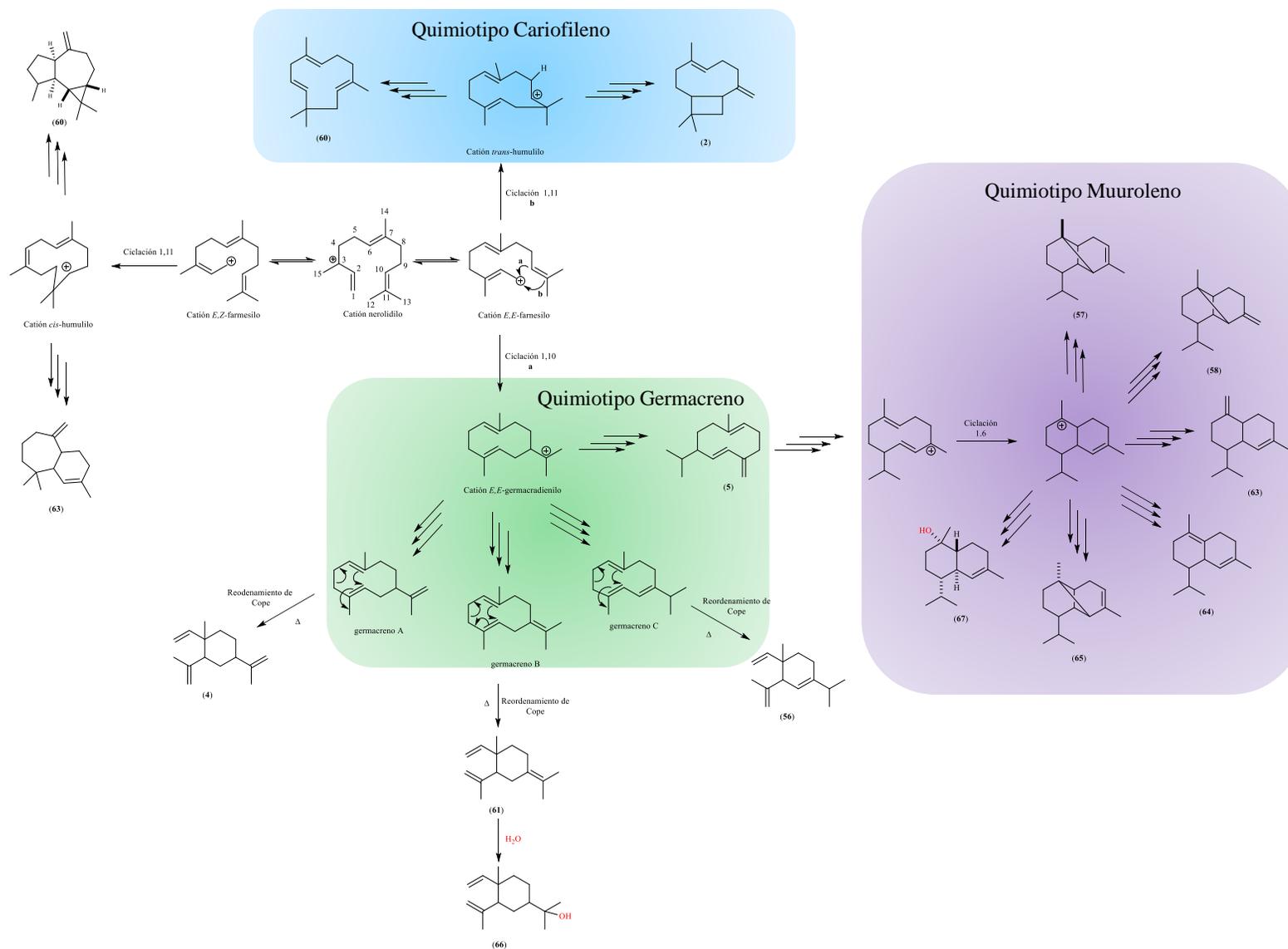
Figura 6.2.1.2. Componentes principales del AEs de las hojas y flores frescas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

Una vez calculados los *IK* estos se compararon con lo descrito por Babushok *et al.*, en 2011, permitiendo confirmar los resultados obtenidos en la base de datos NIST 2.0 2011, estos datos se describen en la Tabla 6.2.1.1. Las variaciones en la composición química de los AEs de las plantas de un mismo género o especie pueden ser ocasionadas por factores ambientales o método de extracción. Siendo estas las principales razones por las que se ha conducido a designar quimiotipos, los cuales se determinan con base a sus componentes mayoritarios (Ruíz *et al.*, 2007).

Tabla 6.2.1.1. Principales componentes del AEs de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

Rt	IK experimental	Rango IK Reportado (Babushok et al., 2011)	Compuesto	Composición (%)
9.62	1311	1322-1381	δ -elemeno (56)	1.21
9.90	1364	1360-1392	α -copaeno (57)	9.91
10.01	1386	1372-1403	β -elemeno (4)	10.02
10.21	1425	1384-1430	β -cariofileno (2)	8.97
10.27	1437	1408-1446	β -copaeno (58)	1.27
10.45	1432	1430-1436	α -humuleno (59)	1.28
10.50	1423	1413-1463	Aromandendreno (60)	2.66
10.62	1460	1458-1491	Germacreno D (5)	7.40
10.73	1456	1418-1499	γ -elemeno (61)	6.89
10.78	1463	1438-1451	α -Himachaleno (62)	0.90
10.82	1468	1455-1494	γ -muuroleno (63)	1.04
10.87	1513	1498-1531	δ -cadieno (64)	3.31
10.97	1489	1454-1500	α -ylangeno (65)	0.54
11.04	1497	1518-1555	Elemol (66)	0.47
11.60	1628	1612-1642	Cadinol T (67)	3.19

Para la determinación de los quimiotipos presentes en el AEs de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, se tomó en cuenta el porcentaje de composición el cual fue calculado por integración de los Rt presentes en el cromatograma de gases, siendo cinco los componentes mayoritarios: **4**, **2**, **5**, **57** y **61** representan el 43.2% del área total del cromatograma, al ser compuestos sesquiterpénicos los predominantes, en su biogénesis comparten a los intermediarios catiónicos *E,E*-germacradienilo (ciclación 1,10) y *trans*-humulilo (ciclación 1,11) derivados de las ciclaciones del farnesil difosfato (FPP); así como al catión *cis*-humulilo (ciclación 1,11), siendo este producto de la isomerización del FPP a nerolidilo difosfato (NPP) (Dewick, 2009). Estas rutas biogénicas son las más activas en la especie en estudio, lo cual permitió establecer tres quimiotipos: germacreno, muuroleno y cariofileno a partir de los cuales se sintetizan los principales componentes de la mezcla volátil (Mockute *et al.*, 2003; Reza *et al.*, 2018; Kazemeini *et al.*, 2020) (Esquema 6.2.1.1.).



Esquema 6.2.1.1. Principales vías biosintéticas de los componentes principales del AEs de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

Como se observa en el esquema 6.2.1, el quimiotipo germacreno se instauró a partir de las relaciones biosintéticas del catión *E,E*-germacradienilo, el cual puede generar por desprotonaciones alternas a los germacrenos A y B, de igual manera, puede sufrir un desplazamiento 1,3 de hidruro seguido de una desprotonación generando a los germacrenos C y D. Los germacrenos con sistemas *E,E*-1,5-dienos son térmicamente lábiles, por lo cual pueden sufrir reordenamientos tipo Cope, generando esqueletos derivados del elemeno, consecuentemente, estos no son detectados en condiciones de CG-MS, donde se emplean temperaturas excesivas en los inyectores, lo cual es concordante con el análisis por CG-MS donde se empleó un inyector con 250 °C, detectando al β -elemeno (**4**), al δ -elemeno (**56**), γ -elemeno (**61**) y finalmente al elemol (**66**) (Pazouki *et al.*, 2015; Quintana *et al.*, 2003; Rinkel y Dickschat, 2019; Setzer, 2008).

La determinación del quimiotipo muuroleno se apoyó en la biogénesis del germacreno D (**5**), el cual tras sufrir una protonación en C15 promueve la ciclación de 1,6 generando el catión cadinilo, el cual sufre desprotonaciones alternas generando al δ -cadieno (**64**), γ -muuroleno (**63**); la adición de una molécula de agua genera al cadinol T (**67**). Su posterior ciclación en 2,7 a partir de las caras *si* o *re* de C2 genera al α -ylangeno (**65**) y α -copaeno (**57**), respetivamente, o bien de su protonación se genera al catión copaenilo, el cual por pérdida de un protón se obtiene al β -copaeno (**58**) (Croteau *et al.*, 2003).

El quimiotipo cariofileno se estableció teniendo en cuenta que a partir de la formación del catión *trans*-humulilo, de su desprotonación conduce al α -humuleno (**59**), o bien su ciclación de 2,10 generando al catión cariofilo, tras la pérdida de un protón conduce al β -cariofileno (**2**). Por otro lado, una de las vías presentes en el metabolismo es aquella que implica al catión *cis*-humulilo, después de un reordenamiento WM 1,3-hiduro, seguido de la ciclación 1,6 forma al catión himmachanilo, tras su desprotonación genera al α -himachaleno (**62**) (Dewick, 2009).

Esta es la primera ocasión en la que se reporta la composición química del AE de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, lo cual es un aporte significativo a la quimiotaxonomía de la especie y del género. Además, al conocer las relaciones biogénicas de sus componentes se establecieron sus quimiotipos, lo que permitirá establecer las bases para estudios posteriores a especies del género; así como evaluar sus posibles actividades biológicas.

6.2.2. Obtención de extractos vegetales

Para la obtención de los extractos, inicialmente el material vegetal se dejó secar por 15 días a la sombra a temperatura ambiente, separándola en hojas y tallos. Ambas partes se sometieron individualmente a maceración a temperatura ambiente por tres días, obteniendo los extractos con hexanos y CH₂Cl₂, haciendo esto por triplicado con cada disolvente. Los rendimientos de los extractos se muestran en la Tabla 6.2.2.1. Cada extracto fue analizado por CCF y RMN de ¹H para determinar la abundancia y naturaleza de sus componentes.

Tabla 6.2.2.1. Rendimientos de los extractos obtenidos a partir de las partes aéreas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

Colecta	Parte (kg)	Extractos	Peso (g)	Rendimiento (%)
2016	Hojas (0.62)	Hexánico	40.43	6.5
		CH ₂ Cl ₂	23.11	3.7
	Tallos (1.17)	Hexánico	9.74	0.8
		CH ₂ Cl ₂	4.92	0.4
2017	Hojas (1.22)	Hexánico	130.5	10.6
		CH ₂ Cl ₂	82.53	6.8
	Tallos (2.20)	Hexánico	11.93	0.5
		CH ₂ Cl ₂	19.51	0.88

6.2.3. Análisis químico de los extractos hexánicos de tallos

En el análisis por RMN de ¹H de los extractos de hexánicos de tallos de las colectas 2016 y 2017 se observan señales en la región de los protones vinílicos entre δ 5.65- δ 4.50; se distinguen las señales en δ 4.40- δ 2.10 correspondientes a los protones base de heteroátomos y en la región de los protones alifáticos δ 1.90- δ 0.60 destacan las señales típicas correspondientes a los metilos de compuestos terpénicos. El análisis de los extractos obtenidos de ambas colectas permitió establecer que no hay variación entre la composición química, por lo cual se unieron ambos extractos para su posterior estudio químico (Figura 6.2.3.1).

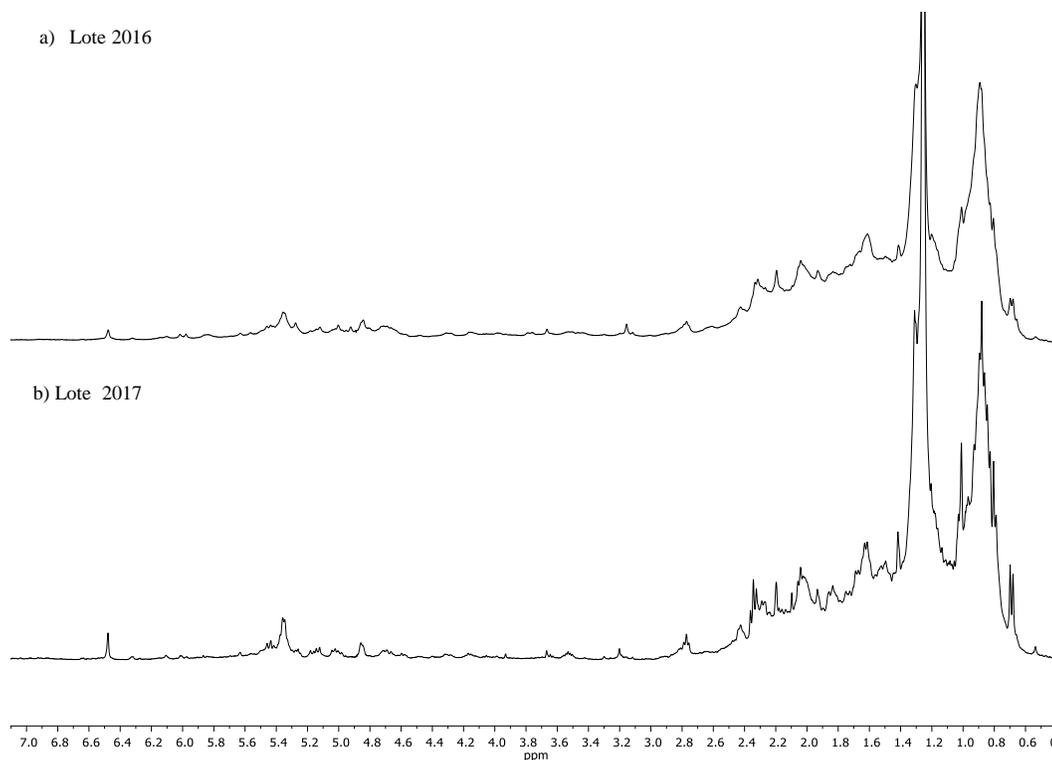


Figura 6.2.3.1. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de los extractos hexánicos de tallos de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

El estudio químico del extracto de tallos se seccionó para la obtención de 15 fracciones enriquecidas, con polaridad ascendente de hexanos:AcOEt. De las fracciones 5 y 6 de hexanos:AcOEt (3:2) del extracto crudo, después de varios procesos cromatográficos se obtuvo un compuesto cristalino de color verde, el cual tras sucesivos lavados con acetona se obtuvieron 170 mg de cristales incoloros con p.f. 136-138 °C.

En su análisis por RMN de ^1H destaca en δ 5.35 una señal doble ($J= 5.2$ Hz) asignada a los protones vinílicos H-6 y H-6', así mismo se aprecia en δ 5.14 y δ 5.01 dos señales dobles de dobles ($J= 15.1, 8.5$ Hz) correspondiente a los protones vinílicos H-22' y H-23', respectivamente; una señal múltiple se observa en δ 3.53 correspondiente a los protones H-3 y H-3' base de hidroxilo; además, se observan en δ 1.01 (s, H-19) y δ 0.68 (s, H-18). El resto de las señales se encuentran entre δ 1.03- δ 0.68 correspondientes al resto de los grupos metilos del esqueleto, este perfil de señales permite establecer que se trata de una mezcla de esteroides (Figura 6.2.3.2).

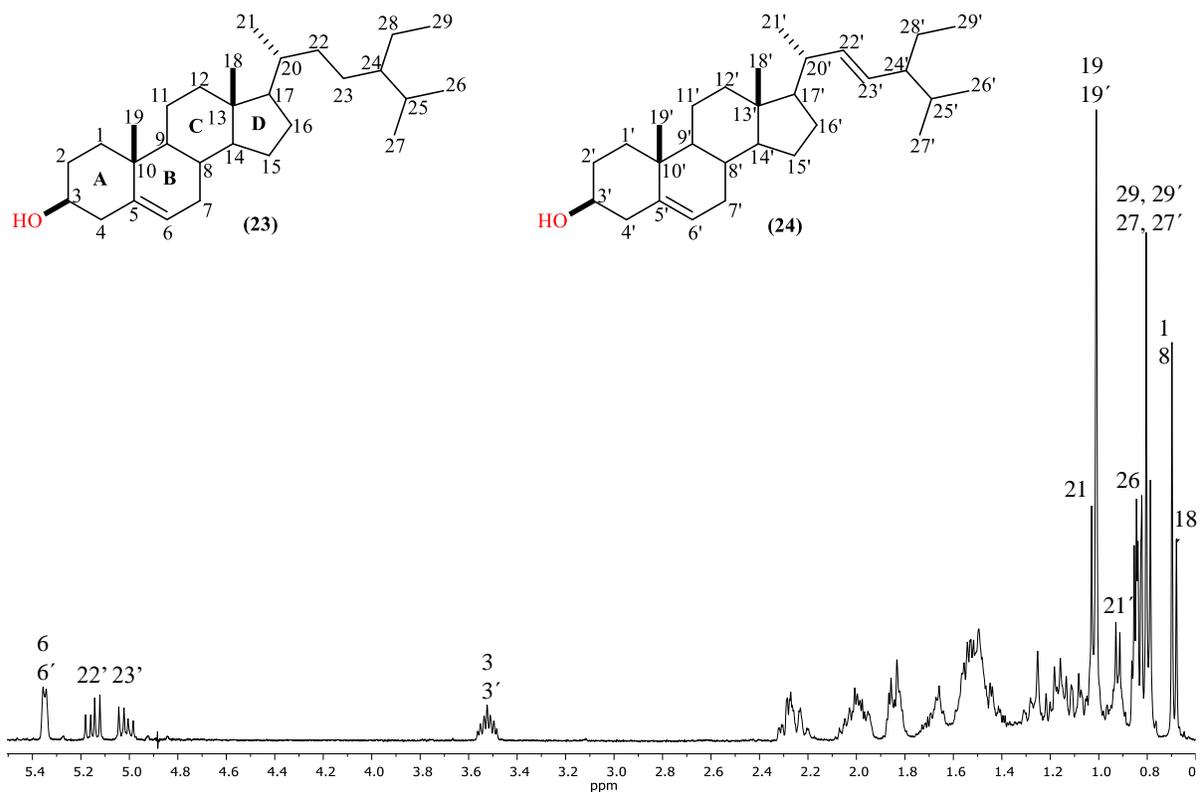


Figura 6.2.3.2. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del sitosterol (23) y estigmasterol (24).

En su espectro de RMN de ¹³C se distinguen en δ 140.5 y δ 121.4 las señales correspondientes a los carbonos vinílicos C-5 y C-6 del anillo B, respectivamente, además en δ 138.1 y δ 129.0 se aprecian señales de los carbonos vinílicos C22' y C-23' de la cadena lateral, respectivamente; además, en δ 71.6 se aprecia la señal correspondiente a los carbonos base de hidroxilo de la posición C-3. El resto de las señales de esqueleto se observan en δ 57.0 a δ 10.0 (Figura 6.2.3.3).

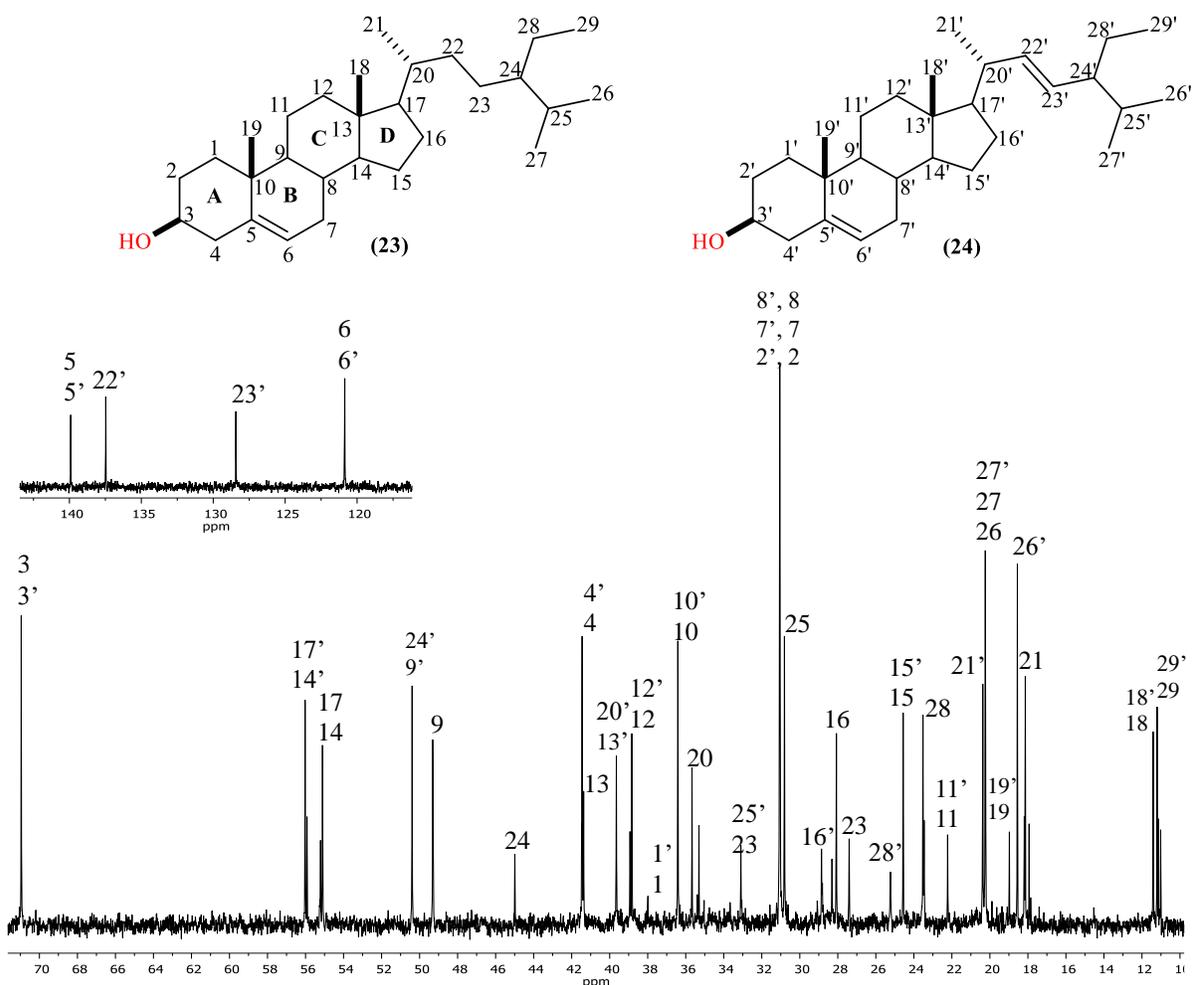


Figura 6.2.3.3. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz en CDCl₃ del sitosterol (23) y estigmasterol (24).

Del extracto hexánico de hojas de la fracción 9 obtenida en 1:1 hexanos:AcOEt tras varios procesos cromatográficos fue posible el aislamiento de 15 mg de esta misma mezcla **23** y **24**. De acuerdo con la literatura, estos datos corresponden a la mezcla de sitosterol (**23**) y estigmasterol (**24**), el análisis de sus integrales del espectro de RMN de ¹H permitió establecer que se encuentran en una proporción 2:1, respectivamente (Tabla 6.2.3.1). Este tipo de metabolitos por lo general, se encuentran en mezcla en la mayoría de las especies vegetales; en el género han sido descritos en *T. grisebachii* y *T. praestans* (De Riscalca *et al.*, 1988; De Riscalca *et al.*, 1989).

Tabla 6.2.3.1. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C de sitosterol (23) y estigmasterol (24) (Kipkemei, 2017; Ododo *et al.*, 2016).

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ Experimental (24)	$\delta^{13}\text{C}$ Reportado (24)	$\delta^{13}\text{C}$ Experimental (23)	$\delta^{13}\text{C}$ Reportado (23)
1	37.0	37.2	37.0	37.2
2	31.6	31.6	31.6	31.7
3	71.6	71.7	71.6	71.8
4	42.0	42.2	42.1	42.3
5	140.5	140.7	140.5	140.7
6	121.4	121.6	121.4	121.6
7	31.6	31.8	32.1	31.9
8	31.7	31.8	31.7	31.9
9	50.0	50.1	49.9	50.1
10	36.3	36.4	36.3	36.5
11	21.0	21.1	21.0	21.1
12	39.5	39.6	39.6	39.8
13	40.2	40.4	42.0	42.3
14	56.6	56.8	56.6	56.8
15	24.1	24.2	24.1	24.3
16	28.7	28.8	28.0	28.2
17	56.5	56.3	55.8	56.0
18	12.0	12.1	11.8	11.8
19	19.1	19.3	19.6	19.4
20	39.6	39.7	35.9	36.1
21	20.8	20.9	18.8	18.8
22	138.1	138.2	33.7	33.9
23	129.0	129.2	25.9	26.1
24	51.0	51.2	45.6	45.8
25	33.7	33.9	29.4	29.2
26	18.8	18.9	19.6	19.8
27	20.8	21.0	19.1	19.0
28	25.2	25.3	22.9	23.1
29	11.8	11.8	12.0	12.0

Marín *et al.* en 2003 evaluaron la actividad de una mezcla de los esteroides de *Lepidium meyenii* (maca) siendo el sitosterol (45%), campesterol (27%) y ergosterol (13.6%) los principales, dicha planta es empleada en la medicina tradicional peruana como estimulante de la reproducción. Reportaron el incremento significativo de folículos de ovarios del aparato reproductor de ratas, a los 16 días de tratamiento (100 mg/kg), este resultado es similar al efecto causado por el citrato de clomifeno (inductor de la ovulación). Es conocido el rol de los esteroides en los procesos reproductivos, generalmente como precursores hormonales en la biosíntesis de estrógenos, explicando el efecto observado (Sifuentes *et al.*, 2015).

6.2.4. Análisis químico del extracto de diclorometano de hojas

Los extractos de CH_2Cl_2 de las colectas 2016 y 2017 fueron analizados por RMN de ^1H , donde se observan en δ 7.00 a δ 6.00 señales correspondientes a protones aromáticos; además se aprecian entre δ 5.90 a δ 4.90 las señales características de protones vinílicos; además se observa entre δ 4.80 a δ 2.10 señales pertenecientes a protones base de heteroátomos, y, por último, en δ 2.00 a δ 0.60 aparecen las señales correspondientes a los protones alifáticos. La comparación de los espectros de ambas colectas no se observa diferencia en su composición, por lo cual se unieron como estrategia para la obtención de sus componentes mayoritarios (Figura 6.2.4.1).

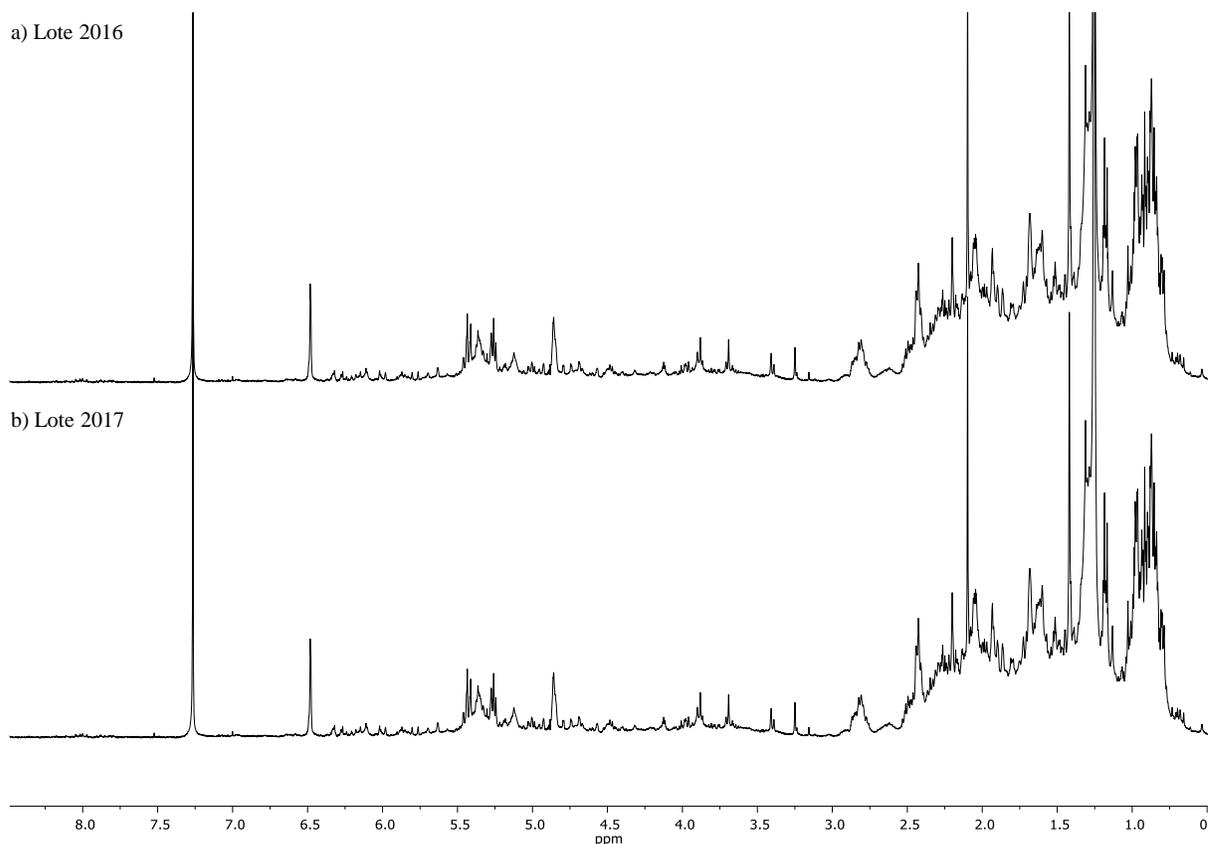


Figura 6.2.4.1. Espectros de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de los extractos de CH_2Cl_2 de hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

El extracto preliminar CH_2Cl_2 , se sometió a separación en columna cromatográfica para la obtención de 15 fracciones enriquecidas utilizando mezclas de polaridades ascendentes de hexanos-AcOEt. De la fracción 1 de Hexanos-AcOEt (9:1) tras precipitarlo con acetona se obtuvieron 27 mg de un sólido blanco ceroso.

En su espectro de RMN de ^1H se observa una señal simple ancha en δ 1.25 asignada a los protones metilénicos de una cadena hidrocarbonada (H-2 a H-26); en δ 0.88 se distingue una señal triple ($J= 6.3$ Hz) correspondiente para los metilos terminales (H-1 y H-27) (Figura 6.2.4.2).

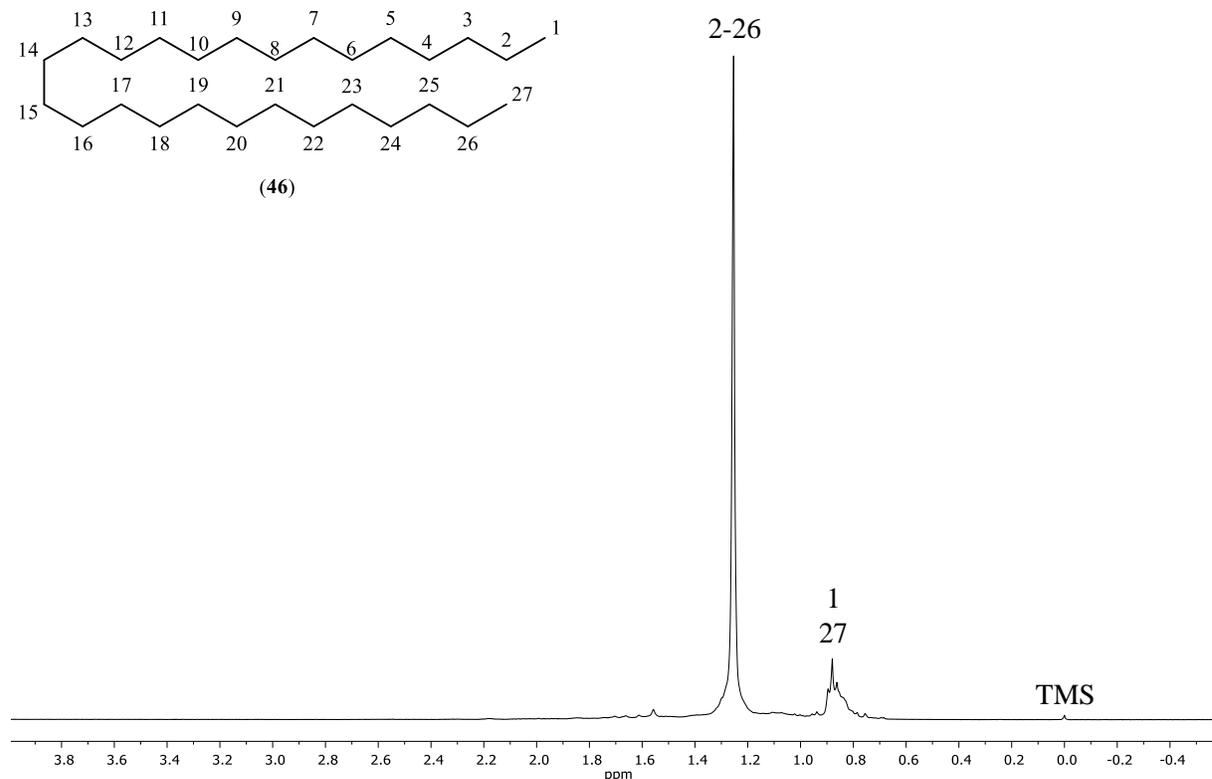


Figura 6.2.4.2. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del heptacosano (46).

En su espectro de RMN de ^{13}C se aprecian 5 señales que confirman la presencia de un compuesto hidrocarbonado saturado en δ : 31.4 (C-3 y C-25), 29.2 (C-5 a C-23), 28.8 (C-4 y C-24), 22.2 (C-2 y C-26) y 13.6 (C-27 y C-1) (Figura 6.2.4.3.).

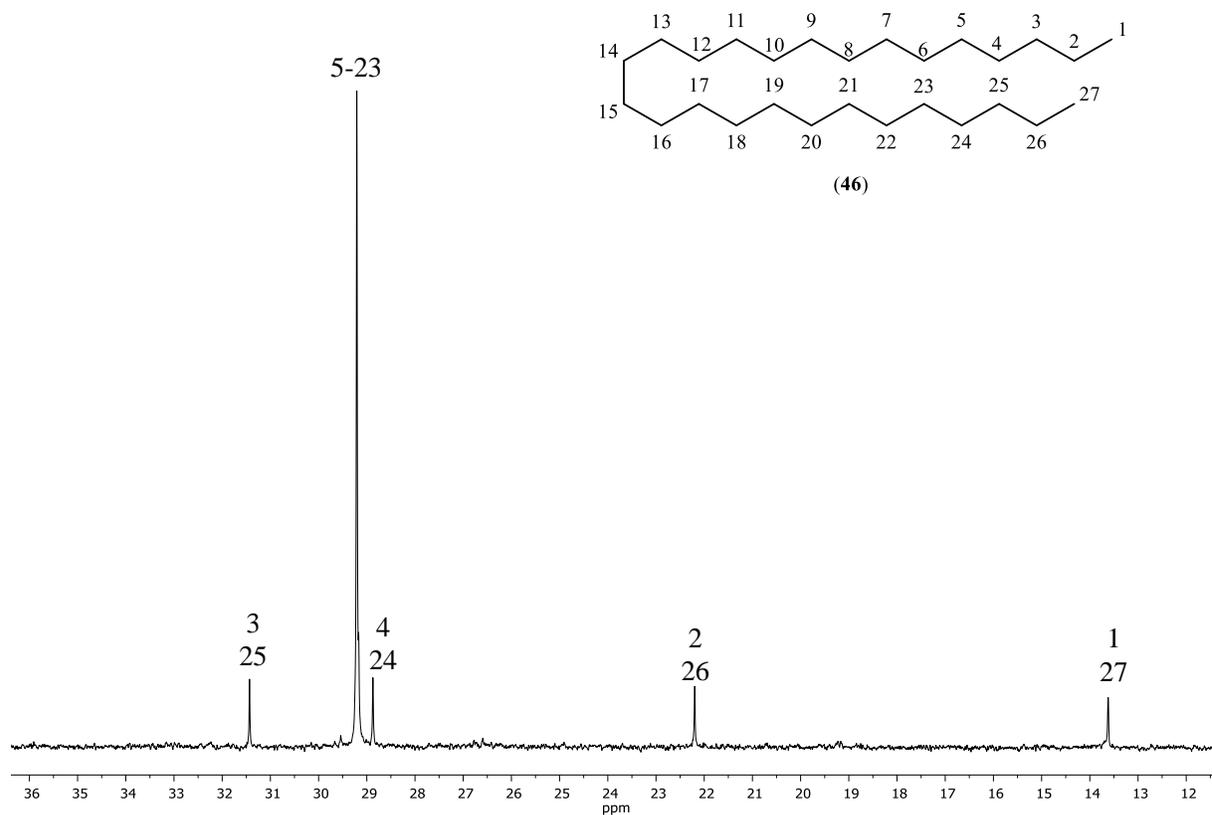


Figura 6.2.4.3. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del heptacosano (46).

Como parte de su caracterización, el compuesto fue analizado por CG-EM, donde se observa un $[\text{M}]^+$ 380.4 m/z calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{56}$, su espectro de masa fue comparado en las bases de datos del NIST 2.0 2011, coincidiendo con el heptacosano (46) (Figura 6.2.4.4).

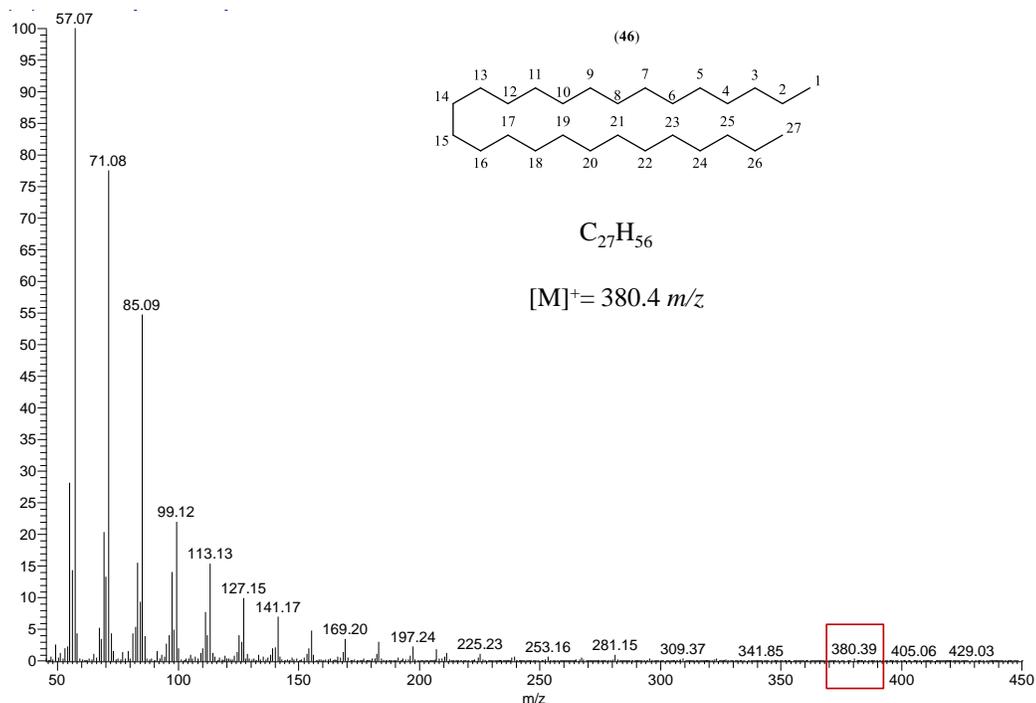


Figura 6.2.4.4. Espectro de masa del Heptacosano (46).

El compuesto **46** fue descrito en mezcla con otros *n*-alcanos de cadena larga como compuesto minoritario en el extracto hexánico de hojas (Herrera, 2019). En este caso, al ser uno de los metabolitos mayoritarios presentes en el extracto de CH_2Cl_2 de hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia* fue posible su aislamiento, purificación y cuantificación.

Es importante destacar que la presencia de *n*-alcanos con un número impar de carbonos se encuentra ligado a la presencia de ceras cuticulares en las hojas de la especie estudiada. Las ceras cuticulares se componen principalmente de compuestos alifáticos saturados de cadena larga ($>C_{20}$), los más comunes son series homólogas de ácidos grasos pares, alcoholes primarios, alquil ésteres y aldehídos, así como alcanos impares, alcoholes secundarios y cetonas (Racovita y Jetter, 2016). La composición química de las ceras cuticulares es específica de la ontogenia de cada especie de plantas, órganos, etapas de desarrollo y condiciones ambientales, por lo cual en algunos casos se desempeñan como marcadores genéticos (Bakker *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2019), lo cual podría considerarse en un futuro para el género *Trixis*, cuando un número significativo de especies sean estudiadas.

Continuando con el análisis de extracto de CH_2Cl_2 de hojas de la fracción 2 de hexanos-AcOEt (9:1) del extracto crudo, se sometió a una cromatografía en columna de las fracciones 14-16, tras varios lavados con acetona fría llevó a la obtención de 16 mg de un sólido blanco ceroso con p.f. 114-116 °C.

En su espectro de RMN de ^1H se aprecia en δ 5.18 una señal triple ancha ($J= 3.7$ Hz) que corresponde al protón vinílico de la posición H-12; en δ 4.50 se ubica una señal doble de dobles ($J= 8.4, 7.5$ Hz) asignada a un protón base de éster H-3; así mismo, se observa en δ 2.29 una señal triple con acoplamiento vecinal ($J=7.5$ Hz) que integra para los protones α al carbonilo del éster H-2'; en δ 1.25 se encontró una señal simple ancha típica de una cadena de ácido graso H-3' a H-13'; entre δ 0.75 a δ 1.80 se encuentran el resto de las señales correspondientes al esqueleto triterpénico (Figura 6.2.4.5).

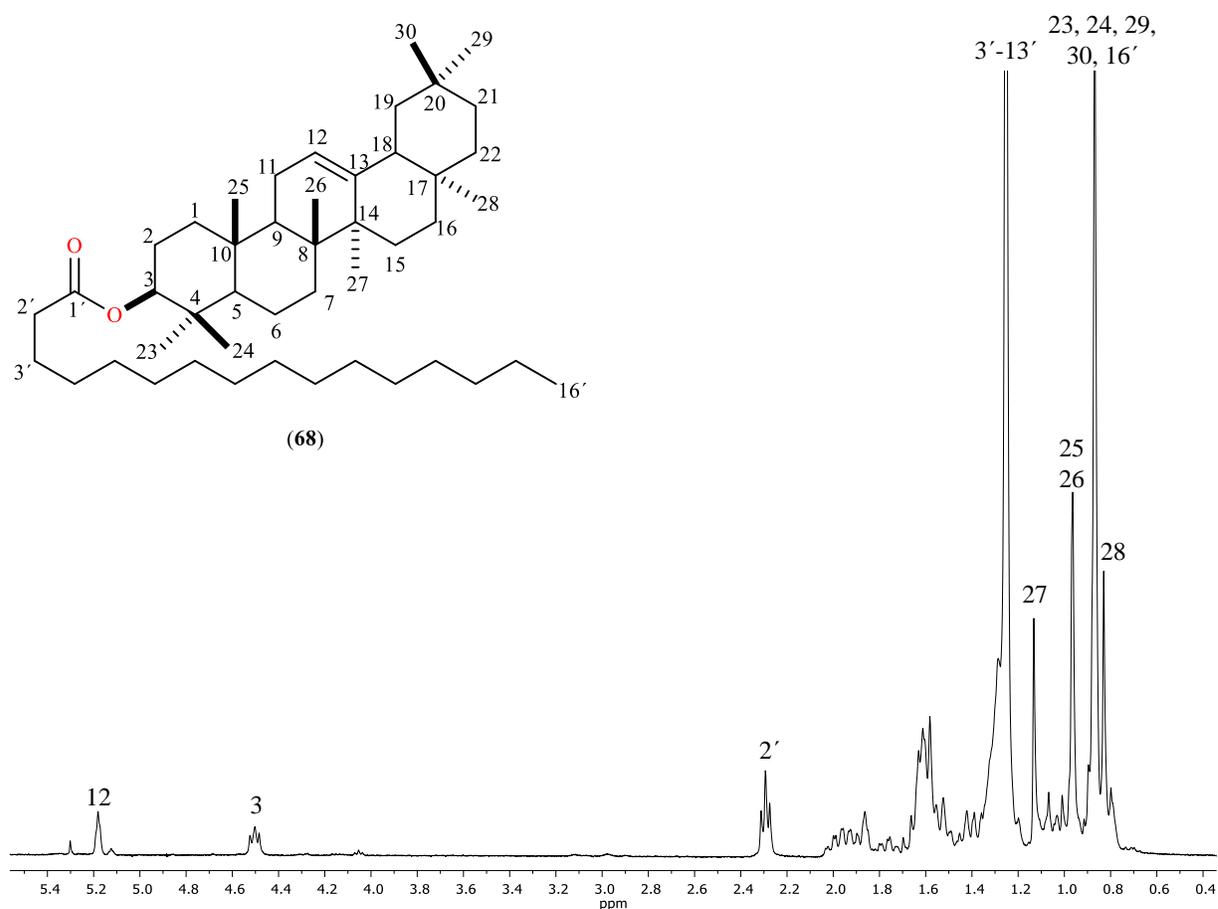


Figura 6.2.4.5. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del palmitato de β -amirina (68).

En su espectro de RMN de ^{13}C se observa en δ 173.5 la señal típica de carbonilo del éster (C-1'); en δ 145.0 y δ 121.5 se encuentran las señales correspondientes para los carbonos olefínicos C-13 y C-12, respectivamente; además, en δ 80.4 se aprecia la señal del C-3 base de éster; entre δ 30.0 y δ 28.0 se distingue un grupo de seis señales asignadas a la cadena alifática típica de ácidos grasos saturados C-4'a C-13'; las señales pertenecientes al resto de los carbonos del esqueleto se encuentran entre δ 28.0- δ 13.0 (Tabla 6.2.4.1); este patrón de señales son características del esqueleto de oleanano que se encuentra esterificado (Figura 6.2.4.6).

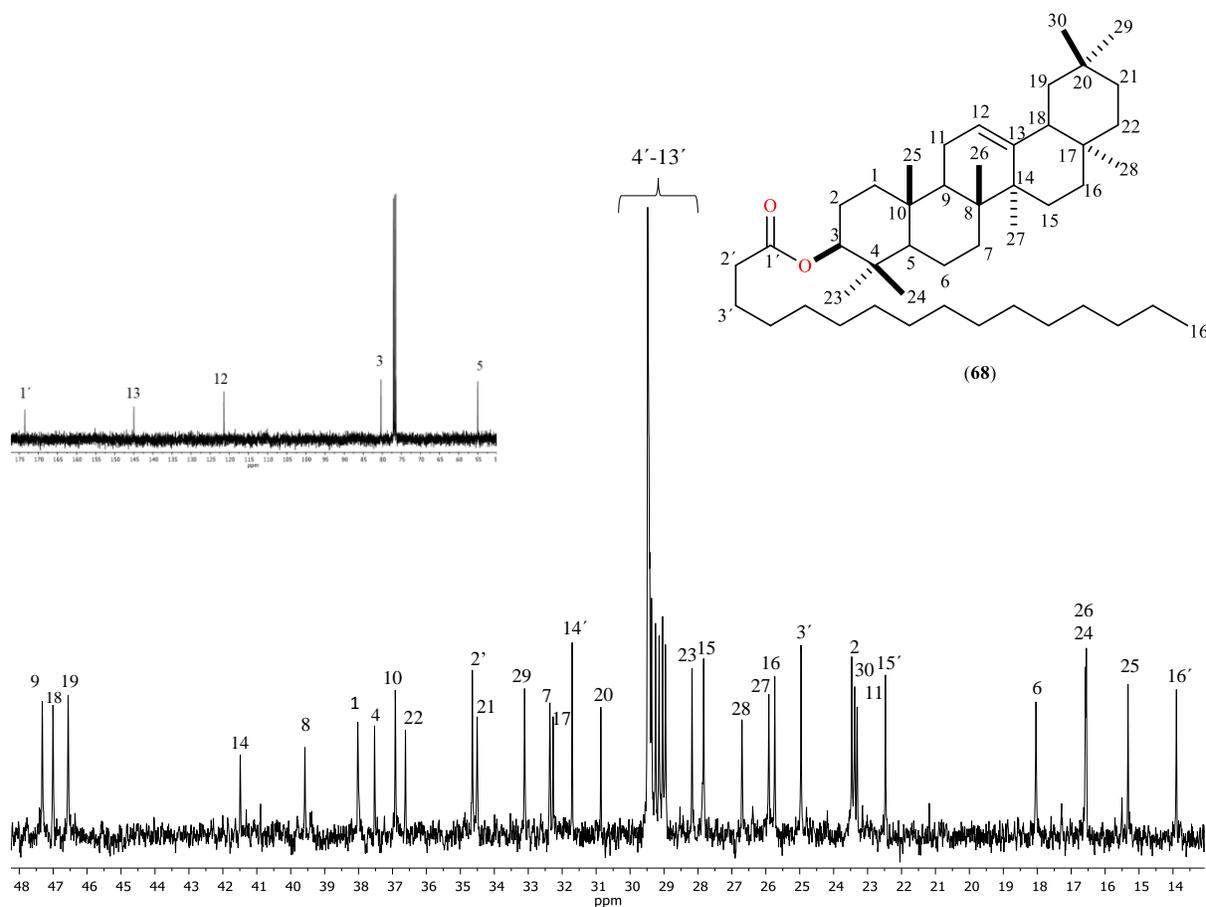


Figura 6.2.4.6. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del palmitato de β -amirina (68).

Tabla 6.2.4.1. Comparación de los desplazamientos de RMN de ^{13}C del palmitato de β -amirina (**68**) (Nurhamidah *et al.*, 2016).

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ Experimental (68)	$\delta^{13}\text{C}$ Reportado (68)
1	38.2	38.2
2	23.7	23.7
3	80.6	80.6
4	37.8	37.8
5	55.2	55.3
6	18.3	18.3
7	32.6	32.6
8	39.8	39.8
9	47.5	47.6
10	37.0	37.0
11	23.5	23.5
12	121.6	121.7
13	145.2	145.2
14	41.7	41.7
15	27.9	27.9
16	26.1	26.1
17	32.5	32.5
18	47.2	47.2
19	46.7	46.8
20	31.1	31.1
21	34.6	34.7
22	37.1	37.1
23	28.1	28.1
24	16.8	16.8
25	15.5	15.6
26	16.8	16.8
27	26.1	26.0
28	26.9	26.9
29	33.3	33.3
30	23.6	23.7
1'	173.7	173.7
2'	31.9	31.9
3'	23.5	23.5
4'-13'	29.1-29.7	29.1-29.6
14'	31.9	31.9
15'	22.6	22.6
16'	14.1	14.0

En su análisis por CG-EM se identificó un $[M]^+$ 662.7 m/z correspondiente para $C_{46}H_{80}O_2-2H$ (Figura 6.2.4.7). Los datos obtenidos fueron comparados con la literatura coincidiendo para el compuesto denominado palmitato de β -amirina (**68**) (Nurhamidah *et al.*, 2016).

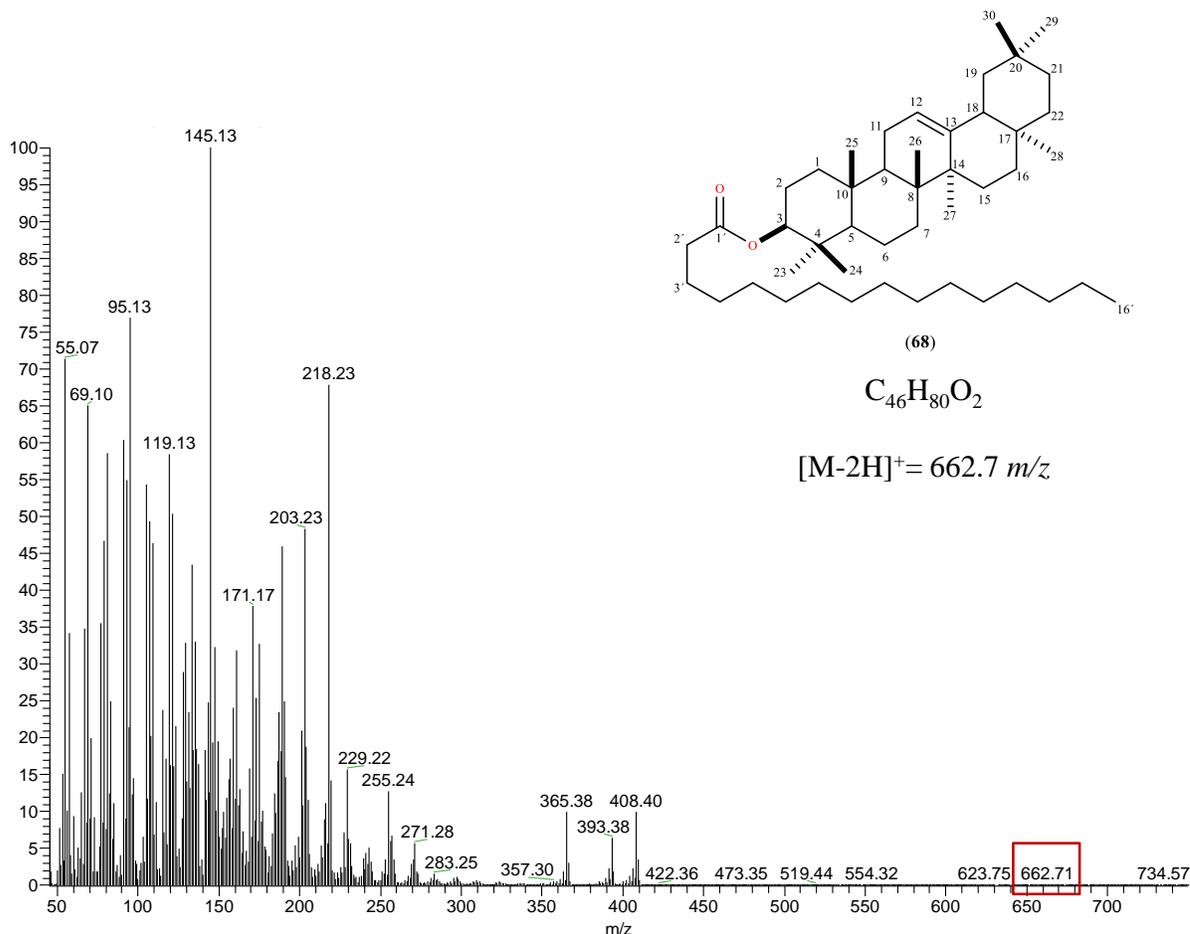


Figura 6.2.4.7. Espectro de masa del palmitato de β -amirina (**68**).

Esta es la primera ocasión en la cual se reporta a **68** en el género, en el análisis químico preliminar de describió al estearato de β -amirina (**52**), en otras especies como *T. antimenorrhoea*, *T. grisebachii* y *T. praestans* se aisló a la β -amirina (**19**). Se ha demostrado que **68** posee actividad anti-hiperglucémica, así como su actividad antidepresiva del sistema nervioso central en ratones (Aragao *et al.*, 2018; Ajikumaran *et al.*, 2014; Subarnas *et al.*, 1992).

6.2.5. Análisis químico del extracto de diclorometano de tallos

El análisis de los extractos de CH_2Cl_2 de tallo por RMN de ^1H se observan entre δ 7.0- δ 6.0 las señales correspondientes a protones aromáticos; además, entre δ 6.0 y δ 4.9 se ubican las señales características de protones vinílicos; también se distinguen entre δ 4.8- δ 1.9 las señales típicas de protones base de heteroátomos; de la misma manera, entre δ 1.8- δ 0.6 se aprecian señales correspondientes a grupos metilo. Ambas colectas poseen la misma composición química por lo cual se unieron para su posterior estudio químico (Figura 6.2.5.1).

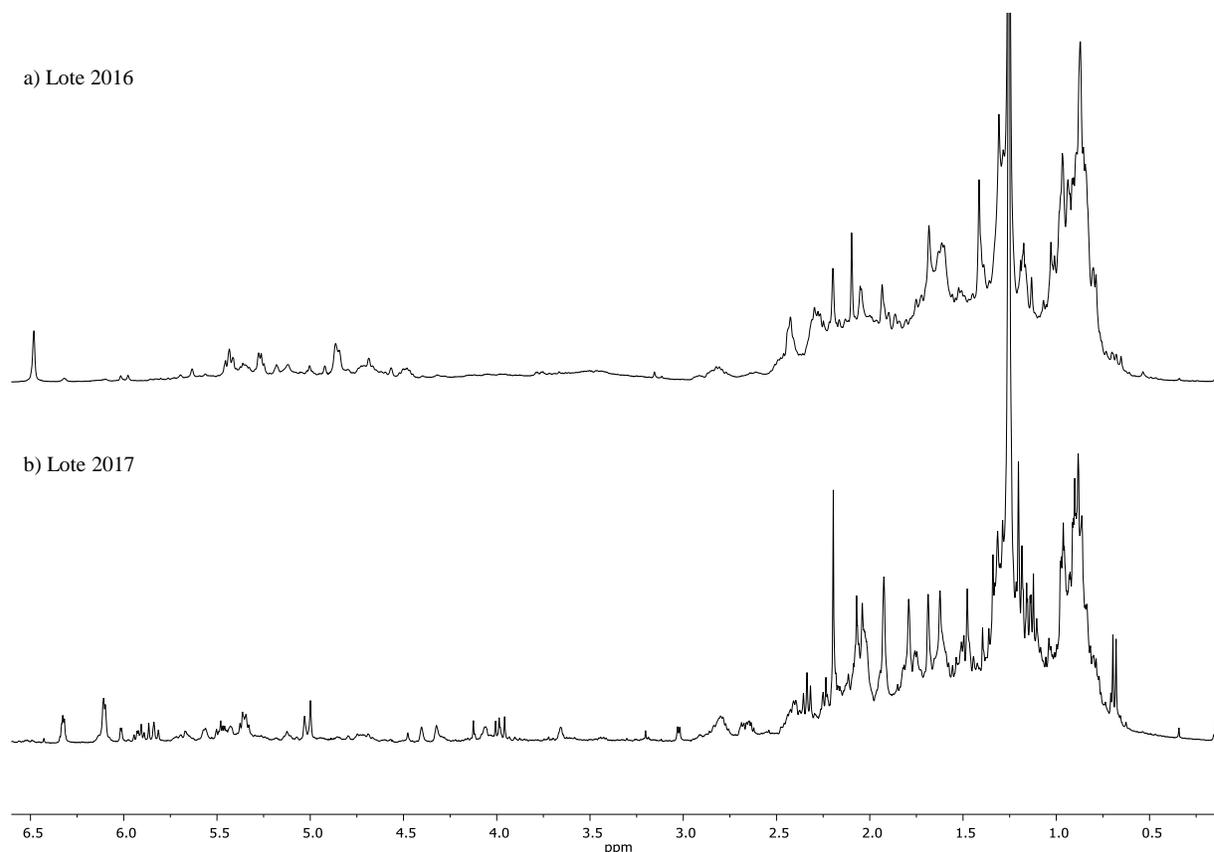


Figura 6.2.5.1. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de los extractos de diclorometano de tallos de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

El extracto crudo de tallos se sometió a una cromatografía en columna para la obtención de 15 fracciones enriquecidas empleando como eluyente mezclas de hexanos:AcOEt. La fracción 1 (Hexanos:AcOEt) se sometió a una segunda cromatografía para la obtención de 20 fracciones (10 mL) usando como fase móvil mezclas de hexanos:acetona, de las fracciones 17-19 tras varios procesos cromatográficos llevó a la obtención de 35 mg de cristales amarillos, con aroma característico con un p.f. 86-88 °C.

En su análisis por RMN de ^1H se distingue en δ 9.83 una señal simple característica de un grupo aldehído H-7, así mismo se aprecian en δ 7.43 una señal doble de dobles con $J= 4.4$ y 3.0 Hz asignada a los protones aromáticos H-5 y H-2; se observa en δ 7.04 una señal doble ($J= 8.4$ Hz) correspondiente a H-6 del anillo aromático; además en δ 3.97 se encuentra una señal simple intensa asignada al OMe (Figura 6.2.5.2).

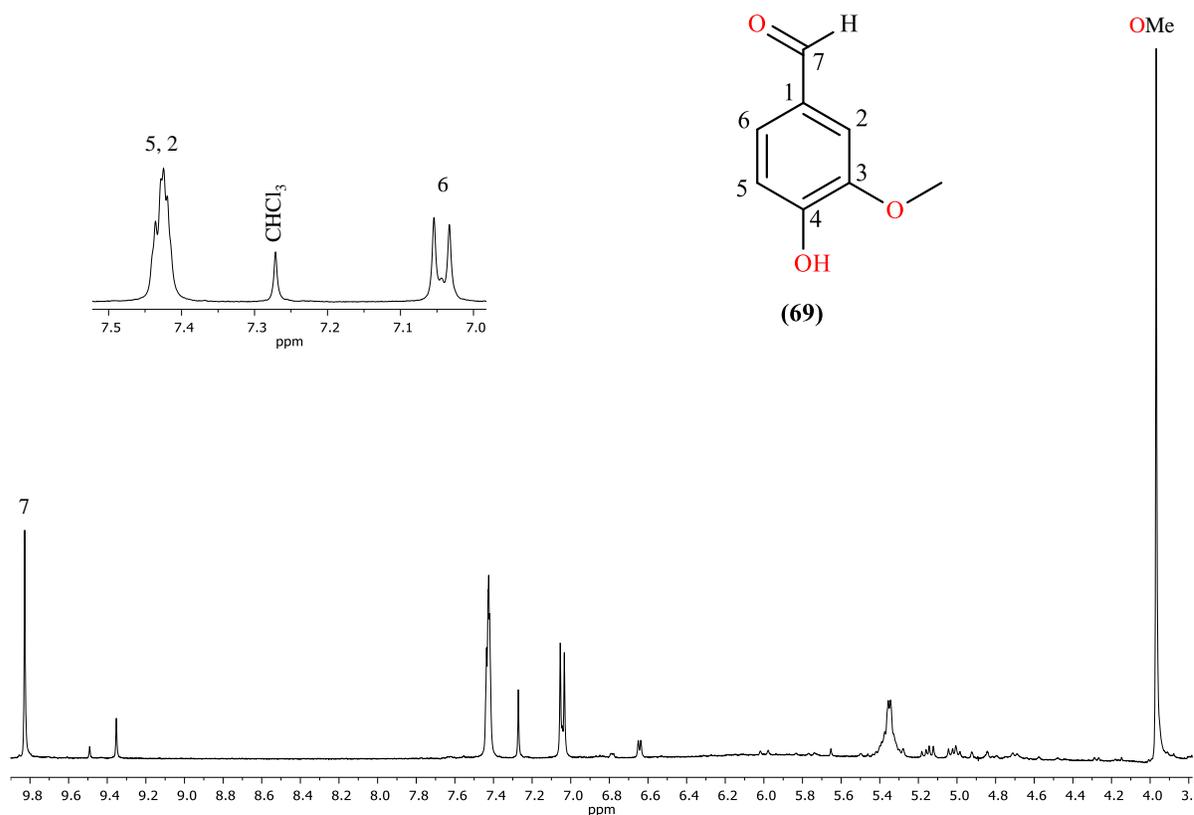


Figura 6.2.5.2. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (69).

En su espectro de RMN de ^{13}C se aprecia en δ 191.0 la señal característica del grupo carbonilo de aldehído C-7, en δ 56.1 se distingue la señal del del metoxilo; además en δ 151.8 se aprecia la señal del C-4 aromático base de hidroxilo; el resto de las señales del esqueleto se observan de δ 147.2 a δ 127.6 (Figura 6.2.5.3).

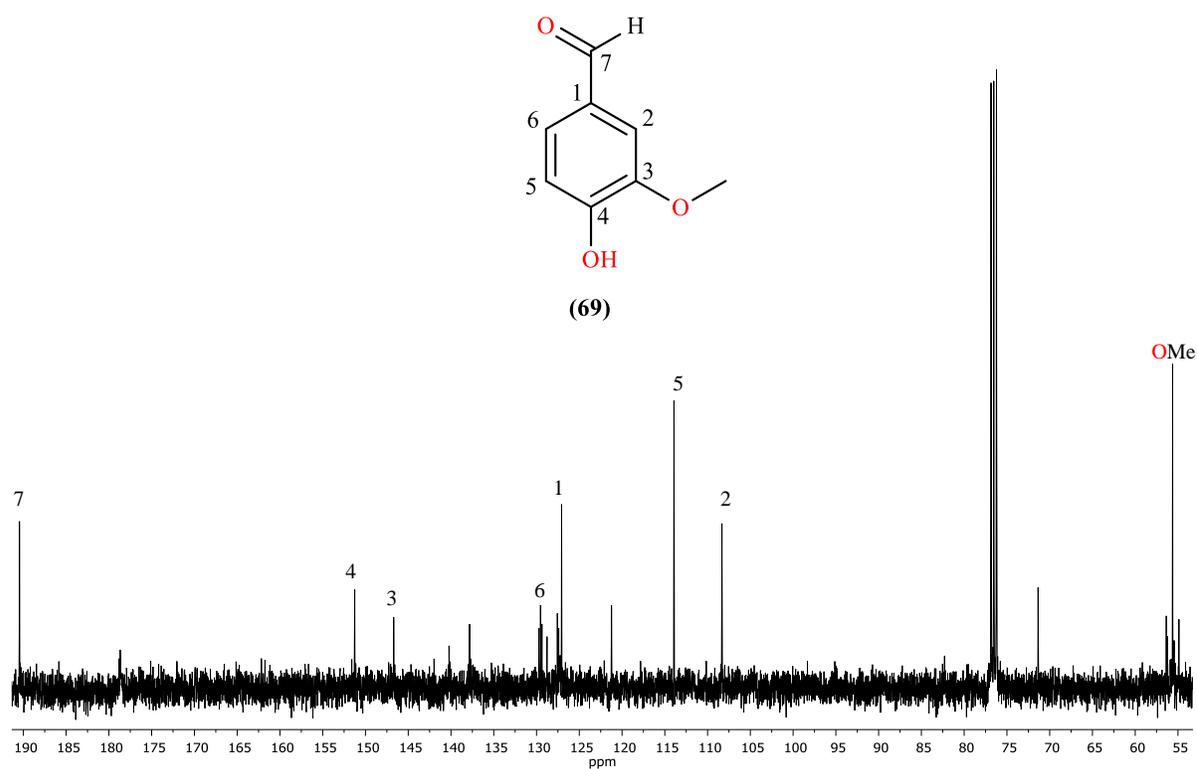


Figura 6.2.5.3. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (**69**).

Los datos obtenidos fueron comparados coincidiendo para el compuesto denominado 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (**69**) también conocido como vainillina, siendo esta es la primera ocasión en la cual se reporta este metabolito para el género *Trixis* (Tabla 6.2.5.1).

Tabla 6.2.5.1. Comparación de los datos de RMN de ^{13}C del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (**69**) (Ching-Kuo *et al.*, 2004).

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ Experimental (69)	$\delta^{13}\text{C}$ Reportado (69)
1	127.6	127.6
2	108.9	108.8
3	147.2	147.2
4	151.8	151.8
5	114.4	114.4
6	129.9	129.8
7	191.0	191.1
8	56.1	56.1

Es bien conocido el uso de **69** como especia dentro de la gastronomía por su aroma y sabor, se puede encontrar en las vainas de vainilla y también se sintetiza artificialmente. Además, la vainillina posee una gamma importante de actividades biológicas, entre las que destacan su actividad antimicrobiana, antioxidante, antifúngica, antiinflamatoria, antitumoral, antimutagénica y antiviral (Wang *et al.*, 2019).

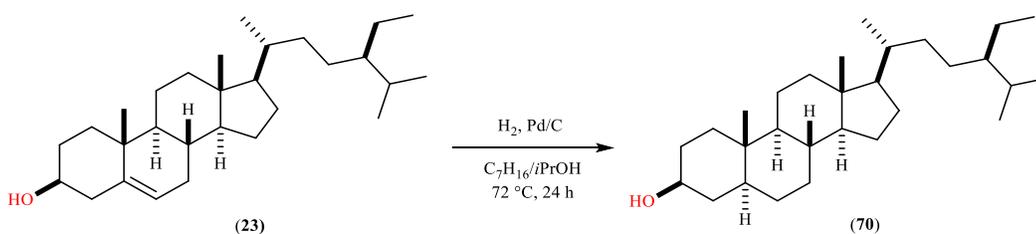
6.3. Exploración de la reactividad química de los metabolitos mayoritarios de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

Los esteroides, obtenidos de plantas y animales, han exhibido una asombrosa variedad de actividades farmacológicas y continúan siendo una de las clases de compuestos más estudiados por una variedad de razones, incluida su desafiante complejidad estructural y, además, son materia de partida en un sinnúmero de derivados con esqueletos biológicamente activos (Kontiza *et al.*, 2006). Estas son las principales razones por las cuales se siguen sintetizando moléculas derivadas de este grupo de compuestos.

La mezcla de **23** y **24** se obtuvo como metabolitos secundarios mayoritarios del extracto hexánico de tallos y como componentes minoritarios del extracto hexánico de hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*. Si bien este tipo de metabolitos se describen en la mayoría de las especies vegetales, resulta interesante explorar su reactividad química para la obtención de derivados de interés químico y biológico.

6.3.1. Hidrogenación de la mezcla de sitosterol (**23**) y estigmasterol (**24**)

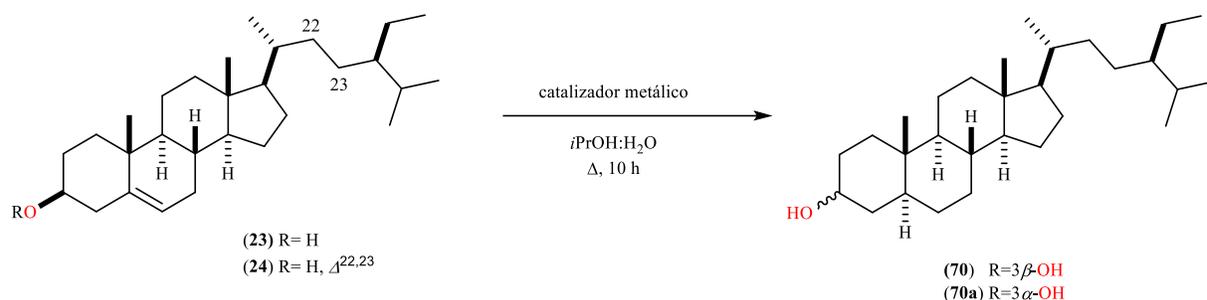
Actualmente los procesos de hidrogenación tienen una gran importancia dentro de la industria alimentaria y farmacéutica, ya que es un proceso empleado en la síntesis química para la modificación de moléculas que poseen insaturaciones (Crespo *et al.*, 2020). En el caso de los fitosteroles, sabemos que estos se pueden encontrar en su forma libre principalmente, o bien como mezclas de isómeros, como es el caso de **23** y **24**. Kyselka *et al.*, en 2019 describen la hidrogenación de sitosterol (**23**) obtenido de manera comercial. Para la hidrogenación se emplearon Pd/C (5%) en presencia de heptano/*i*PrOH (2:1) y en atmósfera de H₂ a 70 °C por un lapso de 24 h obteniendo rendimientos del 89.5% de 5 α -sitostan-3 β -ol (**70**) (Esquema 6.3.1.1).



Esquema 6.3.1.1. Hidrogenación de sitosterol (**23**) comercial bajo condiciones descritas por Kyselka *et al.*, 2019.

La mayoría de los procesos convencionales de hidrogenación se realizan bajo atmósfera de H₂ en presencia de un catalizador metálico obteniendo los productos saturados correspondientes; como productos de adición. Si bien estos procesos son relativamente sencillos, requieren de equipos e instrumentos especiales, además de medidas de seguridad estrictas por lo cual surge la necesidad de buscar nuevas alternativas con condiciones más sencillas y seguras a las convencionales.

Para la hidrogenación de **23** y **24**, se emplearon las condiciones descubiertas recientemente por nuestro grupo de trabajo para obtener el producto hidrogenado (**70**) (Esquema 6.3.1.2). Este proceso resulta de importancia en la química sintética, ofreciendo una alternativa económica y variable para la modificación y síntesis de compuestos orgánicos.



Esquema 6.3.1.2. Reacción de hidrogenación catalítica a partir de **23** y **24**.

Como producto de esta reacción se obtuvieron 94.1 mg de un sólido blanco con un p.f. de 136-138 °C, con un rendimiento del 94%, adicionalmente se detectó [M]⁺ *m/z* 416.4 calculado para C₂₉H₅₂O.

En su espectro de RMN de ¹H en la región de los protones base de heteroátomos, se observan en δ 4.04 (sa, H-3β) y δ 3.60 (m H-3α) bases de hidroxilo, este perfil de señales corresponde a una mezcla isómeros; además en la región de los protones alifáticos se observan las señales típicas del esqueleto esteroidal, lo cual indica la reducción de **23** y **24** (Figura 6.3.1.1).

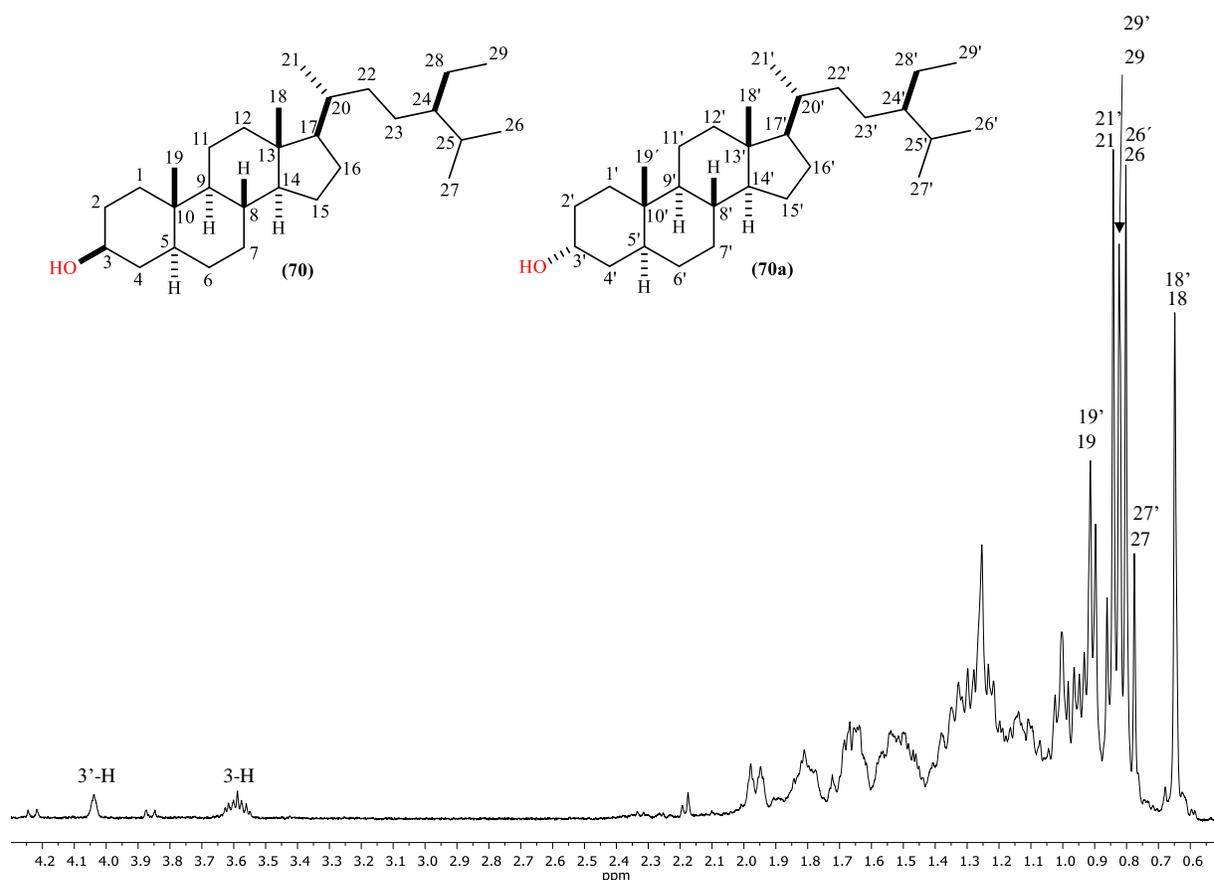


Figura 6.3.1.1. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del 5α -sitostan- 3β -ol (**70**) y 5α -sitostanol- 3α -ol (**70a**).

En su espectro de RMN de ^{13}C se observan dos juegos de señales correspondientes a los productos **70** y **70a**. Se aprecia el desplazamiento de las señales a frecuencias menores destacando en δ 39.1 (C-5) y δ 28.6 (C-6) de ambos núcleos esteroidales; además, se distingue las señales en δ 33.9 (C-22') y δ 26.0 (C-23'). Las señales base de hidroxilo se ubican en δ 73.8 (C-3) y 66.4 (C-3'). El resto de las señales se observan entre δ 56.4 a δ 11.9, que corresponden al esqueleto esteroideal (Figura 6.3.1.2).

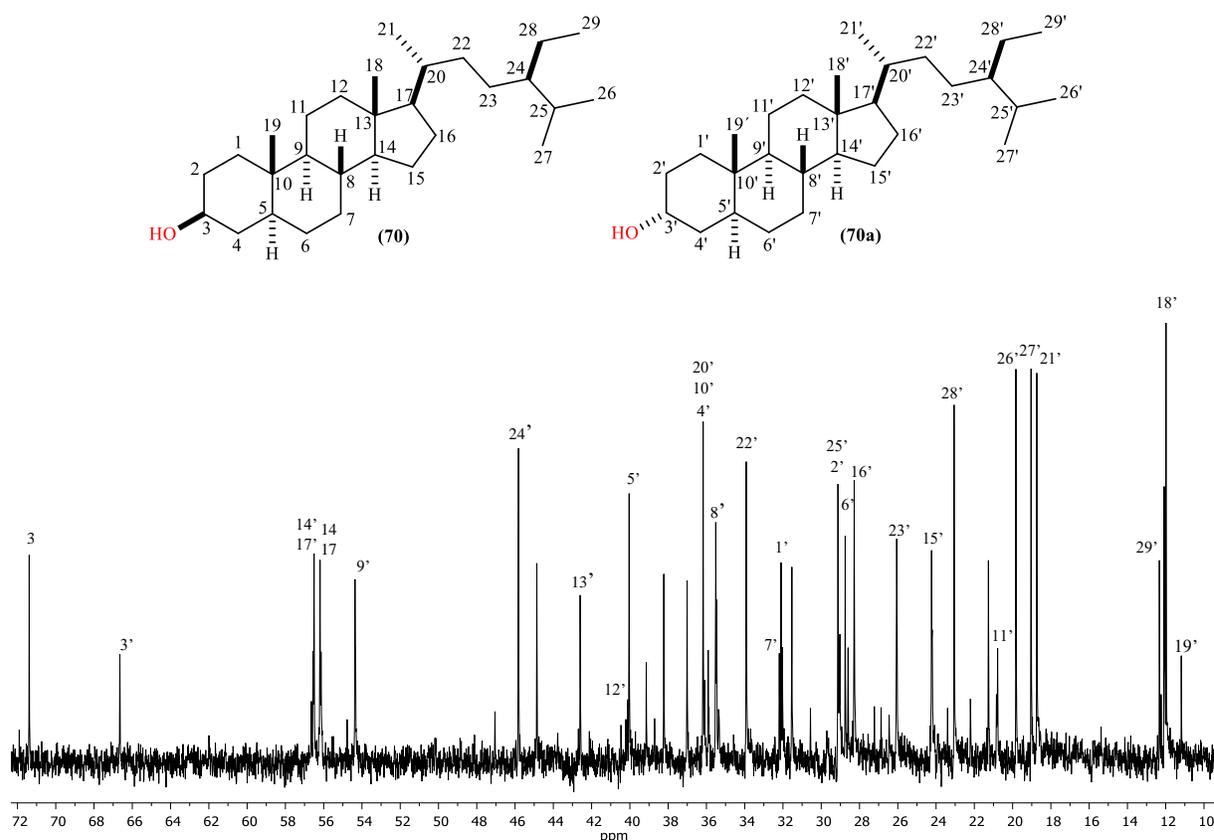


Figura 6.3.1.2. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 5α -sitostan- 3β -ol (**70**) y 5α -sitostan- 3α -ol (**70a**).

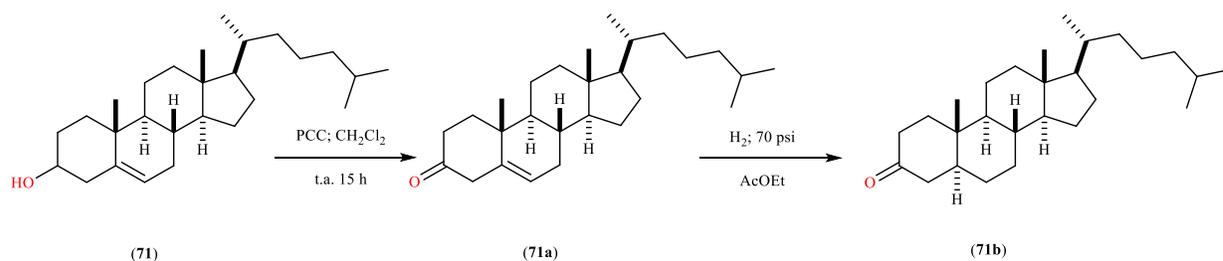
Los datos obtenidos en RMN de ^1H fueron comparados con los descritos por Ives & O’Neill, 1958 y Ritter en 1984, coincidiendo para los isómeros 5α -sitostan- 3β -ol (**70**) y 5α -sitostan- 3α -ol (**70a**), los cuales se encuentra en una proporción 68:32, respectivamente. Los datos de RMN de ^{13}C fueron cotejados con lo descrito por Luo *et al.*, 2009 para **70a** (Tabla 6.3.1.1). Se ha demostrado que los productos hidrogenados **70** y **70a**, poseen una actividad hipocolesterolémica superior a la presentada por **23** (Mäki *et al.*, 2009).

Tabla 6.3.1.1. Comparación de los datos de RMN de ^{13}C del 5α -sitostan- 3α -ol (**70a**) (Luo *et al.*, 2009).

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ Reportado (70a)	$\delta^{13}\text{C}$ experimental (70a)
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	28.6
7	32.0	32.0
8	35.5	35.5
9	54.3	54.3
10	36.0	36.0
11	20.7	20.7
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	56.6
18	12.1	12.1
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

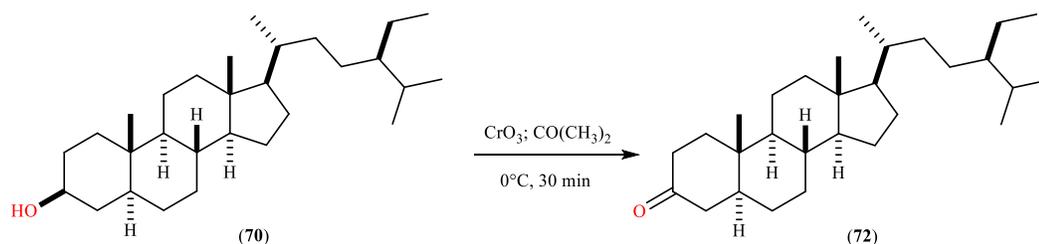
6.3.2. Preparación de la 5 α -sitostan-3-ona (72) a partir de 5 α -sitostan-3-ol (70, 70a)

Los grupos hidroxilo (-OH) son grupos funcionales versátiles, ya que son materia de partida para la preparación de otros grupos funcionales, por ejemplo: éteres, ésteres, aldehídos, cetonas y ácidos carboxílicos, entre otros. Guerra de Miranda *et al.*, en 2013 describe la oxidación del colesterol (71) empleando al clorocromato de piridinio (PCC) como agente oxidante en presencia de CH₂Cl₂ para la obtención de colestan-5-en-3-ona (71a) en 90% de rendimiento, posteriormente realizan la hidrogenación de usando H₂ a 70 psi en AcOEt con un rendimiento del 100% obteniendo la 5 α -colestan-3-ona (71b) (Esquema 6.3.2.1).



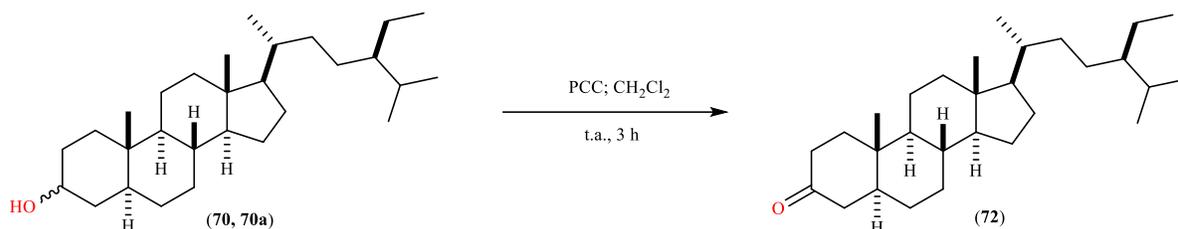
Esquema 6.3.2.1. Síntesis de la 5 α -colestan-3-ona (71b).

Nakajima *et al.*, en 1997, describen a partir del sitostanol (70), la formación de 5 α -sitostan-3-ona (72), empleando como agente oxidante al CrO₃ (oxidación de Jones), obteniendo un rendimiento del 26% (Esquema 6.3.2.2.).



Esquema 6.3.2.2. Síntesis de 5 α -sitostan-3-ona (72) descrita por Nakajima *et al.*, 1997.

Con base en lo anterior se oxidó el hidroxilo de la posición C-3 de **70** y **70a**, empleando como agente de oxidación al PCC (Esquema 6.3.2.3).



Esquema 6.3.2.3. Reacción de oxidación del 5 α -sitostan-3-ol (**70**, **70a**) para formación de la 5 α -sitostan-3-ona (**72**).

El producto de reacción se obtuvo como un sólido ligeramente amarillo 74.8 mg de p.f. 126-128 °C con 74.4% de rendimiento. El análisis por EI-MS identificó un [M]⁺ 415 *m/z*, calculado para la fórmula molecular C₂₉H₅₁O. En su análisis de IR se observa en 1715 cm⁻¹ la señal correspondiente a la vibración del C=O.

En su espectro de RMN de ¹H se observan entre δ 2.41- δ 0.5 las señales típicas correspondientes a los protones alifáticos del esqueleto esteroide, este perfil de señales es indicativo de la formación del producto oxidado **72** (Figura 6.3.2.1).

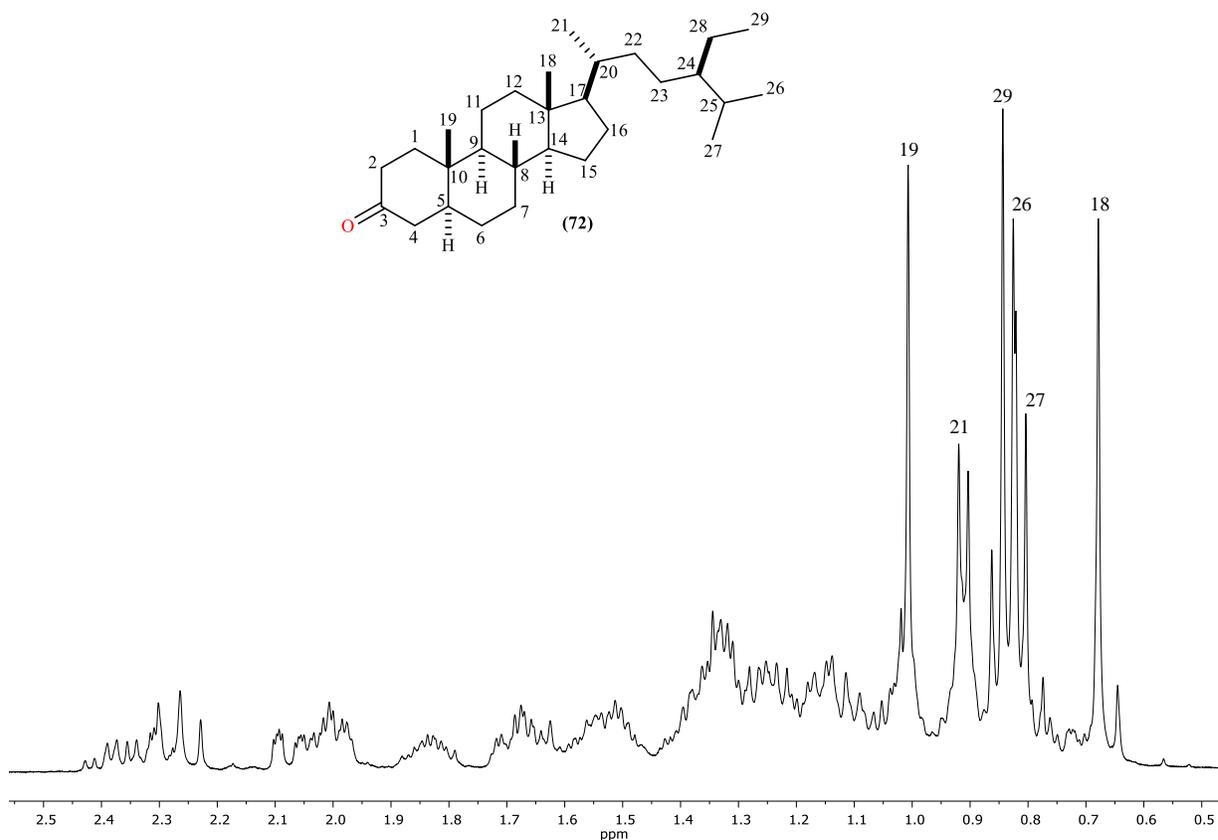


Figura 6.3.2.1. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ de la 5 α -sitostan-3-ona (72).

En su espectro de RMN de ¹³C se observa un patrón de señales esperado para el producto 72; se distingue en δ 212.0 desplazada hacia frecuencias mayores la señal del C-3 característico del carbonilo de cetona; además se aprecia entre δ 56.1- δ 11.5 el resto de las señales de los carbonos correspondientes al esqueleto esteroide (Figura 6.3.2.2).

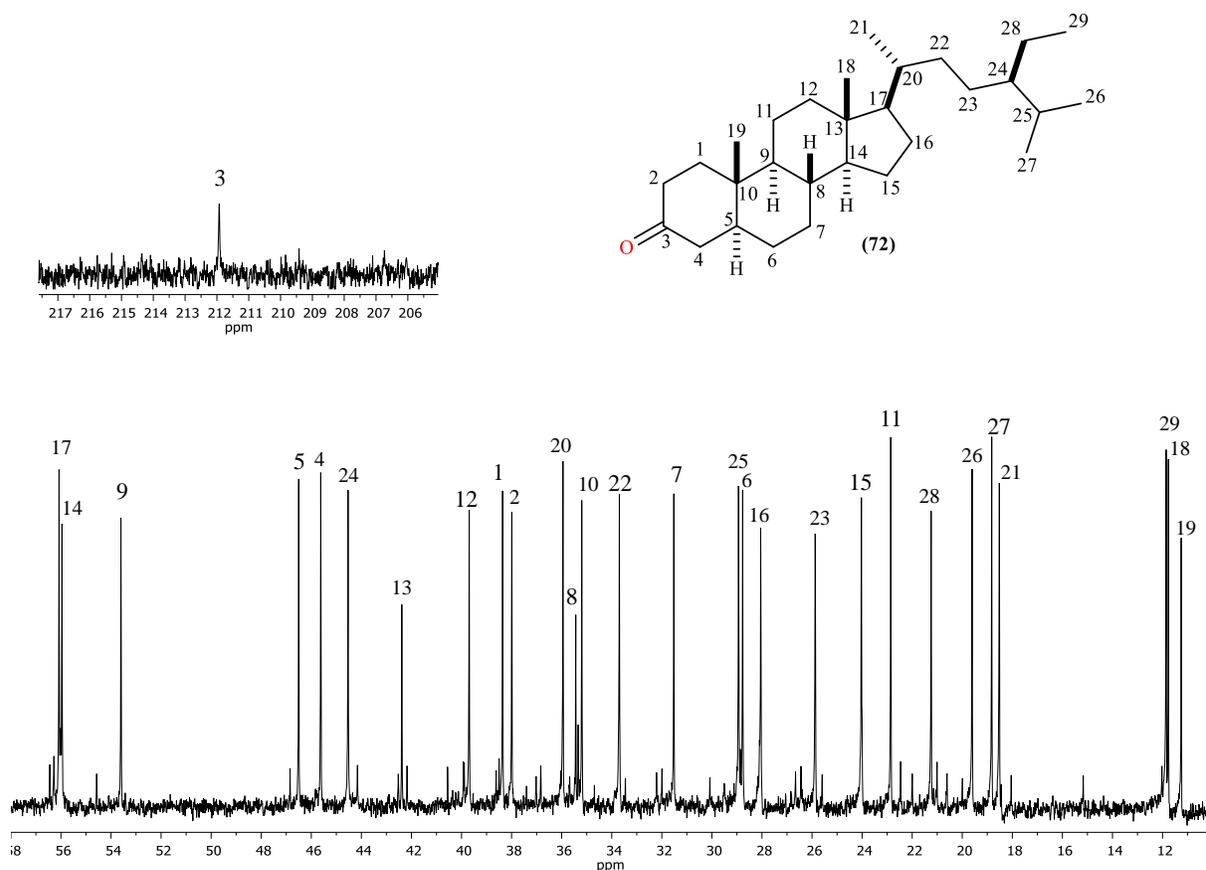


Figura 6.3.2.2. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 de la 5α -sitostan-3-ona (72).

Los datos obtenidos experimentalmente se compararon con lo descrito para el compuesto denominado 5α -sitostan-3-ona (72) (Tabla 6.4.2.1). La formación de cetonas en los esqueletos esteroideos los hace susceptibles a un número importante de reacciones de adición al grupo carbonilo, por ejemplo, la adición nucleofílica de aminas primarias para la formación de bases de Schiff.

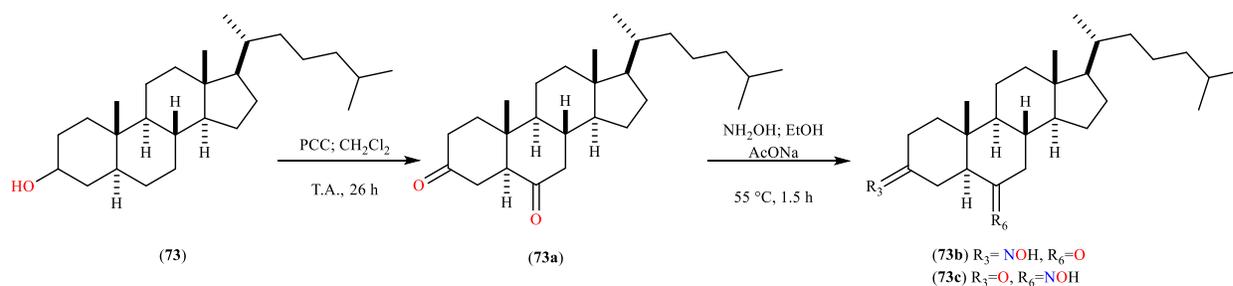
Tabla 6.4.2.1. Comparación de los desplazamiento de RMN de ^{13}C de la 5α -sitostan-3-ona (**72**) (Kyselka *et al.*, 2019).

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ Reportado (72)	$\delta^{13}\text{C}$ experimental (72)
1	38.6	38.5
2	38.2	38.2
3	212.1	212.0
4	44.8	44.8
5	46.7	46.7
6	29.0	29.0
7	31.7	31.7
8	35.4	35.4
9	53.8	53.8
10	35.6	35.6
11	21.5	21.5
12	39.9	39.9
13	42.7	42.6
14	56.1	56.1
15	24.2	24.2
16	28.3	28.3
17	56.3	56.3
18	12.0	12.0
19	11.5	11.5
20	36.2	36.2
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	11.9	11.9

6.3.3. Obtención de la tiosemicarbazona de estigmastano (76) a partir de la 5 α -sitostan-3-ona (72)

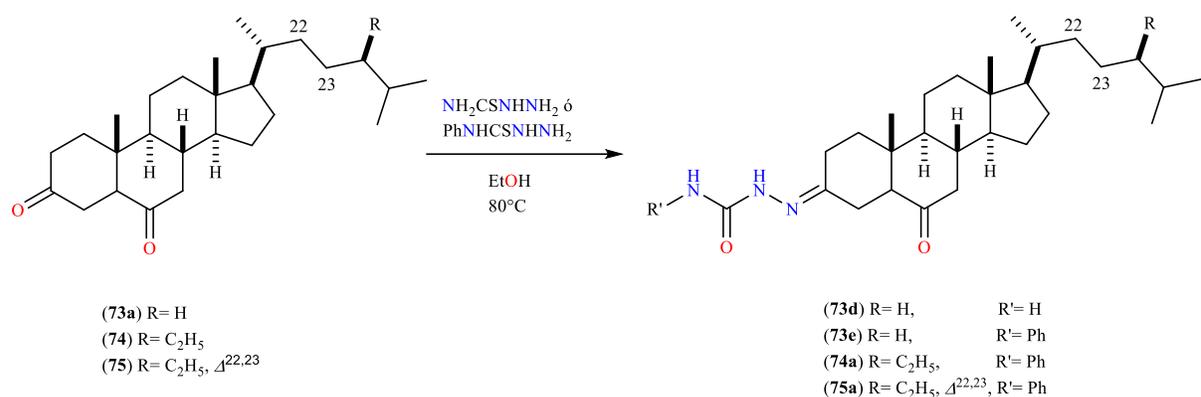
Las bases de Schiff son compuestos que contienen un grupo azometino ($R_2C=N-R$), que se forman por la condensación de una amina primaria con un compuesto carbonilo. Las bases de Schiff pueden usarse para identificar grupos carbonilo o amino, como grupos protectores o bien para la formación de ligantes en la química de coordinación. La presencia del grupo azometino es responsable de la estabilidad, reactividad y actividad biológica de las bases de Schiff (Arulmurugan *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2015; Perentena *et al.*, 2015).

La formación de bases de Schiff a partir de los esteroides ha sido abordado por el grupo de trabajo de Cui *et al.*, en 2009, donde describen la formación de las oximas a partir de colestanol (73), oxidando con PCC al hidroxilo para la formación de colestano-4-en-3,6-diona (73a) con rendimiento del 84%, como paso posterior empleando clorhidrato de hidroxilamina para la formación de las oximas (73b) y (73c), obteniendo rendimientos de 87% y 3% respectivamente (Esquema 6.3.3.1).



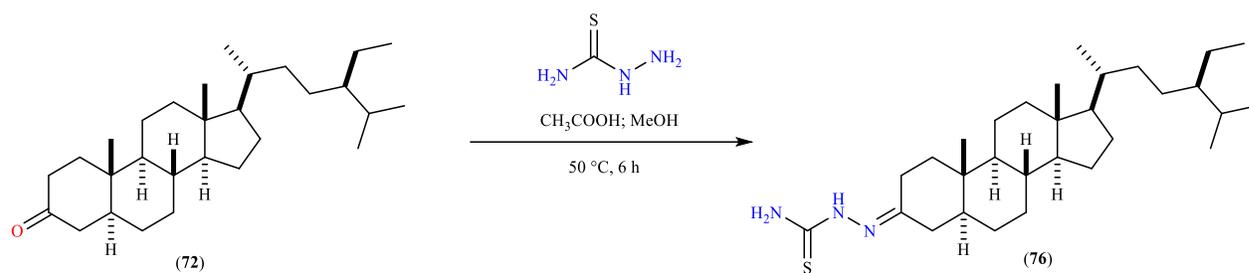
Esquema 6.3.3.1. Síntesis de oximas a partir de colestanol (73).

Gan *et al.*, en 2014 describen la formación una base de Schiff sulfurada a partir del colestano-3,6-diona (73a), donde emplean a la tiosemicarbazida en presencia de EtOH a 80 °C, obteniendo selectivamente la tiosemicarbazona (73d). Así mismo describen la formación de los derivados a partir de 73a, 74 y 75, donde se hicieron reaccionar con feniltiosemicarbazona para la obtención de nuevos derivados 73e, 74a y 75a (Esquema 6.3.3.2), los cuales mostraron actividad antiproliferativa *in vitro* contra carcinoma gástrico y de hígado.



Esquema 6.3.3.2. Síntesis de bases de Schiff sulfuradas a partir de núcleos esteroidales.

De acuerdo con lo anterior y al no encontrar reportes de la formación de bases de Schiff a partir de **72**, y teniendo en cuenta los antecedentes generados por nuestro grupo de trabajo en la preparación de este tipo de compuestos, se emplearon las siguientes condiciones de reacción para la formación de la tiosemicarbazona (**76**) (Esquema 6.3.3.3).



Esquema 6.3.3.3. Reacción para la derivatización de la tiosemicarbazona de estigmastano (**76**) a partir de 5α-sitostan-3-ona (**72**).

El producto de reacción se obtuvo 34.6 mg con 67.8 % de rendimiento en forma de un sólido ligeramente amarillo con p.f. 196-198 °C. En su análisis por espectroscopia de IR mostró: en 3409 cm^{-1} la banda de tensión para N-H, en 2055 cm^{-1} se ubica el modo vibracional correspondiente al C=S; se observa la banda de estiramiento en 1558 cm^{-1} característica de C=N, correspondientes al grupo tiosemicarbazona y adicionalmente se aprecia entre 1928-1865 cm^{-1} los modos de vibración de los C-H del esqueleto esteroidal.

En el análisis por RMN de ^1H se aprecia el mismo perfil de señales típico de los esteroides, adicionalmente se distinguen tres nuevas señales, en δ 8.74 una señal simple ancha que integra para el protón del NH; se observan en δ 7.23 y δ 6.33 las señales simples anchas correspondiente al NH_2 de la tiosemicarbazona (Figura 6.3.3.1).

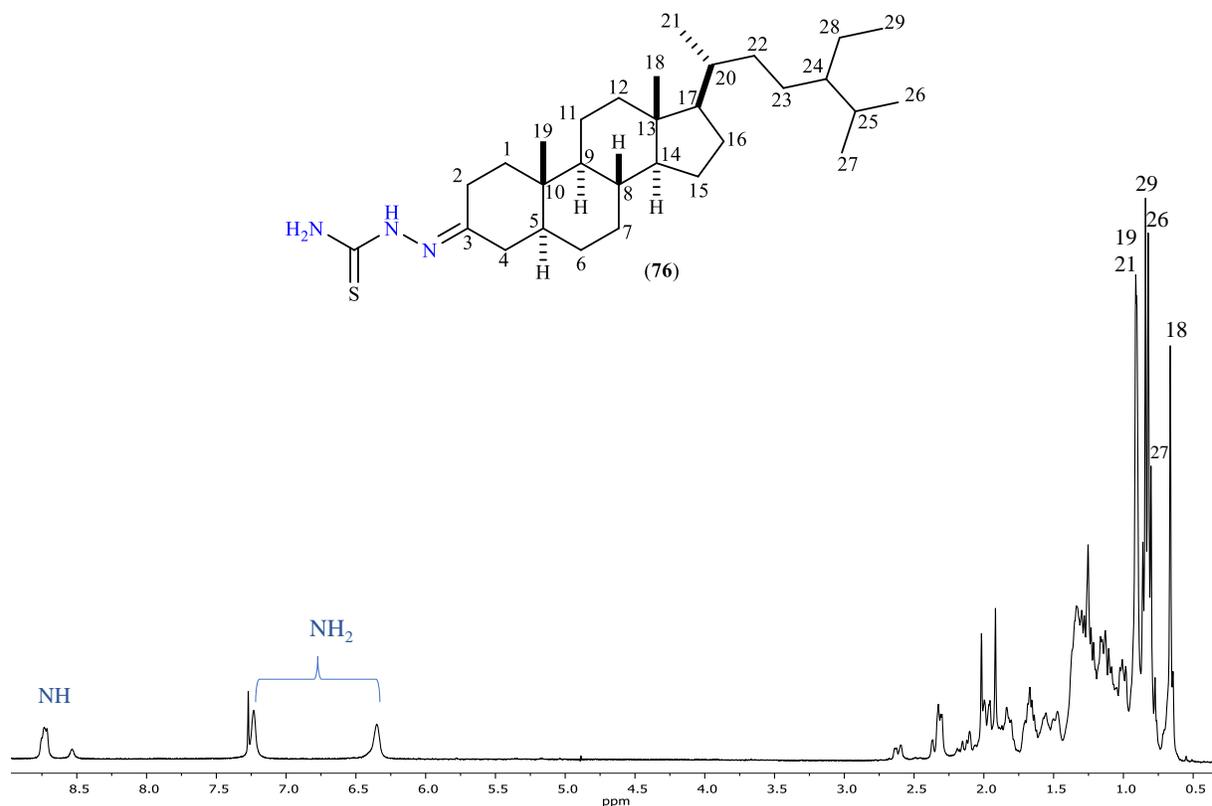


Figura 6.3.3.1. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de la tiosemicarbazona de estigmastano (**76**).

En su espectro de RMN de ^{13}C se aprecia en δ 178.4 el desplazamiento a frecuencias menores de la señal característica al C-3 ahora carbono imínico; adicionalmente se observa en δ 156.8 la señal correspondiente al tiocarbonilo (C=S), entre δ 57.0- δ 11.0 se distinguen el resto de las señales pertenecientes al esqueleto del estigmastano (Figura 6.3.3.2).

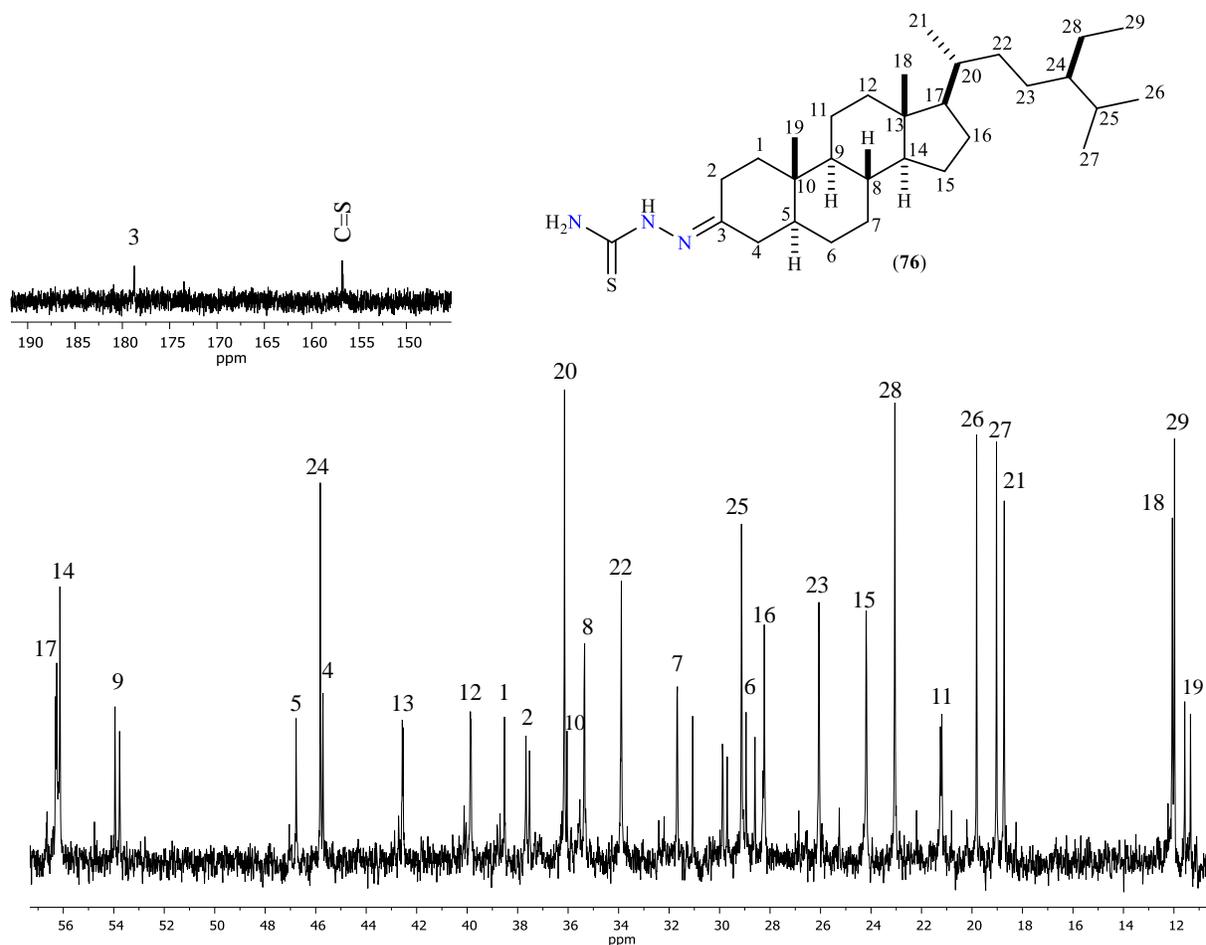


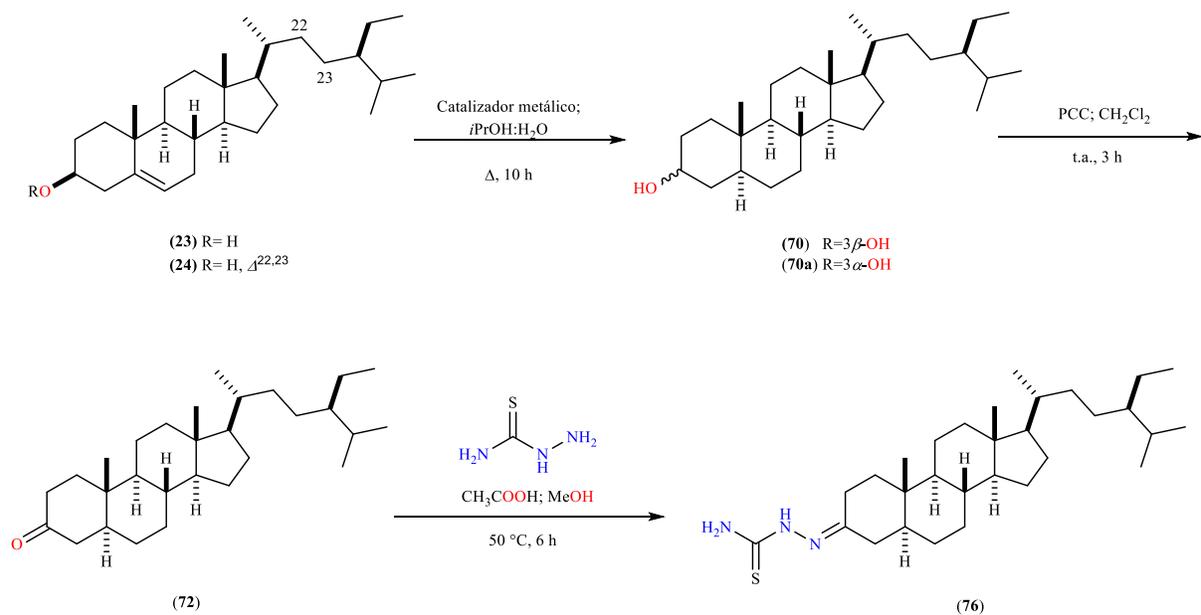
Figura 6.3.3.2. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 de la tiosemicarbazona de estigmastano (**76**).

Los datos obtenidos fueron comparados con los datos experimentales obtenidos para **72** respecto a los datos experimentales obtenidos una vez obtenida **76**, los cuales se enlistan en la Tabla 6.3.3.1.

Tabla 6.3.3.1 Desplazamientos de RMN de ^{13}C de la tiosemicarbazona de estigmastano (**76**).

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ Experimental (72)	$\delta^{13}\text{C}$ Experimental (76)
1	38.6	38.5
2	38.2	37.7
3	212.1	178.4
4	44.8	45.7
5	46.7	46.7
6	29.0	29.0
7	31.7	31.7
8	35.4	35.4
9	53.8	53.9
10	35.6	35.6
11	21.5	21.4
12	39.9	39.9
13	42.7	42.6
14	56.1	56.1
15	24.2	24.2
16	28.3	28.3
17	56.3	56.3
18	12.0	12.0
19	11.5	11.5
20	36.2	36.2
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	11.9	11.9
C=S	---	156.8

La semisíntesis de **76** se obtuvo en un total de tres etapas, obteniendo un rendimiento global de 47.4% (Esquema 6.3.3.4).



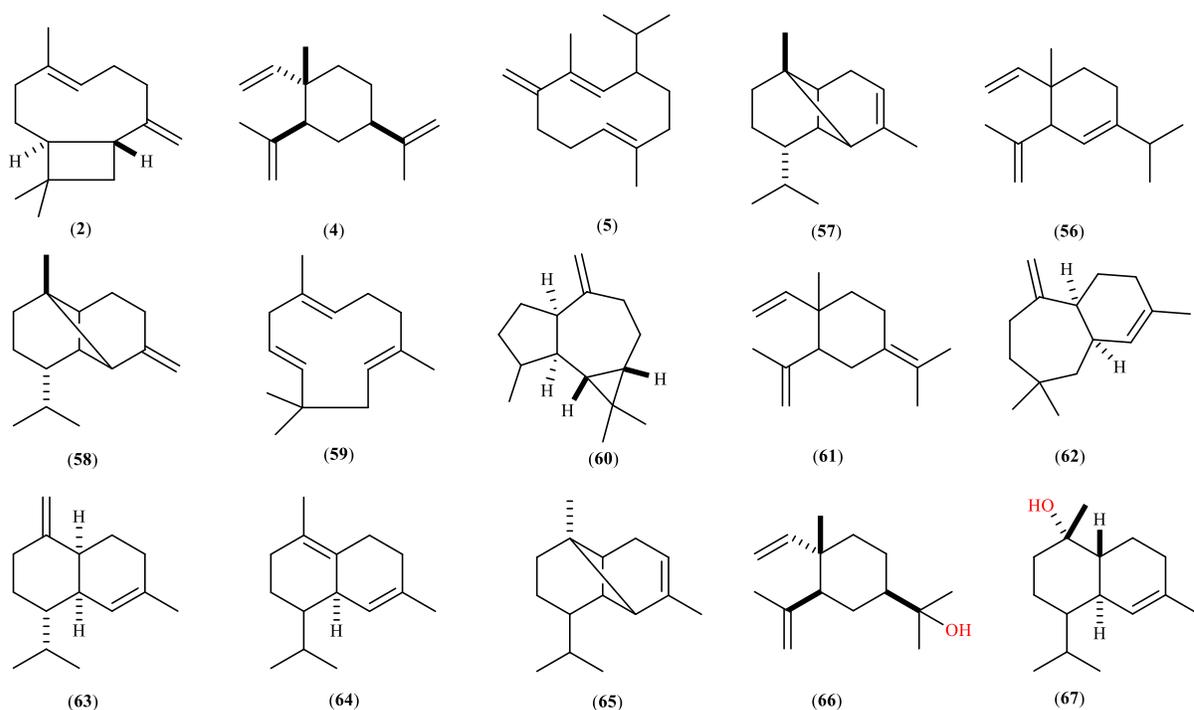
Esquema 6.4.3.4. Semisíntesis de tiosemicarbazona de estigmastano (**76**).

La formación de la tiosemicarbazona de estigmastano (**76**), permitirá evaluar su afinidad hacia ciertos centros metálicos, desde el punto de vista de la química de coordinación, estos compuestos pueden actuar como ligantes en la formación de complejos organometálicos. Desde el punto de vista biológico, es bien conocido que estos compuestos nitrogenados poseen propiedades bioactivas como antimicrobianos, antitumorales, anticonvulsivantes, antituberculosos, antivirales; aunado a la presencia de un núcleo esteroidal puede potenciar algunas de estas actividades.

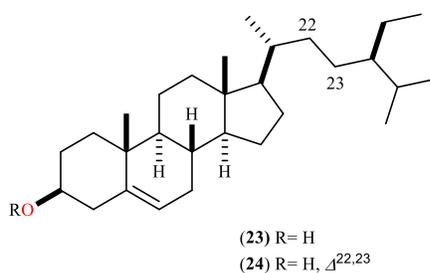
7. Conclusiones

El presente trabajo representa un avance importante en el estudio del género *Trixis*, así como de *Trixis michuacana* var. *longifolia* logrando explorar sus extractos apolares provenientes de las partes aéreas.

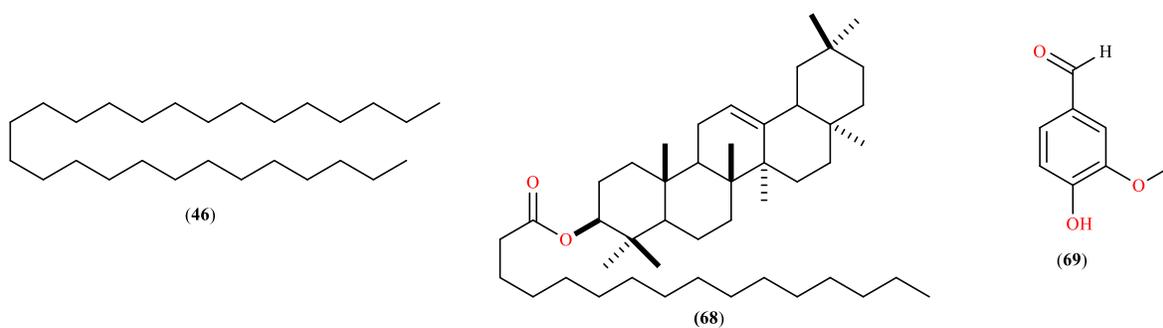
El análisis químico de los AEs de las partes aéreas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, constituye el primer reporte de la composición y naturaleza química de los AEs del género *Trixis*, identificando a los 15 principales componentes. Se determinaron tres quimiotipos presentes: germacreno, muuroleno y cariofileno, que están en función de los componentes mayoritarios; siendo predominantes los compuestos sesquiterpénicos.



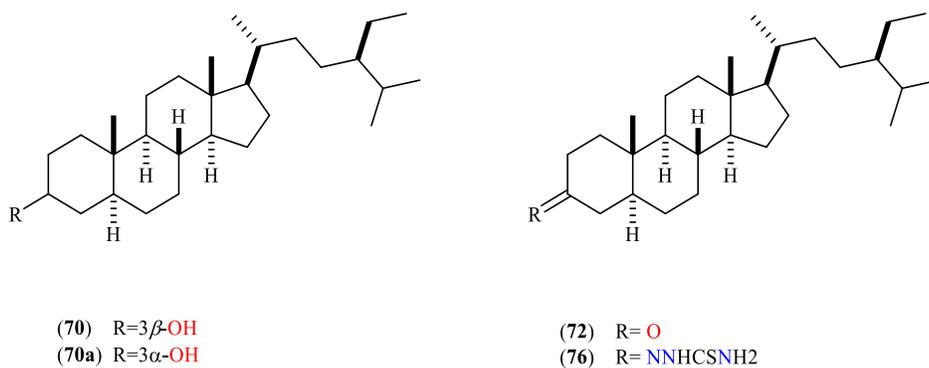
En el estudio de los extractos hexánicos de tallos y hojas se consiguió la purificación y caracterización de los esteroides: sitosterol (**23**) y estigmasterol (**24**) en proporción 2:1, respetivamente; siendo los metabolitos secundarios mayoritarios en el extracto de tallos y como componentes minoritarios en el extracto de hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*. Estos metabolitos serán considerados como posibles candidatos de la acción etnofarmacológica reportada para *Trixis michuacana* var. *longifolia*, ya que estos fitosteroides tienen una presencia notoria en sus extractos apolares.



Del estudio químico del extracto de CH_2Cl_2 de hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, se lograron purificar y caracterizar al heptacosano (**46**) alcano impar de cadena y al triterpeno esterificado palmitato de β -amirina (**68**). El estudio químico del extracto de CH_2Cl_2 de tallos de *Trixis michuacana* var. *longifolia* permitió el aislamiento y caracterización del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (**69**). Cabe destacar que esta la primera ocasión que se describen estos metabolitos para esta especie y género, lo cual constituye un resultado relevante a su quimiotaxonomía.



El estudio químico de los extractos apolares de la especie vegetal *Trixis michuacana* var. *longifolia*, permitió aislar y caracterizar a los esteroides **23** y **24**, como metabolitos mayoritarios de sus partes aéreas. Si bien estos metabolitos se aíslan en la mayoría de las especies vegetales, resultó interesante explorar su reactividad química para la obtención de los derivados **70**, **70a**, **72** y **76**.



Las condiciones de hidrogenación catalítica descritas por nuestro grupo de trabajo, permitió probar la reactividad de Δ^{5-6} y Δ^{22-23} presentes en los esqueletos esteroidales **23** y **24**, obteniendo a los productos hidrogenados **70** y **70a**, los cuales fueron reactivos frente a PCC formando la respectiva cetona **72**, producto clave en la obtención con tiosemicarbazida para la obtención de **76** siendo una estructura novedosa, donde el rendimiento global fue de 47.4%.

8. Parte experimental

8.1. Procedimientos generales

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros de RMN de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz, se midieron en un espectrómetro Varian Mercury Plus-400. Se empleó como disolvente al deuterocloroformo (CDCl_3) y como referencia interna al tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos se reportan en partes por millón (δ) y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Los espectros se procesaron el software MestReNova.

Los espectros de masa se obtuvieron en un aparato Thermo Scientific GC TRACE 1310 EM ISQ LT, operado en modo (70 eV), equipado con un inyector split/splitless (250 °C), utilizando una columna capilar TG-SQC Thermo Scientific [15 m x 0.25 mm (i. d.), espesor de película: 0.25 μm]. La temperatura de la columna TG-SQC fue de 50 °C (5 min) a 250 °C a una velocidad de 20 °C/min. Se empleo Helio como gas de elución a un caudal de 1 mL/min.

Los espectros de IR fueron colectados en un espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Nicolet iS10 empleando la técnica de ATR. Los datos se expresan en números de onda ($\nu \text{ cm}^{-1}$) para los máximos principales de absorción.

Para los procesos cromatográficos se empleó gel de sílice de malla 240-400 (Merck); así como columnas de vidrio de 1-5 cm de diámetro. Para dar seguimiento de la purificación de los metabolitos y reacciones se hicieron CCF empelando cromatofolios silica gel 60 F254 (Merck) se usaron UV y/o H_2SO_4 acuoso (30 %) como reveladores.

8.2. Material vegetal

La especie vegetal *Trixis michuacana* var. *longifolia* (D. Don) C. E. Anderson, fue colectada en la carretera Peribán-Los Reyes, Michoacán, México (19°55'63.9'' N, -103°39'86.1'' O) a 1640 msnm en el mes de noviembre; se trabajó con lotes del 2016 y 2017. Fue identificado por las profesoras Rosa Isabel Fuentes Chávez y Norma Patricia Reyes Martinez del EBUM, donde un ejemplar forma parte de la colección de plantas vasculares con número de folio 3640.

8.3. Análisis químico de *Trixis michuacana* var. *longifolia*

8.3.1. Análisis químico del AEs de hojas y flores de *Trixis michuacana* var. *longifolia*

Para la obtención de los AEs se sometieron 150 g de las partes aéreas frescas de *Trixis michuacana* var. *longifolia* a una extracción por arrastre de vapor, se agregó 1 L de agua destilada, esta extracción se llevó a cabo durante 2 h en un sistema Clevenger. Los AEs que son arrastrados por el vapor de agua, que al condensarse forma una mezcla de aceite esencial más agua. Para eliminar el excedente de agua se emplea una extracción líquido-líquido empleando CH₂Cl₂ (10 mL) en dos ocasiones, donde, debido a la diferencia de densidades, permite obtener la fase oleosa; con un rendimiento de 0.03%, los componentes principales de los AEs se describen en la Tabla 6.2.2.1

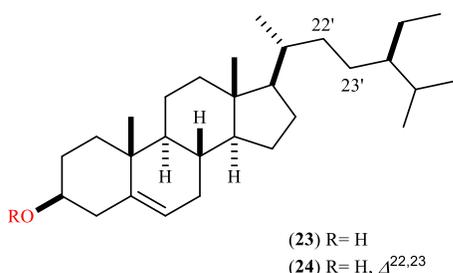
8.3.2. Obtención de extractos

Para la obtención de los extractos, se sometieron a maceración las partes aéreas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, ambas partes hojas (2.84 kg) y tallos (3.37 kg) se sometieron a maceración a temperatura ambiente por tres días, obteniendo los extractos con hexanos (5 L) y CH₂Cl₂ (7 L) haciéndolo en tres ocasiones. Los rendimientos de los extractos se muestran en la Tabla 6.2.2.1.

8.3.3. Estudio químico de los extractos hexánicos de hojas y tallos *Trixis michuacana* var. *longifolia*

El extracto hexánico de tallos (21.7 g), se sometió a un proceso cromatográfico empleando una columna de Ø= 4 cm empleando 6 in de gel sílice para obtener 15 fracciones de 100 mL en polaridad ascendente usando como eluyente mezclas de hexanos:AcOEt. De las fracciones 5 y 6 (6.7 g) obtenidas en hexanos:AcOEt (6:4) del extracto crudo se recromatografiaron en una columna de Ø= 3 cm empelando como fase estacionaria 6 in de gel sílice usando como fase móvil mezcla de hexanos:AcOEt (9:1) para la obtención de 120

fracciones de 2 mL. De las fracciones de 23-79 se obtuvo un compuesto cristalino de color verde, el cual tras sucesivos lavados con acetona se obtuvieron 170 mg de cristales incoloros con p.f. 136-138 °C.

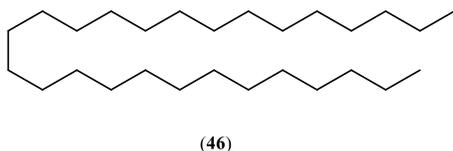


Sitosterol (23) y estigmasterol (24): RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 5.35 (2H, d, $J= 5.2$ Hz, H-6), δ 5.14 (1H, dd, $J= 15.1$ y 8.5 Hz, H-22'), δ 5.01 (1H, dd, $J= 15.1$ y 8.5 Hz, H-23'), δ 3.53 (2H, m, H-3), δ 1.01 (3H, s, H-19), δ 0.92 (6H, d, $J= 6.8$ Hz, H-21), δ 0.84 (6H, t, $J= 7.4$ Hz, H-29), δ 0.82 (6H, d, $J= 7.2$ Hz, H-26), δ 0.80 (6H, d, $J=$

7.2 Hz, H-26), δ 0.68 (6H, s, H-18). Datos de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): consulte la Tabla 6.2.3.1.

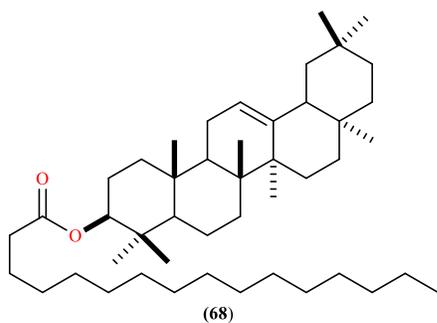
8.3.4. Estudio químico del extracto de CH_2Cl_2 de hojas de *Trixis michuacana* var. *longifolia*

El extracto de CH_2Cl_2 (28 g) se sometió a columna cromatográfica de $\varnothing= 5$ cm con 6 in de gel de sílice para la obtención de 15 fracciones de 100 mL, empleando como fase móvil mezclas de hexanos:AcOEt en polaridad ascendente. De la fracción 1 (481 mg) obtenida en hexanos:AcOEt (9:1) del extracto crudo, se precipito con acetona, lo cual llevo a la purificación de 27 mg de un sólido blanco.



Heptacosano (46): RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 1.25 (50 H, sa, H-2 a H-26), δ 0.88 (6H, t, $J= 6.3$ Hz, H-1 y H-27). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 31.4 (C-3, C-25), δ 29.2 (C-5 a C-23), 28.8 (C-4, C-24), δ 22.2 (C-2, C-26), δ 13.6 (C-1 y C-27). EMIE: m/z 380.4 $[\text{M}]^+$ (calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{56}$).

Continuando con el análisis del extracto de CH₂Cl₂ de hojas de la fracción 2 (2.8 g) obtenida en hexanos:AcOEt (9:1), fue sometido a cromatografía en columna de Ø= 2 cm con 6 in de gel de sílice; usando mezclas de hexanos:AcOEt (95:5) como fase móvil obteniendo 84 fracciones de 2 mL, de las fracciones 14-16 (226 mg), tras varios lavados con acetona llevó a la obtención de 16 mg de un sólido blanco ceroso con p.f. 114-116 °C.

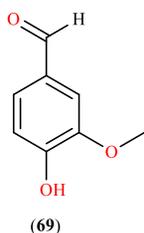


Palmitato de β -amirina (68): RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ : 5.18 (1H, t, J = 3.7, H-12), 4.50 (1H, dd, J = 8.4, 7.5 Hz, H-3), 2.29 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-2'), 1.25 (20H, sa, H-3'-H-13'), 1.13 (3H, s, H-27), 0.97 (3H, s, H-26), 0.96 (3H, s, H-25), 0.88 (18H, s, H-23, H-24, H-29, H-30, H-16'), 0.83 (3H, s, H-28). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃):

Consulte la Tabla 6.2.4.1. EMIE: m/z 662.7 [M]⁺ (calculado para C₄₆H₇₈O₂).

8.3.5. Estudio químico extracto de CH₂Cl₂ de tallo de *Trixis michuacana* var. *longifolia*

El extracto de CH₂Cl₂ (24.5 g) previamente desengrasado con MeOH, se sometió a una cromatografía en columna de Ø= 5 cm usando 6 in de gel sílice como soporte para la obtención de 15 fracciones de 100 mL empleando como eluyente mezclas de hexanos:AcOEt en orden ascendente de polaridad. La fracción 1 (1.2 g) obtenida en hexanos del extracto crudo se recromatografió para la obtención de 20 fracciones de 10 mL usando como fase móvil mezclas de hexanos:CH₂Cl₂ (9:1), de las fracciones 17-19 (170 mg) se sometió a un proceso cromatográfico empleando una columna de Ø= 1 cm con 6 in de gel sílice usando una polaridad hexanos:acetona (85:15) para la obtención de 90 fracciones de 0.5 mL, de la fracción 56-85 llevó obtención de 35 mg de cristales amarillos con aroma característico con p.f. 86-88 °C.

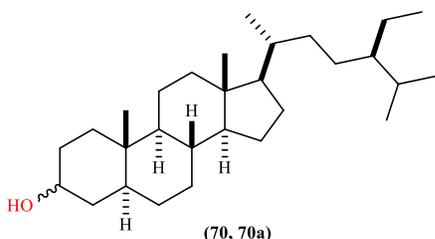


4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (70). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 9.83 (1H, s, H-7), δ 7.43 (1H, da, $J= 8.4$ Hz, H-5), δ 7.40 (1H, sa, H-2), δ 7.04 (1H, d, $J= 8.4$ Hz, H-6), δ 3.97 (3H, s, CH_3 -8). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): Consulte la Tabla. 6.2.5.1.

8.4. Estudio de la reactividad química de los metabolitos mayoritarios de *Trixis michuacana* var. *longifolia*.

8.4.1. Hidrogenación de la mezcla de sitosterol (23) y estigmasterol (24)

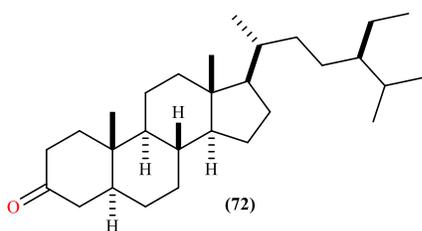
Para la obtención del derivado hidrogenado se colocan 25 mg del catalizador metálico con 100 mg de la mezcla de **23** y **24**, en *i*PrOH:H₂O (3:1 v/v). Se extrajo empleando 10 mL de hexanos (3 veces), lo que llevó a la obtención de 94.1 mg de un sólido blanco el cual presentó un p.f. 136-138 °C, el rendimiento fue el 94%.



5 α -sitostan-3-ol (70, 70a): RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 4.04 (1H, sa, H-3 α), δ 3.60 (1H, m, H-3 β), δ 0.90 (6H, d, $J= 6.4$ Hz, H-19 y H-19') δ 0.64 (6H, s, H-18 y H-18'), δ 0.86 (6H, s, H-21 y H-21'), δ 0.84 (6H, t, $J= 7.2$ Hz, H-29 y 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'). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): Consulte la Tabla 6.3.1.1. EMIE: m/z 416 $[\text{M}]^+$ (Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{52}\text{O}$) (Ver Anexos).

8.4.2. Preparación de la 5 α -sitostan-3-ona (72) a partir de 5 α -sitostan-3-ol (70, 70a)

Para la obtención de **72** se hicieron reaccionar 94.1 mg (1 Eq) de sitostanol (**70, 70a**) con 122 mg (2.5 Eq) de PCC, en 4 mL de CH_2Cl_2 como disolvente, en agitación por 4 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se extrajo filtrando el crudo de reacción por columna cromatográfica de 2 cm con 3.5 in de gel sílice, lo que condujo a la obtención de 74.8 mg un sólido ligeramente amarillo de p.f. 126-128 °C con 74.4% de rendimiento.

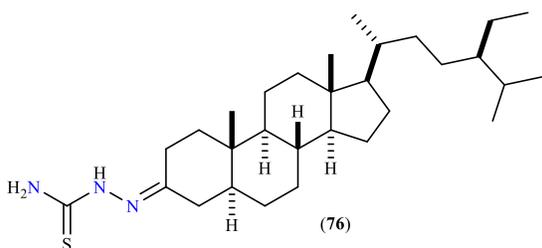


5 α -sitostan-3-ona (72): RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 1.01 (3H, s, H-19), δ 0.92 (3H, d, $J= 6.5$ Hz, H-21), δ 0.86 (3H, t, $J= 7.6$ Hz, H-29), δ 0.85 (3H, d, $J= 7.2$ Hz, H-26), δ 0.83 (3H, d, $J= 6.8$ Hz, H-27), δ 0.68 (3H, s, H-18). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): consulte la Tabla 6.4.2.1. EMIE:

m/z 415 $[\text{M}]^+$ (calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{51}\text{O}$). IR_{vmax} 1715 cm^{-1} ($\text{C}_3=\text{O}$) (Ver Anexos).

8.4.3. Obtención de la tiosemicarbazona de estigmastano (76) a partir de la 5 α -sitostan-3-ona (72)

Se hicieron reaccionar 51 mg (1 Eq) de **72** con 16.8 mg (1.5 Eq) de tiosemicarbazida, empleando 6 mL de MeOH como solvente y 0.01 mL de CH_3COOH como catalizador. La reacción se dejó en agitación y reflujo constante por 6 h. Una vez transcurrido este tiempo se enfrió, posteriormente se evaporó el disolvente a presión reducida obteniéndose 34.6 mg de un precipitado ligeramente amarillo con p.f. 196-198 $^\circ\text{C}$ en 67.8% de rendimiento.



Tiosemicarbazona de estigmastano (76): RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 8.73 (1H, sa, NH), δ 7.22 (1H, sa, NH_2), δ 6.34 (1H, sa, NH_2), δ 0.92 (3H, s, H-19), δ 0.92 (3H, s, H-21), δ 0.86 (3H, t, $J= 7.6$ Hz, H-29), δ 0.85 (3H, d, $J= 7.2$ Hz, H-26),

δ 0.83 (3H, d, $J= 6.8$ Hz, H-27), δ 0.68 (3H, s, H-18). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): Consulte la Tabla 6.4.3.1. IR_{vmax} 3409 cm^{-1} (N-H), 2055 cm^{-1} (C=S), 1558 cm^{-1} (C=N) (Ver Anexos).

9. Bibliografía

- Ajikumaran N. S., Sabulal B., Radhika J., Arunkumar R., Subramoniam A. (2014). Promising anti-diabetes mellitus activity in rats of β -amyrin palmitate isolated from *Hemidesmus indicus* roots. *European journal of Pharmacology*. 734, 77-82.
- Anderson C. (1972). A monograph of the Mexican and Central American species of *Trixis* (Compositae). *Memories New York Botanical Garden*. 22(3), 1-68.
- Arago F. G., de Moraes Filho O. M., Bandeira N. P., Frota P. A., de Oliveira Y. I., Alves B. C., de Moraes M. E. (2018). Monoaminergic involvement in decreased locomotor activity of mice treated with α and β -amyrin from *Protium heptaphyllum*. *Natural Product Communications*. 13 (8), 935-938.
- Babushok V. I., Linstrom P. J., Zenkevich I. G: (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 40 (4), 1-47.
- 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* (Ulmaceae) y *Fraxinus americana* (Oleaceae) en Tandil, Buenos Aires, Argentina. *Darwiniana*. 44 (1), 58-63.
- Baulies R. M. G., Martín L. A., Roig G. I. (2009). ¿Qué pasa con las plantas medicinales? *Atención Primaria*. 41 (10), 584.
- Bermejo J. (2000). La farmacia moderna está en los productos naturales. *Revista Académica Colombiana de Ciencias*. 24 (92), 441-447.
- Bohlmann F., Suwita A., Jakupovic J., King M.R., Robinson H. (1981). Trixikingolides and germacrene derivatives from *Trixis* species. *Phytochemistry*. 20 (7), 1649-1655.
- Bohlmann F., Zdero C. (1979). On a New Group of Sesquiterpene lactones from the Genus *Trixis*. *Chemistry Berlin*. 112, 435-444.

- Chávez M. M. C., White O. L., Moctezuma P. S., Herrera T. F. (2017). Prácticas curativas y plantas medicinales: un acercamiento a la etnomedicina de San Nicolás, México. *Cuadernos Geográficos*. 56 (2), 26-47.
- Ching K. I., Chung K. L., Yuen H. K., Jian Z. C., Guang Z. S. (2004). New prenylated flavones from the roots of *Ficus beecheyana*. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 51, 437-441.
- Cilia L. V. G., Cariño C. R., Zurita S. L.R. (2021). Ethnopharmacology of the Asteraceae family in México. *Botanical Sciences*. 99 (3), 455-486.
- Crespo I., Domínguez O., Baricelli P., Borusiak M., Omaña O., Rosales M. (2020). Hydrogenation of olefins with ruthenium nanoparticles stabilized in ionic liquids. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*. 40 (1), 3-14.
- Croteau R., Davis E. M., Hartman T., Hemscheidt T., Sanz-Cervera J. F., Williams R. M., Lepper F. J., Vederas C. J. (2003). Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. *Biosynthesis: aromatic polyketides, isoprenoids, alkaloids*. 209, 72-82.
- Cui J., Huang L., Fan L., Zhou A. (2008). A facile and efficient synthesis of some (6E)-hydroximino-4-en-3-one steroids, steroidal oximes from *Cinachyrella* spp. Sponges. *Steroids*. 73, 252-256.
- De la Guerra M. M., Mazzei A. A., Nobrega C. J., Sabbatini C. R., Cerqueira L. C. (2013). Straightforward synthesis of 2,2,4,4,5,7,7-d₇-Cholestane: a new deuterated standard in petroleum analysis. *Química Nova*. 36 (8), 1160-1163.
- De Riscalca C. E., Catalán N. C., Legname R. P., Gutiérrez B. A., Herz W. (1989). Trixanolide and Germacatriene derivatives from *Trixis grisebachii*. *Phytochemistry*. 28 (8), 2155-2161.
- De Riscalca C. E., Catalán N.C., Sosa E. V., Gutiérrez B. A., Herz W. (1988). Trixane derivatives from *Trixis praestans*. *Phytochemistry*. 27 (7), 2343-2346.

- Gamboa R. A. (1999). Uso tradicional de la flora en tres comunidades de Cuquío, Jalisco y propiedades colorantes de algunas especies. Tesis de Licenciatura. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara, Jalisco.
- Gan C., Cui J., Su S., Lin Q., Jia L., Fan L., Huang Y. (2014). Synthesis and antiproliferative activity of some steroidal thiosemicarbazones, semicarbazones and hydrazones. *Steroids*. 87, 99-107.
- Granato M. E., Granato M. M., Gerenutti M., Glauze S. M., Onishi F. H., Duarte C. M. (2013). Fitochemical screening of plant species *Trixis antimenorrhoea* (Shrank) Kuntze. *Brazilian Journal of Pharmacy*. 94 (2), 120-135.
- Herrera S. 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, Michoacán.
- Ives D. A. J., O'Neill A. N. (1958). The chemistry of Peat. Part 1. The sterols of peat moss (*Sphagnum*). *Canadian Journal of Chemistry*. 36, 434-439.
- Katinas L. (1996). Revisión de las especies Sudamericanas del Género *Trixis* (Asteraceae, Mutisieae). *Darwiniana*. 34 (1-4), 27-108.
- Katinas L., Gutiérrez D. G., Grossi A. M., Crisci V. J. (2007). Panorama de la familia Asteraceae (= Compositae) en la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Botánica de Argentina*. 42 (1-2), 113-129.
- Katowicz C., Hernández R. L., García-Rojas C. M., Villecco B. M., Catalán N. C., Joseph N. P. (2001). Absolute Configuration of Trixanolides from *Trixis pallida*. *Journal of Natural Products*. 64(10): 1326-1331.
- Kazemeini F., Asri Y., Mostafavi G., Kalvandi R., Mehregan I. (2020). Chemical compositions of the essential oils from Iranian populations of *Rhabdosciadium aucheri* Boiss. (Apiaceae). *Natural Product Research*. 1-6.

- Kipkemei A. S. (2017). Isolation of stigmasterol, α -amyrin acetate and lupeol acetate from *Tabernaemontana stapfiana* Britten. *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 8 (11), 1331-1335.
- Kyselka J., Honzíkova T., Váchalová T., Jirásková T., Alishevich K., Rottnerová Z., Brychová V., Bercíková M., Hrádková I., Filip V. (2019). Formation of 5α -Sitostan-3one, 5α -campestan-3-one, and Steroidal Hydrocarbons in Edible Oils during Catalytic Hydrogenation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 67, 9916-9925.
- Lim J., Ishiguro K., Kubo I. (1999). Tyrosinase Inhibitory p-Coumaric Acid from Ginseng Leaves. *Phytotherapy Research*. 13, 371-375.
- Luo R. J., Ma Y. Q., Zhao X. Y., Yi M. T., Li Sen C., Zhou J. (2009). Paleophytochemical components from the Miocene-fossil wood of *Pinus griffithi*. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 56, 600-605.
- Magaña A. A., Gama C. L., Mariaca M. R. (2010). El uso de las plantas medicinales en las comunidades Maya-Chontales de Nacajuca, Tabasco, México. *Polibotánica*. 29, 213-262.
- Mäki A. P., Simakova M. G., Tokarev A., Wärna J., Hemming J., Holmbom B., Salmi T., Murzin Y. D. (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, 45-51.
- Maldonado M. E., Salamanca E., Giménez A., Saavedra G., Sterner O. (2014). Antileishmanial metabolites from *Trixis antimenorrhoea*. *Phytochemistry Letters*. 10, 281-286.
- Marín M., Arroyo J., Bonilla P. (2003). Efecto de fracciones lipídicas de *Lepidium meyenii* Walpers “Maca”, en el aparato reproductor de ratones. *Ciencia e Investigación*. 6 (1), 9-18.
- Marrero P. Y., Barige J. S., Jorge R. E. M, Tran T. T. (2017). QSRR prediction of gas chromatography retention indices of essential oil components. *Chemistry Papilla*. 72, 57-69.

- Mockute D., Bernotiene G., Judzentiene (2003). The essential oil of the aerial parts of cultivated *Origanum vulgare* L. in Lithuania. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 6(2), 119-115.
- Nakijama S., Okamura A., Takeda T., Iwasa J., Baba S. (1997). Ketosteroids as arrestants to *Oryzaephilus surinamensis* (L.) from wheat flour infested by the same weevil. *Scientific reports of the Faculty of Agriculture Okayama University*. 86, 7-11.
- Nurhamidah, Nurdin H., Manjang Y., Dharma A., Suryati. (2016). Isolation and characterization of β -amyrin palmitate from fruit of *Ficus aurata* (Miq.) Miq. *Journal of chemical and Pharmaceutical Research*. 8 (4), 677-679.
- Ododo M. M., Kumar C. M., Dekebo H. A. (2016). Structure elucidation of β -sitosterol with antibacterial activity from the root bark of *Malva parviflora*. *SpringerPlus*. 5 (1210), 1-11.
- Okoro S. I., Tor A. T., Ogbaji I. J., Noundou S. X., Macedo K. W. (2017). Isolation and carcterisation of Stigmasterol and β -sitosterol from *Anthocleista djalonensis* A. chev. *Asian Journal of Chemical Sciences*. 3 (4), 1-5.
- Pazouki L., Memari R. H., Kännaste A., Bichele R., Niinements Ü. (2015). Germacrene A synthase in yarrow (*Achillea millefolium*) is an enzyme with mixed substrate specificity: gene cloning, functional characterization and expression analysis. *Frontiers in plant science*. 6 (111), 1-15.
- Qu C., Schneider I. B., Kersley A. J., Keyrouz W., Allison C. T. (2021). Predicting Kováts retention indices using graph neural networks. *Journal of Cromatography A*. 1646, 1-9.
- Quintana A., Reinhard J., Faure R., Uva P., Bagnères G. A., Massiot G., Clement L. J. (2003). Interspecific variation in terpenoid composition of defense secretions of European *Reticulitermes* Termites. *Journal of Chemical Ecology*. 29 (3), 639-652.
- Racovita R. C., Jetter R. (2016). Identification of in-chain-functionalized compounds and methyl-branched alkanes in cuticular Waxes of *Triticum aestivum* cv. Bethlehem. *PLoS ONE*. 11(11), 1-25.

- Redonda M. R. (2018). Tratamiento de la Tribu Mutisieae (Asteraceae) en México. *Acta Botánica Mexicana*. 123, 121-166.
- Reza M. M., Maggi F., Tavakoli N. H., Soleimani A. M. (2018). Sumac (*Rhus coriaria* L.) fruit: Essential oil variability in Iranian populations. *Industrial Crops & Products*. 111, 1-7.
- Ribeiro A., Piló V. D., Howarth O., Zani C. L. (1999). A new Cyclohexadecane Derivate from *Trixis vauthieri* DC (Asteraceae). *Organic Letters*. 1(12), 1897-1900.
- Ribeiro A., Piló-Veloso D. (1997). Trypanocidal flavonoids from *Trixis vauthieri*. *Journal of Natural Products*. 60 (8), 836-838.
- Rinkel J., Dickschat J. (2019). Addressing the Chemistry of Germacrene A by isotope labeling experiments. *Organic letters*. 27 (7), 2426-2429.
- Ritter S. K. (1984). Metabolism of Δ^0 -, Δ^5 -, and Δ^7 -Sterols by Larvae of *Heliothis zea*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 1, 281-296.
- 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.965-966.
- Sales-Junior P. A., Leomar Z. C., Pessoa de Siqueire E., Kohlhoff M., Marques R. F., Portes-Calderia A. S., Barros-Cota B., Bueno-Maia D. N., Guimaraes-Tunes L., Fonseca-Murta S. M., Almeida-Alves T. M. (2019). Trypanocidal Trixikingolides From *Trixis vauthieri*. *Natural Product Research*. 35 (16), 2691-2699.
- Setzer N. W. (2008). Ad initio analysis of the Cope rearrangement of germacrene sesquiterpenoids. *Journal of Molecular Modeling*. 14 (5), 335-342.
- Sifuentes P. G, León V. S., Paucar M. L. M. (2015). Estudio de la Maca (*Lepidium meyenii* Walp.), cultivo andino con propiedades terapéuticas. *Scientia Agropecuaria*. Universidad Nacional de Trujillo, Perú. 6 (2), 131.140.
- Subarnas A., Tadao T., Nakahata N., Arai Y., Kinemuchi H., Oshima Y., Kisara K., Ohizumi Y. (1993). A possible mechanism of antidepressant activity of beta-amyrin palmitate

- isolated from *Lobelia inflata* leaves in the forced swimming test. *Life Sciences*. 52 (3), 289-296.
- Ubierno P., Lapp M., Torrecilla P. (2009). Morfología del polen de especies de *Gongylolepis* (Mutisieae: Asteraceae) de la Guyana venezolana. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 66 (1), 93-107.
- Vargas A. G., Castro C. A., Harker M., Villaseñor J. L., Ortiz E., Rodríguez A. (2013). Distribución geográfica y riqueza del género *Cosmos* (Asteraceae: Coreopsidae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 94, 536-555.
- Villareal J. A., Estrada C. E. (2014). Flora de Veracruz: Asteraceae Tribu Mutisieae. Instituto de Ecología A.C., Xalapa, Veracruz. 162, 1-34.
- Wang Y., Zhang J., He F., Gan X., Song B., Hu D. (2019). Design, synthesis, bioactivity and mechanism of dithioacetal derivatives containing dioxyether moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 29, 2218-2223.
- Xavier B. R. A., Machado S. M. (2010). *Trixis forzzae* (Compositae: Mutisieae), a new species from Minas Gerais, Brazil. *Kew Bulletin*. 65 (1), 65-68.
- Yadav R.N.S., Agarwala M. (2011). Phytochemical analysis of some medical plants. *Journal of Phytology*. 3 (12), 10-14.
- Zhang D., Yang H., Wang X., Qiu Y., Tiam L. Qi X., Qing Q. L. (2019). Cytochrome P450 family member CYP96B5 hydroxylates alkanes to primary alcohols and is involved in rice leaf cuticular wax synthesis. *New Phytologist Trust*. 225, 2094-2107.

10. Anexos

10.1. Espectros de Infrarrojo (IR) de los derivados preparados a partir de 23 y 24.

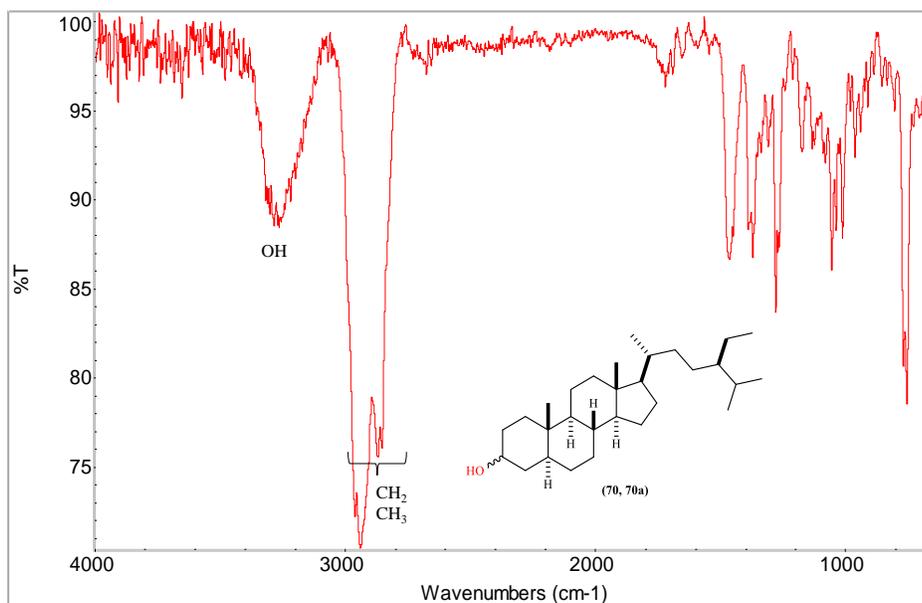


Figura 10.1.2. Espectro de IR del 5 α -sitostan-3 β -ol (70) y 5 α -sitostanol-3 α -ol (70a).

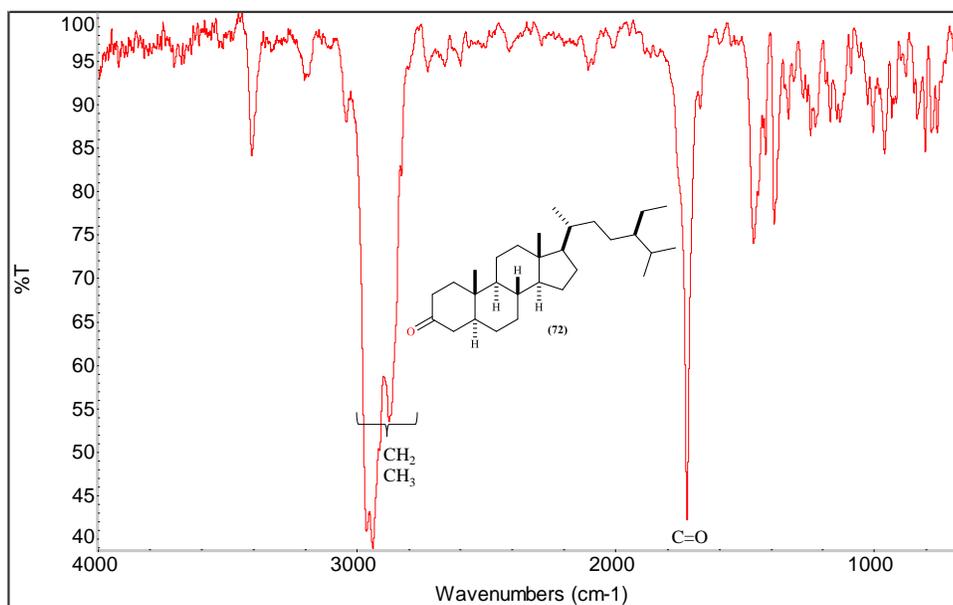


Figura. 10.1.3. Espectro de IR de la 5 α -sitostan-3-ona (72).

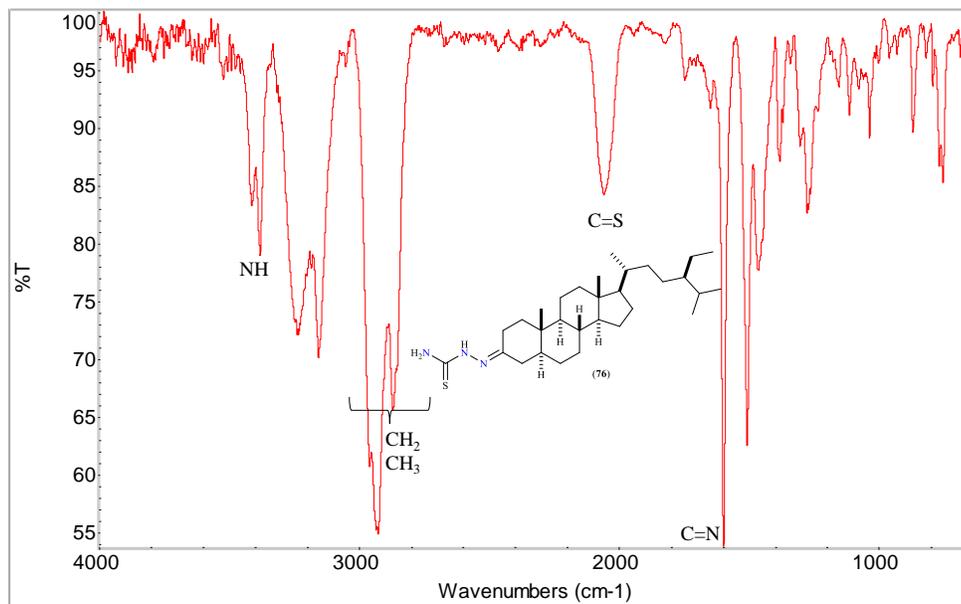


Figura 10.1.4. Espectro de IR de la tiosemicarbazona de estigmastano (76).

10.2. Análisis EM de los derivados a partir de 23 y 24.

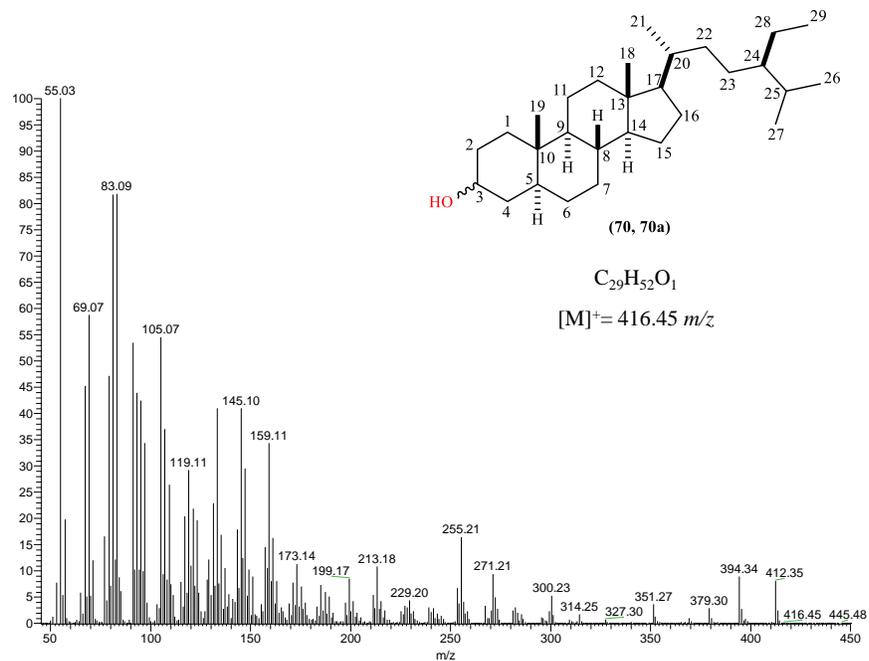


Figura 10.2.1. Espectro de masa del 5 α -sitostan-3 β -ol (70) y 5 α -sitostanol-3 α -ol (70a).

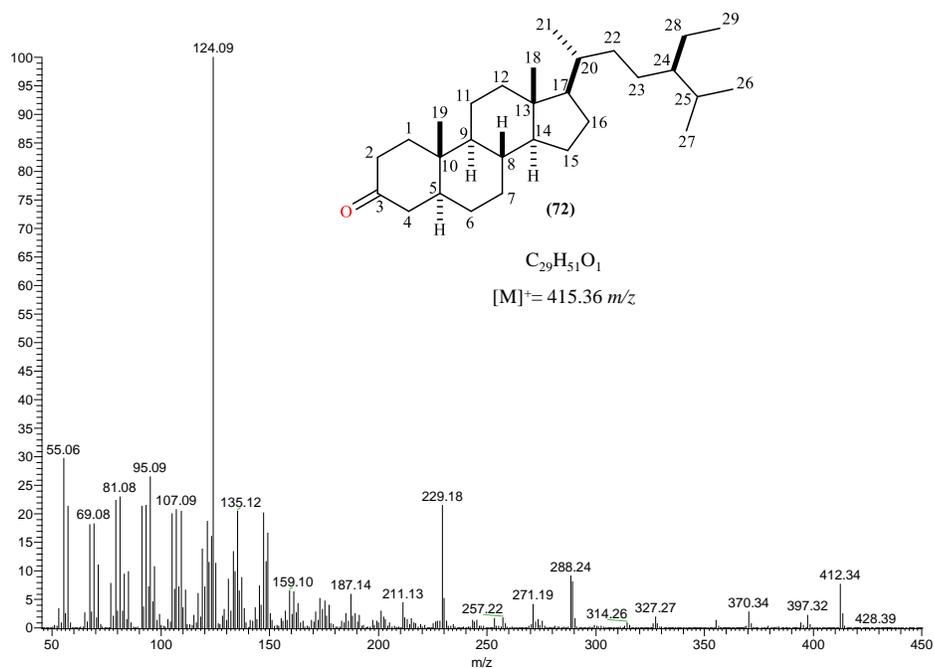


Figura 10.2.1. Espectro de masa de la 5 α -sitostan-3-ona (72).