

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS, MENCIÓN QUÍMICA

Síntesis de nuevos análogos de brasinoesteroides del tipo 2-desoxi con cadena lateral 24-nor-22(R/S), 23-dihidroxi-5 α -colánicos y sus efectos hormonales en crecimiento de plantas.

Lic. Jocelyn Ester Oyarce Asencio

Magíster en Ciencias, mención Química.

Octubre de 2023

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS,
MENCIÓN QUÍMICA

Síntesis de nuevos análogos de brasinoesteroides del tipo 2-desoxi con cadena lateral 24-nor-22(R/S), 23-dihidroxi-5 α -colánicos y sus efectos hormonales en crecimiento de plantas.

Tesis de Grado presentada por

Lic. Jocelyn Ester Oyarce Asencio

Como requisito parcial para optar al grado de

Magíster en Ciencias, mención Química.

Profesor Guía
Dr. Luis Espinoza Catalán

Octubre de 2023

PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS,
MENCIÓN QUÍMICA.

TÍTULO DE LA TESIS:

Síntesis de nuevos análogos de brasinoesteroides del tipo 2-desoxi con cadena lateral 24-nor-22(R/S), 23-dihidroxi-5 α -colánicos y sus efectos hormonales en crecimiento de plantas.

AUTOR:

Lic. Jocelyn Ester Oyarce Asencio

TRABAJO DE TESIS, presentado en cumplimiento parcial de los requisitos para el Grado de Magíster en Ciencias, mención Química de la Universidad Técnica Federico Santa María.

Dra. Katy Díaz Peralta

Dr. Lautaro Taborga Morales

Dra. Waleska Vera Quezada

Dr. Luis Espinoza Catalán

Valparaíso, Chile. Octubre de 2023

Agradecimientos:

Durante el período de formación de magister, pude recibir el apoyo y la ayuda de algunas personas. A través de estas líneas les expreso mis agradecimientos.

Al Dr. Luis Espinoza Catalán, quien dirigió la presente tesis, por su constante apoyo en el desarrollo de este trabajo. Agradezco su confianza, enorme colaboración, gran paciencia, el tiempo dedicado, sus orientaciones y consejos. También porque me hizo partícipe de su proyecto FONDECYT 1160446 *“Synthesis of new brassinosteroids analogs from hyodeoxycholic acid. Evaluation of their potential application, in free and encapsulated forms, as growth promoters and for drought stress mitigation in plants”* y además me abrió las puertas de su laboratorio de investigación “Laboratorio de síntesis orgánica del Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María”.

A los profesores miembros de la comisión, Dra. Katy Díaz Peralta, Dr. Lautaro Taborga Morales, Dra. Waleska Vera Quezada, por aceptar gratuitamente participar en este proceso, por sus aportes al desarrollo y finalización de esta tesis.

A la Universidad Técnica Federico Santa María, por el financiamiento de mis estudios de magister.

Un especial reconocimiento a la Dra. Carolina Manzur, quien muy generosamente, me permitió desarrollar parte de la sección experimental en su laboratorio, lugar donde trabajo desde el año 2011, Laboratorio de Química Inorgánica del Instituto de Química de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

A la Dra. Katy Díaz, por su trabajo y dedicación para realizar los estudios biológicos.

Al Lic. Cesar González, por su dedicación, trabajo, consejos muy valiosos en el desarrollo experimental.

Finalmente, los más importantes, a mi familia, principalmente a mis padres Edith Asencio y Luis Oyarce (Q.E.P.D.), que siempre me apoyaron y me estimularon a ser cada día mejor, a mi hermano Sebastián Oyarce por su increíble complicidad, apoyo, compañía y comprensión.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
SUMMARY	3
CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Antecedentes generales sobre hormonas y reguladores del crecimiento vegetal.....	5
1.2 Brasinoesteroides.....	8
1.3 Relación estructura-actividad relativa de los brasinoesteroides.....	10
HIPÓTESIS.....	21
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo General.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
CAPÍTULO 3 - METODOLOGÍA.....	23
3.1 Síntesis químicas.....	23
3.2 Evaluaciones biológicas.....	26
3.2.1 Material vegetal.....	26
3.2.2. Test de inclinación de la lámina de arroz.....	26
CAPÍTULO 4 - PARTE EXPERIMENTAL.....	27
4.1 Materiales y Equipos: Síntesis orgánica.....	27
4.1.1 Solventes.....	27
4.1.2 Insumos.....	27
4.1.3 Reactivos.....	28
4.1.4 Cromatografía en capa fina.....	28
4.1.5 Cromatografía en columna.....	29
4.2 Instrumentos y Equipos.....	29
4.3 Materiales y equipos: biológicos.....	30
4.4 Abreviaturas generales.....	30
4.5 Abreviaturas en resonancia magnética nuclear.....	31
4.6 Abreviaturas en espectroscopia infrarrojo.....	32
4.7 Abreviaturas en espectrometría de masas.....	32
4.8 Síntesis químicas.....	32
4.9 Evaluaciones Biológicas.....	41
CAPÍTULO 5 - RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	43
5.1 Resultados y Discusiones parte Química.....	43

5.2 Resultados y Discusiones parte Biológica.....	55
CAPÍTULO 6 – CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS.....	62
ANEXOS	700
Compuesto: 3 α , 22(S), 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (62)	
Espectro de ¹ H-RMN (62)	700
Espectro de ¹³ C-RMN(62)	70
Compuesto: 3 α , 22(R), 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (73)	
Espectro de ¹ H-RMN (73)	701
Espectro de ¹³ C-RMN(73).....	71
Espectro de ¹³ C-RMN DEPT-135(73).....	72
Espectro de ¹ H- ¹³ C 2D HSQC (73).....	72
Espectro de ¹ H- ¹³ C 2D HMBC (73).....	73
Espectro de HMRS ESI (73)	73
Compuesto: 3 α -acetoxi-24-nor-5 α -22-colen-6-ona (77)	
Espectro de ¹ H-RMN (77).....	74
Espectro de ¹³ C-RMN(77)	74
Compuesto: 3 α -acetoxi-22(S), 23-dihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (78b)	
Espectro de ¹ H-RMN (78b).....	75
Espectro de ¹³ C-RMN(78b).....	75
Compuesto: 3 α -acetoxi-22(R)-hidroxi-23-benzoiloxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (79)	
Espectro de ¹ H-RMN (79).....	76
Espectro de ¹³ C-RMN (79)	76
Espectro de ¹³ C-RMN DEPT-135 (79)	77
Espectro de ¹ H- ¹³ C 2D HSQC (79)	77
Espectro de ¹ H- ¹³ C 2D HMBC (79)	78
Espectro de HMRS ESI (79)	78
Compuesto: 3 α -acetoxi-22(S)-hidroxi-23-benzoiloxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (80)	
Espectro de ¹ H-RMN (80)	79
Espectro de ¹³ C-RMN(80)	79
Compuesto: 3 α -acetoxi-22(S)-23-dibenzoiloxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (83)	
Espectro de ¹ H-RMN (83)	80
Espectro de ¹³ C-RMN (83)	80
Espectro de ¹³ C-RMN DEPT-135 (83)	81
Espectro de ¹ H- ¹³ C 2D HSQC (83)	81
Espectro de ¹ H- ¹³ C 2D HMBC (83)	82
Espectro de HMRS ESI (83)	82
Compuesto: 3 α -acetoxi-22(S)-23-dibenzoiloxi-24-nor-5 α -colan-7-oxolactona (85)	
Espectro de ¹ H-RMN (85)	83
Compuesto: 3 α -acetoxi-22(S)-23-dibenzoiloxi-24-nor-5 α -colan-6-oxolactona (86)	
Espectro de ¹ H-RMN (86)	84

RESUMEN

Los brasinoesteroides (BRs) son considerados una clase de hormona vegetal que se caracteriza por promover el crecimiento de las plantas y la protección contra el estrés biótico y abiótico que las afectan, donde brasinolida (BL) (**1**) (*Figura 1*) fue la primera encontrada en forma natural y se destaca, porque es la primera hormona con núcleo esteroidal, capaz de promover el crecimiento de las plantas, entre otros efectos. Desde el descubrimiento de (**1**), se han aislado y caracterizado alrededor de 70 BRs. Debido a que estos compuestos muestran potentes propiedades promotoras del crecimiento y que además se obtienen a muy bajas concentraciones desde sus fuentes naturales, es que desde la década del 80' hasta la fecha, se han desarrollado numerosos trabajos de investigación en el campo de la síntesis y los análogos estructurales de estos compuestos.

Se han desarrollado estudios de BRs naturales y análogos sintéticos para establecer los requerimientos estructurales que deben poseer estos compuestos para mostrar una **mayor actividad biológica**, los cuales consideran: 1) funciones: *cis* 2 α , 3 α -glicol en el anillo A, 2) función 6-ceto o 7-oxalactona en el anillo B, 3) fusión de los anillos A/B de tipo *trans* y 4) en la cadena lateral se requiere de la función glicol en los carbonos C-22 y C-23, preferentemente con configuraciones 22*R*, 23*R* y un grupo sustituyente de tipo metilo o etilo en el carbono C-24. Sin embargo, en las últimas décadas se han sintetizado un importante número de análogos de BRs con modificaciones considerables en la cadena lateral, respecto de los BRs naturales, dentro de los cuales se consideran cadenas laterales más cortas, espirostánicas y furostánicas, con sustituyentes aromáticos y cíclicos, con funciones de ésteres y ácidos carboxílicos, entre otros. A pesar de los importantes cambios estructurales, estos análogos han presentado actividad biológica. En consecuencia, los requisitos estructurales que estos compuestos deben poseer para generar actividad biológica han cambiado y se han desarrollado estudios de estructura-actividad, a modo de predecir los nuevos requerimientos estructurales que podrían mejorar el efecto biológico para estos nuevos análogos. Estos resultados sugieren que la actividad de los análogos de BRs depende de la distribución espacial de los átomos de oxígeno en lugar de la presencia o ausencia de un grupo funcional específico en la molécula.

De esta forma, en el presente trabajo se desarrolló una ruta de síntesis para la obtención de nuevos análogos de BRs con cadena lateral más corta, es decir del tipo 24-nor, con funciones hidroxiladas y benzoiladas en las posiciones C-22 y C-23, considerando factores estereoquímicos en C-22 (*R/S*) y el efecto que produciría este nuevo cambio estructural en la actividad biológica por medio del test de *Inclinación en la Lámina de Arroz* (ILA).

En este trabajo se sintetizaron los análogos (**62**), (**73**), (**78a-b**), (**79**), (**80**), (**83**), (**85**) y (**86**) (*Figura 1*), de los cuales (**73**), (**79**), (**83**), (**85**) y (**86**) corresponden a estructuras nuevas. Todos estos compuestos fueron preparados desde ácido hideoxicólico (**14**) y fueron evaluados en el test ILA donde los resultados obtenidos demostraron que los análogos (**79**) y (**80**) fueron los más activos a la concentración de $1,0 \times 10^{-7}$ M, incluso con mayor actividad que el control positivo (**1**), que es considerado como el BRs más activo de los naturales.

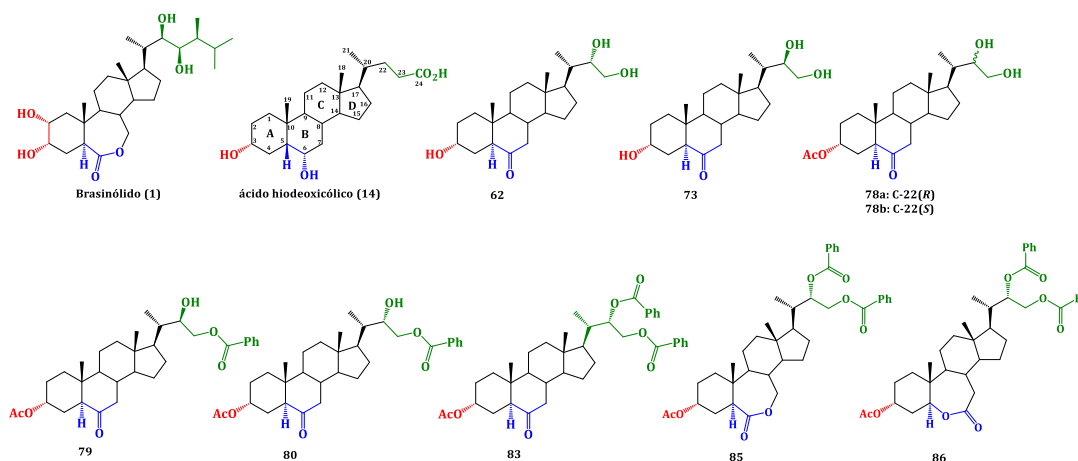


Figura 1: Estructura de brasinolida (**1**), ácido hideoxicólico (**14**) y los análogos de BRs (**62**), (**73**), (**79**), (**80**), (**83**), (**85**) y (**86**) sintetizados en este estudio.

Finalmente, en este estudio fue posible demostrar que nuevos análogos de BRs 24-desoxi, con cadenas laterales más cortas del tipo 24-nor, y funciones benzoatos en C-22 (*R/S*) presentan actividad biológica de tipo hormonal, por lo cual se podría considerar la importancia de este nuevo requisito estructural como una opción real para que este tipo de análogos presenten actividad biológica.

SUMMARY

Brassinosteroids (BRs) are considered a class of plant hormone that is characterized by promoting plant growth and protection against biotic and abiotic stress that affect, where Brasinolide (BL) (**1**) (*Figure 1*) was the first found naturally and stands out, because it is the first hormone with steroidal nucleus, capable of promoting plant growth, among other effects. Since the discovery of (**1**), around 70 BRs have been isolated and characterized. Because these compounds show potent growth-promoting properties and are also obtained at very low concentrations from their natural sources, it is that since the 80s to date, numerous research works have been developed in the field of synthesis and the structural analogues of these compounds.

Studies of natural BRs and synthetic analogues have been developed to establish the structural requirements that these compounds must possess to show greater biological activity, which consider: 1) functions: *cis* 2 α , 3 α -glycol in ring A, 2) 6-keto or 7-oxalactone function on the B ring, 3) *trans*-type A/B rings fusion and 4) on the side chain requires the glycol function at carbons C-22 and C-23, preferably with 22R, 23R configurations and a methyl or ethyl type substituent group on the C-24 carbon. However, in recent decades, a significant number of BRs analogs have been synthesized with considerable modifications in the side chain, with respect to natural BRs, within which shorter, spirostanic and furostanic side chains are considered, with aromatic substituents and cyclic, with functions of esters and carboxylic acids, among others. Despite the important structural changes, these analogues have shown biological activity. Consequently, the structural requirements that these compounds must possess to generate biological activity have changed and structure-activity studies have been developed, in order to predict the new structural requirements that could improve the biological effect for these new analogues. These results suggest that the activity of BRs analogs depends on the spatial distribution of oxygen atoms rather than the presence or absence of a specific functional group in the molecule.

In this way, in the present work a synthesis route was developed to obtain new BRs analogs with a shorter side chain, that is, of the 24-nor type, with hydroxylated and benzoylated functions in positions C-22 and C-23, considering stereochemical factors in C-22 (R/S), and the effect that this new structural change in biological activity would produce by means of the Rice Plate Tilt (ILA) test.

In this work the analogues (**62**), (**73**), (**78a-b**), (**79**), (**80**), (**83**), (**85**) and (**86**) were synthesized (*Figure 1*), of which (**73**), (**79**), (**83**), (**85**) and (**86**) correspond to new structures. All these compounds were prepared from hydoexycholeic acid (**14**) and were evaluated in the ILA test where the results obtained showed that analogs (**79**) and (**80**) were the most active at the concentration of $1,0 \times 10^{-7} \text{M}$, even with greater activity than the positive control (**1**), which is considered the most active BRs of the natural.

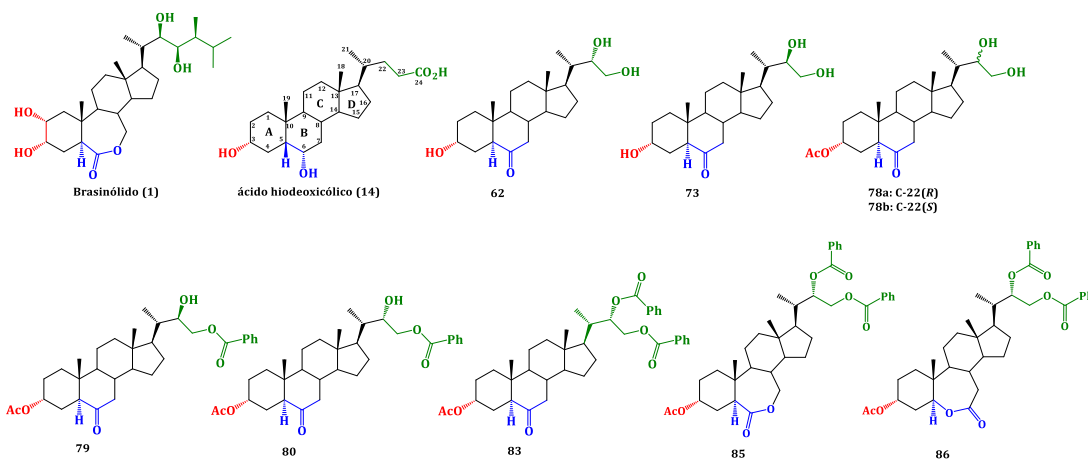


Figure 1: Structure of brasinolide (**1**), hydoexycholeic acid (**14**) and the analogs of BRs (**62**), (**73**), (**79**), (**80**), (**83**), (**85**) and (**86**) synthesized in this study.

Finally, in this study it was possible to demonstrate that new analogs of BRs 2-deoxy, with shorter side chains of the 24-nor type, and benzoate functions in C-22 (R / S) have hormonal biological activity, so the importance of this new structural requirement could be considered as a real option for this type of analogues to present biological activity.

CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes generales sobre hormonas y reguladores del crecimiento vegetal.

El funcionamiento normal de organismos superiores requiere una elevada coordinación entre las diferentes actividades llevadas a cabo entre células, tejidos y órganos. Igualmente, el organismo debe ser capaz de percibir y responder a las fluctuaciones de su ambiente. Entre los distintos mecanismos de regulación, el más conocido es el sistema mediado por mensajeros químicos, el cual corresponde a un conjunto de moléculas esenciales que permiten la comunicación entre células distantes para coordinar sus actividades. Estos compuestos son importantes reguladores del crecimiento y desarrollo en las plantas y median respuestas a distintos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos. En los animales existe una enorme variedad de hormonas químicas, cada una de las cuales se dirige a un número limitado de células, provocando una respuesta altamente específica y son sintetizados en tejidos especializados. Por el contrario, en las plantas, las hormonas (o fitohormonas) son menores en número, por lo tanto, afectan a la mayoría de las células provocando diversas respuestas, siendo además sintetizadas en todas las células y no sólo en tejidos específicos. Por otro lado, la acumulación y efectos de cada una de las fitohormonas son moduladas por influencias ambientales, de desarrollo, así como por las actividades de otras fitohormonas^[1,2].

Durante los últimos años, se han producido grandes avances relacionados con la comprensión del mecanismo de acción de las fitohormonas, incluidos nuevos descubrimientos en las áreas de biosíntesis, transporte, percepción y respuesta. Los receptores específicos de muchas de las principales hormonas ya han sido identificados. Estudios confirman que las vías de señalización de las hormonas interactúan en múltiples niveles durante el crecimiento y desarrollo de la planta. Será de gran importancia entender cómo se integra la información transmitida por estos compuestos durante el crecimiento de ellas^[1, 2].

Estudios pioneros durante el siglo XIX por Julius von Sachs y Charles Darwin, demostraron que diversos procesos de crecimiento de las plantas están regulados por "sustancias" que se mueven de una parte de la planta hacia otra^[3, 4]. Un siglo más tarde se supo que las sustancias en cuestión son pequeñas moléculas derivadas de diversas rutas metabólicas esenciales. En general, estos compuestos están presentes en concentraciones muy bajas y actúan de forma local, en o cerca del sitio donde se biosintetizan (actividad paracrina), o en tejidos distantes (actividad endocrina). Durante los últimos años, el grupo de hormonas vegetales ha ido aumentando y ahora se incluyen, pero no se limitan a: auxinas (IAA), giberelinas (GA), ácido abscísico (ABA), citoquininas, etileno, ácido jasmónico (JA), ácido salicílico y los brasinoesteroides (BRs) (Figura 1.1). Colectivamente estos compuestos regulan todos los aspectos de la vida de las plantas, desde la formación de patrones durante el desarrollo a las respuestas frente a estrés biótico y abiótico^[5, 6].

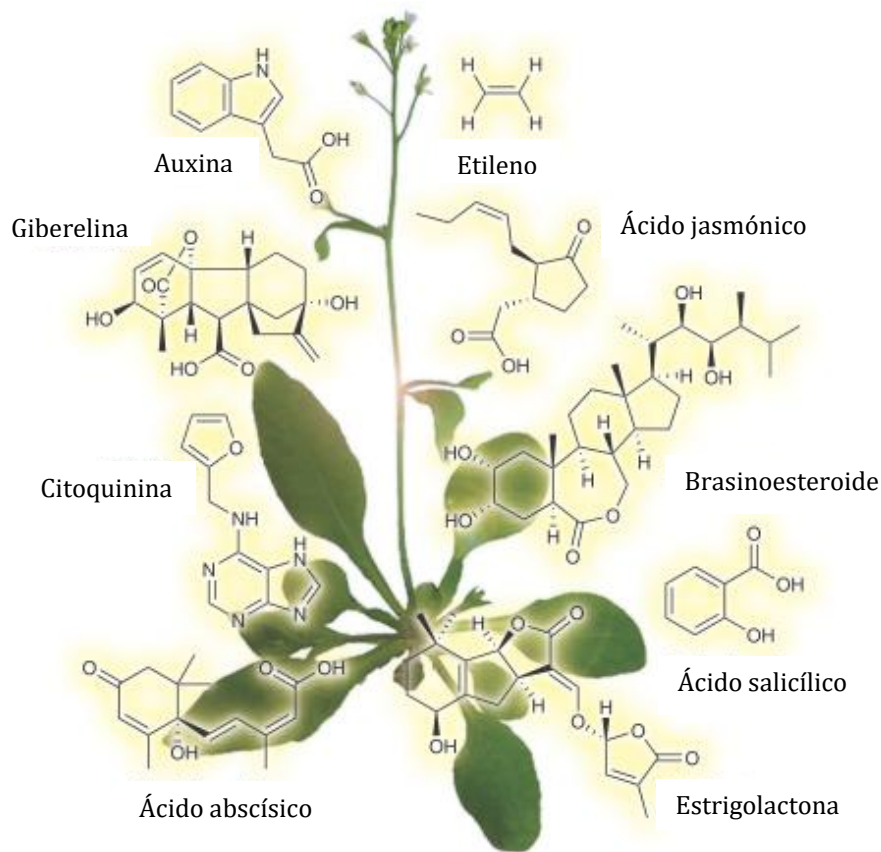
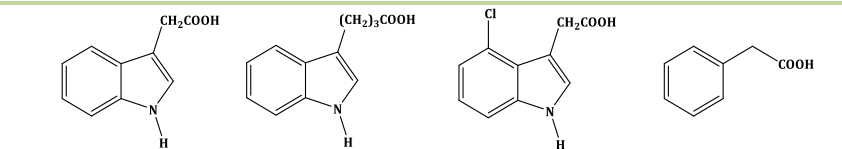
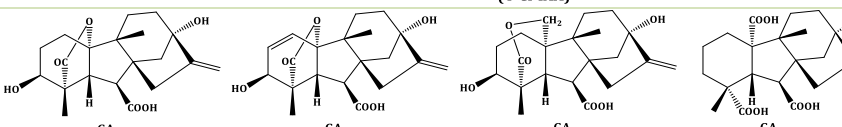
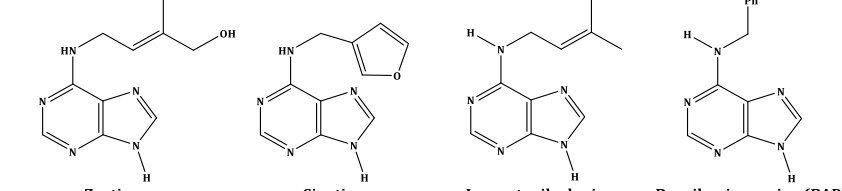
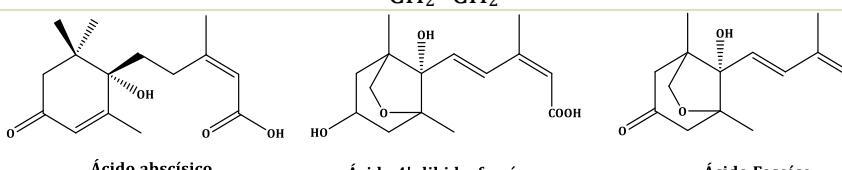


Figura 1.1 Fitohormonas que regulan todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas^[2].

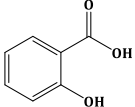
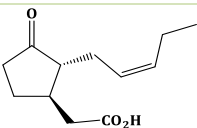
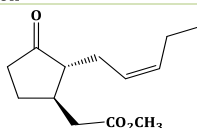
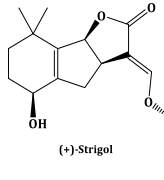
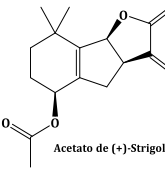
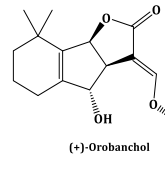
Aunque la función fisiológica de la mayoría de estos compuestos se ha estudiado durante décadas, sólo en los últimos diez a quince años se ha desarrollado un progreso importante en la comprensión de los mecanismos moleculares en biosíntesis de las hormonas, el transporte y la respuesta de las plantas frente a estas. Las rutas biosintéticas para la mayoría de las hormonas están bien caracterizadas (como para los casos de ABA, BR y GA) o emergentes (como para auxinas y JA). También se sabe que los niveles de hormonas están muy regulados y que responden a un entorno cambiante. En el caso de las auxinas, estas tienen un rol clave en muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta, tanto local como a larga distancia, mientras que el transporte de compuestos volátiles tales como el etileno y el jasmonato de metilo son clave en la defensa de la planta, siendo además importantes en proceso de comunicación planta-planta. En las plantas ninguna hormona tiene un control exclusivo de un determinado proceso fisiológico. De hecho, cualquier hormona vegetal ejerce efectos notables sobre la mayoría de las fases del desarrollo de la planta^[7]. En la Tabla 1.1 se muestran algunas de las estructuras químicas de estas hormonas.

Tabla 1.1 Estructuras químicas de hormonas vegetales naturales.

Hormonas	Estructuras
Auxinas	 <p> <chem>CC(=O)Oc1c[nH]c2ccccc12</chem> <chem>CCCC(=O)Oc1c[nH]c2ccccc12</chem> <chem>Clc1c[nH]c2ccccc12CC(=O)O</chem> <chem>O=C(O)Cc1ccccc1</chem> ácido indol acético (IAA) ácido 3-indol butírico (IBA) ácido 4-cloro-indol-3-acético (4-Cl-IAA) ácido 2-fenil acético (PAA) </p>
Giberelinas	 <p> <chem>CC12C(C)C(O)C(C)C1C(O)C2C(=O)O</chem> <chem>CC12C(C)C(O)C(C)C1C(O)C2C(=O)O</chem> <chem>CC12C(C)C(O)C(C)C1C(O)C2C(=O)O</chem> <chem>CC12C(C)C(O)C(C)C1C(O)C2C(=O)O</chem> GA₁ GA₃ GA₁₅ GA₁₇ </p>
Citoquininas	 <p> <chem>CC(C)=CCNc1ncnc2n(cnc12)N</chem> <chem>C1=CC=COC1Nc2ncnc3n(cnc23)N</chem> <chem>CC(C)=CCNc1ncnc2n(cnc12)N</chem> <chem>CC1=CC=C(C=C1)Nc2ncnc3n(cnc23)N</chem> Zeatina Cinetina Isopentenil adenina Benzilaminopurina (BAP) </p>
Etileno	$\text{CH}_2=\text{CH}_2$
Ácido absísico	 <p> <chem>CC1=C(C)C(=O)C=C(C)C1C(O)C</chem> <chem>CC1=C(C)C(=O)C=C(C)C1C(O)C</chem> <chem>CC1=C(C)C(=O)C=C(C)C1C(O)C</chem> Ácido absísico (S-cis-ABA) Ácido 4'-dihidrofaseico Ácido Faseico </p>

Otras sustancias que pueden ser reconocidas como fitohormonas son el ácido salicílico, jasmonatos y estrigolactonas. En la Tabla 1.2 se muestran las estructuras químicas de estos compuestos.

Tabla 1.2 Estructuras químicas de hormonas vegetales naturales (continuación).

Hormonas	Estructuras
Ácido Salicílico	
Jasmonatos	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>(-) Ácido jasmónico</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>(-) Jasmonato de metilo</p> </div> </div>
Estrigolactonas	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>(+)-Strigol</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Acetato de (+)-Strigol</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>(+)-Orobanchol</p> </div> </div>

1.2 Brasinoesteroides.

Los brasinoesteroides (BRs) son hormonas de naturaleza polihidroxiesteroide de bajo peso molecular, principalmente aislados desde fuentes vegetales^[8]. Los BRs poseen propiedades promotoras de crecimiento y diferenciación, actuando en diversos procesos incluyendo germinación, crecimiento radicular y elongación del tallo, fotomorfogénesis en plántulas y diferenciación vascular, floración, fertilidad y senescencia, además de resistencia al estrés biótico y abiótico^[9]. Desde el descubrimiento del primer BRs, brasinolida (**1**)^[10], se han aislado y caracterizado más de setenta brasinoesteroides que provienen de plantas superiores, algas y hongos^[11]. Además, se ha detectado la presencia de estas fitohormonas en todos los órganos de las plantas (polen, antenas, hojas, tallos, raíces, flores y semillas), se producen endógenamente en niveles muy bajos y se almacenan a muy bajas concentraciones, siendo las semillas de polen inmaduras la fuente más abundante encontrándose en un rango de 1-100ng/g de peso fresco, mientras que en brotes y hojas suele tener una menor concentración de 0,01ng/g de peso fresco^[12].

Su estructura tiene un esqueleto común de 5 α -colestano (Figura 1.3) y pueden ser clasificados como BRs de 27, 28 o 29 átomos de carbono, dependiendo de la sustitución

de grupo alquilo en el C-24 (Figura 1.3). Sus variaciones estructurales se observan en la cadena lateral, el tipo y orientación de las funciones oxigenadas presentes en los anillos A y B, y el tipo de fusión de estos anillos (A/B *cis* o A/B *trans*).

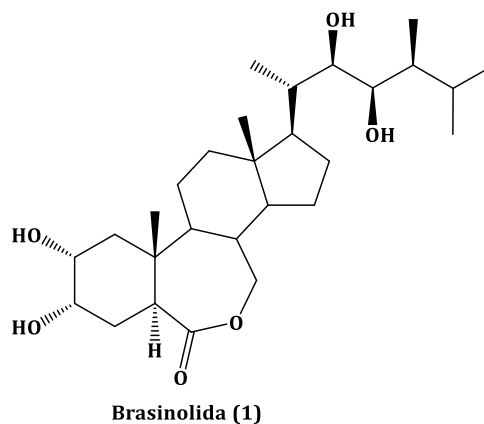


Figura 1.2 “Estructura de brasinolida (1), primer brasinoesteroide aislado desde origen natural”.

Se consideran BRs naturales, exhibiendo bioactividad (actividad biológica relativa asociada), a aquellos que tienen una función oxigenada en las posiciones en C-2 y C-3 del anillo A (preferentemente como 2,3-dihidroxi), posición C-6 en anillo B preferentemente en forma de cetona o lactona (6-desoxo, 6-oxo o 7-oxalactona) y posición C-22 y C-23 oxigenada (preferentemente como 22,23- dihidroxilo), fusión de tipo *trans* entre los anillos A y B, que llevan en C-24 sustituyentes alquilo o hidroxilados (Figura 1.3), también se han encontrado en forma conjugadas con azúcares o ácidos grasos^[13].

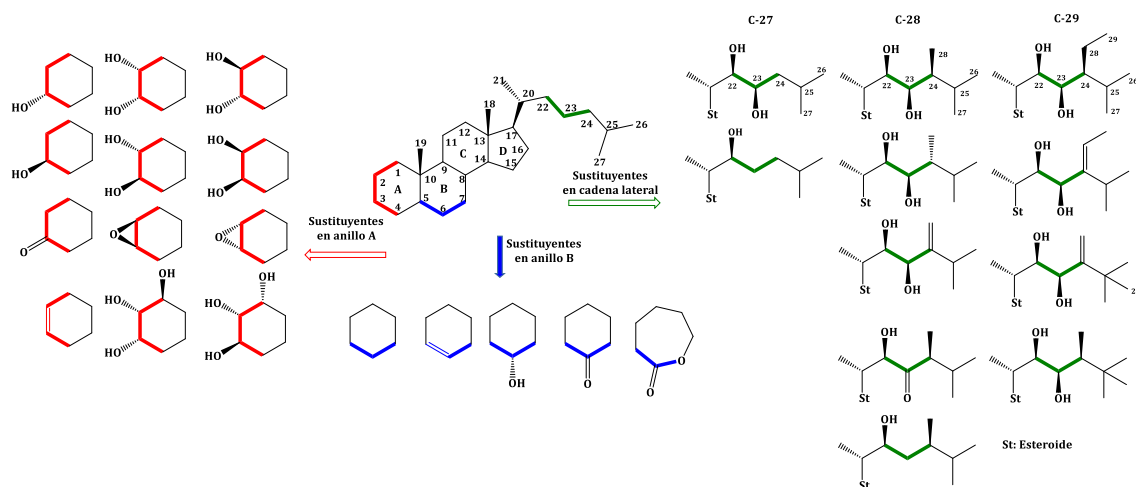


Figura 1.3 Diferentes patrones de sustituyentes en los anillos A, B y la cadena lateral de brasinoesteroides de origen natural.

Otros brasinoesteroides naturales considerados como importantes son 24-epibrasinolido (**2**), castasterona (**3**) y 24-epicastasterona (**4**) (Figura 1.4). A pesar de que los BRs con C-28 son los más recurrentes en la naturaleza, también son conocidos otros BRs con una cadena lateral esteroide diferente. Entre ellos, 28-homobrasinolido (**5**) y 28-homocasterona (**6**), que tienen una estructura de 5α -estigmastano, son los más activos de la serie C-29^[12, 14]. Estos brasinoesteroides y algunos otros, se muestran en la Figura 1.4.

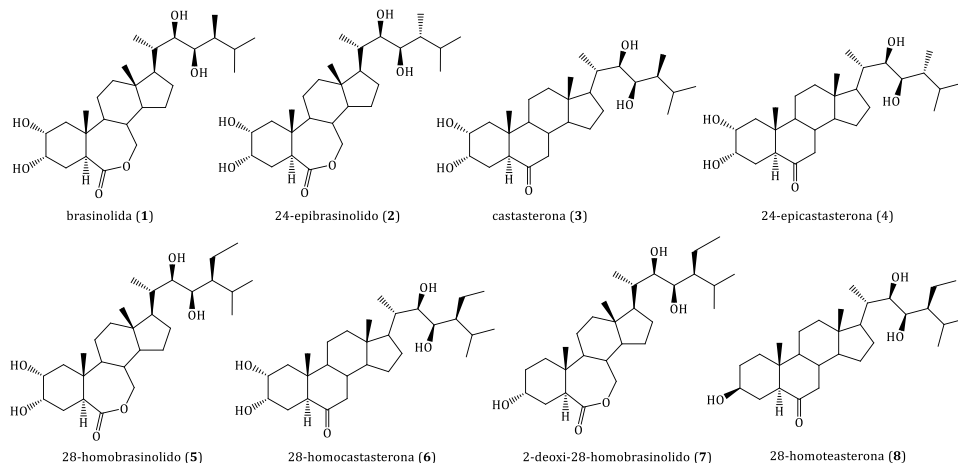


Figura 1.4 Estructuras de brasinoesteroides activos de origen natural.

Existe alguna información disponible sobre el mecanismo de acción de los BRs en plantas a nivel molecular, sin embargo, es muy probable que las plantas posean una vía de señalización intracelular específica que regule la transcripción de genes, como sucede en el caso de otras fitohormonas relacionadas a los mecanismos de defensa, comprometiendo una posible interacción entre los diversos mecanismos frente a estrés biótico. Parte de su función ha sido entendida gracias al descubrimiento de mutantes de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* deficientes en BRs, las cuales presentaban un fenotipo enano grave que puede ser revertido a un tipo salvaje mediante la aplicación exógena de BRs^[15, 16].

1.3 Relación estructura-actividad relativa de los brasinoesteroides.

La actividad biológica de BRs se evalúa por diferentes tipos de bioensayos cuyos resultados no son siempre coherentes entre sí. El bioensayo de *Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA)* (*Oryza sativa*) es el bioensayo más comúnmente utilizado para estos

efectos, sin embargo, diferentes grupos han adaptado el protocolo básico de RLIT, además, utilizan diferentes cultivares de arroz, entregando gran variación en los resultados^[17]. El bioensayo ILA tiene un límite de detección de 50 ppm para el ácido indolacético, su límite de detección para brasinolida (**1**) y 28-homobrasinolido (**5**) es 0,5 y 5 ppb, respectivamente^[17-20]. Además de la falta de normalización de los bioensayos, el análisis de datos también se complica por la combinación de sustituyentes, ya que los valores de actividad biológica se ven afectadas por la naturaleza de los sustituyentes, es decir, al pasar de 7-oxa-lactona a 6-cetona se observa que la actividad relativa disminuye desde 100% a 50% en la mezcla brasinolida/castasterona (1/3)^[21], mientras que la 24-epicastasterona (**4**) es aproximadamente tres veces más activo que castasterona (**3**)^[22]. A pesar de estas limitaciones, se pueden realizar generalizaciones respecto a: relación estructura-actividad relativa en el anillo A^[23, 24], anillo B^[25, 26], tipo de fusión presente en los anillos A/B^[10, 27-30] y la cadena lateral^[17, 31, 32]. En la Figura 1.5 se esquematiza el orden de actividad biológica mostrado por los BRs, en función de los requerimientos estructurales que deben poseer estos compuestos para generar mayores efectos en el crecimiento vegetal.

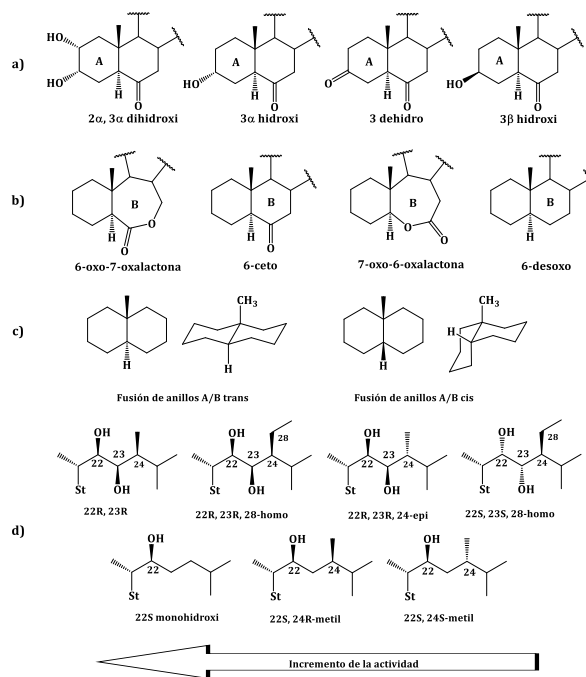


Figura 1.5 (a) Relación estructura-actividad relativa en el anillo A. (b) Efecto en la actividad biológica de la funcionalización relativa en el anillo B. (c) Conformaciones espaciales del núcleo esteroidal de 5α-colestano y 5β-colestano con fusión de los anillos A/B tipo trans (izquierda) y con fusión de los anillos A/B tipo cis. (d) Efecto en la actividad biológica de los sustituyentes en la cadena lateral.

Hasta el momento y desde la revisión bibliográfica, se sugiere que aparentemente los requerimientos estructurales postulados para que un brasinoesteroide presente una alta actividad biológica, pueden resumirse de la siguiente forma:

1. *Debe contener funciones: cis 2 α , 3 α -glicol en el anillo A.*
2. *Función 6-ceto o 7-oxalactona en anillo B.*
3. *Fusión de anillos A/B de tipo trans.*
4. *En la cadena lateral se requiere de función glicol en los carbonos C-22 y C-23 preferentemente con configuraciones 22R, 23R y un grupo sustituyente de tipo metilo o etilo en el carbono C-24.*

Referente al primer requisito se ha demostrado que la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 2 α del anillo A, no es indispensable para la actividad biológica elicitora, aun cuando la ausencia de esta función reduce la actividad^[25]. Adicionalmente, la presencia de un grupo 3 β -hidroxi en lugar de 3 α -hidroxi, produce el mismo efecto en análogos naturales de BRs que contienen la función 3 α -hidroxi. Efecto que fue observado en los compuestos 2-desoxi-28-homobrasinólido (**7**) y 28-homocasterona (**8**) (Figura 1.4)^[25].

Otros BRs naturales como tifasterol (2-desoxicasterona) (**9**) y teasterona (**10**) (Figura 1.6) carecen de la presencia de una función 2 α -hidroxi en el anillo A y por lo tanto se consideran como 2-desoxi-BRs^[33-36]. Posteriormente, al descubrimiento de estos dos nuevos BRs, se reportaron interesantes trabajos de síntesis para la obtención de estos compuestos y análogos estructurales. De esta forma se reportó la síntesis y evaluaciones biológicas de los análogos (**12**) y (**13**) desde estigmasterol (**11**) (Figura 1.6), los cuales prácticamente no fueron activos en el test de ILA, comparados con brasinolida (**1**)^[37]. Otro sugerente trabajo consistió en la obtención del análogo 22(*S*), 23(*S*) tifasterol (**15**) y tifasterol (**9**) desde ácido hiodeoxicólico (**14**) (Figura 1.6). Sin embargo, no se reportaron estudios de actividad biológica para estos compuestos^[38, 39]. Posteriormente, se reportó un trabajo para la síntesis de tifasterol (**9**) y teasterona (**10**) desde estigmaesterol (**11**) (Figura 1.6)^[40].

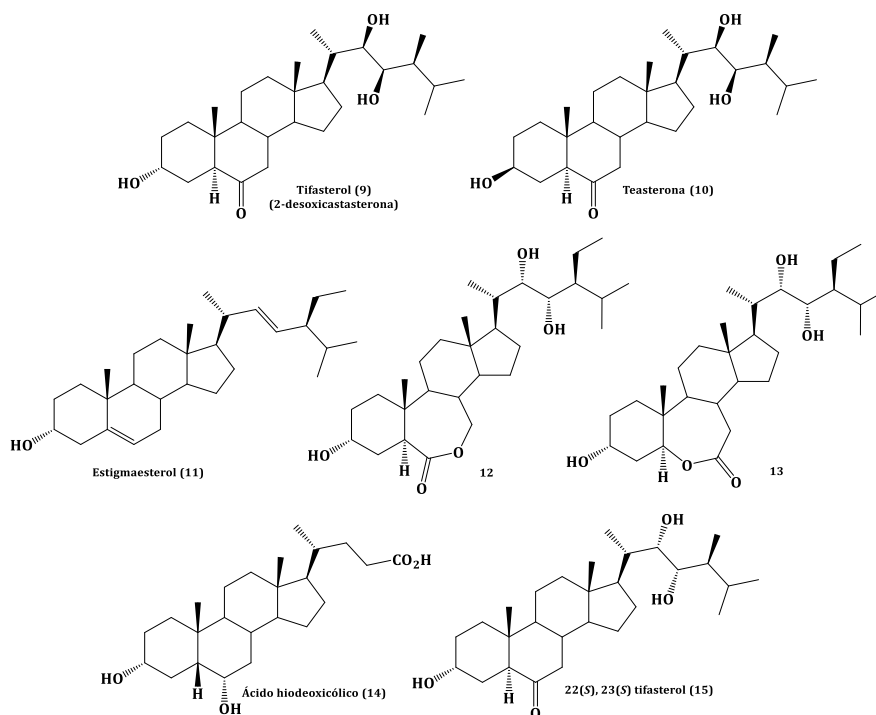


Figura 1.6 Estructuras de 2-desoxi-BRs naturales (9), (10), 2-desoxi-Brs sintéticos (12), (13), (19) y precursores naturales (11) y (14).

Un interesante estudio fue desarrollado para evaluar el efecto en la actividad biológica de un conjunto de 2-desoxi-BRs naturales y análogos sintéticos de 28-homobrasinólido (5), 28-homocasterona (6), tifasterol (9) y teasterona (10) (Figura 1.7), al incorporar el grupo 7-oxa y 6-oxa lactona en el anillo B, en el bioensayo de ILA. Desde estos experimentos, los autores encontraron que los compuestos (9), (10), (18), (19), (22) y (23) (Figura 1.7) mostraron actividades comparables entre ellos, donde resalta una mayor actividad para los compuestos (18) y (19), mientras que el resto de los compuestos fueron menos activos. Concluyendo que la introducción de la función lactona 7-oxa y/o 6-oxa no mostró diferencias significativas en los valores observados para el bioensayo de ILA^[41]. Posteriormente, se informó el aislamiento de los 2-desoxi-BRs naturales (26-29); sin embargo, no se reportaron ensayos biológicos para estos compuestos^[42].

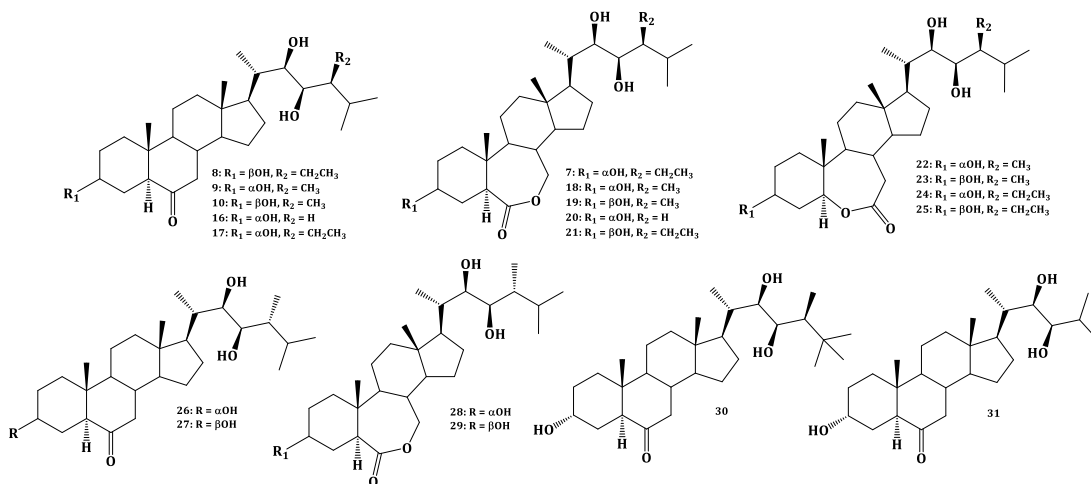


Figura 1.7 Estructuras de análogos sintéticos de 2-desoxi-BRs naturales obtenidos desde 28-homobrasinólido (5), 28-homocasterona (6), tifasterol (9) y teasterona (10).

Considerando los posibles efectos en la actividad biológica al introducir cambios en la estructura de la cadena lateral de análogos de BRs, se reportó la síntesis de los compuestos (30) y (31) (Figura 1.7) desde ácido hiodeoxicólico (14), donde el derivado (31) contiene una cadena lateral más corta que los BRs naturales. No obstante, los autores no reportaron los efectos biológicos de estos derivados^[43,44].

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los BRs activos poseen en la cadena lateral la función 22*R*, 23*R* diol vecinal, que parece esencial para una alta actividad biológica. Sobre esta base, varios estudios han informado de los requisitos estructurales que deben poseer estos compuestos para mostrar una alta actividad biológica. Estas investigaciones concluyen que la actividad de los BRs depende de la orientación espacial de los átomos de oxígeno. Por lo tanto, los requisitos estructurales no deben indicarse como la presencia o no de un grupo funcional específico en la molécula, pero sí como la distribución espacial de todas las funcionalidades presentes en ella. Esta orientación espacial puede ser indicada como distancias o ángulos entre los átomos de oxígeno presentes en un BRs. En este sentido, se propone una nueva forma de definir los requisitos estructurales para que un BRs sea activo^[45, 46].

Sin embargo, en las últimas décadas, los esfuerzos se han centrado en la síntesis de nuevos análogos de BRs, manteniendo patrones comunes de funciones orgánicas en los anillos A/B y fusión “*cis-trans*” entre estos, como en algunos BRs naturales, pero con cambios estructurales dramáticos en la cadena lateral (cadenas laterales más cortas, diferentes funciones oxigenadas, espirostánicas, sustituyentes aromáticos, ésteres,

ácidos carboxílicos cíclicos, entre otros.) Sorprendentemente, estos análogos han presentado resultados interesantes en la actividad biológica. A continuación, se describen algunas estructuras y propiedades biológicas de los análogos más representativos de este tipo. De esta forma el compuesto (32) (Figura 1.8), muestra alta actividad promotora del crecimiento en granos, evaluada en los ensayos del primer y segundo entrenudo del frijol^[47]. Mientras que el compuesto (33) (23-Arilbrasinoesteroide) y otros análogos de este fueron considerados como posibles promotores de crecimiento de las plantas y candidatos prometedores para la aplicación en la agricultura^[48, 49]. El análogo (34) (Figura 1.8), muestra una considerable actividad promotora del crecimiento en el incremento de longitud en epicotilo^[48].

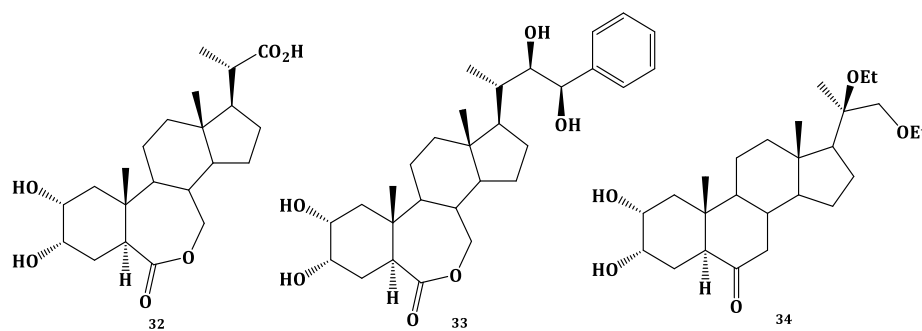


Figura 1.8 Estructuras de análogos de Brasinoesteroides con diferencias estructurales significativas en la cadena lateral.

Por otra parte, un gran número de análogos esteroídicos fueron informados y preparados por diferentes autores. Algunas de estas estructuras se muestran en la Figura 1.9. Los compuestos (35-39) son los ingredientes activos incorporados en formulaciones comerciales, que actualmente están siendo utilizados en la producción y protección agrícola^[41-48].

Adicionalmente, cuando se aplicaron soluciones en agua/etanol (concentraciones entre 0,001-0,1 pg/mL) de los compuestos (40) y (41) en semillas de naranjo, se observó una fuerte promoción en la germinación^[48, 49]. Aunque el compuesto (42) produce una estimulación significativa a las dosis de 2,5 y 5 ng/planta en el ensayo de la elongación del segundo entrenudo de habas^[48]. La actividad biológica del compuesto (41) fue evaluada en el bioensayo de elongación y expansión de cotiledones de rábanos (*Raphanus sativus L.*). La actividad promotora del crecimiento más alta se observó a la concentración de $1,0 \times 10^{-5}$ mg/mL, a la cual los hipocotilos de rábano tratados con el epóxido (43)

aumentaron significativamente su longitud de 20,7% por sobre el control sin tratar^[50]. Mientras que las soluciones en etanol/agua [Conc. 0,01, 0,1 y 1 ppm] de los compuestos (44) y (45) (Figura 1.9), mostraron un fuerte crecimiento en la promoción de la actividad de la planta. El efecto consistió en un aumento en la longitud de los hipocotilos y en el aumento en peso de los cotiledones tratados^[51-62].

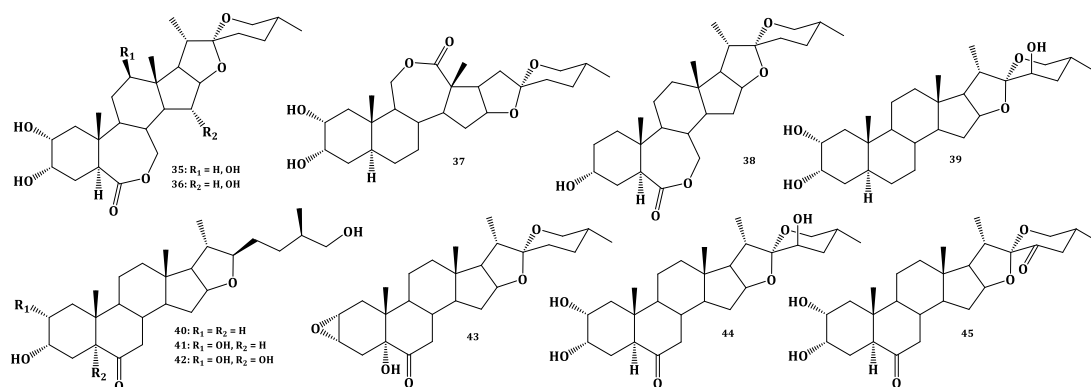


Figura 1.9 Estructuras de análogos de Brasiñoesteroides con cadenas laterales de tipo espiroestánicas.

Otros análogos de BRs con importantes cambios estructurales en la cadena lateral se muestran en la Figura 1.10, donde los análogos (46-51) mostraron una actividad similar y en algunos casos superiores a la brasinolida (1) en el bioensayo de ILA^[63]. Mientras que los análogos (52-55) con cadenas laterales de tipo acilo (Figura 1.10) fueron ensayados en el test de *inclinación de la lámina de arroz* de la variedad enana, destacándose la mayor actividad mostrada para los compuestos (54) y (55) (Figura 1.10)^[64]. Los análogos de BRs de tipo androstano, con grupos 17 β -éster como (56) y (57) (Figura 1.10) mostraron que la actividad más alta fue para el epóxido (56) (19,5 mm) y para el diol-lactona (57) (17,4 mm). En el caso de epóxido (56), la cantidad aplicada fue de $1,0 \times 10^{-9}$ M y en el caso de (57), $1,0 \times 10^{-8}$ M por planta, en el bioensayo del segundo entrenudo del frijol^[65].

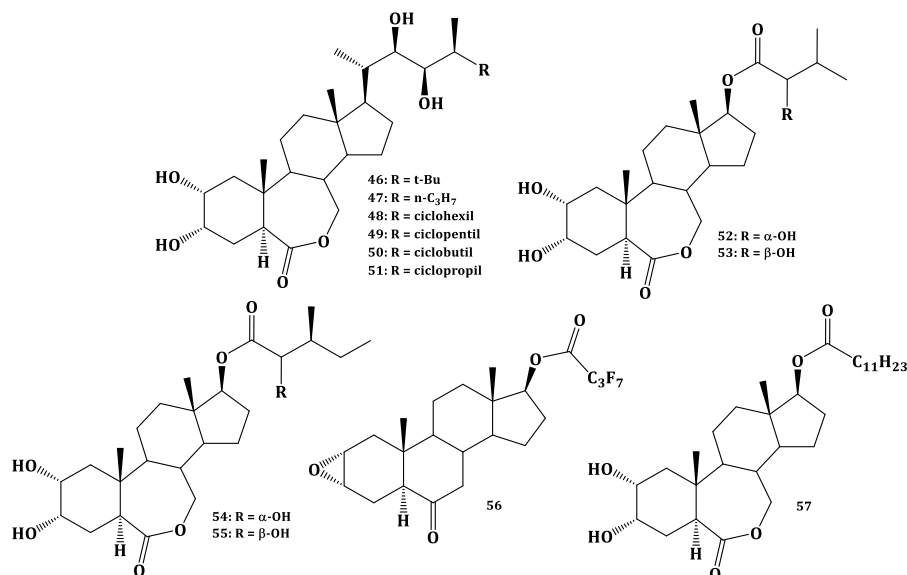


Figura 1.10 Estructuras de análogos de brasinosteroides con cadenas laterales de tipo 24-alkil; 24-cicloalquil y grupos ésteres en posición 17β.

Teniendo en consideración los significativos cambios introducidos en la cadena lateral de análogos de BRs y el posible efecto biológico que esto puede producir, otros autores han reportado la síntesis de los compuestos (**58-61**) (Figura 1.11) con cadenas laterales más cortas del tipo 24-nor, 22-23-dihidroxi-colanos; sin embargo, la actividad biológica de estos compuestos no fue informada^[66]. Adicionalmente, se informó un nuevo método para la síntesis de los compuestos (**61**) y (**62**) (Figura 1.11). Aunque, estos fueron evaluados como potenciales inhibidores del sistema neuroinflamatorio^[67].

Por otra parte, y considerando estas modificaciones en la cadena lateral (24-nor), se sintetizaron otros análogos de 2-desoxi-BRs a partir del ácido desoxicólico (**63**), que contienen funciones oxigenadas en el anillo C, con cadena lateral del tipo 24-nor, 22(S)-23-dihidroxi y con fusión *cis* de los anillos A/B (compuestos **64-67**), Figura 1.11). Las actividades promotoras del crecimiento en plantas de los compuestos (**64**) y (**67**) fueron evaluadas en los bioensayos de elongación de hipocotilos y en la expansión de los cotiledones de rábano. En este caso el compuesto (**64**) mostró actividad promotora del crecimiento a una concentración de $1,0 \times 10^{-5}$ mg/mL en ambos bioensayos, mientras que el compuesto (**67**) mostró un efecto inhibitor en el ensayo de expansión de cotiledones a la misma concentración^[68, 69]. Siguiendo la misma línea, recientemente se informó la síntesis de nuevos análogos 2-desoxi-BRs con funcionalización 11-oxo-12β-hidroxi en el anillo C y con cadena del tipo 24-nor-22(S)-23-dihidroxi y 22(S)-23-diacetoxi

(compuestos **68-70**) (Figura 1.11), para estos compuestos no se informaron datos de actividades biológicas y fueron preparados desde ácido desoxicólico (**63**)^[70].

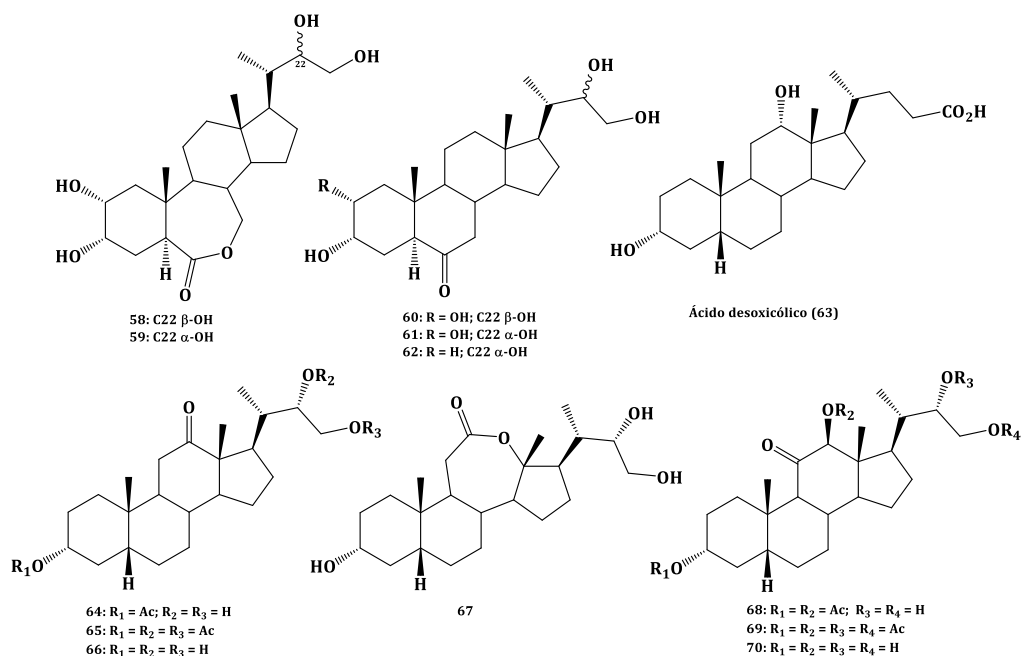


Figura 1.11 Estructuras de análogos de brassinosteroides con cadenas laterales de tipo 24-nor colanos, preparados desde ácido hiodeoxicólico (**14**) y ácido desoxicólico (**63**).

Por otro lado, el grupo de Investigación en Síntesis Orgánica y Evaluaciones Biológicas de Análogos de BRs del Departamento de Química de la U.T.F.S.M., recientemente ha desarrollado una ruta de síntesis alternativa para la obtención de análogos de BRs del tipo 2-desoxi-24-nor-22(S), 23-dihidroxi-5 α -colánicos. Considerando esta ruta de síntesis, se logró obtener el análogo (**62**) y los nuevos análogos (**71**) y (**72**) (Figura 1.12), desde ácido hiodeoxicólico (**14**). Estos tres análogos, fueron evaluados en el bioensayo de *inclinación de la lámina de arroz*, donde el compuesto (**62**), mostró los mejores resultados de acuerdo con los datos de la Tabla 1.3, inclusive con mayores valores que brasinolida (**1**) a las concentraciones de $1,0 \times 10^{-7}$ M y $1,0 \times 10^{-8}$ M, mientras que el análogo (**72**), fue menos activo que (**62**), pero mostró mayores valores que brasinolida (**1**), a las mismas concentraciones indicadas anteriormente^[71, 72].

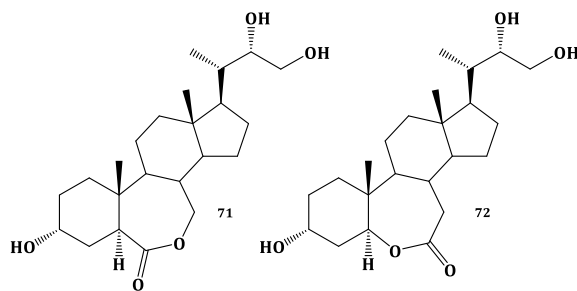


Figura 1.12 Estructuras de nuevos análogos de brasinoesteroides del tipo 2-desoxi-24-nor-22(*S*), 23-dihidroxi-5 α -colánicos.

Tabla 1.3 Efecto de análogos 2-desoxi-24-nor-22(*S*), 23-dihidroxi (**62**), (**71**) y (**72**) sobre el ensayo de inclinación de la lámina de arroz posterior a las 48 horas.

Ángulo de inclinación de la lámina de arroz (°)			
Análogos de BRs/concentración (M)	1,0 \times 10 ⁻⁶ M	1,0 \times 10 ⁻⁷ M	1,0 \times 10 ⁻⁸ M
Brasinolida (1) (C ⁺)	70 \pm 7,5°	41 \pm 4,5°	31 \pm 11,0°
(62)	62 \pm 12,4°	60 \pm 2,7°	35 \pm 2,7°
(71)	46 \pm 2,7°	37 \pm 4,2°	40 \pm 2,7°
(72)	48 \pm 8,7°	24 \pm 2,2°	18 \pm 0,0°
Agua (C ⁻)	7 \pm 0,0		

(C⁺: Control positivo; C⁻: Control negativo).

Teniendo en cuenta la información recopilada, en este proyecto se propone la síntesis de nuevos análogos de BRs, que mantengan tres de los cuatro requerimientos estructurales de los BRs naturales, como lo son: 1) grupo 3 α -hidroxi en el anillo A, 2) fusión de anillos A/B trans, 3) función cetona y/o lactona en el anillo B, con estructuras del tipo 2-desoxi y con modificaciones en la cadena lateral del tipo 24-nor-22(*R*), 23-dihidroxi-5 α -colánicos, compuestos (**73**), (**74**) y (**75**) (Figura 1.13). Estos nuevos análogos serán preparados desde el ácido hiodeoxicólico (**14**). La obtención de estos nuevos derivados tiene por objetivo, introducir la configuración *R* en el carbono 22 debido a que, según los antecedentes bibliográficos, con este tipo de estereoquímica en esta posición, se espera lograr un mayor aumento en la actividad biológica en el ensayo de inclinación de la lámina de arroz. Adicionalmente al poseer cadena lateral del tipo 24-nor colánica se evaluará el efecto en la actividad biológica de este nuevo rasgo estructural.

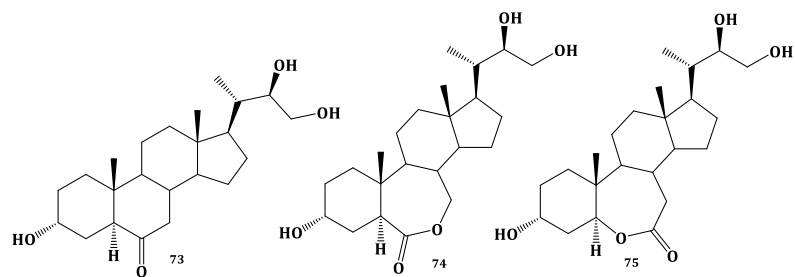


Figura 1.13 Estructuras de nuevos análogos de brasinoesteroides del tipo 2-desoxi-24-nor-22(R), 2,3-dihidroxi-5 α -colánicos, propuestos en este proyecto.

HIPÓTESIS

Teniendo en consideración los antecedentes bibliográficos señalados anteriormente, se propone que: “Nuevos Brasinoesteroides del tipo 2-desoxi-3 α -hidroxi, con función cetona en C-6, función 7-oxa-6-oxo y/o 6-oxa-7-oxa lactona, con cadena lateral más corta de tipo 24-nor y función 22 (*R*), 23-dihidroxi, de estructuras análogas a los brasinoesteroides naturales, mostrarán actividad biológica de tipo hormonal, en el crecimiento de plantas”.

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

2.1 Objetivo General.

Sintetizar tres nuevos análogos de BRs, que mantengan tres de los cuatro requerimientos estructurales de los BRs naturales, como lo son: **1)** grupo 3 α -hidroxi en el anillo A (tipo 2-desoxi), **2)** fusión de anillos A/B de tipo *trans*, **3)** función cetona y/o lactona en el anillo B, con modificaciones en la cadena lateral del tipo 24-nor-22(R), 23-dihidroxi-5 α -colánicos. Evaluar la actividad biológica de los nuevos análogos sintetizados en el crecimiento de plantas.

2.2 Objetivos Específicos.

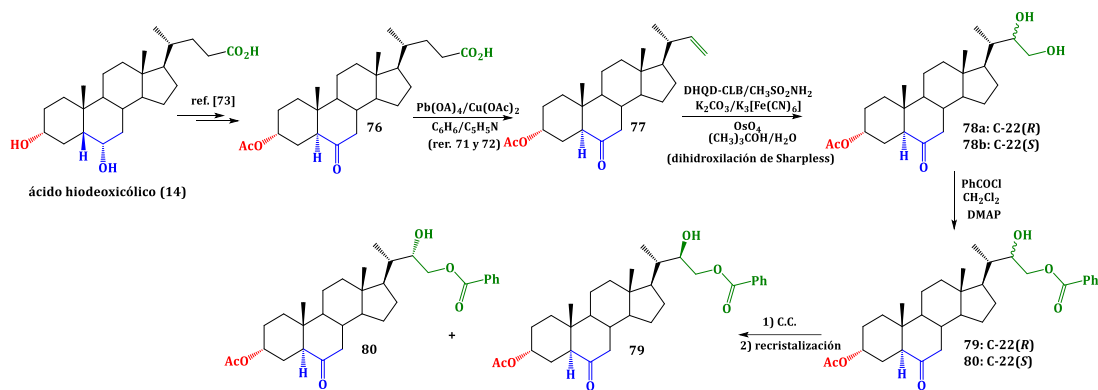
1. Sintetizar los compuestos intermedios (**77**), (**78a-b**), (**79**) y (**80**) indicados en el Esquema 3.1 (Metodología) desde el ácido (**76**), caracterizar por métodos físicos y espectroscópicos los productos obtenidos.
2. Determinar las estructuras de los epímeros (**79**) y (**80**) por métodos físicos y espectroscópicos y establecer la estereoquímica absoluta en el carbono de la posición C-22.
3. Sintetizar el nuevo análogo (**73**), su epímero (**62**) y determinar la estructura de ambos epímeros indicados en el Esquema 3.2 (Metodología).
4. Sintetizar los derivados intermedios (**81-82**) y los análogos de brasinoesteroides (**74**) y (**75**) indicados en el Esquema 3.3 (Metodología), caracterizar por métodos físicos y espectroscópicos de los productos obtenidos.
5. Evaluar la actividad biológica de los análogos finales (**73**), (**74**) y (**75**), mediante el ensayo biológico de *inclinación de la lámina de arroz*, en la especie *Oryza sativa*, variedad Zafiro.

CAPÍTULO 3 - METODOLOGÍA

3.1 Síntesis químicas

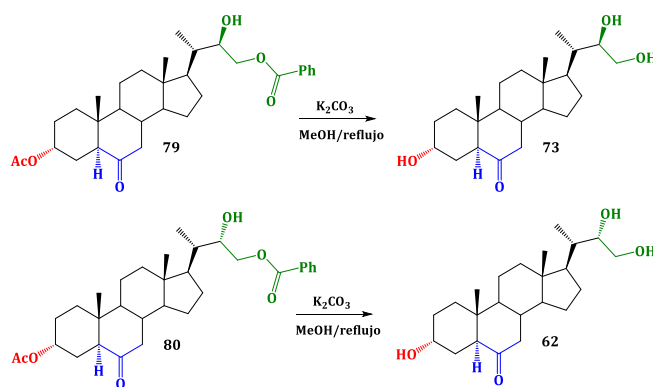
Se utilizará el derivado (**76**) (Esquema 3.1) como sustrato de partida para la obtención de los nuevos análogos 2-desoxi-BRs (**73-75**). Este derivado será proporcionado por el Laboratorio de Síntesis Orgánica del Departamento de Química de la U.T.F.S.M., el cual fue preparado desde el ácido hiodeoxicólico (**14**)^[73], que es un producto natural y está disponible en forma comercial, tiene un costo relativamente bajo y lo más importante es que tiene las funciones orgánicas en posiciones adecuadas para las transformaciones químicas que permitirán la obtención de estos nuevos análogos. Adicionalmente, un importante número de trabajos se han descrito previamente por otros autores para las transformaciones de (**14**)^[38, 43, 44, 48, 49, 66, 74-77].

Dado que se dispone del derivado (**76**) se utilizará como material de partida para preparar los nuevos análogos propuestos de BRs. Entonces el primer paso en la ruta requiere la degradación de la cadena lateral para transformarla en derivados del tipo 24-nor, de tal forma que el alqueno (**77**) (Esquema 3.1) puede prepararse por reacción de *descarboxilación oxidativa* con $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ o $\text{PhI}(\text{OAc})_2$, desde el ácido (**76**), como se ha reportado para la obtención de otros ácidos biliares con estructuras similares^[68, 69, 72, 74, 78]. El paso siguiente consiste en la reacción de dihidroxilación del alqueno (**77**), aun cuando algunos autores han reportado que la adición electrofílica al doble enlace en la posición C-22 con OsO_4 ^[79], $\text{RuCl}_3/\text{NaIO}_4$ ^[67], o reacción de Prevost-Woodward con I_2/AgOAc ^[38], produce predominantemente el epímero con configuración (*S*) en C-22. Mientras que la dihidroxilación directa de Sharpless sobre el doble enlace C-22-23 con un inductor quiral (sistema DHQD-CLB/ $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{NH}_2/\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{OsO}_4$)^[80] o epoxidación directa con *m*-ACPB, produce mayoritariamente la configuración (*R*) en el C-22^[79]. Razón por la cual se utilizará el método de Sharpless para acceder a la mezcla de dioles (**78a-b**) (Esquema 3.1). En estudios desarrollados se ha comprobado que esta mezcla (**78a-b**) no es posible separarla por métodos tradicionales de cromatografía en columna y/o re-cristalizaciones^[72, 73], por lo cual se procederá a derivatizar la mezcla selectivamente en la posición C-23, en forma de ésteres monobenzoatos^[72, 73], generando los derivados (**79** y **80**) (Esquema 3.1).



Esquema 3.1 Estrategia de síntesis propuesta para obtener los derivados monobenzoatos (**79**) y (**80**) desde el ácido (**76**).

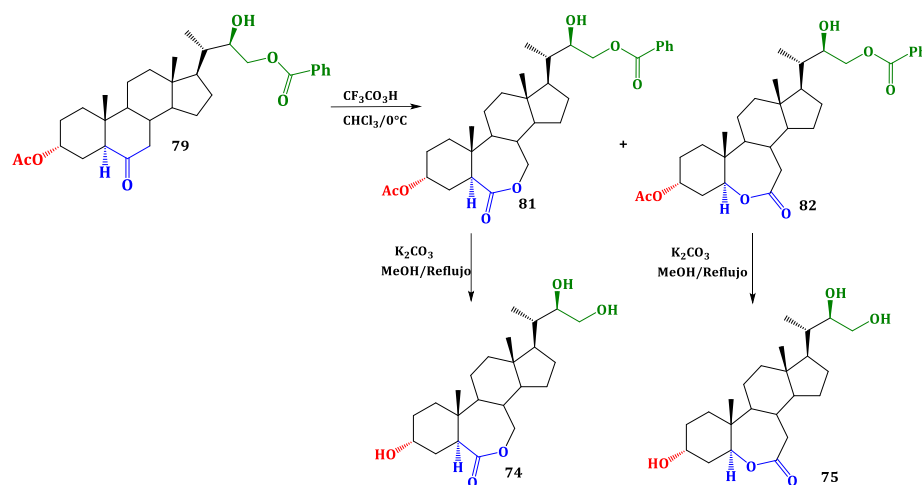
Posteriormente, por medio de reacción de saponificación en condiciones suaves de los derivados (**79**) y (**80**), se obtendrán los análogos (**73**) y (**62**), respectivamente (Esquema 3.2). Para la determinación de la estereoquímica en la posición C-22 del triol (**73**), se realizará un estudio comparativo y de correlación con los datos de desplazamientos químicos de señales de los espectros de ^1H y ^{13}C RMN con las señales del compuesto (**62**)^[71,72].



Esquema 3.2 Reacción de saponificación para obtener los análogos 2-desoxi BRs (**62**) y (**73**).

Para obtener los nuevos análogos de BRs 2-desoxi lactonas (**81**) y (**82**) (Esquema 3.3), el paso consiste en introducir el grupo lactona (7-oxa y 6-oxa) en el anillo B. Esta incorporación se puede realizar por medio de la reacción de oxidación de Baeyer-Villiger con el sistema $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}_2$ sobre el derivado monobenzoilado (**79**) (Esquema 3.3), debido a que es conocido que la oxidación de esteroides del tipo 5α -6-ceto con sustituyentes oxigenados en las posiciones 2α - 3α , 3α y/o 3β , pueden ocurrir con un control regioselectivo para la formación de lactonas de tipo 7-oxa, cuando grupos

electroattractores (acetilo^[43, 48, 49, 66, 75, 81], benzoilo^[43, 81], tosilo^[43, 81], trifluoroacetilo^[81] y acetonido^[48]) están presentes en la posición C-3^[81]. Además, se ha demostrado que los rendimientos globales de lactonización son mayores con la presencia de estos grupos electroattractores, que cuando esta oxidación se lleva a cabo en presencia de grupos hidroxilo libres^[82]. Adicionalmente ocurre una regioselectividad similar en la oxidación de Baeyer-Villiger de esteroides con el sistema *m*-ACPB/NaHCO₃/CH₂Cl₂, pero las reacciones se desarrollan muy lentamente^[81, 83].



Esquema 3.3 Estrategia de síntesis para la obtención de las lactonas (**81**) y (**82**) y los nuevos análogos 2-desoxi BRs (**74**) y (**75**), desde el derivado monobenzoato (**79**).

Por lo tanto, la reacción de oxidación de Baeyer-Villiger con el sistema $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}_2$ sobre el derivado monobenzoilado (**79**), producirá las lactonas (**81**) y (**82**), donde se espera que el regiocontrol de la oxidación forme mayoritariamente la lactona 7-oxa (**81**) por sobre la (**82**) (Esquema 3.3), como fue descrito para la síntesis de análogos de estructura similar^[71,72]. Finalmente, por medio de reacción de saponificación en condiciones suaves ($\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}/\text{reflujo}$), y siguiendo el protocolo descrito para análogos de estructura similar^[71,72], se obtendrán los nuevos análogos de BRs (**74**) y (**75**).

3.2 Evaluaciones biológicas

3.2.1 Material vegetal

Las semillas de arroz a utilizar serán proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y corresponden a *Oryza sativa* variedad denominada Zafiro. El estudio de los efectos de los nuevos análogos de brasinoesteroides sobre el crecimiento, será llevado a cabo con la colaboración de la Dra. Katy Díaz Peralta perteneciente al Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

3.2.2. Test de inclinación de la lámina de arroz

Para determinar la actividad sobre la elongación de la lámina de arroz de los análogos de BRs se utilizarán semillas de arroz (*Oryza sativa*) variedad Zafiro, facilitadas por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA-La Platina. Las semillas se lavarán y se dejarán en remojo con agua destilada estéril durante 24 horas, luego se sembrarán en sustrato/perlita/vermiculita (2:1:1).

Una vez que las plantas alcancen el tamaño ideal para obtener el segundo internado de la lámina, se cortarán los segmentos de la hoja, que consiste en la segunda lámina foliar (5 cm de largo) y la segunda lámina conjunta y la vaina (4 cm de largo), éstos segmentos se incubarán en 60 mL de agua destilada estéril y se probarán a distintas concentraciones de brasinolida (BL) y los análogos de BRs ($1,0 \times 10^{-6}$ M, $1,0 \times 10^{-7}$ M y $1,0 \times 10^{-8}$ M) y el control negativo que sólo llevará agua. Después de incubar durante 48 horas a 25°C en oscuridad, la magnitud de la apertura del ángulo se medirá entre la hoja y la vaina. (Versión modificada de Wada et al.,^[37, 71]). El control positivo utilizado será brasinolida (**1**) (APE***BIO**).

CAPÍTULO 4 – PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiales y Equipos: Síntesis orgánica

4.1.1 Solventes

Los solventes utilizados fueron adquiridos desde Sigma-Aldrich, Merck y Fluka A.G. en grado analítico (p.a.)

Solventes de grado técnico purificados por destilación y posterior secado con sulfato de magnesio anhidro (MgSO_4) o cloruro de calcio anhidro (CaCl_2).

- Acetato de etilo, $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, Merck (EMSURE) (destilación a 77°C).
- Benceno, C_6H_6 , Merck, (EMSURE).
- Cloroformo deuterado 99,96 atom % D, CDCl_3 , Sigma-Aldrich.
- Cloroformo, CHCl_3 , Merck (EMSURE).
- Diclorometano, CH_2Cl_2 , Merck (EMSURE) (destilación a 40°C).
- Éter dietílico, $(\text{C}_2\text{H}_5)_2$, Merck (EMSURE).
- Éter de petróleo, MTEDIA.
- Hexano, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, Merck (EMSURE) (destilación entre 60° a 80°C).
- Metanol, CH_3OH , Merck (EMSURE).
- Metanol deuterado 99,8 atom % D, CD_3OD , Sigma-Aldrich.
- *Terc*-butanol, $(\text{CH}_3)_3\text{COH}$, Merck (EMSURE).

4.1.2 Insumos

- Benzofenona, 99%, $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{CO}$, Sigma-Aldrich.
- Bicarbonato de sodio, NaHCO_3 , Merck.
- Bisulfato de potasio, KHSO_4 , Sigma-Aldrich.
- Bromuro de potasio, KBr , MERCK (EMSURE).
- Cloruro de sodio, NaCl , Merck (EMSURE).
- Cromatoplacas de sílicagel 60 F_{254} Merck.
- Papel filtro 125 mm, Filtros Anovia S. A.
- Papel pH, Prolabo.
- Sílicagel para cromatografía en columna (0,040-0,063 mm), MERCK.

- Sílicagel 60 para cromatografía en columna (0,063-0,200mm) Merck.
- Sodio, 99,9%, Na, Sigma-Aldrich.
- Sulfato de magnesio anhidro, $MgSO_4$, Merck (EMSURE).
- Tiosulfato de sodio pentahidratado, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, Analar.

4.1.3 Reactivos

- Acetato de cobre II monohidratado, 98%, $Cu(AcO)_2 \cdot H_2O$, Sigma-Aldrich.
- Acetato de plomo IV, $Pb(AcO)_4$, Sigma-Aldrich.
- Ácido hiodeoxicólico p.a, 98%, $C_{24}H_{40}O_4$, AK Scientific, Inc.
- Ácido sulfúrico, 98%, 1,84 g/mL, H_2SO_4 , Merck (EMSURE).
- Ácido clorhídrico, p.a, 37%, 1,19 g/mL, HCl, Merck (EMSURE).
- Anhídrido acético, 98,5%, 1,08g/mL, $(CF_3CO)_2O$, Merck (EMSURE).
- Bicarbonato de sodio, $NaHCO_3$, Sigma-Aldrich.
- Carbonato de potasio, 99%, K_2CO_3 , Sigma-Aldrich.
- Cloruro de benzoilo, $PhCOCl$, 99%, Sigma-Aldrich.
- Hexacianoferrato (III) de potasio, $K_3Fe(CN)_6$, 99,0% Sigma-Aldrich.
- Metanosulfonamida, $CH_3SO_2NH_2$, 97%, Sigma-Aldrich.
- Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
- Piridina, anhidra 99,8%, C_5H_5N , Sigma-Aldrich.
- Solución reveladora H_2SO_4 10% v/v.
- Tetraóxido de osmio, 98%, OsO_4 , Sigma-Aldrich.
- 4-clorobenzoato de hidroquinidina, 98%, DHQD-CLB, $C_{27}H_{29}ClN_2O_3$, Sigma-Aldrich.
- 4-(dimetilamino)piridina, (DMAP), $C_7H_{10}N_2$, Alfa-Aesar.

4.1.4 Cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas cromatográficas de Sílicagel Merck 60F 254. Fueron eluidas con mezclas de acetato de etilo y hexano en proporciones adecuadas para cada muestra. Los cromatogramas se revelaron en luz ultravioleta (UV 365 nm) y por pulverizado de la placa con una solución acuosa de ácido sulfúrico al 10%, con posterior calcinación sobre una placa calefactora.

4.1.5 Cromatografía en columna

Se realizaron con Sílica gel Merck 60 (0,032 -0,063 mm) o Sílicagel 60 Merck (0,063-0,2 mm). Los eluyentes fueron mezclas de acetato de etilo y hexano aplicadas en diferentes gradientes de polaridad y se indican en cada caso.

4.2 Instrumentos y Equipos

Puntos de Fusión (PF): Los puntos de fusión fueron medidos en un instrumento StuartTM melting point apparatus SMP3. El cual posee bloque de calefacción que se acomoda en tres tubos capilares. Para el control de temperatura cuenta con sensores Pt100. La calefacción es programable, contiene calentamiento rápido a 10°C/min a unos pocos grados del punto de fusión esperado y también cuenta con velocidades de rampa más lentas.

Espectros de infrarrojo (IR): Los espectros IR fueron registrados en un espectrómetro Thermo[®] Nicolet 6700 y se midieron en discos de bromuro de potasio (KBr). Las frecuencias de absorción fueron expresadas en número de onda (cm⁻¹).

Espectro de Masa de Alta Resolución (HRMS ESI): Los espectros de Masas de Alta Resolución fueron registrados en un espectrómetro de masas Exactive Plus Orbitrap (Thermo Scientific, Bremen, Alemania). El análisis de los productos se realizó con los siguientes parámetros relevantes: temperatura del calentador 100 °C; flujo de gas de la envoltura 5 (unidad arbitraria); Flujo de gas de barrido 0 (unidad arbitraria) y voltaje de pulverización 3.0 kV en modo negativo. Las mediciones de masa precisas se realizaron a un poder de resolución de 140,000 FWHM en el rango m/z 300-500.

Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN): Los espectros (¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT-135, 2D-HSQC y 2D-HMBC) fueron registrados en un espectrómetro digital Bruker Avance 400. Las mediciones fueron llevadas a cabo utilizando como solvente cloroformo deuterado (CDCl₃) o metanol deuterado (CD₃OD) al 99,8%. Los desplazamientos químicos (δ) son expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento *J* en Hertz (Hz). Como referencia se utilizó el desplazamiento químico de las señales residuales para los espectros de ¹H: $\delta_{\text{CDCl}_3} = 7,24 \text{ ppm}^{[84]}$, $\delta_{\text{CD}_3\text{OD}(1)} = 3,31 \text{ ppm}^{[84]}$, $\delta_{\text{CD}_3\text{OD}(2)} = 4,78 \text{ ppm}^{[84]}$; y las señales residuales para los espectros de ¹³C: $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,23 \text{ ppm}^{[84]}$ y $\delta_{\text{CD}_3\text{OD}} = 49,2 \text{ ppm}^{[84]}$, respectivamente.

4.3 Materiales y equipos: biológicos

Los materiales y reactivos utilizados para realizar las evaluaciones biológicas de los análogos de BRs se detallan a continuación:

- Como control positivo se utilizó el compuesto brasinolida (BL), $C_{28}H_{48}O_6$, adquirido desde APE BIO, Boston, MA, USA.
- Los fungibles principales fueron materiales de plásticos como placas petri, tubos eppendorf y falcon y puntas de micropipeta P10, P200, P1000 y P5000.
- Los materiales utilizados para llevar a cabo la siembra de las plantas fueron sustrato, perlita, vermiculita, macetas y bandejas.

Los equipos utilizados fueron:

- Gabinete de bioseguridad tipo II NUARE.
- Cámara de crecimiento de plantas BIOBASE, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperiodo.
- Lupa estereoscópica Marca Leyca con cámara fotográfica incluida para el registro de los resultados cualitativos de los ángulos de inclinación en la lámina de arroz.

4.4 Abreviaturas generales

- Ac_2O : Anhídrido acético
- AcOEt : Acetato de etilo
- anh. : Anhidro
- CC : Cromatografía en columna
- CCF : Cromatografía en capa fina
- DCM : Diclorometano
- DMAP : 4-dimetil amino piridina
- DHQD-CLB : 4-clorobenzoato de hidroquinidina
- Et_2O : Éter dietílico
- Hex. : Hexano
- MeOH : Metanol
- MsO : Metanosulfonato
- N_2 : Nitrógeno
- NMO : *N*-metilmorfolina *N*-óxido
- Py : Piridina

- T°amb. : Temperatura ambiente
- 0,2:9,8 → 10:0,0 : Gradientes de polaridad en C.C.
- ADE : Agua destilada estéril.
- BL : Brasinolida (**1**) C₂₈H₄₈O₆.
- ILA : Inclinação de la Lámina de Arroz.

4.5 Abreviaturas en resonancia magnética nuclear

- RMN : Resonancia Magnética Nuclear.
- δ : desplazamiento químico.
- ppm : partes por millón.
- s : singlete.
- s.a : singlete ancho.
- d : doblete.
- t : triplete.
- dd : doble doblete.
- dt : doble triplete.
- ddd : doblete de doble doblete.
- m : multiplete.
- J : constante de acoplamiento.
- 2J y 3J : acoplamiento escalar heteronuclear a dos y tres enlaces, respectivamente.
- DEPT : *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.*
- HSQC : *Heteronuclear Single Quantum Correlation.*
- HMBC : *Heteronuclear Multiple Bond Connectivities.*
- 1D : Espectro mono-dimensional.
- 2D : Espectro bidimensional.
- *H : Asignación intercambiable con otro hidrógeno marcado con asterisco.
- *C : Asignación intercambiable con otro carbono marcado con asterisco.

4.6 Abreviaturas en espectroscopia infrarrojo

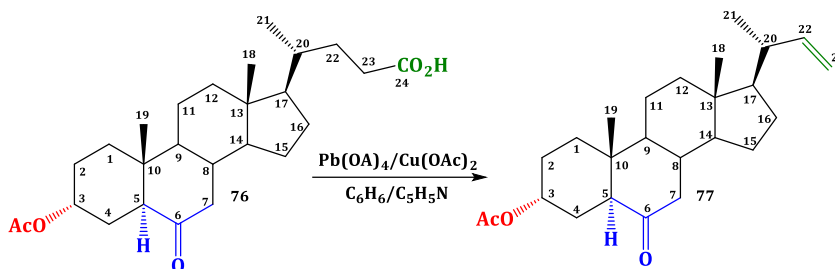
- IR : Espectro Infrarrojo
- cm^{-1} : Frecuencia en centímetros a la inversa

4.7 Abreviaturas en espectrometría de masas

- HRMS-ESI : High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry
- EM : Espectrometría de Masas de Resolución Unitaria
- $[\text{M}]^+$: Ion molecular
- $[\text{M}+1]^+$: Ion molecular + 1

4.8 Síntesis químicas

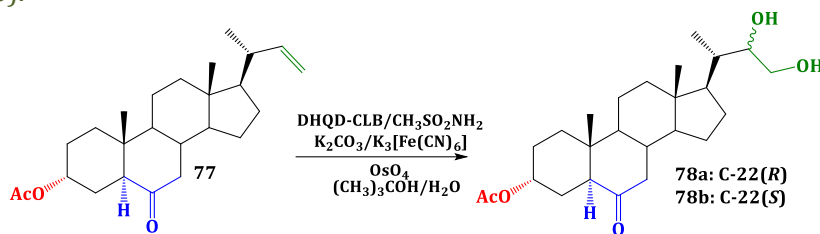
Síntesis de 3 α -acetoxi-24-nor-5 α -22-colen-6-ona (**77**).



A un balón de dos bocas provisto de un tubo refrigerante se añade el compuesto (**76**) (4,00 g, 9,25 mmol) y 150 mL de C_6H_6 seco, en agitación y condiciones de reflujo. Se adiciona $\text{Cu}(\text{AcO})_2$ (0,29 g, 1,5 mmol) y Py (1,5 mL). La mezcla de reacción se agita a reflujo por una hora y se añade $\text{Pb}(\text{AcO})_4$, (9,75 g, 22,0 mmol) dividido en cuatro porciones agregadas en un intervalo de una hora cada una. El término de la reacción se monitorea por CCF. La solución se deja enfriar, se lava con una solución acuosa de NaCl hasta obtener pH neutro. Luego de realizar una extracción discontinua líquido-líquido, la fase orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y seca a presión reducida (el C_6H_6 se recupera en su totalidad). El producto crudo se diluye en 10 mL de DCM y se separa por cromatografía en sílicagel (sílica fina 0,032 - 0,063 mm) utilizando una mezcla de solventes (éter de petróleo: EtOAc) en polaridad creciente (19,8:0,2 \rightarrow 15,8:4,2). El compuesto (**77**) se obtuvo con un porcentaje de rendimiento de 74,5 %. Punto de fusión: 64,0-66,1 $^\circ\text{C}$ (Hex./Et $_2\text{O}$), IR ν_{max} (cm^{-1}): 3082 (CH=CH $_2$); 2946; 2909; 2868 y 2849 (C-H),

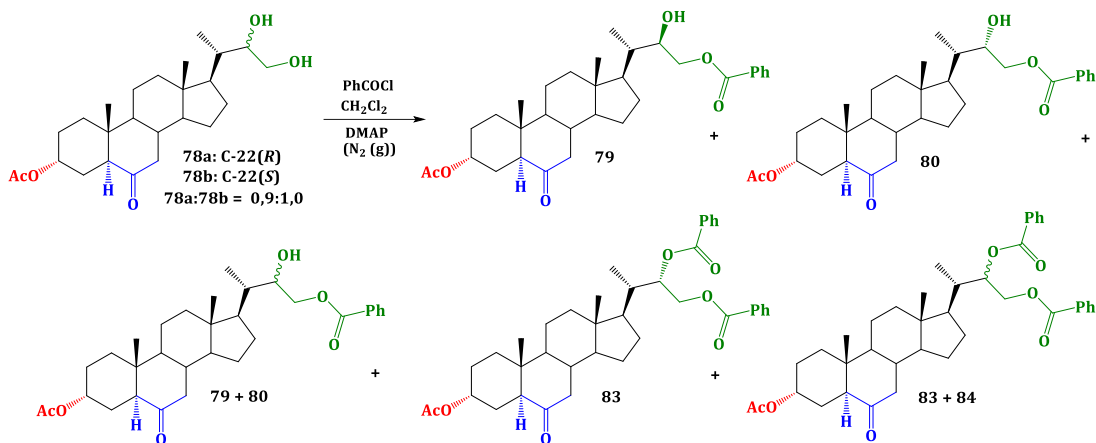
1740 (C=O), 1708 (C=O), 1637 (C=C), 1263 (C-O), 1021 (C-O), 988 (CH=CH₂), 926 (CH=CH₂), ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5,66 (ddd, *J* = 17,0; 10,2 y 8,4 Hz, 1H, H-22), 5,12 (m, 1H, H-3), 4,93 (dd, *J* = 17,0 y 1,8 Hz, 1H, H_{trans}-23), 4,83 (dd, *J* = 10,2 y 1,8 Hz, 1H, H_{cis}-23), 2,56 (dd, *J* = 12,1 y 3,2 Hz, 1H, H-5), 2,31 (dd, *J* = 13,1 y 4,5 Hz, 1H, H-7α), 2,04 (s, 3H, CH₃CO), 1,04 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H, H-21), 0,748 (s, 3H, H-19), 0,694 (s, 3H, H-18). ¹³C RMN, ver Tabla 4.1. HRMS-ESI (modo positivo): *m/z* calculado para C₂₅H₃₈O₃: 386,2821 [M]⁺; encontrado 387,2874 [M+1]⁺.

Síntesis de mezcla epimérica 3α-acetoxi-22(R/S)-23-dihidroxi-24-nor-5α-colan-6-ona (**78a** y **78b**).



A una mezcla de *tert*-butanol/agua (40 mL, 1:1 v/v) se adiciona el compuesto (**77**) (500 mg, 1,29 mmol), DHQD-CLB (157 mg, 0,331 mmol), CH₃SO₂NH₂ (228 mg, 2,33 mmol), K₂CO₃, (993 mg, 7,11 mmol) y K₃[Fe(CN)₆] (2494 mg, 7,50 mmol), la cual se deja en agitación por 5 minutos. Luego se adicionan 700 uL de solución de OsO₄, en *tert*-butanol (1,0 g en 20 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente por seis horas, el avance y término de ésta se monitorea por CCF. Luego de finalizada la reacción, se adiciona 10 mL de H₂O y 10 mL de solución saturada de Na₂S₂O₃·5H₂O. La muestra se extrae con acetato de etilo (2 x 30 mL), la fase orgánica se seca sobre MgSO₄, se filtra y el solvente se evapora completamente en rotaevaporador. El producto crudo se diluye en 10 mL de DCM y se purifica por cromatografía en sílica gel (sílica 0,063 – 0,2 mm) utilizando una mezcla de solventes (hex.:EtOAc) en polaridad creciente (19,8:0,2 → 9,8:10,2). Se obtuvo 515 mg, correspondiente a un 95% de rendimiento de la mezcla (**78a/78b**) (0,9:1,0). La reacción se realizó siete veces con porciones de aproximadamente 500 mg del alqueno, obteniéndose un total de 3,702 g de la mezcla de dioles (85-95% de rendimiento). Se informa el mejor resultado.

Síntesis de 3 α -acetoxi-23-benzoiloxi-22(*R*)-hidroxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**79**), 3 α -acetoxi-23-benzoiloxi-22(*S*)-hidroxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**80**), mezcla epimérica 3 α -acetoxi-22(*R/S*)-hidroxi-23-benzoiloxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**79-80**), 3 α -acetoxi-22(*S*), 23-dibenzoiloxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**83**) y mezcla epimérica 3 α -acetoxi-22(*R/S*), 23-dibenzoiloxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**83-84**)



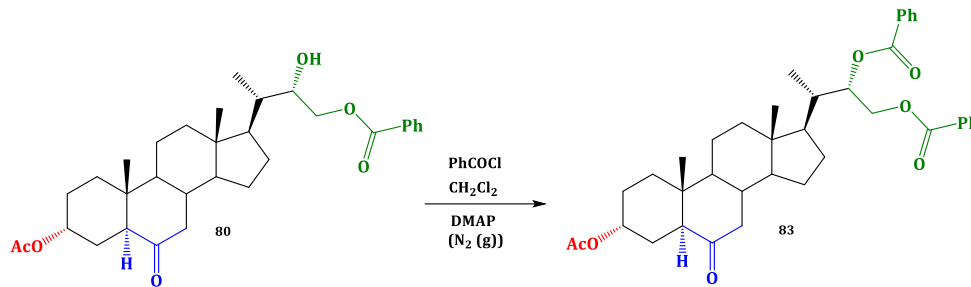
Bajo atmósfera de N₂, se disuelve la mezcla (**78a/78b**) (3,302 g, 7,85mmol), en 75 mL de DCM, DMAP (95,9mg, 0,785mmol) y Py (5mL, d= 0,981 g/mL), luego la mezcla de reacción se enfría a 0-5°C manteniendo la atmósfera de N₂. Posteriormente, se adiciona por goteo lento PhCOCl (1,10 mL, 9,47 mmol, d= 1,21 g/mL) y la mezcla de reacción se mantiene con agitación lenta por una hora y luego que alcance la temperatura ambiente la mezcla de reacción, se mantiene bajo estas condiciones por cuatro horas. El avance y término de ésta se monitorea por CCF. Luego de finalizada la reacción, se concentra a presión reducida hasta un volumen aproximado de 10 mL, se diluye con 40 mL de EtOAc. La mezcla fue lavada con solución saturada de KHSO₄ y con agua (3 x 30 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtra y el solvente se evapora completamente en rotaevaporador. El producto crudo se diluye en 10 mL de DCM y purificó por cromatografía en sílica gel (sílica 0,063 – 0,2 mm) utilizando una mezcla de solventes (hex.:EtOAc) en polaridad creciente (19,8:0,2 → 9,8:10,2), se obtuvo una mezcla de 4,9662 g correspondientes a compuestos mono y dibenzoilados. Posteriormente, se procede nuevamente al proceso de purificación por C.-C, en forma sucesiva (tres veces) para obtener cinco fracciones en el siguiente orden de polaridad. Fracción I: 283 mg del compuesto (**83**). Fracción II: 3968 mg de la mezcla de los compuestos (**83**) y (**84**). Fracción III: 248 mg de la mezcla de compuestos (**79**) y (**80**). Fracción IV: 59 mg del compuesto (**79**) y Fracción V: 198 mg del compuesto (**80**).

El compuesto (**79**) se obtuvo con un porcentaje de rendimiento de 1,4 %. Punto de fusión: 174,6±1 °C (Hex./Et₂O), **IR** ν_{\max} (cm⁻¹): 3509 (O-H), 2948 y 2869 (C-H), 1731 (C=O), 1718 (C=O), 1703 (C=O), 1603 (C=C Ar), 1580 (C=C Ar), 1451 y 1379 (C-H), 1277 (C-O), 1157 (C-O), 1088 (C-O), 712 (CH-Ar). **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,02 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H, H_{Ar}-2'), 7,54 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, H_{Ar}-4'), 7,41 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H, H_{Ar}-3'), 5,08 (m, 1H, H-3), 4,36 (dd, $J = 11,2$ y 8,4 Hz, 1H, H-23a), 4,23 (dd, $J = 11,2$ y 3,6 Hz, 1H, H-23b), 4,04 (dd, $J = 8,4$ y 3,4 Hz, 1H, H-22), 2,54 (dd, $J = 11,7$ y 2,9 Hz, 1H, H-5), 2,28 (dd, $J = 13,4$ y 4,6 Hz, 1H, H-7 α), 2,01 (s, 3H, CH₃CO), 0,990 (d, $J = 6,1$ Hz, 1H, H-21), 0,712 (s, 3H, H-19), 0,668 (s, 3H, H-18). **¹³C RMN** ver Tabla 4.1. **HRMS-ESI** (modo positivo): m/z calculado para C₃₂H₄₄O₆: 524,3138 [M]⁺; encontrado 525,3204 [M + 1]⁺.

El compuesto (**80**) se obtuvo con un porcentaje de rendimiento de 4,8 %. Punto de fusión: 195±1 °C (Hex./Et₂O), **IR** ν_{\max} (cm⁻¹): 3502 (O-H), 2951, 2936, 2893 y 2870 (C-H), 1730 (C=O), 1715 (C=O), 1693 (C=O), 1601 (C=C Ar), 1276 (C-O), 1070 (C-O), 716 (CH Ar). **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,05 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H, H_{Ar}-2'), 7,58 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, H_{Ar}-4'), 7,46 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, H_{Ar}-3'), 5,12 (m, 1H, H-3), 4,50 (dd, $J = 11,4$ y 1,7 Hz, 1H, H-23a), 4,20 (dd, $J = 11,4$ y 4,2 Hz, 1H, H-23b), 4,06 (m, 1H, H-22), 2,57 (dd, $J = 12,0$ y 2,9 Hz, 1H, H-5), 2,32 (dd, $J = 13,1$ y 4,5 Hz, 1H, H-7 α), 2,04 (s, 3H, CH₃CO), 1,06 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, H-21), 0,748 (s, 3H, H-19), 0,709 (s, 3H, H-18). **¹³C RMN** ver Tabla 4.1. **HRMS-ESI** (modo positivo): m/z calculado para C₃₂H₄₄O₆: 524,3138 [M]⁺; encontrado 525,3186 [M + 1]⁺.

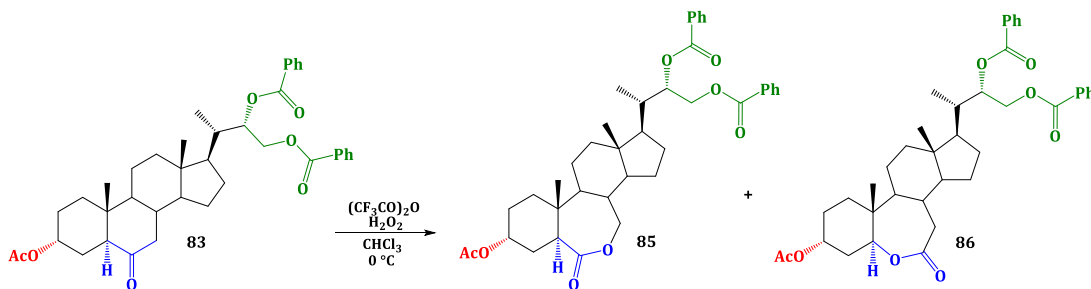
El compuesto (**83**) se obtuvo con un porcentaje de rendimiento de 5,7 %. Punto de fusión: 205,9 ±2 °C (Hex./Et₂O), **IR** ν_{\max} (cm⁻¹): 2943 y 2867, (C-H), 1736 (C=O), 1717 (C=O), 1710 (C=O), 1602 (C=C Ar), 1380 (CH₃), 1284 (C-O), 1112 (C-O), 1070 (C-O), 713 (CH Ar). **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,06 (dd, $J = 8,5$ y 1,4 Hz, 2H, H_{Ar}-2''), 7,97 (dd, $J = 8,5$ y 1,4 Hz, 2H, H_{Ar}-2'), 7,55-7,50 (m, 2H, H_{Ar}-4'' y H_{Ar}-4'), 7,44 (dd, $J = 7,9$ y 7,9 Hz, 2H, H_{Ar}-3'' y H_{Ar}-5''), 7,38 (dd, $J = 7,9$ y 7,4 Hz, 2H, H_{Ar}-3' y H_{Ar}-5'), 5,56 (dt, $J = 9,4$ y 3,1 Hz, 1H, H-22), 5,12 (ta, $J = 2,6$ Hz, 1H, H-3), 4,66 (dd, $J = 12,0$ y 2,3 Hz, 1H, H-23a), 4,49 (dd, $J = 12,0$ y 9,4 Hz, 1H, H-23b), 2,57 (dd, $J = 12,5$ y 3,2 Hz, 1H, H-5), 2,34 (dd, $J = 13,0$ y 4,6 Hz, 1H, H-7 α); 2,05 (s, 3H, CH₃CO), 1,16 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H, H-21), 0,748 (s, 3H, H-19), 0,710 (s, 3H, H-18). **¹³C RMN** ver Tabla 4.1. **HRMS-ESI** (modo positivo): m/z calculado para C₃₉H₄₈O₇: 628,3400 [M]⁺; encontrado 629,3461 [M + 1]⁺.

Síntesis de 3 α -acetoxi-22(*S*), 23-dibenzoiloxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**83**) desde (**80**).



Se disuelve el compuesto (**80**) (100 mg, 0,191 mmol) en 20 mL de DCM, con 1,0 mL de Py, 0,5 mg de DMAP, de PhCOCl (0,5 mL, 4,30 mmol) y la mezcla de reacción se mantiene con agitación constante y atmósfera de N₂. El avance y término de la reacción se monitorea por CCF (2 h). Una vez finalizada la reacción se reduce el volumen de la reacción a aproximadamente a 5 mL y se agregan 20 mL de EtOAc. La fase orgánica fue lavada con solución KHSO₄ al 5% (2 x 5 mL) y H₂O hasta obtener pH neutro (2 x 10 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y el solvente se evapora completamente en rotaevaporador. El producto crudo se diluye en 10 mL de DCM y purifica por CC en sílica gel (sílica fina 0,032 - 0,063 mm) utilizando una mezcla de solventes (éter de petróleo:EtOAc) en polaridad creciente (19,8:0,2 → 14,2:5,8). Se obtiene 114 mg del compuesto (**83**) con un porcentaje de rendimiento de 95 %. Los datos espectroscópicos de IR, ¹H RMN y ¹³C RMN fueron consistentes con los obtenidos anteriormente.

Síntesis de 3 α -acetoxi-22(*S*), 23-dibenzoiloxi-24-nor-5 α -colan-7-oxolactona (**85**) y 3 α -acetoxi-22(*S*), 23-dibenzoiloxi-24-nor-5 α -colan-6-oxolactona (**86**) desde (**83**).

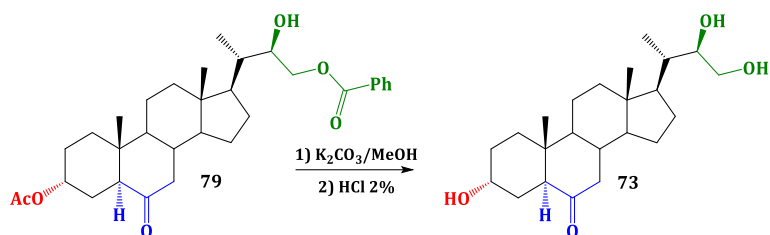


Preparación del agente oxidante: H₂O₂ 30% M/M (0,40 mL, 26,5 mmol) se gotea lentamente sobre una solución de (CF₃CO)₂O, (1,20 mL, 6,00 mmol en 3 mL de CHCl₃) a 0°C y se agita por 30 minutos. Esta mezcla oxidante (4,2 mL) se adiciona sobre una solución de compuesto (**83**) (74,9 mg, 0,119 mmol en 10 mL de CHCl₃) manteniendo la

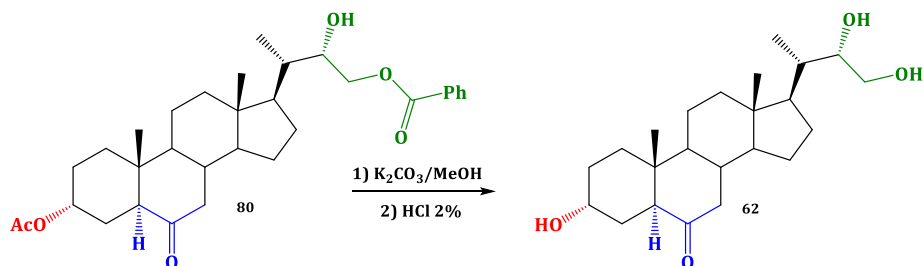
reacción a 0°C por una hora y luego a temperatura ambiente por 24 horas bajo atmósfera de N₂. El avance y término de la reacción se monitorea por CCF. La mezcla de reacción se concentra en rotaevaporador a un volumen aproximado de 5 mL. Se agrega 40 mL de EtO₂ y luego la mezcla se lava con una solución saturada de NaHCO₃ (2 x 20 mL) y luego con H₂O (2 x 10 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄, se filtra y el solvente se evapora completamente en rotaevaporador. El producto crudo se diluye en 5 mL de DCM, se purifica y separa por cromatografía en columna (sílica fina 0,032 - 0,063 mm) utilizando una mezcla de solventes (hexano:EtOAc) en polaridad creciente (0,2:48,0 → 23,8:26,2). Se obtienen tres fracciones: Fracción I, 29,8 mg del compuesto (**85**), Fracción II, 24,6 mg de la mezcla de (**85**) y (**86**) y Fracción III, 20,5 mg del compuesto (**86**).

El compuesto (**85**) se obtuvo con un porcentaje de rendimiento de 38,8 %. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,06 (dd, *J* = 8,7 y 1,4 Hz, 2H, H_{Ar}-2''), 7,96 (dd, *J* = 8,7 y 1,2 Hz, 2H, H_{Ar}-2'), 7,58-7,51 (m, 2H, H_{Ar}-4'' y H_{Ar}-4'), 7,44 (dd, *J* = 7,8 y 7,8 Hz, 2H, H_{Ar}-3'' y H_{Ar}-5''), 7,39 (dd, *J* = 7,5 y 7,5 Hz, 2H, H_{Ar}-3' y H_{Ar}-5'), 5,56 (dt, *J* = 9,3 y 3,0 Hz, 1H, H-22), 5,09 (sa, 1H, H-3), 4,64 (dd, *J* = 12,1 y 2,2 Hz, 1H, H-23a), 4,47 (dd, *J* = 12,1 y 9,3 Hz, 1H, H-23b), 4,16-4,06 (m, 2H, H-7α y H-7β), 3,04 (dd, *J* = 12,4 y 4,3 Hz, 1H, H-5), 2,09 (s, 3H, CH₃CO), 1,15 (d, *J* = 7,7 Hz, 3H, H-21), 0,907 (s, 3H, H-19), 0,742 (s, 3H, H-18).

El compuesto (**86**) se obtuvo con un porcentaje de rendimiento de 26,7 %. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,06 (dd, *J* = 8,4 y 1,2 Hz, 2H, H_{Ar}-2''), 7,97 (dd, *J* = 8,7 y 1,5 Hz, 2H, H_{Ar}-2'), 7,58-7,51 (m, 2H, H_{Ar}-4'' y H_{Ar}-4'), 7,44 (dd, *J* = 8,0 y 8,0 Hz, 2H, H_{Ar}-3'' y H_{Ar}-5''), 7,39 (dd, *J* = 7,7 y 7,7 Hz, 2H, H_{Ar}-3' y H_{Ar}-5'), 5,55 (dt, *J* = 9,4 y 2,5 Hz, 1H, H-22), 5,14 (sa, 1H, H-3), 4,64 (dd, *J* = 11,8 y 2,4 Hz, 1H, H-23a), 4,50-4,45 (m, 2H, H-23b y H-5), 2,58-2,46 (m, 2H, H-7α y H-7β) 2,09 (s, 3H, CH₃CO), 1,15 (d, *J* = 7,7 Hz, 3H, H-21), 0,916 (s, 3H, H-19), 0,738 (s, 3H, H-18).

Síntesis de 3 α , 22(*R*), 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**73**)

Se disuelve el compuesto (**79**) (87 mg, 0,17 mmol) en 30 mL de CH₃OH, con agitación suave y condiciones de reflujo. Se agrega 10 mL de solución de K₂CO₃ al 15% y se mantienen las condiciones hasta el término de la reacción, indicado por CCF, noventa minutos. La muestra se concentra en rotaevaporador hasta sequedad. Posteriormente, se adiciona 10 mL de solución de HCl 2,5% y el precipitado formado fue lavado con 10 mL de solución 10% de NaHCO₃ y luego con agua (10 mL), hasta tener pH neutro en los lavados. El sólido fue secado al vacío hasta mantener peso constante. Se obtiene 52 mg del compuesto (**73**) con un porcentaje de rendimiento de 82,8 %. Punto de fusión: 210,5 \pm 1 °C (Et₂O/MeOH), **IR** ν_{\max} (cm⁻¹): 3421 (O-H), 2941 y 2867, (C-H), 1703 (C=O), 1461 (C-H), 1380 (CH₃), 1284 (C-O), 1051 (C-O). **¹H RMN** (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 4,07 (ta, 1H, H-3), 3,73 (ta, *J* = 6,5 Hz, 1H, H-22), 3,53 (dd, *J* = 10,9 y 7,1 Hz, 1H, H-23a), 3,46 (dd, *J* = 10,9 y 6,5 Hz, 1H, H-23b), 2,78 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H, H-5), 2,24 (dd, *J* = 13,0 y 4,7 Hz, 1H, H-7 α), 2,13 (ta, *J* = 13,0 Hz, 1H, H-7 β), 0,925 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H, H-21), 0,762 (s, 3H, H-19), 0,753 (s, 3H, H-18). **¹³C RMN** ver Tabla 4.2. **HRMS-ESI** (modo negativo): *m/z* calculado para: C₂₃H₃₈O₄: 378,2770 [M]⁺; encontrado 377,2702 [M - 1]⁺.

Síntesis de 3 α , 22(*S*), 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**62**)

Se disuelve el compuesto (**80**) (50 mg, 2,46 mmol) en 30 mL de CH₃OH, con agitación suave y condiciones de reflujo. Se adiciona 10 mL de solución de K₂CO₃ al 15% y se

mantienen las condiciones hasta el término de la reacción, indicado por CCF, noventa minutos. La muestra se concentra en rotaevaporador hasta sequedad. Posteriormente, se agrega 5 mL de solución de HCl 2,5% y el precipitado formado se lava con 5 mL de solución 10% de NaHCO₃ y luego con agua (10 mL), hasta tener pH neutro en las aguas de lavado. El sólido se seca al vacío hasta mantener peso constante. Se obtienen 32,5 mg del compuesto (**62**) con un porcentaje de rendimiento de 90 %. Punto de fusión: 229,1±5 °C (Et₂O/MeOH), **IR** ν_{\max} (cm⁻¹): 3387 (O-H), 2940, 2906 y 2871 (C-H), 1700 (C=O), 1246 (C-O), 1050 (C-O), 754 (CH). **¹H RMN** (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 4,04-4,03 (m, 1H, H-3), 3,71 (dt, $J = 8,9$ y $3,2$ Hz, 1H, H-22), 3,60 (dd, $J = 11,3$ y $2,7$ Hz, 1H, H-23a), 3,40 (dd, $J = 11,3$ y $8,9$ Hz, 1H, H-23b), 2,74 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H, H-5), 2,21 (dd, $J = 13,1$ y $4,8$ Hz, 1H, H-7 α), 2,11 (ta, $J = 13,1$ Hz, 1H, H-7 β), 2,04 (dt, $J = 12,2$ y $2,2$ Hz, 1H, H-12 β), 0,943 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, H-21), 0,732 (s, 3H, H-19), 0,716 (s, 3H, H-18). **¹³C RMN** ver Tabla 4.2. **HRMS-ESI** (modo positivo): m/z calculado para: C₂₃H₃₈O₄: 378,2770 [M]⁺; encontrado 379,2823 [M + 1]⁺.

Tabla 4.1. δ (ppm) de ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100,6 MHz) para los compuestos (77), (79), (80) y (83).

N° C	(77)	(79)	(80)	(83)
1	32,38	32,22	32,36	32,36
2	28,19	27,43	27,41	27,21
3	68,85	68,73	68,81	68,79
4	25,27	25,13	25,26	25,25
5	52,27	52,44	52,58	52,55
6	211,81	211,81	211,62	211,46
7	46,75	46,56	46,69	46,65
8	37,92	37,85	37,90	37,86
9	53,79	52,00	52,90	52,94
10	41,28	41,15	41,23	41,49
11	21,06	20,97	21,06	21,06
12	39,36	38,26	39,41	39,41
13	42,94	42,71	43,41	43,49
14	55,41	53,52	53,72	53,68
15	25,01	24,87	25,01	25,00
16	23,91	23,71	24,02	24,00
17	56,80	56,49	56,41	56,41
18	12,18	11,83	11,81	11,87
19	12,41	12,29	12,40	12,39
20	41,10	39,31	40,33	38,55
21	20,04	12,30	12,90	13,72
22	144,89	71,40	71,77	74,60
23	111,84	68,84	66,39	62,98
CH_3CO	21,41	21,32	21,41	21,40
CH_3CO	170,26	170,24	170,27	170,24
$\text{C}22\text{-CO-Ar}$				166,62
$\text{C}23\text{-CO-Ar}$		166,74	167,01	165,88
$\text{C}1'\text{-Ar}$		129,80	129,86	130,33
$\text{C}4'\text{-Ar}$		133,05	133,22	133,06
$\text{C}2'\text{-Ar y C}6'\text{-Ar}$		129,53	129,63	129,60
$\text{C}3'\text{-Ar y C}5'\text{-Ar}$		128,31	128,45	128,35
$\text{C}1''\text{-Ar}$				129,74
$\text{C}4''\text{-Ar}$				133,00
* $\text{C}2''\text{-Ar y C}6''\text{-Ar}$				129,63
* $\text{C}3''\text{-Ar y C}5''\text{-Ar}$				128,38

* Señales intercambiables.

Tabla 4.2. δ (ppm) de ^{13}C RMN (CD_3OD , 100,6 MHz) para los compuestos (62) y (73).

N° C	(62)	(73)
1	32,88	32,90
2	28,73	28,75
3	66,02	66,04
4	28,53	28,58
5	52,84	52,86
6	214,49	215,55
7	47,61	47,63
8	39,45	39,52
9	54,18	53,56
10	42,62	42,64
11	22,19	22,22
12	40,76	39,52
13	44,46	44,00
14	55,08	55,13
15	28,45	28,47
16	25,07	24,91
17	57,56	58,03
18	12,14	12,30
19	12,67	12,67
20	42,01	38,66
21	13,42	12,37
22	75,19	74,45
23	63,19	65,53

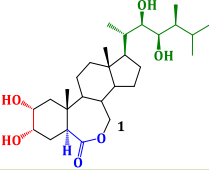
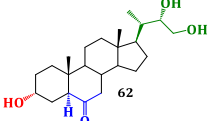
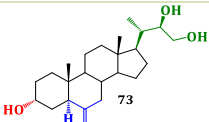
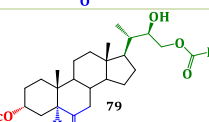
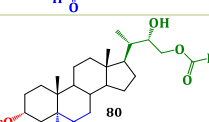
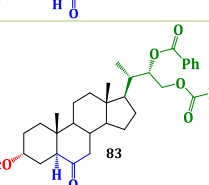
4.9 Evaluaciones Biológicas

Como se indicó en la Metodología, la actividad promotora del crecimiento de los compuestos sintetizados se evaluó utilizando el bioensayo de ILA^[85] y siguiendo un procedimiento descrito anteriormente^[86, 87]. Después de remojar las semillas de arroz (*Oryza sativa*) en agua destilada estéril durante 48 horas, las semillas se esterilizaron y cultivaron a 22 °C en una cámara de cultivo de plantas bajo fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad, en macetas con tierra y abundante agua. Las plántulas de arroz se cultivaron hasta el momento en que su crecimiento fuera homogéneo y presentaran el segundo internudo en la lámina principal. Se cortaron segmentos de 5 cm de largo, para posteriormente incubar seis segmentos por tratamiento en una placa de Petri que contiene 60 mL de agua destilada y una cantidad finita (0 M, $1,0 \times 10^{-6}$ M, $1,0 \times 10^{-7}$ M,

$1,0 \times 10^{-8}$ M) de los análogos de brasinoesteroides en solución acuosa. Después de dos días, se realizó el registro fotográfico con una cámara digital y se registró la medición del ángulo entre la lámina y la vaina del segundo internado con un transportador. Los resultados fueron expresados como el promedio del tratamiento \pm de la desviación estándar; para la simplificación estadística se utiliza la prueba de t de Student. Se obtuvieron datos de n=6-12 repeticiones.

De esta forma se registraron los resultados para los análogos de brasinoesteroides evaluados en el ensayo de ILA, los cuales se muestran en la Tabla 4.3

Tabla 4.3: Efecto de los análogos de Brasinoesteroides en la apertura del ángulo ($^{\circ}$) en el Ensayo de Inclinación de la Lámina de Arroz (ILA).

Análogos de brasinoesteroides.	Ángulo de inclinación de la lámina de arroz ($^{\circ}$)		
	$1,0 \times 10^{-6}$ M	$1,0 \times 10^{-7}$ M	$1,0 \times 10^{-8}$ M
 1	$70 \pm 7,6^*$	$41 \pm 4,5$	$31 \pm 1,0$
 62	$62 \pm 12,4$	$60 \pm 2,7^*$	$35 \pm 2,7^*$
 73	$24 \pm 5,8$	31 ± 5	$45 \pm 9,5^*$
 79	$70 \pm 1,0^*$	$64 \pm 2,5^*$	$28 \pm 2,9$
 80	$78 \pm 1,5^*$	$60 \pm 0,0^*$	$49 \pm 4,8^*$
 83	$35 \pm 2,9$	$34 \pm 2,5$	$24 \pm 2,5$
C. Negativo	$7 \pm 4,5$		

Control positivo: Brasinolida (1); Control negativo agua; * significa aquellos tratamientos significativos con respecto al control positivo (C+).

CAPÍTULO 5 - RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Resultados y Discusiones parte Química

Como se indicó anteriormente, uno de los objetivos de este trabajo fue sintetizar nuevos análogos de brasinoesteroides, donde el principal cambio estructural es reducir la longitud de la cadena lateral, pero manteniendo la función de glicol en la posición C22-C23. Generalmente, la introducción de esta función en la cadena lateral es mediante la reacción de dihidroxilación con OsO_4 , para lo cual se requiere la presencia de un enlace doble terminal. Para el caso de ácidos carboxílicos, esto se puede lograr mediante la reacción de descarboxilación oxidativa previa, usando el sistema $\text{Pb}(\text{OAc})_4/\text{Cu}(\text{OAc})_2$. Este método ha sido propuesto para obtener enlaces dobles terminales a partir de ácidos carboxílicos^[75, 88]. Específicamente, se ha aplicado ampliamente para la degradación de la cadena lateral de un gran número de ácidos biliares, incluidos derivados del ácido hiodeoxicólico (**14**)^[67,68]. Adicionalmente, la reacción de degradación carboxílica también se puede llevar a cabo usando el sistema $\text{PhI}(\text{OAc})_2/\text{CuSO}_4$ ^[67].

En este caso, cuando el ácido (**73**) fue tratado con el sistema $\text{Pb}(\text{OAc})_4/\text{Cu}(\text{OAc})_2$, se logró descarboxilar la cadena lateral y se obtuvo el alqueno terminal (**77**) con 74,5% de rendimiento. La formación del alqueno en la posición C22-C23 fue confirmada por datos espectroscópicos de ^1H y ^{13}C RMN. De esta forma, las señales observadas a $\delta_{\text{H}} = 5,66$ ppm (ddd, $J = 17,0; 10,2$ y $8,4$ Hz, 1H), $4,93$ ppm (dd, $J = 17,0$ y $1,8$ Hz, 1H) y $4,83$ ppm (dd, $J = 10,2$ y $1,8$ Hz, 1H) que fueron asignadas a los hidrógenos H-22, H-23_{trans} y H-23_{cis}, respectivamente. Mientras que las señales observadas en el espectro de ^{13}C RMN a $\delta_{\text{C}} = 144,89$ y $111,84$ ppm fueron asignadas a los carbonos C22 y C23, respectivamente. Estos datos espectroscópicos fueron consistentes con los reportados, por otros autores, para alquenos esteroidales con estructuras similares^[67, 89].

Recientemente se ha informado que la dihidroxilación de Upjohn del alqueno (**77**) con OsO_4/NMO produce una mezcla 1:7 de dioles epiméricos (**78a/78b**) con 72,3% de rendimiento^[71, 72]. La obtención de la mezcla epimérica es un resultado esperado dado que este efecto fue observado cuando otros núcleos esteroidales con enlace doble en la posición C22-C23 (24-nor-colánicos-22-eno) fueron hidroxilados con el mismo sistema^[79]. Esta reacción es estereoselectiva, debido a que el epímero 22(*S*) fue obtenido como el derivado mayoritario (68% de rendimiento)^[70] al igual que otros análogos con estructuras similares (compuestos (**58-62**), (**66-68**) y (**70**), Figura 1.11)^[67-71]. Debido a

que uno de los objetivos de este trabajo consistió en obtener preferentemente el epímero (**78b**) (con configuración *R* en C-22), se realizó la reacción de dihidroxilación asimétrica de Sharpless utilizando un inductor quiral (DHQD-CLB) sobre el alqueno (**77**), de acuerdo con un procedimiento descrito para otros análogos^[80].

En esta oportunidad mediante la reacción de dihidroxilación asimétrica de Sharpless sobre el alqueno (**77**), se logró obtener la mezcla de los glicoles epiméricos (**78a/78b**) con un rendimiento de 95%. La proporción de los glicoles en la mezcla fue de (**78a/78b**) = 0,9:1,0, la cual se determinó en base a las áreas de integración de las señales dobles del grupo CH₃-21 en el espectro de ¹H RMN comparando con el espectro de una muestra pura del compuesto (**78b**), según se indica en la Figura 5.1. De esta forma para el compuesto (**78b**), la señal para el grupo CH₃-21 fue observada a $\delta_H = 0,962$ ppm (d, $J = 6,9$ Hz, 3H)^[72], mientras que la señal del grupo CH₃-21 para el compuesto (**78a**) fue observada a $\delta_H = 0,925$ ppm (d, $J = 6,7$ Hz, 3H).

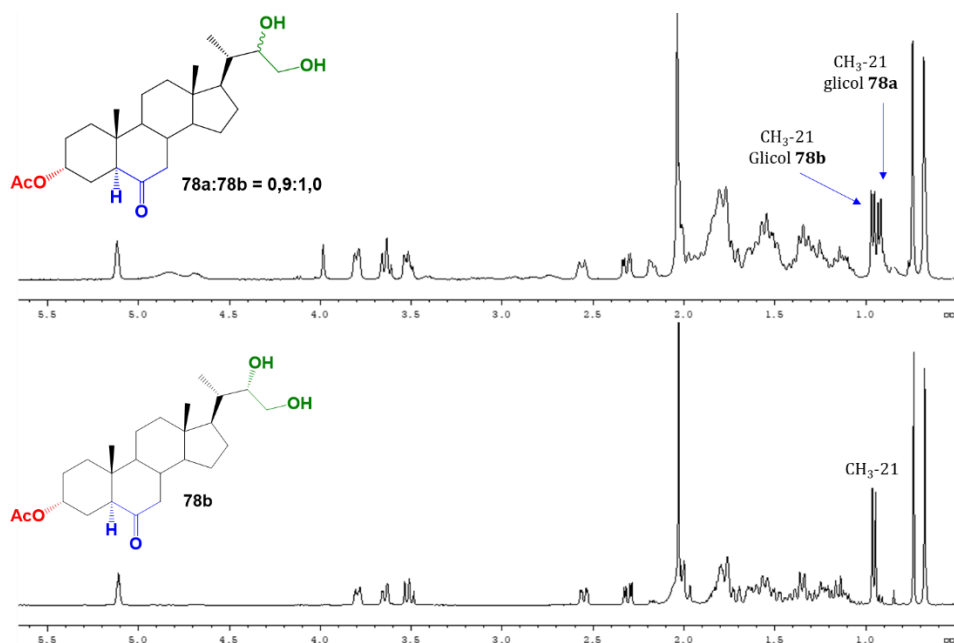


Figura 5.1. Comparación entre los espectros de ¹H RMN para el glicol (**78b**) y la mezcla de glicoles (**78a/78b**).

El mecanismo por el cual transcurre la reacción de dihidroxilación de Sharpless propone un ciclo catalítico el cual transcurre con la presencia de un agente co-oxidante [K₃Fe(CN)₆] que permite la re-oxidación de osmio (VI) a osmio (VIII), según se indica en la Figura 5.2^[90].

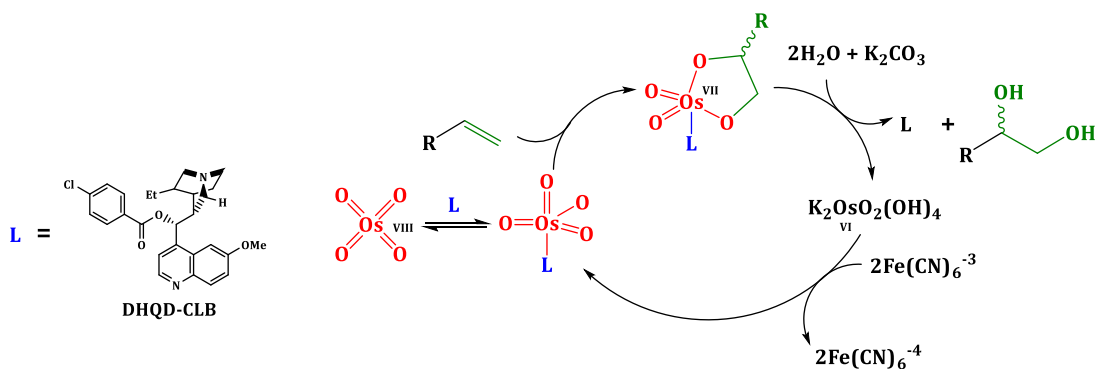


Figura 5.2. Mecanismo con ciclo catalítico propuesto para la reacción de dihidroxilación asimétrica de Sharpless.

Referente a la proporción de la mezcla de glicoles, en la cual se ve incrementada la producción del epímero C-22(*R*) (compuesto **78a**) respecto a la reacción de dihidroxilación de Upjohn, se puede explicar en términos del principio Curtin-Hammett^[91,92], que establece que la distribución del producto obtenido de dos conformaciones diferentes en el equilibrio está determinada, principalmente, por la diferencia de energía en el estado de transición. En otras palabras, la conformación que genera el estado de transición más estable, tiene la constante de reacción más alta y produce el producto mayoritario, además se considera en función del aumento de tamaño del agente oxidante (OsO_4), cuando se encuentra formando el complejo con el ligando quiral (DHQD-CLB) y por la conformación preferencial que adopta el enlace doble C22-C-23 frente al ataque del complejo OsO_4-L , donde la conformación I (cara izquierda) sigue siendo menos impedida que la conformación II (cara derecha) para el ataque del complejo OsO_4-L (lo que explica la leve mayor proporción para el epímero 22 (*S*)), pero también más alejada del grupo CH_3-21 , lo que permitiría una mayor aproximación por el plano izquierdo del enlace doble, y por lo tanto, permite un aumento en la obtención del epímero 22 (*S*), según se indica en la Figura 5.3.

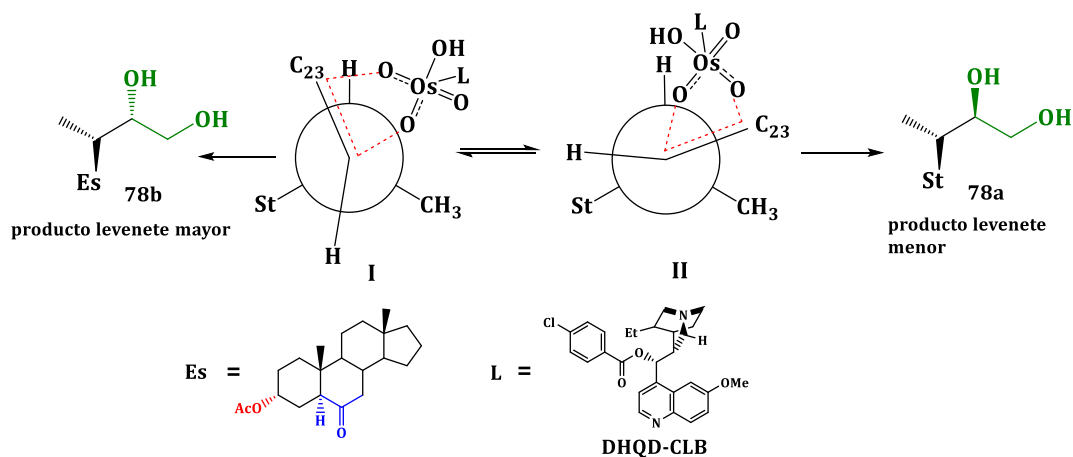
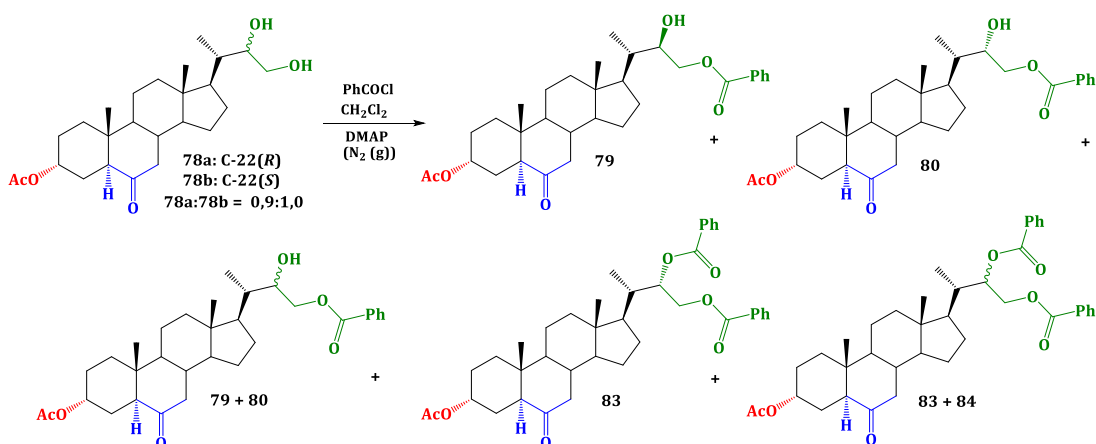


Figura 5.3. Representación esquemática del ataque del complejo $\text{OsO}_4\text{-L}$ sobre el enlace doble C22-C23, que muestra la conformación preferencial para la reacción de dihidroxilación asimétrica de Sharpless.

Como se indicó en la metodología que no es posible separar los glicoles (**78a**) y (**78b**) desde la mezcla por métodos convencionales (C.C., cristalización, etc.), y siguiendo con lo propuesto, el paso siguiente consistió en derivatizar esta mezcla mediante la reacción de benzoilación selectiva en la posición C-23 con cloruro de benzoilo, según se indicó en el Esquema 3.1 de la metodología, de tal forma de lograr separar los derivados benzoilados según se indicó previamente en referencia^[72]. Sin embargo, la reacción de benzoilación sobre la mezcla de glicoles (**78a/78b**), produjo una mezcla de derivados mono benzoilados en C-23 y dibenzoilados en C-22 y C-23, según se indica en el Esquema 5.1.



Esquema 5.1: Reacción de benzoilación de la mezcla (**78a/78b**), que produjo la mezcla de derivados (**79-84**).

Luego de reiteradas purificaciones de la mezcla de productos por cromatografía en columna, se lograron aislar los derivados (**79**) (1,2 %), (**80**) (4,0 %), (**83**) (5,7 %), la mezcla de epímeros monobenzoilados (**79-80**) (5,0 %, (**79:80**) = 1,0:0,7) y la mezcla de los epímeros dibenzoilados (**83-84**) (79,9 %, (**83:84**) = 1,0:0,5). La estereoquímica asignada como C-22(*R*) para el epímero (**79**), fue establecida por comparaciones considerando los desplazamientos químicos, constantes de acoplamiento (*J*) y multiplicidades en el espectro de ¹H RMN para las señales de H-22, H-23a, H-23b y CH₃-21, con las equivalentes observadas para el epímero (**80**), el cual fue reportado previamente con estereoquímica C-22 (*S*)^[72]. De esta forma las principales diferencias observadas entre los hidrógenos señalados se muestran en la Tabla 5.1, donde los hidrógenos que experimentan mayores variaciones en desplazamiento químico y valores de *J* corresponden a H-23a y CH₃-21. Estas variaciones pueden apreciarse de forma similar al comparar los espectros completos de ¹H RMN mostrados en la Figura 5.4, con lo cual se asignó la estereoquímica en C-22 como *R* para el epímero (**79**).

Tabla 5.1. Comparación entre las señales de ¹H RMN para H-22, H-23a-b y CH₃-21, para los epímeros (**79**) y (**80**).

Señal	Compuesto 79	Compuesto 80
H-22	4,04 ppm (dd, <i>J</i> = 8,4 y 3,4 Hz, 1H)	4,06 ppm (m, 1H)
H-23a	4,36 ppm (dd, <i>J</i> = 11,2 y 8,4 Hz, 1H)	4,50 ppm (dd, <i>J</i> = 11,4 y 1,7 Hz, 1H)
H-23b	4,23 ppm (dd, <i>J</i> = 11,2 y 3,6 Hz, 1H)	4,20 ppm (dd, <i>J</i> = 11,4 y 4,2 Hz, 1H)
CH₃-21	0,990 ppm (d, <i>J</i> = 6,1 Hz, 3H)	1,06 ppm (d, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H)

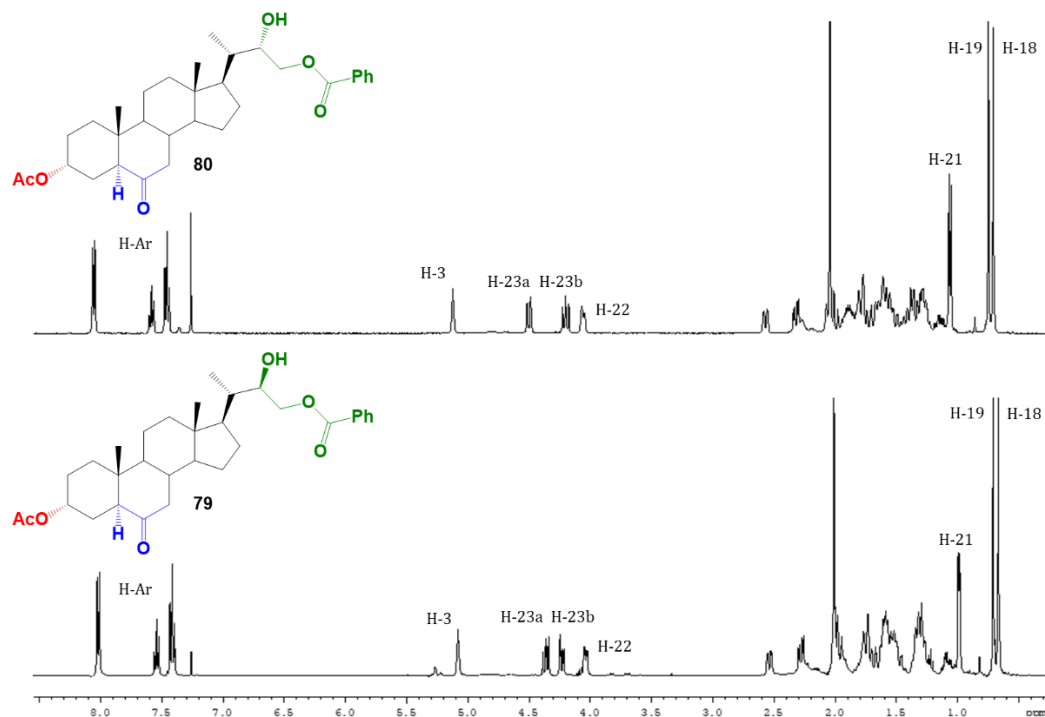
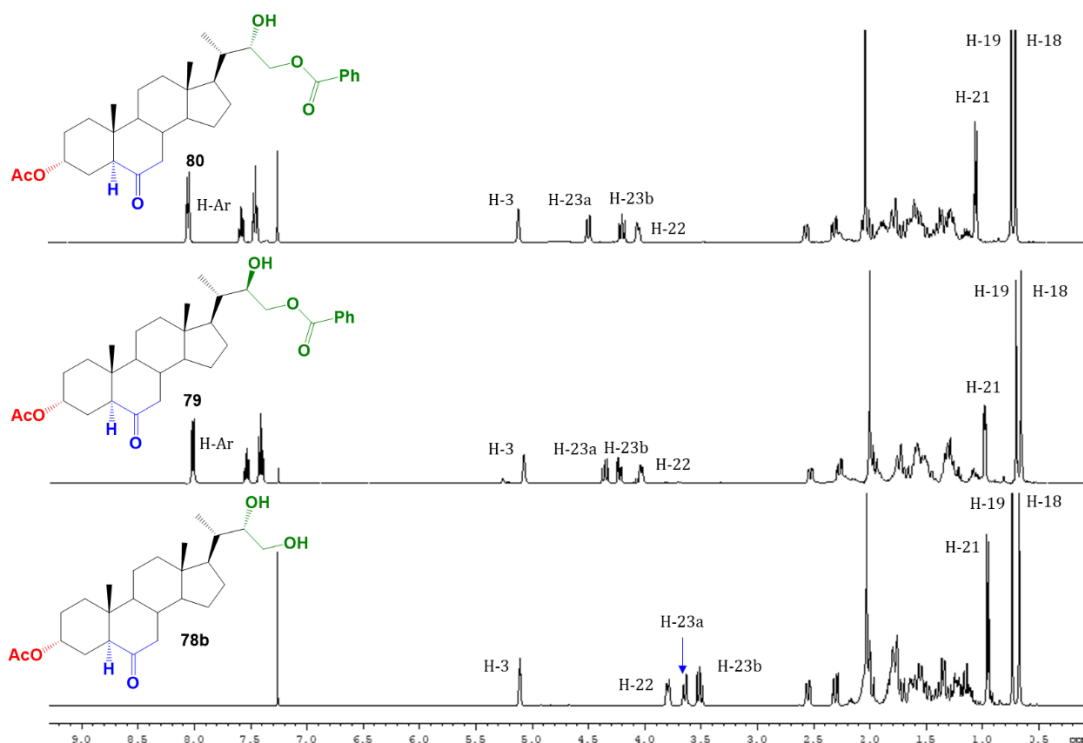


Figura 5.4. Comparación entre los espectros de ^1H RMN correspondientes a los epímeros (**79**) y (**80**), donde se observan las principales diferencias en el desplazamiento químico entre los hidrógenos H-23a y CH₃-21.

La confirmación de la mono benzoilación en la posición C-23 para ambos derivados (**79**) y (**80**) fue establecida en primera instancia considerando las reactividades químicas de alcoholes primarios y secundarios para la reacción de esterificación con cloruro de benzoilo, donde se establece que los alcoholes primarios son más reactivos que los alcoholes secundarios frente a esta reacción^[93,94]. Como segundo punto, comparando los datos de desplazamientos químicos de los hidrógenos H-23a y H-23b entre los espectros de ^1H RMN de los derivados (**79**) y (**80**) con el glicol precursor (**78b**) (reportado previamente^[72]), donde se observa claramente un desplazamiento químico a campos bajos para H-23a y H-23b en los derivados (**79**) y (**80**), debido a la presencia del grupo benzoato (atractor de electrones) enlazado al átomo de oxígeno de la posición C-23, como se indica en la Tabla 5.1, y en la comparación de los espectros de ^1H RMN de ambos epímeros (**79**) y (**80**), con el precursor (**78b**)^[72] mostrados en la Figura 5.5.

Tabla 5.2. Comparación entre las señales observadas de ^1H RMN para H-23a-b en los compuestos (**78b**), (**79**) y (**80**).

Señal	Compuesto 78b	Compuesto 79	Compuesto 80
H-23a	3,64 ppm (dd, $J = 10,8$ y $3,6$ Hz, 1H)	4,36 ppm (dd, $J = 11,2$ y $8,4$ Hz, 1H)	4,50 ppm (dd, $J = 11,4$ y $1,7$ Hz, 1H)
H-23b	3,51 ppm (dd, $J = 10,8$ y $9,6$ Hz, 1H)	4,23 ppm (dd, $J = 11,2$ y $3,6$ Hz, 1H)	4,20 ppm (dd, $J = 11,4$ y $4,2$ Hz, 1H)

**Figura 5.5.** Comparación entre los espectros de ^1H RMN correspondientes a los compuestos (**78b**), (**79**) y (**80**), donde se observan las principales diferencias en el desplazamiento químico para los hidrógenos H-23a y H-23b.

Como tercera evidencia experimental, desde los espectros de ^1H , ^{13}C , 2D HSQC y 2D HMBC de RMN, para el compuesto monobenzoilado (**79**), la señal observada a $\delta_{\text{C}} = 166,74$ ppm fue asignada al grupo carbonilo del éster aromático. Mientras que las señales a $\delta_{\text{C}} = 133,05$, $129,81$, $129,54$, y $128,31$ ppm fueron asignadas a los carbonos C-4', C-1', C-2' y C-6' (señales simétricas), C-3' y C-5' (señales simétricas) del anillo aromático. Información adicional desde el espectro 2D HMBC indica que fueron observadas las correlaciones heteronucleares a $^3J_{\text{H-C}}$ entre H-23a ($\delta_{\text{H}} = 4,36$ ppm, dd, $J = 11,2$ y $8,4$ Hz,) y H-23b ($\delta_{\text{H}} = 4,23$ ppm (dd, $J = 11,2$ y $3,6$ Hz) con el carbono carbonílico del éster aromático ($\delta_{\text{C}} = 166,74$ ppm), además de las señales observadas a $^3J_{\text{H-C}}$ entre HAr-2' ($\delta_{\text{H}} = 8,02$ ppm, d, $J = 7,4$ Hz) con el carbono carbonílico a $\delta_{\text{C}} = 166,74$ ppm, como se indican en la Figura 5.6. De esta forma se confirma la presencia del grupo benzoato enlazado al átomo de

oxígeno en la posición C-23. Un análisis similar se realizó para establecer la posición del éster de benzoato en el derivado (**80**)^[72].

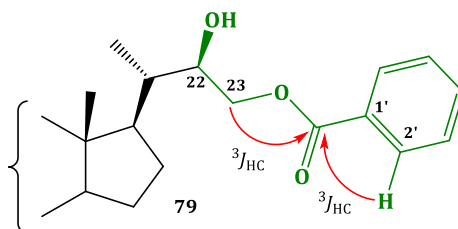
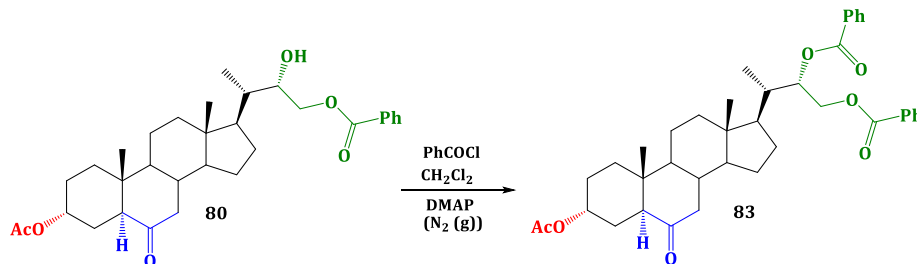


Figura 5.6. Correlaciones heteronucleares $^3J_{\text{H-C}}$ HMBC entre los hidrógenos H-23ab y HAr-2' con el grupo carbonilo aromático, que confirman la posición del éster de benzoato en C-23 en el derivado **79**.

Posteriormente, para determinar la estereoquímica en C-22 del derivado dibenzoilado (**83**), se realizó nuevamente la reacción de benzoilación sobre el derivado monobenzoilado (**80**), que dio como resultado la obtención del derivado dibenzoilado (**83**) con un 95% de rendimiento, según se indica en el Esquema 5.2. De esta forma los datos espectroscópicos de ^1H y ^{13}C RMN para este derivado fueron comparados con aquellos obtenidos para el derivado dibenzoilado (**83**) obtenido de acuerdo con el Esquema 5.1, donde las señales de RMN observadas son consistentes entre ambos derivados.



Esquema 5.2. Reacción de benzoilación del derivado monobenzoilado (**80**) para obtener del derivado dibenzoilado (**83**).

La determinación estructural del derivado dibenzoilado (**83**) fue establecida utilizando técnicas espectroscópicas combinadas de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC y por comparaciones y correlaciones de RMN con el derivado monobenzoilado (**80**). De esta forma, la principal información estructural fue proporcionada desde el espectro 2D HMBC, donde las asignaciones de los ambos grupos benzoatos mostraron correlaciones heteronucleares a $^2J_{\text{H-C}}$ y $^3J_{\text{H-C}}$ según se indican en la Figura 5.7.

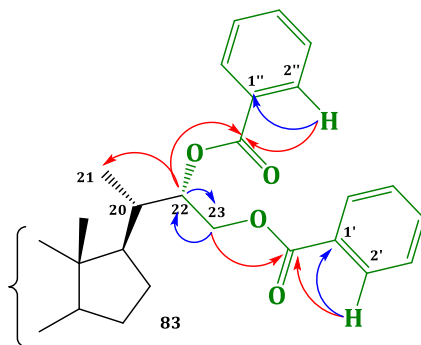
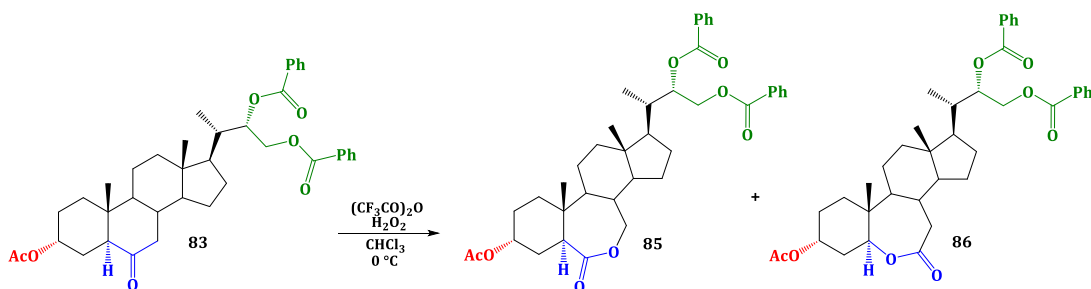


Figura 5.7. Principales correlaciones heteronucleares 2D HMBC a $^2J_{\text{HC}}$ (azul) y $^3J_{\text{HC}}$ (rojo) observadas para el derivado dibenzoilado (**83**), que confirman las posiciones de ambos grupos benzoatos en C-22 y C-23 de la cadena lateral.

Dado que no se logró obtener cantidades adecuadas del derivado monobenzoilado (**79**), para acceder a los precursores (**81**) y (**82**) de los compuestos finales (**74**) y (**75**) propuestos en el Esquema 3 de la metodología, se decidió utilizar el derivado monobenzoilado (**83**) que fue obtenido como producto mayoritario de la reacción de benzoilación, para su posterior oxidación de Baeyer-Villiger. De esta forma al tratar el compuesto (**83**), con el sistema oxidante $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}_2$, se obtuvieron las lactonas (**85**) y (**86**) (Esquema 5.3) con rendimientos de 38,8 % y 26,7 %, respectivamente. Tal como se indicó en la metodología la reacción de oxidación de Baeyer-Villiger transcurrió con regiocontrol obteniéndose mayor cantidad de la lactona 7-oxa (compuesto **85**) sobre la lactona 6-oxa (compuesto **86**), tal como se había descrito para la obtención de otros análogos del tipo 2-desoxibrasinoesteroides^[72].



Esquema 5.3. Reacción de oxidación de Baeyer-Villiger de (**83**) que permitió la obtención de las lactonas (**85**) y (**86**).

La asignación de las estructuras de (**85**) y (**86**) fue establecida por comparaciones y correlaciones de espectros de RMN de ^1H , entre el precursor (**83**) y por análogos de estructuras similares^[72]. De esta forma la posición de la función 7-oxalactona en el compuesto (**85**) fue establecida por la observación en el espectro de ^1H RMN de las

señales a $\delta_H = 4,16-4,06$ ppm (m, 2H) fueron asignadas a los hidrógenos H-7 que se encuentran desplazadas a campo bajo por estar enlazadas al carbono carbinólico de la función lactona, mientras que la señal observada a $\delta_H = 3,04$ ppm (dd, $J = 12,4$ y $4,3$ Hz, 1H) fue asignada al H-5, con desplazamiento químico, multiplicidad de señal y valores de J esperados para este hidrógeno en los sistemas esteroidales 5α -colánicos^[72]. Un análisis similar para el compuesto (**86**) de las señales asociadas a la función 6-oxalactona muestran que el hidrógeno H- 5α experimenta un importante desplazamiento químico a campos bajos encontrándose a $\delta_H = 4,50-4,45$ ppm (m, 2H, H-23b y H-5), mientras que a campo más alto $\delta_H = 2,58-2,46$ ppm (m, 2H) fueron observados los hidrógenos H- 7α y H- 7β , esperados para hidrógenos “ α ” de grupos carbonilos^[72]. Estos cambios en los desplazamientos químicos para las señales de H-5 y H-7 en funciones 7-oxa y 6-oxa lactonas para los compuestos (**85**) y (**86**) pueden observarse más claramente al comparar los espectros de ^1H RMN de ambos regioisómeros en la Figura 5.8.

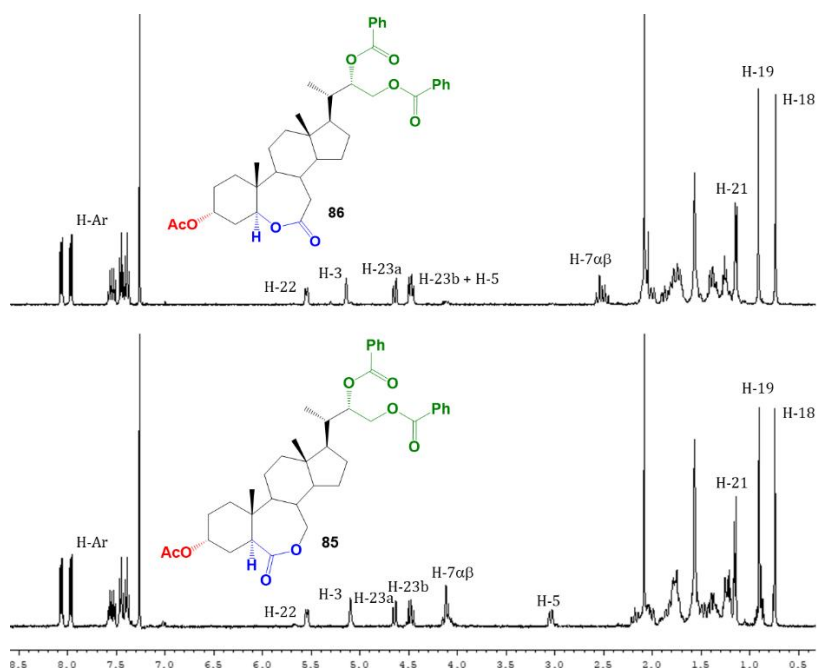


Figura 5.8. Comparación de espectros de ^1H RMN entre los compuestos 7-oxalactona (**85**) y 6-oxalactona (**86**). Los principales cambios en los desplazamientos químicos observados para los hidrógenos H-5 y H- $7\alpha\beta$.

Finalmente, por medio de reacción de saponificación con $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$ de los derivados monobenzoilados (**79**) y (**80**), se obtuvieron los análogos de brasinoesteroides (**73**) y (**62**) con rendimientos de 82,5% y 90%, respectivamente. Los datos espectroscópicos de ^1H y ^{13}C RMN para el compuesto (**62**) fueron consistentes con aquellos reportados previamente^[72]. Mientras que la confirmación de la estructura para

el análogo (**73**), fue establecida por técnicas espectroscópicas combinadas de RMN de ^1H , ^{13}C , 2D HSQC y 2D HMBC.

La asignación estereoquímica en el C-22 como “*R*” del análogo (**73**) fue establecida considerando dos criterios, donde el primero de estos fue que la reacción de saponificación del precursor (**80**) no altera los centros quirales, por lo cual todos estos permanecen intactos. Como segundo criterio se consideró la comparación espectroscópica de ^1H RMN entre ambos epímeros (**73**) y (**62**), donde se observan claramente las diferencias entre desplazamiento químico y multiplicidades de señales para los hidrógenos de la cadena lateral H-21, H-22 y H-23. De esta forma las principales diferencias entre los análogos (**73**) y (**72**) se aprecian para los hidrógenos H-21 y H-22, los cuales se indican en la Tabla 5.3. Esto permitió establecer las configuraciones absolutas como C-22 (*R*) y C-22 (*S*), respectivamente.

Tabla 5.3. Comparación entre las señales observadas de ^1H RMN para H-21, H-22 y H-23a-b en los epímeros (**73**) y (**62**).

Señal	Compuesto 73	Compuesto 62
H-21	0,925 ppm (d, $J = 6,3$ Hz, 3H)	0,943 ppm (d, $J = 6,9$ Hz, 3H)
H-22	3,73 ppm (ta, $J = 6,5$ Hz, 1H)	3,71 ppm (dt, $J = 8,9$ y $3,2$ Hz, 1H)
H-23a	3,53 ppm (dd, $J = 10,9$ y $7,1$ Hz, 1H)	3,60 ppm (dd, $J = 11,3$ y $2,7$ Hz, 1H)
H-23b	3,46 ppm (dd, $J = 10,9$ y $6,5$ Hz, 1H)	3,40 ppm (dd, $J = 11,3$ y $8,9$ Hz, 1H)

Adicionalmente y a modo de comparación visual, en la Figura 5.9 se muestran los espectros de ^1H RMN para ambos epímeros, donde se logra apreciar el efecto producido en los desplazamientos químicos de los hidrógenos H-21, H-22 y H-23 con el cambio de estereoquímica desde C-22 (*R*) a C-22 (*S*).

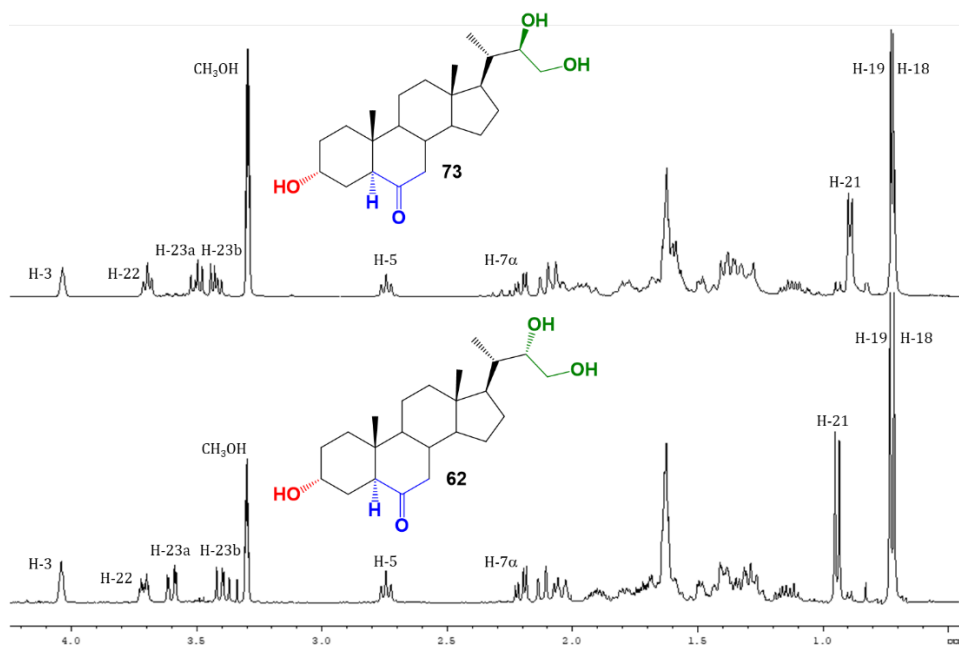


Figura 5.9. Comparación de espectros de ^1H RMN entre los análogos (62) y (73). Los principales cambios en los desplazamientos químicos observados para los hidrógenos H-21, H-22 y H-23, que muestran el efecto en el cambio de estereoquímica en la posición C-22 entre ambos epímeros.

5.2 Resultados y Discusiones parte Biológica

De acuerdo con el objetivo específico N°5 planteado en esta tesis, se procedió a evaluar la actividad biológica de los análogos finales (**62**), (**73**), (**79**), (**80**) y (**83**), mediante el ensayo biológico de *Inclinación de la Lámina de Arroz*, en la especie *Oryza sativa*, variedad Zafiro^[85] y siguiendo un procedimiento descrito en la metodología^[86, 87], utilizando como control positivo, la brasinolida (**1**) y agua como control negativo.

Como se indicó en la introducción y referente a los requerimientos estructurales que deben poseer los brasinoesteroides naturales y sus análogos sintéticos en la cadena lateral, se ha establecido que se debe tener una función glicol en los carbonos C-22 y C-23, preferentemente con configuraciones 22*R*, 23*R* y un grupo sustituyente de tipo metilo o etilo en el carbono C-24, sin embargo, claramente este requisito estructural no está del todo claro, y es así como se ha reportado que análogos de brasinoesteroides con cadena lateral más corta y con distinta naturaleza estructural han demostrado ser activos en varios ensayos biológicos de estimulación del crecimiento vegetal^[45-49].

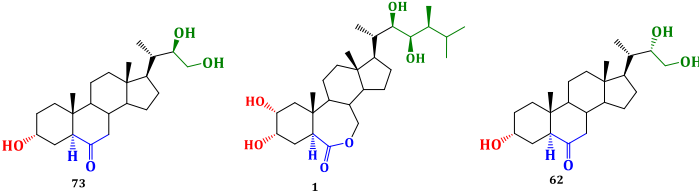
En esa dirección y analizando los resultados obtenidos durante esta tesis, se observa que los análogos sintéticos de BRs evaluados (con cadena lateral más corta) presentaron una dependencia directa de la concentración para los efectos como promotor de elongación celular vegetal. Una observación importante en términos generales fue que el análogo (**80**) presentó mayor actividad como promotor de crecimiento vegetal que el control positivo brasinolida (**1**) en todo el rango de concentraciones ensayadas ($1,0 \times 10^{-6}$ – $1,0 \times 10^{-8}$ M) mientras que el análogo (**79**) mostró igual efecto de actividad que la brasinolida (**1**) a la concentración de $1,0 \times 10^{-6}$ M, pero mayor actividad a la concentración de $1,0 \times 10^{-7}$ M, y una actividad similar a $1,0 \times 10^{-8}$ M (Tabla 5.5). El otro análogo que mostró tener un efecto significativo en la actividad fue el compuesto (**62**), donde se observó una actividad menor que la brasinolida (**1**) a la concentración de $1,0 \times 10^{-6}$ M, pero fue superior a las concentraciones de $1,0 \times 10^{-7}$ M y $1,0 \times 10^{-8}$ M (Tabla 5.4); mientras que el análogo (**73**) fue menos activo a las concentraciones de $1,0 \times 10^{-6}$ M y $1,0 \times 10^{-7}$ M, y (**83**), fue menos activo que el resto de los análogos en todo el rango de concentraciones ensayadas.

De esta forma aun cuando el número de análogos sintetizados y evaluados no es suficiente para establecer un estudio de Relación-Estructura-Actividad, sí se pueden realizar algunas interesantes comparaciones entre la estructura de la cadena lateral y los resultados de evaluaciones de crecimiento obtenidas. Así ordenando en cuanto a los

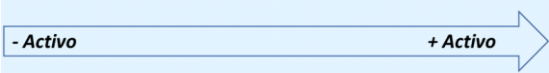
cambios estructurales en la cadena lateral de los análogos y considerando el efecto a una concentración intermedia ($1,0 \times 10^{-7}$ M) se analizaron de la siguiente forma:

1. *Efecto de la cadena lateral más corta (24-Nor) y estereoquímica en la posición C-22.* Desde los datos de la Tabla 5.4, se observa que el análogo (**73**) mostró un menor efecto en la apertura del ángulo que la BL (**1**), pero el análogo (**62**) fue más activo que BL (**1**) a la concentración de $1,0 \times 10^{-7}$ M, lo que indica que la cadena lateral más corta y con estereoquímica C-22 (*S*) fue más activa en esta serie.

Tabla 5.4. Ángulo promedio de apertura de la lámina de arroz (grados \pm DS) para la serie (**1**), (**62**) y (**73**) (cadena lateral corta con C-22(R) y C-22(S) a concentraciones $1,0 \times 10^{-8}$ M, $1,0 \times 10^{-7}$ M y $1,0 \times 10^{-6}$ M.

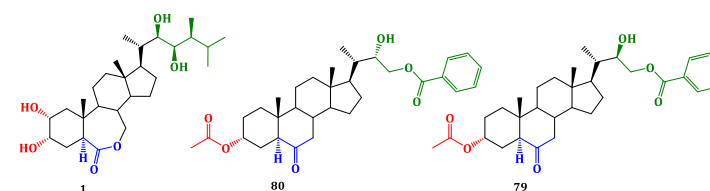


Concentración	Ángulo (°)	Ángulo (°)	Ángulo (°)
$1,0 \times 10^{-8}$ M	$45 \pm 9,5^*$	$31 \pm 1,0$	$35 \pm 2,7^*$
$1,0 \times 10^{-7}$ M	$31 \pm 5,0$	$41 \pm 4,5$	$60 \pm 2,7^*$
$1,0 \times 10^{-6}$ M	$24 \pm 5,8$	$70 \pm 7,6$	$62 \pm 12,4$

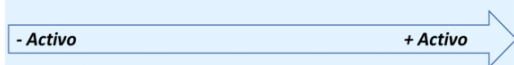


2. *Efecto de la benzoilación en C-23 de la cadena lateral y estereoquímica en la posición C-22.* Desde los datos de la Tabla 5.5, se observa que los análogos (**79**) y (**80**) benzoilados en C-23 mostraron un significativo efecto en la apertura del ángulo comparado con el BL (**1**) a la concentración de $1,0 \times 10^{-7}$ M, pero el análogo (**79**) con estereoquímica C-22 (*R*) fue levemente más activo que el análogo (**80**) con estereoquímica C-22 (*S*) en esta serie.

Tabla 5.5. Ángulo promedio de apertura de la lámina de arroz (grados \pm DS) para la serie (**1**), (**79**) y (**80**) (cadena lateral corta con C-22(R), C-22(S) y benzoilada en C-23 a concentraciones $1,0 \times 10^{-8}$ M, $1,0 \times 10^{-7}$ M y $1,0 \times 10^{-6}$ M.

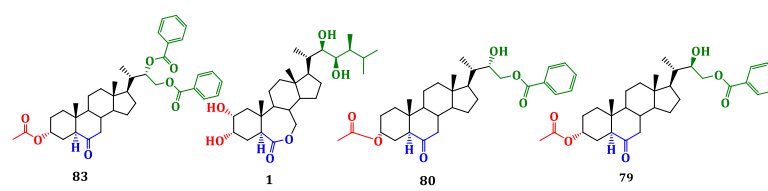


Concentración	Ángulo (°)	Ángulo (°)	Ángulo (°)
$1,0 \times 10^{-8}$ M	$31 \pm 1,0$	$49 \pm 4,8^*$	$28 \pm 2,9$
$1,0 \times 10^{-7}$ M	$41 \pm 4,5$	$60 \pm 0^*$	$64 \pm 2,5^*$
$1,0 \times 10^{-6}$ M	$70 \pm 7,6$	$78 \pm 1,5^*$	$70 \pm 1,5^*$

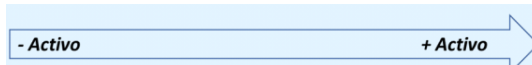


3. *Efecto de la benzoilación en C-22 y C-23 de la cadena lateral y estereoquímica en la posición C-22.* Desde los datos de la Tabla 5.6, y al igual que en el caso anterior, se observa que los análogos (**79**) y (**80**) benzoilados en C-23 mostraron un significativo efecto en la apertura del ángulo comparado con el BL (**1**) a la concentración de $1,0 \times 10^{-7}$ M, sin embargo, el efecto se reduce significativamente cuando ambas posiciones C-22 y C-23 se encuentran benzoiladas. De esta forma el compuesto dibenzoilado (**83**) fue el menos activo de la serie en todas las concentraciones ensayadas.

Tabla 5.6. Ángulo promedio de apertura de la lámina de arroz (grados \pm DS) para la serie (**1**), (**79**), (**80**) y (**83**) (cadena lateral corta con C-22(R), C-22(S) benzoilada en C-23, dibenzoilada en C-22 y C-23 a concentraciones $1,0 \times 10^{-8}$ M, $1,0 \times 10^{-7}$ M y $1,0 \times 10^{-6}$ M.

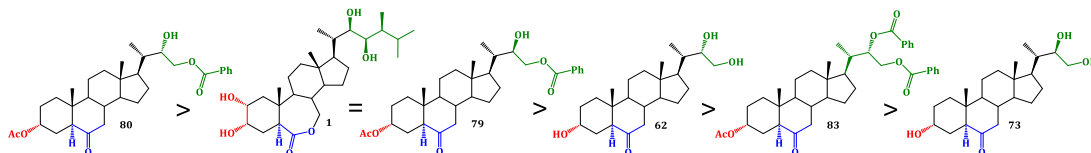


Concentración	Ángulo (°)	Ángulo (°)	Ángulo (°)	Ángulo (°)
$1,0 \times 10^{-8}$ M	$24 \pm 2,5$	$31 \pm 1,0$	$49 \pm 4,8^*$	$28 \pm 2,9$
$1,0 \times 10^{-7}$ M	$34 \pm 2,5$	$41 \pm 4,5$	$60 \pm 0^*$	$64 \pm 2,5^*$
$1,0 \times 10^{-6}$ M	$35 \pm 2,9$	$70 \pm 7,6$	$78 \pm 1,5^*$	$70 \pm 1,5^*$

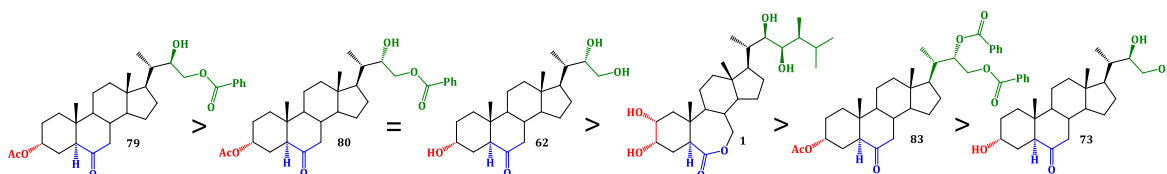


A modo de referencia en la Figura 5.10 se muestra un orden decreciente del efecto de la actividad en la apertura del ángulo en todos los compuestos ensayados a las tres concentraciones estudiadas. De acuerdo con este ordenamiento se observa claramente que, de los cinco análogos estudiados, los compuestos (62), (79) y (80) fueron los más activos de todas las series.

Concentración $1,0 \times 10^{-6} M$.



Concentración $1,0 \times 10^{-7} M$.



Concentración $1,0 \times 10^{-8} M$.

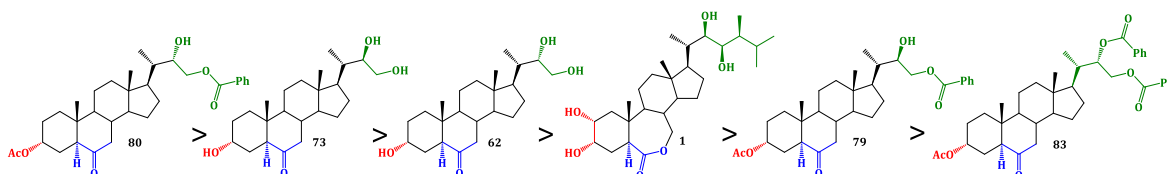


Figura 5.10. Orden decreciente del efecto en la Inclinación del ángulo en la lámina de arroz, de todos los análogos ensayados a las concentraciones $1,0 \times 10^{-6}$ - $1,0 \times 10^{-8} M$.

CAPÍTULO 6 - CONCLUSIONES

Desde el trabajo de tesis desarrollado se desprenden las siguientes conclusiones en función de los objetivos específicos, objetivo general e hipótesis propuesta:

1. Se sintetizaron los compuestos intermedios (**77**), (**78a-b**), (**79**) y (**80**) indicados en el Esquema 3.1 (Metodología) desde el ácido (**76**). Todos los compuestos obtenidos fueron caracterizados por métodos físicos y espectroscópicos.
2. Se logró establecer la estereoquímica absoluta en el carbono de la posición C-22 para los compuestos (**62**), (**73**), (**79**) y (**80**), por métodos de comparación y correlación espectroscópica de ^1H y ^{13}C RMN.
3. La reacción de dihidroxilación asimétrica de Sharpless, utilizando un inductor quirral, permitió obtener el epímero hidroxilado en C-22(*R*) (compuesto **78a**) como una mezcla de glicoles (**78a/78b**) = 0,9:1,0, con una mayor proporción del epímero C-22(*R*), comparado con la reacción de dihidroxilación de Upjohn (**78a/78b** = 1:7).
4. Uno de los objetivos específicos planteados consistió en obtener el precursor (**79**), por medio de la reacción de benzoilación de la mezcla de glicoles (**78a/78b**). Sin embargo, la benzoilación produjo una mezcla de cuatro derivados dentro de los cuales se formaron compuestos monobenzoilados en C-22 (*R/S*) y derivados dibenzoilados en C-22(*R/S*) y C-23. Lo que condujo a un bajo rendimiento de obtención en el compuesto deseado (**79**).
5. Debido al bajo rendimiento obtenido en el precursor (**79**) (1,4%), no fue posible obtener los análogos propuestos (**74**) y (**75**), ni los compuestos intermedios (**81**) y (**82**) indicados en el Esquema 3.3 (Metodología). Sin embargo, se obtuvieron los tres nuevos compuestos (**83**) (Esquema 5.1), (**85**) y (**86**) (Esquema 5.3) que no estaban considerados en la propuesta original.
6. La principal dificultad para la obtención del compuesto (**79**) se observó en la baja selectividad en la reacción de benzoilación de los alcoholes en las posiciones C-

22 y C-23, de la mezcla (**78a/78b**) y en el método de separación de los productos de reacción de la benzoilación. De esta forma al existir mínimas diferencias de polaridad entre las mezclas de epímeros monobenzoilados y dibenzoilados, el método de separación por C.C. no fue eficiente y por lo tanto se requiere de otros métodos de separación y purificación, como por ejemplo la técnica de HPLC semi preparativo.

7. Se logró evaluar la actividad biológica en el test de *Inclinación de la Lámina de Arroz* de los análogos sintetizados (**62**), (**73**), (**79**), (**80**) y (**83**), y ésta fue evaluada a las concentraciones $1,0 \times 10^{-8}$, $1,0 \times 10^{-7}$ y $1,0 \times 10^{-6}$ M. Los resultados obtenidos demostraron que los análogos (**79**) y (**80**) fueron los más activos a la concentración de $1,0 \times 10^{-7}$ M, incluso se observó mayor actividad que la brasinólida (**1**), que se considera como el más activo de los brasinoesteroides naturales.
8. El otro compuesto que mostró una actividad similar, pero menor a (**79**), (**80**) y el brasinólida (**1**), fue el análogo trihidroxilado (**62**). Sin embargo, su epímero C-22(*R*) (compuesto **73**) y el análogo dibenzoilado (**83**) fueron los menos activos en todo el rango de concentraciones evaluadas.
9. El cambio de estereoquímica en la posición C-22 desde una configuración *S* a una configuración *R*, produce una disminución significativa en el efecto de la apertura del ángulo en el bioensayo de *inclinación de la lámina de arroz*, efecto observado al comparar las estructuras y los valores de actividad biológica entre los análogos (**62**) y (**73**).
10. En general, los análogos sintetizados considerando el requisito estructural de la cadena lateral más corta de tipo 24-Nor, con funciones hidroxiladas en C-22 con configuración absoluta *R* o *S* y con función de éster de benzoato en C-23 tienen una actividad mayor o similar a la brasinólida (**1**). Lo que se interpreta como un nuevo requerimiento estructural para que estos análogos muestren actividad biológica en el bioensayo de *inclinación de la lámina de arroz*.
11. La incorporación de dos funciones de ésteres de benzoatos en las posiciones C-22 y C-23, produce una disminución significativa de la actividad biológica en el

Ensayo de *inclinación de la lámina de arroz*, efecto observado para el compuesto **(83)**.

12. Finalmente, la hipótesis planteada se cumple en forma parcial, dado que sólo se logró sintetizar uno de los tres nuevos análogos (compuesto **62**) de brasinoesteroides propuestos del tipo 2-desoxi-3 α -hidroxi, con función cetona en C-6, con cadena lateral más corta de tipo 24-nor y función 22 (*R*), 23-dihidroxi, y que este análogo no mostró la actividad biológica esperada. Sin embargo, los nuevos análogos **(79)** y **(80)**, que mostraron mayor actividad que la brasinolida **(1)** permiten plantear la posibilidad de generar una línea de investigación en la obtención de nuevos análogos con estructura 24-Nor y con la posición C-23 como ésteres de benzoatos.

REFERENCIAS

- [1] The Plant Cell, June 2011, www.plantcell.org, © 2011 American Society of Plant Biologists. Mary E. Williams mwilliams@aspb.org Features Editor, The Plant Cell American Society of Plant Biologists c/o Plant Science Research Group, University of Glasgow.
- [2] A. Santner, L. I. A. Calderon-Villalobos, M. Estelle, Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth, *Nature Chem. Biol.*, **2009**, *5*, 301-307.
- [3] J. Sachs, Stoff und form der Pflanzenorgane. *Arb. Bot. Inst. Würzburg* **1880**, *2*, 452-488.
- [4] C. Darwin, The Power of Movement in Plants (John Murray, London, **1880**).
- [5] J. H. Jun, E. Fiume, J. C. Fletcher, The CLE family of plant polypeptide signaling molecules. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2008**, *65*, 743-755.
- [6] H. Fukuda, T. Higashiyama, Diverse functions of plant peptides: entering a new phase, *Plant Cell Physiol.*, **2011**, *52*, 1-4.
- [7] F. A. Squeo, L. Cardemil, **2006**. Fisiología vegetal. Ediciones Universidad de la Serena, La Serena, Chile. Cap. 16 (M. Jordán, J. Casaretto) y Cap. 17 (G. I. Cassab, Y. Sánchez Guevara).
- [8] V. A. Khripach, V. N. Zhabinskii, A. E. de Groot, **1999**. Brassinosteroids. A new class of plant hormones. Academic Press, San Diego, p.219.
- [9] S. D. Clouse, J. M. Sasse, Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **1998**, *49*, 427-451.
- [10] M. D. Grove, G. F. Spencer, W. K. Rohwedder, N. Mandava, J. F. Worley, J. D. Warthen Jr., G. L. Steffens, J. C. Cook, Jr., Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen, *Nature*, **1979**, *281*, 216-217.
- [11] S. Fujioka, T. Yokota, Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2003**, *54*, 137-164.
- [12] A. Bajguz, A. Tretyn, The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 1027-1046.
- [13] M. A. T. Zullo, L. Kohout, M. B. M. De Azevedo, Some notes on the terminology of brassinosteroids. *Plant Growth Regul.*, **2003**, *39*, 1-11.
- [14] T. Yokota, **1999**, Brassinosteroids. In P. J. J. Hooykaas, M. A. Hall, K. R. Libbenga (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. Elsevier Science, London, pp. 277-293.

- [15] J. Chory, P. Nagpal, C. A. Peto, Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **1991**, 3, 445-459.
- [16] M. Szekeres, K. Németh, Z. Koncz-Kálmán, J. Mathur, A. Kauschmann, T. Altmann, G. P. Rédei, F. Nagy, J. Schell, C. Koncz, Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell*. **1996**, 85, 171-182.
- [17] V. A. Khripach, V. N. Zhabinskii, A. E. de Groot, **1999**. Brassinosteroids: A new class of plant hormones. Academic Press, San Diego, p. 456.
- [18] K. Takeno, R. P. Pharis, Brassinosteroid-induced bending of the leaf lamina of dwarf rice seedlings: an auxin-mediated phenomenon. *Plant Cell Physiol.*, **1982**, 23, 1275-1281.
- [19] S.-K. Kim, H. Abe, C. H. A. Little, R. P. Pharis, Identification of two brassinosteroids from the cambial region of Scots pine (*Pinus silverstris*) by gas chromatography-mass spectrometry, after detection using a dwarf rice lamina inclination bioassay. *Plant physiol.*, **1990**, 94, 1709-1713.
- [20] J. A. Ramírez, O. M. T. Centurión, E. G. Gros, L. R. Galagovsky, Synthesis and bioactivity evaluation of brassinosteroid analogs. *Steroids* **2000**, 65, 329-337.
- [21] S. Takatsuto, N. Yazawa, N. Ikekawa, T. Takematsu, Y. Takeuchi, M. Koguchi, Structure-activity relationships of brassinosteroids. *Phytochemistry* **1983**, 22, 2437-2441.
- [22] M. J. Thompson, W. J. Meudt, N. B. Mandava, S. R. Dutky, W. R. Lusby, D. W. Spaulding, Synthesis of brassinosteroids and relationship of structure to plant growth-promoting effect. *Steroids* **1982**, 39, 89-105.
- [23] L. R. Galagovsky, E. G. Gros, J. A. Ramírez, Synthesis and bioactivity of natural and C-3 fluorinated biosynthetic precursors of 28-homobrassinolide. *Phytochemistry* **2001**, 58, 973-980.
- [24] B. Voigt, A. Porzel, D. Golsch, W. Adam, G. Adam, Regioselective oxyfunctionalization of brassinosteroids by methyl(trifluoromethyl)dioxirane: Synthesis of 25-hydroxy-brassinolide and 25-hydroxy-24-epibrassinolide by direct C-H insertion. *Tetrahedron* **1996**, 52, 10653-10658.
- [25] S. Takatsuto, N. Ikekawa, T. Morishita, H. Abe, Structure-activity relationship of brassinosteroids with respect to the A/B-ring functional groups. *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, 35, 211-216.
- [26] T. Yokota, S. K. Kim, Y. Fukui, N. Takahashi, Y. Takeuchi, T. Takematsu, Brassinosteroids and sterols from a green alga, *Hydrodictyon Reticulatum*: Configuration at C-24. *Phytochemistry* **1987**, 26, 503-506.
- [27] N. B. Mandava, Plant growth-promoting brassinosteroids. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **1988**, 39, 23-52.

- [28] K. Okada, K. Mori, Stereoselective synthesis of dolicholide, a plant growth-promoting steroid. *Agric. Biol. Chem.*, **1983**, *47*, 925-926.
- [29] T. Kishi, K. Wada, S. Marumo, K. Mori, Synthesis of brassinolide analogs with a modified ring B and their plant growth-promoting activity. *Agric. Biol. Chem.*, **1986**, *50*, 1821-1830.
- [30] M. J. Thompson, N. Mandava, J. L. Flippen-Anderson, J. F. Worley, S. R. Dutky, W. E. Robbins, W. Lusby, Synthesis of brassinosteroids: new plant-growth-promoting steroids. *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*, 5002-5004.
- [31] K. Richter, J. Koolman, J. **1991**. *Antiecdysteroid effects of brassinosteroids in insects. In Brassinosteroids: chemistry, bioactivity and applications*. ACS Symp. Ser, Washington, DC (Vol. 474), pp. 265-278.
- [32] H. Seto, S. Fujioka, H. Koshino, T. Suenaga, S. Yoshida, T. Watanabe, S. Takatsuto, Epimerization at C-5 of brassinolide with sodium methoxide and the biological activity of 5-*epi*-brassinolide in the rice lamina inclination test. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3355-3358.
- [33] J. A. Schneider, K. Yoshihara, K. Nakanishi, N. Kato, Typhasterol (2-dexoycastasterone) a new plant growth regulator from cat-tail pollen. *Tetrahedron Lett.*, **1983**, *24*, 3859-3860.
- [34] T. Yokota, M. Arima, N. Takahashi, S. Takatsuto, N. Ikekawa, T. Takematsu; 2-Deoxycastasterone, a new brassinolide-related bioactive steroid from *Pinus* pollen. *Agric. Biol. Chem.*, **1983**, *47*, 2419-2420.
- [35] H. Abe, T. Morishita, M. Uchiyama, S. Takatsuto, N. Ikekawa; A new brassinolide-related steroid in the leaves of *Thea sinensis*., *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 2171-2172.
- [36] Y. Suzuki, I. Yamaguchi, T. Yokota, N. Takahashi; Identification of castasterone, typhasterol and teasterone from the Pollen of *Zea mays*. *Agric. Biol. Chem.*, **1986**, *50*, 3133-3138.
- [37] K. Wada, S. Marumo; Synthesis and plant growth-promoting activity of brassinolide analogues., *Agric. Biol. Chem.* **1981**, *45*, 2579-2585.
- [38] W.-S. Zhou, W.-S. Tian; Studies on steroidal plant-growth hormones II: stereoselective synthesis of (22S, 23S)-typhasterol from hyodeoxycholic acid. *Acta Chimica Sinica*, **1985**, *43*, 1060-1067 (Chinese Edition).
- [39] W.-S. Zhou, W.-S. Tian; Study on the synthesis of brassinolide and related compounds III. Stereoselective synthesis of typhasterol from hyodeoxycholic acid. *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 3705-3712.
- [40] M. Aburatani, T. Takeuchi, K. Mori; Facile synthesis of brassinosteroids: brassinolide, castasterone, teasterone and typhasterol. *Agric. Biol. Chem.*, **1987**, *51*, 1909-1913.

- [41] H. Abe, S. Asakawa, T. Ando, T. Mouri, M. Aburatani, T. Takeuchi; Effect of introducing a lactone group into typhasterol and teasterone to promote rice lamina inclination. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1992**, *56*, 1312-1313.
- [42] J. Schmidt, B. Voigt, G. Adam; 2-deoxybrassinolide a naturally occurring brassinosteroid from *Apium Graveolens*. *Phytochemistry*; **1995**, *40*, 1041-1043.
- [43] W.-S. Zhou, L.-F. Huang; Studies on steroidal plant-growth regulator 25. Concise stereoselective construction of sidechain of brassinosteroid from the intact sidechain of hyodeoxycholic acid: Formal syntheses of brassinolide, 25-methylbrassinolide, 26, 27-bisnorbrassinolide and their related compounds. *Tetrahedron*; **1992**, *48*, 1837-1852.
- [44] W.-S. Zhou, L.-F. Huang, L.-Q. Sun, X.-F. Pan; Studies on a steroidal plant-growth regulator. Part 26. Stereoselective construction of the brassinolide side-chain: new practical syntheses of brassinolide analogues from hyodeoxycholic acid. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1992**, 2039-2043.
- [45] C. Brosa, J. M. Capdevila, I. Zamora; Brassinosteroids: a new way to define the structural requirements. *Tetrahedron*; **1996**, *52*, 2435-2448.
- [46] C. Brosa, L. Soca, E. Terricabras, J. C. Ferrer, A. Alsina; New synthetic brassinosteroids: a 5 α -hydroxy-6-ketone analog with strong plant growth promoting activity. *Tetrahedron*; **1998**, *54*, 12337-12348.
- [47] V. Černý, M. Strnad, M. Kamínek; Preparation of 2 α , 3 α -dihydroxy -7-oxa-6-oxo-23, 24-dinor-B-Homo-5 α -cholanolic acid, its esters and amides as brassinolide analogues. *Collection Czechoslovak Chem. Commun.*, **1986**, *51*, 687-697.
- [48] S. Hayashi, T. Hohjoh, A. Shida, N. Ikekawa, **1987**. Preparation of 23-phenylbrassinosteroids as plant growth regulators. *Eur. Pat. Appl.* **EP 282,984**. [C. A. **110**, 95639].
- [49] L.-F. Huang, W.-S. Zhou; Studies on steroidal plant-growth regulators. Part 33. Novel method for construction of the side-chain of 23-arylbrassinosteroids via Heck arylation and asymmetric dihydroxylation as key steps. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*. **1994**, 3579-3585.
- [50] B. G. Hazra, S. Basu, B. B. Bahule, V. S. Pore, B. N. Vyas, V. M. Ramraj; Stereoselective synthesis of a new hexanor(C₂₃-C₂₈) castasterone-20,22-ethyl diether from 16-dehydropregnenolone acetate and its plant growth promoting activity. *Tetrahedron*; **1997**, *53*, 4909-4920.
- [51] V. Marquardt, M. F. Coll, B. E. M. Alonso, **1988**. Preparation of brassinosteroid analogs of spirostans as plant growth regulators. *Ger. (East) DD 273,638* [C. A. **112**, 217353].
- [52] G. Adam, V. Marquardt, H. M. Vorbrodtt, G. Hörhold, W. Andreas, J. Gartz; **1991**. Aspects of synthesis and bioactivity of brassinosteroids. In "Brassinosteroids, Chemistry, bioactivity, and applications. ACS Symposium Series" (H.G. Cutler, T. Yokota, and G. Adam, Eds.), Vol. 474, pp. 74-85. American Chemical Society, Washington.

- [53] W. Tian, **1992**. Study on the rational use of steroidal sapogenin. I. Synthesis of sapogenin with A/B ring structure unit of brassinolide. *Acta Chim. Sin. (Huaxue Xuebao)* **50**, 72-77 [C A. **116**, 214773].
- [54] F. Coll, E. Alonso, M. Iglesias, V. Marquardt, G. Adam, **1992**. Synthesis of spirostanoic analogs of brassinosteroids. II. (25/R)-5 α -spirostan-2 α ,3 α -diol. *Rev. Cubana Quim.* **6**, 7-12 [C A. **121**, 9811].
- [55] M. F. Coll, R. I. M. Jomarron, R. C. M. Robaina, B. E. M. Alonso, P. M. T. Cabrera, **1995**. Polyhydroxyspirostanones as plant growth regulators. *PCT Int. Appl.* **WO 9713,780** [C A. **126**, 343720].
- [56] A. M. A. Iglesias, G.R. Perez, M. F. Coll, **1996**. Natural brassinosteroids and their synthetic analogs. *Rev. CENIC, Cienc. Quim.* **27**, 3-12 [C A. **127**, 248270].
- [57] A. M. A. Iglesias, V. L. Lara, C. P. Martinez, F. C. Manchado, **1997**. Synthesis of spirobrassinosteroid analogs of 6-deoxocastasterone. *Quim. Nova.* **20**, 361-364 [C A. **127**, 95449].
- [58] M. A. Iglesias Arteaga, R. Pérez Gil, V. Leliebre Lara, C. S. Pérez Martínez, F. Coll Manchado, A. Rosado Pérez, L. Pozo Ríos, Synthesis of (22R, 25R)-3 β ,26-dihydroxy-5 α -furostan-6-one. *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 1381-1386.
- [59] M. A. Iglesias Arteaga, R. Pérez Gil, V. Leliebre Lara, C. S. Pérez Martínez, F. Coll Manchado, Synthesis of (22R, 25R)-2 α ,3 α ,26-trihydroxy-5 α -furostan-6-one. *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 1779-1784.
- [60] M. Romero-Avila, G. De Dios-Bravo, J. M. Mendez-Stivalet, R. Rodríguez-Sotresa, M. A. Iglesias-Arteaga; Synthesis and biological activity of furostanoic analogues of brassinosteroids bearing the 5 α -hydroxy-6-oxo moiety. *Steroids*; **2007**, *72*, 955-959.
- [61] C. R. Rodríguez, Y. I. Villalobos, E. A. Becerra, F. Coll- Manchado, D. C. Herrera, M. A. T. Zullo; Synthesis and biological activity of three new 5 α -hydroxy spirostanoic brassinosteroid analogues. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2003**, *14*, 466-469.
- [62] M. A. Iglesias-Arteaga, C. Pérez Martínez, F. Coll-Manchado; Spirostanic analogues of castasterone. *Steroid*; **2002**, *67*, 159-163.
- [63] T. G. Back, R. P. Pharis; Structure-activity studies of brassinosteroids and the search for novel analogues and mimetics with improved bioactivity. *J. Plant Growth Regul.*, **2003**, *22*, 350-361.
- [64] S. Uesusuki, B. Watanabe, S. Yamamoto, J. Otsuki, Y. Nakagawa, H. Miyagawa; Synthesis of brassinosteroids of varying acyl side chains and evaluation of their brassinolide-like activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2004**, *68*, 1097-1105.
- [65] M. Šiša, J. Hniličková, J. Swaczynová, L. Kohout; Syntheses of new androstane brassinosteroids with 17 β -ester groups-butyrates, heptafluorobutyrate, and laurates. *Steroids*; **2005**, *70*, 755-762.

- [66] W.-S. Tian, W.-S. Zhou, B. Jiang, X.-F. Pan; Studies on steroidal plant-growth regulator IX. The preparation of 22R- and 22S-24, 25, 26, 27, 28-penta-nor-brassinolides. *Acta Chimica Sinica*, **1989**, *47*, 1017-1021 (Chinese Edition).
- [67] Y.-X. Yang, L.-T. Zheng, J.-J. Shi, B. Gao, Y.-K. Chen, H.-C. Yang, H.-L. Chen, Y.-C. Li, X.-C. Zhen; Synthesis of 5 α -cholestan-6-one derivatives and their inhibitory activities of NO production in activated microglia: discovery of a novel neuroinflammation inhibitor. *Bioor. Med. Chem. Lett.*, **2014**, *24*, 1222-1227.
- [68] L. Espinoza, M. Cortés, Síntesis y actividad biológica de dos nuevos análogos de brasinoesteroides funcionalizados en el anillo C. *Bol. Soc. Chil. Quim.* **2002**, *47*, 335-347.
- [69] L. Espinoza, M. Cortés, Síntesis y Actividad Biológica de análogos de brasinoesteroides. *Bol. Soc. Chil. Quím.* **2002**, *47*, 511-516.
- [70] L. Espinoza, Synthesis of four new brassinosteroids analogues 11-oxo-functionalized on C ring, with 24-Nor side chain and containing 5 β -cholanic acid skeleton. *Org. Chem. Curr. Res.*, **2015**, *4*, 156-161.
- [71] R. Carvajal, Síntesis de nuevos análogos de brasinoesteroides con posible rol en el tratamiento contra estrés biótico en plantas y carcinoma humano. *Tesis para Optar al Grado Académico de Dr. en Ciencias mención Química*. **2017**.
- [72] R. Carvajal, C. González, A. F. Olea, M. Fuentealba, L. Espinoza; Synthesis of 2-deoxybrassinosteroids analogs with 24-nor, 22(S)-23-dihydroxy-type side chains from hyodeoxycholic acid. *Molecules*; **2018**, *23*, 1306-1321.
- [73] H. Herrera, R. Carvajal, A. F. Olea, L. Espinoza; Structural modifications of deoxycholic acid to obtain three known brassinosteroid analogues and full NMR spectroscopic characterization. *Molecules* **2016**, *21*, 1139-1150.
- [74] W.-S. Zhou, W.-S. Tian; The synthesis of steroids containing structural unit of A, B ring of brassinolide and ecdysone from hyodesoxycholic acid. *Acta Chimica Sinica*; **1984**, *42*, 1173-1177.
- [75] W.-S. Zhou, L.-Z. Jiang, W.-S. Tian, X.-Y. Zhao, H. Zheng; Studies on steroidal plant-growth hormone VII: Synthesis of 2 α , 3 α -dihydroxy-7-oxa-6-oxo-23,24-bisnor-B-homo-5 α -cholanic Acid and 2 α ,3 α -dihydroxy-7-oxa-6-oxo-24-nor-B-homo-5 α -cholanic acid. *Acta Chimica Sinica*; **1988**, *46*, 1212-1218 (English version).
- [76] W.-S. Zhou; The synthesis of brassinosteroid. *Pure & Appl. Chem.*, **1989**, *61*, 431-434.
- [77] W.-S. Zhou, B. Jiang, X.-F. Pan; Stereoselective synthesis of the brassinolide side chain: novel syntheses of brassinolide and related compounds. *Tetrahedron*; **1990**, *46*, 3173-3188.
- [78] A.-S. Vaidya, S.-M. Dixit, A.-S. Rao; Degradation of bile acid side chain with lead Tetraacetate. *Tetrahedron Lett.*, **1968**, *9*, 5173-5174.

- [79] M. Ishiguro, N. Ikekawa; Stereochemistry of electrophilic reactions at the steroidal C-22 double bond. *Chem. Pharm. Bull.*, **1975**, *23*, 2860-2866.
- [80] M. Kvasnica, J. Oklestkova, V. Bazgier, L. Rárová, P. Korinková, J. Mikulík, M. Budesinsky, T. Béres, K. Berka, Q. Lu, E. Russinova, M. Strnad. Design, synthesis and biological activities of new brassinosteroid analogues with a phenyl group in the side chain. *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, *14*, 8691-8701.
- [81] S. Takatsuto, N. Ikekawa; Remote substituent effect on the regioselectivity in the Baeyer-Villiger oxidation of 5 α -cholestan-6-one derivatives. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 917-920.
- [82] B. Voigot, J. Schmidt, G. Adam; Synthesis of 24-epiteasterone, 24-epityphasterol and their B-homo-6 α -oxalactones from ergosterol. *Tetrahedron*; **1996**, *52*, 1997-2004.
- [83] M. S. Ahmad, G. Moinuddin, I. A. Khan, Steroid B-Ring Lactones: a reinvestigation. *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 163-165.
- [84] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg; NMR Chemical Shift of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist, *Organometallics*, **2010**, *29*, 9, 2176-2179.
- [85] H.-Y. Li, H.-M. Wang, S. Jang; Rice Lamina Joint Inclination Assay, *Bio-protocol*, **2017**, *7*, (14).
- [86] K. Wada, S. Marumo, N. Ikekawa, M. Morisaki, K. Mori; Brassinolide and homobrassinolide promotion of lamina inclination of rice seedlings. *Plant Cell Physiol.*, **1981**, *22*, 323-325.
- [87] K. Wada, S. Marumo, H. Abe, T. Morishita, K. Nakamura, M. Uchiyama, K. Mori; A rice lamina inclination test-a micro-quantitative bioassay for brassinosteroids. *Agric. Biol. Chem.*, **1984**, *48*, 719-726.
- [88] J. D. Bacha, J. K. Kochi; Alkenes from acids by oxidative decarboxylation. *Tetrahedron*, **1968**, *24*, 2215-2226.
- [89] T. Iida, T. Momose, T. Tamura, T. Matsumoto, F. C. Chang, J. Goto, T. Nambara; Potential bile acid metabolites. 13. Improved routes to 3 β ,6 β - and 3 β ,6 α -dihydroxy-5 β -cholanoic acids. *J. Lipid Res.*, **1988**, *29*, 165-171.
- [90] M. M. Heravi, V. Zadsirjan, M. Esfandyari, T. Baie Lashaki; Applications of Sharpless asymmetric dihydroxylation in the total synthesis of natural products. *Tetrahedron Asymmetry*, **2017**, *28*, 987-1043.
- [91] J. I. Seeman; Effect of conformational change on reactivity in organic chemistry. Evaluations, applications, and extensions of Curtin-Hammett/Winstein-Holness kinetics. *Chem. Rev.*, **1983**, *83*, 83-134.

[92] J. I. Seeman; The Curtin–Hammett principle and the Winstein-Holness equation new definition and recent extensions to classical concepts. *J. Chem. Ed.* **1986**, *63*, 42-48.

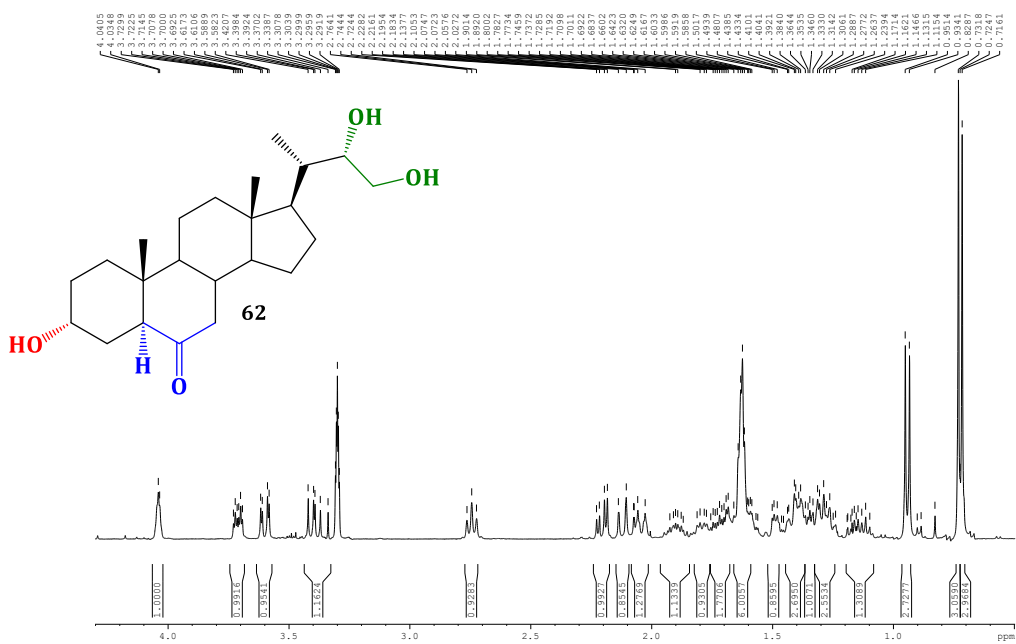
[93] R. J. Ouellette, J. D. Rawn. Organic chemistry structure, mechanism, and synthesis. 2^{Ed}, Academic Press, Copyright © 2019 Elsevier B.V. ScienceDirect® **2018**, Pages 625-663.

[94] R. Khan; The chemistry of maltose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1981**, *39*, 213–278.

ANEXOS

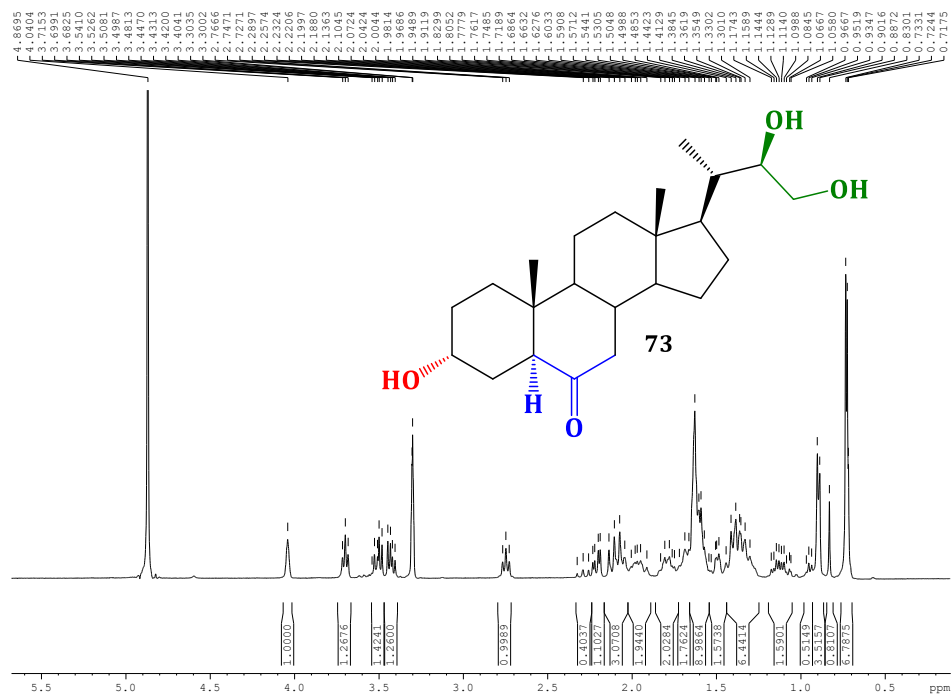
3 α , 22(S), 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (62)

Espectro de ¹H-RMN

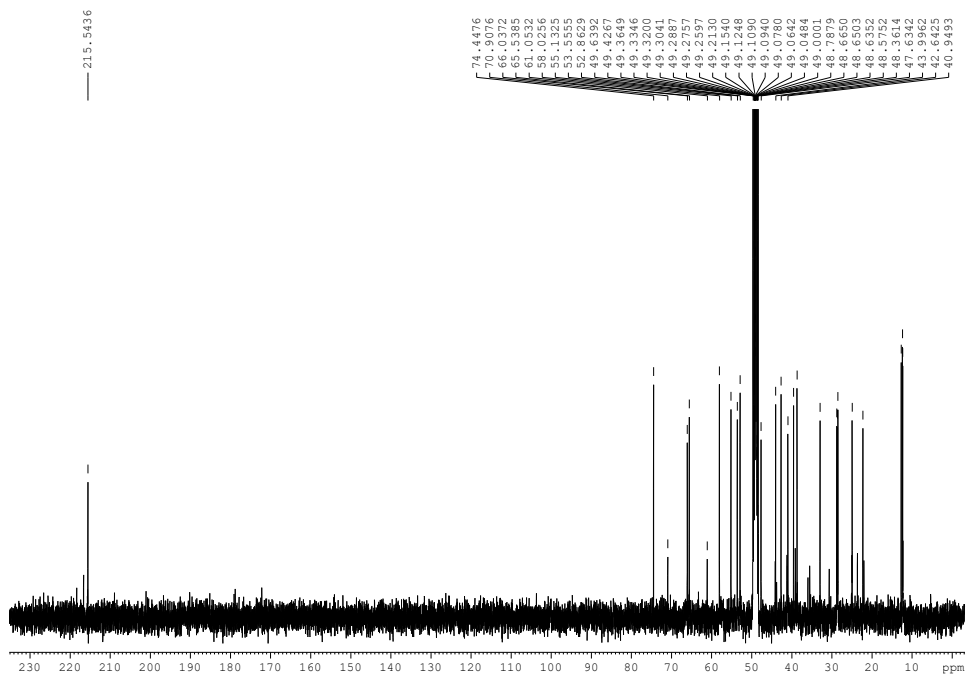


3 α , 22(R), 23-trihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (73)

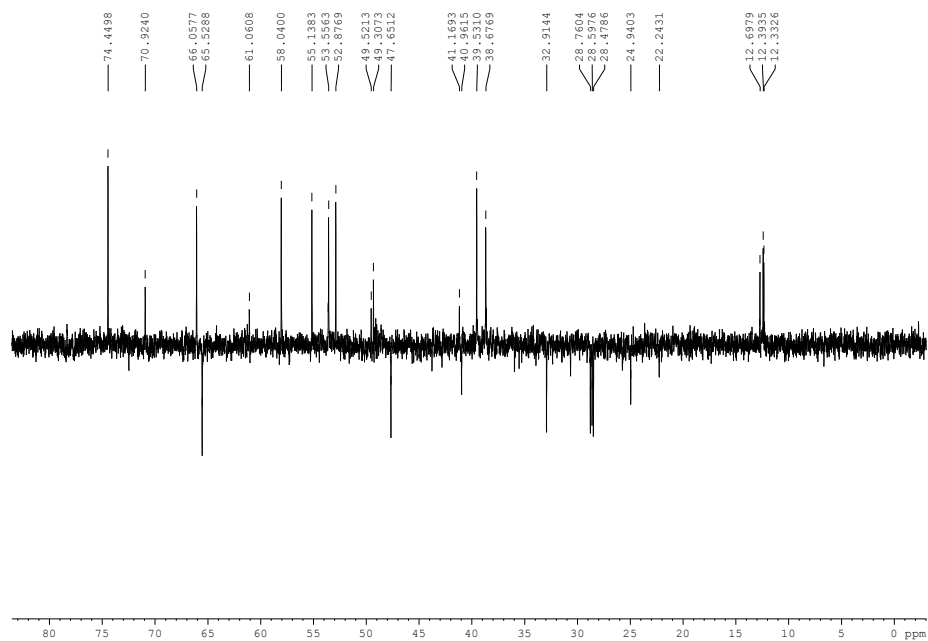
Espectro de ¹H-RMN



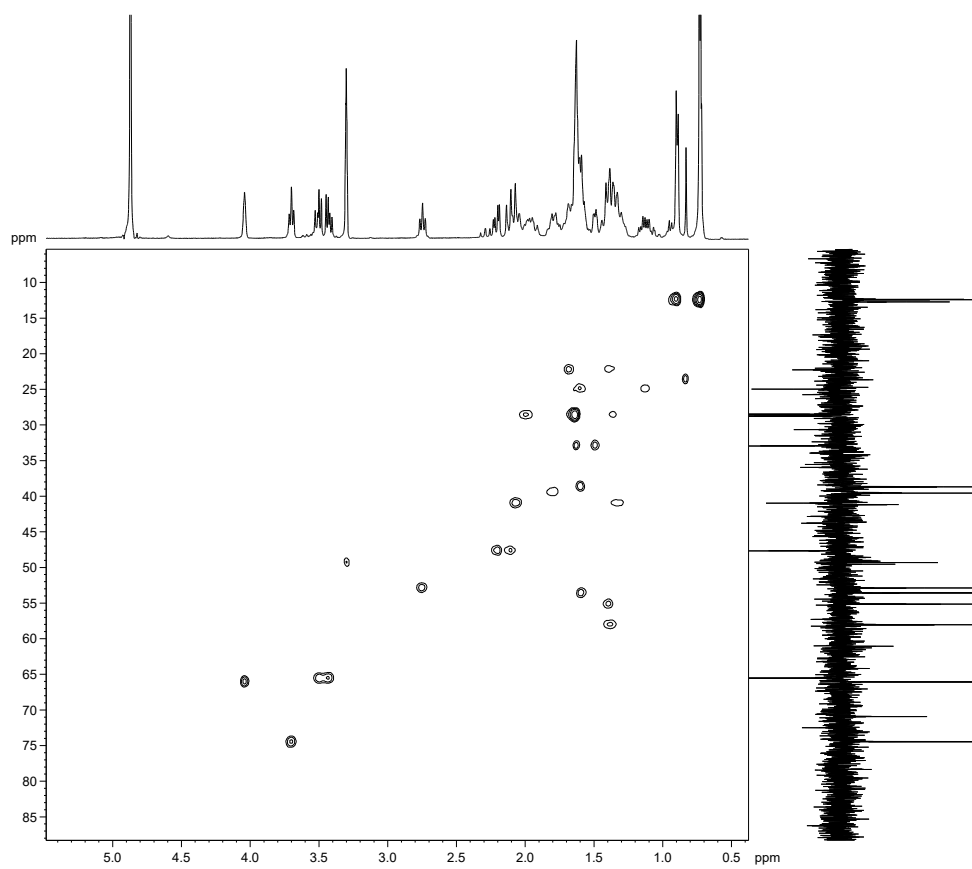
Espectro de ¹³C-RMN



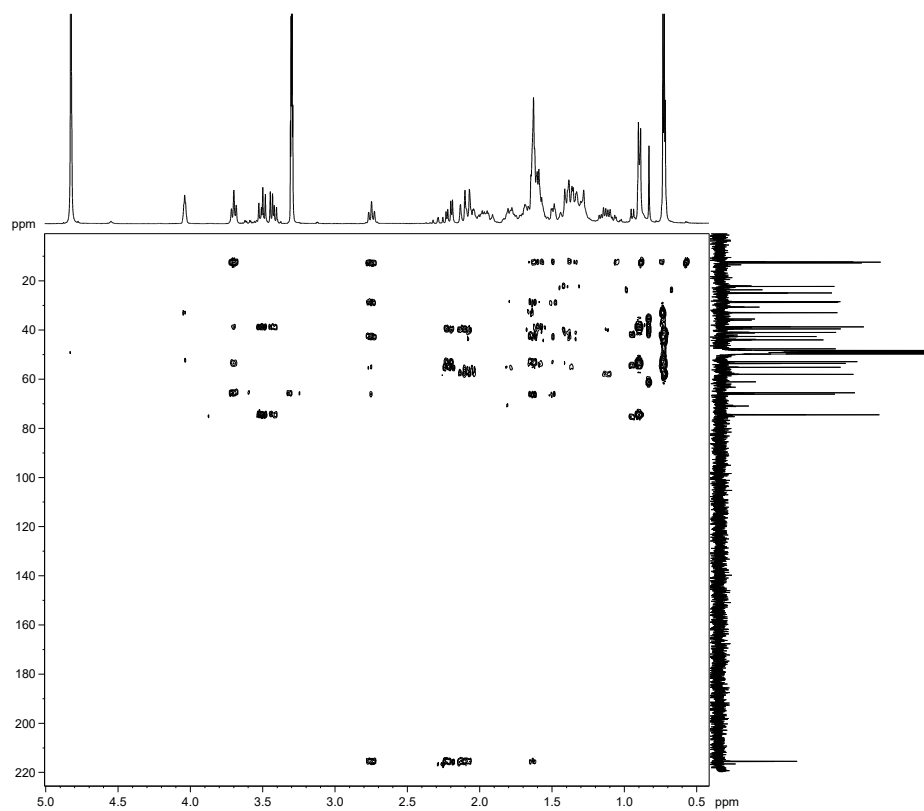
Espectro de ^{13}C -RMN DEPT-135



Espectro de ^1H - ^{13}C 2D HSQC



Espectro de ^1H - ^{13}C 2D HMBC

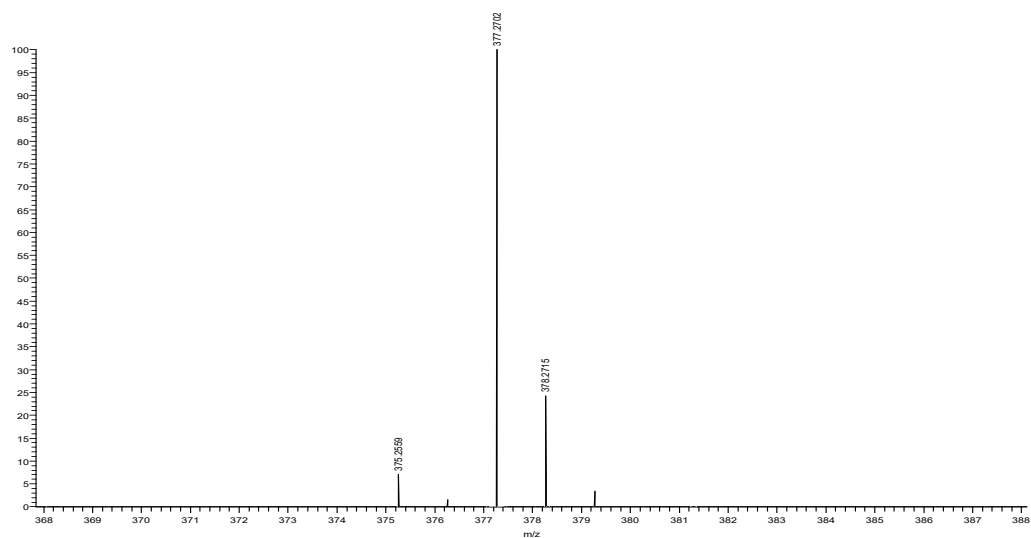


Espectro de HMRS ESI

D:\Tunes\2019\Junio\03.06.19\Triol

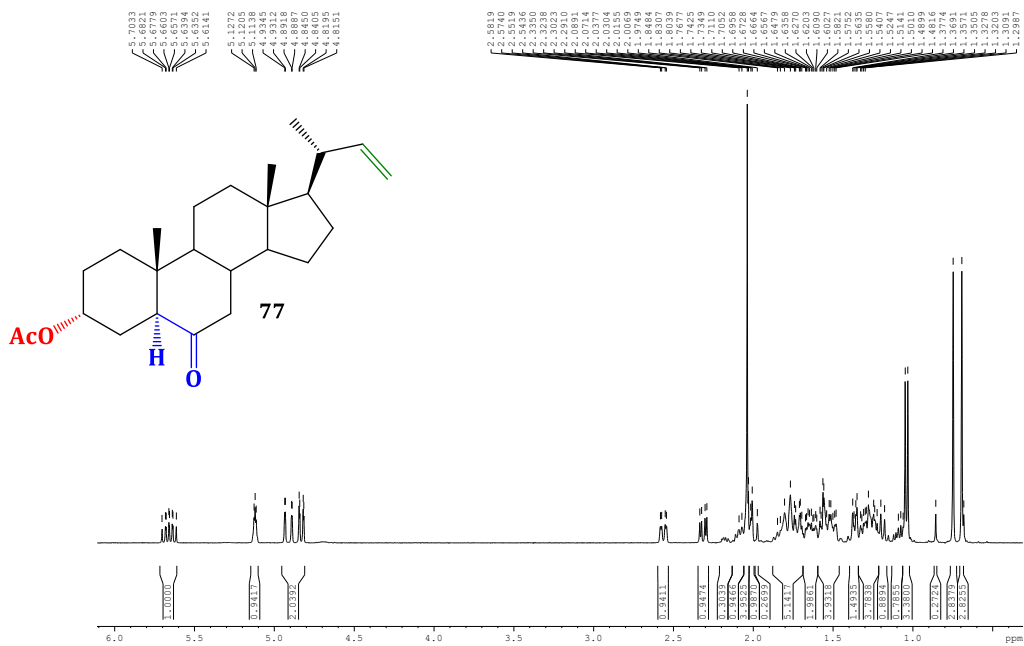
06/03/19 13:00:34

Triol #13 RT: 0.11 AV: 1 NL: 1.17E8
T: FTMS - p ESI Full ms [278.0000-478.0000]

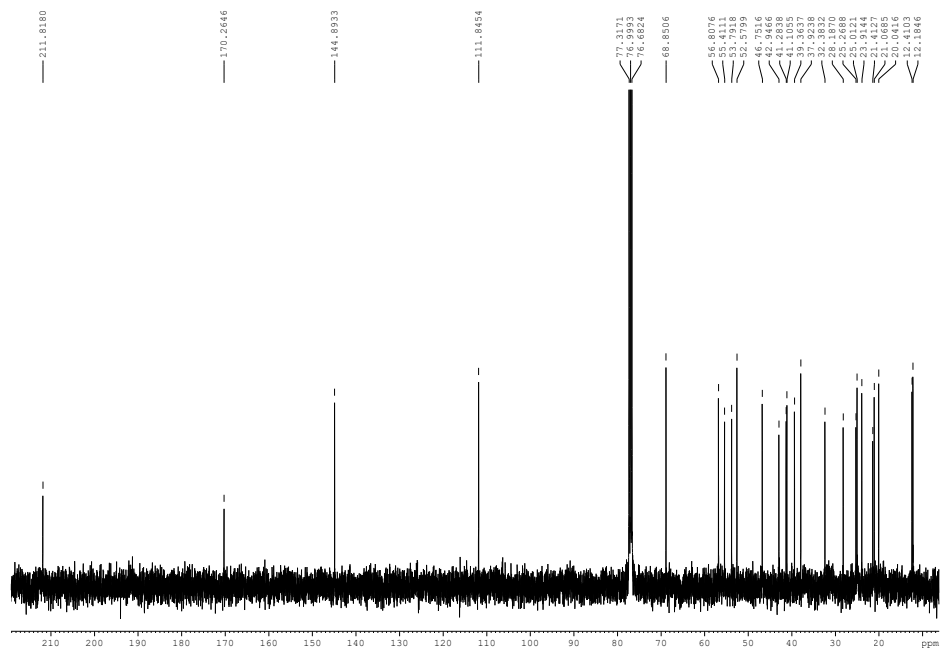


3 α -acetoxi-24-nor-5 α -22-colen-6-ona (77)

Espectro de ¹H-RMN

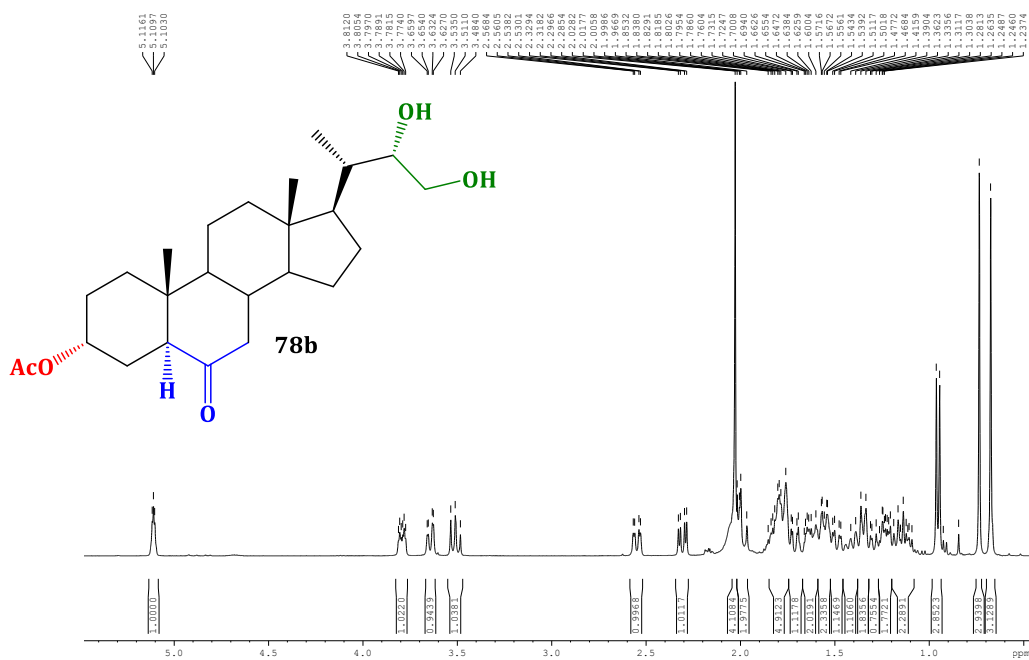


Espectro de ¹³C-RMN

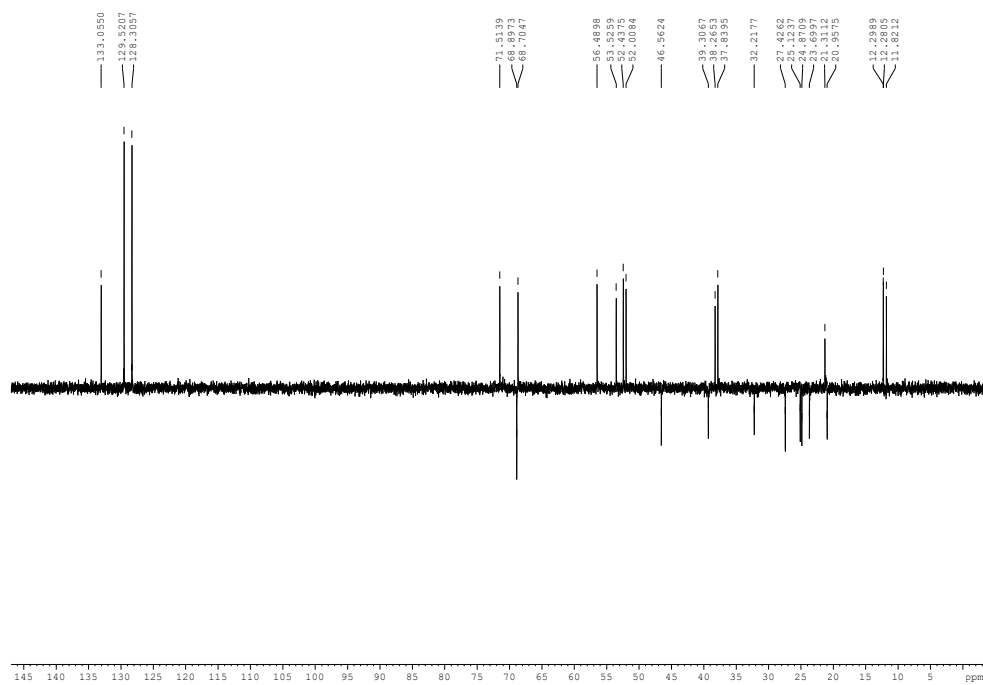


3 α -acetoxi-22(*S*), 23-dihidroxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (**78b**)

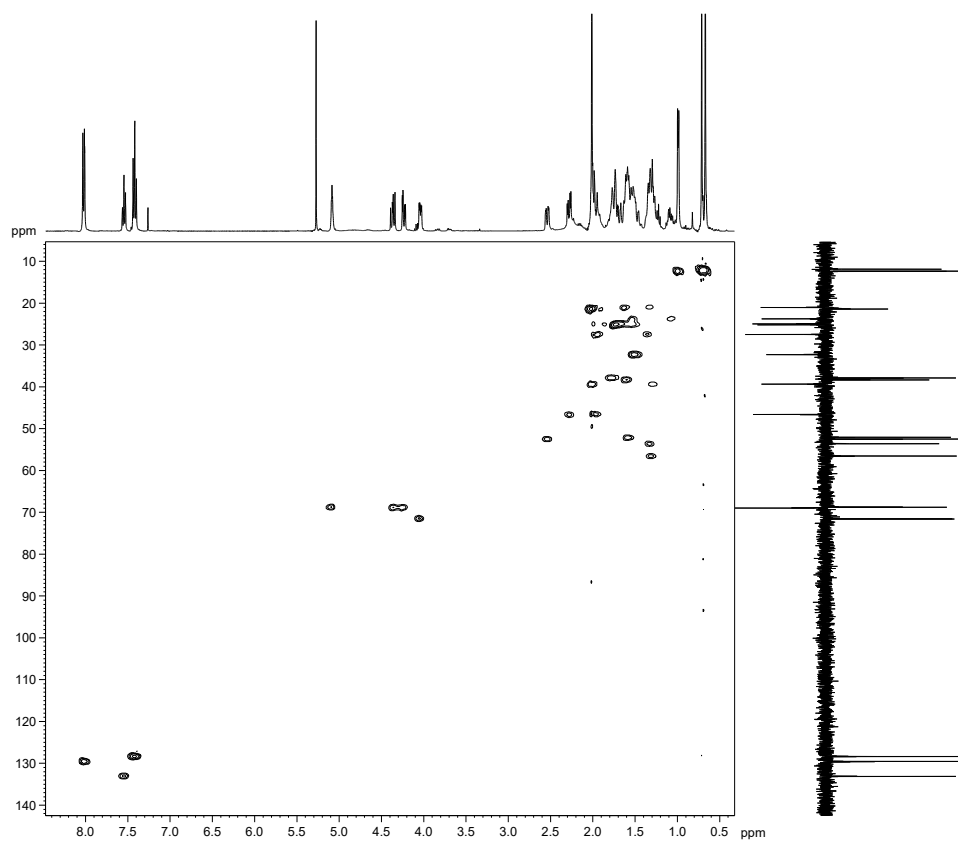
Espectro de ¹H-RMN



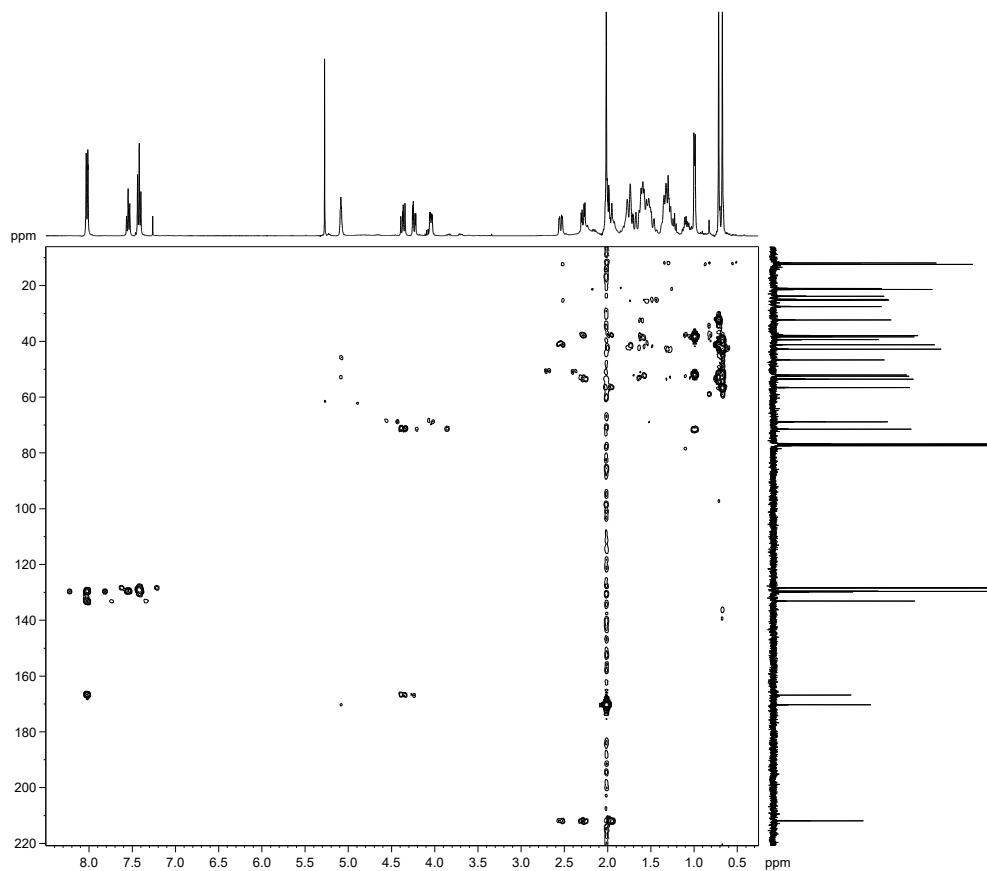
Espectro de ^{13}C -RMN DEPT-135



Espectro de ^1H - ^{13}C 2D HSQC



Espectro de ^1H - ^{13}C 2D HMBC

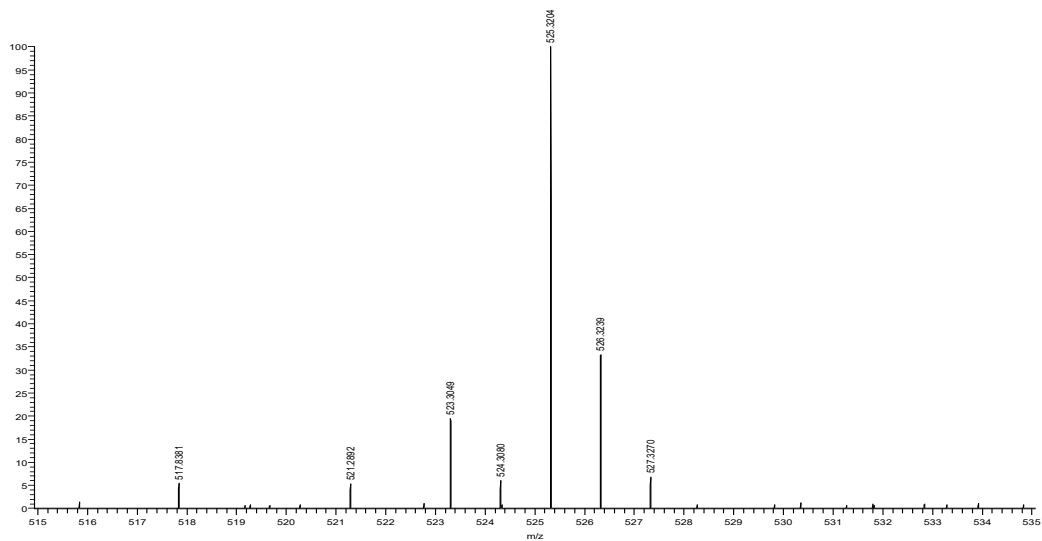


Espectro de HMRS ESI

D:\Tunes\2019\Junio\03.06.19\BenzoladoR

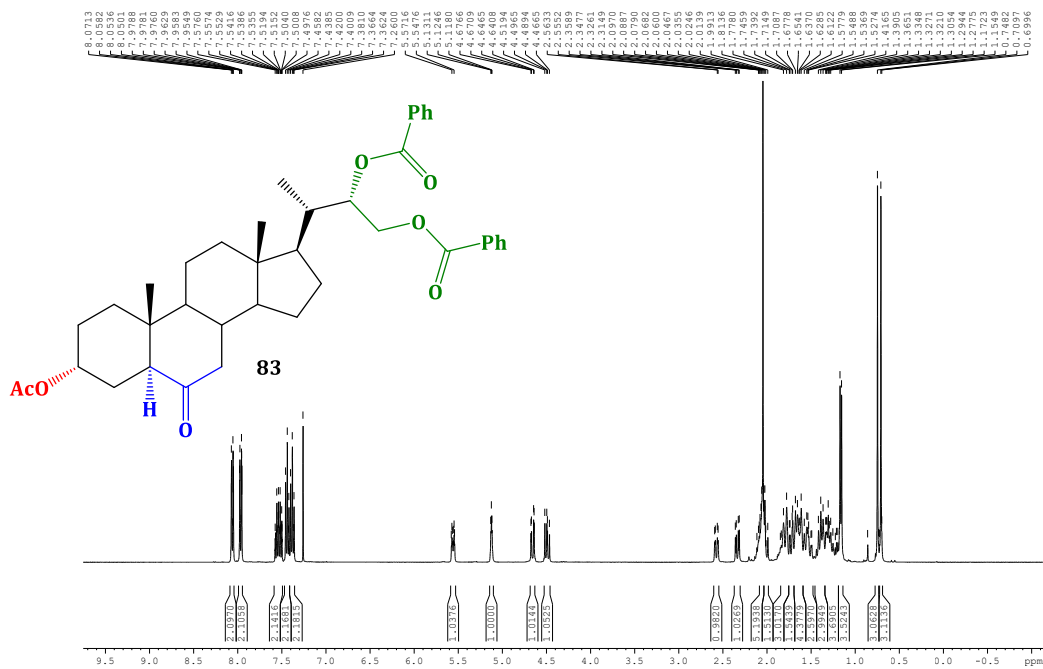
06/03/19 13:07:16

BenzoladoR #6 RT: 0.05 AV: 1 NL: 9.94E6
T: FTMS + p ESI Full ms [424.0000-624.0000]

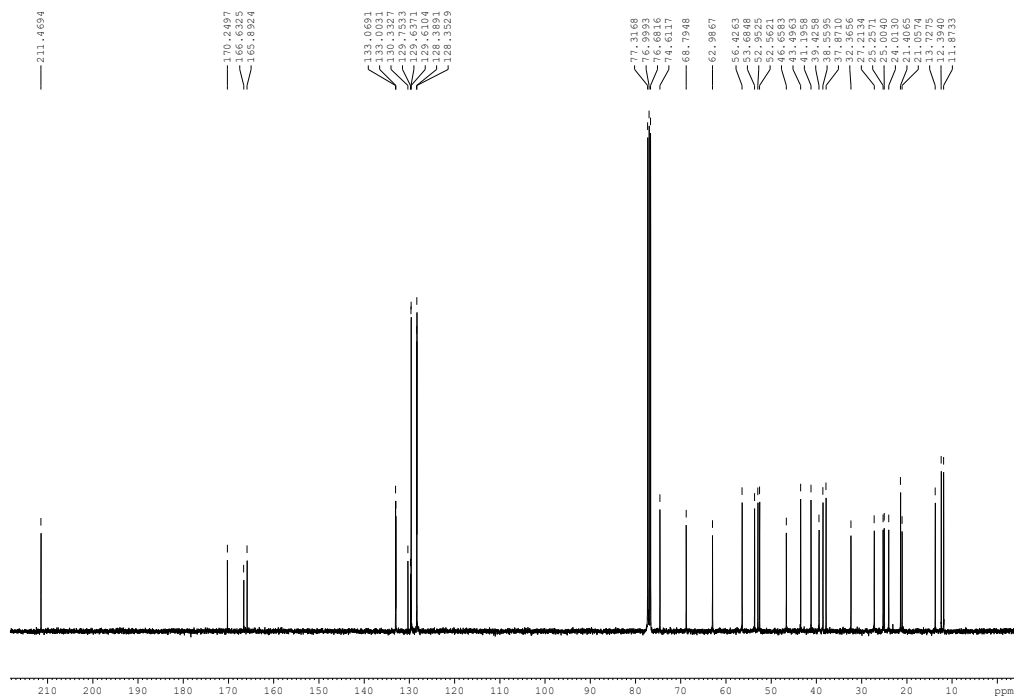


3 α -acetoxi-22(*S*)-23-dibenzoiloxi-24-nor-5 α -colan-6-ona (83)

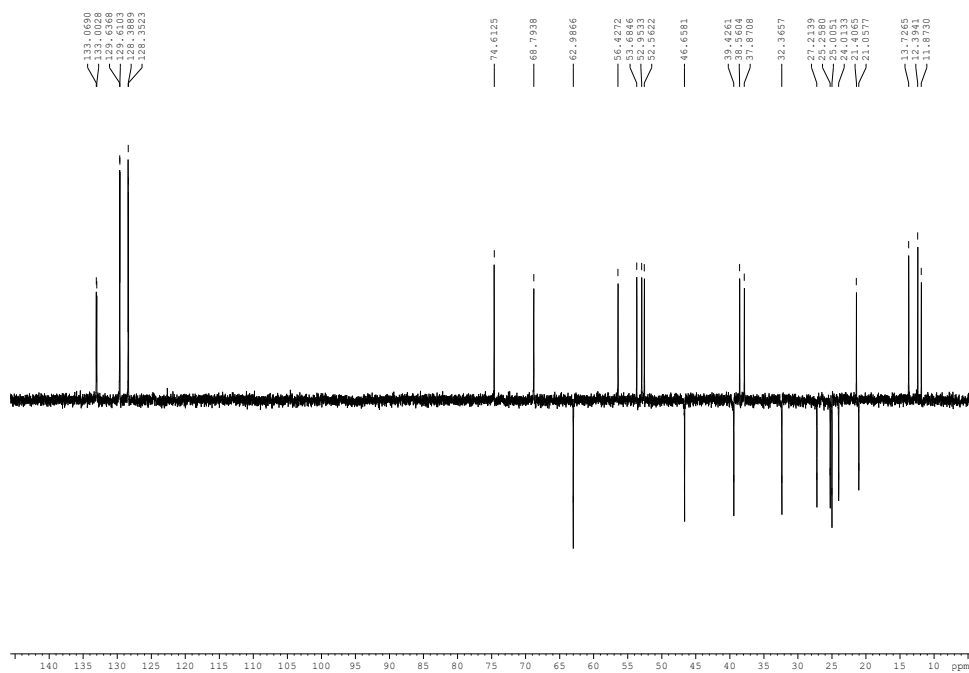
Espectro de ¹H-RMN



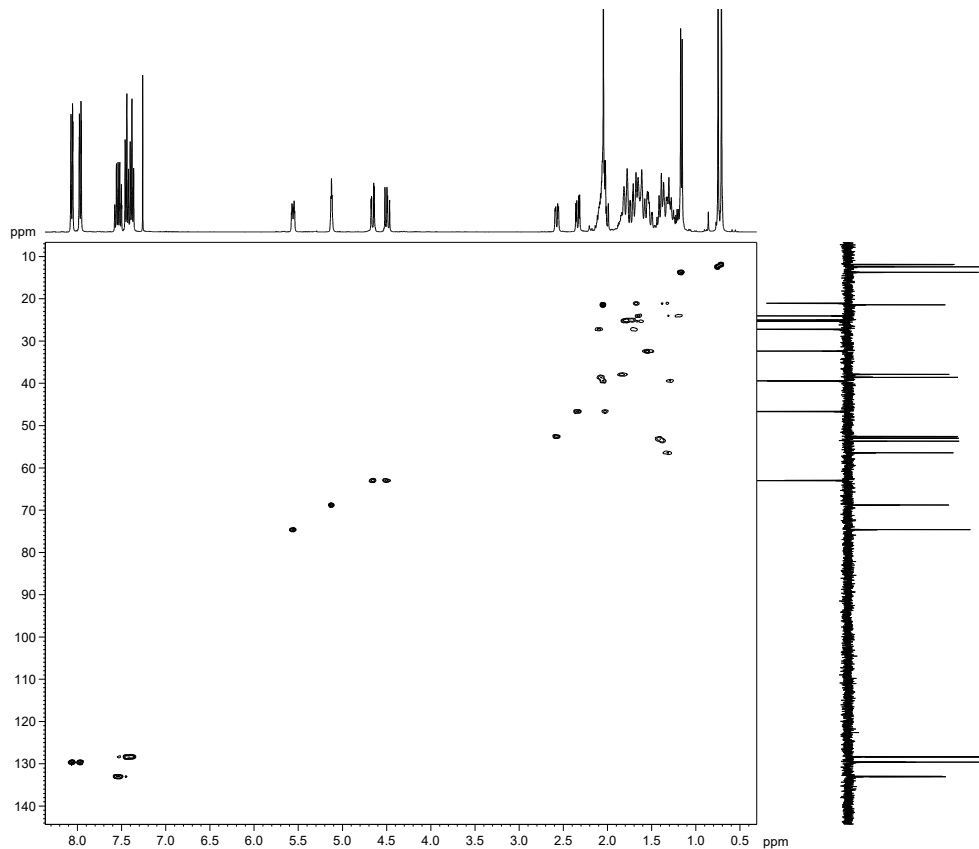
Espectro de ¹³C-RMN



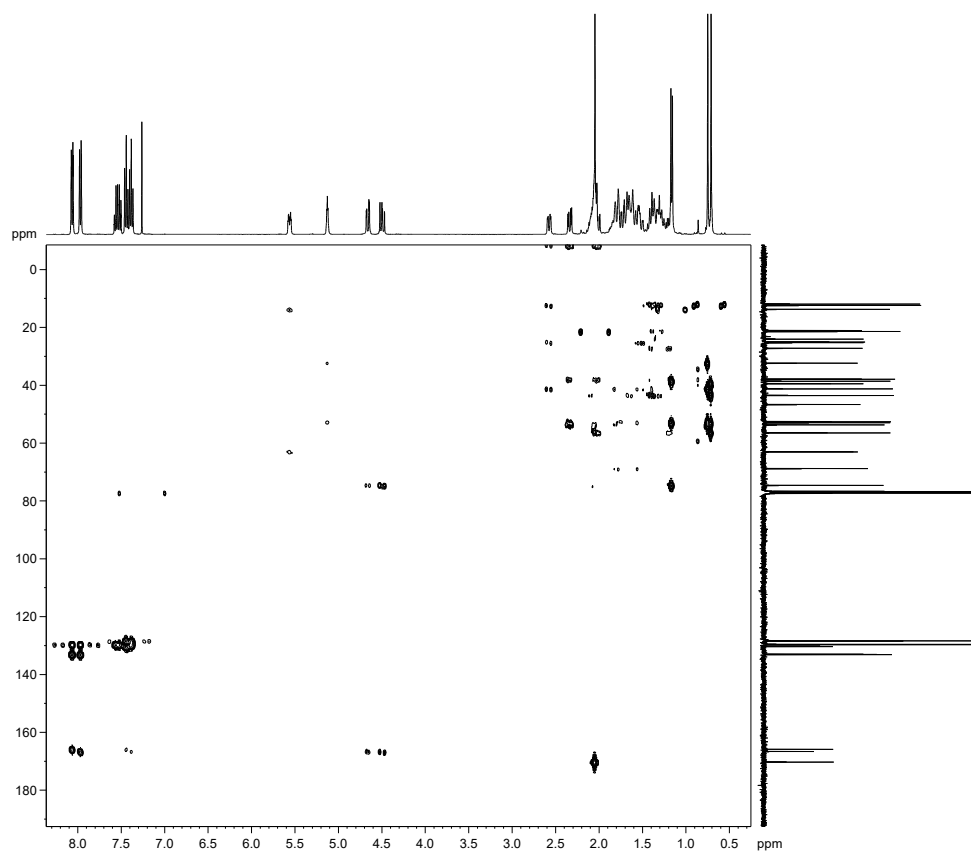
Espectro de ^{13}C -RMN DEPT-135



Espectro de ^1H - ^{13}C 2D HSQC



Espectro de ^1H - ^{13}C 2D HMBC

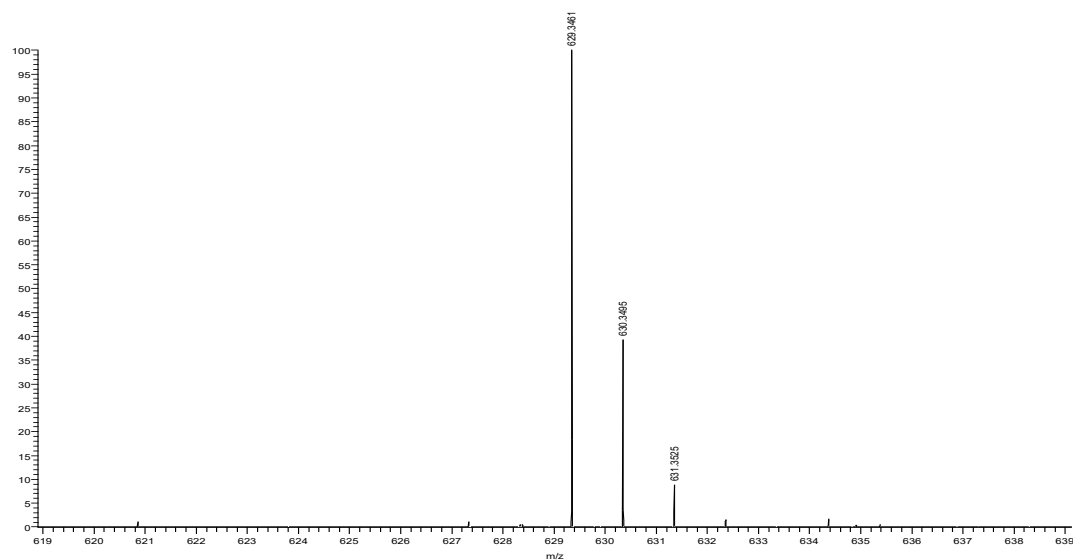


Espectro de HMRS ESI

D:\Tunes\...Junio\03.06.19\Dibenzolado

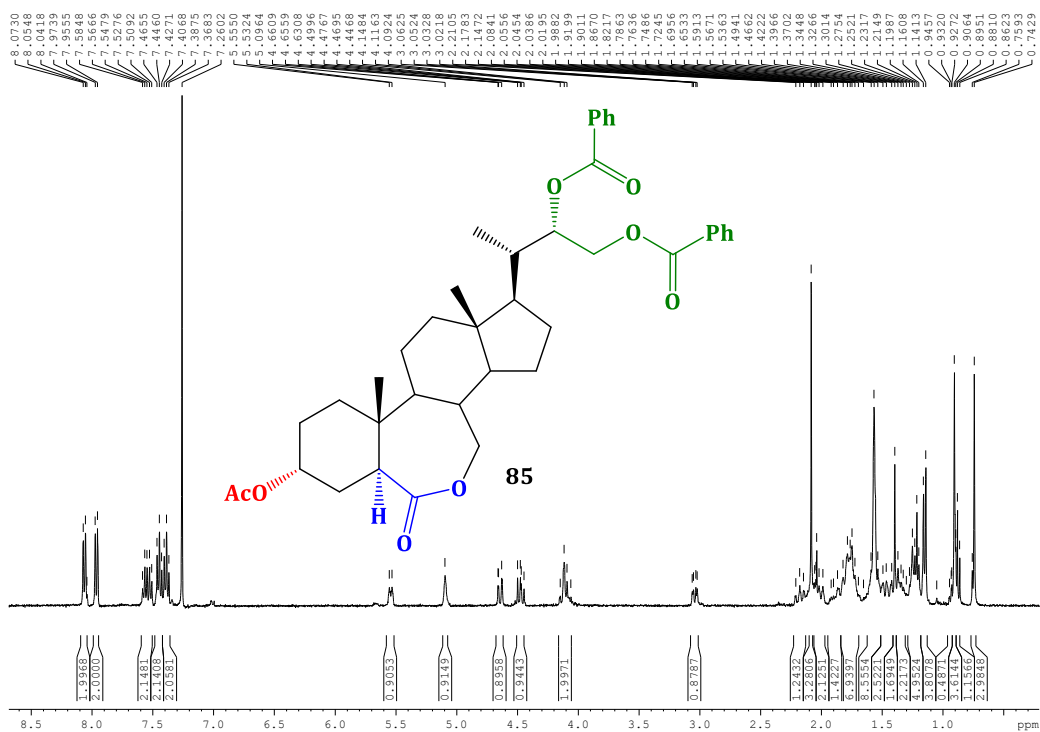
06/03/19 13:17:50

Dibenzolado #15 RT: 0.13 AV: 1 NL: 1.00EG
T: FTMS + p ESI Full.ms [528.0000-728.0000]



3 α -acetoxi-22(*S*)-23-dibenzoiloxi-24-nor-5 α -colan-7-oxolactona (85)

Espectro de ¹H-RMN



3 α -acetoxi-22(*S*)-23-dibenzoiloxi-24-nor-5 α -colan-6-oxolactona (86)

Espectro de ^1H -RMN

